

III Encontro de
Pesquisa e Inovação da
Embrapa Agroenergia

Anais

Alexandre Alonso Alves
Editor técnico



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



III Encontro de
Pesquisa e Inovação da
Embrapa Agroenergia

Anais

Alexandre Alonso Alves
Editor técnico

Embrapa
Brasília, DF
2016

Disponível no endereço eletrônico: <http://www.embrapa.br/agroenergia/publicacoes>

Embrapa Agroenergia

Parque Estação Biológica (PqEB)

Av. W3 Norte (final)

CEP 70770-901 Brasília, DF

Fone: (61) 3448-4246

Fax: (61) 3448-1589

www.embrapa.br

<https://www.embrapa.br/fale-conosco/sac/>

Unidade responsável pelo conteúdo e pela edição

Embrapa Agroenergia

Comitê Técnico-Científico do III EnPI

Presidente

Alexandre Alonso Alves

Membros

Alexandre Nunes Cardoso

André Pereira Leão

César Heraclides Bheling Miranda

Leticia Jungmann Cançado

Lorena Costa Garcia

Clenilson Martins Rodrigues

Patrícia Verardi Abdelnur

Leonardo Fonseca Valadares

Gilmar Souza Santo

1ª edição

Publicação digitalizada (2016)

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

Encontro de Pesquisa e Inovação da Embrapa Agroenergia (3. : 2016 : Brasília, DF).

III Encontro de Pesquisa e Inovação da Embrapa Agroenergia: anais / Alexandre Alonso Alves, editor técnico. – Brasília, DF : Embrapa, 2016.

PDF (257 p.) : il. color.

ISBN 978-85-7035-639-0

1. Agroenergia – pesquisa – inovação. I. Alves, Alexandre Alonso. II. Título.

CDD (22 ed.) - 333.79

© Embrapa 2016

Comitê Local de Publicações

Presidente

Alexandre Alonso Alves

Secretária-executiva

Marcia Mitiko Onoyama Esquiagola

Membros

Bruno Galvêas Laviola

Gislaine Ghiselli

Jose Dilcio Rocha

Maria Iara Pereira Machado

Patrícia Verardi Abdelnur

Rosana Falcão

Sérgio Saraiva Nazareno dos Anjos

Sílvia Belém Gonçalves

Supervisão editorial e revisão de texto

Luciane Chedid Melo Borges

Normalização bibliográfica

Maria Iara Pereira Machado

Projeto gráfico e editoração eletrônica

Maria Goreti Braga dos Santos

Arte da capa

Leandro Lobo

Apresentação

O Encontro de Pesquisa e Inovação (EnPI) foi instituído pela Chefia de Pesquisa e Desenvolvimento da Embrapa Agroenergia no ano de 2014, com a principal motivação de 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 contou com trabalhos que nos surpreenderam pela sua qualidade e pela dedicação dos nossos colaboradores e alguns foram, inclusive, premiados pela sua qualidade. No nosso segundo Encontro de Pesquisa e Inovação, o evento foi incrementado com um Simpósio cujo principal objetivo foi discutir o tema “Produção e uso de enzimas no contexto da Agroenergia” nos eixos político, mercadológico e tecnológico. O Simpósio foi um evento aberto, direcionado a estudantes, pesquisadores e interessados no tema. Como resultado dessa ampla discussão, construímos um documento síntese elencando as prioridades para investimentos em pesquisa e inovação na área de produção de etanol de segunda geração e bioprodutos de valor agregado, derivados de biomassa lignocelulósica.

Nesta terceira edição, o EnPI proporcionou espaços para o debate em PD&I visando à definição de focos de pesquisa para um tema de bastante relevância para a Agroenergia no País: “Bioeconomia, o papel da química verde e dos biomateriais”. Para tanto, estruturamos três mesas-redondas. Na primeira delas, com o tema “Pesquisa e Inovação na Embrapa Agroenergia”, discutimos a visão e ações da Embrapa Agroenergia no tema. Nas outras duas, focamos as discussões nos temas “Estratégias, Assuntos Regulatórios e Oportunidades de Mercado” e “Desafios tecnológicos em química verde e biomateriais”. Além disso, como nas edições anteriores, houve a divulgação dos trabalhos de PD&I da Embrapa Agroenergia por meio de apresentações em formato de pôster e na modalidade oral, além da premiação dos melhores trabalhos de PD&I desenvolvidos nas grandes áreas: 1) Genética e Biotecnologia Microbiana; 2) Genética e Biotecnologia Vegetal; 3) Processos Bioquímicos; 4) Processos Químicos e 5) Química de Biocombustíveis e Biomassa.

Nestes anais, disponibilizamos artigos decorrentes dos trabalhos apresentados no EnPI 2016, com o objetivo de divulgar as soluções que as equipes de Pesquisa e Desenvolvimento da Embrapa Agroenergia estão trazendo para o País e, também, com o intuito de fortalecer as parcerias existentes, além de permitir 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-Geral da Embrapa Agroenergia

O Encontro de Pesquisa e Inovação da Embrapa Agroenergia

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) Debater e avaliar o cenário externo no que diz respeito à química verde, aos biomateriais e ao impacto destes na bioeconomia nos eixos político, mercadológico e tecnológico.
- II) Debater novos focos de PD&I para o tema em questão.
- III) Produzir documento síntese das discussões apontando prioridades para pesquisa na área.
- IV) Divulgar os trabalhos de PD&I desenvolvidos na Embrapa Agroenergia nas áreas de Genética e Biotecnologia Vegetal; Genética e Biotecnologia Microbiana; Processos Bioquímicos; Processos Químicos e Química de Biocombustíveis e Biomassa.
- V) Premiar os melhores talentos nas categorias de graduandos, graduados e doutores.

Formato

Esta terceira edição do Encontro de Pesquisa e Inovação da Embrapa Agroenergia (EnPI 2016) contou 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 2016 foi realizado no período de 8 a 10 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 foi subdividido em dois momentos:

I) Simpósio “Bioeconomia: o papel da química verde e dos biomateriais”, com três mesas-redondas, que abordarão os temas “Pesquisa e Inovação na Embrapa Agroenergia”, “Estratégias, Assuntos Regulatórios e Oportunidades de Mercado” e “Desafios tecnológicos em química verde e biomateriais”.

II) Sessão de divulgação dos trabalhos do III EnPI, que conta com apresentações em formato de pôster e na modalidade oral, além da premiação dos melhores trabalhos de PD&I desenvolvidos nas grandes áreas: 1) Genética e Biotecnologia Microbiana; 2) Genética e Biotecnologia Vegetal; 3) Processos Bioquímicos; 4) Processos Químicos e 5) Química de Biocombustíveis e Biomassa.

Público-alvo

O público-alvo do III Encontro de Pesquisa e Inovação da Embrapa Agroenergia são pesquisadores, professores, estudantes de pós-graduação e graduação envolvidos em pesquisas relacionadas à produção de Agroenergia, em especial nos temas bioeconomia, química, biotecnologia, nanotecnologia e áreas correlatas. No Distrito Federal, portanto, esse público engloba profissionais e estudantes vinculados às unidades de pesquisa da Embrapa (Embrapa Agroenergia, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Embrapa Hortaliças, Embrapa Cerrados, Embrapa Quarentena Vegetal, Embrapa Sede) e universidades como a Universidade de Brasília, Universidade Católica de Brasília e outras com as quais a Embrapa mantém parcerias formalizadas. Os setores públicos, agentes reguladores e agentes de fomento estão igualmente contemplados no público-alvo, uma vez que objetiva-se que as discussões e documentos produzidos durante o encontro possam servir como norteadores para a formulação de ações governamentais nos âmbitos distrital e federal.

Sumário

Genética e Biotecnologia Microbiana

Graduandos

Seleção de linhagens industriais de *Saccharomyces cerevisiae* para produção de ácidos orgânicos, 14

Luana Assis Serra, Thályta Fraga Pacheco, Flávia C. de Paula e Silva, João Ricardo Moreira de Almeida

Construção de novas linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* capazes de utilizar xilose para a produção de bioetanol, 21

Victor M. Honorato, Bárbara Gomes Paes, João Ricardo Moreira de Almeida

Graduados

Expressão heteróloga de monoxigenases de polissacarídeos bacterianas em *Pichia pastoris*, 27

Fernanda Pinheiro dos Santos, Kelly Barreto Rodrigues, Márcio Waluce Pinheiro Rocha de Santana, Thaís Fabiana Chan Salum, Léia Cecília de Lima Fávoro, Bruno dos Santos Alves Figueiredo Brasil

Clonagem e expressão de genes de monoxigenases de polissacarídeos líticas (LPMOs) de fungos em *Pichia pastoris*, 36

Márcio Waluce Pinheiro Rocha de Santana, Kelly Barreto Rodrigues, Fernanda Pinheiro dos Santos, Thaís Demarchi Mendes, Mônica Caraméz Triches Damaso, Léia Cecília de Lima Fávoro, Félix Gonçalves de Siqueira

Doutores

Genomic and mitochondrial assembly of xylose-fermenting yeasts from Debaryomycetaceae family, 48

Andrei Stecca Steindorff, Marcelo Soares Souza, João Ricardo Moreira de Almeida, Eduardo Fernandes Formighieri

Genética e Biotecnologia Vegetal

Graduados

Seleção de famílias e genitores de *Jatropha curcas* L. para produção de grãos via modelos mistos, 56

Erina Vitório Rodrigues, Bruno Galveas Laviola, Rosana Falcão, Paulo Eduardo Teodoro, Júlio César Marana, Alexandre Alonso Alves

Highly efficient pipeline to perform integrated analysis of transposable elements and tandem repeats in complex genomes, 63

Lucas Soares de Brito, Jaire Alves Ferreira Filho, Marcelo Soares Souza, Eduardo Fernandes Formighieri

Bioenergy Metabolomics DB, 70

Marcelo Soares Souza, Vanessa de A. Soares, Lucas Soares de Brito, Patrícia Verardi Abdelnur, Eduardo Fernandes Formighieri

Doutores

Specific Quality Control is essential for Next-Generation Sequencing data usage: case studies in Illumina data from algae, yeasts and plants, 77

Brenda Neves Porto, Andrei Stecca Steindorff, Lucas Soares de Brito, Eduardo Fernandes Formighieri

Processos Bioquímicos

Graduandos

Avaliação de fungos filamentosos isolados a partir de solo contendo glicerina para produção de compostos químicos por bioconversão, 87

Rebeca Baiocchi Vianna, Karen Santos de Lima, Carolina Madalozzo Poletto, Thaís Demarchi Mendes, Augusto Lopes Souto, José Antônio de Aquino Ribeiro, Patrícia Pinto Kalil Goncalves Costa, Flávia Soares Vieira, Jamille Ribeiro Coelho de Lima, Patrícia Verardi Abdelnur, Clenilson Martins Rodrigues, Mônica Carames Triches Damaso

Graduados

Efeito da morfologia celular e fase de crescimento algal na eficiência da criopreservação de microalgas, 95

Maiara Sousa Fernandes, Priscila Borges Morais, Rodrigo Carvalho do Nascimento, Lorena Costa Garcia, Guy de Capdeville, Bruno dos Santos Alves Figueiredo Brasil

Avaliação do cultivo de microalgas em fotobiorreatores de placas planas para a produção de biomassa e biorremediação de efluente da agroindústria de óleo de palma, 102

Rodrigo Carvalho do Nascimento, Maiara Sousa Fernandes, Hugo Santana, Carolina Cereijo, Lorena Costa Garcia, Félix Gonçalves Siqueira, Bruno dos Santos Alves Figueiredo Brasil

Otimização da produção de lipases de *Aspergillus* sp. BDA-FI 7 por fermentação em estado sólido para a síntese de biodiesel, 110

Pedro Alves Martins, Débora Lo Sciuto, Léia Cecília de Lima Fávaro, Thályta Fraga Pacheco, Thaís Fabiana Chan Salum

Fungo filamentososo CANA175: produção e caracterização bioquímica de enzimas lipolíticas, 116

Débora Lo Sciuto, Pedro Alves Martins, Thaís Demarchi Mendes, Thaís Fabiana Chan Salum, Félix Gonçalves de Siqueira, Dasciana de Sousa Rodrigues

Caracterização da composição química da biomassa da microalga *Nannochloropsis oculata* cultivada em tanque aberto tipo raceway, 123

Dagon Manoel Ribeiro, Pedro L. D. S. Junior, Valérya Carneiro Teles, Itânia Pinheiro Soares, Lorena Costa Garcia, Paulo C. V. Abreu, Bruno dos Santos Alves Figueiredo Brasil

Lignocelulases de basidiomicetos cultivados em biomassas vegetais residuais da agroindústria do dendê, 130

Ruben Romero Peláez, Carla M. Camelini, Arailde Fontes Urban, Cristiane Vieira Helm, Thaís Demarchi Mendes, Simone Mendonça, Félix Gonçalves de Siqueira

Avaliação preliminar da microbiota nativa do Pome (*palm oil mill effluent*) para a produção de biogás, 138

Priscilla Araújo Victor, Sílvia Belém Gonçalves, Fabrício Machado Silva, Rossano Gambetta

Doutores

Seleção de fungos filamentosos capazes de crescer em diferentes glicerinas como única fonte de carbono, 145

Andréia Aparecida Jacomassi Carneiro, Gleiciane P. Sousa, Diogo Keiji Nakai, Thályta Fraga Pacheco, Léia Cecília de Lima Fávaro, Simone Mendonça, Itânia Pinheiro Soares, Mônica Caraméz Triches Damaso

Obtenção de compostos químicos de valor agregado pela bioconversão de glicerina bruta por bactéria, 152

Carlos Oliveira de Jesus, Jamille Ribeiro Coelho de Lima, Mônica Caraméz Triches Damaso, Thaís Fabiana Chan Salum, Thályta Fraga Pacheco, Sílvia Belém Gonçalves

Processos Químicos

Graduandos

Reforma a vapor de biogás usando catalisadores de óxidos mistos Ni-Mg-Al obtidos a partir de hidrotalcitas, 161

Itânia Pinheiro Soares, Felipe Heimer Correia, Isabela C. Curado, Emerson Leo Schultz

Compósitos de borracha natural e endocarpo de macaúba: efeito sobre a coloração e propriedades mecânicas, 167

Eduardo Jonathan Ramos e Silva Sampaio, Alexandre Nunes Cardoso, Leonardo Fonseca Valadares

Graduados

Isolamento e caracterização de nanofibras de celulose de engaços de dendê obtidas por hidrólise enzimática, 174

Eliane da Silva Simplicio, Dasciana de Sousa Rodrigues, Fabrício Machado Silva, Leonardo Fonseca Valadares

Otimização da polimerização do glicerol: avaliação da reologia, 182

Débora Rodrigues Serra, Fabrício Machado Silva, Larissa Andreani Carvalho, Leonardo Fonseca Valadares

Caracterização química e gaseificação em leito fluidizado borbulhante de bagaço de cana e engaço de dendê, 190

Amanda Assunção Rosa, Albert Reis dos Anjos, Anna Letícia Montenegro Turtelli Pighinelli, Rafael Benjamin Werneburg Evaristo, Fabricio Machado, Rossano Gambetta

Química de Biocombustíveis e Biomassa

Graduandos

Avaliação da estabilidade oxidativa do B100 com o uso de aditivos comerciais e extrativos, 196

Nayara Neiva Moura, Rodrigo Bastos Cesarino Dutra, Itânia Pinheiro Soares

Desenvolvimento de um processo verde de separação por estireno-divinilbenzeno para eliminar inibidores de fermentação do licor de pré-tratamento ácido, 203

Layanne Souza Guirra, Raquel Bombarda Campanha, Sílvio Vaz Júnior, Clenilson Martins Rodrigues

Análise da composição química de cinco variedades de capim-elefante por métodos diferentes, 208

Carolina Assunção Lucas da Silva, Raquel Bombarda Campanha, Juarez Campolina Machado, Patrícia Abrão Oliveira

Caracterização química e física de resíduos industriais de dendê tenera e híbrido manicoré, 214

Larissa Silva Fonseca, Raquel Bombarda Campanha, Marcos Enê Chaves Oliveira, Simone Mendonça

Avaliação da eficiência de obtenção de extratos e de metabólitos polares de *Crambe abyssinica* com o uso de solventes quimicamente limpos, 222

Rodrigo Wesley Nascimento de Melo, Mauro Vicentini Correia, Patrícia Pinto Kalil Gonçalves Costa, Clenilson Martins Rodrigues

Graduados

Variação dos parâmetros associados ao rendimento e qualidade de óleo no período pós-colheita do dendê híbrido, 229

Marina Borges Guimarães, Brenda Lee Simas Porto, José Antônio de Aquino Ribeiro, Paula Andrea Osorio Carmona, Raimundo Nonato Vieira da Cunha, Simone Mendonça

Impressão digital metabólica de folhas de *Elaeis guineensis* em diferentes condições de preparo de amostra utilizando UHPLC-MS, 237

Jorge Candido Rodrigues Neto, Luiz Henrique Galli Vargas, José Antônio de Aquino Ribeiro, Maria Esther Ricci da Silva, Manoel Teixeira Souza Júnior, Clenilson Martins Rodrigues, Anselmo Elcana de Oliveira, Patrícia Verardi Abdelnur

Produção de gás combustível por meio de processo de gaseificação de *Eucalyptus grandis* em reator de leito fluidizado, 246

Albert Reis dos Anjos, Amanda Assunção Rosa, Diogo Keiji Nakai, Emerson Leo Schultz, Anna Letícia Montenegro Turtelli Pighinelli, Fabrício Machado, Rossano Gambetta

Development and optimization of a HILIC-UPLC-ELSD method for simultaneous determination of eleven polyols from glycerin bioconversion processes, 254

Pedro Ribeiro Fontes, Patrícia Pinto Kalil Gonçalves Costa, Kaian Amorim Teles, Carolina Madalozzo Poletto, Mônica Carames Triches Damaso, Clenilson Martins Rodrigues

Estabilidade do óleo de polpa de macaúba bruto e refinado armazenado em diferentes condições, 261

Rodrigo da Silveira Nascimento Siqueira, Gabriela A. B. Brito, Aline F. de Carvalho, Simone Mendonça, Simone Palma Fávaro, Lorena Costa García

Desenvolvimento e aplicação de um método RP-UPLC-PDA para a análise simultânea de dez ácidos orgânicos derivados da bioconversão de glicerina, 268

Flávia Soares Vieira, Augusto Lopes Souto, Patrícia Pinto Kalil Gonçalves Costa, Fernanda Justen, Talita Gabriela Salles Ramos, Karen Santos de Lima, João Ricardo Moreira de Almeida, Mônica Caraméz Triches Damaso, Clenilson Martins Rodrigues

Doutores

Estudo da vida útil das fibras da prensagem de dendê híbrido, 275

Paula Andrea Osorio Carmona, Marina Borges Guimarães, Raquel Bombarda Campanha, Lorena Costa García, Marcos Enê Chaves Oliveira, Félix Gonçalves de Siqueira, Simone Mendonça

Estudo da atividade enzimática de lipases presentes no mesocarpo de dendê (*Elaeis guineensis*), 283


Jéssica Kele Arruda Macêdo, Dasciana de Sousa Rodrigues, Thályta Fraga Pacheco, Thaís Demarchi Mendes, Cibele Favoreto, Félix Gonçalves de Siqueira, Patrícia Verardi Abdelnur

Ferramentas metabolômicas aplicadas na identificação de marcadores químicos relacionados ao amarelecimento fatal em folhas de *Elaeis guineensis*, 290

Mauro Vicentini Correia, Augusto Lopes Souto, José Antônio de Aquino Ribeiro, Patrícia Verardi Abdelnur, Clenilson Martins Rodrigues

Prospecção de compostos químicos de valor agregado em amostras de glicerina de palma e de soja biotransformadas por microrganismos, 297

Augusto Lopes Souto, Andréia Aparecida Jacomassi Carneiro, Rodrigo Wesley Nascimento de Melo, José Antônio de Aquino Ribeiro, Patrícia Pinto Kalil Gonçalves Costa, Thaís Fabiana Chan Salum, Thaís Demarchi Mendes, Léia Cecília de Lima Fávaro, Mônica Caraméz Triches Damaso, Patrícia Verardi Abdelnur, Clenilson Martins Rodrigues



**Genética e
Biotecnologia
Microbiana**

Seleção de linhagens industriais de *Saccharomyces cerevisiae* para produção de ácidos orgânicos

Luana Assis Serra¹, Thályta Fraga Pacheco², Flávia C. de Paula e Silva³, João Ricardo Moreira de Almeida⁴

Resumo

Linhagens da levedura *Saccharomyces cerevisiae* capazes de produzir etanol e outros compostos químicos de interesse a partir dos açúcares presentes na biomassa da cana-de-açúcar têm sido obtidas por meio de engenharia metabólica. O presente trabalho teve por objetivo selecionar linhagens capazes de produzir ácidos orgânicos a partir de fontes renováveis (bagaço da cana, por exemplo). Os ácidos orgânicos possuem ampla aplicação, podendo ser utilizados na indústria de alimentos, química, farmacêutica e como químico bloco construtor. Entretanto, sua produção por microrganismos pode ser limitada por seus efeitos inibitórios. Com isso, as linhagens industriais de *S. cerevisiae* CAT1, JP1, PEDRA2, BLUE, RED, SA1, A21, A33 e BG1 foram avaliadas com relação à capacidade de tolerar a presença de ácido acético, visando selecionar a linhagem mais robusta para posterior engenharia metabólica.

Introdução

O conceito de biorrefinarias é baseado na integração de processos de conversão de biomassa para a produção de combustíveis, energia e produtos químicos. Nesse sentido, a utilização da biomassa para produção de etanol e outros compostos químicos de interesse biotecnológico tem sido amplamente avaliada e, dessa forma, tem sido apontada como meio de viabilizar economicamente a cadeia produtiva de biocombustíveis, valorar resíduos e coprodutos e reduzir a eliminação de resíduos industriais (ALMEIDA; PAES, 2014).

Nesse contexto, microrganismos são essenciais para o funcionamento de biorrefinarias, já que são responsáveis por diferentes processos de conversão de

¹ Graduanda em Biologia, Universidade de Brasília, luaserra@globo.com

² Engenheira química, mestre em Engenharia Química, analista da Embrapa Agroenergia, thalyta.pacheco@embrapa.br

³ Bióloga, doutora em Microbiologia Aplicada, Universidade Federal de Minas Gerais, flavia_cristina.silva@colaborador.embrapa.br.

⁴ Biólogo, doutor em Microbiologia Aplicada, pesquisador da Embrapa Agroenergia, joao.almeida@embrapa.br

biomassa e produção de moléculas de interesse. Várias linhagens microbianas capazes de produzir etanol e outros compostos químicos a partir dos açúcares presentes na biomassa lignocelulósica têm sido obtidas por engenharia metabólica. A levedura *Saccharomyces cerevisiae* é um exemplo de microrganismo utilizado em biorrefinarias, capaz de fermentar grande parte dos açúcares presentes, sendo bastante importante na produção de etanol. Além disso, essa levedura vem sendo modificada geneticamente para produção de vários compostos químicos de interesse industrial.

As condições de crescimento das leveduras nas destilarias são bastante diversas das condições em ambientes laboratoriais. O substrato por si só contém alguns compostos em níveis bastante tóxicos (como potássio, alumínio, etc.), assim como altas concentrações de açúcares, variações de temperatura e baixo pH. (DELLA-BIANCA; GOMBERT, 2013). Todas essas condições podem agir como fatores de estresse para as linhagens de *S. cerevisiae* utilizadas na produção industrial de etanol em indústrias mundiais e brasileiras.

Durante o processo usual de produção de etanol, as leveduras são comumente lavadas com ácido sulfúrico, o que pode abaixar o pH até 1,8 (BASSO et al., 2011). Geralmente, linhagens industriais são mais tolerantes a condições desfavoráveis do que linhagens laboratoriais. Nesse âmbito, o presente trabalho teve por objetivo selecionar linhagens industriais da levedura *S. cerevisiae* tolerantes a altas concentrações de ácido acético, visando posterior produção de ácidos orgânicos. Estes podem ser produzidos a partir de açúcares e possuem ampla aplicação, podendo ser utilizado na indústria de alimentos, química, farmacêutica e como químico bloco construtor. Como a produção de ácidos é favorecida a baixo pH, a utilização de linhagens industriais de *S. cerevisiae* pode ser vantajosa para a otimização do processo de produção (TOIVARI et al., 2013).

Neste trabalho, foram utilizadas as linhagens industriais de *S. cerevisiae* CAT1, JP1, PEDRA2, BLUE, RED, SA1, A21, A33 e BG1 crescidas na presença de diferentes concentrações de ácido acético. Crescimento, viabilidade e vitalidade celular, consumo de açúcar e produção de etanol foram acompanhados durante 72 horas. As linhagens foram selecionadas baseando-se em dois fatores importantes para a produção de ácidos: resistência a alta concentração de ácidos e pH do meio de cultivo.

Materiais e métodos

Curva de crescimento de leveduras em presença de ácido acético

Para avaliação da curva de crescimento das linhagens de leveduras em presença de ácido acético em diferentes concentrações, foram utilizadas placas de 96 poços. As linhagens CAT1, JP1, PEDRA2, BLUE, RED, SA1, A21, A33 e BG1 foram dispostas em microplacas contendo em cada poço 200 µL de meio YPD e tampão kftalato durante 24 horas. Posteriormente, as leveduras foram transferidas para as novas placas contendo 200 µL de meio YPD e tampão kftalato suplementado com ácido acético nas concentrações de 0 g/L, 2 g/L, 4 g/L e 6 g/L. Seguiu-se a incubação em estufa bacteriológica a 28 °C e foram realizadas leituras de absorbância em espectrofotômetro a 600 nm durante 72 horas.

Avaliação de viabilidade, vitalidade, biomassa e produção de metabólito celular das leveduras em presença de diferentes concentrações de ácido acético

Inicialmente, foram realizados os pré-inóculos nos quais as leveduras foram individualmente crescidas em placas de Petri contendo meio YPD ágar. Após detecção de crescimento, algumas colônias foram transferidas para frascos também individuais de YPD líquido duas vezes concentrado, no volume de 5 mL contidos em frascos do tipo Falcon com capacidade de 50 mL. Posteriormente, as leveduras foram incubadas em shaker durante 2 horas com rotação de 200 rpm e temperatura de 28 °C. Em seguida, as leveduras foram novamente transferidas para frascos do tipo Erlenmeyer aletados com capacidade de 500 mL contendo 100 mL de meio YPD líquido na concentração de uma vez. Feito isso, as leveduras foram novamente incubadas nas mesmas condições acima descritas, *overnight*.

Para a avaliação das leveduras em meio suplementado com ácido acético a pH 3 ou 5, foram adicionados 20 mL de YPD suplementado com 10 g/L (1,9 mL) de ácido acético em Erlenmeyer aletados de 200 mL de volume. O pH do meio foi ajustado com ácido clorídrico (HCl) ou hidróxido de sódio (NaOH) para atingir os valores de pH 3 e pH 5, respectivamente. O experimento foi iniciado com uma densidade celular inicial de 5 g/L de células preparadas a partir do pré-inóculo. A cada 24 horas do início do experimento, alíquotas do meio de crescimento de cada linhagem de levedura foram retiradas para realização dos testes de viabilidade e vitalidade celular por meio de contagem de células (câmara de

Neubauer e contagem de unidade formadora de colônia), leitura de biomassa celular por meio de absorvância (OD 600nm) e análise de metabólitos por meio de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC).

Para verificar a viabilidade das células, foram feitas diluições decimais em solução salina 0,85% das alíquotas do meio de crescimento retiradas a cada 24 horas. As amostras nas diluições de 10^{-3} , 10^{-4} e 10^{-5} foram plaqueadas em meio YPD ágar com auxílio de pérolas e, após 48 horas de incubação a 28 °C em estufa bacteriológica, foram realizadas as contagens das unidades formadoras de colônias (UFC).

Para verificar a vitalidade das células, foram feitas contagens em Câmara de Neubauer com auxílio de microscópio óptico. As células foram marcadas com o corante celular eritrosina, e as leveduras marcadas de rosa representaram as células mortas. O percentual de vitalidade foi calculado da seguinte forma: número de células vivas divididas pelo total de células contadas (vivas e mortas).

Todos os experimentos foram realizados em duplicatas técnicas.

Resultados e discussão

Para o primeiro experimento, por meio das leituras em espectrofotômetro, foi possível delinear curvas de crescimento para as linhagens. Sem a presença do inibidor, todas as leveduras apresentam fase de crescimento exponencial nas primeiras 24 horas. Na presença do ácido acético com concentração de 2 g/L e 4 g/L, as linhagens de leveduras também apresentaram crescimento, porém menor quando comparadas ao crescimento sem inibidor. Na concentração de 6 g/L, todas as linhagens foram afetadas pela alta concentração de ácido acético.

Conforme esperado, a ação inibitória do ácido acético foi maior quando este se encontrava em concentrações mais altas. As linhagens permaneceram em uma faixa de crescimento homogêneo entre si, sem um padrão de desempenho que pudesse mostrar se uma linhagem é melhor que a outra. É possível também que o ácido acético em 6 g/L adie a fase log de crescimento das leveduras (figura 1).

Para o experimento realizado em frascos sob agitação, os resultados relativos a absorvância (OD600), vitalidade (% de células vivas) e viabilidade (UFC) apresentaram valores maiores em pH 5 do que em pH 3, principalmente para a vitalidade (dados não mostrados). Os resultados obtidos, considerando a duplicata de cada análise para as 9 linhagens, foram analisados estatisticamente por análise de variância e teste de Tukey de comparação de médias ($p < 0,05$).

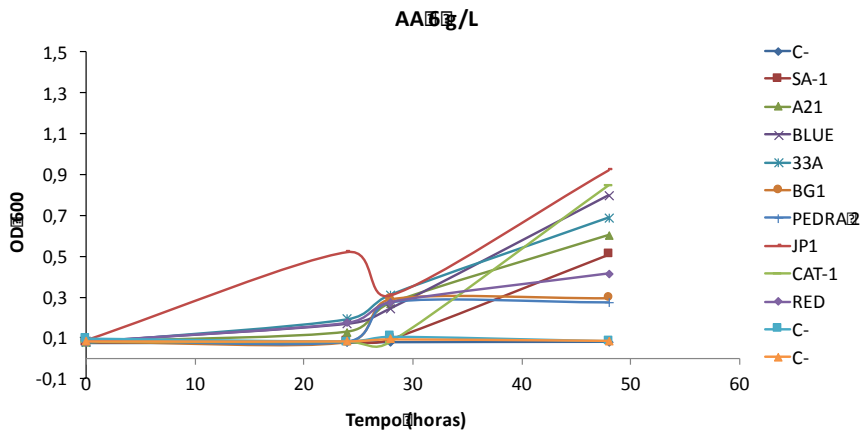


Figura 1. Curva de crescimento das linhagens na concentração de 6 g/L de ácido acético.

Para cada variável analisada (variação da OD, da viabilidade e vitalidade, glicose e ácido acético consumidos e etanol formado) foi possível ranquear as leveduras e estabelecer quais delas apresentam melhor desempenho na presença de ácido acético em pH 3 e pH 5. Os dados foram normalizados e, considerando o somatório de todas as variáveis (atribuindo-se o mesmo peso para todas as variáveis), para cada levedura, pôde-se estabelecer uma ordem global de desempenho das leveduras em cada um dos pHs. As leveduras com maior *score* apresentam melhor desempenho.

Tabela 1. Ordem decrescente de desempenho das leveduras avaliadas em pH 5, considerando somatório das variáveis normalizadas, variação de OD, viabilidade e vitalidade, glicose consumida e etanol formado.

pH 5								
1. BLUE	2. 33A	3. PEDRA 2	4. A21	5. RED	6. JP1	7. CAT1	8. BG1	9. SA1
3,63	3,36	2,88	2,77	2,51	2,44	1,95	1,53	1,39

A Tabela 1 apresenta em ordem decrescente os resultados para o pH 5. Como pode ser observado, as leveduras BLUE, 33A e PEDRA2 obtiveram os três melhores valores para o pH 5.

Quanto ao pH 3, na Tabela 2 são apresentados os resultados de maneira decrescente. É possível observar que a levedura BLUE obteve melhores resultados

tanto para pH 5 como para pH 3. A PEDRA 2 também se manteve entre as três melhores, porém, diferente do pH 5, sua colocação foi de segundo lugar. A levedura 33A, por exemplo, teve bom desempenho em pH 5, mas quando comparada ao pH 3 ela foi a segunda levedura a apresentar pior desempenho.

Portanto, não é possível afirmar que a levedura que teve bom desempenho em pH 5 terá bom desempenho em pH 3. Essa afirmação também é válida dita ao contrário. As linhagens BLUE e PEDRA 2 podem ser relacionadas como melhor desempenho tanto para o pH 3 como para pH 5. Por esse motivo, essas foram as linhagens em potencial para experimentos posteriores.

Tabela 2. Ordem decrescente de desempenho das leveduras avaliadas em pH 3, considerando somatório das variáveis normalizadas, variação de OD, viabilidade e vitalidade, glicose consumida e etanol formado.

pH 3								
1. BLUE	2. PEDRA2	3. JP1	4. BG1	5. SA1	6. CAT1	7. RED	8. 33A	9. A21
4,90	2,636	2,56	2,05	1,99	1,98	1,34	1,09	1,01

Por meio da análise por HPLC, foi possível observar que as linhagens A21 e SA1 apresentaram a capacidade de consumir completamente o ácido acético nas primeiras 24 horas do experimento. Já as linhagens 33A e JP1 também demonstraram a mesma capacidade de consumo de ácido acético, porém, após as 48 horas do experimento. Com o objetivo de avaliar o grau de correlação entre consumo de glicose, produção de etanol, variação de OD e consumo de ácido acético, foram determinados os coeficientes de correlação de Pearson para cada um dos pHs avaliados. Todos esses coeficientes determinados apresentaram valores próximos a zero, indicando não existir tendência quanto à variação conjunta das variáveis avaliadas duas a duas.

O fato de as leveduras com melhor desempenho, BLUE e PEDRA2, não terem consumido ácido acético nas condições avaliadas pode indicar que sua melhor tolerância pode estar relacionada à capacidade de bloquear a entrada do ácido na célula.

Conclusões

Foi possível constatar que quanto maior a concentração de ácido acético maior o efeito negativo sobre o crescimento das leveduras. Quando a

concentração de ácido acético foi aumentada para 6 g/L, a curva de crescimento apresentou um padrão inesperado, com fase exponencial de crescimento após as 48 horas. É possível concluir que as leveduras na presença de alta concentração de ácido (6 g/L) levam maior tempo para se adaptar (maior fase Lag) e, conseqüentemente, atrasam a sua fase de crescimento exponencial (fase Log).

Dessa forma, a partir dos resultados obtidos, foi possível determinar que as linhagens *S. cerevisiae* BLUE e PEDRA2 são as mais tolerantes ao ácido acético nas condições avaliadas. O desempenho das linhagens foi melhor em pH 5, quando comparado com o desempenho em pH 3.

Apoio financeiro

Embrapa Agroenergia, CNPq.

Referências

ALMEIDA, R. M. J.; PAES, B. Genetic improvement of microorganisms for applications in biorefineries. **Chemical and biological technologies in Agriculture**, Portici, v. 1, p. 1-10, 2014.

BASSO, L. C.; BASSO, O. T.; ROCHA, S. N. Ethanol production in Brazil: the industrial process and its impact on yeast fermentation. In: BERNARDES, M. A. dos S. (Ed.). **Biofuel production – Recent developments and prospects**. Rijeka: Intech, 2011. Capítulo 5. p. 85-100.

DELLA-BIANCA, B. E; GOMBERT, A. K. Stress tolerance and growth physiology of yeast strains from the Brazilian fuel ethanol industry. **Antonie Van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology**, Dordrecht, v. 104, n. 6, p. 1083-1095, 2013.

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.

Construção de novas linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* capazes de utilizar xilose para a produção de bioetanol

Victor M. Honorato¹, Bárbara Gomes Paes², João Ricardo Moreira de Almeida³

Resumo

A utilização de microrganismos para o aproveitamento de biomassa lignocelulósica e produção de bioetanol vem atraindo grande interesse para pesquisas na área de biotecnologia. A levedura *Saccharomyces cerevisiae* pode ser tratada como um dos grandes protagonistas nesse contexto, seja pelo grande conhecimento acerca de suas características ou pelas inúmeras possibilidades de seu uso em estudos envolvendo engenharia genética. Sabe-se que essa levedura é incapaz de utilizar xilose para a produção de bioetanol. Sendo essa pentose o segundo açúcar mais presente na biomassa lignocelulósica, a obtenção de leveduras capazes de utilizá-la representaria um grande avanço para a produção de uma energia mais barata e sustentável. O consumo de xilose em *S. cerevisiae* pode ser obtido pela expressão de uma xilose isomerase, enzima que converte xilose a xilulose, a qual pode ser metabolizada pela levedura. Neste trabalho, uma linhagem laboratorial de *S. cerevisiae* melhorada para o consumo de xilose foi transformada com plasmídeos episomais contendo sete novos genes codificadores para xilose isomerase. Transformantes selecionados foram avaliados pela capacidade de crescer em meio mínimo contendo xilose como única fonte de carbono. As novas xilose isomerases possibilitaram o crescimento das linhagens obtidas, porém a taxas menores que as obtidas com a linhagem controle contendo a XI de *Piromyces* sp. Esse crescimento está associado tanto com a atividade da xilose isomerase como com possíveis mutações além do plasmídeo obtido no processo de evolução adaptativa da levedura. Novos estudos envolvendo essas leveduras transformadas podem revelar o perfil de seu crescimento, bem como a produção de metabólitos nesse processo.

¹ Graduando em Ciências Biológicas, Universidade de Brasília, victor.honorato@colaborador.embrapa.br

² Bióloga, doutoranda em Biologia Molecular, Universidade de Brasília, barbara.paes@colaborador.embrapa.br

³ Biólogo, doutor em Microbiologia Aplicada, pesquisador da Embrapa Agroenergia, joao.almeida@embrapa.br

Introdução

O avanço industrial e tecnológico sempre esteve diretamente ligado com altas demandas de produção de energia. Dentro desse contexto, os combustíveis fósseis sempre se apresentaram como grandes protagonistas. Entretanto, alguns fatores como a finitude desses recursos, além dos grandes impactos ambientais causados por sua utilização, vêm chamando a atenção para energias alternativas. Sendo assim, a utilização de recursos presentes na biomassa apresenta grande destaque, seja por sua ampla disponibilidade ou por seus benefícios econômico-ambientais. Mais especificamente podemos tratar da biomassa lignocelulósica como uma fonte alternativa. Dentro desse tipo de matéria-prima são encontrados resíduos agrícolas (bagaço de cana-de-açúcar, cascas e gramíneas), geralmente descartados, que podem ser utilizados para a produção de bioetanol (MATSUSHIKA et al., 2009). Entre os compostos mais abundantes na biomassa lignocelulósica, a glicose e a xilose ocupam, respectivamente, o primeiro e o segundo lugares (PAES; ALMEIDA, 2014). O bioetanol atualmente produzido em biorrefinarias é resultado dos processos de conversão de hexoses por meio de processos metabólicos realizados por diferentes microrganismos (PAES; ALMEIDA, 2014). Existe uma diversa gama de agentes responsáveis por esses bioprocessos, como, por exemplo, bactérias, leveduras e fungos filamentosos.

Um dos organismos que apresenta maior efetividade na produção de etanol é a levedura *Saccharomyces cerevisiae*. Por ser amplamente utilizado como modelo científico, esse é um organismo extremamente bem conhecido, tendo suas vias metabólicas e métodos de bioengenharia bem descritos. No entanto, ainda existem alguns desafios relacionados à *S. cerevisiae* e sua capacidade de produzir etanol, como, por exemplo, a utilização de xilose no metabolismo. Existem duas vias principais de catabolismo da xilose, a via xilose redutase – xilitol desidrogenase (XR-XDH), utilizada majoritariamente por fungos, e a via da Xilose Isomerase (XI), utilizada principalmente por bactérias (Figura 1). A via XR-XDH é caracterizada por ocasionar um desbalanço durante o processo de excreção do xilitol (MATSUSHIKA et al. 2009). A fim de tentar evitar essa dificuldade, uma alternativa interessante é a bioengenharia de linhagens de *S. cerevisiae* capazes de expressar genes codificadores para xilose isomerase.

Neste trabalho, uma linhagem curada de *Saccharomyces cerevisiae* foi transformada utilizando novos genes codificadores para XI. Dessa maneira, analisaremos a eficiência da utilização da xilose pela via da isomerização.

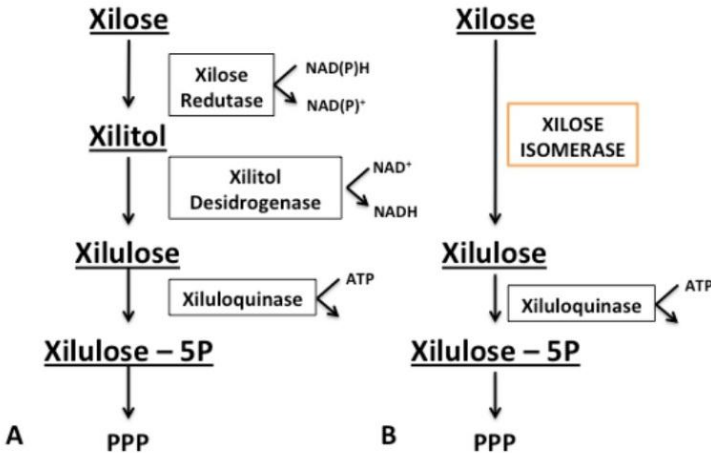


Figura 1. Vias metabólicas da xilose em fungos e bactérias. A: via XR-XDH; B: via da Xilose Isomerase.

Fonte: Paes (2015).

Materiais e métodos

Linhagem de levedura

A linhagem de *S. cerevisiae* utilizada, que chamaremos de Levedura Curada 7 (LC7), é o resultado da cura da levedura CEN.PK 113.3C $\Delta trp1-289::p424$ -GPDXI, $\Delta ura-52::p426$ -TEFXK (Levedura 7- XIXK (L7XIXK) construída previamente em um trabalho de mestrado realizado na Embrapa Agroenergia (PAES, 2015). A cura consistiu na retirada dos plasmídeos p424-GPDXI e p426-TEFXK do citoplasma da levedura. A linhagem L7XIXK demonstrava melhores taxa de crescimento, menor fase lag e maior produtividade de etanol.

Escolha dos genes

Dez novos genes possivelmente codificadores para xilose isomerase foram prospectados em bancos de dados, a partir de semelhança com os genes: XI *Piromyces*, descrito por Kuyper et al. (2003), XI *Burkholderia*, XI *Prevotella ruminicola*. Os genes foram sintetizados por empresa terceirizada e clonados no mesmo plasmídeo p424 utilizado anteriormente.

Transformação de leveduras

A linhagem LC7 foi transformada com os diferentes genes sintetizados. Como parâmetros comparativos, foram criadas as linhagens LC7XIPiro, da linhagem curada transformada com plasmídeo contendo XIPiomyces e LC7Ø da mesma linhagem transformada com o plasmídeo vazio. A transformação foi realizada por choque térmico seguindo o protocolo descrito por Gietz e Schiestl (2007). Porém, algumas mudanças foram feitas no protocolo. Durante o preparo de células competentes esperou-se que a OD600 duplicasse três vezes. Foram utilizados 100 ng de DNA plasmidial nas transformações. Os transformantes foram selecionados em meio YNB suplementado com glicose (20 g/L) e URA (100 mg/L).

Identificação de transformantes

Após a transformação, três colônias de cada gene foram replicadas e crescidas em meio YNB Glicose em shaker com rotação de 200 rpm e 30 °C. Em um primeiro teste, as células crescidas em meio de glicose foram transferidas para tubos falcon contendo 10 mL de meio mínimo YNB xilose. Posteriormente, foram selecionados os transformantes que apresentaram crescimento em meio mínimo com xilose, os quais tiveram colônias isoladas e validadas por PCR para os genes de interesse.

Caracterização dos transformantes

Os transformantes obtidos que demonstraram crescimento em meio mínimo com xilose foram isolados e caracterizados por meio de fermentação aeróbica em erlenmeyer contendo 50 mL de meio mínimo suplementado com xilose e análise dos metabólitos gerados por HPLC.

Resultados e discussão

Foram gerados transformantes para os controles e para sete dos genes codificantes para XI escolhidos. Após o isolamento de transformantes em meio mínimo, a inserção dos plasmídeos contendo os genes de interesse foi confirmada por PCR.

O primeiro teste de crescimento revelou que todas as linhagens foram capazes de crescer em meio mínimo utilizando xilose como única fonte de carbono. O segundo teste, no qual foi feita a fermentação das leveduras em 50 mL

de meio, revelou um crescimento significativo da linhagem controle, transformada com XI-*Piromyces* (C+), com sua OD₆₀₀ variando em 0,374 em 69 horas (Figura 2).

As amostras contendo os genes prospectados, quando comparadas à atividade da linhagem LC7XIPIRO, não apresentaram um crescimento superior ao controle positivo (Figura 2). De qualquer forma, as linhagens MUCI, FLAVO e MEJOT apresentaram melhor crescimento que os controles negativos, que apresentaram um crescimento não significativo, podendo ser fruto apenas de variações no processo de pipetagem ou do espectrofotômetro utilizado para a leitura (Figura 2). A análise completa do perfil de crescimento, feita em triplicata e produção de metabólitos dos transformantes comparado aos controles em alta densidade celular, se faz necessário para melhor avaliação das linhagens construídas.

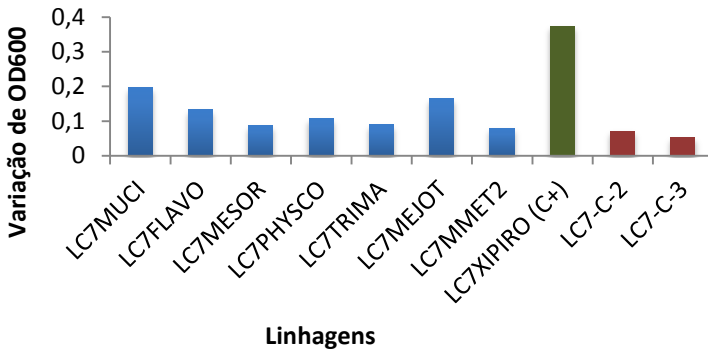


Figura 2. Teste de crescimento em meio mínimo com xilose como única fonte de carbono. As barras representam a variação de crescimento no intervalo de 69 horas. A OD₆₀₀ inicial das amostras foi de 0,5. As cores verde (controle positivo), vermelho (controles negativo) e azul (diferentes genes avaliados) representam as diferentes linhagens.

Conclusões

Neste trabalho, foram construídas linhagens capazes de utilizar uma pentose muito comum na biomassa lignocelulósica, a xilose. Essas linhagens de *S. cerevisiae* foram transformadas com genes codificadores para xilose isomerase, na tentativa de identificar novos genes-alvo, para possível utilização na

construção de linhagens adaptadas ao uso de xilose a partir de biomassa lignocelulósica. Três possíveis candidatos foram identificados.

Apoio financeiro

O projeto foi financiado pela Embrapa e pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

Referências

GIETZ, R. D.; SCHIESTL, R. H. Large-scale high-efficiency yeast transformation using the LiAc/SS carrier DNA/PEG method. **Nature Protocols**, London, v. 2, n. 1, p. 38-41, 2007.

KUYPER, M.; HARHANGI, H. R.; STAVE, A. K.; WINKLER, A. A.; JETTEN, M. S. M.; DE LAAT, W. T. A. M.; DEN RIDDER, J. J. J.; OP DEN CAMP, H. J. M.; VAN DIJKEN, J. P.; PRONK, J. T. High-level functional expression of a fungal xylose isomerase: the key to efficient ethanolic fermentation of xylose by *Saccharomyces cerevisiae*? **FEMS Yeast Research**, Amsterdam, v. 4, n. 1, p. 69–78, 2003.

MATSUSHIKA, A.; INOUE, H.; KODAKI, T.; SAWAYAMA, S. Ethanol production from xylose in engineered *Saccharomyces cerevisiae* strains: current state and perspectives. **Applied Microbiology and Biotechnology**, New York, v. 84, n. 1, p. 37–53, 2009.

PAES, B. G. Engenharia metabólica de *Saccharomyces cerevisiae* para aproveitamento de xilose na produção de etanol lignocelulósico. 2015. Dissertação (Mestrado em Biologia Molecular) - Universidade de Brasília, Brasília, DF.

PAES, B. G.; ALMEIDA, J. R. M. Genetic improvement of microorganisms for applications in biorefineries. **Chemical and Biological Technologies in Agriculture**, v. 1, p. 21, 2014 .

Expressão heteróloga de monoxigenases de polissacarídeos bacterianas em *Pichia pastoris*

Fernanda Pinheiro dos Santos¹, Kelly Barreto Rodrigues², Márcio Waluce Pinheiro Rocha de Santana³, Thais Fabiana Chan Salum⁴, Léia Cecília de Lima Fávaro⁵, Bruno dos Santos Alves Figueiredo Brasil⁶

Resumo

A descoberta das monoxigenases de polissacarídeos líticas dependentes de cobre (LPMOs), que agem em sinergismo auxiliando outras enzimas na degradação da celulose, gerou um grande interesse da comunidade científica em relação às pesquisas voltadas principalmente para produção de biocombustíveis a partir de resíduos lignocelulósicos. A busca por essas proteínas auxiliares em microrganismos surgiu como uma estratégia promissora, pois há grande diversidade de isoformas e disponibilidade de sequências genômicas. Diante disso, o presente trabalho teve como objetivo a expressão de LPMOs de origem bacteriana utilizando o sistema de expressão da levedura *Pichia pastoris*. Foram obtidos clones de *P. pastoris* transformados com todos os seis genes candidatos, porém apenas o gene referente a LPMO de *Thermobifida fusca* YX obteve sucesso na expressão.

Introdução

A produção de energia renovável derivada de biomassa é uma alternativa para reduzir o uso intensivo de combustíveis fósseis e para diversificar e garantir o suprimento de energia no futuro. No entanto, a produção de etanol a partir de biomassa lignocelulósica (etanol 2G ou de segunda geração) depende do desenvolvimento de tecnologias para exploração eficiente dos componentes da parede celular vegetal.

¹ Engenheira de Bioprocessos e Biotecnologia, mestranda em Biotecnologia, Universidade Federal do Tocantins, fernanda.pinheiro@colaborador.embrapa.br

² Bióloga, doutora em Ciências Biológicas, Universidade de Brasília, kellybiobarreto@gmail.com.

³ Bacharel em Biotecnologia, mestrando em Biotecnologia, Universidade Federal da Bahia, marcio.santana@colaborador.embrapa.br

⁴ Farmacêutica, doutora em Bioquímica, pesquisadora da Embrapa Agroenergia, thais.salum@embrapa.br

⁵ Bióloga, doutora em Genética e Melhoramento de Plantas, pesquisadora da Embrapa Agroenergia, leia.favaro@embrapa.br

⁶ Biólogo, doutor em Ciências Biológicas (Microbiologia), pesquisador da Embrapa Agroenergia, bruno.brasil@embrapa.br

A recalcitrância da celulose é um dos fatores limitantes para a hidrólise enzimática e impõe a necessidade de adição de elevada carga de enzimas hidrolíticas (LEE et al., 2009). Portanto, novas enzimas que tornem a sacarificação mais eficiente tem sido buscadas. Nesse contexto, a descoberta das monoxigenases de polissacarídeos líticas dependentes de cobre (LPMOs) revolucionou o conhecimento sobre a degradação enzimática da celulose e atualmente é aceito que essa degradação inclui componentes com ação hidrolítica e oxidativa.

As monoxigenases de polissacarídeos líticas dependentes de cobre (LPMOs) são uma importante classe de enzimas auxiliares, as quais agem sinergicamente com celulasas, aumentando a eficiência e diminuindo os custos da etapa de sacarificação. Dessa forma, este trabalho teve como objetivo a expressão de LPMOs bacterianas na levedura *P. pastoris*.

Materiais e métodos

Seleção de monoxigenases de polissacarídeos (LPMOs) bacterianas a partir de banco de dados

A partir da base de dados de domínio público CAZY (Carbohydrate-Active enZymes Database) e de literatura específica, foram selecionados seis genes codificadores para enzimas monoxigenases de polissacarídeos (LPMOs) de diferentes bactérias, sendo eles: gene 1(F1), gene 2(F2), gene 3 (F3), gene 4 (F4), gene 5 (F5) e gene 6(F6).

A base de dados de domínio público NCBI (National Center for Biotechnology Information) foi utilizada para obter as sequências proteicas e nucleotídicas. Após análise *in silico* a sequência do peptídeo sinal nativo para secreção das proteínas foi retirada dos genes selecionados, uma vez que se optou por utilizar a sequência sinal de secreção (denominado α -factor, nativa de *Saccharomyces cerevisiae*) existente no vetor de *Pichia pastoris*, pPICZ α A (Life Technologies) (Figura 1). Após a remoção, foi necessário fazer análise desses genes modificados, de forma a garantir a integridade do *frame* das construções após subclonagem no vetor final (pPICZ α A). Nessa etapa, também foram inseridos dois sítios de restrição: um para a enzima *EcoRI* (extremidade 5') e outro para *XbaI* (extremidade 3'). As construções foram analisadas utilizando o programa Geneious versão 7.1.8., e dois nucleotídeos foram adicionados antes do sítio da enzima de restrição *XbaI*,

com o objetivo de manter as construções em *frame* (tradução correta das proteínas).

As sequências foram submetidas e otimizadas na plataforma GeneArt (Life Technologies), para expressão em *Pichia pastoris*.

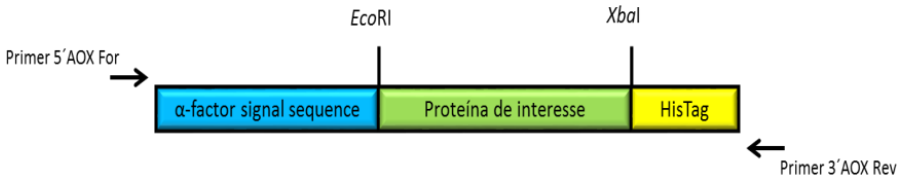


Figura 1. Representação esquemática das clonagens em *P. pastoris*.

Transformação de *Escherichia coli* por eletroporação com os genes codificadores de LPMOs bacterianas

Para a transformação de *E. coli*, foram utilizados 2 μL de DNA, na concentração de 10 $\text{ng}/\mu\text{L}$, conforme descrito por Sambrook e Russel (2001). Foram selecionadas duas colônias transformadas de cada gene, que foram inoculadas em meio LB ágar contendo Zeocina (25 $\mu\text{g}/\text{mL}$). A extração de DNA plasmidial foi realizada utilizando-se o kit GeneJET Plasmid Miniprep Kit (Thermo Scientific).

Para confirmar se as construções continham o gene de interesse, o DNA plasmidial extraído de *E. coli* foi analisado por padrão de restrição, utilizando os sítios de restrição selecionados para a síntese das seqüências (*EcoRI* na extremidade 5' e *XbaI* na extremidade 3'). Para as restrições, foram utilizados os seguintes reagentes: tampão - Promega, 50 $\text{ng}/\mu\text{L}$ de DNA, *EcoRI* 15U/ μL - Invitrogen, *XbaI* 12 U/ μL - Promega e água destilada para um volume final de 10 μL .

Transformação de *P. pastoris* por eletroporação com os genes codificadores de LPMOs bacterianas e seleção de clones positivos

Após a confirmação das construções por padrão de restrição, as colônias transformadas de *E. coli* selecionadas foram inoculadas em meio LB contendo 25 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de Zeocina. A extração de DNA foi realizada utilizando kit comercial 'QIAGEN Plasmid Midi Kit' (Qiagen), obtendo-se quantidade suficiente de DNA para linearizar e purificar os plasmídeos para a transformação em *Pichia pastoris*.

De acordo com o manual que foi utilizado para transformação (EasySelect™ *Pichia* Expression Kit - Invitrogen) (INVITROGEN, 2010), os plasmídeos devem ser

linearizados para que ocorra a integração do gene de interesse no genoma da levedura e as enzimas que podem ser utilizadas para linearizar o vetor pPicZαA são *Pme* I e *Sac* I. Portanto, os plasmídeos contendo os genes 1 (F1), 3 (F3), 4 (F4), 5 (F5) e 6 (F6) foram linearizados com a enzima *Sac* I e o plasmídeo contendo o gene 2 (F2) foi linearizado com a enzima *Pme* I. O protocolo seguido para a restrição dos plasmídeos fez uso dos seguintes reagentes: tampão *Sac* I 10X, 3-5 µg de DNA, *Sac* I ou *Pme* I 10 U/µL e água destilada para um volume final de 10 µL.

Os plasmídeos previamente linearizados foram então purificados por precipitação com etanol (SAMBROOK; RUSSEL, 2001). Células eletrocompetentes da linhagem X-33 de *P. pastoris* foram transformadas por eletroporação e incubadas a 30 °C por 48 a 72 horas em meio YPD contendo Zeocina (100 µg/µL). Depois do crescimento dos transformantes de *P. pastoris*, foi feita a lise das leveduras, utilizando o protocolo adaptado do manual EasySelect™ *Pichia* Expression Kit. O DNA genômico de *P. pastoris* foi diretamente utilizado como molde em reações de PCR (*polymerase chain reaction*). Para tanto, foram utilizados *primers* específicos que flanqueiam as regiões 5'e 3' do promotor AOX1. O gene AOX1 é responsável pela maior parte da atividade álcool oxidase da célula. A recombinação homóloga no genoma de *Pichia* pode ocorrer de duas formas: na região do promotor AOX2, o que resulta na redução da capacidade das células para metabolizar metanol, resultando em uma linhagem denominada Mut^S (*Methanol utilization slow*); ou na região do promotor AOX1, que confere aos transformantes a capacidade de metabolizar metanol como única fonte de carbono e resulta em células capazes de crescerem bem em meio com metanol. Essas células são denominadas Mut⁺ (*Methanol utilization plus*). Uma vez que a linhagem utilizada para a transformação foi a selvagem X-33, espera-se o padrão Mut⁺, que é caracterizado, após a PCR, pela visualização de duas bandas com os tamanhos de 2.200 pb e o tamanho do gene mais 588 pb, provenientes do vetor.

Cada reação de PCR para confirmação da inserção dos genes no genoma de *P. pastoris* continha: 1X de 10X PCR Rxm Buffer (-MgCl₂) (Invitrogen), 3,7 mM de MgCl₂, 0,2 mM de dNTPs 10mM (Invitrogen), 0,8 mM de *primer* 5'AOX1 Forward, 0,8 mM de *primer* 3'AOX1 Reverse, 5-20 ng de DNA, 1,0 U de Platinum *Taq* DNA Polymerase (Invitrogen) e água destilada para um volume final de 25 µL. Para a amplificação foi utilizada uma desnaturação inicial a 95 °C por 3 minutos, seguida de 35 ciclos de desnaturação a 95 °C por 30 segundos, anelamento do primer a 54 °C

por 30 segundos e extensão a 72 °C por 4 minutos. A extensão final foi a 72 °C por 10 minutos.

Indução por metanol dos clones de *P. pastoris* contendo os genes de LPMOs bacterianas

Uma colônia de cada transformante de *P. pastoris* foi inoculada em 25 mL de meio BMGY e incubada a 30 °C sob agitação de 250 rpm, até atingir uma OD₆₀₀ de 2 a 6. Ao mesmo tempo, foi utilizado como controle da expressão e de *background* um clone de *P. pastoris* transformado com vetor pPicZαA sem inserto.

As células foram então coletadas por centrifugação e ressuspendidas em 50 mL de meio BMMY, obtendo-se uma OD₆₀₀ final de 1.0. As mesmas foram transferidas para erlenmeyers e novamente incubadas a 30 °C sob agitação de 250 rpm.

A cada 24 horas, foi adicionado metanol 100% a uma concentração final de 0,5% para manter a indução dos transformantes. Durante 72 horas de indução, foram coletadas alíquotas de 1 mL em tubos de 1,5 mL a cada 24 horas. Essas foram centrifugadas e o sobrenadante transferido para outro tubo de 1,5 mL. Tanto o pellet quanto o sobrenadante foram armazenados em freezer -80 °C para posterior análise por SDS-PAGE e Western Blot.

Análise das proteínas expressas em *P. pastoris* por SDS-PAGE e Western Blot

Após a indução, as amostras foram avaliadas por eletroforese em gel desnaturante de poliacrilamida 12% e Western Blot, para o qual foi utilizado o anticorpo Anti-HisTag (Sigma), uma vez que todas as proteínas foram clonadas *in frame* com a cauda de histidina existente no vetor pPICZαA (Figura 1). O SDS-PAGE e o Western Blot foram realizados de acordo com o protocolo de Sambrook e Russel (2001).

Resultados e discussão

O resultado da restrição do DNA plasmidial extraído de *E. coli* foi visualizado por eletroforese em gel de agarose 1%, onde foram visualizados fragmentos de DNA correspondentes aos tamanhos dos genes sintetizados (Figura 2), um do tamanho

esperado do vetor (3.000 pb) e o outro dos fragmentos clonados (aproximadamente 500 pb), confirmando que os plasmídeos possuem o gene de interesse. Dessa forma, pôde-se dar início à transformação de leveduras com esses plasmídeos.

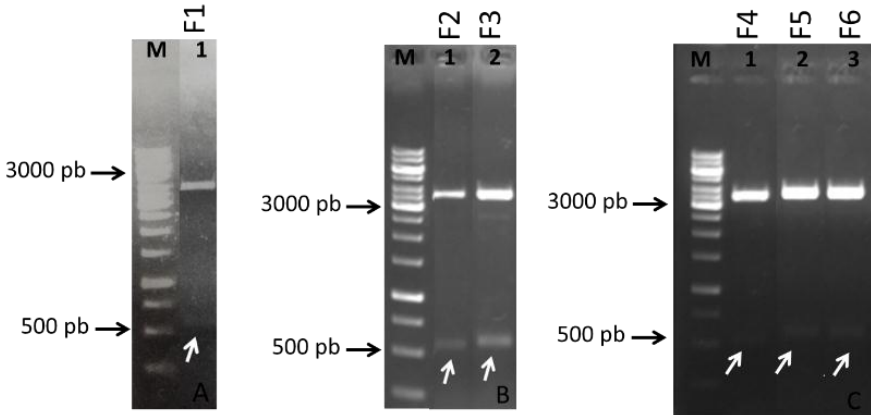


Figura 2. Padrão de restrição do DNA plasmidial obtido com as enzimas de restrição EcoRI e XbaI. Em (A) poço 1: gene 1 (F1); (B) poço 1: gene 2 (F2), poço 2: gene 3 (F3); (C) poço 1: gene 4 (F4), poço 2: gene 5 (F5) e poço 3: gene 6 (F6). As setas indicam o tamanho dos fragmentos de DNA esperados.

M - Marcador de tamanho molecular GeneRuler 1kb DNA Ladder.

Os plasmídios selecionados foram então linearizados com as respectivas enzimas de restrição (Figura 3), sendo observado que o tamanho do plasmídeo tratado com enzima de restrição (linearizado) estava diferente do não tratado (íntegro), indicando que ocorreu a linearização. Após a preparação do DNA linearizado, leveduras *P. pastoris*, linhagem X-33, foram então transformadas.

Para avaliar a integração dos genes de interesse no genoma de *P. pastoris*, foi realizada a PCR, cujos produtos de amplificação podem ser visualizados por eletroforese em gel de agarose 1%, conforme a Figura 4.

De acordo com o manual EasySelect™ *Pichia* Expression Kit, quando o padrão de amplificação esperado é Mut⁺, devem ser visualizados dois fragmentos após a PCR: um de aproximadamente 2.200 pb, que corresponde ao gene *AOX1*, e o outro do tamanho do gene de interesse mais 588 pb (no caso do vetor pPICZαA), provenientes do vetor.

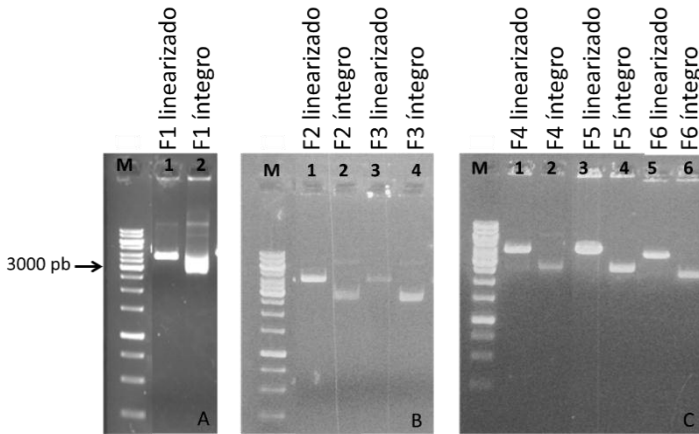


Figura 3. Plasmídeos digeridos (linearizados) e íntegros, respectivamente. Em (A) poço 1 e 2: gene 1 (F1); (B) poço 1 e 2: gene 2 (F2), poço 3 e 4: gene 3 (F3); (C) poço 1 e 2: gene 4 (F4); poço 3 e 4: gene 5 (F5) e poço 5 e 6: gene 6 (F6). M- Marcador de tamanho molecular GeneRuler 1kb DNA Ladder.

Todos os clones de *P. pastoris* estudados no presente trabalho, que apresentam genes codificadores para LPMOs bacterianas, apresentaram o padrão Mut^+ , e esses clones foram submetidos a indução por metanol.

Alíquotas das amostras retiradas durante a indução foram utilizadas para a análise da expressão das proteínas por SDS-PAGE e Western Blot, que podem ser visualizadas na Figura 5. Essa análise confirma a expressão da LPMO de *Thermobifida fusca*, a qual está fusionada com cauda de histidina.

No entanto, não houve detecção das demais LPMOs bacterianas clonadas em *P. pastoris* até o momento. Possivelmente, estas não estão sendo secretadas de forma efetiva para o meio ou o metanol, utilizado na indução dos clones de *Pichia*, provavelmente pode ser tóxico à levedura na concentração utilizada, prejudicando a expressão das proteínas.

A partir desses resultados, novas induções serão realizadas, com base em outras referências, como Wang e colaboradores (2014), os quais testaram diferentes concentrações de metanol e soluções que inibem a ação das proteases, enzimas que podem degradar as proteínas durante o processo de purificação.

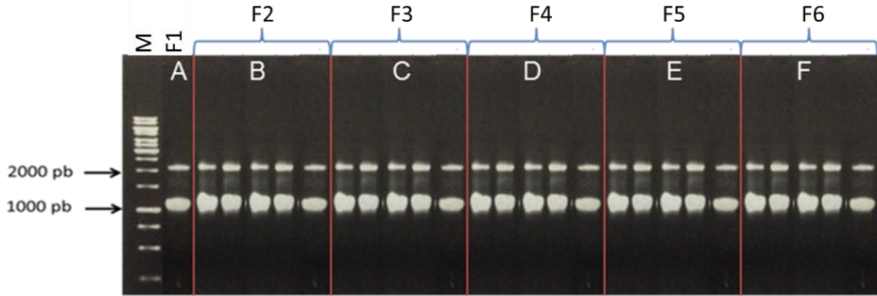


Figura 4. Avaliação por PCR da integração dos genes de interesse no genoma de *P. pastoris*. Em (A): um clone de *P. pastoris* contendo o gene 1 (F1); (B): cinco clones de *P. pastoris* contendo o gene 2 (F2); (C): cinco clones de *P. pastoris* contendo o gene 3 (F3); (D): cinco clones de *P. pastoris* contendo o gene 4 (F4); (E): cinco clones de *P. pastoris* contendo o gene 5 (F5) e (F): cinco clones de *P. pastoris* contendo o gene 6 (F6). M - Marcador molecular GeneRuler 1kb DNA Ladder.

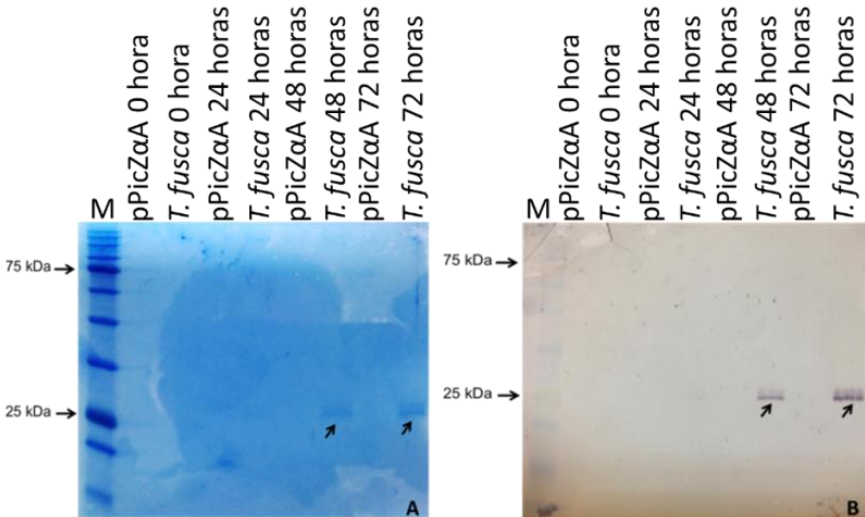


Figura 5. SDS-PAGE e imunomarcção da indução por metanol da LPMO de *Thermobifida fusca* YX. Em (A) - Gel de poliacrilamida desnaturante 12%, corado com Coomassie Blue (B) - Membrana de nitrocelulose marcada com anticorpo anti-HisTag. M - Marcador Color Protein Standard Broad Range (NEB).

Conclusão

A análise da expressão de proteínas confirmou a expressão apenas da enzima LPMO de *Thermobifida fusca* YX. Todos os clones de *P. pastoris* contendo os novos genes de LPMOs bacterianas analisados até o momento apresentaram o padrão Mut⁺ e serão, portanto, novamente induzidos por metanol e avaliados quanto à expressão por eletroforese em gel de poliacrilamida e Western Blot.

Apoio financeiro

Este trabalho foi financiado com recursos da Embrapa (Projeto UPZYME) e BNDES.

Referências

INVITROGEN. **EasySelect™ Pichia Expression Kit**: for expression of recombinant proteins using pPICZ and pPICZα in *Pichia pastoris*. Carlsbad, CA, 2010. Cat. no. K1740-01; Manual part no. 25-0172; MAN0000042.

LEE, S. H.; DOHERTY, T. V.; LINHARDT, R. J.; DORDICK, J. S. Ionic Liquid: mediated selective extraction of lignin from wood leading to enhanced enzymatic cellulose hydrolysis. **Biotechnology and Bioengineering**, Hoboken, v. 102, n. 5, p. 1368-1376, 2009.

SAMBROOK, J.; RUSSEL, D. W. **Molecular cloning: a laboratory manual**. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.

WANG, W.; LIU, C.; MA, Y.; LIU, X.; ZHANG, K.; ZHANG, M. H. Improved production of two expansin-like proteins in *Pichia pastoris* and investigation of their functional properties. **Biochemical Engineering Journal**, Amsterdam, v. 84, p. 16–27, 2014.

Clonagem e expressão de genes de monoxigenases de polissacarídeos líticas (LPMOs) de fungos em *Pichia pastoris*

Márcio Waluce Pinheiro Rocha de Santana¹, Kelly Barreto Rodrigues²,
Fernanda Pinheiro dos Santos³, Thaís Demarchi Mendes⁴, Mônica Caraméz
Triches Damaso⁵, Léia Cecília de Lima Fávoro⁶, Félix Gonçalves de Siqueira⁷

Resumo

Um dos grandes desafios no processo de conversão de biomassa lignocelulósica em açúcares fermentescíveis é a obtenção de coquetéis enzimáticos com alta eficiência, para atuação no processo de hidrólise enzimática. O conceito clássico de que a degradação da celulose e de outros polissacarídeos na natureza é um processo hidrolítico tem sido revolucionado nos últimos anos. Isto se deve à descoberta em microrganismos (especialmente fungos) das monoxigenases de polissacarídeos líticas dependentes de cobre (LPMOs – *lytic polysaccharide monoxygenase*). Essas enzimas realizam clivagem oxidativa da celulose (e também de hemicelulose, amido e quitina) e, atualmente, a degradação desses polissacarídeos é considerada um processo hidrolítico e oxidativo. As LPMOs são capazes de clivar a celulose e outros polissacarídeos em suas regiões cristalinas usando um mecanismo oxidativo que depende da presença de íons metálicos divalentes (cobre) e de um doador de elétrons. LPMOs de diferentes famílias podem apresentar efeito sinérgico às hidrolases durante a hidrólise de substratos celulósicos e hemicelulósicos. Apesar desse potencial, somente um pequeno número de LPMOs tem sido caracterizado e validado como aditivo na conversão de biomassa. Nesse contexto, este trabalho teve como objetivo selecionar genes candidatos de LPMOs de fungos, bem como clonar e expressar esses genes em *P. pastoris*. A seleção de genes candidatos e a clonagem de seis genes de LPMOs de

¹ Biotecnologista, mestrando em biociências, Universidade Federal da Bahia, marcio.santana@colaborador.embrapa.br

² Bióloga, doutora em Ciências Biológicas (Biologia Molecular), Universidade de Brasília kelly.rodrigues@colaborador.embrapa.br

³ Engenheira de Bioprocessos e Biotecnologia, mestranda em Biotecnologia, Universidade Federal do Tocantins, fernanda.pinheiro@colaborador.embrapa.br

⁴ Bióloga, mestre em Microbiologia Aplicada, analista da Embrapa Agroenergia, thais.demarchi@embrapa.br

⁵ Engenheira Química, doutora em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos, pesquisadora da Embrapa Agroenergia, monica.damaso@embrapa.br

⁶ Bióloga, doutora em Genética e Melhoramento de Plantas, pesquisadora da Embrapa Agroenergia, leia.favaro@embrapa.br

⁷ Biólogo, doutor em Ciências Biológicas (Biologia Molecular), pesquisador da Embrapa Agroenergia, felix.siqueira@embrapa.br

fungos em *P. pastoris* foram realizadas com sucesso, e a etapa de expressão foi confirmada até o momento para um desses genes.

Introdução

A elevada demanda mundial de energia, as fontes de petróleo instáveis e incertas e a preocupação com a mudança climática global levaram ao interesse no desenvolvimento de tecnologias para geração de energias renováveis com o intuito de reduzir o consumo de combustível fóssil. Uma das alternativas é a utilização de biomassa vegetal para a produção de etanol de primeira ou segunda geração (celulósico) (HIMMEL, 2007).

As biomassas lignocelulósicas oriundas dos cultivos, colheitas e beneficiamento de grãos, cereais, gramíneas, etc. são recursos renováveis e possíveis substratos para obtenção de etanol de segunda geração. No entanto, o custo de obtenção desse biocombustível ainda é um dos obstáculos para exploração dessas biomassas vegetais. Todos os processos para o desenvolvimento dessa tecnologia ainda são trabalhados para melhorar os rendimentos de glicose durante a hidrólise e subsequente fermentação a etanol. A etapa de hidrólise enzimática da parede celular vegetal faz uso de combinações de enzimas microbianas a fim de vencer a recalcitrância da celulose e lignina (HIMMEL, 2007; WANG et al., 2014). Na hidrólise, a celulose e hemicelulose (dependendo do pré-tratamento) são degradadas por enzimas hidrolíticas microbianas em monossacarídeos e oligossacarídeos. Até recentemente, somente as enzimas hidrolíticas eram consideradas importantes na degradação de celulose e hemicelulose a açúcares fermentescíveis. A descoberta de que monoxigenases de polissacarídeos (LPMOs de fungos principalmente, mas também de bactérias) aumentam a ação de enzimas hidrolíticas forneceu uma nova dimensão ao conceito clássico de degradação da celulose e da hemicelulose, conforme revisado por Horn et al. (2012) e Agger et al. (2014).

Genes codificadores de LPMOs são abundantes nos genomas de microrganismos capazes de converter biomassa e essas enzimas oxidativas representam um novo paradigma para degradação de polissacarídeos recalcitrantes, revelando sua importância para o desenvolvimento de biorrefinarias. Nesse aspecto, o estudo de novas LPMOs microbianas, sejam elas provenientes de bancos de dados, de espécies microbianas cultiváveis ou de

microrganismos não cultiváveis (abordagem metagenômica), pode permitir o desenvolvimento de coquetéis enzimáticos mais eficientes para hidrólise de determinada biomassa de interesse. Paralelamente, sua utilização como aditivo durante a sacarificação de biomassa pode permitir uma diminuição na quantidade de enzimas hidrolíticas necessárias para sacarificação, reduzindo os custos de produção de etanol lignocelulósico, como apontam diversos estudos (KITTL et al., 2012; CANNELLA et al., 2016).

Objetivo geral

Selecionar e clonar seis genes codificadores de LPMOs de fungos para expressão em levedura *P. pastoris*.

Material e métodos

Seleção e síntese de genes candidatos

A seleção dos genes de LPMOs de fungos filamentosos foi realizada utilizando programas e base de dados de domínio público, tais como CAZY (Carbohydrate-Active enZymes Database) e NCBI (National Center for Biotechnology Information). Os critérios para seleção dos genes candidatos incluíram: revisão de literatura e de patentes, análise filogenética, taxonomia e biologia das espécies, capacidade de degradação de polissacarídeos. Dessa forma, cinco genes foram selecionados provenientes de espécies de fungos das classes Ascomycota e Basidiomycota (microrganismo 1 a 5). Também foi selecionado para síntese um gene de LPMO do ascomiceto *Trichoderma reesei*, já caracterizado na literatura, a fim de utilizá-lo como modelo e padrão de comparação nas etapas posteriores do trabalho. Para as análises de confirmação da expressão das proteínas (SDS-PAGE e Western blot), também foi incluída uma LPMO bacteriana modelo (de *Thermobifida fusca*) expressa em *P. pastoris* e purificada previamente (dados não mostrados).

A sequência do peptídeo sinal nativo para secreção das proteínas foi retirada dos genes selecionados, uma vez que se optou por utilizar a sequência sinal (denominada α -factor, nativa de *Saccharomyces cerevisiae*) existente no vetor de *P. pastoris*, pPICZ α A (Life Technologies). Após a remoção das sequências não alvo (peptídeo sinal nativo), foi necessário fazer análise desses genes modificados, de

forma a garantir a integridade do *frame* das construções para subclonagem no vetor de expressão (pPICZαA). Nessa etapa, também foram inseridos dois sítios de restrição: um para a enzima *EcoRI* (extremidade 5´) e outro para *XbaI* (extremidade 3´). As construções foram analisadas utilizando o programa Geneious versão 7.1.8. e foi necessário adicionar dois nucleotídeos antes do sítio da enzima de restrição *XbaI*, com o objetivo de manter as construções em *frame* (tradução correta das proteínas).

As sequências foram submetidas e otimizadas na plataforma *GeneArt* (Life Technologies) e posteriormente foram sintetizadas e clonadas em vetor de expressão para *P. pastoris*.

Transformação de *Escherichia coli* por eletroporação

Células eletrocompetentes de *Escherichia coli* DH10B foram preparadas para transformação por eletroporação, de acordo com o protocolo descrito por Sambrook e Russel (2001).

Os cinco genes sintetizados de LPMOs de fungos foram recebidos na forma liofilizada, contendo 5 µg de DNA. Esses foram então ressuspensos em 50 µL de tampão de eluição (10 mM Tris HCl, 1 mM EDTA, pH 8,0), para serem armazenados a uma concentração estoque de 100 ng/µL. As transformações de *E. coli* foram realizadas com 2 µL do DNA previamente diluído do estoque (10 ng/µL) e, em seguida, as células foram plaqueadas em meio de cultura Luria Bertani Agar contendo zeocina (25 µg/µL) e crescidas a 37 °C, por 16 a 20 horas, de acordo com o protocolo descrito por Sambrook e Russel (2001). De cada transformação, foram selecionadas três colônias das placas, que então foram inoculadas em 3 mL de meio Luria Bertani contendo zeocina (25 µg/µL). Para confirmar a inserção em pelo menos uma colônia, foi feita a extração do DNA plasmidial utilizando o kit '*QIAGEN Plasmid mini Kit*' e então realizada a clivagem do DNA plasmidial com *EcoRI* (extremidade 5´) e *XbaI* (extremidade 3´).

Transformação de *P. pastoris* por eletroporação

Depois de confirmada a clonagem dos genes de LPMOs em *E. coli*, foi feita extração de DNA plasmidial utilizando kit '*QIAGEN Plasmid Midi Kit*' para obtenção da quantidade necessária de DNA (5 µg – 10 µg). Para a transformação de *P. pastoris* X-33, aproximadamente 5 µg de DNA plasmidial foram clivados com

a enzima de restrição 'Sac I'. Essa linearização é necessária para que ocorra a integração do gene de interesse no genoma da levedura. As transformações foram feitas de acordo com o protocolo 'EasySelect™ *Pichia Expression Kit* (Invitrogen)' e então as leveduras foram inoculadas em YPDS (*Yeast Extract Peptone Dextrose+Sorbitol*) com zeocina (100 µg/µL) e incubadas a 30 °C por até 72 horas. As colônias que cresceram foram repicadas em placas para cultura de células com 96 poços (deep well) contendo YPD (*Yeast Extract Peptone Dextrose*) e zeocina (100 µg/µL) por até 48 horas e, posteriormente, criopreservadas (glicerol 30%).

Indução por metanol dos clones de *P. Pastoris* e análise molecular dos transformantes

Após a transformação da *P. pastoris*, o DNA genômico da levedura foi extraído com 'Gentra Puregene Yeast/Bact. Kit'. Esse DNA genômico foi utilizado como molde na reação de PCR (*Polymerase Chain Reaction*) com os primers 5' AOX1 e 3' AOX1 para confirmar a inserção do gene de interesse (genótipo ou padrão de bandas denominado Mut⁺ *Methanol utilization plus*). Depois de confirmado o padrão de bandas do tipo Mut⁺, foi iniciada a indução com metanol para verificar se as proteínas codificadas pelos genes de LPMOs estavam sendo expressas. A indução para expressão das proteínas recombinantes foi realizada conforme descrito no manual 'EasySelect™ *Pichia Expression Kit*', com adaptações relacionadas à concentração de metanol. A confirmação da expressão das LPMOs foi feita por *immunoblotting* utilizando anticorpo anti His-tag e SDS-PAGE com corante Coomassie Blue R-250.

Resultados e discussão

O padrão de bandas obtido na clivagem do DNA plasmideal com as enzimas de restrição EcoRI e XbaI confirmou a clonagem dos genes de interesse em *E. coli*, conforme pode ser visto na Figura 1. A presença de dois fragmentos de DNA pode ser observada nas amostras digeridas, como o exemplo indicado pela seta (4.2d).

Os vetores não digeridos com enzima de restrição apresentaram tamanho de 3.600 pb (4.2), enquanto os digeridos apresentaram duas bandas (de 3.000 pb e 600 pb, aproximadamente), que correspondem aos tamanhos esperados do vetor e do gene inserido, respectivamente.

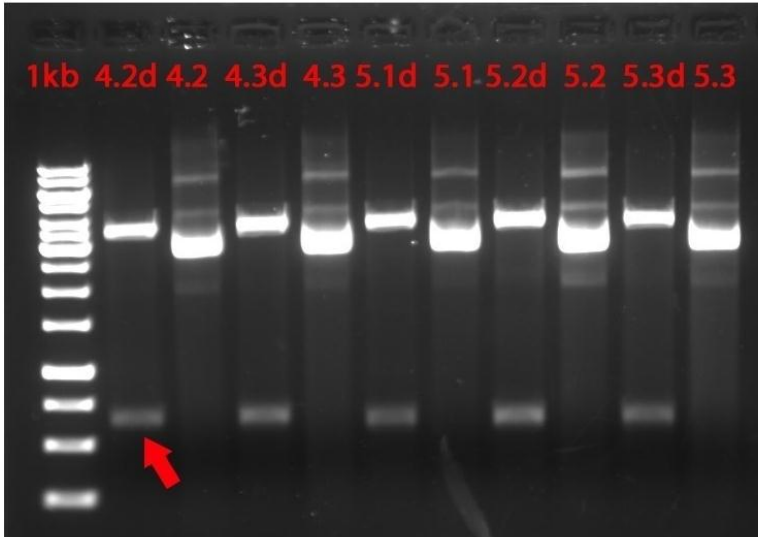


Figura 1. Clivagem enzimática com EcoRI e XbaI. Clivagem do DNA plasmidial de *E. coli* transformada por eletroporação mostrando os padrões de bandas do plasmídeo digerido e não digerido (4.2, 4.3 – Basidiomycota; 5.1, 5.2, 5.2 – Ascomycota), em que a letra ‘d’ representa o plasmídeo digerido e a seta indica o tamanho do fragmento esperado do gene inserido. 1kb - GeneRuler 1kb DNA Ladder.

Fonte: Arquivo pessoal.

Na Figura 2 é apresentado o resultado da linearização com *SacI* do DNA plasmidial extraído de *E. coli* contendo os genes dos fungos provenientes de Basidiomycota (1, 3 e 4) e Ascomycota (2 e 5) que foram selecionadas ao crescerem em meio de cultura Luria Bertani Agar com zeocina.

Após a transformação de *P. pastoris* com o DNA linearizado, iniciou-se, então, a busca por transformantes com padrão de bandas do tipo Mut⁺ (*Methanol utilization plus*). O padrão de bandas Mut⁺ é indicado pela amplificação de duas bandas (tendo o DNA genômico de *P. pastoris* como molde), uma correspondente ao tamanho do gene de interesse (~588 pb) e a outra correspondente ao gene AOX1 da levedura (aproximadamente 2,2 Kb). Durante a transformação, caso a recombinação ocorra na região 3'AOX1, o gene selvagem AOX1 da *P. pastoris* irá sofrer disrupção, tendo então a capacidade de utilizar o metanol como fonte de carbono reduzida, sendo chamada de transformante Mut^s (*methanol utilization*

slow). Entretanto, a expressão da proteína heteróloga ainda pode ocorrer em menor quantidade.

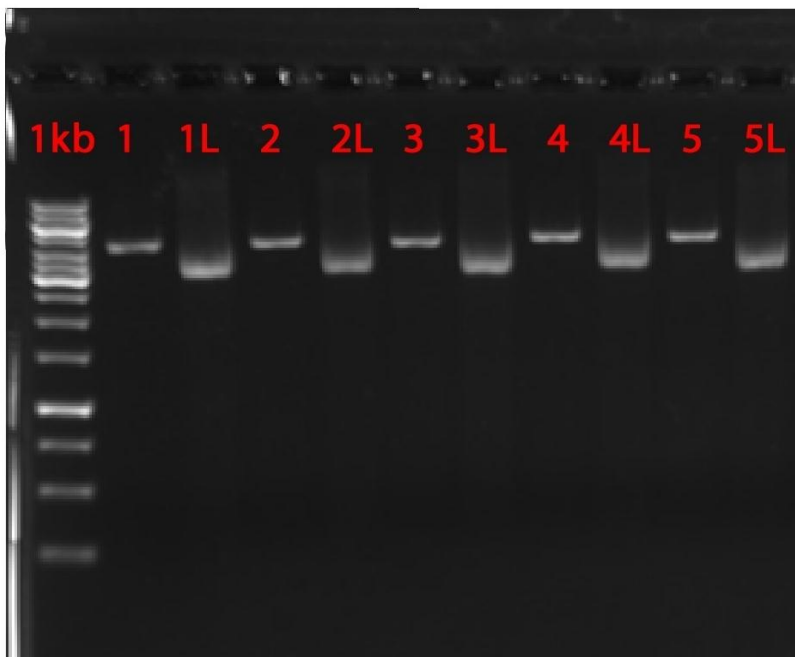


Figura 2. Linearização do DNA plasmidial de *E. coli* com *SacI* dos clones de Basidiomycota (1, 3 e 4) e Ascomycota (2 e 5). Resultado da linearização do DNA plasmidial de *E. coli* em que 1 é o plasmídeo não linearizado e 1L é o plasmídeo linearizado seguindo o mesmo código para os demais.

Fonte: Arquivo pessoal.

Na Figura 3, podemos observar o padrão de bandas Mut^+ que foi amplificado por PCR a partir do DNA genômico extraído de diferentes clones de *P. pastoris* (indicado pelas setas vermelhas). Nessa figura podemos observar que alguns transformantes de *P. pastoris* possuem o padrão de bandas Mut^+ desejado, por exemplo, o transformante B4 com o gene do microrganismo 4 (4B4 - Basidiomycota). Assim, todos transformantes que possuem o padrão de bandas Mut^+ foram selecionados para a etapa de indução.

Nas Figuras 4 e 5, podem ser observados os resultados da análise de SDS-PAGE e de Western Blot, respectivamente, de 5 LPMOs selecionadas neste trabalho. Apenas o tempo de 72 horas de indução foi submetido à análise. Em ambas as

Figuras, podem ser observadas bandas da proteína utilizada como controle positivo (LPMO da bactéria *Thermobifida fusca* fusionada à cauda de histidina).

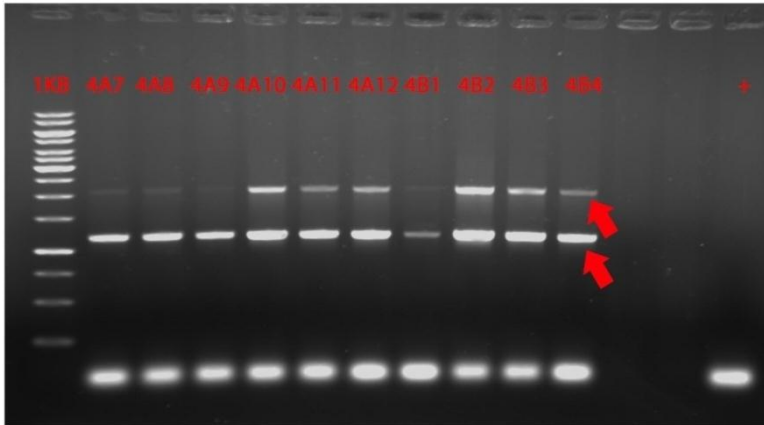


Figura 3. PCR do DNA genômico de *P. pastoris* com primers 5'AOX1 e 3'AOX1. Avaliação da integração por PCR do gene de Basidiomycota (4) no genoma de dez clones de *P. pastoris*. 1kb - Marcador molecular GeneRuler 1kb DNA Ladder.

Fonte: Arquivo pessoal.

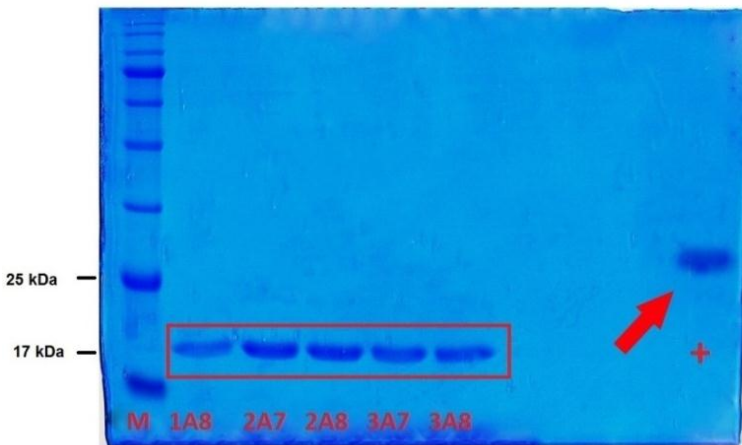


Figura 4. SDS-PAGE da indução de *P. pastoris* recombinante – 72 h. SDS-PAGE da indução realizada com cinco clones de *P. Pastoris* transformadas com genes de Basidiomycota (1 e 3) e Ascomycota (2). Controle positivo (LPMO da bactéria *Thermobifida fusca*).

Fonte: Arquivo pessoal.

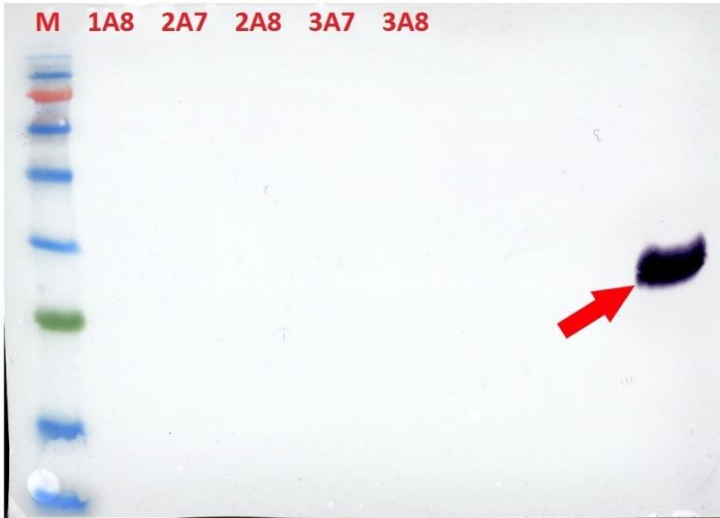


Figura 5. Western Blot da indução de *P. pastoris* recombinante – 72 h. Western Blot da indução realizada com cinco clones de *P. Pastoris* transformadas com genes de Basidiomycota (1 e 3) e Ascomycota (2). Controle positivo (LPMO da bactéria *Thermobifida fusca*).

Fonte: Arquivo pessoal.

Na Figura 4, ainda é possível observar a secreção de proteínas (retângulo vermelho) durante o processo de indução, mostrando que ocorreu o crescimento da levedura. No entanto, não foi possível visualizar a cauda de histidina das LPMOs de origem fúngica clonadas em *P. pastoris* após a indução por metanol, como observado na Figura 5.

As proteínas secretadas na Figura 4 indicam que há secreção de proteínas heterólogas (LPMOs), uma vez que a expressão de proteínas heterólogas normalmente ocorre em maior quantidade do que as proteínas nativas (não visualizadas no gel), porém o tamanho delas, cerca de 17 kDa, não confere com o tamanho esperado das LPMOs de fungos, 25 kDa a 30 kDa. Assim, é possível que na LPMO exista um ponto de clivagem sendo identificado por proteases durante a tradução na porção C-terminal, onde está a cauda de histidina.

Dessa forma, pode-se dizer que a técnica foi realizada corretamente, porém a expressão das LPMOs selecionadas não foi detectada, ou porque não foram expressas, ou, se expressas, não foram secretadas. Wang (2014) já demonstrou que

pode ocorrer degradação de proteínas heterólogas por proteases, o que afeta consideravelmente a detecção no Western Blot.

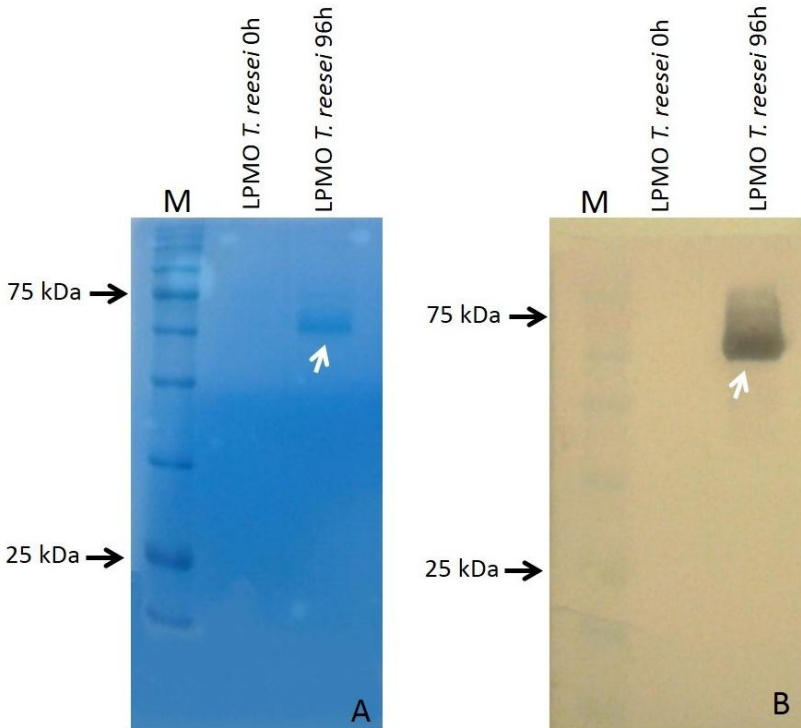


Figura 6. SDS-PAGE e Western Blot de *P. Pastoris* 0 h e 96 h. Resultado da indução de *P. Pastoris* com o gene modelo de LPMO proveniente de *T. reesei*.

Ilustração: Kelly Barreto Rodrigues.

Na Figura 6, observamos a LPMO modelo do fungo *T. reesei* expressa em *P. pastoris*, em que podemos observar uma proteína com cerca de 75 kDa e é possível observar que a cauda de histidina na LPMO modelo está presente.

Considerações finais e perspectivas

Até o momento, foi possível confirmar a expressão de uma LPMO modelo previamente caracterizada do fungo *T. reesei*, utilizando o sistema de expressão de *P. pastoris*.

Embora a análise molecular de transformantes de *P. pastoris* contendo novos genes de LPMOs selecionados de ascomicetos e basidiomicetos tenha confirmado o padrão de bandas esperado, até o momento não foi possível confirmar se as proteínas heterólogas estão sendo expressas.

Novas tentativas serão realizadas com algumas alterações nos protocolos utilizados a fim de conseguir expressar as LPMOs recombinantes selecionadas. Uma vez expressas, deverão ser feitos testes para determinação da atividade enzimática, utilizando diferentes metodologias, tais como análise por espectrometria de massas e ensaios colorimétricos de oxidação/redução.

Apoio financeiro

Este trabalho foi realizado com recursos financeiros do projeto Upzyme (Embrapa), da Embrapa Agroenergia e também do Banco Nacional de Desenvolvimento Econômico e Social (BNDES).

Referências

AGGER, J. W.; ISAKSEN, T.; VARNAI, A.; VIDAL-MELGOSA, S.; WILLATS, W. G. T.; LUDWIG, R.; HORN, S. J.; EIJSINK, V. G. H.; WESTERENG, B. EIJSINK AND B. WESTERENG. 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.

BENNATI-GRANIER, C.; GARAJOVA, S.; CHAMPION, C.; GRISEL, S.; HAON, M.; ZHOU, S.; FANUEL, M.; ROPARTZ, D.; ROGNIAUX, H.; GIMBERT, I.; RECORD, E.; BERRIN, J. G. Substrate specificity and regioselectivity of fungal AA9 lytic polysaccharide monooxygenases secreted by *Podospora anserina*. **Biotechnology for Biofuels**, London, v. 8, número do artigo 90, 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26136828>>. Acesso em: ago. 2016.

CANNELLA, D.; MÖLLERS, K. B.; FRIGAARD, N.-U.; JENSEN, P. E.; BJERRUM, M. J.; JOHANSEN, K.; FELBY, C. Light-driven oxidation of polysaccharides by photosynthetic pigments and a metalloenzyme. **Nature Communications**, London, v. 7, artigo número 11134, 2016.

HIMMEL, M. E. Biomass recalcitrance: engineering plants and enzymes for biofuels production. **Science**, Washington, DC, v. 315, n. 5813, p. 804-807, 2007.

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, número do artigo 45, 2012.

KITTL, R.; KRACHER, D.; BURGSTALLER, D.; HALTRICH, D.; LUDWIG, R. Production of four *Neurospora crassa* lytic polysaccharide monoxygenases in *Pichia pastoris* monitored by a fluorimetric assay. **Biotechnology for biofuels**, London, v. 5, artigo número 79, 2012.

MURALEEDHARAN, M. N.; ROVA, U.; CHRISTAKOPOULOS, P.; SANDGREN, M. Enhanced release of oxidized sugars by Lytic Polysaccharide MonoOxygenases, by the effect of synergistic action with endoglucanases. In: SYMPOSIUM ON BIOTECHNOLOGY FOR FUELS AND CHEMICALS, 38., 2016, Baltimore, MD. [Anais...]. [S.l: s.n], 2016.

SAMBROOK, J. R.; RUSSEL, D. W. **Molecular cloning**: a laboratory manual. 3rd ed. New York: CHS Press, 2001.

WANG, W.; LIU, C.; MA, Y.; LIU, X.; ZHANG, K.; ZHANG, M. Improved production of two expansin-like proteins in *Pichia pastoris* and investigation of their functional properties. **Biochemical Engineering Journal**, Amsterdam, v. 84, p. 16-27, 2014.

Genomic and mitochondrial assembly of xylose-fermenting yeasts from Debaryomycetaceae family

Andrei Stecca Steindorff¹, Marcelo Soares Souza², João Ricardo Moreira de Almeida³, Eduardo Fernandes Formighieri⁴

Abstract

Cellulosic biomass, especially sugarcane, is an abundant and underused substrate for biofuel production. The poor efficiency of many microbes to metabolize the xylose abundant in hemicellulose fraction of biomass creates challenges for microbial biofuel production derived from pentose sugars. In this study, we present the genome draft assembly of three yeasts from *Debaryomycetaceae* family, as well as the assembly and annotation of mitochondrial genomes from these isolates. Low coverage assemblies were used to assemble mtDNA. tRNA carrying all aminoacids and rRNA (SSU, LSU) were found. Coding genes for COX, COB, NADH dehydrogenase complex, ATP synthase were found as well, excepting ATP8, absent in all three mtDNA. Different strategies were used to assembly total genomes. As result, assemblies with coverages ranging from 80X – 200X and mtDNA reads removed, showed better assembly metrics.

Introduction

The production of cellulosic biofuels presents an economic and environmental challenge and opportunity. From lignocellulosic materials, which include agricultural residues such as sugar-cane bagasse, xylose is the second-most abundant sugar, after glucose. Xylose consumption and consequent fermentation to alcohol on yeasts depends on assimilation enzymes, including xylose reductase, xylitol dehydrogenase and xylulokinase, as well as correct balance of NADH/NAD+ under anaerobic conditions. However, natural xylose fermentation remains slow

¹ Biólogo, doutor em Biologia Molecular, Universidade de Brasília, andreistecca@gmail.com

² Informata, Universidade Católica de Salvador, marcelo@libertais.org

³ Biólogo, doutor em Microbiologia Aplicada, pesquisador da Embrapa Agroenergia, joao.almeida@embrapa.br

⁴ Engenheiro-agrônomo, doutor em Biologia Funcional e Molecular, pesquisador da Embrapa Agroenergia, eduardo.formighieri@embrapa.br

and inefficient in the majority of yeasts tested so far. Therefore, improving xylose utilization in industrially relevant yeasts is essential for producing economically viable biofuels from cellulosic materials (WOHLBACH et al., 2011). In this aspect, yeasts from *Debaryomycetaceae* family are promising candidates for xylose-fermenting experiments (LOPES et al., 2016). Here we present the genome draft assembly of three yeasts from *Debaryomycetaceae* family, as well as the assembly and annotation of mitochondrial genomes from these isolates. All work was developed by Bioinformatics Research Group at the Bioinformatics and Bioenergy Laboratory – LBB. All software used are free to use and run on Linux OS.

Material and methods

Yeasts isolation, sequencing and quality control

Strains A1, A5 and A9 were obtained from wood decaying samples in Brasília, Distrito Federal, Brazil (unpublished data). For each strain, genomic DNA (gDNA) was isolated and sent for sequencing through two strategies: short inserts (Illumina Miseq paired-end 2x250bp) and long inserts (Illumina Hiseq 2000 paired-end long jump distance 2x125 bp with 3Kb insert size).

FastQC (www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/) was used to evaluate the libraries quality before and after trimming. For quality trimming and sequence filtering, the software NGS QC Toolkit (version 2.3.3, www.nipgr.res.in/ngsqctoolkit.html) was employed to remove sequencing adapters residues and low quality reads.

The wet lab work was carried out by Microbial Biotechnology and Yeasts Research Group, and the analysis by Bioinformatics Research Group (LBB/Embrapa Agroenergia).

Genomes assemblies and mitochondrial genomes annotation

Mitochondrial genomes (mtDNA) were assembled using the premise that everything with high sequencing coverage will assemble first at low coverage assemblies. For this purpose, 1x and 2x coverage (based on genome size) assemblies were performed using AllPaths-LG (GNERRE et al., 2011). All assemblies (mtDNA and genomes) present same given coverage of short and

long inserts (2X assembly means 1X of short + 1X of long inserts, 40X is 20X short + 20X long, and so on).

The “clean” datasets for assemblies were obtained with mapping, after quality control, of fastq files onto the previously yeast assembled mitochondrial genome using bwa software (<http://bio-bwa.sourceforge.net/>), and unmapped reads were considered “mtDNA clean data”, rescued using samtools function ‘view -f 12 -F 256’.

Trimmed fastq files were used for *de novo* assembly using AllPaths-LG varying coverages from 40x to 240x. Metrics used on Figure 1 were calculated using a custom per script developed in house. The mitochondrial genomes were annotated using MITOS pipeline (BERNT et al., 2013). This pipeline predicts coding genes, tRNA and rRNA, and makes functional categorization of each structure.

Results and discussion

Regarding the mitochondrial assembly, as expected, the first scaffold from 1x or 2x assembly was mtDNA and the second ribosomal region. In order to verify the presence of residual pieces from mitochondrial genome in other scaffolds of clean assembly, nine complete mtDNA from yeasts were used in blastn comparison and no match was found. Table 1 shows the size of each mtDNA and coverage from each library. It reveals the importance of clean sequencing files before assembly due to the high coverage for such small region, compared to total genome.

Table 1. Mitochondrial genome assembly features. Percent values indicate the representation of mtDNA at sequenced data for each yeast.

	Size	%GC	Miseq	Coverage	LJD 3kb	Coverage
A1	23.3 Kb	29.89	1.80%	5,174X	1.20%	2,472X
A5	32.6 Kb	25.19	6.54%	14,392X	11.40%	12,895X
A9	32.6 Kb	23.41	3.40%	7,704X	3.80%	4,740X

Structural and functional annotation was performed using MITOS pipeline (BERNT et al., 2013). The Figure 1 presents linearized-mapping genome of the

three mtDNAs, all presenting low GC content, ranging from 23.41% to 29.89% (Table 1). They are composed of 39, 48 and 46 genes (A1, A5 and A9, respectively. Results in this order from now on), representing 63, 53 and 56% of total mtDNA and being transcribed by both strands. Among the genes predicted, there are 14, 19 and 20 protein coding genes, including all three subunits of cytochrome c oxidase (COX1, COX2 and COX3), the apocytochrome b (COB), two subunits of ATP synthase (ATP6 and ATP9) and seven subunits of NADH dehydrogenase complex 1 (NAD1-6 and NAD4L). LSU and SSU genes code the large and the small rRNA genes, whereas the other represent 24 tRNA genes able to carry all amino acids in all three yeasts. An interesting fact is the absence of gene ATP8 in all three mtDNA. We compared by sequence similarity (standalone tblastn) and did not find any match in mtDNA or nuclear genome scaffolds.

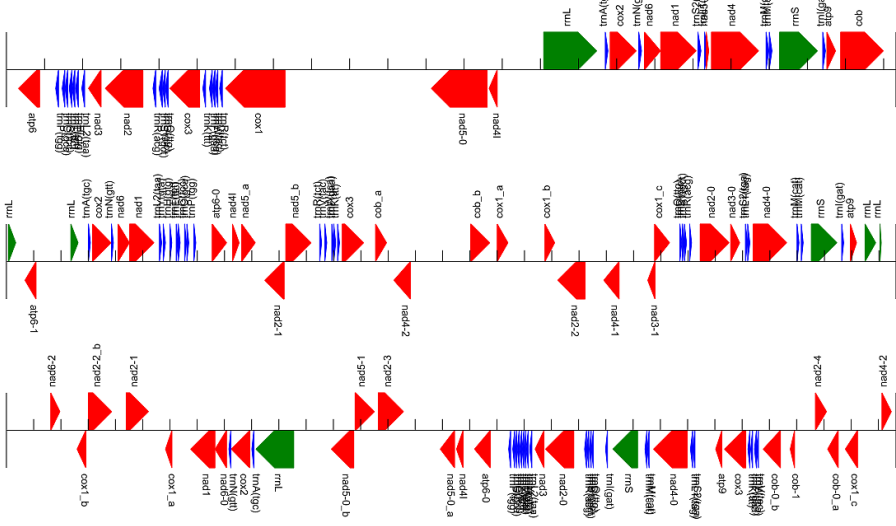


Figure 1. Structural and functional annotation of mitochondrial genomes. Coding genes in red: subunits of cytochrome c oxidase (COX1, 2, 3), the apocytochrome b (COB), ATP synthase (ATP6 and ATP9) and NADH dehydrogenase complex (NAD1-6 and NAD4L); rRNA in green: LSU and SSU genes; tRNA in blue: trnA(tgc), trnC(gca), trnD(gtc), trnE(ttc), trnF(gaa), trnG(tcc), trnH(gtg), trnI(gat), trnK(ttt), trnL1(tag), trnM(cat), trnN(gtt), trnP(tgg), trnQ(ttg), trnR(acy), trnS(gct), trnT(tgt), trnV(tac), trnW(tca), trnY(gta).

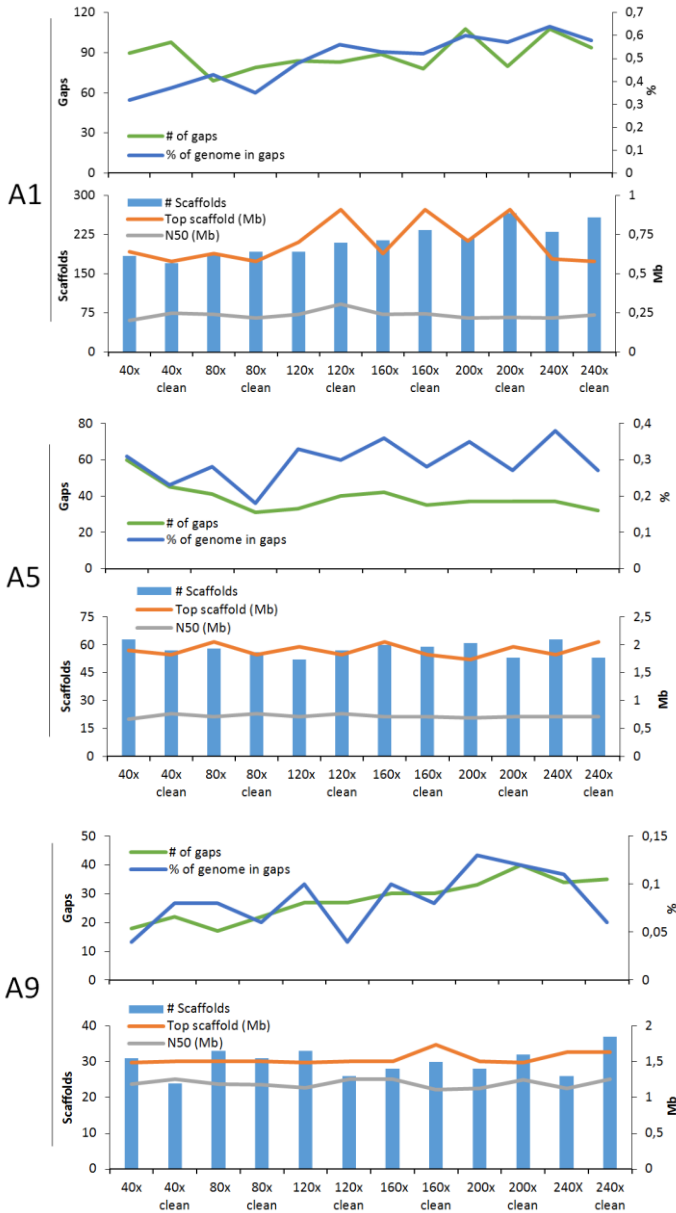


Figure 2. Assembly profile of yeasts genome using different coverages. All assemblies were performed using AllPaths-LG software. “Clean” in this context means that clean assemblies does not contain mtDNA sequences.

Concerning nuclear genome, aiming to reconstruct the genome as accurately as possible, we performed different rounds of genome assembly, varying total genome coverage from 40X to 240X. Figure 2 shows relevant metrics regarding each assembly: Number of gaps, percentage of genome in gaps, number of scaffolds, size of major scaffold and N50. Genome size variation was minimal between assemblies (<0,1%), therefore, was not included in the figure.

The number and size of genome gaps included into the assembly grow up in the same pace of coverage, with the exception of A5 yeast, that reduces and stabilizes after 80X (Figure 2). Other metrics did not change when we increase coverage. The most relevant information of the Figure 2 is that assemblies without organelle reads (clean assemblies) were improved in all metrics for all yeasts analyzed. Based on Figure 1, the sweet spot for better assembly metrics was between 80x and 200x for all yeasts. The size of genomes was comparable with yeasts from *Debaryomycetaceae* family: A1 – 14.5 Mb; A5 – 14.8; A9 – 10.3 Mb. The next step will be the structural and functional annotation of these three yeasts genomes and analysis regarding the phylogenetic relationship between mitochondrial genes and ribosomal regions of yeasts.

Conclusions

In this study, we assembled and annotated the mitochondrial genome from three different xylose-fermenting yeasts. tRNA carrying all aminoacids and rRNA (SSU, LSU) were found. Coding genes (COX, COB, NADH dehydrogenase complex, ATP synthase) were found as well, excepting ATP8, absent in all three mtDNA.

After that, nuclear genome was assembled with and without (clean) mitochondrial sequences. The clean approach improved significantly the final assembly in basically all coverages used. This result showed the importance of clean sequences from “not nuclear” regions before assemblies in order to remove coverage bias and therefore, improve genome assemblies. The next step of this work will be the structural and functional annotation of these nuclear genomes.

Financial support

This study was supported by the Brazilian Agricultural Research Corporation (Embrapa) through a grant provided by 'Banco Nacional de Desenvolvimento Econômico e Social' (BNDES).

References

- BERNT, M.; DONATH, A.; JÜHLING, F.; EXTERNBRINK, F.; FLORENTZ, C.; FRITZSCH, G.; PÜTZ, J.; MIDDENDORF, M.; STADLER, P. F. MITOS: improved de novo metazoan mitochondrial genome annotation. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, San Diego, v. 69, n. 2, p. 313-319, 2013.
- GNERRE, S.; MACCALLUM, I.; PRZYBYLSKI, D.; RIBEIRO, F. J.; BURTON, J. N.; WALKER, B. J.; SHARPE, T.; HALL, G.; SHEA, T. P.; SYKES, S.; BERLIN, A. M.; AIRD, D.; COSTELLO, M.; DAZA, R.; WILLIAMS, L.; NICOL, R.; GNIRKE, A.; NUSBAUM, C.; LANDER, E. S.; JAFFE, D. B. High-quality draft assemblies of mammalian genomes from massively parallel sequence data. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, Washington, DC**, v. 108, n. 4, p. 1513-1518, 2011.
- LOPES, M. R.; MORAIS, C. G.; KOMINEK, J.; CADETE, R. M.; SOARES, M. A.; UETANABARO, A. P.; FONSECA, C.; LACHANCE, M. A.; HITTINGER, C. T.; ROSA, C. A. Genomic analysis and D-xylose fermentation of three novel *Spathaspora* species: *Spathaspora girioi* sp. nov., *Spathaspora hagerdaliae* f. a., sp. nov. and *Spathaspora gorwiae* f. a., sp. nov. **Fems Yeast Research**, Oxford, v. 16, n. 4, 2016.
- WOHLBACH, D. J.; KUO, A.; SATO, T. K.; POTTS, K. M.; SALAMOV, A. A.; LABUTTI, K. M.; SUN, H.; CLUM, A.; PANGILINAN, J. L.; LINDQUIST, E. A.; LUCAS, S.; LAPIDUS, A.; JIN, M.; GUNAWAN, C.; BALAN, V.; DALE, B. E.; JEFFRIES, T. W.; ZINKEL, R.; BARRY, K. W.; GRIGORIEV, I. V.; GASCH, A. P. Comparative genomics of xylose-fermenting fungi for enhanced biofuel production. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, Washington, DC**, v. 108, n. 32, p. 13212-13217, 2011.



**Genética e
Biotecnologia
Vegetal**

Seleção de famílias e genitores de *Jatropha curcas* L. para produção de grãos via modelos mistos

Erina Vitório Rodrigues¹, Bruno Galveas Laviola², Rosana Falcão³, Paulo Eduardo Teodoro⁴, Júlio César Marana⁵, Alexandre Alonso Alves⁶

Resumo

O pinhão-manso é uma espécie com alto potencial para produção de biocombustíveis. No entanto, por ainda encontrar-se em fase de domesticação, necessita de estratégias de seleção de genitores promissores para serem utilizados na formação de populações segregantes superiores. Nesse contexto, o trabalho tem como objetivo estimar a capacidade geral e específica de combinação dos genótipos avaliados e selecionar famílias e genitores de *Jatropha curcas* para produção de grãos, via REML/BLUP. Realizaram-se cruzamentos controlados entre genótipos de pinhão-manso em esquema fatorial desconexo (3x3), totalizando 70 famílias, que foram avaliadas em delineamento de blocos ao acaso, com seis repetições e três plantas por parcela. A variância genética para o caráter produção de grãos em pinhão-manso foi explicada pelos efeitos genéticos aditivos e pelos efeitos de dominância, com predominância dos efeitos aditivos. A seleção de famílias via REML/BLUP é uma estratégia eficiente para identificar as superiores com base no valor genotípico, bem como selecionar maior número de indivíduos promissores dentro da família. A melhor família para produção de grãos em pinhão-manso foi oriunda do cruzamento entre os genitores BAG 270-II-2 e BAG 147-I-2. Os genitores BAG 270-II-2, BAG 167-I-5, BAG 167-I-2, 18 Gen. 811-I-5, DIAL 10 e BAG 107-I-4 são os mais promissores para serem usados em programa de seleção visando ao aumento da produção de grãos em pinhão-manso.

¹ Agrônoma, doutoranda em Genética e Melhoramento de Plantas, Universidade Estadual do Norte Fluminense, erina.rodrigues@colaborador.embrapa.br

² Agrônomo, doutor em Fitotecnia (Produção Vegetal), pesquisador da Embrapa Agroenergia, bruno.laviola@embrapa.br

³ Bióloga, mestre em Ciências Genômicas e Biotecnologia, analista da Embrapa Agroenergia, rosana.falcao@embrapa.br

⁴ Agrônomo, doutorando em Genética e Melhoramento, Universidade Federal de Viçosa, eduteodoro@hotmail.com

⁵ Biólogo, técnico da Embrapa Agroenergia, julio.marana@embrapa.br

⁶ Agrônomo, doutor em Genética e Melhoramento, pesquisador da Embrapa Agroenergia, alexandre.alonso@embrapa.br

Introdução

O pinhão-manso (*Jatropha curcas* L.) é uma espécie perene que apresenta diversos usos, tais como cerca viva, fitorremediação, uso medicinal (SHARMA et al., 2012). No entanto, sua principal utilização é na produção de biocombustíveis (FEY et al., 2014), posto que apresenta alta produtividade de óleo, cerca de 1.200 kg ha⁻¹ a 1.500 kg ha⁻¹, de boa qualidade para produção de biodiesel (LAVIOLA et al., 2014) e a expectativa de se obter alto rendimento de grãos.

Apesar do enorme potencial energético, o pinhão-manso ainda se encontra em fase de domesticação no Brasil. Assim, esforços são concentrados na escolha correta dos indivíduos superiores que serão genitores das próximas gerações, visando obter êxito no programa de melhoramento. Uma das estratégias para identificar os indivíduos com alelos favoráveis para caracteres de interesse é a avaliação genética dos candidatos à seleção.

O dialelo é um dos principais delineamentos genéticos para avaliação e seleção dos genótipos a serem utilizados como genitores, bem como de cruzamentos para praticar a seleção. É possível quantificar a variabilidade genética dos caracteres avaliados, a importância relativa dos efeitos genéticos aditivos relacionados à capacidade geral de combinação (CGC), bem como os efeitos devidos aos desvios da dominância, associados à capacidade específica de combinação (CEC) (CRUZ et al., 2012). Para escolha dos cruzamentos superiores, pelo menos um dos genitores deve possuir alta CGC e o cruzamento possuir alta CEC.

Em plantas perenes, a seleção deve ser realizada com base nos valores genéticos dos indivíduos. Assim, o método mais adequado é o BLUP (melhor preditor linear não viesado), posto que maximiza a diferença entre os valores preditos e os valores reais, maximiza a probabilidade de selecionar indivíduos superiores e maximiza o ganho genético esperado por ciclo de seleção (RESENDE, 2007). A seleção, quando praticada em famílias com elevados valores genotípicos, possibilita maior probabilidade de identificar genótipos superiores.

Diante do exposto, o objetivo deste trabalho foi estimar as capacidades geral e específica de combinação dos genótipos avaliados e selecionar famílias e genitores de *Jatropha curcas* para produção de grãos, via REML/BLUP.

Material e métodos

O experimento foi instalado na área experimental da Embrapa Cerrados, Planaltina, DF, situada a 15°35'30" S e 47°42'30" W, a 1.007 m altitude. O clima é tropical com inverno seco e verão chuvoso (Aw) segundo a classificação de *Köppen*, com temperatura média anual de 22 °C, umidade relativa de 73% e precipitação pluvial média de 1.100 mm. O solo predominante no local foi classificado como Latossolo Vermelho com alto teor de argila.

Realizou-se cruzamentos controlados entre genótipos de pinhão-manso em esquema fatorial desconexo (3 x 3), totalizando 70 famílias, as quais foram avaliadas em delineamento de blocos ao acaso, com seis repetições, três plantas por parcela e espaçamento de 4 m x 2 m. O caráter avaliado foi a produção de grãos (PROD, g planta⁻¹), no segundo ano de colheita.

As estimativas de variâncias e os valores genéticos foram obtidos utilizando o *software* Selegen REML/BLUP, considerando-se o seguinte modelo misto (RESENDE, 2007):

$$y = Xr + Za + Wp + Tf + e,$$

em que, y é o vetor de dados, r é o vetor dos efeitos de repetição (fixos) somados à média geral, a é o vetor dos efeitos genéticos aditivos individuais (aleatórios), p é o vetor dos efeitos de parcela (aleatórios), f é o vetor dos efeitos de dominância de família de irmãos germanos (aleatórios), e é o vetor de erros ou resíduos (aleatórios). As letras maiúsculas X , Z , W e T representam as matrizes de incidência para os referidos efeitos.

Resultados e discussão

Observou-se que a variância genética para o caráter produção de grãos foi condicionada por efeitos genéticos aditivos, bem como pelos efeitos de dominância (Tabela 1). No entanto, houve maior predominância de variância genética aditiva, o que possibilita a obtenção de ganhos com a estratégia de seleção intrapopulacional, visando à alteração da frequência alélica favorável para o caráter em estudo. A estimativa de herdabilidade no sentido amplo apresentou média magnitude, evidenciando bom controle genético na expressão do caráter, o que pode ser comprovado pela acurácia seletiva de alta magnitude ($\hat{r}_{gg}=0,76$).

Tabela 1. Estimativas dos componentes de variância e parâmetros genéticos para produção de grãos (g planta⁻¹) de 70 famílias de pinhão-mansão.

Parâmetros	Produção de grãos (g)
$\hat{\sigma}_a^2$	36424,62
$\hat{\sigma}_{fam}^2$	21301,67
$\hat{\sigma}_e^2$	135221,95
$\hat{\sigma}_f^2$	206518,62
\hat{h}_a^2	0,18
\hat{h}_g^2	0,59
\hat{r}_{gg}	0,76
\hat{c}_{parc}^2	0,07
\hat{c}_{fam}^2	0,10
Média geral	766.99

$\hat{\sigma}_a^2$: variância genética aditiva; $\hat{\sigma}_{parc}^2$: variância ambiental entre parcelas; $\hat{\sigma}_{fam}^2$: variância genética de dominância; $\hat{\sigma}_e^2$: variância residual; $\hat{\sigma}_f^2$: variância fenotípica individual; \hat{h}_a^2 : herdabilidade individual no sentido restrito; \hat{h}_g^2 : herdabilidade individual no sentido amplo; \hat{r}_{gg} : acurácia seletiva; \hat{c}_{parc}^2 : coeficiente de determinação dos efeitos de parcela; \hat{c}_{fam}^2 : coeficiente de determinação dos efeitos da capacidade específica de combinação.

Para a seleção de genitores, considerou-se aqueles que apresentaram estimativas de capacidade geral de combinação (CGC) positivas e de alta magnitude, pois estes contribuem para aumento da expressão do caráter. Com base no ranqueamento, selecionou-se 10 genitores superiores que podem ser utilizados em programas de melhoramento visando ao aumento da produção de grãos em pinhão-mansão (Tabela 2). Além disso, são apresentados os genitores que não são indicados para esquemas de cruzamentos, pois estes contribuem para redução do caráter em estudo.

As estimativas de capacidade específica de combinação (CEC) indicam os desvios de um híbrido em relação ao que seria esperado com base na CGC de seus genitores. Altas estimativas de CEC são importantes no que tange à obtenção de cruzamentos superiores, pois permite maior variabilidade nas gerações segregantes, o que é essencial no processo seletivo. Assim, interessa ao melhorista as combinações híbridas com estimativas de CEC positiva e de alta magnitude e que envolva pelo menos um genitor com estimativas de CGC favoráveis. Observando a Tabela 3, percebe-se que todos os cruzamentos atendem a esse pressuposto e, embora os genitores BAG 283-I-1 e BAG 167-II-5 não estejam entre os 10 superiores, apresentaram estimativas de CGC positivas equivalentes a 54,71 e 22,68, respectivamente (resultados não apresentados).

Tabela 2. Estimativas dos efeitos de capacidade geral de combinação (CGC) dos 10 genótipos superiores e dos 10 inferiores para produção de grãos (g planta⁻¹) em pinhão-mansão.

Genótipos superiores			Genótipos inferiores		
Ordem	Genitor	Produção de grãos	Ordem	Genitor	Produção de grãos
1	BAG 270-II-2	300,50	24	DIAL 5	-66,24
2	BAG 167-I-5	243,53	25	BAG 279-I-4	-67,58
3	BAG 167-I-2	173,98	26	BAG 113-I-4	-103,96
4	BAG 300-I-1	133,06	27	BAG 156-I-5	-107,37
5	18 Gen. 811-I-5	126,35	28	DIAL 16	-150,66
6	DIAL 3	92,25	29	INTER 6	-151,11
7	BAG 199-II-5	85,60	30	BAG 147-I-2	-152,67
8	DIAL 10	73,30	31	DIAL 7	-176,47
9	BAG 107-I-4	58,44	32	INTER 4	-254,78
10	DIAL 2-V-3	56,12	33	BAG 171-I-5	-305,14

Tabela 3. Estimativas dos efeitos de capacidade específica de combinação (CEC) das 10 combinações híbridas superiores e das 10 inferiores para produção de grãos (g planta⁻¹) em genótipos de pinhão-mansão.

Cruzamentos superiores			Cruzamentos inferiores		
Genitor masculino	Genitor feminino	Produção de grãos	Genitor masculino	Genitor feminino	Produção de grãos
BAG 270-II-2	BAG 147-I-2	310,15	INTER 4	DIAL 6	-109,76
BAG 283-I-1	BAG 167-II-5	221,65	DIAL 5	DIAL 7	-118,82
18 Gen. 811-I-5	DIAL 10	215,09	BAG 144-I-1	BAG 167-I-5	-120,18
BAG 283-I-1	BAG 167-I-5	207,15	DIAL 6	DIAL 6	-123,40
BAG 283-I-1	BAG 283-I-1	178,12	BAG 191-I-5	DIAL 10	-129,36
18 Gen. 811-I-5	BAG 167-I-2	157,11	DIAL 7	DIAL 7	-129,56
BAG 191-I-5	DIAL 3	132,81	18 Gen. 811-I-5	DIAL 7	-140,69
BAG 191-I-5	BAG 167-I-2	122,66	INTER 4	BAG 171-I-5	-145,36
BAG 167-I-5	BAG 263-I-1	117,82	INTER 6	BAG 171-I-5	-146,58
BAG 279-I-4	BAG 156-I-5	110,11	BAG 279-I-4	BAG 167-I-2	-160,44
BAG 240-I-2	BAG 107-I-4	94,17	DIAL 5	DIAL 5	-260,96

As 10 famílias selecionadas apresentam valor genotípico superior à média geral (Tabela 4). A família que apresentou maior valor genotípico (1151,06) foi oriunda do cruzamento entre os genitores BAG 270-II-2 e BAG 147-I-2,

confirmando o bom desempenho observado nas Tabelas 3 e 4 para CGC e CEC, respectivamente. A seleção de famílias com base no valor genotípico possibilita selecionar o maior número de indivíduos promissores para produção de grãos em pinhão-mansão.

Tabela 4. Estimativa dos valores genotípicos do cruzamento (Vgc) e novas médias para o caráter produção de grãos (g planta⁻¹) das 70 famílias de pinhão-mansão.

Cruzamentos superiores				Cruzamentos inferiores			
Macho	Fêmea	Vgc	Nova média	Macho	Fêmea	Vgc	Nova média
BAG 270-II-2	BAG 147-I-2	1151,06	1151,06	DIAL 6	DIAL 7	569,83	815,10
BAG 283-I-1	BAG 167-I-5	1123,26	1137,16	DIAL 5	DIAL 5	560,75	811,00
18 Gen. 811-I-5	DIAL 10	1081,91	1118,75	DIAL 6	DIAL 6	536,23	806,64
18 Gen. 811-I-5	BAG 167-I-2	1074,27	1107,63	INTER 4	DIAL 6	521,69	802,19
BAG 283-I-1	BAG 167-II-5	1027,34	1091,57	INTER 4	DIAL 16	521,40	797,87
BAG 167-I-5	BAG 263-I-1	1025,90	1080,63	DIAL 5	BAG 171-I-5	516,34	793,60
BAG 167-I-5	BAG 167-I-5	1007,45	1070,17	INTER 6	DIAL 16	512,00	789,40
BAG 283-I-1	BAG 283-I-1	999,83	1061,38	DIAL 7	DIAL 7	484,77	784,92
BAG 191-I-5	BAG 167-I-2	996,86	1054,21	INTER 6	BAG 171-I-5	392,29	779,23
BAG 270-II-2	BAG 133-I-1	982,64	1047,05	INTER 4	BAG 171-I-5	341,68	772,98

Conclusões

A variância genética para o caráter produção de grãos em pinhão-mansão foi explicada pelos efeitos genéticos aditivos e pelos efeitos de dominância, com predominância dos efeitos aditivos.

A melhor família para produção de grãos em pinhão-mansão foi oriunda do cruzamento entre os genitores BAG 270-II-2 e BAG 147-I-2.

Os genitores BAG 270-II-2, BAG 167-I-5, BAG 167-I-2, 18 Gen. 811-I-5, DIAL 10, BAG 107-I-4, são os mais promissores para serem usados em programa de seleção visando ao aumento da produção de grãos em pinhão-mansão.

Agradecimento

Os autores agradecem à assistente Laíse Teixeira da Costa pela colaboração para realização deste trabalho.

Apoio financeiro

Embrapa, CNPq e Finep.

Referências

- CRUZ, C. D.; REGAZZI, A. J.; CARNEIRO, P. C. S. **Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético**. 3. ed. Viçosa: Editora UFV, 2012. 514 p.
- FEY, R.; MALAVASI, U. C.; MALAVASI, M. M.; SCHULZ, D. G.; DRANSKI, J. A. L. Relações interdimensionais e produtividade de pinhão-manso (*Jatropha curcas* L.) em sistema silvipastoril. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 35, n. 2, p. 613-624, 2014.
- LAVIOLA, B. G.; SILVA, S. D. A.; JUHÁSZ, A. C. P.; ROCHA, R. B.; OLIVEIRA, R. J. B.; ALBRECHT, J. C.; ALVES, A. A.; ROSADO, T. B. Desempenho agrônômico e ganho genético pela seleção de pinhão-manso em três regiões do Brasil. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v. 49, n. 5, p. 356-363, 2014.
- RESENDE, M. D. V. de. **Selegen-Remi/Blup**: sistema estatístico e seleção genética computadorizada via modelos lineares mistos. Colombo: Embrapa Florestas, 2007.
- SHARMA, S.; DHAMIJA, H.; PARASHAR, B. *Jatropha curcas*: a review. **Asian Journal of Research in Pharmaceutical Science**, Delhi, v. 2, n. 3, p. 107-111, 2012.

Highly efficient pipeline to perform integrated analysis of transposable elements and tandem repeats in complex genomes

Lucas Soares de Brito¹, Jaire Alves Ferreira Filho², Marcelo Soares Souza³,
Eduardo Fernandes Formighieri⁴

Abstract

The study of repetitive regions is gaining attention with increase of sequenced genome, mainly the Transposable Elements (TEs, such as LTR) and Tandem Repeats (mainly as microsatellite candidates). This type of analysis demands deep Bioinformatics/IT knowledge and usually takes long processing time. In our study, we present an alternative way to facilitate the user's work by using a single Perl pipeline script, that automates full identification and annotation and improve the analysis performance, including automatization of intermediate steps and avoiding not so rare manual compilation errors. To evaluate the pipeline efficiency and robustness, we tested parameters and run it with different sequences, varying the number of processing cores of the machine. By automating the analysis, the pipeline reduces the execution time for *E. guineensis* from several weeks or months (comparing to previous manual work) to some days, by just using one CPU processor. With 48 processors, it takes only 2 days. This quick and efficient tool can help other works that aims to discover and annotate repetitive content (e.g., SSRs for breeding) and/or improve the repetitive content filtering to obtain better genome assemblies.

Introduction

In the last decades, the DNA sequencing technology passed through several advances, which allowed a huge leap for the genomic sequences analysis. The

¹ Engenheiro de Redes de Comunicações, mestre em Engenharia de Sistemas Eletrônicos e de Automação, Universidade de Brasília, lucas.brito@colaborador.embrapa.br

² Biólogo, doutorando em Genética e Biologia Molecular, Universidade Estadual de Campinas, jaire_hp@yahoo.com.br

³ Informata, graduado em Informática pela Universidade Católica do Salvador, marcelo@juntadados.org

⁴ Engenheiro-agrônomo, doutor em Biologia Funcional e Molecular, pesquisador da Embrapa Agroenergia, eduardo.formighieri@embrapa.br

New Generation Sequencing (NGS), represented by platforms such as Roche/454 and Illumina/Solexa technologies, and the third generation (e.g., PacBio), has contributed with the generation of several new genomic sequencing data. One of the consequences of this phenomenon is that the analysis size and complexity is growing constantly. The genome characterization plays an important role in these analyses, where the functionality of each gene can be described. However, to understand each gene functionality, we also have to characterize non-coding sequences like *repetitive regions*. These regions have several implications on genomic characterization; e.g., it may complicate the assembly process by generating gaps in the DNA sequence. The most important kinds of structures related with repetitive content are tandem repeats and Transposable Elements (TEs).

Tandem repeats are motifs repeated in tandem, and can be classified as microsatellites or minisatellites. Microsatellites are composed by motifs from 1 to 6 base pairs, while the second have larger motifs. Because this type of repetition makes difficult correct transcription, inducing mutation in DNA replication, these regions tend to have a high degree of polymorphism. Thus, considering the variation of the number of similar motifs in different genotypes, these structures are used as potential molecular markers for breeding studies.

There are two classes in *Transposable Elements (TEs)*: class I and class II, subdivided in families, and these last ones into types. In class I we have *Retrotransposons*, which are the most complex, because they replicate to another genome position into the genome through intermediates (transcriptase and reverse transcriptase). Thus, the Retrotransposons replicates by a *copy/paste* mechanism, increasing genome size (GRANDBASTIEN, 1992). The Retrotransposons are also the most abundant TEs in plant genomes, and the main families are *Copia* and *Gypsy*. In the class II, the mechanism of replication is similar to Class I, but without the requirement of intermediates.

Transposable elements are related to the genome size variation and genetic variation. These elements can also be used as markers, with different applications, such as gene therapy, gene silencing, evolutionary studies and epigenetics.

A complete repetitive analysis from a genome, including identification and classification, is a laborious and complex job. Ferreira Filho (2015) performed this analysis from scratch in some plants, made a complete annotation of TEs and microsatellites of an Embrapa genotype of *E. oleifera* (manuscript being

submitted) and it cost a lot of work and time (it took literally months). It was a great effort, which could have been addressed to not automatable problems. This fact motivated us to develop a pipeline to really facilitate and accelerate these analyzes, consistently and reducing the risk of errors. The first version of this pipeline will be presented in this work. The work presented here was developed by Bioinformatics Research Group at the Bioinformatics and Bioenergy Laboratory – LBB. All uses software products are free to use and run in Linux OS.

Material and methods

Software

- **TRF** – *Tandem Repeats Finder* program (<https://tandem.bu.edu/trf/trf.html>), to identify repetitions with any pattern or size, perfect and imperfect. Output with tandem repeats (html format).
- **TRAP** – *Tandem Repeats Analysis Program* (www.coccidia.icb.usp.br/trap/), to compile and categorize results from TRF. Output with sorted tandem repeats (html format).
- **LTR Finder** – (<https://code.google.com/archive/p/ltr-finder/>), to predict locations and structure of full-length LTR retrotransposons accurately. Output all LTRs annotated (text format).
- **RepeatModeler** – (<http://www.repeatmasker.org/RepeatModeler.html>), to identify and model repeat families. Depends on RECON and RepeatScout (*de novo* repeats finding); TRF; Perl programming language, RepeatMasker (described below) and a search engine (RMBlast or ABBlast). Output repeat families (fasta format).
- **NCBI Blast** – *Blast Search Alignment Tool* (www.ncbi.nlm.nih.gov/guide/howto/run-blast-local), to compare sequences against TEs databases aiming annotation. Output matches ('-t 6' tabular format).
- **RepeatMasker** – (<http://www.repeatmasker.org/>, Tarailo-Graovac and Chen (2009), to identify, annotate and mask repetitive elements. The masked version (Ns at TEs regions) permits better genome assemblies. Output: i) repeats ('cat' format, similar to fasta); ii) annotation (tabular format); iii) masked sequences (fasta format); and iv) report (text format).

Biological material (DNA sample)

We tested the pipeline into four plant genomes (data not shown), but used one of them to build performance metrics for this work: *Elaeis guineensis* (EG5) (from NCBI, January 2015). We used the .fna file (fasta format), which contains the draft of the 16 chromosomes and other 40,044 unplaced scaffolds. The total length of this fasta is ~1.5 Gbp (Giga base pairs), the maximum scaffold length is ~65 Mbp and the *N50* is ~1.2 Mbp. The average GC content is 37.21%, and it presents 164,421 gaps, or 31.14% of the genome.

Methods

The goal of this pipeline is the simplified execution of chosen repeats analyzes efficiently, respecting the dependencies and processing intermediate files in order not to require any user interaction after it starts.

To achieve that, the strategy was: i) select the best tools for each step; ii) choose a suitable programming language; iii) setup hardware and software infrastructure (more infrastructure details on the work of Marcelo S. Souza, this same event); iv) test tools parameters; v) build auxiliary scripts; vi) develop and test basic pipeline; vii) improve pipeline; viii) validate pipeline; ix) write documentation and pipeline disclosing.

Chosen language was Perl (structured), and the Operational System (OS) was Linux (all used tools was developed just for this OS). Additional scripts, needed to connect some of the steps, provide auxiliary functionalities, such as well as data format conversion, concatenation and filtering. To make possible the full automation, we used a unique configuration file (text format), which includes parameters for all stages of the pipeline, such as original options for each of the bioinformatics software and choose of modules to run (one, some or all pipeline steps).

For the pipeline optimization, we used parallelism techniques (Perl *fork*) and normalized the multithreads capacity into a single pipeline parameter, maximizing the use of processors for all tools. In other words, with one parameter setup, you can get the best out of your machine processing for all analyses. More details about the pipeline can be found in the pipeline documentation, at the code itself, and, as soon as possible, in a publication of the final version.

Results and discussion

We develop the pipeline with Perl language. The final script is automated, modular and parallelized. Its structure is shown in Figure 1, where we can see the parallelism between tools (TRAP, LTR Finder and RepeatModeler) and the main steps and dependencies.

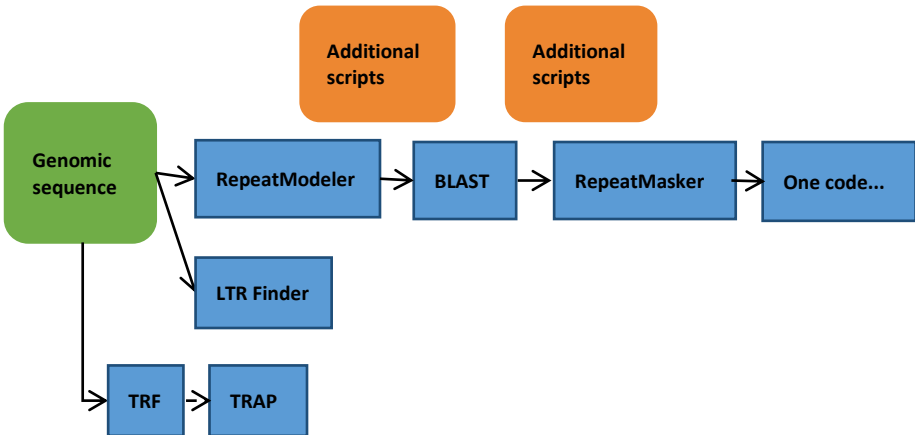


Figure 1. Pipeline structure.

To run the pipeline, up to main three steps: i) install Linux software packages (if is the very first time); ii) setup config file (the config file includes suggestions whenever possible); and iii) run a unique and simple command line.

Automation

To be done manually, one needs to choose tools, install each one (and its dependencies), learn and test, understand, convert and in some cases still need to process and filter output from one tool to the demanded for the next one. All of this depends on Bioinformatics/IT skills. We turned all these steps (and a few more things) into one command line.

How to run

Before running the pipeline command, there are a few requirements to follow, listed below:

- Define and/or create a folder for the results (Linux OS), and set the path into the config file.
- Put the completed config file and your fasta file into the results folder.
- Execute the main script (below) inside this results folder:
\$ rep_pipeline <name of your fasta file>

Multithread performance

We tested all multi thread tools and normalized all of them into one configuration parameter. Table 1 shows the user execution time, for each main pipeline software and for two cases: one processor and 48 processors. By looking at this table, we can see the huge gain of performance in execution time. The largest gain was in the *RepeatMasker* step, followed by *RepeatModeler*.

Table 1. Pipeline execution time according to the number of processors.

Time x Processors	1	48
TRF	0 day(s), 00:58:05	0 day(s), 00:58:03
TRAP	0 day(s), 00:14:22	0 day(s), 00:13:32
LTR Finder	0 day(s), 04:54:37	0 day(s), 04:47:08
RepeatModeler	2 day(s), 07:00:13	0 day(s), 21:46:09
Auxiliary	0 day(s), 00:00:03	0 day(s), 00:00:02
Blast	0 day(s), 00:00:52	0 day(s), 00:00:28
Post Blast	0 day(s), 00:00:10	0 day(s), 00:00:12
RepeatMasker	9 day(s), 02:40:57	0 day(s), 16:17:24
Post RepeatMasker	0 day(s), 04:14:00	0 day(s), 00:47:33

Format: "day, hh:mm:ss".

Conclusions

The developed pipeline is able to execute in a simple and efficient way a complex and complete analysis of repetitive regions, including Tandem Repeats and Transposable Elements of all present classes, families and types.

A configuration file works very well in this context, since it can contain into just one file: parameters for all tools and steps, optimized parameters from literature, and also comments explaining each tool and each parameter.

In the near future, we aim to provide installation packages for used tools, to do some additional improvement and then publish the full work and the codes.

Financial support

This study was supported by the Brazilian Ministry of Science, Innovation and Technology (MCTI) through a grant (DENDEPALM) provided by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico (CNPq).

References

GRANDBASTIEN, M.A. Retroelements in higher plants. **Trends in Genetics**, Cambridge, v. 8, n. 3, p. 103-108, 1992.

TARAILO-GRAOVAC, M.; CHEN, N. Using RepeatMasker to Identify Repetitive Elements in Genomic Sequences. **Current Protocols in Bioinformatics**, New York, chapter 4, unit 4.10, 2009.

FERREIRA FILHO, J. A. Caracterização de sítios polimórficos e sequências repetitivas, e estabelecimento de coleção nuclear de caiaué [*Elaeis oleifera* (Kunth) Cortés]. 2015. 112 p. Dissertação (Mestrado) – Universidade de Lavras, Lavras, MG. Originalmente apresentada como dissertação de mestrado à EMBRAPA Agroenergia.

Bioenergy Metabolomics DB

*Marcelo Soares Souza¹, Vanessa de A. Soares², Lucas Soares de Brito³,
Patrícia Verardi Abdelnur⁴, Eduardo Fernandes Formighieri⁵*

Abstract

In the last years, with the evolution of the mass spectrometry, the metabolites databases passed through a large information increase. This growth generated a demand for computational systems to store this information, which requires several additional tools, instances and a well-prepared infrastructure (e.g., servers, storages and hardware maintenance). The objective of this work is to present the current stage of the Bioenergy Metabolomics DB system development, and its main planned functionalities. To build this system we used free software and tools, like the Python language, Django framework, PostgreSQL database and the Git version control. The adopted development method was based on Scrum, with the adoption of sprints and frequent meetings. The hardware and software infrastructure is installed, configured and in production. The “Base system”, called GBP, which comprises the main functionalities of the system, is already functional and almost complete, and we are working into the Metabolomics related modules.

Introduction

Metabolites are small molecules chemically transformed during metabolism and, in this way, provide a functional reading of the cellular state. The set of metabolites of an organism is called metabolome (BAKER, 2011). With the mass spectrometry evolution (e.g. instrumentation, software products and bioinformatics), it is possible to measure thousands of metabolites simultaneously from minimal sample amounts, resulting in large information increase to the metabolites databases in the last years (PATTI et al., 2012).

¹ Informático, graduado em Informática pela Universidade Católica do Salvador, marcelo@libertais.org

² Engenheira de Software, graduada em Engenharia de Software, Universidade de Brasília, vanessa.soares@colaborador.embrapa.br

³ Engenheiro de Redes de Comunicações, mestre em Engenharia de Sistemas Eletrônicos e de Automação, Universidade de Brasília, lucas.brito@colaborador.embrapa.br

⁴ Química, doutora em Química Orgânica, pesquisadora da Embrapa Agroenergia, patricia.abdelnur@embrapa.br

⁵ Engenheiro-agrônomo, doutor em Biologia Funcional e Molecular, pesquisador da Embrapa Agroenergia, eduardo.formighieri@embrapa.br

Through the metabolomics, it has been identified alternative paths in metabolic pathways, in many cases related to specific phenotypes. Despite the technology great advances, the results are still lists of molecular formulas, being necessary a contextual analysis to define the most likely compounds in each case. The complexity and the large amount of data generated, added to the large amount of resources invested, such as equipment and protocols development, have generated demand for the development of computational systems, to enable and optimize the use of data. This system must to store the information in a safe, centralized and organized way, allowing easy access to the information and reports, with specific access control for the different types of information.

The system development involves several tools and instances, including: Data Base Management System (DBMS), for an organized, safe and quick information access storage; Programming language, base for the system development; Framework, to speed up the development and facilitate its maintenance; and documentation and development best practices, aiming at both the development process improvement and the future maintenance possibility, increasing the system lifetime.

Additionally, an appropriate infrastructure is necessary for the system availability, including server racks with real and virtual servers, backup system, access control, storage and constant hardware and software monitoring and maintenance.

This work presents the current development state of *Bioenergy Metabolomics DB*, that aims to store metabolomics analyses raw data in a safe and organized manner, allow advanced searches, reports generation and, further, external access to selected data. This work was developed by Bioinformatics Research Group at the Bioinformatics and Bioenergy Laboratory – LBB (lbb.cnpae.embrapa.br), in collaboration with the Metabolomics Research Group (“client”). All used software products are free to use and run in Linux OS.

Material and methods

Material

Only Free or Open Code software have been selected. All of them are consolidated, with large amount and variety of documentation and with good global growth prospects of continuity.

It was chosen the multi-paradigm programming language Python (<https://www.python.org>), widely used for systems development for the Web and with growing adoption by the Bioinformatics area researchers and professionals. To enhance the results, facilitate the collaborative development and increase the system life cycle, it was adopted the Django framework (<https://www.djangoproject.com>), a library that provides a set of functionalities commonly used for the web platform development, based on the model-template-view (MTV) standard.

For the data storage it was adopted the Object-Relational Data Base Management System (ORDBMS) PostgreSQL (<https://www.postgresql.org>), a robust and scalable solution for data storage, handling and availability for computational systems, and that uses the research language called Structured Query Language (SQL). PostgreSQL also can be used by other bioinformatics tools, allowing an easy data interchange.

All the development process is being done using the “best practices” of code development and maintenance, assisted by the Git version control tool (<https://git-scm.com/>) and supported in the GitLab platform (<https://about.gitlab.com>), which provides a simpler interface, allowing a better monitoring of the activities as well as tracking changes made throughout the development process.

Methods

Several meetings were made for the knowledge of the features needed so that the system meets the demand the best way possible (requirements gathering). From these information, it was made an initial system planning, needed for tooling establishment and suitable methods.

The architecture chosen is based on the MTV model, base of the Django framework. This model consists on the separation of the system in related layers, providing a better logical separation of the system subparts and a better maintainability, making it safer and more effective.

The MTV standard divides the platform into three layers, namely: i) *Template*, directly accountable for the interaction with the user; ii) *Model*, responsible for the persistence (storage) of the data in the Data Base and for the setting of business rules for the data processing; and iii) *View*, responsible to intermediate the relation between the interaction with the user layer (through the Templates) and the data.

The data modeling is intrinsically related to the business rules modeling in the Model layer, and it has not been made a traditional modeling based on Model Entity Relationship.

It was adopted a method of fast development based partially on the Scrum model (<http://scrummethodology.com>), an iterative and incremental development framework used in the project management mainly in software development. It was defined a general scope through *Brainstorming* meetings, where it was defined the essential requisites and more important business rules. It is held weekly meetings of development monitoring of the tasks in LBB, in which is presented and discussed what was made and the next actions are defined (*sprints* – www.scrumguides.org/scrum-guide.html). These tasks are constantly revised in order to ensure the most possible proper delivery to the updated client demand.

The development system is composed by a base and by subsystems. The base is the GBP, a registration, edition and visualization system of the Projects data made at LBB. In GBP are registered, for example, the Users (Team), Project general Data, Specific Objectives, Expected Results, Components, Plan of Action, Activities and Tasks. This detailing level is necessary to allow detailed access control based on the projects information, and is being developed in a flexible and comprehensive way in order to accommodate different specific modules to be developed at LBB.

The subsystem Bioenergy Metabolomics DB was planned to be an application of support to activities of Metabolomics, which extends the functionalities of the GBP and offers an interface for the management of experiments (storing results), equipment, methods and techniques used, providing a database that will be the basis both for the external availability of selected information and for the creation of a decision support System (definition of metabolites through the molecular formulas), through the last planned module.

Results and discussion

In terms of hardware and software infrastructure, the servers operational systems (Ubuntu - www.ubuntu.com and Debian – <https://www.debian.org>) were updated in the real servers (last Long Term Stable version), virtual machines were installed and configured on KVM (www.linux-kvm.org), including, among others, one for backup (Bacula – www.bacula.org), one for PostgreSQL DBMS and one for infrastructure management tool (Zabbix – www.zabbix.com). All the needed tools to the development were installed, configured and tested.

GBP Base

After completion of the infrastructure, the next step was the development of GBP (Projects Basic Management), which first version is nearing completion, already including the registration of projects and of all correlated data. To finished it, we are working into navigability and documentation aspects, but it already has a stable basis to enable the development of the subsystem *Bioenergy Metabolomics DB*. The Figure 1 shows one of the interfaces of GBP.

The screenshot displays the GBP beta interface. At the top, there is a navigation menu with items: Início, Projetos, Sequenciamento, Administrar, and Logout (marceloss). Below this is a breadcrumb trail: Projetos (5) > Obj. Especificos (1) > Resultados (1) > PCs (1) > Metas (1) > PAs (1) > Atividades (1) > Tarefas (1) > Instituições (2) > Keywords (1). The main content area is titled 'Projeto XYZ' and contains a form with the following fields:

- Resumo:** A text area containing placeholder text: "Lorem ipsum dolor sit amet, sem vulputate quam suscipit, sapien arcu augue, proin senectus eros amet commodo ornare, egestas lectus quam vitae ridiculus, maecenas vitae nonummy. Fells integer laoreet vel, risus luctus porttitor, netus nunc ligula at nam, maecenas sit dul, augue erat sociosqu."
- Situação:** A dropdown menu with the selected value 'Planejamento'.
- Líder:** A text field containing 'Marcelo Soares'.
- Código SEG:** A text field containing '0001'.
- Título (Português):** A text field containing 'Projeto XYZ'.
- Título (Inglês):** A text field containing 'Projeto XYZ'.
- Data Início:** A text field containing '28 de Julho de 2016'.
- Duração (Meses):** A text field containing '1'.

Figure 1. GBP beta interface example – top of the project general data CRUD (Create, Read, Update, Delete) page.

The Figure 2 presents the initial development of a visualization/navigation interface, as a simple way to find data to posterior detailed visualization.

The screenshot displays the top of a web interface for project management. At the top, there is a navigation bar with links: 'Início', 'Projetos', 'Sequenciamento', 'Administrar', and 'Logout (marcelos)'. Below this is a breadcrumb trail: 'Projetos (5) > Obj. Especificos (1) > Resultados (1) > PCs (1) > Metas (1) > PAs (1) > Atividades (1) > Tarefas (1) > Instituições (2) > Keywords (1)'. A secondary navigation bar contains a 'Sigla' button, an 'Atualizado Em' dropdown menu, and an 'Adicionar' button. The main content area shows the details for 'Projeto XYZ':
- **Título:** Projeto XYZ
- **Líder:** Marcelo Soares
- **Situação:** Planejamento
At the bottom of the card are 'Editar' and 'Apagar' buttons. A timestamp '28 de Julho de 2016 às 15:15' is visible in the bottom right corner of the card.

Figure 2. GBP beta interface example – top of the projects main information visualization page.

Bioenergy metabolomics DB subsystem

The *Bioenergy Metabolomics DB* is in the final stages of requisites analysis, with face-to-face meetings and defined scope for the first module, which will include the equipment and processes management to be made by the researchers, and the subsystem specific authorization profiles.

Initial module (internal)

Seeks an organized storage of the pre-existing metabolomics results of the client, including advanced searches, download of raw and compiled data files, and organized results presentation. It is under advanced phase of planning, and will be a quick and simple solution for initial organization of the present results.

Raw-data DB module (internal)

This module aims at the complete organization of the client metabolomics analyses, including registration and edition of all the equipment, types of analyses and its parameters. Also for all the results (linked to people, projects, biological material, equipment, analysis, parameters etc). It is in advanced stage of requirements gathering and planning.

Metabolomics DB module (external)

It seeks the external and controlled availability of selected information. It will be the public interface for research relevant results availability, in principle by previous registration. In phase of requisites gathering and initial planning.

Decision support module (internal)

Aims to help the decision-making on the metabolites setting from the chemical formulas generated by the metabolomics analyses. In stage of requirements gathering, it will be better evaluated in the final development phase.

Conclusions

These methods showed to be essential to a safer and more efficient evolution of the development, and are indispensable to reduce the inherent risks to any web based system, like unavailability and data loss. The chosen tooling showed to be suitable and efficient, and will be used in the next subsystems to be developed at LBB.

The accurate definition of the demand is an essential stage, and the meetings for demand definition (project and development scopes) generated an additional learning for both parts involved, and became gradually more efficient.

Financial support

This study was supported by the Embrapa (Project: Functional genomics, transcriptomics and metabolomics, of xylose-fermenting yeast for increasing efficiency in the production of second generation ethanol - YEASTOMICS. SEG: 02.12.01.006.00.00).

References

- BAKER, M. Metabolomics: from small molecules to big ideas. **Nature Methods**, London, v. 8, n. 2, p. 117-121, 2011.
- PATTI, G. J.; YANES, O.; SIUZDAK, G. Metabolomics: the apogee of the omics trilogy. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, London, v. 3, n. 4, p. 263-269, 2012.

Specific Quality Control is essential for Next-Generation Sequencing data usage: case studies in Illumina data from algae, yeasts and plants

Brenda Neves Porto¹, Andrei Stecca Steindorff², Lucas Soares de Brito³,
Eduardo Fernandes Formighieri⁴

Abstract

Next-Generation Sequencing technologies have contributed extensively to genomic studies due to the high-throughput data generation. However, errors can occur during the sequencing process and need to be removed before other analyses, otherwise, lead to understated results or wrong conclusions. In this paper we evaluate common errors of Illumina sequencing technology, such as: reads quality, adapter and vector residues, insert size of Long-Jumping Distance libraries. We evaluated data from algae, yeasts and plants, and propose guidelines for Quality Control.

Introduction

Next-generation sequencing (NGS) technologies have expanded the breadth of genomics. Genome data, once restricted to model organisms, can now be generated for any species at remarkable speed and low cost (TRIVEDI et al., 2014). An annotated genome draft provides an *in silico* preview of species metabolism, and it's a base for other "omics" approaches, such as Transcriptomics, Metabolomics, Exomics etc. However, although cheaper, DNA sequencing technology still generates small fragments that needs to be reassembled.

Usually, millions of reads are generated for a genome assembly, and the number of errors accompanying the increase in the speed of data generation. To ensure quality of the data set, errors such as: i) wrong identification of nucleotide;

¹ Bióloga, doutora em Biotecnologia Vegetal, Universidade de Federal de Lavras, brenda.neves@colaborador.embrapa.br

² Biólogo, doutor em Biologia Molecular, Universidade de Brasília, andreistecca@gmail.com

³ Engenheiro de Redes de Comunicações, mestre em Engenharia de Sistemas Eletrônicos e de Automação, Universidade de Brasília, lucas.brito@colaborador.embrapa.br

⁴ Engenheiro-agrônomo, doutor em Biologia Funcional e Molecular, pesquisador da Embrapa Agroenergia, eduardo.formighieri@embrapa.br

ii) contamination and iii) residues of adapters, must also be identified and corrected and/or trimmed.

Data set Quality control (QC) is essential for raw NGS data not to lead to underused data and/or erroneous conclusions. Among the different sequencing platforms, the Illumina (www.illumina.com/systems.html) is the most used (YANG et al., 2013). During the QC analysis for assemble, low-quality reads are removed, as well as sequences from primers, vectors, adapters and contamination. Also, some repetitive content can be marked or separated to not disturb the assembly process (PATEL; JAIN, 2012; ZHOU et al., 2013).

In this study, we evaluated different sets of data and propose Quality Control guidelines to be applied in data sequencing from Illumina, aiming to improve the genome assembly. All work was developed by Bioinformatics Research Group at the Bioinformatics and Bioenergy Laboratory - LBB (lbb.cnpae.embrapa.br). All used software products are free to use and run in Linux OS.

Material and methods

Material

The data set is composed by DNA sequences from two strains of algae (LBA32 and LBA40), three yeast isolates (A1, A5 and A9) and two species of plants (*Attalea speciosa* and *Acrocomia aculeata*). The *Mi-Seq* technology was used to generate *paired-end* (PEs) data from algae and yeasts short insert libraries (SIL). *Hi-Seq* technology was used to generate PEs from plants SIL, and from yeasts and plants Long Jumping Distance Libraries (LJDL).

Reads quality and trimming

The quality visualization of all data sets, before and after filtering and trimming, was performed using the FastQC software, with default parameters (v. 0.11.5, www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc). FastQC generates a html formatted result, including general statistics and several graphs for different aspects of reads composition, such as Ns, kmers, adapters, quality and bases proportion. All graphs present an indicative status icon, and must to be evaluated. Usually, the problems are: quality, residues from adapters and contamination.

We evaluated two of the main software's for reads QC: FASTX-Toolkit (v. 0.0.13, http://hannonlab.cshl.edu/fastx_toolkit/) and the NGS QC Toolkit software (v. 2.3.3, www.nipgr.res.in/ngsqctoolkit.html). NGS QC was chosen for next steps because it presents more complete analysis and a graphic interface. We tested different parameters to improve the quality of reads, such as percentage of reads with minimum quality, phred quality threshold, end trimming, and cleavage of adapters and vectors.

Analysis of insert size for LJD data

To evaluate the insert size of LJD libraries from yeast, we used BWA software (v. 0.7.15, <https://sourceforge.net/projects/bio-bwa/files/>) to map these read pairs against its own genome, then sort results using software SAMtools (v. 1.3.1, <https://sourceforge.net/projects/samtools/files/>), and finally held metric insert size with Picard-Tools software (v. 1.119, <https://broadinstitute.github.io/picard/>). For *Acrocomia aculeate* data set, we follow the same method, except for genome used as reference for mapping, since we used the know genome of the closest specie, *Elaeis guineensis* EG5 (www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/2669?genome_assembly_id=34040).

Results and discussion

Reads QC

Data sets generated by Illumina *Mi-Seq* sequencer (PEs libraries from algae and yeasts) present most of reads with length of 251 bp. They are similar in quality, and after some tests, we choose these parameters for quality filtering, aiming a basic trustable data set for assemblies: 70% reads / phred \geq 20 (70/20). At Figure 1, we present some FastQC graphs from LBA32 algae data, being part 'A' a quality plot from Raw data, and 'C' a plot from filtered and trimmed data. The yellow boxes represent data frequency from Percentil 25 to 75, with a red line at median.

The parts 'B' and 'D' of the Figure 1 show nucleotide distribution of all reads along reads position. Considering the pairing of the nucleotides (AT/CG) and that we are showing millions of reads, by chance, we should see just four parallel lines, like the central region of the graphs. The first (5') positions present a typical bias of Illumina library build, but a bias at the final (3') positions can indicate the

presence of non-trimmed adapters, or, residues from sequencing that must be cut. After filtering and trimming, we recovered 80% of data from algae (LBA32 e LBA40) and 90% of data from yeast (A1, A5 e A9).

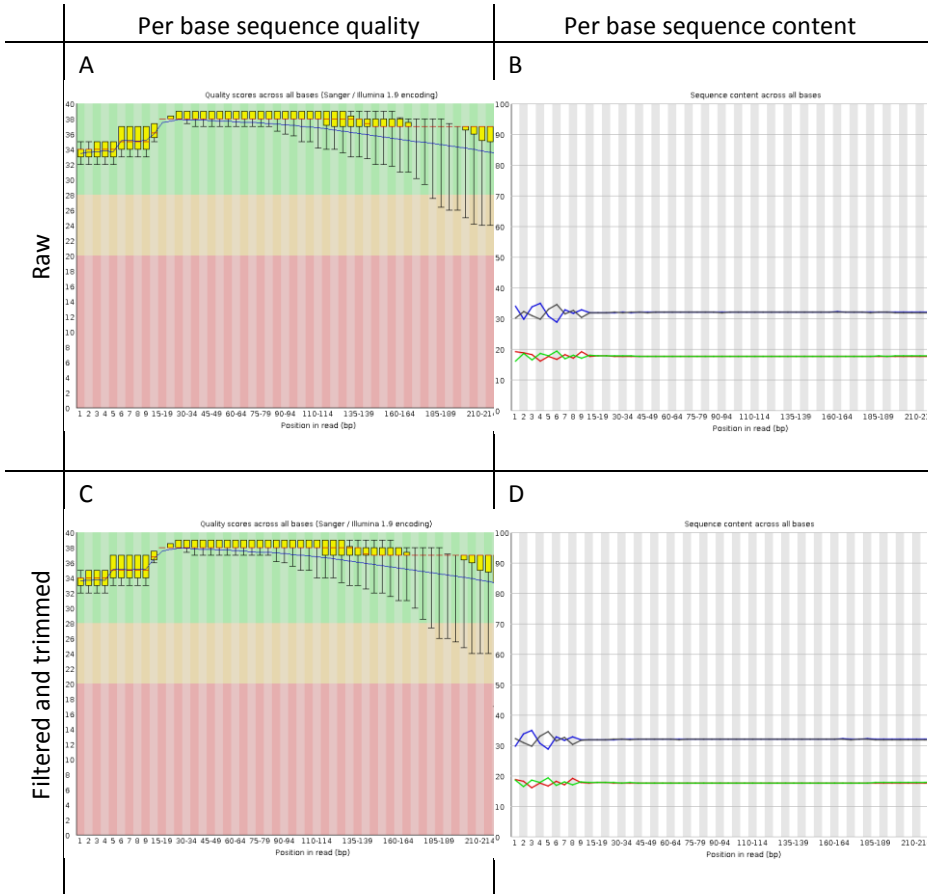


Figure 1. LBA32 algae data set visualization through FastQC. Raw (A and B) versus Filtered/trimmed (C and D) data. Filter parameters: 70% of reads with at least quality phred 20. Trimming parameters: trim 3 bases at 3' end.

Data sets generated by Illumina *Hi-Seq* sequencer present most of reads with length of 125 bp (*High Output Mode*, PEs and LJD libraries from *A. aculeata*) or 150 bp (*Rapid Run Mode*, PEs from *A. speciosa*). The PEs libraries sequencing of

the *A. speciosa* and *A. aculeata* generates discrepant quality: very poor in the first case (Figure 2A) and very high in the second (Figure 2C).

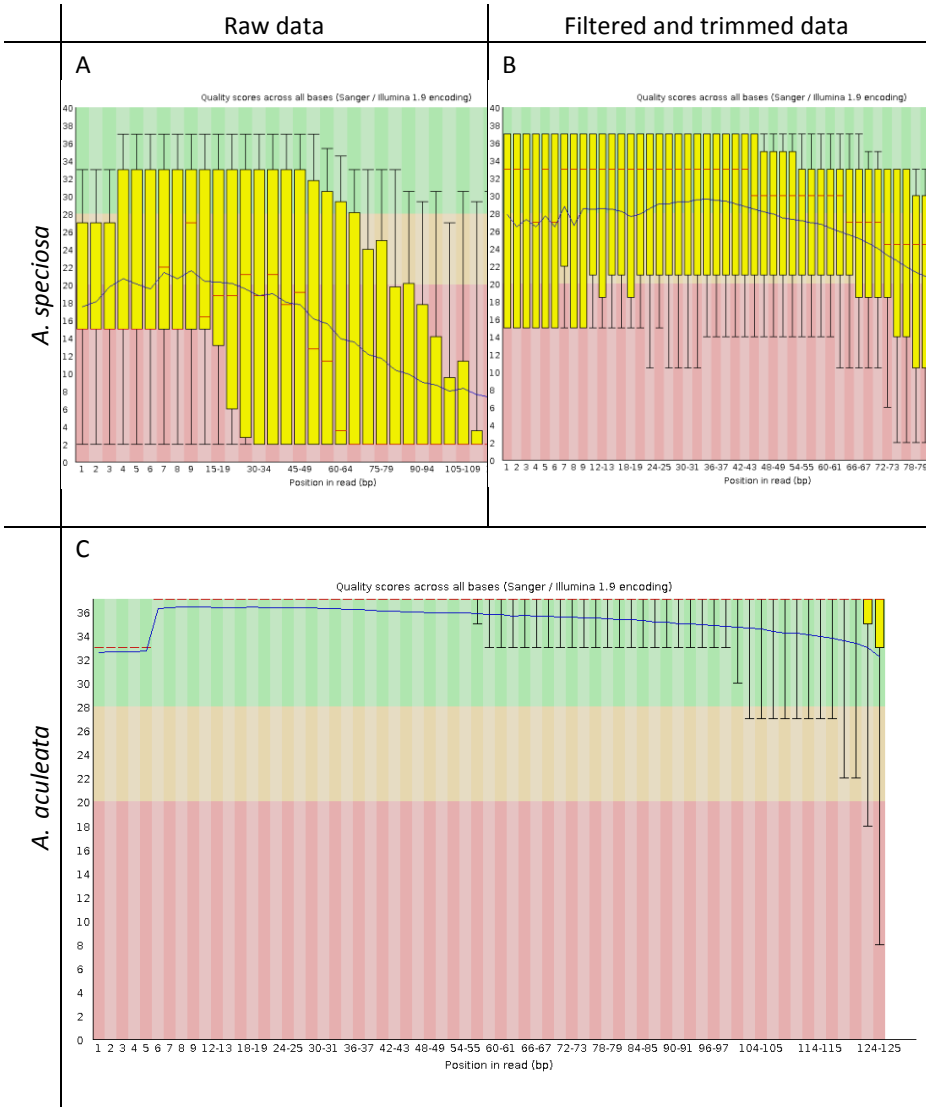


Figure 2. Plants Hi-Seq results: *A. speciosa* ('A' and 'B') and *A. aculeata* ('C') data sets visualization through FastQC. Raw ('A' and 'C') and Filtered/trimmed ('B'). Filter parameters: 50% of reads with at least quality phred 20. Trimming parameters: 10 nt 5'-end, 40 nt 3'-end.

DNA samples degradation during transportation and the mode of run are the most likely causes of the poor quality. We tested some QC approaches, and choose by cost/benefit: cut 10 bp at 5'-end and 40 bp 3'-end, filtering reads with at least 50/20, resulting only 40% of original data (Figure 2B), even with low quality (with 70/20, remain only 10%). Moreover, it was not necessary to trim or filter the *A. aculeata* data (Figure 2C).

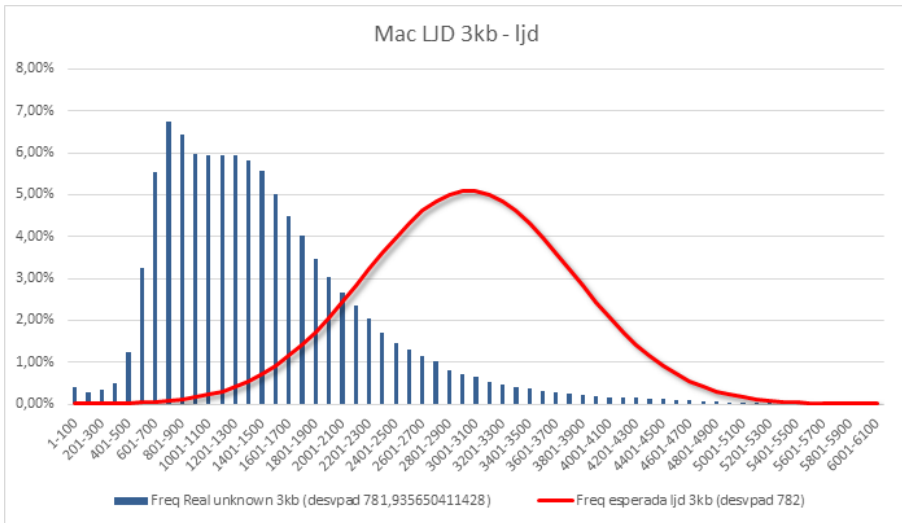
LJD libraries insert sizes

LJD libraries usually generate less reads than PEs, but although most of the quality assessment is similar, an additional step is required to evaluate insert size (distance between pairs at the original DNA sequence). To evaluate the data set from *A. aculeate*, presented at Figure 3, we used a draft genome from the closest specie with genomic sequences public available (*Elaeis guineensis* EG5) as reference, based in the premise that most part of mapped pairs will be in relatively conserved regions. Around 30% of the reads mapped, what means millions of matches, and a representative sample to support our discussion. Yeasts analysis presented similar patterns.

Figure 3 patterns shows that most part of the data generated from LJD libraries present sizes smaller than expected. Based in this analysis, it is needed to regroup read pairs according to the insert size, considering the limit standard deviation of used assembler, to allow better assembly.

LJD file data set

A



PE file data set

B

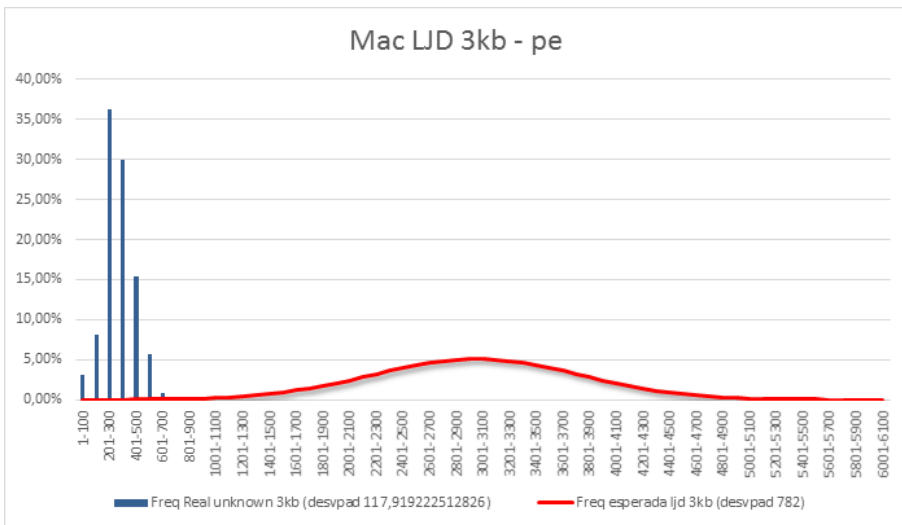


Figure 3. *Acrocomia aculeata* - insert size evaluation from LJD sequencing. The normal distribution curves (as reference, in red) was built with the parameters: *mean* = 3,000; *standard deviation* = 782 (same value found in real mapped data from LJD file).

Quality Control guidelines for Mi-Seq and Hi-Seq data

As a final result, summarizing and systematizing the analysis, we present guidelines to be considered in Quality Control of Illumina sequencing data:

- a. Run FastQC into each raw data file and take a look at the graphs, mainly:
 - Per base sequence quality (Figure 1 and 2) – check data quality and define quality filter initial parameters to test.
 - Per base sequence content (Figure 1) – check lines, compare to quality, define ends trimming.
- b. Run NGS QC Toolkit for each pair of files (R1 and R2), varying filter parameters according to previous evaluation, assembler to be used, genome size and complexity, and amount of data or genome coverage (e.g. 70/20, 70/30, 80/20), and run again FastQC for each filtered file. The NGS QC can: i) remove low quality reads; ii) cut adapters and vectors; and iii) cut under demand 5'-end and 3'-end of all reads.
- c. Alternatively, and/or complementary, you can run Trimmomatic (www.usadellab.org/cms/?page=trimmomatic) using similar parameters.
- d. After running these tests and define the better parameters, remember to delete all other results (keep just the FastQC results). Compact original files and work from now with filtered ones. If there is low disk space, develop a script to run filtering, FastQC, and then delete filtered files before run next test.
- e. For LJD data, also do the insert size evaluation (download the closest genome, map with BWA, sort (SAMtools), measure (Picard-Tools), regroup mapped data according to insert size).
- f. Additional tips to help assemblies: i) find and separate reads from organelles; ii) verify other contamination (e.g. Blast); iii) check organism identification (phylogeny of ribosomal and mitochondrial genes); iv) filter repetitive content; v) talk to a bioinformatician before hiring sequencing – seek collaboration during project planning.
- g. Check other works of this event that complement the information of this work: Lucas S. de Brito – Repeats; Andrei S. Steindorff – Yeasts assembly.

Conclusions

Quality Control of sequencing data is not a simple task. It demands robust infrastructure of hardware and software, specific software and several tests with different parameters. However, some guidelines can make the job easier.


Insert size of LJD data is an undervalued issue. Use the correct values of insert size during is definitely an important aspect for genome assembly.

Financial support

This study was supported by the Brazilian Ministry of Science, Innovation and Technology (MCTI) through a grant provided by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico (CNPq).

References

- PATEL, R. K.; JAIN, M.. NGS QC Toolkit: a toolkit for quality control of next generation sequencing data. **PLoS One**, San Francisco, v. 7, n. 2, p. e30619, 2012.
- TRIVEDI, U. H.; CÉZARD, T.; BRIDGETT, S.; MONTAZAM, A.; NICHOLS, J.; BLAXTER, M.; GHARBI, K. Quality control of next-generation sequencing data without a reference. **Frontiers in Genetics**, Lausanne, v. 5, p. 111, 2014.
- YANG, X.; LIU, D.; LIU, F.; WU, J.; ZOU, J.; XIAO, X.; ZHAO, F.; ZHU, B. HTQC: a fast quality control toolkit for Illumina sequencing data. **BMC Bioinformatics**, London, v. 14, n. 33, p. 1, 2013.
- ZHOU, Q.; SU, X.; WANG, A.; XU, J.; NING, K. QC-Chain: fast and holistic quality control method for next-generation sequencing data. **PLoS One**, San Francisco, v. 8, n. 4, p. e60234, 2013.



**Processos
Bioquímicos**

Avaliação de fungos filamentosos isolados a partir de solo contendo glicerina para produção de compostos químicos por bioconversão

Rebeca Baiocchi Vianna¹, Karen Santos de Lima², Carolina Madalozzo Poletto³, Thaís Demarchi Mendes⁴, Augusto Lopes Souto⁵, José Antônio de Aquino Ribeiro⁶, Patrícia Pinto Kalil Goncalves Costa⁷, Flávia Soares Vieira⁸, Jamille Ribeiro Coelho de Lima⁹, Patrícia Verardi Abdelnur¹⁰, Clenilson Martins Rodrigues¹¹, Mônica Caramez Triches Damaso¹²

Resumo

Visando agregar valor à glicerina bruta, coproduto da produção de biodiesel, 46 linhagens de fungos filamentosos isolados da Fazenda Sucupira, Brasília, DF, foram avaliadas quanto à capacidade de crescimento em meio de cultivo contendo essa matéria-prima como única fonte de carbono. Baseado no Índice de Velocidade de Crescimento Micelial, cujos valores em glicerina metílica de soja variaram entre 1,25 e 10,53, 13 fungos foram selecionados segundo critérios de crescimento e de forma de isolamento, para avaliação de bioconversão de glicerina de soja em compostos químicos de valor agregado. Os sobrenadantes foram analisados por espectrometria de massas por infusão direta (DIMS) e por cromatografia líquida de ultra eficiência (UPLC) para identificação e quantificação dos compostos químicos. Com base nos resultados obtidos por meio de DIMS, cinco linhagens teriam produzido polióis. Porém, quando as amostras foram analisadas por UPLC não foi

¹ Graduanda em Biotecnologia, Universidade de Brasília, rebeca.baiocchi@colaborador.embrapa.br

² Bióloga, ex-bolsista de DTI-C (CNPq) na Embrapa Agroenergia, karen.lima@colaborador.embrapa.br

³ Engenheira de alimentos, mestre em Microbiologia Agrícola e do Ambiente, analista da Embrapa Agroenergia, carolina.poletto@embrapa.br

⁴ Bióloga, mestre em Microbiologia Aplicada, analista da Embrapa Agroenergia, thais.demarchi@embrapa.br

⁵ Farmacêutico, doutor em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, pós-doutorando na Embrapa Agroenergia, augusto.souto@colaborador.embrapa.br

⁶ Farmacêutico, mestre em Ciências Farmacêuticas, analista da Embrapa Agroenergia, jose.ribeiro@embrapa.br

⁷ Química, mestre em Química Orgânica, analista da Embrapa Agroenergia, patricia.costa@embrapa.br

⁸ Farmacêutica, bolsista DTI-C do CNPq na Embrapa Agroenergia, flavia.vieira@colaborador.embrapa.br

⁹ Bióloga, doutora em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos, pós-doutoranda na Embrapa Agroenergia, jamille.lima@colaborador.embrapa.br

¹⁰ Química, doutora em Química Orgânica, pesquisadora da Embrapa Agroenergia, patricia.abdelnur@embrapa.br

¹¹ Químico, doutor em Química, pesquisador da Embrapa Agroenergia, clenilson.rodrigues@embrapa.br

¹² Engenheira Química, doutora em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos, pesquisadora da Embrapa Agroenergia, monica.damaso@embrapa.br

possível quantificar a presença dos mesmos, embora a quantidade de glicerol, fonte de carbono, tenha sido reduzida. Portanto, acredita-se que o glicerol tenha sido consumido, principalmente, para crescimento dos fungos e que a quantidade de polióis produzida seja inferior aos limites de detecção e quantificação do método.

Introdução

O aumento crescente na demanda por combustíveis tem intensificado o desenvolvimento de pesquisas envolvendo biocombustíveis, de forma que a matriz energética renovável complemente a fóssil. Nesse contexto, o biodiesel é uma alternativa promissora, uma vez que diminui o impacto do efeito estufa e apresenta a possibilidade de ser produzido por uma gama de matérias-primas, dentre as oleaginosas e gorduras, tendo o óleo de soja como a principal fonte no Brasil (AGÊNCIA NACIONAL DO PETRÓLEO, GÁS NATURAL E BIOCMBUSTÍVEIS, 2016).

A produção de biodiesel tem crescido desde 2005, atingindo mais de 3,9 bilhões de litros em 2015 (AGÊNCIA NACIONAL DO PETRÓLEO, GÁS NATURAL E BIOCMBUSTÍVEIS, 2016). Entretanto, à medida que essa produção se intensifica, o mesmo ocorre com as quantidades de coprodutos e resíduos gerados na cadeia produtiva desse biocombustível, como é o caso da glicerina.

Segundo Almeida et al. (2012) e Yang et al. (2012), o aproveitamento da glicerina, por via microbiana, possibilita, respectivamente, a produção de compostos químicos de alto valor agregado para a indústria, tais como: 1,3-propanediol, 2,3-butanediol, etanol, n-butanol, cetonas, ácidos orgânicos e polióis, e, conseqüentemente, contribui para o aumento da viabilidade e competitividade da produção de biodiesel por meio da diminuição dos custos associados com a eliminação industrial dos resíduos.

O presente trabalho teve como objetivo selecionar fungos filamentosos capazes de crescer em glicerina bruta de soja como única fonte de carbono e avaliar a produção de compostos químicos a partir da bioconversão da glicerina bruta por métodos de DIMS e UPLC.

Materiais e métodos

Isolamento dos fungos filamentosos

Cinquenta mililitros de glicerina bruta de soja (Cesbra Química S.A. Volta Redonda, RJ) e padrão comercial (PA) (USB) foram derramadas em solo de duas seções distintas da Fazenda Sucupira, Brasília, DF: Plantação de *Amaranthus* sp. (Caruru) e Barragem, em junho de 2015, época caracterizada pela ausência de chuva. Não foram feitas análises físico-químicas do solo. Na área de plantação, a cultura havia sido plantada, mas quando se retornou para a coleta do solo, ela já estava crescida. Foram colocadas pedras e pedaços de madeira que identificassem o local do derramamento, que foi feito com cerca de 5 cm de profundidade. Após 2 meses, amostras de solo do local do derramamento foram recolhidas para isolamento de fungos filamentosos. As amostras foram codificadas por: **Glicerina Padrão Plantação (GPP)**, **Glicerina Bruta Plantação (GBP)**, **Glicerina Padrão Barragem (GPB)** e **Glicerina Bruta Barragem (GBP)**.

Para isolamento de linhagens de fungos filamentosos, uma primeira diluição, de 50 g de cada amostra em 50 mL de tampão PBS, foi incubada por 1 hora a 30 °C e 200 rpm em agitador de bancada. Posteriormente, novas diluições seriadas (1/10, 1/100, 1/1000 e 1/10000 da amostra pura) foram realizadas e estas inoculadas, em duplicata, em placas de Petri contendo Meio Mínimo, 2% Glicerina bruta e sulfato de estreptomicina. As placas de Petri foram incubadas em estufa a 28 °C, por 7 dias. Após o período de incubação, as colônias formadas foram purificadas em meio BDA (batata dextrose ágar) e as linhagens preservadas seguindo os protocolos dos métodos de ultracongelamento (Glicerol 30%) e do método de Castellani (água destilada).

Avaliação do índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM)

Para avaliação da eficiência de crescimento em glicerina, todas as linhagens foram reativadas e inoculadas, em triplicata, na forma de ponto central em meios contendo gliceras distintas: glicerina bruta de soja ou glicerina padrão comercial, sendo esta última para fins comparativos. A metodologia da avaliação consistiu na medida do diâmetro micelial no 3º, 5º e 7º dias de incubação, para cálculo do Índice de Velocidade de Crescimento Micelial (IVCM). Por fim, a partir desses dados, as linhagens foram agrupadas em três grupos de acordo com baixo,

médio e alto IVCM. De cada um dos grupos, foram selecionadas linhagens e estas destinadas para estudo do processo de bioconversão de glicerina. Essa estratégia de seleção foi utilizada pelo fato de não ser possível afirmar que microrganismos que apresentam maior IVCM são os que melhor produzem os compostos químicos de interesse.

Bioconversão da glicerina bruta e identificação e quantificação dos compostos químicos produzidos

A partir de placas de meio de adaptação (com glicerina) contendo as linhagens reativadas, quatro discos (9 mm) de micélio foram retirados e inoculados em meio de cultivo submerso contendo glicerina bruta de soja, em triplicata, e incubados a 28 °C a 120 rpm, por 10 dias. Após 5 e 10 dias de cultivo, em condições adequadas, alíquotas foram retiradas e centrifugadas (5.200 rpm, por 10 minutos, a 4 °C). Os sobrenadantes foram diluídos em metanol:água (1:1). Posteriormente, foram analisadas por espectrometria de massas por infusão direta (DIMS), utilizando um espectrômetro de massas com fonte de ionização por eletrospray e analisador tipo TOF (time of flight) (Maxis 4G, Bruker Daltonics). As análises foram realizadas em modo de ionização positivo (ESI(+)-MS) e os espectros das amostras biotransformadas processadas utilizando o software Data Analysis (Bruker Daltonics). Para quantificação dos polióis, as amostras foram analisadas por duas metodologias utilizando sistema UPLC (Ultra-High Performance Liquid Chromatography) com fase estacionária HILIC (Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography) com detecção por ELSD (Evaporative Light Scattering Detector) e eluição em modo gradiente. Em ambas as metodologias, a coluna utilizada foi a HILIC BEH Amide (2,1 X 150 mm; 1,7 µm, Waters®), com a temperatura de: A) primeira condição 30 °C e B) segunda condição 73 °C.

Resultados e discussão

Um total de 46 fungos filamentosos, ainda sem identificação, foi isolado de solo da Fazenda Sucupira contaminado com glicerina: 32 de solo da barragem, sendo 21 a partir da contaminação com glicerina padrão (GPBF) e 11, com glicerina bruta (GBBF), e 14 da plantação de *Amaranthus* sp. (Caruru), sendo 5 a partir da contaminação com glicerina padrão (GPPF) e 9, com glicerina bruta (GBPF). Essas 46 linhagens foram submetidas a uma avaliação quanto à sua eficiência de crescimento em meio de cultivo que continha apenas glicerina como

fonte de carbono. Baseados nos dados obtidos e apresentados na Figura 1, os valores de IVCM em Glicerina bruta variaram de 1,25 a 10,53, enquanto os valores em Glicerina Comercial oscilaram dentro da faixa 1,79 a 14,87. Embora os maiores resultados tenham sido obtidos em glicerina padrão comercial, considerando-se que a glicerina de soja contém várias impurezas, como metanol, cinzas e resíduos de catalisador, o resultado obtido pelas linhagens quando crescidas nessa glicerina bruta pode ser considerado satisfatório.

Para seleção das linhagens, os 46 fungos foram agrupados em três grupos de acordo com o valor de IVCM baixo, médio e alto, obtidos em glicerina bruta, e linhagens de cada grupo, totalizando 13 linhagens, foram selecionadas para bioconversão nessa glicerina.

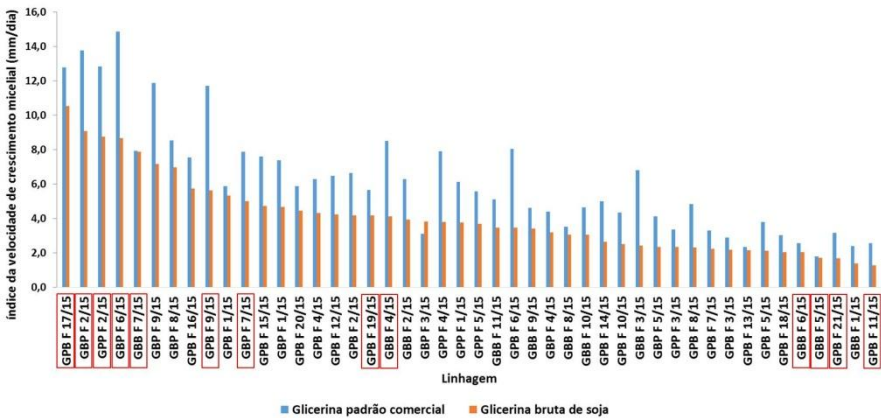


Figura 1. Índice de velocidade de crescimento micelial das 46 linhagens de fungos filamentosos, obtidos em glicerina bruta de soja e padrão comercial.

As amostras geradas por bioconversão de glicerina de soja das 13 linhagens, após 5 e 10 dias de cultivo, foram analisadas, primeiramente, por DIMS (Figura 2). De acordo com a análise de componente principal realizada sobre os dados espectrais das amostras de glicerol bioconvertidas pelos fungos filamentosos, pôde-se perceber no gráfico de *scores* (Figura 2), a presença de dois grupos distintos: no quadrante esquerdo, localizam-se as amostras geradas após 5 dias de cultivo (T1), e no quadrante direito, as amostras geradas após 10 dias (T2).

O gráfico de *scores* representa todas as amostras analisadas. As suas posições no gráfico dependem dos íons detectados nas amostras e que estão

representados no gráfico de loadings. Então, existe uma correlação espacial entre o gráfico de scores e o gráfico de loadings. Ao se comparar os dois gráficos, pôde-se constatar que as amostras do tipo T2 possuem íons mais intensos que o das amostras T1.

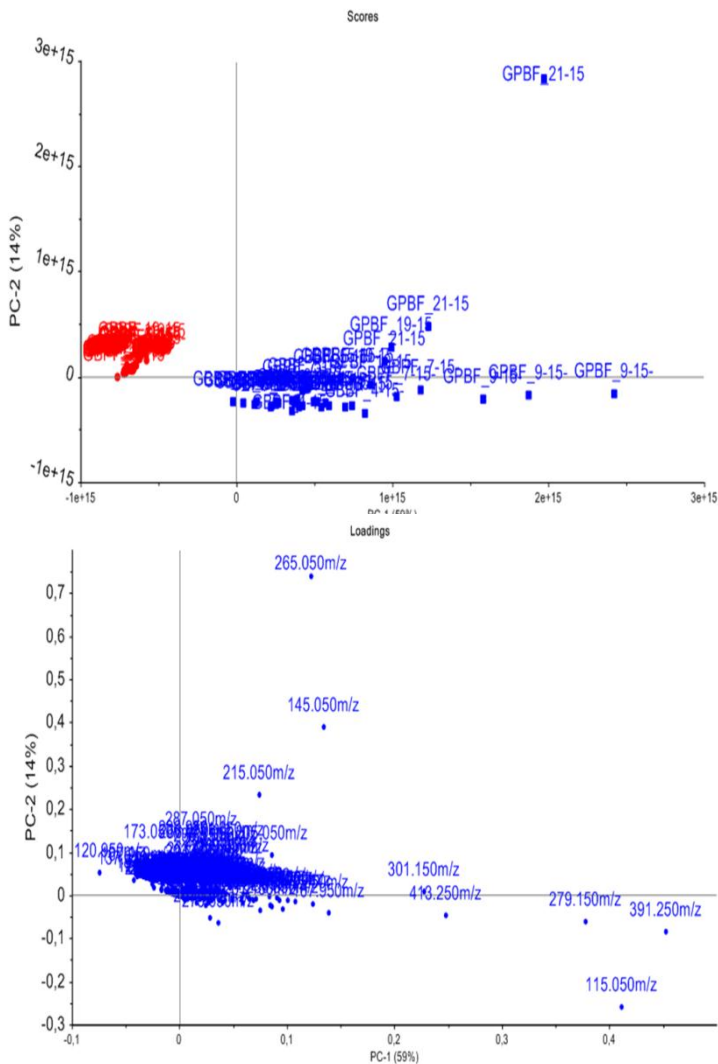


Figura 2. Gráfico de scores e loadings das amostras de glicerol bioconvertidas por fungos filamentosos, em glicerina bruta de soja. T1–5 dias e T2–10 dias de cultivo.

Após processamento dos dados, foi possível inferir que as linhagens **GPBF 21/15**, **GPBF 19/15** e **GBBF 5/15** produziram polióis do tipo C4 (m/z 145,0471), C5 (m/z 175,0577) e C6 (m/z 205,0683), os quais foram detectados com intensidade perto de 1×10^5 . As linhagens **GPBF 9/15** e **GPBF 7/15** produziram polióis do tipo C4 (m/z 145,0467 e m/z 145,0468 respectivamente), porém seu íon correspondente foi detectado com intensidade menor, 2×10^4 , do que as linhagens anteriormente citadas.

Nas réplicas de **GPBF 21/15** e **GPBF 19/15**, foi detectado o íon m/z 215,0692, correspondente a compostos como carpacina, miristicina, metoxicinamato e isoquinolona, e o íon m/z 215,0162, correspondente ao ácido cítrico. Diante disso, ainda não foi possível confirmar qual produto essas linhagens realmente haviam produzido, além dos polióis.

Com base nos resultados que indicaram a produção de polióis pelas linhagens **GPBF 21/15**, **GPBF 19/15**, **GBBF 5/15**, **GPBF 9/15** e **GPBF 7/15**, as amostras obtidas após 5 e 10 dias de cultivo foram analisadas por UPLC para identificar e quantificar esses compostos.

Porém, não foi possível determinar a identificação e concentração dos polióis do tipo C4, C5 e C6 que as linhagens teriam produzido conforme resultados indicativos por DIMS, por estarem abaixo do limite de quantificação do método empregado. No entanto, verificou-se que o polioli glicerol, fonte de carbono da bioconversão, foi consumido entre 35% e 57%, dependendo da linhagem avaliada. Sendo assim, acredita-se que o consumo de glicerol tenha ocorrido, principalmente, para crescimento dos fungos.

Conclusões

Linhagens de fungos filamentosos isolados a partir de solos contendo glicerina bruta de soja e padrão comercial, da Fazenda Sucupira, Brasília, DF, foram avaliadas de acordo com a capacidade de crescer em glicerina bruta de soja ou comercial, como única fonte de carbono. Ao todo, 13 linhagens foram selecionadas de acordo com valores de IVC alto, médio e baixo e testadas em processo de bioconversão de glicerina bruta de soja. Os resultados obtidos por espectrometria de massas (DIMS) indicaram que cinco linhagens foram capazes de produzir polióis C4, C5 e C6, porém, esse resultado não foi confirmado por UPLC-ELSD, embora a fonte de carbono glicerol tenha sido parcialmente consumida.

Apoio financeiro

Os autores agradecem ao CNPq, pelo apoio financeiro e concessão de bolsas (404854/2013-3) para as autoras Rebeca Vianna, Karen de Lima e Flávia Soares; à Capes, pela bolsa de Augusto Souto, e à Embrapa Agroenergia, pela infraestrutura de pesquisa.

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 Fuels**, London, v. 5, número do artigo 48, 2012.

AGÊNCIA NACIONAL DO PETRÓLEO, GÁS NATURAL E BIOCOMBUSTÍVEIS (Brasil). **Anuário estatístico brasileiro do petróleo, gás natural e biocombustíveis 2016**. Brasília, DF, 2016. Disponível em: <<http://www.anp.gov.br/?pg=82385&m=&t1=&t2=&t3=&t4=&ar=&ps=&1475169199578>>. Acesso em: ago 2016.

YANG, F.; HANNA, M. A.; SUN, R. Value-added uses for crude glycerol-a byproduct of biodiesel production. **Biotechnology for Biofuels**, London, v. 5, artigo número 13, 2012.

Efeito da morfologia celular e fase de crescimento algal na eficiência da criopreservação de microalgas

Maiara Sousa Fernandes¹, Priscila Borges Morais², Rodrigo Carvalho do Nascimento³, Lorena Costa Garcia⁴, Guy de Capdeville⁵, Bruno dos Santos Alves Figueiredo Brasil⁶

Resumo

A preservação de recursos genéticos algais depositados em coleções de referência é crucial para o apoio e desenvolvimento de programas de melhoria. Para tanto, faz-se necessário o desenvolvimento de metodologias para a conservação de microalgas por longos períodos. O objetivo deste trabalho foi avaliar a eficiência de criopreservação de três espécies de microalgas com arquiteturas celulares distintas, colonial cenobial (EMBRAPA|LBA35 *Desmodesmus* sp.), cocóide unicelular (EMBRAPA|LBA39 *Chlorella sorokiniana*) e colonial palmeloide (EMBRAPA|LBA40 *Chlamydomonas biconvexa*), em diferentes momentos do seu ciclo de crescimento (3º, 6º e 9º dias de crescimento). Foram testados três agentes crioprotetores: dois agentes com alta permeabilidade celular (Glicerol e Dimetilsulfóxido) e um agente não permeável (Polietilenoglicol 400). A viabilidade celular foi mensurada utilizando-se o método do cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio (CTT). Os resultados demonstraram que a eficiência dos agentes crioprotetores varia em função da cepa avaliada. Além disso, a fase de crescimento de cada cepa também afeta a efetividade dos agentes crioprotetores.

Introdução

A manutenção de cepas unialgais crescendo ativamente durante longos períodos de tempo é um processo dispendioso. O congelamento desses

¹ Engenheira de Bioprocessos e Biotecnologia, mestranda em Biotecnologia, Universidade Federal do Tocantins, maiara.fernandes@colaborador.embrapa.br

² Bióloga, Universidade Católica de Brasília, pri.bio9@gmail.com

³ Engenheiro de Bioprocessos e Biotecnologia, mestrando em Biotecnologia, Universidade Federal do Tocantins, rodrigo.nascimento@colaborador.embrapa.br

⁴ Engenheira de alimentos, doutora em Engenharia de Alimentos, analista da Embrapa Agroenergia, lorena.garcia@embrapa.br

⁵ Agrônomo, doutor em Fitopatologia, pesquisador da Embrapa Agroenergia, guy.capdeville@embrapa.br

⁶ Biólogo, doutor em Ciências Biológicas (Microbiologia), pesquisador da Embrapa Agroenergia, bruno.brasil@embrapa.br

microrganismos permite mantê-los em um estado metabolicamente inativo, possibilitando maiores intervalos entre as replicações das culturas (ANDRADE; COLOZZI FILHO, 2014). A fim de minimizar a lise celular decorrente da formação de cristais de gelo intracitoplasmáticos e consequente perda da viabilidade durante o congelamento, diferentes substâncias podem ser utilizadas como crioprotetoras. Essas substâncias podem ser classificadas de acordo com a capacidade de penetração celular: crioprotetores intracelulares, como o glicerol, dimetilsulfóxido ou metanol; ou extracelulares, como o polietilenoglicol, sorbitol ou manitol. Além da substância crioprotetora utilizada, características da alga como a espécie, a estrutura celular, a fase de crescimento, o teor de água da célula e a taxa de resfriamento podem afetar a criopreservação. A viabilidade pós-descongelamento é a forma utilizada para se estimar quantitativamente a sobrevivência das células e para comparar a eficiência dos métodos de criopreservação. O cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazolio (CTT) é um método frequentemente usado para determinar a viabilidade celular (SANTOS, 2010). O ensaio baseia-se na atividade enzimática dos micro-organismos vivos que reduzem o sal de CTT (incolor) à formazan. Os cristais de formazan resultantes apresentam cor vermelha e a intensidade da coloração é utilizada para medir a atividade mitocondrial e consequentemente a viabilidade celular.

Este trabalho teve como objetivo avaliar a eficiência de três agentes crioprotetores na conservação de microalgas de diferentes cepas, em estágios distintos de ciclo de vida, com base na avaliação de viabilidade pós-congelamento das cepas.

Material e métodos

Obtenção e Cultivo das estirpes

Três espécies de microalgas selecionadas a partir da coleção de microrganismos fotossintetizantes da Embrapa Agroenergia foram utilizadas para a realização dos experimentos: *Desmodesmus sp.* (EMBRAPA|LBA35); *Chlorella sorokiniana* (EMBRAPA|LBA39) e *Chlamydomonas biconvexa* (EMBRAPA|LBA40) (Figura 1). As cepas foram inoculadas com densidade óptica inicial de 0,01 (D.O=0,01), em erlenmeyers contendo 300 ml de meio BG11 (RIPPKA et al., 1979), e mantidas em sala de crescimento com iluminação artificial de 8.000 Lux, ciclo de iluminação 12 h claro/12 h escuro, temperatura de 26 °C, aeração de 10 L.h⁻¹, por

um período de 10 dias. O crescimento da biomassa foi monitorado diariamente pela densidade óptica das culturas a 680 nm em espectrofotômetro (SPECTRAMAX M3, Molecular Devices), com o intuito de acompanhar e determinar a curva-padrão de crescimento de cada cepa.

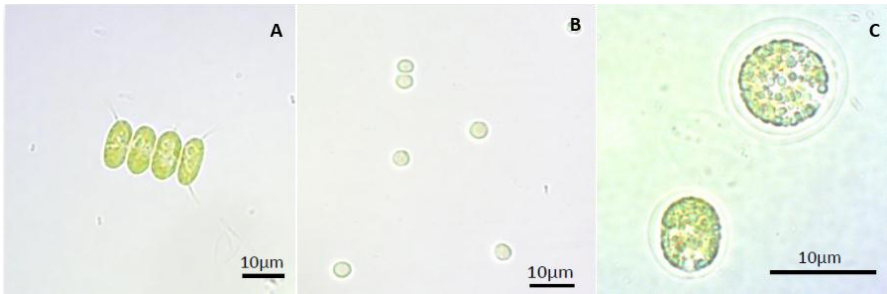


Figura 1. Fotomicrografia das cepas: A) Embrapa|LBA35 (*Desmodesmus* sp.); B) Embrapa|LBA39 (*Chlorella sorokiniana*); C) Embrapa|LBA40 (*Chlamydomonas biconvexa*).

Fonte: Catálogo da coleção de microalgas aplicadas à agroenergia e biorrefinaria da Embrapa.

Criopreservação das microalgas

As microalgas foram congeladas, na ausência de agentes crioprotetores (controle), e na presença dos agentes crioprotetores penetrantes dimetilsulfóxido (DMSO) e glicerol, e do crioprotetor não penetrante polietilenoglicol 400 (PEG 400), todos em uma concentração final de 10% v/v. O procedimento foi realizado em três estágios do crescimento das cepas: metade da fase exponencial (3º dia), final da fase exponencial (6º dia) e fase estacionária (9º dia). Os agentes crioprotetores e a suspensão celular foram misturados (0,15 ml e 1,35 ml, respectivamente) em criotubos de polipropileno de 2 ml estéreis. O congelamento das amostras foi realizado em ultrafreezer a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, com o auxílio de um container de congelamento (Mr. Frosty™ Freezing Container) que permite uma taxa de resfriamento de aproximadamente $-1\text{ }^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$. O descongelamento foi realizado 20 dias após o congelamento. Os criotubos foram retirados do ultrafreezer e submersos em banho-maria a $35\text{ }^{\circ}\text{C}$ por aproximadamente 1 minuto. Em seguida, o conteúdo dos criotubos foi centrifugado por 5 minutos a 10.000 rpm, o sobrenadante foi desprezado e o conteúdo celular ressuspensado em 1,5 ml de meio BG11.

Ensaio da viabilidade celular pós-descongelamento

A viabilidade das amostras foi determinada usando o método do CTT (SANTOS, 2010). Em tubos de ensaio, cada amostra foi homogeneizada em 3 ml do reagente CTT 0,5% (p/v), preparado em solução tampão fosfato pH 7. As misturas foram incubadas por 24 h no escuro, a 28 °C. Após esse período, foram adicionados 6 ml de etanol 95% (v/v) e os tubos foram colocados em água fervente durante 10 minutos, para tornar o formazan solúvel no meio. O material foi então centrifugado a 10.000 rpm, durante 5 minutos, para a separação dos sólidos. O sobrenadante foi reservado para as leituras de absorbância a 490 nm em espectrofotômetro (SPECTRAMAX M3, Molecular Devices).

Análises estatísticas

Em todos os tratamentos, foi realizada a análise de variância (Anova) e as médias foram comparadas pelo Teste de Tukey a 5% de significância, utilizando-se o programa Assistat 7.7.

Resultados e discussão

Crescimento celular

As curvas de crescimento obtidas para as três cepas mostraram comportamentos semelhantes (Figura 2). Não foi observada fase de indução ao crescimento, caracterizada por um crescimento lento em virtude da adaptação da cultura às condições do meio. O crescimento teve início já em fase exponencial (fase log) e estendeu-se até o 6º dia de cultivo para as três cepas. Almeida et al. (2015), ao estudarem o crescimento de cepas de *Chlorella vulgaris*, e *Desmodesmus sp* em meio de cultivo BG-11, observaram a fase exponencial para essas espécies entre o 2º e 5º dia de cultivo. A fase de desaceleração ocorreu do 6º ao 8º dia, e a fase estacionária foi registrada no 9º dia de cultivo para todas as cepas. O maior rendimento máximo em biomassa foi observado para a Embrapa|LBA39. As cepas Embrapa|LBA35 e Embrapa|LBA40 apresentaram menores densidades ao final do experimento. Essas diferenças podem estar associadas à eficiência de captura de luz e às taxas de crescimento específica das espécies.

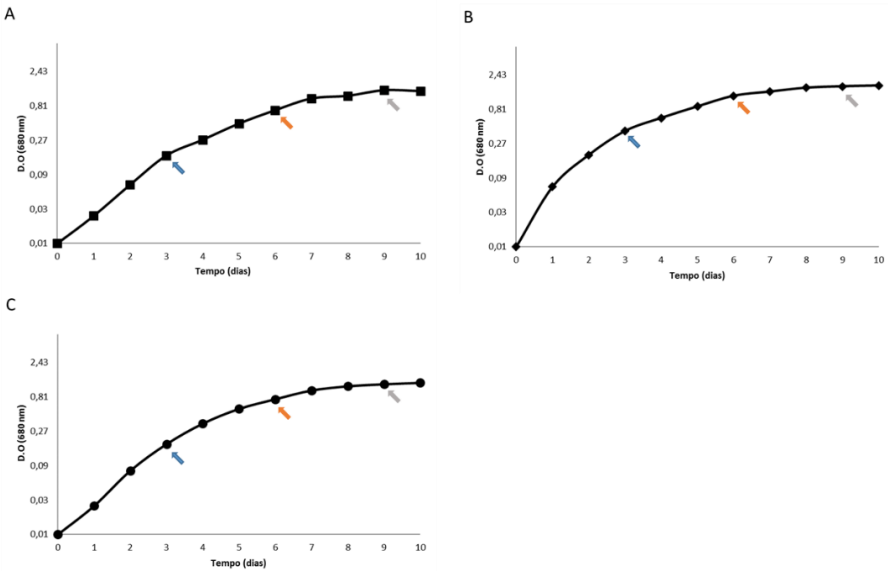


Figura 2. Curva de crescimento baseada em densidade ótica da cepa: A) Embrapa|LBA35 (*Desmodosmus sp.*); B) Embrapa|LBA39 (*Chlorella sorokiniana*); C) Embrapa|LBA40 (*Chlamydomonas biconvexa*), cultivadas em meio BG-11 por um período de 10 dias com iluminação artificial de 16.000 Lux, ciclo de iluminação 12 h claro/12 h escuro, temperatura de 30 °C, aeração de 10 L.h⁻¹. As setas destacam os dias de colheita das células para congelamento.

Viabilidade após congelamento

Na Figura 3, são apresentados os resultados de sobrevivência após o processo de criopreservação. Pode-se observar que as respostas foram diferentes dependendo da espécie, do agente crioprotetor e da fase de crescimento em que as células foram colhidas para serem submetidas ao congelamento.

Para a cepa Embrapa|LBA35, os melhores resultados foram obtidos com o congelamento efetuado durante a fase estacionária (9º dia) na presença dos agentes glicerol e PEG 400.

A cepa Embrapa|LBA39 apresentou maior viabilidade pós-congelamento quando as células foram submetidas ao processo de criopreservação durante a fase exponencial de crescimento (3º dia), e o melhor resultado de criopreservação foi obtido com o DMSO. Esse resultado corrobora o observado por Gwo et al. (2005) e de Guermazi et al. (2010), os quais também comprovaram a eficácia do DMSO para a criopreservação de espécies de *Chlorella*.

De forma semelhante à cepa Embrapa|LBA 35, glicerol e PEG 400 foram os agentes que promoveram os melhores resultados de sobrevivência celular para a Embrapa|LBA40, na fase estacionária (9º dia). O DMSO foi menos efetivo como crioprotetor para essa espécie, não diferindo estatisticamente do controle (sem agente). Para cepas da espécie *Chlamydomonas reinhardtii*, Crutchfield et al. (1999) reportaram que o DMSO é um agente ineficaz de criopreservação.

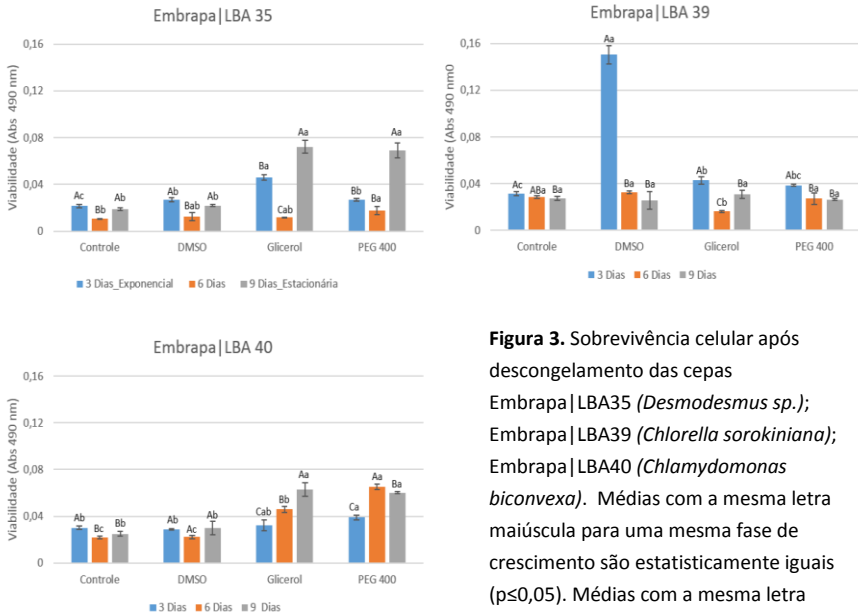


Figura 3. Sobrevivência celular após descongelamento das cepas Embrapa|LBA35 (*Desmodesmus sp.*); Embrapa|LBA39 (*Chlorella sorokiniana*); Embrapa|LBA40 (*Chlamydomonas biconvexa*). Médias com a mesma letra maiúscula para uma mesma fase de crescimento são estatisticamente iguais ($p \leq 0,05$). Médias com a mesma letra minúscula para o mesmo agente crioprotetor são estatisticamente iguais ($p \leq 0,05$).

Conclusão

As respostas de viabilidade pós-congelamento mostraram que os agentes crioprotetores podem melhorar a tolerância das cepas ao congelamento. A eficácia da criopreservação para cada espécie pode variar em função da fase de crescimento em que as células se encontram e do agente utilizado no processo.

Referências

- ALMEIDA, V. F. de.; RIOS, L. F.: FILHO, R. M.; MACIEL, M. R. W. Estudo do crescimento autotrófico de três cepas de microalgas visando a produção de biodiesel. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA QUÍMICA EM INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 11., 2015, Campinas. [Anais...]. Campinas: Unicamp, 2015.
- ANDRADE, D. S.; COLOZZI FILHO, A. Microalgas de águas continentais - Produção de Biomassa e Coprodutos. Londrina: IAPAR, 2014. v. 2.
- CRUTCHFIELD, A. L. M.; DILLER, K. R.; BRAND, J. J. Cryopreservation of *Chlamydomonas reinhardtii* (Chlorophyta). **European Journal of Phycology**, New York, v. 34, n. 1, p. 43-52, 1999.
- GUERMAZI, W.; SELLAMI-KAMMOUN, A.; ELLOUMI, J.; DRIRA, Z.; ALEYA, L.; MARANGONI, R.; AYAD, I. H.; MAALEJ, S. Microalgal cryo-preservation using dimethyl sulfoxide (Me2SO) coupled with two freezing protocols: Influence on the fatty acid profile. **Journal of Thermal Biology**, Oxford, v. 35, n. 4, p. 175 - 181, 2010.
- GWO, J. C.; CHIU, J. Y.; CHOU, C. C.; CHENG, H. Y. Cryopreservation of a marine microalga, *Nannochloropsis oculata* (Eustigmatophyceae). **Cryobiology**, San Diego, v. 50, n. 3, p. 338–343, 2005.
- RIPPKA, R.; DERUELLES, J.; WATERBURY, J.B.; HERDMAN, M.; STANIER, R. Y. Generic assignments, strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria. **Journal of General Microbiology**, Berks, v. 111, p. 1-61, 1979.
- SANTOS, D. N. dos. **Caracterização de massas pró-embriogênicas em pinhão-mansô (*Jatropha curcas* L.)**. 2010. 119 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2010.

Avaliação do cultivo de microalgas em fotobiorreatores de placas planas para a produção de biomassa e biorremediação de efluente da agroindústria de óleo de palma

Rodrigo Carvalho do Nascimento¹, Maiara Sousa Fernandes², Hugo Santana³, Carolina Cereijo⁴, Lorena Costa Garcia⁵, Félix Gonçalves Siqueira⁶, Bruno dos Santos Alves Figueiredo Brasil⁷

Resumo

O *palm oil mill effluent* (Pome) é o principal efluente líquido gerado pela indústria do óleo de palma. Para cada tonelada de óleo extraído são necessários de 5 a 7,5 toneladas de água e cerca de 50% deste volume termina como efluente. A utilização de microalgas para o tratamento de águas residuais, além de constituir um processo biológico de baixo custo, permite o aproveitamento da biomassa algal produzida para produção de energia, ração animal e pigmentos, por exemplo. Neste trabalho foi avaliada a capacidade de biorremediação e produção de biomassa em efluente de lagoa de estabilização de Pome (ELE-Pome) da cepa de microalga *Chlamydomonas biconvexa* Embrapa|LBA40. As microalgas foram cultivadas nos meios ELE-Pome e BBM (meio sintético controle) em fotobiorreatores *air lift* de placas planas com capacidade de 15 L. Com base nos resultados obtidos, conclui-se que o ELE-Pome pode ser utilizado como meio de cultura para a produção de biomassa da microalga *C. biconvexa* Embrapa|LBA40 sem necessidade de suplementação de nutrientes. Com relação à biorremediação do efluente, os ensaios mostraram que há remoção significativa de nitrogênio e fósforo principalmente durante a fase de crescimento exponencial das células, período que coincide a máxima produtividade de biomassa algal.

¹ Engenheiro Bioquímico, mestrando em Biotecnologia, Universidade Federal do Tocantins, rodrigo.nascimento@colaborador.embrapa.br

² Engenheira Bioquímica, mestranda em Biotecnologia, Universidade Federal do Tocantins, maiara.fernandes@colaborador.embrapa.br

³ Doutorando em Tecnologias Química e Biológica, Universidade de Brasília, hugo.santana@colaborador.embrapa.br

⁴ Doutoranda em Tecnologias Química e Biológica, Universidade de Brasília, carolina.cereijo@colaborador.embrapa.br

⁵ Engenheira de alimentos, doutora em Engenharia de Alimentos, analista da Embrapa Agroenergia, lorena.garcia@embrapa.br

⁶ Biólogo, doutor em Ciências Biológicas (Biologia Molecular), pesquisador da Embrapa Agroenergia, felix.siqueira@embrapa.br

⁷ Biólogo, doutor em Ciências Biológicas (Microbiologia), pesquisador da Embrapa Agroenergia, bruno.brasil@embrapa.br

Introdução

Países como Malásia e Indonésia são responsáveis por 85% da produção mundial de óleo de palma, enquanto outros como Nigéria, Tailândia, Colômbia, Equador e Papua-Nova Guiné complementam outros 6% do mercado. Atualmente, a produção de óleo de palma no Brasil é de aproximadamente 300 mil toneladas por ano, proveniente, em sua maioria, do Estado do Pará. Essa produção não é capaz de suprir o mercado interno, já que o consumo anual gira em torno de 500 mil toneladas. Os principais fornecedores do produto para o Brasil são Colômbia e Equador (ABRAPALMA, 2016).

A composição do Pome é variável, mas de um modo geral possui altas concentrações de demanda química de oxigênio (DQO), demanda bioquímica de oxigênio (DBO) e sólidos orgânicos em suspensão. O sistema tradicional de tratamento é o de lagoas de estabilização que, geralmente, consiste de um tratamento primário, em que ocorre a fase de sedimentação e/ou flotação da matéria sólida; tratamento secundário, no qual os sólidos orgânicos em suspensão são removidos por processos físicos, químicos e biológicos; e, por fim, o resíduo passa por um tratamento terciário, para desinfecção da água e eliminação da carga inorgânica (SASONGKO; NOGUCHI, 2015; CHIU et al., 2015).

Microalgas são microrganismos clorofilados, capazes de converter fotossinteticamente dióxido de carbono atmosférico em uma grande variedade de metabólitos e produtos químicos incluindo proteínas, polissacarídeos e lipídeos. Além disso, durante o metabolismo, as células de microalgas assimilam nitrogênio e fósforo, característica importante para processos de tratamento de águas residuais (SAMBUSITI et al., 2015). O cultivo de algas em efluentes alia biorremediação e produção de biomassa, reduzindo a utilização de água doce e os custos com adição de nutrientes. Desenvolver uma metodologia de cultivo desses microrganismos pode revolucionar a produção de energia limpa e os sistemas de tratamento de águas residuais. Para tanto, é necessário compreender a cinética de crescimento de microalgas em águas residuais, além de aprimorar-se a produtividade desse bioprocessos (LEE; ZHANG, 2016). Sendo assim, o presente trabalho tem como objetivo avaliar a capacidade das microalgas *Chlamydomonas biconvexa* Embrapa|LBA40 de biorremediar o ELE-Pome (Pome biodigerido, obtido da lagoa aeróbia de estabilização) e de produzir biomassa, quando cultivadas em fotobiorreatores de placas planas suplementados com CO₂.

Material e métodos

Microalgas

Foi estudada uma cepa de *Chlamydomonas biconvexa* pertencente à coleção de microrganismos fotossintetizantes da Embrapa Agroenergia, nomeada como Embrapa|LBA40 (Figura 1).

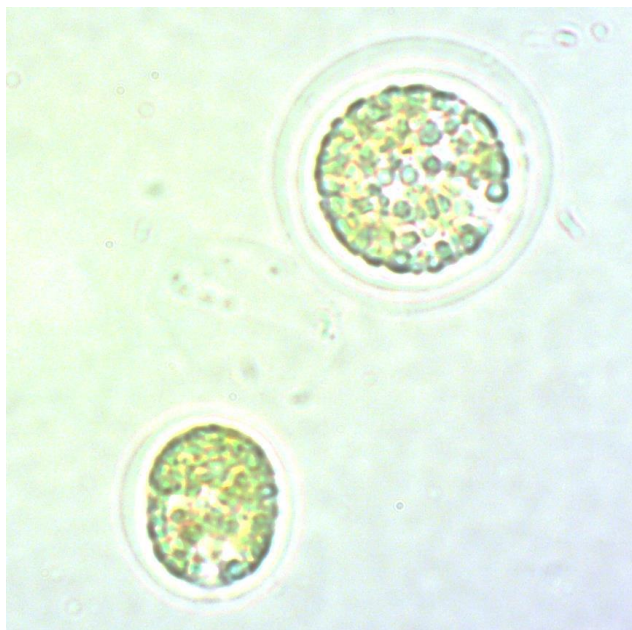


Figura 1. *Chlamydomonas biconvexa* Embrapa|LBA 40 (A e B).

Fotomicrografias obtidas por meio de microscopia de luz utilizando técnica DIC (contraste diferencial de fase). Escala: 5 μ m.

Fonte: Catálogo da coleção de microalgas aplicadas à agroenergia e biorrefinarias da Embrapa.

Meios de cultura

Foram utilizados dois meios de cultivo: i) Bold's Basal Medium (BBM) modificado por Brunale (2014); ii) Efluente da Lagoa anaeróbia de Estabilização do Pome (ELE-Pome) coletado na agroindústria Denpasa (Santo Antônio do Tauá, PA). Antes do cultivo, o ELE-Pome foi centrifugado a 16.267 x g por 5 minutos, como pré-tratamento para redução dos sólidos suspensos.

Produção de inóculo algal e cultivo em fotobiorreator

Os inóculos algais foram produzidos em condições estéreis, utilizando-se frascos erlenmeyers de 1 L contendo 500 ml de meio BBM em condições estéreis, com iluminação artificial de 16.000 Lux, ciclo de iluminação 12/12 claro/escuro,

temperatura de 28 °C e aeração de 10 L.h⁻¹. Após 7 dias de cultivo, equivalente ao fim da fase exponencial, o conteúdo dos erlenmeyers foi homogeneizado em um frasco único e inoculado em quantidade suficiente para garantir a densidade ótica inicial de 0,1 nos fotobiorreatores de placas planas. A quantidade de inóculo utilizada foi sempre 10% menor do volume de trabalho nos fotobiorreatores.

A cepa *C. biconvexa* Embrapa|LBA40 foi cultivada em fotobiorreatores *air lift* de placas planas, com iluminação artificial de 35.000 Lux em ciclos de 12h/12h claro/escuro, temperatura de 25 °C no escuro e 35 °C no claro, aeração de 60 L.h⁻¹ e suplementação de CO₂ ajustada para 5 % da vazão de ar. Os cultivos foram realizados em bateladas independentes durante 5, 10 e 15 dias, utilizando 13 L de ELE-Pome ou de meio BBM. Os três períodos foram escolhidos de modo a ser avaliada a influência do tempo de cultivo na taxa de crescimento celular e remoção dos nutrientes do meio. A biomassa foi obtida por centrifugação do cultivo, sendo então congelada a -80 °C por 24 h e posteriormente liofilizada (Liofilizador LIOTOP K105). O sobrenadante foi autoclavado por 15 minutos e armazenado em bombonas para análises da composição química.

Quantificação do crescimento algal

A quantificação do crescimento algal foi feita a partir de amostras retiradas no tempo inicial e final dos cultivos. Foram realizadas medidas de determinação de peso seco, na qual três amostras de 10 mL foram centrifugadas, lavadas com 10 mL de água destilada (3x) e então ressuspensas em água destilada. A biomassa lavada foi adicionada às placas, previamente taradas, postas em estufa por 24 h a 105 °C e em seguida pesadas. A diferença entre a massa da placa com biomassa seca e da placa vazia foi definida como o peso seco da amostra.

Análise dos sobrenadantes dos cultivos algais

Os sobrenadantes dos cultivos algais em fotobiorreatores de placas planas utilizando ELE-Pome foram caracterizados quanto à demanda bioquímica de oxigênio (DBO), demanda química de oxigênio (DQO), conteúdo de fosfato, nitrato, nitrito, nitrogênio amoniacal, potássio, turbidez, pH e carbono orgânico total. Essas análises foram realizadas pela empresa Ambientale, em Maringá, PR.

Análises estatísticas

Foi realizada análise da variância (Anova) de fator único com repetição, usando o teste de Tukey, a 5% de significância, para comparação entre as médias, utilizando-se o programa Sisvar.

Resultados e discussões

Não foram observadas diferenças significativas ($p \leq 0,05$) no crescimento da cepa *C. biconvexa* Embrapa|LBA40 quando cultivada nos dois substratos de crescimento testados, ou seja, meio BBM ou ELE-Pome (Figura 2). Esses resultados sugerem que os nutrientes presentes no ELE-Pome são suficientes para garantir um crescimento algal vigoroso dessa cepa. É importante ressaltar que as produtividades obtidas neste estudo, são superiores àquelas relatadas na literatura. Por exemplo, Wu et al. (2012) relataram o cultivo de *Chlamydomonas* sp. em efluente de estação de tratamento de água, no qual obtiveram $150 \text{ mg.L}^{-1} \text{ dia}^{-1}$ de produtividade de biomassa. Já Ledda et al. (2015) isolaram uma cepa autóctone de *Chlorella* sp. de tanques de armazenamento de esgoto da criação de suínos e testaram formulações do efluente como fonte de cultivo para a cepa. Como resultado, obtiveram produtividades máximas de $220 \text{ mg.L}^{-1} \text{ dia}^{-1}$.

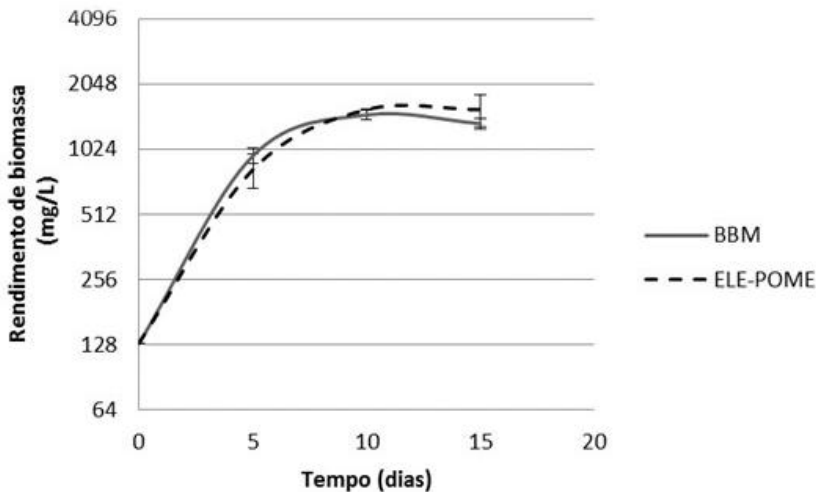


Figura 2. Curva de crescimento da cepa *C. biconvexa* Embrapa|LBA40 cultivada em fotobiorreatores *air-lift* de placas planas, baseada no rendimento de biomassa (mg L^{-1}) por 5, 10 e 15 dias utilizando meio BBM e ELE- Pome.

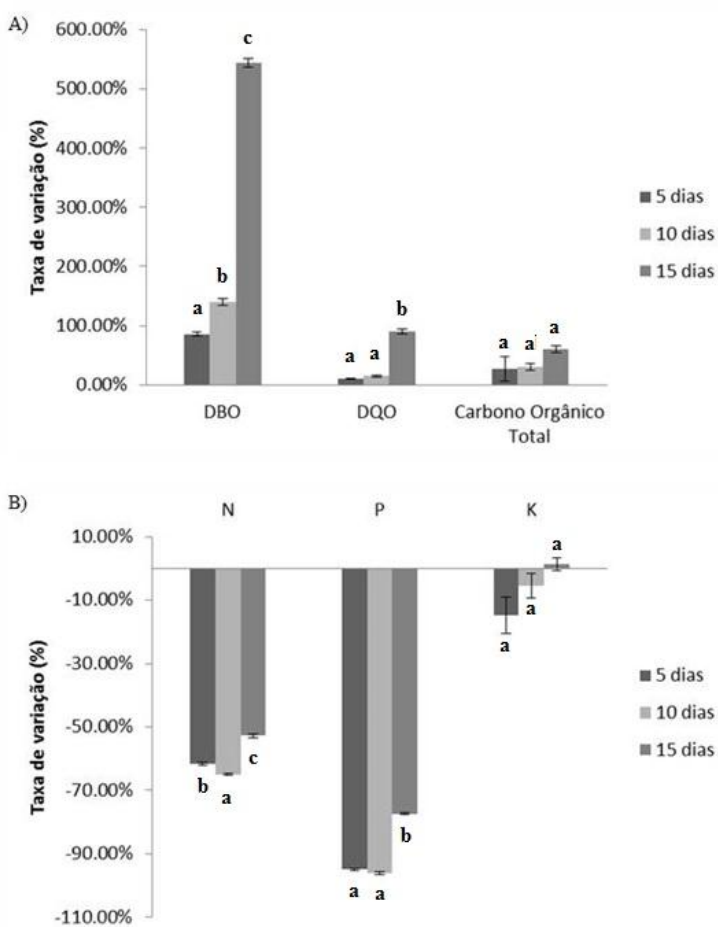


Figura 3. Percentual de variação na composição do ELE-Pome ao longo cultivo com a cepa *C. biconvexa* Embrapa|LBA40 durante 5, 10 e 15 dias em fotobiorreatores *air lift* de placas planas. A análise estatística foi realizada com Anova de fator único com repetição, e foi usado o teste de Tukey para comparação entre as médias. Letras diferentes (a, b, c) indicam diferenças estatisticamente significativas entre os tempos de cultivo avaliados ($p < 0,05$).

A partir dos dados apresentados na Figura 3, nota-se que as microalgas assimilam as fontes de nitrogênio e fósforo do meio, sendo as maiores reduções observadas nos períodos de cultivo que coincidem com a fase exponencial de crescimento (10 dias). Observou-se também que em todos os cultivos houve

elevação na DBO e DQO com o aumento no tempo de cultivo, os quais foram mais acentuados após o final da fase exponencial de crescimento algal. Pode-se hipotetizar a contribuição de dois fatores para esse fenômeno: i) O acúmulo de compostos orgânicos no meio de cultivo, secretados pelas microalgas, em especial carboidratos; ii) A baixa eficiência de remoção de células mortas e debris celulares que se acumulam ao longo do tempo de cultivo pelo método de colheita de biomassa empregado (centrifugação).

Pode-se perceber que há aumento nos parâmetros orgânicos ao longo do tempo de cultivo, sendo mais acentuado após o término da fase de crescimento algal exponencial. Por outro lado, as concentrações de nitrogênio e fósforo apresentaram reduções significativas, enquanto a concentração do potássio não variou significativamente ($p \leq 0,05$) ao longo do tempo de cultivo. As taxas de remoção de nitrogênio total atingiram mais de 64,13% para *Chlamydomonas biconvexa* Embrapa|LBA40. Cultivando *Chlamydomonas sp.* em Pome, Ding et al. (2016) obtiveram, taxas de remoção de nitrogênio amoniacal e nitrogênio total equivalentes a 100% e 72,97% da concentração inicial, respectivamente. A variação da concentração de fósforo total nos cultivos da cepa foi de 96%, obtido no tempo de 5 dias, o que equivale a uma redução $19,32 \text{ mgL}^{-1}$ de fósforo (Figura 3B). Ding et al. (2016) reportaram 63,53% de remoção de fósforo total por uma cepa de *Chlamydomonas sp.* em Pome diluído com água destilada.

Tomados em conjunto, os resultados aqui apresentados sugerem que os pontos de máxima produtividade de biomassa e de máxima remoção de nutrientes inorgânicos coincidem, determinando assim um único ponto ótimo de colheita. Esses achados são importantes, pois maximizam as vantagens da exploração biotecnológica do cultivo de microalgas acoplado à agroindústria de palma-de-óleo. Estudos futuros focados na análise da composição da biomassa algal produzida em ELE-Pome auxiliarão na identificação e valoração de potenciais bioprodutos que poderão ser obtidos a partir dessas microalgas.

Conclusões

Conclui-se que o Efluente da Lagoa de Estabilização do Pome (ELE-Pome) pode ser utilizado como meio de cultura para a produção de biomassa da cepa *C. biconvexa* Embrapa|LBA40, sem necessidade de suplementação de NPK.

Verificou-se que há remoção significativa de nitrogênio e fósforo do ELE-Pome, principalmente durante a fase de crescimento exponencial das células, período que coincide a máxima produtividade de biomassa algal.

Apoio financeiro

Finep, Capes e Embrapa.

Referências

ABRAPALMA, **A palma no Brasil e no mundo**. Disponível em: <<http://www.abrapalma.org/pt/a-palma-no-brasil-e-no-mundo/>> Acesso em: 20 maio 2016.

BRUNALE, P. P. de M. O isolamento das microalgas e o seu cultivo em vinhaça para produção de biocombustíveis e biorremediação. Curitiba: União Latino-americana de Tecnologia, 2014.

CHIU, S.; KAO, C.; CHEN, T.; CHANG, Y.; KUO, C.; LIN, C. Cultivation of microalgal *Chlorella* for biomass and lipid production using wastewater as nutrient resource. **Bioresource Technology**, Oxon, v. 184, p. 179–189, 2015.

DING, G. T.; YAAKOB, Z.; TAKRIFF, M. S.; SALIHON, J.; RAHAMAN, M. S. A. Biomass production and nutrients removal by a newly-isolated microalgal strain *Chlamydomonas* sp in palm oil mill effluent (POME). **International Journal of Hydrogen Energy**, Oxford, v. 41, n. 8, p. 4888–4895, 2016.

LEDDA, C.; IDÀ, A.; ALLEMAND, D.; MARIANI, P.; ADANI, F. Production of wild *Chlorella* sp. cultivated in digested and membrane-pretreated swine manure derived from a full-scale operation plant. **Algal Research-Biomass Biofuels and Bioproducts**, Amsterdam, v. 12, p. 68–73, 2015.

LEE, E.; ZHANG, Q. Integrated co-limitation kinetic model for microalgae growth in anaerobically digested municipal sludge centrate. **Algal Research-Biomass Biofuels and Bioproducts**, Amsterdam, v. 18, p. 15–24, 2016.

SAMBUSITI, C.; BELLUCCI, M.; ZABANIOTOU, A.; BENEDEUCE, L.; MONLAU, F. Algae as promising feedstocks for fermentative biohydrogen production according to a biorefinery approach: a comprehensive review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, Oxford, v. 44, p. 20–36, 2015.

SASONGKO, N. A.; NOGUCHI, R. Comprehensive evaluation of integrated energy plantation model of palm oil and microalgae based biofuel for sustainable energy production. In: BAKAR, R. B. A.; FROOME, C. **Energy Procedia**. Amsterdam: Elsevier, 2015. v. 68. p. 226–235. Apresentado no: 2nd International Conference on Sustainable Energy Engineering and Application (ICSEEA); Sustainable Energy for Green Mobility, 2014.

WU, L. F.; CHENG, P. C.; HUANG, A. P.; LEE, C. M. The feasibility of biodiesel production by microalgae using industrial wastewater. **Bioresource Technology**, Oxon, v. 113, p. 14–18, 2012.

Otimização da produção de lipases de *Aspergillus* sp. BDA-FI 7 por fermentação em estado sólido para a síntese de biodiesel

Pedro Alves Martins¹, Débora Lo Sciuto², Léia Cecília de Lima Fávoro³,
Thálya Fraga Pacheco⁴, Thaís Fabiana Chan Salum⁵

Resumo

O biodiesel é um biocombustível que pode ser obtido por rota enzimática por meio da reação de transesterificação de óleos de origem vegetal e/ou animal com o uso de lipases para catalisar o processo. Neste trabalho, avaliou-se a produção de lipases por cinco fungos filamentosos quando cultivados por fermentação em estado sólido. Dentre estes, o fungo BDA-FI 7, identificado por técnicas moleculares como pertencente ao gênero *Aspergillus*, se destacou quanto à atividade lipolítica dos extratos enzimáticos obtidos, alcançando $68,53 \pm 5,41$ U/gss. Os sólidos fermentados oriundos do cultivo do fungo BDA-FI 7 em farelo de trigo se destacaram quanto à capacidade de transesterificar óleo de soja e etanol em ésteres etílicos quando a reação foi conduzida em solvente orgânico (*n*-heptano). A fim de otimizar a produção de lipases para sua aplicação na síntese de biodiesel, foi realizado um planejamento experimental do tipo delineamento composto central rotacional (DCCR) considerando temperatura, umidade e quantidade de inóculo como variáveis de cultivo. O experimento foi conduzido com 7 dias de incubação e foi gerado um modelo para explicar o comportamento da produção de lipases.

Introdução

Lipases são enzimas da família das carboxil-éster hidrolases capazes de catalisar a hidrólise de triacilgliceróis, produzindo glicerol e ácidos graxos, bem como promover as reações de esterificação, transesterificação, interesterificação e aminólise. Diferenciam-se das esterases, dentre outras classificações, por sua

¹ Biólogo, mestre em Biologia Molecular, bolsista DTI-B, LPB, pedro.alves@colaborador.embrapa.br

² Bióloga, mestre em Biologia Microbiana, bolsista DTI-B, LPB, debora.sciuto@colaborador.embrapa.br

³ Bióloga, doutora em Genética e Melhoramento de Plantas, pesquisadora da Embrapa Agroenergia, leia.favaro@embrapa.br

⁴ Engenheira química, mestre em Engenharia Química, analista da Embrapa Agroenergia, thalya.pacheco@embrapa.br

⁵ Farmacêutica, doutora em Ciências (Bioquímica), pesquisadora da Embrapa Agroenergia, thais.salum@embrapa.br

especificidade de atuação sobre o substrato de acordo com o tamanho da cadeia carbônica do mesmo. Assim, consideram-se esterases as enzimas que são capazes de atuar apenas sobre triacilgliceróis de cadeia curta (solúveis em água) e lipases verdadeiras aquelas capazes de atuar tanto sobre triacilgliceróis de cadeia curta quanto longa (insolúveis em água) (VERGER, 1997).

Dentre diversas aplicações, as lipases podem ser utilizadas como catalisadoras da rota enzimática de produção do biodiesel por meio da reação de transesterificação (MA; HANNA, 1999). A legislação brasileira atual estabelece uma adição obrigatória de 7% de biodiesel ao óleo diesel comercializado, enfatizando, assim, a importância do estudo e da produção desse biocombustível, sobretudo quando produzido de forma sustentável. Tendo em vista este panorama socioeconômico, o objetivo deste trabalho foi otimizar a produção de lipases por fermentação em estado sólido para sua utilização em reações de transesterificação para produção de biodiesel.

Materiais e métodos

Após etapa de isolamento de microrganismos produtores de lipase a partir de diferentes amostras ambientais, foram selecionados cinco fungos filamentosos promissores (dados não mostrados). Estes foram avaliados quanto à produção de lipases quando submetidos à fermentação em estado sólido utilizando três substratos distintos: farelo de trigo, fibra de prensagem (torta) de dendê e uma mistura 1:1 destes. A extração das lipases foi realizada incubando 5 mL de solução extratora (Tampão fosfato de sódio 50 mmol/L pH 7,0, Goma arábica 1,11 g/L e Triton X-100 4,44 g/L) por grama de substrato seco. Os extratos enzimáticos obtidos foram, então, avaliados conforme método de hidrólise do palmitato de *p*-nitrofenila (KRIEGER, 1995). As atividades foram expressas em unidades de atividade enzimática por grama de substrato seco (U/gss). Uma unidade de atividade enzimática é definida como a quantidade de enzima necessária para a formação de 1 μ mol do produto (*p*-nitrofenol) por minuto.

Aqueles que apresentaram atividade de hidrólise do palmitato de *p*-nitrofenila tiveram seus extratos enzimáticos e sólidos fermentados (material resultante do cultivo do fungo sobre o suporte sólido durante a etapa de fermentação) obtidos do cultivo em farelo de trigo submetidos a uma etapa de liofilização e, em seguida, à reação de transesterificação. Esta foi realizada com razão óleo:álcool 1:3. Assim, foi utilizado óleo de soja (2 mmol) e etanol P.A. (6 mmol). Para a proteção da

conformação estrutural da enzima, a reação foi conduzida em solvente orgânico. Deste modo, adicionou-se *n*-heptano P.A. totalizando um volume de 10 mL por reação. A este volume, considerou-se, ainda, a adição de água destilada 0,5% (m/m) de forma que houvesse um mínimo de água necessário à manutenção da conformação estrutural e camada de solvatação da enzima (SALUM, 2010). Cada reação foi preparada, individualmente, em frascos do tipo Erlenmeyer de 100 mL vedados com rolha. A cada Erlenmeyer foi adicionado 1g de sólido fermentado mantendo as duplicatas biológicas separadas. Como controle positivo do experimento, utilizou-se Amano Lipase de *Pseudomonas cepacia* (Sigma-Aldrich) a 4 mg/mL. O controle negativo da reação consistiu de um meio reacional incubado sem adição de enzima. Os Erlenmeyers foram, então, incubados a 37 °C com agitação de 120 rpm e foram retiradas alíquotas de 50 µL para acompanhamento da reação por meio de Cromatografia em Camada Delgada (CCD). A CCD foi realizada em cromato folhas de alumínio ALUGRAM® XTRA SIL G/UV₂₅₄ (espessura 0,20mm; Macherey-Nagel) nas dimensões de 10 cm x 10 cm com fase móvel constituída de hexano:éter etílico:ácido acético na proporção 70:29:1. Como padrões, utilizou-se biodiesel de óleo de soja, óleo de soja (Soya) e ácido oléico (Dinâmica). Para a revelação, a placa foi incubada com iodo ressublimado.

A etapa de otimização da produção da lipase foi feita por meio de planejamento experimental do tipo delineamento composto central rotacional (DCCR), avaliando-se três variáveis de cultivo independentes em cinco níveis: temperatura (20 °C a 35 °C), umidade (45% a 65%) e quantidade de inóculo (10^6 esporos/g a 10^8 esporos/g). As faixas de estudo para cada variável foram escolhidas conforme dados da literatura para cultivo de *Aspergillus sp.* por fermentação em estado sólido e também conforme limitações do substrato (a umidade máxima do farelo de trigo sem que haja água livre é de 65%). O experimento foi conduzido conforme matriz gerada utilizando um valor de alfa de 1,68 (fatorial completo $2^3 + 4$ repetições do ponto central + 6 pontos axiais) por 7 dias de cultivo. A produção de lipase foi avaliada conforme atividade lipolítica determinada pela hidrólise do palmitato de *p*-nitrofenila (KRIEGER, 1995) e, em seguida, analisada estatisticamente pelo *software* Statística (v. 12) considerando um nível de significância de 90% ($p < 0,1$). Para a validação do modelo, o cultivo referente ao ponto de maior atividade (observado na superfície de resposta como sendo o de maior umidade e temperatura) descrito na função obtida foi realizado.

Resultados e discussão

Quando avaliados pelo método de hidrólise do palmitato de p-nitrofenila, nenhum dos cultivos realizados em torta de dendê foi capaz de produzir lipases. Já os extratos enzimáticos obtidos dos cultivos por fermentação em estado sólido dos fungos filamentosos BDA 24, BDA-FI 8.1 e BDA-FI 7 contendo farelo de trigo apresentaram atividade lipolítica. Sendo assim, deu-se continuidade apenas aos estudos com os cultivos desses fungos exclusivamente em farelo de trigo.

A fim de dar continuidade ao estudo de condições de cultivo de fungos para a produção de lipases, realizaram-se alguns testes preliminares de produção de biodiesel usando as lipases produzidas pelos três fungos. Os extratos enzimáticos liofilizados não foram capazes de catalisar a reação de transesterificação. As amostras de sólidos fermentados, entretanto, foram capazes de produzir ésteres etílicos, e as amostras relativas ao cultivo do fungo BDA-FI 7, quando analisadas por CCD, se destacaram por apresentarem manchas com intensidades semelhantes às obtidas no controle positivo (Figura 1). Uma possível explicação para o fenômeno encontrado seria que a enzima pode estar adsorvida ao sólido fermentado de tal maneira que estabilize a conformação tridimensional da mesma protegendo-a da ação desnaturante do álcool de forma que favoreça a catálise.

Deste modo, selecionou-se o fungo BDA-FI 7 (*Aspergillus sp.*) para a etapa de otimização da produção de lipases e procedeu-se com os cultivos conforme delineamento composto central rotacional (DCCR). Apenas as variáveis temperatura e umidade influenciaram significativamente a atividade lipolítica dos extratos, sendo a quantidade de inóculo indiferente à resposta em atividade lipolítica. Assim, considerando-se as variáveis significativas, obteve-se a função que descreve o modelo:

$$\textit{Atividade lipolítica} = -74,417 + 2,863 \cdot \textit{Temperatura} + 0,503 \cdot \textit{Umidade}$$

Quando o cultivo ocorre em temperaturas e umidades mais elevadas a função prevê um potencial aumento de atividade lipolítica, chegando a 58,44 U/gss. Godoy et al. (2011) e Moftah et al. (2012) observaram que baixas umidades resultam em menor turgescência do substrato o que pode reduzir a acessibilidade de nutrientes pelo microrganismo, resultando em menor crescimento e produção de enzimas e metabólitos, o que pode explicar a preferência desse fungo por umidades mais altas.

A função que codifica o modelo em questão foi utilizada para determinar o ponto de máxima atividade e o cultivo do fungo BDA-FI 7 em tais condições foi realizado, exibindo atividade de $68,53 \pm 5,41$ U/gss. Sendo assim, em virtude da boa correlação entre os valores preditos e os resultados empíricos obtidos e, segundo a análise de variância do modelo, o mesmo foi considerado validado.

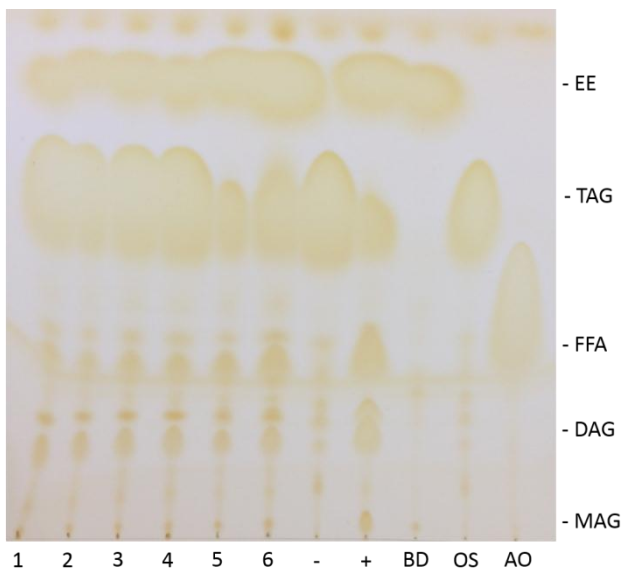


Figura 1. Avaliação qualitativa da produção de ésteres etílicos por cromatografia em camada delgada utilizando os sólidos fermentados (120h). A produção de ésteres etílicos (EE) é acompanhada da diminuição da quantidade de triacilgliceróis (TAG) e do aumento da quantidade de diacilgliceróis (DAG), monoacilgliceróis (MAG) e ácidos graxos livres (FFA). 1 e 2: sólidos fermentados de BDA 24; 3 e 4: sólidos fermentados de BDA-FI 8.1; 5 e 6: sólidos fermentados de BDA-FI 7; -: controle negativo; + : controle positivo; BD: padrão de biodiesel de óleo de soja; OS: padrão de óleo de soja; e AO: padrão de ácido oleico.

Conclusões

Quando cultivados em farelo de trigo por fermentação em estado sólido, os fungos BDA 24, BDA-FI 7 e BDA-FI 8.1 foram capazes de produzir lipases.

As amostras de extrato enzimático liofilizado não apresentaram atividade de transesterificação, sendo incapazes de produzir biodiesel. Entretanto, as amostras de sólido fermentado dos cultivos das linhagens BDA 24, BDA-FI 8.1 e BDA-FI 7

realizados em farelo de trigo como substrato foram capazes de converter o óleo de soja em ésteres etílicos. A lipase do fungo BDA-FI 7 teve uma maior eficiência em produzir ésteres etílicos.

O fungo BDA-FI 7 foi o microrganismo isolado com maior capacidade de produção de lipases quando cultivado em farelo de trigo. O DCCR mostrou que as variáveis temperatura e umidade apresentaram efeito significativo sobre a atividade lipolítica, enquanto a quantidade do inóculo foi indiferente em relação à atividade lipolítica. A maior atividade lipolítica obtida foi de 68,53 U/gss em 7 dias de cultivo com temperatura de 35 °C e umidade de 65%.

Apoio financeiro

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

Referências

- GODOY, M. G.; GUTARRA, M. L. E.; CASTRO, A. M.; MACHADO, O. L. T.; FREIRE, D. M. G. Adding value to a toxic residue from the biodiesel industry: production of two distinct pool of lipases from *Penicillium simplicissimum* in castor bean waste. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, Heidelberg, v. 38, n. 8, p. 945-953, 2011.
- KRIEGER, N. **Produção, purificação e caracterização de lipases de *Penicillium citrinum***. 1995. 260 f. Tese (Doutorado em Bioquímica) – Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas, Curitiba, PR.
- MA, F.; HANNA, M. A. Biodiesel production: a review. **Bioresource Technology**, Oxon, v. 70, n. 1, p. 1-15, 1999.
- MOFTAH, O. A. S.; GRBAVČIĆ, S.; ŽUŽA, M.; LUKOVIĆ, N.; BEZBRADICA, D.; KNEŽEVIĆ-JUGOVIĆ, Z. Adding value to the oil cake as a waste from oil processing industry: production of lipase and protease by *Candida utilis* in solid state fermentation. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Totowa, v. 166, n. 2, p. 348-364, 2012.
- SALUM, T. F. C. **Produção e imobilização de lipase de *Burkholderia cepacia* LTEB11 para a síntese de ésteres etílicos**. 2010. 130 f. Tese (Doutorado em Bioquímica) – Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas, Curitiba, PR.
- VERGER, R. 'Interfacial activation' of lipases: facts and artifacts. **Trends in Biotechnology**, Oxon, v. 15, n. 1, p. 32-38, 1997.

Fungo filamentososo CANA175: produção e caracterização bioquímica de enzimas lipolíticas

Débora Lo Sciuto¹, Pedro Alves Martins², Thaís Demarchi Mendes³, Thaís Fabiana Chan Salum⁴, Félix Gonçalves de Siqueira⁵, Dasciana de Sousa Rodrigues⁶

Resumo

O fungo filamentososo CANA175 (FF-CANA175) foi cultivado em estado sólido por 7 dias a 30 °C em quatro diferentes substratos: torta de dendê (TD), torta de palmiste (TP), borra do decantador de óleo de dendê (BD) e farelo de trigo (FT). Atividade de lipase, avaliada pelo método de hidrólise do palmitato de *p*-nitrofenila (ρ NPP), foi observada nos extratos brutos de FF-CANA175 provenientes dos cultivos em farelo de trigo (102,4 U/gSS) e torta de palmiste (25,7 U/gSS). A atividade de lipase apresentou os melhores resultados a 40 °C e pH 9,0. Os íons metálicos (Ca^{2+} , Co^{2+} , Cu^{2+} , Fe^{2+} , Fe^{3+} , K^+ , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Na^+ , Zn^{2+}) e EDTA na concentração de 10 mmol/L não apresentaram efeitos significativos sobre a atividade lipolítica. Testou-se o extrato bruto liofilizado de FF-CANA175 em reações de transesterificação de óleo de soja com álcool etílico (razão molar 1:3), entretanto não houve conversão durante o tempo de reação de 168 h.

Introdução

Os frutos de dendê são utilizados na produção de dois tipos de óleo: óleo de dendê (extraído do mesocarpo do fruto) e óleo de palmiste (da amêndoa), ambos apresentam amplo emprego alimentar e industrial. Em contrapartida, elevada quantidade de resíduos é gerada nas agroindústrias de dendê, tais como: cachos vazios, fibra de prensagem do mesocarpo (torta de dendê), casca que recobre a amêndoa, fibra da prensagem da amêndoa (torta de palmiste), cinzas da queima das fibras, borra do decantador de óleo de dendê e o efluente líquido (POME, do

¹ Bióloga, mestre em Biologia Microbiana, bolsista DTI-B, LPB, debora.sciuto@colaborador.embrapa.br

² Biólogo, mestre em Biologia Molecular, bolsista DTI-B, LPB, pedro.alves@colaborador.embrapa.br

³ Bióloga, mestre em Microbiologia Aplicada, analista da Embrapa Agroenergia, thaís.demarchi@embrapa.br

⁴ Farmacêutica, doutora em Bioquímica, pesquisadora da Embrapa Agroenergia, thaís.salum@embrapa.br

⁵ Biólogo, doutor em Ciências Biológicas (Biologia Molecular), pesquisador da Embrapa Agroenergia, felix.siqueira@embrapa.br

⁶ Química Industrial, doutora em Engenharia Química, pesquisadora da Embrapa Agroenergia, dasciana.rodrigues@embrapa.br

inglês: *Palm Oil Mill Effluent*). A utilização desses subprodutos como substrato para o cultivo de microrganismos capazes de produzir enzimas e biomoléculas de interesse industrial pode agregar valor a esses resíduos lignocelulósicos e efluentes.

As enzimas lipolíticas podem ser classificadas em três principais grupos com base na especificidade pelo substrato: lipases (EC 3.1.1.3), esterases (EC 3.1.1.1) e fosfolipases (EC 3.1.1.4). As lipases catalisam a hidrólise de ligações éster de triacilgliceróis (TAG) de cadeia longa (acima de 10 átomos de carbono) em ácidos graxos livres e glicerol; em contrapartida, as esterases atuam sob acilgliceróis de cadeia curta (TIRAWONGSAROJ et al., 2008). 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. As enzimas lipolíticas são produzidas por vegetais, animais e diversos microrganismos, sendo os fungos amplamente utilizados em decorrência da produção de enzimas extracelulares, o que facilita a recuperação destas do meio de cultivo (MESSIAS et al., 2011).

As lipases microbianas apresentam grande potencial biotecnológico por diversas razões: 1) são estáveis em solventes orgânicos; 2) não requerem cofatores; 3) possuem ampla especificidade por substrato; 4) apresentam elevada enantiosseletividade; 5) atuam em ampla faixa de temperatura e pH. Por conseguinte, são utilizadas em diversas indústrias, como alimentícia, têxtil, farmacêutica, polpa e papel, detergentes, entre outras (HASAN et al., 2006). Em virtude dessa variedade de aplicações, a prospecção de lipases com características específicas, mais eficientes e estáveis continua sendo uma importante linha de pesquisa. Dessa forma, FF-CANA175 foi cultivado em quatro diferentes substratos: torta de dendê (TD), torta de palmiste (TP), borra do decantador de óleo de dendê (BD) e farelo de trigo (FT), visando à produção e caracterização bioquímica de enzimas lipolíticas.

Materiais e métodos

Fermentação em estado sólido e atividades lipolíticas

O FF-CANA175, pertencente à Coleção de Microrganismos e Microalgas Aplicados a Agroenergia e Biorefinarias, da Embrapa Agroenergia, foi cultivado a 30 °C por 7 dias em estado sólido nos substratos: TD, FT, TP e BD, umedecidos

com tampão fosfato de sódio 100 mmol/L pH 7, de forma a apresentarem teor de umidade de aproximadamente 60%.

Os extratos enzimáticos foram obtidos pela adição de 5 mL de solução B por grama de sólido seco fermentado (solução B: goma arábica 0,11% (m/m) e triton X100 0,44% (m/m) em tampão fosfato de sódio 50 mmol/L pH 7). As amostras foram homogeneizadas a 30 °C sob agitação de 150 rpm por 60 minutos e, então, centrifugadas (4 °C/10.000 rpm/10 minutos). Os sobrenadantes obtidos, denominados extratos brutos, foram utilizados para determinação da atividade lipolítica pelo método colorimétrico de hidrólise do palmitato de ρ -nitrofenila (ρ NPP) (KRIEGER, 1995). O ensaio enzimático padrão foi realizado em meio aquoso a 40 °C pH 8,0. As atividades lipolíticas foram expressas em U/g de substrato seco (U/gSS), em que U foi definido como a quantidade de ρ -nitrofenol, em μ mol, liberada por minuto.

Caracterização enzimática

Foram avaliados os efeitos da temperatura, pH e íons metálicos na atividade de lipase presente nos extratos brutos de FF-CANA175 oriundos dos cultivos em farelo de trigo (eb-FT) e torta de palmiste (eb-TP). Dessa forma, ensaios enzimáticos foram realizados em um intervalo de temperatura de 30 °C a 60 °C ($\Delta = 5^\circ\text{C}$) em pH 8,0. O efeito do pH foi aferido na faixa entre 4,0 e 11,0 ($\Delta = 1,0$) a 40 °C, sendo utilizado tampão universal 0,12 mol/L.

O efeito de íons metálicos (Ca^{2+} , Co^{2+} , Cu^{2+} , Fe^{2+} , Fe^{3+} , K^+ , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Na^+ , Zn^{2+}) e EDTA sobre a atividade de lipase foi avaliado pela pré-incubação dos extratos brutos por 20 minutos na presença desses compostos em concentração final de 10 mmol/L. Como controle, substituiu-se o volume dos reagentes por água milli-Q. A termoestabilidade da lipase foi averiguada incubando-se alíquotas dos extratos brutos nas temperaturas de 30 °C e 40 °C por 24 h e 4 h, respectivamente. A atividade lipolítica residual foi quantificada pelo método colorimétrico padrão (ρ NPP) e expressa como atividade percentual em relação ao controle.

Ademais, foi avaliada atividade enzimática pelo método titulométrico sobre tributirina, trioleína e três diferentes óleos: de oliva, pinhão-manso e dendê; emulsificados com goma arábica (3% m/v) em tampão tris-HCl 2,5 mmol/L pH 7,0 contendo NaCl 150 mmol/L. Nesse método, a atividade enzimática é percebida pela titulação com NaOH dos ácidos graxos liberados pela ação da enzima na hidrólise dos triacilgliceróis presentes na emulsão. Para cada ensaio, são

incubados 20 mL de substrato e 1 mL de extrato enzimático em um vaso de reação com temperatura controlada (37 °C) e com agitação magnética, por 5 minutos.

Reações de transesterificação enzimática e cromatografia em camada delgada (CCD)

A dosagem de proteínas presentes nos extratos brutos de FF-CANA175 foi realizada pelo método do Ácido Bicinconínico (BCA), utilizando *Kit Protein Assay* (Sigma-Aldrich Inc.) e albumina sérica bovina como padrão. Após a determinação da concentração proteica de cada extrato enzimático, alíquotas apresentando 20 mg de proteína total foram congeladas com nitrogênio líquido e submetidas ao processo de liofilização.

As reações de transesterificação foram realizadas utilizando-se 2 mmol de óleo de soja e 6 mmol de álcool etílico (previamente seco com sulfato de sódio anidro) em *n*-heptano, totalizando 5 mL de meio reacional. Os extratos previamente liofilizados foram, então, adicionados ao meio; a reação foi mantida em agitador orbital a 120 rpm e 37 °C por 7 dias. O controle positivo foi realizado pela adição de 20 mg de lipase comercial de *Pseudomonas cepacia* e, para o controle negativo, não foi adicionada enzima. Foram coletadas alíquotas do meio reacional após 0 h, 24 h, 48 h, 72 h, 144 h e 168 h de reação.

A avaliação qualitativa dos produtos de transesterificação foi realizada por cromatografia em camada delgada (CCD), sendo utilizada como fase móvel uma solução de hexano:éter etílico:ácido acético (70:29:1); a placa de sílica gel foi revelada com iodo ressublimado. Ácido oleico, biodiesel e óleo de soja foram utilizados como padrões.

Resultados e discussão

A maior atividade de lipase (102,4 U/gSS), determinada pela hidrólise de *p*NPP, foi obtida quando utilizado o farelo de trigo como substrato do cultivo. O extrato bruto de FF-CANA175, proveniente do cultivo em torta de palmiste, apresentou atividade lipolítica de 25,7 U/gSS. Em contrapartida, não foi observada atividade de lipase no extrato enzimático oriundo da fermentação em torta e borra de dendê.

O efeito da temperatura, pH, íons metálicos e EDTA na atividade lipolítica dos extratos brutos de FF-CANA175 está representado na Figura 1.

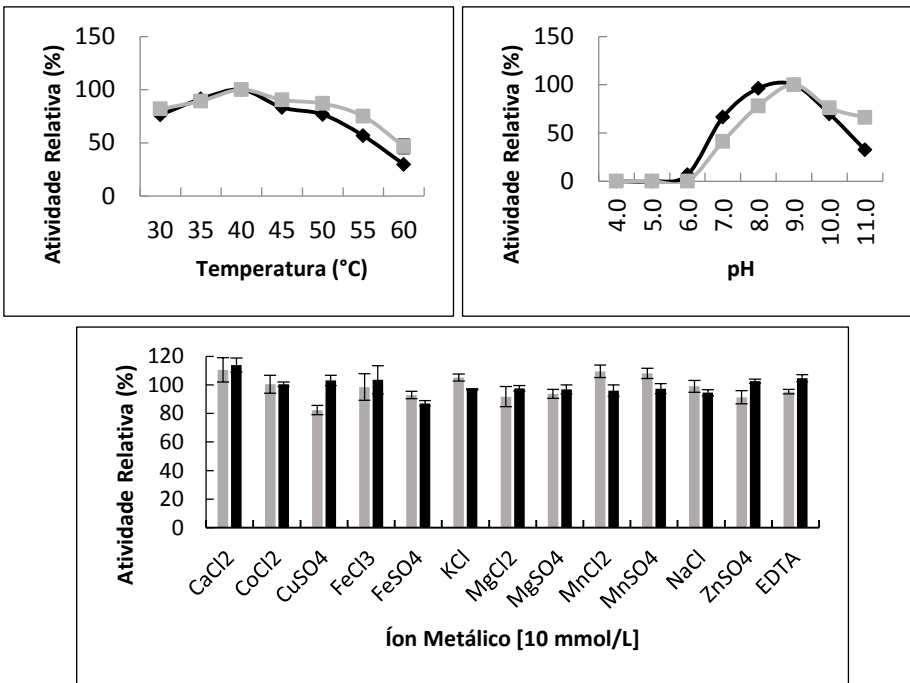


Figura 1. Efeito da temperatura, pH, íons metálicos e EDTA na atividade de lipase presente no extrato bruto de FF-CANA175 cultivado em farelo de trigo (eb-FT) (♦) e torta palmiste (eb-TP) (■).

Observa-se que a maior atividade enzimática foi obtida a 40 °C e pH 9,0 em ambos os extratos brutos averiguados (eb-FT e eb-TP). Foi mantida, pelo menos, 75% da atividade máxima na faixa de temperatura entre 30 °C e 55 °C em eb-TP, enquanto a lipase presente em eb-FT manteve mais de 65% da atividade no intervalo de pH entre 7,0 e 10,0. Enzimas que atuam em uma ampla faixa de temperatura e pH apresentam grande potencial de aplicação biotecnológica; lipases termoestáveis e que atuam em pH alcalino possuem vasto emprego nas indústrias de detergente e de couro, por exemplo (HASAN et al., 2006).

De forma geral, a atividade lipolítica apresentou variações pequenas (abaixo de 20%) quando acrescidos os íons metálicos avaliados; Cu²⁺, por exemplo, exibiu o maior efeito inibitório, causando decréscimo de 18% na atividade da enzima em eb-TP. Ademais, pode-se inferir que a atividade dessa enzima não depende da

presença de íons metálicos, visto que o agente quelante EDTA não apresentou efeito inibitório na atividade lipásica nas amostras analisadas. As atividades lipolíticas residuais presentes nos extratos brutos eb-FT e eb-TP mantiveram, respectivamente, 48,3% e 65,5% da atividade original após 24 h de incubação a 30 °C; e 47,6% e 59,3% após 4 h a 40 °C.

A determinação da atividade enzimática pelo método titulométrico sobre tributirina, trioleína, óleos de oliva, de pinhão-manso e de dendê mostrou que os extratos brutos eb-FT e eb-TP apresentaram atividade sobre tributirina: 48,5 U/gSS e 18,2 U/gSS, respectivamente. Os demais substratos não foram hidrolisados por nenhum dos extratos enzimáticos utilizados, inferindo-se que a enzima somente foi capaz de atuar sobre triacilglicerol de cadeia curta.

As reações de transesterificação enzimática de óleo de soja e álcool etílico (razão molar 1:3), catalisadas pelas lipases presentes no extrato bruto liofilizado de FF-CANA175, foram avaliadas qualitativamente por cromatografia em camada delgada (CCD). Não foi observada síntese de biodiesel durante avaliação por 168 h de reação (Figura 2).

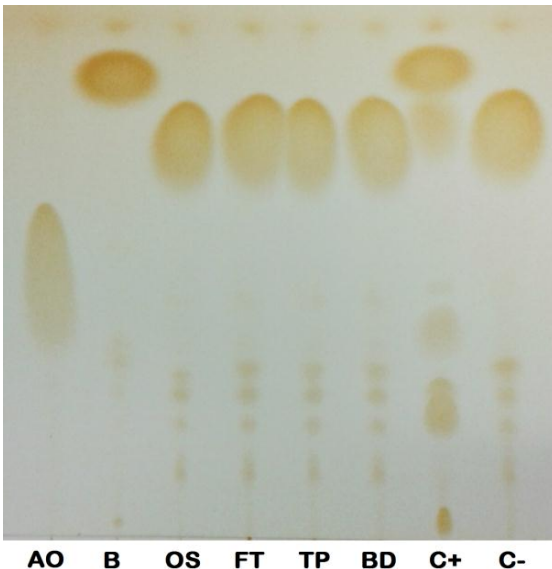


Figura 2. Placa de CCD mostrando os produtos após 168 h da reação de transesterificação enzimática utilizando extrato bruto liofilizado de FF-CANA175 cultivado em farelo de trigo (FT), torta de palmiste (TP) e borra de dendê (BD). AO: ácido oleico; B: biodiesel; OS: óleo de soja; C+: controle positivo; C-: controle negativo.

Conclusões

Farelo de trigo foi o substrato que induziu maior produção de lipase por FF-CANA175, porém a enzima presente no extrato bruto proveniente do cultivo em torta de palmiste foi mais termoestável a 30 °C e 40 °C. Embora tenha apresentado atividade sob palmitato de ρ -nitrofenila, a lipase foi capaz de catalisar apenas a hidrólise de triacilgliceróis de cadeia curta (tributirina).

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.
- KRIEGER, N. **Produção, purificação e caracterização de lipases de *Penicillium citrinum***. 1995. 260 f. Tese (Doutorado em Bioquímica) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR.
- MESSIAS, J. M.; COSTA, B. Z.; LIMA, V. M. G.; GIESE, E. C.; DEKKER, R. F. H.; BARBOSA, A. M. Lipases microbianas: produção, propriedades e aplicações biotecnológicas. **Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas**, Londrina, v. 32, n. 2, p. 213-234, 2011.
- TIRAWONGSAROJ, P.; SRIPRANG, R.; HARNPICHARNCHAI, P.; THONGARAMA, T.; CHAMPREDA, V.; TANAPONGPIPAT, S.; POOTANAKIT, K.; EURWILAICHITR, L. Novel thermophilic and thermostable lipolytic enzymes from a Thailand hot spring metagenomic library. **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v. 133, n. 1, p. 42-49, 2008.

Caracterização da composição química da biomassa da microalga *Nannochloropsis oculata* cultivada em tanque aberto tipo raceway

Dagon Manoel Ribeiro¹, Pedro L. D. S. Junior², Valérya Carneiro Teles³, Itânia Pinheiro Soares⁴, Lorena Costa Garcia⁵, Paulo C. V. Abreu⁶, Bruno dos Santos Alves Figueiredo Brasil⁷

Resumo

A produção de microalgas encontra-se em ascensão e possui potencial para atender a diversas necessidades tecnológicas, como combustíveis limpos e alimentos em um contexto de biorrefinaria. Neste trabalho, a microalga *Nannochloropsis oculata* foi cultivada em tanque aberto e obteve uma produtividade de biomassa de 25,21 mg/L/dia. Na caracterização da biomassa, foi observado acúmulo de diferentes compostos de interesse como lipídios (17,62%), carboidratos (10,62%) e proteínas (32,76%). Além disso, é uma biomassa rica em ácidos graxos poli-insaturados.

Introdução

A exploração da biomassa de microalgas em um contexto de biorrefinaria é uma estratégia promissora para a viabilização econômica dessa matéria-prima para produção de biocombustíveis, biomateriais e commodities químicas (YEN et al., 2013). Dentro do contexto de biorrefinarias, as microalgas podem ser utilizadas para diferentes fins em razão da possibilidade de aproveitamento integral da sua biomassa. Assim, é possível aproveitar carboidratos (aplicação em processos fermentativos), lipídeos (produção de biodiesel e outros produtos

¹ Biotecnologista, doutorando em Biotecnologia e Biodiversidade, Universidade de Brasília, dagon.ribeiro@colaborador.embrapa.br.

² Graduando em Farmácia, Universidade de Brasília, pedro.lopes.junior@colaborador.embrapa.br

³ Engenheira de alimentos, mestre em Biotecnologia, Universidade do Tocantins, valerya.teles@colaborador.embrapa.br

⁴ Química, doutora em Química Analítica, pesquisadora da Embrapa Agroenergia, itania.soares@embrapa.br

⁵ Engenheira de alimentos, doutora em Engenharia de Alimentos, analista da Embrapa Agroenergia, lorena.garcia@embrapa.br

⁶ Biólogo, doutor em Ciências Naturais, Universität Bremen, docpca@furg.br

⁷ Biólogo, doutor em Ciências Biológicas (Microbiologia), pesquisador da Embrapa Agroenergia, bruno.brasil@embrapa.br

oleaginosos), proteínas (produção de ração), pigmentos e outras moléculas com maior valor agregado (YEN et. al., 2013).

Visando o entendimento dos processos de produção de microalgas, são necessários estudos focados em cultivos que extrapolem a escala laboratorial para testes em escala piloto (RAWAT et al., 2013). Dentre as diversas opções de sistemas de cultivo, a utilização de sistemas abertos (ex: tanques abertos tipo raceway) é considerada a melhor alternativa para a produção de biomassa em virtude da sua fácil construção, manutenção e operação (PARK et al., 2011).

Nannochloropsis oculata (Eustigmatophyceae) é uma microalga marinha, com altas taxas de crescimento e alta produtividade lipídica, além de resistência a condições ambientais adversas. Por essas características, é recomendada para estudos em cultivos de grande escala e é também uma das microalgas promissoras para a produção de biocombustíveis (BORGES et al., 2007). O objetivo deste trabalho é a caracterização química da biomassa de *Nannochloropsis oculata* cultivada em tanques abertos.

Metodologia

A microalga *Nannochloropsis oculata* foi cultivada na Universidade Federal do Rio Grande em tanque aberto tipo raceway instalado no interior de casa de vegetação. O cultivo foi realizado em volume útil de 216 litros, agitação mecânica por pás-rotativas, temperatura média de 23 ± 5 °C, por um período de 8 dias, utilizando meio de cultivo NPK. Após o cultivo, a biomassa foi coletada, utilizando o floculante Tanfloc 20 ppm, em seguida centrifugada a 1.300 rpm, lavada com formiato de amônio e seca em estufas de circulação a 60 °C.

A biomassa foi caracterizada quanto ao teor de sólidos totais e cinzas (WYCHEN; LAURENS, 2015b), proteínas pela metodologia microKjeldahl (AOAC, 1990) utilizando o fator de conversão de 4,75 específico para microalgas (LAURENS, 2013), carotenoides totais (HUANG; CHEUNG, 2011), carboidratos (WYCHEN; LAURENS, 2015a). A fração de amido foi determinada utilizando o protocolo de Sluiter e Sluiter (2008), a fração lipídica foi obtida pelo método de determinação do Extrato Etéreo (EE) extraído com éter de petróleo a 90 °C por 90 minutos em sistema Ankom XT15 e a caracterização do perfil de ácidos graxos foi realizada em cromatógrafo gasoso (AOAC INTERNATIONAL, 2005).

Resultados e discussões

Ao final do cultivo da microalga *Nannochloropsis oculata* cultivada em tanques abertos, se obteve uma taxa de 25,21 mg/L/dia de produção de biomassa. Na Tabela 1, pode-se observar a composição química da biomassa e a produtividade estimada de cada componente.

Tabela 1. Composição química (em base seca) e produtividade da *Nannochloropsis oculata*.

Parâmetros	Teor (%)	Produtividade (mg/L/dia)
Sólidos Totais	96,271 ± 0,552	24,28
Cinzas	13,432 ± 0,192	3,39
Proteínas	32,760 ± 0,442	8,26
Carotenoides Totais	0,117 ± 0,011	0,03
Carboidratos Totais	10,624 ± 1,374	2,68
Amido	0,184 ± 0,003	0,05
Lipídios Totais	17,62 ± 0,20	4,44

Foi observado teor de 10,62% de carboidratos totais em *Nannochloropsis oculata* (Tabela 1). Arnold et al. (2015) relatam que os principais polissacarídeos presentes em *N. oculata* são a celulose (parede celular) e a crisolaminarina (leucosina), um polímero linear formado por ligações β (1 → 3) e β (1 → 6), que é sua reserva energética principal. Isso também explica os baixos teores de amido observados nessa microalga (Tabela 1), geralmente a reserva energética mais comum observadas em clorófitas (SUBRAMANIAN et al. 2013).

Neste experimento, obteve-se um teor de lipídios de 17,62% (Tabela 1), nos estudos de Olofsson et al. (2014) com *Nannochloropsis oculata* cultivadas em tanques abertos, é apresentado que a estação do ano e a deficiência de nitrogênio podem aumentar o acúmulo de lipídios em até 60%.

Zhu e Dunford (2013), realizando cultivos com *Nannochloropsis oculata* em frascos fechados, obtiveram teores maiores de lipídios (36,4%) e menores de proteínas (26,6%), mostrando que o modo de cultivo também influencia o acúmulo dos diferentes compostos de interesse.

O ácido graxo predominante encontrado na biomassa de *N. oculata* é o ácido palmítico (29,24%) (Tabela 2). Nascimento e colaboradores (2013) relatam que esse é o ácido graxo predominante na maioria dos extratos lipídios de microalgas. Segundo Sharma et al. (2012), a síntese desse ácido é aumentada em resposta a

altas intensidades luminosas, pois esse ácido está relacionado à fotoproteção das células.

Tabela 2. Perfil Ácidos Graxos da microalga *Nannochloropsis oculata*.

Perfil Ácidos Graxos da microalga <i>Nannochloropsis oculata</i>	
Ácido caprílico (C8:0)	0,19 ± 0,001
Ácido láurico (C12:0)	0,38 ± 0,064
Ácido mirístico (C14:0)	4,75 ± 0,161
Ácido miristoleico (C14:1)	0,55 ± 0,022
Ácido pentadecanóico (15:0)	0,78 ± 0,090
Ácido cis-10-pentadecanóico (15:1)	1,78 ± 0,59
Ácido palmítico (C16:0)	29,24 ± 0,921
Ácido palmitoleico (C16:1)	15,75 ± 2,633
Ácido heptadecanóico (C17:0)	0,30 ± 0,003
Ácido cis-10 heptadecanóico (C17:1)	0,37 ± 0,080
Ácido oleico (C18:1)	1,02 ± 0,572
Ácido esteárico (C18:0)	6,77 ± 0,933
Ácido linoleico (C18:2n-6c)	2,06 ± 0,242
Ácido gamalinolênico (C18:3n-ω-6)	0,64 ± 0,107
Ácido alfa-linolênico (C18:3)	7,17 ± 4,481
Ácido cis-11-eicosanoico (C20:1)	1 ± 0,655
Ácido beênico (C24:0)	0,27 ± 0,087
Ácido heneicosanóico (C21:0)	0,18 ± 0,343
Ácido cis-8,11,14-eicosatrienóico (C20:3n6)	1,66 ± 0,546
Ácido cis-11,14,17-eicosatrienóico (C20:3n3)	2,89 ± 0,105
Ácido tricosanoico (C23:0)	0,52 ± 0,296
Ácido eicosapentaenoico (C20:5 (ω-3))	15,51 ± 2,217
Ácido docosahexaenoico (C22:6n-3)	6,22 ± 0,137

Os dois tipos de ácidos graxos observados em maior concentração (C16:0 e C16:1) em *Nannochloropsis oculata* neste trabalho (Tabela 2), também é visto comumente por outros pesquisadores (BORGES et al., 2011). Recht et al. (2012) observaram que em resposta a estresses, *Nannochloropsis sp.* tende a aumentar a produção de ácidos graxos, pois muitos são responsáveis pela proteção da célula.

Nannochloropsis oculata apresentou altos níveis de ácidos graxos poli-insaturados (Pufa) (C18:3n-6, C18:3, C20:3n-6, C20:3n-3, C20:5 (ω -3) e C22:6n-3), fato relatado em outros estudos (RONQUILLO et al, 2012) e que indica potencial para utilização da biomassa algal para melhoria na qualidade nutricional de ração animal ou humana. Além disso, o mercado da produção de Pufa está crescendo pelas suas diversas propriedades benéficas à saúde e isso tem incentivado a busca de um maior entendimento da bioquímica lipídica das microalgas (KHOZIN-GOLDBERG et al., 2011).

Conclusão

A *Nannochloropsis oculata* é uma das microalgas potenciais para produção e processamento de bioprodutos em um contexto de biorrefinaria. Essa espécie possui resistência a condições adversas e um alto teor de diferentes compostos de interesse como lipídios (17,62%), carboidratos (10,62%) e proteínas (32,76%) em sua biomassa. O conteúdo de ácidos graxos poli-insaturados agrega valor à biomassa abrindo uma gama de possibilidades e aplicações tecnológicas.

Referências

- AOAC INTERNATIONAL. **Official methods of analysis**. 11TH ed. Washington, DC, 1990.
- AOAC INTERNATIONAL. Official Procedure. Approved Procedure Ce 1-62 - Fatty Acid Composition by gas chromatography. **American Oil Chemists Society**, 2005.
- AOCS. Official Procedure. Approved Procedure Ce 2-66 - Preparation of methyl esters of fatty acids. **American Oil Chemists Society**, 2005.
- ARNOLD, A. A.; GENARD, B.; ZITO F.; TREMBLAY R.; WARSCHAWSKI, D. E.; MARCOTTE, I. Identification of lipid and saccharide constituents of whole microalgal cells by C-13 solid-state NMR. **Biochimica et Biophysica Acta-Biomembranes**, Amsterdam, v. 1848, n. 1, p. 369–377, part B, 2015.
- BORGES, L.; FARIA, B. M.; ODEBRECHT, C.; ABREU, P. C. Potencial de absorção de carbono por espécies de microalgas usadas na aquicultura: primeiros passos para o desenvolvimento de um “mecanismo de desenvolvimento limpo”. **Atlântica**, Rio Grande, v. 29, n. 1, p. 35-46, 2007.
- BORGES, L.; MORÓN-VILLARREYES, J. A.; DOCA, M. G. M.; ABREU, P. C. Effects of flocculants on lipid extraction and fatty acid composition of the microalgae *Nannochloropsis oculata* and *Thalassiosira weissflogii*. **Biomass and Bioenergy**, Oxford, v. 35, n. 10, p. 4449 – 4454, 2011.

HUANG, J. J.; CHEUNG, P. C. Enhancement of polyunsaturated fatty acids and total carotenoid production in microalgae by ultraviolet band A (UVA, 365 nm) radiation. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, DC, v. 59, n. 9, p. 4629-4636, 2011.

KHOZIN-GOLDBERG, I.; ISKANDAROV, U.; COHEN, Z. LC-PUFA from photosynthetic microalgae: occurrence, biosynthesis, and prospects in biotechnology. **Applied Microbiology and Biotechnology**, New York, v. 91, n. 4, p. 905-915, 2011.

LAURENS, L. M. L. **Summative mass analysis of algal biomass**: integration of analytical procedures. Golden: The National Renewable Energy Laboratory, 2013.

NASCIMENTO, I. A.; MARQUES, S. S. I.; CABANELAS, I. T. D.; PEREIRA, S. A.; DRUZIAN, J. I.; SOUZA, C. O.; VICH, D. V.; CARVALHO, G. C.; NASCIMENTO, M. A. Screening microalgae strains for biodiesel production: lipid productivity and estimation of fuel quality based on fatty acids profiles as selective criteria. **Bioenergy Research**, New York, v. 6, n. 1, p. 1-13, 2013.

OLOFSSON, M.; LAMELA, T.; NILSSON, E.; BERGÉ, J. P.; PINO, V.; URONEN, P.; LEGRAND, C. Combined Effects of Nitrogen Concentration and Seasonal Changes on the Production of Lipids in *Nannochloropsis oculata*. **Marine Drugs**, Basel, v. 12, n. 4, p. 1891-1910, 2014.

PARK, J. B. K.; CRAGGS, R. J.; SHILTON, A. N. Wastewater treatment high rate algal ponds for biofuel production. **Bioresource Technology**, Oxon, v. 102, n. 1, p. 35-42, 2011.

RAWAT, I.; KUMAR, R. R.; MUTANDA, T.; BUX, F. Biodiesel from microalgae: a critical evaluation from laboratory to large scale production. **Applied Energy**, Oxon, v. 103, p. 444-467, 2013.

RECHT, L.; ZARKA, A.; BOUSSIBA, S. Patterns of carbohydrate and fatty acid changes under nitrogen starvation in the microalgae *Haematococcus Pluvialis* and *Nannochloropsis* Sp. **Applied Microbiology and Biotechnology**, New York, v. 94, n. 6, p. 1495-1503, 2012.

RONQUILLO, J. D.; FRASER, J.; MCCONKEY, A. J. Effect of mixed microalgal diets on growth and polyunsaturated fatty acid profile of European oyster (*Ostrea edulis*) juveniles. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 360-361, p. 64-68, 2012.

SHARMA, K. K.; SCHUHMANN, H.; SCHENK, P. M. High lipid induction in microalgae for biodiesel production. **Energies**, Basel, v. 5, n. 5, p. 1532-1553, 2012.

SLUITER, A.; SLUITER, J. **Determination of starch in solid biomass samples by HPLC**. Golden: National Renewable Energy Laboratory, [2008].

SUBRAMANIAN, S.; BARRY, A. N.; PIERIS, S.; SAYRE, R. T. Comparative energetics and kinetics of autotrophic lipid and starch metabolism in chlorophytic microalgae: implications for biomass and biofuel production. **Biotechnology for Biofuels**, London, v. 6, p. 150-162, 2013.

WYCHEN, S. V.; LAURENS, L. M. L. Determination of total carbohydrates in algal biomass. **The National Renewable Energy Laboratory**, 2015a. Disponível em: <<http://www.nrel.gov/docs/fy16osti/60957.pdf>>. Acesso em: 1 ago. 2016.

WYCHEN, S. V.; LAURENS, L. M. L. **Determination of total solids and ash in algal biomass**. Golden: The National Renewable Energy Laboratory, 2015b. Disponível em: <<http://www.nrel.gov/docs/fy16osti/60956.pdf>>. Acesso em: 1 ago. 2016.

YEN, H. W.; HU, I. C.; CHEN, C. Y.; HO, S. H.; LEE, D. J.; CHANG, J. S. Microalgae-based biorefinery: from biofuels to natural products. **Bioresource Technology**, Oxon, v. 135 p. 166–174, 2013.

ZHU, Y.; DUNFORD, N. T. Growth and biomass characteristics of *Picochlorum oklahomensis* and *Nannochloropsis oculata*. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, New York, v. 90, n. 6, p. 841-849, 2013.

Lignocelulases de basidiomicetos cultivados em biomassas vegetais residuais da agroindústria do dendê

Ruben Romero Peláez¹, Carla M. Camelini², Arailde Fontes Urben³, Cristiane Vieira Helm⁴, Thais Demarchi Mendes⁵, Simone Mendonça⁶, Félix Gonçalves de Siqueira⁷

Resumo

Os fungos de podridão-branca produzem enzimas extracelulares capazes de modificar os componentes de celulose, hemicelulose e lignina da parede celular vegetal. Foi avaliada a capacidade de produção de enzimas lignocelulolíticas (lignocelulases) por basidiomicetos, também conhecidos como fungos de podridão-branca ou do inglês white-rot fungi (WRF), quando cultivados em fermentação estado sólido (FES) em formulações contendo três resíduos lignocelulósicos da agroindústria do dendê. Foram avaliadas 60 cepas de basidiomicetos quanto à taxa de crescimento micelial (mm.dia^{-1}) e densidade micelial em ágar contendo os resíduos lignocelulósicos. Os macrofungos *Lepiota fuscipes* CC402, *Trametes versicolor* CC124, *Panus lecontei* CC40, *Ganoderma lipsiense* CC36 e *Oudemansiella canarii* CC37 tiveram as melhores taxas de crescimento. Esses WRFs foram cultivados em FES em frascos (tipo erlenmeyer) contendo 30 g (massa seca) de biomassas lignocelulósicas de dendê em três formulações diferentes: F1) cacho vazio 100% (CV100); F2) fibra de prensagem 100% (FP100); e F3) mistura de cacho, fibra e borra do decantador (CV60:FP30:BD10). Os extratos enzimáticos, obtidos a partir da FES, foram avaliados quanto às atividades celulolíticas, hemicelulolíticas, lignolíticas, lipolíticas e proteolíticas. Os extratos obtidos do cultivo dos WRFs apresentaram maiores atividades para proteases e enzimas oxidativas, tais como peroxidases totais, lacases e manganês peroxidases, do que celulasas e hemicelulasas, nos três

¹ Biólogo, mestrando em Biotecnologia, Universidade Federal de Tocantins, ruben.pelaez@coloaborador.embrapa.br

² Farmacêutica tecnóloga de alimentos, doutora em Biotecnologia, carla.camelini@colaborador.embrapa.br

³ Bacharel em História Natural, doutora em Biologia, pesquisadora da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, arailde.urben@embrapa.br

⁴ Química Industrial, doutora em Ciência dos Alimentos, pesquisadora da Embrapa Florestas, cristiane.helm@embrapa.br

⁵ Bióloga, mestre em Microbiologia Aplicada, analista da Embrapa Agroenergia, thais.demarchi@embrapa.br

⁶ Farmacêutica, doutora em Saúde Pública, Universidade de São Paulo, pesquisadora da Embrapa Agroenergia, simone.mendonca@embrapa.br

⁷ Biólogo, doutor em Biologia Molecular, pesquisador da Embrapa Agroenergia, felix.siqueira@embrapa.br

tipos de formulações de substratos, com melhor desempenho da formulação mista (F3). Os extratos brutos fúngicos, pela presença de enzimas lignolíticas e peroxidases que têm atuação na deslignificação e complexos fenólicos, podem ser empregados na formulação de coquetéis enzimáticos (*enzyme blend*) para desconstrução de biomassa vegetal.

Introdução

O óleo de palma ou óleo de dendê (Brasil) é o óleo vegetal mais produzido no mundo, sendo utilizado para obtenção de biodiesel, cosméticos e na indústria de alimentos. A cultura agrônômica dessa palmeira tem alta produtividade (4 a 5,5 toneladas de óleo por hectare por ano), com menor custo de produção em comparação com outros óleos vegetais. Durante o processo agroindustrial, apenas 10% de todo cacho com as sementes são convertidos em óleo, gerando assim um volume significativo de resíduos lignocelulósicos. Esses resíduos podem ser utilizados na obtenção de produtos de valor agregado, tais como biocombustíveis (etanol celulósico), químicos (monossacarídeos, ácidos orgânicos, compostos bioativos), ração animal ou enzimas lignocelulolíticas, por exemplo.

Os white-rot fungi (WRFs) são reconhecidos pela capacidade de degradar os componentes da parede celular vegetal, principalmente a lignina, por meio da atuação de enzimas como lacases, manganês peroxidases e lignina peroxidases. O uso desses macrofungos em processos de pré-tratamento ou na produção dessas enzimas pode servir para deixar a celulose mais acessível às celulasas e, assim, obter maiores rendimentos de glicose na hidrólise enzimática de biomassa vegetal.

O objetivo deste trabalho foi utilizar os resíduos lignocelulósicos da agroindústria do óleo de palma (cachos vazios, fibra de prensagem e borra do óleo de dendê gerada no decantador, aqui chamada de borra do decantador) como substrato para o crescimento de macrofungos (WRFs) e produção de lignocelulasas.

Materiais e métodos

Microrganismos

Os macrofungos utilizados neste trabalho pertencem às coleções de microrganismos da Embrapa Agroenergia, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia e Embrapa Florestas. A manutenção e preservação das cepas foi

feita por repicagens regulares em meio BDA (Batata dextrose ágar) em placas Petri e incubadas a 28 °C. Placas totalmente colonizadas foram armazenadas em câmara fria (4 °C).

Capacidade de crescimento micelial dos macrofungos

Foram avaliados 60 macrofungos quanto à capacidade de crescimento em meios a base de biomassa de dendê. Cada macrofungo foi avaliado individualmente em ágar contendo 10% (m/v) de cacho vazio (CV), fibra de prensagem (FP) ou borra do decantador (BD) como único substrato. Os meios foram esterilizados (121 °C, 30 minutos), por duas vezes (tindalização), com intervalo de 24 horas, antes de serem vertidos nas placas. As placas foram inoculadas, no ponto central, com um disco de 5 mm de diâmetro (massa micelial). O crescimento micelial foi avaliado pela medição do diâmetro micelial nos tempos de 3, 5, 7 e 9 dias de cultivo a 28 °C (Figura 1). Também foram registradas as características morfológicas quanto à densidade micelial (qualitativamente).

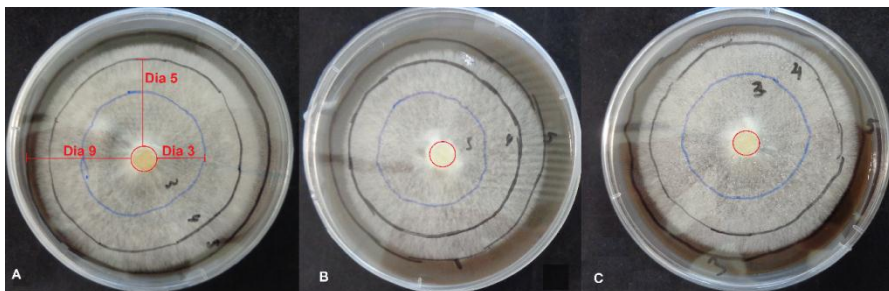


Figura 1. Crescimento micelial de *Panus lecomtei* CC40 nos três substratos à base de ágar + biomassas vegetais residuais da agroindústria de extração de óleo de dendê: Borra do decantador (A); Fibra de prensagem (B); Cacho vazio (C).

Macrofungos: cultivos em fermentação em estado sólido (FES)

Em frascos de vidro, foram adicionados 30 g (massa seca) de resíduos lignocelulósicos (biomassa residual da agroindústria do óleo de dendê) e água destilada para atingir ~65% de umidade. As formulações do meio de cultivo foram: CV 100% (F1); FP 100% (F2); e, CV/FP/BD relação 6:3:1 (F3). Cada frasco foi inoculado com cinco discos de 5 mm de massa micelial de cada macrofungo (cinco macrofungos selecionados previamente) e transferidos para incubação a 28 °C por 15 dias.

Atividades enzimáticas

Em frascos Erlenmeyer de 250 mL, adicionou-se 10 g do sólido fermentado (micélio crescido nas formulações de biomassas vegetais) e solução Triton X100 0,1%, em relação 1:5 (massa úmida/volume). Os frascos foram submetidos a agitação em shaker a 200 rpm, 5 °C por 40 minutos. O conteúdo foi transferido para tubos de 50 mL e centrifugados por 10 minutos, 10.000 rpm a 4 °C. O sobrenadante, agora denominado extrato enzimático, foi transferido para tubos de 50 mL com 0,02% de azida sódica. Os extratos enzimáticos foram usados para avaliação das atividades enzimáticas. As atividades de FPase (celulases totais), endoglicanase, xilanase e poligalacturonase foram determinadas por ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) a 540 nm, usando-se como substratos papel filtro Whatman®, carboximetilcelulose, xilana (beechwood) e ácido poligalacturônico, respectivamente. A atividade beta-glicosidase foi determinada com base em Ghose (1987) com celobiose como substrato. As atividades de lacase e peroxidases totais foram determinadas pela oxidação de ABTS a 420 nm sem e com presença de H₂O₂ (WOLFENDEN; WILSONS, 1982). A lignina peroxidase e as peroxidases totais foram determinadas pela oxidação do álcool veratrílico a 310 nm. A manganês peroxidase foi determinada pela oxidação de MnSO₄ em presença de H₂O₂. A atividade proteolítica foi determinada com azocaseína como substrato. As lipases foram determinadas por titulação dos ácidos graxos liberados, usando como substrato óleo de oliva (DIAZ et al., 2006). As proteínas solúveis totais foram quantificadas pela metodologia do ácido bicinconínico (BCA). Todas as atividades foram expressas em Unidades internacionais (UI) por mL em função da liberação dos produtos de cada reação.

Resultados e discussão

Crescimento micelial

Dentre os 60 basidiomicetos testados, 55 cresceram nos distintos meios de cultura contendo ágar e os resíduos lignocelulósicos como substrato. Os melhores resultados quanto ao crescimento micelial foram observados para os macrofungos *L. fuscipes* CC402 em BD, *G. lipsiense* CC36 em CV e *T. versicolor* CC124 em FP com a medida de 8,4 mm.dia⁻¹. Com base em dados quantitativos (crescimento) e qualitativos (densidade micelial), cinco cepas apresentaram

melhores resultados (*L. fuscipes* CC402, *T. versicolor* CC124, *G. lipsiense* CC36, *O. canarii* CC37 e *P. lacomtei* CC40) e foram selecionadas para cultivo em estado sólido contendo como substrato apenas os resíduos lignocelulósicos para então determinar as atividades enzimáticas.

Atividades enzimáticas

Os cinco macrofungos mostraram atividade enzimáticas residuais para celulasas totais nas três formulações e não houve diferenças significativas ($p < 0.005$), conforme apresentado nas Tabelas 1, 2 e 3.

Tabela 1. Perfil enzimático de extrato obtido de cultivo de cinco basidiomicetos em Fermentação Estado Sólido (FES) usando cacho vazio do dendê (F1) como substrato, durante 15 dias, com incubação a 28 °C e ~65% de umidade. Os valores estão apresentados em U/mL para atividades enzimáticas e em mg/mL para proteínas totais, seguido dos valores do desvio padrão.

Enzimas	<i>G. lipsiense</i>	<i>O. canarii</i>	<i>P. lacomtei</i>	<i>T. versicolor</i>	<i>L. fuscipes</i>
	CC36	CC37	CC40	CC124	CC402
Celulasas totais	0,09 ± 0,03	0,03 ± 0,00	0,03 ± 0,00	0,05 ± 0,01	0,05 ± 0,03
Endoglicanase	0,04 ± 0,02	0,04 ± 0,01	0,03 ± 0,02	0,08 ± 0,02	0,04 ± 0,03
β-glicosidase	ND	ND	ND	ND	ND
Xilanase	ND	ND	ND	ND	ND
Peroxidase totais	ND	10,76 ± 2,40	12,5 ± 0,00	20,83 ± 0,00	26,04 ± 2,08
Lacase	ND	9,37 ± 2,75	4,16 ± 0,00	31,25 ± 0,00	12,5 ± 0,00
Manganês Pox	0,40 ± 0,09	0	28,46 ± 0,35	6,09 ± 0,28	31,37 ± 0,33
Lignina Pox	ND	ND	ND	ND	ND
Oxidases (AV)	ND	ND	ND	ND	ND
Protease	32,06 ± 1,14	33,39 ± 0,76	44,99 ± 4,26	6,94 ± 0,96	3,54 ± 1,96
Lipase	ND	ND	ND	ND	ND
Poligalacturonase	ND	ND	ND	ND	ND
Proteína total (BCA)	3,05 ± 0,03	2,8 ± 0,03	3,72 ± 0,07	2,83 ± 0,05	3,10 ± 0,03

ND: não detectada; Pox: peroxidase; BCA: ácido bicinconínico; AV: álcool veratrílico.

As atividades celulolíticas foram baixas em comparação à literatura. Por outro lado, é de interesse a busca de fungos com alta especificidade na degradação oxidativa da parede celular.

As atividades oxidativas relacionadas ao processo de deslignificação mostraram atividades enzimáticas com diferenças significativas para alguns macrofungos nas diferentes formulações. Os extratos enzimáticos dos macrofungos *P. lacomtei* CC40, *T. versicolor* CC124 e *L. fuscipes* CC402 apresentaram as maiores atividades para as oxidases e peroxidases; *T. versicolor* CC124 obteve a maior atividade para lacase (44,79 U/mL) e *L. fuscipes* CC402 para manganês peroxidase (48,71 U/mL), ambas na formulação F3. O *Ganoderma lipsiense* CC36 não apresentou atividade para lacase em nenhuma das formulações. Atividades de beta-glicosidase, xilanase, lignina peroxidase, oxidases álcool veratrílico, lipase e poligalacturonase não foram observadas em nenhum dos macrofungos nas três formulações de meios (Tabelas 1 a 3).

Tabela 2. Perfil enzimático de extrato obtido de cultivo de cinco basidiomicetos em Fermentação Estado Sólido (FES) usando fibra de prensagem do dendê (F2) como substrato, durante 15 dias, com incubação a 28 °C e ~65% de umidade. Os valores estão apresentados em U/mL para atividades enzimáticas e em mg/mL para proteínas totais, seguido dos valores do desvio padrão.

Enzimas	<i>G. lipsiense</i> CC36	<i>O. canarii</i> CC37	<i>P. lacomtei</i> CC40	<i>T. versicolor</i> CC124	<i>L. fuscipes</i> CC402
Celulase total	0,07 ± 0,01	0,02 ± 0,01	0,03 ± 0,02	0,05 ± 0,02	0,05 ± 0,01
Endoglicanase	0,08 ± 0,03	0,04 ± 0,02	0,03 ± 0,01	0,07 ± 0,01	0,05 ± 0,00
β-glicosidase	ND	ND	ND	ND	ND
Xilanase	ND	ND	ND	ND	ND
Peroxidase totais	ND	ND	6,94 ± 0,00	26,04 ± 2,08	6,25 ± 0,00
Lacase	ND	4,17 ± 0,00	4,16 ± 0,00	31,25 ± 4,16	4,16 ± 0,00
Manganês Pox	0,05 ± 0,01	0	9,78 ± 0,29	6,09 ± 0,29	32,99 ± 0,56
Lignina Pox	ND	ND	ND	ND	ND
Oxidases (AV)	ND	ND	ND	ND	ND
Protease	40,95 ± 1,89	31,03 ± 0,93	42,98 ± 3,09	29,36 ± 1,57	17,98 ± 1,63
Lipase	ND	ND	ND	ND	ND
Poligalacturonase	ND	ND	ND	ND	ND
Proteína total (BCA)	1,48 ± 0,01	1,56 ± 0,05	1,82 ± 0,04	3,07 ± 0,02	1,57 ± 0,03

ND: não detectada; Pox: peroxidase; BCA: ácido bicinconíico; AV: álcool veratrílico.

A degradação seletiva de lignina em função de alta atividade lacase em *T. versicolor* CC124 já foi observada por Zhu et al. (2011), usando palha de milho

como substrato. *L. fuscipes* CC402 ainda não foi reportado na literatura em relação a pré-tratamentos de biomassas lignocelulósicas e atividades enzimáticas.

No presente trabalho, o extrato de *L. fuscipes* CC402 apresentou alta atividade de peroxidases totais, lacases e proteases, indicando que esse fungo, ainda pouco explorado, pode ser melhor estudado como fonte de enzimas oxidativas. Os extratos dos cinco macrofungos, nas três formulações de substratos, apresentaram atividade proteolítica. Os maiores resultados foram obtidos nos cultivos com formulação (F3), nos quais foram obtidos valores próximos a 50 U/mL, com exceção do *L. fuscipes* CC402, que apresentou atividade 25 U/mL, mas superior às outras duas formulações.

Tabela 3. Perfil enzimático de extrato obtido de cultivo de cinco basidiomicetos em Fermentação Estado Sólido (FES) usando mistura de cacho vazio, fibra de prensagem e borra do decantador do dendê em uma relação 6:3:1 (F3) como substrato, durante 15 dias, com incubação a 28 °C e ~65% de umidade. Os valores estão apresentados em U/mL para atividades enzimáticas e em mg/mL para proteínas totais, seguido dos valores do desvio padrão.

Enzimas	<i>G. lipsiense</i> CC36	<i>O. canarii</i> C37	<i>P. lacomtei</i> CC40	<i>T. versicolor</i> CC124	<i>L. fuscipes</i> CC402
Celulase total	0,04 ± 0,02	0,03 ± 0,00	0,02 ± 0,01	0,06 ± 0,04	0,07 ± 0,01
Endoglicanase	0,06 ± 0,01	0,04 ± 0,02	0,06 ± 0,04	0,11 ± 0,04	0,05 ± 0,03
β-glicosidase	ND	ND	ND	ND	ND
Xilanase	ND	ND	ND	ND	ND
Peroxidase totais	ND	14,93 ± 2,40	8,33 ± 0,00	37,5 ± 0,00	16,67 ± 0,00
Lacase	ND	16,66 ± 2,16	8,33 ± 0,00	44,79 ± 2,08	8,33 ± 0,00
Manganês Pox	0,45 ± 0,11	2,54 ± 0,24	41,05 ± 0,43	8,05 ± 0,50	48,71 ± 0,43
Lignina Pox	ND	ND	ND	ND	ND
Oxidases (AV)	ND	ND	ND	ND	ND
Protease	51,32 ± 5,22	50,67 ± 7,63	54,79 ± 1,85	47,78 ± 5,53	25,51 ± 7,13
Lipase	ND	ND	ND	ND	ND
Poligalacturonase	ND	ND	ND	ND	ND
Proteína total (BCA)	3,59 ± 0,27	3,73 ± 0,29	4,06 ± 0,11	3,78 ± 0,16	2,46 ± 0,12

ND: não detectada; Pox: peroxidase; BCA: ácido bicinconíico; AV: álcool veratrílico.

Conclusões

Os basidiomicetos são macrofungos que podem ser explorados quanto ao potencial de produção de algumas ligninases e proteases quando cultivados em biomassas lignocelulósicas da agroindústria do dendê como fonte nutritiva. Essas enzimas podem ser utilizadas em coquetéis enzimáticos empregados na desconstrução de biomassa vegetal para obtenção de açúcares solúveis. São enzimas atuantes na degradação da lignina ou componentes fenólicos/peróxidos de hidrogênio liberados nas etapas de pré-tratamento.

Referências

- DIAZ, J. C. M.; RODRÍGUEZ, J. A.; ROUSSOS, S.; CORDOVA, J.; ABOUSALHAM, A.; CARRIERE, F.; BARATTI, J. 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, 2006.
- GHOSE, T. K. Measurement of cellulase activities. **Pure and Applied Chemistry**, Oxon, v. 59, n. 2, p. 257-268, 1987.
- KUWAHARA, M.; GLENN, J. K.; MORGAN, M. A.; GOLD, M. H. Separation and characterization of 2 extracellular H₂O₂- dependent oxidases from ligninolytic cultures of *Phanerochaete chrysosporium*. **FEBS Letters**, Amsterdam, v. 169, n. 2, p. 247-250, 1984.
- MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical biochemistry**, Washington, DC, v. 31, n. 3, p. 426-428, 1959.
- WOLFENDEN, B.; WILSON, R. Radical-cations as reference chromogens in the kinetic studies of one-electron transfer reactions: pulse radiolysis studies of 2,2'-azinobis-(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonate). **Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 2**, Londres, n. 7, p. 805-812, 1982.
- ZHU, Y; ZHANG, H; ZHANG, Y; HUANG, F. Lignocellulose degradation, enzyme production and protein enrichment by *Trametes versicolor* during solid-state fermentation of corn stover. **African Journal of Biotechnology**, Lagos, v. 10, n. 45, p. 9182-9192, 2011
- TIEN, M.; KIRK, T. T. Lignin-degrading enzyme from *Phanerochaete chrysosporium* purification, characterization, and catalytic properties of a unique H₂O₂-requiring oxygenase. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America-Biological Sciences**, Washington, DC, v. 81, n. 8, p. 2280-2284, 1984.

Avaliação preliminar da microbiota nativa do Pome (*palm oil mill effluent*) para a produção de biogás

Priscilla Araújo Victor¹, Sílvia Belém Gonçalves², Fabrício Machado Silva³,
Rossano Gambetta⁴

Resumo

Os efluentes da obtenção do óleo de palma (Pome), quando descartados de forma inadequada, tornam-se um problema ambiental e econômico uma vez que será necessário dispor de recursos financeiros para remediar os danos gerados por esse descarte. Por ser rico em matéria orgânica, esse resíduo pode ser reutilizado para a produção de compostos químicos, agregando valor a cadeia produtiva do óleo de palma. Nesse contexto, esse trabalho visa avaliar o potencial de aplicação do Pome na produção de biogás.

Introdução

O dendezeiro (palma de óleo) é uma planta originária da África, onde se concentra quase 90% de sua produção mundial. Foi trazida para o Brasil pelos escravos e se adaptou muito bem ao clima tropical e úmido das regiões Norte e Nordeste. O Pará é o estado com a maior produção de óleo oriundo dessa palmácea, representando mais de 90% da produção nacional(ALVES, 2011).

O Pome, sigla para *palm oil mil efluente* (efluente da extração do óleo de palma) é um resíduo líquido abundante da extração de óleo. Seu volume é cerca de cinco vezes maior que a quantidade de óleo extraído, pois, na extração de óleos, cada tonelada de dendezeiros gera cerca de uma tonelada de efluentes (NÚÑEZ CAMARGO, 2012).

O Pome tem aproximadamente 95% de água, 0,6% de óleo e 4,5% de sólidos totais, que são principalmente fragmentos da palma. Geralmente, possui pH entre 3,4 e 5,2. Quando descartado diretamente nos rios pode causar um processo de eutrofização, que é o excesso de nutrientes na água, provocando um aumento

¹ Química, doutoranda em Tecnologias Químicas e Biológicas, Universidade de Brasília, priscilla.analitica@hotmail.com

² Engenharia química, doutora em Engenharia Química, pesquisadora da Embrapa Agroenergia, silvia.belem@embrapa.br

³ Engenheiro químico, doutor em Engenharia Química, professor do Instituto de Química da Universidade de Brasília, fmachado@unb.br

⁴ Engenheiro químico, doutor em Engenharia Química, pesquisador da Embrapa Agroenergia, rossano.gambetta@embrapa.br

excessivo de algas e conseqüentemente um grande prejuízo ambiental (NABARLATZ et al., 2013).

Em suma, o maior problema nas agroindústrias de dendezeiros no Brasil é em relação à água, e as indústrias argumentam que os sistemas de tratamento dos efluentes são de alto custo, o que as levam a armazenar os efluentes em grandes tanques para posterior utilização nos plantios. Além disso, há uma série de parâmetros exigidos pela legislação Conama 357/2005 para o descarte de efluentes industriais em corpos hídricos como, por exemplo: temperatura, DQO (Demanda Química de Oxigênio), DBO (Demanda Bioquímica de Oxigênio), alcalinidade total, pH e ácidos voláteis (NABARLATZ et al., 2013).

Tipicamente, o biogás possui a seguinte composição: 60% de metano, 35% de dióxido de carbono e 5% de uma mistura de oxigênio, aminas, nitrogênio, hidrogênio e monóxido de carbono. Contudo, dependendo do processo e o material escolhido para a produção de biogás, a quantidade de metano pode variar de 40% a 80% (PRADO et al., 2010).

O grande desafio hoje é que com o aumento na produção e beneficiamento da palma de óleo ocorrerá inevitavelmente um aumento na geração do Pome. Diante disso, os pesquisadores têm o papel de encontrar rotas alternativas para o uso dos resíduos desse processo de forma a produzir materiais com maior valor agregado, como, por exemplo, o biogás.

Materiais e métodos

Análise de pH – foi utilizado pHmetro Methohm, modelo 827 pHLAB, em que 50 mL da amostra foi transferida para um béquer e depois introduzido o sensor para a medição.

Teor de umidade e sólidos totais – aproximadamente 20 g de Pome foram pesados e colocados em 3 placas de petri (previamente secas e pesadas). As placas foram colocadas na estufa a 105 °C. Após o tempo de evaporação (24 h), as placas foram colocadas em dessecadores para esfriar e depois pesadas novamente até peso constante.

Determinação de alcalinidade total – aproximadamente 200 mL de Pome foram centrifugados em centrífuga de bancada. Depois, foram colocados 50 mL do sobrenadante em 3 béqueres e colocados para agitação na placa de aquecimento com agitação magnética. O eletrodo de pH foi colocado no béquer e o pH inicial medido. O pH foi ajustado para 4,3 usando H_2SO_4 (**H_2SO_4 0,02 N:**

13,4 mL de H₂SO₄ 97,8% para cada 500 mL de água destilada) e o volume anotado. Depois o pH foi reduzido para 3,0. A solução resultante foi reservada para a determinação de ácidos voláteis. Para a determinação em mg/L, é usada a seguinte fórmula: Alcalinidade total = $(V_{\text{ácido}} * M(\text{molaridade do ácido}) * 100.000) / V_{\text{amostra}}$

Determinação de ácidos voláteis – na solução reservada do experimento anterior foram colocadas pérolas de vidro e levadas para aquecer em placa de aquecimento com agitação magnética por 3 minutos depois da fervura. Após o resfriamento, o pH foi corrigido para 4,0 com a solução de NaOH (**NaOH 0,5 N**: 10 g de NaOH para cada 500 mL de água destilada). Depois, abaixado para pH 7,0 e anotado o volume. Para a determinação em mg/L, é usada a seguinte fórmula: Ácidos Voláteis = $(V_{\text{base}} * M(\text{molaridade da base}) * 600.000 * 1,5) / V_{\text{amostra}}$

Crescimento microbiano e análise microscópica da microbiota – com o objetivo de comparar o crescimento da microbiota do lodo, foram utilizados outros quatro meios além do Pome: LB (ágar Luria Bertani), BDA (ágar batata dextrose), YPG (ágar Yeast extract com peptona e glucose) e vinhaça. Para crescimento microbiano, foi utilizado 1 mL de lodo (oriundo da lagoa de estabilização de uma empresa de beneficiamento de dendê) e colocado em 40 mL meio. Os frascos utilizados foram armazenados em capela e depois de 10 dias a microbiota presente foi analisada em microscópio de luz.

Resultados e discussão

A literatura reporta que o pH ótimo para o crescimento das bactérias responsáveis pela produção de biogás fica entre 6,5 e 7,5. O pH da amostra obtida foi de 4,7. Contudo, isso pode ser ajustado adicionando tampão ao meio. O teor de umidade foi de 86% e os sólidos totais de 14%.

A alcalinidade total está correlacionada à concentração de substâncias contidas na água que têm a competência de neutralizar ácidos, ou seja, de atuar como tampão. Para que o meio seja tamponado devidamente, a alcalinidade total deve estar entre 2.500 mg/L e 5.000 mg/L. A média do volume foi de 0,73 e a alcalinidade medida foi de 29,2 mg/L, por meio do emprego da Equação 1.

$$\text{Alcalinidade total} = (V_{\text{ácido}} * M * 100.000) / V_{\text{amostra}} \quad (\text{Equação 1})$$

Os ácidos voláteis do Pome na concentração de 50.400 mg/L, conforme Equação 2, torna-se tóxica para as bactérias metanogênicas (responsáveis pela produção de metano), já que estão em sua forma não ionizável e causam a inibição da atividade. Uma solução para tal problema é o ajuste do pH para uma faixa entre 6,7 e 8,0, pois nessa faixa cerca de 90% dos ácido voláteis estão em sua forma ionizada, portanto não tóxica.

$$\text{Ácidos Voláteis} = (V_{\text{base}} * M * 600.000 * 1,5) / V_{\text{amostra}} \quad (\text{Equação 2})$$

Diante dos inibidores apresentados anteriormente, o pH dos meios foram ajustados para aproximadamente 6,7 com o objetivo de minimizar os inibidores e observar as bactérias responsáveis pelo processo de produção de biogás. Os meios LB, BDA e YPG foram escolhidos por serem meios comerciais e mais usuais para manutenção e cultivo de microrganismos cultiváveis. A vinhaça, por sua vez, foi escolhida por também ser um efluente agroindustrial. Os frascos foram abertos todos os dias para a liberação do gás produzido, evitando assim o aumento da pressão dentro dos frascos.

Na Figura 1 são apresentadas análises de microscopia óptica (campo claro) do lodo, em que é possível observar microrganismos com morfologia característica de cocos, estreptococos, leveduras e microalgas. Tal variedade pode ser explicada pelo fato de o lodo ser oriundo de uma lagoa de estabilização.

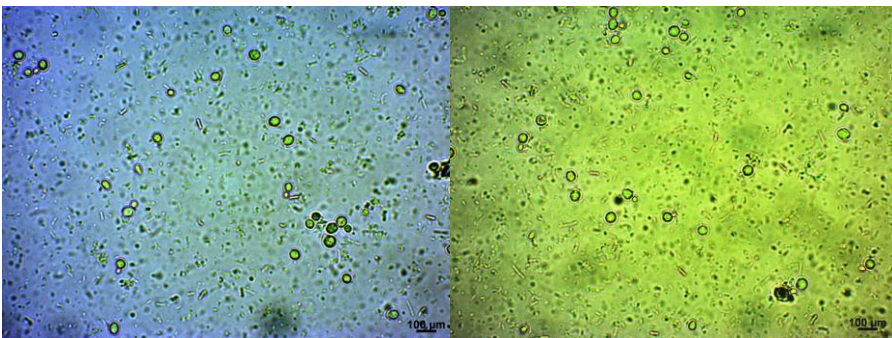


Figura 1. Análises de microscopia óptica (campo claro) do lodo da lagoa de estabilização.

Na Figura 2 são mostrados os frascos com a solução Pome/lodo (40:1) e suas análises de microscopia óptica (campo claro), depois de 10 dias, em que é possível observar uma maior quantidade de microrganismos com morfologias

características de bactérias cocos (em maior concentração) e estreptococos. Essas bactérias, em ambiente anaeróbico (ausências de oxigênio) são responsáveis pela produção de biogás. A ausência de microalgas e leveduras pode ser explicada pela alta turbidez do Pome, o que causa a dificuldade de entrada de luz e a diminuição da quantidade de oxigênio no meio.

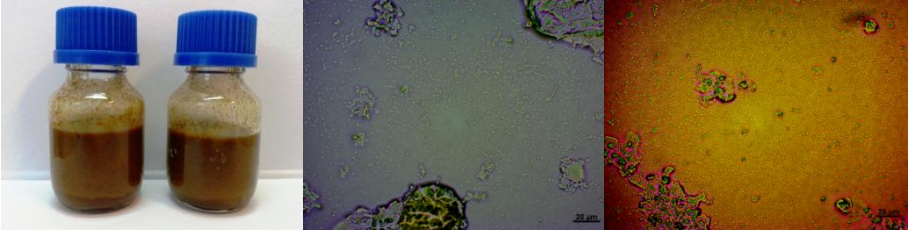


Figura 2. Frascos contendo Pome e lodo da lagoa de estabilização analisados por microscopia óptica (campo claro).

Nas Figuras 3 e 4, estão os frascos com as soluções de vinhaça/lodo (40:1) e meio YPG/lodo (40:1), respectivamente, bem como suas análises de microscopia óptica (campo claro), depois de 10 dias, em que apresentam uma grande concentração de microrganismos com morfologia de leveduras e microalgas. No caso da vinhaça, esse crescimento pode ser explicado pelo fato de o meio ser favorável ao crescimento, sendo inclusive usado para o cultivo de microalgas (ORTENZIO et al., 2015). O meio YPG é usado no cultivo de leveduras e isso pode ser observado na microscopia. No caso das leveduras, o crescimento em ambos os meios pode ser explicado pela alta concentração de açúcares.

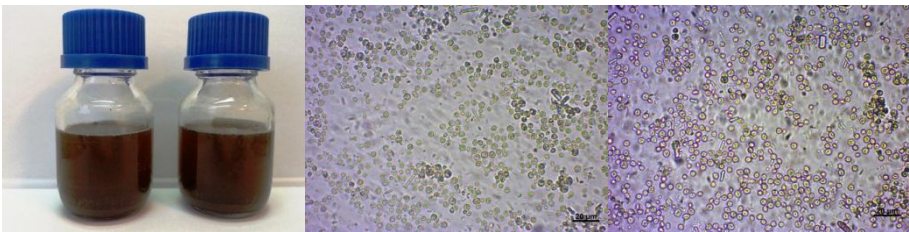


Figura 3. Frascos contendo vinhaça e lodo da lagoa de estabilização e suas microscopias.

Nas Figuras 5 e 6, são mostrados os frascos com as soluções de meios LB/lodo (40:1) e BDA/lodo (40:1) e suas respectivas microscopias depois de 10 dias. Os dois meios são usados para crescimento de bactérias. Ambas as

microscopias são similares, pois apresentam uma grande concentração de bactérias com morfologias de cocos e estreptococos, dentre esses uma maior concentração de estreptococos.

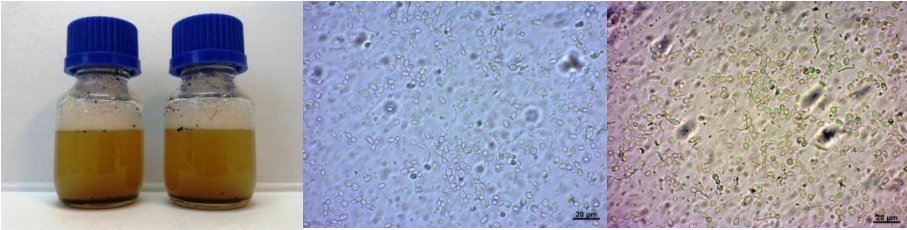


Figura 4. Frascos contendo meio YPG e lodo da lagoa de estabilização e suas microscopias.

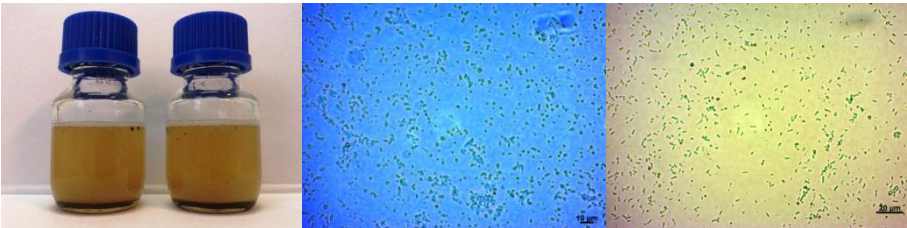


Figura 5. Frascos contendo meio LB e lodo da lagoa de estabilização e suas microscopias.



Figura 6. Frascos contendo meio BDA e lodo da lagoa de estabilização e suas microscopias.

O conjunto de resultados apresentados indica que a microbiota original do lodo é bem rica. Para o isolamento e seleção de bactérias, microrganismos responsáveis pela produção de biogás, é aconselhável o uso dos meios LB, BDA e Pome.

Conclusão

A microbiota responsável pela produção de biogás é influenciada e equilibrada diretamente pelo pH, alcalinidade e acidez. De acordo com as análises iniciais do Pome, é possível inferir que esse efluente in natura não é adequado para o crescimento da microbiota, contudo, após o ajuste de pH, foi observado o crescimento de microrganismos e isso é importante para criar condições favoráveis para desenvolvimento e conservação da microbiota no reator anaeróbio para uma maior produção de biogás. Podemos também concluir que o Pome, com os devidos ajustes, é um meio favorável para crescimento de bactérias e, no caso de isolamento e seleção, os meios mais indicados são o LB e o BDA.

Apoio financeiro

Este trabalho foi financiado com recursos do projeto DendePalm/Finep.

Referências

- ALVES, S. A. O. **Sustentabilidade da agroindústria de palma no Estado do Pará**. 2011. 162 f. Tese (Doutorado em Ciências) - Universidade de São Paulo, São Paulo, SP.
- NABARLATZ, D. A.; ARENAS-BELTRÁN, L. P.; HERRERA-SORACÁ, D. M.; NIÑO-BONILLA, D. A. Biogas production by anaerobic digestion of wastewater from palm oil mill industry. **CT&F - Ciencia, Tecnología y Futuro**, Bogotá, v. 5, n. 2, p. 73-83, 2013.
- NÚÑEZ CAMARGO, D. W. Uso de residuos agrícolas para la producción de biocombustibles en el departamento del meta. **Tecnura**, Bogotá, v. 16, n. 34, p. 142-156, 2012.
- PRADO, M. A. C.; CAMPOS, C. M. M.; SILVA, J. F. D. Estudo da variação da concentração de metano no biogás produzido a partir das águas residuárias do café. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 34, n. 2, p. 475-484, 2010.
- ORTENZIO, Y. T.; AMARAL, G. G. do; ALMEIDA, S. S.; OLIVEIRA, E. C. A. M. Cultivo de Microalgas utilizando resíduos agroindustriais para a produção de biocombustíveis: perspectivas e desafios. **Bioenergia em Revista: Diálogos**, Piracicaba, v. 5, n. 1, p. 58-65, 2015.

Seleção de fungos filamentosos capazes de crescer em diferentes glicerinas como única fonte de carbono

Andréia Aparecida Jacomassi Carneiro¹, Gleiciane P. Sousa², Diogo Keiji Nakai³, Thályta Fraga Pacheco⁴, Léia Cecília de Lima Fávaro⁵, Simone Mendonça⁶, Itânia Pinheiro Soares⁷, Mônica Caraméz Triches Damaso⁸

Resumo

Com o crescente aumento mundial na produção de biodiesel, inclusive no Brasil, existe uma grande oportunidade em agregar valor ao coproduto gerado, a glicerina. Neste trabalho, três glicerinas de diferentes origens (padrão comercial, brutas de óleo de palma e de soja) foram utilizadas como única fonte de carbono, para avaliação do índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM) de 96 linhagens de fungos endofíticos, previamente isolados de cana-de-açúcar. A glicerina de óleo de palma foi produzida neste trabalho como coproduto da produção de biodiesel por transesterificação com metanol. Todas as linhagens avaliadas foram identificadas taxonomicamente por técnicas moleculares. As 96 linhagens foram incubadas em YNB acrescido das glicerinas, por 7 dias a 28 °C. A medição do diâmetro das colônias foi realizada após 3º, 5º e 7º dias, com o auxílio de um paquímetro digital. As faixas de valores de IVCM (mm/dia) para as glicerinas de palma, soja e comercial foram 0,49-18,97; 2,02-20,79; 2,68-18,50, respectivamente. Dentre as 96 linhagens, somente 13 não cresceram em meio contendo glicerina de palma. Para a glicerina comercial e de soja, houve crescimento de todas as linhagens. Com base nos valores de IVCM e na identificação taxonômica, 20 delas foram selecionadas para testes futuros de bioconversão visando avaliar a síntese de químicos utilizando-se glicerina bruta.

¹ Bióloga, doutora em Microbiologia Aplicada, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, andrea.jacomassi@colaborador.embrapa.br

² Engenheira de Bioprocessos e Biotecnologia, mestranda em Biotecnologia, Universidade Federal do Tocantins, gleiciane.sousa@colaborador.embrapa.br

³ Engenheiro de bioprocessos e biotecnologia, mestre em Ciências Mecânicas, analista da Embrapa Agroenergia, diogo.nakai@embrapa.br

⁴ Engenheira química, mestre em Engenharia Química, analista da Embrapa Agroenergia, thalyta.pacheco@embrapa.br

⁵ Bióloga, doutora em Genética e Melhoramento de Plantas, pesquisadora da Embrapa Agroenergia, leia.favaro@embrapa.br

⁶ Farmacêutica, doutora em Saúde Pública, Universidade de São Paulo, pesquisadora da Embrapa Agroenergia, simone.mendonca@embrapa.br

⁷ Química, doutora em Química Analítica, pesquisadora da Embrapa Agroenergia, itania.soares@embrapa.br

⁸ Engenheira Química, doutora em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos, pesquisadora da Embrapa Agroenergia, monica.damaso@embrapa.br

Introdução

Com o aumento mundial da produção de biodiesel, um excedente cada vez maior de glicerina está sendo gerado, surgindo a necessidade de novas aplicações para esse coproduto. A glicerina tem sido avaliada como fonte de carbono na produção de compostos químicos de interesse comercial, utilizando-se diferentes microrganismos. Em estudo recente, realizado na Embrapa Agroenergia, a bioconversão de glicerina bruta metílica de soja possibilitou a produção de polióis manitol e arabitól, usando o fungo filamentosso *Paecilomyces variotti* CCF/IOC 4627 (FONTES et al., 2016).

Apesar de o óleo de soja ser a matéria-prima mais utilizada para a produção de biodiesel no Brasil, há outras oleaginosas que apresentam características vantajosas.

Segundo Issariyakul e Dalai (2014), o óleo de palma é uma fonte promissora para a produção de biodiesel por apresentar maior produção de óleo por área, se comparado a outros óleos, o que possibilita menor preço final dessa matéria-prima.

O objetivo deste estudo foi avaliar a capacidade de crescimento de 96 linhagens de fungos filamentosos empregando três diferentes glicerinas (comercial, brutas de soja e de palma). A utilização da glicerina de palma, visa à avaliação futura dessa matéria-prima para produção de químicos por bioconversão.

Material e métodos

Glicerinas

A glicerina bruta metílica de palma foi produzida na planta piloto da Embrapa Agroenergia, Brasília, DF. A glicerina bruta metílica de soja foi gentilmente cedida pela indústria Cesbra Química S.A. (Volta Redonda, RJ). A glicerina padrão comercial (PA) foi adquirida comercialmente. As glicerinas de soja e PA possuem pureza de 52% e 99,5%, em termos de glicerol, respectivamente.

Produção de biodiesel e glicerina de óleo de palma

A reação de esterificação do óleo de palma com H_2SO_4 1% foi realizada em reator Parr de 19 L de capacidade total, a 60 °C por 1 hora, com agitação contínua de 120 rpm. Após lavagem e secagem, a fase mais densa foi transferida para o

tanque de reação, e adicionou-se o metanol (5,590 L) e o catalisador (1% da massa do óleo, 640 mL de $\text{Na}(\text{CH}_3\text{O})$, equivalente a 190 g de NaOH). A reação de transesterificação ocorreu por 1 hora a 60 °C. As duas fases formadas (glicerina e biodiesel) foram separadas nesse tanque. O metanol foi removido da glicerina, sob pressão reduzida.

Análise da quantificação da glicerina de palma por HPLC

A pureza da glicerina de palma foi determinada, em duplicata, por HPLC utilizando detector RID, coluna Aminex HPX-87H e solução de H_2SO_4 5 mM como fase móvel.

Manutenção e reativação dos microrganismos

Fungos filamentosos endofíticos associados à cana-de-açúcar, isolados de folhas e raízes, preservados na “Coleção de Microrganismos e Microalgas Aplicados a Agroenergia e Biorrefinarias”, da Embrapa Agroenergia, foram avaliados neste estudo. As referidas linhagens foram utilizadas por terem apresentado em trabalhos anteriores capacidade de crescer em meio de cultura contendo 18% de glicerol (dados não mostrados). Os fungos filamentosos foram cultivados em meio de cultura PDA (Potato Dextrose Agar) e crescidos em estufa a 28 °C, por 5 dias.

Identificação taxonômica dos fungos filamentosos

Os fungos foram cultivados em meio de cultura comercial PDB (Potato Dextrose Broth), por 5 dias a 28 °C. O micélio foi coletado, lavado e macerado com nitrogênio líquido. A extração de DNA genômico foi realizada utilizando Wizard Genomic DNA Purification Kit. O DNA extraído foi utilizado como molde em reações de PCR para amplificação da região ITS1-5.8S-ITS2 do DNA ribossômico, a qual contém aproximadamente 600 pares de bases. Após purificação e quantificação dos produtos de PCR, estes foram sequenciados por empresa terceirizada. As sequências foram analisadas com auxílio do software CodonCode Aligner (<http://www.codoncode.com/>), para obtenção da sequência consenso. As sequências foram analisadas com o auxílio da ferramenta Blast em bases de dados curadas de fungos filamentosos: MycoBank (<http://www.mycobank.org/>), Ribosomal Database Project (<http://rdp.cme.msu.edu/index.jsp>), Aftol (<http://www.aftol.org>), TrichOKEY

(<http://isth.info/tools/molkey/index.php>) e também na base não curada do GenBank (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

Crescimento dos fungos filamentosos em meio de cultivo contendo glicerinas de diferentes origens

As 96 linhagens reativadas foram inoculadas em meio estéril contendo *Yeast Nitrogen Base* (YNB) 6,7 g/L, ágar 15 g/L, e glicerinas (4 %, v/v) de palma, soja e comercial, separadamente, como única fonte de carbono. Todas as linhagens foram inoculadas com um disco contendo o microrganismo, nos três meios de cultura, e crescidas a 28 °C, em triplicata. O crescimento das linhagens foi medido no 3º, 5º e 7º dias de incubação, pela medida do diâmetro das colônias dos fungos, utilizando um paquímetro digital. O cálculo do Índice da Velocidade de Crescimento Micelial (IVCM) foi obtido pelo $\sum [(diâmetro\ da\ colônia\ no\ dia\ atual - diâmetro\ da\ colônia\ no\ dia\ anterior)/(dias\ de\ incubação)]$.

Resultados e discussão

A produção de glicerina bruta de óleo de palma foi de 3,4 kg (contendo metanol) e 16,4 kg de biodiesel. Assim o rendimento biodiesel/óleo foi de 91%. Após a remoção do metanol (~1 L), o rendimento da glicerina foi de aproximadamente 70,6%. Em seguida, a glicerina bruta de palma foi quantificada por HPLC e apresentou pureza de 51,7% de glicerol. Além do metanol, a glicerina bruta contém outras impurezas. Segundo Hájek e Skopal (2010), essas impurezas são essencialmente constituídas por sais (orgânicos e inorgânicos), água, sabão e pigmentos provenientes de vegetais.

Dentre as 96 linhagens de fungos filamentosos analisadas, somente 13 não cresceram em meio adicionado de glicerina de palma. Nos meios contendo glicerinas de soja e comercial (PA), todas as linhagens cresceram. As faixas de valores de IVCM (mm/dia) em meio contendo a glicerina de palma, soja e comercial foram de 0,49-18,97; 2,02-20,79; 2,68-18,50, respectivamente (Figura 1). As linhagens AR273, 109, e 174 cresceram por toda a placa em meio com glicerina padrão (dados não apresentados). Até o momento, não se encontrou uma justificativa para esse crescimento tão mais expressivo em glicerina padrão. A presença de metanol nas glicerinas brutas não pode ser a justificativa, pois as três linhagens foram as que mais cresceram em glicerina bruta de soja que tem

mais metanol (19,3%) do que a glicerina bruta de palma (6,14%), na qual as linhagens AR273 e 109 não apresentaram crescimento (Figura 1).

Em virtude da falta de dados sobre uma correlação entre o valor de IVCM e a produção dos químicos (identificação e quantificação), optou-se por selecionar fungos com valores de IVCM em diferentes faixas: alto, médio e baixo (Tabela 1), independentemente do tipo de glicerina utilizada.

Vale ressaltar que, para seleção das linhagens, além dos valores de IVCM obtidos em glicerina padrão, soja e palma, também foi utilizado como critério de seleção o conhecimento do gênero ou da espécie dos fungos, na tentativa de se escolher linhagens taxonomicamente diversas.

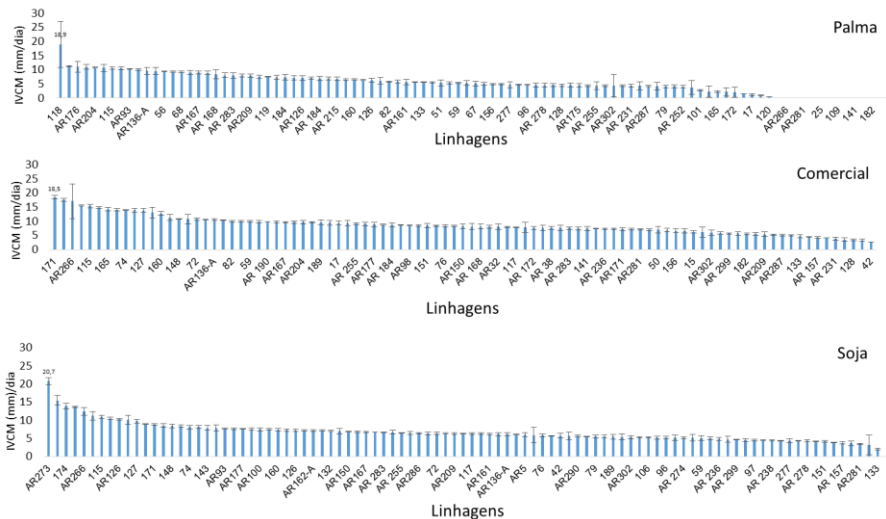


Figura 1. Índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM) obtido para cada uma das linhagens, nas diferentes glicerinas, em ordem decrescente. O valor de IVCM é a média de triplicatas.

Tabela 1. Valores de IVCM obtidos por linhagens fúngicas quando cultivadas em meios de cultura contendo ágar e os três tipos de glicerinas.

Identificação**	Código da coleção	IVCM (mm/dia)		
		Palma	Soja	PA
<i>Fusarium</i> sp.	118	18,9	13,7	14,8
<i>Trichoderma harzianum</i>	109	0	15,42	ND*
<i>Trichoderma koningiopsis</i>	AR273	0	20,79	ND*
<i>Trichoderma harzianum</i>	174	4,31	13,87	ND*
<i>Aspergillus terreus</i>	AR136-A	9,59	6,15	10,54
<i>Aspergillus terreus</i>	125	6,39	4,2	5,83
<i>Bipolaris sorokiniana</i>	156	4,96	4,73	6,68
<i>Bipolaris sorokiniana</i>	165	2,29	5,84	14,29
<i>Beauveria bassiana</i>	AR240	9,3	7,56	9,65
Não identificado	AR5	5,58	5,96	5,64
<i>Peniophora versiformis</i>	51	5,37	5,55	7,00
<i>Trametes sanguinea</i>	AR287	4,25	4,54	5,15
<i>Penicillium spinulosum</i>	151	0	4,18	8,5
<i>Penicillium funiculosum</i>	17	1,13	5,14	9,41
<i>Phoma</i> sp.	172	2,06	8,55	13,06
<i>Phomopsis</i> sp.	120	0,49	11,19	13,91
<i>Fusarium</i> sp.	AR176	11,08	6,74	9,46
<i>Fusarium</i> sp.	56	9,42	6,67	7,82
<i>Fusarium</i> sp.	115	10,61	10,95	15,36
<i>Fusarium fujikuroi</i>	160	6,57	7,32	12,81
Não identificado	AR12	10,71	6,32	17,61

*ND: não determinado. O fungo cresceu por toda a placa de Petri.

**Identificação baseada em análise da região ITS1-5.8S-ITS2 do DNA ribossômico.

Conclusões

A maioria das linhagens avaliadas apresentou crescimento nos três diferentes tipos de glicerina, inclusive a de palma, produzida neste trabalho. Dentre as 96 linhagens estudadas, somente 13 não cresceram em glicerina de palma dendê. O potencial de utilização das glicerinas brutas de palma e soja, em detrimento à glicerina comercial mostram a possibilidade de aproveitar essas matérias-primas brutas para crescimento de fungos filamentosos e possível aplicação na produção de compostos químicos de interesse comercial, como, por exemplo, polióis.

Apoio financeiro

Os autores agradecem ao programa Capes-Embrapa, pela concessão de bolsa de pós-doutorado de Andréia A. J. Carneiro; à Financiadora de Estudos e Pesquisa (FINEP), pelo recurso financeiro (Projeto DendePalm), e à Embrapa Agroenergia, pelo suporte e infraestrutura para realização dos experimentos.

Referências

FONTES, P. R.; RIBEIRO, J. A. de A.; COSTA, P. P. K. G.; DAMASO, M. C. T.; GONZALEZ, W. de A.; SANTOS, C. M. C. dos.; ABDELNUR, P. V.; RODRIGUES, C. M. Development and validation of a HILIC-UPLC-ELSD method based on optimized chromatographic and detection parameters for the quantification of polyols from bioconversion processes. **Analytical Methods**, Cambs, v. 8, n. 9, p. 2048-2057, 2016.

HÁJEK, M.; SKOPAL, F. Treatment of glycerol phase formed by biodiesel production. **Bioresource Technology**, Oxon, v. 101, n. 9, p. 3242-3245, 2010.

ISSARIYAKUL, T.; DALAI, A. K. Biodiesel from vegetable oils. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, Berlin, v. 31, p. 446-471, 2014.

Obtenção de compostos químicos de valor agregado pela bioconversão de glicerina bruta por bactéria

Carlos Oliveira de Jesus¹, Jamille Ribeiro Coelho de Lima², Mônica Caramex Triches Damaso³, Thais Fabiana Chan Salum⁴, Thályta Fraga Pacheco⁵, Sílvia Belém Gonçalves⁶

Resumo

A transesterificação é o processo mais utilizado para a produção industrial de biodiesel. Como resultado dessa reação, obtém-se uma fase glicerínica, que por ser impura possui baixo valor de mercado, porém sendo rica em carbono, surge como uma alternativa para a obtenção de compostos de maior valor agregado por meio da bioconversão por microrganismos. Este trabalho teve como objetivo analisar os biocompostos produzidos pela bactéria 7GBP por bioconversão de glicerina bruta na concentração inicial de glicerol de 40 g/L, em processo de batelada, a 30 °C e 180 rpm. Verificou-se que dentre os sistemas de produção avaliados, o processo em microaerobiose foi o mais promissor, com obtenção de 5,5 g/L de composto químico.

Introdução

Consequências ambientais negativas relacionadas à queima de combustíveis fósseis e às preocupações sobre o aumento da demanda energética mundial têm estimulado a procura de combustíveis obtidos a partir de fontes renováveis.

A produção de biodiesel a partir de óleos e gorduras gera grande quantidade de glicerina bruta, também denominada glicerina “loira”. Uma opção para o aproveitamento da glicerina loira é o refino visando à obtenção da glicerina pura que é destinada para vários ramos da indústria, como os de cosméticos e fármacos. Ocorre que, em virtude do aumento da produção de biodiesel e o

¹ Tecnólogo em Biocombustíveis, mestrando em Bioenergia, Universidade Federal do Paraná, carlos.jesus@colaborador.embrapa.br

² Bióloga, doutora em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos, Universidade Federal do Rio de Janeiro,

jamille.lima@colaborador.embrapa.br

³ Engenheira Química, doutora em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos, pesquisadora da Embrapa Agroenergia, monica.damaso@embrapa.br

⁴ Farmacêutica, doutora em Bioquímica, pesquisadora da Embrapa Agroenergia, thais.salum@embrapa.br

⁵ Engenheira química, mestre em Engenharia Química, analista da Embrapa Agroenergia, thalyta.pacheco@embrapa.br

⁶ Engenheira química, doutora em Engenharia Química, pesquisadora Embrapa Agroenergia, silvia.belem@embrapa.br

desaquecimento do mercado mundial, há sobra de glicerina loira que vem sendo aproveitada em unidades de incineração, em fornos e em outros processos térmicos (WOJTUSKI et al., 2015).

Os processos convencionais atualmente aplicados em escala industrial no Brasil produzem, aproximadamente, 1 tonelada de glicerina loira para cada 10 toneladas de biodiesel. De acordo com a Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis (ANP), somente no ano de 2015 foram produzidas 346.839 m³ de glicerina em todo Brasil (AGÊNCIA NACIONAL DO PETRÓLEO, GÁS NATURAL E BIOCMBUSTÍVEIS, 2015).

As questões econômicas e ambientais relacionadas à glicerina motivam a realização deste trabalho, que tem como objetivo a produção de biocompostos por fermentação submersa, a partir de glicerina bruta, utilizando linhagem de bactéria selvagem.

Materiais e Métodos

Isolamento de Microrganismos

A bactéria utilizada neste estudo foi isolada a partir da seleção de microrganismos com capacidade para metabolizar glicerina padrão comercial e bruta de soja. O experimento de isolamento consistiu em derramar 50 mL de amostras de glicerina padrão e bruta de soja (Cesbra) (52% de pureza) em solo pertencente a duas partes distintas da Fazenda Sucupira-Embrapa, Brasília, DF, sendo elas: Plantação de *Amaranthus* ssp. (Caruru) (S: 15° 54'46.3" W: 048° 02'2.1") e Barragem (S: 15° 55' 03.8" W: 048° 01' 19.7"). Em cada localidade, o ponto de derrame de cada glicerina separou-se por aproximadamente 1 m. Os solos contaminados foram coletados após 2 meses, recebendo as seguintes nomenclaturas: Glicerina Padrão Barragem (GPB), Glicerina Padrão Plantação (GPP), Glicerina Bruta Plantação (GBP) e Glicerina Bruta Barragem (GBB). O local onde se realizou o experimento ficou isolado e não se levou em conta as condições ambientais.

Para realizar a triagem, utilizaram-se meios de cultivo TSB (Tryptic soy broth), contendo glicerina bruta como única fonte de carbono.

Os microrganismos selecionados foram inseridos na coleção de trabalho de microrganismos e algas da Embrapa Agroenergia, para posterior uso em

experimentos de bioconversão de glicerina bruta em compostos químicos de interesse comercial.

Seleção de microrganismos isolados capazes de sintetizar biocompostos utilizando glicerina bruta de soja como fonte de carbono

Ao todo, 13 bactérias isoladas de solos contaminados com glicerina padrão e bruta da Fazenda Sucupira foram selecionadas em virtude do crescimento microbiano em glicerina bruta de soja e padrão comercial (P.A.), visando à síntese de químicos de valor agregado.

Para a fase de crescimento das bactérias, foi utilizado o mesmo meio da fase de bioconversão (meio de cultura M9), contendo concentração de 4% de glicerina bruta. Foram dispersos 800 μL de meio de cultivo em cada poço de duas microplacas de 96 poços de 1,1 mL de volume e 10 μL de cada amostra foram inoculados em poços distintos de cada placa, em duplicata. As microplacas contendo as bactérias em meio de cultivo M9 foram incubadas em shaker a 28 °C, 200 rpm, por 24 horas.

Após o crescimento, os microrganismos foram inoculados novamente em microplacas nas mesmas condições descritas acima, por período de 48 horas, para a fase de bioconversão. Após centrifugação das placas a 14.000 rpm por 15 minutos, os sobrenadantes foram separados para quantificação de biocompostos de valor agregado por método de cromatografia líquida de alta eficiência (Agilent, 1260 infinity), e a bactéria mais promissora na produção de biocompostos foi utilizada nas fases seguintes do trabalho.

Condições de cultivo para bioconversão de glicerina bruta de soja por bactéria selecionada

A bactéria selecionada 7GBP ainda não foi identificada e encontra-se estocada em método de criopreservação.

O pré-inóculo foi produzido a partir da cultura estoque de 7GBP, onde foi utilizado meio de cultivo M9 acrescido de 40 g/L de glicerina bruta. O pH do meio foi mantido em 7,1; esterilizado a 121 °C por 15 minutos. A biomassa transferida com auxílio de uma alça de platina calibrada em 10 μL , 0,5 mm x 50 mm (CIAL) de diâmetro para frascos cônicos de 250 ml de volume útil, contendo 50 ml do meio M9 acrescido de 40 g/L de glicerina bruta. O sistema foi mantido em agitador

orbital a 180 rpm, 30 °C por 10 horas. As células bacterianas foram centrifugadas por 10 minutos a 10.000 rpm e o sobrenadante, descartado. Foi inoculado 1% da biomassa em relação ao substrato inicial na fase de bioconversão (em triplicata), em diferentes frascos com objetivo de analisar a influência da aeração na síntese de biocompostos. O primeiro frasco tipo erlenmeyer de 500 mL, contendo 100 mL do meio M9 acrescido de 40 g/L de glicerina bruta e o segundo frasco, tipo penicilina de 60 mL contendo 50 mL de meio de cultura M9 suplementado com 40 g/L de glicerina bruta devidamente vedados e conectados por meio de seringas plásticas graduadas de 20 mL acopladas com agulhas interligadas ao meio de fermentação.

Os sistemas foram novamente mantidos em agitador orbital a 180 rpm, 30 °C por 90 horas. Foram retirados 500 µL de amostra até 48 horas para quantificação de biocompostos.

Determinação da concentração de glicerina residual e de compostos químicos produzidos

Os compostos químicos presentes no sobrenadante das amostras foi quantificado por cromatografia líquida de alta eficiência - HPLC (Agilent, 1260 infinity) equipado com coluna Aminex HPX- 87H de 300 mm x 7,8 mm e pré-coluna de 30 mm x 4,6 mm marca Bio-Rad, fase móvel 0,005 mol/L H₂SO₄, pressão de 0,6 mL/ min e temperatura da coluna de 40 °C. Os padrões utilizados seguiram concentração de aproximadamente 5 g/L para os compostos químicos, glicerina padrão PA, ácido láctico, 1,3 propanodiol e 2,4 de butanodiol, diluídos em 50 mL de água mili-Q.

Resultados e discussão

A partir do isolamento de bactérias de solo contaminado com glicerina padrão comercial e bruta de soja, as bactérias morfologicamente distintas e capazes de metabolizar o substrato foram selecionadas para processo de bioconversão do substrato em biocompostos de valor agregado. Todas as linhagens consumiram mais de 77,5% do glicérol inicial (Figura 1). Para 4GPB, 3GBB, 4GBB e 7GBP, o consumo foi de mais de 90%. A bactéria 7GBP foi selecionada para a continuidade do trabalho, visto que consumiu quase todo o

glicerol e teve maior síntese dos compostos químicos, como dióis (7,6 g/L), em 48 horas de processo.

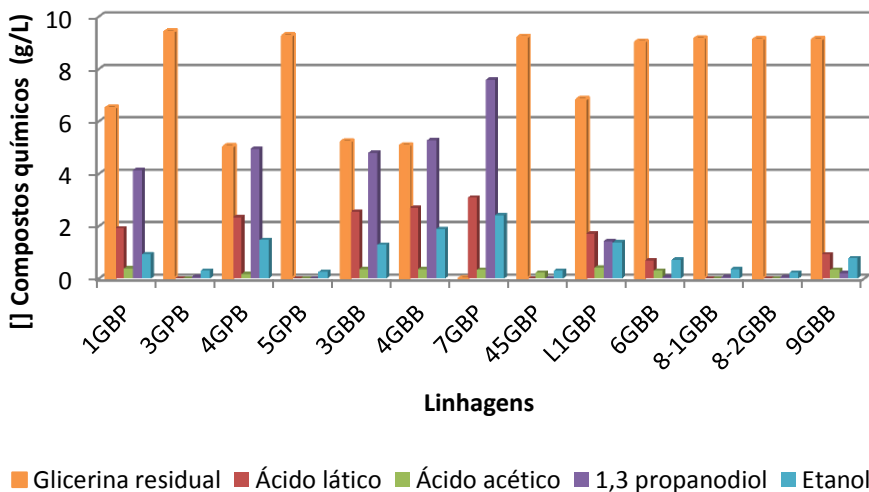


Figura 1. Triagem de bactérias isoladas do solo de cerrado (decomposição de glicerina) capazes de produzir biocompostos a partir de meio de cultivo M9 suplementado com glicerina bruta.

Embora a bactéria 7GBP tenha sido selecionada, ocorre a formação de flocos quando ela é cultivada tanto no sistema em microaerobiose quanto em aerobiose, tornando difícil uma quantificação precisa da biomassa microbiana utilizando espectrofotometria. Essa característica aparenta ser inerente à fisiologia do microrganismo, uma vez que apresentou a mesma característica de floculação em meio mínimo suplementado com glicerina padrão (Figura 2).

A bactéria 7GBP foi capaz de sintetizar um biocomposto, que foi identificado por análises de cromatografia líquida de alta eficiência como sendo 1,3 propanodiol. Porém, esse resultado não foi confirmado em testes adicionais realizados em cromatografia líquida de ultra eficiência (ULPC) (dados não apresentados). Portanto, ainda se faz necessária a confirmação da natureza desses biocompostos por meio de técnicas analíticas ainda mais específicas.

A relação entre o consumo da glicerina bruta e a formação do composto químico pela bactéria 7GBP cultivada nos sistemas em microaerobiose e aerados estão apresentados nas Figuras 3A e 3B, respectivamente.

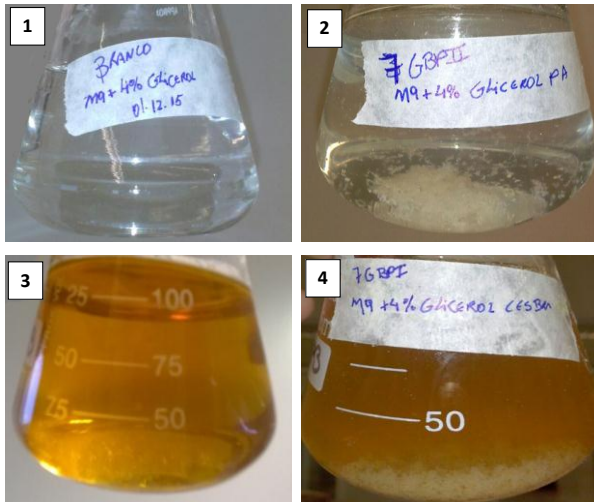
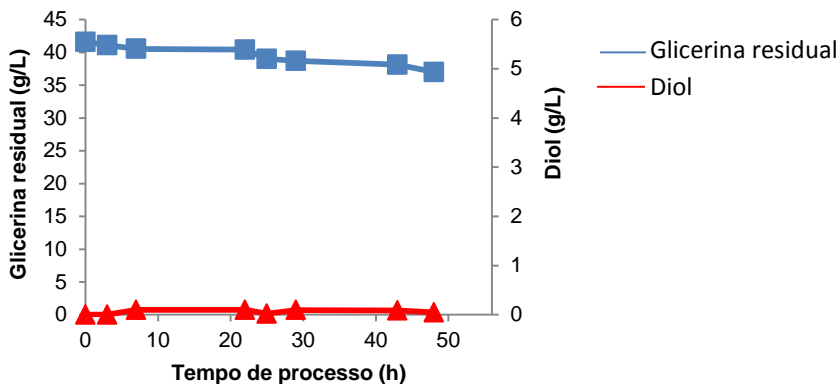
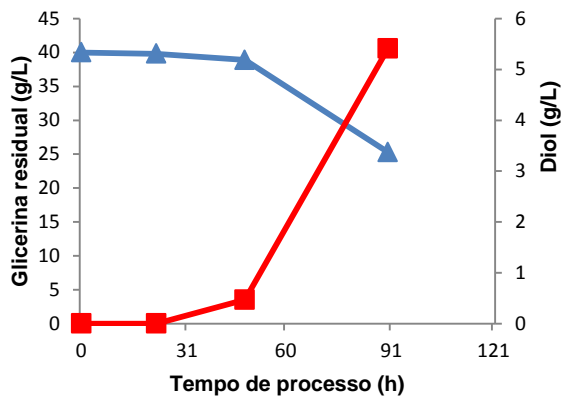


Figura 2. Floculação da biomassa microbiana (bactéria 7GBP) em condição de microaerobiose, onde (1) branco (M9 + 4% glicerol PA); (2) Biomassa de 7GBP em M9 + 4% de glicerol PA; (3) Branco (M9 + 4% de glicerina bruta); (4) Biomassa 7GBP em M9 + 4% de glicerina bruta.

Apesar de aparentemente o crescimento da bactéria 7GBP ter sido melhor na condição aerada em virtude da quantidade de biomassa formada (análise visual, biomassa não calculada em função da floculação), a condição em microaerobiose se apresentou mais eficiente na produção do biocomposto (Figura 3A). A síntese do biocompostos, supostamente um diol, foi crescente entre os tempos de 22 e 90 horas de cultivo, com produção de 5,4 g/L e com diminuição da concentração da glicerina bruta. Na condição aerada, não ocorreu a formação do biocomposto nem o consumo de glicerina bruta de soja (Figura 3B). Metsoviti et al. (2012), utilizando sistema em microaerobiose e a mesma concentração inicial de glicerina bruta com a bactéria *Klebsiella oxytoca* obtiveram uma produção de 9,1 g/L de 1,3 propanodiol no período de 20 horas, enquanto neste estudo a maior concentração do produto que se supõe ser o propanodiol foi de 5,5 g/L obtida em 90 horas. Vale ressaltar que essa etapa foi realizada em escala diferente do processo de triagem (screening) de compostos químicos e, portanto, com base nesses dados, sabe-se que o microrganismo tem potencial para uma maior produção.



(a)



(b)

Figura 3. Consumo de glicerina bruta e síntese de biocompostos pela bactéria 7GBP durante cultivo em sistema em microaerobiose (a) e sistema aerado (b).

Conclusão

A bioconversão de glicerina bruta em produtos de valor agregado tais como dióis por ação bacteriana, pode tornar a cadeia produtiva do biodiesel mais economicamente competitiva, por meio do incremento de mais um ativo econômico. A bactéria 7 GBP foi capaz de sintetizar no sistema de cultivo com baixa concentração de oxigênio um composto químico que acredita-se ser diol (1,3 propanodiol). Métodos analíticos mais específicos ainda precisam ser utilizados para confirmação da natureza do composto. A linhagem 7GBP apresenta potencial para geração desses biocompostos e a otimização da produção, incluindo a de condições de cultivo, pode permitir o escalonamento do processo.

Apoio financeiro

Os autores agradecem ao CNPq, pelo aporte financeiro e concessão de bolsa (404854/2013-3) para o autor Carlos de Jesus; à Capes, pela bolsa de Jamille Lima, e à Embrapa Agroenergia, pela infraestrutura para realização dos experimentos.

Referências

AGÊNCIA NACIONAL DO PETRÓLEO, GÁS NATURAL E BIOCOMBUSTÍVEIS (BRASIL). **Anuário estatístico brasileiro do petróleo, gás natural e biocombustíveis**: 2015. Rio de Janeiro: ANP, 2015. Disponível em: <www.anp.gov.br/?dw=78135>. Acessado em: jun. 2016.

METSOVITI, M.; PARASKEVAIDI, K.; KOUTINA, A.; ZENG, A-P.; PAPANIKOLAOU, S. Production of 1,3 propanediol, 2,3 butanediol and ethanol by newly isolated *Klebsiella oxytoca* strain growing on biodiesel- derived glycerol based media. **Process Biochemistry**, Oxon, v. 12, p. 1872-1882, 2012.

WOJTUSIK, M.; RODRIGUEZ, A.; RIPOLL, V.; SANTOS, V. E.; GARCÍA, J. G.; GARCÍA-OCHOA, F. 1,3 porpanediol production by *Klebsiella oxytoca* NRRL-B199 from glycerol. Medium composition and operation. **Biotechnology Reports**, Amsterdam, v. 6, p. 100-107, 2015.



**Processos
Químicos**

Reforma a vapor de biogás usando catalisadores de óxidos mistos Ni-Mg-Al obtidos a partir de hidrotalcitas

*Itânia Pinheiro Soares¹, Felipe Heimer Correia², Isabela C. Curado³,
Emerson Leo Schultz⁴*

Resumo

Um dos gases que têm mais influência no atual cenário catastrófico referente ao aquecimento global é o metano. Após um período de 100 anos, uma quantidade emitida de metano é até 25 vezes mais poluente do que a mesma quantidade emitida de dióxido de carbono. Uma forma comum de emissão de metano é através do biogás, sendo necessário tratar este gás. A reforma a vapor do metano é uma das possíveis formas de se adaptar um processo existente para se utilizar o biogás. O processo consome o poluente metano e gera como produtos o hidrogênio e o monóxido de carbono. O presente trabalho teve como objetivo a avaliação do uso de catalisadores de óxidos mistos Ni-Mg-Al com diferentes teores de níquel na reforma a vapor de biogás. Os resultados mostraram que a conversão de metano ficou acima de 98% e a razão H_2/CO variou entre 2,64 e 3,47.

Introdução

A problemática do aquecimento global é considerada como um dos maiores desafios a serem superados no século 21. Os níveis de emissão de gases do efeito estufa continuam crescendo ano após ano e um dos maiores desafios encontrados pelo mercado atual de energia é como se adaptar a uma crescente demanda pelo corte dessas emissões. É imperativo que as emissões de metano sejam reduzidas tendo em vista a previsão de um cenário catastrófico no futuro caso nada seja feito. As atuais consequências geradas pela poluição do ar, que já é a causa de 6,5 milhões de mortes prematuras no mundo, podem ser acentuadas

¹ Química, doutora em Química, pesquisadora da Embrapa Agroenergia, itania.soares@embrapa.br

² Graduando em Engenharia de Energia, Universidade de Brasília, felipe.heimer@gmail.com

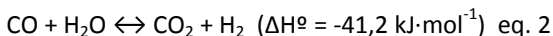
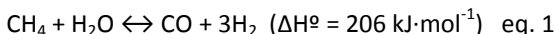
³ Engenheira de Energia, Universidade de Brasília, isabelaccurado@gmail.com

⁴ Engenheiro químico, doutor em Engenharia Química, pesquisador da Embrapa Agroenergia, emerson.schultz@embrapa.br

caso os níveis de emissões de poluentes não sejam reduzidos (ESTADOS UNIDOS, 2016; INTERNATIONAL ENERGY AGENCY, 2016).

Uma das formas de emissão de metano é uma mistura gasosa conhecida como biogás, proveniente da decomposição da matéria orgânica em condições anaeróbias. Os principais componentes do biogás são metano (CH₄) e dióxido de carbono (CO₂). O biogás é emitido em pântanos e aterros sanitários, bem como pode ser produzido em plantas de tratamento de esgotos, dejetos animais e efluentes industriais em equipamentos conhecidos como biodigestores (ALVES et al., 2013).

Dessa forma, o aproveitamento do biogás é um meio importante para reduzir as emissões de gases do efeito estufa. Apesar de poder ser empregado diretamente para gerar energia, o biogás tem grande potencial para gerar produtos de maior valor agregado, por processos de reforma, que darão origem ao gás de síntese (mistura de hidrogênio e monóxido de carbono). Os processos são adaptados dos já utilizados para a reforma do gás natural, já que este é composto principalmente de metano. O método que é amplamente considerado como mais eficiente na reforma do gás natural emprega temperaturas entre 800-1.000 °C e pressão entre 30-40 bar, e é denominado de reforma a vapor. Essa reação é apresentada na equação 1, e normalmente é seguida pela reação de deslocamento, mostrada na equação 2 (ALVES et al., 2013; BEUERDEN, 2004).



O principal fator que pode viabilizar a utilização do processo de reforma a vapor em grande escala é a escolha do catalisador. Os catalisadores à base de níquel são a alternativa mais utilizada atualmente na indústria para realização da reforma a vapor. Para maximizar o desempenho desse catalisador, acredita-se que seria ideal inserir um suporte ou alguma matriz em sua estrutura para melhorar a dispersão do níquel e diminuir a formação de carbono na sua superfície.

A hidrotalcita ([Mg₆Al₂(OH)₁₆]CO₃·4H₂O) é uma argila aniônica formada por lâminas duplas de hidróxido de magnésio e alumínio, que pode ser usada como catalisador, precursor ou suporte para o catalisador e já foi testada com bons

resultados na reação de reforma a vapor. Outros íons M^{2+} podem ser incorporados na estrutura da hidrotalcita desde que tenham raio iônico similar ao Mg^{2+} , que é o caso do Ni^{2+} , para formar compostos tipo hidrotalcita. Após a calcinação desses compostos, óxidos mistos são formados, os quais possuem alta área superficial específica e boa estabilidade térmica (VILLANUEVA, 2005).

Portanto, neste artigo pretende-se testar a efetividade da reforma a vapor utilizando como catalisador uma mistura de óxidos provenientes da hidrotalcita composta com níquel em diferentes concentrações, visando encontrar a concentração que apresenta melhores resultados experimentais e seja mais viável para uso em grande escala.

Materiais e métodos

Materiais utilizados

Nas reações foram utilizados: água destilada, gases (hidrogênio, metano, hélio, argônio e dióxido de carbono) de pureza 99,99%, carbetto de silício e óxidos mistos Ni-Mg-Al (denominados 5% NiMO550, 10% NiMO550 e 15% NiMO550 – óxidos mistos com teores de níquel 5%, 10% e 15%, respectivamente).

Procedimento experimental para a reforma a vapor do biogás

O biogás foi simulado pela mistura dos gases metano e dióxido de carbono. Os catalisadores utilizados foram sintetizados segundo Villanueva (2005) e calcinados a 550 °C. Os testes de reforma a vapor foram realizados em um reator PID Eng&Tech conectado a um cromatógrafo gasoso Shimadzu, GC-2014, com detector de condutividade térmica e coluna Carboxen 1000 a uma temperatura de 150 °C. Foram pesados 100 mg do catalisador e 100 mg de carbetto de silício (SiC), utilizado para homogeneizar a temperatura no leito catalítico, em balança analítica AB265-S/FACTDU, Mettler Toledo. Em seguida, foram misturados e depositados em um reator de leito fixo de Hastelloy, com uma camada de lã de quartzo colocada sobre um suporte de aço inox para evitar o arraste da mistura de catalisador e SiC durante o experimento. A reação durou 360 minutos, tendo sido realizada a uma temperatura de 750 °C e a pressão atmosférica. A análise foi feita com injeções periódicas (em intervalos de 30 minutos) de 1 uL do produto no cromatógrafo gasoso durante a reação.

Resultados e discussão

A conversão do metano e do dióxido de carbono foi calculada conforme as equações 3 e 4:

$$\text{Conversão } CH_4 = \frac{(\%CH_{4,in} - \%CH_{4,out})}{\%CH_{4,in}} \times 100 \quad \text{eq. 3}$$

$$\text{Conversão } CO_2 = \frac{(\%CO_{2,in} - \%CO_{2,out})}{\%CO_{2,in}} \times 100 \quad \text{eq. 4}$$

em que: $\%CH_{4,in}$ e $\%CO_{2,in}$ é a concentração percentual do metano e do dióxido de carbono no reagente e $\%CH_{4,out}$ e $\%CO_{2,out}$ é a concentração percentual do metano e do dióxido de carbono no produto.

As seletividades dos produtos (H_2 e CO) foram calculadas de acordo com a eq. 5.

$$\text{Seletividade Produto } (H_2 \text{ ou } CO) = \frac{\% \text{ Produto } (\%H_2 \text{ ou } \%CO)}{\sum \text{Produtos } (\%H_2 + \%CO)} \times 100 \quad \text{eq. 5}$$

em que: $\%H_2$ é a concentração percentual do hidrogênio, $\%CO$ é a concentração percentual do monóxido de carbono obtida na análise cromatográfica. A seletividade de um produto representa a tendência que os reagentes têm para formar esse produto em relação ao total de produtos formados.

Os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 1.

Tabela 1. Valores médios da conversão de metano, dióxido de carbono e razão H_2/CO .

Catalisador	X_{CH_4} (%)	X_{CO_2} (%)	Razão H_2/CO
5%NiMO550	98,2	63,6	2,69
10%NiMO550	98,4	57,3	3,47
15%NiMO550	99,7	56,8	2,64

Os resultados apresentados na Tabela 1 dizem respeito aos valores médios de conversão e razão H_2/CO , obtidos durante a reação. A conversão do metano foi ligeiramente maior com o catalisador 15%NiMO550, enquanto a conversão do dióxido de carbono foi maior com o 5%NiMO550. No entanto, considerando o hidrogênio como produto principal, a reação que apresentou maior razão H_2/CO

foi a reação que utilizou catalisador com 10% de níquel. Uma maior razão H_2/CO é o resultado desejado, pois indica maior formação de hidrogênio após a reação, que é o produto com maior valor agregado.

Na Figura 1 são apresentados os valores de conversão para metano e dióxido de carbono, bem como os resultados de seletividade para hidrogênio e monóxido de carbono ao longo de 360 minutos de reação.

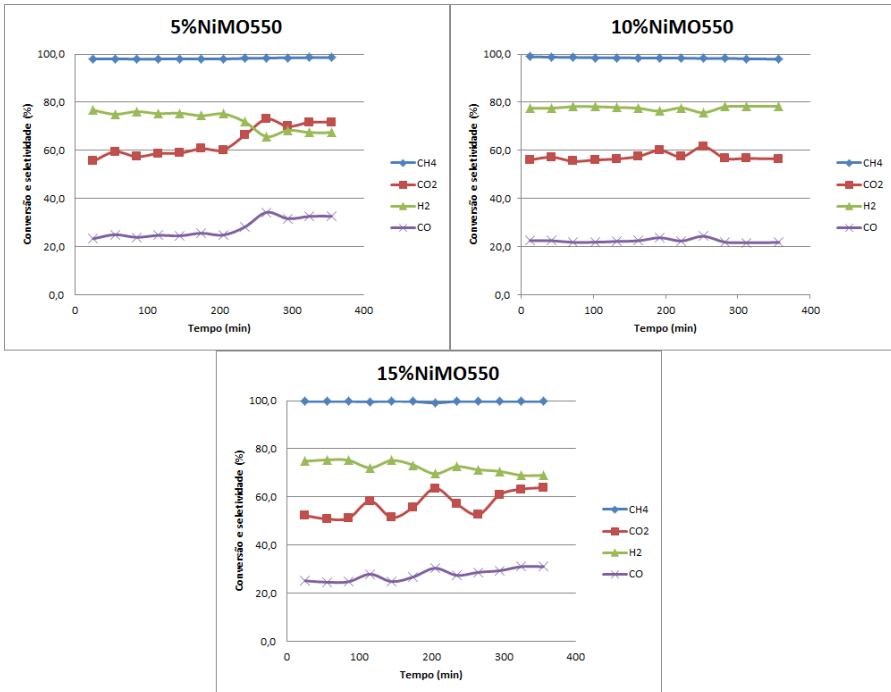


Figura 1. Conversão e seletividade durante 360 minutos de reação.

Considerando a seletividade do hidrogênio, na reação com o catalisador 5%NiMO550 ocorreu diminuição por volta de 260 minutos, enquanto com 10%Ni a seletividade ficou mais estável durante todo o período da reação e com 15%Ni a seletividade oscilou entre 75% e 69%, com aparente declínio nos 100 minutos finais. Pode-se observar também que, quando a seletividade de H_2 diminui, ocorre um aumento na conversão de CO_2 , que possivelmente está relacionado com a diminuição na ocorrência da reação de deslocamento (eq. 2). Já considerando a

conversão de metano, esta se apresentou bem estável com todos os catalisadores testados, e esteve próxima de 100%.

Conclusão

Os resultados da reforma utilizando os óxidos mistos se mostraram promissores, indicando potencial na sua utilização. A conversão de CH_4 ficou acima de 98%, enquanto a razão H_2/CO ficou em torno de 3, que é um valor desejável. Além disso, deve-se prosseguir com testes alterando parâmetros reacionais, por exemplo, tentando diminuir a quantidade de vapor usada na reação, bem como com modificações no catalisador, como empregar outra temperatura de calcinação do catalisador.

Apoio financeiro

Este trabalho foi conduzido com financiamento do projeto Embrapa/Itaipu – Tecnologias para produção e uso de biogás e fertilizantes a partir do tratamento de dejetos animais no âmbito do plano ABC (BiogasFert, Cód SEG 02.12.08.004.00.00).

Referências

ALVES, H. J.; BLEY JUNIOR, C.; NIKLEVICZ, R. R. ; FRIGO, E. P.; FRIGO, M. S.; COIMBRA-ARAÚJO, C. H. Overview of hydrogen production technologies from biogas and the applications in fuel cells. **International Journal of Hydrogen Energy**, Oxford, v. 38, n. 13, p. 5215-5225, 2013.

BEURDEN, P. van. **On the catalytic aspects of steam-methane reforming**: a literature survey. Petten: Energy research Centre of the Netherlands, 2004. Technical Report ECN-I--04-003. Disponível em: <<http://www.ecn.nl/docs/library/report/2004/i04003.pdf>>. Acesso em: 30 ago. 2016.

ESTADOS UNIDOS. Environmental Protection Agency. **Overview of greenhouse gases**. Disponível em: <<https://www3.epa.gov/climatechange/ghgemissions/gases/ch4.html>>. Acesso em: 27 jul. 2016.

INTERNATIONAL ENERGY AGENCY. **Energy and Air Pollution 2016 - World Energy Outlook Special Report**. Disponível em: <<http://www.worldenergyoutlook.org>>. Acesso em: 30 maio 2016.

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.

Compósitos de borracha natural e endocarpo de macaúba: efeito sobre a coloração e propriedades mecânicas

Eduardo Jonathan Ramos e Silva Sampaio¹, Alexandre Nunes Cardoso²,
Leonardo Fonseca Valadares³

Resumo

A macaúba é uma palmácea com grande potencial para a produção de óleo vegetal. Dentre os resíduos gerados nessa produção, o endocarpo é o material rígido e escuro que encobre a amêndoa e ainda não possui aplicações definidas. Este trabalho propõe que o endocarpo possa ser acrescentado à borracha natural com a finalidade de modificar a cor e as propriedades mecânicas dos compósitos obtidos. Assim, foram preparados corpos de prova de borracha natural pura e borracha aditivada com até 25% de endocarpo. Por fotografias e colorimetria, observou-se que é necessário apenas 5% de adição de endocarpo para tornar a amostra escura. Os ensaios mecânicos mostram que à medida que se aumenta a concentração de endocarpo na borracha, aumenta-se a tensão na ruptura e diminui-se o alongamento máximo das amostras, não sendo observado efeito significativo sobre a rigidez do material.

Introdução

A macaúba (*Acrocomia aculeata*) é uma palmácea não domesticada com potencial para produção de óleo vegetal no Brasil. Em virtude de sua distribuição geográfica no território e adaptação a períodos secos definidos, existe a possibilidade de estabelecer cultivos em diferentes regiões do País.

O potencial econômico da macaúba tem sido enfatizado, em função do potencial para produção de óleo (4.000 kg/ha – 6.000 kg/ha) e amplas possibilidades para o aproveitamento integral de seu fruto, que pode gerar outros produtos além do óleo.

¹ Graduando em Engenharia de Energia, Universidade de Brasília, eduardo_jonathan@hotmail.com

² Engenheiro-agrônomo, doutor em Ciência do Solo, pesquisador da Embrapa Agroenergia, alexandre.cardoso@embrapa.br

³ Químico, doutor em Química, pesquisador da Embrapa Agroenergia, leonardo.valadares@embrapa.br

A fase inicial de processamento dos frutos resulta em quatro frações, a saber: casca, polpa, endocarpo e amêndoa. Esse endocarpo é o núcleo rígido e escuro do fruto que aloja a amêndoa da macaúba. A amêndoa consiste em uma parte do fruto de grande interesse econômico, considerando o teor proteico descrito na literatura de 12,28% (DESSIMONI-PINTO et al., 2010) e a qualidade do óleo que pode ser obtido, que contém principalmente ácido láurico.

Uma vez que o endocarpo é quebrado para extração da amêndoa, esse material é, em geral, descartado ou vendido para produção de carvão, dado o seu poder calórico. Para cada 100 kg de frutos, são gerados cerca 13 kg de endocarpo.

Embora a composição e características desse material sejam ainda pouco estudadas, acredita-se que a rigidez que lhe é conferida possa proporcionar resistência a polímeros. Por causa da cor preta do endocarpo, a sua aditivação a materiais deve também proporcionar uma mudança de tonalidade de cor ao compósito resultante.

Considerando esses aspectos e visando agregar valor aos endocarpos gerados no processamento da macaúba, neste trabalho, é proposto o estudo da aditivação de material obtido a partir da moagem de endocarpo à borracha natural, sendo analisado o efeito desta na coloração e nas propriedades mecânicas das amostras geradas.

Materiais e métodos

Os endocarpos usados neste trabalho são provenientes do Núcleo Rural Buriti Vermelho, DF, e de Igarapava, SP. Inicialmente, foi realizada a limpeza dos endocarpos para retirada de resquícios de polpa aderidos à superfície, por meio de polimento superficial realizado com um esmeril.

Para moagem, foi utilizado um moinho de facas do tipo Willye da marca Fortinox. O processo realizado em dois ciclos de 10 minutos, utilizando no primeiro ciclo uma peneira de 2.050 μm para separação de partículas ainda grandes. O material peneirado foi submetido a um segundo ciclo moagem utilizando uma peneira de 700 μm , para seleção de partículas menores.

A distribuição do tamanho de partículas foi obtida utilizando seis peneiras dispostas verticalmente, com diferentes tamanhos de malha, instaladas em um agitador eletromagnético da marca Bertel, apropriado para peneiras granulométricas. O equipamento foi acionado por 30 minutos para promover a distribuição do material. As frações geradas em cada peneira foram pesadas em

balança de precisão para calcular a porcentagem de material retida em cada uma das peneiras em relação ao total.

O látex de borracha natural foi cedido pela empresa QR Borrachas Quirino Ltda. e foram extraídos de clones de seringueira RRIM600. O teor de sólidos do látex foi feito pela separação de porções de látex em béqueres para medição inicial de massa. O material foi então colocado na estufa a 75 °C por 12 horas e pesada novamente. A porcentagem do teor de sólidos presentes foi calculada com base na relação entre a massa final e a massa inicial da amostra. Esse teor foi utilizado para o cálculo da quantidade de endocarpo a ser usada na elaboração das amostras.

As amostras estudadas foram obtidas a partir da adição de endocarpo moído à borracha natural nas seguintes proporções: 5%, 10%, 15%, 20% e 25%, denominadas respectivamente 95B 5E, 90B 10E, 85B 15E, 80B 20E e 75B 25E. Também foi gerada uma amostra da borracha pura (100B). A homogeneização da mistura ocorreu em agitador magnético por 30 minutos.

A mistura, vertida em placa de Petri, foi acondicionada em vácuo por 15 minutos, com o intuito de diminuir as bolhas presentes. Em seguida, o material foi colocado em estufa a 75 °C por 12 horas, gerando o material para preparação dos corpos de prova. Para os testes de tração, o material foi cortado em tiras utilizando guilhotina.

Análises de colorimetria de reflectância foram conduzidas nas amostras sobre anteparo branco (bloco de papel) utilizando colorímetro Konica Minolta. As medidas foram realizadas em triplicata e registradas na escala CIEL*a*b*, em que L* corresponde ao valor de luminosidade, que varia de 0 (preto) a 100 (branco); a* corresponde ao verde para valores negativos e vermelho para positivos e b* corresponde ao azul para valores negativos e a amarelo para valores positivos.

Os corpos de prova foram condicionados em ambiente de controle de umidade a 50%, utilizando solução saturada de nitrato de cálcio, a 23 °C, conforme definido no método ASTM D 3039 (AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS, 2004). Os ensaios de tração foram então realizados pelo equipamento Arotec modelo WDW-201, que traciona os corpos de prova e registra a força resultante até a ruptura dos mesmos. Um mínimo de cinco corpos de provas foram ensaiados para cada amostra.

Resultados

A amostra de endocarpos moídos foi submetida à análise granulométrica. A distribuição de tamanho das partículas está mostrada na Tabela 1.

Tabela 1. Resultados da análise granulométrica mostrando o tamanho de partículas dos endocarpos de macaúba moídos.

Peneira	Abertura (μm)	ABNT/ASTM	Tyler/Mesh	Porcentagem (%)
1	1700	12	10	0
2	850	20	20	0,32
3	300	50	48	51,18
4	150	100	100	36,85
5	75	200	200	4,12
6	25	500	500	1,86
Fundo	-	-	-	0
Perdido no Processo	-	-	-	5,66

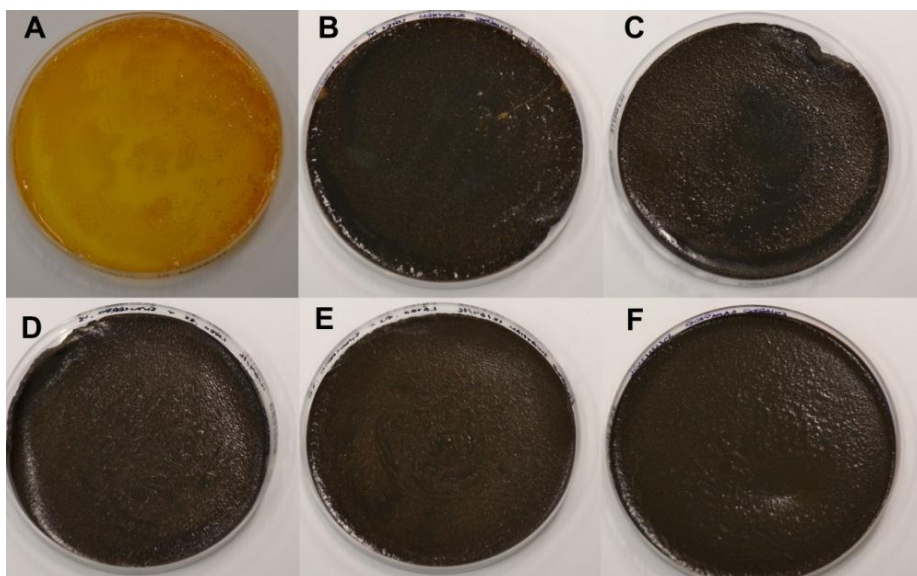


Figura 1. Fotografia mostrando as amostras preparadas em placas de Petri: A) 100B; B) 95B 5E, C) 90B 10E, D) 85B 15E, E) 80B 20E e F) 75B 25E.

A Figura 1 mostra que a amostra 100B tem coloração amarela, distinta das demais amostras, que são escuras. Tendo em vista a diferença de cor das amostras, foram realizadas análises colorimétricas, que são apresentadas na Tabela 2.

Tabela 2. Colorimetria de reflectância das amostras de borracha natural e compósitos. Os valores se referem à escala CIEL*a*b* e os erros se referem ao desvio padrão.

Amostra	L*	a*	b*
100B	68,17 ± 2,44	2,07 ± 0,22	42,12 ± 4,31
95B 5E	23,26 ± 1,30	0,92 ± 0,21	1,54 ± 0,07
90B 10E	25,38 ± 1,03	1,49 ± 0,06	1,95 ± 0,16
85B 15E	26,73 ± 0,63	2,00 ± 0,40	2,86 ± 0,32
80B 20E	26,66 ± 0,62	2,24 ± 0,04	3,46 ± 0,08
75B 25E	26,72 ± 0,63	1,30 ± 0,13	1,77 ± 0,03

É possível verificar que a maior parte das partículas tem tamanho variando entre 300 µm e 850 µm, correspondendo a 51% da amostra. Uma fração significativa, de 36,85%, possui tamanho entre 150 µm e 300 µm.

O teor de sólidos do látex utilizado foi determinado, sendo encontrado o valor de 61,68 ± 0,23% e este valor foi utilizado para a elaboração das amostras. Após a secagem da mistura do endocarpo moído e látex, foram obtidas as amostras mostradas na Figura 1.

A colorimetria revela que é necessário apenas 5% de adição de endocarpo para tornar a amostra escura, fazendo com que a luminosidade (L*) seja reduzida de 68,17 para 23,26, e a coloração amarela da borracha, medida pelo valor b* = 42,12, também é drasticamente modificada pela adição de endocarpo moído.

Por meio dos ensaios de tração, foram geradas as curvas de tensão *versus* deformação dos corpos de prova, como mostrado na Figura 2. A partir dessas, foram encontrados os valores de módulo de Young, tensão máxima suportada pelas amostras e alongamento na ruptura. O módulo de Young foi determinado como o coeficiente angular da região elástica da curva (alongamento menor que 7%). A média dos valores encontrados e o desvio padrão estão presentes na Tabela 3.

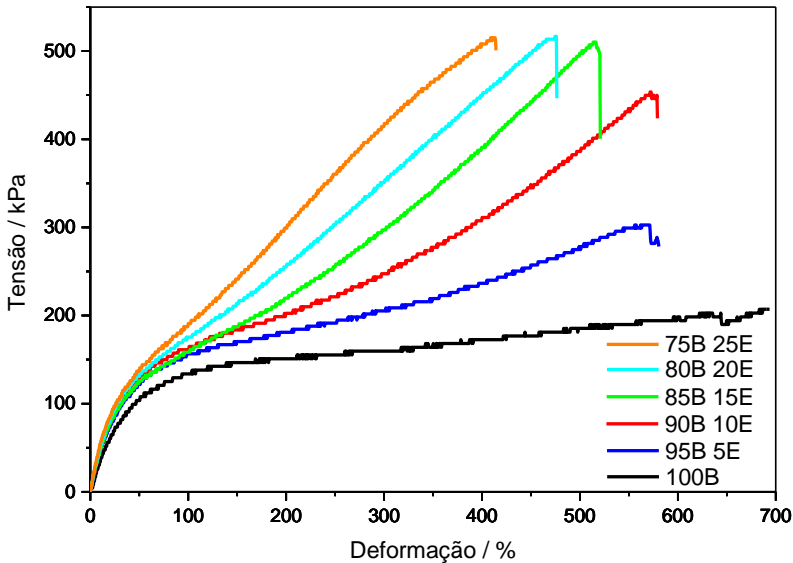


Figura 2. Curvas de tensão *versus* deformação de corpos de prova de borracha natural pura e de seus compósitos com endocarpos de macaúba moídos.

Tabela 3. Média dos valores de tensão máxima, alongamento na ruptura e módulo de Young para a borracha natural e seus compósitos com endocarpos de macaúba moídos.

Amostra	Tensão máxima / kPa	Alongamento na ruptura / %	Módulo de Young / kPa
100B	178 ± 26	617 ± 143	409 ± 52
95B 5E	272 ± 46	595 ± 155	496 ± 66
90B 10E	396 ± 48	590 ± 99	520 ± 28
85B 15E	452 ± 41	535 ± 75	481 ± 60
80B 20E	486 ± 35	488 ± 35	533 ± 41
75B 25E	451 ± 59	398 ± 43	529 ± 51

A Figura 2 e a Tabela 3 mostram que uma força maior precisa ser aplicada para romper os compósitos, quando comparados à borracha pura. Esse efeito é evidenciado pelo aumento da tensão máxima, que é cerca de 2,7 vezes maior, quando comparada à borracha pura com a amostra 80B 20E. Entretanto, esse efeito de reforço tem seu máximo observado em 20% de adição de endocarpos, indicando que em concentrações maiores, a tensão máxima tende a reduzir.

Por meio da análise de tração dos corpos de prova, é possível ser visto que a adição do pó de endocarpo de macaúba conferiu uma diminuição do comportamento elástico, evidenciado pela diminuição do alongamento na ruptura dos corpos de prova. A Tabela 3 mostra que a aditivação de endocarpo de macaúba causa uma redução gradual do alongamento máximo, partindo de $617 \pm 143\%$ para a borracha natural, até $398 \pm 43\%$ para o compósito com 25% de endocarpo. A redução de alongamento não é desejada para elastômeros, entretanto, o efeito de reforço, observado pelo aumento na tensão na ruptura, é normalmente acompanhado de redução em outras propriedades mecânicas.

A aditivação de pó de endocarpo à borracha não causa mudanças significativas na rigidez dos materiais obtidos, pois, apesar de ser verificado um leve aumento no módulo de Young, esse efeito não é significativo considerando os desvios das medidas.

Conclusões

É possível concluir que endocarpo de macaúba moído pode ser acrescentado ao látex de borracha natural para formação de filmes compósitos escuros. As amostras assim geradas apresentaram tensão na ruptura maior que a borracha pura, entretanto, o alongamento na ruptura é menor. Os materiais não apresentaram diferenças significativas em seus módulos de Young.

Apoio financeiro

Este estudo é apoiado pela Embrapa. Os autores agradecem Leo Duc Haa Carson Schwartzaupt da Conceição e à Embrapa Cerrados, pela doação dos endocarpos. Os autores agradecem Juarez Lopes da Silva pelas ideias e execução da limpeza e moagem dos endocarpos.

Referências

AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS. **ASTM D3039**: standard test method for tensile properties of polymer matrix composite materials. West Conshohocken, 2004.

DESSIMONI-PINTO, N. A. V.; MARIA, V.; DUMONT, P. V. Características físico-químicas da amêndoa de macaúba e seu aproveitamento na elaboração. **Alimentos e Nutrição**, Araraquara, v. 21, n. 1, p. 79-86, 2010.

Isolamento e caracterização de nanofibras de celulose de engaços de dendê obtidas por hidrólise enzimática

Eliane da Silva Simplicio¹, Dasciana de Sousa Rodrigues², Fabrício Machado Silva³, Leonardo Fonseca Valadares⁴

Resumo

A obtenção de nanofibras de celulose por hidrólise enzimática, no contexto do aproveitamento de biomassa lignocelulósica, tem sido explorada como uma rota promissora nos últimos anos. Nesse sentido, o objetivo deste trabalho consiste no isolamento e caracterização de nanofibras de celulose de engaços de dendê obtidas por hidrólise enzimática, avaliando diferentes tempos de reação. O isolamento da celulose foi realizado com solução de clorito de sódio (2%) acidificado com solução aquosa de ácido acético 1:1 e solução de hidróxido de potássio (6%). A hidrólise da celulose foi efetuada em três condições de tempo (24, 48 e 72 horas), utilizando complexo de celulasas comercial a 50 °C. As enzimas foram inativadas após transcorrer o tempo de hidrólise pelo aquecimento a 98 °C por uma hora. A caracterização foi conduzida por colorimetria de reflectância, microscopia eletrônica de transmissão (MET), difratometria de raios-X (DRX) e termogravimetria (TG). A fração celulósica isolada apresentou rendimento igual a 36,97%, cristalinidade avaliada em 59,92% e elevado grau de branqueamento. Na hidrólise enzimática, com o aumento do tempo de reação, houve um decréscimo na cristalinidade e na espessura das fibras celulósicas, com morfologia fina, alongada e altamente entrelaçada. Observou-se um comportamento térmico semelhante para as amostras estudadas. No entanto, a melhor condição de obtenção de nanocelulose foi em 48 horas de reação, visto o índice de cristalinidade evidenciado (62,57%), comportamento térmico estável e a diferença não acentuada na espessura da fibra, comparado ao material obtido em 72 horas de reação, o que não justifica gasto adicional de tempo e energia com manutenção do processo.

¹ Química, mestranda em Tecnologias Química e Biológica, Universidade de Brasília, eliane.simplicio@colaborador.embrapa.br

² Química Industrial, doutora em Engenharia Química, pesquisadora da Embrapa Agroenergia, dasciana.rodrigues@embrapa.br

³ Engenheiro Químico, doutor em Engenharia Química, Universidade de Brasília, fimachado@unb.br

⁴ Químico, doutor em Química, pesquisador da Embrapa Agroenergia, leonardo.valadares@embrapa.br

Introdução

A busca por novas fontes de matérias-primas, disponíveis em grande escala e competitivas econômica e ambientalmente tem sido foco de inúmeras discussões em caráter mundial. Aliado à dependência generalizada de insumos de origem petroquímica, torna-se primordial dispor de alternativas locais que contribuam para a manutenção das atividades na indústria. Com isso, a biomassa lignocelulósica vem sendo explorada em processos graças à grande quantidade de resíduos agroindustriais produzidos anualmente e ao fato de estes serem subutilizados dentro das cadeias de produção em que são gerados, o que é de interesse para o Brasil, visto a oportunidade de gerar novas tecnologias e produtos (CORTEZ, 2010).

Nessa perspectiva, a dendeicultura no País consiste de uma cadeia produtiva atrativa, fornecendo resíduos lignocelulósicos como os engaços de dendê, utilizados em diversas finalidades nesse setor, visando à geração de renda. A biomassa lignocelulósica é composta por três principais frações: celulose (40-50%), hemicelulose (15-25%) e lignina (15-25%), dentre outros constituintes. A partir de processos adequados de conversão, pode-se obter biocombustíveis, materiais renováveis e produtos químicos de interesse comercial. Para isso, podem ser empregados métodos químicos, físicos, biológicos ou combinados, selecionados de acordo com as características da matéria-prima, rendimento e viabilidade em escala industrial (CORTEZ, 2010; ROSILLO-CALLE et al., 2005).

A fração celulósica para a ciência de materiais pode contribuir significativamente como uma fonte precursora de matéria-prima na obtenção de inúmeros produtos de caráter renovável, inéditos e de elevado valor agregado. Nesse âmbito, com os conhecimentos no campo da nanotecnologia, a produção e aplicação de fibras celulósicas de escala nanométrica como alternativa de agente de reforço para matrizes variadas, possibilita a melhoria das propriedades físicas e químicas dessa matéria-prima, sobretudo para a síntese de biomateriais e nanocompósitos.

Na literatura, a obtenção de nanoestruturas de celulose é reportada por meio de processos mecânicos e hidrólise seletiva da celulose. Esta última deve ser realizada na presença de catalisadores, tendo duas possibilidades: ácidos inorgânicos (H_2SO_4 , HCl e H_3PO_4) ou enzimas (celulases). Embora a hidrólise ácida seja o método consolidado atualmente, o uso de celulases vem sendo

avaliado como uma rota alternativa e promissora, apresentando como principais vantagens condições operacionais mais brandas de temperatura, pH e a eliminação de problemas com a corrosão de equipamentos e a alta especificidade por substrato celulósico elucidada (BONONI, 2010). Nesse sentido, o objetivo deste trabalho consiste na obtenção e caracterização de nanofibras de celulose de engaços de dendê isoladas por hidrólise enzimática, considerando diferentes tempos de reação.

Materiais e métodos

Purificação da celulose de engaços de dendê

A metodologia descrita a seguir é adaptada de Fahma et al. (2010). A remoção da fração de lignina foi realizada com solução de clorito de sódio 2% acidificado com solução aquosa de ácido acético 1:1 e a fração de hemicelulose foi removida com solução de hidróxido de potássio (6%). Esse procedimento foi realizado em dois ciclos. Para o experimento, foram adicionados 50 g de engaços de dendê secos, moídos e sem extrativos (5%) para um sistema aquoso (1.000 mL). Para cada ciclo foram realizadas quatro extrações, adicionando-se 25 g clorito de sódio Sigma Aldrich (80%) e acidificando o sistema com 6 mL de solução aquosa de ácido acético 1:1, e uma extração adicionando-se 70,59 g de hidróxido de potássio Tedia Brasil (85%). Cada extração teve a duração de 24 horas sob agitação à temperatura ambiente, seguido de lavagem até pH neutro. O teor de sólidos foi determinado em triplicata.

Hidrólise enzimática de celulose de engaços de dendê

Para a realização da hidrólise enzimática de celulose, utilizou-se complexo de celulasas comercial com atividade igual a 41,7 FPU/mL. Primeiramente, pesou-se em balança analítica aproximadamente 20 g de polpa de celulose em triplicata. Cada alíquota foi inserida em um Erlenmeyer de 125 mL, juntamente com 0,2 mL de solução de tampão citrato de sódio/ácido cítrico 0,1 M, pH 5 e o respectivo volume de celulasas comercial. Os sistemas foram incubados em *shaker* sob agitação a 250 rpm a 50 °C. As reações foram interrompidas após 24, 48 e 72 horas de tempo de hidrólise. A inativação enzimática foi realizada por meio de aquecimento a 98 °C por 1 hora, seguida de lavagem até pH neutro.

Caracterização química e morfológica

Para a análise por microscopia eletrônica de transmissão (MET), uma alíquota de cada amostra foi diluída, sonicada e adicionada em “grids” de cobre e armazenadas em dessecador. As micrografias foram registradas em microscópio eletrônico de transmissão JEOL - JEM/1011, a 80 kV. A análise das dimensões (comprimento e espessura) das nanofibras foi realizada com o programa ImageJ, pela medida de cerca de 200 nanoestruturas.

Para a difratometria de raios-X, as amostras foram secas por 48 horas a 78 °C e analisadas em difratômetro Bruker/D8 Focus, potência de 40 kV, 30 mA e radiação de $\text{CuK}\alpha$ ($\lambda=1,54 \text{ \AA}$), a uma velocidade de 0,5°/minuto no intervalo de ângulos 2θ variando de 5° a 40°. O índice de cristalinidade (IC) foi determinado de acordo com a equação proposta por Segal et al. (1959), a partir da intensidade de difração dos picos: $2\theta = 18^\circ$ e $22,6^\circ$.

Para a colorimetria de reflectância [considerou-se os valores da escala $\text{CIEL}^*a^*b^*$, em que L^* é a luminosidade, a^* é a coordenada que descreve o vermelho (+) e o verde (-) e o b^* é a coordenada para o amarelo (+) e o azul (-)] e termogravimetria, as amostras foram secas a 78 °C por 24 horas e analisadas em colorímetro Konica Minolta, modelo CR-400 com fundo branco e no equipamento Shimadzu DTG-60H. Foram pesadas entre 8 mg e 10 mg de cada amostra em cadinho de platina e analisadas a uma faixa de aquecimento de 25 °C até 900 °C com taxa de aquecimento de 10 °C/min, em atmosfera de nitrogênio (N_2) com fluxo de 50 mL/min⁻¹.

Resultados e discussão

O processo de polpação da celulose apresentou rendimento igual a 36,97% (com base no teor de sólidos), elevado grau de branqueamento e cristalinidade avaliada em 59,92% (Tabela 1). Para os hidrolisados gerados, as micrografias confirmam a obtenção de fibras em escala nanométrica, evidenciada pela diminuição da espessura destas com o aumento do tempo de hidrólise, apresentando morfologia fina, alongada e altamente entrelaçada (Figura 1).

Essa informação comprova a atividade efetiva e sinérgica das celulases sobre a estrutura da fibra celulósica, embora não seja observada a redução no comprimento das mesmas (característica acentuada da fibra de engajo de

dendê), o que não restringe e nem compromete a ação enzimática, propriedades e aplicações avaliadas para esse material (Tabela 1).

Tabela 1. Valores de cristalinidade, comprimento, espessura e coloração de biomassa, fibra celulósica e nanofibras de celulose (NFC) em diferentes tempos de hidrólise.

Material	Cristalinidade (%)	Espessura (nm)	Comprimento (nm)	Coloração (L*; a*; b*)
Engaço de dendê	27,38	-	-	43,38; 4,57; 17,49
Fibra de celulose	59,92	11,0x10 ³ ±3,9x10 ³	190x10 ³ ±106x10 ³	95,15; -0,46; 5,07
NFC – 24 horas	69,57	17,4 ±7,3	782,1±341,2	95,78; -0,69; 6,96
NFC – 48 horas	62,57	12,9 ±6,2	414,2 ±207,0	96,60; -0,52; 6,40
NFC – 72 horas	49,68	11,8 ±5,9	640,4 ±384,2	96,01; -0,77; 6,07

Com isso, a melhor condição de tempo de hidrólise apresentada foi em 48 horas de reação, visto que, com 24 horas de reação, observam-se fibras não hidrolisadas e, com 72 horas de reação, não há uma diminuição significativa, principalmente na espessura das nanofibras, em comparação ao material obtido em 48 horas de reação. O termograma gerado (Figura 2A) mostra que, com o aumento do tempo de hidrólise, as nanofibras apresentaram uma temperatura maior de degradação em relação à fibra de engaço de dendê e de celulose. Entretanto, essa diferença não é acentuada, sugerindo que as amostras de nanofibras apresentam comportamentos térmicos semelhantes.

A partir do índice de cristalinidade calculado por meio do difratograma de raios-X construído (Figura 2B), verifica-se que, com 24 horas de hidrólise enzimática, ocorreu o aumento da cristalinidade da nanofibra, comparado à fibra celulósica de engaço de dendê (59,92%).

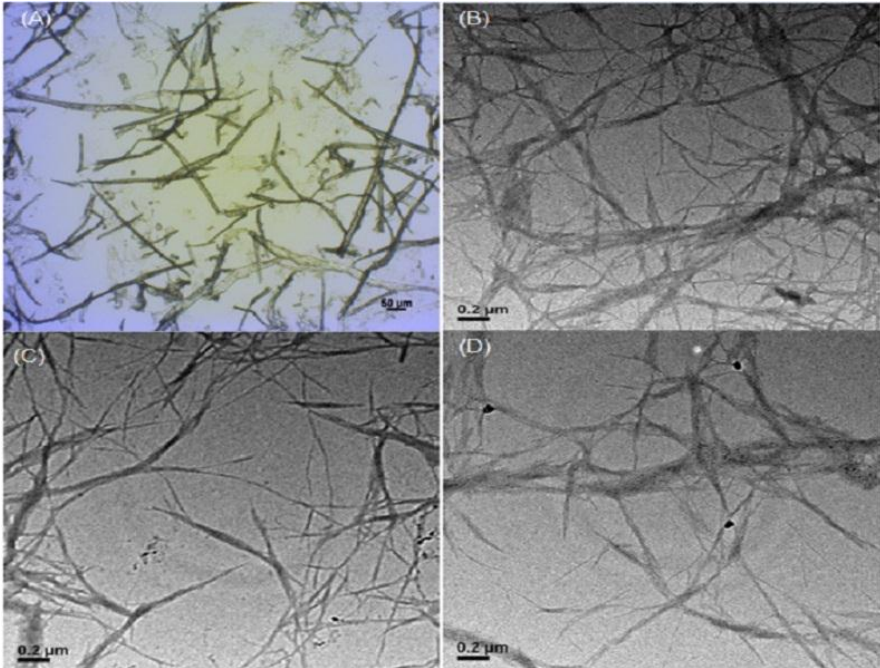


Figura 1. Micrografias registradas por microscopia de luz (A) e por microscopia eletrônica de transmissão (MET) (B, C e D): (A) fibra de celulose de engaços de dente, (B) nanofibra de celulose em 24 horas, (C) nanofibras de celulose em 48 horas e (D) nanofibras de celulose em 72 horas.

Entretanto, com o aumento do tempo de reação, ocorreu a diminuição da cristalinidade do material (Tabela 1). Tal resultado sugere que, com o aumento do tempo de reação, as enzimas, após hidrolisar a parte amorfa do material, começam a agir sobre a celulose cristalina, diminuindo a fração de cadeias cristalinas da mesma.

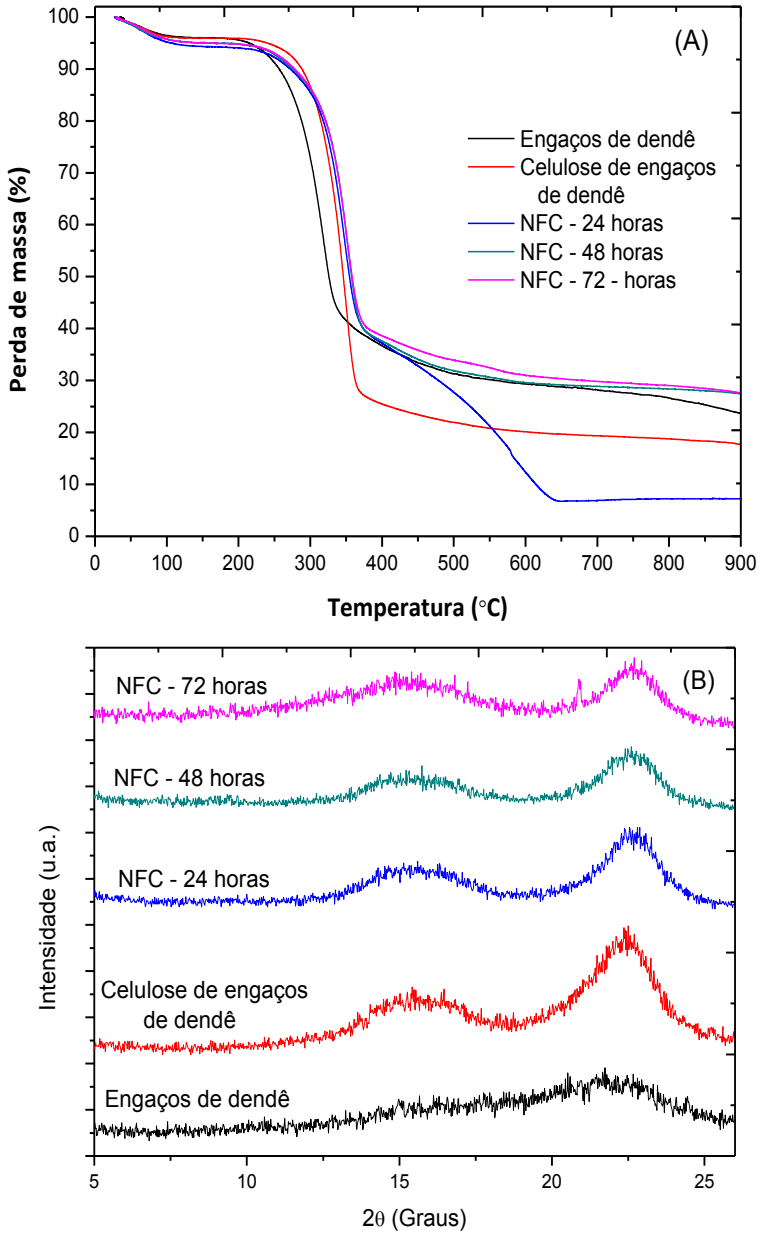


Figura 2. Caracterização de amostras de fibra de engaços de dendê, fibra celulósica e nanofibras (24, 48 e 72 horas): (A) Termograma e (B) Difratoograma de raios-X.

Conclusões

Constatou-se que a melhor condição de isolamento de nanofibras por hidrólise enzimática da celulose de engaços de dendê foi alcançada durante 48 horas de reação, apresentando cristalinidade elevada (62,57%) e morfologia fina (12,9 nm), alongada, altamente entrelaçada. O valor encontrado para a espessura das nanofibras nesse tempo se mostrou semelhante ao verificado em 72 horas de reação, o que não justifica custos adicionais com energia e tempo para a manutenção do processo, visto também a diminuição da cristalinidade da fibra celulósica (49,68 %) nessa condição. Os resultados obtidos contribuem quanto ao uso de tecnologias químicas e biológicas direcionadas à ciência de materiais, visando à produção de fibras celulósicas de escala nanométrica.

Apoio financeiro

Os autores agradecem à Capes e ao CNPq. Particularmente, E. Simplicio agradece à Capes (Capes/Embrapa, Projeto n° 086404/2014), pela concessão de bolsas.

Referências

- BONONI, A. Workshop hidrólise de material lignocelulósico. In: CORTEZ, L. A. B. (Coord.). **Bioetanol de cana-de-açúcar: p&d para produtividade e sustentabilidade**. São Paulo: Blucher, 2010.p. 679-695.
- CORTEZ, L. A. B. (Coord.). **Bioetanol de cana-de-açúcar: p&d para produtividade e sustentabilidade**. São Paulo: Blucher, 2010. 992 p.
- FAHMA, F.; IWAMOTO, S.; HORI, N.; IWATA, T.; TAKEMURA, A. Isolation, preparation, and characterization of nanofibers from oil palm empty-fruit-bunch (OPEFB). **Cellulose**, Dordrecht,, v. 17, n. 5, p. 977-985, 2010.
- ROSILLO-CALLE, F.; BAJAY, S. V.; ROTHMAN, H. (Org.). **Uso da biomassa para produção de energia na indústria brasileira**. Campinas: UNICAMP, 2005. 447 p.
- SEGAL, L.; CREELY, J. J.; MARTIN, A. E.; CONRAD, C. M. An empirical method for estimating the degree of crystallinity of native cellulose using the X-ray diffractometer. **Textile Research Journal**, Princeton, v. 29, n. 10, p. 786-794, 1959.

Otimização da polimerização do glicerol: avaliação da reologia

Débora Rodrigues Serra¹, Fabrício Machado Silva², Larissa Andreani Carvalho³, Leonardo Fonseca Valadares⁴

Resumo

A produção de biodiesel vem crescendo ao longo dos anos e tende a crescer ainda mais. Com isso, há também um aumento do volume de glicerol produzido, acarretando em uma redução do valor comercial do glicerol, o que gera a necessidade de agregar valor a esse coproduto. Com o objetivo de desenvolver um produto útil e rentável para o aproveitamento do glicerol, esse trabalho aplicou o planejamento fatorial para otimizar a sua polimerização com o menor número de experimentos possíveis. As condições de reação variadas para a produção de poliglicerol com as propriedades necessárias foram a temperatura e a concentração do ácido sulfúrico, utilizado como catalisador. Por meio das análises de reometria foi possível determinar que houve um aumento considerável na viscosidade e uma modificação nas propriedades reopéticas do produto obtido a 180 °C e 2% de ácido sulfúrico, sendo essas as melhores condições para a produção do poliglicerol.

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; PINTO, 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, 2012). Em virtude da quantidade crescente

¹ Química, mestre em Química, Universidade de Brasília, debora.serra@colaborador.embrapa.br

² Engenheiro químico, doutor em Engenharia Química, Universidade de Brasília, fmachado@unb.br

³ Química, doutora em Química, analista da Embrapa Agroenergia, larissa.andreani@embrapa.br

⁴ Químico, doutor em Química, pesquisador da Embrapa Agroenergia, leonardo.valadares@embrapa.br

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, 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 et al., 2010). O objetivo deste trabalho foi otimizar essa polimerização variando a concentração do catalisador e a temperatura da reação. Utilizou-se as mesmas amostras apresentadas no Encontro de Pesquisa e Inovação de 2015, porém foram realizadas análises de reometria e reologia, e os materiais e métodos utilizados estão representados a seguir.

Materiais e métodos

Utilizou-se um planejamento fatorial 2^2 com triplicata no ponto central, em que 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, como pode ser visto na Tabela 1, e a matriz de planejamento está mostrada na Tabela 2, para especificar a ordem e as condições dos experimentos. 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 acordo com o planejamento, as reações ocorreriam por 4 horas, sob sistema de vácuo com fluxo de nitrogênio a, aproximadamente, 10 litros por minuto. Foram feitas análises reológicas para caracterização dos produtos obtidos.

Tabela 1. Tabela de fatores e seus níveis iniciais.

Fatores	Nível (-)	Ponto Central	Nível (+)
Temperatura (°C)	140	180	220
Concentração de catalisador (mol%)	1	2	3

Tabela 2. Matriz de planejamento.

Ensaio	Fator 1	Fator 2	Interação 12
1	-	-	+
2	+	-	-
3	-	+	-
4	+	+	+
5	0	0	0
6	0	0	0
7	0	0	0

Resultados e discussão

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, em virtude das 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. 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 uma meia hora e apresentou-se como um líquido escuro extremamente viscoso. Já as duas seguintes apresentaram-se como sólidos pretos. Uma reação ocorreu por meia hora e a outra por duas horas, até que se transformassem em sólidos. Os produtos obtidos podem ser vistos na Figura 1.

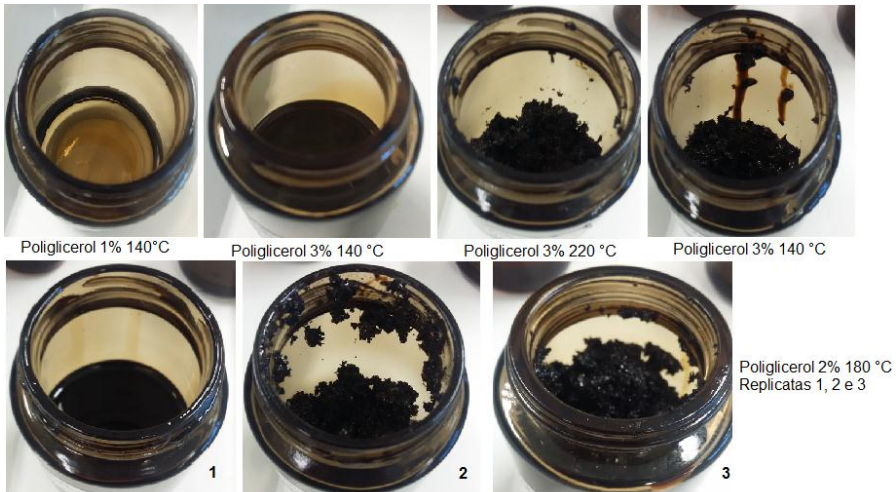


Figura 1. Produtos obtidos na primeira fase de experimentos.

As análises de reometria e reologia foram realizadas apenas para as quatro amostras líquidas obtidas e utilizou-se o reômetro Brookfield LVDV – III Ultra com termosel e o spindle SV-34.

Colocou-se aproximadamente 10 mL de cada uma das amostras líquidas e do glicerol no recipiente adequado para uso no termosel e mediu-se 25 pontos para cada uma das seis temperaturas analisadas em cada amostra, sendo elas a temperatura ambiente, 21,6 °C; 25 °C; 24,6 °C e 21,6 °C para as amostras de Poliglicerol 2% 180 °C, Poliglicerol 3% 140 °C, Poliglicerol 1% 140 °C e glicerol, respectivamente, 30 °C, 40 °C, 50 °C, 60 °C e 70 °C. As velocidades utilizadas foram diferentes para cada uma das amostras em virtude das suas viscosidades. Na ordem da maior para a menor viscosidade aparente, foram 0,1 rpm, na seguinte 15 rpm, depois 55 rpm e por último 45 rpm. Os gráficos obtidos estão mostrados nas Figuras 2 e 3, tendo sido necessário separar o gráfico da amostra mais viscosa por causa da diferença de escala.

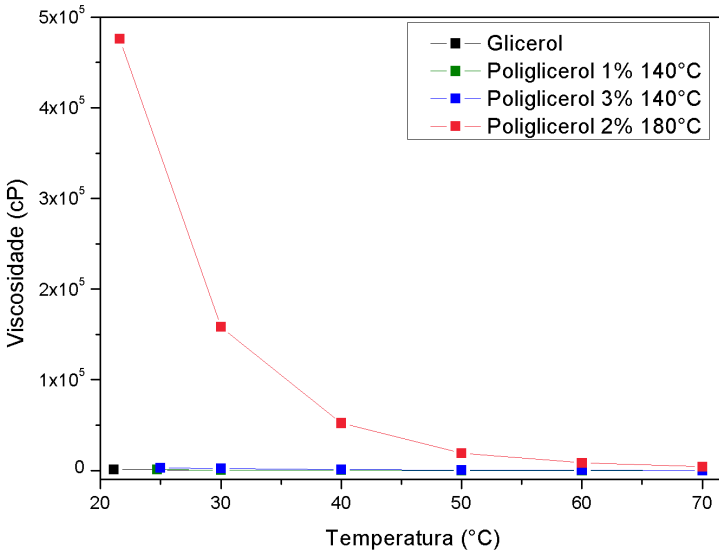


Figura 2. Comparação entre as viscosidades dos produtos obtidos e o glicerol.

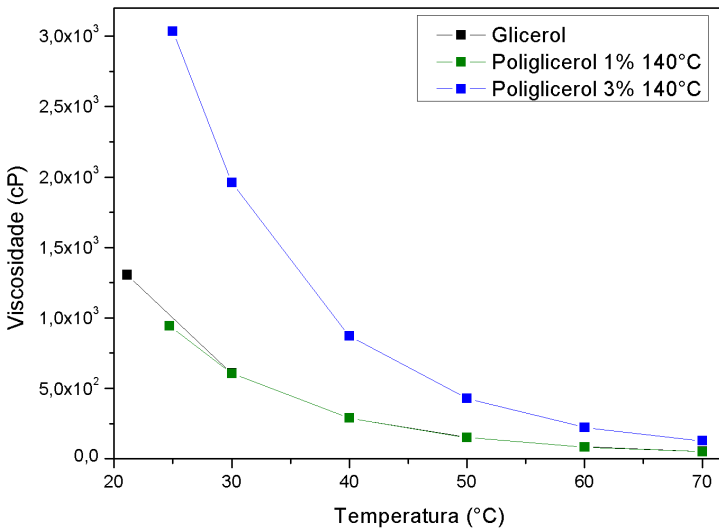


Figura 3. Comparação entre as viscosidades dos produtos obtidos e o glicerol.

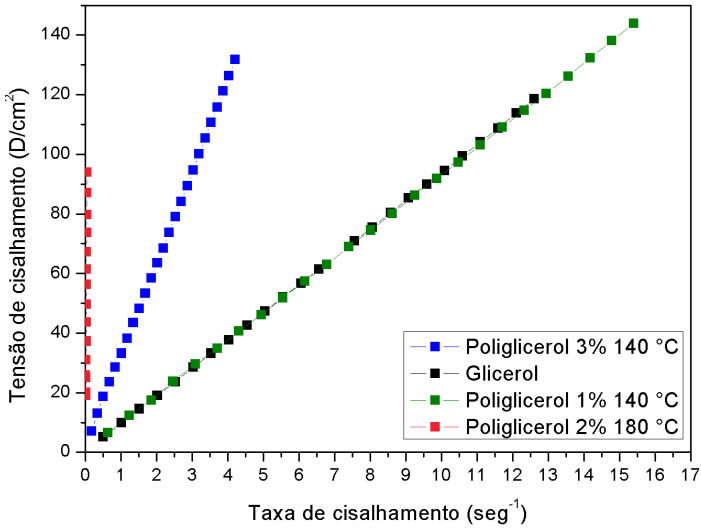


Figura 4. Curvas de fluxo dos produtos líquidos obtidos e do glicerol.

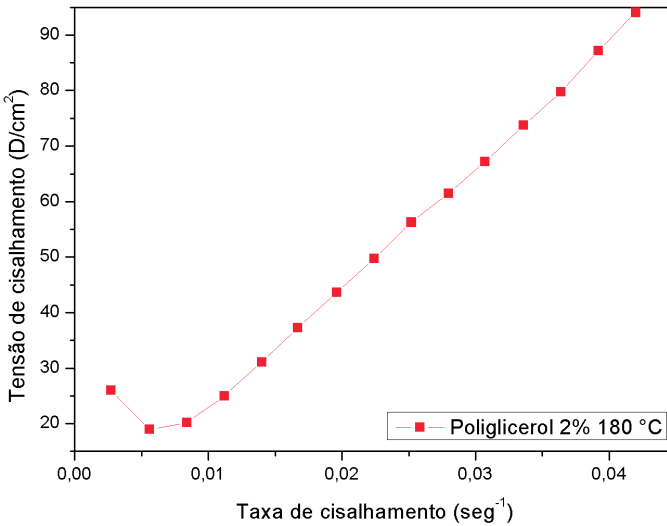


Figura 5. Curva de fluxo do poliglicerol 2% 180 °C replicata 1.

Analisando os gráficos, é possível reparar que a reação com 1% de catalisador e 140 °C não acarretou mudanças significativas na viscosidade do produto, fazendo acreditar que não houve formação de polímeros, somente de oligômeros. Já o produto da reação com 3% de catalisador gerou um produto com viscosidade aproximadamente 2 vezes maior que a do glicerol, levando-se à conclusão de que houve a formação de oligômeros de cadeias maiores. Já a reação do ponto central ficou muito mais viscoso que o glicerol, dando a entender que a seletividade para polímeros foi maior do que para oligômeros.

Também foi necessário observar o comportamento dos materiais com a variação da taxa de cisalhamento. Para isso, aumentaram-se gradativamente as velocidades adquirindo até 25 medidas para cada uma das amostras até alcançar a velocidade máxima possível para cada uma das amostras, os gráficos obtidos estão mostrados nas Figuras 4 e 5, tendo sido separados novamente pela diferença de escala.

Pelo gráfico mostrado na Figura 4, conclui-se que os produtos Poliglicerol a 1% e a 3% e o glicerol são caracterizados como fluidos dilatantes com comportamento tixotrópico, pois suas viscosidades aumentam com o aumento da taxa de cisalhamento a uma mesma temperatura e reduzem com a aplicação de uma mesma taxa de cisalhamento por um certo tempo. Já a amostra produzida a 180 °C e 2% de ácido, mostrado na Figura 6, é considerada um fluido não newtoniano dilatante com comportamento reopético a temperatura ambiente, pois sua viscosidade aumenta quando se mantém a mesma taxa de cisalhamento e, com a variação da taxa de cisalhamento, sua curva de fluxo inicialmente decai para depois começar a subir.

Conclusão

Concluiu-se então que o uso de 2% de catalisador e 180 °C são as melhores condições de reação para a polimerização do glicerol. Apesar disso, os polímeros obtidos nessa primeira etapa possuem cadeias pequenas e uma mudança da viscosidade extremamente baixa, além da formação de acroleína, evidenciada pela alteração da coloração e do odor, um composto tóxico e indesejado para esse trabalho.

Apoio financeiro

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

Referências

MEDEIROS, M. de A.; REZENDE, J. de C.; ARAÚJO, M. H.; LAGO, R. 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**, Curitiba, edição 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 Fapesp**, São Paulo, n. 196, 2012. Disponível em: <<http://www.biodieselbr.com/noticias/usinas/glicerina/glicerina-residuo-biodiesel-pesquisas-040712.htm>>. Acesso em: 01 fev. 2015.

Caracterização química e gaseificação em leito fluidizado borbulhante de bagaço de cana e engaço de dendê

Amanda Assunção Rosa¹, Albert Reis dos Anjos², Anna Letícia Montenegro Turtelli Pighinelli³, Rafael Benjamin Werneburg Evaristo⁴, Fabricio Machado⁵, Rossano Gambetta⁶

Resumo

Este trabalho teve por objetivo avaliar o potencial do bagaço de cana e do engaço de dendê como matérias-primas para a gaseificação, bem como mostrar resultados obtidos em suas gaseificações. Verificou-se que ambas as biomassas apresentaram um elevado poder calorífico superior (PCS) equivalente a 18,3 kJ/kg para o engaço e 17,5 kJ/kg para o bagaço em decorrência dos altos teores de voláteis e carbono fixo. Em relação aos dados obtidos nas gaseificações usando ar ou vapor d'água como agente gaseificante, observou-se um melhor resultado para o vapor, gerando uma mistura gasosa composta por quase 50% de gás combustível.

Introdução

O consumo energético mundial nunca foi tão alto quanto no presente, o que é consequência de uma série de fatores, como o modo de vida atual e o fato de que a população global é cada vez maior (MORTENSEN, et al., 2011). O fato de o mundo apresentar uma alta dependência de combustíveis fósseis como sua principal fonte de energia tem gerado problemas ambientais e uma séria crise energética (MOHAMMED et al., 2011).

Nesse contexto, tem crescido a busca por uma descentralização da matriz energética mundial e as fontes renováveis de energia surgem como uma alternativa viável para a amenização do problema (MOHAMMED et al., 2011). A

¹ Química, mestranda em Tecnologias Químicas e Biológicas, Universidade de Brasília, amanda.rosa@colaborador.embrapa.br

² Engenheiro de Energia, mestrando em Tecnologias Químicas e Biológicas, Universidade de Brasília, albert.anjos@colaborador.embrapa.br

³ Engenheira Agrícola, doutora em Engenharia Agrícola, analista da Embrapa Agroenergia, anna.pighinelli@embrapa.br

⁴ Graduando em Química Tecnológica, Universidade de Brasília, rafaelwerneburg@hotmail.com

⁵ Engenheiro Químico, doutor em Engenharia Química, Universidade de Brasília, fmachado@unb.br

⁶ Engenheiro Químico, doutor em Engenharia Química, pesquisador da Embrapa Agroenergia, rossano.gambetta.embrapa.br

biomassa consiste na quarta maior fonte de energia do mundo e ainda oferece vantagens substanciais como a redução da emissão de gases de efeito estufa e a contribuição para um desenvolvimento socioeconômico e ambientalmente sustentável (SARKER et al., 2015; KHAN et al., 2009).

Define-se biomassa como um material biológico proveniente de organismos vivos ou recentemente vivos (KHAN et al., 2009). Inclui-se nessa definição os resíduos tanto urbanos quanto agroindustriais, como é o caso do bagaço de cana e do engaço de dendê. Essas biomassas podem ser usadas como matéria-prima para a síntese de produtos químicos, para a conversão em combustível para o setor de transportes e para a geração de energia e calor. Essas conversões podem ser realizadas por meio de processos bioquímicos, como fermentação e digestão, ou por meio de processos termoquímicos, como combustão, pirólise e gaseificação (LAKSMONO et al., 2013).

Morrin et al. (2012) definem o processo de gaseificação como a conversão termoquímica de matéria orgânica em um produto gasoso por meio de uma oxidação parcial a elevadas temperaturas. O produto gasoso obtido é conhecido como gás de síntese e consiste em uma mistura de H_2 e CO , com concentrações mais baixas de CO_2 , vapor d'água, CH_4 e outros hidrocarbonetos leves e N_2 a depender do agente gaseificante utilizado. O gás de síntese pode ser utilizado diretamente para a combustão ou para a síntese de combustíveis e produtos químicos de elevado valor agregado.

Este trabalho teve por objetivo avaliar o potencial do bagaço de cana e do engaço de dendê como matérias-primas para a gaseificação, bem como mostrar resultados obtidos em suas gaseificações.

Materiais e métodos

As caracterizações foram realizadas na Embrapa Agroenergia e na Central Analítica do Instituto de Química da Universidade de Brasília (UnB). As biomassas utilizadas são provenientes de projetos da Embrapa Agroenergia. Ambas foram moídas e peneiradas até um tamanho médio equivalente a 0,5 mm. Várias análises foram feitas com o fim de averiguar o potencial do bagaço de cana e do engaço de dendê como matérias-primas para a gaseificação.

Análises imediatas

Os teores de umidade, cinzas, carbono fixo e voláteis foram obtidos seguindo a norma ASTM D 5142-02a num analisador termogravimétrico da marca LECO modelo TGA 701.

Poder calorífico superior

Os dados de poder calorífico superior (PCS) foram obtidos utilizando uma bomba calorimétrica da IKA, modelo C-2000.

Fluorescência de raios X por energia dispersiva (FRX/EDX)

Os dados de fluorescência de raios X por energia dispersiva (FRX/EDX) foram obtidos utilizando um espectrômetro da Shimadzu, modelo EDX-720, que analisa a faixa de elementos que vai do sódio (^{11}Na) ao urânio (^{92}U), com tubos de raios X com alvo de ródio.

Gaseificador

Os experimentos de gaseificação foram realizados num gaseificador de leito fluidizado da marca PID Eng & Tech. O processo foi realizado a 800 °C.

Análise dos gases gerados na gaseificação

Os gases gerados no processo de gaseificação foram analisados por um analisador de gases em linha da marca SICK, modelo GMS800.

Resultados e discussão

Por meio das análises imediatas, obtêm-se os teores de umidade, cinzas, carbono fixo e voláteis. Essa análise é relevante para o processo de gaseificação, uma vez que quanto maiores os teores de voláteis e carbono fixo de uma determinada biomassa, maior será seu poder calorífico superior. Na Tabela 1, encontram-se os valores obtidos para as análises imediatas. Observou-se que os teores de voláteis e carbono fixo em base seca para ambas as biomassas foram altos, o que indica que elas geram grande quantidade de energia em sua queima. Tal fato é corroborado pelos valores de PCS obtidos: $18,3 \pm 0,1$ kJ/kg para o engaço de dendê e $17,5 \pm 0,1$ kJ/kg para o bagaço de cana.

Tabela 1. Resultado das análises imediatas do engaço de dendê e do bagaço de cana.

Amostra	Umidade	Voláteis	Carbono Fixo	Cinzas
Engaço de dendê	6,18 ± 0,01	72,62 ± 0,27	15,93 ± 0,41	5,27 ± 0,22
Bagaço de cana	8,91 ± 0,01	75,36 ± 0,07	13,35 ± 0,16	2,38 ± 0,22

A caracterização dos materiais inorgânicos por meio da análise de FRX/EDX também é bastante importante, principalmente para o engaço de dendê, no qual o teor de cinzas é relativamente alto (aproximadamente 5,3%). Nesse caso, o alto teor de potássio — que corresponde a aproximadamente 60% das cinzas — influenciará diretamente o processo de gaseificação, uma vez que a presença desse metal diminui o ponto de fusão das cinzas, causando aglomeração do leito e formação de depósitos nas paredes do reator, o que em última instância pode interferir na estabilidade do leito fluidizado (KHAN et al., 2009).

Ensaio de gaseificação preliminares foram realizados usando ar ou vapor d'água como agentes de gaseificação, com o intuito de verificar o efeito de tais agentes sobre a produção dos principais constituintes do gás de síntese (H_2 e CO). A vazão de cada agente gaseificante a ser usada foi definida por meio de testes de fluidização e, assim, para o ar foi definida uma vazão de 12 L/min de ar e 15 L/min para o vapor d'água. De acordo com os resultados obtidos, o melhor agente gaseificante é o vapor d'água tanto para o engaço de dendê quanto para o bagaço de cana. Na Tabela 1, são apresentados os resultados obtidos no processo de gaseificação do bagaço de cana. Observa-se que o tipo de agente de gaseificação apresenta um efeito significativo sobre a composição dos gases gerados, de tal forma que, enquanto com vapor d'água houve uma produção de 44% de gás combustível, com ar a produção foi de apenas 11,5%. A quantidade de H_2S gerada foi desconsiderada para esses somatórios, pois embora ele seja um gás combustível, sua produção é indesejada.

Tabela 1. Composição dos gases gerados na gaseificação de bagaço de cana.

	H_2	CO	CO_2	CH_4	H_2S
Ar	1,0%	9,0%	13,6%	1,5%	0,4%
Vapor d'água	11,7%	24,9%	6,2%	7,4%	2,1%

Conclusões

Por meio dos resultados obtidos nas caracterizações, é possível perceber que ambas as biomassas apresentam potencial para a gaseificação, porém no caso do engajo de dendê há problemas operacionais em decorrência do alto teor de potássio na sua composição, o que compromete o desempenho do processo, uma vez que a capacidade de fluidização é reduzida.

Avaliando os dados da análise dos gases, percebe-se que utilizando o vapor d'água como agente gaseificante é possível obter uma mistura gasosa composta por mais de 40% de gás combustível, o que é bastante satisfatório, visto que ainda serão realizados mais estudos a fim de otimizar a produção de H_2 e CO .

Apoio financeiro

Os autores agradecem à Capes, ao CNPq e à Finep. Particularmente, A. Rosa agradece à Capes (Capes/Embrapa, Projeto n° 086404/2014) e A. Anjos agradece ao CNPq (Projeto n° 406.812/2013-6), pela concessão de bolsas de estudo.

Referências

- KHAN, A. A.; DE JONG, W.; JANSENS, P. J.; SPLIETHOFF, H. Biomass combustion in fluidized bed boilers: Potential problems and remedies. **Fuel Processing Technology**, Amsterdam, v. 90, n. 1, p. 21-50, 2009.
- LAKSMONO, N.; PARASCHIV, M.; LOUBAR, K.; TAZEROUT, M. Biodiesel production from biomass gasification tar via thermal/catalytic cracking. **Fuel Processing Technology**, Amsterdam, v. 106, p. 776-783, 2013.
- MOHAMMED, M. A. A.; SALMIATON, A.; AZLINA, W. A. K. G. W.; AMRAN, M. S. M.; FAKHRU'L-RAZI, A. Air gasification of empty fruit bunch for hydrogen-rich gas production in a fluidized-bed reactor. **Energy Conversion and Management**, v. 52, n. 2, p. 1555-1561, 2011.
- MORRIN, S.; LETTIERI, P.; CHAPMAN, C.; MAZZEI, L. Two stage fluid bed-plasma gasification process for solid waste valorisation: technical review and preliminary thermodynamic modelling of sulphur emissions. **Waste Management**, Oxford, v. 32, n. 4, p. 676-684, 2012.
- MORTENSEN, P. M.; GRUNWALDT, J.-D.; JENSEN, P. A.; KNUDSEN, K. G.; JENSEN, A. D. A review of catalytic upgrading of bio-oil to engine fuels. **Applied Catalysis A: General**, Amsterdam, v. 407, n. 1-2, p. 1-19, 2011.
- SARKER, S.; BIMBELA, F.; SÁNCHEZ, J. L.; NIELSEN, H. K. Characterization and pilot scale fluidized bed gasification of herbaceous biomass: a case study on alfalfa pellets. **Energy Conversion and Management**, Oxford, v. 91, p. 451-458, 2015.



**Química de
Biocombustíveis
e Biomassa**

Avaliação da estabilidade oxidativa do B100 com o uso de aditivos comerciais e extrativos

Nayara Neiva Moura¹, Rodrigo Bastos Cesarino Dutra², Itânia Pinheiro Soares³

Resumo

O biodiesel é composto de ésteres de cadeia saturada, monossaturada e poli-insaturada. Devido a essas insaturações um parâmetro de suma importância para garantia da qualidade do combustível é a estabilidade à oxidação. Para atender à especificação da Agência Nacional de Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis (ANP), o biodiesel deve apresentar no mínimo 8 horas de estabilidade no teste, para ser comercializado. O biodiesel de soja não atende a essa especificação sem a adição de um aditivo antioxidante. Embora já existam aditivos disponíveis comercialmente, a pesquisa sempre busca encontrar novos aditivos que possam atender a essa demanda. O presente trabalho testou dois aditivos comerciais (ainda não utilizados como antioxidantes) e um extrativo de biomassa, para avaliar a estabilidade oxidativa do B100 após a adição. O Aditivo 3 apresentou resultados em concordância com o valor mínimo estipulado pela ANP, com um período de indução médio variando entre 8,62 h e 22,85 h para as concentrações de 150 ppm e 3.000 ppm, respectivamente.

Introdução

A composição do biodiesel afeta suas propriedades físico-químicas, ou seja, diferentes matérias-primas podem resultar em diferentes composições de ésteres. As estruturas moleculares dos ésteres podem variar em relação à massa molecular, à quantidade e posição das insaturações e, até mesmo, à presença de grupamentos na cadeia (OLIVEIRA, 2012; KNOTHE, 2007). O biodiesel é produzido essencialmente por catálise homogênea básica, utilizando metanol como álcool. Para ser comercializado em território nacional, o biodiesel deve seguir

¹ Graduanda em Engenharia de Energia, Universidade de Brasília, neiva.nayara@gmail.com

² Farmacêutico, Universidade de Brasília, rodrigo.dutra@colaborador.embrapa.br

³ Química, doutora em Química, pesquisadora da Embrapa Agroenergia, itania.soares@embrapa.br

necessariamente as especificações que constam na Resolução nº 45 de 2014 regida pela ANP (AGÊNCIA NACIONAL DO PETRÓLEO, GÁS NATURAL E BIOCMBUSTÍVEIS, 2014).

Uma das especificações requeridas pela ANP está relacionada à estabilidade à oxidação do biodiesel, que deve ser igual ou superior ao período de 8 horas. A estabilidade oxidativa do biodiesel refere-se à tendência de o biocombustível reagir com o oxigênio do ar em temperaturas próximas à temperatura ambiente. Essa reação geralmente ocorre de forma lenta, porém é acelerada em altas temperaturas (GERPEN et al., 2004).

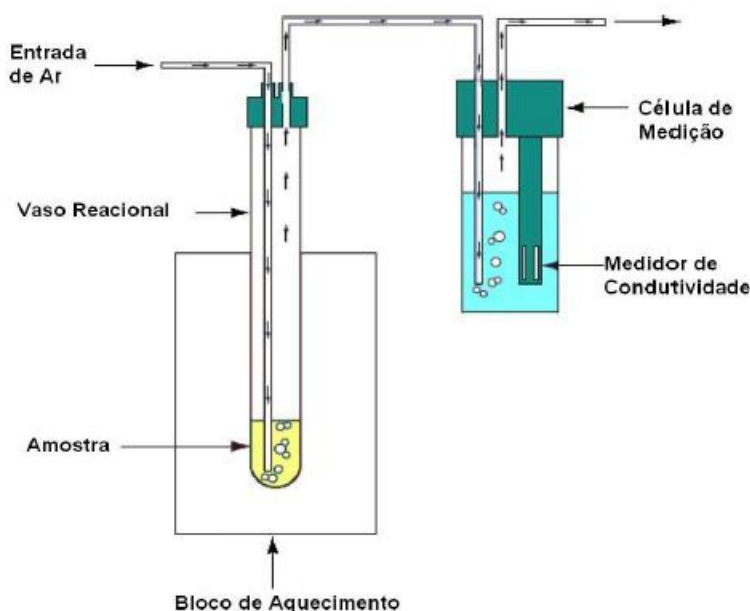


Figura 1. Esquema da análise de estabilidade à oxidação de biodiesel.

Fonte: (OLIVEIRA, 2012).

O ensaio de estabilidade oxidativa a 110 °C é uma análise que expõe o biodiesel a dois fatores que acabam por acelerar sua oxidação, sendo eles o aumento da temperatura e a intensa exposição ao ar. A partir desses fatores, mede-se o tempo que o combustível permanece estável perante a essas condições (OLIVEIRA, 2012). No método normatizado EN 14112 a oxidação é induzida pela passagem de uma corrente de ar a uma taxa de 10 L/h pela amostra

em análise a uma temperatura constante de 110 °C. Os vapores produzidos durante o processo de oxidação, juntamente com o ar, passam para a célula de medição de condutividade, a qual contém água deionizada. A Figura 1 elucida esse processo de aferição.

O término da análise acontece quando ocorre um rápido aumento da condutividade, apresentando assim um gráfico com ponto de inflexão evidente, o qual representa o período de indução máximo da amostra. Esse parâmetro está inversamente ligado ao grau de instauração dos ésteres presentes, sendo estes dependentes da matéria-prima que foi utilizada para produzir o biocombustível (KNOTHE, 2007). Sendo assim, esse trabalho tem por objetivo testar diferentes aditivos, a fim de que o biodiesel produzido via rota convencional atenda às especificações da Resolução nº45/2014 (AGÊNCIA NACIONAL DO PETRÓLEO, GÁS NATURAL E BIOCOMBUSTÍVEIS, 2014).

Materiais e métodos

Produção do biodiesel B100

A reação de transesterificação foi realizada em um sistema de refluxo contínuo, composto por agitador magnético com aquecimento, balão de fundo chato, barra magnética e condensador. A razão molar utilizada para a reação foi de 1:6 para o sistema óleo:álcool e a quantidade de catalisador (KOH) adicionada foi de 1% m/m em relação à massa de óleo de soja. O sistema foi mantido sob agitação constante por 1 hora, a uma temperatura de 60 °C. Os processos de lavagem e purificação foram conduzidos de acordo com Gerpen et al. (2004).

Aditivos

Com o intuito de avaliar a estabilidade à oxidação do biodiesel B100, foram testados 2 aditivos comerciais e um extrativo. A descrição detalhada assim como os nomes de cada aditivo não serão explicitados em respeito aos termos de confidencialidade da Embrapa Agroenergia. Sendo assim, no decorrer deste trabalho serão utilizados os termos Aditivo 1 para o extrativo e Aditivos 2 e 3, para os comerciais. As concentrações utilizadas dos aditivos variaram entre 3.000 ppm e 150 ppm. A definição da concentração a ser empregada com cada aditivo foi baseada no limite máximo permitido pela ANP (5.000 ppm) e em testes preliminares. Caso o período de indução obtido fosse superior ao período

especificado pela ANP, de 8 horas, a concentração de aditivo seria reduzida. O propósito da redução foi de encontrar a menor concentração que satisfizesse a Resolução nº 45/2014 da ANP (AGÊNCIA NACIONAL DO PETRÓLEO, GÁS NATURAL E BIOCOMBUSTÍVEIS, 2014).

Ensaio de estabilidade oxidativa

Os ensaios referentes à estabilidade à oxidação a 110 °C foram conduzidos com o equipamento Rancimat, modelo 743, da marca Metrohm, conforme norma europeia EN 14112.

Resultados e discussão

Biodiesel sem aditivos

Depois de produzir o biodiesel via rota convencional, foram realizados ensaios quanto a sua estabilidade oxidativa a fim de se obter um parâmetro inicial para posteriores comparações. Foram preparadas triplicatas correspondentes a 3 g de cada amostra de biodiesel puro (B100), conforme descrito no método EN 14112. A média de 0,60 horas obtida para o período de indução foi coerente com os valores reportados pela literatura para o biodiesel puro (OLIVEIRA, 2012).

Aditivo 1

Para iniciar os ensaios de estabilidade à oxidação com o Aditivo 1, foram utilizadas as concentrações de 3.000 ppm e 1.500 ppm no biodiesel puro (B100). Foram preparadas triplicatas correspondentes a 3 g de cada amostra e o aditivo, para obter as concentrações desejadas, conforme descrito no método EN 14112. O Aditivo 1 apresentou resultados insatisfatórios no que diz respeito ao período de indução para as duas concentrações testadas. As médias do período de indução encontradas foram de 1,97 h e 3,14 h para 1.500 ppm e 3.000 ppm, respectivamente. Considerando o limite de adição de 5.000 ppm e certo grau de linearidade no que diz respeito ao aumento da concentração de aditivo e consequente aumento do período de indução, não foram realizados outros ensaios com esse aditivo.

Aditivo 2

Para realizar os ensaios de estabilidade oxidativa com o Aditivo 2 foram utilizadas as mesmas concentrações do primeiro estudo com o Aditivo 1, 3.000 ppm e 1.500 ppm. Foram preparadas triplicatas correspondentes a 3 g de cada amostra e o aditivo, para obter as concentrações desejadas, conforme descrito no método EN 14112. Assim como o Aditivo 1, o Aditivo 2 apresentou resultados insatisfatórios no que diz respeito ao período de indução para as duas concentrações testadas. A média do período de indução para a concentração de 1.500 ppm foi de 1,76 horas, e para a de 3.000 ppm foi de 1,94 hora, muito abaixo do período especificado pela ANP. Pelos mesmos motivos explicitados para o Aditivo 1, não foram realizados outros ensaios com este aditivo.

Aditivo 3

Com o intuito de se obter a melhor concentração que satisfaça a resolução estabelecida pela ANP, estipularam-se as concentrações de 800 ppm e 3.000 ppm a serem aditivadas ao B100. Tais valores iniciais foram diferentes dos utilizados com os Aditivos 1 e 2 por já haverem estudos preliminares do Aditivo 3. Foram preparadas triplicatas correspondentes a 3 g de cada amostra e o aditivo, para obter as concentrações desejadas, conforme descrito no método EN 14112 .

A média do período de indução para as concentrações de 800 ppm e 3.000 ppm foram de 15,16 horas e 20,85 horas respectivamente. Tendo em vista que a média obtida para as duas concentrações testadas foi superior ao indicado na especificação brasileira, foram testadas concentrações mais baixas. Na Tabela 1, são apresentados todos os resultados obtidos, utilizando-se o Aditivo 3 com concentrações variando entre 150 ppm e 3.000 ppm.

Tabela 1. Resultados obtidos com diferentes concentrações do Aditivo 3.

Concentração (ppm)	R1 (h)	R2 (h)	R3 (h)	Média (h)	Desvio (h)
3.000	20,53	20,94	21,07	20,85	0,28
800	15,09	15,02	15,36	15,16	0,18
500	12,63	12,70	12,30	12,54	0,21
250	10,24	10,51	10,00	10,25	0,25
200	9,35	9,47	9,72	9,51	0,19
150	8,24	8,61	9,01	8,62	0,39

O resumo dos resultados obtidos com a utilização do Aditivo 3 encontra-se ilustrado na Figura 2, em que é possível observar a média dos períodos de indução para cada concentração.

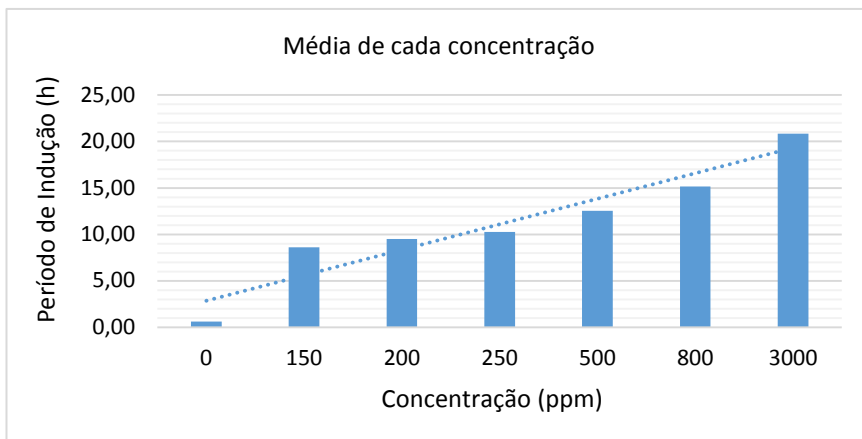


Figura 2. Média dos resultados obtidos em cada concentração analisada com o Aditivo 3.

Conclusões

A utilização dos Aditivos 1 e 2 não gerou resultados satisfatórios no que diz respeito à estabilidade à oxidação do biodiesel. O Aditivo 3 mostrou-se eficiente no que diz respeito ao período de indução obtido para concentrações acima de 150 ppm. É possível inferir da Figura 2 que a concentração de 150 ppm apresentou resultados bem próximos aos descritos na Resolução nº45/2014 da ANP (AGÊNCIA NACIONAL DO PETRÓLEO, GÁS NATURAL E BIOCOMBUSTÍVEIS, 2014), com uma média de 8,62 h. Considerando uma margem de segurança para aditivar o biodiesel, a concentração de 200 ppm do Aditivo 3 mostrou-se ideal, uma vez que é significativamente inferior ao valor de 5.000 ppm utilizado pela indústria e possui período de indução superior ao requerido pela norma brasileira.

Apoio financeiro

Este trabalho foi financiado pelo CNPq, projeto Biobom.

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 de agosto de 2014. Disponível em: <<https://www.legisweb.com.br/legislacao/?id=274064>>. Acesso em: jul. 2016.

EUROPEAN COMMITTEE FOR STANDARTIZATION. **EN 14112**: fat and oil derivates. Fatty acid methyl esters (FAME). Determination of oxidation stability (accelerated oxidation test). Berlin, 2003.

GERPEN, J. V.; SHANKS, B.; PRUSKO, R.; CLEMENTS, D.; KNOTHE, G. **Biodiesel production technology**. Golden: NREL, 2004. NREL/SR-510-36244.

KNOTHE, G. Some aspects of biodiesel oxidative stability. **Fuel Processing Technology**, Amsterdam, v. 88, n. 7, p. 669-677, 2007.

OLIVEIRA, E. M. S. de. Estudo de produção e caracterização de biodiesel produzido por transesterificação com catalisadores: tris-dodecilsulfato de cério(III), CeHUSY e KF/MgO. 2012. 109 f. Dissertação (mestrado) - Universidade de Brasília, Instituto de Química, Brasília, DF. Orientador: Silvia Cláudia Loureiro Dias.

Desenvolvimento de um processo verde de separação por estireno-divinilbenzeno para eliminar inibidores de fermentação do licor de pré-tratamento ácido

*Layanne Souza Guirra¹, Raquel Bombarda Campanha², Sílvio Vaz Júnior³,
Clenilson Martins Rodrigues⁴*

Resumo

A biomassa de plantas, como o bagaço de cana-de-açúcar, são constituídas, principalmente, de celulose, hemicelulose e lignina. Os açúcares presentes nas frações C6 (glicose) e C5 (xilose e arabinose) representam os substratos de maior interesse econômico. Para a disponibilização dos açúcares fermentescíveis, o bagaço de cana-de-açúcar requer etapas de pré-tratamento. Todavia, o pré-tratamento gera compostos inibidores de fermentação que se agrupam em três principais categorias: furano-aldeídos, ácidos alifáticos e compostos fenólicos. Este trabalho teve como objetivo a avaliação do potencial de uso da resina de estireno-divinilbenzeno na separação de furano-aldeídos e compostos fenólicos da fração dos açúcares em amostras de licores de pré-tratamento ácido do bagaço de cana-de-açúcar. Os resultados obtidos evidenciaram a separação da classe dos furano-aldeídos e compostos fenólicos da fração dos açúcares e não foram observadas perdas significativas dos analitos de interesse.

Introdução

Materiais lignocelulósicos, na forma de biomassa de plantas, como o bagaço de cana-de-açúcar, são constituídos, principalmente, de três componentes: celulose, hemicelulose e lignina. Os açúcares presentes nas frações celulósicas (glicose) e hemicelulósicas (xilose e arabinose) representam os substratos que possibilitam a conversão em produtos químicos de maior valor econômico (CANILHA et al., 2010). O aproveitamento do bagaço de cana-de-açúcar requer

¹ Graduanda em Ciências Ambientais, Universidade de Brasília, layanne.guirra@colaborador.embrapa.br

² Química, mestre em Engenharia e Ciência de Alimentos, analista da Embrapa Agroenergia, raquel.campanha@embrapa.br

³ Químico, doutor em Química Analítica, pesquisador da Embrapa Agroenergia, silvio.vaz@embrapa.br

⁴ Químico, doutor em Química, pesquisador da Embrapa Agroenergia, clenilson.rodrigues@embrapa.br

uma etapa de pré-tratamento para a disponibilização dos açúcares fermentescíveis. Entretanto, em decorrência das condições empregadas nos pré-tratamentos, uma série de compostos são gerados, dentre os quais, alguns podem atuar como inibidores potenciais do processo fermentativo. Os produtos de degradação dos açúcares e da lignina, que são inibidores da fermentação bem descritos, se agrupam em três categorias: derivados furânicos (furfural e 5-hidroxi-metilfurfural -HMF), ácidos orgânicos fracos (ácido fórmico e ácido acético) e compostos fenólicos (ácido cumárico e ácido ferúlico) (BETANCUR; PEREIRA, 2010).

Resinas de estireno-divinilbenzeno do tipo Amberlite[®] são esferas poliméricas utilizadas em procedimentos de separação cromatográfica, em virtude da sua porosidade, hidrofobicidade, alta área superficial e pureza. Essas resinas são também empregadas na obtenção de amostras em grande escala. A resina Amberlite[®] possui granulometria específica. Assim, aspectos como tamanho da partícula, superfície de contato, volume e diâmetro dos poros caracterizam cada tipo de resina XAD[®] comercial que pode ser empregada. Nesse sentido, há resinas XAD na forma de polímero orgânico não iônico, apolar e hidrofóbico, estável em ampla faixa de pH (SIGMA ALDRICH, 2016), o que se mostra bastante adequada para aplicação em amostras de licores de pré-tratamento de biomassa lignocelulósica.

Face à composição química do licor do bagaço de cana-de-açúcar, o objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial de uso da resina XAD na separação de furano-aldeídos e compostos fenólicos da fração dos açúcares.

Materiais e métodos

Utilizou-se neste estudo uma amostra-modelo de licor de bagaço de cana-de-açúcar, obtida por hidrólise ácida e identificada como Licor 1. Como controle, usou-se uma alíquota de 1 mL do Licor 1 diluída para o volume final de 5 mL e a amostra foi injetada no HPLC-RID-PDA. Pesou-se 50 g da resina Amberlite XAD[®] (Supelco) úmida em etanol e empacotou-a em uma coluna de vidro (100 cm × 2,5 cm). Para o procedimento de ativação e condicionamento da resina, utilizou-se etanol e H₂O, respectivamente. Posteriormente, inseriu-se 100 mL do Licor 1 na coluna de vidro empacotada com resina, seguido por 70 mL de H₂O, o efluente coletado foi denominado 1° eluato. Em seguida, aplicou-se 100 mL de etanol e obteve-se o 2° eluato.

Em seguida, o 1º eluato foi transferido para um balão volumétrico de 250 mL e o volume foi ajustado com H₂O Milli-Q. Transferiu-se o 2º eluato para o balão volumétrico de 100 mL e o volume foi ajustado com etanol. Após o ajuste do volume, uma alíquota de cada amostra foi filtrada em filtros do tipo Millex® com membrana de PVDF com 0,22 µm de poro e transferida para *vials* de 1,5 mL, sendo estes identificados segundo a sua respectiva quantidade de carga, tipo de eluato e metodologia correspondente. Posteriormente, alíquotas de 10 µL, de cada eluato, foram injetadas no HPLC-RID-PDA.

Amostras analisadas por HPLC-RID foram analisadas segundo as seguintes condições: açúcares, ácidos alifáticos e furano-aldeídos foram seletivamente separados em uma coluna Aminex HPX-87H; a temperatura da coluna foi configurada em 45 °C; o detector por índice de refração foi mantido a 45 °C; a fase móvel usada foi H₂SO₄ preparado com H₂O Milli-Q a 5 mM; a vazão empregada foi de 0,6 mL/min; o tempo total de cada análise foi de 60 minutos e o volume de injeção das amostras foi de 10 µL.

Amostras analisadas por UPLC-PDA foram analisadas segundo as seguintes condições: a composição fenólica e de furano-aldeídos foi analisada por meio de uma coluna Acquity UPLC® HSS T3 (150 x 2,1; 1,8 µm), sob um volume de injeção de 1 µL; fase móvel composta por ACN e TFA 0,05%; taxa de fluxo a 0,5 mL/min; temperatura do forno configurada em 40 °C; temperatura do detector em 40 °C e o tempo de execução foi de 11,36 minutos. Os cromatogramas foram analisados em 280 nm e 325 nm. Os picos foram caracterizados pela comparação do tempo de retenção e espectro UV com o respectivo padrão e pela coinjeção de amostra padrão e amostras legítimas.

Resultados e discussão

Os resultados obtidos a partir das análises qualitativas (perfil cromatográfico das amostras) e quantitativas (teor dos compostos químicos recuperados) por HPLC-RID-PDA apresentam a eluição majoritária dos açúcares e ácido acético no primeiro eluato, e os demais inibidores eluíram majoritariamente nas frações do segundo eluato.

Na Tabela 1, apresenta-se a quantificação e recuperação dos constituintes químicos presentes no licor. Evidencia-se que os açúcares permaneceram majoritariamente no 1º eluato. O 2º eluato reteve os furano-aldeídos e compostos fenólicos. Não foram observadas perdas significativas dos analitos de interesse,

uma vez que todos os açúcares apresentaram uma taxa de recuperação acima de 93%.

Tabela 1. Taxas de recuperação de açúcares, furano-aldeídos, ácidos alifáticos e compostos fenólicos após o processo de separação por Resina XAD-2.

Substâncias	Recuperação 1º eluato (%) ¹	Recuperação 2º eluato (%) ¹
Xilose	93.09	4.77
Glicose	93.73	4.61
Celobiose	95.46	5.38
Arabinose	95.88	5.09
Ácido acético	88.87	7.74
HMF	12,74	73,44
Furfural	21,63	60,29
Cumárico	3,04	81,69
Ferúlico	1,19	86,68

¹ Recuperação com base na amostra controle.

Conclusões

A utilização da técnica de extração em fase sólida com a resina Amberlite XAD pode ser uma boa estratégia empregada na eliminação de furano-aldeídos e compostos fenólicos do licor do bagaço de cana-de-açúcar, uma vez que os açúcares eluíram majoritariamente no primeiro eluato e não foram evidenciadas eluições significativas de compostos fenólicos e furano-aldeídos na fração dos açúcares. Infere-se que a utilização da resina na separação dos açúcares dos inibidores é viável, pois é uma técnica que possui menor custo econômico e propicia viabilidade de aumento de escala, o que pode permitir a avaliação de processos fermentativos durante a etapa de *downstream*.

Quanto à utilização de etanol e H₂O como solvente de eluição, representa um aspecto positivo ao ambiente, uma vez que são solventes de grande disponibilidade, atóxico, de baixo custo econômico e seu processo de produção é caracterizado como menos agressivo ao meio ambiente. A utilização do etanol garantirá que as frações do licor de bagaço de cana-de-açúcar não contenham traços de outros solventes apolares (como, por exemplo, a acetona, que é um solvente amplamente empregado em processos de separação cromatográfica) que podem ser tóxicos aos microrganismos durante o processo de fermentação.

Portanto, o uso de etanol e H₂O como solvente de eluição torna-se promissor nesse tipo de aplicação.

Apoio financeiro

Ao CNPq, pela bolsa PIBIC concedida. À Embrapa, pelo estágio realizado e pelo suporte à pesquisa.

Referências

CANILHA, L.; MILAGRES, A. M. F.; SILVA, S. S.; ALMEIDA E SILVA, J. B.; FELIPE, M. G. A.; ROCHA, G. J. M.; FERRAZ, A.; CARVALHO, W. Sacarificação da biomassa lignocelulósica através de pré-hidrólise ácida seguida por hidrólise enzimática: uma estratégia de “desconstrução” da fibra vegetal. **Revista Analytica**, São Paulo, v. 44, p. 48-54, 2010.

BETANCUR, G. J. V.; PEREIRA, J. Sugar cane bagasse as feedstock for second generation ethanol production. Part I: Diluted acid pretreatment optimization. **Electronic Journal of Biotechnology**, Valparaiso, v. 13, n. 3, 2010.

SIGMA ALDRICH. Amberlite XAD Polymeric Adsorbent. **Supelco**. Disponível em: <https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigmaaldrich/docs/Supelco/Product_Information_Sheet/4802.pdf>. Acesso em: 01 ago. 2016.

Análise da composição química de cinco variedades de capim-elefante por métodos diferentes

Carolina Assunção Lucas da Silva¹, Raquel Bombarda Campanha², Juarez Campolina Machado³, Patrícia Abrão Oliveira⁴

Resumo

O capim-elefante (*Pennisetum purpureum* Schum.) é uma gramínea considerada como uma alternativa sustentável para a produção de energia e biocombustíveis em razão da sua alta eficiência fotossintética (metabolismo C4), grande capacidade de acumulação de matéria seca e de fixação biológica de nitrogênio. Por ser uma forrageira, geralmente, o capim-elefante tem a sua composição química determinada por análise bromatológica. Para a produção de biocombustíveis, a composição química deve ser avaliada por métodos com maior exatidão. Dessa forma, o presente trabalho teve como objetivo avaliar os teores de celulose, hemicelulose e lignina de variedades de capim-elefante por análise bromatológica e pelo protocolo do National Renewable Energy Laboratory (NREL). As análises dos teores de celulose, hemicelulose e lignina resultaram em valores diferentes nos dois métodos avaliados. O método adotado pelo NREL apresentou maiores teores de lignina e menores de celulose e hemicelulose do que aqueles obtidos na análise bromatológica.

Introdução

O capim-elefante (*Pennisetum purpureum* Schum.) é uma forrageira tradicionalmente utilizada na alimentação de rebanhos leiteiros, sob a forma de capineira e, em menor escala, como forragem conservada. É uma gramínea que apresenta grande capacidade de acumulação de matéria seca e composição bromatológica adequada para alimentação animal, com um percentual de fibra elevado (QUESADA et al., 2004).

¹ Graduanda em Farmácia, Universidade de Brasília, carolina.als94@gmail.com

² Química, mestre em Engenharia e Ciência de Alimentos, analista da Embrapa Agroenergia, raquel.campanha@embrapa.br

³ Engenheiro-agrônomo, doutor em Genética e Melhoramento, pesquisador da Embrapa Gado de Leite, juarez.machado@embrapa.br

⁴ Farmacêutica bioquímica, doutora em Química, pesquisadora da Embrapa Agroenergia, patricia.oliveira@embrapa.br

Atualmente, o aumento da demanda energética mundial tem exigido o desenvolvimento de processos economicamente viáveis. Dessa forma, o aproveitamento de biomassa lignocelulósica tem se tornado de grande relevância. Os principais usos da biomassa como insumo energético são: a produção de energia térmica (carvão vegetal, lenha e resíduos agroflorestais), produção de energia mecânica (álcool combustível e bio-óleos) e produção de energia elétrica (combustão direta, gaseificação e queima de gases). Em todos os casos, o capim-elefante é considerado como uma alternativa sustentável, em razão da sua alta eficiência fotossintética (metabolismo C4), grande capacidade de acumulação de matéria seca e de fixação biológica de nitrogênio; além de suas propriedades químicas (ANDERSON et al., 2008; MORAIS et al., 2009).

As análises de composição química com foco em nutrição, ou seja, bromatológicas, são fundamentais quando o objetivo é avaliar a qualidade de alimentos e rações animais. A quantificação dos componentes presentes nas gramíneas possibilita a produção de rações mais eficientes e racionaliza a utilização de recursos (NOGUEIRA; SOUZA, 2005). Para a análise da composição química de biomassas lignocelulósicas para a produção de bioenergia, há a necessidade de métodos com maior exatidão e com mais informações a respeito da parede celular e de outros constituintes da biomassa. Dessa forma, o objetivo deste trabalho é comparar os principais métodos de análise quantitativa de celulose, hemicelulose e lignina em diferentes variedades de capim-elefante.

Materiais e métodos

Amostras de cinco variedades de capim-elefante (Tabela 1) coletadas no banco de germoplasma da Embrapa Gado de Leite foram secas em temperatura ambiente e trituradas em moinho de facas tipo Wiley.

Tabela 1. Variedades de capim-elefante analisadas.

Variedades
Três Rios
Pusa Napier n° 2
Merkeron de Pinda
Taiwan A-144
Elefante da Colômbia

As amostras de capim-elefante foram analisadas em relação aos teores de fibra em detergente neutro (FDN), fibra em detergente ácido (FDA), hemicelulose (HCEL), celulose (CEL), lignina (LDA), segundo técnicas descritas no Manual de Laboratórios (NOGUEIRA; SOUZA, 2005): solo, água, nutrição vegetal, nutrição animal e alimentos. As mesmas amostras de capim-elefante foram analisadas em relação aos teores de carboidratos estruturais e lignina de acordo com o protocolo do National Renewable Energy Laboratory (NREL) (SLUITER et al., 2008). Para a determinação de celulose, foi considerado o teor de glucana, e, para hemicelulose, foi considerada a soma de xilana, arabinana e grupos acetil. Todas as análises foram realizadas em duplicata. A diferença entre as médias foi estatisticamente avaliada pelo software Excel usando o teste *t* Student ($p < 0,05$).

Resultados e discussão

A determinação dos teores de carboidratos estruturais e lignina pelo método do NREL consiste basicamente na hidrólise do material com ácido sulfúrico 72%, que posteriormente é colocado em um banho termostático a 30 °C por 1 hora. O material sólido resultante é denominado lignina Klason ou lignina insolúvel. Na fração líquida, são determinados os teores de lignina solúvel por espectrofotometria em 240 nm e o teor dos carboidratos estruturais (CE) é determinado por cromatografia líquida com detecção por índice de refração.

Já a análise bromatológica de determinação de fibra em detergente neutro (FDN) consegue aferir o componente fibroso da biomassa (hemicelulose, celulose e lignina) por gravimetria. Após a análise de FDN, é realizada a determinação de fibra em detergente ácido (FDA), que são a celulose e lignina. Após a obtenção de FDA, há uma última etapa de hidrólise em ácido sulfúrico 72%, em que é obtido um resíduo sólido final constituído de lignina. Nessa etapa final, a lignina solúvel em ácido não é medida, como ocorre no método NREL.

Os valores descritos na literatura sobre a composição química de biomassa lignocelulósica varia em função do tipo de biomassa e normalmente apresenta 35-50% de celulose, seguido de 20-35% de hemicelulose, 10-25% de lignina e uma pequena quantidade de cinzas e extrativos (SANTOS et al., 2012).

Os resultados apresentados na Tabela 2 mostram que os valores obtidos para as cinco variedades de capim-elefante nas análises bromatológicas e pelo método do NREL se encontram dentro da faixa esperada para biomassas lignocelulósicas, porém, não podem ser considerados equivalentes. Os valores

encontrados para cada uma das cinco espécies em replicatas biológicas pelo método do NREL foram uma média de 37,2 para glucana, 13,49 para xilana, 2,65 para arabinana e 3,09 para grupos acetil da variedade Elefante da Colômbia. A variedade Três Rios apresentou uma média de 35,5 de glucana, 13,04 de xilana, 2,66 de arabinana e 3,24 de acetil. Os valores encontrados para a variedade Pusa Napier nº 2 foram 37,73 de glucana, 13,80 de xilana, 2,58 de arabinana e 3,61 de acetil. O capim-elefante da variedade Merkeron de Pinda apresentou os seguintes valores: 37,08; 13,03; 2,50 e 3,36, respectivamente, para glucana, xilana, arabinana e acetil. A outra variedade analisada, Taiwan A-144, apresentou em média os seguintes valores: 37,57 para glucana, 14,14 para xilana, 2,82 para arabinana e 3,60 para grupos acetil.

Tabela 2. Valores, em base seca, de celulose, hemicelulose e lignina de cinco variedades de capim-elefante.

Método*	Cel	Hcel	Lig
Bromatológico	41,51±0,67 ^a	27,16±0,10 ^a	10,22±0,23 ^a
NREL	37,18±1,08 ^b	19,47±0,85 ^b	23,53±1,03 ^b

*Cada valor representa a média de duas determinações de cinco amostras com o respectivo desvio padrão. Valores seguidos pela mesma letra na mesma coluna não diferem significativamente pelo teste t de Student ($p < 0,05$).

A principal diferença nos resultados se refere ao teor de lignina, pois o teor encontrado pelo método do NREL é quase o dobro que o obtido na análise bromatológica (Tabela 2). A análise do teor de lignina é considerada de grande dificuldade em termos de exatidão, em decorrência da complexidade inerente à parede celular de gramíneas. Existem vários métodos para quantificação de lignina (Klason, lignina detergente ácido, brometo de acetila, tioglicocato, etc.), mas ainda não há um método não invasivo, rápido, que permita uma análise de grande número de amostras na rotina e que produza resultados exatos.

O teor de lignina encontrado pelo método do NREL é um valor relativamente alto, porém nesse valor está incluída a lignina que foi solubilizada pelo ácido e determinada por espectrofotometria a 240 nm. Neste resultado, a possibilidade de interferência da celulose não hidrolisada estar aumentando o valor de lignina obtido é mínima, pois a formação de celobiose é monitorada por cromatografia durante a análise de carboidratos estruturais. O teor subestimado para a lignina

na análise bromatológica se deve ao fato de a lignina solúvel não ser quantificada e, portanto, não há como medir a extensão dessa solubilização.

Como os valores de celulose, hemicelulose e lignina na análise bromatológica são estimados por cálculos a partir de FDN, FDA e LDA, o valor subestimado de lignina irá influenciar diretamente no teor de celulose que ficará aumentado.

Os teores discrepantes de hemicelulose se devem à diferença de métodos, no método do NREL, o teor de hemicelulose é obtido a partir da análise cromatográfica de carboidratos estruturais e, na análise bromatológica, a partir da determinação de FDN e FDA (FDN menos FDA). Pela análise cromatográfica de carboidratos estruturais, obtém-se os constituintes da parede celular e uma parte sofre degradação. Nessa etapa, pode-se fazer a correção com um padrão de carboidratos que são hidrolisados nas mesmas condições, pelos produtos de degradação (furfural e hidroximetilfurfural) ou optar pela não correção, como foi realizado neste trabalho. De qualquer forma, os valores encontrados no método do Nrel são sempre estimados de acordo com os constituintes da parede celular, fornecendo um valor mais correto da hemicelulose para análise de biomassa lignocelulósica para produção de energia, enquanto na análise bromatológica são estimados pelos cálculos de FDN, FDA e LDA.

Conclusões

Apesar das diferenças encontradas, a análise bromatológica é de grande utilidade na rotina de laboratórios de nutrição animal, pois é um método de boa precisão e permite avaliar grande número de amostras simultaneamente. Considerando-se a análise de biomassa lignocelulósica para produção de energia e bicomcombustíveis, apesar de serem dispendiosos e de execução lenta, os protocolos do NREL são aceitos internacionalmente e produzem resultados com melhor exatidão. Tendo em vista que, atualmente, a demanda energética mundial aumentou e que tem sido necessário o desenvolvimento de obtenção de energia de forma sustentável, acredita-se que o protocolo do NREL é adequado para essas análises voltadas para a produção de energia e bicomcombustíveis e espera-se que num futuro próximo seja possível criar condições favoráveis para uma execução mais rápida do método, otimizando o processo.

Apoio financeiro

Este trabalho foi financiado pela Embrapa.

Referências

ANDERSON, W.; CASLER, M.; BALDWIN, B. Improvement of perennial forage species as feedstock for bioenergy. In: VERMERRIS, W. (Ed.). **Genetic improvement of bioenergy crops**. New Delhi: Springer, 2008. p. 308-345.

MORAIS, R. F. de; SOUZA, B. J. de; LEITE, J. M.; SOARES, L. H. de B.; ALVES, B. J. R.; BODDEY, R. M.; URQUIAGA, S. Elephant grass genotypes for bioenergy production by direct biomass combustion. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 44, n. 2, p. 133-140, 2009.

NOGUEIRA, A. R. de A.; SOUZA, G. B. de. (Ed.). **Manual de laboratórios: solo, água, nutrição vegetal, nutrição animal e alimentos**. São Carlos, SP: Embrapa Pecuária Sudeste, 2005.

QUESADA, D. M.; BODDEY, R. M.; REIS, V. M.; URQUIAGA, S. Parâmetros qualitativos de genótipos de capim elefante (*Pennisetum purpureum* Schum.) estudados para a produção de energia através da biomassa. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 2004. 4 p. (Embrapa Agrobiologia. Circular técnica, 8).

RODRIGUES, R. C. **Métodos de análises bromatológicas de alimentos: métodos físicos, químicos e bromatológicos**. Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2010. (Embrapa Clima Temperado. Documentos, 306).

SANTOS, F. A.; QUEIRÓZ, J. H.; COLODETTE, J. L.; FERNANDES, S. A.; GUIMARÃES, V. M.; REZENDE, S. T. Potencial da palha de cana-de-açúcar para produção de etanol. **Química Nova**, São Paulo, v. 35, n. 5, p. 1004-1010, 2012.

SLUITER, A.; HAMES, B.; RUIZ, R.; SCARLATA, C.; SLUITER, J.; TEMPLETON, D.; CROCKER, D. **Determination of structural carbohydrates and lignin in biomass: Laboratory Analytical Procedure (LAP)**. Golden: National Renewable Energy Laboratory, 2008. Technical Report - NREL/TP-510-42618.

Caracterização química e física de resíduos industriais de dendê tenera e híbrido manicoré

Larissa Silva Fonseca¹, Raquel Bombarda Campanha², Marcos Enê Chaves Oliveira³, Simone Mendonça⁴

Resumo

A produção do dendê tem aumentado no Brasil, sendo que o estado do Pará concentra a maior parte da sua produção e processamento. O objetivo do trabalho foi caracterizar e comparar os resíduos gerados em diferentes indústrias, épocas do ano, e origens para, então, apontar possíveis usos deste resíduo agroindustrial. Diferentes lotes de fibras de prensagem e efluente líquido (POME – *Palm oil mil efluente*) gerados do processamento do dendê (*Elaeis guineensis*) variedade tenera ou do híbrido interespecífico (*Elaeis guineensis* x *Elaeis oleifera*) BRS Manicoré, originária de duas empresas, foram comparados. As fibras de dendê híbrido apresentaram maior variação na composição que as de dendê tenera. Não existe um padrão na distribuição de tamanho de partícula das fibras, variando muito entre as amostras analisadas. As fibras possuem alta umidade (31,2 a 34,2%) necessitando de rápido processamento para que não ocorra multiplicação de microrganismos, e também relevante teor residual de extrato etéreo (em torno de 9,1–11,8% em base seca), indicando potencial para melhoria nos processos e/ou oportunidade para utilização desta fibra para extração de substâncias lipossolúveis. No POME, a composição foi mais influenciada pelo local de processamento (empresa) que pela sazonalidade ou origem genética da matéria-prima. O alto teor de sólidos e principalmente matérias graxas indicam a importância de tratamentos adequados para minorar os impactos ambientais, tais como a produção de biogás ou cultivo de microalgas.

¹ Graduanda em Farmácia, Universidade de Brasília, larissa.fonseca@colaborador.embrapa.br

² Química, mestre em Engenharia e Ciência de Alimentos, analista da Embrapa Agroenergia, raquel.campanha@embrapa.br

³ Engenheiro Químico, doutor em Engenharia Mecânica, pesquisador da Embrapa Amazônia Oriental, marcos-ene.oliveira@embrapa.br

⁴ Farmacêutica, doutora em Saúde Pública, Universidade de São Paulo, pesquisadora da Embrapa Agroenergia, simone.mendonca@embrapa.br

Introdução

A demanda mundial pelo óleo de dendê aumentou 167% entre 1998 e 2010. O dendê é a oleaginosa cultivada de maior produtividade, com rendimento de até 4 a 6 ton de óleo por hectare/ano. Grande parte desta produtividade deve-se ao fato dos investimentos em melhoramento genético que resultou no aumento de 300% na produtividade média desta espécie. Dois óleos são extraídos desta palmeira, o óleo de palmiste, extraído da amêndoa e óleo de palma, extraído da polpa que se caracteriza pela cor que vai do amarelo ao vermelho devido à presença de grande quantidade de carotenoides, que são pigmentos com propriedades antioxidantes. Existem duas espécies no gênero *Elaeis* de interesse econômico: *E. guineensis* e *E. oleifera*, originárias da África e da América do Sul, respectivamente. A Embrapa, fazendo uso da hibridação interespecífica entre o caiaué (*E. oleifera*) e o dendê de origem africana (*E. guineensis*) desenvolveu o híbrido BRS Manicoré, cultivar tão produtiva quanto à de dendê *guineensis* e com características do caiaué, como baixo porte e resistência à anomalia do amarelecimento fatal. Seu óleo apresenta maiores teores de ácidos graxos insaturados e metabólitos bioativos como carotenoides, tocoferóis e tocotrienóis, os quais possuem importante poder antioxidante.

O aumento da demanda por óleo de palma, resultará em maior geração de resíduos desta indústria. A extração do óleo de dendê gera diversos subprodutos, como cachos, fibra de prensagem, torta de palmiste, entre outros. A incorporação desses subprodutos como ingredientes na ração de ruminantes têm sido estudada, mas outras aplicações podem ser sugeridas a partir da melhor caracterização deste material. A fibra, conhecida também como torta de dendê, é o resíduo da prensagem do mesocarpo de dendê. O POME (palm oil mill effluent) é uma suspensão coloidal composta principalmente de água, resultante do processo de separação do óleo de dendê. Devido à crescente preocupação mundial com o meio ambiente, estudos visando o aproveitamento desses resíduos se tornam essenciais para uma economia sustentável.

Ainda não existem estudos caracterizando os resíduos do híbrido interespecífico, o que seria um importante passo para indicar possíveis usos para agregação de valor a este resíduo agroindustrial. Assim, o objetivo deste trabalho foi caracterizar e comparar as diferentes fibras de prensagem oriunda do processamento do híbrido BRS Manicoré com aquelas oriundas do dendê tenera (*Elaeis guineensis*), provenientes de duas unidades de processamento.

Materiais e métodos

Foram analisados três diferentes lotes da fibra de dendê híbrido (FDH), coletado na empresa X, localizada na região metropolitana de Belém-PA, sendo o lote 1 em março/2015, o lote 2 em agosto/2015 e lote 3 em março/2016; e dois lotes da fibra de dendê tenera/guineensis (FDG) coletadas também na empresa X, em março/2016 e maio/2016. Uma alíquota foi utilizada para a determinação de umidade – amostra seca ao (ASA) e granulometria. O restante do material foi seco em estufa com circulação e renovação de ar durante 5 dias a temperatura ambiente e posteriormente moídas em moinho de facas tipo Willye (STAR FT-60, Fortinox). A determinação da granulometria consistiu no fracionamento da amostra utilizando peneiras com malhas de 2,0, 0,85, 0,425, 0,30, 0,15 mm de abertura, com agitação mecânica por 10 minutos. As análises da fibra quanto ao teor de matéria seca (MS), cinzas, extrato etéreo (EE) e proteína bruta (PB). A partir dos teores de fibra em detergente neutro (FDN), fibra em detergente ácido (FDA), e lignina (LIG) foram calculados os valores de hemicelulose (HCEL) e celulose (CEL) (NOGUEIRA et al., 2005).

Dois lotes do POME oriundos da empresa X, um de dendê híbrido e outro de dendê guineensis, foram coletados em março/2016; e um lote de dendê guineensis da empresa Y, distante 120 km de Belém-PA foi coletado em novembro/2015. Estas amostras foram analisadas quanto ao teor de sólidos totais, sólidos solúveis e sólidos suspensos de acordo com metodologia empregada na análise de efluentes industriais (Métodos 2540B e 2540D – APHA, 1999). Uma alíquota do material foi liofilizada e teve o teor de cinzas (NOGUEIRA et al., 2005) e o teor de extrato etéreo (AMERICAN OIL CHEMISTS' SOCIETY, 2005) (Method Am5-04) determinados.

Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias de todas as amostras de fibra comparadas entre si por teste de Tukey a 5% de probabilidade, e a comparação por teste T quando se comparou o conjunto de fibras de dendê híbrido contra as de dendê tenera (*Elaeis guineensis*). Foi utilizado o software Excel 2010.

Resultados e discussão

As amostras de fibra de dendê foram recebidas com umidade (ASA) variando entre 31,2 e 34,16%, evidenciando a necessidade da pré-secagem deste resíduo para adequado armazenamento. Apenas as amostras com menos de 10% de

umidade são estáveis suficientes para serem armazenadas à temperatura ambiente.

A distribuição granulométrica (em porcentagem de cada fração) das amostras de fibra está apresentada na Tabela 1. Houve grande variação de distribuição do tamanho de fibras entre os lotes avaliados. A maior parte do material (36 a 63%) era composta por fibras bem alongadas, que formavam novelos e acumulavam na peneira com 2 mm de abertura. Outra parte do material (15 a 37%) apresentou granulometria média entre 2 e 0,425 mm; e uma última fração foi composta basicamente por um pó muito fino, menor que 0,425 mm, representando 19 a 35% do material.

Os resultados de cinzas, extrato etéreo, proteína, fibra em detergente neutro e fibra em detergente ácido estão apresentados na Tabela 2. Foram realizados dois testes de comparação de médias, Tukey (comparação das 3 fibras de híbrido entre si) e teste T (comparação da média dos resultados do dendê híbrido x dendê guineensis).

Tabela 1. Distribuição percentual das fibras de dendê híbrido e guineensis de acordo com a granulometria.

Amostra	%Grossa	%Média	%Fina
FDH - Lote 1 (março2015)	61	20	19
FDH - Lote 2 (agosto2015)	38	37	25
FDH - Lote 3 (março2016)	57	23	19
FDG - Lote 1 (março2016)	63	15	22
FDG - Lote 2 (maio2016)	36	29	35

FDH: fibra de dendê híbrido, FDG: fibra de dendê guineensis.

Médias seguidas da mesma letra minúscula e maiúscula na coluna, indicam semelhança estatística entre os lotes e as fibras, respectivamente. FDH: fibra de dendê híbrido; FDG: fibra de dendê guineenses.

A comparação dos diferentes lotes de fibra de prensagem do dendê híbrido mostrou que o segundo e o terceiro lote podem ser considerados semelhantes quanto aos resultados de cinzas, extrato etéreo, proteína e FDN. O resultado de lignina variou de 22,69 a 25,21%, sendo que o primeiro e o terceiro lote são semelhantes. Na comparação das fibras do dendê híbrido e a fibra do dendê

guineense, quanto a sua composição, observou-se que o extrato etéreo, proteína, FDN, celulose e hemicelulose são semelhantes estatisticamente.

Tabela 2. Composição das fibras de prensagem de dendê híbrido e guineensis.

Amostras	Cinzas (%)	Extrato Etéreo (%)	FDN (%)	FDA (%)	Lignina (%)	Proteína (%)	Celulose (%)	Hemicelulose (%)
FDH - Lote 1	3,26± 0,09 ^b	6,09± 0,03 ^b	78,78± 0,34 ^a	56,17± 0,37 ^a	22,69± 0,29 ^b	5,19± 0,27 ^b	45,49± 1,00 ^a	21,75± 1,09 ^a
FDH - Lote 2	5,23± 0,16 ^a	11,24± 0,12 ^a	70,14± 0,86 ^b	56,10± 0,62 ^a	25,21± 0,47 ^a	7,78± 0,35 ^a	35,64± 0,85 ^b	12,98± 2,93 ^b
FDH - Lote 3	5,90± 0,31 ^a	9,86± 0,11 ^a	70,26± 0,52 ^b	52,16± 0,32 ^b	23,90± 0,63 ^b	8,41± 0,02 ^a	25,04± 0,74 ^c	18,10± 0,25 ^a
Média	4,86± 1,15 ^B	9,06± 2,18 ^A	72,66± 4,23 ^A	54,65± 2,12 ^A	23,91± 1,20 ^A	7,78± 1,55 ^A	35,39± 8,89 ^A	17,61± 4,12 ^A
	FDG - Lote 1	6,05± 0,03 ^a	10,96± 0,33 ^b	74,87± 0,52 ^a	51,99± 0,71 ^a	20,39± 0,01 ^a	6,57± 0,13 ^b	27,77± 0,63 ^a
FDG - Lote 2	6,23± 0,15 ^a	11,80± 0,21 ^a	71,95± 0,83 ^b	51,75± 0,80 ^a	18,95± 1,16 ^a	8,69± 0,22 ^a	29,47± 1,25 ^a	19,82± 0,17 ^b
Média	6,16± 0,16 ^A	11,38± 0,55 ^A	72,22± 1,96 ^A	51,55± 0,84 ^B	19,67± 1,26 ^B	7,84± 1,18 ^A	28,62± 1,29 ^A	21,35± 1,90 ^A

O teor de extrato etéreo para as amostras foi de 9,1 a 11,8% (com exceção do Lote 1, que apresentou 6,1%), indicando boa eficiência na extração de óleo pela indústria, uma vez que inicialmente o mesocarpo pode apresentar até 70% de extrato etéreo em base seca. No entanto, ainda há espaço para melhorias no processo, uma vez que na literatura geralmente são relatados teores em torno de 6%.

Os teores de proteína mostraram-se semelhantes aos valores relatados por Fariani et al. (2015) (5,20%), assim como os valores de celulose (22,50%). Porém, os valores encontrados por Fariani et al. (2015) para FDN (43,40%), FDA (36,30%), lignina (9,2%) e hemicelulose (7,10%) foram bem diferentes. Segundo Thambirajah e Kuthubutheen (1989), a fibra de prensagem do dendê apresenta valores altos para fibra (78%) e aproximadamente 22% de lignina, aproximando-se mais dos resultados encontrados neste trabalho. Essa diferença pode estar relacionada com diversos fatores, como a variedade do dendê, método de extração do óleo e sazonalidade.

O terceiro lote da fibra de dendê híbrido apresentou 25,04% de celulose e a fibra de dendê guineensis apresentou em média 28,62% de celulose. Teores de celulose e hemicelulose variaram entre os diferentes lotes de dendê híbrido analisados, indicando que materiais desta origem genética ainda apresentam grande variação na composição. As fibras de dendê guineensis, mesmo sendo originários de empresas diferentes, não apresentaram a mesma amplitude de variação. Em relação à sazonalidade, os únicos parâmetros que parecem ter sido afetados foram os teores de lignina e hemicelulose, sendo que a lignina é maior que a hemicelulose nos meses mais chuvosos (março).

A determinação da concentração de sólidos totais no POME envolve todos os compostos particulados e dissolvidos como metais, sais inorgânicos, óleos e graxas e matéria orgânica presentes no efluente. Óleos e graxas consistem no conjunto de substâncias que um determinado solvente consegue extrair da amostra e que não se volatilizam durante a evaporação do solvente a 100 °C. É importante parâmetro nos efluentes, uma vez que sua alta concentração nas águas naturais poderia causar seu acúmulo nas superfícies, podendo trazer sérios problemas ecológicos por dificultar as trocas gasosas que ocorrem entre a massa líquida e a atmosfera, especialmente a de oxigênio. No presente trabalho, o teor de graxas foi calculado a partir do resultado de extrato etéreo determinado no POME liofilizado e do teor de sólidos totais.

Tabela 3. Composição do Pome.

Amostras	Sólidos Totais (mg/L)	Sólidos Suspensos (mg/L)	Sólidos Solúveis (mg/L)	Cinzas (%)	Extrato Etéreo (%)	Matéria Graxa (mg/L)	pH
Lote 1 - Híbrido	130.140± 9.051 ^a	76.333± 7.178 ^a	53.473± 2.303 ^a	4,38± 0,08 ^c	33,06± 0,58 ^b	43.024,30	4,87
Lote 2 - Guineensis	126.970± 13.506 ^a	85.800± 6.147 ^a	46.233± 3.590 ^a	6,04± 0,06 ^b	46,31± 1,00 ^a	58.799,80	4,76
Lote 3 - Guineensis	81.680± 57 ^b	12.160± 4.024 ^b	58.200± 7.201 ^a	15,97 ± 0,04 ^a	18,15± 0,55 ^c	14.824,90	4,76

*Média ± desvio padrão

**Letras diferentes indicam médias diferentes ($p < 0,05$).

O local de coleta (empresa) foi o fator que mais impactou nas diferenças de composição do POME. A origem genética do material parece não ter sido um fator relevante nos parâmetros analisados.

Como mostrado na Tabela 3, lote 2 foi o que apresentou maior teor de sólidos suspensos, extrato etéreo e matéria graxa. De acordo com Rupani e colaboradores (2010), o POME fresco apresenta pH ácido (entre 4 e 5), alta concentração de matéria orgânica, alto teor de sólidos totais (40.500 mg L^{-1}), óleo e graxa (4.000 mg L^{-1}), sólidos suspensos (18.000 mg L^{-1}). Todos os lotes diferiram dos valores encontrados na literatura, sendo que o lote 3 do POME apresentou os valores mais próximos.

Conclusões

As fibras de híbrido de dendê apresentaram maiores variações quanto à granulometria e à composição bromatológica quando comparada à fibra de dendê guineenses. Em relação à sazonalidade, houve pequena influência na composição do dendê híbrido, sendo o teor de lignina maior e o teor de hemicelulose menor nos meses mais chuvosos (março). A composição do POME é mais afetada pelas condições de processamento do que pela origem genética e época de coleta.

Apoio Financeiro

Esse trabalho foi financiado pela FINEP.

Referências

AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. **Standard methods for the examination of water and wastewater**: selected analytical methods approved and cited by the United States Environmental Protection Agency. Washington, D.C; American Water Works Association : Water Pollution Control Federation, 1999.

AMERICAN OIL CHEMISTS' SOCIETY. **Official Methods and recommended practices of the AOCS**. Champaign, IL: AOCS, 2005.

FARIANI, A.; ABRAR, A.; MUSLIM, G.; WARLY, L. Supplementation of fermented palm press fibre on digestibility of rice straw and rumen bacteria profile. **Pakistan Journal of Nutrition**, Punjab, v. 14, n. 2, p. 80-83, 2015.

NOGUEIRA, A. R. A.; SOUZA, G. B. de. **Manual de laboratório**: solo, água, nutrição vegetal, nutrição animal e alimentos. São Carlos: Embrapa Pecuária Sudeste, 2005. p. 201-329.

RUPANI, P. F.; SINGH, R. P.; IBRAHIM, M. H.; ESA, N. Review of current palm oil mill effluent (pome) treatment methods: vermicomposting as a sustainable practice. **World Applied Sciences Journal**, Faisalabad, v. 11, n. 1, p. 70-81, 2010.

THAMBIRAJAH, J. J.; KUTHUBUTHEEN, A. J. Composting of palm press fibre. **Biological Wastes**, Oxon, v. 27, n. 4, p. 257-269, 1989.

Avaliação da eficiência de obtenção de extratos e de metabólitos polares de *Crambe abyssinica* com o uso de solventes quimicamente limpos

Rodrigo Wesley Nascimento de Melo¹, Mauro Vicentini Correia², Patrícia Pinto Kalil Gonçalves Costa³, Clenilson Martins Rodrigues⁴

Resumo

Crambe abyssinica é uma planta oleaginosa pertencente à família *Brassicaceae*, nativa da região Mediterrânea, que ocorre principalmente nos locais de clima quente-temperado da Etiópia com moderada pluviosidade. É uma cultura de fácil adaptação nas regiões mais frias e secas, tendo alguns cultivos comerciais no Brasil. O crambe tem sido classificado como matéria-prima promissora para extração de óleo não alimentar que pode ser empregado na produção de biodiesel. O material de prensagem das sementes de crambe apresenta alto teor proteico, mas, em decorrência da toxicidade de algumas classes de substâncias pertencentes na sua composição, não pode ser utilizado como suplemento alimentar na dieta de animais. Por outro lado, esse material apresenta rica composição química, com metabólitos que podem apresentar aplicações variadas, em virtude das atividades biológicas de alguns desses compostos químicos. Dessa forma, visando agregar valor à cultura do *C. abyssinica*, este trabalho teve como objetivo avaliar diferentes processos de extração das sementes de crambe, com uso de solventes quimicamente limpos, como água e etanol, para obter o máximo de rendimento dos extratos obtidos, bem como do teor dos compostos químicos majoritários de interesse.

Introdução

As sementes de crambe (*Crambe abyssinica*) vêm sendo objeto de estudos pelo fato de apresentar grande potencial como matéria-prima para a produção do

¹ Graduando em Química, Universidade Católica de Brasília, rodrigo.melo@colaborador.embrapa.br

² Farmacêutico, doutor em Química, Universidade de São Paulo, mauro.correia@colaborador.embrapa.br

³ Química, mestre em Química Orgânica, analista da Embrapa Agroenergia, patricia.costa@embrapa.br

⁴ Químico, doutor em Química, pesquisador da Embrapa Agroenergia, clenilson.rodrigues@embrapa.br

biodiesel (FALASCA et al., 2010), além de fornecer outros compostos químicos que apresentam inúmeras atividades biológicas, tais como: antibactericida, anticancerígenas, inseticida e herbicida (VIG et al., 2009).

O crambe é oriundo da região Mediterrânea e ocorre principalmente nos locais de clima quente-temperado da Etiópia com moderada pluviosidade. Essa cultura vem sendo adaptada ao clima brasileiro com facilidade, podendo ser cultivado tanto em clima mais frio, como no Sul do País, como em lugares mais quentes e secos, como no Centro-Oeste. Outra vantagem dessa cultura é que o seu plantio ocorre entre abril e maio e não coincide com o período da safra da soja (FALASCA et al., 2010).

O material resultante do processamento das sementes de crambe apresenta elevada quantidade de proteínas, o que a tornaria excelente matéria-prima para nutrição animal. Entretanto, por conta da alta toxicidade de algumas classes de substâncias, o uso para suplementação animal é inviabilizado (ATABANI et al., 2013).

Em decorrência da importância biológica dos metabólitos de crambe e dos seus produtos de hidrólise, é necessário quantificar esses compostos químicos nas sementes. No entanto, existem inúmeras barreiras que precisam ser superadas para conseguir avaliar esses materiais de forma quantitativa. A principal delas é a ausência de padrões comerciais. Há também dificuldades em se obter todos os produtos da hidrólise enzimática. As estratégias mais comuns são a realização da quantificação relativa em caso de ausência de padrões e a quantificação específica quando há padrões comerciais ou quando é viável isolar esses componentes e usá-los como padrões na etapa de calibração (KONG et al., 2012). Dessa forma, seria possível estabelecer quais compostos são os responsáveis pelas atividades biológicas citadas na literatura.

Outro grande entrave esbarra na obtenção desses metabólitos que possuem características muito hidrofílicas. Por ser uma oleaginosa, a extração baseada em solventes orgânicos tende a remover principalmente os ácidos graxos das sementes e os compostos químicos de interesse acabam ocorrendo em concentrações muito baixas. Com isso, o objetivo deste trabalho foi realizar extrações das sementes de crambe, partindo de uma mesma proporção de material vegetal e com a variação do tipo de solvente utilizado (água e etanol) e da temperatura de extração. Com base nas massas recuperadas e com a

quantificação dos metabólitos extraídos, foi possível determinar quais processos apresentaram melhor rendimento.

Materiais e métodos

Extração das sementes de crambe

Sementes de crambe, doadas e coletadas junto ao Banco de Gemoplasma de Crambe da Fundação MS (Maracaju, MS), foram moídas, secas a temperatura ambiente e submetidas a extração com diferentes sistemas de solventes. Em seguida, as amostras tiveram o seu rendimento calculado a partir da quantidade de massa recuperada em relação à massa inicial do material vegetal. Utilizou-se quatro processos de extração descritos na Tabela 1.

Tabela 1. Condições empregadas nos processos de extração dos principais metabólitos polares de *Crambe abyssinica*.

Processo	Material vegetal (g)	Solvente (L)	Temperatura (°C)
1	150,27	1,5	70
2	150,05	2,0	27
3	150,46	2,0	100
4	150,02	1,5	27

Remoção dos solventes de extração das amostras

Quando necessário, as amostras que continham etanol foram rotaevaporadas para remoção do solvente orgânico e ao final todas as amostras aquosas foram congeladas (inicialmente em freezer -18 °C por 12 horas e depois transferidas para freezer -80 °C por 10 horas). Na sequência, foram transferidas para frascos do sistema de liofilização e foram liofilizadas por 4 dias.

Análise cromatográfica

O material liofilizado de cada um dos quatro processos foi preparado na concentração de 5 mg/mL em acetonitrila/H₂O (1:1). As análises de UPLC-PDA-ELSD das amostras foram realizadas no equipamento UPLC *Acquity H-Class* acoplado ao detector PDA e ELSD. Nessas condições, os dois principais metabólitos extraídos pelos quatro processos estudados foram avaliados de

forma qualitativa e quantitativa. Alíquotas de 0,5 µL das amostras foram injetadas nas seguintes condições:

- Coluna *Acquity UPLC® HILIC Amide* 1,7 µm, 2,1 x 50 mm.
- Temperatura da coluna: 40 °C.
- Modo de eluição: gradiente (Tabela 2).
- Fase móvel – solvente A: Formiato de amônio 25 mmol/L; solvente B: Acetonitrila.

Tabela 2. Gradiente de eluição empregado na separação por UPLC-PDA-ELSD dos compostos químicos presentes dos extratos obtidos na Tabela 1.

Tempo (min.)	Vazão (mL/min.)	%A	%B
0,20	0,500	0,0	100,0
0,21	0,500	15,0	85,0
1,50	0,500	15,0	85,0
5,00	0,500	50,0	50,0
5,01	0,500	0,0	100,0
7,00	0,500	0,0	100,0

Resultados e discussões

A partir das análises feitas, foram obtidos os perfis dos compostos A e B, que são apresentados nas Figuras 1 a 4.

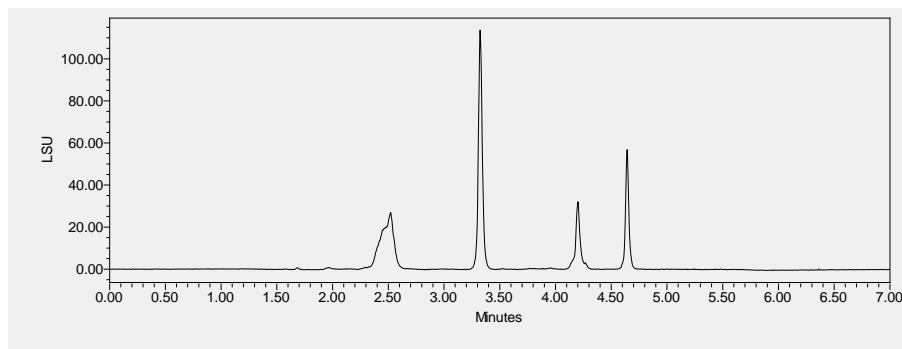


Figura 1. Cromatograma relativo ao composto A em $t_R = 3,3$ min (ELSD) a partir do processo 1 de extração.

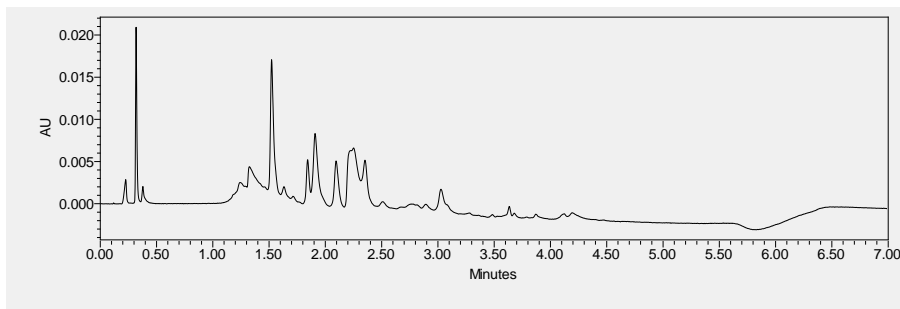


Figura 2. Cromatograma relativo ao composto B em $t_R = 0,3$ min (PDA 247 nm) a partir do processo 1 de extração.

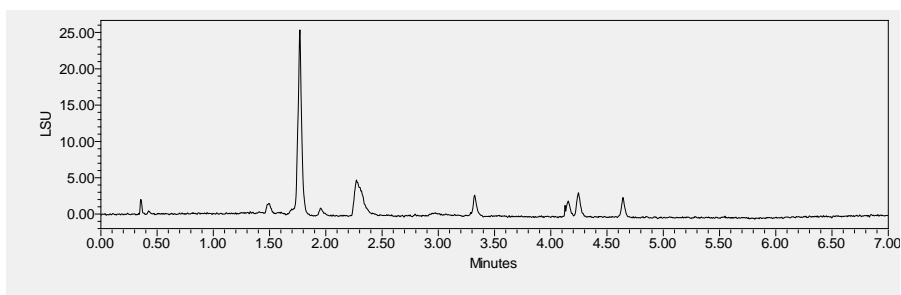


Figura 3. Cromatograma relativo ao composto A em $t_R = 3,3$ min (ELSD) a partir do processo 3 de extração.

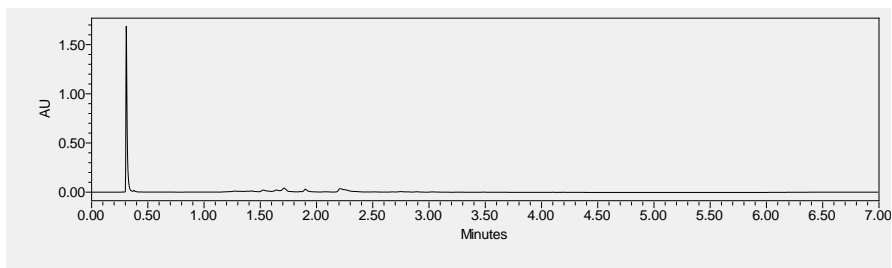


Figura 4. Cromatograma relativo ao composto B em $t_R = 0,3$ min (PDA 247 nm) a partir do processo 3 de extração.

Em termos de recuperação, o processo 4 foi o que obteve melhor rendimento em massa e a condição menos eficiente foi obtida pelo processo 3 (Tabela 3).

Tabela 3. Massas obtidas a partir da liofilização do extrato dos grãos de crambe.

Extração	Massa do material vegetal	Solvente	Massa recuperada	Rendimento (%)
Processo 1	150,27 g	1,5 L	20,77 g	13,82
Processo 2	150,05 g	2 L	15,96 g	10,64
Processo 3	150,46 g	2 L	14,62 g	9,72
Processo 4	150,02 g	1,5 L	22,85 g	15,23

Visando atribuir a melhor condição com base na obtenção dos dois principais compostos químicos-alvo (composto A e composto B), uma etapa de quantificação foi realizada para estabelecer os valores recuperados para os metabólitos A e B. Essas informações estão apresentadas na Tabela 4.

Tabela 4. Massas obtidas dos metabólitos A e B.

Processo de extração	Composto A (mg/g de amostra)	Rendimento referente à massa recuperada (%)	Composto B (mg/g de amostra)	Rendimento referente à massa recuperada (%)
1	162,06	16,2	2,67	0,3
2	164,40	16,4	1,44	0,1
3	227,76	22,8	3,49	0,4
4	-	-	10,34	1,0

Conclusões

Todos os processos de extração mostraram-se efetivos para a extração seletiva dos compostos de interesse, A e B. Os rendimentos em termos de massa de extrato obtido variaram de 9,72% a 15,23%. Em relação à quantidade de cada um dos metabólitos recuperados, o processo 3 foi o mais significativo para se obter o metabólito A (227,76 mg/g) e o processo 4 foi o mais seletivo para se obter o metabólito B (10,34 mg/g). A próxima etapa do estudo será avaliar a ação biológica de cada extrato e, posteriormente, isolar cada um dos compostos para verificar qual deles será responsável pelas atividades observadas.

Apoio financeiro

Embrapa (SEG. Proc. N° 03.12.01.011.00.00).

Referências

ATABANI, A. E.; SILITONGA, A. S.; ONG, H. C.; MAHLIA, T. M. I.; MASJUKI, H. H.; BADRUDDIN, I. A.; FAYAZ, H. Non-edible vegetable oils: A critical evaluation of oil extraction, fatty acid composition, biodiesel production, characteristics, engine performance and emissions production. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, Oxford, v. 18, p. 211-245, 2013.

BONES A. M.; ROSSITER, J. T. The enzymic and chemically induced decomposition of glucosinolates. **Phytochemistry**, Oxford, v. 67, n. 11, p. 1053-1067, 2006.

FALASCA, S. L.; FLORES, N.; LAMAS, M. C.; CARBALLO, S. M.; ANSCHAU, A. Crambe abyssinica: An almost unknown crop with a promissory future to produce biodiesel in Argentina. **International Journal of Hydrogen Energy**, Oxford, v. 35, n. 11, p. 5808-5812, 2010.

KONG, X. Y.; KISSEN, R.; BONES, A. M. Characterization of recombinant nitrile-specifer proteins (NSPs) of Arabidopsis thaliana: Dependency on Fe(II) ions and the effect of glucosinolate substrate and reaction conditions. **Phytochemistry**, Oxford, v. 84, p. 7-17, 2012.

VIG, A. P.; RAMPAL, G.; THIND, T. S.; ARORA, S. Bio-protective effects of glucosinolates-a review. **LWT-Food Science and Technology**, Amsterdam, v. 42, n. 10 p. 1561-1572, 2009.

Variação dos parâmetros associados ao rendimento e qualidade de óleo no período pós-colheita do dendê híbrido

Marina Borges Guimarães¹, Brenda Lee Simas Porto², José Antônio de Aquino Ribeiro³, Paula Andrea Osorio Carmona⁴, Raimundo Nonato Vieira da Cunha⁵, Simone Mendonça⁶

Resumo

O óleo de dendê pode ter sua qualidade afetada por dois fatores: variações genéticas e procedimentos pós-colheita. Seis materiais híbridos interespecíficos produzidos na Embrapa Amazônia Ocidental foram avaliados quanto aos parâmetros umidade, teor de óleo, perfil de ácidos graxos e acidez do óleo, ao longo de 5 tempos de pós-colheita: 24 horas, 48 horas, 5 dias, 7 dias e 10 dias. Esses parâmetros foram avaliados também quanto à posição no cacho para orientar futuras coletas de amostras para pesquisa. O teor de óleo não variou significativamente para a maioria das amostras, ao contrário do teor de acidez, que teve aumento significativo após 48 horas. O teor de ácidos graxos foi diminuindo ao longo do armazenamento. O perfil de ácidos graxos dos híbridos estudados difere do padrão de identidade sugerido pelo Codex Alimentarius. No entanto, o teor de acidez, mesmo ao final de 10 dias, ficou dentro do exigido pela legislação. Dois genótipos, dentre os estudados, apresentaram-se promissores por serem mais resistentes à lipólise.

Introdução

O óleo de palma bruto é extraído a partir do mesocarpo do fruto do dendezeiro (*Elaeis guineensis*) e possui várias utilizações e grande importância econômica. Estima-se que cerca de 80% da produção do óleo é destinada à indústria alimentícia e o restante é aplicado nas indústrias de cosméticos, sabões,

¹ Farmacêutica, Universidade de Brasília, marina.borges@colaborador.embrapa.br

² Química, doutora em Química, Universidade Federal de Juiz de Fora, blsporto@gmail.com

³ Farmacêutico, mestre em Ciências Farmacêuticas, analista da Embrapa Agroenergia, jose.ribeiro@embrapa.br

⁴ Engenheira de alimentos, doutora em Agronomia, pós-doutoranda na Embrapa Agroenergia, paula.carmona@colaborador.embrapa.br

⁵ Engenheiro-agrônomo, doutor em Agronomia, pesquisador da Embrapa Amazônia Ocidental, raimundo.vieira@embrapa.br

⁶ Farmacêutica, doutora em Saúde Pública, Universidade de São Paulo, pesquisadora da Embrapa Agroenergia, simone.mendonca@embrapa.br

velas, produtos farmacêuticos, lubrificantes, além da produção de biocombustíveis (ABRAPALMA, 2016).

Apesar de *E. guineensis* ser a palmeira mais cultivada mundialmente, *E. oleifera* possui características agrônômicas desejáveis, como menor crescimento do tronco e resistência a pragas e doenças. Além disso, sua maior composição de ácidos graxos insaturados e maior concentração de antioxidantes (carotenos, tocoferóis e tocotrienóis) apresentam relevância para a indústria fitofarmacêutica (MONTROYA et al., 2013). Em vista disso, desde 1969 o cruzamento entre as duas espécies do gênero *Elaeis* tem sido incentivado a fim de desenvolver híbridos com melhores características agrônômicas e óleos com melhor qualidade.

A qualidade do óleo de dendê pode ser rapidamente deteriorada no intervalo entre a colheita e o processamento do cacho para a extração do óleo na indústria, por isso a extração de óleo ocorre dentro das primeiras 48 horas do pós-colheita. Esse fato é limitante, pois nem sempre o local de colheita é próximo à indústria onde o óleo será obtido. Existem relatos de que os materiais híbridos produzem óleos mais resistentes à perda da qualidade, principalmente no que se refere ao índice de acidez. O índice de acidez representa o teor de ácidos graxos livres produzidos pela hidrólise dos triacilglicerídeos do óleo por ação de uma lipase endógena (CADENA et al., 2013).

Neste trabalho, a variação dos parâmetros de qualidade do óleo, como teor de óleo, perfil de ácidos graxos e índice de acidez, foi avaliada em diferentes períodos de pós-colheita a fim de identificar as melhores condições de rendimento e qualidade do óleo de diferentes genótipos de dendê híbrido produzidos pelo programa de melhoramento da Embrapa Amazônia Ocidental.

Materiais e métodos

Seis cachos de dendê híbrido foram coletados do Centro Experimental Rio Urubu (Rio Preto da Eva, AM) em agosto de 2015, dos genótipos 10/30, 19/06, 22/24, 24/24, 25/04 e 37/18. Foram coletadas amostras compostas (uma amostra por cacho/genótipo) contendo 4 frutos da ponta, 12 frutos do meio e 4 frutos da base do cacho, para cada genótipo, em cinco pontos temporais: foram 24 horas, 48 horas, 5 dias, 7 dias e 10 dias após a colheita do cacho. No 10º dia do pós-colheita, foram coletadas separadamente amostras do meio, ponta e base de cacho para avaliar se os parâmetros avaliados variavam também em relação à posição no cacho. Nesses pontos amostrais, o material foi autoclavado por 1 hora

a 121 °C, visando à inativação da lipase. As amostras foram armazenadas à temperatura de -20 °C até transporte e armazenamento na Embrapa Agroenergia.

Após despulpamento dos frutos, foi determinada a umidade das amostras (uma determinação por amostra), parâmetro este chamado de Amostra Seca ao Ar (ASA) (NOGUEIRA; SOUZA, 2005). Nessa análise as amostras foram secas por 48 horas em estufa a 65 °C, moídas, embaladas e congeladas a -20 °C até o momento das análises. Foi realizada em duplicata a determinação de matéria seca a 105 °C (NOGUEIRA; SOUZA, 2005) e teor de extrato etéreo em equipamento Ankon (AMERICAN OIL CHEMISTS' SOCIETY, 2005) (Method Am5-04).

Para a realização de análises de qualidade de óleo (índice de acidez e perfil de ácidos graxos), o óleo das amostras foi extraído (uma extração por amostra) em Extrator por Solvente Acelerado (ASE350 – Dionex), utilizando éter de petróleo como solvente. Os parâmetros do equipamento foram ajustados na seguinte configuração: 70 °C, aquecimento por 5 minutos, 5 ciclos, rinse com volume de 100%, purge de 60 segundos. O óleo foi mantido em freezer a -20 °C antes das análises de acidez e perfil de ácidos graxos.

A determinação do índice de acidez, expresso mg KOH por g de óleo (AMERICAN OIL CHEMISTS' SOCIETY, 2005) (Method Cd 3d-63) foi realizada em duplicata em titulador automático Metrhon, pesando-se 0,7 g de óleo em balança analítica. As análises de acidez foram realizadas num período de no máximo 24 horas após a extração do óleo.

A determinação do perfil de ácidos graxos do óleo extraído da polpa foi efetuada também em duplicata, de acordo com as metodologias da AOCS, 2005 (Ce 1-62 e Ce2—66), sendo a tomada de amostra de 20 mg e a metilação realizada com BF₃.

Foi realizada análise de variância (Anova) para verificar o efeito do tempo pós-colheita sobre os parâmetros de qualidade do óleo nas amostras. O teste de Scott-Knott foi usado para determinar as diferenças entre as médias, utilizando-se o software R Core Team (2013).

Resultados e discussão

O teor de extrato etéreo não diferiu ao longo do tempo nos genótipos analisados, com exceção do genótipo 10/30, que apresentou menor teor a partir de 48 horas. Tendo em vista que apenas um dos seis genótipos apresentou tal diferença, em trabalhos futuros o teor de óleo será analisado apenas no primeiro

ponto de colheita. Quanto à posição do fruto no cacho (ponta, meio e base), avaliada no 10º dia, não houve diferença significativa entre os genótipos 24/24, 24/05 e 37/18. O genótipo 22/24 apresentou menor teor de extrato etéreo nas amostras obtidas da ponta do cacho, enquanto nos genótipos 10/30 e 19/06 os frutos da ponta apresentaram maior teor. Essas diferenças em alguns genótipos reforçam a necessidade de se formar amostras compostas (frutos da base, meio e ponta combinados) sempre que se coleta materiais para análise de teor de óleo. Assim sendo, adotou-se a prática de coletar um número de frutos proporcional ao peso daquela parte (base, meio ou ponta) do cacho.

Quanto ao índice de acidez, foi observado que houve diferença estatística pelo tempo em todos os genótipos (Figura 1). Como o esperado, até as 48 horas após a colheita os genótipos não apresentam grande variação na acidez.

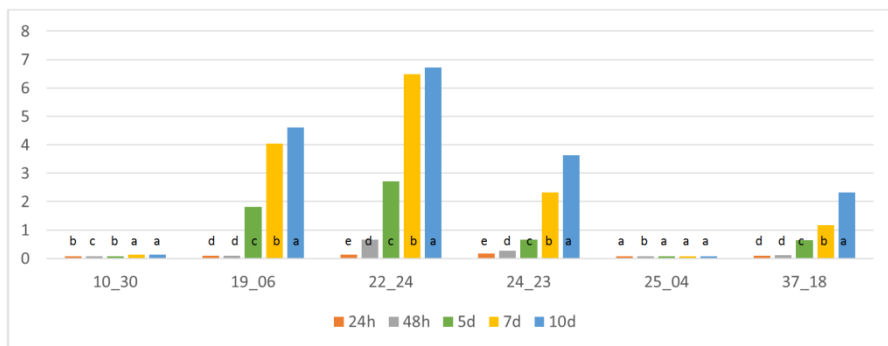


Figura 1. Variação de acidez (mg KOH/g óleo) por genótipo e por tempo de estocagem. Médias seguidas da mesma letra minúscula por genótipo não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de significância.

Conforme citado anteriormente, a ação da lipase endógena dos óleos promove o aumento do índice de acidez, indicando o estado de rancidez hidrolítica do óleo. De acordo com a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa), o índice de acidez permitido para o óleo de palma é de 10mg KOH/g de óleo bruto. Portanto, todos os genótipos, mesmo após 10 dias, permaneceram dentro dos parâmetros da legislação brasileira. Os genótipos 10/30 e 25/04 apresentaram pouca ou nenhuma diferença no índice de acidez ao longo dos tempos pós-colheita comparados aos outros genótipos. O não aumento no índice de acidez pelo tempo pós-colheita indica que tais genótipos apresentam

resistência à lipólise, sendo acessos promissores por manter a qualidade do óleo mais tempo no pós-colheita.

Avaliando a posição do fruto no cacho, apenas o genótipo 22/24 apresentou maior acidez nos frutos da base. Todos os outros genótipos apresentaram maior acidez nos frutos da ponta. Essa heterogeneidade de acidez ao longo do cacho está relacionada com a desuniformidade de maturação no mesmo e reforça a necessidade da coleta de amostras compostas para avaliação química representativa de todo o cacho.

Um fator importante na qualidade de um óleo é sua composição de ácidos graxos. Óleos ricos em ácidos graxos monoinsaturados possuem propriedades benéficas à saúde, pois são capazes de melhorar os níveis de colesterol e prevenir doenças cardiovasculares (CARLUCCIOLL et al., 2007 LOPEZ-MIRANDA et al., 2006). Além disso, o aumento de ácidos graxos poliinsaturados interfere em características de importância comercial como estabilidade e rancidez do óleo (LÉON et al., 2008).

Todos os híbridos apresentaram perfil semelhante de ácidos graxos, com predominância de ácido oleico (C18:1) – variando de 48,69% a 56,75%, seguido do ácido palmítico (C16:0) – variando de 22 a 26,75%. O padrão de identidade do óleo de palma (*Elaeis guineenses*) aponta que o teor de ácido oleico deve estar em torno de 36.0-44.0% e palmítico 39.3-47.5% (*Codex alimentarius*).

Em relação aos diferentes tempos pós-colheita, o único genótipo que não sofreu redução estatística na concentração de C18:1 foi o 19/06, entretanto, a concentração média desse ácido graxo se manteve acima de 50% em todos os genótipos. Quanto aos ácidos graxos poli-insaturados (C18:2 e C18:3), todos os genótipos apresentaram redução estatística desses ácidos graxos, exceto o genótipo 22/24 em relação a C18:3. A concentração de C18:3 se manteve menor que 0,5% em todos, bem menor do que a concentração média da espécie *Elaeis guineenses* (9% – 12%). Todos os genótipos apresentaram redução significativa na concentração do ácido palmítico (C16:0) pelo tempo pós-colheita.

Quanto à posição do fruto no cacho, os genótipos 25/05 e 37/18 apresentaram maior teor de C18:1 nas amostras colhidas na base do cacho. Os genótipos 10/30, 24/23 e 22/24 apresentaram maior concentração de C18:1 nos frutos do meio e de C18:2 na ponta do cacho para os dois primeiros e na base para o 22/24. Os frutos da ponta do cacho do genótipo 10/30 apresentaram

maior concentração de C16:0, enquanto o restante dos genótipos mostrou pouca ou nenhuma diferença estatística entre o local do fruto no cacho.

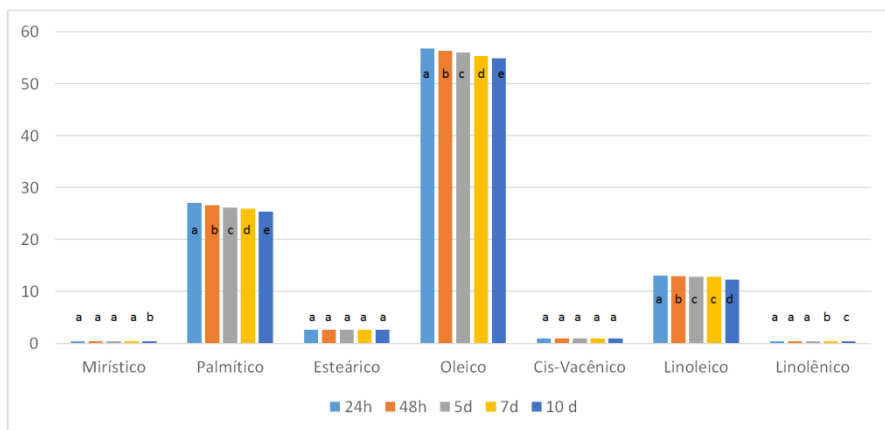


Figura 2. Porcentagem de ácidos graxos por tempo – Amostra 37/18. Médias seguidas da mesma letra minúscula por ácido graxo não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de significância.

Conclusões

De acordo com os dados obtidos, foi possível verificar que o parâmetro mais afetado pelo tempo de estocagem pós-colheita dos frutos foi o índice de acidez. Tais modificações foram identificadas a partir do tempo pós-colheita de 48 horas, sendo mais acentuadas a partir de 5 dias e nos frutos da ponta dos cachos. Entretanto, o índice de acidez permaneceu dentro do limite estabelecido pela Anvisa em todos os acessos, o que demonstra o grande potencial dos híbridos interespecíficos como possibilidade na ampliação da área de plantio para regiões um pouco mais distantes da indústria de processamento. Investigações futuras podem ser realizadas quanto aos genes responsáveis pela resistência à lipólise dos genótipos 10/30 e 25/04.

No geral, todos os genótipos apresentaram uma pequena queda no teor dos ácidos graxos predominantes ao longo do tempo. Apesar da redução de ácidos graxos insaturados, C18:1 ainda se manteve maioria na composição de ácidos graxos do óleo. A posição do fruto no cacho não mostrou correlação significativa com a concentração dos ácidos graxos, apenas em alguns genótipos.

O teor de extrato etéreo não demonstrou grandes variações em decorrer do tempo pós-colheita e, apesar de mostrar algumas diferenças entre as localizações

do cacho em que o fruto foi colhido, não foi possível estabelecer uma região de maior concentração, devendo, por isso, ser amostrado de forma a conter frutos de todas as posições do cacho.

Apoio financeiro

Finep.

Referências

ABRAPALMA. **O Óleo de palma no dia a dia**. Disponível em: <<http://www.abrapalma.org/pt/oleo-da-palma-no-dia-a-dia/>>. Acesso em: 20 Jul. 2016.

AMERICAN OIL CHEMISTS' SOCIETY. **Official methods and recommended practices of the AOCS**. Champaign, IL, 2005.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (Brasil). Resolução RDC nº. 270 de 22 de setembro de 2005. Regulamento técnico para óleos vegetais, gorduras vegetais e creme vegetal. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 23 set. 2005, Seção 1.

CADENA, T.; PRADA, F.; PEREA, A.; ROMERO, H. M. Lipase activity, mesocarp oil content, and iodine value in oil palm fruits of *Elaeis guineensis*, *Elaeis oleifera*, and the interspecific hybrid O×G (*E. oleifera* × *E. guineensis*). **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 93, n. 3, p. 674–680, 2013.

CARLUCCIOLL, M. A.; MASSARO, M.; SCODITTI, E. DE CATERINA, R. Vasculoprotective potential of olive oil components. **Molecular Nutrition & Food Research**, v. 51, p. 1225–1234, 2007.

FAO. **Codex Standard for Named Vegetable Oils** (CODEX-STAN 210 - 1999). 1999. Disponível em: <<http://www.fao.org/docrep/004/Y2774E/y2774e04.htm>>. Acesso em: 28 jul 2016.

LEÓN, L.; DE LA ROSA, R.; GRACIA, A.; BARRANCO, D.; RALLO, L. Fatty acid composition of advanced olive selections obtained by crossbreeding. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, Sussex, v. 88, n. 11, p. 1921-1926, 2008.

LOPEZ-MIRANDA, J.; BADIMON, L.; BONANOME, A.; LAIRON, D.; KRIS- ETHELTON, P.M.; MATA, P. Monounsaturated fat and cardiovascular risk. **Nutrition Reviews**, v. 64, p. 52–512, 2006.

MONTOYA, C.; LOPES, R.; FLORI, A.; CROS, D.; CUELLAR, T.; SUMMO, M.; ESPEOUT, S.; RIVALLAN, R.; RISTERUCCI, A.-M.; BITTENCOURT, D.; ZAMBRANO, J. R.; ALARCÓN G., W. H.; VILLENEUVE, P.; PINA, M.; NOUY, B.; AMBLARD, P.; RITTER, E.; LEROY, T.; BILLOTTE, N. Quantitative trait loci (QTLs) analysis of palm oil fatty acid composition in an interspecific pseudo-backcross from *Elaeis oleifera* (H.B.K.) Cortés and oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.). **Tree Genetics & Genomes**, Heidelberg, v. 9, n. 5, p. 1207-1225, 2013.

NOGUEIRA, A. R. de A.; SOUZA, G. B. de. (Ed.). **Manual de laboratórios**: solo, água, nutrição vegetal, nutrição animal e alimentos. São Carlos, SP: Embrapa Pecuária Sudeste, 2005. 334 p.

Impressão digital metabólica de folhas de *Elaeis guineensis* em diferentes condições de preparo de amostra utilizando UHPLC-MS

Jorge Candido Rodrigues Neto¹, Luiz Henrique Galli Vargas², José Antônio de Aquino Ribeiro³, Maria Esther Ricci da Silva⁴, Manoel Teixeira Souza Júnior⁵, Clenilson Martins Rodrigues⁶, Anselmo Elcana de Oliveira⁷, Patrícia Verardi Abdelnur⁸

Resumo

Neste trabalho, é apresentado um protocolo de alta eficiência para extração e detecção de metabólitos em folhas de dendê (*Elaeis guineensis*) utilizando UHPLC-MS com posterior tratamento estatístico de dados no modelo ASCA (*ANOVA simultaneous component analysis*). O objetivo é comparar a impressão digital metabólica quando diferentes métodos de coleta e extração são empregados, simulando coleta em locais remotos, onde normalmente são localizadas as plantações de dendê. A partir desses resultados, buscou-se verificar qual o melhor método de preparo de amostra de modo a manter a integridade dos metabólitos presentes nas folhas.

Introdução

O óleo de dendê é o mais consumido no mundo, dentre os óleos vegetais, com 35,05% do mercado em 2014/15. Originário da África, tem no seu mesocarpo a maior fonte de óleo vegetal do mundo e foi trazido ao nosso país pelos escravos no século XVII (ALVES et al., 2011). Além de ser utilizado na culinária há muitos anos, também é usado na produção de sabões e produtos de limpeza, cosméticos, farmacêuticos, plásticos, lubrificantes e na produção de biodiesel (DENDÊ ..., 2007). Sua cultura é afetada por doenças ou condições anômalas, como o

¹ Químico, mestrando em Química, Universidade Federal de Goiás, jorgecrn@hotmail.com

² Engenheiro-agrônomo, mestre em Biotecnologia Vegetal, Universidade Federal de Lavras, zealotrs@gmail.com

³ Farmacêutico, mestre em Ciências Farmacêuticas, analista da Embrapa Agroenergia, jose.ribeiro@embrapa.br

⁴ Farmacêutica, doutora em Biotecnologia, Universidade de São Paulo, esthericci@hotmail.com

⁵ Engenheiro-agrônomo, doutor em Patologia Vegetal, pesquisador da Embrapa Agroenergia, manoel.souza@embrapa.br

⁶ Químico, doutor em Química, pesquisador da Embrapa Agroenergia, clenilson.rodrigues@embrapa.br

⁷ Químico, doutor em Química, Universidade Federal de Goiás, elcana.iqfug@gmail.com

⁸ Química, doutora em Química Orgânica, pesquisadora da Embrapa Agroenergia, patricia.abdelnur@embrapa.br

amarelecimento fatal (AF), que pode afetar uma ou mais vias metabólicas da planta e demanda um estudo de suas causas.

A estratégia metabolômica tem como uma de suas vertentes a impressão digital metabolômica (*metabolic fingerprinting*), que consiste na análise rápida e eficiente dos analitos detectáveis e posterior análise multivariada de diferentes amostras com relação à intensidade de picos cromatográficos ou sinais de espectros de massas (ABDELNUR et al., 2014). Técnicas hífenadas são amplamente utilizadas nessa estratégia por promoverem a separação de misturas complexas antes da detecção e identificação de compostos presentes na amostra (FIEHN, 2001). O uso de cromatógrafos a líquido de ultra-alta eficiência, como o UHPLC (*Ultra High Pressure Liquid Chromatography*) acoplado a espectrômetro de massas de alta resolução (*High Resolution Mass Spectrometry* - HRMS) permite a obtenção de *screening* com alta sensibilidade e rapidez, além de permitir a elucidação de compostos químicos.

Assim, neste trabalho é apresentado o desenvolvimento de um protocolo analítico para a obtenção da impressão digital metabólica (*metabolic fingerprinting*) de folhas de *Elaeis guineensis*. O protocolo consiste na análise por UHPLC-MS, quando diferentes métodos de transporte e extração são empregados, seguido do tratamento de dados multivariados, para que sejam identificados compostos característicos de cada grupo de amostras. Dessa forma, é possível determinar a melhor condição de extração do maior número de metabólitos possíveis ou na investigação de metabólitos específicos.

Materiais e métodos

Foi realizado um estudo da impressão digital metabólica de folhas de dendê simulando coleta em campo e transporte de amostras utilizando três condições: nitrogênio líquido, gelo seco e temperatura ambiente. Em seguida, as amostras foram armazenadas em freezer -80 °C até o momento da extração e análise, que aconteceram 24 horas depois.

Outro fator que influencia na análise metabolômica é o solvente utilizado na extração dos metabólitos. Portanto, três solventes foram utilizados, sendo eles: i) etanol 100%, ii) etanol 70% e iii) etanol 70% + ácido fórmico 0,1%.

Foram realizadas análises por UHPLC-ESI(+)-MS em quintuplicata analítica (Tabela 1). De forma a avaliar as variações metabólicas de um grande número de

amostras e de variáveis (espectros de massas complexos), fez-se necessário o uso da ferramenta estatística ASCA (*ANOVA simultaneous component analysis*).

Tabela 1. Amostras de folha de dendê analisadas por UHPLC-ESI(+)-MS sob diferentes condições de transporte (TA, gelo e N₂) e extração (100E, 70E e FA70E).

Número amostra (#)	Condição de transporte	Solvente de extração	Replicata
1-5	TA	100E	R1-R5
6-10	TA	70E	R1-R5
11-15	TA	FA70E	R1-R5
16-20	Gelo	100E	R1-R5
21-25	Gelo	70E	R1-R5
26-30	Gelo	FA70E	R1-R5
31-35	N ₂	100E	R1-R5
36-40	N ₂	70E	R1-R5
41-45	N ₂	FA70E	R1-R5

TA = temperatura ambiente; N₂ = nitrogênio líquido; 100E = etanol 100%; 70E = 70:30 etanol:água; FA70E = 70:30 etanol:água + 0,1% ácido fórmico.

Os experimentos de UHPLC-ESI-MS foram realizados utilizando um sistema de cromatografia líquida de ultra-alta eficiência, modelo Nexera X2 (Shimadzu, Japão) equipado com coluna de fase-reversa *Acquity* UPLC BEH C8 (1,7 μm, 2,1x150 mm) (Waters Technologies, Estados Unidos). O espectrômetro de massas utilizado foi o modelo Maxis 4G (Bruker Daltonics, Alemanha), equipado com fonte de ionização *electrospray* (ESI) e analisador de massas de alta resolução tipo TOF (*Time of flight*).

Após o tempo de transporte e armazenamento, microtubos de 2 mL contendo 100 mg de cada amostra de folha descrita na Tabela 1 foram submetidos à extração de metabólitos secundários baseada em método previamente descrito (TAHIR et al., 2012). Posteriormente, 0,2 μL de amostra foram injetados no sistema cromatográfico com gradiente de fase móvel e fluxo de 400 μL/min em corridas cromatográficas de 22 minutos.

Os dados foram adquiridos pelo *software HyStar Application*, versão 3.2. Para elucidar a fórmula molecular dos íons detectados, foi utilizado o algoritmo *SmartFormula (DataAnalysis* versão 4.2, Bruker Daltonics, Alemanha). No

tratamento estatístico foi utilizado o *software* MatLab, versão R2014b (The MathWorks Inc, Estados Unidos) e o *software* PLS Toolbox versão 7.9 (Eigenvector Research Inc, Estados Unidos), contemplando as corridas cromatográficas de 0,6 a 10 minutos (em que os picos cromatográficos de interesse se apresentaram), na faixa de m/z 80 a 1200. Os compostos foram relacionados às respectivas massas utilizando-se o algoritmo FMF (*Find Molecular Features*).

Resultados e discussão

Os cromatogramas de pico-base (BPC – *Base Peak Chromatogram*) são mostrados na Figura 1, em que a média de 44, 50 e 54 picos cromatográficos foram atribuídos, na análise por ESI(+)-MS, aos métodos de extração 100E, 70E e FA70E, respectivamente, com uso do algoritmo FMF (Bruker Daltonics, Alemanha).

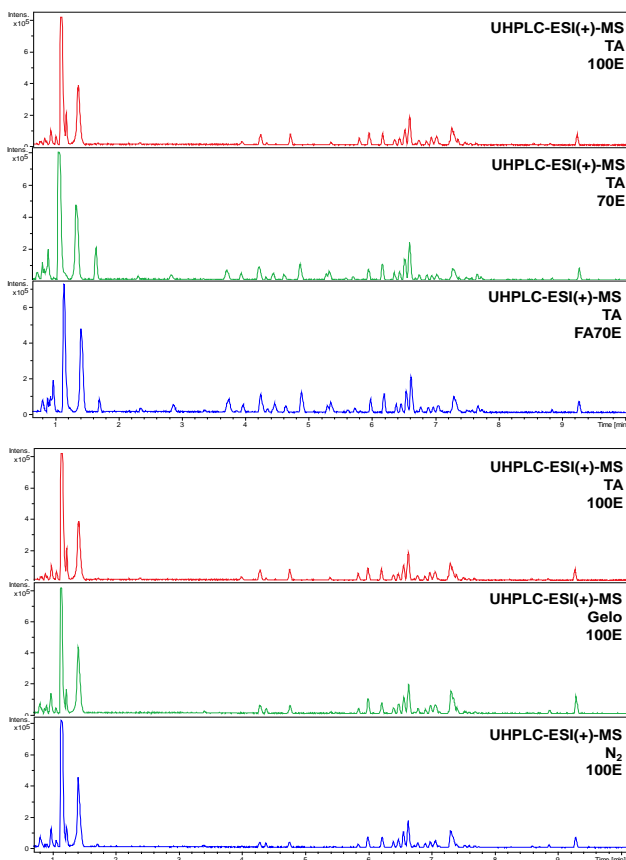


Figura 1. Cromatogramas de pico-base (BPC) de extratos de dendê em diferentes métodos de transporte e solventes de extração.

TA: temperatura ambiente; 100E: etanol 100%; 70E: etanol 70%; FA70E: etanol 70% + ácido fórmico 0,1%.

Os efeitos de transporte e solvente foram avaliados por modelos de análise de componente principal (PCA – *Principal Component Analysis*) e são apresentados na Figura 2a. Houve a discriminação de três grupos de acordo com condições de transporte, assim como de solventes. As avaliações foram feitas considerando-se valores de *loadings* maiores que 0,1 e menores que -0,1. Na Figura 2b e Tabela 2, são mostrados os dois íons de cada grupo com maior relevância estatística para a separação das variáveis nos gráficos de *score*.

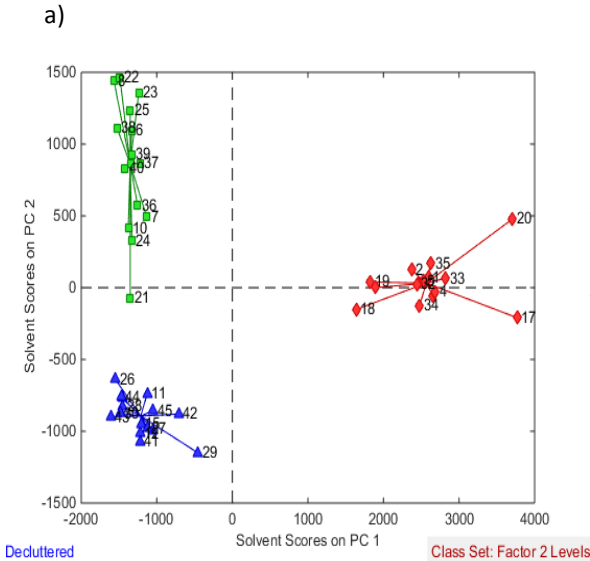


Figura 2. Dados UHPLC-ESI(+)-MS com análise da condição de solvente de análise. a) Gráfico de scores relativo à separação de grupos. b) Comparação das intensidades dos picos de massas de cada metabólito avaliado. Vermelho: etanol 100%; verde: etanol 70%; azul: etanol 70% + ácido fórmico 0,1%. O íon m/z 147,044 é um fragmento do íon m/z 379,0528.

b)

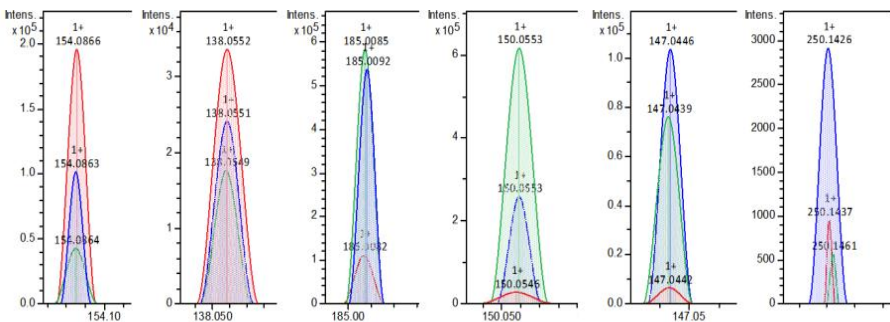


Tabela 2. UHPLC-ESI(+)-MS para análise do efeito de solvente.

Loadings		Tempo de retenção (min)	m/z	Intensidades médias			Fórmula empírica	Principal condição
PC1	PC2			100E	70E	FA70E		
0,2395		1,17	154,086	597.342	97.740	188.458	C ₈ H ₁₂ NO ₂	100E
0,1167	0,1365	1,04	138,057	456.791	350.454	377.669	C ₇ H ₇ NO ₂	100E
-0,3373	0,2494	1,17	185,009*	151.801	1.443.287	1.145.015	C ₇ H ₄ O ₆	70E
-0,1520	0,4891	1,74	150,055	38.666	739.486	142.659	C ₈ H ₇ NO ₂	70E
-0,1396		4,92	147,044	13.574	186.457	207.316	C ₉ H ₆ O ₂	FA70E
	-0,1380	5,41	250,144	3.027	2.885	52.146	C ₁₄ H ₁₉ NO ₃	FA70E

Na análise por ESI(+)-MS, 22 metabólitos destacaram-se na separação dos grupos na análise estatística. Os metabólitos m/z 154,086: rt 1,17 min (C₈H₁₂NO₂) e m/z 138,057: rt 1,04 min (C₇H₇NO₂) foram majoritariamente extraídos quando utilizado etanol 100% (100E), enquanto os metabólitos m/z 185,009: rt 1,17 min (C₇H₄O₆) e m/z 150,055: rt 1,74 min (C₈H₇NO₂) foram melhor detectados com uso de etanol 70% no processo de extração. Usando etanol 70% + 0,1% de ácido fórmico, os metabólitos m/z 147,044: rt 4,92 min (C₉H₆O₂) e m/z 250,144: rt 5,41 min (C₁₄H₁₉NO₃) foram melhor extraídos. Esses resultados mostram que metabólitos são extraídos em diferentes intensidades dependendo do solvente utilizado. Espectros de massas ESI(+)-MS foram analisados (Figura 2b) para confirmar os dados obtidos pelo ASCA.

Com relação ao efeito de transporte, 18 metabólitos destacaram-se na separação dos grupos na análise estatística e foram analisados seguindo os mesmos critérios do efeito de solvente. Os dados de ASCA e espectrometria de massas são mostrados na Figura 3 e Tabela 3.

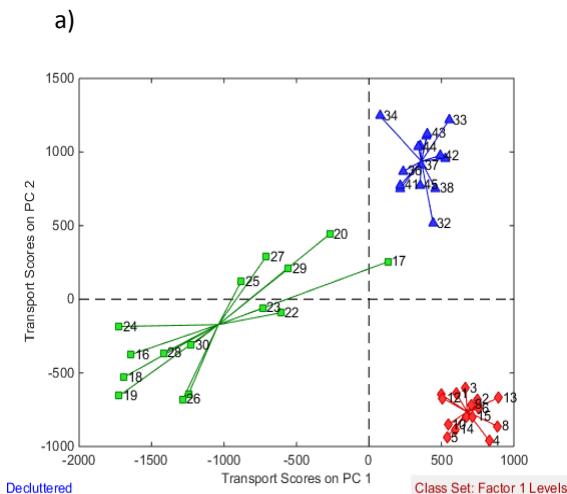


Figura 3. Dados UHPLC-ESI(+)-MS com análise da condição de transporte. a) Gráfico de scores relativos à separação de grupos. b) Comparação das intensidades dos picos de massas de cada metabólito avaliado. Vermelho: temperatura ambiente; verde: gelo; azul: nitrogênio líquido.

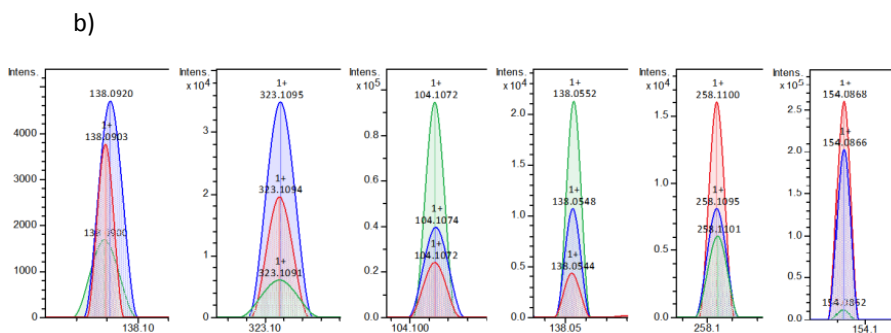


Tabela 3. UHPLC-ESI(+)-MS para análise do efeito de transporte.

Loadings	Tempo de retenção (min)	m/z	Intensidades médias			Fórmula empírica	Principal condição	
			TA	Gelo	N ₂			
0,1033	1,39	138,091	67.947	41.045	73.970	C ₈ H ₁₁ NO	N ₂	
	0,1128	4,39	323,110	41.675	35.385	69.941	C ₁₆ H ₁₈ O ₇	N ₂
-0,1376	0,94	104,107	108.105	170.064	110.319	C ₅ H ₁₃ NO	Gelo	
-0,1219	1,04	138,057	427.995	430.030	326.888	C ₇ H ₇ NO ₂	Gelo	
0,1612	-0,1357	0,98	258,110	100.907	23.710	38.581	C ₈ H ₁₉ NO ₃	TA
0,1457	1,17	154,086	339.210	220.618	323.712	C ₈ H ₁₂ NO ₂	TA	

Os metabólitos com m/z 138,091: rt 1,39 min ($C_8H_{11}NO$) e m/z 323,110: rt 4,39 min ($C_{16}H_{18}O_7$) foram detectados em maior intensidade utilizando nitrogênio líquido como transporte. Já os metabólitos com m/z 104,107: rt 0,94 min ($C_5H_{13}NO$) e m/z 138,057: rt 1,04 min ($C_7H_7NO_2$) foram melhor extraídos quando transportados em gelo. Os metabólitos m/z 258,110: rt 0,98 min ($C_8H_{19}NO_3$) e m/z 154,086: rt 1,17 min ($C_8H_{12}NO_2$) foram detectados em maior intensidade quando transportados em temperatura ambiente.

O método de análise multivariada ASCA foi aplicado à estrutura de dados gerada pelas *bucket tables*, com escalonamento Pareto para corrigir variâncias de sinais não constantes. Os fatores de transporte e solvente foram estatisticamente significantes ($P = 0,05$) e, dentre os dois fatores, o efeito do solvente (48,37) foi indicado como o mais importante em relação ao efeito do transporte (9,34).

Conclusão

O protocolo de extração e transporte se mostrou eficiente na análise da impressão digital metabólica de folhas, evidenciando a diferença nas intensidades de massas de certos metabólitos extraídos quando diferentes solventes ou modos de transporte são empregados. A análise multivariada permitiu a distinção de grupos que podem ser avaliados quando metabólitos específicos são investigados, como o íon m/z 154,086 que está presente em todas as amostras, mas é melhor extraído com uso de etanol 100% ou o íon m/z 138,091, que é melhor extraído quando transportado em nitrogênio líquido. O uso de nitrogênio líquido é o mais indicado por promover o *quenching* dos metabólitos, mas foi observada uma influência com uso de diferentes solventes. Assim, foi estabelecido um protocolo analítico confiável de preparo de amostra ao tratamento estatístico dos dados para prospecção de analitos previamente reportados ou novos, utilizando métodos cromatográficos rápidos e com alta sensibilidade. Na próxima etapa do projeto, será feita a identificação dos compostos por UHPLC-ESI-MS/MS e comparação dos fragmentos com a literatura existente e com bancos de dados públicos de metabolômica.

Apoio financeiro

Os autores agradecem à Embrapa, Capes, Finep e ao CNPq, pelo apoio financeiro.

Referências

ALVES, S. A. O.; DE LEMOS, O. F.; DOS SANTOS FILHO, B. G.; DA SILVA, A. L. L.. In vitro protocol optimization for development of interspecific hybrids of oil palm (*Elaeis oleifera* (H.B.K) Cortés x *Elaeis guineensis* Jacq.). **Journal of Biotechnology and Biodiversity**, Gurupi, v. 2, n. 3, p. 1-6, 2011.

DENDÊ: produtos, mercado e potencialidade. Manaus: Embrapa Amazônia Ocidental, 2007. 1 folder.

ABDELNUR, P. V.; CALDANA, C.; MARTINS, M. C. Metabolomics applied in bioenergy. **Chemical and Biological Technologies in Agriculture**, v. 1, n. 22, p. 1-9, 2014.

FIEHN, O. Combining genomics, metabolome analysis, and biochemical modelling to understand metabolic networks. **Comparative and Functional Genomics**, Sussex, v. 2, n. 3, p. 155-168, 2001.

TAHIR, N. I.; SHAARI, K.; ABAS, F.; PARVEEZ, G. K. A.; ISHAK, Z.; RAMLI, U. S. Characterization of apigenin and luteolin derivatives from oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) leaf using LC-ESI-MS/MS. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, DC, v. 60, n. 45, p. 11201-11210, 2012.

Produção de gás combustível por meio de processo de gaseificação de *Eucalyptus grandis* em reator de leito fluidizado

Albert Reis dos Anjos¹, Amanda Assunção Rosa², Diogo Keiji Nakai³,
Emerson Leo Schultz⁴, Anna Letícia Montenegro Turtelli Pighinelli⁵, Fabrício
Machado⁶, Rossano Gambetta⁷

Resumo

Este estudo tem como objetivo avaliar os comportamentos de fluidização, com ar, em leito de quartzo ocre à temperatura ambiente e de gaseificação (700-800 °C) e da composição do gás produto de processo de gaseificação em leito fluidizado de *Eucalyptus grandis* utilizando ar como agente de gaseificação para valores de 0,30 e 0,39 da razão de equivalência (RE). Observou-se que para RE igual a 0,30 a produção de hidrogênio, monóxido de carbono e metano se comportou de maneira mais eficiente, formando cerca de 2%, 10% e 2,5%, respectivamente.

Introdução

O processo de gaseificação consiste de uma oxidação térmica parcial que produz um gás composto por diversos componentes, como monóxido e dióxido de carbono, metano, hidrogênio, nitrogênio, hidrocarbonetos, além de pequenas quantidades de carvão, cinzas e componentes condensáveis (por exemplo, alcatrão e óleos). A mistura gasosa constituída basicamente de monóxido de carbono e hidrogênio é geralmente denominada de gás de síntese e pode ser aplicada na queima direta para geração de energia elétrica e como matéria-prima para a indústria química visando produção de amônia, hidrogênio e combustíveis líquidos de maior valor agregado (BALAT; KIRTAY, 2010).

¹Engenheiro de energia, mestrando em Tecnologias Química e Biológica, Universidade de Brasília, albert.anjos@colaborador.embrapa.br

²Química, mestranda em Tecnologias Química e Biológica, Universidade de Brasília, amanda.rosa@colaborador.embrapa.br

³Engenheiro de bioprocessos e biotecnologia, mestre em Ciências Mecânicas, analista da Embrapa Agroenergia, diogo.nakai@embrapa.br

⁴Engenheiro químico, doutor em Engenharia Química, pesquisador da Embrapa Agroenergia, emerson.schultz@embrapa.br

⁵Engenheira agrícola, doutora em Engenharia Agrícola, analista da Embrapa Agroenergia, anna.pighinelli@embrapa.br

⁶Engenheiro químico, doutor em Engenharia Química, professor da Universidade de Brasília, fmachado@unb.br

⁷Engenheiro químico, doutor em Engenharia Química, pesquisador da Embrapa Agroenergia, rossano.gambetta.embrapa.br

O processo de gaseificação em leito fluidizado envolve uma grande quantidade de variáveis que afetam comportamento das reações químicas, como o tipo de material envolvido, a temperatura do leito, a velocidade superficial do gás, a taxa de alimentação ar/biomassa, a distribuição granulométrica do combustível (RAVELLI et al., 2008). A razão de equivalência (RE), que corresponde à relação ar-combustível real utilizada durante o processo dividida pela relação ar-combustível estequiométrica necessária para que haja combustão, é um parâmetro fundamental para se determinar a faixa de operação do agente de gaseificação. Para a gaseificação, o valor de RE está entre 0,2 e 0,4 (BASU, 2006).

O presente estudo objetivou avaliar a composição do gás produzido utilizando ar como agente de gaseificação, em função da variação da razão de equivalência. Como material do leito, foi utilizado quartzo ocre (malha 30) de diâmetro característico aproximadamente igual a 0,6 mm. Caracterizou-se a região de fluidização do material do leito por meio de ensaios de fluidização em condição ambiente de temperatura e à temperatura de gaseificação (700-800 °C).

Materiais e métodos

Os ensaios de fluidização e gaseificação foram realizados em planta-piloto de gaseificação e pirólise (PID Eng&Tech), localizada na área de plantas-piloto (APP) da Embrapa Agroenergia. A planta é composta por: sistema de alimentação de combustível; sistema de alimentação do agente de fluidização, podendo ser utilizado ar, vapor, nitrogênio ou uma mistura destes; reator de leito fluidizado de diâmetro de 8,28 cm e altura útil do leito de 70,5 cm, com sistema de aquecimento por resistência elétrica, ao qual é adicionado o leito (quartzo ocre), o agente de fluidização (que pode ser previamente aquecido por meio de resistência elétrica) e o combustível para que ocorram as reações; condensador para obtenção do alcatrão; ciclones, responsáveis por separar o material sólido (cinzas, carvão, biomassa que não reagiu, material do leito); lavador de gases, que é responsável por purificar a mistura gasosa produzida, removendo por exemplo H₂S; medidor de gás, que quantifica o gás produzido no processo; e queimador dos gases combustíveis contidos na mistura gasosa produzida no reator antes de serem lançados na atmosfera. Por meio do software computacional *Process@*, é possível determinar a temperatura de aquecimento do gás de fluidização e do reator, a vazão de alimentação dos agentes de fluidização e da biomassa e obter o perfil de temperatura ao longo do tempo em três regiões do reator.

Inicialmente, realizou-se ensaios de fluidização à temperatura ambiente e à temperatura de gaseificação (800 °C) em leito de quartzo ocre, com ar, objetivando caracterizar a região de fluidização desse material. A vazão do agente de gaseificação (ar) foi variada de 3 L/min em 3 L/min, na faixa de 0 L/min a 120 L/min para temperatura ambiente e de 0 L/min a 40 L/min para temperatura de gaseificação. Cada valor de vazão foi mantido constante durante 3 minutos como garantia de operação do fluxo de ar em estado estacionário. Por meio de transdutores de pressão localizados na região superior do reator (topo) e na saída do distribuidor de ar, obteve-se a perda de carga (ΔP) relativa ao leito de quartzo. Utilizaram-se as médias de vazão e ΔP para representação dos regimes de fluidização do quartzo.

Nos ensaios de gaseificação de *Eucalyptus grandis*, foram utilizados os parâmetros apresentados na Tabela 1.

Tabela 1. Parâmetros operacionais utilizados no processo de gaseificação de *Eucalyptus grandis*.

Biomassa	<i>Eucalyptus grandis</i>
Agente de Fluidização (ar) – L/min	10–13
Temperatura do leito – (°C)	700–800
Material do leito	Quartzo Ocre (1 kg)
Vazão de alimentação de biomassa – g/min	6,13

A biomassa foi previamente moída em moinho de facas (Willey) utilizando peneira de 2 mm. Durante os ensaios de gaseificação, variou-se a vazão de alimentação do agente de fluidização a fim de analisar o comportamento da composição do gás final. Cada vazão de ar foi mantida constante durante 5 minutos e, por meio de analisador de gases da SICK (Modelo GMS800) em linha, obteve-se a composição do gás final.

Resultados e discussões

Nas Figuras 1 e 2, é apresentado o comportamento da perda de carga no leito em relação à vazão superficial de ar com reator em condição de temperatura ambiente e a temperatura de gaseificação (700-800 °C), respectivamente. Observa-se que à temperatura ambiente o comportamento da perda de carga no leito é similar ao descrito na literatura, em que em baixas vazões (entre 0 L/min e

30 L/min) a perda de carga aumenta de forma linear (diretamente proporcional à velocidade do gás), caracterizando um regime de leito fixo em que o gás apenas percola o leito afastando algumas partículas. Quando a condição de mínima fluidização é atingida, entre as vazões de 35 L/min e 41 L/min, a perda de carga no leito não varia com o aumento da vazão de ar. Novos incrementos de velocidade do gás caracterizam outros regimes de fluidização (por exemplo, *slug*, turbulento).

À temperatura de gaseificação (entre 700 °C e 800 °C na região do leito), tem-se que a região de fluidização ocorre em vazões menores do agente de gaseificação em comparação à temperatura ambiente. Em decorrência da instabilidade do controlador de vazões, não é possível caracterizar a região entre 0 L/min e 6 L/min (o controlador do gaseificador não consegue estabilizar nessas vazões), mas nota-se que a partir da vazão de 6 L/min a perda de carga se mantém constante com o aumento da vazão de ar, apresentando comportamento de fluidização típico de processo em leito fluidizado. Assim, pode-se considerar que a partir dessa vazão o leito de quartzo se comporta como um leito fluidizado clássico.

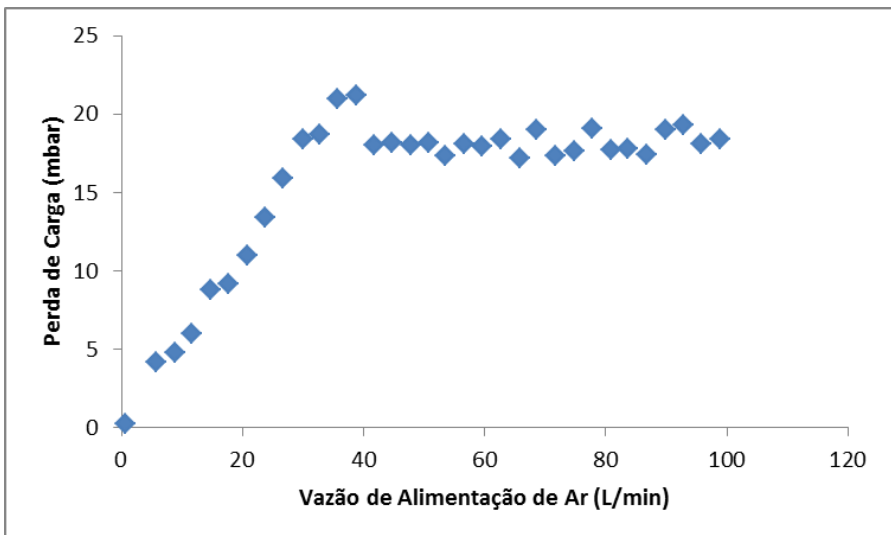


Figura 1. Perda de carga em leito de quartzo ocre em função da vazão de alimentação de ar à temperatura ambiente.

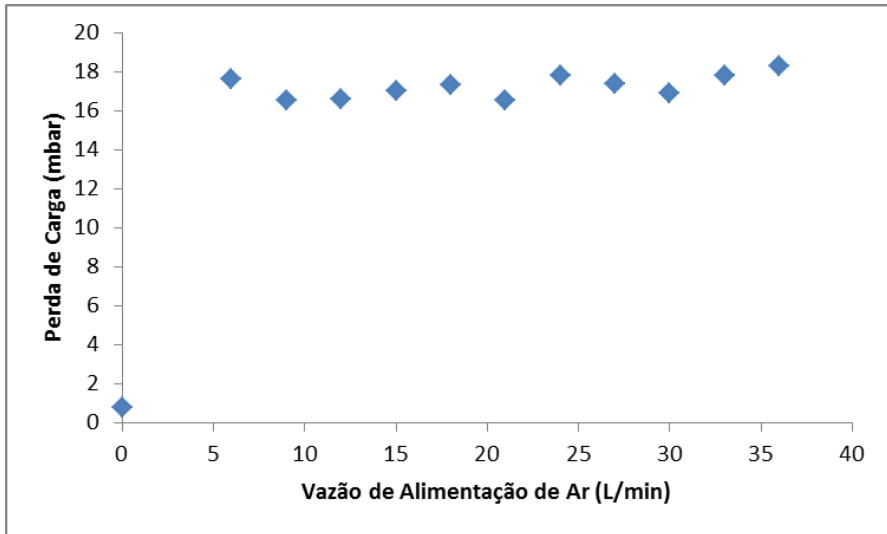


Figura 2. Perda de carga em leito de quartzo ocre em função da vazão de alimentação de ar à temperatura de gaseificação.

A partir da análise de fluidização e considerando uma vazão de alimentação de biomassa de 6,13 g/min (determinada experimentalmente), tem-se como razão de equivalência (RE) em função da vazão de alimentação de ar os valores de 0,30 e 0,39 para as vazões de 10 L/min e 13 L/min, respectivamente.

As Figuras 3 e 4 mostram a composição de hidrogênio, monóxido de carbono, dióxido de carbono e metano do gás produzido em processo de gaseificação de *Eucalyptus grandis* utilizando ar como agente de gaseificação para os valores de 0,30 e 0,39 de RE. Nota-se um pequeno aumento na concentração de CO₂ e uma redução na concentração de CH₄ e H₂ com aumento de RE. Já o CO se manteve estável para um RE de 0,30 e teve um aumento gradativo para um RE de 0,39.

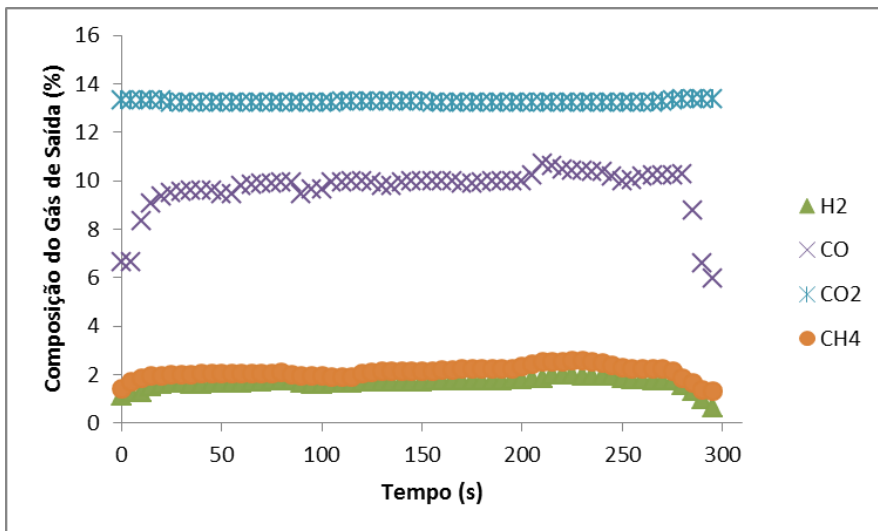


Figura 3. Composição do gás produzido de processo de gaseificação de *Eucalyptus grandis* utilizando ar como agente de gaseificação (RE=0,30).

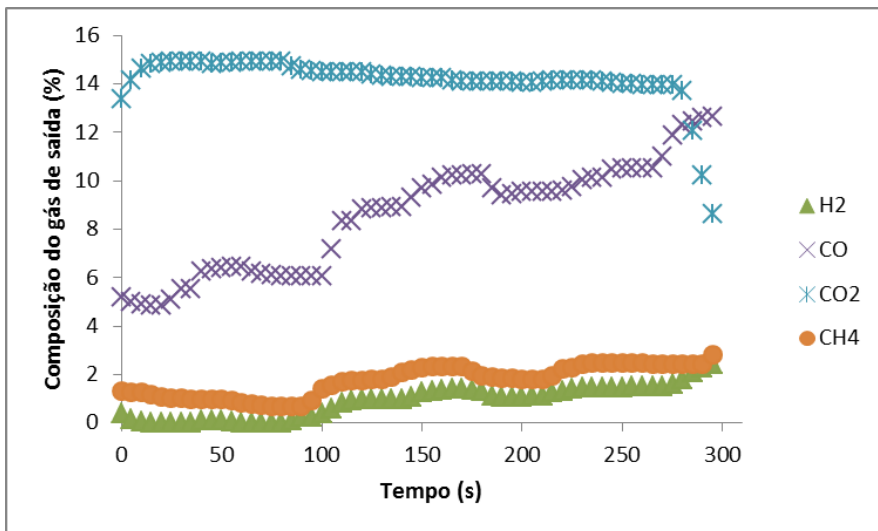


Figura 4. Composição do gás produzido de processo de gaseificação de *Eucalyptus grandis* utilizando ar como agente de gaseificação (RE=0,39).

Considerações finais

Por meio de ensaios de fluidização, foi possível determinar experimentalmente a vazão de ar mínima de fluidização, aproximadamente 6 L/min, para o quartzo ocre malha 30 à temperatura de gaseificação. Observou-se que para um RE de 0,30 foram obtidos os melhores resultados para composição do gás produto (maior concentração de H₂ e CH₄, e CO estável).

Um parâmetro importante na gaseificação em leito fluidizado é o agente de gaseificação, pois diferentes agentes produzem gases com diferentes poderes caloríficos e, embora a gaseificação com ar ofereça simplicidade operacional e não necessite de infraestrutura industrial complexa, o poder calorífico do gás produzido é baixo (4-7 MJ/Nm³). A gaseificação utilizando oxigênio e vapor produz um gás com poder calorífico médio (10-18 MJ/Nm³) (LOHA et al., 2011), porém, a produção de oxigênio puro tem custo elevado, o que torna a sua utilização no processo menos competitiva em comparação com o vapor, que além da vantagem econômica proporciona alta produção de hidrogênio no gás final (KARMAKAR; DATTA, 2011), que é atribuída à utilização do conteúdo de hidrogênio presente no vapor nas reações de *shift* e de reforma. Dessa forma, as próximas etapas do presente projeto serão analisar o comportamento da composição do gás combustível produzido em função da variação do agente de gaseificação, utilizando ar, vapor, nitrogênio e uma mistura destes, bem como o balanço de massa e energia do processo, além de caracterizar os coprodutos alcatrão, carvão e cinzas em condições ótimas de operação do reator.

Agradecimentos

Os autores agradecem à Capes, ao CNPq e à Finep. Particularmente, A. Anjos agradece ao CNPq (Projeto n° 406.812/2013-6) e A. Rosa agradece à Capes (Capes/Embrapa, Projeto n° 086404/2014), pela concessão de bolsas de estudo. Os autores agradecem, de forma especial, toda a ajuda prestada por Juarez Lopes da Silva, técnico da Embrapa Agroenergia.

Referências

BALAT, H.; KIRTAY, E. Hydrogen from biomass - Present scenario and future prospects. **International Journal of Hydrogen Energy**, Oxford, v. 35, n. 14, p. 7416-7426, 2010.

BASU, P. Combustion and gasification in fluidized beds. Boca Raton: CRC Press, 2006.

KARMAKAR, M. K.; DATTA, A. B. Generation of hydrogen rich gas through fluidized bed gasification of biomass. **Bioresource Technology**, Oxon, v. 102, n. 2, p. 1907-1913, 2011.

LOHA, C.; CHATTERJEE, P. K.; CHATTOPADHYAY, H. Performance of fluidized bed steam gasification of biomass - Modeling and experiment. **Energy Conversion and Management**, Oxford, v. 52, n. 3, p. 1583-1588, 2011.

RAVELLI, S.; PERDICHIZZI, A.; BARIGOZZI, G. Description, applications and numerical modelling of bubbling fluidized bed combustion in waste-to-energy plants. **Progress in Energy and Combustion Science**, Oxford, v. 34, n. 2, p. 224-253, 2008.

Development and optimization of a HILIC-UPLC-ELSD method for simultaneous determination of eleven polyols from glycerin bioconversion processes

Pedro Ribeiro Fontes¹, Patrícia Pinto Kalil Goncalves Costa², Kaian Amorim Teles³, Carolina Madalozzo Poletto⁴, Mônica Caramez Triches Damaso⁵, Clenilson Martins Rodrigues⁶

Abstract

To prevent the constant greenhouse emissions caused by fossil fuels, renewable energy sources are becoming of utmost relevance to diversify worldwide energy matrix. Alternative energy sources, such as biofuels and biomass are nowadays focus of several studies due to their great potential as matrices to bioenergy that can be used in complement to fossil fuels. Brazil has a huge potential for production of biofuels (e.g., 1st and 2nd generation ethanol, biodiesel) considering that the country has vegetal feedstocks and agricultural residues highly available, once it is one of the greatest agricultural commodities producer in the world. Biodiesel production generates considerable amounts of glycerol as a by-product and it is necessary to overcome this problem with feasible solutions. Bioconversion in biorefinery-based systems is one of them and monitoring the production of building blocks or value-added compounds from the bioconversion of renewable sources like glycerol is essential to assure effectiveness of such systems. In this work, we aimed to develop and perform an initial evaluation of some analytical parameters of a HILIC-UPLC-ELSD method for determination of eleven different polyols as products of glycerin bioconversion processes based on the biorefinery concept. The eleven target compounds were successfully separated and two methods were developed to correctly identify and quantify all of them. Preliminary evaluation of analytical parameters revealed that

¹ Farmacêutico, mestre em Ciências Farmacêuticas, Universidade de Brasília, pedro.r.fontes@colaborador.embrapa.br

² Química, mestre em Química Orgânica, analista da Embrapa Agroenergia, patricia.costa@embrapa.br

³ Farmacêutico, mestrando em Patologia Molecular, Universidade de Brasília, kaian.teles@gmail.com

⁴ Engenheira de alimentos, mestre em Microbiologia Agrícola e do Ambiente, analista da Embrapa Agroenergia, carolina.poletto@embrapa.br

⁵ Engenheira química, doutora em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos, pesquisadora da Embrapa Agroenergia, monica.damaso@embrapa.br

⁶ Químico, doutor em Química, pesquisador da Embrapa Agroenergia, clenilson.rodrigues@embrapa.br

both methods presented good linearity ($R^2 \geq 0.99$) and sensitivity ($LOQ \leq 100$ ng of analyte in the column). Experiments are currently being conducted to perform full method validation and to evaluate polyols production by biotransformation of glycerol.

Introduction

Diversification of energy matrix to include alternatives to fossil fuels is becoming a very important issue in several countries. Biomass and its derivatives are among the most promising options to the evidently limited fossil fuels. Examples to be cited include first and second generation ethanol, produced from vegetal feedstocks, and biodiesel, which can be produced either from vegetal oils or animal fats (DA SILVA et al., 2009).

Commercially, biodiesel is produced by a transesterification reaction between a source of triglycerides and an alcohol (methanol) in the presence of a catalyst. This reaction produces the fatty acid methyl esters (FAME) and glycerol as by-product (LEONETI et al., 2012). Since by-product glycerol is accumulating and neither sustainable nor rentable destination has been developed yet, searching for reuse solutions has become of utmost importance.

Polyols can be produced from the reduction of aldehyde or ketone functions from carbohydrates (ALMEIDA et al., 2012). They have a variety of uses, such as food additives, pharmaceutical adjuvants and intermediates in chemical synthesis. Polyols such as xylitol, mannitol and erythritol can also be obtained by biorefinery-based bioprocesses, which reuse industrial or agricultural wastes as carbon source to production of other value-added compounds by microorganisms.

It is important to consider that biochemical machinery of microorganisms is very complex and some biosynthesis routes may not be specific to produce only one type of polyol isomer. This complexity becomes greater with higher number of possible compounds produced by a specific microorganism. Given that, it is imperative to develop analytical tools to accurately identify and quantify such compounds, considering that their production would be very advantageous to both economic and environmental aspects. Polar compounds like polyols are generally evaluated using Hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC) as a separation mode. In this work is presented the development and an initial evaluation of some analytical validation parameters of a HILIC-UPLC-ELSD method

for determination of eleven different polyols as products of glycerin bioconversion processes.

Material and methods

Analytical standards and chemicals

Polyol standards (glycerol, two $C_4H_{10}O_4$ isomers [C4a and C4b], three $C_5H_{12}O_5$ isomers [C5a, C5b and C5c], four $C_6H_{14}O_6$ isomers [C6a, C6b, C6c and C6d] and one $C_7H_{16}O_7$ isomer [C7a] — Table 1) and trifluoroacetic acid (TFA) were purchased from Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA). HPLC-grade acetonitrile was purchased from Tedia® (Fairfield, OH, USA). Ultrapure water (18 M Ω cm) was obtained from a Direct 16 Milli-Q purification system (Millipore Co., Bedford, MA, USA).

Table 1. Polyol's isomers labeled according to the number of carbon atoms in the structure. Compound's identification is under protected rights in this work.

C3	C4	C5	C6	C7
Glycerol	C4a	C5a	C6a	C7a
	C4b	C5b	C6b	
		C5c	C6c	
			C6d	

Instruments and method validation

This work was started with the instrumental parameters previously described by Fontes et al. (2016) and this configuration (

Table 2, a) was used during the optimization of the HILIC-UPLC-ELSD gradient method. An Acquity UPLC H-class system (Waters®, Milford, MA, USA) and an evaporative light scattering detector (ELSD, Waters®) controlled by Empower PRO 3 software was used to perform method development. Separation was achieved on gradient mode (Table 2, **Erro! Fonte de referência não encontrada.**b and c) using a UPLC BEH-Amide column (2.1 x 150 mm, 1.7 μ m; Waters®) equipped with its respective pre-column.

Table 2. Instrumental parameter set for polyols determination. ^a previous method described by Fontes *et al.* (2016); ^b LC condition for C3, C4a, C4b, C5a, C5b, C5c, C6a, C6b and C7 separation. ^c LC condition for C6c and C6d separation.

System	Parameters	Initial condition ^a	Method 1 ^b	Method 2 ^c
ELSD	Nebulizer gas pressure (psi)	25.0	40.0	40.0
	Photomultiplier gain	200	200	200
	Drift tube temperature (°C)	34.0	50.0	50.0
	Nebulizer mode	Cooling	Cooling	Cooling
UPLC	Mobile phase flow (mL/min)	0.3	0.3	0.3
	Column temperature (°C)	65.0	30.0	73.0
	Injection volume (μL)	2.0	0.5	0.5
	Elution mode	Isocratic	Gradient	Gradient

The gradient was composed of 0.05% TFA in ultrapure water (A) and 0.05% TFA in acetonitrile (B), running as follows (percentages of A/B): 5/95 with isocratic elution (zero to 9.00 min); 15/85 to 34/66 with linear gradient elution (9.00 to 15.00 min); 5/95 with isocratic elution (15.01 to 20.00) for column re-equilibration. Total run time was 20.00 minutes.

Limits of detection (LOD) and quantification (LOQ) were determined by the signal-to-noise (S/N) method (ICH ..., 2005): the concentration at which the method returned $S/N \geq 3$ and $S/N \geq 10$, respectively. All analytical curves were determined in triplicate, and LOQ values were chosen as starting concentrations for the curves. Linearity was evaluated by linear least squares regression method and regression lines were subjected to Analysis of Variance (ANOVA; $\alpha = 0.05$) to evaluate statistical significance. Model fitting was determined by visual inspection of regression residuals scatter plot.

Results and discussion

The isocratic method that was before applied only to 3 analytes (FONTES *et al.*, 2016) was successfully adapted to the present scenario, which demands the separation of eleven different polyols. In the first condition (Table 2b), nine

polyols were successfully separated within 20 min. However, two C6 compounds (C6a and C6b) co-eluted at 11.12 min (Figure 1, A). For this reason, a new attempt to separate these analytes was performed changing the column temperature to higher values (second condition, Table 2c). The co-eluted C6 polyols were partially separated at 73°C and this condition allows the differentiation between the both C6 isomers as well as the quantification of them (Figure 1, B). To cover the eleven analytes, these two methods were adopted: Method 1 to all polyols with the exception of C6a and C6b; for these two, Method 2 was adopted.

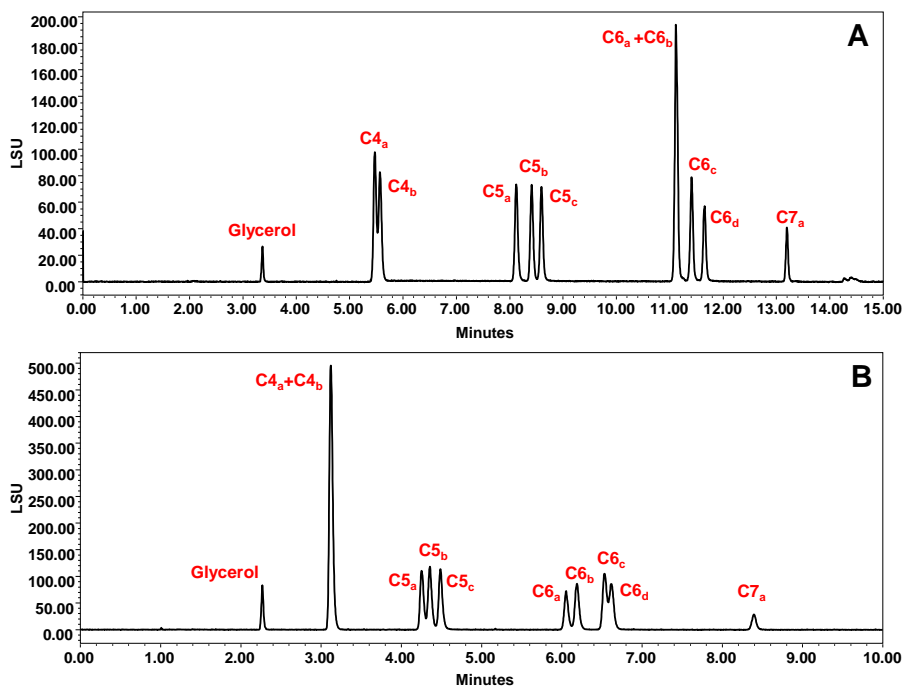


Figure 1. Chromatograms of a mix (11 polyols) standard solution at 400 µg/mL running as described in Table 2. (A) 15.00 minutes chromatogram cut running at 30°C and (B) 10.00 minutes chromatogram cut running at 73°C. LSU: arbitrary light scattering units.

The LOD and LOQ were determined to the eleven compounds and are represented in Table 3, in terms of analyte mass injected in the column.

Table 3. Limits of detection (LOD) and quantification (LOQ) and linearity coefficient of determination for each polyol studied.

Analyte	R ²	LOD	LOQ	Analyte	R ²	LOD	LOQ
Glycerol	0.9925	< 1 µg	1.5 µg	C6a	0.9998	50 ng	75 ng
C4a	0.999	50 ng	75 ng	C6b	0.9941	62.5 ng	0.1 µg
C4b	0.9995	50 ng	75 ng	C6c	0.9999	50 ng	75 ng
C5a	0.9998	40 ng	62.5 ng	C6d	0.9998	45 ng	62.5 ng
C5b	0.9999	50 ng	75 ng	C7a	0.9999	50 ng	75 ng
C5c	0.9997	40 ng	62.5 ng	----	----	----	----

Linearity data analysis was performed with both mass and peak area data transformed to the logarithm form, given that the mathematical relation between a compound mass and its ELSD response is not linear, but exponential (FONTES et al., 2016). Regression lines to all polyols studied in this work presented a coefficient of determination (R^2) ≥ 0.99 (Table 3). Regression models were also statistically significant and showed to be fitted to the data. Also, all angular coefficients were significantly different from zero.

Conclusions

The methods presented in this work showed to be suitable for the purpose they were developed, being capable to separate the eleven analytes considered in the study. The separation achieved makes possible the correct identification and quantification of all polyols' isomers within 15.00 minutes in Method 1 and 10.00 minutes in Method 2 (

Table 2; Figure 1). The HILIC-UPLC-ELSD methods showed to be linear in the range studied with all $R^2 \geq 0.99$. It also presented good sensitivity with all LOQs ≤ 100 ng of analytes mass on the column, with the exception of glycerol. Nevertheless, the higher LOQ observed for glycerol does not represent a loss on method quality, since this compound is expected to be found at high concentrations in real samples compared to the target polyols. The developed methods remain to be fully validated and applied to real samples of bioconverted glycerol. Experiments are currently being conducted to evaluate these analytical aspects.

Financial support

The authors gratefully acknowledge the financial support of the CNPq (Proc. N°. 404854/2013-3) and Embrapa (Proc. N°. 03.14.04.004.00.00). Thanks are also extended to CNPq for a fellowship to P.R.F and K.A.T.

References

ALMEIDA, J. R.; FAVARO, L. C.; 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, 2012.

DA SILVA, G. P.; MACK, M.; CONTIERO, J. Glycerol: a promising and abundant carbon source for industrial microbiology. **Biotechnology Advances**, Oxford, v. 27, n. 1, p. 30-9, 2009.

FONTES, P. R.; RIBEIRO, J. A. A.; COSTA, P. P. K. G.; DAMASO, M. C. T.; GONZALEZ, W. D.; DOS SANTOS, C. M. C.; ABDELNUR, P. V.; RODRIGUES, C. M. Development and validation of a HILIC-UPLC-ELSD method based on optimized chromatographic and detection parameters for the quantification of polyols from bioconversion processes. **Analytical Methods**, Cambs, v. 8, n. 9, p. 2048-2057, 2016.

ICH Harmonised Tripartite Guideline: validation of analytical procedures: text and methodology Q2(R1). [S.l.]: ICH, 2005. 13 p. International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use.

LEONETI, A. B.; ARAGÃO-LEONETI, V.; DE OLIVEIRA, S. V. W. B. Glycerol as a by-product of biodiesel production in Brazil: Alternatives for the use of unrefined glycerol. **Renewable Energy**, Oxford, v. 45, p. 138-145, 2012.

Estabilidade do óleo de polpa de macaúba bruto e refinado armazenado em diferentes condições

Rodrigo da Silveira Nascimento Siqueira¹, Gabriela A. B. Brito², Aline F. de Carvalho³, Simone Mendonça⁴, Simone Palma Fávoro⁵, Lorena Costa Garcia⁶

Resumo

O óleo de polpa de macaúba, para ser incorporado na mistura para produção de biodiesel ou para fins alimentícios, deve atender a critérios de qualidade. Para tal, o processo de refino faz-se necessário. O presente trabalho teve como objetivo avaliar o efeito de um processo de refino e das condições de armazenamento sobre parâmetros de qualidade do óleo de polpa de macaúba. O óleo de polpa obtido por solvente foi refinado por meio das etapas de degomagem, neutralização e clarificação. Tanto o óleo bruto como o refinado foram armazenados por 60 dias nas condições de presença e ausência de luz e sob temperatura ambiente e de refrigeração. Verificou-se que o óleo refinado apresentou ligeira redução da acidez, redução à metade do índice de peróxido e perda de 2/3 do conteúdo de carotenoides. Ao final do armazenamento, a acidez não diferiu entre o óleo bruto e refinado. O índice de peróxido no óleo bruto aumentou nas condições de armazenamento em temperatura ambiente, sendo a oxidação ainda mais intensa com a incidência de luz. Conclui-se que o refino favoreceu a qualidade do óleo de polpa de macaúba independentemente das condições de armazenamento.

Introdução

A produção de biodiesel no Brasil está calcada, sobretudo, em duas fontes de matéria-prima: óleo de soja (75% a 85%) e gorduras animais (15% a 20%) (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS INDÚSTRIAS DE ÓLEOS VEGETAIS, 2016),

¹ Farmacêutico, Universidade Católica de Brasília, farm.siqueira@gmail.com

² Farmacêutica, Universidade Católica de Brasília, gabrielaabrito@gmail.com

³ Graduanda em Farmácia, Universidade de Brasília, alinefcarvalho02@gmail.com

⁴ Farmacêutica, doutora em Saúde Pública, pesquisadora da Embrapa Agroenergia, simone.mendonca@embrapa.br

⁵ Agrônoma, doutora em Ciências de Alimentos, pesquisadora da Embrapa Agroenergia, simone.favaro@embrapa.br

⁶ Engenheira de alimentos, doutora em Engenharia de Alimentos, analista da Embrapa Agroenergia, lorena.garcia@embrapa.br

necessitando de uma diversificação para pavimentar as demandas crescentes. Outros setores industriais também têm tido aumento no consumo de óleos vegetais. Aliado a esse contexto e a aspectos de produção agrícola e industrial sustentável, a palmeira macaúba (*Acrocomia aculeata*) desponta como uma das mais promissoras espécies na produção de óleo vegetal para diversas áreas do território brasileiro. O elevado rendimento em óleo, com expectativas que podem superar os 4.000 kg/ha, as características físico-químicas dos óleos de polpa e amêndoa e o aproveitamento dos coprodutos são pontos muito favoráveis para o estabelecimento da cadeia produtiva da macaúba (PIRES et al., 2013; EVARISTO et al., 2016). Até o momento, a exploração da macaúba no Brasil tem sido feita de forma extrativista e em pequena escala, não alcançando o real potencial de desenvolvimento socioeconômico que pode ser gerado em sistemas produtivos com maior nível de organização.

Os óleos vegetais estão suscetíveis à degradação por fatores extrínsecos e intrínsecos, que vão desde as condições de colheita da matéria-prima até o armazenamento dos óleos já extraídos. Fatores como temperatura, composição do óleo, atmosfera gasosa do meio, incidência de luz e presença de compostos pró ou antioxidantes, são os preponderantes em definir a ocorrência e a velocidade de reações de degradação de óleos vegetais. Geralmente, os óleos brutos passam por um processo de refino para atender padrões específicos para cada área de consumo e contribui para a estabilidade do óleo porque remove substâncias com atividade pró-oxidante. A finalidade do óleo irá determinar o uso ou não de todas as etapas de refino, quais sejam degomagem, neutralização, clarificação ou branqueamento e desodorização (VICARI, 2013). Poucos estudos foram divulgados até o momento sobre o processamento do fruto e estabilidade dos óleos extraídos da macaúba durante o armazenamento (DEL RÍO et al., 2016; NUNES, 2013). Dessa forma, é necessário gerar mais conhecimento para estabelecer condições de processo e armazenamento para os óleos de macaúba, sobretudo para o óleo de polpa que corresponde à maior porção de óleo do fruto e contém alto teor de ácido oleico (CONCEIÇÃO et al., 2015).

Para tanto, o presente trabalho teve como objetivo avaliar parâmetros de qualidade de óleo de polpa de macaúba bruto e refinado, ambos armazenados sob diferentes condições de temperatura e presença/ausência de luz.

Material e métodos

Frutos de macaúba, coletados no Município de Corumbá, MS, e armazenados a $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ foram secos a $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 48 horas e despolpados mecanicamente em despolpadeira marca RM Ltda. Para a extração do óleo, a polpa seca foi adicionada de éter de petróleo e mantida *overnight* a $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ em agitação orbital. O solvente foi removido por rotaevaporação.

Uma parte do óleo obtido foi refinada, sendo executadas as etapas de degomagem, neutralização e clarificação, visando ao uso para biocombustíveis. Na degomagem, o óleo foi aquecido a $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ sob agitação constante durante 30 minutos. Em seguida, foram adicionados 4% de ácido fosfórico e a mistura foi aquecida a $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 5 minutos, sendo então centrifugada a 3.900 rpm por 20 minutos. A seguir, fez-se processo de neutralização, no qual foi adicionado 10% de NaOH 0,2 mol/L em relação à massa de óleo e novamente a mistura foi centrifugada a 3.900 rpm por 20 minutos. Na etapa de clarificação, foi adicionado 1% de carvão ativado ao óleo e então a mistura foi seca em um rotaevaporador por 30 minutos a $90\text{ }^{\circ}\text{C}$ com pressão de 10,67 kPa. Por fim, foi realizada a centrifugação da amostra a 3.900 rpm a $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 20 minutos, obtendo assim o óleo refinado.

A outra parte do óleo permaneceu em seu estado bruto. Ambos foram acondicionados em recipientes de vidro transparente. As variáveis independentes avaliadas foram: tipo de óleo (bruto e refinado, temperatura de armazenamento ($10\text{ }^{\circ}\text{C}$ e $25\text{ }^{\circ}\text{C}$), incidência de luz (embalagem sem e com proteção de papel alumínio) e tempo de armazenamento (0, 15, 30, 45 e 60 dias). Portanto, neste estudo foram avaliados oito tratamentos, sendo eles: óleo bruto geladeira com proteção (BGCP); óleo bruto geladeira sem proteção (BGSP); óleo bruto bancada com proteção (BBCP); óleo bruto bancada sem proteção (BBSP); óleo refinado geladeira com proteção (RGCP); óleo refinado geladeira sem proteção (RGSP); óleo refinado bancada com proteção (RBCP); óleo refinado bancada sem proteção (RBSP).

Os óleos foram avaliados quanto ao índice de acidez (ACID..., 2007), índice de peróxido (PEROXIDE..., 2007) e quantificação de carotenos totais (SIEW et al., 1995). A determinação do índice de peróxido foi realizada nos tempos 0, 15 e 45 dias e as demais análises foram realizadas também após 60 dias de armazenamento. Os índices de acidez e peróxidos foram determinados em

titulador automático (Metrohm, modelo 907). A quantificação de carotenos totais ($\lambda=446\text{nm}$) foi realizada em espectrofotômetro UV-VIS (Agilent, modelo Cary 60).

Resultados e discussão

Índice de Acidez

A acidez do óleo refinado foi ligeiramente menor do que a do óleo bruto (Tabela 1).

Tabela 1. Índice de acidez (mgKOH/g de óleo) de óleo bruto e refinado de macaúba armazenados sob diferentes condições.

Amostra	0 dias	15 dias	30 dias	45 dias	60 dias
BGCP	16,36	14,28	16,34	15,14	18,37
BGSP	16,71	16,02	16,42	15,87	17,55
BBCP	16,47	15,27	16,41	16,02	**
BBSP	16,56	15,57	16,22	16,19	18,77
RGCP	15,75	14,36	15,27	15,30	**
RGSP	15,69	14,59	15,40	15,00	18,81
RBCP	15,71	14,61	15,58	15,28	17,77
RBSP	15,99	14,70	15,50	15,29	18,04

BGCP: óleo bruto geladeira com proteção; BGSP: óleo bruto geladeira sem proteção; BBCP: óleo bruto bancada com proteção; BBSP: óleo bruto bancada sem proteção; RGCP: óleo refinado geladeira com proteção; RGSP: óleo refinado geladeira sem proteção; RBCP: óleo refinado bancada com proteção; RBSP: óleo refinado bancada sem proteção; **: análise não realizada por falta de amostra.

Até 45 dias a acidez dos óleos manteve-se estável, porém após 60 dias o índice de acidez aumentou em todos os tratamentos.

Índice de Peróxido

O processo de refino e o método de armazenamento influenciaram no índice de peróxidos do óleo de macaúba estudado (Tabela 2). Os óleos refinados apresentaram menores índices de peróxidos, uma vez que o processo de refino remove substâncias oxidantes e entre elas as que favorecem a formação de peróxidos pelo contato do óleo com o oxigênio. Em relação ao local de armazenamento, os óleos mantidos na geladeira apresentaram menores índices de peróxido, em decorrência da redução da velocidade de oxidação. A incidência de luz favoreceu a formação de peróxidos no óleo bruto. As amostras deixadas

expostas na bancada (BBSP) apresentaram valor de peróxido mais do que o dobro daquelas que foram revestidas por papel alumínio (BBCP) (Tabela 2).

Tabela 2. Índice de peróxido (meq/kg de óleo) de óleo de macaúba bruto e refinado armazenado sob diferentes condições.

Amostra	0 dias	15 dias	45 dias
BGCP	10,74	10,20	10,77
BGSP	10,04	10,75	11,19
BBCP	10,02	12,30	16,54
BBSP	13,11	17,66	34,81
RGCP	7,79	7,24	7,26
RGSP	7,53	7,45	8,65
RBCP	7,07	7,90	8,10
RBSP	7,80	8,21	9,06

BGCP: óleo bruto geladeira com proteção; BGSP: óleo bruto geladeira sem proteção; BBCP: óleo bruto bancada com proteção; BBSP: óleo bruto bancada sem proteção; RGCP: óleo refinado geladeira com proteção; RGSP: óleo refinado geladeira sem proteção; RBCP: óleo refinado bancada com proteção; RBSP: óleo refinado bancada sem proteção.

Carotenos totais

O processo de refino foi eficiente em remover em torno de 2/3 do teor inicial de carotenos do óleo bruto (Tabela 3). A temperatura de armazenamento influenciou no teor de carotenos para ambos os óleos, e em condição ambiente houve redução desses pigmentos. A decomposição dos carotenoides foi potencializada pela presença da luz, tanto no óleo bruto como refinado (Tabela 3).

Tabela 3. Teor de carotenos das amostras de óleo de macaúba (ppm)

Amostra	0 dias	15 dias	30 dias	45 dias	60 dias
BGCP	134,38	146,72	159,95	123,42	184,53
BGSP	138,41	139,76	129,88	121,77	121,15
BBCP	119,05	120,26	108,29	97,01	90,89
BBSP	112,21	104,80	92,22	74,80	50,86
RGCP	31,41	35,10	33,25	30,30	31,81
RGSP	34,26	32,51	34,01	29,97	30,84
RBCP	27,86	35,08	33,20	30,66	26,12
RBSP	30,85	32,96	31,00	27,87	25,52

BGCP: óleo bruto geladeira com proteção; BGSP: óleo bruto geladeira sem proteção; BBCP: óleo bruto bancada com proteção; BBSP: óleo bruto bancada sem proteção; RGCP: óleo refinado geladeira com proteção; RGSP: óleo refinado geladeira sem proteção; RBCP: óleo refinado bancada com proteção; RBSP: óleo refinado bancada sem proteção.

Conclusão

O processo de refino mostrou-se eficiente para retardar a degradação oxidativa do óleo de polpa de macaúba. O armazenamento em temperatura ambiente influencia negativamente a qualidade do óleo. Esse efeito negativo é potencializado pela incidência de luz. Portanto, o óleo de macaúba deve ser armazenado ao abrigo da luz para favorecer a manutenção de sua qualidade.

Apoio financeiro

Agradecemos o apoio financeiro da Embrapa (Projeto Bocpan 02.11.01.033.00) e da Finep (Projeto Propalma).

Referências

ACID value: AOCS official method Cd 3d-63. In: AOCS methods for biodiesel feedstock quality: official methods and recommended practices of the AOCS. Urbana: AOCS Press, 2007.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS INDÚSTRIAS DE ÓLEOS VEGETAIS. **Biodiesel**: produção por tipo de matéria-prima: maio - 2016. Dado de produção de biodiesel por tipo de matéria-prima. Disponível em: <<http://www.abiove.org.br/site/index.php?page=estatistica&area=NC0yLTE=>>. Acesso: ago. 2016.

CONCEIÇÃO, L. D. H. C. S. da.; JUNQUEIRA, N. T. V.; MOTOIKE, S. Y.; PIMENTEL, L. D.; FAVARO, S. P.; BRAGA, M. F.; ANTONIASSI, R. Macaúba. In: LOPES, R.; OLIVEIRA, M. do S. P. de; CAVALLARI, M. M.; BARBIERI, R. L.; CONCEIÇÃO, L. D. H. C. S. da. **Palmeiras nativas do Brasil**. Brasília, DF: Embrapa, 2015. p. 271-305.

CORSINI, M. S.; JORGE, N. Estabilidade oxidativa dos óleos vegetais utilizados em frituras de mandioca palito congelada. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 26, n. 1. p. 27-32, 2006. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0101-20612006000100005&lng=en&nrm=iso>. Acesso em: ago. 2016.

DEL RÍO, J. C.; EVARISTO, A. B.; MARQUES, G.; MARTÍN-RAMOS, P.; MARTÍN-GIL, J.; GUTIÉRREZ, A. Chemical composition and thermal behavior of the pulp and kernel oils from macauba palm (*Acrocomia aculeata*) fruit. **Industrial Crops and Products**, Amsterdam, v. 8, p. 294-304, 2016.

EVARISTO, A. B.; GROSSI, J. A. S.; CARNEIRO, A. D. O.; PIMENTEL, L. D.; MOTOIKE, S. Y.; KUKI, K. N. Actual and putative potentials of macauba palm as feedstock for solid biofuel production from residues. **Biomass & Bioenergy**, Oxford, v. 8., p. 18-24, 2016.

NUNES, A. A. **Óleo da polpa de macaúba (*Acrocomia aculeata* (Jacq) Lood. ex Mart.) com alta qualidade: processo de refino e termoestabilidade**. 2013. 126 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade Católica Dom Bosco, Campo Grande, MS. Disponível em:

<<https://www.alice.cnptia.embrapa.br/alice/bitstream/doc/967176/1/DISSERTACAOMESTRADO2013ANGELA.pdf>>. Acesso em: ago. 2016

PEROXIDE value: acetic acid-chloroform method Cd 8-53. In: AMERICAN OIL CHEMISTS' SOCIETY. **Official methods and recommended practices of the AOCS**. Urbana: AOCS Press, 2007.

PIRES, T. P.; SOUZA, E. D.; KUKI, K. N.; MOTOIKE, S. Y. Ecophysiological traits of the macaw palm: a contribution towards the domestication of a novel oil crop. **Industrial Crops and Products**, v. 44, p. 200-210, 2013.

SIEW, W. L.; TANG, T. S.; TAN, Y. A. **Methods of test for palm oil and palm oil products**. Kuala Lumpur : Palm Oil Research Institute of Malaysia, 1995. 181 p.

VICARI, J. da S. O. **Qualidade de óleo de soja refinado embalado em PET (Polietileno Tereftalato) armazenado na presença e ausência de luz**. 2013. 68 f. il. Dissertação (mestrado em Biotecnologia) - Universidade Católica Dom Bosco, Campo Grande, MS. Disponível em: <<http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/80913/1/dissertacao-jaice-final.pdf>>. Acesso em: ago. 2016.

Desenvolvimento e aplicação de um método RP-UPLC-PDA para a análise simultânea de dez ácidos orgânicos derivados da bioconversão de glicerina

Flávia Soares Vieira¹, Augusto Lopes Souto², Patrícia Pinto Kalil Gonçalves Costa³, Fernanda Justen⁴, Talita Gabriela Salles Ramos⁵, Karen Santos de Lima⁶, João Ricardo Moreira de Almeida⁷, Mônica Carames Triches Damaso⁸, Clenilson Martins Rodrigues⁹

Resumo

A glicerina é um coproduto da produção do biodiesel que possui baixo valor comercial. Sabe-se que microrganismos podem convertê-la em substâncias de maior valor agregado. Nesse contexto, este trabalho foi desenvolvido com o objetivo de estabelecer uma metodologia analítica simples e assertiva para identificar e quantificar ácidos orgânicos que podem ser obtidos nas etapas de bioconversão de glicerina. Utilizando a técnica de cromatografia líquida de ultra-alta eficiência (UPLC) acoplada ao detector de arranjo de fotodiodos (PDA), pretendeu-se avaliar a bioconversão da glicerina em ácidos orgânicos de forma rápida e eficaz. Ao empregar o sistema de eluição em gradiente constituído de solução tamponada com H_2PO_4 a 0,01 M (pH 2) e metanol, foi possível separar e identificar 10 ácidos orgânicos em 15 minutos de análise. Na etapa de quantificação dos compostos de interesse, foram geradas curvas analíticas pela técnica de calibração externa. As curvas apresentaram linearidade satisfatória com coeficiente de determinação $> 0,999$. A aplicação desse novo método cromatográfico foi capaz de auxiliar na prospecção de microrganismos produtores de ácidos orgânicos de valor agregado. Sendo assim, o método desenvolvido representa uma importante ferramenta analítica para avaliar a capacidade de

¹ Farmacêutica, mestranda em Química, Universidade Federal de Goiás, flavia.vieira@colaborador.embrapa.br

² Farmacêutico, doutor em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, pós-doutorando na Embrapa Agroenergia, augusto.souto@colaborador.embrapa.br

³ Química, mestre em Química Orgânica, analista da Embrapa Agroenergia, patricia.costa@embrapa.br

⁴ Bióloga, mestranda em Tecnologias Química e Biológica, Universidade de Brasília, fernanda.justen@colaborador.embrapa.br

⁵ Bióloga, doutoranda em Tecnologias Química e Biológica, Universidade de Brasília, talita.ramos@colaborador.embrapa.br

⁶ Bióloga, Universidade de Brasília, karen.lima@colaborador.embrapa.br

⁷ Biólogo, doutor em Microbiologia Aplicada, pesquisador da Embrapa Agroenergia, joao.almeida@embrapa.br

⁸ Engenheira Química, doutora em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos, pesquisadora da Embrapa Agroenergia, monica.damaso@embrapa.br

⁹ Químico, doutor em Química, pesquisador da Embrapa Agroenergia, clenilson.rodrigues@embrapa.br

produção dessa classe de compostos-alvo a partir de processos de agregação de valor da glicerina.

Introdução

Na busca de novas fontes de energia, o biodiesel surgiu como uma alternativa de combustível sustentável. Pesquisas sugerem que o biodiesel seja menos poluente do que o diesel de origem fóssil, sendo uma importante forma de progresso tecnológico para limitar as emissões de gases do efeito estufa e diminuir a poluição ambiental. (QUISPE *et al.*, 2013). O biodiesel é comercialmente obtido a partir de óleos vegetais e gorduras por processos de transesterificação. No processo também é formado cerca de 10% de glicerina, coproduto de baixo valor comercial (QUISPE *et al.*, 2013; SILVA *et al.*, 2009).

A produção mundial de biodiesel tem aumentado rapidamente na última década. Entre as razões para esse aumento está a maior preocupação com os efeitos dos combustíveis fósseis sobre o meio ambiente. A crescente produção de biodiesel acarretará grandes excedentes de glicerina impura, trazendo novos desafios de como converter ou usar o glicerol, a fim de melhorar a viabilidade econômica da cadeia produtiva desse biocombustível (QUISPE *et al.*, 2013). Sabe-se que microrganismos podem naturalmente utilizar glicerol como fonte de energia/carbono e convertê-lo em produtos químicos de maior valor agregado (SILVA *et al.*, 2009).

Diferentes classes de substâncias podem ser obtidas a partir da bioconversão da glicerina, dentre elas os ácidos orgânicos (ASAD-UR-REHMAN *et al.*, 2008). Diversas metodologias têm sido empregadas para detecção de ácidos em diferentes matrizes, sendo a cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por arranjo de fotodiodos (HPLC-PDA) a técnica mais utilizada em virtude da sua simplicidade, mas ainda muito morosa (AQUINO *et al.*, 2015; SHUI & LEONG, 2002). No entanto, há poucos estudos que utilizam cromatografia líquida de ultra-alta eficiência (UPLC) para monitorar um conjunto amplo de ácidos orgânicos de forma simultânea e rápida, sendo muito raro encontrar aplicações específicas para a área de biotecnologia.

Dessa forma, este trabalho teve como objetivo desenvolver um método de análise rápido e simples baseado em cromatografia líquida de ultra-alta eficiência (UPLC) para detectar e quantificar dez ácidos orgânicos de cadeia curta (C2-C6) e aplicar a metodologia analítica para monitorar a bioconversão de glicerol.

Materiais e métodos

Reagentes e materiais

Foram utilizados Metanol grau HPLC (J.T. Baker[®]), fosfato de potássio monobásico anidro (Sigma-Aldrich), ácido orto-fosfórico P.A. 85% (Vetec), e os padrões de ácidos orgânicos AO₁, AO₂, AO₃, AO₄, AO₅, AO₆, AO₇, AO₈, AO₉, e AO₁₀. Água ultrapura foi obtida utilizando um sistema de purificação Milli-Q (Millipore Co., Bedford, MA, EUA).

Instrumentação

As análises foram realizadas no cromatógrafo UPLC-PDA modelo Acquity H-class (Waters) que consiste em um sistema de bombeamento de solvente quaternário, um desgaseificador a vácuo, um gerenciador de amostra com termostato FTN (*Flow-Through Needle*), um forno de coluna equipado com pré-aquecedor de solvente (*pre-heater*) e detector de arranjos de fotodiodos (PDA), todos controlados pelo software Empower 3. As separações foram realizadas em coluna de fase reversa (C18) HSS T3 (2,1 X 150 mm, 1,8 µm, Waters[®]), equipada com pré-coluna com mesma composição de fase estacionária. A fase móvel utilizada foi: A) solução tampão fosfato monobásico de potássio 0,01 M (pH 2,0) e B) metanol. A separação foi realizada em eluição em gradiente à vazão de 0,3 mL/min. A temperatura da coluna foi mantida a 30 °C.

Resultados e discussão

Diferentes condições analíticas foram testadas a fim de se obter separação e resolução cromatográfica para todos os ácidos AO₁₋₁₀ no menor tempo de análise possível. Foram avaliados de forma unidimensional diferentes valores de pH, vazão de fase móvel, solventes e temperatura da coluna.

Os valores de pH utilizados foram 2,0; 2,2; 2,5; 3,0; 3,5 e a melhor separação/resolução foi obtida em pH 2,0. Nessa condição, os ácidos orgânicos estudados apresentaram-se, predominantemente, na forma não ionizada. Variou-se a composição do solvente orgânico entre metanol e isopropanol havendo perda de resolução dos picos com a utilização de isopropanol. Foram avaliadas as temperaturas do forno da coluna de 20 °C, 25 °C e 30 °C.

Optou-se por trabalhar na condição a 30 °C, pois menores temperaturas não trouxeram ganho na separação dos ácidos, além de terem aumentado o tempo de eluição de alguns analitos. Foram avaliados os modos de eluição gradiente e isocrático. A eluição em gradiente permitiu que os ácidos de diferentes polaridades fossem eluídos na mesma corrida cromatográfica, permitindo ainda ajustar a resolução dos picos por meio da variação da polaridade da fase móvel.

Para o estudo da vazão da fase móvel, foram estudados os valores de 0,3 mL/min e 0,4 mL/min. Verificou-se que a vazão a 0,3 mL/min forneceu um maior número de pratos teóricos para todos os ácidos, exceto para o último ácido orgânico eluído, AO₁₀.

Variou-se também a composição da fase móvel com alterações da proporção final do solvente orgânico entre 15% e 25%. Verificou-se que o uso do gradiente chegando a 25% de metanol trouxe melhorias para a resolução de todos os picos, em especial para o AO₁₀, resolvendo o problema de resolução que o uso da vazão de 0,3 mL trouxe para esse ácido. Na Tabela 1, é apresentado o gradiente de eluição otimizado para a fase móvel utilizada neste estudo e, na Figura 1, é ilustrado o perfil de separação dos dez ácidos orgânicos no método estabelecido.

Tabela 1. Gradiente de eluição da fase móvel.

Tempo (min)	A (%)	B (%)
0	100	0
1,50	100	0
5,00	95	5
8,00	75	25
9,00	75	25
9,01	100	0
12,00	100	0

A = Tampão KH₂PO₄ 0,01 M; B = Metanol

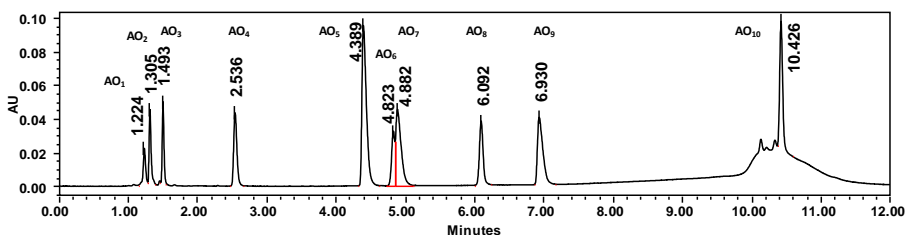


Figura 1. Perfil cromatográfico de separação dos dez ácidos orgânicos obtidos a partir da análise por RP-UPLC-PDA (210 nm).

Análises quantitativas

Soluções-estoque de cada um dos ácidos orgânicos estudados foram individualmente preparadas em diferentes concentrações. Os padrões dos ácidos AO₁ a AO₆, AO₈ e AO₉ foram diluídos em água ultrapura e os padrões dos ácidos AO₇ e AO₁₀ foram diluídos em água:metanol (2:8). Curvas analíticas foram preparadas a partir da diluição de volumes apropriados dos mix das soluções-estoque em água:metanol (2:8), para os AO₇ e AO₁₀ e em água Milli-Q para os demais ácidos orgânicos estudados. Na etapa de quantificação foram realizadas injeções em triplicata de cada um dos níveis da curva analítica.

Tabela 2. Dados de regressão linear para os ácidos orgânicos estudados.

Análito	Faixa linear	R ²
AO ₁	0,002 – 0,9 mg/mL	0,9998
AO ₂	0,02 – 2,0 mg/mL	0,9999
AO ₃	0,02 – 4,0 mg/mL	0,9999
AO ₄	0,02 – 6,0 mg/mL	0,9999
AO ₅	0,02 – 6,0 mg/mL	0,9999
AO ₆	0,125 – 5 µg/mL	0,9993
AO ₇	0,03 – 9,0 mg/mL	0,9999
AO ₈	0,2 – 150 µg/mL	0,9999
AO ₉	0,03 – 4,5 mg/mL	0,9999
AO ₁₀	0,18 – 20 µg/mL	0,9999

A linearidade de cada composto foi estabelecida a partir de curvas analíticas que foram construídas plotando a área do pico *versus* concentração dos padrões. Na Tabela 2, estão apresentados os valores da faixa linear e do coeficiente de

determinação linear (R^2) das curvas analíticas obtidas em 260 nm para o AO₁₀ e em 210 nm para os demais ácidos. Todas as curvas analíticas mostraram boa linearidade ($R^2 > 0,999$) como uma função área *versus* concentração dentro dos intervalos testados.

Aplicação do método RP-UPLC-PDA para a análise de ácidos orgânicos em amostras bioconvertidas

Para confirmar a aplicabilidade do método, alíquotas de amostras de glicerina submetidas a quatro diferentes processos de bioconversão por microrganismos foram centrifugadas, diluídas em água ultrapura e analisadas no sistema RP-UPLC-PDA. Foi identificada bioconversão com produção em níveis significativos de quatro tipos de ácidos orgânicos nas amostras analisadas durante o estudo. Os valores de concentração calculados a partir das equações de regressão linear para os ácidos orgânicos encontrados são apresentados na Tabela 3.

Tabela 3. Concentração de ácidos orgânicos em diferentes amostras geradas pela bioconversão de glicerina*, calculada a partir da aplicação do método RP-UPLC-PDA.

Analito	Amostra	Concentração
AO ₅	Processo 1	0,7 g/L
AO ₁	Processo 2	0,9 g/L
AO ₂	Processo 3	5,8 g/L
AO ₈	Processo 4	8,5 g/L

*Os processos de bioconversão não são descritos neste trabalho por razões de sigilo.

Conclusões

Neste estudo, foi possível estabelecer um método para análise rápida e simultânea de dez ácidos orgânicos por UPLC-PDA. Os parâmetros cromatográficos foram otimizados para fornecer a melhor resposta analítica para o método proposto. A técnica mostrou-se promissora para realizar *screening* de microrganismos eficientes na bioconversão de glicerina para produção de ácidos orgânicos de valor agregado. Dentre os processos mais efetivos avaliados, o método proposto indicou a produção dos ácidos AO₁, AO₂, AO₅ e AO₈ em concentrações que variaram de 0,7 g/L a 8,5 g/L. Dessa forma, o método proposto

se torna uma ferramenta analítica valiosa para estudos biotecnológicos de aproveitamento de biomassa e seus coprodutos, como demonstrado para o caso específico de agregação de valor à glicerina.

Apoio financeiro

Este estudo foi apoiado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e pela Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa).

Referências

- AQUINO, A. C. M. S.; AZEVEDO, M. S.; RIBEIRO, D. H. B.; COSTA, A. C. O.; AMANTE, E. R. Validation of HPLC and CE methods for determination of organic acids in sour cassava starch wastewater. **Food Chemistry**, Oxon, v. 172, p. 725–730, 2015.
- ASAD-UR-REHMAN; WIJESEKARA, R. G. S.; NOMURA, N.; SATO, S.; MATSUMURA, M. Pre-treatment and utilization of raw glycerol from sunflower oil biodieselfor growth and 1,3-propanediol production by *Clostridium butyricum*. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, Susex, v. 83, n. 7, p. 1072–1080, 2008.
- QUISPE, C. A. G.; CORONADO, C. J. R.; CARVALHO, Jr J. A. Glycerol: Production, consumption, prices, characterization and new trends in combustion. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, Oxford, v. 27, p. 475–493, 2013.
- SHUI, G.; LEONG, L. P. Separation and determination of organic acids and phenolic compounds in fruit juices and drinks by high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 977, n. 1, p. 89-96, 2002.
- SILVA, G. P.; MACK, M.; CONTIERO, J. Glycerol: A promising and abundant carbon source for industrial microbiology. **Biotechnology Advances**, nº 27, p. 30-39, 2009.

Estudo da vida útil das fibras da prensagem de dendê híbrido

Paula Andrea Osorio Carmona¹, Marina Borges Guimarães², Raquel Bombarda Campanha³, Lorena Costa Garcia⁴, Marcos Enê Chaves Oliveira⁵, Félix Gonçalves de Siqueira⁶, Simone Mendonça⁷

Resumo

Apesar de o óleo ser o principal produto da palma de óleo, durante sua produção são gerados resíduos, como as fibras da prensagem, que contêm mais de 8% do óleo original e podem ser utilizadas para a obtenção de produtos de maior valor agregado, como, por exemplo, o β -caroteno. O β -caroteno é um pigmento lipossolúvel, precursor da vitamina A, que apresenta importante poder antioxidante, com ampla aplicação nas indústrias cosmética e alimentícia. Para que a atividade antioxidante desse composto seja mantida, é importante que não se oxide durante o armazenamento da matéria-prima ou sua extração. O presente trabalho teve como objetivo avaliar a vida útil das fibras frente a alguns dos fatores que afetam a qualidade do β -caroteno presente. Estudaram-se ao longo de 6 semanas o efeito da temperatura (25 °C e 40 °C) e da luz (incidência/ausência) sobre a concentração de carotenoides totais, a estabilidade oxidativa e a qualidade do óleo extraído. Independentemente do tempo de estocagem, os óleos extraídos a partir das fibras armazenadas nas diferentes condições apresentaram alta acidez e alterações no perfil de ácidos graxos. A diminuição paulatina do teor de óleo no tempo indicou atividade metabólica de microrganismos, que aparentemente favoreceram a produção de carotenoides na ausência de luz.

¹ Engenheira de alimentos, doutora em Agronomia, Universidade de Brasília, paula.carmona@colaborador.embrapa.br

² Farmacêutica, Universidade de Brasília, marina.borges@colaborador.embrapa.br

³ Química, mestre em Engenharia e Ciência de Alimentos, analista da Embrapa Agroenergia, raquel.campanha@embrapa.br

⁴ Engenheira de alimentos, doutora em Engenharia de Alimentos, analista da Embrapa Agroenergia, lorena.garcia@embrapa.br

⁵ Engenheiro Químico, doutor em Engenharia Mecânica, pesquisador da Embrapa Amazônia Oriental, marcos-ene.oliveira@embrapa.br

⁶ Biólogo, doutor em Ciências Biológicas (Biologia Molecular), pesquisador da Embrapa Agroenergia, felix.siqueira@embrapa.br

⁷ Farmacêutica, doutora em Saúde Pública, Universidade de São Paulo, pesquisadora da Embrapa Agroenergia,

simone.mendonca@embrapa.br

Introdução

A palma de óleo (*Elaeis guineenses*) possui importância mundial por ser uma oleaginosa de destaque para as indústrias alimentícia, cosmética, farmacêutica e de biocombustíveis. Com o crescimento da área de plantio, a indústria de óleo de palma está gerando grandes quantidades de resíduos, com estimativas de 184 milhões de toneladas anualmente no mundo (VAKILI et al., 2015). O aproveitamento desses resíduos para a obtenção de produtos de valor agregado pode contribuir para o aumento do lucro nas indústrias processadoras de óleo de palma, além de torná-las ambientalmente corretas. Dentre esses resíduos, destaca-se a fibra de prensagem do mesocarpo, geralmente utilizada como combustível no processo de geração de vapor, que representa aproximadamente 12% do cacho de fruto fresco processado e contém de 8% a 18% de óleo residual em base seca, o qual é uma rica fonte de carotenoides (4.000 ppm – 6.000 ppm). No caso do óleo extraído a partir das fibras, o α - e o β -caroteno constituem cerca de 90% do total dos carotenoides presentes. Esses compostos são conhecidos pelas suas atividades pró-vitamínicas A, uma vez que eles podem ser transformados em vitamina A in vivo. Entretanto, há escassez de informações sobre a forma como as fibras devem ser armazenadas, após a prensagem dos frutos, de modo a manter estável a concentração de carotenoides e a qualidade de seu óleo residual. Portanto, este estudo objetivou investigar a incidência da luz, da temperatura e do período de armazenamento sobre o teor de carotenoides e a estabilidade oxidativa (índice de substâncias reativas ao ácido 2-tiobarbitúrico - TBARS) e hidrolítica (índice de acidez) do óleo extraído a partir das fibras, simulando as condições de estocagem na indústria de óleo de palma.

Materiais e métodos

As fibras da prensagem de dendê híbrido foram coletadas no dia 26/08/2015 na Empresa Denpasa e recebidas congeladas no dia 31/08/2015 na Embrapa Agroenergia. Após a recepção, as fibras foram condicionadas em sacos plásticos transparentes ou recobertos com folhas de alumínio (para simular as condições de armazenamento expostas ou protegidas contra a luz, respectivamente) e armazenadas em incubadoras tipo BOD a 25 °C ou 40 °C contendo soluções saturadas de NaCl de forma a criar ambientes com umidades relativas de 74,3%. Amostras de cada condição de armazenamento foram retiradas a cada 7 dias, durante um período de 42 dias, para a extração do óleo. As fibras

correspondentes a cada tempo de estudo foram secas em estufa com circulação e renovação de ar durante 24 horas a 65 °C e posteriormente moídas em moinho de facas tipo Willye (STAR FT-60, Fortinox). Os óleos foram extraídos em extrator acelerado por solvente (ASE-350, Dionex) com éter de petróleo a 70 °C e analisados quanto ao teor de ácidos graxos livres, índice de TBARS e perfil de ácidos graxos, determinados pelos métodos da American Oil Chemists' Society (2005) Cd 3d-63, Cd 19-90 e Ce 1-62, respectivamente. Os carotenoides totais foram extraídos do óleo com acetona acrescida de BHT (0,1% m/v) e quantificados por meio de curva padrão de β -caroteno em acetona, com leitura espectrofotométrica a 450 nm. O teor de extrato etéreo foi determinado em equipamento tipo Ankon (AMERICAN OIL CHEMISTS' SOCIETY, 2005) (método Am 5-04). Foi utilizado um delineamento inteiramente ao acaso, em esquema de parcelas subdivididas, com três repetições. Nas parcelas, foram avaliados os efeitos da temperatura (25 °C e 40 °C) e da luz (incidência/ausência) e, nas subparcelas, o efeito do tempo de armazenamento (tempo zero e 7, 14, 21, 28, 35 e 42 dias) das fibras. Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias agrupadas pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade, utilizando-se o software SISVAR 5.6.

Resultados e discussão

A interação tripla luz \times temperatura \times tempo de estocagem foi estatisticamente significativa para todas as variáveis analisadas ($p < 0,05$, Tabela 1).

De acordo com a Tabela 1, na ausência de luz, a 25 °C, foi verificada queda no teor de carotenoides nas duas primeiras semanas de armazenamento, em relação ao tempo zero. Após esse período, houve aumento significativo desses compostos no óleo e a concentração foi semelhante durante a terceira, quarta e quinta semana de estocagem. Um comportamento similar foi constatado nas fibras mantidas protegidas contra a luz a 40 °C, com decréscimo no conteúdo de carotenoides do óleo na primeira semana de armazenamento, o qual foi estatisticamente equivalente até os 28 dias de análise e incremento expressivo nas duas semanas posteriores. Esse declínio e subsequente aumento no teor de carotenoides foi apenas observado no óleo extraído das fibras armazenadas na ausência de luz e pode estar relacionado com a produção desses compostos pelos microrganismos observados na matéria-prima durante o tempo de estudo.

Tabela 1. Efeito da temperatura (25 °C e 40 °C) e da luz (incidência/ausência) sobre os teores de carotenoides, índice de acidez, extrato etéreo e TBARS ao longo de seis semanas de armazenamento da fibra de prensagem de dendê.

L	T (°C)	Tempo de armazenamento das fibras						
		T0	S1	S2	S3	S4	S5	S6
CAROTENOIDES TOTAIS (µg/ g de óleo)								
P	25	3.153Aα	3.324Aα	3.364Aα	3.441Aα	3.400Aα	3.293Aα	3.177Aα
	40	3.153Aα	3.103Aα	3.054Aα	2.589Aβ	2.572Aβ	2.232Bβ	1.660Bβ
A	25	3.153Aα	2.522Bβ	2.655Bα	3.285Aα	3.660Aα	3.267Aα	2.940Bβ
	40	3.153Aα	2.643Bα	2.802Bα	2.646Bα	2.848Bβ	3.244Aα	3.735Aα
EXTRATO ETÉREO (% b.s.)								
P	25	10,93Aα	10,51Aβ	9,97Aα	9,40Aα	7,19Bα	5,37Bα	6,32Bα
	40	10,93Aα	12,40Aα	9,73Aα	10,46Aα	7,18Bα	6,83Bα	7,79Bα
A	25	10,93Bα	13,30Aα	10,88Bα	9,84Bα	6,60Ca	5,56Ca	6,79Ca
	40	10,93Aα	11,69Aα	9,84Aα	7,36Bβ	5,90Bα	4,66Caβ	3,63Cbβ
ÍNDICE DE TBARS								
P	25	0,041Aα	0,052Aα	0,053Aα	0,048Aα	0,046Aα	0,048Aα	0,043Aα
	40	0,041Aα	0,047Aα	0,046Aα	0,043Aα	0,047Aα	0,040Aβ	0,025Bβ
A	25	0,041Bα	0,044Bα	0,045Bα	0,048Aα	0,057Aα	0,054Aα	0,030Bβ
	40	0,041Bα	0,045Bα	0,053Aα	0,057Aα	0,039Bβ	0,068Aα	0,054Aα
ACIDEZ (mg KOH/ g de óleo)								
P	25	15,26Da	21,08Ca	27,30Ba	27,89Ba	29,85Aα	24,49Ba	33,10Aα
	40	15,26Ba	18,98Ba	26,71Aβ	22,81Aα	21,53Aβ	18,90Bβ	17,28Bβ
A	25	15,26Da	14,94Dβ	20,07Caβ	25,80Ba	33,56Aα	23,17Ca	19,73Caβ
	40	15,26Ba	19,97Ba	31,85Aβ	18,97Bβ	17,09Bβ	15,92Bβ	16,19Ba

T0, S1, S2, S3, S4, S5, S6 = tempo zero e primeira, segunda, terceira, quarta, quinta e sexta semana de armazenamento, respectivamente; P e A = fibras armazenadas na presença e na ausência de luz, respectivamente. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si, pelo teste de Scott-Knott, no nível de 5% de significância. Para a comparação do tempo de estocagem das fibras (linha), fixados os níveis dos fatores luz e temperatura, empregaram-se letras maiúsculas; para a comparação da temperatura de armazenamento das fibras (coluna), fixados os níveis dos fatores luz e tempo, utilizaram-se letras minúsculas e, para a comparação dos níveis de luz (coluna), fixados os níveis dos fatores temperatura e tempo, utilizaram-se letras gregas.

Vale destacar que a escolha da temperatura (25 °C e 40 °C) e da umidade relativa (74,3%) para conduzir o experimento foi realizada buscando simular as condições de estocagem observadas nas indústrias processadoras de óleo de palma. Quando as fibras chegaram ao laboratório, já se encontravam com fungos e foram armazenadas conforme recebidas, sem passar por processo de autoclavagem. Essa contaminação aliada à alta umidade relativa e às temperaturas avaliadas podem ter propiciado um ambiente favorável à proliferação e colonização de possíveis microrganismos produtores de carotenoides na ausência de luz. Entretanto, os microrganismos isolados das fibras ao longo do tempo de estudo ainda estão sendo caracterizados molecularmente. Dentre os fungos que apresentam capacidade de produzir pigmentos em quantidades elevadas, destacam-se os pertencentes aos gêneros *Monascus*, *Paecilomyces*, *Aspergillus* e *Penicillium* (DUFOSSE, 2006). Quando foram avaliadas as temperaturas de armazenamento das fibras, na presença de luz, observou-se que a 25 °C a concentração de carotenoides do óleo manteve-se constante ao longo do tempo. Já nas fibras mantidas a 40 °C, o conteúdo de carotenoides diminuiu significativamente na quinta e na sexta semana de armazenamento. Tal resultado pode estar associado com a sensibilidade dos carotenoides à luz e ao calor.

De acordo com a Tabela 1, o teor de extrato etéreo das fibras diminuiu ao longo do tempo, independentemente da temperatura de armazenamento e do nível de luz empregado, indicando atividade metabólica dos microrganismos presentes na fibra. Nas fibras mantidas a 40 °C, na ausência de luz, essa redução foi mais acentuada. Conforme observado para a concentração de carotenoides totais, é possível que essa condição de armazenamento apresente forte efeito sobre a biossíntese de metabólitos produzidos por microrganismos, tais como os pigmentos. Metabolicamente, a temperatura está associada com alterações nas atividades das proteínas, podendo controlar o crescimento celular, a produção de metabólitos primários e secundários, a fermentação e os processos de oxidação da célula.

Fixando-se os níveis do tempo de armazenamento a 25 °C, o índice de TBARS do óleo foi estatisticamente equivalente independentemente da exposição ou da proteção das fibras contra a luz durante a estocagem (Tabela 1). A mesma tendência foi observada para as fibras mantidas a 40 °C, em um determinado tempo de armazenamento, durante as quatro primeiras semanas. Depois da

quinta semana de estudo, para todas as condições avaliadas, foi verificado um declínio no índice de TBARS, presumivelmente pela formação de produtos estáveis em decorrência da reação dos produtos da oxidação secundária com outros compostos.

Foram observadas duas tendências de acidificação do óleo extraído a partir das fibras da prensagem de dendê (Tabela 1). O óleo obtido das fibras armazenadas a 40 °C apresentou um pico máximo de acidez durante a segunda semana de armazenamento, independentemente da exposição ou da proteção contra a luz da matéria-prima. Já no óleo extraído das fibras mantidas a 25 °C, os maiores valores de acidez durante a estocagem na ausência e na presença de luz foram constatados na quarta e na sexta semana de análise, respectivamente. Entretanto, para essa última condição de armazenamento, a acidez do óleo verificada durante a quarta (29,85 mg KOH/ g de óleo) e a sexta (33,10 mg KOH/ g de óleo) semana foi estatisticamente equivalente ($p > 0,05$).

A mais rápida acidificação verificada nos óleos extraídos das fibras mantidas a 40 °C pode estar relacionada com a alta temperatura de armazenamento que, associada à umidade relativa do ambiente (74,3%), favoreceu o crescimento de microrganismos na matéria-prima e a degradação do óleo. Por sua vez, a atividade microbiana e os altos teores de umidade, que servem como fonte de moléculas de água para desencadear uma série de reações químicas indesejáveis, ocasionam a hidrólise das moléculas de triacilglicerídeos dos óleos e, conseqüentemente, o aumento do teor de ácidos graxos livres. Provavelmente, nas fibras armazenadas a 25 °C, a elevação da carga microbiana conforme o tempo de armazenamento aconteceu mais lentamente, retardando as reações hidrolíticas responsáveis pela formação de ácidos graxos livres. Entretanto, as densidades de bactérias, leveduras e fungos filamentosos nos diferentes períodos de armazenamento não foram quantificadas neste estudo. Segundo a Resolução RDC nº 270 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (2005), de 22 de setembro de 2005, regulamento técnico para óleos vegetais, gorduras vegetais e creme vegetal, o teor de ácidos graxos livres para óleos não refinados não deve exceder 10 mg KOH/g de óleo. Desse modo, os óleos extraídos a partir das fibras armazenadas nas diferentes condições de estudo, em função do tempo, indicaram baixa qualidade da matéria-prima utilizada, já que nenhum deles atendeu à legislação.

Uma vez que os óleos apresentaram perfis de ácidos graxos semelhantes ao longo do tempo, independentemente da condição de armazenamento das fibras, somente serão mostrados os resultados obtidos para o óleo extraído das fibras armazenadas a 40 °C sob incidência de luz (Figura 1).

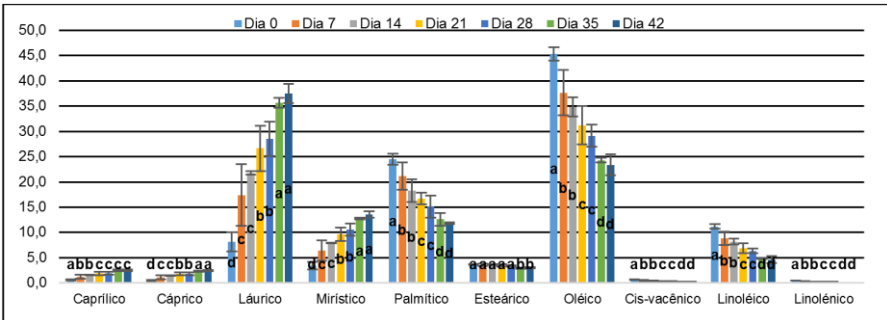


Figura 1. Perfil de ácidos graxos (%) das fibras estocadas a 40 °C expostas à luz.

No tempo zero de armazenamento, o óleo apresentou altos teores de ácidos graxos insaturados, sendo os mais abundantes o ácido oléico ($C_{18:1}$) e o ácido linoléico ($C_{18:2}$), que representaram 45,3% e 11,2%, respectivamente, do conteúdo total de ácidos graxos observado. Os ácidos graxos saturados palmítico ($C_{16:0}$), com 24,5%, e láurico ($C_{12:0}$), com 8,1%, também foram encontrados em quantidades significativas. Foram verificadas diferenças estatisticamente significativas, logo na primeira semana de armazenamento, no perfil de ácidos graxos dos óleos extraídos a partir das fibras. Enquanto os teores de ácidos graxos insaturados ($C_{18:1}$, $C_{18:2}$ e $C_{18:3}$) e os de ácidos graxos saturados de cadeia longa ($C_{16:0}$ e $C_{18:0}$) apresentaram queda ao longo do tempo, as concentrações de ácidos graxos saturados de cadeia média ($C_{8:0}$, $C_{10:0}$, $C_{12:0}$ e $C_{14:0}$) aumentaram durante o armazenamento. A diminuição no teor de ácidos graxos poli-insaturados pode ser explicada pela suscetibilidade desses ácidos a transformações químicas na presença de fatores pró-oxidantes, tais como o oxigênio, a umidade, a luz e o calor, em virtude da reatividade das suas ligações duplas. Já o decréscimo dos ácidos graxos saturados de cadeia longa pode estar associado com a preferência da microbiota presente na matéria-prima por esses ácidos, que estariam sendo utilizados pelos microrganismos para a biossíntese de outros ácidos graxos de cadeias mais curtas. Entretanto, essas mudanças foram mais acentuadas nas fibras armazenadas a 40 °C, principalmente, sob incidência de luz. Essa

instabilidade química sugere que a estabilidade oxidativa do óleo não foi preservada durante o tempo de armazenamento nas condições estudadas.

Conclusões

Neste estudo, utilizaram-se as fibras resultantes da prensagem na indústria de óleo de palma para a obtenção de produtos de alto valor agregado, como o β -caroteno. Os óleos extraídos a partir das fibras armazenadas nas diferentes condições de estudo, em função do tempo, indicaram instabilidade oxidativa e baixa qualidade. As mudanças no perfil de ácidos graxos e a hidrólise de triacilglicerídeos (índice de acidez) foram mais significativas que as do índice de TBARS. Em estudos posteriores, seria interessante quantificar as densidades de bactérias, leveduras e fungos filamentosos associadas com as fibras durante o armazenamento para ter um maior controle sobre as condições que favorecem o desenvolvimento desses microrganismos. A diminuição paulatina do teor de óleo no tempo indicou atividade metabólica de microrganismos. O armazenamento das fibras a 25 °C, com presença de luz, foi a condição que menos apresentou variações no teor de carotenoides ao longo do tempo, ao passo que a ausência de luz, aparentemente, favoreceu a produção desses compostos.

Apoio financeiro

Finep – Projeto DendePalm.

Referências

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (Brasil). Resolução n. 270, de 22 de setembro de 2005. Regulamento técnico para óleos vegetais, gorduras vegetais e creme vegetal. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 23 de setembro de 2005. p. 2134.

AMERICAN OIL CHEMISTS' SOCIETY. Official methods and recommended practices of the AOCS. Champaign, 2005.

DUFOSSÉ, L. Microbial production of food grade pigments. **Food technology and Biotechnology**, Zagreb, v. 44, n. 3, p. 313–323, 2006.

VAKILI, M.; RAFATULLAH, M.; IBRAHIM, M. H.; SALAMATINIA, B.; GHOLAMI, Z.; ZWAIN, H. A review on composting of oil palm biomass. **Environment, Development and Sustainability**, Dordrecht, v. 17, n. 4, p. 691–709, 2015.

Estudo da atividade enzimática de lipases presentes no mesocarpo de dendê (*Elaeis guineensis*)

Jéssica Kele Arruda Macêdo¹, Dasciana de Sousa Rodrigues², Thályta Fraga Pacheco³, Thaís Demarchi Mendes⁴, Cibele Favoreto⁵, Félix Gonçalves de Siqueira⁶, Patrícia Verardi Abdelnur⁷

Resumo

A acidificação do óleo de dendê decorrente da atividade de lipases é um obstáculo em sua produção e tem um forte impacto sobre sua qualidade, podendo levá-lo a se tornar impróprio para consumo humano. Assim, existe um grande interesse na identificação das alterações que ocorrem no óleo durante a maturação e após a colheita dos frutos. O objetivo deste estudo foi desenvolver um protocolo de isolamento das lipases responsáveis pela acidificação do óleo e verificar sua atividade por meio de técnicas bioquímicas e analíticas.

O mesocarpo dos frutos de dendê foram picados, triturados em uma solução aquosa e centrifugados para determinação das atividades de lipases por meio de titulação utilizando hidróxido de sódio. Além disso, a formação de produtos da degradação enzimática de triacilgliceróis também foi avaliada por espectrometria de massas (MS).

Os resultados obtidos indicam a presença de lipases em uma das fases obtidas, uma vez que a titulação mostrou uma rápida acidificação do óleo na presença do extrato enzimático e a análise por MS indicou a presença de novos compostos com massas moleculares menores, além da diminuição na intensidade dos compostos de alta massa molecular após 15 minutos de reação.

O protocolo de isolamento da lipase utilizado apresenta resultados satisfatórios, visto que a atividade de lipase foi identificada em frutos de *Elaeis*

¹ Bióloga, doutora em Biologia molecular, pós-doutoranda na Embrapa Agroenergia, jessica.macedo@colaborador.embrapa.br

² Química Industrial, doutora em Engenharia Química, pesquisadora da Embrapa Agroenergia, dasciana.rodrigues@embrapa.br

³ Engenheira química, mestre em Engenharia Química, analista da Embrapa Agroenergia, thalyta.pacheco@embrapa.br

⁴ Bióloga, mestre em Microbiologia Aplicada, analista da Embrapa Agroenergia, thaís.demarchi@embrapa.br

⁵ Química, mestranda em bioenergia e bioprocessos, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, cibele.favoreto@hotmail.com

⁶ Biólogo, doutor em Biologia Molecular, pesquisador da Embrapa Agroenergia, felix.siqueira@embrapa.br

⁷ Química, doutora em Química Orgânica, pesquisadora da Embrapa Agroenergia, patricia.abdelnur@embrapa.br

guineensis coletados na Embrapa Cerrados. No entanto, a identificação dos compostos químicos encontrados ainda é indispensável a fim de confirmar o aumento de ácidos graxos e diminuição de acilgliceróis, como mono, di e triacilgliceróis. Além disso, outras condições para as reações enzimáticas como variação de temperatura e pH deverão ser testadas a fim de compreender melhor a ação dessas enzimas.

Introdução

Dendê

O óleo de dendê ou palma, extraído de *Elaeis guineensis*, compreende a maior fonte de óleo vegetal, correspondendo a cerca de 32% do mercado mundial. Espera-se ainda que a produção de óleo de palma do mercado deverá aumentar para atender à demanda, que está prevista para dobrar até 2030 (CARLSSON et al., 2011). Uma questão importante na produção do óleo é a acidificação rápida que pode ocorrer após a colheita. Isso ocorre em decorrência da atividade de lipases que liberam ácidos graxos livres (FFA – *free fatty acid*) no mesocarpo de frutos maduros (EBONGUE et al., 2006). Essa acidez tem um forte impacto sobre a qualidade do óleo, já que um teor de FFA de 45% é considerado impróprio para o consumo humano (EBONGUE et al., 2008). Como essa acidificação ocorre rapidamente após a colheita, as indústrias devem processar os cachos em até 2 dias, impossibilitando a estocagem e, conseqüentemente, dificultando a exploração do óleo de palma em grande escala. Apesar de a lipase poder ser inativada por tratamento térmico dos cachos colhidos, qualquer ação enzimática antes do tratamento térmico leva à liberação de FFAs que devem ser removidos por meio de um processo de refinação onerosa e que leva a perdas de óleo (GIBON et al., 2007).

A importância econômica da acidez do óleo de palma faz com que a lipase do mesocarpo seja uma enzima de grande interesse em dendê (SAMBANTHAMURTHI et al., 2000). Sabe-se que essas plantas podem apresentar uma atividade lipolítica alta ou baixa e que essa característica é monogênica (EBONGUE et al., 2008). Diversos trabalhos buscando lipases que poderiam estar envolvidas com a acidez do óleo foram realizados (BOURGIS et al., 2011; EBONGUE et al., 2008; MORCILLO et al., 2013; EBONGUE et al., 2006). No entanto, a atividade das lipases presentes nesses frutos ainda não foi completamente elucidada. Assim, a ação dessa classe

de enzimas após a colheita dos frutos ainda precisa ser estudada, já que estas contribuem não apenas para a alteração do perfil lipídico dos frutos, mas também para o processo de acidificação do óleo, gerando grandes impactos econômicos e sociais. Além de desenvolver um protocolo de isolamento das lipases responsáveis pela acidificação do óleo, este trabalho tem como objetivo verificar sua atividade por meio de técnicas bioquímicas e analíticas.

Materiais e métodos

Produção do extrato bruto

A purificação da lipase foi realizada de acordo com o método descrito por Abigor e colaboradores (1985). O extrato foi preparado pela homogeneização do mesocarpo com tampão fosfato 0,1 mol/L contendo EDTA 0,1 mol/L. O material foi filtrado com uma gaze e centrifugado a 1.1000 x g durante 30 minutos. Três frações foram obtidas: uma camada superior de gordura, uma camada intermediária aquosa e detritos sedimentados. A camada superior foi transferida para um tubo contendo solução aquosa de éter dietílico saturada em cloreto de sódio. Essa mistura foi suavemente agitada e mantida em repouso a 4 °C durante 1 hora. Em seguida, a mistura foi centrifugada a 5.000 rpm dando origem a três fases: uma fase superior contendo éter e lipídeos, uma camada intermediária contendo a enzima e uma camada inferior contendo outros componentes solúveis em sal. Ambas as fases superior e inferior foram removidas com uma pipeta Pasteur e a camada sólida (intermediária, contendo a enzima) foi reextraída duas vezes com éter e NaCl saturado para remover a máxima quantidade de óleo possível da fase contendo a enzima. Esse extrato bruto da enzima foi dialisado contra água destilada durante 24 horas.

Atividade lipolítica

Para determinação da atividade de lipase, foram usadas como substrato duas emulsões preparadas pela mistura de 0,75 g do óleo de dendê refinado, 30 mL de tampão fosfato 10 mmol/L (pH 7 ou 9) e 6 g de goma arábica. A liberação de ácidos graxos após adição de 1 mL do extrato bruto obtido da fração do mesocarpo de dendê foi monitorada em diferentes intervalos de tempo, de 150 até 1.000 segundos, e o pH mantido em 7 ou 9, com o auxílio de um titulador automático. A atividade enzimática é diretamente proporcional à quantidade de

hidróxido de sódio (100 mmol/L) necessária para neutralizar os ácidos graxos liberados e, neste trabalho, considerou-se uma unidade arbitrária de atividade como sendo volume de NaOH, 100 mmol/L por minuto, por mL de extrato enzimático. A mistura reacional foi mantida sob agitação magnética a 37 °C e a reação foi monitorada por até 1.000 segundos.

Análise por espectrometria de massas

Para confirmar a acidificação do óleo, as seguintes amostras foram analisadas: o óleo (refinado fornecido pela Denpasa), o extrato bruto de mesocarpo de dendê, o hidrolisado proveniente da atividade lipolítica em pH 7 e um outro hidrolisado em pH 9, ambos obtidos no processo descrito no item “Produção do extrato bruto”.

As amostras (100 µL) foram diluídas em 900 µL de metanol/tolueno (1:1) contendo ácido fórmico 0,1%. Em seguida, os tubos foram agitados e centrifugados a 10.000 rpm por 5 minutos. Foram diluídos novamente 100 µL dessas soluções em 900 µL de metanol contendo 0,1% de ácido fórmico. As análises foram realizadas por injeção direta (DIMS - *Direct Infusion Mass Spectrometry*) em um espectrômetro de massas Ion Trap (LTQ XL, *Thermo Fisher Scientific*). As condições de análise consistiram em um fluxo da seringa de 5 µL/min, temperatura do capilar de 400 °C, e os dados foram adquiridos utilizando fonte de ionização *electrospray* em modo positivo ESI(+)-MS com faixa de massa entre 100 *m/z* a 1.000 *m/z*. As análises foram realizadas utilizando os softwares LTQ 2.2 e Xcalibur 2.2 (*Thermo Scientific*) e os resultados avaliados pelo Xcalibur Qual Browser (*Thermo Scientific*).

Resultados e discussão

No ensaio de atividade de lipase utilizando o extrato bruto obtido a partir do mesocarpo de frutos de *Elaeis guineensis* e óleo de dendê refinado como substrato, foi possível observar uma acidificação do meio na reação contendo a fase enzima da extração com éter e na reação contendo a fase éter (Figura 1, linhas azul e roxa, respectivamente), após 300 segundos, (após o titulador reajustar o pH do meio, o qual diminuiu drasticamente quando da adição do extrato enzimático em decorrência da presença de ácidos graxos nesse extrato). Isso indica a presença da enzima ativa nessa amostra. Tal atividade foi registrada

por um longo período de tempo (900 s). O branco contendo apenas a enzima (ausência de substrato, linha laranja) também apresentou uma acidificação rápida (queda inicial do pH devido a ácido preexistente no extrato enzimático), porém apenas em um primeiro momento (aproximadamente 100 s), seguido por estabilização da acidificação. As outras amostras também apresentaram acidificação nos primeiros segundos, seguido por estabilização do pH ao longo do tempo.

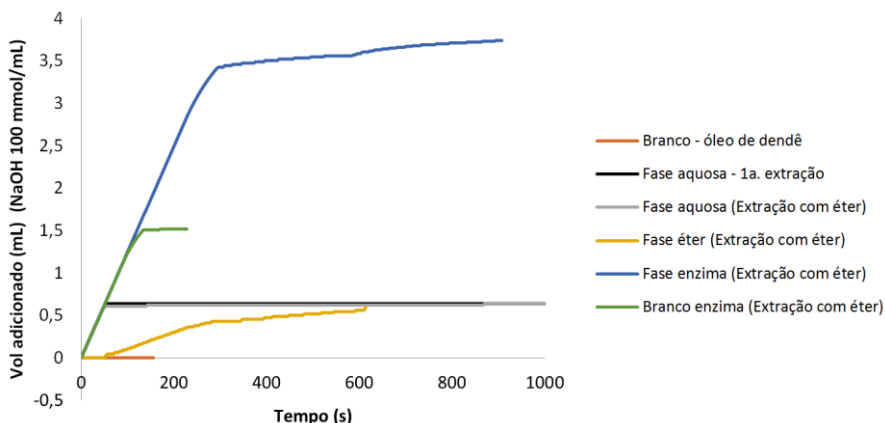


Figura 1. Perfil de hidrólise do óleo de dendê refinado catalisado por lipase de mesocarpo de dendê, utilizando titulador automático. A mistura foi mantida a pH 7 °C e 37 °C. Atividades calculadas após reajuste inicial do pH (mL de NaOH/min): Branco da enzima, 0; Fase enzima 0,03; Fase éter, 0,03; Fase aquosa (extração com éter), 0; fase aquosa (1ª extração), 0; Branco do óleo, 0.

Outra maneira de confirmar a atividade enzimática nas amostras foi por meio da análise de formação de produtos no óleo por espectrometria de massas. Após a diluição das amostras na solução de tolueno/metanol/ácido fórmico e centrifugação, houve a separação das amostras em duas fases, sendo uma superior e outra inferior. Dessa forma, na etapa seguinte de diluição, tanto a fase superior quanto a inferior de cada amostra foram diluídas em metanol/ácido fórmico e analisadas separadamente. A análise preliminar dos compostos da fase superior mostra a presença de uma ampla diversidade de componentes com m/z entre 100 e 1.000.

A comparação entre o substrato puro e as reações mostra que existe uma diminuição na intensidade dos compostos de alta massa molecular e aumento da

intensidade dos componentes de baixa massa (Figura 2). Isso pode indicar a presença de atividade enzimática, já que as lipases são enzimas que atuam de maneira específica sobre lipídeos e agem principalmente catalisando reações de hidrólise de triacilglicerídeos.

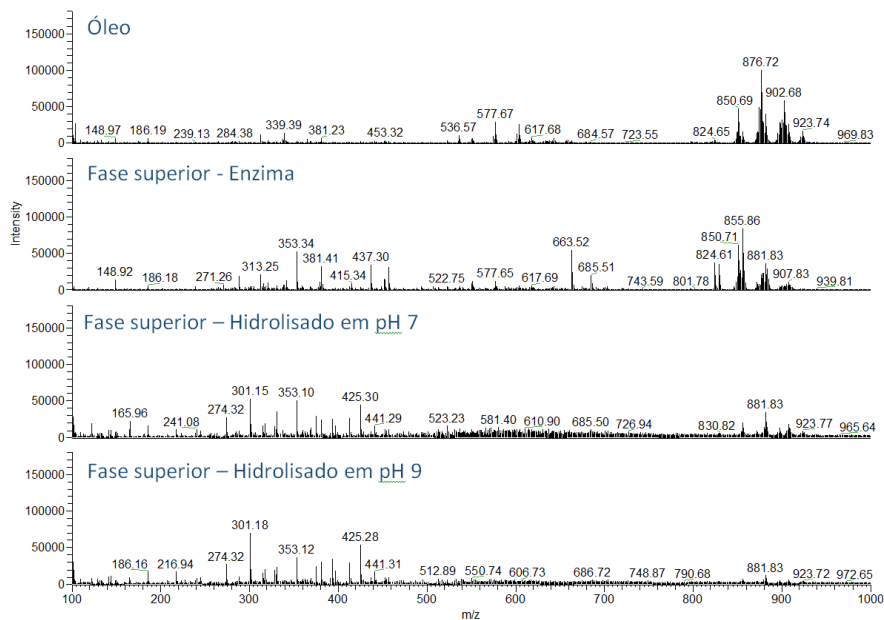


Figura 2. Identificação de compostos presentes no substrato, extrato enzimático e formação de produtos após a reação enzimática. Espectros de massas (ESI (+)-MS) das amostras: a) Óleo, b) Fase superior – Enzima, c) Fase superior – Hidrolisado em pH7, d) Fase superior – Hidrolisado em pH 9.

Conclusão

O protocolo de isolamento da lipase foi desenvolvido e apresenta resultados satisfatórios, visto que uma atividade da lipase foi identificada no extrato enzimático de frutos de *Elaeis guineensis* coletados na Embrapa Cerrados. A identificação da atividade enzimática foi realizada por meio de titulação e por análise da formação de produtos por espectrometria de massas. No entanto, a identificação dos compostos formados será realizada utilizando experimentos de espectrometria de massas de alta resolução (HRMS - *High Resolution Mass Spectrometry*) e tandem (MS/MS) a fim de confirmar a identidade de cada íon.

Apoio Financeiro

Finep.

Referências

ABIGOR, D. R.; OPUTE, F. I.; OPOKU, A. R.; OSAGIE, A. U. Partial purification and some properties of the lipase present in oil palm (*Elaeis guineensis*) mesocarp. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, Sussex, v. 36, n. 7, p. 599–606, 1985.

BOURGIS, F.; KILARU, A.; CAO, X.; NGANDO-EBONGUE, G.; DRIRA, N.; OHLROGGE, J. B.; ARONDEL, V. Comparative transcriptome and metabolite analysis of oil palm and date palm mesocarp that differ dramatically in carbon partitioning. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, DC, v. 108, n. 44, p. 18186–18186, 2011.

CARLSSON, A. S.; YILMAZ, J. L.; GREEN, A. G.; STYMNE, S.; HOFVANDER, P. Replacing fossil oil with fresh oil—with what and for what? **European Journal of Lipid Science and Technology**, Malden, v. 113, n. 7, p. 812–831, 2011.

EBONGUE, G. F. N.; DHOUIB, R.; CARRIÈRE, F.; AMVAM ZOLLO, P.-H.; ARONDEL, V. Assaying lipase activity from oil palm fruit (*Elaeis guineensis* Jacq.) mesocarp. **Plant Physiology and Biochemistry**, Paris, v. 44, n. 10, p. 611–617, 2006.

EBONGUE, G. F. N.; KOONA, P.; NOUY, B.; ZOK, S.; CARRIÈRE, F.; ZOLLO, P. H. A.; ARONDEL, V. Identification of oil palm breeding lines producing oils with low acid values. **European Journal of Lipid Science and Technology**, Weinheim, v. 110, n. 6, p. 505–509, 2008.

GIBON, V.; DE GREYT, W.; KELLENS, M. Palm oil refining. **European Journal of Lipid Science and Technology**, Weinheim, v. 109, n. 4, p. 315–335, 2007.

MORCILLO, F.; CROS, D.; BILLOTTE, N.; NGANDO-EBONGUE, G.-F.; DOMONHÉDO, H.; PIZOT, M.; CUÉLLAR, T.; ESPÉOUT, S.; DHOUIB, R.; BOURGIS, F.; CLAVEROL, S.; TRANBARGER, T. J.; NOUY, B.; ARONDEL, V. Improving palm oil quality through identification and mapping of the lipase gene causing oil deterioration. **Nature Communications**, London, v. 4, p. 2160, 2013.

SAMBANTHAMURTHI, R.; SUNDRAM, K.; TAN, Y.-A. Chemistry and biochemistry of palm oil. **Progress in Lipid Research**, Oxford, v. 39, n. 6, p. 507–558, 2000.

Ferramentas metabolômicas aplicadas na identificação de marcadores químicos relacionados ao amarelecimento fatal em folhas de *Elaeis guineensis*

Mauro Vicentini Correia¹, Augusto Lopes Souto², José Antônio de Aquino Ribeiro³, Patrícia Verardi Abdelnur⁴, Clenilson Martins Rodrigues⁵

Resumo

A palma de óleo ou dendezeiro é uma das culturas vegetais mais rentáveis no mundo. Além do óleo da polpa do fruto, com 34% do mercado, também há exploração comercial da casca, das fibras, do óleo da amêndoa (palmiste) e do cacho vazio do dendezeiro em diversos segmentos industriais. Nas regiões produtoras da América Latina, incluindo o Brasil, a produção do dendê é ameaçada por uma anomalia desconhecida e denominada como amarelecimento fatal (AF), essa condição diminui significativamente a produção do dendezeiro e pode matar a planta. Apesar de ter sido bastante estudado, ainda não se conhece a causa do AF. Assim, o objetivo do presente trabalho foi identificar marcadores químicos relacionados à ocorrência do AF, utilizando abordagens metabolômicas. As técnicas de análise utilizadas nesta abordagem foram cromatografia acoplada a espectrometria de massas (UHPLC-ESI-QTOF-MS). Foram identificadas como marcadores 13 substâncias, sendo 10 detectados pelo modo de ionização ESI(+)-MS e 3 identificados por ESI(-)-MS. Uma estrutura proposta foi confirmada, com base em dados do banco de dados *Metlin* e experimentos de fragmentação (MS/MS).

Introdução

Das principais espécies vegetais exploradas comercialmente, a palma de óleo ou dendezeiro (*Elaeis guineensis*) é uma das culturas mais rentáveis no mundo.

¹ Farmacêutico, doutor em Química, Universidade de São Paulo, mauro.correia@colaborador.embrapa.br

² Farmacêutico, doutor em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, Universidade Federal da Paraíba, augusto.souto@colaborador.embrapa.br

³ Farmacêutico, mestre em Ciências Farmacêuticas, analista da Embrapa Agroenergia, jose.ribeiro@embrapa.br

⁴ Química, doutora em Química Orgânica, pesquisadora da Embrapa Agroenergia, patricia.abdelnur@embrapa.br

⁵ Químico, doutor em Química, pesquisador da Embrapa Agroenergia, clenilson.rodrigues@embrapa.br

Além do óleo da polpa do fruto, também há exploração comercial da casca, das fibras, do óleo da amêndoa (palmiste) e do cacho vazio do dendezeiro em diversos segmentos industriais (BARCELOS et al., 2015).

O óleo de *E. guineensis* é o mais consumido no mundo dentre os óleos vegetais, com 34% do mercado em 2015, seguido pelo óleo de soja com 29%. Em 2015, a produção de óleo de dendê foi de 60,8 milhões de toneladas, sendo os maiores produtores a Indonésia e a Malásia, com 85% da produção mundial (ESTADOS UNIDOS, 2016).

O maior entrave na manutenção e expansão da cultura de *E. guineensis* são as doenças, que provocam a diminuição significativa na produção. No Brasil e em outros países da América Latina, como Colômbia e Equador, a produção do dendê é ameaçada por uma anomalia desconhecida e denominada como amarelecimento fatal (AF), uma condição que pode matar a planta (BOARI, 2008). Apesar de ter sido bastante estudada, ainda não foi possível encontrar a causa dessa anomalia e não há evidências de que seja provocada por agentes bióticos como fungos, bactérias, fitoplasma ou viróides (BARCELOS et al., 2015). No entanto, a causa biótica ainda não foi descartada. Por outro lado, há estudos que apontam a origem do AF como sendo um fator abiótico, existindo evidências de que o surgimento do AF no espaço e no tempo não segue padrões de doenças causadas por fitopatógenos; também há relatos de que áreas próximas de cursos de água e com drenagem ineficiente possuem maior incidência de AF (BERGAMIN et al., 1998).

A partir do estudo da composição química de plantas com e sem AF é possível empregar ferramentas metabolômicas para tentar encontrar possíveis vias que são influenciadas. A metabolômica pode ser descrita como o estudo sistemático dos “rastros” deixados por processos celulares específicos em um determinado momento. Esses “rastros”, uma vez identificados, podem revelar o perfil fisiológico de uma célula, tecido ou órgão em um momento determinado (POULSON-ELLESTAD et al., 2014).

O objetivo do presente trabalho foi empregar ferramentas metabolômicas no estudo do AF. A estratégia foi analisar extratos de folhas de *E. guineenses* com o uso de técnicas cromatográficas e espectrométricas, seguido de análises estatísticas, e indicar os grupos de metabólitos contrastantes entre amostras de *E. guineenses* com e sem AF.

Materiais e métodos

Coleta do material vegetal

As folhas e raízes de plantas de *Elaeis guineenses* (dendê) foram coletadas no Município de Moju, no Estado do Pará, nas áreas de plantio da empresa Marborges Agroindústria S. A. Foram coletadas folhas e raízes de 8 plantas sadias e de 8 plantas anômalas (com AF).

Pré-tratamento do material vegetal

O material botânico (folhas de dendê) foi lavado em solução de hipoclorito de sódio a 1% por 2 min, em seguida foi lavado em água corrente, lavado com água destilada e finalmente seco com papel toalha. Após isso, foi acondicionado em papel pardo, identificado, introduzido em estufa de circulação e renovação de ar a 40 °C até adquirir peso constante. Após a secagem, as folhas foram trituradas utilizando-se moinho de facas.

Preparo dos extratos

Pesou-se, em tubo falcon de 50 mL, 1 g de material vegetal (folhas trituradas), em seguida 10 mL de solução etanol 70% foi adicionada ao tubo, que foi submetido por 5 min a um banho de ultrassom à temperatura ambiente. A amostra foi retirada do banho de ultrassom e adicionou-se 15 mL da solução etanol 70% para completar a proporção de 1 g de folha pulverizada para 25 mL de solução, e novamente a amostra foi submetida por 5 min ao banho de ultrassom.

Em seguida, a amostra foi centrifugada a 9000 rpm por 10 min, depois o sobrenadante foi filtrado, em papel filtro, para um balão volumétrico de 25 mL. O volume foi completado para 25 mL com solução de etanol 70%. Uma alíquota de 3 mL do extrato hidroalcoólico foi submetida ao processo de extração em fase sólida (SPE), cartucho C18 de 500 mg, com o objetivo de retirar o excesso de clorofila.

Foi coletado 1,3 mL de cada amostra de extrato hidroalcoólico passada por SPE, em um “*vial*” de 1,5 mL. O procedimento foi realizado para cada uma das 16 amostras de folhas, 8 anômalas (F1-F8) e 8 sadias (F9-F16).

Cromatografia líquida com detecção espectrométrica

As análises dos extratos de folhas de *E. guineensis* foram realizadas nos seguintes equipamentos: UHPLC Nexera X2 (Shimadzu) acoplado ao espectrômetro de massas maXis-4G (Q-TOF) (Bruker). Utilizou-se a coluna Acquity UPLC® HSS T3 C18 (150 mm de comprimento; 2,1 mm de diâmetro interno e tamanho de partícula de 1,8 µm), a temperatura da coluna foi de 40 °C e o volume de injeção de 1 µL. As condições cromatográficas foram: fluxo de 0,4 mL/min; fase móvel A - água Milli-Q + 0,1% ácido fórmico e a fase B - acetonitrila + 0,1% de ácido fórmico; utilizou-se o gradiente de eluição 4-30-90% de B com um aumento linear de 0-12-15, e 90% de B entre 15-16 min. As condições do espectrômetro de massas maXis-4G foram as seguintes: condições da fonte – *nebulizer gas* (N₂) em 4,0 bar; *dry gas* (N₂) em 8,0 L/min; *dry temperature* em 200 °C; *capillary voltage* em 3,5 KV. As análises foram realizadas nos modos positivo e negativo com ionização por *electrospray* (ESI), a faixa de massas foi de 70 – 1000 *m/z*. A aquisição dos dados foi realizada no software HyStar Versão 4.2.

Tratamento dos dados e análise estatística

Os dados brutos foram exportados para o formato mzXML utilizando-se o software DataAnalysis versão 4.2 (Bruker Daltonik GmbH), em seguida foi realizado o “*upload*” dos dados para o servidor do software XCMS versão on-line. Os dados foram processados utilizando-se a opção “*pairwise*” e com os parâmetros otimizados para *UPLC / Bruker Q-TOF* nos modos ESI(+)-MS e ESI(-)-MS. O método estatístico utilizado para avaliar as diferenças entre as plantas com e sem AF foi o teste paramétrico não pareado t-test (*Welch t-test*). A identificação dos íons foi realizada, de maneira automatizada, com busca na base de dados *Metlin*.

Resultados e discussão

Separação cromatográfica e detecção por espectrometria de massas (UHPLC-ESI-QTOF-MS)

A partir dos resultados de sobreposição dos cromatogramas das 16 amostras de extrato de folhas, analisadas por UHPLC-MS, ficou evidenciado que não era possível discriminar entre as amostras com e sem AF por simples inspeção visual,

assim foi necessário o uso de ferramentas estatísticas. Nesse conjunto de dados, a amostra F15 (amostra de folha saudável) foi considerada *outlier* e retirada do *set*.

Tratamento dos dados de UHPLC-MS/MS

O software XCMS é utilizado para análises de *metabolômica “untargeted”*, realizando desde o processamento dos dados brutos e alinhamento dos tempos de retenção até análise estatística e identificação de metabólitos. As etapas básicas da análise foram: detecção de picos, correspondências dos picos entre amostras e correção do tempo de retenção. Em seguida, foi construída uma tabela com informações detalhadas sobre as amostras, como tempo de retenção, intensidade e relação massa-carga (m/z) dos íons identificados.

Nas análises estatísticas, utilizando-se os dados de UHPLC-MS dos extratos de folhas foi possível identificar grande número de íons com diferença significativa (valor de $p < 0,001$) e intensidades superiores a 10.000, entre as amostras com e sem AF, 10 no modo ESI(+)-MS e 3 no ESI(-)-MS (Tabela 1).

Tabela 1. Íons com maiores diferenças entre as amostras de folhas com e sem AF, com valor de $p < 1,00E-03$, modos ESI(+)-MS e ESI(-)-MS.

Experimento	FSAF/FCAF*	Valor de p	m/z	Tempo de retenção (min)	Intensidade máxima
ESI(-)-MS	4,32	6,16E-04	505,1924	10,15	2,60E+04
ESI(+)-MS	3,9	2,90E-04	499,1582	10,15	2,33E+04
ESI(+)-MS	3,9	4,08E-04	479,2325	10,15	1,47E+04
ESI(+)-MS	3,9	4,14E-04	478,2293	10,15	5,59E+04
ESI(+)-MS	7,2	8,50E-04	464,2132	9,80	1,31E+04
ESI(-)-MS	2,39	2,19E-04	461,1663	9,47	2,28E+04
ESI(-)-MS	2,4	1,17E-04	415,1609	9,48	2,20E+04
ESI(+)-MS	3,1	5,67E-04	147,0440	7,00	2,12E+04
ESI(+)-MS	3,7	3,76E-04	138,0915	2,00	8,76E+04
ESI(+)-MS	4,6	6,59E-04	122,0681	2,00	5,74E+04
ESI(+)-MS	4,9	9,42E-04	121,0650	1,99	6,80E+05
ESI(+)-MS	5	4,32E-04	103,0541	2,00	1,60E+04
ESI(+)-MS	5	7,41E-04	93,0698	2,00	1,14E+04

*Intensidade dos íons de FSAF dividido pela intensidade dos íons de FCAF; FSAF = amostras de folhas sem AF, FCAF= amostras de folhas com AF.

A busca na base de dados *Metlin* gerou um grande número de possíveis estruturas para os íons apresentados na Tabela 1, no entanto, somente para os íons 103,0541 e 121,0650 e 138,092 foi possível atribuir às fragmentações as estruturas encontradas na base de dados. Os íons 103,0541 e 121,0650 são fragmentos do íon 138,0927 (Figura 2). As estruturas compatíveis com o íon 138,0927, após análise dos fragmentos, foram as substâncias tiramina e 1-(p-hidroxifenil)etilamina.

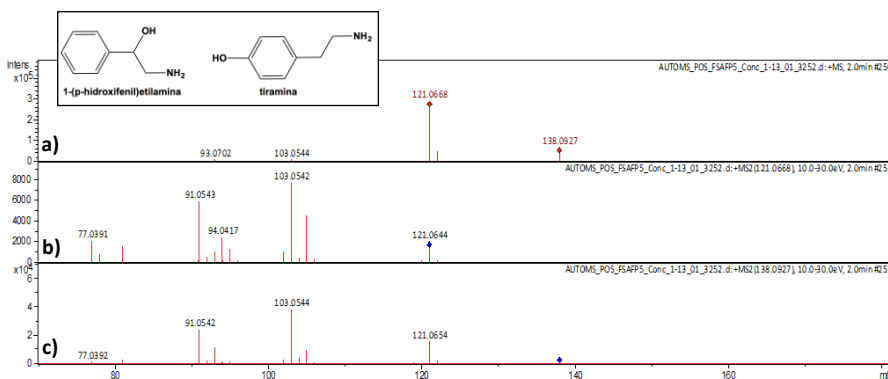


Figura 2. a) Espectro de massas obtido por ESI-MS do pico cromatográfico com tempo de retenção de 2 min; b) Espectro de massas MS/MS do íon m/z 121.0668; c) Espectro de massas MS/MS do íon m/z 138.0927. Energias de colisão de 10-30 eV, ionização ESI(+)-MS.

Conclusões

De acordo com os dados obtidos, foi possível verificar que existem diferenças entre as amostras com e sem AF. Foram identificados 10 íons no modo positivo e 3 no modo negativo, com diferenças significativas (valor de $p < 0,001$) e intensidade superior a $1,00E+04$ entre amostras com e sem AF. As substâncias tiramina e 1-(p-hidroxifenil)etilamina foram pospostas como possíveis estruturas do marcador encontrado para o AF. As próximas etapas do trabalho serão direcionadas à identificação dos outros 10 íons e também na identificação das vias de produção dos metabólitos identificados para traçar alguma correlação entre as vias afetadas e o AF.

Apoio financeiro

Os autores agradecem o apoio financeiro da Finep e CNPq e também à Embrapa Agroenergia, pela estrutura disponibilizada.

Referências

BARCELOS, E.; RIOS, S. A.; CUNHA, R. N. V.; LOPES, R.; MOTOIKE, S. Y.; BABIYCHUK, E.; SKIRY CZ, A.; KUSHNIR, S. Oil palm natural diversity and the potential for yield improvement. **Frontiers in Plant Science**, v. 6, n. 190, p. 1-16, 2015.

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**, Brasília, DF, v. 23, n. 3, p. 391-396, 1998.

BOARI, A. de J. **Estudos realizados sobre o amarelecimento fatal do dendezeiro (*Elaeis guineensis* Jacq.) no Brasil**. Belém, PA: Embrapa Amazônia Oriental, 2008. 62 p. (Embrapa Amazônia Oriental. Documentos, 348).

ESTADOS UNIDOS. Department of Agriculture. **Oilseeds: world markets and trade**. [Washington, DC], 2016. Disponível em: <<http://apps.fas.usda.gov/psdonline/circulars/oilseeds.pdf>>. Acesso em: 25 jun. 2016.

POULSON-ELLESTAD, K. L.; JONES, C. M.; ROY, J.; VIANT, M. R.; FERNÁNDES, F. M.; KUBANEK, J.; NUNN, B. L. Metabolomics and proteomics reveal impacts of chemically mediated competition on marine plankton. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, DC, v. 111, n. 34, p. 12568-12568, 2014.

Prospecção de compostos químicos de valor agregado em amostras de glicerina de palma e de soja biotransformadas por microrganismos

Augusto Lopes Souto¹, Andréia Aparecida Jacomassi Carneiro², Rodrigo Wesley Nascimento de Melo³, José Antônio de Aquino Ribeiro⁴, Patrícia Pinto Kalil Gonçalves Costa⁵, Thaís Fabiana Chan Salum⁶, Thaís Demarchi Mendes⁷, Léia Cecília de Lima Fávoro⁸, Mônica Caraméz Triches Damaso⁹, Patrícia Verardi Abdelnur¹⁰, Clenilson Martins Rodrigues¹¹

Resumo

A glicerina, coproduto da produção de biodiesel, pode ser obtida por processos de transesterificação de óleos de plantas como soja e palma. Com o aumento mundial da produção de biodiesel, torna-se importante prospectar novas aplicações tecnológicas para agregar valor ao coproduto gerado. A proposta deste trabalho foi avaliar, com o uso de técnicas de espectrometria de massas e cromatografia líquida, o desempenho de fungos filamentosos quanto à bioconversão de glicerina de soja e palma em compostos químicos de valor agregado. Amostras de diferentes tipos de glicerina bioconvertidas foram analisadas por *fingerprinting* MS utilizando-se a técnica de espectrometria de massas por infusão direta (DIMS) e por cromatografia líquida de ultra-alta eficiência acoplada a detector evaporativo de espalhamento de luz (UHPLC-ELSD) para identificação e quantificação dos compostos químicos formados. Para interpretação dos dados obtidos pela análise espectrométrica, foi realizada a análise multivariada de dados, utilizando-se como método estatístico, a análise de componente principal. Dessa forma, pôde-se detectar de maneira eficiente,

¹ Farmacêutico, doutor em Produtos Naturais, Universidade Federal da Paraíba, augusto.souto@colaborador.embrapa.br

² Bióloga, doutora em Microbiologia Aplicada, Universidade Estadual Paulista, andrea.jacomassi@colaborador.embrapa.br

³ Graduando em Química, Universidade Católica de Brasília, rodwesley1995@gmail.com

⁴ Farmacêutico, mestre em Ciências Farmacêuticas, analista da Embrapa Agroenergia, jose.ribeiro@embrapa.br

⁵ Química, mestre em Química Orgânica, analista da Embrapa Agroenergia, patricia.costa@embrapa.br

⁶ Farmacêutica, doutora em Ciências (Bioquímica), pesquisadora da Embrapa Agroenergia, thais.salum@embrapa.br

⁷ Bióloga, mestre em Microbiologia Aplicada, analista da Embrapa Agroenergia, thais.demarchi@embrapa.br

⁸ Bióloga, doutora em Genética e Melhoramento de Plantas, pesquisadora da Embrapa Agroenergia, leia.favaro@embrapa.br

⁹ Engenheira química, doutora em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos, pesquisadora da Embrapa Agroenergia, monica.damaso@embrapa.br

¹⁰ Química, doutora em Química Orgânica, pesquisadora da Embrapa Agroenergia, patricia.abdelnur@embrapa.br

¹¹ Químico, doutor em Química, pesquisador da Embrapa Agroenergia, clenilson.rodrigues@embrapa.br

fungos produtores de compostos de valor agregado, como polióis do tipo C6. Porém, quando as amostras foram analisadas por UHPLC-ELSD, não foi possível confirmar a produção dos polióis, embora após 10 dias de cultivo, todo o glicerol, fonte de carbono, tenha sido consumido, independentemente da glicerina utilizada. Portanto, acredita-se que os fungos o tenham utilizado, principalmente, para crescimento, e que a quantidade de polióis produzida seja inferior aos limites de detecção e quantificação do método cromatográfico aplicado.

Introdução

O biodiesel é um biocombustível obtido a partir de reação de transesterificação de óleos vegetais ou gordura animal com metanol na presença de um catalisador. Nessa reação, há a produção do coproduto conhecido como glicerina (SILVA et al, 2009). A produção de glicerina tem aumentado em virtude do crescimento da produção de biodiesel no mundo, o que proporcionou uma redução no preço desse coproduto no mercado (DHAMARDI et al., 2006). A fim de incrementar a cadeia de produção do biodiesel, estudos na área biotecnológica têm abordado diferentes estratégias para biotransformar a glicerina em produtos de valor agregado (BOZELL; PETERSEN, 2010).

Diante disso, o objetivo deste trabalho foi utilizar técnicas analíticas instrumentais para prospectar microrganismos capazes de biotransformar a glicerina em compostos químicos de alto valor agregado, assim como avaliar a influência de glicerina de diferentes procedências nessa biotransformação, a partir da análise dos compostos gerados via espectrometria de massas e análise multivariada de dados.

Material e métodos

Bioconversão utilizando glicerinas brutas

Neste trabalho, foram utilizados dois tipos de glicerina bruta: (a) glicerina gerada na Embrapa Agroenergia, proveniente da produção de biodiesel de óleo de palma; (b) glicerina proveniente da produção de biodiesel de óleo de soja, gentilmente cedido pela empresa Cesbra.

Os experimentos de bioconversão foram realizados em frascos *Erlenmeyers* de 250 mL, contendo 50 mL de meio de Mandels e Weber (1969), sem adição de Tween 80, e glicerina bruta de palma ou de soja (3%) como única fonte de

carbono. O pH dos meios foi ajustado para 6,0 e foram esterilizados a 121 °C por 20 minutos. Os meios foram inoculados com 4 discos de 0,8 cm de diâmetro, contendo os fungos filamentosos crescidos em meio de adaptação (constituído de Yeast Nitrogen Base 6,7 g/L, ágar 15,0 g/L e glicerina 4%, v/v), e em seguida incubados em agitador rotatório a 120 rpm e 30 °C, por 10 dias, em triplicata. Foram utilizados 7 fungos para inoculação com glicerina de soja e 8 fungos para inoculação com glicerina de palma, os quais foram selecionados obedecendo a critérios como: o valor do índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM) em meios de cultivo contendo glicerina como única fonte de carbono e pela diversidade das espécies. Alíquotas (1 mL) dos experimentos e dos controles (sem o inóculo), foram retiradas no 5º e no 10º dia de cultivo e centrifugadas por 5 minutos a 14.000 rpm. O sobrenadante foi utilizado para as análises cromatográficas e de espectrometria de massas, visando avaliar a produção de químicos de valor agregado.

Espectrometria de massas por infusão direta

As amostras de bioconversão da glicerina de palma e de soja (Cesbra) por diferentes fungos filamentosos foram primeiramente homogeneizadas em vortex por 10 segundos, em seguida, as amostras foram diluídas mil vezes em metanol:água (1:1) e analisadas por espectrometria de massas por infusão direta (DIMS – *direct infusion mass spectrometry*), utilizando um espectrômetro de massas com fonte de ionização por *electrospray* e analisador TOF (*time of flight*) (Maxis 4G, Bruker Daltonics). As análises foram realizadas em modo de ionização positivo (ESI(+)-MS) utilizando formiato de sódio 1 mmol/L como calibrante. As amostras foram injetadas em triplicata para verificar a reprodutibilidade das análises. O tempo total de análise de cada amostra, incluindo o branco, calibrante e amostra, foi de 5 minutos por injeção. O pré-processamento dos dados de espectrometria de massas das amostras analisadas foi executado pelo software “*Profyle Analysys*” 2.1 (Bruker Daltonics), com calibração por HPC (*High Precision Calibration*) e normalização pelo maior valor do *bucket* analisado. A faixa de íons de interesse explorado foi de m/z 70 a 1.000, os quais foram analisados entre 1,3 e 3,5 minutos de corrida cromatográfica. Os dados tratados foram exportados no formato ASCII para o software “*The Unscrambler*” 10.0 (CAMO Process), a fim de realizar a quimiometria por meio da análise de componente principal (PCA).

Cromatografia líquida de ultra-alta eficiência acoplada a detector evaporativo de espalhamento de luz (UHPLC-ELSD)

Para identificação e quantificação dos compostos de valor agregado produzidos pelos microrganismos, assim como para o monitoramento do consumo de glicerol pelos microrganismos, foi utilizado um cromatógrafo a líquido, modelo Acquity H-Class UHPLC (WATERS®), com coluna Acquity BEH amida (1,7 µm, 2,1 x 150 mm), acoplado a detector evaporativo de espalhamento de luz (UHPLC-ELSD). Como método de eluição, foi utilizado o modo gradiente, com água e ácido trifluoroacético (0,05%) representando a fase aquosa, e acetonitrila, a fase orgânica.

Resultados e discussão

Após a aquisição das análises das amostras de bioconversão dos diferentes tipos de glicerina por DIMS, foi realizado o PCA dos dados obtidos, a fim de encontrar os microrganismos mais promissores, ou capazes de biotransformar a glicerina em compostos químicos de valor agregado. A partir da confirmação de produção, feita analisando os espectros obtidos, foi realizada a confirmação e quantificação dos compostos-alvo, por experimento de coinjeção com padrões utilizando a técnica de UHPLC-ELSD.

De acordo com o PCA realizado com os dados espectrais das amostras de biotransformação de glicerina de palma, foi possível explicar 83% dos dados. Ao comparar o gráfico de *loadings* com o gráfico de *scores* (Figura 1), verificou-se que dentre as 8 linhagens estudadas, a linhagem 4 (*Trichoderma harzianum*), após 5 dias de cultivo, se destacou por produzir o íon m/z 205,0680 com maior intensidade em relação a mesma linhagem com inoculação de 10 dias (Figura 2), e que ambas demonstraram esse íon com maior intensidade em relação às demais linhagens.

Acerca do PCA das amostras de bioconversão de glicerina bruta de soja por 7 diferentes tipos de fungos, foi possível explicar 89% dos dados (Figura 3), em que as linhagens 4 e 6, ambas identificadas como *T. harzianum*, (10 dias de cultivo) se destacaram, por produzir o íon m/z 205,0680, com maior intensidade em relação às demais. A base de dados pública de metabolômica (KEGG, ChEBI, ChemSpider) indicou que o íon m/z 205,0680 é um poliol do tipo C6.

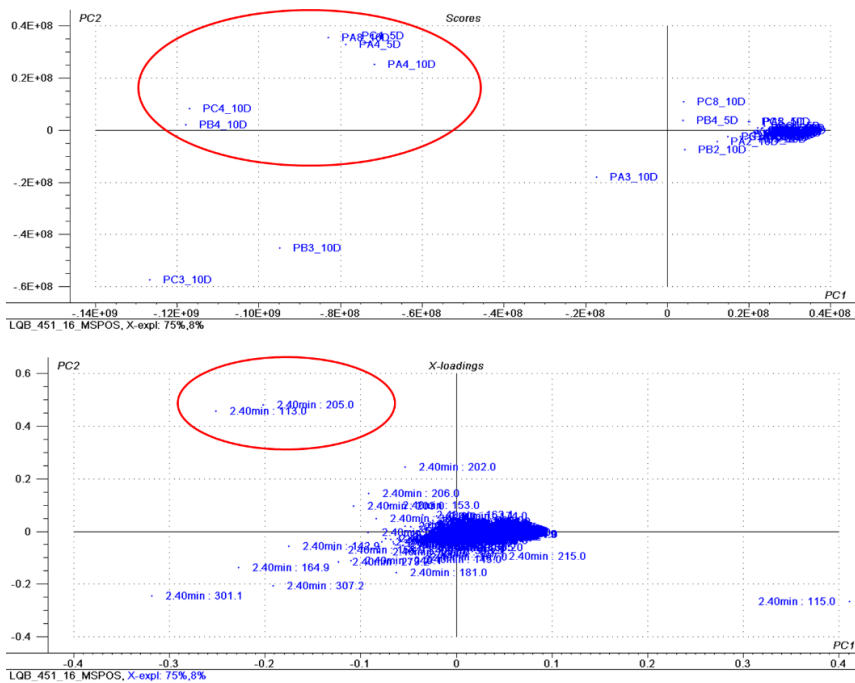


Figura 1. Gráfico de *scores* e *loadings* das amostras de bioconversão de glicerina de palma por fungos filamentosos. P: Glicerina de palma. A: Réplica A; B: Réplica B; C: Réplica C; 1: Linhagem 1; 2: Linhagem 2; 3: Linhagem 3; 4: Linhagem 4; 5: Linhagem 5; 6: Linhagem 6; 7: Linhagem 7; 5D: 5 dias de cultivo; 10D: 10 dias de cultivo.

Experimentos de quantificação, utilizando a técnica de UHPLC-ELSD não detectou glicerina nas amostras bioconvertidas pelas linhagens mais promissoras cultivadas por 10 dias, representadas pela linhagem 4, inoculada com glicerina de palma, e as linhagens 4 e 6 inoculadas com glicerina de soja, demonstrando que houve total consumo desse substrato por parte dos microrganismos. Em contrapartida, não pôde ser quantificado nenhum poliol do tipo C6, possivelmente, em decorrência do fato de o detector de espalhamento de luz ser muito menos sensível que o detector de espectrometria de massas. Adicionalmente, isso também indica que houve uma baixa eficiência na conversão da glicerina em poliol C6, a qual, provavelmente, foi utilizada para o crescimento dos microrganismos.

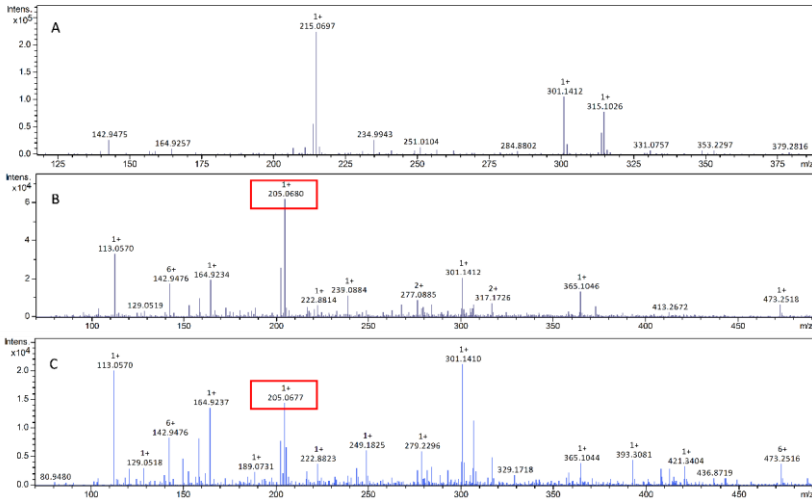


Figura 2. Espectro de massas das amostras de bioconversão de glicerina de palma por fungos filamentosos. A: Meio de cultura (branco, sem inóculo); B: Linhagem 4 com 5 dias de cultivo; C: Linhagem 4 com 10 dias de cultivo.

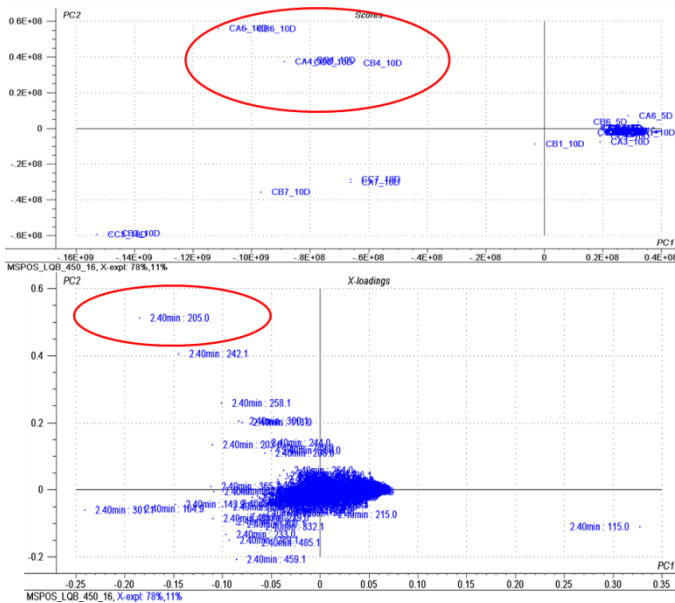


Figura 3. Gráfico de *scores* e *loadings* das amostras de bioconversão de glicerina de soja por fungos filamentosos. C: Glicerina de soja; A: Réplica A; B: Réplica B; C: Réplica C; 1: Linhagem 1; 2: Linhagem 2; 3: Linhagem 3; 4: Linhagem 4; 5: Linhagem 5; 6: Linhagem 6; 7: Linhagem 7; 5D: 5 dias de cultivo; 10D: 10 dias de cultivo.

Conclusões

O método de análise de componente principal (PCA) aplicado à análise de dados de DIMS obtidos de amostras de bioconversão de glicerina de palma e de soja possibilitou demonstrar a produção de polióis por parte dos fungos avaliados. O uso do PCA, aliado às técnicas de espectrometria de massas e UHPLC-ELSD, torna-se muito útil para a prospecção de microrganismos promissores, assim como para identificação de compostos-alvo em experimentos que envolvem bioconversão de blocos de construção, como a glicerina.

Agradecimentos

À Capes, pela bolsa de pós-doutorado; ao CNPq, pelo apoio financeiro, e à Embrapa, pela estrutura laboratorial fornecida.

Referências

BOZELL, J. J.; PETERSEN, G. R. Technology development for the production of biobased products from biorefinery carbohydrates: the US Department of Energy's "Top 10" revisited. **Green Chemistry**, Cambridge, v. 12, n. 4, p. 539–554, 2010.

DHAMARDI, Y.; MURARKA, A.; GONZALEZ, R. Anaerobic fermentation of glycerol by *Escherichia coli*: a new platform for metabolic for metabolic engineering. **Biotechnology and Bioengineering**, Hoboken, v. 94, n.5, p. 821–829, 2006.

MANDELS, M.; WEBER, J. The production of cellulases. **Advances in Chemistry**, Washington, DC, v. 95, p. 394-414, 1969.

SILVA, G. P.; MACK, M.; CONTIERO, J. Glycerol: A promising and abundant carbon source for industrial microbiology. **Biotechnology Advances**, Oxford, v. 27, n. 1, p. 30-39, 2009.

Embrapa
Agroenergia

Apoio


Ubrabio
União Brasileira do Biodiesel
e Bioquerosene


fapdf
Fundação de Apoio à
Pesquisa do Distrito Federal

 **BOEING**

MINISTÉRIO DA
**AGRICULTURA, PECUÁRIA
E ABASTECIMENTO**


BRASIL
GOVERNO FEDERAL

CGPE 13165