



I Encontro de
Pesquisa e Inovação da
Embrapa Agroenergia

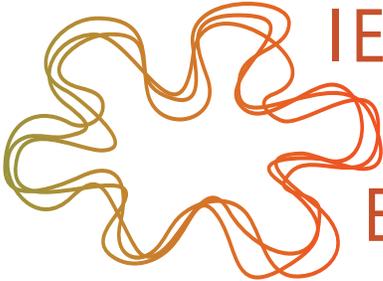
Anais

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

Editores Técnicos

Embrapa

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



I Encontro de
Pesquisa e Inovação da
Embrapa Agroenergia
Anais

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

Embrapa
Brasília, DF
2014

Exemplares desta publicação podem ser obtidos na:

Embrapa Agroenergia

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

CEP: 70770-901

Fone: (61) 3448-4246

Fax: (61) 3448-1589

www.embrapa.br

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

Unidade responsável pelo conteúdo e pela edição

Embrapa Agroenergia

Comitê de Publicações da Unidade

Presidente: *Marcia Mitiko Onoyama*

Secretária-executiva: *Lorena Costa Garcia*

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

Supervisão editorial: *Marcia Mitiko Onoyama*

Revisão de texto: *Sérgio Saraiva Nazareno dos Anjos*

Normalização bibliográfica: *Maria Iara Pereira Machado*

Editoração eletrônica: *Maria Goreti Braga dos Santos*

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

Comitê Técnico-Científico

Presidente: *Bruno dos Santos Alves F. Brasil*

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

1a edição

Publicação digitalizada (2014)

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 (1. : 2014: Brasília, DF).

Anais... / I Encontro de Pesquisa e Inovação da Embrapa Agroenergia, Brasília, DF, 2014/ editado por Alexandre Alonso Alves, Bruno dos Santos Alves Figueiredo Brasil, Lorena Costa Garcia. – Brasília, DF : Embrapa Agroenergia, 2014.

PDF (120 p.) : il. color.

ISBN: 978-85-7035-611-6

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

CDD 333.79

© Embrapa, 2014

APRESENTAÇÃO

Neste ano de 2014 a Embrapa Agroenergia inaugura o seu 1º Encontro de Pesquisa e Inovação, evento anual cujo objetivo é apresentar à sociedade os resultados dos seus trabalhos de pesquisa científica. Nesta primeira edição foram apresentados trabalhos desenvolvidos por nossos colaboradores graduandos e pós-graduandos nas áreas de genética e biotecnologia, de processos bioquímicos, de processos químicos e, também, aqueles relacionados à área de química de biomassa e biocombustíveis. Os trabalhos apresentados na forma de pôster foram avaliados por profissionais especialistas nas diferentes áreas compreendidas no evento e, aqueles trabalhos melhor pontuados foram premiados durante uma seção solene de entrega da premiação aos seus respectivos autores. Esperamos que com a abertura deste espaço de divulgação das nossas ações de pesquisa a Embrapa Agroenergia possa retornar à sociedade informações e produtos que justifiquem o investimento que a mesma faz na Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, através do financiamento público de suas atividades. Nos próximos anos pretendemos ampliar o evento criando novos espaços para não somente trazer informações à sociedade, mas também ampliando as discussões científicas que possam contribuir ainda mais para o desenvolvimento de soluções tecnológicas que atendam aos anseios do setor produtivo, do setor industrial e da sociedade como um todo. Esperamos que, com a publicação destes anais, possamos levar a todos nossa produção científica estimulando ainda mais os jovens que ingressam no ensino universitário a perseguirem uma carreira científica.

Guy de Capdeville

Chefe- Adjunto de Pesquisa e Desenvolvimento

Encontro de Pesquisa e Inovação

Organização

Chefia 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).

Objetivo

Divulgar os trabalhos de PD&I desenvolvidos na Embrapa Agroenergia e premiar os melhores talentos nas categorias de graduação e pós-graduação.

Formato

Os trabalhos inscritos no I Encontro de Pesquisa e Inovação da Embrapa Agroenergia, foram classificados em três categorias (graduação, pós-graduação e pós-doutoramento) e cinco áreas temáticas: 1) Biotecnologia Vegetal; 2) Biotecnologia Microbiana; 3) Processos Bioquímicos; 4) Processos Químicos e 5) Química Analítica. Os trabalhos de graduação foram apresentados na forma de pôsteres e estes avaliados por um comitê avaliador único. Cada apresentador teve 5 minutos para apresentação + 3 minutos para arguição. Os melhores trabalhos de graduação foram então selecionados pela comissão julgadora e premiados durante a cerimônia de encerramento do evento. Os trabalhos de pós-graduação foram apresentados na forma de pôsteres e estes avaliados por um comitê avaliador designado de acordo com a área no qual o trabalho foi inscrito. Cada apresentador teve também 5 minutos para apresentação + 3 minutos para arguição. O melhor trabalho de pós-graduação em cada uma das cinco áreas (total = 5 trabalhos) foi selecionado para uma apresentação oral na manhã do segundo dia do evento. Cada apresentador teve nesta oportunidade 20 minutos para apresentação + 10 minutos para arguição. Os três melhores trabalhos da categoria pós-graduação foram então selecionados pela comissão julgadora. Estes foram então premiados durante a cerimônia de encerramento do evento.

Local: Foyer e Auditório da Embrapa Agroenergia.

Data: 27 e 28 de Novembro de 2014.

Programação:

1º dia (27/11/2014)

- Abertura do encontro (Foyer - 08:30)
- Apresentação de pôsteres (Foyer - 09:00 – 16:00):

2º dia (28/11/2014)

- Apresentação oral de trabalhos de pós-graduação selecionados (Auditório – 09:00):
- Encerramento do encontro e divulgação/premiação dos melhores trabalhos (Foyer - 16:00)

Premiação

Foram premiados os três melhores trabalhos nas categorias graduação e pós-graduação.

Trabalhos premiados:

Resultado Final Premiação – Pós-Graduação

1º LUGAR – ANA PAULA RIBEIRO

Ana Paula Ribeiro; Polyana K. Martins; Bárbara B. A. Dias; Adilson K. Kobayashi; Alan C. Andrade; Hugo B. C. Molinari

Título: Transformação genética de *Saccharum* spp. e *Setaria viridis* com gene MATE visando tolerância ao alumínio.

2º LUGAR – HENRIQUE VERAS

Henrique C. T. Veras, Nádia S. Parachin, Gabriel R. Fernandes; João Ricardo M. de Almeida

Título: Biologia de Sistemas para Estudo Comparativo de Leveduras Fermentadoras de Xilose e Produção de Etanol de Segunda Geração.

3º LUGAR – BARBARA PAES

Bárbara G. Paes, Larissa M. Lima, João Ricardo M. Almeida

Título: Engenharia metabólica de *Saccharomyces cerevisiae* para aproveitamento de xilose na produção de etanol lignocelulósico.

COMISSÃO AVALIADORA

- Alexandre Alonso (Pesquisador Embrapa Agroenergia)
- André Leão (Analista Embrapa Agroenergia)
- Bruno Brasil (Pesquisador Embrapa Agroenergia)
- Carlos Sousa (Pesquisador Embrapa Agroenergia)
- Carolina Polletto (Analista Embrapa Agroenergia)
- Daniel Sifuentes (Analista Embrapa Agroenergia)
- Leticia Jungman (Pesquisador Embrapa Agroenergia)
- Lorena Garcia (Analista Embrapa Agroenergia)
- Gisele Domiciano (Pesquisadora Visitante – Embrapa Agroenergia)
- Lunalva Pedroso (Pesquisadora Visitante – Embrapa Agroenergia)

Resultado Final Premiação – Graduação

1º LUGAR - CATARINA VARGAS CUNHA

Catarina V. Cunha, João Ricardo M. de Almeida

Título: Bioconversão de xilose proveniente da biomassa vegetal em produtos químicos de interesse através de diferentes linhagens bacterianas.

2º LUGAR – ÍSIS VIANA MENDES

Ísis Viana Mendes, Nadia Skorupa Parachin, Betulia de Moraes Souto, João Ricardo Almeida, Ana C. Bitencourt, Betania Ferraz Quirino.

Título: Identificação de Novo gene de Xilose Isomerase em Biblioteca Metagenômica de Rúmen de Caprino.

3º - ANDRÉ FERNANDO PASSAMANI OLIVEIRA

Valérya C. Teles, André F. Passamani Oliveira, Raquel B. Campanha, Rodrigo C. do Nascimento, Itânia P. Soares, Bruno S. A. Figueiredo Brasil.

Título: Rendimento de amido em microalgas cultivadas em vinhaça utilizando fotobiorreatores.

COMISSÃO AVALIADORA

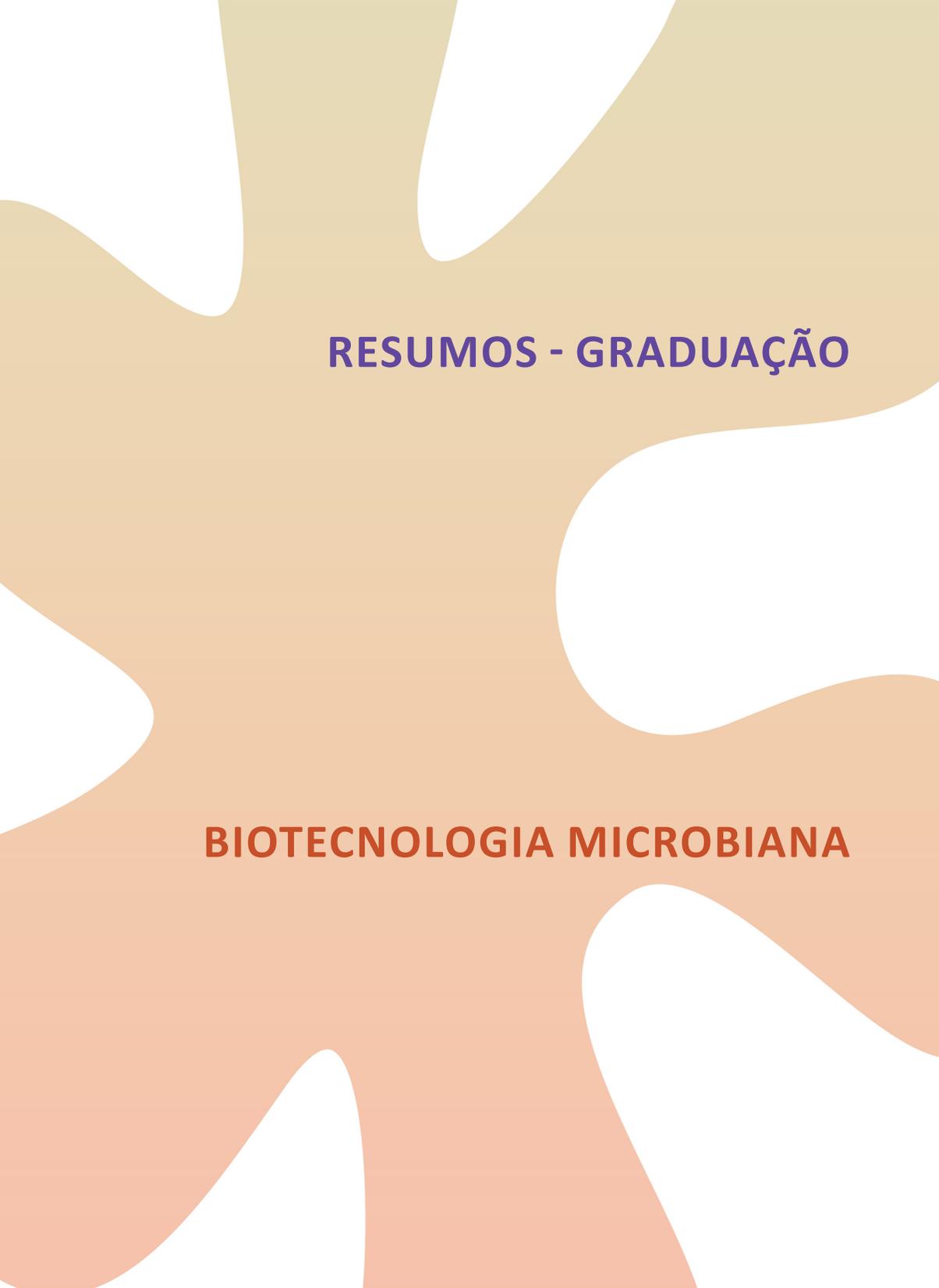
- André Leão (Analista Embrapa Agroenergia)
- Carolina Polletto (Analista Embrapa Agroenergia)
- Daniel Sifuentes (Analista Embrapa Agroenergia)
- Lorena Garcia (Analista Embrapa Agroenergia)

Sumário

RESUMOS - GRADUAÇÃO	11
BIOTECNOLOGIA MICROBIANA	11
Avaliação da atividade enzimática de um fungo isolado de Cerrado em diferentes condições de crescimento	12
Identificação de novo gene de xilose isomerase em biblioteca metagenômica de rúmen de caprino.....	14
Melhoramento genético de leveduras naturalmente capazes de fermentar xilose para aumento da tolerância a inibidores presentes em hidrolisados lignocelulósicos	16
Fungos endofíticos de cana-de-açúcar e seu potencial para produção de enzimas lignocelulolíticas.....	18
Construção e melhoramento genético de linhagens industriais de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> capazes de fermentar xilose em hidrolisados lignocelulósicos	20
Bioconversão de xilose proveniente da biomassa vegetal em produtos químicos de interesse através de diferentes linhagens bacterianas	22
Fungos associados aos frutos da palma de óleo (<i>Elaeis guineensis</i>) e seu potencial para produção de lipases.....	24
Novas lipases para a síntese de biodiesel: bactérias associadas aos frutos de dendê e seu potencial biotecnológico	26
Fungos associados a plantas de interesse para agroenergia e seu potencial para produção de lipases	28
Bactérias associadas a plantas e seu potencial para produção de enzimas lignocelulolíticas	30
Avaliação do perfil enzimático de linhagens de <i>Aspergillus niger</i> 3T5B8 melhoradas geneticamente por mutação – seleção recorrente	32
Seleção de linhagens de leveduras para a produção de químicos a partir de matérias-primas renováveis	34
PROCESSOS BIOQUÍMICOS.....	36
Avaliação da produtividade de biomassa de microalgas utilizando vinhaça como meio de cultivo.....	37
Design de fotobiorreatores do tipo placa plana em escala piloto para cultivo de microalgas.....	39
Produção de nanofibras de celulose por hidrólise enzimática a partir de cachos vazios de dendê.....	41
Seleção de variáveis que influenciam a produção de endoglucanases e xilanases por <i>Celulomonas</i> sp	43
Avaliação do crescimento de fungos filamentosos em glicerina, coproduto do biodiesel, como	

única fonte de carbono	45
Enzyme dosage effects over enzymatic hydrolysis of elephant grass pretreated with diluted acid.....	47
Avaliação de variáveis que influenciam a quantificação de açúcares redutores utilizando ácido dinitrosalicílico.....	49
Avaliação de mandiocas híbridas para a produção de etanol	51
Influência de diferentes concentrações enzimáticas na hidrólise de bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado visando produção de etanol	53
Avaliação da autohidrólise como pré-tratamento para a produção de etanol a partir de bagaço de cana-de-açúcar.....	55
PROCESSOS QUÍMICOS.....	58
Caracterização dos resíduos gerados no processo de produção do etanol de segunda geração ...	59
Testes de aumento de escala na utilização de MgO/KF na produção de biodiesel	61
Delineamento experimental de <i>screening</i> de variáveis aplicado à produção de biodiesel de pinhão-manso (<i>Jatropha curcas</i> L.).....	63
QUÍMICA ANALÍTICA.....	65
Síntese e caracterização do catalisador Ni/Co/HUSY para aplicação em reforma de Biogás.....	66
Rendimento de amido em microalgas cultivadas em vinhaça utilizando fotobiorreatores	68
Utilização da lignina como agente antioxidante em biodiesel de óleo de soja.....	70
Avaliação da qualidade do óleo de macaúba visando à produção de biocombustíveis	72
Avaliação do fluxo a frio do biodiesel produzido a partir da mistura de óleo de soja e sebo bovino	74
Otimização do gradiente de eluição usado no monitoramento por UPLC-PDA de furano-aldeídos e compostos fenólicos em amostras de biomassa lignocelulósica	76
Determinação por UPLC-ELSD de polióis em processos biotecnológicos de conversão de glicerina crua: desenvolvimento, validação e aplicação	79
Desenvolvimento de metodologia para diferenciação entre a coloração do corante do diesel e a coloração do biodiesel de palma	81
Aplicação da extração em fase sólida na eliminação de furano-aldeídos e derivados de ácidos fenólicos do licor do bagaço de cana-de-açúcar	83
RESUMOS - PÓS-GRADUAÇÃO	85
BIOTECNOLOGIA VEGETAL	85
Transformação genética de <i>Saccharum</i> spp. e <i>Setaria viridis</i> com gene <i>MATE</i> visando tolerância ao alumínio.....	86

Descoberta e caracterização genômica de marcadores PAVs e SNPs em <i>Elaeis oleifera</i>	88
Genetic Transformation of <i>Setaria viridis</i> with <i>CcUNK8</i> Gene of <i>C. canephora</i> for Enhanced Drought Tolerance	90
BIOTECNOLOGIA MICROBIANA	92
Engenharia metabólica de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> para aproveitamento de xilose na produção de etanol lignocelulósico	93
Biologia de sistemas para estudo comparativo de leveduras fermentadoras de xilose e produção de etanol de segunda geração	95
Caracterização de espécies selvagens de leveduras consumidoras de xilose para a produção de etanol de segunda geração por espectrometria de massa MALDI-TOF.	97
Degradação de ésteres de forbol da torta de pinhão-manso por basidiomicetos e seu potencial como substrato para produção de cogumelos comestíveis	99
Macrofungos como agentes desconstrutores e detoxificadores de torta de caroço de algodão – Resultados esperados.	101
Isolamento e seleção de microalgas para o cultivo em vinhaça.....	103
Identificação molecular de microalgas utilizando marcador ITS-2	105
QUÍMICA ANALÍTICA	107
Novas abordagens em espectrometria de massas para análise direta de licores de cana-de-açúcar	108
Desenvolvimento de protocolo para análise metabolômica de leveduras fermentadoras de xilose	110
An analytical platform based on Untargeted Metabolomics for leaves of oil palm	112
RESUMOS - PÓS-DOCTORADO	114
BIOTECNOLOGIA VEGETAL	114
<i>Setaria viridis</i> as a model system for functional genomic studies in sugarcane	115
Development of a protocol for controlled inoculation of powdery mildew in <i>Jatropha curcas</i> L. and characterization of its symptoms and structures in young plants	117
Impacto de modelos preditos via seleção genômica na seleção ultraprecoce de genótipos superiores de pinhão-manso	119



RESUMOS - GRADUAÇÃO

BIOTECNOLOGIA MICROBIANA

Avaliação da atividade enzimática de um fungo isolado de Cerrado em diferentes condições de crescimento

Gustavo P. Carneiro^{1*}, Ana C. Bitencourt^{1,2}, Betania F. Quirino^{1,2}

Introdução

Tendo em vista a grande dependência de combustíveis fósseis e seus efeitos nas mudanças climáticas, o modelo de biorrefinaria surge como uma opção sustentável e versátil a esses dilemas (CHERUBINI, 2010). Utilizando microrganismos que atuem na biomassa, podem-se obter subprodutos dentre eles o bioetanol, com propriedades semelhantes aos combustíveis fósseis (PERALTA-YAHYA et al., 2012). A biomassa pode ser degradada por um conjunto de enzimas hidrolíticas, dentre elas as endoglucanases, exoglucanases e β -glicosidases que atuam na celulose, liberando açúcares que poderão ser fermentados a etanol (CHO et al., 1999). O presente projeto tem como objetivo validar e aperfeiçoar a capacidade de um fungo isolado de solo de Cerrado para degradação da biomassa lignocelulósica. Os fungos são atualmente a principal fonte de produção de enzimas celulolíticas comerciais capazes de converter a biomassa em monômeros de açúcar, os quais podem ser convertidos a etanol e outros bioprodutos (HORN et al., 2012).

Métodos

Foram realizados ensaios em placa com o reagente Vermelho do Congo, para verificar a eficiência do isolado em crescer em meio mínimo Czapek, com diferentes fontes de carbono. Como substratos, utilizou-se o bagaço de cana-de-açúcar, capim elefante, Avicel[®], lactose e bagaço de cana pré-tratado e capim elefante pré-tratado com ácido sulfúrico a 1,5%, de modo a favorecer a ação das enzimas. O crescimento do fungo ocorreu em erlenmeyers com meio *Mandels & Weber* (RODRÍGUEZ-ZÚNIGA et al., 2011), durante o período de cinco dias. Dois modelos de ensaio foram testados, o primeiro, apenas com o sobrenadante do fungo e o segundo, concentrando-o duas vezes a partir de um valor inicial de 15 mL em colunas VIVASPIN[®]. Para cada ensaio, foram utilizados parâmetros específicos em relação aos ciclos de temperatura ótima para a atuação das enzimas. As placas tiveram suas densidades ópticas analisadas em espectrofotômetro. Experimentos com variação de potencial hidrolítico (pH) também foram realizados para melhor otimização do crescimento do isolado.

¹ Embrapa Agroenergia, Parque Estação Biológica, Brasília/DF, Brasil, 70770-901

² Universidade Católica de Brasília, W5 Norte, Brasília/DF, 70790-160; *gustavo.carneiro@colaborador.embrapa.br

Resultados e Conclusões

A escolha dos substratos se deu por suas características particulares. O bagaço de cana e o capim elefante foram escolhidos por serem abundantes e de baixo custo. Por sua vez, o Avicel® foi escolhido por se tratar de um polímero semelhante à celulose encontrada na natureza. Por fim, a escolha da lactose se deu por ser indutor de enzimas β -glicosidase. Utilizando apenas o sobrenadante no qual o fungo cresceu, foram obtidos baixos valores de atividade enzimática com os ensaios de CMC (carboximetilcelulose) visando endo-glucanases, papel filtro Whatman #1 visando endo e exoglucanases e celobiose visando β -glicosidases. Ao comparar este ensaio com o experimento utilizando o sobrenadante concentrado, o resultado foi relativamente menor. Contudo, este resultado se limitou a apenas dois substratos, Avicel® e lactose, todavia, ainda existem substratos a serem testados. O trabalho de aperfeiçoamento do tempo de crescimento do fungo para secreção ótima de enzimas para degradação da biomassa está em andamento.

Referências

- CHERUBINI, F. The biorefinery concept: using biomass instead of oil for producing energy and chemicals. **Energy Conversion and Management**, Oxford, v. 51, n. 7, p. 1412-1421, 2010.
- CHO, K. M.; YOO, Y. J.; KANG, H. S. Delta-Integration of endo/exo-glucanase and beta-glicosidase genes into the yeast chromosomes for direct conversion of cellulose to ethanol. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v. 25, n. 1-2, p. 23-30, 1999.
- HORN, S. J.; VAAJE-KOLSTAD, G.; WESTERENG, B.; EIJNSINK, V. G. H. Novel enzymes for the degradation of cellulose. **Biotechnology for Biofuels**, London, v. 45, n. 5, p. 1-12, 2012.
- PERALTA-YAHYA, P. P.; ZHANG, F.; DEL CARDAYRE, S. B.; KEASLING, J. D. Microbial engineering for the production of advanced biofuels. **Nature**, London, v. 488, n. 7411, p. 320-328, 2012.
- RODRÍGUEZ-ZÚÑIGA, U. F.; FARINAS, C. S.; NETO, V. B.; COURI, S.; CRESTANA, S. Produção de celulasas por *Aspergillus niger* por fermentação em estado sólido. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v. 46, n. 8, p. 912-919, 2011.

Identificação de novo gene de xilose isomerase em biblioteca metagenômica de rúmen de caprino

Ísis Viana Mendes^{1,2}, Nadia Skorupa Parachin³, Betulia de Moraes Souto¹, João Ricardo Almeida¹, Ana C. Bitencourt^{1,2}, Betania Ferraz Quirino^{1,2}

Introdução

Devido a políticas que visam à sustentabilidade, atualmente há a necessidade de conciliar o progresso no setor energético e industrial com o desenvolvimento sustentável (SACHS, 2002). A biorrefinaria surge como um procedimento alternativo que engloba a utilização de novas tecnologias que visam diminuir a geração de resíduos aproveitando-os como fonte geradora de bioprodutos (CHERUBINI, 2010). Dentro do conceito de biorrefinaria, a biomassa vegetal pode ser convertida em seus açúcares constituintes e utilizada para a produção de energia, biocombustíveis de transporte e produtos químicos. Um dos principais recursos que o modelo de biorrefinaria se dispõe, é a utilização de microrganismos que tenham a capacidade de secretar enzimas de interesse comercial, capazes de degradar a biomassa e mais precisamente os componentes da hemicelulose. Entretanto, leveduras como *Saccharomyces cerevisiae* não são capazes de fermentar a xilose proveniente da hemicelulose, sendo um obstáculo ao aproveitamento total da biomassa. O presente projeto visa à identificação de xiloses isomerases, enzimas-chave para criação de leveduras capazes de converter xilose em outros produtos por engenharia metabólica. Na literatura há xiloses isomerases já descritas, todavia existe uma limitação quanto à funcionalidade das mesmas no processo de fermentação (PARACHIN; GORWA-GRAUSLUND, 2011). Para identificar genes codificadores de xiloses isomerases provenientes tanto de organismos cultivados quanto não cultivados, foi utilizada uma abordagem metagenômica neste trabalho.

Metodologia

O presente projeto visa à triagem da biblioteca metagenômica de rúmen de caprino utilizando duas metodologias. A primeira é baseada na função e a segunda é baseada na sequência. Naquela transformam-se células HB101, pertencentes à *Escherichia coli*, com o vetor pcf430 contendo o fragmento da biblioteca e plaquei-as em meio mínimo SM3, contendo xilose como única fonte de carbono. Em seguida, o DNA plasmidial é isolado das

¹ Embrapa Agroenergia, Parque Estação Biológica, Brasília/DF, Brasil, 70770-901; *isis.mendes@colaborador.embrapa.br.

² Laboratório de Ciências Genômicas e Biotecnologia da Universidade Católica de Brasília, SGAN 916 Módulo B Avenida W5.

³ Universidade de Brasília, Campus Plano Piloto, SHIN 916 Bloco C sala 212, Asa Norte, 70790-160.

colônias que apresentam crescimento e realiza-se o sequenciamento. A segunda metodologia, baseada na sequência utiliza quatro primers degenerados, dois internos e dois externos, baseados nos sítios conservados de xiloses isomerases já descritas. Com estes primers é realizado o procedimento de reação em cadeia da polimerase (PCR), utilizando o DNA da biblioteca metagenômica de rúmen de caprino. As sequências originadas da PCR são clonadas e sequenciadas.

Resultados e Conclusões

O procedimento de transformação em HB101 com o vetor pcf430 contendo o inserto da biblioteca se mostrou eficaz resultando em um primeiro clone positivo e seis outros potenciais clones. A análise do primeiro clone isolado e parcialmente sequenciado foi realizada com auxílio do banco de dados nr no GenBank (NCBI) utilizando-se o alinhamento *blastx*. Foi possível constatar que este clone apresenta 78% de identidade com a xilose isomerase do organismo *Clostridiales bacterium*. A segunda metodologia baseada em sequência apresentou possíveis clones que codificam para xilose isomerase e estão em fase de confirmação.

Suporte Financeiro

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa).

Referências

- CHERUBINI, F. The biorefinery concept: using biomass instead of oil for producing energy and chemicals. **Energy Conversion and Management**, Trondheim, v. 51, n. 7, p. 1412-1421, 2010.
- PARACHIN, N. S.; GORWA-GRAUSLUND, M. F. Isolation of xylose isomerases by sequence- and function-based screening from a soil metagenomic library. **Biotechnology for Biofuels**, London, v. 4, n. 9, 2011.
- SACHS, I. **Caminhos para o desenvolvimento sustentável**. 2. ed. Rio de Janeiro: Garamond, 2002. 96 p.

Melhoramento genético de leveduras naturalmente capazes de fermentar xilose para aumento da tolerância a inibidores presentes em hidrolisados lignocelulósicos

Ana Carolina S. Antunes*, João R. M. Almeida¹.

Introdução

Durante o pré-tratamento e hidrólise da biomassa lignocelulósica, há a formação de um complexo contendo diversos açúcares e inibidores. A tolerância da levedura aos inibidores é crítica para a produção de etanol, pois a gama de inibidores interfere negativamente no crescimento, atividade enzimática e o conseqüentemente na produção e rendimento de etanol. Dentre os inibidores, destaca-se pela toxicidade a leveduras o furfural, um composto heterocíclico derivado da desidratação de pentoses (ALMEIDA et al., 2007). A conversão do furfural à sua forma menos tóxica ocorre durante a fase lag, onde o grupo aldeído do inibidor é reduzido a um grupo álcool (WALLACE-SALINA; GORWA-GRAUSLUND, 2013). Dos açúcares presentes no hidrolisado, a xilose é o segundo açúcar mais abundante na parede celular, consistindo em até 35% do total de carboidratos da biomassa lignocelulósica (WEI et al., 2013). Desta forma, leveduras naturalmente capazes de fermentar xilose, tais como *Spathaspora passalidarum*, *Spathaspora arborariae* e *Scheffersomyces stipitis* apresentam interesse biotecnológico, pois poderiam ser utilizadas para aumentar a produção de etanol com a utilização da mesma quantidade de biomassa. Como essas leveduras apresentam baixa tolerância a compostos inibidores presentes em hidrolisados lignocelulósicos, este trabalho teve por objetivo realizar o melhoramento genético destas 3 espécies para aumentar sua tolerância ao furfural.

Métodos

Os experimentos de evolução dirigida consistiram na transferência contínua das linhagens de leveduras em meio com concentrações crescentes de furfural, tendo a xilose como única fonte de carbono. O pré-inóculo das três leveduras foi realizado em Erlenmeyer de 100 ml contendo meio YNB (yeast nitrogen base), suplementado com xilose e tampão fosfato de potássio. Para iniciar os experimentos de evolução adaptativa, o mesmo meio de cultura citado acima foi utilizado, exceto pela adição de 0,5g/L de furfural ao meio. Após constatar o crescimento por meio da medição de densidade ótica com o comprimento de onda de 600nm, foi realizada a transferência de células para um novo erlenmeyer

¹ Embrapa Agroenergia, Parque Estação Biológica, Brasília/DF, Brasil, 70770-901; *ana.antunes@colaborador.embrapa.br

contendo os mesmos componentes e a mesma concentração de furfural. Após aproximadamente 3 transferências sob a mesma concentração de furfural, foi realizado o aumento de 0,2g/L na concentração. Ao final do experimento, que durou aproximadamente 7 meses, as concentrações máximas de furfural foram de 2,0g/L para *Spathaspora arborariae* e *Scheffersomyces stipitis* e de 2,2g/L para *Spathaspora passalidarum*. Essas populações finais foram plaqueadas em YNB, xilose e 1,0g/L de furfural e 30 isolados de cada espécie foram obtidos. Posteriormente, o crescimento destes isolados foi analisado na presença de furfural. Os 5 isolados que apresentaram crescimento mais rápido foram selecionados para experimentos de fermentação. A caracterização fisiológica e atividade enzimática destas linhagens estão sendo realizadas.

Resultados e Conclusões

O processo de evolução adaptativa permitiu a seleção de leveduras *Spathaspora passalidarum*, *Spathaspora arborariae* e *Scheffersomyces stipitis* com maior tolerância a furfural. Dentre as três leveduras utilizadas para o experimento de evolução dirigida, *Spathaspora passalidarum* apresentou melhor resistência ao furfural durante todo o experimento e *Scheffersomyces stipitis* apresentou maior tempo de adaptação ao inibidor, conferindo a ela menor sucesso adaptativo. Foram selecionados os 5 isolados de cada espécie, que foram avaliados em relação a crescimento e capacidade fermentativa em diferentes meios de cultura e atividades enzimáticas relacionadas à destoxificação de furfural.

Suporte Financeiro

Embrapa, CNPq.

Referências

- ALMEIDA, J. R. M.; MODIG, T.; PETERSSON A.; HÄHN-HÄGERDAL, B.; LIDÉN, G.; GORWA-GRAUSLUND, M. F. Increased tolerance and conversion of inhibitors in lignocellulosic hydrolysates by *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, Sussex, v. 82, n. 4, p. 340-349, 2007.
- WALLACE-SALINA, V.; GORWA-GRAUSLUND, M. Adaptive evolution of an industrial strain of *Saccharomyces cerevisiae* for combined tolerance to inhibitors and temperature. **Biotechnology for Biofuels**, London, v. 6, n. 1, p. 151, 2013.
- WEI, N.; QUARTEMAN, J.; KIM, S.; CATE, J.; JIN, Y. Enhanced biofuel production through coupled acetic acid and xylose consumption by engineered yeast. **Nature Communications**, London, v. 4, n. 2580, 2013.

Fungos endofíticos de cana-de-açúcar e seu potencial para produção de enzimas lignocelulolíticas

Gleiciane P. Sousa^{1*}, Paula F. Franco², Thais D. Mendes², Wellington L. Araújo³, Dasciana S. Rodrigues², Thais F. C. Salum², Léia C. L. Fávoro²

Introdução

Um dos desafios para a produção de etanol a partir de biomassa lignocelulósica é o aumento da eficiência de hidrólise enzimática. Isto pode ser obtido, por exemplo, por meio da obtenção de microrganismos capazes de produzir enzimas em concentrações elevadas e de serem cultivados em substratos de baixo custo (FAVARO; POLETTTO, 2013). Tem sido proposto que o afrouxamento de microfibrilas de celulose pela ação de proteínas não hidrolíticas pode facilitar o acesso das enzimas às fibras, aumentando a área superficial disponível e tornando a sacarificação mais eficiente. Entre as proteínas não hidrolíticas conhecidas como indutoras de afrouxamento de celulose e estimuladoras da ação de enzimas celulolíticas estão as expansinas (SAMPEDRO; COSGROVE, 2005) e as monoxigenases de polissacarídeos líticas dependentes de cobre (LPMOs) (BEESON et al., 2012). As expansinas rompem pontes de hidrogênio entre as microfibrilas de celulose e as LPMOs catalisam a oxidação direta da celulose, hemicelulose e oligossacarídeos. Apenas um pequeno número de expansinas e LPMOs de origem microbiana foi caracterizado até o momento e seu estudo deve ser intensificado para explorar o potencial de aumento da eficiência de sacarificação. Neste contexto, este trabalho teve por objetivos: *i)* avaliar uma coleção de fungos endofíticos de cana-de-açúcar quanto à produção de enzimas lignocelulolíticas; *ii)* iniciar a clonagem de genes codificadores de expansinas e LPMOs dos fungos celulolíticos *Trichoderma harzianum* CFAM-422 e *Epicoccum nigrum* P16.

Métodos

Fungos endofíticos de cana-de-açúcar preservados na “Coleção de Microrganismos Aplicados a Agroenergia” (134 linhagens) foram avaliados quanto à produção de enzimas lignocelulolíticas. Para tanto, os fungos foram cultivados em meio mínimo de sais acrescido de Avicel, carboximetilcelulose (CMC), xilana, pectina e amido como fonte de carbono. O índice enzimático foi calculado em triplicata. Os fungos selecionados foram identificados por

¹ Universidade Federal do Tocantins, Gurupi/TO. *gleiciane.sousa@colaborador.embrapa.br

² Embrapa Agroenergia, Brasília/DF

³ Universidade de São Paulo, São Paulo/SP

meio de análise filogenética da região ITS1-5,8S-ITS2 do DNA ribossômico. Paralelamente, iniciou-se a clonagem de genes codificadores de swollenin e LPMOs de *T. harzianum* CFAM-422 e *E. nigrum* P16. Oligonucleotídeos degenerados disponíveis na literatura para *T. asperellum* (BROTMAN et al., 2008) foram utilizados para amplificação de swollenin de *T. harzianum* CFAM-422. Oligonucleotídeos específicos para uma LPMO de *E. nigrum* P16 foram construídos com base na sequência genômica completa deste fungo [5]. Os produtos de amplificação foram purificados do gel de agarose, clonados em plasmídeo pGEM-T Easy e transformados em *Escherichia coli* XL10 Gold. Os plasmídeos foram purificados e enviados para sequenciamento no Centro de Estudos do Genoma Humano (USP).

Resultados e Conclusões

Verificou-se que 56%, 79%, 68%, 49% e 96% das linhagens degradaram CMC, xilana, pectina, amido e Avicel, respectivamente. Os fungos selecionados foram identificados como *Aspergillus terreus*, *Beauveria bassiana*, *Bipolaris sorokiniana*, *Curvularia intermedia*, *Fusarium* sp., *Fusarium oxysporum*, *Mariannaea camptospora*, *Talaromyces pinophilus* e *Trichoderma harzianum*. Foi possível estabelecer, pela primeira vez, as melhores condições de amplificação dos genes codificadores de swollenin e LPMOs para *T. harzianum* CFAM-422 e *E. nigrum* P16, respectivamente. Os fragmentos amplificados foram clonados e a identificação dos genes será realizada futuramente. Este trabalho mostrou que fungos endofíticos de cana-de-açúcar constituem uma fonte prolífica de novas linhagens microbianas capazes de produzir insumos para desconstrução de biomassa lignocelulósica.

Apoio Financeiro

Embrapa

Referências

- BEESON, W. T.; PHILLIPS, C. M.; CATE, J. H.; MARLETTA, M. A. Oxidative cleavage of cellulose by fungal copper-dependent polysaccharide monoxygenases. **Journal of the American Chemical Society**, Berkeley, v. 134, n. 2, p. 890-892, 2012.
- BROTMAN, Y.; BRIFF, E.; VITERBO, A.; CHET, I. Role of swollenin, an expansin-Like protein from *Trichoderma*, in plant root colonization. **Plant Physiology**, Rockville, v. 147, n. 2, p. 779-789, 2008.
- FAVARO, L. C. de L.; POLETTTO, C. M. Bioprospecção e melhoramento genético de fungos para produção de enzimas aplicadas em biocombustíveis. In: MACHADO, C. M. M. (Ed.). **Microorganismos na produção de biocombustíveis líquidos**. Brasília, DF: Embrapa Agroenergia, 2013. p. 35-79.
- FÁVARO, L. C. L. **BioProject PRJNA77841 - *Epicoccum nigrum* P16 Genome sequencing**. 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/bioproject/PRJNA77841>>. Acesso em: nov. 2014.
- SAMPEDRO, J.; COSGROVE, D. J. The expansin superfamily. **Genome Biology**, London, v. 6, n. 12, n. 242, 2005.

Construção e melhoramento genético de linhagens industriais de *Saccharomyces cerevisiae* capazes de fermentar xilose em hidrolisados lignocelulósicos

Samantha J. L. Sousa^{1*}, Bárbara G. Paes^{1,2}, João R. M. de Almeida¹

Introdução

A xilose é um dos principais açúcares componentes da biomassa lignocelulósica e sua utilização na produção de etanol lignocelulósico é de importância para viabilidade econômica do processo (ALMEIDA et al., 2011). Contudo, a levedura *Saccharomyces cerevisiae* que é utilizada na produção industrial de primeira geração, é capaz de utilizar apenas hexoses na fermentação, não sendo capaz de metabolizar naturalmente pentoses, como a xilose (KUYPER et al., 2003). Linhagens recombinantes desta levedura capazes de fermentar xilose foram construídas pela expressão de enzimas responsáveis pelo catabolismo de xilose em bactérias, leveduras e fungos. A expressão do gene que codifica para xilose isomerase (XI) de *Piromyces* sp. E2 nesta levedura mostrou-se como uma das estratégias de maior sucesso, permitindo que a levedura fermentasse xilose a etanol com alto rendimento (KUYPER et al., 2003). Entretanto, a simples expressão da via catabólica de fermentação de xilose não é suficiente para construção de linhagens eficientes, haja vista que o metabolismo de xilose envolve outras vias metabólicas, tais como a via das pentoses fosfato. Assim, a linhagem de levedura a ser utilizada para construção da linhagem recombinante tem grande impacto na capacidade fermentativa final da linhagem obtida. Neste trabalho, o efeito do background de cinco diferentes linhagens industriais de *S. cerevisiae* sobre o metabolismo de xilose foi analisada. Para tanto, essas linhagens foram transformadas com o plasmídeo integrativo YIplac204 XI, o qual codifica para a expressão da XI de *Piromyces*. Posteriormente, linhagens recombinantes capazes de crescer em xilose foram selecionadas e comparadas em termos de consumo de xilose e produção de etanol.

Métodos

O plasmídeo YIplac204 XI foi construído valendo-se da XI isolada de *Piromyces* sp. E2 utilizando-se vetor de expressão integrativo YIplac204 (GIETZ; SUGINO, 1988), a partir do

¹ Embrapa Agroenergia, Parque Estação Biológica, Brasília/DF, Brasil, 70770-901; *samantha.sousa@colaborador.embrapa.br

² Programa de Pós-Graduação em Biologia Molecular – Departamento de Biologia Celular, Universidade de Brasília – UnB, Brasília/DF, Brasil, 70910-900

cassete de expressão construído previamente em plasmídeo multicópia p424 XI, contendo promotor forte GPD e terminador CYC (MUMBERG et al., 1994). O plasmídeo, que contém marca de seleção pra ampicilina, foi inicialmente clonado em *Escherichia coli*. Após confirmação e validação do plasmídeo construído, este foi transformado em cinco diferentes linhagens industriais de *S. cerevisiae*, sendo elas: BG-1, CAT-1, JP-1, PG-2 e SA-1. A seleção e identificação dos transformantes foram realizadas por reação de polimerase em cadeia (PCR). Por fim, a avaliação do crescimento dos transformantes foi realizada através da medição de densidade óptica em espectrofotômetro e de fermentação aeróbia em meio mínimo contendo YNB e xilose.

Resultados e Conclusões

Testes de viabilidade celular em meio não-seletivo comprovaram o crescimento de todas as linhagens após a transformação. A linhagem recombinante de *S. cerevisiae* SA-1 foi obtida e confirmada através de PCR para amplificação do gene codificante para XI. O crescimento em meio mínimo contendo xilose como única fonte de carbono após a transformação foi apontado neste caso. Fermentação de xilose foi realizada, taxas de consumo de substrato e formação de produtos foram calculados e serão apresentados.

Apoio Financeiro

Embrapa, CNPq.

Referências

- ALMEIDA, J. R. M.; RUNQUIST, D.; SÀNCHEZ I NOGUÉ, V.; LIDÉN, G.; GORWA-GRAUSLUND, M. F. Stress-related challenges in pentose fermentation to ethanol by the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnol Journal**, Hoboken, v. 6, n. 3, p. 286–299, 2011.
- GIETZ, R. D.; SUGINO, A. New yeast-*Escherichia coli* shuttle vectors constructed with in vitro mutagenized yeast genes lacking six-base pair restriction sites. **Gene**, Amsterdam, v. 74, n. 2, p. 527-534, 1988.
- KUYPER, M.; HARHANGI, H. R.; STAVE, A. K.; WINKLER, A. A.; JETTEN, M. S.; DE LAAT, W. T.; DEN RIDDER, J. J.; OP DEN CAMP, H. J.; 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.
- MUMBERG, D.; MÜLLER, R.; FUNK, M. Regulatable promoters of *Saccharomyces cerevisiae*: comparison of transcriptional activity and their use for heterologous expression. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 22, n. 25, p. 5767-5768, 1994.

Bioconversão de xilose proveniente da biomassa vegetal em produtos químicos de interesse através de diferentes linhagens bacterianas

Catarina V. Cunha^{1}, João Ricardo M. de Almeida¹*

Introdução

Novas tecnologias para a produção de biocombustíveis e outros compostos químicos a partir de fontes renováveis têm sido objeto de intensa investigação, devido às preocupações com o aumento da demanda e do custo destes produtos e o aquecimento global (BERGMANN et al., 2013). Várias abordagens têm sido empregadas para o estudo de tecnologias sustentáveis, entre elas o uso de microrganismos para produção de compostos químicos de alto valor agregado a partir dos açúcares presentes na biomassa lignocelulósica (DIEN et al., 2003). Sendo assim, é de interesse biotecnológico, realizar a identificação de novos microrganismos para bioconversão de xilose, um dos açúcares gerados durante a hidrólise de biomassa lignocelulósica (LIMA et al., 2013). Previamente, linhagens bacterianas da coleção microbiana da Embrapa Agroenergia foram selecionadas pela sua capacidade em metabolizar xilose. O presente trabalho tem por objetivo caracterizar fisiologicamente tais linhagens microbianas selecionadas e avaliar a capacidade de produção de compostos químicos de interesse, destacando-se 2,3-butanodiol.

Métodos

Neste trabalho foram utilizadas 192 linhagens de bactérias da Coleção Microbiana da Embrapa Agroenergia previamente selecionadas pela capacidade de crescer em xilose. Inicialmente, as bactérias foram inoculadas em meio TSB (Sigma Aldrich) e posteriormente foram submetidas ao microcultivo em 800µL de meio seletivo M9 (Sigma) suplementado com D-xilose 40%. Os sobrenadantes das culturas foram analisados por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC; Agilent) sobre uma coluna Aminex HPX - 87H a 45°C. Como fase móvel foi utilizado o ácido sulfúrico a 5 mM com um fluxo de injeção de 0,6 mL/min. Todos os compostos foram detectados com um detector de índice de refração. Este experimento nos permitiu avaliar quais metabólitos estavam sendo produzidos por cada uma das linhagens em questão. Com base na conversão de xilose e na produção de compostos de interesse, foram selecionadas 5 linhagens bacterianas, com as quais foram realizadas fermentações em 50 mLs de meio seletivo M9 suplementado com D-xilose 40%. As fermentações

¹ Embrapa Agroenergia, Parque Estação Biológica, Brasília/DF, Brasil, 70770-901; *catarina.cunha@colaborador.embrapa.br.

foram realizadas a 28°C sob agitação de 180 rpm, por aproximadamente 120 horas. As amostras foram retiradas em intervalos de tempo regulares. Simultaneamente, mediu-se a variação de biomassa pela leitura da absorbância em 600nm e a concentração de metabólitos produzidos, por análise em HPLC, seguindo as mesmas condições acima citadas.

Resultados e Conclusões

Dentre as 192 bactérias analisadas foi possível identificar várias linhagens produtoras de 2,3-butanodiol, ácido láctico, etanol e outros compostos químicos. Após análises de rendimento e produção dos compostos químicos desejados, linhagens foram selecionadas para análise de cinética de fermentação. Nestes experimentos, notou-se que algumas culturas não apresentaram valores significativos para o crescimento celular. Além disso, no microcultivo observaram-se maiores concentrações de metabólitos provavelmente devido a limitação de oxigênio durante o crescimento celular. Estes resultados indicaram a necessidade de se trabalhar em anaerobiose com as bactérias avaliadas.

Apoio Financeiro

Embrapa, CNPq

Referências

BERGMANN, J. C.; TUPINAMBÁ, D. D.; COSTA, O. Y. A.; ALMEIDA, J. R. M.; BARRETO, C. C.; QUIRINO, B. F. Biodiesel production in Brazil and alternative biomass feedstocks. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, Oxford, v. 21, p. 411-420, 2013.

DIEN, B. S.; COTTA, M. A.; JEFFRIES, T. W. Bacteria engineered for fuel ethanol production: current status. **Applied MicrobiologyBiotechnology**, New York, v. 63, n. 3, p. 258-266, 2003.

LIMA, M. A.; LAVORENTE, G. B.; SILVA, H. K. P. da.; BRAGATTO, J.; REZENDE, C. A.; BERN ADINELLI, O. D.; AZEVEDO, E. R. de.; GOMEZ, L. D.; MC-QUEEN-MANSON, S. J.; LABATE, C. A.; POLIKARPOV, I. Effects of pretreatment on morphology, chemical composition and enzymatic digestibility of eucalyptus bark: a potentially valuable source of fermentable sugars for biofuel production - part 1. **Biotechnology of Biofuels**, London, v. 6, NUSP 75, 2013.

Fungos associados aos frutos da palma de óleo (*Elaeis guineensis*) e seu potencial para produção de lipases

Jheniffer R. Cunha^{1,2}; Lucas S. Leite^{1,2}; Carolina M. Poletto²; Paula F. Franco²; Jorge A. Santos³; Thais F. C. Salum²; Léia C. L. Fávoro²*

Introdução

A produção de biodiesel utilizando lipases como biocatalisador e etanol em substituição ao metanol de origem fóssil é uma alternativa promissora do ponto de vista ambiental em comparação ao processo de catálise alcalina (VIEIRA et al., 2006). Porém a baixa eficiência e o alto custo de produção de lipases dificultam sua utilização em escala industrial. Microrganismos são considerados fontes importantes de lipases com características de interesse para diferentes bioprocessos (SHARMA et al., 2001). O estudo da microbiota naturalmente associada a plantas oleaginosas de interesse para produção de biodiesel pode ser uma estratégia promissora para a descoberta de linhagens produtoras de lipases. Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi isolar fungos associados aos frutos de dendê e caracterizá-los quanto à produção de lipases visando sua aplicação na síntese de biodiesel.

Métodos

Frutos maduros foram coletados a partir de quatro variedades de dendê cultivadas no campo experimental da Embrapa Cerrados, sendo três repetições de cada variedade, totalizando 12 amostras. Após a coleta em campo as amostras foram imediatamente transportadas para a Embrapa Agroenergia para o isolamento de fungos filamentosos e leveduriformes. Para o isolamento foram utilizados os meios de cultura Oat Meal Agar, Potato Dextrose Agar, Yeast Peptone Dextrose Agar e meio mínimo com Tween 20, todos acrescidos de 100 µg/mL de penicilina (para evitar o crescimento de bactérias) e 0,1% de Triton X-100 (para restringir o tamanho das colônias dos fungos). Foram escolhidos cinco frutos de aparência, peso e tamanho similares de cada amostra, os quais foram transferidos para 50 mL de tampão PBS (pH 7,4) e incubados a 28°C por duas horas sob agitação (200 rpm). Em seguida foram preparadas diluições seriadas e alíquotas destas diluições foram plaqueadas nos meios de cultura descritos anteriormente (para o isolamento de fungos filamentosos foram plaqueadas as diluições 10-1, 10-2 e 10-3, e para o isolamento de leveduras foram

¹ Universidade de Brasília, Brasília/DF. *jheniffer.cunha@colaborador.embrapa.br

² Embrapa Agroenergia, Brasília/DF.

³ Embrapa Cerrados, Planaltina/DF

plaqueadas as diluições 10-4, 10-5, 10-6 e 10-7). As placas foram incubadas durante 3-5 dias à 28°C, na ausência de luz. Após esse período, a contagem de microrganismos foi realizada, bem como a purificação e preservação dos isolados. Testes qualitativos para detecção de atividade lipolítica foram realizados em triplicata utilizando diferentes substratos (óleo de oliva, trioleína e Tween 20). Os fungos selecionados com base nos maiores valores de índice enzimático foram submetidos à extração de DNA genômico e à identificação taxonômica baseada na análise filogenética da região ITS1-5,8S-ITS2 do DNA ribossômico.

Resultados

A contagem de microrganismos do isolamento resultou em um total de 3841 leveduras e 1105 fungos filamentosos. Deste total, 384 leveduras e 427 fungos filamentosos foram purificados e preservados na Coleção de Microrganismos Aplicados à Agroenergia. De 384 leveduras avaliadas quanto à produção de lipases, 23% degradaram exclusivamente trioleína, 8% degradaram exclusivamente óleo de oliva e 53% degradaram exclusivamente Tween 20. Dos 427 fungos filamentosos prospectados, 17 degradaram exclusivamente óleo de oliva; 103 degradaram exclusivamente trioleína; 5 degradaram exclusivamente Tween 20. A utilização de diferentes substratos simultaneamente para detecção de lipases permitiu traçar o perfil fenotípico de cada linhagem. Além disso, esta estratégia pode ser importante para reduzir o número de linhagens a serem investigadas quanto a produção de lipases por meio de testes quantitativos. Até o momento, as linhagens selecionadas foram identificadas como pertencentes aos gêneros *Diaporthe*, *Fusarium*, *Trichoderma* e *Penicillium*.

Conclusões

Este trabalho mostrou que fungos associados aos frutos da palma de óleo constituem uma fonte prolífica de linhagens produtoras de lipases. As linhagens selecionadas quanto à atividade hidrolítica serão futuramente avaliadas quanto à capacidade de síntese de ésteres e também em testes quantitativos para determinação de atividade enzimática.

Suporte Financeiro

Embrapa

Referências

- SHARMA, R.; CHISTI, Y.; BANERJEE, U. C. Production, purification, characterization, and applications of lipases. **Biotechnology Advances**, Kidlington, 19, n. 8, p. 627-662, 2001.
- VIEIRA, A.; DA SILVA, M. A. P.; LANGONE, M. A. P. Biodiesel production via esterification reactions catalyzed by lipase. **Latin American Applied Research**, Bahia Blanca, v. 36, n. 4, p. 283-288, 2006.

Novas lipases para a síntese de biodiesel: bactérias associadas aos frutos de dendê e seu potencial biotecnológico

Lucas S. Leite^{1,2}; Jheniffer R. Cunha^{1,2}; Carolina M. Poletto²; Paula F. Franco²; Jorge A. Santos³; Thais F. C. Salum⁴; Léia C. L. Fávoro⁴*

Introdução

A produção de biodiesel empregada atualmente ocorre em grande parte pelo processo alcalino, no entanto este processo possui diversas desvantagens, como por exemplo, alto consumo de energia e etapas extras para remoção do catalisador. Uma alternativa para reduzir estas desvantagens seria a produção de biodiesel por rota enzimática. Porém a baixa eficiência e o alto custo das lipases dificultam sua utilização em escala industrial (FJERBAEK et al., 2009). Microrganismos são considerados uma fonte importante de lipases para diferentes aplicações e o estudo da microbiota naturalmente associada a plantas oleaginosas pode ser uma estratégia promissora para descoberta de novas linhagens microbianas e genes codificadores de lipases (FAVARO; POLETTTO, 2013). O objetivo deste trabalho foi isolar bactérias associadas aos frutos de dendê, e caracterizá-las quanto à sua atividade lipolítica visando à descoberta de novas lipases, e sua posterior aplicação na síntese de biodiesel.

Métodos

Frutos maduros foram coletados a partir de quatro variedades de dendê cultivadas no campo experimental da Embrapa Cerrados, sendo três repetições de cada variedade, totalizando 12 amostras. As amostras foram transportadas para a Embrapa Agroenergia em condição refrigerada e imediatamente processadas para o isolamento de bactérias epifíticas (KUKLINSKI-SOBRAL et al., 2004). Para o isolamento, foram utilizados os meios de cultura Tryptic Soy Agar, Actinomyceete Isolation Agar e meio mínimo de sais com Tween 20, todos acrescidos de fungicida para impedir o crescimento de fungos. Foram escolhidos cinco frutos de aparência, peso e tamanho similares de cada amostra, os quais foram transferidos para 50 mL de tampão PBS (pH 7,4) e incubados a 28°C por 2 horas sob agitação (200 rpm). Em seguida, foram preparadas diluições seriadas e alíquotas destas diluições foram plaqueadas nos meios de cultura descritos anteriormente. As placas foram incubadas

¹ Universidade de Brasília, Brasília/DF. *lucas.leite@colaborador.embrapa.br

² Embrapa Agroenergia, Brasília/DF.

³ Embrapa Cerrados, Planaltina/DF

durante 3-5 dias a 28°C, na ausência de luz. Após esse período, a contagem de microrganismos foi realizada, bem como a purificação e preservação dos isolados. Testes qualitativos para detecção de atividade lipolítica foram realizados em triplicata utilizando diferentes substratos (óleo de oliva, trioleína e Tween 20). As bactérias selecionadas com base nos valores de índice enzimático foram identificadas por meio de análise filogenética da região 16S do DNA ribossômico (WOESE; FOX, 1977).

Resultados e Conclusões

Das 664 linhagens de bactérias analisadas, 9% apresentaram atividade lipolítica em pelo menos um dos substratos avaliados. Ao todo, 22 linhagens de bactérias apresentaram índice enzimático elevado, as quais foram identificadas como pertencentes aos gêneros *Burkholderia*, *Erwinia*, *Falsibacillus*, *Gibbsiella*, *Kluivera*, *Leclercia* e *Stenotrophomonas* sp. Conforme os resultados obtidos, as bactérias associadas aos frutos da palma de óleo constituem uma fonte prolífica de linhagens bacterianas com potencial biotecnológico. As bactérias selecionadas serão avaliadas quanto à produção de lipases por testes quantitativos visando sua aplicação na síntese de biodiesel a partir de óleo de dendê.

Apoio Financeiro

Embrapa

Referências

- FAVARO, L. C. de L.; POLETTTO, C. M. Bioprospecção e melhoramento genético de fungos para produção de enzimas aplicadas em biocombustíveis. In: MACHADO, C. M. M. (Ed.). **Microrganismos na produção de biocombustíveis líquidos**. Brasília, DF: Embrapa Agroenergia, 2013. p. 35-79.
- FJERBAEK, L.; CHRISTENSEN, K. V.; NORDDAHL, B. A review of the current state of biodiesel production using enzymatic transesterification. **Biotechnology and Bioengineering**, Hoboken, v. 102, n. 5, p. 1298-1315, 2009.
- KUKLINSKI-SOBRAI, J.; ARAÚJO, W. L.; MENDES, R.; GERALDI, I. O.; PIZZIRANI-KLEINER, A. A.; AZEVEDO, J. L. Isolation and characterization of soybean-associated bacteria and their potential for plant growth promotion. **Environmental Microbiology**, Oxford, v. 6, n. 12, p. 1244-1251, 2004.
- VIEIRA, A.; DA SILVA, M. A. P.; LANGONE, M. A. P. Biodiesel production via esterification reactions catalyzed by lipase. **Latin American Applied Research**, Bahia Blanca, v. 36, n. 4, p. 283-288, 2006.
- WOESE, C. R.; FOX, G. E. Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: the primary kingdoms. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, DC, v. 74, n. 11, p. 5088-5090, 1977.

Fungos associados a plantas de interesse para agroenergia e seu potencial para produção de lipases

Larissa C. R. Magalhães^{1,2*}, Carolina M. Poletto¹, Jheniffer R. Cunha¹, Paula F. Franco¹, Jorge S. Antonini³, Thais F. Salum¹, Léia C. L. Fávoro¹

Introdução

Lipases são enzimas amplamente distribuídas na natureza e catalisam a hidrólise de gorduras e óleos em ácidos graxos livres, monoacilgliceróis, diacilgliceróis e glicerol, atuando em substratos lipídicos emulsificados (DHEEMAN et al., 2011). Microrganismos produtores de lipases são encontrados em vários habitats tais como lixo industrial, fábricas de processo de óleo vegetal, laticínios, solos contaminados com óleo, sementes oleaginosas e alimentos deteriorados (VENTATESAGOWDA et al., 2012). A demanda industrial por novas fontes de lipases com diferentes características estimula a pesquisa visando à descoberta de linhagens microbianas produtoras destes insumos para aplicação em diferentes bioprocessos. As lipases são consideradas catalisadores alternativos para síntese de biodiesel, no entanto, o alto custo de produção e a baixa eficiência dificultam sua aplicação em escala industrial. Este trabalho teve por objetivo caracterizar fungos associados a plantas de interesse para agroenergia (*Elaeis guineensis*, *Jatropha curcas* e *Saccharum officinarum*) visando à identificação de linhagens produtoras de lipases.

Métodos

Foram avaliadas 151 linhagens de fungos endofíticos de cana-de-açúcar, 71 linhagens endofíticas de folhas de dendê e 72 linhagens obtidas de tortas de pinhão-manso, as quais encontram-se preservadas na Coleção de Microrganismos Aplicados a Agroenergia. Para detecção de atividade lipolítica, as linhagens foram avaliadas nos substratos óleo de oliva, trioleína, tributirina, Tween 20 e Tween 80, e cultivadas a 25 °C por 4 dias. O índice enzimático (IE = diâmetro médio do halo/diâmetro médio da colônia) foi calculado em duplicata. Os fungos de cana-de-açúcar também foram avaliados quanto à capacidade de crescimento em condições de baixa atividade de água (a_w) nos meios de cultura DG18 e MY50G, visando selecionar linhagens mais adaptadas às condições de fermentação no estado sólido. Nestes substratos, os fungos foram cultivados por um período de 10 a 14 dias

1 Embrapa Agroenergia, Parque Estação Biológica, Brasília/DF, 70770-901; *larissa.magalhaes@colaborador.embrapa.br

2 Universidade Paulista, Brasília/DF

3 Embrapa Cerrados, Planaltina/DF

a 25 °C, sendo posteriormente calculada a taxa de crescimento, em triplicata. As linhagens foram identificadas por meio de sequenciamento e análise filogenética da região ITS1-5,8S-ITS2 do DNA ribossômico.

Resultados e Conclusões

A degradação de pelo menos um dos substratos foi observada para 41% dos fungos de cana-de-açúcar, 68% dos fungos de pinhão-manso e 52% dos fungos de dendê. Entre os fungos de cana-de-açúcar, 65% apresentaram tolerância a baixa atividade de água. As linhagens que apresentaram índice enzimático elevado foram identificadas como pertencentes aos gêneros *Fusarium*, *Penicillium* e *Bipolaris*. A produção de lipases por testes quantitativos e sua capacidade de sínteses de ésteres serão avaliadas futuramente.

Apoio Financeiro

Embrapa

Referências

DHEEMAN, D. S.; BABU, S. A.; FRÍAS, J. M.; HENEHAN, G. T. M. Purification and characterization of an extracellular lipase from novel strain *Penicillium* sp. DS-39 (DSM 23773). **Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic**, Amsterdam, v. 72, n. 3-4, p. 256-262, 2011.

VENTATESAGOWDA, B.; PONUGUPATY, E.; BARBOSA, A. M.; DEKKER, R. F. H. Diversity of plant oil seed-associated fungi isolated from seven oil-bearing seeds and their potential for the production of lipolytic enzymes. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, New York, v. 28, n. 1, p. 71-80, 2012.

Bactérias associadas a plantas e seu potencial para produção de enzimas lignocelulolíticas

Letícia B. M. Lima^{1,2}; Thais D. Mendes¹; Maria C. Quecine³; Welington L. Araújo⁴; Paula M. D. Jaramillo¹; Betania F. Quirino¹; Dasciana S. Rodrigues¹; Thaís F. C. Salum¹; Léia C. L. Fávoro¹

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 (FÁVARO; POLETO, 2013). Processos de produção de etanol lignocelulósico economicamente viáveis estão em desenvolvimento, entretanto, existem vários pontos do processo que precisam ser otimizados. Para viabilizar a produção de etanol de biomassa é necessário que haja aumento da eficiência de hidrólise enzimática, bem como diminuição do custo de produção de enzimas (MARGEOT et al., 2009). Neste contexto, este projeto propõe prospectar a biodiversidade microbiológica brasileira, uma coleção de bactérias da Embrapa Agroenergia, para obter enzimas e micro-organismos que possam ser utilizados como insumos no processo de produção de etanol lignocelulósico.

Métodos

Bactérias endofíticas e epifíticas de diferentes ambientes (total de 8452 acessos diferentes) foram avaliadas em testes qualitativos (em duplicata) quanto à capacidade de degradação dos substratos carboximetilcelulose (CMC), xilana, pectina, amido, ABTS e Remazol Brilliant Blue R (RBBR). O meio de cultura basal para os ensaios de CMCase, xilanase, pectinase, amilase e ligninasas foi o meio de saís M9. As linhagens selecionadas foram submetidas a uma segunda etapa de triagem na qual se avaliou o índice enzimático, em triplicata. As bactérias mais promissoras foram submetidas à identificação taxonômica por meio de sequenciamento e análise da região 16S do DNA ribossômico.

Resultados e Conclusões

Os resultados mostraram que 17%, 2%, 0,5% e 0,8% apresentaram atividade de degradação de CMC, xilana, pectina e amido, respectivamente. De 731 bactérias degradadoras de CMC (índice enzimático variando de 1,08 a 16,43) foram selecionadas 27 linhagens com índice enzimático superior a 6 para identificação taxonômica. A análise da região 16S

1 Embrapa Agroenergia, Parque Estação Biológica, Brasília/DF, Brazil, 70770-901

2 Universidade de Brasília, Brasília/DF

3 Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba/SP

4 Departamento de Microbiologia, Universidade de São Paulo, São Paulo/SP. *leticia.lima@colaborador.embrapa.br

do DNA ribossômico revelou que as linhagens selecionadas com potencial de produção de endoglicanase pertencem ao Filo Firmicutes e aos gêneros *Bacillus* e *Falsibacillus*. Este trabalho demonstrou que bactérias associadas a plantas são uma fonte prolífica de novas linhagens com potencial de produção de enzimas para conversão de biomassa e aplicações em biorrefinarias.

Apoio Financeiro

Embrapa; CNPq

Referências

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

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

Avaliação do perfil enzimático de linhagens de *Aspergillus niger* 3T5B8 melhoradas geneticamente por mutação – seleção recorrente

Jhéssica C. Araújo^{1*}; Thais D. Mendes¹; Mariana S. Tamietti¹; Edna M. M. Oliveira²; Mônica C. T. Damaso¹; Léia C. L. Fávaro¹

Introdução

O interesse na utilização de biomassa para a produção de etanol tem despertado a atenção da comunidade científica para os desafios técnicos que precisam ser vencidos. Entre estes desafios está o aumento da eficiência de hidrólise enzimática. Isto pode ser obtido, por exemplo, por meio da obtenção de microrganismos capazes de produzir enzimas degradadoras de componentes da parede celular vegetal em concentrações elevadas e de serem cultivados em substratos de baixo custo.

A Embrapa realiza pesquisas em melhoramento genético de fungos produtores de enzimas de interesse biotecnológico por meio de melhoramento clássico, engenharia genética (transformação) e tecnologias ômicas (FAVARO; POLETTTO, 2013). A linhagem de *A. niger* 3T5B8 foi selecionada em um programa de melhoramento visando aumento da produção de pectinases (COURI; FARIAS, 1995; PINTO, 1998). Nesse contexto, este trabalho teve por objetivo dar continuidade ao programa de melhoramento desta linhagem por mutação-seleção recorrente, visando o aumento da produção de β -glicosidase, endoglicanase, xilanase, poligalacturonase e FPase.

Métodos

Conídios do fungo *A. niger* 3T5B8 (10^6 conídios/mL) foram irradiados com ultravioleta por 7,5 minutos de modo a se obter entre 1- 10% de sobrevivência. Em seguida, os conídios foram inoculados em meios de cultura seletivos (Avicel, carboximetilcelulose, pectina, xilana). Conídios não irradiados foram usados como controle. As colônias sobreviventes foram preservadas em óleo mineral e avaliadas em meio de cultura sólido para seleção de mutantes com índice enzimático superior ao parental. Linhagens selecionadas foram avaliadas em testes quantitativos. A avaliação quantitativa de FPase, β -glicosidase e poligalacturonase foi realizada em ensaios miniaturizados em microplacas de 96 poços e a cinética de produção de enzimas também foi avaliada (3, 5 e 7 dias). Linhagens selecionadas nos testes

1 Embrapa Agroenergia, PqEB s/nº W3 Norte (final), Brasília- DF, CEP 70770-901. *jhessica.araujo@colaborador.embrapa.br

2 Embrapa Agroindústria de Alimentos, Av. das Américas, 29501, Guaratiba- RJ, CEP 23020-470.

quantitativos foram submetidas ao tratamento com o agente mutagênico EMS 10% em um 2º ciclo de mutagênese.

Resultados e Conclusões

No 1º ciclo de mutagênese foram obtidas 1800 linhagens que foram preservadas em óleo mineral. Trinta linhagens que apresentaram índice enzimático superior ao parental foram selecionadas para os testes quantitativos, sendo possível obter 3 linhagens com produção superior de poligalacturonase e β -glicosidase. Com essas 3 linhagens foram feitos novos testes miniaturizados para confirmação dos resultados e seleção de uma dessas linhagens para realização de um 2º ciclo de mutação. Após testes com a linhagem mutante C88, foi observado um leve aumento da produção de poligacturonase (7,35 U/ml ($\pm 0,8$)) enquanto que no parental foi observada uma produção de 4,76 U/ml ($\pm 1,7$). Para outras enzimas não foram observados resultados significativos para essa seleção. O mutante C88 foi submetido a um novo ciclo de mutagênese com EMS 10%. Foi observada uma taxa de 6,6% de sobrevivência e aproximadamente 200 linhagens foram obtidas e serão avaliadas qualitativa e quantitativamente em relação ao seu parental quanto à produção de enzimas, visando obter linhagens superiores. As estratégias utilizadas para obtenção de mutantes têm sido satisfatórias e até o momento uma biblioteca com 2000 linhagens foi obtida e poderá ser avaliada futuramente. Após as análises realizadas, um mutante derivado do parental 3T5B8 se mostrou levemente superior, denominado C88. Os mutantes obtidos por melhoramento genético convencional poderão ser submetidos a manipulação de genes alvo visando aumento da produção de enzimas degradadoras de biomassa. Além disso, os mutantes melhorados poderão ser futuramente utilizados em cruzamentos multiparentais via fusão de protoplastos.

Apoio Financeiro

Embrapa

Referências

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

COURI, S.; FARIAS, A. X. Genetic manipulation of *Aspergillus niger* for increased synthesis of pectinolytic enzymes. **Revista de Microbiologia**, São Paulo, v. 26, n. 4, p. 314-317, 1995.

PINTO, G. A. S. **Produção de uma mistura hidrolítica por *Aspergillus niger* 3T5B8 em fermentação submersa**. 1998. 107 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.

Seleção de linhagens de leveduras para a produção de químicos a partir de matérias-primas renováveis

Angra Paula Bomfim Rêgo¹ e João Ricardo Moreira de Almeida²

Introdução

A produção de biocombustíveis e produtos químicos a partir de matérias-primas renováveis é necessária para atingir a demanda de energia em um mundo onde os combustíveis fósseis estão ficando cada vez mais escassos e caros (HANSEN et al., 2005). Neste sentido, biomassa lignocelulósica e glicerol bruto, resíduo da indústria de etanol e biodiesel, respectivamente, representam dois substratos de baixo custo e abundantes que podem ser utilizados para a produção de biocombustíveis e químicos (HONG et al., 2009). A natureza reduzida do glicerol, como da xilose, permite aos microrganismos serem capazes de convertê-la a uma série de metabólitos, com rendimentos semelhantes aos obtidos com o metabolismo de açúcares. Várias linhagens microbianas, incluindo bactérias, leveduras e fungos filamentosos, tem sido avaliadas, em condições aeróbicas e anaeróbicas, para a produção de ácidos orgânicos e outros compostos químicos (ALMEIDA et al., 2012). Este trabalho tem por objetivo selecionar novas linhagens de leveduras capazes de produzir compostos químicos de interesse a partir da xilose e do glicerol.

Métodos

Para a seleção de linhagens capazes de consumir xilose e glicerol, leveduras do banco de microrganismos da Embrapa Agroenergia foram selecionadas pela capacidade de crescimento nessas fontes de carbono. Inicialmente, aproximadamente 500 linhagens de leveduras foram inoculadas em 200µl de meio completo YM (4g de glicose; 1,2g de extrato de levedura; 2g de peptona bacteriológica; 1,2g de extrato de levedura). Após crescimento no meio YM, as linhagens foram transferidas para 200 µl de meio mínimo (YNB Sigma Aldrich) suplementado com xilose 150g/L, arabinose 150g/L e glicerol 40g/L, incubadas à 28°C sem agitação. O crescimento das linhagens foi acompanhado pela leitura de absorbância a 600nm. As linhagens que apresentaram melhor crescimento foram selecionadas e a capacidade fermentativa das mesmas foi analisada em fermentações em batelada. Por fim,

¹ Discente do curso de Biotecnologia da Universidade Federal da Bahia, Campus Anísio Teixeira. ² Pesquisador/Orientador da Embrapa Agroenergia Email correspondente: angra.paula@colaborador.embrapa.br

² Pesquisador/Orientador da Embrapa Agroenergia Email correspondente: angra.paula@colaborador.embrapa.br

os compostos químicos produzidos pelas linhagens de leveduras selecionadas foram identificados e quantificados utilizando um sistema de HPLC .

Resultados e Conclusões

Foram selecionadas do banco de micro-organismos da Embrapa Agroenergia, leveduras capazes de utilizar xilose, arabinose e glicerina como únicas fontes de carbono. Poucas linhagens apresentaram a capacidade de crescimento nas fontes de carbono analisadas. Análises da capacidade fermentativa demonstraram que as linhagens selecionadas são capazes de consumir as fontes de carbono específicas em 48 horas, produzindo principalmente biomassa xilitol em condições de aerobiose e limitação de oxigênio.

Referências

- ALMEIDA, J. R. M.; FAVARO, L. C. L.; QUIRINO, B. F. Biodiesel biorefinery: opportunities and challenges for microbial production of fuels and chemicals from glycerol waste. **Biotechnology for Biofuels**, London, v. 5, n. 48, 2012.
- HANSEN, A. C.; ZHANG, Q.; LYNE, P. W. Ethanol-diesel fuel blends: a review. **Bioresource Technology**, Oxon, v. 96, n. 3, p. 277-285, 2005.
- HONG, A. A.; CHENG, K. K.; PENG, F.; ZHOU, S.; SUN, Y.; LIU, C. M.; LIU, D. H. Strain isolation and optimization of process parameters for bioconversion of glycerol to lactic acid. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, Sussex, v. 84, n. 10, p. 1576-1581, 2009.



PROCESSOS BIOQUÍMICOS

Avaliação da produtividade de biomassa de microalgas utilizando vinhaça como meio de cultivo

Maiara S. Fernandes¹, Patrícia P. M. Brunale², Rodrigo C. Nascimento³, Bruno dos S. A. F. Brasil⁴

Introdução

A vinhaça é o resíduo final da fabricação do álcool etílico por via fermentativa, caracterizada como um efluente de destilarias com alto poder poluente e alto valor fertilizante. É rica em matéria orgânica e em importantes componentes químicos como C, N, P, K, Ca, Mg, S, F, Z, Co, Mn, entre outros (PREVITALE, 2011). A carga poluidora da vinhaça é cerca de cem vezes maior que a do esgoto doméstico, principalmente devido ao baixo potencial hidrogeniônico (em torno de 4,5) e à presença da alta demanda bioquímica de oxigênio (DBO). De acordo com (LELIS NETO, 2008), para cada 1 litro de álcool produzido, são gerados cerca de 13 litros de vinhaça. A disposição final mais empregada para este subproduto tem sido o uso *in natura* como fertilizante, apesar de tal aplicabilidade ser limitada devido à saturação do solo por nutrientes, e dos riscos associados à contaminação do lençol freático (VAN HAANDEL, 2000). Na tentativa de remediar a problemática da vinhaça, uma alternativa é a sua utilização como elemento nutricional para a produção de microalgas, com objetivo de obter biomassa para diversas finalidades. Microalgas são micro-organismos fotossintéticos, que apresentam ampla capacidade de se desenvolverem em baixos níveis de nutrientes, gerando biomassa rica em ácidos graxos, proteínas e carboidratos (RIBEIRO et al., 2011). Possuem ampla aplicabilidade nas indústrias de alimentos, farmacêutica, cosmética, na área ambiental e grande potencial na produção de biocombustíveis. Diante do exposto, objetivou-se com este trabalho, avaliar a eficiência na produção de biomassa de cepas de microalgas, em função de diferentes meios de cultivo a base de vinhaça, afim de verificar a viabilidade do uso deste resíduo da indústria sucroenergética no cultivo de microalgas, bem como identificar a cepa mais promissora à produção de biomassa.

Métodos

Avaliou-se o crescimento e a produção de biomassa de quatro cepas de microalgas selecionadas a partir da Coleção de Micro-organismos Fotossintetizantes da Embrapa Agroenergia. As quatro cepas pertencem à divisão *Chlorophyta*, sendo X1 e X4 pertencentes

^{1,3} Universidade Federal do Tocantins, Zona Rural, Gurupi/TO, 77402-970; *maiara_fernandes@yahoo.com.br

^{2,4} Embrapa Agroenergia, Parque Estação Biológica, Brasília/DF, Brasil, 70770-901;

ao gênero *Chlamydomonas*, X2 ao gênero *Acrochasma* e X3 ao gênero *Chlorella*. As microalgas foram cultivadas por 7 dias a 30°C, com agitação contínua por meio de injeção de ar atmosférico (5 L/h), fotoperíodo de 16h:8h (luz/escuro) e intensidade luminosa de 15.000 lux, em quatro meios distintos: (1) Vinhaça (2) Vinhaça clarificada; (3) Vinhaça enriquecida com fósforo e nitrogênio; (4) Meio básico **Bold** (BBM) modificado. O meio de cultivo (1) Vinhaça, foi empregado em duas condições diferentes: Vinhaça na ausência de luz e vinhaça com luz em fotoperíodos de 16h:8h (claro/escuro). Todos os outros meios foram utilizados com regulação em fotoperíodos. A concentração inicial de células foi de (T0) de 1×10^6 células/ml ($0,047 \pm 0,014$ g/L). A produção de biomassa foi determinada por técnica de peso seco e o crescimento por contagem celular em câmara de Neubauer.

Resultados e Conclusões

Os resultados demonstraram que todos os meios de cultivo testados favorecem o crescimento das cepas. Contudo, a condição vinhaça com fotoperíodos 16:8 (claro/escuro) promoveu o maior acúmulo de biomassa, ao apresentar uma concentração final superior a 2,5 g L⁻¹ nas quatro cepas de microalgas. As cepas X1, X2, X3 e X4 apresentam potencial para produção de biomassa, porém a cepa X2 se destacou ao apresentar a maior produtividade média diária de biomassa ($443 \pm 16,9$ mg L⁻¹ dia⁻¹) e maior rendimento do número de células ($7,1762 \pm 0,1797$ células.dia⁻¹), quando cultivada em vinhaça com fotoperíodos 16:8 (claro/escuro).

Apoio Financeiro

Embrapa (SEG: 02.12.11.001.00.00)

Referências

LELIS NETO, J. A. **Monitoramento de componentes químicos da vinhaça aplicados em diferentes tipos de solo**. 2008. 89 f. Dissertação (Mestrado). Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba.

PREVITALI, N. R. **Uso de vinhaça para fertirrigação**. 2011. 60 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Especialização) - Faculdade de Tecnologia, Araçatuba.

RIBEIRO, D. M.; MINILLO, A.; FONSECA, G. G.; GODOY, H. C. Biotecnologia Sustentável: Possibilidades de utilização de resíduos da produção de açúcar e álcool para a produção de biodiesel através de microalgas. **Anais do VII Simpósio Brasileiro De Engenharia Física**, Dourados, MS, v. 1, n. 1, p. 1-5, 2011.

VAN HAANDEL, A. C. Aproveitamento dos subprodutos de destilarias de álcool para proteger o meio ambiente e aumentar a rentabilidade. In: CONGRESSO INTERAMERICANO DE ENGENHARIA SANITÁRIA E AMBIENTAL, 27., 2000, Porto Alegre, RS. **Resumos**. Porto Alegre: Abes, 2000. p. 3-8.

Design de fotobiorreatores do tipo placa plana em escala piloto para cultivo de microalgas

Rodrigo C. Nascimento^{1,2}, Maiara S. Fernandes^{1,2}, Patrícia P. M. Brunale¹, Bruno S. A. F. Brasil¹

Introdução

Microalgas são seres fotossintéticos que crescem rapidamente devido à sua estrutura celular simples. Apresentam alto teor lipídico e baixa necessidade de terra para produção. Por apresentarem capacidade de se desenvolver em condições adversas, o uso de resíduos agroindustriais como meio de cultivo é promissor (MATA et al., 2010). A vinhaça é um composto rico em matéria orgânica, elevada DBO (demanda bioquímica de oxigênio) e baixo pH. Estima-se que para 1 L de etanol seja gerado em torno de 13 L de vinhaça (LELIS NETO, 2008). O cultivo de microalgas é tradicionalmente feito em fotobiorreatores. Podem ser do tipo aberto ou fechado (MATA et al., 2010). Os fotobiorreatores fechados têm a vantagem de permitir o melhor controle das condições de cultura (pH, temperatura, iluminação) e menor risco de contaminação. Porém, os custos de produção são mais elevados devido ao maior consumo de energia e equipamentos mais sofisticados. Nos fotobiorreatores abertos a produção é mais barata, pelo baixo consumo de energia. No entanto, apresentam alta vulnerabilidade à contaminação (MATA et al., 2010). Esta pesquisa busca desenvolver um protótipo de fotobiorreator fechado com aeração *air lift* para cultivo de microalgas.

Métodos

Neste trabalho desenvolveu-se um protótipo de fotobiorreator do tipo placa plana (FBM), baseado no modelo de GRIS (GRIS, 2011), com volume de trabalho de 15 L. O FBM foi construído em acrílico de base retangular com 35 cm de largura, 10 cm de espessura e 50 cm de altura. Utilizaram-se duas cepas de microalgas (X1 e X4) do gênero *Chlamydomonas* sp., provenientes da coleção de microrganismos fotossintetizantes da Embrapa Agroenergia e, como meio de cultivo, vinhaça cedida pela Usina Jales Machado S.A. (Goianésia/GO). O cultivo foi conduzido em duas réplicas do FBM, uma para cada cepa, o qual durou 11 dias com aeração de 35 L/h, vazão de CO₂ a 3% da vazão de ar, temperatura de 30°C, iluminação de 15.000 Lux, fotoperíodo de 16/8 horas de luz/escuro e pH inicial de 8,0. Diariamente, foi realizado o monitoramento do pH, assim como da biomassa produzida e do número de células através da retirada de amostras. Para o cultivo no fotobiorreator foi realizado o preparo de inóculo em erlenmeyers contendo vinhaça, por 7 dias.

¹ Embrapa Agroenergia, Parque Estação Biológica, Brasília/DF, Brasil, 70770-901; *rodrigo.nascimento@colaborador.embrapa.br

² Universidade Federal do Tocantins, Zona Rural, Gurupi/TO, 77402-970.

Resultados e Conclusões

O cultivo teve início sem adição de CO₂ nas 48 horas iniciais. Supõe (Considera)-se que neste período as algas consomem apenas os compostos orgânicos. Isto explicaria a redução do pH inicial de 8,0 para 5,79 e 5,92 no cultivo da cepa X1 e X4, respectivamente, após 24 horas. A partir das 24 horas de cultivo, as algas iniciam o metabolismo autotrófico, no qual a taxa de inserção de CO₂ é balanceada pela liberação de O₂ no meio. O pH final dos cultivos foi de 6,76 para X1 e 7,22 para X4. A produtividade do inóculo cultivado em erlenmeyers foi aproximadamente duas vezes maior do que aquele cultivado no fotobiorreator. O aumento do volume de trabalho pode ser o motivo da reduzida produtividade. Comparando com os resultados de HUANG e colaboradores (HANG et al., 2014) o FBM apresentou similaridade de produtividade com todos os modelos testados, com uma ressalva, o meio utilizado em seu trabalho por aqueles autores é sintético. Os meios sintéticos para escala de bancada são mais eficientes, trazem resultados melhores e mais rápidos. Para escalas maiores, no entanto, o balanço energético é negativo, pois os fertilizantes químicos são derivados de fontes fósseis (BRENNAN; OWENDE, 2010). Através dos resultados obtidos conclui-se que o fotobiorreator de placas planas produzido em acrílico é funcional, mas otimizações serão necessárias para atingir o potencial produtivo das microalgas testadas.

Referências

- BRENNAN, L.; OWENDE, P. Biofuels from microalgae: a review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, Oxford, v. 14, n. 2, p. 557–577, 2010.
- GRIS, L. R. S. **Produção da Microalga *Nannochloropsis oculata* em Fotobiorreator Airlift**. 2011. 148 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS. Orientadores: Jorge Otávio Trierweiler, Marcelo Farenzena.
- HUANG, J.; LI, Y.; WAN, M.; YAN, Y.; FENG, F.; QU, X.; WANG, J.; SHEN, G.; LI, W.; FAN, J.; WANG, W. Novel flat-plate photobioreactors for microalgae cultivation with special mixers to promote mixing along the light gradient. **Bioresource technology**, Oxon, v. 159, p. 8–16, 2014.
- LELIS NETO, J. A. **Monitoramento de componentes químicos da vinhaça aplicados em diferentes tipos de solo**. 2008. 89 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo, Piracicaba, SP. Orientador: Jarbas Honorio de Miranda.
- MATA, T. M.; MARTINS, A. A.; CAETANO, N. S. Microalgae for biodiesel production and other applications: a review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, Oxford, v. 14, n. 1, p. 217–232, 2010.

Produção de nanofibras de celulose por hidrólise enzimática a partir de cachos vazios de dendê

José A. Fiorote^{*1}, Dasciana de S. Rodrigues¹ e Leonardo F. Valadares¹

Introdução

O atual interesse mundial por tecnologias sustentáveis possibilita o desenvolvimento de produtos oriundos de fontes renováveis de menor impacto ambiental. Resíduos agroindustriais lignocelulósicos ainda subutilizados (FAHMA et al., 2010) podem ser usados como matéria-prima para a química de polímeros e compósitos, sendo justificado pelo elevado número de patentes nacionais e internacionais (SILVA et al., 2009). O termo “material lignocelulósico” é usado genericamente para descrever o conjunto dos constituintes majoritários na maior parte dos vegetais: a celulose, hemicelulose e a lignina (FAHMA et al., 2010). Esses constituintes encontram-se ligados de maneira complexa na fibra lignocelulósica de modo ainda não completamente elucidado. Quando uma fibra de celulose é submetida à hidrólise controlada, tradicionalmente feita em meio ácido, pode-se obter glicose e partículas altamente cristalinas chamadas celulose nanocristalina ou nanofibras. A hidrólise do material celulósico também pode ser promovida por meios enzimáticos pelo uso das celulasas. Esse método apresenta algumas vantagens sobre a hidrólise ácida, pois, dependendo da aplicação, a hidrólise ácida se torna menos indicada por inserir grupos sulfato na superfície da nanofibra. Este trabalho tem como objetivo a obtenção de nanofibras por meio da hidrólise enzimática da celulose purificada de cachos vazios de dendê.

Métodos

Primeiramente, as atividades de dois complexos enzimáticos comerciais celulase de *Trichoderma reesei* – Sigma Aldrich e celulase de *Aspergillus* – Sigma Aldrich foram determinadas conforme Xiao e colaboradores, (XIAO et al., 2004). Após isso, hidrolisou-se a celulose purificada de cachos vazios de dendê de acordo com um plano fatorial 2^3 , elaborado com variáveis de tempo, que foi de 24, 48 e 72 horas, concentração, que foi de 5, 10 e 15 FPU/g de substrato e tipo de enzima. As condições de temperatura 50 °C e pH = 5 foram mantidas constantes com base em Zhu e colaboradores, (ZHU et al., 2011). Baseado no plano fatorial anterior, utilizou-se além dos dois já citados, mais três complexos enzimáticos: Cellic Cetec 2 – Novozymes, Cellic Cetec 3 – Novozymes e Accellerase 1500 – Genecor, em concentrações e tempo de hidrólise análogos ao experimento de melhor resultado.

¹ Embrapa Agroenergia, Parque Estação Biológica, Brasília/DF, Brasil, 70770-901; *jose.fiorote@colaborador.embrapa.br

Foram preparadas porta-amostras de TEM (*transmission electron microscopy*). Uma alíquota da amostra foi diluída dentro de um béquer (0,003%). Após a diluição, seguiu-se 5 minutos de sedimentação. Decorrido o tempo, com o auxílio de uma micropipeta, uma gotícula do sobrenadante foi depositada sobre a telinha. As amostras foram obtidas por microscopia eletrônica de transmissão, utilizando o equipamento Zeiss TEM 109 da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

Resultados e Conclusões

As atividades em papel de filtro dos complexos enzimáticos de *Trichoderma reesei* e de *Aspergillus* foram de 84,77 e 0,04 FPU/g de substrato, respectivamente. A baixa atividade da celulase de *Aspergillus* deve-se ao fato de o complexo enzimático ser composto principalmente por endoglucanase, que é responsável por iniciar a hidrólise clivando a parte amorfa da celulose, mas sem a liberação de glicose. A hidrólise da celulose purificada dos cachos vazios de dendê apresentou nanofibras nas condições de 48 horas, 15 FPU/g de substrato e utilização da celulase de *Trichoderma reesei*. A microscopia confirmou a presença de fibras com espessura média de 36 nm com desvio padrão de 12 nm. As fibras são alongadas e possuem vértices, que indicam a cristalinidade da fibra. O experimento utilizando as cinco enzimas nas condições de 48 horas, 15 FPU/g de substrato revelou, por meio de microscopia, a presença de nanofibras somente com o uso da celulase de *Trichoderma reesei*, corroborando o resultado do experimento anterior.

Apoio Financeiro

Sistema Embrapa de Gestão (SEG) - Projeto Extração de Nanofibras de Celulose dos Cachos Vazios de Dendê e sua Utilização como Reforço para Borracha Natural (NanofiBRa).

Referências

- FAHMA, F.; IWAMOTO, S.; HORI, N.; IWATA, T.; TAKEMURA, A. Isolation, preparation, and characterization of nano-fibers from oil palm empty-fruit-bunch (OPEFB). **Cellulose**, Dordrecht, v. 17, n. 5, p. 977-985, 2010.
- SILVA, R.; HARAGUCHI, S. K.; MUNIZ, E. C.; RUBIRA, A. F. Aplicações de fibras lignocelulósicas na química de polímeros e em compósitos. **Química Nova**, São Paulo, v. 32, n. 3, p. 661-671, 2009.
- XIAO, Z.; STORMS, R.; TSANG A. Microplate-based filter paper assay to measure total cellulase activity. **Biotechnology and Bioengineering**, Hoboken, v. 88, n. 7, p. 832-837, 2004.
- ZHU, J. Y.; SABO, R.; LUO, X. Integrated production of nano-fibrillated cellulose and cellulosic biofuel (ethanol) by enzymatic fractionation of wood fibers. **Green Chemistry**, Cambs, v. 13, n. 5, p. 1339-1344, 2011.

Seleção de variáveis que influenciam a produção de endoglucanases e xilanases por *Cellulomonas* sp

Lorena Ferreira Gomes^{1,2*}, Diego Arthur de Moraes Silva^{1,3}, Lucas de Souza Pimenta^{1,2}, Thais Demarchi Mendes¹, Thais Fabiana Chan Salum¹, Thályta Fraga Pacheco¹, Paola Talia⁴, Eleonora Campos⁴, Mônica Caraméz Triches Damaso¹

Introdução

As biomassas lignocelulósicas, como bagaço de cana-de-açúcar, têm ganho destaque por constituírem uma fonte rica de carboidratos passíveis de serem hidrolisados e biotransformados em etanol. Estes materiais são compostos principalmente por celulose, hemicelulose e lignina.

A hidrólise das frações de celulose e hemicelulose em açúcares fermentescíveis necessita da ação sinérgica de celulases e enzimas correlatas (LYND et al., 2002; ZHANG et al., 2006). Microrganismos, como as bactérias, são uma importante fonte produtora destas enzimas.

A ferramenta de planejamento experimental é muito útil para investigar quais os fatores (ou variáveis) podem influenciar em uma ou mais respostas de um processo em estudo, citando como exemplo a produção de enzimas. O desenho experimental do tipo Plackett-Burman possibilita examinar os principais efeitos e interações entre os fatores. Este desenho é aplicado quando o número de fatores é grande, desta forma este planejamento seria o primeiro passo de uma sequência de etapas visando atingir a otimização do processo de produção das enzimas (LYND et al., 2002).

Neste sentido, o objetivo deste trabalho foi selecionar variáveis que influenciam na produção de endoglucanases e xilanases pela bactéria *Cellulomonas* sp., em fermentação submersa, utilizando bagaço de cana-de-açúcar como fonte de carbono.

Métodos

Um desenho experimental Plackett-Burman (RODRIGUES; IEMMA, 2014) foi conduzido para avaliar a influência de 12 variáveis de processo na produção de endoglucanase e

¹ Embrapa Agroenergia, Parque Estação Biológica- PqEB. Brasília, DF- Brasil, CEP 70770-901.

² Universidade de Brasília, Campus Universitário Darcy Ribeiro, Brasília, DF- Brasil, CEP 70910-900. *lorena.gomes@colaborador.embrapa.br

³ Universidade Católica de Brasília, Campus I – QS 07 – Lote 01 – EPCT – Águas Claras – Brasília – CEP 71966-700.

⁴ Instituto de Biotecnología, CICVyA, CNIA, INTA Castelar, Argentina.

xilanase por *Cellulomonas* sp. usando bagaço de cana-de-açúcar como fonte de carbono. Os fatores avaliados foram: pH, temperatura, concentração do substrato e do inóculo, concentração das fontes de nitrogênio: extrato de levedura, peptona, sulfato de amônio e nitrato de sódio e concentrações dos sais K_2HPO_4 , $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, KCl e $FeSO_4 \cdot 7H_2O$. Foram realizados 16 ensaios distintos e 4 repetições do ponto central, seguindo desenho experimental. A produção das enzimas foi conduzida sob agitação de 150 rpm, e após 24, 48, 72 e 96h de fermentação, amostras foram retiradas e as medidas de atividade enzimática foram determinadas colorimetricamente, seguindo métodos adaptados de Ghose (1987) e Xiao et al. (2004).

Foi feita uma análise estatística dos resultados a fim de identificar as variáveis significativas para produção das enzimas.

Resultados e Conclusões

Com base nos resultados obtidos foi possível traçar um perfil de produção de endoglucanases e xilanases após 72h de fermentação. As maiores atividades enzimáticas obtidas foram 0,20 e 5,58 U/mL de endoglucanase e xilanase, respectivamente. Os dados obtidos em 72h de cultivo foram analisados estatisticamente com 90% de confiança. Verificou-se que dos 12 fatores estudados, 3 fatores foram estatisticamente significativos, concomitantemente, para ambas as enzimas. Os fatores pH e KCl foram estatisticamente significativos de forma positiva e concentração de substrato de forma negativa. Com base nos resultados encontrados, novo desenho experimental está sendo realizado visando aumentar os níveis de atividade enzimática obtidos.

Apoio Financeiro

EMBRAPA, INTA (Argentina)

Referências

- LYND, L. R.; WEIMER, P. J.; ZYL, W. H. V; PRETORIUS, I. S. Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, Washington, DC, v. 66, n. 3, p. 506-577, 2002.
- ZHANG, Y. H. P.; HIMMEL, M. E.; MIELENZ, J. R. Outlook for cellulase improvement: screening and selection strategies. **Biotechnology Advances**, Oxford, v. 24, p. 452-481, 2006.
- RODRIGUES, M. I.; IEMMA, A. F. **Planejamento de experimentos e otimização de processos**. Campinas, SP: Casa do Espírito Amigo Fraternidade Fé e Amor, 2014. 618 p.
- GHOSE, T. K. Measurement of cellulase activities. **Pure and Applied Chemistry**, Oxon, v. 59, n. 2, p. 257-268, 1987.
- XIAO, Z.; STORMS, R.; TSANG, A. Microplate-based filter paper assay to measure total cellulase activity. **Biotechnology and Bioengineering**, Hoboken, v. 88, n. 7, p. 832-837, 2004.

Avaliação do crescimento de fungos filamentosos em glicerina, coproduto do biodiesel, como única fonte de carbono

Ricardo M. C. da Silva^{1,2}, Catarina B. Pereira^{1,2}, Carolina M. Poletto¹ e Mônica C. T. Damaso¹*

Introdução

O crescimento da produção de biodiesel, no cenário atual, vem de encontro com novas pesquisas para descobertas e/ou investimentos em novas fontes de energia. Durante o processo de produção de biodiesel é formado um coproduto da reação, a glicerina (NICOL et al., 2012; TACCARI et al., 2012). Como o processo utilizado comercialmente para produção do biocombustível utiliza a rota química, a glicerina contém várias impurezas, e portanto possui um baixo valor comercial (CHOI, 2008; FAN et al., 2010; NICOL et al., 2012). Com o intuito de agregar valor a este coproduto podem ser utilizadas diferentes rotas tecnológicas, como a bioquímica, para obtenção de produtos de valor agregado. Neste sentido, estudos de bioconversão da glicerina em polióis, etanol, ácidos orgânicos têm sido alvo de pesquisas (FAN et al., 2010; NICOL et al., 2012; YANG et al., 2012).

O objetivo deste trabalho consiste em avaliar o crescimento de fungos filamentosos em meio de cultivo contendo glicerina como única fonte de carbono, visando selecioná-los para serem utilizados na bioconversão deste coproduto em produtos de valor agregado, que possam ser usados na indústria farmacêutica ou alimentícia.

Métodos

Foram avaliados fungos filamentosos da Coleção de Microrganismos aplicados à Agroenergia, da Embrapa Agroenergia. Estes microrganismos foram coletados em mangue, torta de pinhão manso e folhas e solo de dendezeiro. Os fungos filamentosos foram repicados em meio BDA (Agar Batata Dextrose) e crescidos em estufa a 28°C, por 5 dias. Posteriormente, foram inoculados em meio básico contendo glicerina como única fonte de carbono. O crescimento dos fungos filamentosos foi avaliado tanto em glicerina padrão como em glicerina bruta de soja oriunda de duas usinas de biodiesel. As placas contendo glicerina e microrganismos foram incubadas na estufa a 28°C. O crescimento dos microrganismos foi avaliado após 3, 5 e 7 dias através do halo de crescimento formado. Com base nesses valores foi calculado o Índice da Velocidade de Crescimento Micelial (IVCM).

¹ Embrapa Agroenergia, Parque Estação Biológica, s/nº, Ed. Embrapa Agroenergia, Brasília/DF, Brasil, 70770-901;

² Universidade de Brasília, Campus Universitário Darcy Ribeiro, Brasília, DF- Brasil, CEP 70910-900. *ricardo.miranda@colaborador.embrapa.br

Resultado e Conclusões

O crescimento de 102 fungos filamentosos em meio de cultivo contendo os 3 tipos de glicerina foi avaliado. Deste total, cerca de 20 microrganismos não apresentaram crescimento. O Índice da Velocidade de Crescimento Micelial (IVCM) de 82 fungos filamentosos foi calculado. Os valores de IVCM encontrados variaram de 0,37 a 20,15. Com base no valor do IVCM, os fungos filamentosos foram reunidos em 3 grupos, segundo a taxa de crescimento: alta, média e baixa. Com base nesses resultados, a próxima etapa do trabalho consistirá em avaliar a bioconversão de glicerina bruta em produtos de valor agregado pelos microrganismos selecionados.

Referências

- CHOI, W. J. Glycerol-based biorefinery for fuels and chemicals. **Recent Patents on Biotechnology**, Sharjah, v. 2, n. 3, p. 173-180, 2008.
- FAN, X.; BURTON, R.; ZHOU, Y. Glycerol (byproduct of biodiesel production) as a source for fuels and chemicals – mini review. **The Open Fuels & Energy Science Journal**, v. 8, n. 3, p. 17-22, 2010.
- NICOL, R. W.; MARCHAND, K.; LUBITZ, W. D. Bioconversion of crude glycerol by fungi. **Applied Microbiology and Biotechnology**, New York, v. 93, n. 5, p. 1865-1875, 2012.
- TACCARI, M.; CANONICO, L.; COMITINI, F.; MANNAZZU, I.; CIANI, M. Screening of yeasts for growth on crude glycerol and optimization of biomass production. **Bioresource Technology**, Oxon, v. 110, p. 488–495, 2012.
- YANG, F.; HANNA, M.; SUN, R. Value-added uses for crude glycerol: a byproduct of biodiesel production. **Biotechnology for Biofuels**, London, v. 5, n. 13, 2012.

Enzyme dosage effects over enzymatic hydrolysis of elephant grass pretreated with diluted acid

Ariane de Almeida Rodrigues^{1,2}, Yuri Yabu^{1,2}, Leticia M. C. Filardi^{1,2}, Thais Demarchi Mendes¹, Emerson Léo Schultz¹, Thalyta Fraga Pacheco¹, Raquel Bombarda Campanha¹, Clenilson Martins Rodrigues¹, Mônica C. Triches Damaso¹*

Background

Lignocellulosic materials have been investigated for their potential to produce fermentable sugars that can be converted into ethanol and other value added products (SOMERVILLE et al., 2010). Among those, elephant grass is an attractive option, since it is a perennial plant with high dry matter productivity (SOMERVILLE et al., 2010). Nevertheless, the production of fuel from elephant grass requires improved technology processes, and few studies have been published about this bioenergy crop.

The enzymatic hydrolysis is one of the ethanol production bottlenecks, due to the high cost of the commercial enzyme complexes and long process duration (CHENG; TIMILSINA, 2011). So, determining the right dosage of enzyme loading required for enhancing the glucose yield and the hydrolysis rate without significantly increasing the cost is important for developing a feasible process. A reasonable dosage of enzyme often used in laboratory studies is 10 FPU/g of cellulose (CHENG; TIMILSINA, 2011). Cardona et al. (2014) used an enzyme loading of 30 FPU/g of biomass for the hydrolysis of pretreated elephant grass.

Therefore, this study was performed to determine the optimal dosage of enzyme for the enzymatic hydrolysis of elephant grass pretreated with diluted acid. Previous studies based on sugarcane bagasse were used as parameter to determine experimental conditions and compare results.

Methods

Elephant grass, previously dried and milled, was pretreated with 2.5% (v/v) diluted sulfuric acid, solid:liquid ratio of 1:10, at 121°C and 1 atm, for 50 min. This condition yielded the highest amount of glucose in previous experiments, using an enzyme loading of 15 FPU/g of dry material. Pretreated biomass was then filtered and the solid fraction was washed three times with distilled water. The washed biomass was then submitted to enzymatic hydrolysis using different dosages of commercial enzyme complex (Cellic Ctec 3 – Novozymes): 15, 20, 22.5 and 30 FPU/g of dry material. Each condition was performed in

¹ Embrapa Agroenergia, Parque Estação Biológica - PqEB, Brasília, DF - Brasil, 70770-901.

² Universidade de Brasília, Campus Universitário Darcy Ribeiro, Brasília, DF - Brasil, CEP 70910-900; * ariane.rodrigues@colaborador.embrapa.br.

triplicates, with buffering solution pH 5.0, continuous agitation of 200 rpm, at 50°C, during 72 hours. Aliquots were periodically taken for analysis by HPLC-RID.

Discussion and results

The dosages of enzyme tested were selected considering that, under the same experimental conditions, a higher glucose yield was obtained from the enzymatic hydrolysis of elephant grass (37.0 g/L) than from sugar cane bagasse (29,0 g/L) (SCHULTZ et al., 2014). Various enzyme dosages were previously tested for sugarcane bagasse, under its optimal pretreatment conditions (1,5% v/v H₂SO₄, 56 min.), and the best observed enzyme dosage was 15 FPU/g of dry biomass, after 24 hours of enzymatic hydrolysis. Since glucose yields from elephant grass were higher, the initial hypothesis was that higher amounts of enzyme would be necessary to hydrolyze its cellulose.

The highest average glucose yield from elephant grass was 43.2 g/L, using 30 FPU/g of dry biomass, after 72 hours of enzymatic hydrolysis. Consequently, higher glucose yield was obtained under longer reaction time and higher enzyme dosage. However, considering the process rate, the highest amount of glucose was observed until 24 hours of hydrolysis, and after 48 hours there was practically no further increase in the glucose generated. At 24 hours, there was statistically significant difference between the glucose yield under enzyme dosages of 15 and 30 FPU ($P < 0,05$). But the average increase in glucose yield under these 2 conditions was only 3.7 g/L, using double the amount of enzyme loading.

Therefore, the best observed condition for elephant grass was 15 FPU/g of dry material and 24 hours of enzymatic hydrolysis, because it provides a hydrolysis profile with high levels of glucose yield in a reasonable time, at a reasonable enzyme cost.

Financial Support

EMBRAPA

References

- CARDONA, E.; RIOS, J.; PEÑA, J.; RIOS, L. Effects of the pretreatment method on enzymatic hydrolysis and ethanol fermentability of the cellululosic fraction from elephant grass. **Fuel**, Oxon, v. 118, p. 41–47, 2014.
- CHENG, J. J.; TIMILSINA, G. R. Status and barriers of advanced biofuel technologies: a review. **Renewable Energy**, Oxford, v. 36, n. 12, p. 3541-3549, 2011.
- SCHULTZ, E. L.; RODRIGUES, A.; MENDES, T. D.; RODRIGUES, D. de S.; DAMASO, M. C. T. Aproveitamento do bagaço de cana-de-açúcar para obtenção de açúcares fermentecíveis por hidrólise enzimática. In: SEMINÁRIO BRASILEIRO DE TECNOLOGIA ENZIMÁTICA - ENZITEC, 11., 2014, Rio de Janeiro, RJ. [Para um mundo sustentável: resumos...]. [S.l: s.n], 2014.
- SOMERVILLE, C.; YOUNGS, H.; TAYLOR, C., DAVIS, S. C.; LONG, S. P. Feedstocks for lignocellulosic biofuels. **Science**, Washington, DC, v. 329, n. 5993, p. 790–792, 2010.

Avaliação de variáveis que influenciam a quantificação de açúcares redutores utilizando ácido dinitrosalicílico

Filipe B.M. Santos¹; Thais D. Mendes²; Dasciana S.R. Gambetta²

Introdução

A quantificação de açúcares redutores (AR) é uma etapa fundamental para a determinação da velocidade de reações catalisadas por celulases. A reação entre AR e o ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) gera um produto vermelho-acastanhado (MILLER, 1959; SUMNER, 1921). Além do DNS, outros compostos são adicionados ao meio reacional para evitar degradação dos açúcares redutores (tartarato de sódio e potássio), aumentar a intensidade da cor produzida (fenol), estabilizar a cor produzida na presença de fenol (metabissulfito de sódio) e favorecer a redução de DNS pelos açúcares (hidróxido de sódio). A sensibilidade e exatidão deste método depende de fatores como: tempo em que a amostra permanece misturada à solução de DNS antes do aquecimento, tempo de aquecimento da mistura, concentração dos componentes da solução de DNS, composição e pH da amostra, etc. Os primeiros métodos desenvolvidos geravam elevados volumes de resíduos por amostra (25 mL), mas atualmente este volume pode ser reduzido para 0,34 mL (XIAO et al., 2004). Além disso, componentes como o fenol (o mais tóxico desta mistura) e o metabissulfito podem ser eliminados do reagente (VASCONCELOS et al., 2013). A Embrapa Agroenergia adotou um protocolo de preparo da solução de DNS desenvolvido para a quantificação de produtos de hidrólise catalisada por celulases (GHOSE, 1987). Entretanto, o fenol foi excluído do preparo desta solução. Este trabalho teve como objetivo avaliar como o pH da amostra, o tempo de aquecimento da reação entre AR e DNS e a presença de fenol afetam a quantificação de AR.

Métodos

A solução de DNS utilizada foi preparada a partir da mistura de: 1416 mL de água destilada; 10,6 g de ácido 3,5-dinitrosalicílico; 19,8 g de NaOH; 306 g de tartarato de sódio e potássio e 8,3 g de metabissulfito de sódio. Todas as reações entre o DNS e AR foram conduzidas em microplacas ou placas para microtitulação e termociclador a 95 °C. Para avaliar o efeito do pH das amostras, curvas de calibração utilizando glicose como padrão foram construídas variando o valor de pH das soluções entre 3,0 e 8,0. A faixa de concentração de

1 Universidade de Brasília, Campus Darcy Ribeiro, Prédio do Instituto de Ciências Biológicas, Brasília/DF, Brasil, 70910-900.

2 Embrapa Agroenergia, Parque Estação Biológica, Brasília/DF, Brasil, 70770-901. *filipe.barbosa@colaborador.embrapa.br.

glicose estudada foi de 2,0 a 6,7 g/L. As diferenças nos parâmetros das equações das retas obtidas permitiram estimar os erros na quantificação de glicose em amostras com pH ácido. Para avaliar o efeito da presença de fenol, curvas de calibração foram construídas utilizando o reagente DNS (com 0,4 % m/m ou sem fenol) e glicose na concentração de 1 a 10 g/L. Os coeficientes angulares destas curvas foram comparados para avaliar a sensibilidade do método. O tempo de aquecimento das amostras na presença de DNS variaram de 5 a 15 minutos e as absorbâncias observadas foram utilizadas para estimar o tempo de reação necessário para completa reação entre DNS e AR.

Resultados e Conclusões

Uma redução de 10 a 15 % nos valores exatos de concentração de glicose foram observados em amostras com pH 3,0. Este erro associado a outros, como por exemplo, a diluição, torna difícil a interpretação dos resultados. Duas estratégias podem ser aplicadas para reduzir esta fonte de erro: a construção de curvas de calibração no mesmo pH da amostra ou a correção do pH das amostras para um valor neutro. Um aumento de 2,5 % na sensibilidade do método foi observado quando fenol foi utilizado no reagente DNS. Entretanto, devido a toxicidade do fenol, o mesmo só será utilizado em caso de amostras com concentração de glicose muito baixa. Quanto ao tempo de aquecimento, observou-se que, nas condições estabelecidas neste trabalho, 10 minutos são suficientes para garantir completa reação entre DNS e açúcares redutores.

Apoio Financeiro

O Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) por meio da EMBRAPA financiou o projeto INSUMICRO, dentro do qual foi desenvolvido este trabalho.

Referências

GHOSE, T.K. Measurement of cellulose activities. **Pure & Applied Chemistry**, Berlin v. 59, p. 257-268, 1987.

MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, Urbana-Champaign, v. 31, p. 426, 1959.

SUMNER, J. B. Dinitrosalicylic acid: a reagent for the estimation of sugar in normal and diabetic urine. **The Journal of Biological Chemistry**, Rockville v. 47, p. 5-9, 1921.

VASCONCELOS, N. M.; PINTO, G. A. S.; ARAGAO, F. A. S. de. **Determinação de açúcares redutores pelo ácido 3,5-dinitrosalicílico**: histórico do desenvolvimento do método e estabelecimento de um protocolo para o laboratório de bioprocessos. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 2013. (Embrapa Agroindústria Tropical. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 87).

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

Avaliação de mandiocas híbridas para a produção de etanol

Nathalia R. Pinheiro^{1*}; Thályta Fraga Pacheco²; Sílvia B. Gonçalves²

Introdução

No Brasil, o etanol é um combustível de fonte renovável e é menos poluente comparado à gasolina (MACHADO; ABREU, 2006). Atualmente, a cana-de-açúcar é a matéria-prima mais utilizada para tal (MACHADO; ABREU, 2006). Contudo, a busca pela diversidade de matérias-primas favoráveis à produção desse combustível se torna uma estratégia econômica e política para o País. Existe potencialidade no solo brasileiro em fornecer insumos agrícolas variados. A mandioca é de fácil cultivo em diversas regiões do país, inclusive nas quais o cultivo da cana não é viável; apresenta elevada produtividade; é uma opção para períodos de entressafra e para produtores de menor escala; e a colheita pode ser realizada durante o ano todo, sem exigência de muito fertilizante ou herbicida, dentre outras vantagens. Mandiocas açucaradas dispensam a etapa de sacarificação, na qual o amido é convertido em glicose (BELÉM et al., 2011), pois acumulam glicose e água na raiz, ao invés de amido. Assim, este trabalho tem como principal objetivo avaliar variedades de mandiocas híbridas na produção de etanol, contribuindo com o estudo da implementação da produção destas mandiocas — ricas *in natura* em amido e em açúcares —, provenientes do cruzamento das mandiocas açucarada e amilácea.

Métodos

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Processos Bioquímicos da Embrapa Agroenergia em triplicata. 9 variedades de mandiocas híbridas, com números de cruzamento 618/8, 608/8, 579/8, 601/8, 600/8, 603/8, 594/8, 580/8 e 617/8, e 2 variedades de mandiocas comerciais, numeradas como 753 (testemunha de indústria) e 12 (testemunha de mesa), foram descascadas e moídas. Os 11 híbridos de mandioca foram plantados e cultivados na EMBRAPA — Cerrado, por 15 meses. O peso seco é determinado por secagem direta em estufa a 105°C (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 2008). Em seguida, são hidrolisadas com as enzimas Termamyl 2X e AMG 300, com pH 6,0, a 90°C, e na faixa 4,0-4,5, a 60°C, respectivamente. Caracterizam-se os açúcares presentes nas amostras antes e depois da hidrólise, em aparelho de análise por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), da marca Agilent Technologies e modelo 1260 Infinity, com a coluna Aminex HPX87H.

1 Universidade de Brasília, Campus Universitário Darcy Ribeiro, 70910-000, Asa Norte, Brasília/DF

2 EMBRAPA — Agroenergia, Parque Estação Biológica, Brasília/DF, Brasil, 70770-901; *nathalia.pinheiro@colaborador.embrapa.br.

Resultados e Conclusões

Até o momento, foram testadas soluções tampão com distintas concentrações de ácido cítrico e fosfato de sódio bibásico para a manutenção do pH ótimo das enzimas empregadas e realizadas as sacarificações das mandiocas. A variedade híbrida 603/8 (41,1%) tem teor de matéria seca próximo ao da variedade amilácea 753 (44,2%), enquanto que o teor da 617/8 é inferior (23,9%), o que denota um baixo percentual de amido.

A partir da avaliação e comparação dos cromatogramas resultantes, é possível inferir que, nas mandiocas comerciais, praticamente todo o carboidrato está na forma de amido. Após a hidrólise destas, o amido converte-se em glicose. Já no cromatograma da mandioca 617/8, observa-se um alto teor de frutose, glicose e maltose *in natura* (8,2%). Este teor aumenta após a hidrólise e o açúcar total é o somatório dos açúcares procedentes desta reação e dos iniciais.

Todavia, a quantidade de açúcares após a hidrólise completa da mandioca híbrida 603/8 (32,0%) foi superior à da amilácea 753 (29,9%), ao passo que essa quantidade na 617/8 (15,3%) é bastante inferior. Em contrapartida, a produtividade em campo desta, em toneladas de açúcar por hectare, é 14,04, enquanto que as das mandiocas 603/8 e 753 são 10,06 e 13,8, respectivamente. Isto reflete que, apesar da mandioca 603/8 apresentar alto teor de açúcar final em relação à 617/8, a última se apresenta mais adequada ao processo de produção de etanol por gerar maior quantidade de açúcar por hectare.

A pesquisa ainda está em desenvolvimento e novos experimentos serão conduzidos. Já é possível compreender que as mandiocas híbridas apresentam amido facilmente hidrolisável (CARVALHO et al., 2004) e, ainda, que a fermentação da 617/8 deve ser priorizada. Assim, estima-se que o etanol produzido com estas variedades será menos oneroso que aquele produzido com as variedades amiláceas, uma vez que estas demandam quantidades menores de enzimas.

Apoio financeiro

A EMBRAPA – Agroenergia financiou este trabalho por meio de bolsa de estágio e do sistema SEG.

Referências

- BELÉM, S.; CARVALHO, F. B. P.; PACHECO, T. F.; POLETO, C. M. Produção de etanol utilizando mandioca açucarada e híbrida. In: SIMPÓSIO NACIONAL DE BIOPROCESSOS, 18., 2011, Caxias do Sul. **Anais...** Caxias do Sul: [s.n.], 2011.
- CARVALHO, L. J. C. B.; SOUZA, C. R. B.; CASCARDO, J. C. M.; JUNIOR, C. B.; CAMPOS, L. Identification and characterization of a novel cassava (*Manihot esculenta* Crantz) clone with high free sugar content and novel starch. **Plant Molecular Biology**, Berlin, v. 56, p. 643-659, 2004.
- INSTITUTO ADOLFO LUTZ. Perda por dessecação (umidade) — secagem direta em estufa a 105°C. **Métodos Físico-químicos para Análise de Alimentos**. 1. ed. digital. p. 98-99.
- MACHADO, C. M. M.; ABREU, F. R. Produção de álcool combustível a partir de carboidratos **Revista de Política Agrícola**, Brasília, v.3, p. 64-78, 2006.

Influência de diferentes concentrações enzimáticas na hidrólise de bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado visando produção de etanol

Yuri Y. Barros^{1,2}, Ariane A. Rodrigues^{1,2}, Thálya F. Pacheco¹, Thaís D. Mendes¹, Emerson Leo Schultz¹, Mônica C. T. Damaso¹*

Introdução

O bagaço de cana de açúcar é uma matéria-prima lignocelulósica composta por frações de celulose, hemicelulose e lignina, sendo a última fração a principal barreira para hidrólise da biomassa (CANILHA et al., 2012; LIMA et al., 2014). Diferentes estratégias podem ser utilizadas para obtenção de açúcares fermentescíveis e Etanol de 2ª Geração a partir dessa matéria-prima. Uma delas consiste em hidrólise enzimática da celulose e, em etapa subsequente, fermentação para produção de etanol (SHF) (SANTOS et al., 2010a, 2010b). Outra estratégia empregada é o processo de sacarificação e fermentação Simultâneas (SSF), que consiste em promover a hidrólise enzimática e a fermentação alcoólica concomitantemente (SANTOS et al., 2010a).

No processo SHF tem-se a vantagem da otimização de temperatura em cada uma das etapas do processo, cerca de 50°C para a hidrólise e 30°C para a fermentação. Por outro lado, existe a possibilidade de ocorrer a inibição da ação das enzimas, principalmente pelo produto formado, neste caso a glicose (CANILHA et al., 2012; SANTOS et al., 2010b). No processo SSF, diferentemente de SHF, há necessidade do uso de uma temperatura que não reduza a viabilidade das leveduras fermentadoras (SANTOS et al., 2010a; SANTOS et al., 2010b). Sendo assim, para que o SSF alcance adequado rendimento em termos de produção de etanol, é importante avaliar o perfil da ação do coquetel enzimático na temperatura ideal para a fermentação. Neste sentido, o objetivo deste trabalho foi o estudo de diferentes concentrações enzimáticas na hidrólise de bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado, na condição ideal de fermentação.

Metodologia

O bagaço de cana-de-açúcar foi primeiramente pré-tratado com solução de ácido sulfúrico 1,5% (v/v) em autoclave por 56 minutos a 121°C. As amostras foram filtradas para retirada do licor e, em seguida, a parte sólida foi lavada com água destilada por 3 vezes para retirada do excesso de ácido. As amostras de bagaço de cana pré-tratado foram

¹ Embrapa Agroenergia, Parque Estação Biológica, s/nº, Ed. Embrapa Agroenergia, Brasília/DF, Brasil, 70770-901;

² Universidade de Brasília, Campus Universitário Darcy Ribeiro, Brasília, DF- Brasil, CEP 70910-900. *yuri.barros@colaborador.embrapa.br

homogeneizadas. Retirou-se 2 gramas de biomassa em duplicata para análise do peso seco em estufa a 105°C. Para a hidrólise enzimática, a biomassa úmida foi suspensa em tampão citrato de sódio/ácido cítrico 0,1 M pH 5, numa razão sólido líquido de 1:10. O experimento foi conduzido na temperatura e agitação em que a produção de etanol é favorecida (30°C). Foi empregado coquetel enzimático Cellic CTEC 3 (Novozymes) em concentrações de 3 a 35 FPU/g de bagaço de cana pré-tratado (3 FPU, 6 FPU, 10 FPU, 15 FPU, 25 FPU, 35 FPU). Considerou-se, para o cálculo das concentrações enzimáticas, as informações fornecidas pelo fabricante a respeito da atividade enzimática 30°C. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

A hidrólise enzimática foi conduzida em shaker a 120 rpm e 30°C e o controle (15 FPU/g bagaço de cana pré-tratado) a 200 rpm e 50°C, todos por 48 horas com retiradas periódicas de alíquotas. As amostras foram centrifugadas e o sobrenadante analisado em Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência (HPLC-RID). Avaliou-se o perfil de produção de glicose para cada condição citada.

Resultados e Conclusões

Verificou-se que as concentrações de 25 e 35 FPU/g de biomassa foram as mais eficientes. Porém, como os resultados com 15 FPU/g são bastante semelhantes aos obtidos com as concentrações de 25 e 35 FPU e, considerando-se questões de custos, decidiu-se que os experimentos de produção de etanol por SSF serão conduzidos com a carga enzimática de 15 FPU/g de biomassa pré-tratada.

Apoio Financeiro

Embrapa

Referências

CANILHA, L.; CHANDEL, A. K.; MILESSI, T. S. S.; ANTUNES, F. A. F.; FREITAS, W. L. C.; FELIPE, M. G. A.; SILVA, S. S. Bioconversion of sugar biomass into ethanol: an overview about composition, pretreatment methods, detoxification of hydrolysates, enzymatic saccharification and ethanol fermentation. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, Akron, 2012.

LIMA, M. A.; GOMEZ, L. D.; STEELE-KING, C. G.; SIMISTER, R.; BERNARDINELLI, O. D.; CARVALHO, M. A.; REZENDE, C. A.; LABATE, A. C.; AZEVEDO, E. R.; MCQUEEN-MASON, S. J.; POLIKARPOV, I. Evaluating the composition and processing potential of novel sources of Brazilian biomass for sustainable biorenewables production. **Biotechnology for Biofuels**, London, v. 7, n. 10, 2014.

SANTOS, D. S.; CAMELO, A. C.; RODRIGUES, K. C. P.; CARLOS, L. C.; PEREIRA JUNIOR, N. Ethanol production from sugarcane bagasse by *Zymomonas mobilis* using SSF process. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Totowa, v. 161, n. 1-8, p. 93-105, 2010a.

SANTOS, J. R. A. dos; SOUTO-MAIOR, A. M.; GOUVEIA, E. R.; MARTÍN, C. Comparação entre processos em SHF e em SSF de bagaço de cana-de-açúcar para a produção de etanol por *Saccharomyces cerevisiae*. **Química Nova**, São Paulo, v. 33, n. 4, p. 904-908, 2010b.

Avaliação da autohidrólise como pré-tratamento para a produção de etanol a partir de bagaço de cana-de-açúcar

Marcelo P. Silva^{1}, Felipe B. P. Carvalho¹, Thais D. Mendes¹, Thályta F. Pacheco¹, Rossano Gambetta¹*

Introdução

A produção de etanol a partir de biomassa lignocelulósica, como os resíduos florestais, bagaço e palha de diferentes biomassas, é uma das soluções encontradas para aumentar produção total de etanol no país. Essa iniciativa é importante também no sentido de aumentar produtividade de etanol por hectare, por exemplo, de cana-de-açúcar plantada, de forma a atender à crescente demanda por biocombustível.

A biomassa lignocelulósica é constituída principalmente por três polímeros: celulose, hemicelulose e lignina. Esses polímeros estão associados formando uma matriz amorfa complexa, apresentando uma estrutura bastante recalcitrante, que varia a composição de acordo com o tipo e espécie da biomassa (AGBOR et al., 2011).

Diferentes tipos de pré-tratamentos -ácido, básico, auto hidrólise, explosão a vapor, entre outros- têm sido estudados e aprimorados com o intuito de vencer essa barreira física que dificulta o acesso às estruturas das macromoléculas. É necessário, ainda, reduzir os custos de todas as etapas do processo, além do tratamento dos resíduos, de modo a obter uma tecnologia viável técnica e economicamente (SIMS et al., 2010).

Nesse sentido, a autohidrólise constitui um pré-tratamento promissor, à medida que utiliza apenas água e pressão como ferramentas para a quebra da intrincada estrutura da biomassa, evitando o uso de reagentes químicos que podem catalisar a formação de compostos inibidores das etapas de hidrólise enzimática e fermentação, por exemplo.

Métodos

O bagaço de cana-de-açúcar foi moído no moinho de martelos com granulometria máxima de 3 mm. O pré-tratamento com autohidrólise foi realizado com uma diluição de 1:12, utilizando o reator Büchi Kiloclave, com capacidade de 5 litros. O aquecimento e o resfriamento do mesmo são feitos por um banho térmico acoplado ao mesmo. Isso impõe um limite de temperatura máxima de pré-tratamento, visto que o banho tem temperatura máxima de operação de 200 °C.

¹ Embrapa Agroenergia, Parque Estação Biológica, Brasília/DF, Brasil, 70770-901; *marcelo.silva@colaborador.embrapa.br

O reator foi aquecido até atingir 180 °C no seu interior e esta temperatura mantida por 20 minutos. Na sequência, o reator foi resfriado pela abertura da válvula de alívio. Durante todo o processo foi mantida uma agitação de 600 rpm.

O produto da autohidrólise foi centrifugado a 4500 rpm por 10 minutos para separar a fração líquida da fração sólida. A última foi submetida à hidrólise enzimática, enquanto a primeira foi enviada para análise externa.

Na hidrólise enzimática da fração sólida, foi utilizada solução tampão citrato de sódio/ácido cítrico 0,1M e PH 5. O complexo celulolítico utilizado foi Cellic cTec3 e a dosagem estabelecida foi de 15 FPU/g de substrato seco. Esta etapa foi conduzida em agitador orbital, com temperatura de 50 °C e agitação de 200 rpm por 24 horas.

Os hidrolisados foram centrifugados para a recuperação do sólido e da fração líquida para fermentação. Uma amostra da fração líquida foi analisada no HPLC de acordo com protocolo previamente estabelecido para a análise de açúcares em coluna Aminex HPX-87H.

O creme de leveduras foi inoculado no hidrolisado e o meio colocado em agitador orbital do tipo shaker a 100 rpm e 32 °C. A fermentação foi conduzida até completo consumo da glicose, após 7 horas de fermentação.

Resultados e Conclusões

Ao final da hidrólise enzimática, realizada após a autohidrólise, obteve-se 38,7 g/L de glicose. A fermentação dessa glicose produziu 221,2 ml de etanol. Essa quantidade de álcool representa um rendimento de aproximadamente 41 % (g/g), que corresponde a 81% do rendimento teórico. Quando a mesma biomassa foi submetida ao mesmo processo supracitado, porém o pré-tratamento utilizado foi a explosão a vapor, a quantidade de glicose obtida foi de aproximadamente 33 g/L. Já com o pré-tratamento ácido do bagaço, o resultado em relação à quantidade de glicose obtida foi de aproximadamente 27 g/L. Esses dois últimos resultados foram obtidos em experimentos realizados por outros grupos dentro do mesmo projeto. Os resultados conseguidos com a autohidrólise são animadores, mostrando um potencial para a utilização desse pré-tratamento no processo de produção de etanol celulósico, necessitando de próximos passos para otimização das condições operacionais e redução da geração de resíduos.

Apoio Financeiro

Sistema Embrapa de Gestão (SEG). Projeto Rotas Tecnológicas Para a Produção Sustentável de Etanol de Celulose (Etanol 2G).

Referências

AGBOR, V. B.; CICEK, N.; SPARLING, R.; BERLIN, A.; LEVIN, D. B. Biomass pretreatment: Fundamentals toward application. **Biotechnology Advances**, Oxford, v. 29, n. 6, p. 675-685, 2011.

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.

SIMS, R. E. H.; MABEE, W.; SADDLER, J. N.; TAYLOR, M. An overview of second generation biofuel technologies. **Bioresource Technology**, Oxon, v. 101, n. 6, p. 1570-1580, 2010.

The background features a gradient from light beige at the top to a deeper orange at the bottom. Large, white, organic, teardrop-shaped elements are scattered across the page, creating a modern, abstract aesthetic.

PROCESSOS QUÍMICOS

Caracterização dos resíduos gerados no processo de produção do etanol de segunda geração

Clara R. Amore^{1}, Lorena C. Garcia¹, Larissa Andreani², Leonardo F. Valadares¹*

Introdução

O etanol de segunda geração (2G) é o combustível gerado a partir de biomassa lignocelulósica. Ao contrário do etanol de primeira geração (1G), que provém da fermentação direta da sacarose, o etanol lignocelulósico provém da celulose, que é submetida a um pré-tratamento, hidrólise para, por fim, ser fermentada a etanol. As pesquisas no Brasil apontam a possibilidade de produção deste combustível a partir de bagaço de cana-de-açúcar e capim elefante. No entanto, este é um processo descentralizado que pode utilizar qualquer resíduo lignocelulósico. Desde 2011, a demanda de etanol está acima da produção efetiva estimada e, em 2015, estima-se alcançar a capacidade produtiva de 47,9 bilhões de litros (MILANEZ et al., 2012). É neste cenário que o etanol 2G torna-se relevante, por possibilitar o aumento na produção de etanol sem requerer o aumento da área de cultivo, nem competir com a cadeia alimentar. Este estudo analisa os resíduos de cada etapa de produção para determinar, com base na legislação e normas, como serão manejados, sendo por descarte direto, tratamento ou reaproveitamento.

Métodos

Foram coletados resíduos líquidos e sólidos gerados no processo de produção do etanol 2G a partir de pré-tratamentos distintos, para duas matérias-primas, o bagaço de cana-de-açúcar (CA) e o capim elefante (CE). Para a CA realizou-se o pré-tratamento ácido (Ác. CA), de explosão a vapor (EV) e de auto-hidrólise (AH). Para o CE, o pré-tratamento ácido (Ác. CE). Os efluentes coletados foram: a fração líquida do pré-tratamento, chamada de “licor” (L); e o resíduo da destilação do fermentado, denominado “vinhaça” (V). Os resíduos sólidos da fermentação também foram coletados. A análise foi feita por uma empresa contratada. Os laudos gerados foram compilados e organizados em uma base de dados. Os resultados foram analisados tendo como referência legislações e normas atuais que estabelecem limites para o descarte direto. Os resíduos líquidos foram avaliados segundo o Conama 357 e 430 e o Decreto 8468 art. 18 e 19^a e os sólidos segundo a norma ABNT NBR 10.004:2004.

¹ Embrapa Agroenergia, Parque Estação Biológica, Brasília/DF, Brasil, 70770-901; *clara.amore@colaborador.embrapa.br

Resultados e Conclusões

Os resultados mostram que as concentrações dos seguintes parâmetros estão acima do estipulado: cianeto total para L e V da EV e AH; fenóis para L e V do Ác. CE; ferro dissolvido para L do Ác. CA, AH e Ác. CE; manganês dissolvido para L do Ác. CA, EV, AH e Ác. CE; nitrogênio amoniacal total para L da AH e V da EV, AH e Ác. CE; óleos e graxas minerais para L da AH e V do Ác. CE. Os valores de DBO_5 e pH estiveram fora dos limites para todos os efluentes.

Estes resultados indicam que nenhum desses efluentes pode ser descartado sem tratamento prévio, seja por absorção, troca catiônica ou floculação. Estudos já mostraram que a vinhaça do etanol 1G é altamente tóxica e contaminante quando descartada em meios aquáticos, causando aumento da acidez, temperatura, turbidez e esgotamento do oxigênio dissolvido (CHRISTOFOLETTI et al., 2013), resultando na morte da biota aquática. Os resultados de ecotoxicidade corroboram com estas consequências. O uso extensivamente aplicado à vinhaça é a fertirrigação, devido a sua riqueza em N, P, K e matéria orgânica. Porém, o uso indevido do efluente pode causar contaminação de águas subterrâneas e gerar gases do efeito estufa, especialmente N_2O (PAREDES et al., 2014). Desta forma, a fertirrigação deve ser realizada na dosagem correta, em concordância com as características do solo. Um potencial uso para os efluentes é a produção de biogás por biodigestão anaeróbica da matéria orgânica. Além de gerar energia, a biodigestão reduz amplamente a demanda biológica de oxigênio (DBO_5), mantendo as características fertilizantes.

Entre os resíduos sólidos, os limites ultrapassados foram: bário e fluoretos para Ác. CA; cádmio para Ác. CE; cloreto e ferro para AH e Ác. CE; fenóis para Ác. CA, AH e Ác. CE; manganês para EV e AH; sódio para EV, AH e Ác. CE. Por não ser prático o tratamento de resíduos sólidos, o enfoque está no reaproveitamento. Busca-se a aplicação destes na cogeração de energia, estudando o poder calorífico e outras características.

Apoio Financeiro

Sistema Embrapa de Gestão (SEG). Projeto Rotas Tecnológicas Para a Produção Sustentável de Etanol de Celulose (Etanol 2G).

Referências

- CHRISTOFOLETTI, C. A.; ESCHER, J. P.; CORREIA, J. E.; MARINHO, J. F. U.; FONTANETTI, C. S. Sugarcane vinasse: environmental implications of its use. **Waste Management**, Oxford, v. 33, n. 12, p. 2752-2761, 2013.
- MILANEZ, A. Y.; NYKO, D.; GARCIA, J. L. F.; REIS, B. L. S. F. S. dos. O déficit de produção de etanol no Brasil entre 2012 e 2015: determinantes, consequências e sugestões de política. **Biocombustíveis. BNDES Setorial**, Rio de Janeiro, n. 35, p. 277-302, 2012.
- PAREDES, D.; LESSA, A. C.; SANT'ANNA, S. de; BODDEY, R.; URQUIAGA, S.; ALVES, B. Nitrous oxide emission and ammonia volatilization induced by vinasse and N fertilizer application in a sugarcane crop at Rio de Janeiro, Brazil. **Nutrient Cycling in Agroecosystems**, Dordrecht, v. 98, n. 1, p. 41-55, 2014.

Testes de aumento de escala na utilização de MgO/KF na produção de biodiesel

Itânia Pinheiro Soares¹, Sílvia da Cunha Oliveira^{2}, Grace Ferreira Ghesti², Daniel Ribeiro Araújo², José Dias², Sílvia Claudia Loureiro Dias², Julio Lemos deMacedo²*

Introdução

Um dos grandes desafios dos últimos anos é a gradual substituição dos combustíveis fósseis por combustíveis de fontes renováveis. Neste contexto, a produção de biodiesel a partir de óleos e gorduras vegetais tem-se mostrado uma alternativa bastante interessante. Os processos de obtenção do biodiesel podem ser feitos através de transesterificação via catálise homogênea alcalina ou catálise heterogênea, sendo que a primeira é a mais empregada atualmente. No entanto, a catálise heterogênea oferece algumas vantagens, como por exemplo, a reutilização do catalisador até a sua total desativação e a minimização da formação de sabões, facilitando a separação dos produtos e melhorando a pureza tanto do biodiesel quanto da glicerina. A partir disso, o trabalho teve como principal objetivo a realização de um aumento de escala (“*scaleup*”) da síntese de biodiesel via catálise heterogênea, utilizando como catalisador Fluoreto de Potássio suportado em Óxido de Magnésio (MgO/KF).

Métodos

O catalisador MgO/KF foi preparado com razão m/m de 1:1. A mistura foi macerada e levada ao forno mufla por 4h a 300°C (ARAÚJO, 2011). As reações foram realizadas em batelada e o biodiesel foi produzido com 10% e 1,5% do catalisador, em relação à massa de óleo de soja. As massas de óleo utilizadas nas sínteses foram 10, 20, 100 e 1000 g. A reação foi processada a 70 °C, por 2 h, com agitação de 100 rpm. Os produtos obtidos foram caracterizados por meio de análises de espectroscopia na região do infravermelho médio (IV) e por determinação do teor de éster, através da Cromatografia Gasosa e detector de ionização por chama (GC/FID), segundo a norma EN 14103.

Resultados e Conclusões

Os resultados obtidos foram acompanhados através de comparação com uma amostra de biodiesel do interlaboratorial da Agência Nacional de Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis (ANP) e demonstram que, dos experimentos com massa de óleo de 10,

¹ Embrapa Agroenergia, Parque Estação Biológica, Brasília/DF, Brasil, 70770-901.

² Universidade de Brasília, Campus Universitário Darcy Ribeiro, Brasília/DF, Brasil, 70910-900. *silviaoliveira.sco@gmail.com

20e 100 g, apenas o experimento 1 (com 10% de catalisador) apresentou conversão acima de 96% e, portanto, encontra-se de acordo com a Resolução ANP nº 45/2014, na qual o biodiesel deve apresentar um teor mínimo de éster de 96,5%. O último experimento com aumento de escala para 1000 g não foi analisado por GC/FID, apenas por IV, e mesmo não podendo inferir sob a porcentagem de conversão em ésteres, foi observada grande semelhança com o espectro da amostra do biodiesel de referência. O uso do catalisador mostrou-se promissor na síntese de biodiesel, entretanto, salienta-se a necessidade de realização de planejamento experimental para otimizar as variáveis do processo. Além disso, é necessário que seja avaliada a reutilização do catalisador, para estudo de viabilidade de sua aplicação em substituição ao catalisador homogêneo empregado industrialmente.

Apoio Financeiro

Projeto Biofrito - FINEP

Referências

AGÊNCIA NACIONAL DO PETRÓLEO (Brasil). Regulamenta as especificações dos óleos diesel de uso rodoviário, consoante as disposições contidas no Regulamento Técnico ANP nº 08/2011 e as obrigações quanto ao controle da qualidade a serem atendidas pelos diversos agentes econômicos que comercializam o produto em todo o território nacional. **Resolução ANP nº 65**, de 9 de dez. 2011. Disponível em: <http://nxt.anp.gov.br/nxt/gateway.dll/leg/resolucoes_anp/2011/dezembro/ranp%2065%20-%202011.xml>. Acesso em: 17 set. 2014.

ARAÚJO, D. R. **Síntese e caracterização de óxido de magnésio obtido por diferentes técnicas e sua aplicação na produção de biodiesel**. 2011. 92 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade de Brasília, Brasília, DF.

DEUTSCHES INSTITUT FÜR NORMUNG. **EN 14103**: Fat and oil derivatives: fatty acid methyl esters (FAME) - Determination of ester and linolenic acid methyl ester contents. Berlin, 2003.

Delineamento experimental de *screening* de variáveis aplicado à produção de biodiesel de pinhão-mansão (*Jatropha curcas* L.)

Adriana de S. Oliveira^{1*}, José Antonio de Aquino Ribeiro¹, Lorena C. Garcia¹, Simone Mendonça¹

Introdução

O biodiesel é um biocombustível produzido a partir da transesterificação de um óleo vegetal e um álcool na presença de um catalisador resultando em mono-alquil-ésteres e glicerina. Existem diversas formas de se produzir biodiesel, sendo que a transesterificação é a mais amplamente utilizada. A transesterificação ocorre a partir de um ácido graxo, que é o óleo vegetal, um álcool (metanol ou etanol) e um catalisador homogêneo ou heterogêneo. Ao final da reação produz-se o biodiesel na camada superior e a glicerina na camada inferior. A rota mais empregada tem sido a catálise alcalina homogênea e os catalisadores mais utilizados o hidróxido de sódio (NaOH) e o hidróxido de potássio (KOH). Porém, tal rota tecnológica apresenta algumas desvantagens, como um tempo de reação relativamente alto, dificuldade na separação dos produtos e sensibilidade à água e aos ácidos graxos livres (SILVEIRA, 2012). O pinhão-mansão é considerado uma das matérias-primas potenciais para a produção de óleo vegetal, devido à rusticidade da planta e alto teor de óleo (25 a 54%) quando comparado a outras oleaginosas, como por exemplo, a soja (17 e 20%) (ALVES, 2010; SILVEIRA, 2012). Este trabalho tem como objetivo avaliar quais as condições de processo afetam a produção de biodiesel a partir do óleo de pinhão-mansão. Para isso foi feito um delineamento experimental fatorial fracionado, que permite realizar um *screening* de grande número de variáveis com um pequeno número de experimentos.

Métodos

Todos experimentos foram realizados por rota etílica. Foi utilizado um delineamento experimental fracionado para 7 fatores 2^{7-3} (combinação que gera 16 experimentos) onde as variáveis estudadas foram: razão molar óleo/álcool, porcentual de catalisador (KOH), temperatura da reação, tempo de reação, agitação, acidez inicial do óleo de pinhão-mansão e número de lavagens ao final do processo. Para obter dois níveis de acidez do óleo de pinhão-mansão, foram utilizadas matérias-primas de diferentes procedências. Após a reação ocorrida, a amostra foi centrifugada para acelerar a separação de fases, o biodiesel (fase superior) foi lavado com água acidificada (5% de ácido cítrico), e posteriormente pesado

¹ Embrapa Agroenergia, Parque Estação Biológica, Brasília/DF, Brasil, 707700-901; *adriana.oliveira@colaborador.embrapa.br.

e o rendimento (%) foi calculado. Em havendo dúvida sobre a composição das fases (se tratava de biodiesel ou de óleo não-reagido), foram utilizadas as características físicas viscosidade cinemática e densidade, de acordo com as metodologias recomendadas pela ANP (AGENCIA NACIONAL DE PETRÓLEO, 2012), NBR 10441 e NBR 14065 respectivamente. Além disso, foi realizada a análise de teor de ésteres de acordo com a norma EN 14103 (AGENCIA NACIONAL DE PETRÓLEO, 2012).

Resultados e Conclusões

Foi utilizado o software Statistica 12 (Statsoft, EUA) para avaliar quais das variáveis independentes estudadas afetam ou não a produção de biodiesel. Os efeitos que foram considerados estatisticamente significativos ($p < 0,05\%$) na variável resposta “rendimento em peso” (%) foram razão molar óleo/álcool, acidez da amostra e percentual de KOH. Já para a resposta “teor de ésteres” (%) apenas a porcentagem do catalisar KOH foi significativa. Na variável resposta “rendimento em ésteres” (%) obtida pela multiplicação do teor de ésteres pelo rendimento em peso, o teor de KOH e a acidez do óleo foram efeitos significativos.

Numa próxima etapa, a de otimização do processo, serão aprofundados estudos apenas nas variáveis independentes: razão molar, teor de KOH e acidez da matéria-prima.

Apoio Financeiro

FINEP (projeto BRJATROPHA)

Referências

AGENCIA NACIONAL DE PETRÓLEO (Brasil). Resolução nº 14 2012, de 11 maio 2012. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 18 maio 2012. Seção 1, p. 79. Disponível: < http://www.lex.com.br/legis_23365001_RESOLUCAO_N_14_DE_11_DE_MAIO >. Acesso em: 16 fev. 2014.

ALVES, M. A. B. **Otimização da obtenção de biodiesel etílico de pinhão manso (*Jatropha curcas* L.)**. 2010. 97 f. Dissertação (Mestrado em Agroenergia) - Universidade Federal do Tocantins, Palmas, TO.

SILVEIRA, D. A. **Produção de biodiesel a partir de sementes de pinhão-manso (*Jatropha curcas* L.) e etanol em reator supercrítico**. 2012. 237 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC.

The background features a vertical gradient from light beige at the top to a deeper orange at the bottom. Overlaid on this are several large, white, organic, wavy shapes that resemble liquid droplets or abstract organic forms, scattered across the frame.

QUÍMICA ANALÍTICA

Síntese e caracterização do catalisador Ni/Co/HUSY para aplicação em reforma de Biogás

MunIQUE G. Guimarães^{1}, Itânia P. Soares², Emerson L. Schultz², Grace F. Ghesti¹*

Introdução

Gás de síntese é o nome dado a uma mistura de H₂ e CO que pode ser produzido a partir de fontes fósseis, gás natural, carvão e petróleo, bem como de fontes renováveis, como biomassa e biogás (LORA et al., 2012).

A obtenção de gás de síntese a partir do biogás pode ser realizada por processos de reforma de CH₄, como reforma a vapor, seca e autotérmica, empregando catalisadores à base de metais como platina, ródio e paládio e níquel suportados em materiais como alumina. O níquel é o metal mais amplamente utilizado, principalmente devido ao menor custo. Em contrapartida, sofre desativação pela deposição de carbono na sua superfície. Para diminuir esse problema, diferentes suportes têm sido estudados, como as zeólitas, bem como a adição de um segundo metal ao níquel, entre eles está o cobalto (FOO et al., 2012; PINHEIRO et al., 2008).

As zeólitas têm muitas propriedades como a sua estrutura microporosa, de elevada área superficial e elevada afinidade por CO₂ como adsorventes (PINHEIRO et al., 2008). Os catalisadores à base de níquel tem a vantagem de apresentarem alta atividade mesmo a baixas temperaturas, isto é, entre 400 e 550°C (XIE et al., 2013), enquanto que catalisadores à base de cobalto são largamente usados devido a sua alta atividade e seletividade, juntamente com a alta resistência deste a reoxidação do metal ativo pela presença de água (TEIXEIRA, 2008).

Este trabalho objetivou a preparação e modificação da zeólita HUSY com NiO e CoO em diferentes proporções a fim de aplicá-la na reforma de biogás. Para isso análises de Difração de Raios-X (DRX) foram realizadas com a finalidade de prever a dispersão destes metais ao longo da estrutura zeolítica.

Métodos

As amostras Ni/HUSY (Zeólita Y ultraestabilizada na forma protônica) contendo 5, 10 e 15% de NiO, foram preparadas pelo método de impregnação em meio aquoso, seguida pela calcinação em mufla a 550°C por 8h, a partir da zeólita NH₄USY (CBV 500, Zeolyst

¹ Laboratório de Catálise, Universidade de Brasília, Instituto de Química, Caixa Postal 04478, 70910-970, Brasília- DF. *muniquegg@gmail.com

² Embrapa Agroenergia, Parque Estação Biológica, Brasília/DF, Brazil, 70770-901.

International). Após, a impregnação de um terceiro metal nas amostras foi realizada, para isso foi utilizado acetato de cobalto II. Os sólidos resultantes da impregnação em meio aquoso foram calcinados a 550 °C por 8 h. Os catalisadores preparados foram caracterizados por Difração de Raios-X (DRX).

Resultados e Conclusões

Nos difratogramas de raios X observa-se que na estrutura dos materiais não houve mudança de cristalinidade após os procedimentos de impregnação e calcinação quando comparado ao padrão da HUSY pura, porém a intensidade dos picos das amostras sintetizadas à medida que a proporção NiO/CoO/HUSY era aumentada houve a gradual perda de cristalinidade causada pela deposição dos óxidos na superfície de contato.

Nas condições usadas para a ativação do material, determinou-se por DRX que o $\text{Ni}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ e o $\text{C}_4\text{H}_6\text{CoO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ é completamente transformado em NiO e CoO, devido a ausência de picos de NiO e CoO no espectro de DRX das amostras, o que está relacionado com a alta dispersão das partículas de NiO e CoO na superfície da zeólita.

Assim, concluiu-se pelo espectro de DRX, que após a impregnação de cobalto e níquel e das posteriores calcinações, as amostras mantiveram a estrutura da zeólita, bem como, a dispersão dos metais ao longo da estrutura zeolítica foi completa.

Apoio Financeiro

Embrapa Agroenergia.

Referências

FOO, S. Y.; CHENG, C. K.; NGUYEM, T. H.; ADESINA, A. A. Syngas production from CH_4 over Co-Ni/ Al_2O_3 catalyst: Coupled reaction-deactivation kinetic analysis and the effect of O_2 co-feeding on H_2 :CO ratio. **International Journal of Hydrogen Energy**, Oxford, v. 37, n. 22, p. 17019-17026, 2012.

LORA, E. E. S.; ANDRADE, R. V.; ÁNGEL, J. D. M.; LEITE, M. A. H.; ROCHA, M. H., SALES, C. A. V. B.; MENDONZA, M. A. G.; CORAL, D. S. O. Gaseificação e pirólise para a conversão de biomassa em eletricidade e biocombustíveis. In: LORA, E. E. S.; VENTURINI, O. J. (Coord.). **Biocombustíveis**. Rio de Janeiro: Interciência, 2012. v. 1, p. 411-498.

PINHEIRO, A. N.; VALENTINI, A., SASAKI, J. M.; OLIVEIRA, A. C. Structural characterization of highly stable Pt–Ni supported zeolites and its catalytic performance for methane reforming with CO_2 . **Studies in Surface Science and Catalysis**, Amsterdam, v. 174, part A, p. 205-208, 2008.

TEIXEIRA, G. A. **Avaliação de catalisadores Co/ Al_2O_3 na síntese Fischer-Tropsch**. 2008. 42 f. Monografia (Graduação) - Universidade de Uberlândia, Uberlândia, MG.

XIE, X.; OTREMBIA, T.; LITTLEWOOD, P.; SCHOMÄCKER, R.; THOMAS, A. One-Pot Synthesis of Supported, Nanocrystalline Nickel Manganese Oxide for Dry Reforming of Methane. **ACS Catalysis**, Washington, DC, v. 3, n. 2, p. 224-229, 2013.

Rendimento de amido em microalgas cultivadas em vinhaça utilizando fotobiorreatores

Valérya C. Teles¹, André F. Passamani Oliveira^{1*}, Raquel B. Campanha¹, Rodrigo C. do Nascimento¹, Itânia P. Soares¹, Bruno S. A. Figueiredo Brasil¹.

Introdução

Nos últimos anos o uso de biomassa de microalgas ganhou notoriedade, pois é considerada uma promissora matéria-prima renovável (POSTEN; ROSELLO-SASTRE, 2011). Devido à alta capacidade fotossintética apresentada pelas microalgas, estas têm sido estudadas como alternativa para suprimento da demanda energética. As algas verdes (*Chlorophyta*) apresentam parede celular celulósica, porém sem lignina em sua composição, o que reduz os custos de sua hidrólise para produção de etanol. Algumas espécies possuem altos teores de carboidratos, como amido e celulose, constituindo uma promissora matéria-prima para a fabricação de biocombustível (HO et al., 2013). As microalgas dos gêneros *Chlamydomonas*, *Chlorella*, *Dunaliella*, *Scenedesmus* e *Tetraselmis* têm demonstrado capacidade de acumular grandes quantidades de carboidratos (> 40% do peso seco) (JOHN et al., 2011). O presente trabalho foi realizado com o objetivo de verificar a potencialidade de microalgas do gênero *Chlamydomonas*, cultivadas em efluente de indústria sucroalcooleira, na produção de amido, visando à produção de bioetanol.

Metódos

Duas cepas de microalgas, LBA8 e LBA40, foram cultivadas em fotobiorreatores tipo placas planas com sistema de agitação *air lift*. Ambas as microalgas são pertencentes ao gênero *Chlamydomonas* e fazem parte da coleção de micro-organismos fotossintetizantes da Embrapa Agroenergia. Utilizou-se como meio de cultura, vinhaça proveniente da Usina Jales Machado S. A. (Goianésia- GO). As microalgas foram inoculadas em vinhaça e após 11 dias de cultivo foram colhidas por centrifugação, lavadas com água destilada e submetidas a congelamento a -20 °C. Logo após, realizou-se a liofilização da biomassa e prosseguiu-se com a pesagem para determinação do rendimento diário. Foi realizada análise do teor de amido com as biomassas algais previamente liofilizadas e trituradas em moinho analítico de bancada. Nas análises de amido empregou-se metodologia analítica proposta pelo National Renewable Energy Laboratory (NREL) baseada em Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC) (SLUITER; SLUITER, 2008).

¹ Embrapa Agroenergia, Parque Estação Biológica, Brasília/DF, Brasil, 70770-901; *andre.passamani@colaborador.embrapa.br.

Resultados e Conclusões

Foi observado um rendimento total de biomassa algal após 11 dias de cultivo em fotobiorreator com volume útil de trabalho de 13 litros de 1,16 g/L para a cepa LBA8 e 1,28 g/L para a LBA40. Foi verificado que a cepa LBA8 apresentou 16,38 % \pm 1,96 e a LBA40 12,14% \pm 0,47 de teor de amido em sua composição. Dessa forma, podemos ressaltar que os resultados quantitativos mostram-se promissores como fonte de biomassa para produção de bioetanol de 3ª geração. Não obstante, ainda poderão ser melhorados por meio da otimização do processo de cultivo para alcançar teores de amido mais elevados. Dessa forma o aproveitamento do principal resíduo líquido de usinas de etanol, a vinhaça, apresenta potencialidade para geração de energia limpa e também redução de impactos ambientais, pois o efluente final do processo de cultivo da microalga apresenta menor carga orgânica.

Apoio Financeiro

Embrapa (ALGAVIN - SEG: 02.12.11.001.00.00)

Referências

HO, S. H.; HUANG, S. W.; CHEN, C. Y.; HASUNUMA, T.; KONDO, A.; CHANG, J. S. Bioethanol production using carbohydrate-rich microalgae biomass as feedstock. **Bioresource Technology**, Oxon, v. 135, p. 191–198, 2013.

JOHN, R. P.; ANISHA, G. S.; NAMPOOTHIRI, K. M.; PANDEY, A. Micro and macroalgal biomass: a renewable source for bioethanol. **Bioresource Technology**, Oxon, v. 102, n. 1, p. 186-193, 2011.

POSTEN, C.; ROSELLO-SASTRE, R. **Microalgae reactors**. 2011. Disponível em: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/14356007.o16_o01/abstract>. Acesso em: jul. 2014

SLUITER, A.; SLUITER, J. **Determination of starch in solid biomass samples by HPLC**. Technical Report NREL/TP-510-42624 January 2008. Disponível em: <<http://www.nrel.gov/biomass/pdfs/42624.pdf>>. Acesso em: jul. 2014.

Utilização da lignina como agente antioxidante em biodiesel de óleo de soja

Janaína M. de Oliveira^{1}, Itânia P. Soares²*

Introdução

A lignina é uma macromolécula estrutural presente nos materiais lignocelulósicos. A segunda matéria prima mais abundante na natureza, ficando atrás apenas da celulose. A lignina é uma parcela estrutural na parede celular vegetal, responsável pela proteção contra o ataque de fungos, pela resistência mecânica e pelo transporte de metabólitos, nutrientes e água (XIAO et al., 2001). Compostos fenólicos podem ser obtidos através da lignina, e estes apresentam propriedades antioxidantes (PINA et al., 2011). O biodiesel é um biocombustível derivado de óleos e gorduras, composto por ésteres de cadeia longa. Muitos dos ésteres que constituem o biodiesel possuem insaturações na cadeia carbônica, o que o torna susceptível ao processo de oxidação. Para garantir uma boa qualidade do biodiesel produzido e comercializado no país a Agência Nacional de Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis (ANP) define uma especificação quanto à estabilidade à oxidação desse biocombustível, segundo a norma EN14112, constante da Resolução ANP 45/2014 (AGÊNCIA NACIONAL DO PETRÓLEO, GÁS NATURAL E BIOCOMBUSTÍVEIS, 2014). Segundo a Resolução, o biodiesel deve apresentar estabilidade mínima de 8 h no teste de oxidação acelerada. Para garantir a estabilidade do biodiesel é necessária a adição de aditivos antioxidantes, sendo que o mais comumente utilizado é o TBHQ (SANTOS, 2013). A fim de utilizar uma matéria prima abundante e renovável como aditivo no biodiesel, no presente trabalho objetivou-se testar o poder antioxidante da lignina em amostras de biodiesel de óleo de soja.

Materiais e Métodos

A lignina utilizada foi cedida pela Suzano Papel e Celulose. O biodiesel utilizado foi produzido na proporção 6:1 (metanol:óleo), utilizando como catalisador 0,8% de hidróxido de potássio em relação à massa de óleo. A lignina foi adicionada durante o processo de produção de biodiesel, na concentração de 1% em relação à massa de óleo. A reação ocorreu durante uma hora, à temperatura de 60°C, sobre refluxo. As amostras de biodiesel sem lignina (BSL), e de biodiesel com a lignina (BCL) foram avaliadas em analisador de estabilidade à oxidação, Rancimat, utilizando os parâmetros estabelecidos pela norma EN14112.

¹ Universidade de Brasília, Campus Universitário Darcy Ribeiro, Brasília/DF, Brasil, 70910-900. *monica.janaína@gmail.com

² Embrapa Agroenergia, Parque Estação Biológica, Brasília/DF, Brasil, 70770-901.

Resultados e Conclusões

A amostra BSL apresentou uma estabilidade à oxidação de aproximadamente 0,6 horas, o que é um bom resultado, visto que não houve acréscimo de aditivos na amostra. A amostra BCL apresentou uma estabilidade à oxidação de 1,8 horas, resultado este que demonstra que a lignina apresenta atividade antioxidante, porém este resultado ainda não é satisfatório, visto que o biodiesel deve apresentar pelo menos 8 horas de estabilidade à oxidação segundo a resolução da ANP.

A utilização da lignina como antioxidante no biodiesel gerou resultados promissores. O fato da estabilidade à oxidação do biocombustível ter aumentado em uma hora com o acréscimo da lignina é significativo, pois fica evidenciado que a lignina apresenta esta propriedade e abre-se um novo leque de pesquisas nesta área. Em etapas futuras, o estudo deverá ser conduzido buscando rotas para potencializar a ação antioxidante da lignina, a fim de chegar ao estabelecido na legislação (mínimo de 8 horas). Além disso, ainda deverá ser testado o potencial antimicrobiano da lignina, já que uma das formas de degradação do biodiesel se dá pela presença de micro-organismos.

Apoio Financeiro

Projeto Biobom e Centro Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

Referências

AGÊNCIA NACIONAL DO PETRÓLEO, GÁS NATURAL E BIOCOMBUSTÍVEIS (Brasil). **Resolução ANP nº 45**, de 25 de agosto de 2014. Disponível em: <http://nxt.anp.gov.br/nxt/gateway.dll/leg/resolucoes_anp/2014/agosto/ranp%2045%20-%202014.xml>. Acesso em: set. 2014.

PIÑA, I.; YSAMBERTT, F.; ARIAS, M.; CHIRINOS, J.; CASTILLO, M. Capacidad antioxidante de la lignina extraída del licor negro en polietileno de baja densidad. **Revista Iberoamericana de Polímeros**, Madrid, v. 12 n. 4, p. 216-226, 2011.

SANTOS, F. F. P. dos. **Avaliação de antioxidantes aplicados à produção de biodiesel**. 2013. 152 f. Tese (Doutorado em Engenharia Química) - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, Ceará.

XIAO, B.; SUN, X. F.; SUN, R. C. Chemical, structural, and thermal characterizations of alkali-soluble lignins and hemicelluloses, and cellulose from maize stem, rye straw, and rice straw. **Polymer Degradation and Stability**, Oxon, v. 74, n. 2, p. 307-319, 2001.

Avaliação da qualidade do óleo de macaúba visando à produção de biocombustíveis

Cynthia Yamada¹; Rodrigo S. N. Siqueira^{1,2}; Lorena Garcia¹; Simone Mendonça¹*

Introdução

A macaúba ou bocaiúva (*Acrocomia aculeata*) é uma palmeira nativa do cerrado brasileiro com ampla distribuição geográfica (AMARAL et al., 2011) e com boa adaptação aos climas subtropicais e aos ecossistemas semiáridos e secos (LOPES et al., 2013). Atualmente a maior parte dos óleos naturais produzidos no Brasil é derivada de três oleaginosas: soja, palma e canola (NUNES, 2013), sendo o de soja responsável por 70 a 80% da matéria-prima para biodiesel. Comparada a essa oleaginosa, essa palmeira possui um grande potencial de cultivo e obtenção de óleo, sendo capaz de produzir 5.000 kg de óleo por hectare contra 375 kg/ha do óleo de soja e 1.188 kg/ha do óleo da mamona (NUNES, 2013). Os frutos de macaúba apresentam grande diversidade fenotípica, inclusive entre indivíduos encontrados num mesmo maciço. Um importante passo para a domesticação da cultura e a estruturação de um programa de melhoramento é a compreensão das diferenças em termos de qualidade de óleo dos diferentes acessos. Para isso, tornam-se necessários métodos rápidos e precisos na avaliação da qualidade do óleo. O presente estudo se dispõe a avaliar dois fatores que afetam a qualidade de óleo: método de secagem da amostra (liofilização e estufa de convecção) e método de extração (Soxhlet, ASE e à frio).

Materiais e Métodos

A polpa de macaúba analisada foi fornecida pela Universidade Federal de Viçosa (UFV). Ela foi moída em moinho e seca em estufa à 60°C por 16h ou liofilizada, também por 16h. Após a secagem, as amostras foram novamente moídas, identificadas e armazenadas em potes dentro de dessecadores. Estas amostras foram utilizadas para extração de óleo por Soxhlet (Método Aa 4-38) (AMERICAN OIL CHEMISTS' SOCIETY, 2010), ASE (Accelerated Solvent Extraction – Dionex[®]) e extração a frio (16 horas, proporção massa: solvente de 1:5), sendo o éter de petróleo utilizado como agente extrator. A qualidade do óleo foi avaliada com base nos resultados de acidez, absorvidade molar e teor de carotenoides. Para avaliação da acidez do óleo, o óleo foi solubilizado em uma solução de tolueno:isopropanol e então titulado com uma solução padronizada. A absorvidade molar foi determinada em espectrofotômetro, nos comprimentos de onda de 232 nm (dienos conjugados) e 270 nm

¹ Embrapa Agroenergia, Parque Estação Biológica, Brasília/DF

² Universidade Católica de Brasília, QS 07 – EPCT, Brasília/DF *rodrigo.siqueira@colaborador.embrapa.br

(trienos conjugados), utilizando isoctano como solvente. A quantidade total de carotenos no óleo extraído foi determinada através da absorção espectrofotométrica no comprimento de onda de 446nm, tendo hexano como solvente.

Resultados e Conclusões

A secagem teve influência no teor de dienos conjugados, sendo que a amostra seca em estufa apresentou maiores valores. Tanto para dienos como para trienos conjugados, o método de extração não influenciou a oxidação do óleo das amostras secas em estufa. Já nas amostras liofilizadas, verificou-se influencia do método de extração, sendo a extração a frio o método que resultou em menor oxidação. Nos processos de extração de óleo a quente (Soxhlet e ASE), não se verificou variação da acidez nos dois métodos de secagem utilizados. Já no processo de extração a frio, o óleo extraído da polpa liofilizada foi significativamente ($p \leq 0,05$) menos ácido que o extraído da polpa seca em estufa. Para a polpa liofilizada, o óleo extraído a frio foi o menos ácido. Já para amostra seca em estufa, não houve diferença significativa na acidez do óleo extraído utilizando os diferentes métodos de extração. A amostra seca em estufa apresentou maior teor de carotenoides quando extraída a frio. Não foram verificadas diferenças significativas resultantes do processo de extração da polpa seca em estufa. Apenas o óleo extraído no ASE apresentou diferenças no teor de carotenoides, quando os dois processos de secagem da polpa foram comparados. O processo de extração a frio nas amostras liofilizadas mostrou-se ser mais eficaz na obtenção de óleos menos ácidos e com menor oxidação.

Apoio Financeiro

FINEP e SEG (SEG 02.11.01.033)

Referências

AMARAL, F. P.; BROETTO, F.; BATISTELLA, C. B.; JORGE, S. M. A. Extração e caracterização qualitativa do óleo da polpa e amendoas de frutos de macaúba [*Acrocomia aculeata* (Jacq) Lodd. ex Mart] coletada na região de Botucatu, SP. **Revista Energia na Agricultura**, Botucatu, v. 26, n. 1, 2011. Disponível em: <<http://energia.fca.unesp.br/index.php/energia/article/view/142/86>>. Acesso em: 10 out. 2014.

AMERICAN OIL CHEMISTS' SOCIETY. **Official methods and recommended practices of the American Oil Chemists' Society**. 8th ed. Champaign, 2010. 2 v.

LOPES, D. C.; NETO, A. J. S.; MENDES, A. A.; PEREIRA, D. T. V. Economic feasibility of biodiesel production from Macaúba in Brazil. **Energy Economics**, Amsterdam, v. 40, p. 819-824, 2013. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0140988313002284>>. Acesso em: 05 out. 2014.

NUNES, A. A. **Óleo da polpa de macaúba (*Acrocomia aculeata* (Jacq) Lodd. ex Mart.) com alta qualidade: processo de refino e termoestabilidade**. 2013. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade Católica Dom Bosco, Campo Grande, MS.

Avaliação do fluxo a frio do biodiesel produzido a partir da mistura de óleo de soja e sebo bovino

Itânia P. Soares¹, Paulo Stenio M. Sales Junior^{1}, Jéssica de Souza Silva¹, Priscila S. Sabaini²*

Introdução

Uma importante característica a ser observada na matéria-prima utilizada para produzir biodiesel é a composição em ácidos graxos. Isso, porque algumas propriedades físico-químicas do biodiesel são influenciadas pela estrutura molecular desses ácidos. As cadeias saturadas apresentam maior estabilidade à oxidação, comparadas às cadeias insaturadas e poli-insaturadas. Em contrapartida, biodiesel contendo alto teor de cadeias saturadas apresenta tendência de se solidificar a baixas temperaturas.

Devido à disponibilidade e ao baixo custo, a gordura bovina passou a ser bastante utilizada na produção de biodiesel, tornando-se a segunda matéria prima mais empregada no país. A utilização do sebo para a produção do biodiesel constitui-se em uma grande vantagem ambiental, por representar uma destinação eficiente do produto, oriundo do abate bovino, transformando o potencial dejetado em fonte de energia limpa (PIRES, 2012). O inconveniente é que a gordura bovina (sebo) apresenta um alto teor de cadeias saturadas, e possui, portanto, alto ponto de solidificação. Sendo assim, a gordura bovina é utilizada em mistura com o óleo de soja, normalmente, em porcentagem não superior a 30% (m/m). No entanto, não existem estudos que indiquem as porcentagens de gordura bovina que podem ser utilizadas juntamente com o óleo de soja em baixas temperaturas.

O biodiesel obtido com alto teor de ésteres saturados pode resultar em problemas de fluxo a frio nos motores veiculares movidos a diesel. A regulamentação para os limites de temperatura de solidificação, considerando diversidade climática e variação de temperatura ao longo do ano, é tratada na resolução ANP 45/2014, por meio da realização do ensaio de ponto de entupimento de filtro a frio. A temperatura nesse ensaio varia de 5 a 19 °C, dependendo da região e dos meses do ano.

Sendo assim, o objetivo do trabalho foi produzir misturas de sebo bovino com óleo de soja e correlacionar com a temperatura no ensaio de ponto de entupimento de filtro a frio.

Métodos

O biodiesel foi produzido a partir da mistura de óleo de soja refinado e gordura bovina (sebo) obtidos no comércio varejista, com razão molar álcool/óleo 6:1, utilizando-se

¹ Embrapa Agroenergia, Parque Estação Biológica, Brasília/DF, Brasil, 70770-901; * jessica.souza@colaborador.embrapa.br

hidróxido de potássio a 1 % (em relação à massa de óleo) como catalisador a 50 °C, por uma hora. O ensaio de ponto de entupimento de filtro a frio foi realizado segundo a norma NBR 14747. As porcentagens de sebo utilizadas juntamente com o óleo de soja foram: 25; 37,5; 50; 62,5 e 75%. A produção do biodiesel e as análises foram realizados em duplicata.

Os dados de ponto de entupimento de filtro a frio e % de sebo no biodiesel foram correlacionados por meio de um modelo linear. A análise de variância foi adotada para verificar a adequação do ajuste do modelo linear por meio da significância da regressão.

Resultados e Conclusões

Os resultados gerados no ensaio de ponto de entupimento foram plotados graficamente em função da composição da mistura sebo/óleo de soja. Observou-se que a mistura dos dois componentes tem uma relação linear com a propriedade de fluxo a frio do biodiesel, apresentando um coeficiente de correlação de 0,9674 e o p-valor menor que 0,001.

Nas proporções de 25; 37,5; 50; 62,5 e 75% de sebo as temperaturas encontradas foram de 0,5; 2,0; 3,5; 6,0 e 7,5 °C, respectivamente.

Nas condições empregadas e considerando as repetições realizadas no experimento, pode se inferir que uma mistura com 50 % de sebo bovino no óleo de soja seria segura para a região Sul do Brasil, durante o inverno. Nos demais meses e demais regiões do país seria seguro utilizar uma mistura contendo 62,5% de sebo bovino.

Apoio Financeiro

Projeto Biofrito (apropriado 03.13.00.066.00.00) – recurso Finep.

Referências

AGÊNCIA NACIONAL DO PETRÓLEO, GÁS NATURAL E BIOCOMBUSTÍVEIS (Brasil). Resolução ANP nº 45, de 25 agosto 2014. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 26 ago. 2014. Disponível em: <http://nxt.anp.gov.br/nxt/gateway.dll/leg/resolucoes_anp/2014/agosto/ranp%2045%20-%202014.xml>. Acessado em: set. 2014.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 14747**: óleo diesel - determinação do ponto de entupimento de filtro a frio. Rio de Janeiro, 2008.

PIRES, A. Sebo bovino e o biodiesel. **Biodieselbr**, 07 ago. 2012. Disponível em: <<http://www.biodieselbr.com/noticias/materia-prima/sebo/sebo-bovino-biodiesel-070812.htm>>. Acesso em: maio 2014.

Otimização do gradiente de eluição usado no monitoramento por UPLC-PDA de furano-aldeídos e compostos fenólicos em amostras de biomassa lignocelulósica

Gabriel F. Viégas^{1,2}, Ariane de A. Rodrigues^{1,2}, Raquel B. Campanha¹, Emerson Léo Schultz¹, Thaís D. Mendes¹, Mônica C. T. Damaso¹, Sílvio Vaz Jr¹, Clenilson M. Rodrigues¹

Introdução

O bagaço de cana-de-açúcar (BCA) é o principal subproduto da indústria canavieira e contém cerca de 50% de celulose, 25% de hemicelulose e 25% de lignina (PANDEY et al., 2000). A produção de etanol celulósico utiliza os produtos da hidrólise do BCA como substrato para a bioconversão de açúcares em etanol. No entanto, a porção da hemicelulose do BCA não tem sido empregada para esta mesma finalidade, visto que os microrganismos capazes de converter xilose a etanol ainda não executam esta bioconversão com a mesma eficiência que a *Saccharomyces cerevisiae* converte hexoses. Entretanto, uma vez hidrolisada, a hemicelulose pode ser uma boa fonte de substrato para a fermentação e produção de outros químicos de valor agregado (MAZUMDAR et al., 2013).

Inúmeros grupos de pesquisas estão estudando a melhor forma de aproveitar as pentoses presentes na hemicelulose. Dependendo da metodologia utilizada para o pré-tratamento, substâncias tóxicas aos microrganismos podem ser geradas. Assim, para monitorar o processo de pré-tratamento, bem como a bioconversão da xilose monomérica, é necessário ter ferramentas analíticas capazes de gerar informações qualitativas e quantitativas dos principais produtos e interferentes gerados por esses processos.

Para o monitoramento de açúcares, ácidos alifáticos e furano-aldeídos existem métodos oficiais que podem ser implantados em análises de rotina, embora sejam demasiadamente morosos (TEMPLETOM et al., 2010). Por sua vez, métodos aplicados ao monitoramento de compostos fenólicos são incipientes e, na maioria das vezes, empregam protocolos laboriosos para determinar o conteúdo polifenólico desse tipo de matriz, incluindo análises por Cromatografia Gasosa-Espectrometria de Massas (GC-MS) precedidas de etapas de derivatização (ZHA et al., 2014).

Diante dessas dificuldades, este trabalho teve o objetivo de estabelecer um novo método cromatográfico rápido, simples e preciso, que emprega o sistema de Cromatografia

¹ Embrapa Agroenergia, Parque Estação Biológica - PqEB, Brasília, DF - Brasil, 70770-901.

² Universidade de Brasília, Campus Universitário Darcy Ribeiro, Brasília, DF - Brasil, CEP 70910-900. E-mail: gabriel.viegas@colabora-dor.embrapa.br

Líquida de Ultra-alta Eficiência acoplado com um detector de fotodiodos (UPLC-PDA) para monitorar a ocorrência dos derivados de ácidos fenólicos e furano-aldeídos em amostras de biomassa lignocelulósica pré-tratadas.

Métodos

Amostras de licor de BCA foram preparadas a partir do pré-tratamento da biomassa em diferentes condições experimentais. Alíquotas dos licores foram diluídas para 10 mL com H_2SO_4 5 mM e usadas como amostras-controle. Os derivados de ácidos fenólicos e furano-aldeídos foram pré-concentrados e separados pela técnica de *Solid-Phase Extraction* (dados não publicados) e usados como amostras-modelo no estudo. As análises foram realizadas empregando um UPLC-PDA (1290 Infinity, Agilent®) equipado com coluna HSS T3 (150 x 2,1, L x d.i.; 1,8 μ m, Acquity, Waters®). Inúmeros sistemas de eluição em modo gradiente foram investigados usando fase móvel (FM) binária composta por acetonitrila (ACN) e água (H_2O), ambas acidificadas com ácido trifluoroacético (TFA).

Resultados e Conclusões

O perfil das amostras foi inicialmente avaliado empregando o gradiente exploratório linear sugerido por Snyder e colaboradores (SNYDER et al., 1997), sendo as condições adaptadas para UPLC. Após a obtenção do perfil, outras 5 variações foram estabelecidas usando gradiente de eluição segmentado. Os segmentos foram estabelecidos variando a força de eluição da FM com a finalidade de eluir os analitos no menor tempo e mantendo a seletividade de separação e resolução dos picos cromatográficos.

A melhor condição estabelecida empregou os seguintes parâmetros: Temperatura da coluna = 40°C. FM = TFA 0,05% (A), ACN + TFA 0,05% (B). Vazão = 0,5 mL/min. Rampa de eluição = 0–60% B, gradiente linear (4,87 min); 60% B, isocrático (5,19 min); 60–100% B, gradiente linear (5,52 min); 100% B, isocrático (6,49 min).

A partir de experimentos de co-injeção, usando o gradiente otimizado, as seguintes substâncias foram identificadas no licor: hidroximetilfurfural - HMF (t_R = 3,61 min); furfural (t_R = 4,03 min); ácido *p*-cumárico (t_R = 4,93 min); ácido *trans*-ferúlico (t_R = 5,11 min).

O método desenvolvido se mostrou bastante simples, sendo 5 vezes mais rápido que os métodos convencionais. O tempo total de análise foi de 12 min, considerando o tempo de reequilíbrio para uma nova injeção no sistema UPLC-PDA. A FM é bastante simples e baseada na mistura binária de ACN: H_2O acidificadas com TFA. Com a aplicação da técnica de UPLC, os compostos-alvo separados apresentaram elevada resolução cromatográfica e os analitos foram identificados e diferenciados inequivocamente. O método desenvolvido pode ser considerado uma alternativa analítica inovadora, confiável e promissora no monitoramento das classes de substâncias investigadas, principalmente no contexto do

aproveitamento de biomassa lignocelulósica para produção de etanol de segunda geração ou de químicos de valor agregado.

Apoio Financeiro

EMBRAPA, CNPq

Referências

MAZUMDAR, S.; LEE, J.; OH, M-K. Microbial production of 2,3 butanediol from seaweed hydrolysate using metabolically engineered *Escherichia coli*. **Bioresource Technology**, Oxon, v. 136, n. 1, p. 329-336, 2013.

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

SNYDER, L. R.; KIRKLAND, J. J.; GLAJCH, J. L. **Practical HPLC Method Development**. 2 ed. New Jersey: Wiley, 1997. 765 p.

TEMPLETON, D. W.; SCARLATA, C. J.; SLUITER, J. B.; WOLFRUM, E. J. J. Compositional Analysis of Lignocellulosic Feedstocks. 2. Method Uncertainties. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, DC, v. 58, n. 16, p. 9054-9062, 2010.

ZHA, Y.; WESTERHUIS, J. A.; MUILWIJK, B.; OVERKAMP, K. M.; NIJMEIJER, B. M.; COULIER, L.; SMILDE, A. K.; PUNT, P. J. Identifying inhibitory compounds in lignocellulosic biomass hydrolysates using an exometabolomics approach. **BMC Biotechnology**, London, v. 14, n. 22, 2014.

Determinação por UPLC-ELSD de polióis em processos biotecnológicos de conversão de glicerina crua: desenvolvimento, validação e aplicação

Pedro R. Fontes^{1,2,}, José A. A. Ribeiro², Carolina M. Poletto², Mônica C.T. Damaso², Patrícia V. Abdelnur², Clenilson M. Rodrigues²*

Introdução

Baseado no crescimento da cadeia produtiva do biodiesel, surge a problemática da ausência de alternativas viáveis de aproveitamento dos seus coprodutos, especialmente sobre o uso da glicerina crua. Embora o seu valor agregado tenha diminuído devido ao aumento da sua disponibilidade (SCHULTZ et al., 2014), estudos recentes apontam que a glicerina crua (70%-80% de glicerol) pode ser utilizada como fonte de carbono em processos biotecnológicos que visam à obtenção de compostos com maior valor agregado, incluindo a classe dos polióis (ALMEIDA et al., 2012). Dessa forma, é necessário desenvolver método analíticos capazes de determinar tais compostos em amostras obtidas a partir de bioprocessos, de forma a permitir a verificação da eficiência da bioconversão da glicerina crua. Na literatura atual existem apenas protocolos analíticos que empregam a cromatografia líquida convencional (HPLC) acoplada à detecção por UV-VIS ou ELSD para determinação de polióis em outros tipos de amostras (BALL, 1990; SIMONZADEH; ROSEN, 2012). O objetivo deste trabalho foi desenvolver uma nova metodologia cromatográfica com a aplicação da técnica de Cromatografia Líquida de Ultra-Alta Eficiência acoplada ao Detector Evaporativo de Espalhamento de Luz (UHPLC-ELSD) para monitorar processos biotecnológicos de conversão da glicerina crua.

Métodos

Meios de cultura contendo apenas glicerina crua como fonte de carbono foram inoculados com dois fungos filamentosos. O processo foi avaliado em três tempos de fermentação para ambos os grupos. As análises de glicerol, xilitol e sorbitol foram feitas utilizando um sistema Acquity UPLC (*H-class*, Waters®) acoplado ao ELSD (Waters®). As separações foram feitas utilizando a coluna Acquity UPLC-BEH-Amida (2,1 x 150 mm, d.i. x L, 1,7 µm, Waters®) equipada com a respectiva pré-coluna. A fase móvel utilizada foi: A (água) e B (acetonitrila), ambas acidificadas com ácido fórmico a 0,05%. Foi empregada eluição isocrática a 85% de B com vazão da fase móvel de 0,3 mL/min. Foi realizada a otimização de parâmetros

¹ Embrapa Agroenergia, Parque Estação Biológica (PqEB)- Asa Norte, Brasília/DF, Brasil, 70770-901.

² Universidade de Brasília, Faculdade de Ciências da Saúde, Campus Universitário Darcy Ribeiro, S/N – Asa Norte, 70910-900, Brasília/DF, Brasil. E-mail: pedro.fontes@colaborador.embrapa.br

cromatográficos e de detecção partindo da condição padrão indicada como *default*. Fatores cromatográficos (retenção [k], seletividade [alfa], eficiência [HETP], temperatura da coluna e fluxo de fase móvel) e do detector (pressão do gás de nebulização, temperatura do *drift tube* e modo de nebulização) foram avaliados para definir a condição ótima, expressa em termos de intensidade de sinal e área média de pico. O método foi validado determinando-se precisão, exatidão, sensibilidade, limites de detecção e quantificação (LD e LQ) e linearidade.

Resultados e Conclusões

Sob a condição ótima global, adaptada a partir de cada parâmetro individualmente otimizado, os analitos foram separados e resolvidos em 6 minutos. O LD e o LQ variaram de 15,63-31,25 ng e 31,30-62,50 ng, respectivamente. O método apresentou boa precisão, estabilidade, exatidão e pôde ser aplicado com sucesso às amostras de glicerina bioconvertidas. O método apresentou linearidade em escala log-log para os três analitos ($R^2 > 0,99$). A faixa de concentração utilizada variou de 7,81 a 506,88 $\mu\text{g/mL}$. A faixa de recuperação média variou entre 98,8-105,7%. O presente método, desenvolvido e validado, representa uma importante ferramenta analítica que permitirá avaliar a eficiência do processo de bioconversão da glicerina pelos fungos filamentosos utilizados, além de fornecer informações relevantes sobre a eficiência de outros microrganismos selecionadas em futuros estudos de bioprospecção. Adicionalmente, este método possui diversas vantagens sobre os métodos clássicos no que concerne à maior eficiência cromatográfica, separação satisfatória com eluição isocrática, além da redução do tempo de análise e do gasto de solventes.

Apoio Financeiro

EMBRAPA, CNPq

Referências

- 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.
- BALL, G. F. M. The application of HPLC to the determination of low molecular weight sugars and polyhydric alcohols in foods: a review. **Food Chemistry**, Oxon, v. 35, p. 117-152, 1990.
- SCHULTZ, E. L.; SOUZA, D. T.; DAMASO, M. C. T. The glycerol biorefinery: a purpose for Brazilian biodiesel production. **Chemical and Biological Technologies in Agriculture**, London, v. 1, n. 7, 2014.
- SIMONZADEH, N.; RONSEN, B. An isocratic HPLC method for the determination of sorbitol and glycerol in pharmaceutical formulations. **Journal of Chromatographic Science**, Cary, v. 50, n. 7, p. 644-647, 2012.

Desenvolvimento de metodologia para diferenciação entre a coloração do corante do diesel e a coloração do biodiesel de palma

Itânia P. Soares¹, Rodrigo Bastos Cesarino Dutra^{1}, Patricia Abrão de Oliveira¹, Patricia Pinto K. G. Costa¹, Maria do Socorro Maia Quintino², Waldemar Pacheco de O. Filho², Fabio da Silva Vinhado², Warley G. dos Santos²*

Introdução

Atualmente, existem duas misturas de óleo diesel/biodiesel comercializadas no país, o BX (onde x é a porcentagem v/v de biodiesel no óleo diesel) com S500 e o BX com S10, contendo 500 e 10 ppm de enxofre, respectivamente. As regiões onde é comercializado o BX com 500 ppm de enxofre são aquelas onde a frota de veículos é menor, ao passo que o óleo diesel B S10 deve ser distribuído nos grandes centros. Para identificar o tipo de BX comercializado nos postos de combustível, a Agência Nacional de Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis (ANP) determina que o óleo diesel S500 seja marcado com um corante vermelho. A especificação para a mistura BX é dada na Resolução ANP nº 50/2013.

Um dos desafios para o sucesso do Programa Nacional de Produção e Uso de Biodiesel é encontrar matérias-primas alternativas à soja, que sejam econômica e tecnicamente viáveis. Embora apresente acidez mais elevada que o óleo de soja, o óleo de palma é uma fonte interessante devido à sua alta produtividade e à possibilidade de regionalização da produção.

No entanto, em razão da presença de carotenóides, o óleo de palma apresenta coloração avermelhada. Esse é um inconveniente na utilização do biodiesel de palma, que também possui coloração vermelha e, em mistura com o óleo diesel, pode tornar o produto fora da especificação.

De acordo com Corgozinho (2009), o corante Vermelho Sudan, utilizado para marcar o óleo diesel, apresenta duas bandas de absorção, uma em 380 nm e outra em 540 nm. Remédios e colaboradores, 2006, obtiveram espectros de absorbância de diferentes óleos derivados de frutos da palma e observaram que todos apresentaram uma única banda de absorção dentro do intervalo de 250 a 600 nm, com absorção máxima em 351,5 nm.

Tendo em vista que a utilização do óleo de palma na produção de biodiesel pode gerar não conformidades em regiões onde é comercializado o BX com S10, este trabalho objetivou o desenvolvimento de uma metodologia para identificar a origem da coloração avermelhada em amostras de BX.

¹ Embrapa Agroenergia, Parque Estação Biológica, Brasília/DF, Brasil; *rodrigo.dutra@colaborador.embrapa.br

² Agência Nacional de Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis, SGAN 603, Módulo I, Asa Norte, Brasília/DF, Brasil;

Métodos

O biodiesel de soja foi produzido com razão molar metanol/óleo 6:1, com 1% de hidróxido de potássio, a temperatura de 50 °C, por uma hora. O biodiesel de palma foi produzido com uma etapa anterior a esta nas mesmas condições, mas utilizando como catalisador o ácido sulfúrico. Foi adicionado o corante vermelho às amostras de biodiesel e BX e, em seguida, as amostras foram analisadas em um espectrofotômetro de UV-Vis, Agilent, modelo Cary 60. As amostras de biodiesel foram diluídas com hexano 50 vezes e as amostras de B5 foram diluídas 5 vezes.

Resultados e Conclusões

Inicialmente foram realizadas análises das amostras de biodiesel de soja B100 de biodiesel de palma B100, sendo a absorção máxima 1 e a faixa de comprimento de onda de 320 à 700 nm. No espectro obtido para o biodiesel de soja não foi observada nenhuma absorção nessa região. No caso do biodiesel de palma foi observada uma absorção na faixa de 300 a 500 nm, que é atribuída à presença de carotenoides.

Uma vez obtido o espectro relativo aos carotenoides da palma outros testes com amostras de biodiesel B5 foram realizados para identificar a absorção relativa ao corante. Após esses testes, foi identificada uma região onde o corante apresenta absorção entre 500 e 600 nm, confirmando dados da literatura (CORGOZINHO, 2009).

Alguns estudos sobre o desenvolvimento da metodologia e a validação do método ainda serão desenvolvidos, mas conclui-se que é possível a diferenciação entre a coloração do corante do óleo diesel e a coloração atribuída aos carotenóides da palma.

Apoio Financeiro

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

Referências

AGÊNCIA NACIONAL DO PETRÓLEO (Brasil). Resolução ANP nº 65, de 9 de dez. 2011. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 12 dez. 2011. Disponível em: <http://nxt.anp.gov.br/nxt/gateway.dll/leg/resolucoes_anp/2011/dezembro/ranp%2065%20-%202011.xml>. Acesso em: set. 2014.

CORGOZINHO, C. N. C. **Utilização de técnicas espectrofluorimétricas na análise de biodiesel e suas misturas com óleo diesel**. 2009. 140 f. Tese (Doutorado em Química) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG.

REMÉDIOS, C. M. R.; NUNES, E. C. B.; CABRAL, A. J. F.; DEL NERO, J.; ALCÂNTARA JUNIOR, P.; MOREIRA, S. G. C. Estudo espectroscópico de óleos derivados de frutos da palma. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA E CIÊNCIA DOS MATERIAIS, 17., 2006, Foz do Iguaçu, PR. **Anais** [S. l.]: Ipen, 2006. p. 3158-3165.

Aplicação da extração em fase sólida na eliminação de furano-aldeídos e derivados de ácidos fenólicos do licor do bagaço de cana-de-açúcar

Layanne S. Guirra^{1,2}, Ariane de A. Rodrigues^{1,2}, Raquel B. Campanha², Thályta F. Pacheco², Emerson Léo Schultz², Silvio Vaz Jr², Mônica C. T. Damaso², Clenilson M. Rodrigues²

Introdução

A biomassa lignocelulósica é uma fonte de polissacarídeos amplamente distribuída no Brasil e o bagaço de cana-de-açúcar constitui uma das principais matérias-primas para a obtenção de açúcares monoméricos (TEMPLETON et al., 2010). A hemicelulose representa aproximadamente 25% do conteúdo total do bagaço de cana-de-açúcar e pode ser hidrolisada por ácidos que geram uma mistura de açúcares com majoritária ocorrência de xilose, sendo esta fração um substrato potencial para a conversão em etanol de segunda geração e em uma variedade de produtos de valor agregado (YANG et al., 2013).

A hidrólise com ácido diluído é considerada uma estratégia bastante simples e rápida para realizar a despolimerização da hemicelulose do bagaço de cana-de-açúcar. Embora a xilose seja o açúcar mais abundante do hidrolisado, o licor obtido contém outras substâncias que podem afetar os processos de bioconversão. Os interferentes encontrados no licor de hidrolisados da hemicelulose podem ser classificados em três principais classes: furano-aldeídos, ácidos alifáticos e derivados de ácidos fenólicos (BETANCUR; PEREIRA JUNIOR, 2010). Mas, mesmo em baixas concentrações, esses interferentes podem afetar o crescimento de microrganismos nos processos fermentativos.

A extração em fase sólida (SPE) é uma técnica de separação líquido-sólido e está fundamentada nos mesmos mecanismos de separação da Cromatografia Líquida de baixa pressão (LANÇAS, 2004). De acordo com a diversidade estrutural e às características lipofílicas ou hidrofílicas dos analitos presentes em uma amostra, essa técnica pode ser utilizada na segregação de diferentes classes de substâncias. Desta forma, devido à característica da composição química encontrada no licor do hidrolisado da hemicelulose do bagaço de cana-de-açúcar, o objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial da SPE em eliminar furano-aldeídos e derivados de ácidos fenólicos presentes no licor do bagaço de cana-de-açúcar.

¹ Embrapa Agroenergia, Parque Estação Biológica - PqEB, Brasília, DF - Brasil, 70770-901.

² Universidade de Brasília, Campus Universitário Darcy Ribeiro, Brasília, DF - Brasil, CEP 70910-900. E-mail: layanne.guirra@colaborador.embrapa.br

Métodos

O licor do bagaço de cana-de-açúcar foi preparado a partir do pré-tratamento da biomassa com H_2SO_4 2,5% (v:v) por 20 min à 121°C e 1 atm. Cartuchos de SPE (Phenomenex®) foram usados nos experimentos e, antes do processo de separação, o pH do licor foi ajustado para valores entre 2 – 8 com uma solução de NaOH 50% (m:v). Alíquotas de 1 mL do licor foram aplicadas aos cartuchos e três eluatos foram obtidos. Cada eluato foi diluído para 10 mL com H_2SO_4 5 mM e alíquotas de 10 μL foram injetadas no UHPLC. O perfil cromatográfico de açúcares e furano-aldeídos do licor do bagaço de cana-de-açúcar, antes e após os procedimentos de SPE, foi obtido por HPLC-RID [1]. Derivados de ácidos fenólicos e furano-aldeídos foram monitorados por UPLC-PDA, metodologia em desenvolvimento (dados não publicados).

Resultados e Conclusões

As análises por HPLC-RID e UPLC-PDA evidenciaram que os açúcares permaneceram no 1° eluato do processo de SPE. O 2° eluato da SPE reteve seletivamente furano-aldeídos e derivados de ácidos fenólicos, sendo que avaliações quantitativas indicaram recuperações no intervalo de 97 – 105% para os açúcares. Não foram observados analitos de interesse no 3° eluato.

A utilização da SPE, como estratégia de eliminação de furano-aldeídos e derivados de ácidos fenólicos do hidrolisado do bagaço de cana-de-açúcar, mostrou-se bastante efetiva, podendo ser um protocolo empregado na obtenção de frações enriquecidas com açúcares e isentas da presença das principais substâncias que atuam como inibidoras do processo fermentativo. Atualmente, estudos adicionais estão sendo conduzidos para avaliar o escalonamento deste protocolo.

Apoio Financeiro

EMBRAPA, CNPq

Referências

- BETANCUR, G. J. V.; PEREIRA JUNIOR, N. Sugar cane bagasse as feedstock for second generation ethanol production. Part I: Diluted acid pretreatment optimization. **Electronic Journal of Biotechnology**, Valparaíso, v. 13, n. 3, n. 3, 2010.
- LANÇAS, F. M. **Extração em Fase Sólida (SPE)**. São Carlos: RiMa, 2004. 96 p. (Métodos Cromatográficos de Análise, 4).
- TEMPLETON, D. W.; SCARLATA, C. J.; SLUITER, J. B.; WOLFRUM, E. J. Compositional Analysis of Lignocellulosic Feedstocks. 2. Method Uncertainties. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, DC, v. 58, n. 16, p. 9054-9062, 2010.
- YANG, W.; LI, P.; BO, D.; CHANG, H.; WANG, X.; ZHU, T. Optimization of furfural production from D-xylose with formic acid as catalyst in a reactive extraction system. **Bioresource Technology**, Oxon, v. 133, p. 361-369, 2013.



RESUMOS - PÓS-GRADUAÇÃO

BIOTECNOLOGIA VEGETAL

Transformação genética de *Saccharum spp.* e *Setaria viridis* com gene *MATE* visando tolerância ao alumínio

Ana Paula Ribeiro^{1,2*}; Polyana K. Martins¹; Bárbara B. A. Dias¹; Adilson K. Kobayashi²; Jurandir V. Magalhães³; Alan C. Andrade⁴; Hugo B. C. Molinari²

Introdução

Duas grandes limitações para a produção agrícola mundial, particularmente nas regiões tropicais, é a toxidez por alumínio (Al) e o déficit hídrico. Regiões consideradas potenciais para a expansão agrícola canavieira no Brasil estão localizadas na região do Cerrado, caracterizado por apresentar solos ácidos com elevados níveis de Al³⁺. Sob níveis tóxicos de Al no solo, as raízes das plantas paralisam seu desenvolvimento e tornam-se incapazes de explorar camadas mais profundas do solo, restringindo a absorção de nutrientes, aumentando a susceptibilidade à seca e reduzindo a produção. A tolerância ao alumínio tem sido amplamente estudada em gramínea, com destaque a dois genes clonados, em trigo (ALMT1) e em sorgo (MATE). O gene MATE de sorgo codifica um transportador de membrana, responsável pelo efluxo de citrato, ativado em presença do Al³⁺. Plantas de *Arabidopsis* transformadas com este gene apresentaram um aumento da tolerância ao alumínio e da exsudação de citrato, em comparação com plantas não transgênicas (MAGALHÃES et al., 2007). Tais resultados evidenciam que esse gene pode ser utilizado, via transgenia, para aumento da tolerância ao alumínio e consequente maior adaptabilidade de plantas aos solos ácidos. Devido à complexidade do genoma da cana-de-açúcar, o tempo para obtenção de eventos transgênicos e a baixa eficiência de transformação, *Setaria viridis* vem sendo utilizada como planta modelo para prova de conceito. *S. viridis* é filogeneticamente próxima a cana-de-açúcar, possuindo características como pequeno porte, ciclo de vida curto e protocolo de transformação genética estabelecida (MARTINS et al., 2014). Assim, o objetivo deste trabalho foi gerar plantas transgênicas de *S. viridis* superexpressando o gene *MATE* ortólogo isolado de *Brachypodium distachyon*. Paralelamente, experimentos de transformação genética da planta alvo, cana-de-açúcar, superexpressando o gene *SbMATE* também estão em andamento.

Métodos

Calos embriogênicos de *S. viridis* foram infectados com *Agrobacterium tumefaciens* EHA105 contendo a construção gênica *ZmUbi1::BdMATE::TNos* e gene *hpt* como marcador

¹ Laboratório de Genética e Biotecnologia, Embrapa Agroenergia, Brasília/DF.

² Pós-graduação em Biotecnologia Vegetal, Universidade Federal de Lavras, Lavras/MG. *ana.ribeiro@colaborador.embrapa.br

³ Núcleo de Biologia Aplicada, Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas/MG.

⁴ Laboratório de Genética Molecular, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília/DF.

de seleção (MARTINS et al., 2014). Plantas regeneradas em meio seletivo foram aclimatadas e submetidas às análises de PCR utilizando *primers* específicos para confirmação dos eventos positivos. A abundância de transcritos dos eventos foi avaliada por qPCR e a análise de segregação mendeliana foi conduzida para identificação dos eventos com uma única inserção do transgene. A avaliação quanto à tolerância ao alumínio foi realizada submetendo plantas não transgênicas a: i. diferentes soluções nutritivas; ii. concentrações de CaCl_2 ; iii. concentrações de AlCl_3 e respectivas atividades livres de Al^{3+} estimadas no GeoChem-EZ. O crescimento radicular foi avaliado diariamente utilizando o equipamento WinRhizo durante 10 dias nos diferentes tratamentos. Calos embriogênicos de cana-de-açúcar estão sendo transformados via biolística com a construção gênica *ZmUbi1::SbMATE::TNos* contendo o gene marcador de seleção *bar* que confere resistência ao herbicida glufosinato de amônio.

Resultados e Conclusões

Foram obtidos 30 eventos *ZmUbi1::BdMATE* de *S. viridis*. A expressão gênica destes eventos variou de 150 a 2043 vezes em comparação ao controle, permitindo uma separação dos eventos em 7 grupos distintos. Um evento representativo de cada grupo foi selecionado para as análises de segregação mendeliana. Dentre estes, foram identificados 3 eventos com proporção mendeliana 3:1 pelo teste de χ^2 , indicando uma inserção única do transgene. Baseado no crescimento diário das raízes das plantas, a solução de CaCl_2 a 500 μM e pH 4,2 apresentou o melhor resultado. Portanto, esta solução foi utilizada para definir a melhor atividade livre de Al^{+3} e seu respectivo tempo de exposição para os testes de tolerância ao Al em *S. viridis*. Assim, após estes ensaios foi identificado que {20} μM de Al^{+3} por um período de 5 dias mostrou-se a mais adequada para o *screening* dos eventos contendo o gene *MATE*. Para cana-de-açúcar, ensaios similares estão em andamento.

Apoio Financeiro

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária; Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior.

Referências

MAGALHÃES, J. V.; LIU, J.; GUIMARÃES, C. T.; LANA, U. G. P.; ALVES, V. M. C.; WANG, Y.; SCHAFFERT, R. E.; HOEKENGA, O. A.; PINEROS, M. A.; SHAFF, J. E.; KLEIN, P. E.; CARNEIRO, N. P.; COELHO, C. M.; TRICK, H. N.; KOCHIAN, L. V. A gene in the multidrug and toxic compound extrusion (MATE) family confers aluminum tolerance in sorghum. **Nature Genetics**, New York, v. 39, n. 9, p. 1156-1161, 2007.

MARTINS, P. K.; DIAS, B. B. A.; RIBEIRO, A. P.; KOBAYASHI, A. K.; MOLINARI, H. B. C. *Setaria viridis*: a tool for functional gene analysis in sugarcane. In: INTERNATIONAL SERTARIA GENETICS CONFERENCE, 1., 2014, Beijing, China. **Proceedings** ... [Beijing]: China Agricultural Research Systems, 2014. p. 19.

Descoberta e caracterização genômica de marcadores PAVs e SNPs em *Elaeis oleifera*

Jaire A. Ferreira Filho^{1,2*}, Alexandre A. Alves¹, Manoel T. Souza Junior^{1,2} e Eduardo F. Formighieri¹

Introdução

A palma de óleo (*Elaeis guineensis*) destaca-se por ser a oleaginosa cultivada com maior produtividade de óleo por área (SAVILAAKSO et al., 2014). Atualmente, o óleo de palma vem sendo utilizado também para a produção de biocombustíveis, devido às demandas por uma matriz energética mais sustentável, além de fatores relacionados ao aquecimento global, que abriram novas perspectivas para uso de biodiesel (URQUIAGA et al., 2005). Com a crescente demanda por óleo de palma, os programas de melhoramento da espécie vêm sendo forçados a obter ganhos em eficiência cada vez maiores. Nesse sentido, a aplicação de marcadores moleculares para fins de seleção assistida (SAM) vem se destacando com uma das principais abordagens do chamado melhoramento genômico. Com o enorme avanço das tecnologias de sequenciamento de nova geração (NGS) têm-se hoje técnicas robustas que permitem a genotipagem de milhares de marcadores moleculares distribuídos ao longo de todo o genoma a custos bem reduzidos. Estas técnicas são conhecidas como genotipagem por sequenciamento (GBS). Ante o exposto, iniciou-se um projeto para o desenvolvimento de marcadores moleculares para a espécie americana de Palma de Óleo (*Elaeis oleifera*), com base na plataforma DARTSeq. Os objetivos desse trabalho foram, portanto, (i) identificar marcadores PAVs (*presence/absence variants*) e SNPs (*single nucleotide polymorphism*) e (ii) realizar a caracterização genômica destes marcadores, por meio da verificação de sua distribuição no genoma de *Elaeis oleifera*.

Métodos

Foi utilizado um banco de sequências geradas por meio da genotipagem-por-sequenciamento via plataforma DARTSeq de 553 genótipos de *E. oleifera*. Foi realizado um pré-processamento para a remoção de sequências de baixa qualidade com os softwares FASTX-toolkit e FASTQC. As sequências foram mapeadas contra o genoma público de *Elaeis guineensis* (SING et al., 2013). O mapeamento foi realizado utilizando o software BWA-MEM (parâmetros padrão) a partir da ferramenta de alinhamento Burrows-Wheeler (LI; DURBIN, 2010) para produzir um arquivo BAM (*Binary Alignment Map*). Para a manipulação do arquivo foi utilizado o pacote de softwares SAMtools (LI et al., 2009) (as opções utilizadas foram *sort, index, mpileup -uf e bcftools view -vcg*) que também gerou o arquivo *Variant Call Format*

¹ Embrapa Agroenergia, Parque Estação Biológica, Brasília/DF, Brasil, 70770-901;

² Universidade Federal de Lavras, UFLA, Lavras/MG, Brasil, 37200-000; *jaire.filho@colaborador.embrapa.br

(VCF) com os SNPs identificados nas sequências. Para ser considerado um marcador PAV foi utilizado o filtro de cobertura de no mínimo 6X por genótipo e um máximo de dois SNPs na sequência. Os SNPs foram filtrados com base em parâmetros de qualidade *phred* 20, profundidade 10, qualidade de mapeamento 30 e qualidade consenso de 10. Posteriormente, cada um dos 16 cromossomos de *E. guineensis* foram divididos em intervalos de 5Mb para uma análise detalhada da distribuição dos marcadores ao longo do genoma.

Resultados e Conclusões

Um total de 849.301.904 sequências foram mapeadas contra o genoma de *E. guineensis*. Destas, foi possível caracterizar 17.412 PAVs com posições únicas no genoma. O número de marcadores PAVs nos 16 cromossomos variou de 569 a 2.228. Para os 130 intervalos em que os cromossomos foram divididos, observou-se uma frequência de no mínimo 39 e no máximo 352 marcadores, com uma média de 134 marcadores por intervalo. Com base no alinhamento dessas sequências, foram posteriormente identificados 36.590 SNPs, sendo 5.433 do tipo heterozigoto. Após aplicar os parâmetros de filtragem, esse número foi reduzido para 2.370 SNPs (high-quality SNPs). O conjunto de marcadores mapeados proporciona uma cobertura consideravelmente homogênea ao longo do genoma de *E. oleifera* e com a identificação dos SNPs ampliou-se a informatividade genética do conjunto de marcadores. Estes marcadores poderão agora ser aplicados em estudos de diversidade genética e em estratégias de SAM.

Apoio Financeiro

MCTI/FINEP/CNPq.

Referências

- LI, H.; DURBIN, R. Fast and accurate long-read alignment with Burrows-Wheeler transform. **Bioinformatics**, Oxford, v. 26, n. 5, p. 589-595, 2010.
- LI, H.; HANDSAKER, B.; WYSOKER, A.; FENNELL, T.; RUAN, J.; HOMER, N.; MARTH, G.; ABECASIS, G.; DURBIN, R. The sequence alignment/map format SAMtools. **Bioinformatics**, Oxford, v. 25, n. 16, p. 2078-2079, 2009. 1000 Genome Project Data Processing Subgroup.
- SAVILAAKSO, S.; GARCIA, C.; GARCIA-ULLOA, J.; GHAZOUL, J.; GROOM, M.; GUARIGUATA, M. R.; LAUMONIER, Y.; NASI, R.; PETROKOFKY, G.; SNADDON, J.; ZRUST, M. Systematic review of effects on biodiversity from oil palm production. **Environmental Evidence**, London, v. 3, n. 4, p. 1-20, 2014.
- SING, R.; ONG-ABULLLAH, M.; LOW, E. T. L.; MANAF, M. A. A.; ROSLI, R.; NOOKIAH, R.; OOI, L. C. L.; OOI, S. E.; CHAN, K. L.; HALIM, M. A.; AZIZI, N.; NAGAPPAN, J.; BACHER, B.; LAKEY, N.; SMITH, S. W.; HE, D.; HOGAN, M.; BUDIMAN, M. A.; LEE, E. K.; DESALLE, R.; KUDRNA, D.; GOICOECHEA, J. L.; WING, R. A.; WILSON, R. K.; FULTON, R. S.; ORDWAY, J. M.; MARTIENSSEN, R. A.; SAMBANTHAMURTHI, R. Oil palm genome sequence reveals divergence of interfertile species in old and new worlds. **Nature**, London, v. 500, n. 7462, p. 335-339, 2013.
- URQUIAGA, S.; ALVES, B. J. R.; BOODEY, R. M. Produção de biocombustíveis: a questão do balanço energético. **Revista de Política Agrícola**, Brasília, DF, v. 14, n. 1, p. 42-46, 2005.

Genetic Transformation of *Setaria viridis* with *CcUNK8* Gene of *C. canephora* for Enhanced Drought Tolerance

Karoline E. Duarte^{1,2*}, Natália G. Vieira¹, Polyana K. Martins², Ana P. Ribeiro², Bárbara A.B.D. Cunha², Hugo B.C. Molinari², Adilson K. Kobayashi², Carlos A. F. de Sousa², Pierre Marraccini³, Alan C. Andrade¹

Background

Sugarcane is an important crop worldwide not only for sugar and ethanol production, but also as a lignocellulosic biomass source for electricity and potentially 2nd generation (2G) ethanol production (SAVAGE, 2011). Drought is one of the most challenging agricultural issues limiting sustainable sugarcane production that, in some cases, can cause yield losses close to 50%. To improve drought tolerance, significant advances were done in the discovery of candidate genes involved in this genetic determinism. Some of them do not exhibit any similarity with sequences deposited in global databases and are commonly called "no hits" or "orphan" genes. The emergence of these genes might be related to adaptive responses specific to each species to stresses and adverse conditions during the evolutionary process (TAUTZ; DOMAZET-LOSO, 2011). The *CcUNK8* (*UNK* for *UNK*known) gene of *Coffea canephora* was previously identified as candidate gene involved in drought tolerance in this species. This gene was cloned in an expression vector used to transformed embryogenic callus of *Setaria viridis* by *Agrobacterium tumefaciens*. Thirteen T₀ transformed plants of *S. viridis* were selected and the insertion of the T-DNA was confirmed by PCR. Leaf *CcUNK8* gene expression was analyzed by RT-qPCR and presented a variation between transformed plants. Phenological analyses (with or without drought) were performed in order to see if *CcUNK8* expression enhanced drought tolerance in *S. viridis*.

Methods

We used the binary vector pUBI:*CcUNK8* containing in the T-DNA region containing the selective gene *hptII* that confers resistance to hygromycin and the *CcUNK8* full-length cDNA under the control of the constitutive promoter (pUBI) of ubiquitin gene from maize. The genetic transformation of *S. viridis* by *A. tumefaciens* was performed according to previously reported protocol (BRUTNELL et al., 2010). For the RT-PCR we used method relative quantification. For physiological and phenological analyses of *S. viridis*, ten plants of wild-type (WT, untransformed) and T₂ transformed events were grown during 32 days under controlled greenhouse conditions (T 24°C, RH 54 %) and then separated in 2 blocks of 5 plants

¹ EMBRAPA Genetic Resources and Biotechnology, Brasília, DF-BR,

² EMBRAPA Agroenergy, Brasília, DF-BR. *karollduarte31@gmail.com

³ CIRAD UMIG AGAP, Montpellier, FR

subjected (non irrigated) or not (irrigated) to water deficit by suspension of irrigation during 7 additional days. At the end of the treatment, all plants were subjected to destructive tests to measure the fresh weigh (FW) of both shoot and root biomass.

Results and Conclusions

Using the pUBI:*CcUNK8* vector to transform *S. viridis*, it was possible to obtain thirteen independent T_0 events of transformation. All of them were checked by conventional PCR experiment to confirm the presence of T-DNA region of pUBI:*CcUNK8* vector inserted in genomic DNA of *S. viridis*. Quantitative RT-PCR led to the selection of 4 events representing low, medium and high levels of *CcUNK8* gene expression in leaves of T_1 events. In order to evaluate the effects of water suspension on phenotype and plant development, the root and shoot fresh biomass (FW) was measured only in T_2 events of the 4 events previously selected. The classic symptoms of drought, became visible around the 5th day after water suspension, and appeared more pronounced for the WT and transformed events n°56 and 62 of *S. viridis* than for transformed event n°54 and 60. Under irrigated condition, we also observed that FW accumulation in roots and shoot was higher for all T_2 events of *S. viridis* in comparison to WT. Under non-irrigated condition, FW varied between organs (root and shoot) and plants analyzed. For example, root FW appeared similar for WT and transformed events n°54, 56 and 60 but was higher for transformed events n°62. Regarding shoot FW, no significant differences were observed between all plants analyzed.

Altogether, these preliminary results

- Showed that the *CcUNK8* gene was expressed to different levels in all T_0 events of *S. viridis*,
- Identified T_2 transformed events (e.g. n°62) of *S. viridis* presenting higher FW biomass compared to untransformed (WT) plants.

This phenotype could be directly related to *CcUNK8* gene expression levels measured in transformed *S. viridis*. In order to verify such a possibility, new experiments of water suspension using more uniformed plant materials are currently on-going.

References

- BRUTNELL, T. P.; WANG, L.; SWARTWOOD, K.; GOLDSCHMIDT, A.; JACKSON, D.; ZHU, X.; KELLOGG, E.; VAN ECK, J. *Setaria viridis*: a model for C4 photosynthesis. **Plant Cell**, Rockville, v. 22, n. 8, p. 2537-2544, 2010.
- SAVAGE N. Fuel options: the ideal biofuel. **Nature**, London, v. 474, n. 7352, p. S9-S11, 2011.
- TAUTZ, D.; DOMAZET-LOŠO, T. The evolutionary origin of orphan genes. **Nature Reviews Genetics**, London, v. 12, n. 10, p. 692-702, 2011.

The background features a gradient of warm colors, transitioning from a light beige at the top to a deeper orange at the bottom. Large, white, organic shapes resembling liquid droplets or cells are scattered across the frame, creating a dynamic and scientific aesthetic.

BIOTECNOLOGIA MICROBIANA

Engenharia metabólica de *Saccharomyces cerevisiae* para aproveitamento de xilose na produção de etanol lignocelulósico

Bárbara G. Paes^{1,2}, Larissa M. Lima¹, João Ricardo M. Almeida¹

Introdução

O crescimento da demanda energética e preocupação com o meio ambiente têm impulsionado buscas por fontes de energia sustentáveis e comercialmente competitivas. Para aumentar a produção de bioetanol, a fermentação dos açúcares presentes na biomassa lignocelulósica tem sido proposta. Entretanto, a levedura *Saccharomyces cerevisiae*, utilizada na produção industrial de etanol, é incapaz de fermentar todos os açúcares presentes em hidrolisados lignocelulósicos (VAN MARIS et al., 2007), incluindo a xilose, o açúcar mais abundante na hemicelulose de várias biomassas (ALMEIDA et al., 2011). Afim de solucionar estes problemas, estratégias para desenvolvimento de linhagens recombinantes de *S. cerevisiae* capazes de fermentar xilose vem sendo desenvolvidas pela expressão de enzimas de vias catabólicas para este açúcar (VAN MARIS et al., 2007). Neste trabalho, a xilose isomerase de *Piromyces* sp. foi utilizada para a construção de linhagens recombinantes laboratoriais de *S. cerevisiae*. Posteriormente, engenharia evolutiva foi realizada para o melhoramento genético das linhagens construídas. As linhagens obtidas estão sendo caracterizadas fisiologicamente. Paralelamente, a identificação e caracterização de novos genes codificadores de xilose isomerase (XI) estão sendo realizadas.

Métodos

O gene de *Piromyces* foi amplificado com os primers e plasmídeo descritos no artigo de Kuyper, 2008 (KUYPER et al., 2003). O gene foi clonado no plasmídeo multicópia p424 [4] sob expressão do promotor GPD. Também foi construído um plasmídeo multicópia p426 [4] contendo o gene endógeno de xiluloquinase (XK). Os plasmídeos foram utilizados de forma combinada ou isolada para transformar duas linhagens de *S. cerevisiae* industrial: CEN.PK 113.C (Levedura 2) e CEN.PK 113-14A (Levedura 7), gerando as linhagens: L2XI-*Piro* (CEN.PK 113.C + p424-XI-*Piromyces*), L7XIΦ-*Piro* (CEN.PK 113.14A + p424-XI-*Piromyces* + p426), e L7XIXK-*Piro* (CEN.PK 113-14A + p424-XI-*Piromyces* + p426-XK). Os transformantes obtidos foram selecionados e submetidos a evolução adaptativa, que consiste da

¹ Embrapa Agroenergia, Parque Estação Biológica, Brasília/DF, Brasil, 70770-901; *barbara.paes@colaborador.embrapa.br.

² Programa de Pós – Graduação em Biologia Molecular – Departamento de Biologia Celular, Universidade de Brasília – UnB, Brasília/DF, Brasil, 70910-900

fermentação contínua das linhagens, fazendo transferência sucessiva em meio mínimo seletivo (YNB+Xilose).

Paralelamente foram identificadas através de alinhamento em banco de dados, diferentes genes codificadores de xilose isomerase. Os genes, sintetizados pela Life Technology, foram clonados no mesmo vetor (MUMBERG et al., 1994) escolhido para expressão de XI-*Piromyces*. A levedura laboratorial CEN.PK 113.C foi transformada e clones positivos isolados.

Resultados e Conclusões

Linhagens recombinantes de *S. cerevisiae* capazes de consumir xilose foram obtidas pela expressão da enzima XI de *Piromyces*. Conjuntamente, ou não, com XK. Estratégias de evolução adaptativa permitiram o melhoramento genético das linhagens, as quais apresentaram diferença de crescimento mais de quatro vezes maior que as originais (sem condicionamento).

Novos genes codificadores para xilose isomerase foram identificados através de análises filogenéticas. Estes foram utilizados para construção de linhagens recombinantes de *S. cerevisiae*. As linhagens geradas estão sendo caracterizadas fisiologicamente considerando taxa de crescimento e capacidade de consumir xilose.

Apoio Financeiro

EMBRAPA, CNPq e CAPES - Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior apoia este projeto através da bolsa de pós-graduação.

Referências

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

KUYPER, M.; HARHANGI, H.; STAVE, A.; WINKLER, A.; JETTEN, 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.

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

VAN MARIS, A. J. A.; WINKLER, A. A.; KUYPER, M.; DE LAAT, W. T. A. M.; VAN DIJKEN, J. P.; PRONK, J. T. Development of efficient xylose fermentation in *Saccharomyces cerevisiae*: xylose isomerase as a key component. **Advances in Biochemical Engineering**, Berlin, v. 108, p. 179-204, 2007.

Biologia de sistemas para estudo comparativo de leveduras fermentadoras de xilose e produção de etanol de segunda geração

henrique C. T. Veras^{1,2*}, Nádia S. Parachin^{2,3}, Gabriel R. Fernandes³; João Ricardo M. de Almeida¹

Introdução

O etanol resultante de biomassa lignocelulósica é uma das opções para obtenção de energia renovável (JEFFRIES, 2006). Cepas de leveduras, que são amplamente utilizadas na indústria do bioetanol, têm diferentes capacidades metabólicas para converter açúcares derivados da biomassa em etanol. A espécie *Saccharomyces cerevisiae*, a principal levedura utilizada nesse bioprocesso, apresenta preferência por açúcares hexoses, principalmente glicose (ALMEIDA et al., 2011). Assim, é especialmente desejado, a identificação e/ou modificação de leveduras que realizem fermentação de xilose, a pentose mais abundante presente na biomassa lignocelulósica, segunda maior fonte de carboidrato do planeta (SASSNER; ZACCHI, 2008). Logo, a fermentação de xilose tem importância tanto para aumentar a quantidade de etanol produzido, diminuir os resíduos da agricultura, bem como os custos de sua produção. Desta forma, a detecção de diferentes características fisiológicas e moleculares relacionados ao metabolismo deste açúcar em diferentes leveduras é de grande relevância. No entanto, ainda necessitamos controlar as condições de aerobiose, visto que a produtividade e o rendimento são consideravelmente maiores em condições anaeróbicas (HOU, 2012). Isso pode nos fornecer alvos para o melhoramento genético de linhagens e processos fermentativos. Assim, nosso objetivo é avaliar a capacidade de produtividade e rendimento de etanol a partir das fermentações realizadas por diferentes leveduras utilizando xilose como fonte de carbono.

Métodos

As leveduras *Scheffersomyces stipitis*; *Spathaspora passalidarum*; *Spathaspora arborariae* e *Candida tenuis* foram cultivadas em meio mínimo concentrado 2.5X, suplementado com xilose 40g/L e mantidas sob condições de aerobiose e microaerobiose a fim de investigar os efeitos exercidos sobre as características fisiológicas e moleculares das mesmas. Os experimentos foram iniciados com OD600 (Optical Density) inicial de 0,5 – 1,0. As culturas foram mantidas em agitação (180 rpm) e temperatura (28° C) constante, e em intervalos regulares foram coletadas amostras para monitoramento do crescimento e quantificação

¹ Embrapa Agroenergia – Parque Estação Biológica, Brasília/DF, Brasil, 70.770-901; *henrique.veras@colaborador.embrapa.br

² Universidade de Brasília – UnB, Campus Darcy Ribeiro, IB – PPGBIOMOL, 70.000-000;

³ Universidade Católica de Brasília – UCB, Campus Asa Norte, Brasília/DF, Brasil, 70.790-160;

por HPLC dos compostos consumidos e produzidos pelas leveduras. Além disso, durante a fase exponencial de crescimento das leveduras, foram coletadas amostras para extração de RNA e avaliação das atividades enzimáticas envolvidas no catabolismo de xilose. Paralelamente, as vias metabólicas das leveduras estudadas foram montadas a partir dos genomas que estão disponíveis na base de dados (KEGG) e visualizadas através da ferramenta IPATH. Os dados obtidos a partir destes experimentos estão sendo analisados integradamente por estratégias de biologia de sistemas com intuito de corroborar as vias metabólicas montadas a partir dos genomas e construção de modelos matemáticos de fluxos metabólicos visando a otimização do catabolismo de xilose até a produção de etanol.

Resultados e Conclusões

Comparado com os cultivos aeróbicos que apresentaram OD final entre 15 – 20, os bioprocessos em condições microaeróbicas apresentaram OD de 3 a 4 vezes menor. Os resultados observados com menor taxa de crescimento, obtiveram maior formação de etanol e foram vistos principalmente nas leveduras *S. stipitis* e *S. passalidarum*. A montagem das vias metabólicas conforme a base de dados KEGG, demonstrou que a levedura *S. stipitis* apresenta enzimas diferenciadas das demais leveduras analisadas. Isto pode explicar a maior adaptabilidade dessa levedura nos bioprocessos fermentativos de xilose. No entanto, a *S. passalidarum* ainda apresenta as maiores taxas de crescimento e rendimento de etanol. Portanto, a construção de modelos de fluxo metabólicos que possibilite a identificação de novos alvos moleculares que possam ser utilizados em simulações *in silico* contribuirá para aumentar o consumo de xilose e favorecerá programas de melhoramento genético de leveduras para obtermos maior produtividade e rendimento de etanol.

Apoio Financeiro

EMBRAPA, CNPq, CAPES.

Referências

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

HOU, X. Anaerobic xylose fermentation by *Spathaspora passalidarum*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, New York, v. 94, n. 1, p. 205-214, 2012.

JEFFRIES, T. W. Engineering yeasts for xylose metabolism. **Current Opinion in Biotechnology**, London, v. 17, n. 3, p. 320-326, 2006.

SASSNER, P.; ZACCHI, G. Integration options for high energy efficiency and improved economics in a wood-to-ethanol process. **Biotechnology for Biofuels**, London, v. 1, n. 4, 2008.

Caracterização de espécies selvagens de leveduras consumidoras de xilose para a produção de etanol de segunda geração por espectrometria de massa MALDI-TOF.

Carlos E. V. F. Soares^{1,2}; João R. M. Almeida¹. Beatriz S. Magalhães².

Introdução

Estudos com leveduras capazes de fermentar xilose são importantes para produção de etanol a partir da lignocelulose. A xilose é o segundo açúcar mais abundante na biomassa vegetal e pode corresponder a mais de 30% dos açúcares presentes, p. ex. no bagaço de cana de açúcar. Desta forma, a identificação de novas espécies de leveduras capazes de fermentar xilose permitiria o aumento da produção de etanol sem o aumento da área plantada. O objetivo deste trabalho é desenvolver metodologia para identificação rápida de leveduras selvagens capazes de fermentar xilose. Para tanto, um banco de dados de perfis de proteínas destas leveduras será construído por espectrometria de massa MALDI-TOF.

Metodologia

Para a construção do banco de dados de perfis proteicos de referência foram utilizadas cinco leveduras controles consumidoras de xilose, *Pichia stipitis*, *Merezozyma guilliermondii*, *Candida tenuis*, *Spathaspora arborariae* e *Spathaspora passalidarum*. Os perfis proteicos foram extraídos de leveduras cultivadas em meios de cultura líquido e sólido YPX (400 mL de meio de cultura para uma concentração final de 20g/L, extrato de levedura 4g, xilose 8g, peptona bacteriológico 8 g e ágar bacteriológico 8g) e YPD (400 mL de meio de cultura para uma concentração final de 20g/L, extrato de levedura 4g, glicose 8g, peptona bacteriológico 8g, ágar bacteriológico 8g), utilizando como reagente de extração (1:1) ácido fórmico 70% e acetonitrila 100%. Para cada levedura foi adquirido um total de 24 espectros de massa brutos. Os espectros foram adquiridos no equipamento Bruker Daltonics modelo Autoflex Speed MALDI-TOF e o banco de dados foi criado utilizando o programa Biotyper system 3.0 (Bruker Daltonics). Os resultados de identificação obtidos por MALDI-TOF foram comparados com resultados obtidos por sequenciamento de DNA ribossomal (DNAr) realizados no laboratório de sequenciamento da Universidade Católica de Brasília.

¹ Embrapa Agroenergia, Parque Estação Biológica, Brasília/DF, Brasil, 70770-901; *carlos.soares@colaborador.embrapa.br

² Universidade Católica de Brasília, Campus II SGAN 916 Av. W5 Norte, Brasília/DF, Brasil, 70790-160.

Resultados e Conclusões

O uso de espectrometria de massa MALDI-TOF para identificação e diferenciação de novas espécies de leveduras, por meio de aquisição do seu perfil de proteínas, foi possível. Os resultados obtidos com MALDI-TOF foram comparados com as árvores filogenéticas gerados a partir das sequências de DNAr 18S, demonstraram que as leveduras selvagens apresentam semelhanças fisiológicas quanto à produção de xilitol e capazes de fermentar xilose como as leveduras já conhecidas, indicando proximidade taxonômica. Além disso, foi confirmado que a aquisição de espectros de proteína adquiridos de leveduras crescidas em meio líquido também são identificados pelo banco de dados criado com o perfil obtido de meio sólido, validando a metodologia para a extração de proteínas em meio líquido.

Apoio Financeiro

EMBRAPA, FAP-DF, CAPES (Bolsa de Mestrado).

Referências

AUGUSTINI, B. C.; SILVA, L. P.; BLOCH JUNIOR, B. C.; BONFIM, T. M. B.; SILVA, G. A. Evaluation of MALDI-TOF mass spectrometry for identification of environmental yeast and development of supplementary database. **Applied Microbiology and Biotechnology**, New York, v. 98, n. 12, p. 5645-5654, 2014.

BASSO, L. C.; AMORIM, H. V.; OLIVEIRA, A. J.; LOPES, M. L. Yeast selection for fuel ethanol production in Brazil. **FEMS Yeast Research**, Malden, v. 8, n. 7, p. 1155-1163, 2008.

BIER, M. C.; MARANHO, L. T.; AZEVEDO, J. A. M.; SILVA JUNIOR, L. Crescimento e Consumo de Xilose de *Candida guilliermondii* na fermentação submersa utilizando-se bagaço de cana-de-açúcar. **Evidência**, Joaçaba, v. 7, n. 2, p. 119-130, 2007.

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

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

Introdução

Jatropha curcas (pinhão-manso) é uma oleaginosa promissora para produção de biodiesel, devido ao alto rendimento de óleo pela semente e adaptação a diversos tipos de solos e fatores ambientais. O resíduo gerado após a extração mecânica do óleo é chamado de torta (MENDONÇA; LAVIOLA, 2009), que tem em sua constituição fibras lignocelulosicas, proteínas (46-63%), lipídeos, carboidratos solúveis e minerais¹. A composição da torta de pinhão-manso torna este coproduto um potencial candidato para ser usado como suplementação animal, adubo orgânico e/ou insumo para produção de etanol de segunda geração (celulósico). Dentre estas possibilidades, a aplicação que combina maior valor agregado e menor custo é a produção de insumos para ração animal; no entanto, faz-se necessária a inativação de compostos tóxicos e fatores antinutricionais que estão presentes nesta biomassa vegetal. Os ésteres de forbol são os principais componentes tóxicos neste coproduto, cujos efeitos biológicos em animais dependem da estrutura molecular, podendo induzir respostas inflamatórias agudas e a formação de tumores (MENDONÇA; RIBEIRO, 2013). Diversas estratégias químicas ou biológicas tem sido abordadas na tentativa de destoxificação da torta de pinhão-manso, com sucesso limitado em alguns casos³. Estudo prévios utilizando-se basidiomicetos em meio axênico indicaram grande potencial na produção de cogumelo comestível, associado à destoxificação do substrato (MENDONÇA; RIBEIRO, 2013). A produção e consumo de macromicetos (cogumelos) cresce a cada ano em nosso país, de forma que a possibilidade de integração desta cadeia de alimentos, com a utilização de um coproduto da cadeia do biodiesel e o uso do substrato pós-cultivo na cadeia de ração animal, torna esta solução tecnológica muito atrativa.

1 Embrapa Agroenergia, Brasília-DF, Brasil;

2 Embrapa Florestas, Colombo-PR, Brasil; Mestrado em Biotecnologia, Universidade Federal do Tocantins, Gurupi Brasil; *taisa.gomes@colaborador.embrapa.br

Métodos

A coleção de basidiomicetos utilizados nesse trabalho foi cedida pela Embrapa Florestas (Colombo-PR). O *screening* inicial do fungo foi realizado utilizando-se um meio de cultura à base de torta de pinhão-manso (ágar-ágar+ torta de PM 5 %). O crescimento micelial foi medido a cada 24 h. Os fungos selecionados foram inoculados em 100 g de torta de pinhão-manso com umidade de 60 %. As amostras foram autoclavadas durante 1 h a 121 °C. Inoculou-se uma placa completa de micélio de cada fungo e o cultivo durou 30 dias em estufa a 26 ± 2 °C. Após o término do período de cultivo o éster de forbol foi extraído das biomassas e analisado seguindo o protocolo desenvolvido na Embrapa Agroenergia². A partir desse resultado, o fungo mais efetivo na destoxificação foi cultivado em formulações contendo 80% de torta de pinhão-manso e resíduos lignocelulósicos (bagaço de cana, capim elefante, casca PM, serragem, pós cultivo *L. edodes*), com 60 % de umidade, em sacos de polipropileno. Os sacos foram autoclavados durante 2 horas a 121 °C, e inoculou-se 10 g de *spawn*. O cultivo durou 60 dias, 30 dias em temperatura ambiente e 30 dias em estufa climatizada (etapa de frutificação). Realizou-se a extração e quantificação dos ésteres de forbol no resíduo pós-cultivo (Spent Mushroom Substrate) e nos cogumelos produzidos.

Resultados e Conclusões

O screening inicial dos fungos em meio de cultura à base de pinhão-manso foi muito eficiente. A cepa EF-87 reduziu em 94 % a concentração de éster de forbol, após 30 dias de cultivo. Após 60 dias de cultivo, esta mesma cepa reduziu 99,5% da concentração inicial de ésteres de forbol da formulação torta PM + bagaço de cana. O corpo de frutificação gerado nesse substrato não apresentou nenhuma presença desse composto. Os resultados obtidos até o presente momento são promissores, mostrando ser possível eliminar o componente tóxico desse substrato, juntamente com a produção viável de cogumelos comestíveis. Experimentos biológicos e bromatológicos serão efetuados para confirmar a segurança alimentar do cogumelo e do resíduo pós-cultivo.

Apoio Financeiro

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

Referências

MENDONÇA, S.; RIBERIO J. A. A. Desafios na destoxificação da torta de pinhão-manso In: RODRIGUES, C.; ABDELNUR, P.V. (Ed.) **Destoxificação e aproveitamento das tortas de pinhão-manso e mamona**: perspectivas em pesquisa, desenvolvimento e inovação. Brasília, DF, Embrapa Agroenergia, 2013. p. 95-124,

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

Macrofungos como agentes desconstrutores e detoxificadores de torta de caroço de algodão – Resultados esperados.

Ana Paula Fernandes Araujo*¹; Taisa Godoy Gomes^{1,2}; Antony Enis Virgínio Machado¹; Thaís Danielle Duarte Santana¹; José Antônio de Aquino Ribeiro¹; Raquel Bombarda Campanha¹; Simone Mendonça¹; Felix Gonçalves de Siqueira¹.

Introdução

O algodoeiro (*Gossypium* spp) é cultivado para produção de fibra e óleo, após a extração destes produtos são gerados alguns subprodutos como torta ou farelo do caroço de algodão. A disponibilidade do caroço e do farelo de algodão no mercado produtor, seu valor energético, proteico e o baixo preço, têm estimulado pecuaristas a adotarem sua utilização na alimentação animal. No entanto, um fator limitante da utilização desses subprodutos na alimentação de animais é a presença do gossipol composto antinutricional. O gossipol é altamente tóxico para animais monogástricos, enquanto que ruminantes toleram níveis mais altos. Os efeitos do gossipol são cumulativos, e podem surgir abruptamente após um período variável de ingestão. Atualmente, a torta e o farelo de algodão são comercializados apenas para ruminantes (gado de confinamento). Os macrofungos são microrganismos que formam corpo de frutificação (basidiomicetos e algumas espécies de ascomicetos). Estes microrganismos são encontrados na natureza degradando matéria orgânica, apresentando assim um arsenal enzimático capaz de desconstruir parte ou toda a parede celular vegetal (celulose, hemicelulose e lignina). Os macrofungos tem sido aplicados em diversos setores industriais, como alimentação, bioremediação, produtores de enzimas. Deste modo este trabalho tem como objetivo avaliar o potencial de alguns macrofungos (coleção da Embrapa Cenargen e Florestas) como agentes desconstrutores (enzimas) e detoxificadores das tortas e farelo de algodão (ABDURAKHIMOV et al. 2009; CHEEKE, 1998; KONG et al., 2010; MCCAUGHEY et al., 2005; ROMERO, 2013).

Métodos

O plano de trabalho prevê a triagem de pelos menos 50 macrofungos cultivados em meio agar-torta de algodão, onde será mensurado o crescimento micelial em cm/dia. Após esta etapa serão feitos cultivos em sacolas de polipropileno (método axenico) contendo misturas de torta de algodão (80%) com outras fontes lignocelulósicas (bagaço de cana, capim

1 Embrapa Agroenergia, Parque Estação Biológica, Brasília/DF, Brasil, 70770-901; Mestranda em Biotecnologia

2 Universidade Federal do Tocantins2, Gurupi/TO; *anapaula.araujo@colaborador.embrapa.br

andropgnon, resíduo do beneficiamento de algodão), onde serão avaliados a produção de cogumelos e os teores de gossipol após o crescimento micelial e frutificação dos macrofungos (tratamento biológico), tanto na biomassa pós-cultivo (*spent mushroom substrate* - SMS) como também no corpo de frutificação. Nas espécies que foram selecionadas serão feitos testes utilizando a metodologia de preparo de substratos (meio de cultivo) por compostagem e pasteurização a vapor. Serão avaliados também as atividades enzimáticas (celulases, hemicelulases, oxidases, fitases, lipases e esterases no SMS). Serão feitas as análises centesimais do SMS antes e depois do tratamento biológico, como também o tratamento hidrotermal (físico) do SMS como matéria-prima para hidrólise enzimática e obtenção de açúcares solúveis. Um dos planos de ações prevê testes em animais (artemia, ratos e aves/suínos) para os agentes que se mostrarem promissores.

Resultados e Conclusões

Os resultados preliminares mostram que os macrofungos CC-403, CC-351, CC-353, CC-348 e CC-389 quando cultivados em ágar-torta de algodão apresentaram média de crescimento micelial de 2,13 (cm/dia). Deste modo estes macrofungos serão submetidos a fase de crescimento em substratos combinados (lignocelulosicos), avaliando desde a ausência do gossipol como também a produtividade, eficiência biológica e atividades enzimáticas. Faz-se importante salientar que a maioria dos macrofungos ainda estão sendo transferidos pelas empresas parceiras.

Apoio Financeiro

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

Referências

- ABDURAKHIMOV R. S.; VESHKUROVA, O. N.; UZBEKOV, V. V.; ARZANOVA, I. A.; SULTANOVA, E. M.; SALIKHOV, S. H. I. Effect of cotton-seed biocidal peptides and gossypol on resistance to biotic factors. **Chemistry of Natural Compounds**, Berlim v. 45, p. 213-216, 2009.
- CHEEKE P. R. **Natural toxicans in feeds, forages, and poisonous plants**. 2.ed. Danville: Interstate Publishers, 1998. p. 479.
- KONG, G.; DAUD, M. K.; ZHU, S. Effects of pigment glands and gossypol on growth, development and insecticide-resistance of cotton bollworm (*Heliothis armigera* (Hübner)). **Crop Protec**, Filadélfia v. 29, p.813-819, 2010.
- MCCAUGHEY, K. M.; DEPETERS, E. J.; ROBINSON, P. H.; SANTOS, J. E. P.; PAREAS, J. W.; TAYLOR, S. J. Impact of feeding whole Upland cottonseed, with or without cracked Pima cottonseed with increasing addition of iron sulfate, on productivity and plasma gossypol of lactating dairy cattle. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 122, p. 241-256, 2005.
- ROMERO, A. C. Resíduos da produção de biodiesel: **Avaliação de moléculas bioativas e potencial de aplicação na alimentação animal**. 2013. 115 f. Tese (Doutorado) - Universidade de São Paulo, Piracicaba, SP.

Isolamento e seleção de microalgas para o cultivo em vinhaça

Hugo Santana¹, Patricia Portela De Medeiros Brunale²; Maiara Fernandes³; Samed Ibrahim Isa Abdel Hadi³, Carolina Ribero Cereijo³, Bruno Brasil²

Introdução

Microalgas são uma promissora fonte para a produção de biocombustíveis e podem ser cultivadas usando águas residuais e a emissão de CO₂ de plantas industriais (PEREZ-GARCIA et al., 2011). Considerando essa característica, microalgas podem ser utilizadas em um modelo de biorrefinaria para a produção de biocombustíveis associada à produção de outros bioprodutos como pigmentos, ração animal e fertilizante (STEPHENS et al., 2010). Esta estratégia poderia ser aplicada a uma planta industrial usando a vinhaça e o CO₂ produzido na destilação do etanol. A vinhaça, em especial, é um resíduo da destilação de etanol que não pode ser descartado diretamente no meio ambiente. Existem alguns estudos sobre o pré-tratamento da vinhaça por meio de clarificação ou de biodigestão anaeróbica com o objetivo de favorecer o crescimento de microalgas (RAZZAK et al., 2013). No entanto, não há relatos de pesquisas objetivando a seleção e a adaptação de cepas de microalgas para crescimento em vinhaça não-tratada (*in natura*). O objetivo deste trabalho foi coletar microalgas de diferentes biomas brasileiros, selecionar cepas viáveis para o cultivo em vinhaça e avaliar a produtividade de biomassa das cepas com melhor resultado no cultivo.

Métodos

Para a prospecção de microalgas, foram coletadas amostras nos biomas Cerrado e Amazônia, e também de águas residuais (áreas de aplicação de vinhaça e lagoa de estabilização de esgoto rural). As amostras foram centrifugadas, o sobrenadante descartado e o precipitado cultivado nos meios quimicamente definidos BBM e BG-11 com pH 7.1 a 28°C com fotoperíodo de 16 horas de luz e 8 horas de escuro por 20 dias. Após esse período, as amostras foram semeadas por esgotamento em placas de petri com meio ágar-BBM ou ágar-BG-11 nas mesmas condições. Após 20 dias, colônias isoladas de microalgas foram coletadas e cultivadas em meio líquido até a ocorrência de turvação. Para triagem e seleção de cepas de microalgas capazes de crescer em vinhaça *in natura*, duas estratégias paralelas foram utilizadas. I) Cultivo em meio sólido com gradiente linear de ágar-vinhaça (0-100%); II) Cultivo em vinhaça líquido. Nesta segunda abordagem, as mesmas cepas foram cultivadas

¹ Universidade Federal da Bahia, Vitória da Conquista- BA- Brasil;

² Embrapa, Brasília- DF- Brasil;

³ Universidade Federal do Tocantins, Gurupi- TO- Brasil.

em 25%, 50% e 75% de vinhaça diluída em água destilada em frascos aerados com ar atmosférico (5L/h), fotoperíodo com 18h claro e 6h escuro a 30°C. As cepas que apresentaram crescimento foram selecionadas e cultivadas em frascos aerados, nas mesmas condições anteriores, por 8 dias em vinhaça *in natura* e também em BBM, para comparação. Para análise da produtividade, alíquotas do cultivo foram coletadas em triplicata, centrifugadas a 10600 RCF e lavadas em água destilada. Do volume final avaliou-se a produção de biomassa por pesagem de biomassa seca.

Resultados e Conclusões

Foi possível obter 40 cepas isoladas de microalgas, as quais foram depositadas na coleção de microrganismos da EMBRAPA Agroenergia. Na primeira estratégia, foi selecionada uma cepa, LBA8, a qual apresentou crescimento em toda a superfície da placa de petri. Na segunda estratégia, foi possível selecionar quatro cepas capazes de crescer em vinhaça a 75% de concentração: LBA8, LBA32, LBA39 e LBA40. Todas as quatro cepas foram identificadas como algas verdes (*Chlorophyta*), sendo as cepas LBA8 e LBA40 pertencentes ao gênero *Chlamydomonas*, a cepa LBA39 ao gênero *Chlorella* e a cepa LBA32 ao gênero *Acrochasma*. As quatro cepas selecionadas foram cultivadas em vinhaça *in natura* e em BBM, paralelamente, apresentando as seguintes produtividades diárias e produtividade de biomassa, respectivamente: I) Meio BBM: LBA8 - 141.90 mg.d⁻¹.L⁻¹/0.99 g.L⁻¹; LBA32 - 168.57 mg.d⁻¹.L⁻¹/1.18 g.L⁻¹; LBA39 - 140.00 mg.d⁻¹.L⁻¹/0.98 g.L⁻¹; LBA40 168.57 mg.d⁻¹.L⁻¹/1.18 g.L⁻¹. II) Cultivo em vinhaça: LBA8 - 375.20 mg.d⁻¹.L⁻¹/2.62 g.L⁻¹; LBA32 - 443.30 mg.d⁻¹.L⁻¹/3.10 g.L⁻¹; LBA39 - 358.18 mg.d⁻¹.L⁻¹/2.51 g.L⁻¹; LBA40 - 359.54 mg.d⁻¹.L⁻¹/2.51 g.L⁻¹. Esses dados sugerem que microalgas podem ser cultivadas em vinhaça *in natura* e alcançam produtividades ainda maiores que aquelas obtidas em meio sintético. Com isso, o uso desse resíduo pode ser uma estratégia viável para produção de biomassa a partir de microalgas.

Referências

- PEREZ-GARCIA, O.; ESCALANTE, F. M.; DE-BASHAN, L. E.; BASHAN, Y. Heterotrophic cultures of microalgae: metabolism and potential products. **Water Research**, Kidlington, v. 45, n. 1, p. 11-36, 2011.
- RAZZAK, S. A.; HOSSAIN, M. M.; LUCKY, R. A.; BASSI, A. S.; DE LASA, H. Integrated CO2 capture, wastewater treatment and biofuel production by microalgae culturing - a review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, Oxford, v. 27, p. 622-653, 2013.
- STEPHENS, E.; ROSS, I. L.; MUSSGNUM, J. H.; WAGNER, L. D.; BOROWITZKA, M. A.; POSTEN, C.; KRUSE, O.; HANKAMER, B. Future prospects of microalgal biofuel production systems. **Trends in Plant Science**, London, v. 15, n. 10, p. 554-564, 2010.

Identificação molecular de microalgas utilizando marcador ITS-2

Sámed I. I. A. Hadi^{1*}, Patrícia P. M. Brunale², Hugo Santana³, Bruno S. A. F. Brasil²

Introdução

As microalgas são organismos fotossintetizantes com estrutura celular procariótica ou eucariótica que contribuem com aproximadamente 40% do oxigênio da atmosfera. Estes organismos vêm sendo amplamente estudados por apresentarem características únicas (altas taxas de conversão solar através da fotossíntese, grande capacidade de assimilação de CO₂), possíveis soluções ambientais (produção de energia, biorremediação, plásticos biodegradáveis) e uma enorme quantidade de produtos exploráveis, tais como alimentos, compostos nutricionais, fertilizantes orgânicos, proteínas recombinantes, pigmentos, medicamentos, entre outros (GOUVEIA, 2011). Muitas microalgas possuem poucas características morfológicas úteis para identificação taxonômica tradicional, desta forma a identificação molecular se torna uma poderosa ferramenta para a discriminação de espécies microalgais (EBENEZER; MEDLIN, 2012; RADHA et al., 2013). O sequenciamento da região ITS (*Internal Transcribed Spacer*), região não-codificadora do rDNA, pode ser utilizado para este propósito. A região ITS-2 está localizada entre os genes 5.8S e 28S e possui uma taxa de evolução mais rápida que as regiões codificadoras, resultando em uma maior variação intraespecífica e possibilitando o uso desta região na taxonomia de espécies e gêneros. O processo de identificação dos organismos em pesquisa é pré-requisito básico para o planejamento e desenvolvimento de todas as atividades posteriores.

Métodos

As amostras microalgais foram coletadas em diversos ambientes aquáticos brasileiros localizados em áreas de Cerrado (Brasília/DF) e Amazônia (Belém/PA), bem como em áreas de descarte de efluentes agroindustriais (Goianésia/GO) e esgoto rural (Concórdia/SC). A partir destas amostras, foram isoladas 40 cepas que estão sendo mantidas em meios de cultivo sintéticos na Coleção de Microrganismos da Embrapa Agroenergia. Para identificação molecular, 30 mg de biomassa algal fresca foram submetidos à extração de DNA contendo o detergente brometo de cetil-trimetilamônio (CTAB), seguido de amplificação e sequenciamento da região ITS-2. A reação de PCR foi realizada utilizando um par de *primers*

¹ Programa de pós-graduação em Biotecnologia, Universidade Federal do Tocantins (Gurupi/TO). *samed.hadid@colaborador.embrapa.br

² Embrapa Agroenergia - Brasília/DF

³ Programa de pós-graduação em Biociências, Universidade Federal da Bahia (Vitória da Conquista/BA)

(IDT) sintetizados para amplificar a região ITS-2 (*Fw_ITS2*: 5' – AGG AGA AGT CGT AAC AAG GT – 3'; *Rv_ITS2*: 5' – TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC – 3'). Após visualização dos fragmentos de DNA em gel de agarose corado com brometo de etídio, os produtos da PCR foram sequenciados bidirecionalmente por eletroforese capilar em equipamento ABI3130 (Life Technologies), utilizando kit BigDye v3.1 (Life Technologies) de acordo com instruções do fabricante. A identificação molecular de espécies foi obtida por meio da comparação das sequências obtidas com aquelas depositadas no GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank).

Resultados e Conclusões

Das 40 cepas, 6 obtiveram um sequenciamento de baixa qualidade (>20% da sequência com valor de Phred (QV) < 20) e não foram incluídas nas análises posteriores. Nas 34 amostras restantes, o fragmento amplificado variou de 534 a 888 pares de bases, e a porcentagem média de bases com alta qualidade no eletroferograma foi de 84,41%. Cada sequência foi comparada com o banco de dados GenBank através da ferramenta BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*). A identidade das sequências variou de 85 a 100%, com os gêneros mais frequentes sendo *Chlorococcum*, *Desmodesmus*, *Chlorella* e *Chlamydomonas*. Com auxílio do programa MEGA (*Molecular Evolutionary Genetics Analysis*) [4], foi construída uma árvore filogenética através do método *Neighbor-Joining*, utilizando um *Bootstrap* com 1000 réplicas e o modelo Kimura-2-parâmetros. As 34 cepas apresentaram 20 genótipos diferentes segundo a análise das sequências. Apenas 12 sequências obtiveram similaridade alta (>98%) com sequências depositadas no GenBank. Embora sejam amplamente utilizadas como marcadores para identificação de fungos, as regiões ITS ainda são pouco empregadas na identificação de microalgas, diminuindo assim a resolução deste marcador nestes organismos, contudo, os resultados obtidos demonstram que é possível usá-las para taxonomia de espécies e gêneros.

Apoio Financeiro

Embrapa (SEG: 02.12.11.001.00.00/ALGAVIN) e CAPES.

Referências

EBENEZER, V.; MEDLIN, L. K.; KI, J. S. Molecular detection, quantification, and diversity evaluation of microalgae. **Marine Biotechnology**, New York, v. 14, n. 2, p. 129-142, 2012.

GOUVEIA, L. **Microalgae as a feedstock for biofuels**. Berlin: Springer-Verlag, 2011. (SpringerBriefs in Microbiology, 68).

RADHA, S.; FATHIMA, A. A.; IYAPPAN, S.; RAMYA, M. Direct colony PCR for rapid identification of varied microalgae from freshwater environment. **Journal of Applied Phycology**, v. 25, n. 2, p. 609-613, 2013.

TAMURA K.; STECHER G.; PETERSON D.; FILIPSKI A.; KUMAR, S. MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. **Molecular Biology and Evolution**, Oxford, v. 30, n. 12, p. 2725-2729, 2013.

The background features a vertical gradient from light beige at the top to a deeper orange at the bottom. Overlaid on this are several large, white, organic, teardrop-shaped elements that vary in size and orientation, creating a modern, abstract aesthetic.

QUÍMICA ANALÍTICA

Novas abordagens em espectrometria de massas para análise direta de licores de cana-de-açúcar

Thays C. Carvalho^{1,*2}, Raquel B. Campanha¹, Paulo T. Garcia², Wendell K. T. Coltro², Clenilson M. Rodrigues¹, Patrícia V. Abdelnur¹, Boniek G. Vaz².

Introdução

O *Paper spray Ionization* (PSI) é uma fonte de ionização ambiente de espectrometria de massas que consiste na aplicação de alta voltagem na base de um papel triangular umedecido com solução do analito ou a própria amostra (ALBERICI et al., 2010). É um método novo, no qual é possível analisar desde pequenas moléculas até proteínas de maneira rápida, precisa, exata e com baixo custo (LIU et al., 2010). A aplicação do PSI vem aumentando em diversas áreas, porém não há registros na literatura sobre o uso deste versátil método de ionização no acompanhamento de processos de produção de biocombustíveis. A produção de etanol a partir de celulose, por exemplo, envolve várias etapas: pré-tratamento, hidrólise e fermentação (RIBEIRO et al., 2013). O pré-tratamento objetiva disponibilizar a celulose para etapa de hidrólise. Nesta etapa, no entanto, pode-se ocorrer a degradação da hemicelulose e lignina formando inibidores dos processos enzimáticos para as etapas posteriores, por exemplo, furfural e hidroximetilfurfural. Diversas pesquisas estão sendo conduzidas ultimamente com o objetivo de otimizar os processos de pré-tratamento evitando a produção de substâncias que possam vir atuar como inibidores dos processos de hidrólise enzimática e fermentação. Neste trabalho, abordamos o acompanhamento do pré-tratamento químico e da hidrólise química do bagaço de cana-de-açúcar por PSI-MS com objetivo de monitorar a formação ou não de inibidores e o perfil qualitativo de açúcares livres no licor.

Métodos

A fonte de PSI foi montada prendendo-se o papel em formato triangular (base e altura de 1 cm), a uma garra, do tipo jacaré, conectada a um fio ligado ao espectrômetro de massas LTQ XL (ThermoScientific, Bremen, Alemanha). Para otimização do método de PSI, avaliou-se: tipos de papel (papel cromatográfico 3mm e papel cromatográfico Grade 1); magnitude da voltagem do spray (2 a 5 kV); modificações no papel (construção de canal de parafina [4] e arredondamento das pontas laterais do triângulo). Após a otimização do método, foram analisados 10 µL de amostras de padrões de açúcares e licores de provenientes do processo de pré-tratamento e hidrólise de bagaço de cana-de-açúcar.

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

² Instituto de Química, Universidade Federal de Goiás, Campus Samambaia, Goiânia/GO, Brasil. *thays.carvalho@colaborador.embrapa.br,

Resultados e Conclusões

O papel cromatográfico 3MM foi o que apresentou os melhores resultados, fornecendo espectros com elevada relação sinal/ruído e elevada abundância absoluta dos analitos. Para alcançar estas características, o valor da voltagem aplicada no papel foi de 4 kV. A construção da barreira de parafina, forneceu um melhor desempenho analítico comparado ao papel com pontas arredondas e o sem modificações. A análise possibilitou a identificação de xilose, $[M + Na]^+ m/z$ 173, glicose $[M + Na]^+ m/z$ 203, furfural, $[M + Na]^+ m/z$ 119 e o hidroximetilfurfural $[M + Na]^+ m/z$ 149. A técnica PSI-MS demonstrou ser um método rápido, eficiente e confiável para a detecção de açúcares livres e inibidores (furfural e hidroximetilfurfural) em licores do processo de obtenção de etanol 2G.

Apoio Financeiro

CAPES, CNPQ, EMBRAPA

Referências

ALBERICI, R. M.; SIMAS, R. C.; SANVIDO, G. B.; ROMÃO, W.; LALLI, P. M.; BENASSI, M.; CUNHA, I. B. S.; ERBELIN, M. N. Ambient mass spectrometry: bringing MS into the “real world”. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, Heidelberg, v. 398, n. 1, p. 265–294, 2010.

GARCIA, P. T.; CARDOSO, T. M. G.; GARCIA, C. D.; CARRILHO, E.; COLTRO, W. K. T. A handheld stamping process to fabricate microfluidic paper-based analytical devices with chemically modified surface for clinical assays. **RSC Advances**, Cambs, v. 4, n. 71, p. 37637–37644, 2014.

LIU, J.; WANG, H.; MANICKE, N. E.; LIN, J. M.; COOKS, R. G.; OUYANG, Z. Development, characterization, and application of paper spray ionization. **Analytical Chemistry**, Washington, DC, v. 82, n. 6, p. 2463–2471, 2010.

RIBEIRO, M. A.; OIKAWA, H.; MORI, M. N.; NAPOLITANO, C. M.; DUARTE, C. L. Degradation mechanism of polysaccharides on irradiated sugarcane bagasse. **Radiation Physics and Chemistry**, Oxford, v. 84, p. 115–118, 2013.

Desenvolvimento de protocolo para análise metabolômica de leveduras fermentadoras de xilose

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

Introdução

A demanda por fontes sustentáveis e renováveis de energia, bem como a substituição de combustíveis fósseis tem estimulado diversos estudos para a produção de biocombustíveis a partir de biomassa lignocelulósica, como o etanol de segunda geração (2G). No entanto, um dos desafios na produção deste biocombustível está no desenvolvimento de tecnologias eficientes para conversão de xilose em etanol no processo de fermentação. Desta forma, a compreensão dos fatores metabólicos relacionados à fermentação deste açúcar é fundamental. Neste sentido, a tecnologia baseada em metabolômica mostra-se atraente, pois é capaz de identificar e quantificar metabólitos presentes em um sistema biológico (ZHOU et al., 2012). O objetivo deste trabalho foi desenvolver um protocolo de análise dos metabólitos relacionados à fermentação de xilose em leveduras, baseado em metabolômica. Estes resultados e aqueles provenientes de outras estratégias como transcriptômica e genômica permitirão a identificação de alvos moleculares a serem utilizados no melhoramento genético de leveduras.

Métodos

Para desenvolvimento do método analítico, foi realizada infusão direta no espectrômetro de massas (Xevo-TQD, Waters) de padrões de moléculas que compõem a via metabólica de fermentação da xilose, nos modos de ionização ESI(+) e ESI(-)-MS. Posteriormente, foi realizado o experimento de fragmentação (MS/MS), identificando-se os íons fragmentos majoritários de cada metabólito (BUESCHER et al., 2010). A partir destas informações determinaram-se as melhores condições para os experimentos de MRM (Multiple Reaction Monitoring). Dois métodos de separação baseados em UHPLC (Ultra-high Performance Liquid Chromatography) foram desenvolvidos: um método de cromatografia por pareamento iônico em fase reversa, utilizando uma coluna do tipo C18 com grupo polar embutido (HSS-T3, Waters); e outro método de cromatografia de interação hidrofílica (HILIC),

¹ Embrapa Agroenergia, Parque Estação Biológica, Brasília/DF, Brasil, 70770-901;

² Universidade de Brasília, Campus Universitário Darcy Ribeiro, Brasília/DF, Brasil, 70910-900; *camposgchristiane@gmail.com

utilizando uma coluna do tipo amida [2,4]. Amostras de duas espécies de leveduras *Pichia stipitis*. e *Spathaspora passalidarum*, foram testadas nos métodos desenvolvidos.

Resultados e Conclusões

Amostras de fermentações de xilose com as leveduras *P. stipitis* e *S. passalidarum* foram testadas utilizando os métodos desenvolvidos e 5 metabólitos foram detectados: xilose, xilulose, xilitol, ácido málico e glicose-6-fosfato. Estes métodos mostraram-se adequados para a análise dos metabólitos presentes na via de fermentação da xilose em leveduras. No entanto, uma otimização na etapa de preparo de amostra será necessária, pois pode haver degradação ou perda dos metabólitos extraídos das leveduras até a etapa de análise por UHPLC-MS/MS. Diferentes condições experimentais estão sendo testadas para as etapas do preparo da amostra, desde o *quenching* até a injeção no espectrômetro de massas, de modo a ter uma condição otimizada para a extração dos metabólitos das leveduras (BERGDAHL et al., 2012; PARK et al., 2012). Serão realizados experimentos de recuperação dos metabólitos na amostra, para verificar a robustez e eficiência do método de preparo e extração. Pode-se concluir que os métodos analíticos desenvolvidos são adequados para a análise desses metabólitos na via metabólica estudada.

Apoio Financeiro

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

Referências

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

BUESCHER, J. M.; MOCO, S.; SAUER, U.; ZAMBONI, N. Ultrahigh performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for fast and robust quantification of anionic and aromatic metabolites. **Analytical Chemistry**, Washington, DC, v. 82, n. 11, p. 4403-4412, 2010.

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

ZHOU, B.; XIAO, J. F.; TULI, L.; RESSOM, H. LC-MS based metabolomics. **Molecular BioSystems**, Cambs, v. 8, n. 2, p. 470-481, 2012.

An analytical platform based on Untargeted Metabolomics for leaves of oil palm

Luiz H. G. Vargas^{1,2*}, José A. A. Ribeiro¹, Daniel N. Sifuentes¹, Manoel T. S. Júnior¹, Clenilson M. Rodrigues¹, Patrícia V. Abdelnur^{1**}

Background

Elaeis guineensis (oil palm) is a crop with a great potential assisting Brazil to cope the growing demand of biodiesel. Palm oil has high oil production capacity, over 10 times more than soybean, and it could be cultivated over 30 million hectares in the country. Considering these characteristics, this crop becomes the main alternative for biodiesel production in regions where soybean cannot be cultivated (PALMAS ..., 2011). Many efforts have been made using OMICs approaches (especially genomics and transcriptomics) and molecular genetic strategies, to understand the biology of this crop, and to improve the efficiency of breeding programs. However, it is necessary to integrate the OMICs information (genomics, transcriptomics, proteomics and metabolomics) to establish a real and complete correlation of the crop biological processes (MOCHIDA; SHINOZAKI, 2011). Metabolomics was the last strategy introduced in this OMICs science, and it is defined as the technology geared towards providing an essentially unbiased, comprehensive qualitative and quantitative overview of the metabolites present in an organism (HALL, 2006). Since there is no detailed information about metabolites present on *Elaeis guineensis*, the aim of this work was to establish an analytical platform based on untargeted metabolomics to detect and identify this crop's metabolites.

Methods

To establish an analytical platform to detect and identify metabolites on leaves of oil palm, an optimization of several steps were performed: harvest, transport and leaves storage, sample preparation and analytical methodologies. Different conditions of transportation (room temperature, ice and N₂ liquid) and storage (room temperature; -20°C; -80°C) of fresh collected leaves were tested. Additionally, metabolite extractions with three solvents were tested: EtOH 100%; EtOH 70% and EtOH 70%: 0.1% FA. Solid phase extraction (SPE), Liquid-liquid extraction (LLE) and Ultra-high performance liquid chromatography (UHPLC) were used to fractionate metabolites before the analysis. Direct Infusion Mass Spectrometry (DIMS) and Liquid Chromatography - Mass Spectrometry (LC-MS) were used

¹ National Center for Agroenergy Research, EMBRAPA Agroenergy, Brasília, DF, Brazil. **patricia.abdelnur@embrapa.br

² Federal University of Lavras, Lavras, MG, Brazil; *luiz.vargas@colaborador.embrapa.br,

after the fractionation process. MS experiments were performed using an electrospray ionization (ESI-MS) and a High Resolution Mass Spectrometer (HRMS), using a Q-TOF (Maxis 4G, Bruker Daltonics), under optimized parameters. DataAnalysis 4.1 (Bruker Daltonics®) software was used to process data.

Results and Conclusions

According to the results, it was verified that collected leaves should be transported from the field to the laboratory using liquid nitrogen, and stored at -80°C , to avoid metabolites degradation. Liquid-liquid extraction (LLE) was the best sample pretreatment tested, because it resulted on a wider range of compounds (polar compounds, lipids and proteins) using fewer steps, when compared to the other pretreatments. LLE and UHPLC were more efficient than SPE (solid phase extraction) to separate metabolites before MS analysis. DIMS has shown to be a simple and faster technique and could be useful to detect some specific metabolites and to verify some degradation process. However, it presents ion suppression effect, which results in the detection of fewer metabolites than UHPLC-MS. According to the results, it was possible to establish an analytical platform based on untargeted metabolomics to identify metabolites from leaves of oil palm as presented: Use of liquid nitrogen soon after harvesting for transportation, followed by -80°C storage, LLE extraction and analysis by UHPLC-MS. The next step will be the validation of this platform for other oil bearing crops, such as *Elaeis oleifera*. The metabolic information of *E. guineensis* leaves could be integrated with results of other OMICs approaches of this potential biodiesel crop and could be useful in breeding programs in the future.

Financial support

FINEP grant (PRODENDE), CAPES, EMBRAPA.

References

PALMAS para o dendê. Brasília, DF: Embrapa Agroenergia, 2011.

MOCHIDA, K.; SHINOZAKI, K. Advances in Omics and Bioinformatics tools for Systems Analyses of Plant Functions. *Plant Cell Physiol*, Oxford, v. 52, n. 12, p. 2017-38, 2011.

HALL, R. D. Plant metabolomics: from holistic hope, to hype, to hot topic. *New Phytologist*, Cambridge, v. 169, n. 3, p. 453-468, 2006.

RESUMOS - PÓS-DOUTORADO

BIOTECNOLOGIA VEGETAL

Setaria viridis as a model system for functional genomic studies in sugarcane

Polyana K. Martins¹, Bárbara B. A. Dias¹, Ana Paula Ribeiro^{1,2},
Adilson K. Kobayashi², Hugo B.C. Molinari²

Background

Sugarcane (*Saccharum* spp.) is an important biofuel feedstock because of its ability to accumulate high quantities of biomass and sucrose and is one of the most photosynthetically efficient C4 plants. Breeding programs has been the main approach towards sugarcane improvement. However, the time required for a new variety (12-15 years) and the complexity of the genome of modern sugarcane varieties are constraints of this method. In recent years, some protocols for sugarcane transformation with reliable transformation and higher efficiency have been established (KUMAR et al., 2014; MAYAVAN et al., 2013). One of Embrapa's R&D platforms in agroenergy is the development of genetically modified sugarcane for tolerance to abiotic stresses and improved industrial quality for 2G ethanol production. Nevertheless, stable transformation and plant regeneration for proof of concept is a time consuming for this crop. In order to assist this endeavor, a common weed green millet (*Setaria viridis* (L.) P. Beauv.) was recently describe as a new monocotyledonous model species for C4 photosynthesis research and genetic transformation (BRUTNELL et al., 2010; DIAO et al., 2014; RIZAL et al., 2013). Hence *Setaria viridis* is being used in our laboratory as a model plant species for sugarcane applied research, our goal was to develop an efficient genetic transformation method to enable downstream high-throughput functional genomics studies in sugarcane.

Methods

For genetic transformation mediated by *Agrobacterium tumefaciens* embryogenic calli derived from mature seeds of *S. viridis* were used. The calli were incubated with *A. tumefaciens* containing the construction to be tested and co-cultivated for 3 days on callus induction medium (CIM). Following this period, the calli were transferred to CIM medium plus 150 mg/L of Timentin[®] where stayed for a week. After this, they were transferred to CIM selective containing the selective agent (Hygromycin B or glufosinate ammonium) for over a week. The calli that survived this first selection were transferred to selection regeneration medium (MRS) with Timentin[®] and the selective agent. At this time, the calli were kept under

¹ Embrapa Agroenergy, Parque Estação Biológica, Brasília/DF, Brazil. *polyana.martins@colaborador.embrapa.br

² Federal University of Lavras, Lavras/MG, Brazil.

16 h light photoperiod and temperature $25 \pm 2^\circ\text{C}$. Regenerated shoots were transplanted into pots containing a mixture of commercial substrate Plantmax®:latosoil:vermiculite (3:3:1). The plantlets were covered with transparent plastic bags and placed into the phyto-tron chambers at $26 \pm 2^\circ\text{C}$ with 16 h photoperiod, 65% relative humidity and light intensity of $400 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. For each construct, the transformation efficiency (%) was calculated as the total number of PCR positive plants/total number of inoculated callus x 100.

Results and Conclusions

We tested two different *A. tumefaciens* strains EHA105 and AGL1 containing *GFP* gene driven by *ZmUbi* promoter and *hpt* as selectable marker. The transformation efficiency (percentage of callus that gives rise to transformants) was 13% for both strains. EHA105 containing another cassette, *ZmUbi::GUS* and *bar* as selectable marker, showed 6% transformation efficiency. In addition, several genes are being functionally characterized by this method and the transformation efficiency reached up to 29% using hygromycin B as selective agent. Considering that *S. viridis* and sugarcane belongs to the same family, having therefore similar NADP-ME subtype C4 metabolism and similar cell wall composition, the high efficiency of our genetic transformation protocol indicate that *Setaria* can be effectively used as a model plant for sugarcane applied research, including those related to abiotic stresses and improved 2G ethanol production.

Financial Support

Embrapa Agroenergy supported this work through an Embrapa-Capes grant.

References

- BRUTNELL, T. P.; WANG, L.; SWARTWOOD, K.; GOLDSCHMIDT, A.; JACKSON, D.; ZHU, X. G.; KELLOGG, E.; VAN ECK, J. *Setaria viridis*: a model for C₄ photosynthesis. **The Plant Cell**, Waterbury, v. 22, n. 8, p. 2537-2544, 2010.
- DIAO, X.; SCHNABLE, J.; BENNETZEN, J. L.; LI, J. Initiation of *Setaria* as a model plant. **Frontiers of Agricultural Science & Engineering**, Beijing, v. 1, n. 1, p. 16-20, 2014.
- KUMAR, T.; UZMA; KHAN, M. R.; ABBAS, Z.; ALI, G. M. Genetic improvement of sugarcane for drought and salinity stress tolerance using Arabidopsis Vacuolar Pyrophosphatase (AVP1) Gene. **Molecular Biotechnology**, Totowa, v. 56, n. 3, p. 199-209, 2014.
- MAYAVAN, S.; SUBRAMANYAM, K.; ARUN, M.; RAJESH, M.; DEV, G. K.; SIVANANDHAN, G.; JAGANATH, B.; MANICKAVASAGAM, M.; SELVARAJ, N.; GANAPATHI, A. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated in planta seed transformation strategy in sugarcane. **Plant Cell Reports**, New York, v. 32, n. 10, p. 1557-1574, 2013.
- RIZAL, G.; ACEBRON, K.; MOGUL, R.; KARKI, S.; LARAZO, N.; QUICK, W. P. Study of flowering pattern in *Setaria viridis* a proposed model species for C₄ photosynthesis research. **Journal of Botany**, Cairo, article ID 592429, 2013.

Development of a protocol for controlled inoculation of powdery mildew in *Jatropha curcas* L. and characterization of its symptoms and structures in young plants

Gisele P. Domiciano^{1*}, Jean C. Alekcevetch¹, Alexandre A. Alves¹,
Bruno G. Laviola¹ and Adilson K. Kobayashi²

Background

Jatropha (*Jatropha curcas* L.) has gained attention recently as a perennial oil-bearing crop that can produce oil to meet the demands created by the biodiesel sector in Brazil (LAVIOLA et al., 2013). Despite the fact that the species is susceptible to wide a range of diseases (MACHADO; PEREIRA, 2013), most of the breeding programs of the species worldwide are not aiming at developing resistant cultivars due to lack of protocols for controlled inoculation of the pathogens. The main disease currently affecting *jatropha* plants that compose the Embrapa's germplasm collection is the powdery mildew (PM) caused by the fungus *Pseudoidium jatrophae* (BRAUN; COOK, 2012). The disease is characterized by the production of abundant white or gray mycelia in leaves and petioles (DIANESE; CARGNIN, 2008). The objectives of this work were therefore (i) to develop a controlled inoculation protocol that could be later used to assess the level of resistance of young *jatropha* plants subjected to selection, and (ii) to characterize macro and microscopically the symptoms and structures of *P. jatrophae* in the inoculated plants.

Methods

Powdery mildew conidia were isolated by rinsing infected leaves with sterile water. To test if conidia would suffer lyses when exposed to high humidity conditions, they were suspended in sterile water and deposited in glass vials. The conidia were incubated at $24 \pm 1^\circ\text{C}$ under a 12 h photoperiod and 99% RH. Conidial germination and appressorium formation were observed under a light microscope (LM). We examined the glass vials after 72, 96, 144 and 168 h of incubation. The concentration of the conidial suspensions (CS) was determined under a LM using a hemacytometer. All CS were adjusted to $10^4/\text{mL}$ and sprayed with the aid of a hand-held spray bottle onto 3045-day-old seedlings of CNPAE-102, within 10 to 15 min of the initial conidia collection. Inoculated plants were left to dry in for up to 30 min. Experiments were repeated twice. All inoculated plants were examined with

¹ Embrapa Agroenergia, PqEB, Av. W3 Norte (final), Brasília/DF, Brasil, 70770-901; *gisele.domiciano@embrapa.br; bruno.laviola@embrapa.br

a stereomicroscopic 5 days after inoculation. Leaf samples with symptoms and signs were then observed under a LM for the characterization of the pathogen structures in young *Jatropha* plants.

Results and Conclusions

Powdery mildews generally are highly sensitive to high relative humidity conditions (LAVIOLA et al., 2013). Surprisingly, however, we found that conidia of *P. jatrophae* germinated well in high humidity conditions (i.e. 65 to 100% RH), producing short to long, terminal or subterminal germ tubes, with conidium length 0–2 times the width. Multi-lobed appressoria were consistently observed forming at the end of the germ tubes. This result indicated that an efficient protocol for inoculation of PM could be developed based on CS. Indeed plants inoculated with CS exhibited characteristic symptoms of PM infection, generally after a latency period of 5 days. Initially, only a slight chlorotic area was observed, but with the development of the disease, this area rapidly turned into a brownish spot characteristic of the disease. Leaf fragments showing symptoms and signs of the disease were collected and observed under a Zeiss LM. The observed conidia were morphologically identical to the ones we had inoculated confirming that the inoculation was efficient. In order to complete the Koch's postulate, conidia were once again isolated and another set of *Jatropha* seedlings were inoculated. The inoculated plants displayed characteristic symptoms and signs of *P. jatrophae*. These observations altogether indicate that the protocol developed may be efficiently used for other experiments such as inheritance studies, which ultimately may provide valuable information for the establishment of breeding strategies to develop resistant varieties.

Financial Support

This work was supported with project grants by MCTI/FINEP/CNPq and EU/FP7.

References

- BRAUN, U.; COOK, R. T. A. **Taxonomic manual of the Erysiphales (Powdery mildews)**. St. Paul: APS Press, 2012. 707 p.
- DIANESE, A. de C.; CARGNIN, A. **Ocorrência de *Oidium* sp. em pinhão-manso (*Jatropha curcas* L.) em Planaltina, DF**. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2008. (Embrapa Cerrados. Documentos, 231)
- LAVIOLA, B. G.; OLIVEIRA, A. M. C.; BHERING, L. L.; ALVES, A. A.; ROCHA, R. B.; GOMES, B. E. L.; CRUZ, C. D. Estimates of repeatability coefficients and selection gains in *Jatropha* indicate that higher cumulative genetic gains can be obtained by relaxing the degree of certainty in predicting the best families. **Industrial Crops and Products**, Amsterdam, v. 51, p. 70-76, 2013.
- MACHADO, A. R.; PEREIRA, O. L. Major Diseases of the Biofuel Plant, Physic Nut (*Jatropha curcas*). In: FANG, Z. (Ed). **Biodiesel and feedstock, production and applications**. Rijeka: InTech, 2013. p. 59-74.

Impacto de modelos preditos via seleção genômica na seleção ultraprecoce de genótipos superiores de pinhão-manso

Lunalva Aurélio Pedroso Sallet¹, Alexandre Alonso Alves¹, Tatiana Barbosa Rosado¹ e Bruno Galvêas Laviola¹

Introdução

O pinhão-manso (*Jatropha curcas* L., Euphorbiaceae) é considerada uma planta com potencial para produção de biocombustíveis, sendo uma oleaginosa em fase de domesticação (LAVIOLA et al., 2011). Por ser uma espécie perene, apresenta ciclo longo, (FREIBERGER et al., 2013) e por isso, novas estratégias devem ser testadas para reduzir o ciclo de melhoramento. Dentre essas alternativas hoje existentes, a seleção genômica ampla (GSA) (RESENDE et al., 2012), que apresenta potencial para reduzir o tempo de melhoramento e aumentar a eficiência de programas de melhoramento. O objetivo deste trabalho foi avaliar a acurácia e o impacto da seleção genômica (GS) no melhoramento genético de pinhão-manso.

Métodos

O estudo piloto de seleção genômica ampla foi realizado com 79 indivíduos selecionados no banco de germoplasma de pinhão-manso, da Embrapa Agroenergia. Os indivíduos foram fenotipados para peso de 100 grãos (gramas), sendo estimados a herdabilidade e a acurácia via modelos mistos (RELM/BLUP). Posteriormente, os mesmos indivíduos foram genotipados via sequenciamento pela tecnologia DArT-Seq, o que gerou 2.724 variantes DArTs de presença/ausência e 747 SNPs. A seleção genômica ampla foi modelada por meio da metodologia RR-BLUP utilizando 47 (60%) indivíduos selecionados ao acaso, que constituíram a população de treinamento. Os 32 (40%) indivíduos remanescentes foram usados para validação dos modelos (população de validação cruzada), com 500 simulações e, para estimar a acurácia da seleção genômica. Ao final, calculou-se a eficiência da seleção genômica ampla comparada a seleção fenotípica.

Resultados e Conclusões

As estimativas da herdabilidade e a acurácia da seleção fenotípica para peso de 100 grãos utilizando a metodologia REML/BLUP foram de 0,37 e 0,60, respectivamente.

¹ Embrapa Agroenergia, Parque Estação Biológica, Brasília/DF, Brazil, 70770-901; *lunalva.pedroso@colaborador.embrapa.br.

Considerando a SGA, as acurácias obtidas pela validação cruzada foram estimadas em 63% quando se utilizou os marcadores SNPs e em 71 % quando as variantes de presença/ausência DArTs foram usados na validação cruzada. As acurácias da seleção genômica corresponderam a acurácia da seleção fenotípica de referência, do conjunto reduzido de indivíduos da população de treinamento/validação. Isto, possivelmente, ocorreu devido aos efeitos consideráveis das relações de família (baixa diversidade genética). Observa-se ainda que, o maior número de marcadores (Silico-DArTs), mesmo com menor conteúdo informativo (presença/ausência), contribui para uma estimativa superior da acurácia. Mantendo estes resultados para outras características em pinhão-manso, os valores genéticos-genômico podem ser estimados no estágio de plântula, reduzindo o ciclo de melhoramento em pelo menos 5 anos (7 anos com a SGA e 12 anos com a seleção fenotípica). Sendo a reposta a seleção inversamente proporcional ao comprimento do ciclo, foi calculado o impacto esperado da SGA no melhoramento do pinhão-manso. Considerando as acurácias e os resultados aqui relatados, com a SGA pode-se aumentar a eficiência da seleção em pinhão-manso em mais de 100%.

Apoio Financeiro

O Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação (MCTI) apoiaram este trabalho através de uma subvenção FINEP e o CNPq pela concessão da bolsa.

Referências

FREIBERGER, M. B.; GUERRINI, I. A.; CASTOLDI, G. Nutrição e adubação NPK para a cultura do pinhão manso no Brasil. *Scientia Agraria Paranaensis*, Cascavel, v. 12, n. 3, p.157-166, 2013.

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

RESENDE, M. D. V. de; SILVA, F. F. e; LOPES, P. S.; AZEVEDO, C. F. **Seleção genômica ampla (GWS) via modelos mistos (REML/BLUP), inferência Bayesiana (MCMC), regressão aleatória multivariada e estatística espacial**. Viçosa, MG: Ed. da UFV, 2012. 291 p.

Apoio



MINISTÉRIO DA
**AGRICULTURA, PECUÁRIA
E ABASTECIMENTO**

