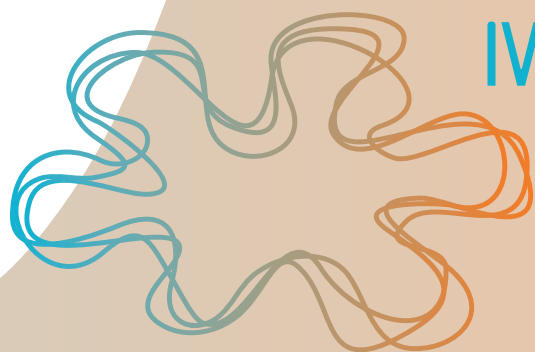


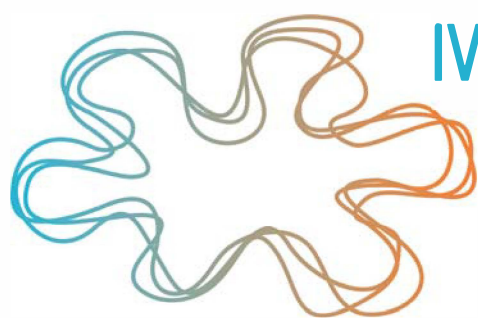


IV Encontro de Pesquisa e Inovação da Embrapa Agroenergia

Anais

Simone Mendonça
Betania Ferraz Quirino
Editoras técnicas

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



IV Encontro de
Pesquisa e Inovação da
Embrapa Agroenergia

Anais

*Simone Mendonça
Betania Ferraz Quirino*
Editoras Técnicas

Embrapa
Brasília, DF
2017

Embrapa Agroenergia

Parque Estação Biológica (PqEB)
Av. W3 Norte (final)
CEP 70770-901 Brasília, DF
Fone: (61) 3448-4246
Fax: (61) 3448-1589
www.embrapa.br
<https://www.embrapa.br/fale-conosco/sac/>

Unidade responsável pelo conteúdo e pela edição

Embrapa Agroenergia

Comitê Técnico-Científico do IV EnPI

Betania Ferraz Quirino – Presidente
César Heraclides Bheling Miranda
Emerson Léo Schultz
Felix Gonçalves de Siqueira
Letícia Jungmann Cançado
Marcia Mitiko Onoyama Esquiagola
Patrícia Abrão Oliveira
Silvia Belém Gonçalves
Simone Mendonça
Simone Palma Fávaro

Comitê Local de Publicações

Presidente

Alexandre Alonso Alves

Secretária-executiva

Marcia Mitiko Onoyama Esquiagola

Membros

André Pereira Leão

Bruno Galvêas Laviola

Emerson Leo Schultz

Maria Iara Pereira Machado

Rosana Falcão

Sílvia Belém Gonçalves

Supervisão editorial, revisão de texto e editoração eletrônica

Luciane Chedid Melo Borges

Normalização bibliográfica

Maria Iara Pereira Machado

Projeto gráfico, capa e divisórias

Maria Goreti Braga dos Santos

Ilustrações da capa e das divisórias

Leandro Lobo

1ª edição

Publicação digitalizada (2017)

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 (4. : 2017 : Brasília, DF).
Anais... / Simone Mendonça, Betania Ferraz Quirino, editoras técnicas. – Brasília, DF :
Embrapa, 2017.

PDF (153 p.) : il. color.

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

ISBN 978-85-7035-717-5

1. Agroenergia – pesquisa – inovação. I. Mendonça, Simone. II. Quirino, Betania Ferraz. III. Título.

CDD (22 ed.) 333.79

© Embrapa 2017

Apresentação

Neste ano de 2017, a Embrapa Agroenergia realiza seu IV Encontro de Pesquisa e Inovação (IV EnPI). Nos anos anteriores, o evento tratou de temas como Enzimas e Química Verde e, nesta edição, além de apresentarmos inúmeros trabalhos científicos desenvolvidos pelos nossos pesquisadores e seus colaboradores nas quatro frentes de atuação da nossa Unidade (Biomassas para fins Industriais, Biotecnologia Industrial, Química de Renováveis e Materiais Renováveis), realizaremos a 3ª edição do Simpósio Agroenergia em Foco, no qual iremos discutir o tema Biotecnologia Industrial. Portanto, pretendemos abordar a atual situação da Biotecnologia Industrial no Brasil e no Mundo, considerando aspectos tecnológicos, econômicos e ambientais, políticas públicas e logística, além de desafios em geral dos diferentes setores envolvidos. Teremos, neste ano, a participação de importantes representantes dos setores de energias renováveis, de química, bem como da academia e do governo.

Por se tratar de evento aberto ao público e transmitido pela Internet, temos a expectativa de aumentarmos consideravelmente seu alcance, levando, dessa forma, conhecimentos atualizados ao variado público-alvo que nos acompanha. Uma das nossas principais expectativas com esse evento é podermos prospectar potenciais demandas que os setores envolvidos com a Biotecnologia Industrial possuem para que possamos organizar nossa programação de pesquisa com o objetivo de trazer soluções para as demandas que por ventura forem prospectadas. Com esse e outros modelos de prospecção que nossa Unidade adota, poderemos desenvolver soluções nacionais para inúmeros gargalos tecnológicos que os diferentes setores da bioeconomia nacional enfrentam.

Exemplos de Tecnologias, Produtos e Processos que temos desenvolvido podem ser encontrados na página da Embrapa Agroenergia na Internet, na aba Vitrine Tecnológica. É dessa forma que acreditamos que poderemos nos tornar uma “referência nacional e internacional na geração de inovações tecnológicas que permitam converter matérias-primas renováveis diversificadas, por processos bioquímicos, químicos e termoquímicos, em alternativas sustentáveis de bioprodutos e bioenergia dentro do contexto da Biotecnologia Industrial e da Química Verde”.

Ao nos tornarmos referência no desenvolvimento de soluções avançadas para nossa bioeconomia, de fato traremos soluções de interesse para nossa sociedade. Esperamos que esta edição do nosso EnPI atenda às expectativas dos setores ligados à Biotecnologia Industrial bem como da academia e do governo.

Boa leitura.

Guy de Capdeville
Chefe-Geral da Embrapa Agroenergia

O Encontro de Pesquisa e Inovação da Embrapa Agroenergia

Organização

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

Objetivos

- I) Debater e avaliar o cenário atual, nos eixos mercadológico e tecnológico, da biotecnologia industrial, em particular a transformação da biomassa em produtos de interesse industrial, via biotecnologia.
- II) Debater prioridades em PD&I para o tema em questão.
- III) Produzir documento síntese das discussões apontando concepções tecnológicas promissoras para a pesquisa na área.
- IV) Divulgar os trabalhos de PD&I desenvolvidos na Embrapa Agroenergia nas áreas de Genética e Biotecnologia Vegetal; Genética e Biotecnologia Microbiana; Processos Bioquímicos; Processos Químicos e Química de Biocombustíveis e Biomassa.
- V) Premiar os melhores talentos nas categorias de graduandos, graduados e doutores.

Formato

Esta quarta edição do Encontro de Pesquisa e Inovação da Embrapa Agroenergia (EnPI 2017) contou com a presença de palestrantes convidados internos e externos, além de participantes da iniciativa privada e de universidades, em sua maioria alunos de graduação e pós-graduação, oriundos do Distrito Federal e de mais 6 estados. O EnPI 2017 foi realizado no período de 25 a 27 de setembro, na Embrapa Agroenergia (Brasília, DF). Esta unidade da Embrapa é integralmente dedicada ao desenvolvimento de soluções tecnológicas inovadoras para a conversão eficiente e sustentável de biomassa em biocombustíveis, produtos químicos e materiais de origem renovável. O evento foi subdividido em dois momentos: I) Simpósio Agroenergia em Foco: Biotecnologia Industrial, com duas mesas-redondas, que abordaram os temas “Biotecnologia aplicada à indústria de nutrição animal e nutracêuticos” e “Biotecnologia aplicada a insumos para cosméticos”, além de duas palestras, uma contextualizando a Biotecnologia Industrial no País e a outra apresentando a Pesquisa e Inovação na Embrapa Agroenergia; e II) Sessão de divulgação dos trabalhos do IV EnPI, que conta com apresentações em formato de pôster e na modalidade oral, nas categorias graduandos, graduados e doutores, com a premiação dos melhores trabalhos de PD&I desenvolvidos nas áreas: 1) Genética e

Biotecnologia Microbiana; 2) Genética e Biotecnologia Vegetal; 3) Processos Bioquímicos; 4) Processos Químicos e 5) Química de Biocombustíveis e Biomassa.

Público-alvo

O público-alvo do IV Encontro de Pesquisa e Inovação da Embrapa Agroenergia são pesquisadores, professores, estudantes de pós-graduação e graduação envolvidos em pesquisas relacionadas à produção de Agroenergia, em especial nos temas de biotecnologia industrial, com enfoque no desenvolvimento e uso de produtos da conversão biotecnológica de biomassa na área de cosméticos, nutrição animal ou de nutracêuticos. No Distrito Federal, esse público engloba profissionais e estudantes vinculados às unidades de pesquisa da Embrapa (Embrapa Agroenergia, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Embrapa Hortaliças, Embrapa Cerrados, Embrapa Quarentena Vegetal, Embrapa Sede) e universidades como a Universidade de Brasília, Universidade Católica de Brasília, além de outras Universidades de outros estados com as quais a Embrapa mantém parcerias formalizadas. Os setores públicos, agentes reguladores e agentes de fomento estão igualmente contemplados no público-alvo, uma vez que as discussões e documentos produzidos durante o encontro servirão como norteadores para a formulação de ações governamentais nos âmbitos distrital e federal. Esta edição teve especial interesse do setor industrial, contando com a participação de diversos profissionais que enriqueceram o debate mercadológico.

Sumário

Genética e Biotecnologia Microbiana

Graduandos

Contaminação microbiana de biodiesel (B100), diesel (B0), e blends (B7) comercializadas no Estado de Goiás e no Distrito Federal, 10

Artur Fiuza Borges Arantes, Mariana Santos Tamietti, Ana Carolina Bitencourt de Araujo, Patrícia Portela de Medeiros Brunale , Bruno Rafael de Lima Moraes , Paula Fernandes Franco, Patrícia Pinto Kalil Gonçalves Costa, Paula Marcela Duque Jaramillo, Betania Ferraz Quirino , Betulia de Moraes Souto, Itânia Pinheiro Soares , Léia Cecília de Lima Fávoro

Descoberta de novos genes de xilose isomerase em rúmen de cabras brasileiras, 16

Gabriel de Souza Colombo, Ísis Viana Mendes, Betulia de Moraes Souto, Nádia Parachin, João Ricardo Almeida, Betania Ferraz Quirino

Caracterização molecular de transformantes de *Trichoderma lentiforme* CFAM-422 visando à identificação de genes envolvidos na clivagem de polissacarídeos, 22

Rebeca Alves Felix, Gláucia Emy Okida Midorikawa, Ayla Santana da Silva , Elba Pinto da Silva Bon , Léia Cecília de Lima Fávoro

Graduados

Determinação de agente seletivo para seleção de transformantes de *Trichoderma lentiforme* CFAM-422, 28

Elisa Zaparoli Ramos, Jhessica Couto Araújo, Gláucia Emy Okida Midorikawa , Ayla Santana da Silva, Leda Maria Fortes Gottschalk, Léia Cecília de Lima Fávoro, Elba Pinto da Silva Bon

Otimização de métodos de extração de DNA genômico dos basidiomicetos *Panus lecomtei* CC40 e *Pleurotus pulmonarius* EF88, 33

Hetiene Pereira Marques Félix Gonçalves de Siqueira, André Leão, Manoel Teixeira Souza Jr.

Bioprospecção de fungos endofíticos de *Paullinia cupana* e *Rhizophora mangle* produtores de enzimas lignocelulolíticas, 39

Jéssica de Sá Guimarães Peixoto, Paula Marcela Duque Jaramillo, Valquíria Martins Pereira, Fabrício Machado Silva, Léia Cecília de Lima Fávoro

Sequenciamento do DNA mitocondrial de *Chlamydomonas biconvexa* revela um mitogenoma compacto, 46

Patrícia Verdugo Pascoal, Sámed Ibrahim Isa Abdel Hadi, Andrei Stecca Steindorff, Eduardo Fernandes Formighieri, Bruno dos Santos Alves Figueiredo Brasil

Doutores

Genome sequencing of thermophilic fungus *Humicola grisea* var. *thermoidea* and effect of pH in sugarcane biomass transformation, 53

Andrei Stecca Steindorff, Eduardo Fernandes Formighieri, Fabrícia Paula de Faria, Marcio José Poças-Fonseca, João Ricardo Moreira de Almeida

Processos Bioquímicos

Graduandos

Perfil da proteção patentária nos últimos 20 anos associado à lignina, **61**

Ana Cristina Prates, Melissa Braga

Estudo da proteção patentária relacionada à produção microbiana do ácido acrílico, **67**

Thuan do Amaral, Melissa Braga, João Ricardo Moreira de Almeida

Graduados

Avaliação prospectiva do potencial biotecnológico de microalgas: uma abordagem filogenética, **73**

Carolina Ribero Cereijo, Hugo Santana, Sámed Ibrahim Isa Abdel Hadi, Lorena Costa Garcia, Letícia Jungmann Cançado, Bruno dos Santos Alves Figueiredo Brasil

Caracterização da composição química da biomassa da microalga *Chlamydomonas biconvexa* cultivada em efluente da indústria de óleo de palma, **80**

Dágon Manoel Ribeiro, Rodrigo Carvalho do Nascimento, Carolina Ribero Cereijo, Hugo Santana, Lorena Costa Garcia, Bruno dos Santos Alves Figueiredo Brasil

Combinação de extratos enzimáticos de basidiomicetos e ascomicetos para hidrólise do cacho vazio de dendê, **88**

Elias Alves da Silva, Thályta Fraga Pacheco, Thais Demarchi Mendes, Marivane Lemos, Felipe B.P. Carvalho, Léia Cecília de Lima Favaro, Simone Mendonça, Felix Gonçalves de Siqueira, Manoel Teixeira Souza Júnior

Produção de lipases bacterianas e aplicação à síntese de biodiesel, **95**

Pedro Alves Martins, Karoline Costa Almeida, Patrícia Pinto Kalil Gonçalves Costa, Thályta Fraga Pacheco, Janice Lisboa de Marco, Thaís Fabiana Chan Salum

Seleção de cepa produtora de ácido kójico a partir de glicerina bruta de soja, **101**

Rebeca Baiocchi Vianna, Flávia Soares Vieira, Augusto Lopes Souto, Thaís Demarchi Mendes, Patrícia Pinto Kalil Gonçalves da Costa, Patrícia Verardi Abdelnur, Clenilson Martins Rodrigues, Mônica Caraméz Triches Damaso

Obtenção de enzimas lignocelulolíticas de monocultivos e cocultivos de fungos filamentosos em fermentação submersa usando biomassas vegetais da agroindústria do dendê, **107**

Ruben Darío Romero-Peláez, Thais Demarchi Mendes, Thályta Fraga Pacheco, Araidle Fontes Urben, Cristiane Vieira Helm, Simone Mendonça, Félix Gonçalves de Siqueira

Química de Biocombustíveis e Biomassa

Graduandos

Reforma a vapor do biogás usando catalisadores de óxidos mistos Ni/Mg-La para produção de gás de síntese, **115**

Gustavo Alves da Costa, Vannia Cristina dos Santos, Emerson Léo Schultz, Itânia Pinheiro Soares

Caracterização química do resíduo pós-cultivo de cogumelos destoxificantes em torta de algodão, **121**

Larissa Silva Fonseca, Ana Paula Fernandes Araújo, Antony Enis Virginio Machado, Félix Gonçalves de Siqueira, Marivane Lemos, Simone Mendonça

Graduados

Reforma seca de biogás usando óxidos mistos de Ni-Al e Co-Ni-Al para produção de gás de síntese, 128

Jéssica de Souza Silva, André Luiz Alvarenga Marinho, Fábio Bellot Noronha, Grace Ferreira Ghesti, Emerson Léo Schultz, Itânia Pinheiro Soares

Estudo da vida útil das fibras da prensagem de dendê (*Elaeis guineensis* Jacq.), 134

Marina Borges Guimarães, Paula Andrea Osorio Carmona, Débora Lo Sciuto, Márcio Waluce P. R. de Santana, Marcos Enê Chaves Oliveira, Félix Gonçalves de Siqueira, Simone Mendonça

Avaliação do perfil de oligossacarídeos produzidos por celulose do tipo PASC em diferentes tampões por MALDI-TOF MS, 141

Tallyta Santos Teixeira, Jéssica Souza de Barros, Jéssica Kele Arruda Macêdo, Kelly Barreto Rodrigues, Léia Cecília de Lima Fávaro, Félix Gonçalves de Siqueira, Patricia Verardi Abdelnur

Doutores

Uso de catalisadores multifuncionais à base de Ni e Mo para a produção de diesel verde pelo processo de hidrodesoxigenação a partir de materiais residuais da produção de biodiesel, 148

Vannia Cristina dos Santos, Bruno Leite Sampaio, Gustavo Alves da Costa, Emerson Léo Schultz, Itânia Pinheiro Soares



GENÉTICA E BIOTECNOLOGIA MICROBIANA

Contaminação microbiana de biodiesel (B100), diesel (B0), e blendas (B7) comercializadas no Estado de Goiás e no Distrito Federal

Artur Fiuza Borges Arantes¹, Mariana Santos Tamietti², Ana Carolina Bitencourt de Araujo³, Patrícia Portela de Medeiros Brunale⁴, Bruno Rafael de Lima Moraes⁵, Paula Fernandes Franco⁶, Patrícia Pinto Kalil Gonçalves Costa⁷, Paula Marcela Duque Jaramillo⁸, Betania Ferraz Quirino⁹, Betulia de Moraes Souto¹⁰, Itânia Pinheiro Soares¹¹, Léia Cecília de Lima Fávaro¹²

Resumo

No Brasil, atualmente, o monitoramento da qualidade do biodiesel, por meio de ensaios físico-químicos, é feito apenas na usina e nos postos de combustíveis, quando em mistura com o diesel. Apesar do conhecimento dos efeitos deletérios da ação microbiana nos combustíveis líquidos, não há no momento legislação específica nacional que regule a avaliação da presença de microrganismos contaminantes em combustíveis líquidos e sistemas associados. Nesse contexto, buscou-se determinar as comunidades microbianas cultiváveis contaminantes em amostras representativas de diesel (B0, uma amostra S500 obtida de distribuidora no DF), de biodiesel (B100, duas amostras obtidas de tanques de armazenamento de usina de produção em Goiás e uma de distribuidora no DF), bem como de blendas biodiesel/diesel (B7, com duas amostras de S500 e duas de S10 obtidas de diferentes postos de gasolina no DF). Todas as amostras foram processadas imediatamente após a coleta para o isolamento de microrganismos. Na sequência, duas amostras de diesel (B0 S500 de distribuidora do DF e blenda B7 S500 de posto de combustível do DF) foram coletadas e submetidas à simulação de estocagem em protótipos de tanques de 20 litros, com isolamentos de microrganismos realizados aos 0, 30, 60 e 90 dias de armazenamento. Cada amostra

¹ Graduando em Ciências Farmacêuticas, Universidade de Brasília, artur.arantes@colaborador.embrapa.br

² Bióloga, mestranda em Biologia Molecular na Universidade de Brasília, mariana.tamietti@colaborador.embrapa.br

³ Bióloga, mestre em Ciências Genômicas, Universidade Católica de Brasília, anaraujo.df@gmail.com

⁴ Química, mestre em Tecnologias Química e Biológica, Universidade de Brasília, patybrunale@globlo.com

⁵ Biólogo, graduado em Ciências Biológicas, Universidade Católica de Brasília, bruno.moraes@colaborador.embrapa.br

⁶ Bióloga, mestre em Biologia Molecular na Universidade de Brasília, analista da Embrapa Agroenergia, paula.franco@embrapa.br

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

⁸ Biomédica, doutora em Biologia Molecular, Universidade de Brasília, Paula.jaramillo@colaborador.embrapa.br

⁹ Bióloga, doutora em Genética e Melhoramento de Plantas, pesquisadora da Embrapa Agroenergia, betania.quirino@embrapa.br

¹⁰ Bióloga, doutora em Genética e Melhoramento de Plantas, analista da Embrapa Agroenergia, betulia.souto@embrapa.br

¹¹ Química, doutora em Química, pesquisadora da Embrapa Agroenergia, itania.soares@embrapa.br

¹² Bióloga, doutora em Genética e Melhoramento de Plantas, pesquisadora da Embrapa Agroenergia, leia.favaro@embrapa.br

foi filtrada (volumes de 2 mL, 20 mL e 200 mL) em membrana de 0,22 micrômetros (três membranas para cada volume), e alíquotas foram dispostas em meios de cultura TSA, MEA, e YPDA contendo fungicida ou antibióticos, para o isolamento de bactérias, fungos filamentosos e leveduriformes, respectivamente. Isolaram-se bactérias e fungos de todas as amostras avaliadas, constituindo-se um banco de microrganismos contaminantes de biodiesel/diesel com mais de 700 linhagens preservadas. Análise das sequências do DNA ribossômico revelou que as bactérias identificadas até o momento pertencem aos gêneros *Bacillus*, *Janibacter*, *Lysinibacillus* e *Paenibacillus*. Já os fungos pertencem aos gêneros *Aspergillus*, *Byssoschlamys* e *Paecilomyces*. O conhecimento da diversidade microbiana de combustíveis é importante para melhor compreensão do papel e do impacto desses microrganismos contaminantes na qualidade do combustível armazenado.

Palavras-chave: fungos filamentosos. bactérias. biocombustíveis. isolamento microbiano. DNA ribossomal.

Introdução

É sabido que o biodiesel pode sofrer degradação química, a qual pode ser potencializada por fatores como temperatura, luz e umidade. Além disso, o biodiesel também pode sofrer degradação mediada por microrganismos, que têm seu crescimento estimulado pela presença de água livre e outros micronutrientes (CHAO et al., 2010). De fato, as temperaturas elevadas que ocorrem durante os processos de produção dos combustíveis esterilizam o combustível produzido. No entanto, durante o armazenamento, ou dependendo das condições de transporte, pode ocorrer a entrada de água nos sistemas e, por conseguinte, a contaminação microbiológica e uma possível biodeterioração. A água é um fator essencial para a atividade microbiana e, devido a esse, fato a maioria das recomendações para evitar a presença e a atividade de microrganismos envolve o controle da água nos sistemas (PASMANN, 2013; SOARES et al., 2014).

Apesar do conhecimento dos efeitos deletérios da ação microbiana nos combustíveis líquidos, especialmente diesel e biodiesel, não há no momento legislação específica no Brasil que regule a avaliação de contaminação microbiológica em combustíveis líquidos e sistemas associados. Nesse contexto, buscou-se acessar as comunidades microbianas cultiváveis contaminantes de diesel, biodiesel e blends biodiesel/diesel, utilizando-se amostras coletadas no Estado de Goiás e no Distrito Federal.

Materiais e métodos

Coleta de amostras de combustível

A coleta foi realizada em bombonas estéreis, com auxílio de luvas e utensílios esterilizados, conforme recomendações da norma internacional ASTM D6469-16 (ASTM D6974-16 Standard Practice for Enumeration of Viable Bacteria and Fungi in Liquid Fuels—Filtration and Culture Procedures). Os combustíveis coletados foram representativos de diferentes pontos da cadeia de produção e distribuição dos

combustíveis. Oito amostras foram processadas para análise microbiológica imediatamente após a coleta, enquanto duas amostras foram coletadas e armazenadas em protótipos de tanques de estocagem para amostragens ao longo do tempo.

As amostras que foram processadas para isolamento microbiano imediatamente após a coleta foram: a) biodiesel (B100), sendo duas amostras de tanques de armazenamento de usina de produção no Estado de Goiás e uma amostra de tanque de armazenamento de uma distribuidora no DF; b) diesel (B0), sendo uma amostra (S500) obtida de distribuidora no DF; c) blends de diesel B7, sendo duas amostras de S500 e duas amostras de S10 obtidas de diferentes postos de gasolina no DF. Amostras de diesel (B0 S500 de distribuidora do DF e blenda B7 S500 de posto de combustível do DF) foram coletadas e submetidas à simulação de estocagem em protótipos de tanques de 10 litros. Isolamentos de microrganismos foram realizados nos tempos 0, 30, 60 e 90 dias de armazenamento.

Isolamento de microrganismos contaminantes de biodiesel, diesel e blends

Para o isolamento, cada amostra foi filtrada (2 mL, 20 mL e 200 mL) em membrana de 0,22 micrômetros (três membranas para cada volume), a qual foi disposta em meios de cultura TSA, MEA, e YPDA contendo fungicida ou antibióticos, para o isolamento de bactérias, fungos filamentosos e leveduriformes, respectivamente (ASTM D6469). As placas foram incubadas a 28 °C e monitoradas por até 30 dias quanto ao crescimento de microrganismos. O número de microrganismos foi contado e as colônias foram purificadas até a obtenção de culturas puras. As bactérias foram preservadas por ultracongelamento e os fungos foram preservados pelo método Castellani (1967).

Identificação molecular de bactérias e fungos contaminantes de biodiesel, diesel e blends

As bactérias e fungos foram cultivados e submetidos à extração de ácidos nucléicos. Para bactérias, a região 16S do DNA ribossômico foi amplificada com os iniciadores universais P0(27f) (5'-GAGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') e R1378 (5'-CGGTGTGTACAAGGCCCGGAACG-3') (LANE, 1999), os quais amplificam uma região de aproximadamente 1.500 pares de bases. Para os fungos, a região ITS1-5.8S-ITS2 do DNA ribossômico foi amplificada com os primers ITS1 (5'TCCGTAGGTGAACCTGCGG3') e ITS4 (5'TCCTCCGCTTATTGATATGC3'), os quais amplificam uma região de aproximadamente 600 pb (FAVARO et al., 2011). Os produtos de amplificação foram separados em gel de agarose (1%), corados com brometo de etídio e fotodocumentados sob luz UV. Os produtos de amplificação foram purificados e o sequenciamento foi realizado para ambas as fitas com os mesmos iniciadores descritos. As sequências foram analisadas com auxílio do software CodonCode Aligner¹³ para análise de qualidade e obtenção da sequência consenso. As sequências foram analisadas com o auxílio da ferramenta BLAST nas bases de dados de microrganismos: MycoBank, Ribosomal Database Project e GenBank¹⁴.

¹ Disponível em: <<http://www.codoncode.com/>>

² Disponível em: <<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>>

Resultados e Discussão

Os resultados de isolamento de combustível não armazenado estão representados na Tabela 1. Na Tabela 2, estão representados os dados de isolamento de amostras armazenadas por até 90 dias. Isolaram-se fungos e bactérias de todas as amostras e tipos de combustíveis. Uma coleção de microrganismos contaminantes foi estabelecida e encontra-se armazenada na Embrapa Agroenergia. Sua identificação parcial revela que as bactérias pertencem aos gêneros *Bacillus*, *Janibacter*, *Lysinibacillus* e *Paenibacillus*, e que os fungos pertencem aos gêneros *Aspergillus*, *Byssoschlamys* e *Paecilomyces*.

Gassen et al. (2015) identificaram *Aspergillus* e *Paecilomyces* em amostras de biodiesel, diesel e blends biodiesel/diesel. Esses microrganismos seriam responsáveis por maior deterioração de amostras contendo biodiesel comparado a amostras de diesel puro.

Tabela 1. Número de microrganismos cultiváveis isolados a partir de amostras de combustíveis provenientes de diferentes pontos da cadeia produtiva, no ano de 2015. Para essas amostras, as análises foram realizadas imediatamente após a coleta (tempo zero).

Nº	Amostra	Origem	Linhagens obtidas e purificadas (fungos/bactérias)	Linhagens preservadas (fungos/bactérias)
1	ANP S500/B7/Coleta 22-01-2015/Posto B/Asa Norte	DF	14/14	14/14
2	ANP S500/B7/Coleta 22-01-2015/Posto C/Asa Norte	DF	6/46	6/46
3	ANP S10/B7/Coleta 22-01-2015/Posto A/Asa Norte	DF	8/21	8/21
4	ANP S10/B7/Coleta 22-01-2015/Posto C/Asa Norte	DF	7/10	7/10
5	ANP B100/Coleta 05-14/Goiás	GO	13/4	13/4
6	B100 / Coleta 16-06-15 / (B100 Metílico)	GO	9/51	8/45 (*)
7	B100 / Distribuidora / Coleta 03-07-2015 (LGB-024/2015)	DF	26/17	23/16 (*)
8	Diesel S500 / Distribuidora /	DF	43/30	39/30 (*)

(*) Alguns microrganismos não permaneceram viáveis após a preservação.

Dentre as amostras apresentadas na Tabela 1, observou-se uma grande variação nas quantidades de fungos e bactérias em amostras de coletas nos postos, nas quais não se pode aferir se a concentração de enxofre (S500 e S10) no combustível afetou diretamente o crescimento dos microrganismos. Observou-se que as amostras de B100 e diesel da distribuidora (6, 7 e 8) apresentaram quantias consideráveis tanto de fungos quanto de bactérias. Nos tanques das distribuidoras, existe um grande volume de combustível que pode ser proveniente de diversos lotes e diferentes origens e composições, como no caso do biodiesel. Esse fato pode explicar a maior concentração de microrganismos.

Observou-se ainda que em quase todas as amostras não houve redução entre as linhagens purificadas e preservadas.

Tabela 2. Número de microrganismos cultiváveis isolados a partir de amostras de combustíveis provenientes de diferentes pontos da cadeia produtiva, no ano de 2015. Para essas amostras, as análises foram realizadas em diferentes tempos de estocagem.

Amostra	Origem	Linhagens obtidas, purificadas e preservadas (fungos/bactérias)				
		Tempo zero lavagem do tanque (Fungo/ Bactéria)	Tempo zero (Fungo/ Bactéria)	Tempo 30D (Fungo/ Bactéria)	Tempo 60D (Fungo/ Bactéria)	Tempo 90D (Fungo/ Bactéria)
Diesel S500 / Distribuidora / Linha de bombeamento. Coleta 03-07-2015 (LGB- 025/2015)	DF	13/27	22/10	16/6	13/40	68/20
B7 (S500) Posto / Coleta 17- 08-2015 (LGB-034/2015)	DF	35/45	19/26	50/8	9/4	103/29

Na Tabela 2, observamos que foram identificados fungos e bactérias na lavagem do tanque, durante a esterilização para receber o combustível. Em relação à amostra S500, houve uma redução da presença de fungos entre os tempos Zero e 60 dias, com aumento não esperado, superior a cinco vezes aos 90 dias. Com as bactérias, houve um decréscimo em sua contagem, com aumento aos 60 dias, seguido de nova redução aos 90 dias. Para a amostra B7, houve uma significativa oscilação na contagem de fungos, uma expressiva redução na contagem de bactérias e um crescimento inesperado de ambos para o tempo de 90 dias.

Não fosse o comportamento observado aos 90 dias, poderia inferir-se que nas condições avaliadas, a amostra que contém biodiesel estaria com menor grau de contaminação por microrganismos, muito embora isso não reflita necessariamente em degradação do combustível.

Conclusões

Com análises apenas no tempo zero, podemos inferir que a contaminação está mais relacionada às condições de armazenamento da amostra que propriamente à composição desta. Em relação à estocagem por período de até 90 dias, serão necessários mais testes que possam explicar as oscilações observadas.

Agradecimentos

Embrapa e CNPq.

Referências

CASTELLANI, A. Maintenance and cultivation of common pathogenic fungi in distilled water: Further researches. **The Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 70, n. 8, p. 181-184, 1967.

CHAO, Y.; LIU, N.; ZHANG, T.; CHEN, S. Isolation and characterization of bacteria from engine sludge generated from biodiesel-diesel blends. **Fuel**, v. 89, n. 11, p. 3358-3364, 2010.

FAVARO, L. C. DE L.; MELO, F. L. DE; AGUILAR-VILDOSO, C. I.; ARAÚJO, W. L. Polyphasic analysis of intraspecific diversity in *Epicoccum nigrum* warrants reclassification into separate species. **PLoS One**, v. 6, n. 8, artigo e14828, 2011. Disponível em: <<http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0014828>>. Acesso em: 14 jun. 2017.

PASSMAN, F. J. Microbial contamination and its control in fuels and fuel systems since 1980: a review. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 81, edição especial, p. 88-104, 2013.

GASSEN, J.; BENTO, F. M.; FRAZZON, A. P. G.; FERRÃO, M. F.; MARRONI, I. V.; SIMONETTI, A. B. Growth of *Paecilomyces variotii* in B0 (diesel), B100 (biodiesel) and B7 (blend), degradation and molecular detection. **Brazilian Journal of Biology**, v. 75, n. 3, p. 541-547, 2015.

SOARES, I. P.; LAVIOLA, B. G.; SCHULTZ, E. L.; ALMEIDA, J. R. M. de; FAVARO, L. C. de L.; DAMASO, M. C. T.; COSTA, P. P. K. G.; SALUM, T. F. C. **Biodiesel: desafios e oportunidades**. Brasília, DF: Embrapa Agroenergia, 2014. 9 p. (Embrapa Agroenergia. Comunicado técnico, 08).

Descoberta de novos genes de xilose isomerase em rúmen de cabras brasileiras

Gabriel de Souza Colombo¹, Ísis Viana Mendes², Betulia de Moraes Souto³,
Nádia Parachin⁴, João Ricardo Almeida⁵, Betania Ferraz Quirino⁶.

Resumo

O etanol de segunda geração é uma das alternativas sustentáveis para a obtenção de combustíveis, sendo produzido a partir da biomassa lignocelulósica. No entanto, parte dessa biomassa não é aproveitada em decorrência da incapacidade de leveduras como *Saccharomyces cerevisiae* de consumir a fração hemicelulósica. A xilose é o açúcar de segunda maior abundância na biomassa (ISIKGOR; BECER, 2015). Algumas bactérias e fungos são capazes de consumir a xilose com a participação de uma enzima chamada xilose isomerase, que realiza a isomerização da D-xilose em D-xilulose, um intermediário da via das pentoses. Por meio de engenharia metabólica, leveduras como *S. cerevisiae* podem ser capazes de expressar a xilose isomerase e realizar a fermentação alcoólica da parte hemicelulósica da biomassa. Com a utilização de uma biblioteca metagenômica de rúmen de cabras brasileiras adaptadas à caatinga, foram identificados novos genes codificadores de xilose isomerase, uma parte usando metodologia de *screening* baseado na função e outra pelo *screening* baseado na sequência. O *screening* funcional resultou em 12 clones positivos de xilose isomerase e o *screening* baseado na sequência resultou em 8 clones positivos. Os clones obtidos serão posteriormente expressos em *S. cerevisiae*, para a análise do crescimento em meio com xilose como única fonte de carbono a fim de avaliar a eficiência da expressão e o consumo da xilose pela levedura.

Palavras-chave: xilose. xilose isomerase. levedura. *Saccharomyces cerevisiae*.

Introdução

Modelos mais sustentáveis de produção têm ganhado destaque em diversos setores industriais. Processos e sistemas de produção sustentáveis, comparados à forma de produção convencional, podem potencialmente ser mais lucrativos em virtude da menor geração de resíduos e pelo uso de materiais e energia renováveis (GAVRILESCU; CHISTI, 2005). Nas biorrefinarias, são integrados e realizados processos de conversão da biomassa para a produção de biocombustíveis, energia, químicos e

¹ Graduando em Ciências Biológicas, Universidade Católica de Brasília (UCB), estagiário da Embrapa Agroenergia, Brasília, DF, gabriel.colombo@colaborador.embrapa.br

² Bióloga, mestranda em Ciências Biológicas, Universidade de Brasília (UnB), bolsista da Embrapa Agroenergia, Brasília, DF, isis.mendes@colaborador.embrapa.br

³ Bióloga, mestre em Ciências Biológicas, analista da Embrapa Agroenergia, Brasília, DF, betulia.souto@embrapa.br

⁴ Bióloga, doutora em Engenharia Metabólica, professora da Universidade de Brasília (UnB), Brasília, DF, nadiasp@unb.br

⁵ Biólogo, doutor em Microbiologia Aplicada, pesquisador da Embrapa Agroenergia, Brasília, DF, joao.almeida@embrapa.br

⁶ Bióloga, doutora em Biologia celular e molecular, pesquisadora da Embrapa Agroenergia, Brasília, DF, betania.quirino@embrapa.br

outros bioderivados a partir da biomassa (CHERUBINI, 2010). As diversas rotas de conversão da biomassa permitem uma ampla utilização do material lignocelulósico presente nas plantas e a obtenção de vários produtos de interesse (CHERUBINI, 2010).

O Brasil é um dos maiores produtores de cana-de-açúcar para a produção de etanol de segunda e primeira geração, com mais de 20 bilhões de litros produzidos no ano de 2016, de acordo com a Renewable Fuels Association (RFA). O bioetanol, por ser produzido a partir de biomassa celulósica encontrada em restos agrícolas, representa uma grande oportunidade para suprir a demanda global de etanol de maneira sustentável (SARKAR et al., 2012).

O material lignocelulósico utilizado na produção de etanol de segunda geração é constituído por três componentes principais: celulose, hemicelulose e lignina, além de pequenas quantidades de outros componentes como grupos acetilas, minerais e grupos fenóis substituintes (ISIKGOR; BECER, 2015). Geralmente, a celulose é o componente de maior abundância, constituindo de 35% a 50% da biomassa lignocelulósica, seguida da hemicelulose (de 20% a 35%) e da lignina (de 10% a 25%) (ISIKGOR; BECER, 2015). A celulose é um polímero formado por longas cadeias de celobiose, um dissacarídeo formado por resíduos de glicose, açúcares de 6 carbonos. A lignina é um polímero formado por três unidades diferentes de fenilpropanóides: os monolignóis álcool p-cumarílico, álcool coniferílico e álcool sinapílico, fornecendo rigidez e resistência aos tecidos vegetais. A hemicelulose é o segundo mais abundante polímero presente na biomassa lignocelulósica (ISIKGOR; BECER, 2015). É composta por heteropolímeros diversos que, por sua vez, são compostos por diferentes monossacarídeos de 5 e 6 carbonos: pentoses (xilose e arabinose), hexoses (glicose, manose e galactose) e açúcares acetilados (ISIKGOR; BECER, 2015).

Para que os açúcares presentes na biomassa possam ser consumidos, algumas enzimas exercem papel fundamental na catálise de reações que possibilitam que esses açúcares sejam metabolizados. O consumo da xilose por parte de alguns microrganismos é possível pela ação da enzima xilose isomerase, que realiza a isomerização da D-xilose em D-xilulose, tornando-a um intermediário da via das pentoses. Algumas bactérias e fungos anaeróbios que possuem xilose isomerase no seu metabolismo são capazes de metabolizar a xilose presente na hemicelulose e produzir etanol nesse processo. No entanto, em virtude da baixa e ineficiente taxa de produção do etanol pela fermentação alcoólica da xilose por esses organismos, além do excesso de subprodutos gerados nesse processo, eles não são viáveis para a produção industrial de bioetanol (BRAT et al., 2009).

A levedura *Saccharomyces cerevisiae*, geralmente utilizada na produção de etanol em processos de fermentação industrial, é incapaz de realizar a fermentação alcoólica de pentoses como a xilose (BRAT et al., 2009). Assim, a fração da hemicelulose não é aproveitada para a produção de bioetanol. Por meio de engenharia genética, a introdução de genes codificantes para xilose isomerases em *S. cerevisiae* pode permitir a utilização da xilose presente na hemicelulose por esses organismos para a produção de bioetanol.

Uma abordagem metagenômica, em que o material genético total de uma comunidade microbiana é analisado a partir de uma amostra natural, pode ser usada para a identificação de novos genes codificantes para xilose isomerases para a expressão em levedura. Kuyper et al. (2003) conseguiram a expressão de xilose isomerase por *S. cerevisiae* a partir de genes do fungo *Piromyces* spp., e Parachin e

Gorwa-Grauslund (2011), usando uma abordagem metagenômica, expressaram dois genes de xilose isomerase (*Xym1* e *Xym2*) provenientes de uma comunidade microbiana de solo de jardim em *Escherichia coli*. Os métodos de triagem foram baseados em similaridade de sequências proteicas e na atividade enzimática observada a partir de colônias transformadas que cresceram em meio suplementado com xilose.

Mendes (2016) realizou uma abordagem semelhante à de Parachin e Gorwa-Grauslund (2011), usando uma biblioteca metagenômica de rúmen de cabras brasileiras adaptadas à caatinga. Ao final do seu trabalho, foram estocados possíveis clones positivos que necessitavam de confirmação de suas identidades. Este trabalho deu continuidade ao trabalho de Mendes (2016). Os clones obtidos pela triagem baseada na sequência foram confirmados e pertencem a diferentes espécies de bactérias. Os possíveis clones positivos obtidos pelo *screening* funcional da biblioteca metagenômica de rúmen caprino descritos neste artigo serão posteriormente sequenciados e analisados por meio de ferramentas de bioinformática e finalmente esses genes serão expressos em *S. cerevisiae* para avaliar a atividade das enzimas encontradas.

Materiais e métodos

Foram utilizadas duas metodologias para a triagem da biblioteca metagenômica de rúmen caprino para xilose isomerase. Uma baseada na função e outra baseada na sequência. Na metodologia de *screening* baseada na função, os possíveis clones de xilose isomerase (Xy) que se encontravam em estoque foram transformados em novas células HB101. Para avaliar a viabilidade dessas células, estas foram plaqueadas em 3 placas contendo meio LB sólido com antibióticos diferentes. Uma placa continha tetraciclina, uma continha ampicilina e uma não apresentava antibiótico. Após alguns dias foi avaliado o crescimento de colônias nas placas. Foram transformados 12 clones, denominados Xy XXX, Xy XXI, Xy XXIX, Xy XXV, Xy XXIV, Xy XVIII, Xy VII, Xy XXVIII, Xy XXVII, Xy VI, Xy IX, Xy XIX, além de um controle positivo (Xy 2G) e um controle negativo contendo a célula apresentando o vetor pCF430 sem inserto. Os transformantes foram plaqueados em meio SM3 com tetraciclina e xilose como fonte de carbono, espalhados nas placas com uma alça esterilizada e, posteriormente, incubados na estufa a 37 °C, juntamente com o controle negativo. Na metodologia de *screening* baseada na sequência, foram montados contigs de clones distintos aos descritos na metodologia baseada na função. Esses clones foram previamente enviados para sequenciamento por Mendes (2016), que resultou em 10 fragmentos de 750 pb de xilose isomerase. Com esses fragmentos sequenciados, foram montados contigs no programa Geneious R6 6.0.6. As sequências consenso foram analisadas no banco de dados nr no GenBank (NCBI) utilizando a ferramenta blastx.

Resultados e Discussão

As células HB101 utilizadas na metodologia de *screening* baseada na função apresentaram-se viáveis para transformação. Foi observado crescimento de colônias somente nas placas sem antibiótico (Figura 1), indicando a ausência de vetor nas células. Todas as placas contendo os clones transformados apresentaram um bom

crescimento de colônias em meio SM3 com xilose como única fonte de carbono (Figura 2), evidenciando a expressão de possíveis genes para xilose isomerase. O controle negativo não apresentou crescimento de colônias, como esperado.

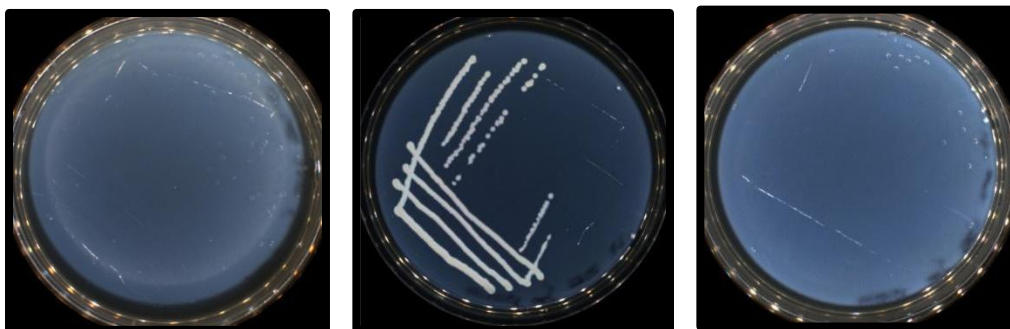


Figura 1. Confirmação da viabilidade da célula HB101 para transformação com possíveis clones positivos de xilose isomerase. Da esquerda para direita: HB101 em meio LB mais tetraciclina; HB101 em meio LB sem antibiótico; HB101 em meio LB mais ampicilina.

Fotos: Gabriel de Souza Colombo

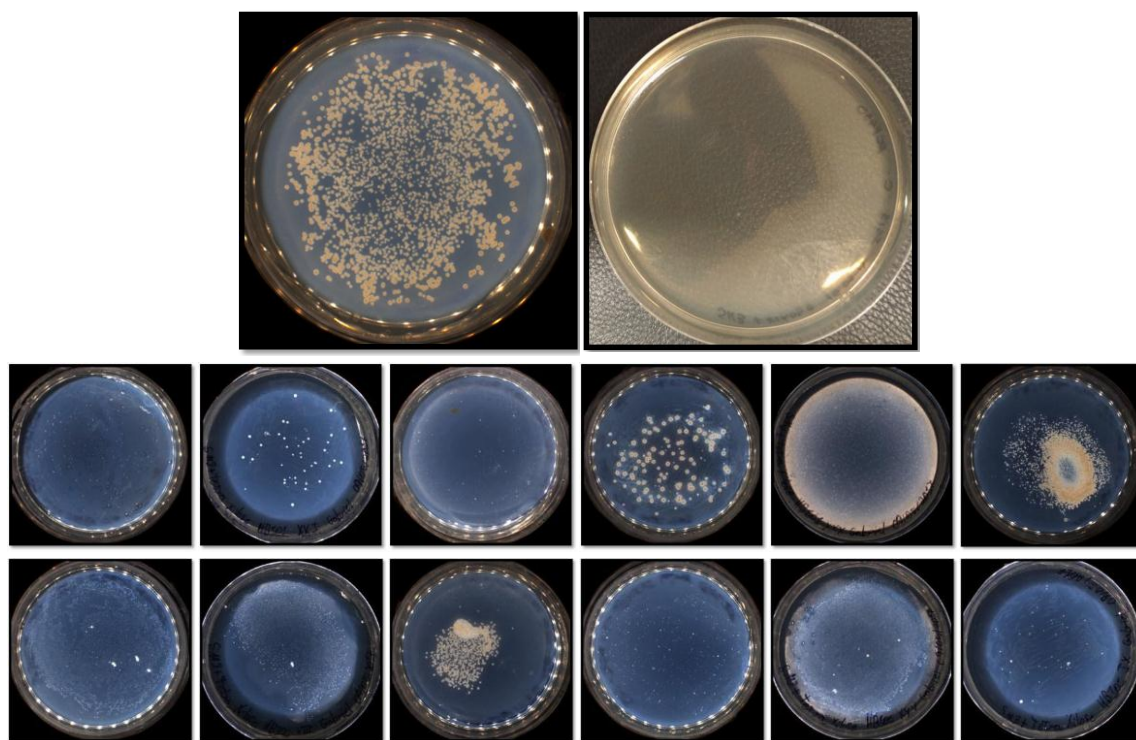


Figura 2. Os 12 clones transformados em meio SM3 com tetraciclina e xilose como única fonte de carbono, juntamente com os controles positivo (Xy 2G) e negativo (respectivamente as duas primeiras placas acima das demais). Da esquerda para direita, começando na fileira superior: Xy XXIX, Xy XXI, Xy XXVII, Xy XIX, Xy XXX, Xy XXVIII, Xy XVII, Xy VIII, Xy XXIV, Xy VI, Xy XXV e Xy IX.

Fotos: Gabriel de Souza Colombo

Para confirmação adicional da identidade dos clones, a fim de se obter resultados mais confiáveis, será realizada a digestão dos clones pela enzima PstI, após a retirada do vetor das células por minipreparação plasmidial. Assim que os clones

forem digeridos, os insertos serão submetidos a eletroforese em gel de agarose 1%, para comparação do padrão de bandas. Em seguida, os clones que apresentarem maiores chances de possuir um gene que codifica para uma xilose isomerase serão enviados para o sequenciamento por terceiros, para serem posteriormente analisados por meio de ferramentas de bioinformática. Na metodologia de *screening* baseada na sequência, os clones previamente enviados para sequenciamento por Mendes (2016) mostraram-se, em sua maioria, pertencentes a xilose isomerase de organismos distintos. A análise das sequências consenso montadas a partir dos 10 fragmentos de 750 pb obtidos por Mendes (2016) revelou que, das 10 sequências consenso obtidas, 7 são similares à xilose isomerase de diferentes bactérias do rúmen caprino, uma apresentou similaridade a uma bactéria não cultivada e duas sequências não apresentaram semelhança a xilose isomerases presentes no banco de dados nr do GenBank (NCBI).

Conclusão

A fração hemicelulósica da biomassa utilizada para a produção de etanol de segunda geração não é aproveitada para este fim. Leveduras que apresentassem a capacidade de realizar a fermentação alcoólica da xilose presente na hemicelulose se mostrariam como um avanço na produção de bioetanol. Os possíveis genes codificantes para xilose isomerase apresentados neste trabalho podem potencialmente permitir um eficiente consumo da xilose por parte de leveduras como *Saccharomyces cerevisiae*, se esta for modificada por meio de engenharia genética. Os possíveis clones positivos obtidos pela metodologia de *screening* baseada na função irão ser posteriormente transformados em *S. cerevisiae* para avaliar a taxa de crescimento em meio com xilose como única fonte de carbono, após a análise do sequenciamento dos clones. Análises adicionais dos contigs obtidos pela metodologia de *screening* baseada na sequência serão realizadas para a garantia de maior confiabilidade nos resultados obtidos. Em um trabalho consecutivo, serão apresentados os resultados observados após a avaliação do crescimento de *S. cerevisiae* em meio com xilose e as análises adicionais das sequências consenso obtidas.

Agradecimentos

Agradeço à minha orientadora, Betania Ferraz Quirino, juntamente às minhas amigas e professoras não oficiais, Ísis Viana Mendes e Betulia de Moraes Souto, por toda a ajuda e apoio que me deram, além dos bons momentos. Agradeço também à Embrapa Agroenergia, pelo acolhimento e pela oportunidade de poder ter a minha primeira experiência de trabalho nessa grande empresa.

Referências

- BRAT, D.; BOLES, E.; WIEDEMANN, B. Functional Expression of a Bacterial Xylose Isomerase in *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 75, n. 8, p. 2304-2311, 2009.
- CHERUBINI, F. The biorefinery concept: Using biomass instead of oil for producing energy and chemicals. *Energy Conversion and Management*, v. 51, n. 7, p. 1412-1421, 2010.

GAVRILESCU, M.; CHISTI, Y. Biotechnology: a sustainable alternative for chemical industry. **Biotechnology Advances**, v. 23, n. 7-8, p. 471-499, 2005.

ISIKGOR, F. H.; BECER, C. R. Lignocellulosic biomass: a sustainable platform for the production of bio-based chemicals and polymers. **Polymer Chemistry**, v. 6, n. 25, p. 4497-4559, 2015.

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**, v. 4, n. 1, p. 69-78, 2003.

MENDES, Í. V. **Identificação de novos genes de xilose isomerase em biblioteca metagenômica de rúmen de caprino**. 2016. 44 f. TCC (Graduação) - Curso de Ciências Biológicas, Universidade Católica de Brasília, Brasília, DF.

SARKAR, N.; SUMANTA K. G.; SATARUPA B.; KAUSTAV A. Bioethanol production from agricultural wastes: an overview. **Renewable Energy**, v. 37, n. 1, p. 19-27, 2012.

Caracterização molecular de transformantes de *Trichoderma lentiforme* CFAM-422 visando à identificação de genes envolvidos na clivagem de polissacarídeos

Rebeca Alves Felix¹, Gláucia Emy Okida Midorikawa², Ayla Santana da Silva³,
Elba Pinto da Silva Bon⁴, Léia Cecília de Lima Fávoro⁵

Resumo

Aumentar a eficiência da hidrólise enzimática da biomassa lignocelulósica é um desafio para aproveitar melhor essa fonte para produção de biocombustíveis e químicos. O uso de microrganismos capazes de produzir alta concentração de enzimas para hidrólise em substratos de baixo custo é apresentado como uma solução para o processo. A Embrapa Agroenergia está realizando o melhoramento genético de *Trichoderma lentiforme* CFAM-422, com o objetivo de alcançar níveis mais elevados de produção de enzimas (hemi) celulolíticas. Como parte desse projeto, fez-se a caracterização enzimática e molecular de 11 agrotransformantes de *T. harzianum* CFAM-422 previamente obtidos (SHIMIZU et al., 2015), visando à identificação de genes envolvidos na produção de enzimas lignocelulolíticas. Os resultados de testes enzimáticos mostraram que alguns transformantes apresentam perfil enzimático diferente quando comparado à linhagem parental. A região de inserção de T-DNA foi amplificada por TAIL-PCR com os iniciadores específicos LB1, LB2 e LB3 e iniciadores degenerados AD1, AD2 e AD3. Os resultados obtidos até o momento mostraram que os fragmentos não flanqueavam o T-DNA, por isso é necessário realizar novas análises de PCR-TAIL com outros iniciadores degenerados para identificar as mudanças genéticas nessas cepas.

Palavras-chave: mutagênese insercional. transformação mediada por *Agrobacterium tumefaciens*. melhoramento genético. fungos filamentosos.

Introdução

O interesse no uso da biomassa para a produção de biocombustíveis e químicos tem despertado a atenção da comunidade científica para os desafios técnicos que precisam ser superados (MARGEOT et al., 2009). Um desses desafios é a sacarificação eficiente da biomassa em decorrência do alto custo das enzimas para a hidrólise.

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

² Bióloga, pós-doutoranda, Embrapa Agroenergia, glaucia.midorikawa@colaborador.embrapa.br

³ Bióloga, doutora em Bioquímica, Universidade Federal do Rio de Janeiro, aylasantana@gmail.com

⁴ Bióloga, pós-doutora em Engenharia Bioquímica, Universidade Federal do Rio de Janeiro, elba1996@gmail.com

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

Fungos como *Trichoderma*, *Aspergillus* e *Penicillium* são reconhecidos por sua capacidade de produzir enzimas para aplicação no processo de conversão enzimática da biomassa vegetal. No entanto, tais microrganismos podem ter limitações na produção de uma ou outra enzima celulolítica, limitando a eficiência do processo de hidrólise (KUMAR et al., 2008).

A Embrapa Agroenergia está realizando o melhoramento genético da cepa *T. harzianum* CFAM-422 para atingir maiores níveis de produção de enzimas celulolíticas. Como parte desse projeto, uma biblioteca de 402 transformantes desse fungo foi obtida por transformação mediada por *Agrobacterium tumefaciens* (SHIMIZU et al., 2015). Nesse contexto, o objetivo deste estudo foi realizar a caracterização enzimática e molecular desses transformantes, visando à identificação de genes envolvidos na produção de enzimas lignocelulolíticas em *T. harzianum* CFAM-422.

Materiais e métodos

Caracterização do perfil de degradação de polissacarídeos dos transformantes selecionados

Foram selecionadas 11 linhagens de agrotransformantes de *T. harzianum* CFAM-422 da biblioteca previamente obtida (SHIMIZU et al., 2015), que apresentaram diferentes valores de índice enzimático em substrato carboximetilcelulose em comparação com o parental CFAM-422. Em seguida, um ensaio enzimático foi realizado para determinar o perfil de degradação de outros polissacarídeos desses transformantes selecionados. Foi utilizado o meio mínimo de *Aspergillus nidulans* (PONTECORVO et al., 1953), sendo a glicose substituída por 10 g/L de cada polissacarídeo: carboximetilcelulose, xilana, pectina (pH 5), pectina (pH 7) ou amido. Os transformantes foram inoculados nesses meios seletivos (triplicata) e incubados durante 4 dias a 28 °C. Após esse período, foi avaliada a capacidade de degradar o substrato, analisando a formação de halo de hidrólise, revelada por meio do uso de corantes específicos (HANKIN; ANAGNOSTAKIS, 1975). O índice enzimático (EI) foi calculado (como EI = diâmetro de degradação halo / diâmetro da colônia).

Extração de ácidos nucleicos de conídios e confirmação da transformação por PCR

Os ácidos nucleicos dos 11 transformantes selecionados foram extraídos de conídios, como descrito por Fávoro (2009), com modificações (SHIMIZU et al., 2015). A quantificação foi realizada por análise em espectrofotômetro. A confirmação da transformação foi realizada por PCR com os iniciadores hph1 e hph2 para o gene que confere resistência à higromicina B, localizado no T-DNA (FAVARO, 2009). As reações foram realizadas em volume final de 25 µL, com dNTP 0,2 mM; MgCl₂ 3,7 mM; Tampão 1X; 0,2 U de Taq DNA polymerase (Invitrogen) e 0,2 µM de cada iniciador. A amplificação foi realizada em termociclador com desnaturação inicial a 94 °C durante 5 min, seguido por 30 ciclos de amplificação (1 min a 94 °C, 1 min a 60 °C e 1 min a 72 °C) e extensão final por 7 minutos a 72 °C. O DNA do vetor pFAT-gfp foi usado como controle positivo. Os produtos de amplificação foram avaliados por eletroforese em gel de agarose, corados com brometo de etídio e fotodocumentado sob luz UV.

Amplificação de regiões que flanqueiam o T-DNA por TAIL-PCR, clonagem e sequenciamento

As regiões que flanqueiam o T-DNA foram amplificadas por TAIL-PCR (Thermal Asymmetric Interlaced Polymerase Chain Reaction) (LIU; WHITTIER, 1995). Três reações de PCR sucessivas foram realizadas utilizando iniciadores específicos para sequências da borda esquerda do T-DNA (LB1, LB2 e LB3) juntamente com primers degenerados (AD1, AD2 e AD3) descritos por Fávoro (2009). A amplificação por TAIL-PCR foi realizada seguindo as condições descritas por Mullins et al. (2001). Os produtos foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1,2%, corados com brometo de etídio e fotodocumentados sob luz UV. Esses produtos foram clonados em pGEM-T easy (Promega) e transformados em *Escherichia coli* DH10B. Os plasmídeos contendo as inserções foram extraídos, purificados e sequenciados com os primers universais M13F e M13R (Eurofins, Brasil).

Resultados e Discussão

A estratégia de mutagênese insercional aleatória mediada por *A. tumefaciens* foi estabelecida para *T. harzianum* CFAM-422 e uma biblioteca de transformantes foi previamente obtida e caracterizada visando à identificação de genes de interesse (SHUMIZU et al., 2015). Um modo simples e rápido de triagem de agrotransformantes para avaliação da capacidade de produção de enzimas hidrolíticas é o uso de testes em meio de cultura sólido. Nesse contexto, 11 transformantes previamente caracterizados quanto à produção de endoglicanase, em substrato carboximetilcelulose (SHIMIZU et al., 2015), foram caracterizados no presente estudo também quanto à capacidade de produção de xilanase, amilase e pectinases (pectina liase e poligalacturonase). A análise enzimática mostrou que alguns transformantes apresentam diferenças de valores de índice enzimático em comparação com a linhagem parental. As mudanças observadas foram relacionadas tanto ao aumento dos valores de índice enzimático, quanto à perda total da capacidade de degradação, conforme resultados mostrados na Tabela 1.

De acordo com os dados apresentados, para o meio carboximetilcelulose as linhagens 67, 90, 161 e 564 apresentaram maior diferença de degradação do parental. Já para o substrato pectina pH 5 (produção de poligalacturonase), as linhagens que se destacaram foram 67, 81 e 564. Alterando o pH da pectina para 7 (pectina liase), apenas duas linhagens apresentaram perfil diferente, 90 e 564. No substrato xilana, as linhagens diferentes do parental foram 111, 387 e 584. Por fim, para o meio de amido, todas as linhagens apresentaram o mesmo perfil de degradação que o parental. Devido a esses resultados, essas cepas foram selecionadas para caracterização dessas diferenças a nível molecular.

Tabela 1: Avaliação do índice enzimático de 11 agrotransformantes de *T. harzianum* CFAM-422 em carboximetilcelulase, pectina pH 5, pectina pH 7, xilana e amido, em comparação à linhagem selvagem.

Linhagem	Substratos avaliados									
	Carboximetil-celulose	Pectina pH 5		Pectina pH 7		Xilana		Amido		
		Desvio padrão		Desvio Padrão		Desvio padrão		Desvio padrão		Desvio padrão
CFAM-422	1,01	0,02	1,21	0,19	3,33	0,07	1,37	0,03	1,00	0,00
67	1,17	0,02	1,47	0,05	3,50	0,16	1,21	0,02	1,00	0,00
80	1,00	0,01	1,29	0,01	3,23	0,14	1,26	0,01	1,00	0,00
81	1,00	0,01	1,47	0,06	2,97	0,25	1,33	0,04	1,00	0,00
90	1,14	0,06	1,32	0,01	3,61	0,04	1,24	0,02	1,00	0,00
111	1,00	0,00	1,31	0,09	3,17	0,24	1,74	0,02	1,00	0,00
161	1,14	0,01	1,28	0,01	3,36	0,12	1,25	0,01	1,00	0,00
166	1,00	0,00	1,34	0,08	3,36	0,02	1,28	0,02	1,00	0,00
364	1,06	0,11	1,26	0,01	3,25	0,08	1,24	0,04	1,00	0,00
387	-	-	1,37	0,12	3,26	0,04	1,00	0,00	-	-
564	1,29	0,08	1,40	0,04	2,94	0,08	1,32	0,02	1,00	0,00
584	1,01	0,01	1,27	0,06	3,33	0,06	1,50	0,13	1,00	0,00

Os valores representam a média de três repetições. A degradação de carboximetilcelulose, xilana, pectina (pH 5), pectina (pH 7) e amido indica a produção, respectivamente, de: endoglicanase, xilanase, poligalacturonase, pectina liase e amilase. Valores de índice enzimático superiores a 1 indicam a degradação do substrato.

Com relação à amplificação do gene *hph*, todas as 11 linhagens foram confirmadas quanto à presença desse gene, em comparação com a linhagem parental (dados não mostrados). Os resultados exibidos nas Figuras 1 e 2 mostraram que a amplificação das regiões flanqueadoras do T-DNA com os iniciadores degenerados AD1, AD2 e AD3 foi mais eficiente na reação secundária de TAIL-PCR, com amplificação positiva para sete linhagens.

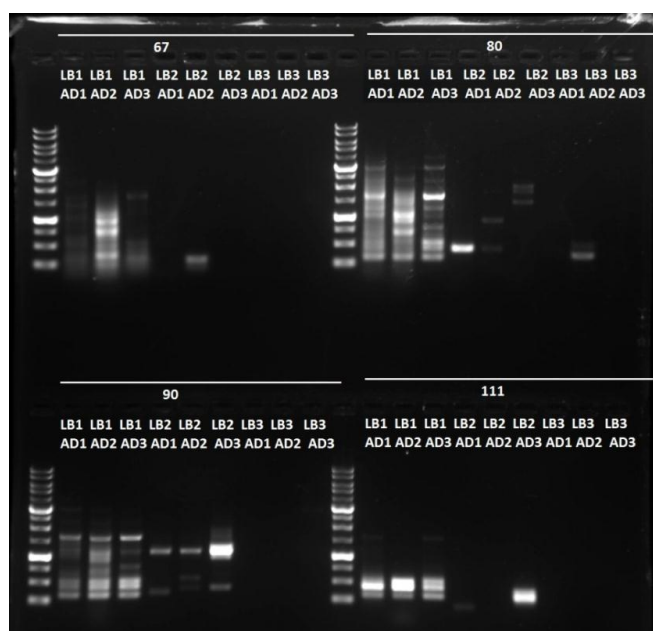


Figura 1. Resultado de análise de TAIL-PCR para os transformantes 67, 80, 90 e 111. Para cada linhagem foi realizada a reação primária, secundária e terciária para os primers degenerados AD1, AD2 e AD3.

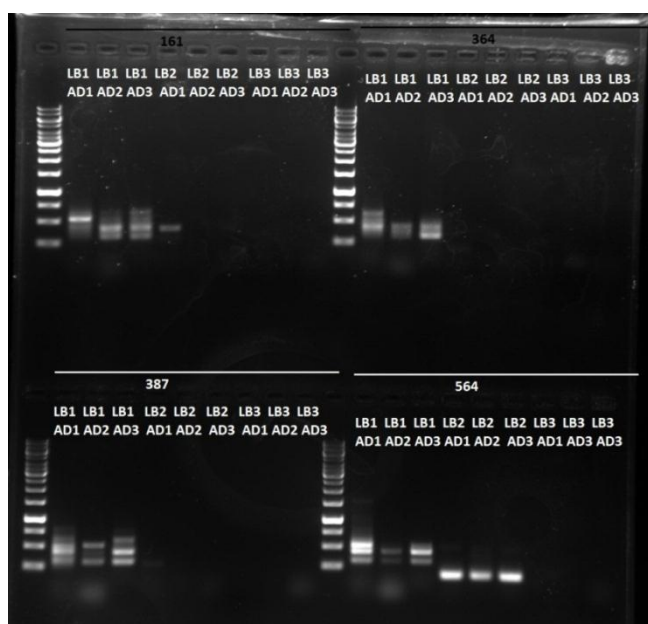


Figura 2. Resultado da análise de TAIL-PCR para os transformantes 161, 364, 378 e 564. Para cada linhagem foi realizada a reação primária, secundária e terciária para os primers degenerados AD1, AD2 e AD3.

Conclusões

A partir da análise de sequenciamento dos produtos da TAIL-PCR clonados, conclui-se que as regiões amplificadas não flanqueiam o T-DNA. É necessário realizar a TAIL-PCR com outros iniciadores degenerados para identificar e analisar a sequência de T-DNA determinando-se os genes envolvidos na desconstrução de polissacarídeos nessa espécie de fungo.

Agradecimentos

Rebeca Felix agradece por todo o conhecimento proporcionado pela pesquisa e à sua orientadora, Léia Fávaro.

Referências

- FAVARO, L. C. de L. **Diversidade e interação de *Epicoccum* spp. com cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L.)**. 2009. 291 f. il. Tese (Doutorado) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Piracicaba, SP.
- HANKIN, L.; ANAGNOSTAKIS, S. L. O uso de meios sólidos para a detecção de produção de enzimas por fungos. *Micologia*, v. 67, p. 597-607, 1975.
- KUMAR, R.; SINGH, S.; SINGH, O. V. Bioconversion of lignocellulosic biomass: biochemical and molecular perspectives. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, v. 35, n. 5, p. 377-391, 2008.
- LIU, Y. G.; WHITTIER, R. F. Thermal asymmetric interlaced PCR: Automatable amplification and sequencing of insert end fragments from P1 and YAC clones for chromosome walking. *Genomics*, v. 25, n. 3, p. 674-681, 1995.

MARGEOT, A.; HAHN-HAGERDAL, B.; EDLUND, M.; SLADE, R.; MONOT, F. Novas melhorias para o etanol lignocelulósico. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 20, n. 3, p. 372-380, 2009.

MULLINS, E. D.; CHEN, X.; ROMAINE, P.; RAINA, R.; GEISER, D. M.; KANG, S. Agrobacterium-mediated transformation of *Fusarium oxysporum*: An efficient tool for insertional mutagenesis and gene transfer. **Phytopathology**, v. 91, n. 2, p. 173-180, 2001.

PONTECORVO, G.; ROPER, J. A.; HEMMONS, L. M.; MCDONALD, K. D.; BUFTON, A. W. J. The genetics of *Aspergillus nidulans*. **Advances in Genetics**, v. 5, p. 141-238, 1953.

SHIMIZU, A. M. F. ; JARAMILLO, P. M. D. ; MIDORIKAWA, G. E. O. ; SILVA, A. S. ; BON, E. P. S; FAVARO, L. C. de L. Transformação mediada por *Agrobacterium tumefaciens* do fungo celulótico *Trichoderma harzianum* CFAM422 e obtenção de uma biblioteca de transformantes. In: ENCONTRO DE PESQUISA E INOVAÇÃO DA EMBRAPA AGROENERGIA, 2., 2015, Brasília, DF. **Anais ... Brasília, DF: Embrapa Agroenergia**, 2015. p. 45-47.

Determinação de agente seletivo para seleção de transformantes de *Trichoderma lentiforme* CFAM-422

Elisa Zaparoli Ramos¹, Jhessica Couto Araújo², Gláucia Emy Okida Midorikawa³, Ayla Santana da Silva⁴, Leda Maria Fortes Gottschalk⁵, Léia Cecília de Lima Fávaro⁶, Elba Pinto da Silva Bon⁷

Resumo

O uso de materiais lignocelulósicos mostrou ser uma ótima oportunidade para o desenvolvimento industrial sustentável. Entretanto para que a degradação dos polissacarídeos desses materiais em açúcares fermentescíveis, que ocorre naturalmente no meio ambiente, se transforme em um processo industrial, são necessárias misturas enzimáticas altamente eficientes e de baixo custo. Nesse contexto, fungos celulolíticos do gênero *Trichoderma* têm sido intensamente estudados, usando técnicas de engenharia genética, para o aumento da secreção de enzimas degradadoras dos polissacarídeos da biomassa. Os estudos de transformação genética de fungos incluem o uso de genes marcadores seletivos que conferem ao microrganismo resistência, por exemplo, a compostos antifúngicos, possibilitando a seleção de linhagens modificadas geneticamente. Embora esse seja um tema muito estudado, linhagens diferentes apresentam respostas individualizadas em relação a esses compostos, sendo necessários estudos para a determinação do agente seletivo mais eficiente para um dado microrganismo. Dessa forma, esse trabalho teve por objetivo avaliar a sensibilidade do fungo *Trichoderma lentiforme* (linhagem CFAM-422) a diversos compostos antifúngicos visando determinar agentes seletivos adequados para futuros experimentos de transformação. Entre os diversos compostos antifúngicos avaliados, em concentrações variadas, o herbicida glufosinato (Lybert) e o ácido 5-Fluorítico monohidratado (5-fluoritic acid monohydrate – ácido 5-FOA) inibiram completamente o crescimento do fungo na concentração de 2.000 µg/mL. Esses compostos serão utilizados para a seleção de transformantes de *Trichoderma lentiforme* modificados geneticamente visando ao aumento da sua capacidade celulolítica, em relação à linhagem selvagem CFAM-422.

Palavras-chave: *Trichoderma lentiforme*. transformação genética. método de seleção.

¹ Biotecnologista, mestranda em Bioquímica, Universidade Federal do Rio de Janeiro, elisa.ramos@colaborador.embrapa.br

² Bióloga, pesquisadora colaboradora da Embrapa Agroenergia, couto.jhessica2011@gmail.com

³ Bióloga, doutora em Biologia Molecular, pós-doc na Embrapa Agroenergia, glauciaemy@gmail.com

⁴ Bióloga, doutora em Genética e Melhoramento de Plantas, pesquisadora na Embrapa Agroenergia, leia.favaro@embrapa.br

⁵ Bióloga, doutora em Bioquímica, pesquisadora do Instituto Nacional de Tecnologia, ayla.santana@int.gov.br

⁶ Engenheira Química, doutora em Engenharia Química, pesquisadora da Embrapa Agroindústria de Alimentos, leda.fortes@embrapa.br

⁷ Bióloga, doutora em Engenharia Bioquímica, professora titular da Universidade Federal do Rio de Janeiro, elba1996@gmail.com

Introdução

A abundância da biomassa lignocelulósica e o crescente interesse pelo uso de xaropes de biomassa como insumos para a produção de biocombustíveis e produtos químicos de forma sustentável têm impulsionado o desenvolvimento da hidrólise enzimática dos polissacarídeos desses materiais. Nesse contexto, a prospecção e o desenvolvimento de linhagens fúngicas com alta expressão de celulases, xilanases e outras enzimas e proteínas acessórias são de importância fundamental. Paralelamente aos estudos de prospecção de linhagens produtoras, avançaram os estudos da expressão gênica em microrganismos que produzem enzimas relacionadas à degradação desses materiais (ZAMPIERI, 2015; HAMRE et al., 2015).

Os microrganismos do gênero *Trichoderma* têm uma grande importância industrial, sendo um dos mais utilizados para a produção de enzimas celulolíticas, pesticidas e também como agentes de controle biológico (MUKHERJEE et al., 2013; LIU; YANG, 2005). Dentre as espécies de *Trichoderma*, o *T. harzianum*, mostrou-se um bom produtor de um complexo celulolítico bem equilibrado em termos das atividades de endoglucanases e β -glicosidases (CASTRO, 2010a). Apesar disso, para a conversão efetiva do material lignocelulósico a açúcares fermentescíveis, ainda são necessárias misturas enzimáticas de mais de um gênero de microrganismo, porém a sinergia entre os diferentes grupos de celulases produzidos por culturas puras é, muitas vezes, melhor do que o observado extrato de coculturas. Dessa maneira, é necessário aplicação de técnicas moleculares para obtenção de um microrganismo capaz de produzir um extrato enzimático para a realização de uma hidrólise altamente eficiente e de baixo custo (CASTRO, 2010b).

De modo geral, para que seja possível a obtenção de transformantes, é necessário utilizar estratégias de seleção, como as baseadas na seleção de um composto tóxico apenas para a cepa selvagem. As células mutantes que não possuírem a capacidade de formar o composto tóxico crescerão na presença do precursor inerte (AVALOS et al., 1989; BOEKE et al., 1987). Os marcadores de seleção dominantes, tais como resistência a compostos antifúngicos, são os mais adequados, porém escassos (SIGL et al., 2010). Entre os marcadores mais utilizados, está o gene *hph* de *Escherichia coli*. Sua utilidade é ampla, pois o agente seletivo correspondente (higromicina B) é tóxico para cepas de tipo selvagem de muitos fungos e a seleção costuma ser inequívoca (STRAUBINGER et al., 1992). Outro método comum é a utilização do ácido 5-FOA para a seleção de células auxotróficas (Ura^-) em meio a uma população de células prototróficas (Ura^+). A seleção é efetiva em estudos de transformação e recombinação, em que a perda de URA^+ é desejada para obter mutantes auxotróficos (BOEKE et al., 1987). No entanto, a sensibilidade de cada espécie e de cada linhagem é diferente em relação ao reagente e sua concentração.

Nesse contexto, este trabalho teve por objetivo selecionar agentes seletivos efetivos, adicionados ao meio de cultivo, para estudos futuros de modificações genéticas de *Trichoderma lentiforme* (linhagem CFAM-422), visando ao aumento da sua capacidade celulolítica.

Metodologia

Obtenção e Propagação do Microrganismo

A linhagem CFAM-422 (*T. harzianum*) foi selecionada por Souza et al. (2011) dentre várias linhagens isoladas da Amazônia. Essa linhagem se encontra preservada na coleção de “Microrganismos e Microalgas Aplicados a Agroenergia e Biorrefinarias” da Embrapa Agroenergia (Brasília, DF). A propagação da linhagem foi efetuada por cultivo em placas de Petri contendo o meio de cultura PDA (*Potato Dextrose Agar*). A preservação da linhagem foi feita pelo método de Castellani (1967): foram cortados discos de uma cultura esporulada em placa de Petri e colocados em frascos com água destilada estéril que foram mantidos à temperatura ambiente. Os conídios foram obtidos por meio da raspagem das placas com solução de Tween 80 (0,1%).

Teste de sensibilidade

A linhagem CFAM-422 de *Trichoderma lentiforme* foi avaliada quanto à sensibilidade a diversos agentes antifúngicos por meio da inibição do crescimento em meio mínimo conforme Pontecorvo et al. (1953). Placas de petri (60x15 mm) com esse meio foram preparadas contendo oito diferentes antifúngicos em diversas concentrações, sendo estas: 10, 20, 50 e 100 ($\mu\text{g/mL}$) para blasticidina ; 50, 75, 100, 200, 500 e 1.000 ($\mu\text{g/mL}$) para neomicina, zeocina e gentamicina; 100, 200, 400, 800 e 1000 ($\mu\text{g/mL}$) para carbenicilina; 50, 100, 500, 1000, 2000, 4000 ($\mu\text{g/mL}$) para ácido 5-FOA; 50, 100, 200, 500, 1000 e 2.000 ($\mu\text{g/mL}$) para herbicida glufosinato; 50, 100, 200, 500, 1000 e 2000, 5000 ($\mu\text{g/mL}$) para acetamida. Uma solução de esporos (conídios) foi preparada por meio da raspagem de uma placa de PDA contendo o microrganismo esporulado (após 7 dias de cultivo) em 5 mL de Tween 80 0,1%. Dessa solução, 5 μL foram plaqueados no centro de cada placa preparada nas condições descritas acima. As placas foram incubadas a 28 °C e avaliadas quanto ao crescimento em comparação com o controle (meio de cultura sem o agente seletivo).

Resultados e discussão

A partir da medida de diâmetros de crescimento da colônia das placas, foi possível avaliar a sensibilidade do microrganismo a cada antifúngico e ao ácido 5-FOA. Na Figura 1, foram mostradas algumas concentrações como padrão de comparação, as concentrações omitidas mantiveram o padrão de crescimento das placas anteriores. Para a blasticidina, neomicina, zeocina, gentamicina e acetamida, a linhagem CFAM-422 apresentou certa sensibilidade nos primeiros dias de crescimento, porém, após o quinto dia o microrganismo cresceu ocupando toda a placa (60 mm). Em relação à acetamida, não houve diferença do crescimento do controle para qualquer concentração testada do reagente, na faixa de 50 $\mu\text{g/mL}$ até 5000 $\mu\text{g/mL}$. Esses dados indicam que a linhagem selvagem tem uma resistência natural a esses compostos, até mesmo em concentrações mais altas.

Como observado, a partir da concentração de 2.000 $\mu\text{g/mL}$ de ácido 5-FOA e herbicida glufosinato, não houve desenvolvimento da linhagem CFAM-422. Isso indica que, a partir dessas concentrações, esses compostos se tornaram tóxicos à cepa selvagem, causando a total repressão de seu crescimento. Dessa forma, quando

utilizados como método de seleção, apenas os mutantes que obtiverem o gene de resistência irão crescer sobre o meio, permitindo a seleção e distinção dos transformantes perante a cepa selvagem.

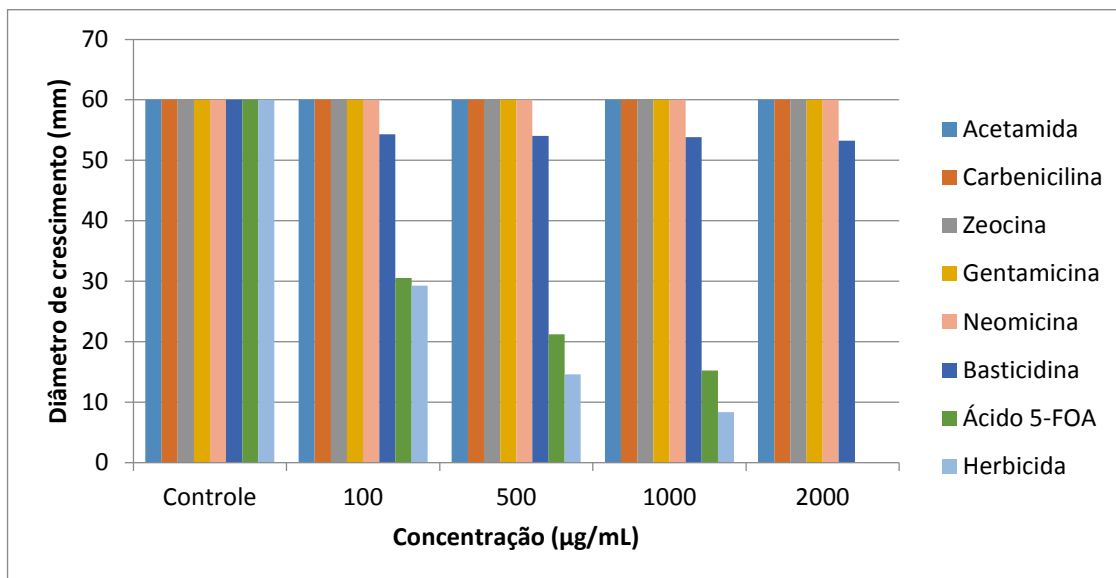


Figura 1. Sensibilidade da linhagem CFAM-422. O gráfico apresenta o diâmetro de crescimento das colônias em relação às diversas concentrações dos reagentes acetamida, carbenicilina, zeocina, gentamicina, blastacidina, ácido 5-FOA e herbicida glufosinato, após 7 dias de incubação.

Conclusões

A linhagem CFAM-422 apresentou resistência natural aos antifúngicos blastacidina, neomicina, zeocina, gentamicina e acetamida, excluindo a possibilidade de utilização desses reagentes como agentes seletivos. No entanto, concentrações a partir de 2.000 µg/mL do ácido 5-FOA e do herbicida glufosinato resultaram na total inibição do crescimento da cepa. Como cada linhagem reage de maneira diferente a cada agente e concentração, é necessário verificar e determinar um agente seletivo eficaz. Nesse caso, foi descoberta a sensibilidade da cepa CFAM-422 para o herbicida glufosinato e o ácido 5-FOA nas concentrações de 2.000 µg/mL. Dessa maneira, esses compostos poderão atuar como potenciais agentes seletivos para futuros experimentos de transformação genética dessa linhagem.

Agradecimentos

À Embrapa Agroenergia e ao Laboratório Bioetanol IQ-COPPE/ UFRJ.

Referências

AVALOS, J.; GEEVER, R. F.; CASE, M. E. "Bialaphos Resistance As A Dominant Selectable Marker In *Neurospora Crassa*". **Current Genetics**, v. 16, n. 5-6, p. 369-372, 1989.

BOEKE, J. D.; TRUEHEART, J.; NATSOULIS, G.; FINK, G. R. 5-Fluoroorotic Acid As A Selective Agent In Yeast Molecular Genetics. **Methods in Enzymology**, v. 154, p. 164-175, 1987.

- CASTELLANI, A. Maintenance and cultivation of the common pathogenic fungi of man in sterile distilled water. Further researches. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 70, p. 181-184, 1967.
- CASTRO, A. M.; FERREIRA, M. C.; DA CRUZ, J. C.; PEDRO, K. C. N. R.; CARVALHO, D. F.; LEITE, S. G. F.; PEREIRA, N. High-Yield endoglucanase production by *Trichoderma harzianum* IOC-3844 cultivated in pretreated sugarcane mill byproduct. **Enzyme Research**, article ID 854526, 2010a.
- CASTRO, A. M.; PEDRO, K. C. N. R.; DA CRUZ, J. C.; FERREIRA, M. C.; LEITE, S. G. F.; PEREIRA, N. *Trichoderma harzianum* IOC-4038: A promising strain for the production of a cellulolytic complex with significant B-glucosidase activity from sugarcane bagasse cellulignin. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 162, n. 7, p. 2111-2122. 2010b.
- HAMRE, A. G.; EIDE K. B.; WOLD H. H.; SØRLIE, M. Activation of enzymatic chitin degradation by a lytic polysaccharide monooxygenase. **Carbohydrate Research**, v. 407, p. 166-169, 2015.
- MUKHERJEE, P.; HORWITZ, B. A.; ESTRELLA, A. H.; SCHMOLL, M.; KENERLEY C. M. *Trichoderma* research in the genome era. **Annual Review of Phytopathology**, v. 51, n. 1, p. 105-129, 2013.
- PONTECORVO, G.; ROPER, J. A.; HEMMONS, L. M.; MCDONALD, K. D.; BUFTON, A. W. J. The genetics of *Aspergillus nidulans*. **Advances in Genetics Incorporating Molecular Genetic Medicine**, v. 5, p.141-238, 1953.
- SOUZA, M. F.; GONÇALVES, H. R. A.; FERNANDES, O. C.; BOM E. P.; SILVA, A. S. Produção de enzimas celulolíticas e hemicelulolíticas por fungos filamentosos isolados da Amazônia: seleção de uma linhagem promissora. In: SIMPÓSIO NACIONAL DE BIOPROCESSOS - SINAFERM, 18., 2011, Caxias do Sul. [Anais...]. Caxias do Sul: Universidade de Caxias do Sul, 2011.
- STRAUBINGER, B.; STRAUBINGER E.; WIRSEL, S.; TURGEON, G.; YODER, O. Versatile fungal transformation vectors carrying the selectable bar gene of *Streptomyces hygroscopicus*. **Fungal Genetics Reports**, v. 39, n. 1, p. 82-83, 1992.
- ZAMPIERI, D. **Expressão gênica e atividade de celulases, β -glicosidases, xilanases e swoleninas de *Penicillium echinulatum* S1M29**. 2015. 236 p. Tese (Doutorado) - Universidade de Caxias do Sul- Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia. Universidade Federal de Caxias do Sul, Caxias do Sul, RS.

Otimização de métodos de extração de DNA genômico dos basidiomicetos *Panus lecomtei* CC40 e *Pleurotus pulmonarius* EF88

Hetiene Pereira Marques¹, Félix Gonçalves de Siqueira², André Leão³,
Manoel Teixeira Souza Jr.⁴

Resumo

Este estudo teve como objetivo estabelecer um método de extração de DNA genômico para duas espécies de basidiomicetos (fungos da podridão-branca) *Panus lecomtei* CC40 e *Pleurotus pulmonarius* EF88. Tendo como premissas para otimização do método características que permeiam a simplificação da extração, rapidez e eficiência, de modo a garantir a qualidade do DNA e, consequentemente, a acurácia na construção de bibliotecas de DNA para sequenciamento do genoma de fungos do filo Basidiomycota. Os métodos de extração testados foram fenol-clorofórmio-álcool isoamílico (CTAB) e dodecil sulfato de sódio (SDS), tendo sido avaliada a interferência dos tipos de cultivos (fermentação submersa – FS ou Fermentação Estado Sólido – FES) para obtenção da biomassa micelial a ser utilizada para a extração do DNA. Os resultados mostram que CTAB foi o melhor método, principalmente para *P. lecomtei* CC40, em que o rendimento foi de 1.506 µg de DNA/g da amostra na condição FS. A FS foi a melhor condição para obtenção de micélio e rendimento de DNA para os dois basidiomicetos avaliados, indicando razão de pureza do DNA de até 1,8, que é o valor mínimo desejado.

Palavras-chave: extração DNA. CTAB. fungos da podridão-branca. SDS.

Introdução

Fungos da podridão-branca compreendem um importante grupo de fungos classificados no filo basidiomycota. Esses fungos são conhecidos pela capacidade de potencializar a biodegradação da biomassa lignocelulósica, como, por exemplo, na obtenção de etanol de segunda geração. Algumas espécies de basidiomicetos apresentam em seu genoma genes ligados a processos de deslignificação, que podem

¹ Bióloga, doutoranda em Biotecnologia Vegetal, Universidade Federal de Lavras.
hetiene.marques@colaborador.embrapa.br

¹ Biólogo, doutor em Biologia Molecular, pesquisador da Embrapa Agroenergia, felix.siqueira@embrapa.br

¹ Biólogo, mestre em Genética e Melhoramento Vegetal, analista da Embrapa Agroenergia, andre.leao@embrapa.br

¹ Engenheiro-agrônomo, doutor em Fitopatologia/Biologia Molecular, pesquisador da Embrapa Agroenergia,
manoel.souza@embrapa.br

facilitar o processo de hidrólise enzimática da biomassa e a obtenção de açúcares fermentescíveis (ROUCHES et al., 2016).

Panus lecomtei CC040 e *Pleurotus pulmonarius* EF88 são dois fungos podridão-branca pertencentes à Coleção de Microrganismos e Microalgas Aplicados à Biorrefinaria, da Embrapa Agroenergia. Esses fungos apresentaram potencial biotecnológico para destoxificação de tortas oleaginosas oriundas das sementes de pinhão-mansão e caroço de algodão. Também apresentaram resultados significativos quando cultivados em resíduos da dendeicultura, quanto à geração de enzimas oxidativas e hidrolíticas. Por isso, eles foram selecionados para estudos, visando, inicialmente, à decodificação do genoma completo dos mesmos. Para tanto, há a necessidade de purificação de DNA total em quantidade e qualidade que condizem com a demanda apresentada pelas técnicas modernas de sequenciamento de DNA.

A extração de DNA total de alta qualidade e em quantidade é um passo crítico na construção de uma biblioteca de DNA genômico. Em basidiomicetos são relatadas algumas desvantagens em relação aos métodos de extração de DNA, tais como: (i) o fato de serem demorados, laboriosos e caros, (ii) a necessidade de alta quantidade de amostra, (iii) o baixo rendimento e concentração do DNA, (iiii) a baixa qualidade de DNA (SABARATNAM; VIKINESWARY, 2013).

Neste estudo, o objetivo foi estabelecer dois diferentes métodos de extração de DNA genômico de fungos da podridão-branca, visando à obtenção de DNA total de alta qualidade e em quantidade suficiente para ser empregado em projeto de sequenciamento dos genomas completos dos fungos *Panus lecomtei* CC40 e *Pleurotus pulmonarius* EF88.

Materiais e métodos

Material biológico

Foram utilizadas duas linhagens de basidiomicetos causadores da podridão-branca, *Pannus lecomtei* CC40 e *Pleurotus pulmonarius* EF88, pertencentes à Embrapa, que estão inclusas na Concessão de autorização de acesso ao patrimônio genético nº 02001.007474/2014-73.

Os fungos foram crescidos em dois sistemas de cultivos: (i) Fermentação Estado Sólido (FES) em batata dextrose ágar (BDA) em placas de petri, incubados a 29 °C por 7 dias e (ii) Fermentação Submersa (FS) em caldo de batata, incubados sob agitação a 120 rpm a 29 °C por 7 dias.

O micélio foi retirado do FES com auxílio de uma pinça estéril, para maceração em nitrogênio líquido. Para a maceração do micélio oriundo da FS, este foi filtrado em discos de papel com filtro de Büchner de porcelana ligado à bomba de vácuo e, posteriormente, lavado com água destilada esterilizada.

Métodos de extração do DNA genômico

Método 1: CTAB-fenol-clorofórmio-álcool isoamílico

Os micélios macerados dos dois tipos de fermentações (200 mg) foram individualmente colocados em microtubos de 2 mL e adicionado 600 µL do tampão de extração CTAB (DOYLE; DOYLE, 1990). Os microtubos foram colocados em banho-maria por 45 min a 65 °C, homogeneizando (vortex) as amostras a cada 10 minutos. Um volume de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1) foi adicionado ao macerado, que fora agitado em vórtex e centrifugado a 14.000 rpm por 10 min. O sobrenadante recolhido foi transferido para novos microtubos, aos quais foram adicionados Proteinase K (55 °C por 40 min) e, posteriormente, RNase (10 µg/ml), incubando por 1 h a 37 °C em termobloco. Após essa última incubação, adicionou-se 400 µL de álcool isoamílico. Os microtubos foram novamente centrifugados a 14.000 rpm por 10 min, e a fase aquosa foi coletada e transferida para novos microtubos, aos quais se adicionou 0,6 volume de isopropanol. Os tubos ficaram 2 horas a -20 °C para precipitação do DNA. Após esse período, o DNA foi centrifugado a 14.000 rpm por 15 min e o *pellet* lavado uma vez com etanol absoluto e outra com etanol 70%. Finalmente, o DNA foi ressuspensionado em 50 µL de água MiliQ® esterilizada e os microtubos foram armazenados a -80 °C.

Método 2: Dodecil sulfato de sódio (SDS - 10%)

Os micélios macerados dos dois tipos de fermentações (200 mg) foram transferidos para microtubos de 2 mL contendo 1 mL do tampão de extração SDS 10% (RAEDER; BRODA, 1985). Após a homogeneização por inversão manual os microtubos foram incubados por uma hora a 65 °C em banho-maria. Após esse período, os microtubos foram resfriados para 37 °C, com adição de RNase A (10 µg/m), e incubados por uma hora em termobloco seco a 37 °C. Após a incubação, foi adicionado em cada microtubo o equivalente a um volume de fenol equilibrado, homogeneizando as fases por inversão manual dos microtubos. Os microtubos foram centrifugados por 10 min a 14.000 rpm a 4 °C e 900 µL do sobrenadante foi coletado e transferido para novo microtubo de 2 mL. Foi adicionado um volume de fenol:clorofórmio (1:1). Os microtubos foram homogeneizados por inversão manual e centrifugados a 14.000 rpm a 4 °C. O sobrenadante foi coletado e transferido para um novo microtubo de 2 mL, onde foi adicionado igual volume de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1), homogeneizando as fases por inversão manual e posterior centrifugação a 14.000 rpm a 4 °C por 10 min. A fase aquosa foi coletada (600 µL), transferida para um novo microtubo de 1,5 mL, com adição de 0,6 volume de isopropanol para a precipitação dos ácidos nucleicos e centrifugada a 14.000 rpm a 4 °C por 30 minutos. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* lavado com 500 µL de etanol 70%. O etanol foi descartado e os microtubos secos em termobloco a 50 °C por 15 min. O DNA foi ressuspensionado em 50 µL de água MiliQ esterilizada e os microtubos armazenados a -80 °C.

Determinação da qualidade e quantidade de DNA

A concentração e a pureza do DNA extraído foram determinadas por espectrofotômetro NanoDrop (Thermo Fisher Scientific, USA). A concentração do DNA foi registrada em ng/µL, enquanto a pureza foi baseada na razão entre as taxas de

densidade óptica (OD) em um comprimento de onda entre 260 nm e 280 nm. A integridade do DNA de cada método foi determinada por eletroforese em gel de agarose em tampão de corrida TAE1X a 0,7%.

Resultados e discussões

Neste trabalho, foi possível validar o método de extração de DNA genômico, de alto rendimento e de alta qualidade, para as duas espécies de basidiomicetos estudadas. O método CTAB proporcionou melhores resultados para as amostras de DNA extraído de *Panus lecomtei* CC40 e *Pleurotus pulmonarius* EF88, principalmente quando cultivados por fermentação submersa (Tabela 1).

Tabela 1. Rendimento do DNA genômico dos fungos da podridão-branca *Panus lecomtei* CC40 e *Pleurotus pulmonarius* EF88 testados em diferentes métodos de extração.

Método	Fungo	Meio de cultivo	Rendimento*	Pureza**
SDS	CC40	FES	18,04	1,60
		FS	88,81	1,94
	EF88	FES	16,57	1,46
		FS	84,05	1,95
CTAB	CC40	FES	107,27	1,81
		FS	1506,06	2,15
	EF88	FES	73,75	1,68
		FS	832,12	2,19

* Rendimento: µg DNA/g amostra; ** Pureza: A260/A280. Cada valor de rendimento e pureza mencionado é a média da triplicata para cada ensaio. Legenda: FES (Fermentação Estado Sólido); FS (Fermentação Submersa).

A diferença no rendimento do DNA genômico entre os meios de cultivos FES e FS ocorreu em virtude da dificuldade da separação do micélio do meio da FES, o que causou perda de micélio e aumento da probabilidade de contaminação por proteínas. Quando cultivado em FS, a separação do micélio e meio de cultivo ocorreu com maior facilidade em função da filtragem e lavagem, não havendo sujidade ou resíduos, melhorando o processo de extração do DNA. Essa situação também foi descrita por (MCCARTNEY et al., 2003), em cujo experimento fungos cultivados em FS apresentaram melhores condições para a obtenção do DNA em relação ao cultivo em FES utilizando ágar.

O rendimento do DNA foi maior para *P. lecomtei* CC40 do que o *P. pulmonarius* EF88 em ambos os métodos avaliados (SDS e CTAB) e nas duas condições de cultivo (FES e FS). No entanto, no método CTAB proporcional, o maior rendimento de DNA na condição FS para os dois fungos, sendo 1.506,06 para (CC40) e 832,12 para (EF88). Isso pode ser explicado pela organização estrutural da membrana e as proteínas que a compõe, pelos microrganismos que podem ser diferentes em função do metabolismo das fontes de carbono e nitrogênio e também pela disponibilidade de oxigênio (ARACHEA et al., 2012).

A razão entre as leituras a 260 nm e 280 nm permite saber a pureza do DNA extraído. Uma razão de 1.8 significa 100% de qualidade. A razão inferior a esse valor indica contaminação de proteínas e a razão superior a 2.0 indica contaminação de RNA. Nota-se na Tabela 1 que alguns valores em ambos os métodos de extração, quando o fungo foi cultivado em FES, foram abaixo de 1.8, enquanto nos cultivos em FS essa razão ficou acima de 1.9.

O método CTAB e a FS, além de ter melhor rendimento do DNA, apresentou melhores resultados na qualidade do DNA, mostrados nas bandas do gel de agarose, como apresentado na Figura 1.

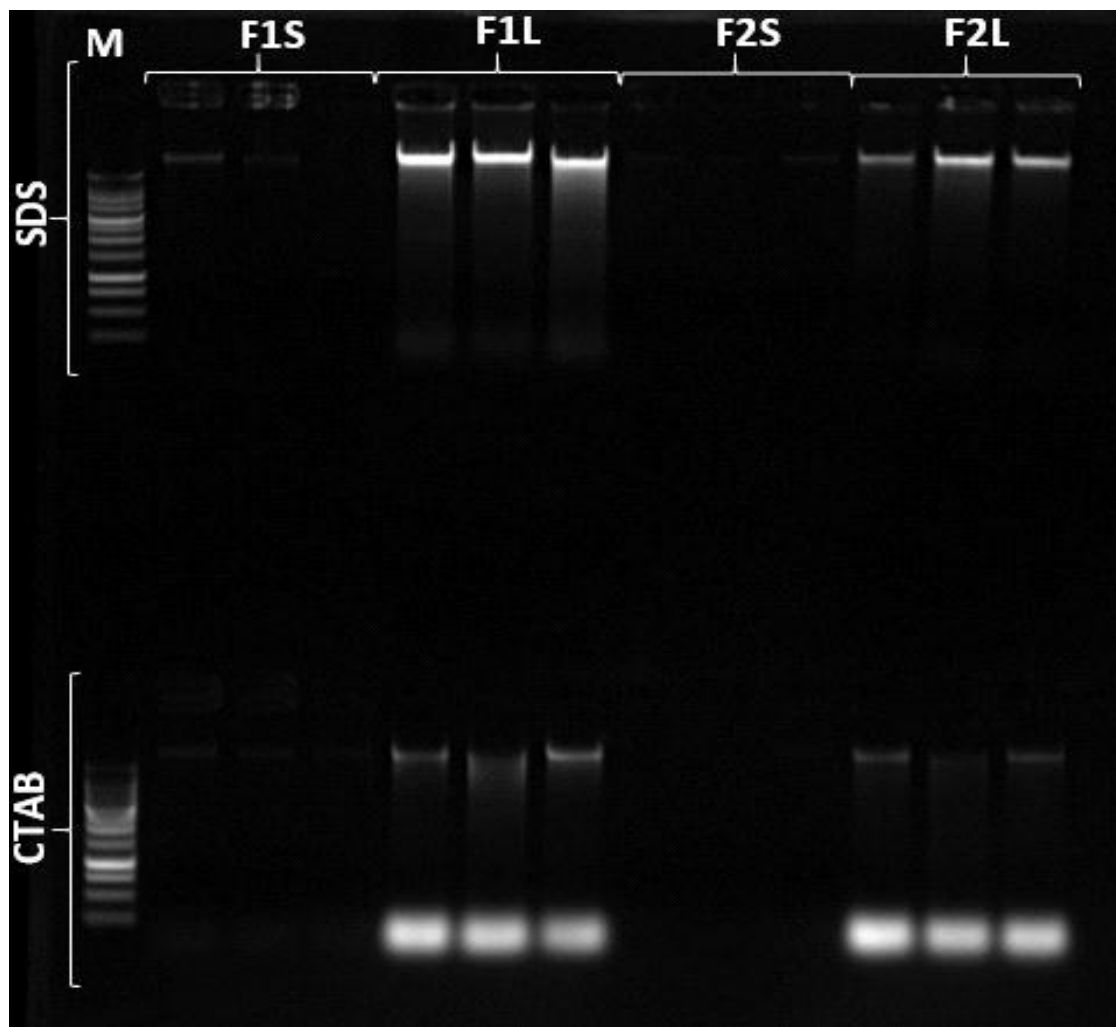


Figura 1. Perfil de extração DNA genômico de *Panus lecomtei* CC40 (F1) *Pleurotus pulmonarius* EF88 (F2), extraído por meio dos métodos SDS e CTAB. As letras S (FES) e L(FS) correspondem a fermentações estado sólido (FES) e submersa, respectivamente. M= Marcador de peso molecular; Lambda/HIDIII.

Em relação à qualidade do DNA, pode-se observar claramente a diferença entre bandas obtidas entre os métodos de extração (Figura 1). A FS apresentou bandas nítidas para os dois fungos avaliados nas triplicatas realizadas nos dois tipos de métodos. A FES não apresentou bandas visíveis ou muito fracas. Isso pode ter ocorrido em função da baixa concentração de DNA da amostra (Tabela 1)

É importante ressaltar, como mostrado na Tabela 1, que houve um rendimento do DNA no protocolo CTAB de até 10 vezes maior do que no método SDS. Assim, no gel de eletroforese foi aplicado 10µl de DNA para SDS e 1µL de DNA para CTAB. Mesmo com menor quantidade de amostra de DNA no gel, o método CTAB mostrou maior nitidez na formação das bandas (Figura 1). Isso pode ser notado principalmente na FS, tanto para *P. lecomtei* CC40 quanto para *P. pulmonarius* EF88, em que as bandas do DNA estão mais evidenciadas.

Conclusão

O método CTAB obteve melhores resultados de rendimento e qualidade do DNA genômico para *Panus lecomtei* CC40 e *Pleurotus pulmonarius* EF88. A fermentação submersa apresentou os melhores rendimentos de DNA para ambos os fungos avaliados.

Referências

- ARACHEA, B. T.; SUN, Z.; POTENTE, N.; MALIK, R.; ISAILOVIC, D.; VIOLA, R. E. Detergent selection for enhanced extraction of membrane proteins. **Protein Expression and Purification**, v. 86, n. 1, p. 12-20, 2012.
- DOYLE, J. J.; DOYLE J. L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, v. 12, p. 13-15, 1990.
- MCCARTNEY, H. A.; FOSTER, S. J.; FRAAIJE, B. A.; WARD, E. Molecular diagnostics for fungal plant pathogens. **Pest Management Science**, v. 59, n. 2, p. 129-142, 2003.
- RAEDER, U.; BRODA, P. Rapid preparation of DNA from filamentous fungi. **Letters in Applied Microbiology**, v. 1, n. 1, p. 17-20, 1985.
- ROUCHES, E.; GIMBERT, I.; STEYER, J-P.; CARRERE, H. Improvement of anaerobic degradation by white-rot fungi pretreatment of lignocellulosic biomass: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 59, p. 179-198, 2016.
- SABARATNAM, S.; VIKINESWARY. A simple and low-cost technique of DNA extraction from edible mushrooms examined by molecular phylogenetics. **Research on Crops**, v. 14, n. 3, 2013.

Bioprospecção de fungos endofíticos de *Paullinia cupana* e *Rhizophora mangle* produtores de enzimas lignocelulolíticas

Jéssica de Sá Guimarães Peixoto¹, Paula Marcela Duque Jaramillo², Valquíria Martins Pereira³, Fabrício Machado Silva⁴, Léia Cecília de Lima Fávaro⁵

Resumo

Um dos desafios para a bioconversão de biomassa lignocelulósica é o aumento da eficiência de hidrólise enzimática dos polissacarídeos da parede celular vegetal. Para isso, a prospecção de fungos endofíticos pode ser uma ferramenta promissora para seleção de linhagens com habilidades lignocelulolíticas. Por serem simbioses das plantas, esses fungos são capazes de produzir enzimas e desconstruir lignocelulose e não têm sido totalmente explorados para produção de enzimas industriais. O objetivo deste trabalho foi avaliar uma coleção de fungos endofíticos de guaranazeiro (*Paullinia cupana* var. *sorbilis*) e de plantas de manguezal (*Rhizophora mangle*) quanto à produção de enzimas lignocelulolíticas e selecionar potenciais linhagens que possam produzir enzimas para composição de coquetéis catalíticos na etapa de conversão de biomassa lignocelulósica em monômeros de carboidratos. Desse modo, foram avaliadas 304 linhagens de fungos endofíticos quanto à capacidade de degradar polissacarídeos em meio de cultura sólido (Avicel, cmc, xilana, pectina e amido), por meio da determinação do índice enzimático, que é dado pela razão entre o diâmetro médio do halo de degradação e o diâmetro médio da colônia. A identificação dos fungos foi por biologia molecular por meio de análise da sequência da região ITS1-5.8S-ITS2 do DNA ribossômico. A partir disso, foram selecionadas 30 linhagens promissoras, pertencentes a espécies que não têm sido tradicionalmente utilizadas na bioindústria e que possuem índice enzimático significativo. Essas linhagens poderão ser potenciais candidatos para a produção de extratos enzimáticos capazes de atuar na hidrólise de biomassa lignocelulósica.

Palavras-chave: biomassa lignocelulósica. hidrólise enzimática. fungos filamentosos.

Introdução

A produção de energia e de químicos renováveis a partir da bioconversão de biomassa lignocelulósica é uma alternativa para minimizar a utilização de combustíveis

¹ Bióloga, doutoranda em Tecnologias Químicas e Biológicas, Universidade de Brasília, jessica.peixoto@colaborador.embrapa.br

² Bacteriologista (Biomédica), doutora em Biologia Molecular, Universidade de Brasília, jaramillo526@gmail.com

³ Graduada Ciências Agrárias, doutora em Biotecnologia Vegetal, Universidade Federal de Lavras, valquiria.pereira@colaborador.embrapa.br

⁴ Engenheiro Químico, doutor em Engenharia Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, professor-adjunto do Instituto de Química da Universidade de Brasília, fmachado@unb.br

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

fósseis e para agregar valor a diferentes cadeias produtivas. Diante do exposto, o foco das pesquisas atuais direciona-se para a busca por soluções que mantenham integradas todas as etapas do processo, independentemente das diferentes rotas tecnológicas utilizadas, como meio de otimizar a produção do etanol de biomassa.

Dentre os desafios encontrados, pode-se citar o aumento da eficiência da hidrólise enzimática. Uma das barreiras encontradas pelas enzimas hidrolíticas é a recalcitrância da parede celular vegetal e mais especificamente da estrutura de celulose, que permace na porção interior das microfibrilas emaranhada com a hemicelulose e lignina. A clivagem dos polissacarídeos da parede celular vegetal geralmente é realizada pela ação de enzimas de fungos, como observado na ecologia microbiana de solos de florestas, por exemplo.

O interior das plantas é reconhecido como um nicho prolífico para a descoberta de fungos com novas atividades biológicas (FÁVARO et al., 2012). Nesse contexto, fungos endofíticos, definidos como os que habitam, pelo menos por um período de seu ciclo de vida, o interior da planta sem induzir sintomas de doenças ou produzir estruturas externas (AZEVEDO; ARAÚJO, 2007) teriam potencial para a produção de enzimas de interesse industrial pouco exploradas até momento (CORREA et al., 2014). O fato de que os endófitos são simbiossiontes das plantas sugere que eles são capazes de produzir enzimas, fazendo-os capazes de desconstruir lignocelulose e convertê-la a açúcares fermentescíveis. Para testar essa hipótese, este estudo realizou a caracterização molecular e enzimática de fungos endofíticos de *Paullinia cupana* e *Rhizophora mangle* visando selecionar novas linhagens produtoras de enzimas degradadoras de parede celular vegetal.

Materiais e Métodos

Linhagens

Neste estudo, foram avaliados 266 fungos endofíticos de guaranazeiro (*Paullinia cupana*) e 38 fungos de uma planta típica de região de mangue (*Rhizophora mangle*). As 304 linhagens encontram-se preservadas na “Coleção de Microrganismos e Microalgas Aplicados a Agroenergia e Biorrefinarias” da Embrapa Agroenergia. Os fungos foram reativados e cultivados em meio ágar batata-dextrose (BDA) a 25 °C por 7 dias.

Análise de sequência do DNA ribossômico (ITS1-5.8S-ITS2) e classificação taxonômica dos fungos

Os DNAs genômicos das 304 linhagens foram extraídos e utilizados como molde para amplificação por PCR da região ITS do rDNA com os primers ITS1 e ITS4 e sequência parcial do gene da beta-tubulina. Após o sequenciamento, a sequência consenso foi obtida com auxílio do software Geneious v. 9.0. Para classificação taxonômica, as sequências foram avaliadas nas bases de dados: NCBI, CBS, MycoBank, RDP, TrichOKEY e Fusarium-ID.

Índice enzimático: capacidade de produção de enzimas para degradação de polissacarídeos

A produção de enzimas foi avaliada em meio sólido (PONTECORVO et al., 1953) com 1,0% de carboximetilcelulose (cmc), de xilana ou de amido, para detecção de endoglicanase, xilanase e amilase, respectivamente. A degradação de pectina foi analisada em meio contendo 0,5% de pectina, em pH 5,0 e 7,0, para detecção de poligalacturonase e pectina liase, respectivamente (HANKIN; ANAGNOSTAKIS, 1975). A produção de celulasas totais foi avaliada em meio mínimo de sais (PONTECORVO et al., 1953) contendo Avicel PH-101 (celulose microcristalina). As linhagens foram incubadas a 25 °C por 6 dias. Os halos de degradação foram revelados com os corantes lugol e vermelho congo. O índice enzimático (IE) foi calculado por meio da razão entre a média do diâmetro do halo e a média do diâmetro da colônia. A produção de celulasas totais foi inferida pelo diâmetro das colônias crescidas em meio contendo celulose microcristalina. Os experimentos foram realizados em triplicata. Os dados foram analisados com auxílio do software Genes (CRUZ, 2006) e submetidos à análise de variância. As médias foram comparadas pelo teste de *Scott-Knott*, ao nível de 5% de significância.

Seleção de linhagens fúngicas promissoras de atividades holocelulolíticas

Os critérios para a seleção de linhagens promissoras quanto à produção de enzimas foram: classificação taxômica, perfil de degradação de polissacarídeos, valores elevados de índice enzimático e análise da literatura. Para a escolha por meio da classificação taxômica, foi adotado o critério de busca por espécies pouco ou não contempladas na literatura, favorecendo as linhagens que não possuem genoma sequenciado, selecionando fungos inéditos quanto ao potencial biotecnológico. Com relação à determinação do perfil de degradação de polissacarídeos (CMC, xilana, pectina e amido), foram considerados os valores de índice enzimático estatisticamente superiores a 1 e a capacidade de cada linhagem de degradar os substratos (degradação exclusiva e /ou simultânea de vários substratos).

Resultados e Discussão

Identificação molecular dos fungos endofíticos presentes em *P. cupana* e *R. mangle*

As 304 linhagens foram cultivadas e submetidas à extração de DNA genômico. Produtos de amplificação únicos da região ITS1-5.8S-ITS2 do DNA ribossômico foram obtidas para 158 linhagens. A Figura 1 representa algumas linhagens amplificadas utilizando os *primers* ITS1-F e ITS4. Os fungos foram classificados utilizando análise de sequências contra diferentes bases de dados. As 158 linhagens foram classificadas em 19 gêneros diferentes, conforme mostrado na Figura 2.

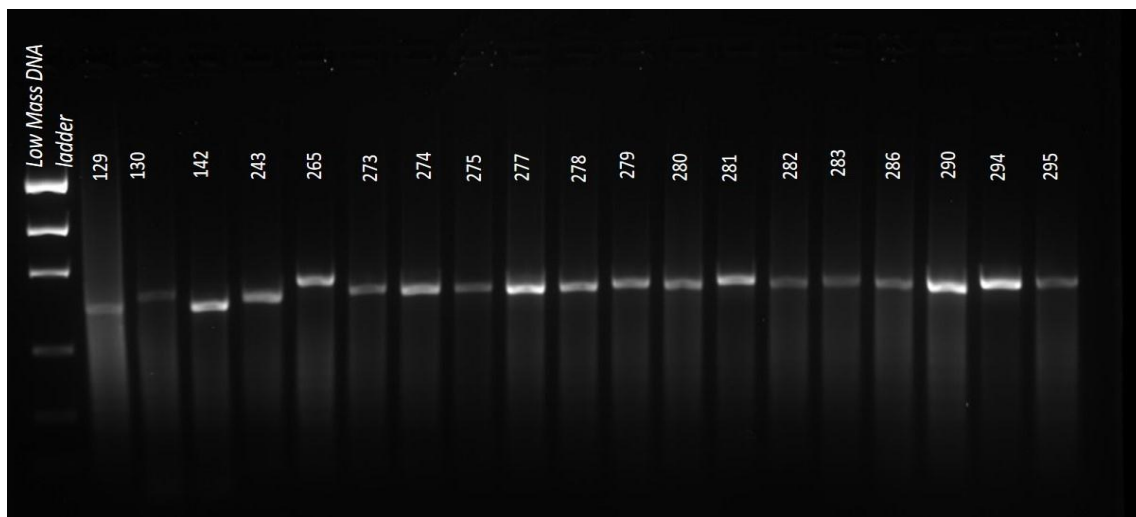


Figura 1. Produtos purificados de amplificação da região ITS1-5.8S-ITS2 do DNA ribossômico de fungos endofíticos de *P. cupana* e *R. mangle*.

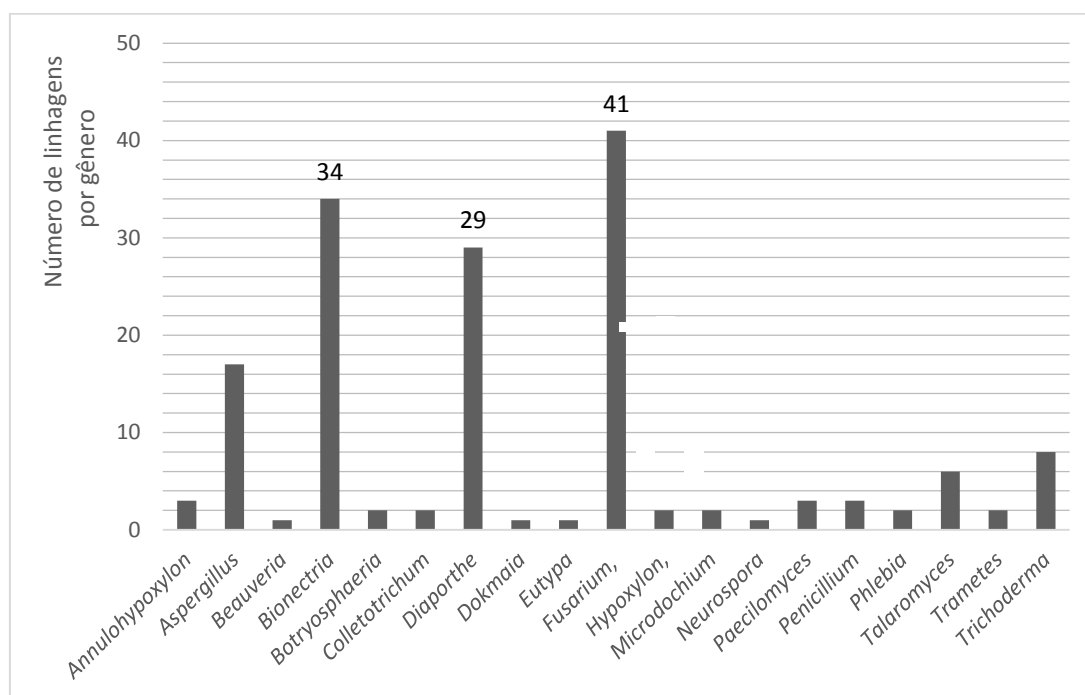


Figura 2. Distribuição de gêneros diferentes entre as 158 linhagens de fungos endofíticos de *P. cupana* e *R. mangle* que apresentaram sequências de qualidade (região ITS do rDNA ou gene betatubulina).

Das 158 linhagens avaliadas quanto à taxonomia, 5 pertencem ao filo Basidiomycota e 153 pertencem ao filo Ascomycota. Entre os ascomicetos, 123 pertencem à classe Sordariomycetes, 26 pertencem à classe Eurotiomycetes e 4 pertencem à classe Dothideomycetes.

Caracterização enzimática de fungos endofíticos de *P. cupana* e *R. mangle*

A Figura 3 resume os resultados dos testes enzimáticos. Os maiores valores de índice enzimático observados foram: 4,18 ($\pm 0,44$) em cmc (*Diaporthe* sp. CED428); 5,26 ($\pm 1,34$) em xilana (*Bionectria* sp. CE100/161); 6,36 ($\pm 0,07$) em pectina pH 7,0 (*Bionectria* sp. CE100/161); 4,03 ($\pm 0,98$) em pectina pH 5,0 (*Fusarium* sp. CED334); 4,14 ($\pm 0,04$) em amido (*Fusarium* sp. CED334). O crescimento em Avicel foi observado para 301 linhagens, mas somente 40 apresentaram crescimento máximo (≥ 75.0 mm) nesse substrato.

Com a análise de correlação realizada pelo teste de *Scott-Knott* foi possível observar diferenças significativas ($p < 0,01$) quanto à capacidade de produção de enzimas e agrupar as 304 linhagens em 27 perfis distintos (classes fenotípicas), de acordo com o padrão de degradação (simultânea ou exclusiva) dos polissacarídeos avaliados.

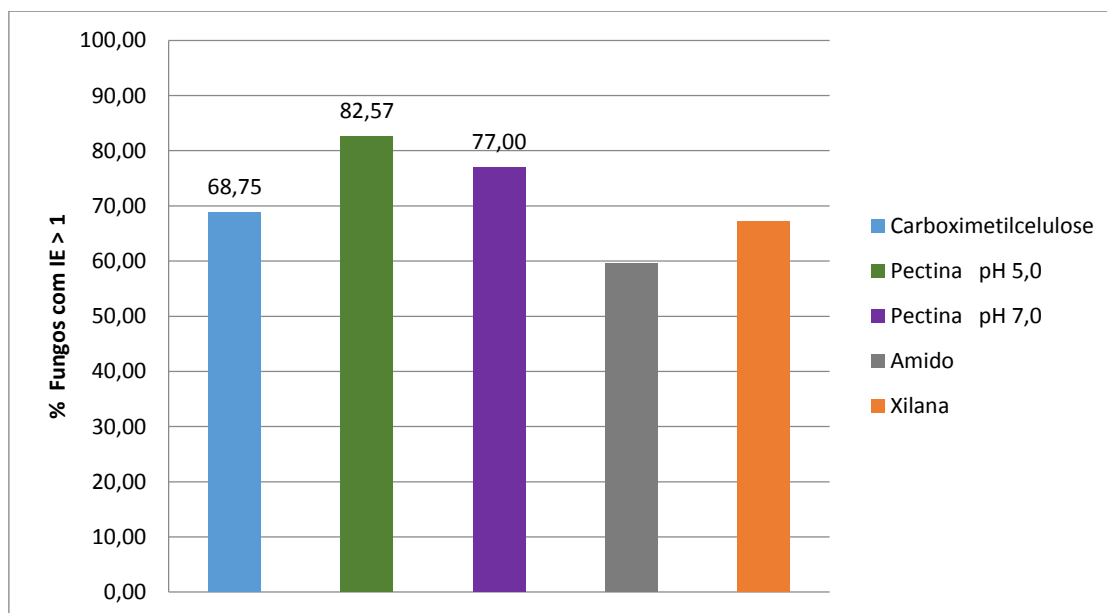


Figura 3. Porcentagem de fungos endofíticos de *P. cupana* e *R. mangle* que apresentaram índice enzimático (IE) > 1 em diferentes substratos. A pectina, em pH 5,0, foi utilizada para detecção de poligalacturonase e, em pH 7,0, para pectina liase. Para as demais fontes, utilizou-se o pH 6,0.

Seleção de fungos endofíticos de *P. cupana* e *R. mangle* promissores para estudos de hidrólise enzimática

Diante dos critérios adotados para seleção de candidatos para estudos posteriores, como taxonomia, maiores índices enzimáticos e análise de literatura foram selecionadas 30 linhagens promissoras, conforme mostrado na Tabela 1.

As linhagens selecionadas pertencem a espécies e gêneros que não têm sido utilizados para produção de enzimas lignocelulolíticas em nível industrial.

Tabela 1. Linhagens de fungos endofíticos selecionadas com base nos critérios múltiplos: taxonomia, índice enzimático e perfil de degradação de polissacarídeos.

Identificação taxonômica ^(*)	Linhagem	Origem
<i>Annulohyphoxylon stygium</i>	CED426	<i>P. cupana</i>
<i>Aspergillus</i> sp. (<i>aculeatus</i>)	EP593	<i>P. cupana</i>
<i>Bionectria</i> sp.	CE101/161	<i>P. cupana</i>
<i>Bionectria</i> sp.	CED326	<i>P. cupana</i>
<i>Botryosphaeria</i> sp. (<i>ribis</i>)	EP555	<i>P. cupana</i>
<i>Colletotrichum</i> sp.	CED449B	<i>P. cupana</i>
<i>Criptovalsa</i> sp.	RZ511	<i>P. cupana</i>
<i>Diaporthe</i> sp.	12G	<i>R. mangle</i>
<i>Didymosphaeria</i> sp. (<i>variabile</i>)	EP654	<i>P. cupana</i>
<i>Eutypa</i> sp.	CED428	<i>P. cupana</i>
<i>Fusarium solani</i>	BDA79 (11A)	<i>R. mangle</i>
<i>Fusarium</i> sp.	CED382	<i>P. cupana</i>
<i>Fusarium</i> sp.	BDA6A (2A)	<i>R. mangle</i>
<i>Fusarium</i> sp.	2G	<i>R. mangle</i>
<i>Hypoxylon investiens</i>	EP647	<i>P. cupana</i>
N.I.	CED413	<i>P. cupana</i>
N.I.	CE101	<i>P. cupana</i>
N.I.	CED412	<i>P. cupana</i>
N.I.	EP551/1	<i>P. cupana</i>
N.I.	CED409	<i>P. cupana</i>
N.I.	CP230	<i>P. cupana</i>
N.I.	BDA64 (9A)	<i>R. mangle</i>
N.I.	CED371	<i>P. cupana</i>
<i>Neofusicoccum</i> sp.	RZ482	<i>P. cupana</i>
<i>Phlebia</i> sp.	CE103	<i>P. cupana</i>
<i>Purpureocillium lilacinum</i>	CED440	<i>P. cupana</i>
<i>Sarocladium</i> sp. (<i>strictum</i>)	CED448	<i>P. cupana</i>
<i>Trametes versicolor</i>	BDA85 (12A)	<i>R. mangle</i>
<i>Trichoderma</i> sp. (<i>lixii</i>)	EP550	<i>P. cupana</i>
<i>Trichoderma spirale</i>	RZ476	<i>P. cupana</i>

^(*) A provável espécie é mostrada entre parênteses. NI (não identificado).

Considerações finais

Os melhores fungos identificados como bons produtores de enzimas pertencem a grupos taxonômicos que não têm sido explorados para bioconversão em nível industrial, tais como *Bionectria*, *Diaporthe* e *Fusarium*. A combinação dos diferentes critérios para seleção de linhagens pode ser uma estratégia promissora para uso em estudos de bioprospecção. Os extratos enzimáticos das linhagens selecionadas serão avaliados na hidrólise de biomassa lignocelulósica de modo a selecionar linhagens que possam ser aplicadas em bioprocessos.

Agradecimentos

À Universidade de Brasília, Capes e Embrapa Agroenergia, pelo apoio concedido na realização deste trabalho.

Referências

- AZEVEDO, J. L.; ARAÚJO, W. L. Diversity and applications of endophytic fungi isolated from tropical plants. In: GANGULI, B. N.; DESHMUKH, S. K. (Ed.). **Fungi: multifaceted microbes**. Boca Raton: CRC Press, 2007. p. 189-207.
- CORRÊA, R. C. G.; RHODEN, S. A.; MOTA, T. R.; AZEVEDO, J. L.; PAMPHILE, J. A.; MARQUES, S. M. C. C.; POLIZELI, M. L. T. M.; BRACHT, A.; PERALTA, R. M. Endophytic fungi: expanding the arsenal of industrial enzyme producers. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 41, n. 10, p. 1467-1478, 2014.
- CRUZ, C. D. **Programa genes: estatística experimental e matrizes**. Viçosa, MG: UFV, 2006. 285 p.
- FÁVARO, L. C. L.; SEBASTIANES, F. L. S.; ARAÚJO, W. L. *Epicoccum nigrum* P16, a sugarcane endophyte, produces antifungal compounds and induces root growth. **PLoS ONE**, v. 7, n. 6, artigo e36826, 2012.
- HANKIN, L.; ANAGNOSTAKIS, S. L. The use of solid media for the detection of enzyme production by fungi. **Mycologia**, v. 67, n. 3, p. 597-607, 1975.
- PONTECORVO, G.; ROPER, J. A.; HEMMONS, L. M.; MCDONALD, K. D.; BUFTON, A. W. J. The genetics of *Aspergillus nidulans*. **Advances in Genetics Incorporating Molecular Genetic Medicine**, v. 5, p. 141-238, 1953.

Sequenciamento do DNA mitocondrial de *Chlamydomonas biconvexa* revela um mitogenoma compacto

Patrícia Verdugo Pascoal¹, Sámed Ibrahim Isa Abdel Hadi², Andrei Stecca Steindorff³, Eduardo Fernandes Formighieri⁴, Bruno dos Santos Alves Figueiredo Brasil⁵

Resumo

A estirpe de microalga *Chlamydomonas biconvexa* Embrapa|LBA40 foi isolada das águas residuais de uma indústria sucroalcooleira em Goianésia, GO. Essa estirpe robusta é capaz de atingir altas produtividades de biomassa rica em proteínas e carboidratos quando cultivada em vinhaça, passivo gerado em grandes quantidades na produção de etanol de cana-de-açúcar. Neste estudo, relatamos a sequência do DNA mitocondrial de *C. biconvexa* Embrapa|LBA40. Seu DNA foi sequenciado por meio da plataforma Illumina HiSeq e Miseq e analisado *in silico* quanto ao conteúdo gênico e ao perfil filogenômico. A metodologia seguiu etapas de controle de qualidade, montagem, anotação e reconstrução filogenômica. A estirpe apresentou mitogenoma linear com estimativa de 9,27 kb de tamanho, contendo 21 genes. Entre eles, 9 codificam para proteínas, 10 para tRNAs e 2 para rRNAs, responsáveis pela manutenção da cadeia respiratória e síntese de ATP. A presença do gene *trnQ* no mitogenoma contendo o códon UUG, um padrão semelhante aos códons encontrados em bactérias (AUG, GUG, UUG), corrobora a hipótese de que alfa-proteobactérias sejam as possíveis ancestrais do genoma mitocondrial. Curiosamente, os genes da subunidade *cox2* e *cox3* estão ausentes nesse mitogenoma, dando origem a um genoma mais simples e compacto em comparação com as outras espécies de microalgas. A perda de informação genética durante a evolução deixa para a subunidade *cox1* todo o papel na geração da enzima citocromo oxidase C. A análise filogenética revelou que a cepa *C. biconvexa* Embrapa|LBA40 possui um dos menores mitogenomas de uma espécie de microalga relatado até agora.

Palavras-chave: microalgas. mitogenoma. genes. filogenômica.

Introdução

Chlamydomonas é um gênero de microalgas bastante estudado e citado quanto às suas aplicações biotecnológicas (SCRANTON et al., 2015). A espécie *Chlamydomonas biconvexa*, tratada no presente estudo, possui potencial aplicação na produção de

¹ Engenheira de Bioprocessos e Biotecnologia, mestranda em Biotecnologia, Fundação Universidade Federal do Tocantins, patricia.pascoal@colaborador.embrapa.br.

² Biotecnólogo, doutorando em Bioinformática, Universidade Federal de Minas Gerais, samed.ibrahim@colaborador.embrapa.br

³ Biólogo, doutor em Biologia Molecular, Universidade de Brasília, andrei.steindorff@colaborador.embrapa.br

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

⁵ Biólogo, doutor em Microbiologia, pesquisador da Embrapa Agroenergia, bruno.brasil@embrapa.br

biomassa com altos teores de proteínas e carboidratos de interesse para a indústria agroalimentar e de biocombustíveis; além da capacidade de ser cultivada em efluentes agroindustriais, contribuindo com a biorremediação desses resíduos líquidos (NASCIMENTO, 2016).

O estudo do mitogenoma dessa espécie contribui com o aumento de informações genéticas, uma vez que são poucos os genomas de organelas já sequenciados em microalgas do gênero e do filo Chlorophyta. Tais informações são necessárias para melhor explorar as características e o potencial biotecnológico do gênero *Chlamydomonas* e contribuir para a geração de bioprodutos de valor agregado para diversas vertentes da Biotecnologia industrial.

Materiais e Métodos

Coleta da amostra, extração do DNA e identificação da cepa

A coleta da amostra foi realizada na vinhaça da indústria sucroalcooleira Jalles Machado (Goianésia, GO). A coleta foi autorizada e registrada conforme os preceitos legais. O cultivo foi realizado em meio BBM (SCHLÖSSER, 1997) a 28 °C, com intensidade luminosa de 50 $\mu\text{Em}^{-2} \text{s}^{-1}$ e fotoperíodo 16/8h. A extração do DNA genômico total foi realizada utilizando o método CTAB (brometo de cetiltrimetilamônio) adaptado de Doyle e Doyle (1990).

Para a identificação, a cepa foi submetida à identificação morfológica, seguida de identificação molecular em que a região ITS1-5.8S-ITS2 foi amplificada por PCR e anotada. As sequências nucleotídicas do gene 5.8S e regiões ITS foram depositadas no GenBank (KT308076.2). A busca por similaridade foi realizada utilizando a ferramenta BLAST. A estrutura secundária da região ITS2 foi predita e comparada com sequências próximas na busca por CBCs e hemi-CBCs (HADI et al., 2016).

Sequenciamento

A cepa nativa do Brasil, Embrapa|LBA40, depositada na Coleção de Microrganismos e Microalgas da Embrapa Agroenergia (Brasília, DF), pertencente à espécie *Chlamydomonas biconvexa*, teve seu genoma fragmentado para a construção de duas bibliotecas: *shotgun library* (2 x 250 pb), sequenciada em plataforma Illumina MiSeq; e *jump library* 3 kb (2 x 125 pb), sequenciada em plataforma Illumina HiSeq 2500. O sequenciamento da biblioteca *paired-end (shotgun)* gerou ~34 milhões de *reads* com tamanho médio de inserto de 280 pb. Já o sequenciamento da biblioteca *jump* gerou ~35 milhões de *reads* com tamanho médio de inserto de 1.8 kb, além de ~30 milhões de *reads* com tamanho médio de inserto de 325 pb. O resultado foi uma cobertura média do genoma total de 40X. Após a obtenção dos *reads* sequenciados, foram iniciadas as análises *in silico* no Laboratório de Bioinformática em Bioenergia (LBB) da Embrapa Agroenergia.

Controle de qualidade de dados

O conjunto de dados do sequenciamento foi verificado quanto à qualidade das sequências pela ferramenta de controle de qualidade FastQC (BABRAHAM BIOINFORMATICS, 2010). Os adaptadores foram trimados por meio do software

Trimmomatic (BOLGER, 2014) com os seguintes parâmetros: ILLUMINACLIP:TruSeq3-PE.fa:3:30:10; SLIDINGWINDOW:4:20 e MINLEN:50.

Montagem do mitogenoma

A montagem do genoma foi realizada com a ferramenta de reconstrução de genoma mitocondrial, MITObim (HAHN et al., 2013), em baixa cobertura, 2X, para retirada da organela. A biblioteca utilizada foi *paired-end* (PE), previamente processada e utilizando-se o mitogenoma da espécie de referência, *Chlamydomonas reinhardtii*.

Anotação de genes mitocondriais

O processo de anotação foi efetuado com o servidor *web* para anotação mitocondrial, MITOS Web Server (BERNT et al., 2013), com a opção: Mold|Protozoan|Coelenterate.

Construção da árvore filogenética

Para a análise filogenômica, a ferramenta RAxML versão 8 (STAMATAKIS, 2014) foi aplicada com valor de bootstrap de 100. O programa FigTree (RAMBAUT, 2006) proporcionou a visualização e edição da árvore filogenômica. Foram incluídos 15 mitogenomas de outras espécies de algas verdes e utilizadas as espécies *Micromonas commoda* como o *outgroup*.

Resultados e discussão

Os 8 genes codantes presentes no genoma mitocondrial são responsáveis pela respiração celular da espécie estudada, especificamente na fosforilação oxidativa que ocorre na mitocôndria. A lista de 21 genes inclui os genes *cob*, *cox1*, *nad1*, *nad2*, *nad4*, *nad5-0_b*, *nad5-0_a*, *nad5-1* e *nad6*, além de genes que codificam para tRNAs como: *trnF*, *trnP*, *trnW*, *trnQ*, *trnI*, *trnC*, *trnN*, *trnT*, *trnM* e *trnE*, e por fim, 2 rRNAs: *rrnL* e *rrnS*.

A teoria da existência de um evento de endossimbiose para fundamentar a origem das mitocôndrias a partir de uma α -proteobacteria foi formulada por Altmann (1894) e, até hoje, vem sendo consolidada pela presença de códons de iniciação provenientes de bactérias. Basicamente, o genoma de endossimbiontes foi reduzido no conteúdo gênico e em seu tamanho, gerando uma dependência direta dos endossimbiontes com a célula hospedeira. O gene *trnQ* no mitogenoma da espécie aqui tratada contém o códon UUG, padrão similar aos códons encontrados em bactérias (AUG, GUG, UUG, AUA); sendo assim, é aceitável afirmar que o mesmo tem herança direta com α -proteobacterias, possível progenitora da mitocôndria (TANIFUJI et al., 2016).

Tabela 1. Anotação e características do mitogenoma de *Chlamydomonas biconvexa*.

Gene	Posição no Genoma		Tamanho (pb)	Proteína produto ou função
	Início	Fim		
Cob	570	1622	1053	Proteína do Apocitocromo b
nad4	1823	2851	1029	Gene da subunidade 4 da NADH desidrogenase
trnF (aaa)	3266	3332	67	RNA transportador. Códon de iniciação: aminoácido ácido glutâmico
trnP (cgg)	3464	3531	68	RNA transportador. Códon de iniciação: aminoácido arginina
nad5-0_b	3660	4259	600	Gene da subunidade 5 da NADH desidrogenase, gene dividido, parte 0_b
nad5-0_a	4271	4795	525	Gene da subunidade 4 da NADH desidrogenase, gene dividido, parte 0_a
cox1	5054	6538	1485	Gene da subunidade 1 da citocromo oxidase
nad5-1	6679	6840	162	Gene da subunidade 5 da NADH desidrogenase, gene dividido, parte 1
nad2	6923	7786	864	Gene da subunidade 2 da NADH desidrogenase
nad6	7987	8397	411	Gene da subunidade 6 da NADH desidrogenase
trnW (cca)	8475	8549	75	RNA transportador. Códon de iniciação: aminoácido prolina
trnQ (ttg)	9251	9322	72	RNA transportador. Códon de iniciação: aminoácido leucina
rrnL	9593	9866	274	RNA Ribossomal 23S
nad1	10390	11265	876	Gene da subunidade 1 da NADH desidrogenase
trnI (tat)	11574	11627	54	RNA transportador. Códon de iniciação: aminoácido ácido aspártico
trnC (gca)	12134	12193	60	RNA transportador. Códon de iniciação: aminoácido treonina
trnN (att)	12510	12580	71	RNA transportador. Códon de iniciação: aminoácido isoleucina
trnT (tgt)	12710	12765	56	RNA transportador. Códon de iniciação: aminoácido glicina
rrnS	13357	13640	284	RNA Ribossomal 16S
trnM (cat)	13876	13494	74	RNA transportador. Códon de iniciação: aminoácido histidina
trnE (ttc)	14580	14633	54	RNA transportador. Códon de iniciação: aminoácido fenilalanina

A Tabela 1 contém informações como: a posição do gene no mitogenoma, onde cada gene inicia e termina, o comprimento de cada gene em pares de bases (pb) e a função ou produto de cada gene.

Pode-se observar que os genes codantes são os maiores no comprimento em pb, como é o caso do gene *cox1* com 1485 bp, seguido pelo *cob*, *nad4*, *nad1*, *nad2*, *nad5-0_b*, *nad5-0_a*, *nad6* e *nad5-1* em ordem decrescente de tamanho. Em seguida, os dois genes de RNAs ribossomais, *rrnS* e *rrnL* tem 284 bp e 274 bp, respectivamente, e, finalmente, os RNAs transportadores apresentaram os menores genes em pb dentro do mitogenoma da espécie *Chlamydomonas biconvexa*.

A Figura 1 ilustra o mitogenoma total com tamanho estimado em 9,27 kb e estrutura linear, como relatado para o gênero das *Chlamydomonas* e pela presença de

telômeros palindrômicos (HAMAJI et al., 2017). A ordem dos genes ocorre da esquerda para a direita na figura 1 e cada gene segue a ordem presente da Tabela 1.



Figura 1. Mitogenoma linear anotado com tamanho estimado de 9,27 kb. Genes de proteína codante (setas vermelhas), genes de tRNA (setas azuis) e genes de rRNA (setas verdes).

A ausência de algumas subunidades importantes como genes *cox2* e *cox3* foi verificada no mitogenoma de *Chlamydomonas biconvexa* e também nas demais espécies que compõem a classe Chlorophyceae, parte superior da árvore (Figura 2), resultando em uma classe com genomas mais simples e compactos. A perda de informação genética com o decorrer da evolução pode ser explicada pela necessidade em diminuir a demanda energética durante a síntese de proteínas, levando a subunidade *cox1* a demandar todo o papel na geração da enzima citocromo C oxidase.

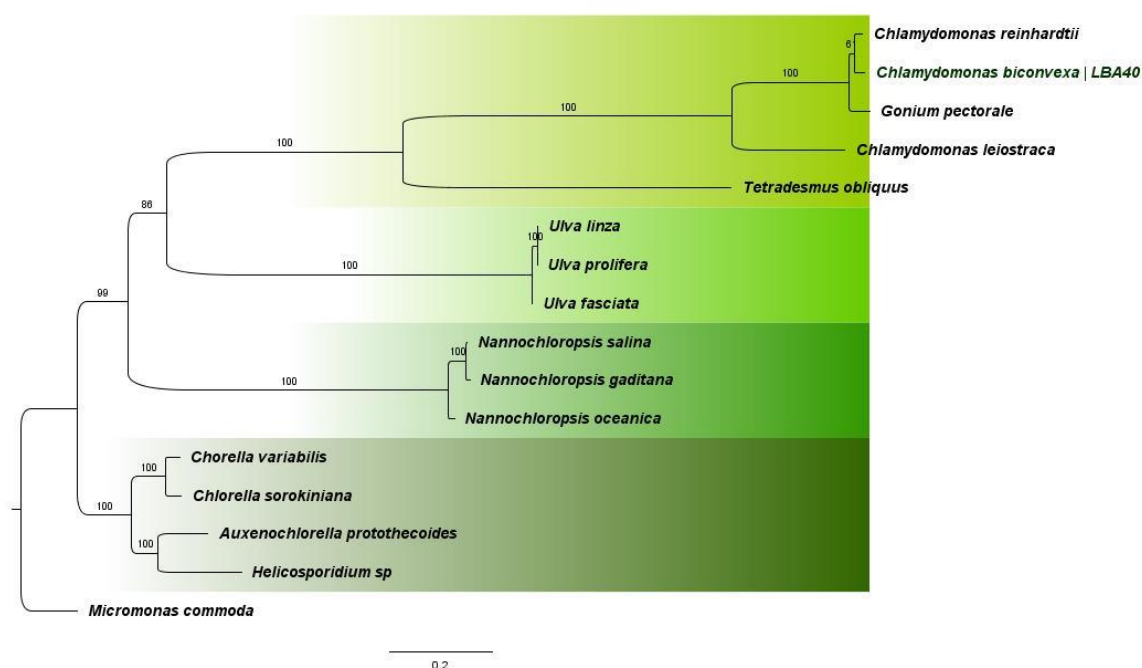


Figura 2. Árvore filogenômica baseada na Máxima Verossimilhança (MV) usando o programa RAxML com valor de bootstrap representado em cada ramo da árvore. A árvore é composta por espécies de algas verdes divididas em quatro classes desse grupo fotossintético.

O mitogenoma da espécie filogeneticamente mais distante, *Micromonas commoda* da classe prasinophyta, é o maior na análise filogenômica, uma vez que possui baixa densidade gênica em relação às outras algas, sendo a mais próxima das plantas terrestres. Um dos motivos para a diminuição da densidade genética nos genomas eucariotos é que esses genomas contêm quantidades consideráveis de DNA repetitivo (VAN BAREN et al., 2016). Na classe das Chlorophyceae, por sua vez, são

relatados mitogenomas menos complexos, mais compactos e de alta densidade gênica, com cerca de 1.980 genes/Mb ou 1,98 gene/kb (TURMEL et al., 2002).

Considerações Finais

A sequência nucleotídica do mitogenoma da LBA40 será em breve depositada nos bancos de dados públicos. A obtenção dos dados moleculares e análises realizadas neste estudo enriquecerá o conhecimento sobre questões evolutivas das microalgas, além subsidiar futuros estudos de melhoramento genético, por exemplo.

Embora uma tendência geral de redução de tamanho em espécies de Chlamydomonadales tenha sido relatada anteriormente, a análise filogenética revela que a cepa *C. biconvexa* Embrapa|LBA40 possui um dos menores mitogenomas de uma espécie de microalga relatada até agora.

Referências

- ALTMANN, R. **Die elementar organismen und ihre beziehungen zu den zellen**. Leipzig: Verlag, 1894.
- BABRAHAM BIOINFORMATICS. **FastQC**: a quality control tool for high throughput sequence data. 2010. Disponível em: <<http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc>>. Acesso em: 10 de Junho de 2017.
- BERNT, M.; DONATH, A.; JÜHLING, F.; EXTERNBRINK, F.; FLORENTZ, C.; FRITZSCH, G.; PÜTZ, J.; MIDDENDORF, M.; STADLER, P. F. MITOS: improved de novo metazoan mitochondrial genome annotation. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 69, n. 2, p. 313-319, 2013.
- BOLGER, A. M.; LOHSE, M.; USADE, B. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. **Bioinformatics**, v. 30 n. 15, p. 2114–2120, 2014.
- DOYLE, J. J.; DOYLE, J. L. Isolation of plant DNA fresh tissue. **Focus**, v. 12, p. 13-15, 1990.
- HADI, S. I. I. A.; SANTANA, H.; BRUNALE, P. P. M.; GOMES, T. G.; OLIVEIRA, M. D.; MATTHIENSEN, A.; OLIVEIRA, M. E. C.; SILVA, F. C. P.; BRASIL, B. S. A. F. DNA barcoding green microalgae isolated from neotropical inland waters. **PloS One**, v. 11, n. 2, 2016.
- HAHN, C.; BACHMANN, L.; CHEVREUX, B. Reconstructing mitochondrial genomes directly from genomic next-generation sequencing reads: a baiting and iterative mapping approach. **Nucleic Acids Research**, v. 41, n. 13, artigo e129, 2013.
- HAMAJI, T.; KAWAI-TOYOOKA, H.; TOYODA, A. Multiple Independent Changes in Mitochondrial Genome Conformation in Chlamydomonadalean Algae. **Genome Biology and Evolution**, v. 9, n. 4, p. 993-999, 2017.
- NASCIMENTO, R. C. do. **Cultivo de microalgas em fotobiorreatores de placas planas para a produção de biomassa e biorremediação de efluente da agroindústria de óleo de palma**. 2016. 55 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade Federal do Tocantins, Gurupi, TO. Orientador: Bruno dos Santos Alves Figueiredo Brasil.
- SCHLÖSSER, U. C. Additions to the culture collection of algae since 1994. **Botanica Acta**, v. 110, n. 5, p. 424–429, 1997.
- SCRANTON, M. A.; OSTRAND, J. T.; FIELDS, F. J.; MAYFIELD, S. P. Chlamydomonas as a model for biofuels and bio-products production. **Plant Journal**, v. 82, n. 3, p. 523–531, 2015.
- STAMATAKIS, A. RAxML version 8: a tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies. **Bioinformatics**, v. 30, n. 9, p. 1312-1313, 2014.

TANIFUJI, G.; ARCHIBALD J. M.; HASHIMOTO T. Comparative genomics of mitochondria in chlorarachniophyte algae: endosymbiotic gene transfer and organellar genome dynamics. **Scientific Reports**, v. 6, artigo 21016, 2016.

TURMEL, M.; OTIS, C.; LEMIEUX, C. The complete mitochondrial DNA sequence of *Mesostigma viride* identifies this green alga as the earliest green plant divergence and predicts a highly compact mitochondrial genome in the ancestor of all green plants. **Molecular Biology and Evolution**, v. 19, n. 4, p. 585, 2002.

VAN BAREN, M. J.; BACHY, C.; REISTETTER, E. N.; PURVINE, S. O.; GRIMWOOD, J.; SUDEK, S.; YU, H.; POIRIER, C.; DEERINCK, T. J.; KUO, A.; GRIGORIEV, I. V.; WONG, C-H.; SMITH, R. D.; CALLISTER, S. J.; WEI, C-L.; SCHMUTZ, J.; WORDEN, A. Z. Evidence-based green algal genomics reveals marine diversity and ancestral characteristics of land plants. **BMC Genomics**, v. 17, artigo 267, 2016.

Genome sequencing of thermophilic fungus *Humicola grisea* var. *thermoidea* and effect of pH in sugarcane biomass transformation

Andrei Stecca Steindorff¹, Eduardo Fernandes Formighieri², Fabícia Paula de Faria³, Marcio José Poças-Fonseca⁴, João Ricardo Moreira de Almeida⁵

Abstract

The thermophilic fungus *Humicola grisea* var. *thermoidea* produces an efficient hydrolytic system with a wide range of thermostable carbohydrate active enzymes (CAZy). In this respect, it represents a promising agent for agricultural residue bioconversion. It can also be employed as a gene donor for the heterologous production of industrial enzymes and to complement enzymatic cocktails. In this work, we sequenced and annotated the genome from *Humicola grisea* var. *thermoidea* and analyzed the transcriptome of this fungus grown in different pH during sugarcane bagasse degradation normalized with glucose as sole carbon source. Genome features corresponds to what we expect for a thermophilic *Sordariomycetes*. In our transcriptomic data, categories related to primary metabolism and polysaccharide deconstruction, especially hydrolases, were significantly up-regulated in pH 5. In pH 8, up-regulated categories were similar to pH 5 with an addition of kinase category, on the other hand, down-regulated categories show a larger diversity of functions – RNA metabolism, transmembrane transporter, oxidoreductase and electron carrier. In conclusion, our data reveals that pH has a great importance in biomass transformation modulating several pathways and will provide support for several biotechnological applications.

Keywords: *Humicola grisea*. transcriptome. genome sequencing. sugarcane bagasse. pH.

Introduction

The thermophilic fungus *Humicola grisea* var. *thermoidea* produces an efficient hydrolytic system with a wide range of thermostable carbohydrate active enzymes (CAZy). In this respect, it represents a promising agent for agricultural residue

¹ Biólogo, Doutor em Biologia Molecular, Consultor na Embrapa Agroenergia, andrei.steindorff@colaborador.embrapa.br

² Agrônomo, Doutor em Biologia Funcional e Molecular, Pesquisador da Embrapa Agroenergia, eduardo.formighieri@embrapa.br

³ Bióloga, Doutora em Biologia Molecular, Professora da Universidade Federal de Goiás, fabriciapfaria@hotmail.com

⁴ Biólogo, Doutor em Biologia Molecular, Professor da Universidade de Brasília, mpossas@unb.br

⁵ Biólogo, Doutor em Microbiologia Aplicada, Pesquisador da Embrapa Agroenergia, joao.almeida@embrapa.br

bioconversion. It can also be employed as a gene donor for the heterologous production of industrial enzymes and to complement enzymatic cocktails (MELLO-DE-SOUZA et al., 2011).

So far, no genome from *Humicola* genus has been published and relatively few genes encoding *Humicola grisea* var. *thermoidea* have already been identified and expressed in heterologous systems. Despite the biotechnological potential of *H. grisea*, little is known about the regulation of its gene expression. In 2011 Mello-de-Sousa and collaborators demonstrated that *H. grisea* *cbh1.2* gene expression, as well as the expression of several other genes of this fungal cellulolytic system, is regulated through a crosstalk between carbon source- and pH-dependent regulatory mechanisms.

In this work we sequenced and annotated the *Humicola grisea* var. *Thermoidea* genome and analyzed the transcriptome of this fungus grown in different pH during sugarcane bagasse degradation normalized with glucose.

Material and Methods

Pre-cultivation

H. grisea was maintained at 42 °C on 4.0% (w/v) oatmeal (Quaker) solid medium. For mycelium obtainment, 10⁶ spores/mL were inoculated in 50 mL of Pontecorvo's minimal medium (MM), at pH 6.8 (non-buffered), enriched with 0.25% (w/v) yeast extract, 0.1% (w/v) peptone and supplemented with 1% (w/v) glucose. Incubation proceeded for 24 h (42 °C/120 rpm).

DNA isolation

Harvested mycelia from pre-cultivation step were immediately ground in liquid nitrogen to a fine powder. DNA was isolated using the DNAzol reagent (Invitrogen) according to manufacturer's instructions.

Cultivation and RNA isolation

For the transcriptome experiment, grown mycelium was filtered, washed and transferred to fresh 50 mL MM, supplemented with 1% (w/v) of glucose or 0.1% ball-milled, steam-exploded sugarcane bagasse (SCB) as carbon sources. Culture media pH was adjusted to 5.0 or to 8.0 (buffered with 100 mM sodium citrate). Cultures were incubated for 6 and 12 h (42°C 120 rpm). Three biological replicates were made for each culture condition. Harvested mycelia were immediately ground in liquid nitrogen to a fine powder. RNA was isolated using Trizol reagent (Invitrogen) according to manufacturer's instructions.

Genome assembly and annotation

H. grisea genomic DNA (gDNA) was isolated and sent for sequencing through two strategies: short inserts (Standard Illumina Hiseq2000 paired-end 2x150bp) and mate-pairs (Illumina Hiseq2000 2x100bp with insert size of 3 Kb). FastQC (www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/) was used to evaluate the libraries quality before and after trimming. For quality trimming and sequence filtering, the software NGS QC Toolkit (version 2.3.3, www.nipgr.res.in/ngsqctoolkit.html) was employed to remove sequencing adapters residues and low-quality reads.

The assembly was performed using AllPaths-LG (software.broadinstitute.org/allpaths-lg) using a maximum coverage of 100X for each library. Genome structural and functional annotation were performed with the MAKER pipeline (www.yandell-lab.org/software/maker.html). Functional annotation of the predicted genes was made using InterProScan v.5.21.60. CAZymes were predicted based on dbCAN HMMs (csbl.bmb.uga.edu/dbCAN). Transporters were predicted based on Transporter Classification DataBase – TCDB (<http://www.tcdb.org/>) and transcription factors based on DBD - Transcription factor prediction database (<http://www.transcriptionfactor.org>).

Transcriptome analysis

Illumina Hiseq2000 100 bp paired-end reads were used for transcript quantification. Quality-filtered reads were mapped to the *H. grisea* assembled in this work, using the TopHat2 v2.0.4 aligner (ccb.jhu.edu/software/tophat). Htseq version 0.6.0 was used to count reads mapped to *T. reesei* transcripts. The R package DESeq2 version 1.6.3 was used to perform the differential expression analysis, using the raw number of reads mapped to each gene in each sample to perform statistical tests, based on the negative binomial distribution, which indicate whether a gene is differentially expressed in a condition relative to each other. Therefore, the DESeq2 package was utilized for normalization, using the median log deviation, and for the differential expression analysis, applying an adjusted $p \leq 0.05$ as threshold. Functional enrichment analysis of differentially expressed genes based on Gene Ontology (GO) terms was performed using the R package GO_MWU (https://github.com/z0on/GO_MWU).

Results and discussion

Humicola grisea genome features

We sequenced the genome of the *H. grisea* var. *Thermoidea* in an Illumina-based whole-genome shotgun sequencing approach delivering 9,460,608 paired reads with an approximate insert size of 350 bp. The acquired sequence reads were assembled into 509 scaffolds using AllPaths-LG. The resulting genome features are shown in Table 1.

Table 1. Genome features of *Humicola grisea* var. Thermoidea genome.

Features	H. grisea genome
Genome size	29.16 Mb
Scaffolds	509
N50	156 Kb
GC content	55,8%
Genes	7120
Genes with PFAM domains	78.56%
Secreted proteins (SignalP 4.1)	650
Completeness (BUSCO)	98.20%

Trascriptome analysis in different pH

In this study, an RNA-seq approach was used to map genes differentially expressed during *H. grisea* growth on a medium containing sugarcane bagasse in pH 5 and pH 8 and normalized with the same conditions but using glucose as sole carbon source. A total of 323,849,916 sequence reads were obtained after quality trimming and aligned onto the reference genome. Figure 1 shows the PCA of samples and replicates based on expression patterns using DESeq2 package. The PCA reveals the good quality of the data and that pH has a crucial role on determining the gene during sugarcane bagasse deconstruction.

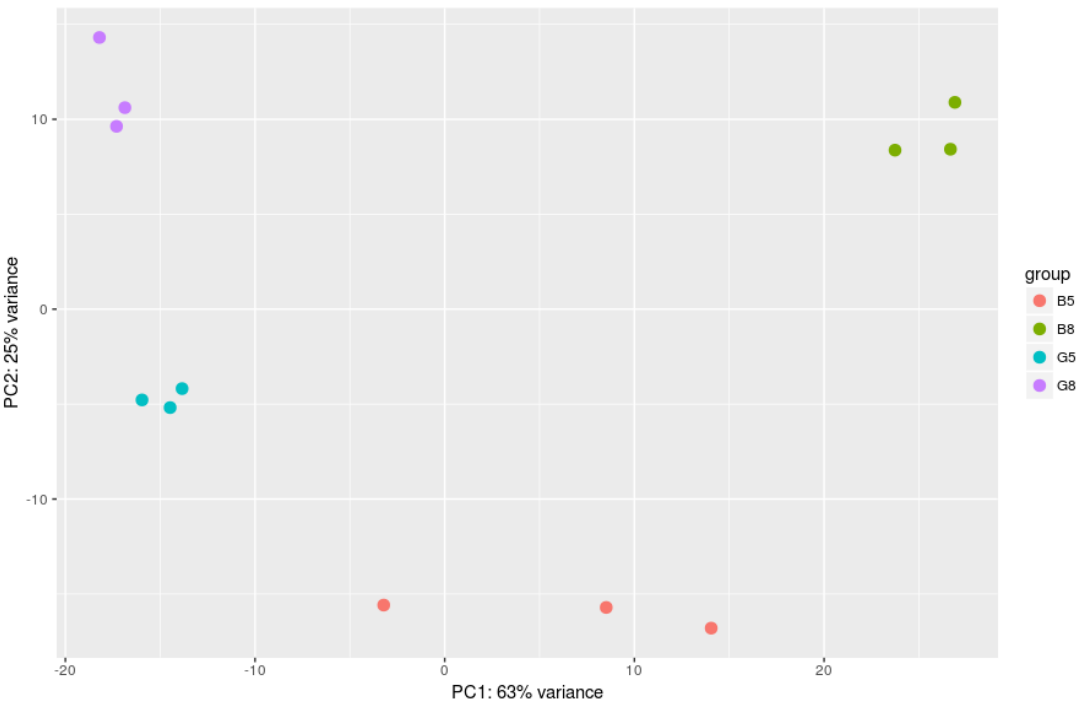


Figure 1. Principal component analysis (PCA) log transformed counts from biological replicates.

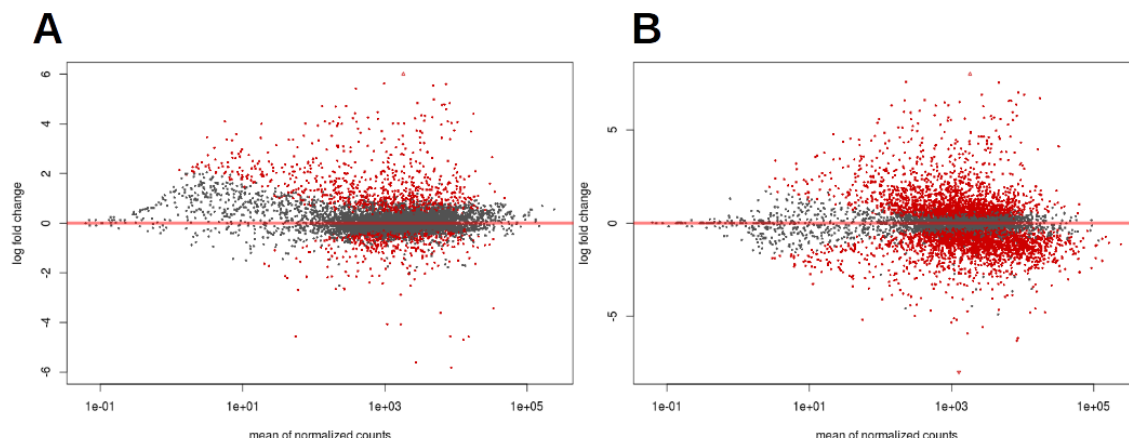


Figure 2. MA plot showing the log2 fold changes over the mean of normalized counts. Differentially expressed genes are shown in red (adjusted p-value < 0.05) **A.** Expression data of *Humicola grisea* grown in 0.1% of sugar cane bagasse in pH 5 during 6-12h hours of cultivation, normalized with same media using 1% glucose as carbon source. **B.** Expression data of *Humicola grisea* grown in 0.1% of sugar cane bagasse in pH 8 during 6-12h hours of cultivation, normalized with same media using 1% glucose as carbon source.

The MAplots in figure 2 show the distribution of expression *H. grisea* in pH 5 (Figure 2A) and pH 8 (Figure 2B). The growth in pH 8 clearly shows more genes differentially expressed compared with pH 5 (4218 genes and 1353 genes, respectively). Another difference is the distribution between up- and down-regulated genes. In pH 5, 842 genes were up-regulated and 511 down-regulated. On the other hand, in pH 8, 1927 genes were up-regulated and 2291 genes were down-regulated (Figure 3). This difference could be related to a larger diversity of pathways required to grow in pH 8, while pH 5 is a more “natural” environment to *H. grisea* grow and secreted its enzyme arsenal.

To broadly compare gene expression patterns between pHs, functional categories were assigned to the differentially expressed genes according to Gene Ontology (GO) guidelines using the R package GO_MWU. To enrich the category analysis for up and down regulated genes at each pH, and exact Fisher test ($p < 0.05$) was performed (Figure 3). In pH 5, as expected, categories related to primary metabolism and polysaccharide deconstruction, especially hydrolases, were significantly up-regulated. In pH 8, up-regulated categories were similar to pH 5 (an exception is presence of kinase category), on the other hand, down-regulated categories show a larger diversity of functions – RNA metabolism, transmembrane transporter, oxidoreductase and electron carrier.



Figure 3. Venn diagram of differentially expressed genes in pH 5 and pH 8. All differentially expressed genes in black, up-regulated in red and down-regulated in blue.

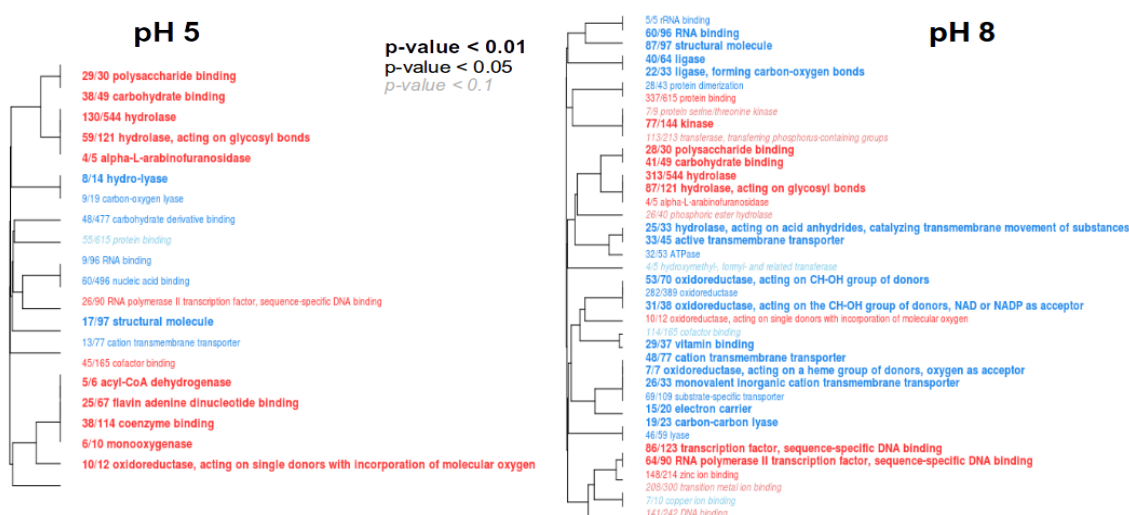


Figure 4. Enrichment of Gene Ontology (GO) categories (Molecular Function) of differentially expressed genes on pH 5 and pH 8. The tree clusters show related categories and the number prior to description represents the number of genes on that category and differentially expressed compared with the whole genome content. In red: up-regulated categories; In blue: down-regulated categories.

Among the top 10 up-regulated genes in both conditions shows a strong presence of carbohydrate active enzymes (CAZy) – cellulases, xylanases, mannanases and esterases. An interesting result is the presence of the gene PID9 (pisatin demethylase), differentially expressed in both conditions but more expressed in pH 8, usually produced by phytopathogens to detoxify phytoalexins produced by plants (COLEMAN et al., 2011). This result suggests that *H. grisea* express this gene for sugarcane bagasse detoxification.

Table 2. Expression of top 10 genes differentially expressed and up-regulated on pH 5 and 8.

Top 10 up-regulated pH 5				Top 10 up-regulated pH 8			
Putative function (blast best-hit)	log ₂ FC pH 5	log ₂ FC pH 8	CAZy annotation	Putative function (blast best-hit)	log ₂ FC pH 5	log ₂ FC pH 8	CAZy annotation
AXE1 Acetylxylan esterase	7.04	9.05	CE5-CBM1	MANA endo-1,4- beta-mannosidase	6.68	10.1 2	GH26- CBM35
MANA endo-1,4- beta-mannosidase	6.68	10.12	GH26- CBM35	XYLB Aryl-alcohol dehydrogenase	5.49	10.0 7	-
CEL1 Cellulose- growth-specific protein	6.55	6.66	AA9	AXE1 Acetylxylan esterase	7.04	9.05	CE5-CBM1
BXLB exo-1,4-beta- xylosidase	6.44	5.59	GH3	EGLD endo-beta- 1,4-glucanase D	4.86	8.69	AA9
EGLD endo-beta-1,4- glucanase D	6.05	1.24	AA9	YPS3 Aspartic proteinase yapsin-3	5.12	8.54	-
GRIF Grixazone synthase	5.86	4.81	-	no hit	4.44	8.06	GH43- CBM35
EGLD endo-beta-1,4- glucanase D	5.78	5.84	CBM1-AA9	GUX1 Exoglucanase 1	5.57	7.78	GH7
YF36 Uncharacterized hydrolase	5.66	4.32	-	CUTI Cutinase	4.79	7.76	CE5
PME Pectinesterase	5.61	5.20	CE8	EGLD endo-beta- 1,4-glucanase D	2.66	7.74	AA9
GUX1 Exoglucanase 1	5.57	7.78	GH7	PID9 Pisatin demethylase	4.61	7.68	-

Conclusions

In conclusion, our transcriptomic data reveals that pH has a great importance in biomass transformation modulating several pathways, especially in basic pH, however, enzymes belonging to CAZy group are still important in such condition. Our genomic data will provide support for other works involving biomass degradation improvement and heterologous expression.

Acknowledgements

This work was supported by Embrapa Agroenergia and a special thanks to Lunalva P. Sallet for genomic DNA isolation.

References

- COLEMAN, J. F.; WASMANN, C. C.; USAMI, T.; WHITE, G. J.; TEMPORINI, E. D.; MCCLUSKEY, K.; VANETTEN, H. D. Characterization of the encoding pisatin demethylase (FoPDA1) in *Fusarium oxysporum*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 24, n. 12, p. 1482-1491, 2011.
- MELLO-DE-SOUSA, T. M.; SILVA-PEREIRA, I.; POÇAS-FONSECA, M. J. Carbon source and pH-dependent transcriptional regulation of cellulase genes of *Humicola grisea* var *thermoidea* grown on sugarcane bagasse. **Enzyme Microbial Technology**, n. 48, edição 1, p. 19-26, 2011.



PROCESSOS BIOQUÍMICOS

Perfil da proteção patentária nos últimos 20 anos associado à lignina

Ana Cristina Prates¹, Melissa Braga²

Resumo

A lignina é um biopolímero que possui grande potencial como fonte de compostos aromáticos para a indústria química, embora seja vista como uma barreira a ser transposta para se chegar à celulose. A abundância dessa potencial matéria-prima na natureza tem despertado um interesse crescente em pesquisa e desenvolvimento, resultando no aumento de pedidos de patente relacionados a produtos e processos associados à lignina. Este trabalho apresenta uma análise patentométrica para avaliar a evolução dos pedidos de patentes ao longo dos anos e por território, as áreas em que esses pedidos estão mais concentrados e os *players* tanto no âmbito nacional quanto no âmbito internacional. Constatou-se que geograficamente a China detém a liderança dos depósitos, sendo a indústria química o principal depositante. O Brasil apresenta um número pouco expressivo de patentes, predominando instituições públicas locais como os principais depositantes.

Palavras-chave: lignina. patentes. depositantes. áreas tecnológicas. regiões de depósito.

Introdução

Lignina é um biopolímero aromático que confere suporte estrutural para paredes celulares de plantas. Quimicamente, trata-se de um complexo polimérico composto de unidades fenilpropano, ligadas de forma não linear e aleatória. Os três principais monômeros são os álcoois cumarílico, coniferílico e sinapílico, cujas proporções podem formar tipos diferentes de lignina (CHEN, 2014).

Embora a lignina seja considerada um obstáculo à produção de etanol de segunda geração em decorrência da alta complexidade envolvida na sua separação dos outros componentes da biomassa, uma vez fragmentada em unidades monoméricas, pode se tornar fonte abundante de compostos químicos aromáticos valiosos capazes de atuar como bloco-construtores e intermediários da indústria química (WELKER et al., 2015).

Diante da perspectiva de aumento do consumo dos polissacarídeos da biomassa lignocelulósica, a destinação da lignina para fins mais nobres e de maior valor agregado torna-se mandatório para o desenvolvimento acelerado e a implantação da biorrefinaria celulósica (RAGAUSKAS et al., 2014). Assim, muitos esforços em pesquisa para o aproveitamento dessa matéria-prima têm sido feitos nas últimas décadas (SANTOS, 2011; HOLLADAY et al., 2007; LI et al., 2015; RAGAUSKAS et al., 2014; WELKER et al., 2015).

¹ Graduanda em Biologia, Universidade Católica de Brasília, ana.prates@colaborador.embrapa.br.

² Química, mestre em Química, analista da Embrapa Agroenergia, melissa.braga@embrapa.br

As informações sobre esses desenvolvimentos estão pulverizadas em uma série de fontes, tais como artigos científicos, livros, sites de empresas, reportagens, etc., mas as tendências de pesquisas aplicadas podem ser identificadas e monitoradas por meio de patentes.

As informações contidas em documentos de patentes podem servir, por exemplo, para analisar: as atividades de patenteamento dos padrões técnicos de internacionalização de um país; o patenteamento em um setor, área de tecnologia ou empresa, para verificar ou prever a direção das mudanças técnicas, ou verificar a posição tecnológica relativa de uma empresa em um mercado, entre outras inferências. Por isso, as análises dessas informações expandiram-se para muitas atividades táticas e estratégicas de negócios, pesquisas e políticas, em nível nacional, institucional ou empresarial.

Sendo assim, este trabalho apresenta um estudo patentário sobre a evolução dos pedidos de patentes relacionados à lignina, às áreas tecnológicas e, em especial, aos principais depositantes desses pedidos.

Materiais e métodos

Para elaboração do presente estudo, efetuou-se um levantamento de patentes na base de dados Derwent Innovation Index, no período de janeiro de 1997 a dezembro de 2015, buscando a palavra *lignin* no campo “Tópico” da base.

Por meio dessa estratégia, recuperaram-se todos os documentos contidos na base naquele período que contivesse palavra *lignin*. Por meio dessa estratégia, recuperou-se 14.123 documentos de patente. Foram excluídos dessa análise os anos de 2016 e 2017, em razão do período de sigilo de 18 meses contados a partir da data de depósito do pedido.

As informações sobre os documentos de patentes disponibilizadas pela base foram salvas na extensão “txt” e avaliadas empregando o software “Vantage Point” (Search Technology).

Resultados e discussão

Os pedidos de patente relacionados à lignina crescem exponencialmente, conforme mostra a Figura 1. Em termos de região onde o depósito ocorreu, até o ano de 2006 predominavam pedidos com prioridade japonesa. A partir de 2007, os pedidos chineses tomaram a liderança nesse *ranking* de patentes e, em 2015, apresentaram dez vezes mais números pedidos comparados aos norte-americanos, que ocupam o segundo lugar em depósitos. A produção japonesa está praticamente constante na última década.

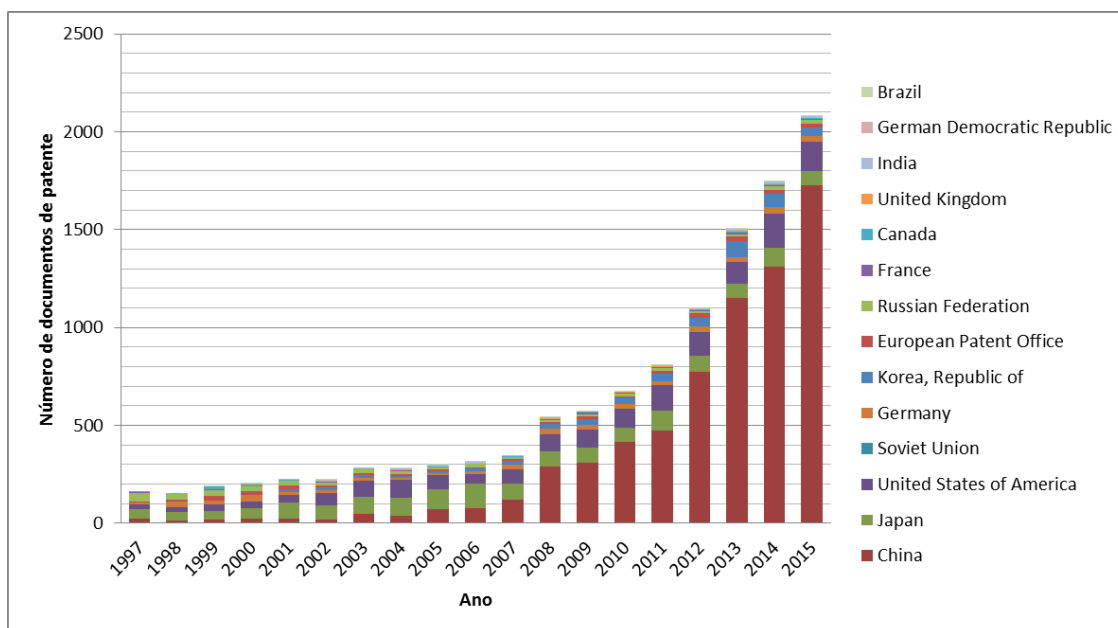


Figura 1. Evolução dos documentos de patentes ao longo dos anos, por país de prioridade.

A área química predomina como área temática entre os 14.123 pedidos recuperados, com 13.670 registros. Isso demonstra um claro interesse no grande potencial da lignina como fonte provedora de moléculas intermediárias para a indústria química.

As instituições que possuem 20 ou mais depósitos relacionados à lignina são predominantemente empresas da indústria química chinesa (ver Figura 3), perfil este que está coerente com o que foi apresentado nas Figuras 1 e 2. Destacam-se pelo número de pedidos a China Petroleum Chemical Corporation, Jinan Shengquan Group Co. e GuangDong ZhongXun Agri-science Corporation. Na Figura 3, destaca-se também o grande número de depósitos feitos por instituições de pesquisa que não estão diretamente associadas ao setor produtivo, em especial universidades. Visto que nesses centros a maioria das pesquisas é de cunho científico, presume-se que os produtos e processos associados à lignina estão em um baixo grau de maturidade tecnológica.

Com relação ao Brasil, os pedidos feitos por instituições brasileiras totalizam apenas 59 e as instituições de pesquisa brasileiras (residentes) representam 75% do número total de instituições identificadas como titulares no período analisado, conforme destacado na Tabela 1. Nota-se que os grandes depositantes, apresentados na Figura 3 não entram em fase nacional brasileira, o que pode demonstrar que o Brasil não se apresenta no momento como um alvo potencial para exploração comercial das tecnologias geradas no exterior.

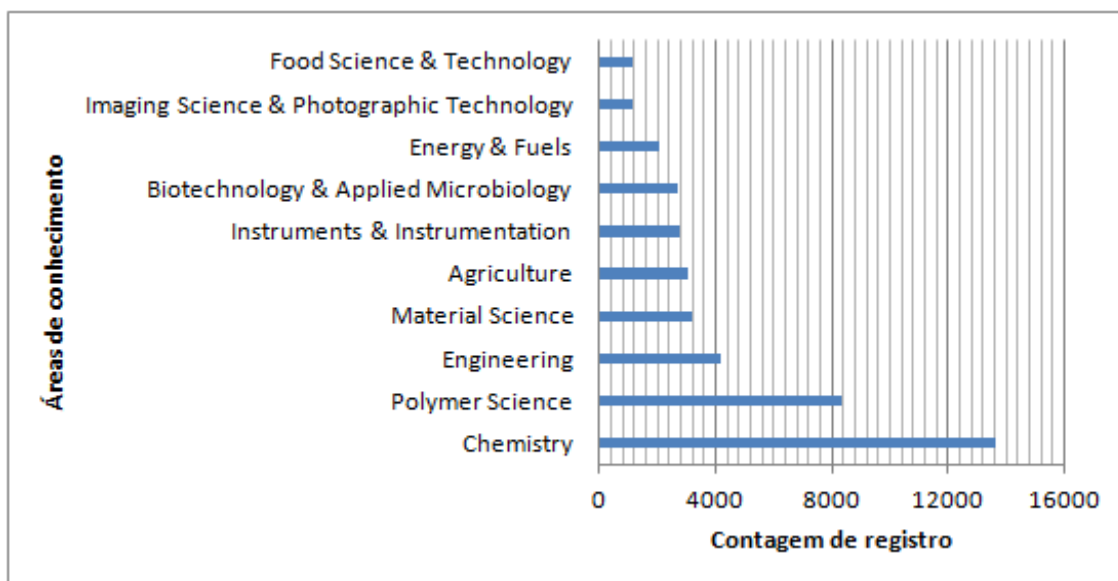


Figura 2. Área de conhecimento dos pedidos de patentes recuperados, relacionados à lignina entre os anos de 1997 e 2015.

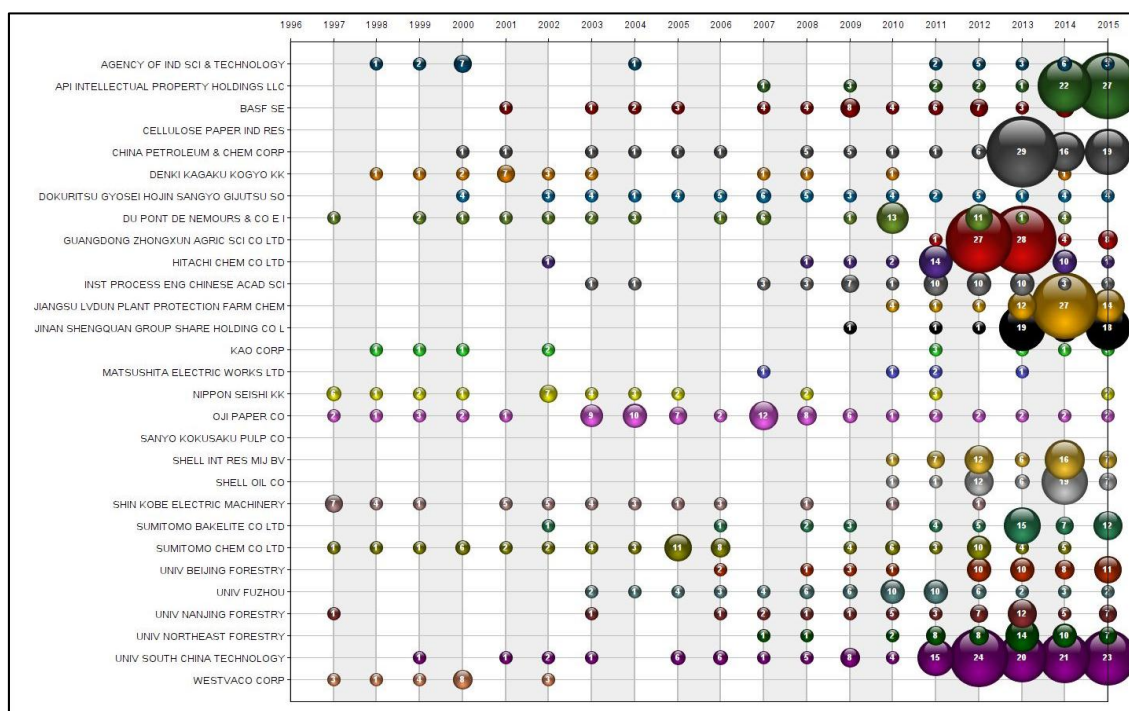


Figura 3. Principais depositantes de patentes, listados em ordem alfabética (linhas), relacionados à lignina no período de 1997 a 2015 (colunas). Os números dentro dos círculos representam os números de documentos de patentes recuperados.

Tabela 1. Instituições que depositaram pedidos de patentes relacionados à lignina no Brasil no período do estudo. Destacadas em amarelo estão instituições de pesquisa e, em negrito, as instituições internacionais (não residentes).

Número de documentos de patente	Instituição
6	Universidade de São Paulo - USP
5	Embrapa
3	Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ
3	Fundação de Tecnologia Industrial - FTI
2	Dalquim Indústria e Comércio Ltda.
2	Resinas Internacionais Ltda.
2	Rhodia S.A.
3	Grupo Brasileiro de Pesquisas Especializadas Ltda. - Braerg
2	Universidade Federal do Espírito Santo - Ufes
2	ArborGen
2	Inovamat Inovação em Materiais Ltda.
1	Aracruz Celulose
1	University of Melbourne
1	White Martins S.A.
1	General Electric
1	Universidade de Caxias do Sul - UCS
1	Fundação Valeparaibana de Ensino - FVE
1	Monsanto Co.
1	Ecosigma - Soluções Integradas em Gestão de Meio Ambiente
1	Deasi Projeto e Consultoria Ltda.
1	FIPEC Banco BR S.A.
1	Dedini S.A.
1	Alba Química Indústria e Comércio
1	Wacker Chemie AG
1	Petróleo Brasileiro S.A. - Petrobras
1	Central de Tratamento de Efluentes Líquidos - Cetrel
1	Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais - CNPEM
1	Helucan Comercial Ltda.
1	Instituto Mauá de Tecnologia - IMT
1	KBK Plásticos Ltda.
1	Jacto - Máquinas Agrícolas
1	Riocell S.A.
1	Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG
1	Universidade Federal de Pernambuco - UFPE
1	Universidade Federal de Sergipe - UFS
1	Universidade Estadual de Santa Cruz - Uesc

Conclusões

Nos últimos 20 anos, presume-se que a China construiu uma base tecnológica proprietária relacionada à lignina, em razão dos números crescentes de pedidos de patentes no tema. Embora as indústrias químicas detenham o maior número de depósitos, a presença de instituições de pesquisa entre os principais depositantes demonstra que muitos dos desenvolvimentos relacionados à lignina encontram-se em estágio de pesquisa, em especial no que vem sendo desenvolvido e protegido no Brasil.

As perspectivas, diante da evolução patentária global resultante do esforço global que está sendo feito para a agregação de valor a resíduos da indústria química, indicam que se trata de uma questão de tempo e investimento para que esse biopolímero deixe de ser reconhecido como uma barreira do processo de fermentação e seja tratado como uma fonte de matéria-prima no conceito de biorrefinaria.

Referências

- CHEN, H. Chemical Composition and Structure of Natural Lignocellulose. In: CHEN, H. **Biotechnology of lignocellulose**. [s.l.] Springer, 2014. p.25-71.
- HOLLADAY, J.; WHITE, J.F.; BOZELL, J.J.; JOHNSON, D. **Top value-added chemicals from biomass: volume ii - results of screening for potential candidates from biorefinery lignin**. [s.l.]: Pacific Northwest National Laboratory, 2007.
- RAGAUŠKAS, A. J. BECKHAM, G.T., BIDDY, M.J.; CHANDRA, R.; CHEN, F.; DAVIS, M.F.; DAVISON, B.H.; DIXON, R.A.; GILNA, P.; KELLER, M.; LANGAN, P.; NASKAR, A.K.; SADDLER, J.N.; TSCHAPLINSKI, T.J.; TUSKAN, G.A.; WYMAN, C.E. Lignin Valorization: Improving Lignin Processing in the Biorefinery. **Science**, v. 344, n. 6185, p. 1246843–1246843, 2014.
- SANTOS, M. R. F. dos. **Elaboração do Technology ROADMAP para biorrefinaria de produtos da lignina no Brasil**. 2011. 300 f. Tese (Doutorado em Química) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ.
- WELKER, C.; BALASUBRAMANIAN, V.K.; PETTI, C.; RAI, K.M.; DEBOLT, S.; MENDU, V. Engineering Plant Biomass Lignin Content and Composition for Biofuels and Bioproducts. **Energies**, v. 8, n. 8, p. 7654–7676, 2015.

Estudo da proteção patentária relacionada à produção microbiana do ácido acrílico

Thuany do Amaral¹, Melissa Braga², João Ricardo Moreira de Almeida³

Resumo

Os tratados internacionais para a redução da emissão de carbono, a busca pela autossuficiência energética e a limitação de recursos não renováveis têm impulsionado a indústria no desenvolvimento de alternativas renováveis, sustentáveis e limpas. Nesse sentido, muitos esforços vêm sendo feitos no intuito de identificar rotas renováveis para obtenção de compostos produzidos até o momento exclusivamente por rota petroquímica. Dentre os compostos que se enquadram nessa categoria, está o ácido acrílico, que tem sido alvo de pesquisas e desenvolvimentos para a produção dele por rota de base biológica, em específico por rota de base microbiana. Neste trabalho, é apresentado um estudo patentário da evolução dessa rota por meio da avaliação dos principais (associações de) depositantes de patentes na área e quais são os principais microrganismos empregados nesses desenvolvimentos. Identificou-se que grandes empresas e associações delas são as principais depositantes de pedidos de patentes e que os microrganismos cujo sistema genético é bastante conhecido, tais como *E.coli* e *S. cerevisiae*, têm sido objeto mais frequente da proteção patentária.

Palavras-chave: ácido acrílico. microrganismos. fermentação. Classificação Internacional de Patentes. depositantes.

Introdução

Os ácidos orgânicos estão entre as classes de compostos mais promissoras no contexto de biorrefinaria em razão de seu grande potencial como intermediários na indústria química e farmacêutica, bem como de seu uso direto na indústria de alimentos (BAUMANN; WESTERMANN, 2016). Destacam-se, do ponto de vista econômico, os ácidos com dois a seis carbonos, como o ácido acrílico, que é idêntico ao composto petroquímico análogo e, portanto, dispensa a necessidade de qualquer adaptação nos processos preexistentes.

O mercado do ácido acrílico tem crescido diariamente em virtude do uso desse ácido em mercados emergentes e de alta demanda, como os de polímeros superabsorventes, adesivos, recobrimento de superfícies e tintas, entre outros. Com uma produção anual de cerca 5 milhões de toneladas, o mercado atual do ácido acrílico supera US\$ 11 bilhões e a demanda anual global em 2020 pode atingir 8 milhões de toneladas e US\$ 18 bilhões. Atualmente, é produzido por meio da oxidação

¹ Graduanda em Biologia, Universidade Católica de Brasília, thuany.amaral@colaborador.embrapa.br.

² Química, doutoranda pela Universidade de Brasília, analista da Embrapa Agroenergia, melissa.braga@embrapa.br

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

do propeno oriundo do petróleo, em um processo de duas etapas via acroleína com rendimento de 90% (CHEN; NIELSEN, 2016).

Apesar de a literatura recente indicar a possibilidade de produção do ácido acrílico por rota microbiana a partir da biomassa, as rotas de base biológica que vêm sendo adotadas por (associação de) empresas como OPX Bio-Dow-Evonik, Caargil-Novozymes, Myriant e Metabolix combinam processos microbianos até a obtenção de intermediários, tais como os ácidos 3-hidroxipropiônico e láctico, que são levados até o ácido acrílico pela integração com a rota química (EUROPEAN COMMISSION, 2015).

Independentemente da atuação direta ou indireta dos microrganismos no processo de conversão de biomassa a produtos de alto valor agregado, eles são agentes essenciais para viabilizar esse processo, visto que permitem a produção de um grande número de moléculas, com alto grau de especificidade, integrando princípios da sustentabilidade associada à economia energética (BAUMANN; WESTERMANN, 2016).

A maior parte dos desenvolvimentos que estão mais próximos de tornarem-se produtos e processos comerciais é realizada em laboratórios de empresas e raramente são tornados públicos por meio de artigos científicos. Dessa forma, a investigação das informações contidas em patentes é a forma mais direta de obtenção de informação sobre essas tecnologias.

Sendo assim, este trabalho apresenta um levantamento informações dos últimos 20 anos disponíveis na literatura patentária, relacionadas ao ácido acrílico e a processos fermentativos, compreendendo a evolução dos pedidos ao longo dos anos, os principais depositantes e os microrganismos que constam dos documentos de patente para esse fim.

Materiais e métodos

Para elaboração do presente estudo, efetuou-se um levantamento de patentes na base de dados Derwent Innovation Index, no período de janeiro de 1997 a maio de 2017, empregando a seguinte estratégia: Tópico: “acrylic acid” AND Classificação Internacional de Patentes (CIP): C12P*.

Por meio dessa estratégia, recuperaram-se todos os documentos contidos na base, naquele período, que contivesse a combinação das palavras *acrylic* e *acid* e todos os grupos e subgrupos da CIP C12P (processos de fermentação, ou processos que utilizem enzimas para sintetizar uma composição ou composto químico desejado ou para separar isômeros ópticos de uma mistura racêmica).

As informações sobre os documentos de patentes disponibilizadas pela base foram salvas na extensão “txt” e avaliadas por meio do software “Vantage Point” (Search Technology).

Resultados e discussão

Foram recuperados 385 documentos de patentes, que estão distribuídos ao longo dos anos conforme mostrado na Figura 1. Nota-se que, nos últimos 20 anos, o número de patentes contendo o tema é crescente, o que indica que há um interesse das instituições em depositar matéria nesse assunto. Destacam-se os pedidos feitos via PCT (*Patent Cooperation Treaty*) e, nos últimos 5 anos, os documentos norte-

americanos e chineses. Cumpre esclarecer que pedidos depositados entre os anos de 2015 a 2017 podem estar no período de sigilo de 18 meses e que, portanto, os números de registros nesses anos, ao serem incorporados à base de dados, podem ser maiores do que os apresentados no gráfico.

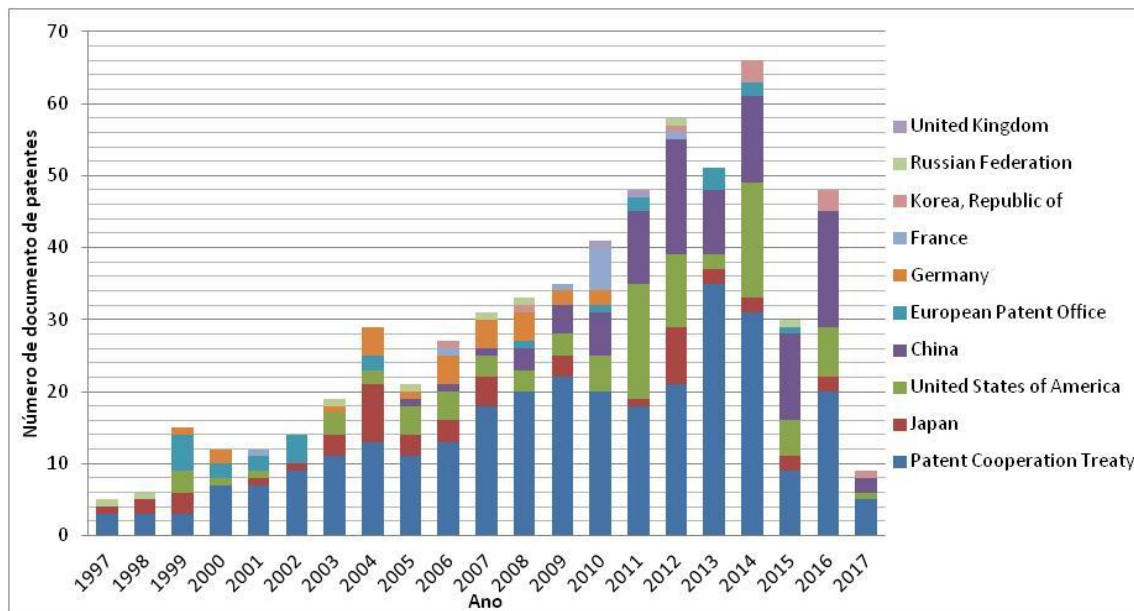


Figura 1. Evolução dos documentos de patentes ao longo dos anos, relacionados ao ácido acrílico e à CIP C12P.

A Basf, que é a maior produtora mundial de ácido acrílico, também lidera o *ranking* das principais depositantes, conforme mostra a Figura 2. Observa-se na Figura 3 que algumas dessas grandes empresas, embora detenham um portfólio próprio de patentes (pontos amarelos), estão se associando a outras empresas para o desenvolvimento em conjunto e o consequente compartilhamento de titularidade (pontos amarelos interligados por entre duas ou mais empresas).

O mapa da Figura 4 mostra o grau de similaridade das áreas tecnológicas nos documentos de patente entre os principais depositantes, por meio da comparação das CIP apresentadas nos documentos recuperados na busca. Nesse mapa, quanto maior o grau de similaridade das áreas tecnológicas entre as empresas, mais espessas são as linhas que ligam os pontos representando as empresas. Nota-se que as linhas cheias e espessas ocorrem entre as empresas Codexis e DSM, que já possuem um acordo para desenvolvimento conjunto (CODEXIS, 2017), e a Abbott e Abbvie, que até 2012 eram a mesma empresa, mas recentemente foram divididas em duas, ficando a Abbvie responsável pela área farmacêutica.

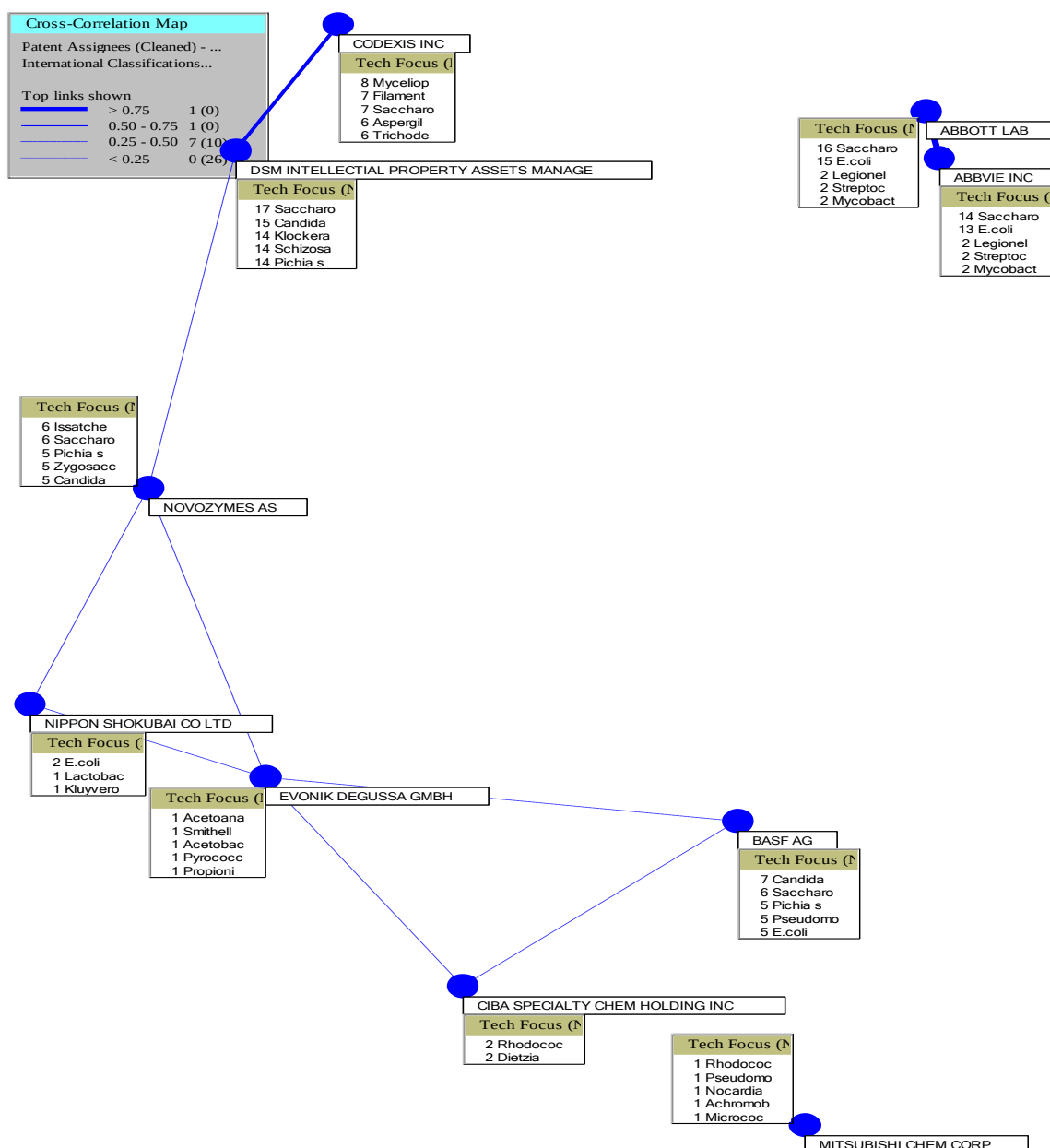


Figura 4. Mapa de correlação entre os temas abordados nos pedidos de patentes e os principais microrganismos apresentados nesses pedidos.

Os microrganismos objetos de pedidos de patentes relacionados ao ácido acrílico estão divididos em fungos ou bactérias geneticamente modificadas, destacando-se os gêneros *Saccharomyces* e *Escherichia*, por serem microrganismos com genética e fisiologia bem conhecidas.

Tabela 1. Número de registros de 20 gêneros de microrganismos mais recorrentes nos documentos de patentes recuperados.

Nº de Registros	Gêneros	Nº de Registros	Gêneros
75	<i>Saccharomyces</i> sp.	22	<i>Filamentous</i> sp.
66	<i>Escherichia</i> sp.	21	<i>Penicillium</i> sp.
62	<i>Candida</i> sp.	21	<i>Rhizopus</i> sp.
47	<i>Pseudomonas</i> sp.	20	<i>Clostridium</i> sp.
40	<i>Pichia</i> sp.	20	<i>Rhodococcus</i> sp.
36	<i>Aspergillus</i> sp.	20	<i>Trichoderma</i> sp.
34	<i>Kluyveromyces</i> sp.	18	<i>Corynebacterium</i> sp.
32	<i>Bacillus</i> sp.	17	<i>Klosteria</i> sp.
28	<i>Schizosaccharomyces</i> sp.	17	<i>Lactobacillus</i> sp.
27	<i>Yarrowia</i> sp.	17	<i>Schwanniomyces</i> sp.

Conclusões

Há um crescente interesse em desenvolvimento de rotas de base biológica para a produção de ácido acrílico. Para tanto, grandes empresas, como a Basf, DSM, Codexis e Novozymes, estão investindo em (co)desenvolvimento de novos microrganismos ou enzimas para a criação de biofábricas capazes de produzir o ácido com coeficientes técnicos passíveis de competir com a rota petroquímica. Destaca-se a rede de parcerias que estão sendo feitas por grandes empresas, como Basf, Dow e Evonik.

Para tanto, uma série de fungos e bactérias vêm sendo estudados associados ao ácido acrílico, com destaque aos pertencentes aos gêneros *Saccharomyces* e *Escherichia*.

Referências

- BAUMANN, I.; WESTERMANN, P. Microbial production of short chain fatty acids from lignocellulosic biomass: current processes and market. **Biomed Research International**, artigo 8469357, 2016.
- CHEN, Y.; NIELSEN, J. Biobased organic acids production by metabolically engineered microorganisms. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 37, p. 165–172, 2016.
- CODEXIS. **News Release**: DSM and Codexis Sign Enzyme Supply Agreement. Disponível em: <<http://ir.codexis.com/phoenix.zhtml?c=208899&p=irol-newsArticle&cat=news&id=1515568>>. Acesso em: 21 jun. 2017.
- EUROPEAN COMMISSION. **From the Sugar Platform to biofuels and biochemical**: final report for the European Commission Directorate-General Energy. 2015. Disponível em: <<http://ibcarb.com/wp-content/uploads/EC-Sugar-Platform-final-report.pdf>>. Acesso em: 6 fev. 2017.

Avaliação prospectiva do potencial biotecnológico de microalgas: uma abordagem filogenética

Carolina Ribero Cereijo¹, Hugo Santana², Sámed Ibrahim Isa Abdel Hadi³,
Lorena Costa Garcia⁴, Letícia Jungmann Cançado⁵,
Bruno do Santos Alves Figueiredo Brasil⁶

Resumo

As microalgas compõem um grupo de microrganismos taxonomicamente diversos com grande potencial biotecnológico. No entanto, a identificação taxonômica tradicional desses microrganismos é laboriosa e demorada. Neste trabalho, foi realizada a identificação molecular (*DNA barcoding*) das cepas de microalgas pertencentes à coleção de microrganismos e microalgas da Embrapa, utilizando o marcador ITS2 e uma análise filogenética das suas relações taxonômicas. A partir dessas informações, foi realizado um levantamento bibliográfico das principais aplicações biotecnológicas relacionadas à utilização de microalgas, bem como sua correlação com as taxas de microalgas presentes na coleção. Os resultados deste trabalho demonstraram que a diversidade de cepas depositadas na coleção abrange as principais famílias de microalgas utilizadas em estudos biotecnológicos nacionais e internacionais.

Palavras-chave: identificação. diversidade. aplicação. bioprodutos. chorophytas.

Introdução

As microalgas verdes (divisão Chlorophyta) são um grupo de microrganismos fotossintetizantes taxonomicamente diverso com aproximadamente 8 mil espécies descritas. Esses organismos são importantes produtores de matéria orgânica em ecossistemas terrestres, sendo alvo de crescente interesse para aplicações biotecnológicas, como a produção de combustíveis, produtos químicos, pigmentos e alimentos em geral (HADI et al., 2016).

O isolamento, a identificação e a preservação de recursos genéticos algais diversificados em coleção biológica de referência é fundamental para amparar o desenvolvimento de um programa de melhoramento genético de microalgas. Todavia, a identificação de microalgas por morfologia é bastante desafiadora, especialmente

¹ Bióloga, mestre em Biotecnologia, doutoranda em Tecnologias Química e Biológica, Universidade de Brasília, Brasília, DF, carolina.cereijo@colaborador.embrapa.br

² Biotecnologista, mestre em Biociências, doutorando em Tecnologias Química e Biológica, Universidade de Brasília, Brasília, DF, hugo.santana@colaborador.embrapa.br

³ Biotecnologista, mestre em Biotecnologia, doutorando em Bioinformática, Universidade de Brasília, Brasília, DF, samed.hadi@colaborador.embrapa.br

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

⁵ Bióloga, doutora em Genética e Biologia Molecular, pesquisadora na Embrapa Agroenergia, leticia.jungmann@embrapa.br

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

para as espécies de maior interesse biotecnológico. Sendo assim, a utilização de métodos moleculares de identificação, como o DNA Barcoding, é fundamental para a adequada identificação e avaliação da diversidade de espécies depositadas em uma coleção biológica (FUQÍKOVÁ et al., 2010).

A fim de avaliar se as principais espécies de interesse biotecnológico estão representadas e disponíveis na Coleção de Microrganismos e Microalgas Aplicados a Agroenergia e Biorrefinarias da Embrapa (HADI et al., 2016; BRASIL et al., 2016), este trabalho analisou a diversidade das microalgas presentes na coleção. Posteriormente, foi feita a correlação entre a identidade taxonômica desses recursos genéticos ao seu potencial de exploração biotecnológica, com base em informações disponíveis na literatura.

Materiais e métodos

Identificação de cepas baseada no marcador Internal Transcribed Spacer 2 (ITS2)

Para a identificação das cepas de microalgas pertencentes à coleção de microrganismos e microalgas aplicados a agroenergia e biorrefinarias da Embrapa (subsequentemente denominada como coleção de microrganismos da Embrapa), foi realizada a extração do DNA genômico total de 76 cepas, utilizando o protocolo CTAB. O DNA extraído foi submetido à PCR para amplificação da região ITS1-5.8S-ITS2 e o produto da reação foi sequenciado pelo método de Sanger. Os resultados obtidos foram analisados utilizando o software Geneious 9, por meio do qual foi obtida uma sequência consenso para cada cepa. Essas sequências foram anotadas no ITS2 database (<http://its2.bioapps.biozentrum.uni-wuerzburg.de/>) para obtenção das sequências ITS2, que foram comparadas com o banco de dados GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) com utilização da ferramenta BLAST. Para identificação das cepas, foram adotados os critérios utilizados por Hadi et al. (2016).

Construção da árvore filogenética

Para estabelecer a relação evolutiva entre as cepas de microalgas, foi construída uma árvore filogenética baseada no marcador ITS2. Para isso, foi utilizado o software MEGA7, no qual as sequências ITS2 das cepas foram alinhadas com o ClustalW, e a árvore foi construída. Foi utilizado o método Maximum Likelihood baseado no modelo General Time Reversible (GTR) com sítios invariáveis (I) e parâmetro de distribuição Gamma (G).

Levantamento bibliográfico

O levantamento do número de pesquisas relacionadas a microalgas nas áreas de biorremediação, biocombustíveis, química fina, nanopartículas e alimentação, no período entre 2007 e 2016 foi realizado com o Google Scholar com os gêneros mais representados (mais frequentes), pertencentes às famílias Chlamydomonadaceae (*Chlamydomonas* e *Dunaliella*), Chlorellaceae (*Chlorella* e *Micractinium*), Chlorococcaceae (*Chlorococcum* e *Tetracystis*), Scenedesmaceae (*Desmodesmus* e *Scenedesmus*) e Uronemataceae (*Uronema*). Critérios de busca utilizados: “Gênero” AND [“Área OR Área no plural”], excluindo citações da busca.

Resultados e Discussão

Com o resultado da identificação molecular das 76 microalgas da coleção de microrganismos da Embrapa utilizando o marcador ITS2, foi contruída uma árvore filogenética para analisar a relação taxonômica das cepas presentes na coleção (Figura 1).

Os dados resultantes da identificação molecular permitiram verificar que as cepas da coleção estão distribuídas em cinco famílias, sendo 47% (36) Scenedesmaceae, 25% (19) Chlorococcaceae, 16% (12) Chlorellaceae, 11% (8) Chlamydomonadaceae e 1% (1) Uronemataceae. Analisando a Figura 1, é possível observar que as cepas da família Chlorellaceae, pertencente à ordem Chlorellales, está filogeneticamente mais distante das demais famílias da coleção, que se agrupam nas ordens Chlamydomonadales (Chlamydomonadaceae e Chlorococcaceae) e Sphaeropleales (Scenedesmaceae). O representante da ordem Chaetophorales (*Uronema trentonense*), no entanto, foi agrupado no mesmo braço da árvore que estavam algumas espécies do gênero *Chlamydomonas* (Ordem Chlamydomonadaceae), indicando uma maior relação filogenética entre os representantes dessas duas ordens.

A partir destas informações, foi realizado um levantamento na literatura para se verificar as áreas de estudo nas quais os gêneros mais representados na coleção são aplicados (Figura 2). Os resultados mostraram que, no período analisado, as principais áreas de interesse têm sido a de biocombustíveis, de alimentação e de biorremediação. De fato, nos últimos anos tem-se observado um crescente interesse no uso de opções sustentáveis para a produção de energia e para as atividades agroindustriais, e as microalgas têm se mostrado como uma opção com grande potencial para essas finalidades.

Na área de biorremediação de efluentes, por exemplo, Sukačová et al. (2015) conseguiram remover $97 \pm 1\%$ do fósforo presente na água residual urbana utilizando um consórcio entre cianobactérias (*Phormidium autumnale* e *Pseudanabaena* sp.) e uma microalga da família Scenedesmaceae (*Scenedesmus acutus*). Resultados similares foram observados em outro trabalho com a vinhaça, resíduo da cadeia de produção do etanol, em que o cultivo da cepa *Micractinium* sp. Embrapa|LBA32 (Chlorellaceae) levou à redução do teor de nitrato no efluente (SANTANA et al., 2017). Esses resultados indicam o potencial de aplicação de representantes dessas famílias para a biorremediação de efluentes, resultado que está associado com o crescente interesse em espécies dessas famílias na literatura (Figura 2).

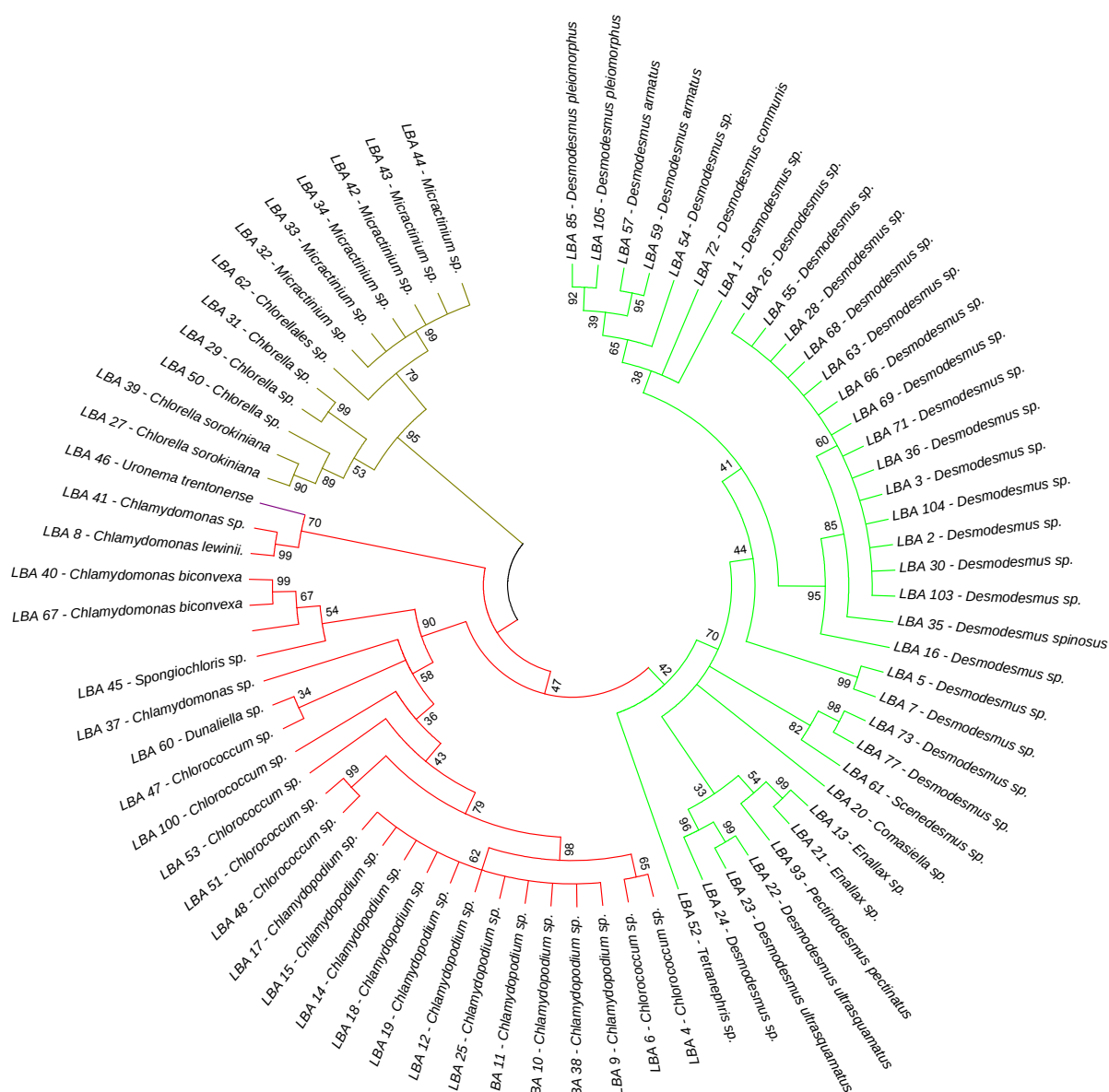


Figura 1. Árvore filogenética das cepas de microalgas depositadas na coleção de microrganismos e microalgas aplicados a agroenergia e biorrefinarias da Embrapa Agroenergia. A árvore foi construída utilizando o método Maximum Likelihood baseado no modelo General Time Reversible (GTR) com sítios invariáveis (I) e parâmetro de distribuição Gamma (G) (GTR+G+I). A análise foi realizada com base em 83 alinhamentos de 76 sequências ITS2. Os valores de bootstrap (1.000 replicatas) são mostrados próximos aos galhos. Valor de cutoff = 30%. A análise evolutiva foi realizada no software MEGA7. As ordens Clorellales, Chlamydomonadales, Chaetophorales e Sphaeropleales estão representadas, respectivamente, pelas cores oliva, vermelho, roxo e verde.

A área de biocombustíveis tem sido o principal alvo de estudos com microalgas nos últimos 10 anos (Figura 2), sendo a maior parte dos trabalhos relacionados a espécies das famílias *Chlorellaceae* e *Chlamydomonaceae*. De fato, se observa um grande potencial para espécies dessas famílias, como é observado em um trabalho realizado por Hodgskiss et al. (2016), no qual foi possível isolar uma cepa da família *Chlorellaceae* capaz de acumular 27% de teor de lipídeos em sua biomassa total.

Segundo Cao et al. (2013), em decorrência da alta capacidade de acúmulo de lipídeos de espécies dessa família, é possível produzir biodiesel com alto rendimento a partir da biomassa úmida desse grupo de microrganismos. Dentre as cepas da coleção de microrganismos da Embrapa, 16% do total são representantes da família Chlorellaceae.

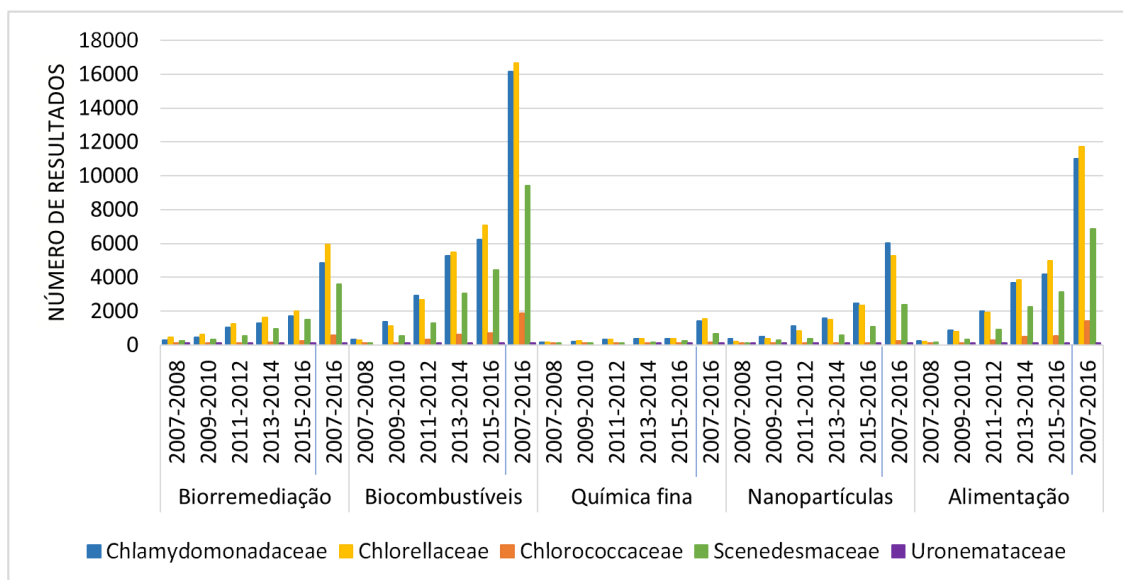


Figura 2. Número de resultados de pesquisa para estudos envolvendo microalgas em diferentes áreas entre 2007 e 2016. Para a obtenção dos resultados, foram realizadas buscas por estudos com espécies dos gêneros mais representativos de cada uma das famílias, utilizando a base de dados do Google Scholar.

Assim como na área de biocombustíveis, os dados obtidos com o levantamento bibliográfico mostram que as espécies das famílias Chlamydomonadaceae e Chlorellaceae também são as mais estudadas quanto ao seu potencial uso na indústria de alimentos. Em trabalho realizado por Tibbetts et al. (2015), a caracterização da biomassa produzida por uma microalga da família Chlorellaceae mostrou que a mesma é alta produtora de aminoácidos essenciais e que por isso poderia ser utilizada para suplementação animal. Dentre as cepas da coleção, a *C.biconvexa* Embrapa|LBA40 (Chlamydomonadaceae) (SANTANA et al., 2017) e *Tetranephris* sp. Embrapa|LBA52 (Scenedesmaceae) (CEREIJO et al., dados não publicados) também apontaram um alto acúmulo de proteínas, indicando o potencial desses organismos para serem utilizados na nutrição animal ou humana. Como apontado por Cheunbarn e Cheunbarn (2015), em geral, a biomassa microalgal é altamente rica em proteínas essenciais para o desenvolvimento de peixes como a tilápia (*Oreochromis niloticus*), podendo ser aplicada industrialmente para essa finalidade.

A indústria química é um segmento de alto valor agregado, que ainda explora pouco o potencial das microalgas. Esses organismos podem ser utilizados para a produção de vários produtos, dentre eles o 1,2 propanodiol e o etileno glicol. De acordo com o trabalho desenvolvido por Miao et al. (2015), é possível utilizar um processo de produção direta dessas substâncias a partir de biomassa de microalgas da Família Chlorococcaceae com um rendimento de 41,5%. Wang et al. (2016), por sua vez, produziram 5-hidroximetilfurfural também utilizando uma espécie da família

Chlorococcaceae. Esses resultados indicam uma potencial aplicação de cerca de 25% das cepas de microalgas da coleção de microrganismos da Embrapa (Figura 2).

Outro segmento de alto valor agregado é a produção de fármacos. Nesse setor, a nanotecnologia busca alternativas de tratamentos de várias patologias de maneira mais direcionada, evitando assim a exposição do organismo a maiores níveis de medicamentos. Segundo Khalid et al. (2017), é possível sintetizar nanopartículas de prata, utilizados para o tratamento de infecções virais e bacterianas e também no combate a neoplasias, a partir de extratos retirados de microalgas das famílias Chlorellaceae e Scenedesmaceae. Tendo em vista que 47% da coleção de microalgas da Embrapa Agroenergia são da família Scenedesmaceae, pode-se desenvolver pesquisas mais específicas para esse segmento.

Conclusões

Os resultados do trabalho demonstram que a coleção de microalgas da Embrapa apresenta significativa diversidade filogenética e possui representantes dos gêneros com potencial biotecnológico e industrial, como, por exemplo, as espécies das famílias Chlorellaceae e Chlamydomonadales. Levando em consideração os dados levantados, é possível verificar que a maior parte das cepas da coleção de microrganismos da Embrapa pertence à família Scenedesmaceae, sendo esta pouco explorada em todas as áreas de pesquisa analisadas. No entanto, esse dado não restringe a aplicação das cepas analisadas em outras áreas, como as de química fina e nanopartículas. Foi possível apontar potenciais usos de espécies das famílias representadas na coleção de microrganismos da Embrapa, o que poderá permitir o direcionamento de futuros trabalhos com esses microrganismos para a produção de biocombustíveis, suplementos alimentares, químicos finos e nanopartículas.

Agradecimentos

Os autores agradecem à Embrapa, ao CNPq e à Capes pelo apoio recebido.

Referências

- BRASIL, B. S. A. F.; SILVA, F. C. P.; SIQUEIRA, F. G. Microalgae biorefineries: the brazilian scenario in perspective. **New Biotechnology**, v. 16, p. 32271-32273, 2016.
- CHEUNBARN, T.; CHEUNBARN, S. Cultivation of algae in vegetable and fruit canning industrial wastewater treatment effluent for tilapia (*Oreochromis niloticus*) feed supplement. **International Journal of Agriculture & Biology**, v. 17, n. 3, p. 653-657, 2015.
- FUQÍKOVÁ, K.; CHIEN, L.; LEWIS, L. A.; KAROL, K. G. An assessment of proposed DNA barcodes in freshwater green algae. **Cryptogamie, Algologie**, v. 31, n. 4, p. 529-555, 2010.
- HADI, S. I.; SANTANA, H.; BRUNALE, P. P.; GOMES, T. G.; OLIVEIRA, M. D.; MATTHIENSEN, A.; OLIVEIRA, M. E.; SILVA, F. C.; BRASIL, B. S. DNA barcoding green microalgae isolated from neotropical inland waters. **PloS One**, v. 11, n. 2, artigo e0149284, 2016.
- HODGSKISS, L. H.; NAGY, J.; BARNHART, E. P.; CUNNINGHAM, A. B.; FIELDS, M. W. Cultivation of a native alga for biomass and biofuel accumulation in coal bed methane production water. **Algal Research-Biomass Biofuels and Bioproducts**, v. 19, p. 63-68, 2016.

KHALID, M.; KHALID, N.; AHMED, I.; HANIF, R.; ISMAIL, M.; JANJUA, H. A. Comparative studies of three novel freshwater microalgae strains for synthesis of silver nanoparticles: insights of characterization, antibacterial, cytotoxicity and antiviral activities. **Journal of Applied Phycology**, v. 29, n. 4, p. 1851-1863, 2017.

MIAO, G.; ZHU, C.; WANG, J.; TAN, Z.; WANG, L.; LIU, J.; KONG, L.; SUN, Y. Efficient one-pot production of 1, 2-propanediol and ethylene glycol from microalgae (*Chlorococcum* sp.) in water. **Green Chemistry**, v. 17, n. 4, p. 2538-2544, 2015.

SANTANA, H.; CEREIJO, C. R.; TELES, V. C.; NASCIMENTO, R. C.; FERNANDES, M. S.; BRUNALE, P.; CAMPANHA, R. C.; SOARES, I. P.; SILVA, F. C. P.; SABAINI, P. S.; SIQUEIRA, F. G.; BRASIL, B. S. A. F. Microalgae cultivation in sugarcane vinasse: Selection, growth and biochemical characterization. **Bioresource Technology**, v. 228, p. 133-140, 2017.

SUKAČOVÁ, K.; TRTÍLEK, M.; RATAJ, T. Phosphorus removal using a microalgal biofilm in a new biofilm photobioreactor for tertiary wastewater treatment. **Water Research**, v. 71, p. 55-63, 2015.

TIBBETTS, S. M.; WHITNEY, C. G.; MACPHERSON, M. J.; BHATTI, S.; BANSKOTA, A. H.; STEFANOVA, R.; MCGINN, P. J. Biochemical characterization of microalgal biomass from freshwater species isolated in Alberta, Canada for animal feed applications. **Algal Research-Biomass Biofuels and Bioproducts**, v. 11, p. 435-447, 2015.

WANG, J.; TAN, Z.; ZHU, C.; MIAO, G.; KONG, L.; SUN, Y. One-pot catalytic conversion of microalgae (*Chlorococcum* sp.) into 5-hydroxymethylfurfural over the commercial H-ZSM-5 zeolite. **Green Chemistry**, v. 18, n. 2, p. 452-460, 2016.

Caracterização da composição química da biomassa da microalga *Chlamydomonas biconvexa* cultivada em efluente da indústria de óleo de palma

Dágon Manoel Ribeiro¹, Rodrigo Carvalho do Nascimento², Carolina Ribeiro Cereijo³, Hugo Santana⁴, Lorena Costa Garcia⁵, Bruno dos Santos Alves Figueiredo Brasil⁶

Resumo

A indústria global de óleo de palma produz mais de 54 milhões de toneladas de óleo anualmente, gerando cerca de 135 milhões de toneladas de efluente, o qual causa diversos danos ao ambiente. Atualmente, há perspectiva de utilização de microalgas para o tratamento de efluentes e concomitante geração de matéria-prima (biomassa) para produção de energia, alimento e bioprodutos. O objetivo deste trabalho foi avaliar o crescimento e a composição da microalga *Chlamydomonas biconvexa* Embrapa|LBA40, cultivada em efluente de lagoa de estabilização da indústria de óleo de palma (ELE-POME). Os teores das frações proteica, lipídica e cinzas também foram determinados juntamente com o perfil de ácidos graxos e carboidratos, permitindo a avaliação de diferentes aplicações biotecnológicas para a biomassa microalgal. Carboidratos correspondem à maior fração encontrada obtendo 42,53% no cultivo com BBM (5º dia) e 42,35% no cultivo com ELE-POME (10º dia).

Palavras-chave: biorremediação. Biorrefinarias. bioenergia.

Introdução

A palma de óleo é uma das mais promissoras matérias primas para a produção mundial de biodiesel (YASIN et al., 2017). Atualmente, a produção mundial de óleo de palma ultrapassa 54 milhões de toneladas anuais (FAOSTATS, 2014). A maior parte é produzida na Indonésia e na Malásia, movimentando mais de 35 bilhões de dólares em todo o mundo (CENTER FOR INTERNATIONAL DEVELOPMENT AT HARVARD UNIVERSITY, 2014).

A cada tonelada de óleo de palma produzido, são geradas 2,5 toneladas de efluente do moinho de óleo de palma (POME: *Palm Oil Mill Effluent*), o que acarreta

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

² Engenheiro bioquímico, Mestre em Biotecnologia, rodrigo.nascimento@colaborador.embrapa.br

³ Bióloga, doutoranda em Tecnologias Químicas de Biológicas, Universidade de Brasília, carolina.cereijo@colaborador.embrapa.br

⁴ Biotecnologista, doutorando em Tecnologias Químicas de Biológicas, Universidade de Brasília, hugo.santana@colaborador.embrapa.br

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

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

um passivo ambiental que deve ser manejado. Uma das alternativas para o tratamento desse resíduo é o seu aproveitamento como substrato para o cultivo de microalgas para a produção de bioenergia e bioprodutos (AHMED et al., 2015). Exemplos são as cepas de microalgas *Clamydomonas biconvexa* Embrapa|LBA40 e *Tetranephris* sp. Embrapa|LBA52 que foram prospectadas a partir da coleção de microorganismos e microalgas aplicados a agroenergia e biorrefinarias da Embrapa. Essas microalgas podem promover a biorremediação do POME quando consorciadas ao uso de sistemas de lagoas de estabilização (BRASIL et al. 2016; CEREJO, 2016; NASCIMENTO, 2016; KAMYAB et al., 2016).

Este trabalho tem como objetivo determinar a composição da biomassa da cepa *C. biconvexa* Embrapa|LBA40 cultivada em efluentes de lagoas de estabilização da indústria de óleo de palma (ELE-POME) de modo a avaliar o seu potencial aproveitamento como matéria-prima para produção de compostos químicos, biocombustíveis, materiais renováveis e alimentos.

Materias e Métodos

O experimento foi realizado no laboratório de biotecnologia de algas (LBA) da Embrapa Agroenergia. A microalga utilizada foi a cepa de *C. biconvexa* Embrapa|LBA40, isolada e identificada por Hadi e colaboradores (2016), cultivada em fotobiorreatores *air lift* de placas planas de acrílico de 15 L, com volume de trabalho de 13 L, aeração de 60 Lh⁻¹ e suplementação de CO₂ ajustada para 5% da vazão de ar, com fotoperíodo de 12/12 a 35.000 Lux e temperatura de 25 °C no escuro e 35 °C no claro.

Os cultivos foram realizados em bateladas independentes durante 5, 10 e 15 dias, avaliando o crescimento celular por densidade óptica (DO) a 680 nm e utilizando dois tipos de meio de cultivo o meio Bold Basal (BISCHOFF; BOLD, 1963) e o meio composto com 100% de efluente de lagoa de estabilização da indústria de óleo de palma (ELE-POME).

Ao final dos cultivos, a biomassa foi liofilizada e foram quantificados os teores de sólidos totais e cinzas segundo Wychen e Laurens (2015b) e de proteínas (metodologia de microKjeldahl (AOAC INTERNATIONAL, 1990) para a quantificação de nitrogênio e o cálculo do teor proteico, utilizando o fator de conversão de 4,75 específico para microalgas (LAURENS, 2013). O teor e as frações de carboidratos foram determinados segundo metodologia descrita por Wychen e Laurens (2015a). A fração lipídica foi obtida por Ankom XT15 pelo método de determinação do Extrato Etéreo (EE), extraído com éter de petróleo a 90 °C por 90 minutos. A caracterização do perfil de ácidos graxos foi realizada em cromatógrafo gasoso (AOAC INTERNATIONAL, 2005).

Os resultados foram submetidos à análise de variância e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey (significância de 5 %).

Resultados e Discussões

A cepa *C. biconvexa* Embrapa|LBA40 foi cultivada em fotobiorreatores de 15L, com volume de trabalho de 14 L, utilizando ELE-POME como meio de cultivo e suplementação de dióxido de carbono durante 15 dias. A Figura 1 apresenta o crescimento da cepa de *C. biconvexa* Embrapa|LBA40 em ELE-POME em comparação com o meio sintético padrão, Bold Basal. É possível observar que não houve diferença significativa na tendência de crescimento durante os primeiros 15 dias de cultivo.

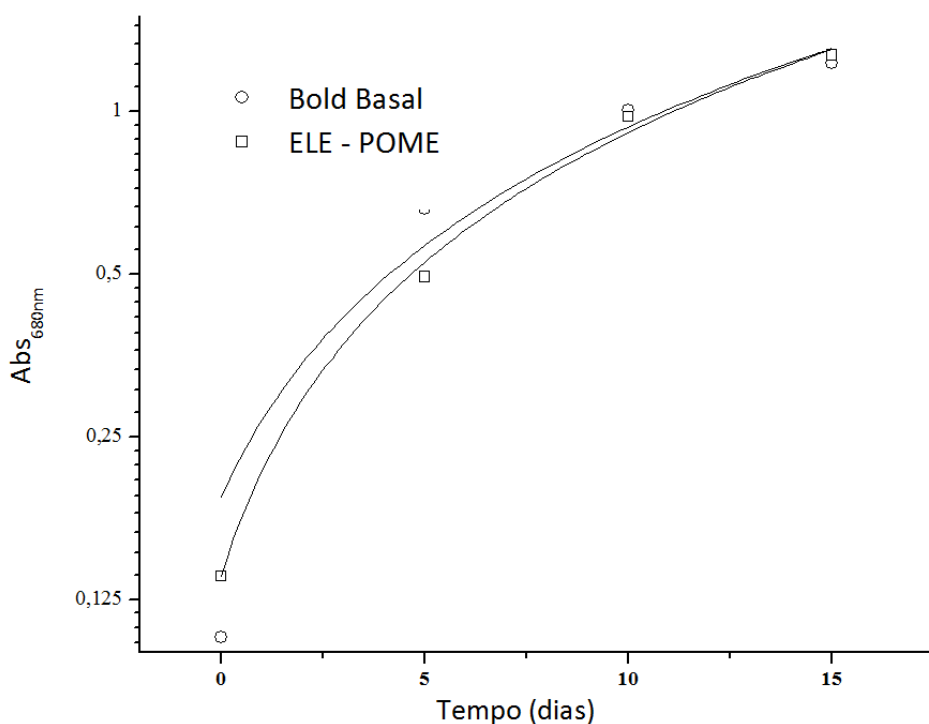


Figura 1. Crescimento *Chlamydomonas biconvexa* cultivadas em Bold Basal e ELE-POME.

Visando o aproveitamento integral da biomassa como potencial matéria-prima para biorrefinarias (BRASIL et al., 2016), as frações majoritárias da biomassa (carboidratos, lipídios, proteínas e cinzas) foram determinadas nos diferentes tempos de cultivo em meio Bold Basal e ELE-POME (Tabela 1).

É possível observar que, em todos os cultivos realizados, a maior fração foi de carboidratos atingindo até 42,53% em cultivo com Bold Basal (quinto dia), com produtividade de 81,1 mg.L⁻¹.d⁻¹, e em cultivo com ELE-POME a máxima fração de carboidratos foi 42,35% no décimo dia com produtividade de 66,1 mg.L⁻¹.d⁻¹. Uma biomassa algal com alto teor e produtividade de carboidratos pode ser destinada à produção de bioetanol (FARIAS SILVA; BERTUCCO, 2016).

Tabela 1. Teor e produtividade de biomassa, carboidratos, proteínas, lipídios e cinzas de *C. biconvexa* Embrapa|LBA40 cultivadas em Bold Basal e ELE-POME de diferentes dias de coleta.

<i>Chlamydomonas biconvexa</i> Embrapa LBA40	Bold Basal			ELE - POME		
	5 dias	10 dias	15 dias	5 dias	10 dias	15 dias
Produtividade de Biomassa (mg.L ⁻¹ .d ⁻¹)	190,6 (± 15) ^a	147,3 (± 7,5) ^b	89,5 (± 5) ^c	164,7 (± 15) ^{ab}	156 (± 1,1) ^b	104 (± 17,3) ^c
Teor de carboidratos (%)	42,53 (± 1,7) ^a	37,17 (± 1,5) ^{abc}	30,97 (± 2,4) ^c	31,96 (± 3,4) ^c	42,35 (± 4,0) ^{ab}	34,31 (± 3,8) ^{bc}
Produtividade de carboidratos (mg.L ⁻¹ .d ⁻¹)	81,1 (± 3,3) ^a	54,7 (± 2,2) ^{bc}	27,7 (± 2,2) ^d	52,6 (± 5,6) ^c	66,1 (± 6,3) ^b	35,7 (± 4,0) ^d
Teor de proteínas (%)	21,6 (± 0,12) ^b	18,9 (± 0,14) ^c	17,9 (± 0,08) ^d	26 (± 0,18) ^a	19,3 (± 0,41) ^c	19,0 (± 0,13) ^c
Produtividade de proteínas (mg.L ⁻¹ .d ⁻¹)	41,1 (± 0,2) ^b	27,8 (± 0,21) ^d	15,7 (± 0,07) ^f	42,8 (± 0,31) ^a	30 (± 0,65) ^c	19,8 (± 0,13) ^e
Teor de lipídios (%)	12 (± 0,43) ^a	12,3 (± 0,52) ^a	6,42 (± 0,31) ^c	11,3 (± 0,8) ^{ab}	9,95 (± 0,45) ^b	6,99 (± 0,60) ^c
Produtividade de lipídios (mg.L ⁻¹ .d ⁻¹)	22,9 (± 0,82) ^a	18 (± 0,77) ^b	5,7 (± 2,8) ^c	18,6 (± 1,3) ^b	15,5 (± 0,71) ^b	7,3 (± 0,62) ^c
Teor de Cinzas (%)	6,45 (± 0,56) ^a	4,8 (± 0,04) ^b	5,2 (± 0,12) ^b	6,68 (± 0,2) ^a	4,64 (± 0,08) ^{bc}	4,06 (± 0,18) ^c
Produtividade de Cinzas (mg.L ⁻¹ .d ⁻¹)	12,3 (± 1,07) ^a	7,1 (± 0,07) ^c	4,6 (± 0,11) ^d	11 (± 0,33) ^b	7,2 (± 0,12) ^c	4,2 (± 0,19) ^d

*Médias seguidas por letras iguais na coluna não diferem pelo teste de Tukey aos 5% de probabilidade

Em estudos de Santana e colaboradores (2016), que realizaram cultivos de *C. biconvexa* Embrapa|LBA40 nas mesmas condições (fotobiorreatores de 15 L), porém utilizando vinhaça (efluente de usinas de etanol), a maior fração observada foi de proteínas atingindo o teor de 41% da biomassa e produtividade de até 88,71 mg.L⁻¹.d⁻¹. Esses valores são superiores aos encontrados neste trabalho, que observou o maior teor (26%) e produtividade (42,8 mg.L⁻¹.d⁻¹) de proteínas em cultivos em ELEPOME após 5 dias de cultivo.

No meio ELE-POME, o teor e a produtividade de lipídios alcançou sua maior produção em 5 dias de cultivo, acumulando 11,3% e com uma produtividade de 18,6 mg.L⁻¹.d⁻¹. Diversas são as estratégias para a obtenção de maior fração lipídica, como a utilização de estresses no cultivo (MINHAS et al., 2016) ou a utilização da tecnologia do DNA recombinante e engenharia metabólica (MALLICK et al., 2016; AJJAW et al., 2017).

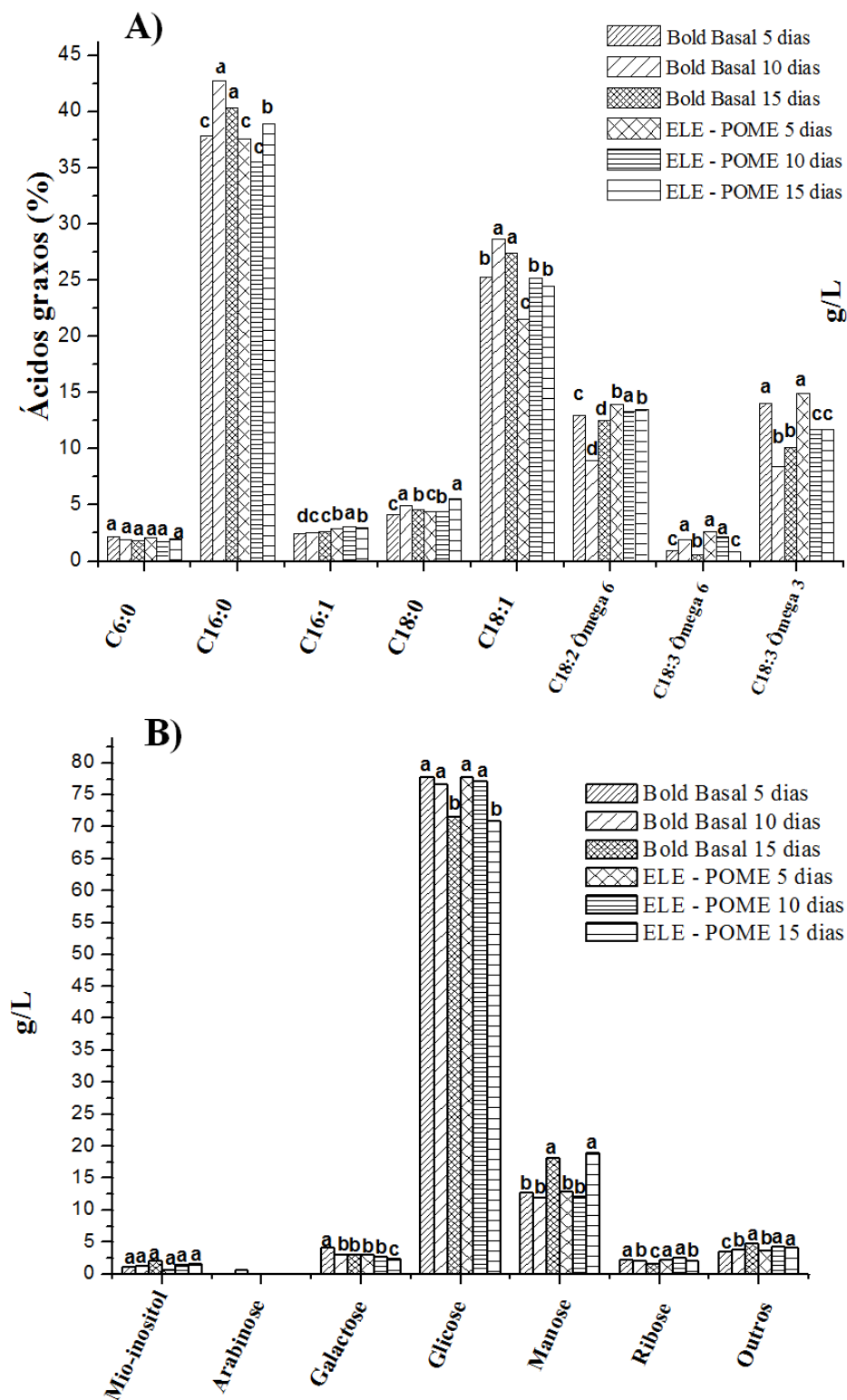


Figura 2. Caracterização do perfil de A) Ácidos Graxos e B) Carboidratos *C. biconvexa* Embrapa|LBA40 cultivadas em Bold Basal e ELE-POME de diferentes dias de coleta.

*Letras iguais não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey aos 5% de probabilidade.

Atualmente, o objetivo de muitos pesquisadores é aperfeiçoar técnicas que possam utilizar toda biomassa. É o caso do processo de liquefação hidrotérmica, por meio da qual, com a utilização de altas temperaturas, pressão e catalizadores, é possível converter a biomassa algal em petróleo bruto (*crude oil*) (JONES et al., 2014; BARREIRO et al., 2015; HU et al., 2017).

Na Figura 2, é apresentada a caracterização do perfil de ácidos graxos e de carboidratos, informações importantes, visto que existe uma crescente busca por coprodutos de alto valor agregado para um maior ganho econômico em biorrefinaria de microalgas (CHEW et al., 2017).

Estudos da caracterização composição química da biomassa são essenciais para entender como os organismos controlam suas vias de biossíntese em resposta às condições fisiológicas e ambientais. A caracterização dos compostos das microalgas traz a possibilidade para além da futura produção de biocombustíveis de a biomassa algal vir a se tornar uma matéria-prima destinada como alimento animal ou humano e biocompostos de alto valor agregado de interesse biotecnológico (YU et al., 2011).

Existem grandes perspectivas de que os estudos com microalgas possam trazer diferentes soluções sustentáveis a problemas energéticos, alimentares e ambientais (BHUIJADE et al., 2017; PIRES, 2017). E especialmente no Brasil, que já foi relatado por diversos autores como um dos países no mundo que tem maior possibilidade de implantação das biorrefinarias de microalgas, pela disponibilidade de áreas, altas incidências luminosas, temperatura tropical e a possibilidade de integrar a produção de microalgas em agroindústrias já existentes como usinas sucroalcooleiras, usinas petroquímicas e indústrias de óleo de palma (MOODY, et al., 2014; SASONGKO; NOGUCHI, 2015; BRASIL et al., 2016).

Conclusão

Mostrou-se promissora a utilização do cultivo de microalgas em efluente da indústria de óleo de palma tanto para biorremediação do efluente, em que foi relatada uma remoção significativa de nitrogênio e fósforo (NASCIMENTO, 2016), quanto para a produção de biomassa algal. Os carboidratos foram os compostos majoritários dentre as frações analisadas, atingindo até 42,53% no cultivo com BBM (5º dia) e 42,35% no cultivo com ELE-POME (10º dia). Os teores de proteínas, lipídios, cinzas, perfil de ácidos graxos e carboidratos foram estudados mostrando que a microalga *Chlamydomonas biconvexa* Embrapa|LBA40 é uma excelente opção para integração da produção e biorrefinaria de biomassa microalgal com a indústria de óleo de palma no Brasil. Análises toxicológicas são necessárias para a destinação da biomassa algal para uso alimentício.

Referências

- AHMED, Y.; YAAKOB, Z.; AKHTAR, P.; SOPIAN, K. Production of biogas and performance evaluation of existing treatment processes in palm oil mill effluent (POME). **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 42, p. 1260–1278, 2015.
- AJJAW, I.; VERRUTO, J.; AQUÍ, MO.; SORIAGA, L. B.; COPPERSMITH, J.; KWOK, K.; PEACH L.; ORCHARD, E.; KALB, R.; XU, W.; CARLSON, T. J.; FRANCIS, K.; KONIGSFELD K.; BARTALIS, J.; SCHULTZ, A.; LAMBERT, W.;

SCHWARTZ, A. S.; BROWN, R.; MOELLERING, E. R. Lipid production in *Nannochloropsis gaditana* is doubled by decreasing expression of a single transcriptional regulator. **Nature Biotechnology**, v. 35, n. 7, p. 647+, 2017.

AOAC INTERNATIONAL. **Official methods of analysis of AOAC International**. 11th ed. Maryland, 1990.

AOAC INTERNATIONAL. **Official Procedure. Approved Procedure Ce 1-62 - Fatty Acid Composition by gas chromatography**. Illinois: American Oil Chemists Society, 2005.

AOCS. **Official Procedure. Approved Procedure Ce 2-66 - Preparation of methyl esters of fatty acids**. Illinois: American Oil Chemists Society, 2005.

BARREIRO, D. L.; RIEDE, S.; HORNING, U.; KRUSE, A.; PRINS W. Hydrothermal liquefaction of microalgae: Effect on the product yields of the addition of an organic solvent to separate the aqueous phase and the biocrude oil. **Algal Research-Biomass Biofuels and Bioproducts**, v. 12, p. 206-212, 2015.

BHUJADE, R.; CHIDAMBARAM, M.; KUMAR, A.; SAPRE, A. Algae to Economically Viable Low-Carbon-Footprint Oil. **The Annual Review of Chemical and Biomolecular**, v. 8 p. 335-357, 2017.

BISCHOFF, H. W.; BOLD, H. C. **Some soil algae from enchanted rock and related algal species**. Austin: University of Texas Publications, 1963. 95 p.

BRASIL, B. S. A. F.; SILVA, F. C. P.; SIQUEIRA F. G. Microalgae biorefineries: the brazilian scenario in perspective. **New Biotechnology**, n. 16, p. 32271-32273, 2016.

CENTER FOR INTERNATIONAL DEVELOPMENT AT HARVARD UNIVERSITY. **The Atlas of Economic Complexity**. 2014. Disponível em: <http://atlas.cid.harvard.edu/explore/tree_map/export/show/all/1511/2014/>. Acesso em: jun. 2017.

CHEW, K. W.; YAPA, J. Y.; SHOW, P. L.; SUANC, N. H.; JUAN, J. C.; LING, T. C.; LEE, D. J.; CHANG, J. S. Microalgae biorefinery: high value products perspectives. **Bioresource Technology**, v. 229, p. 53-62, 2017.

CEREIJO, C. R. **Seleção e cultivo de microalgas em efluentes de agroindústrias de palma-de-óleo e mandioca**. 2016. 51 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Tocantins, Gurupi, TO. Orientador: Félix Gonçalves de Siqueira.

FARIAS SILVA, C. E. de; BERTUCCO A. Bioethanol from microalgae and cyanobacteria: a review and technological outlook. **Process Biochemistry**, v. 51, n. 11, p. 1833-1842, 2016.

FAOSTAT. **Food and agriculture data**. 2014. Disponível em: <<http://www.fao.org/faostat>>. Acesso em: jun. 2017.

HADI, S. I. I. A.; SANTANA, H.; BRUNALE, P. P. M.; GOMES, T. G.; OLIVEIRA M. D.; MATTHIENSEN A.; OLIVEIRA, M. E. C.; SILVA, F. C. P.; BRASIL, B. S. A. F. DNA Barcoding Green Microalgae Isolated from Neotropical Inland Waters. **PLoS ONE**, v. 11, n. 2, artigo e0149284, 2016.

HU, Y.; FENG, S.; XU, C.; BASSI, A. Production of low-nitrogen bio-crude oils from microalgae pre-treated with pre-cooled NaOH/urea solution. **Fuel**, v. 206, p. 300-306, 2017.

JONES, S. B.; ZHU, Y.; ANDERSON, D. B.; HALLEN, R. T.; ELLIOTT, D. C.; SCHMIDT, A. J.; ALBRECHT, K. O.; HART, T. R.; BUTCHER, M. G.; DRENNAN, C.; SNOWDEN-SWAN, L. J.; DAVIS, R.; KINCHIN, C. **Process design and economics for the conversion of algal biomass to hydrocarbons: whole algae hydrothermal liquefaction and upgrading**. Washington, DC: Pacific Northwest National Laboratory, 2014. PNNL-23227.

KAMYAB, H.; DIN, M. F. M.; PONRAJ, M.; KEYVANFAR, A., REZANIA, S; TAIB, S. M.; MAJID, M. Z. A. Isolation and screening of microalgae from agro-industrial wastewater (POME) for biomass and biodiesel sources. **Desalination and Water Treatment**, v. 57, n. 60, p. 29118-29125, 2016.

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

MALLICK, N.; BAGCHI, S. K.; KOLEY, S.; SINGH, A. K. Progress and challenges in microalgal biodiesel production. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, artigo 79, 2016.

MINHAS, A. K.; HODGSON, P.; BARROW, C. J.; ADHOLEYA A. A review on the assessment of stress conditions for simultaneous production of microalgal lipids and carotenoids. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, artigo 546, 2016.

MOODY, J. W.; MCGINTY, C. M.; QUINN, J. C. Global evaluation of biofuel potential from microalgae. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 111, n. 23, p. 8691-8696, 2014.

NASCIMENTO R. C. **Cultivo de microalgas em fotobiorreatores de placas planas para a produção de biomassa e biorremediação de efluente da agroindústria de óleo de palma**. 2016. 59 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Federal do Tocantins, Gurupi, TO. Orientador: Bruno dos Santos Alves Figueiredo Brasil.

PIRES, J. C. M. COP21: The algae opportunity? **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 79, p. 867-877, 2017.

SANTANA, H.; CEREIJO, C. R.; TELES, V. C.; NASCIMENTO, R. C.; FERNANDES, M. S.; BRUNALE, P.; CAMPANHA, R. C.; SOARES, I. P.; SILVA, F. C. P.; SABAINI, P. S.; SIQUEIRA, F. G.; BRASIL, B. S. A. Microalgae cultivation in sugarcane vinasse: selection, growth and biochemical characterization. **Bioresource Technology**, v. 228, p. 133-140, 2016.

SASONGKO, N. A.; NOGUCHI, R. Comprehensive evaluation of integrated energy plantation model of palm oil and microalgae based biofuel for sustainable energy production. In: BAKAR, R. B. A.; FROOME, C. (Ed.). **Sustainable energy for green mobility**. Amsterdam: Elsevier, 2015. p. 226-235. (Energy Procedia, v. 68).

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

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

YASIN, M. H. M.; MAMAT R.; NAJAFIC. G.; ALI, O. M.; YUSOP, A. F.; ALI, M. H. Potentials of palm oil as new feedstock oil for a global alternative fuel: a review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 79, p. 1034-1049, 2017.

YU, W. L.; ANSARI, W.; SCHOEPP, N. G.; HANNON, M. J.; MAYFIELD, S. P.; BURKART, M. D. Modifications of the metabolic pathways of lipid and triacylglycerol production in microalgae. **Microbial Cell Factories**, London, v. 10, artigo 91, 2011.

Combinação de extratos enzimáticos de basidiomicetos e ascomicetos para hidrólise do cacho vazio de dendê

Elias Alves da Silva¹, Thályta Fraga Pacheco², Thais Demarchi Mendes³,
Marivane Lemos⁴, Felipe B.P. Carvalho⁵, Léia Cecília de Lima Favaro⁶, Simone
Mendonça⁷, Felix Gonçalves de Siqueira⁸, Manoel Teixeira Souza Júnior⁹

Resumo

A cadeia de produção e uso do dendê (*Elaeis guineensis*) tem buscado se alinhar à lógica de biorrefinaria, visando à sustentabilidade e competitividade do setor. Nesse contexto, o aproveitamento integral de resíduos para a geração de outros produtos de maior valor agregado ganha relevância. Os cachos vazios são abundantes resíduos lignocelulósicos dessa cadeia. Na natureza, os basidiomicetos degradam eficientemente os componentes estruturais da parede celular vegetal, em função do arcabouço enzimático, enquanto alguns fungos filamentosos são eficientes em determinado componente. O presente estudo objetivou verificar a capacidade lignolítica e hidrolítica de extratos enzimáticos de basidiomicetos (coleção Embrapa Agroenergia – FPB), combinados com extratos de dois ascomicetos *Trichoderma reesei* ATCC60787 (Tr) e *Aspergillus aculeatus* F-50 [NBRC108796] (Aa), sobre o cacho vazio de dendê pré-tratado (autohidrólise). Os basidiomicetos FPB's 26; 28; 102; 104; 109; 115 e 116 foram cultivados sobre o cacho vazio (fermentação estado sólido), para obtenção dos extratos. Os Ascomicetos *T. reesei* ATCC 6087[®] e *A. aculeatus* F-50 [NBRC108796][™] foram cultivados em condição submersa em meio Mandels Weber (1969), suplementado com 2,5 % de borra (sólido obtido no tridecantador de óleo de dendê), para também obtenção de extratos. A hidrólise foi realizada em placas tipo *Deep Well* contendo 0,45g de fibra e 6 mL da mistura constituída por extratos, tampão e água destilada por poço. Os resultados evidenciaram maiores teores de glicose nas misturas contendo extratos de *T. reesei* e *A. aculeatus* e FPB's 109; 115e 116, levando à produção de (2,73 g. L⁻¹), (2,38 g. L⁻¹) e (2,58 g. L⁻¹), respectivamente.

Palavras-chave: fungos de podridão-branca. agroindústria do dendê. coquetel enzimático. açúcares solúveis.

¹ Biólogo, mestre em Plantas Medicinais, Aromáticas e Condimentares, doutorando em Biotecnologia Vegetal, Universidade Federal de Lavras (UFLA) / CAPES-EMBRAPA, elias.silva@colaborador.embrapa.br

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

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

⁴ Farmacêutica analista clínica, Universidade de Caxias do Sul, pós-doutoranda CAPES/ EMBRAPA, marivane.lemos@colaborador.embrapa.br

⁵ Engenheiro bioquímico, analista da Embrapa Agroenergia, felipe.carvalho@embrapa.br

⁶ Bióloga, doutora em genética e melhoramento de plantas, pesquisadora da Embrapa Agroenergia, leia.favaro@embrapa.com

⁷ Farmacêutica bioquímica, doutora em saúde pública, pesquisadora da Embrapa Agroenergia, simone.mendonca@embrapa.br

⁸ Biólogo, doutor em biologia molecular, pesquisador da Embrapa Agroenergia, felix.siqueira@embrapa.br

⁹ Engenheiro-agrônomo, doutor em Fitopatologia e Biologia Molecular de Plantas, pesquisador da Embrapa Agroenergia, manojel.souza@embrapa.br

Introdução

A agricultura tem buscado suprir a demanda da sociedade cada vez mais exigente. Com isso, durante o processamento de matérias-primas, as cadeias produtivas acabam se deparando com resíduos, resultantes de uma ou mais etapas de beneficiamento. Em virtude dessa e de outras problemáticas, nasceu o conceito de bioeconomia, que consiste em um modelo de desenvolvimento sustentável em que a utilização dos recursos naturais deve ocorrer de forma cíclica e com responsabilidade de gerar tecnologias ambientalmente corretas como a bioenergia (PHILP, 2015).

Nesse cenário, encontra-se a cadeia produtiva da palma de óleo (*Elaeis guineensis*), uma cultura oleaginosa altamente produtiva que supera a produtividade de outras oleaginosas tradicionais, como a soja, o girassol e a canola (MALAYSIAN PALM OIL BOARD, 2017). Apesar do alto rendimento de óleo, a indústria do dendeeiro (fazendas e agroindústrias) produz milhões de toneladas de biomassa lignocelulósica anualmente.

Os cachos vazios do dendê EFB (*Empty Fruit Bunch*), resultantes da extração dos frutos para obtenção do óleo, é uma das frações da cadeia produtiva do setor, e que apresenta características para obtenção de açúcares solúveis e fermentescíveis a etanol e outros produtos de polissacarídeos lignocelulósicos (CHIESA; GNANSOUNOU, 2014). O fator limitante de sua utilização é a lignina, constituinte altamente recalcitrante da parede celular (PARK et al., 2013), o que pode ser contornado com pré-tratamentos da biomassa.

O método de auto-hidrólise ou hidrotérmico consiste numa técnica que envolve a mistura de água e biomassa lignocelulósica em reator de alta pressão à altas temperaturas, isso promove a ruptura do material lignocelulósico, permitindo o acesso à celulose pelas enzimas hidrolíticas. No entanto, após o procedimento, parte da lignina solúvel fica adsorvida nas fibras de celulose, dificultando o aproveitamento destas (SINGH et al., 2016).

Os fungos de podridão-branca ou basidiomicetos têm a capacidade de degradar materiais lignocelulósicos (SAHA et al., 2016). Isso é possível em virtude da eficiência dos seus sistemas enzimáticos extracelulares, por apresentarem compostos de baixa massa molar (ligninases e oxidases) que infiltram a parede celular e agem sobre os componentes macromoleculares. Em seguida, ocorre a quebra de polissacarídeos com a ação das hidrolases (AGUIAR; FERRAZ, 2011; DASHTBAN et al., 2010), já os ascomicetos como *Trichoderma reesei* e *Aspergillus aculeatus*, possuem predominantemente em seu arcabouço enzimático a presença de hidrolases, o que justifica os estudos para produção em grande escala visando à utilização em biorrefinarias (GUPTA et al., 2014).

Nesse sentido, percebe-se que o tratamento da biomassa lignocelulósica proveniente dos cachos vazios do dendê é algo necessário para melhor aproveitamento do conteúdo de celulose e consequente produção de bioetanol e outros produtos de valor agregado. Dessa forma, o propósito deste trabalho foi observar os extratos brutos enzimáticos de basidiomicetos da biodiversidade Cerrado Brasileiro em conjunto com enzimas de fungos filamentosos já consolidados na literatura, de forma a compor um coquetel enzimático capaz de sacarificar o cacho vazio do dendê.

Material e métodos

Biomassa

Cachos vazios de dendê foram triturados e submetidos à secagem a 45 °C por 3 dias e, em seguida, a 60 °C por mais 3 dias. Posteriormente, o material foi acondicionado em saco plástico fechado e armazenado em local seco e protegido da luz.

Microrganismos

Foram selecionadas sete espécies de basidiomicetos pertencentes à coleção FPB (Embrapa Agroenergia), a partir de cultivos *in vitro* sobre o cacho vazio triturado e borra do decantador do óleo de dendê. Então, foram cultivados em potes de 200 mL contendo a fibra do cacho vazio de dendê (FC) (30g) ou em uma mistura composta de fibra do cacho vazio mais borra do decantador (FCB) (9:1). A umidade foi ajustada para aproximadamente 70% com adição de água destilada. Na sequência, os potes foram fechados e autoclavados a 121 °C durante 1 hora. Após resfriamento, os frascos foram inoculados assepticamente em câmara de fluxo vertical com 10 discos miceliais de 7 mm de cada fungo e, posteriormente, mantidos a 28 °C por 30 dias em câmara de crescimento até completa colonização.

Obtenção dos extratos enzimáticos

A biomassa colonizada pelos basidiomicetos foi lavada com uma solução de Tritox X-100 0,1% na proporção de 1:10. O extrato foi filtrado com gaze, centrifugado a 10.000 rpm, 4 °C, durante 10 minutos, e o sobrenadante denominado extrato enzimático, recolhido em tubos Falcons de 50 mL. Para obtenção dos extratos dos ascomicetos *Aspergillus aculeatus* F-50 [NBRC108796] e *Trichoderma reesei* ATCC®60787™, os mesmos foram cultivados em meio de cultura líquido (MANDELS; WEBER, 1969) (modificado – suplementado com 2,5% de borra do decantador de dendê moída) (ROMERO-PELAEZ, 2017). Foram utilizados seis discos miceliais de 7 mm de *T. reesei* e *A. aculeatus* separadamente para o cultivo submerso, que teve duração de 7 dias. Decorrido esse tempo, os cultivos foram filtrados com gaze e centrifugados a 10.000 rpm, 4 °C, durante 10 minutos, e os sobrenadantes recolhidos e armazenados em geladeira até utilização no preparo da mistura. Para realização dos ensaios, foi determinado o teor de proteínas solúveis totais de cada extrato de cada fungo pelo método BCA (Pierce™ BCA Protein Assay Kit Thermo scientific™) (SMITH et al., 1985).

Hidrólise da fibra pré-tratada

Para hidrólise, a fibra do cacho vazio de dendê foi pré-tratada pelo processo físico-químico de auto-hidrólise (hidrotérmico) em reator de alta pressão (Parr Illinois EUA), com relação sólido/líquido de 1:10, temperatura de 180 °C durante 40 minutos. Em seguida, utilizando placas de 24 células tipo *Deep Well*, pesou-se 0,45 g de fibra pré-tratada por auto-hidrólise em cada poço, o que corresponde a 5% de biomassa sólida juntamente com um volume de 6,460 mL da mistura enzimática constituída de extratos de basidiomicetos (20 mg de proteína) juntamente com extratos de *Trichoderma reesei* (13 mg de proteína), de *Aspergillus aculeatus* (7 mg de proteína), tampão acetato de sódio/ ácido cítrico 0,3 M pH 5,0 e água destilada. As placas foram seladas com filme adesivo e mantidas em shaker a 250 rpm, 50 °C, durante 24 h. A

concentração de glicose foi determinada pelo método glicose oxidase (Kit BIOCLIN[®]) (NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS, 1995).

Resultados e discussão

Os resultados mostraram que a mistura de extratos de basidiomicetos juntamente com os extratos dos ascomicetos teve efeito positivo na hidrólise da celulose do cacho vazio de dendê, uma vez que a soma da concentração de glicose gerada nas hidrólises usando Tr + Aa ou os extratos brutos dos basidiomicetos separadamente foi menor do que quando combinados.

As adições dos extratos FC 109, FC 115 e FC 116 tiveram efeito positivo quando combinadas com Tr e Aa, levando à liberação de 2,73 g L⁻¹, 2,38 g L⁻¹ e 2,58 g L⁻¹ de glicose respectivamente. Os menores teores de glicose observados foram produzidos pelos tratamentos FC 26 e FCB 115 (0,64 g L⁻¹) (Gráfico 1). Também foi observado que os fungos FCB 102, FC 104 e FCB 116, juntamente com *T.reesei* e *A. aculeatus*, apresentaram baixa liberação de glicose quando comparados com o controle, indicando que esses fungos não tiveram efeito positivo na mistura.

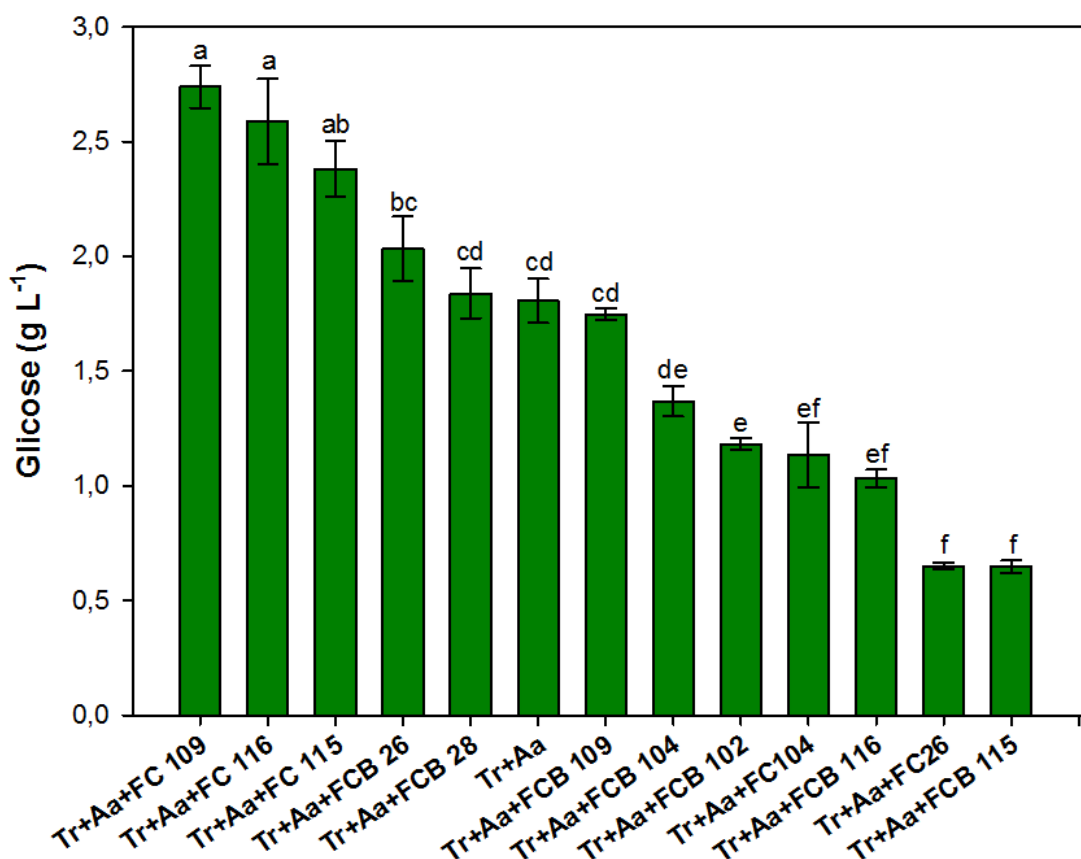


Figura 2. Teores de Glicose liberados após 24 horas de hidrólise enzimática utilizando misturas de enzimas Tr (*Trichoderma reesei* ATCC60787) com Aa (*Aspergillus aculeatus* F-50 [NBRC108796] mais extratos brutos de basidiomicetos (FPB). Legenda: FC (Fibra do cacho), FCB (Fibra do cacho mais Borra do decantador). Os números que sucedem as siglas correspondem aos códigos dos fungos utilizados. Letras diferentes evidenciam diferenças estatisticamente significativas pelo teste de Tukey ($p < 0,05$)

Os fungos filamentosos como *Trichoderma reesei* são muito estudados e utilizados na indústria para produção de enzimas (celulases); contudo, o pool de enzimas obtido a partir de seu cultivo submerso é pobre em alguns componentes. Com base nisso, algumas pesquisas têm buscado a melhoria dessas enzimas por meio de cocultivos com outras espécies de fungos (AHAMED; VERMETTE, 2008; BERLIN et al., 2007).

A produção de enzimas capazes de auxiliar na quebra da lignina tem incentivado a identificação e caracterização de outras espécies de basidiomicetos com potencial para produção de enzimas lignolíticas bem como de enzimas acessórias que agem sinergicamente com celulases e hemicelulases (MORGENSTERN et al., 2014). A lignina que fica adsorvida sobre a fibra após a explosão a vapor, é fator que pode dificultar a ação de enzimas celulolíticas, sugerindo um incremento de ligninases ou oxidases nos coquetéis enzimáticos. Com base nisso e nos resultados obtidos no presente trabalho, observamos que houve um efeito sinérgico entre os extratos de alguns basidiomicetos quando combinados com extratos de *T. reesei* e *A. aculeatus*, sugerindo uma interação positiva entre enzimas hidrolíticas desses fungos e enzimas oxidativas ou acessórias daqueles.

Um recente estudo evidenciou a importância da utilização de diferentes coquetéis enzimáticos para diferentes biomassas lignocelulósicas. A atuação diferencial de enzimas acessórias como as LPMOs, enzima que faz parte do arcabouço de muitos basidiomicetos sugere que o tipo de resíduo lignocelulósico também é fator limitante na hidrólise por meio de misturas, fato que ainda precisa ser elucidado (CHYLENSKI et al., 2017).

Também é preciso reportar o fato de que o tipo de biomassa lignocelulósica pode proporcionar diferenças na expressão de genes nos basidiomicetos levando à produção/supressão de enzimas que atuam sobre a degradação da celulose, hemicelulose e lignina (WYMELENBERG et al., 2011). Os resultados obtidos reforçam em parte essa afirmação, pois, como pôde ser observado, os extratos agiram de modo diferente, o que levanta a hipótese de que a formulação (com ou sem borra do decantador) ou a relação espécie/substrato pode ter ocasionado diferenças na composição de enzimas. Mas, para que isso se confirme, são necessárias abordagens de transcriptômica, metabolômica e proteômica para elucidar as alterações e efeitos sinérgicos observados nos extratos utilizados.

Conclusões

A adição de alguns extratos obtidos a partir da fermentação em estado sólido em fibra do cacho vazio de dendê apresentou efeito positivo na liberação de glicose pela quebra da celulose, quando combinados com extratos de *A. aculeatus* e *T. reesei*. Isso indica uma possibilidade para desenvolvimento de coquetéis para o pré-tratamento de fibra do cacho do dendê e de outras biomassas lignocelulósicas. Contudo, são necessários mais estudos a fim de obter misturas enzimáticas que alcancem rendimentos expressivos de açúcares fermentáveis, o que levaria, por exemplo, à geração de produtos de maior valor agregado na cadeia produtiva do dendê.

Agradecimentos

Os autores agradecem à Capes, pela concessão de bolsas de estudo, e à Embrapa Agroenergia, pelos materiais e equipamentos disponibilizados durante a execução do trabalho.

Referências

- AGUIAR, A.; FERRAZ, A. Mecanismos envolvidos na biodegradação de materiais lignocelulósicos e aplicações tecnológicas correlatas. **Química Nova**, v. 34, n. 10, p. 1729-1738, 2011.
- AHAMED, A.; VERMETTE, P. Enhanced enzyme production from mixed cultures of *Trichoderma reesei* RUT-C30 and *Aspergillus niger* LMA grown as fed batch in a stirred tank bioreactor. **Biochemical Engineering Journal**, v. 42, n. 1, p. 41-46, 2008.
- BERLIN, A.; MAXIMENKO, V.; GILKES, N.; SADDLER, J. Optimization of enzyme complexes for lignocellulose hydrolysis. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 97, n. 2, p. 287-296, 2007.
- CHIESA, S.; GNANSOUNOU, E. Use of empty fruit bunches from the oil palm for bioethanol production: a thorough comparison between dilute acid and dilute alkali pretreatment. **Bioresource Technology**, v. 159, p. 355-364, 2014.
- CHYLENSKI, P.; FORSBERG, Z.; STÅHLBERG, J.; VÁRNAI, A.; LERSCH, M.; BENGTSSON, O.; EIJSSINK, V. G. Development of minimal enzyme cocktails for hydrolysis of sulfite-pulped lignocellulosic biomass. **Journal of Biotechnology**, v. 246, p. 16-23, 2017.
- DASHTBAN, M.; SCHAFT, H.; SYED, T. A.; QIN, W. Fungal biodegradation and enzymatic modification of lignin. **International Journal of Biochemistry and Molecular Biology**, v. 1, n. 1, p. 36-50, 2010.
- GUPTA, V. G.; SCHMOLL, M.; HERRERA-ESTRELLA, A.; UPADHYAY, R. S.; DRUZHININA, I.; TUOHY, M. **Biotechnology and biology of Trichoderma**. Amsterdam: Elsevier, 2014.
- MALAYSIAN PALM OIL BOARD. **Malaysian palm oil industry**. Disponível em: <http://www.palmoilworld.org/about_malaysian-industry.html>. Acesso em: 10 fev. 2017.
- MANDELS, M.; WEBER, J. The production of cellulases. In: HAJNY, G. J.; REESE, E. T. **Cellulases and their applications**. Washington, DC: ACS Publications, 1969. p. 391-414. (Advances in chemistry, v. 95).
- MORGENSTERN, I.; POWLOWSKI, J.; TSANG, A. Fungal cellulose degradation by oxidative enzymes: from dysfunctional GH61 family to powerful lytic polysaccharide monooxygenase family. **Briefings in Functional Genomics**, v. 13, n. 6, p. 471-481, 2014.
- NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS (Estados Unidos). **How to define, determine, and utilize reference intervals in the clinical laboratory, approved guideline**. Villanova, 1995. (NCCLS publication C28-A).
- PARK, J. M.; OH, B. R.; SEO, J. W.; HONG, W. K.; YU, A.; SOHN, J. H.; KIM, C. H. Efficient production of ethanol from empty palm fruit bunch fibers by fed-batch simultaneous saccharification and fermentation using *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied biochemistry and Biotechnology**, v. 170, n. 8, p. 1807-1814, 2013.
- PHILP, J. Global Perspectives on the Global Bioeconomy. In: AGRICULTURAL OUTLOOK FORUM, 91., 2015, Virginia, USA. **Smart Agriculture in the 21st Century**. Washington, DC: USDA, 2015.
- ROMERO-PELAEZ, R. **Enzimas lignocelulolíticas de basidiomicetos cultivados em biomassas vegetais oriundas da agroindústria do dendê e obtenção de açúcares fermentescíveis**. 2017. 142 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Tocantins, TO. Orientador Embrapa Agroenergia: Félix Gonçalves de Siqueira.

SAHA, B. C.; QURESHI, N.; KENNEDY, G. J.; COTTA, M. A. Biological pretreatment of corn stover with white-rot fungus for improved enzymatic hydrolysis. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 109, p. 29-35, 2016.

SINGH, R.; KRISHNA, B. B.; KUMAR, J.; BHASKAR, T. Opportunities for utilization of non-conventional energy sources for biomass pretreatment. **Bioresource Technology**, v. 199, p. 398-407, 2016.

SMITH, P. K.; KROHN, R. I.; HERMANSON, G. T.; MALLIA, A. K.; GARTNER, F. H.; PROVENZANO, M.; KLENK, D. C. Measurement of protein using bicinchoninic acid. **Analytical biochemistry**, v. 150, n. 1, p. 76-85, 1985.

WYMELENBERG, A. V.; GASKELL, J.; MOZUCH, M.; BONDURANT, S. S.; SABAT, G.; RALPH, J.; KERSTEN, P. J. Significant alteration of gene expression in wood decay fungi *Postia placenta* and *Phanerochaete chrysosporium* by plant species. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 77, n. 13, p. 4499-4507, 2011.

Produção de lipases bacterianas e aplicação à síntese de biodiesel

*Pedro Alves Martins¹, Karoline Costa Almeida², Patrícia Pinto Kalil Gonçalves Costa³, Thályta Fraga Pacheco⁴, Janice Lisboa de Marco⁵,
Thaís Fabiana Chan Salum⁶*

Resumo

O biodiesel é um combustível líquido composto por monoalquil ésteres e pode ser obtido por meio da reação de transesterificação por catálise enzimática. Para isso, empregam-se lipases, que, em ambiente aquorrestrito, são capazes de sintetizar monoalquil ésteres tanto a partir de triacilgliceróis quanto de ácidos graxos livres, tornando o processo mais atrativo para o uso com matérias-primas de baixo valor agregado. A versatilidade e a alta eficiência catalítica das lipases representam alguns dos motivos de sua grande aplicabilidade industrial. Entretanto, o custo de obtenção desses biocatalisadores ainda tem sido um grande limitante à utilização destes em processos de produção de biodiesel por catálise enzimática. Assim, este trabalho visou à produção dessa enzima por meio do cultivo da bactéria CNPAE 99 (579) A3 por fermentação em estado sólido em farelo de trigo e a sua aplicação à síntese de biodiesel. Após a avaliação de quatro composições de meio distintas, observou-se que não houve diferença estatística entre os cultivos, sugerindo que a composição do meio pode ser a mais simples e barata, para ser utilizado para o cultivo da bactéria para a produção das lipases (farelo de trigo umedecido com tampão fosfato de sódio 100 mmol/L pH 7,0 acrescido de 5% óleo de soja). Em testes preliminares, tanto os sólidos fermentados quanto os extratos enzimáticos obtidos do cultivo da bactéria CNPAE 99 (579) A3 foram capazes de sintetizar ésteres etílicos a partir de óleo de soja. O maior índice de conversão encontrado foi de 95,1% para a reação conduzida em *n*-heptano e onde foram utilizados sólidos fermentados como catalisador da síntese.

Palavras-chave: lipase, fermentação em estado sólido, biodiesel.

Introdução

A crescente escassez e crise dos combustíveis fósseis revelou a necessidade da busca por fontes de energia renováveis. Assim, os biocombustíveis surgem como tecnologias alternativas mais sustentáveis e eficientes que visam tanto a baixos impactos ambientais quanto a benefícios econômicos.

¹ Graduado em Ciências Biológicas, mestre em Biologia Molecular, doutorando em Biologia Microbiana, Universidade de Brasília, pedro.alves@colaborador.embrapa.br

² Graduada em Biotecnologia, Universidade de Brasília, karoline.almeida@colaborador.embrapa.br

³ Graduada em Química, mestre em Química Orgânica, Universidade Estadual de Campinas, patricia.costa@embrapa.br

⁴ Graduada em Engenharia Química, mestre em Engenharia Química, Universidade Federal de Uberlândia, thalyta.pacheco@embrapa.br

⁵ Graduada em Ciências Biológicas, mestre em Biologia Molecular, doutora em Biologia Molecular, Universidade de Brasília, janicedemarco@unb.br

⁶ Graduada em Farmácia, doutora em Ciências (Bioquímica), Universidade Federal do Paraná, thais.salum@embrapa.br

O biodiesel é um biocombustível composto por ésteres de ácidos graxos e pode ser utilizado tanto na forma de misturas quanto em sua forma pura, sendo um substituto do diesel derivado de petróleo e totalmente compatível com motores a combustão interna. Atualmente, esse combustível é produzido por meio de um processo de catálise alcalina que, apesar de proporcionar altos índices de conversão, apresenta uma série de desvantagens, como a geração de grande quantidade de efluentes alcalinos, a necessidade da utilização de óleos com baixa acidez, um alto consumo energético e a produção de um glicerol de baixa qualidade e de difícil recuperação (SALUM et al., 2013). Uma alternativa mais promissora será a utilização de lipases para realizar as reações de transesterificação dos triacilgliceróis.

As lipases são enzimas da família carboxil-éster hidrolases capazes de catalisar a hidrólise de triacilgliceróis, produzindo glicerol e ácidos graxos, bem como promover as reações de esterificação, transesterificação, interesterificação e aminólise. Dentre diversas aplicações, as lipases podem ser utilizadas na produção do biodiesel por meio da reação de transesterificação (MA; HANNA, 1999). A vantagem de se utilizar lipases em relação à catálise alcalina está na capacidade catalítica dessas enzimas em produzir ésteres tanto a partir de triacilgliceróis quanto de ácidos graxos livres, tornando o processo de produção do biodiesel atrativo para o uso com matérias-primas de baixo valor agregado. Outras vantagens em relação à catálise alcalina são o menor consumo de água em etapas de lavagem, o menor consumo de energia no processo e obtenção de um glicerol de alta qualidade e de fácil recuperação (SOARES et al., 2013).

Apesar de tudo, a produção de biodiesel por catálise enzimática ainda é um processo dispendioso devido ao alto custo de obtenção dessas enzimas. Desse modo, extensos trabalhos de prospecção têm sido conduzidos de forma a isolar microrganismos produtores de lipases a fim de se obter enzimas novas e mais eficientes (CIUDAD et al., 2011; ADRIO; DEMAIN, 2014).

A legislação brasileira atual estabelece uma adição obrigatória de 7% de biodiesel ao óleo diesel comercializado (BRASIL, 2016) e chegará a 10% em 2019, enfatizando, assim, a importância do estudo e da produção desse biocombustível de forma cada vez mais sustentável.

Materiais e Métodos

Cultivo da bactéria por fermentação em estado sólido

A bactéria CNPAE 99 (579) A3 foi isolada a partir do mesocarpo de frutos de dendê em um trabalho prévio de seleção de microrganismos produtores de lipase (dados não apresentados). Para a obtenção das lipases, a bactéria foi estriada em meio Luria-Bertani Ágar e cultivada a 28 °C até a obtenção de colônias puras. Em seguida, uma colônia foi selecionada da placa e repicada para um cultivo submerso em meio Luria-Bertani, etapa denominada de pré-inóculo. Os frascos foram condicionados em mesa agitadora a uma temperatura de 28 °C e rotação de 180 rpm até que a cultura atingisse uma densidade ótica de 0,6 de absorbância a 600 nm, ponto em que a bactéria se encontra na fase exponencial de crescimento. A bactéria foi, então, submetida a uma fermentação em estado sólido utilizando 4 g de farelo de trigo como substrato com 65% de umidade, adição de 5% (m/m) de indutor e 1 mL de pré-inóculo em frascos do tipo Erlenmeyer, variando-se as soluções utilizadas para umedecer o material e os óleos indutores. As soluções utilizadas para umedecer os cultivos foram

um tampão fosfato de sódio 100 mmol/L pH 7,0 e um meio sintético (KNO_3 3,54 g/L; K_2HPO_4 0,7 g/L; KH_2PO_4 0,4 g/L; NaCl 0,38 g/L; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,01 g/L; Extrato de levedura 5,0 g/L; pH 7,0). Os óleos indutores avaliados foram o Óleo de Oliva (Borges) e o Óleo de Soja (Soya), perfazendo um total de 4 combinações. Com os cultivos preparados, os frascos foram condicionados em ambiente com temperatura controlada de 30 °C e sem agitação por 96 horas. Para todas as etapas de cultivo, os meios de cultura e materiais utilizados foram autoclavados por 30 minutos a 121 °C e pressão de 1 atm para garantir condições estéreis de cultivo.

Extração das lipases e determinação de atividade lipolítica (p-NPP)

Após a etapa de cultivo, a extração das lipases foi realizada incubando 5 mL de solução extratora (Tampão fosfato de sódio 50 mmol/L pH 7,0, Goma arábica 1,11 g/L e Triton X-100 4,44 g/L) por grama de substrato seco, incubando-se a 25 °C com agitação de 150 rpm por 1 hora. Após o período de incubação, coletaram-se os sobrenadantes obtidos da centrifugação do material em rotação de 10.000 rpm e temperatura de 4 °C por 10 minutos. Os extratos enzimáticos obtidos foram, então, avaliados conforme método de hidrólise do palmitato de *p*-nitrofenila (Krieger, 1995). As atividades foram expressas em unidades de atividade enzimática por grama de substrato seco (U/gss). Uma unidade de atividade enzimática é definida como a quantidade de enzima necessária para a formação de 1 μmol do produto (*p*-nitrofenol) por minuto.

Reação de síntese de ésteres etílicos

O extrato enzimático e os sólidos fermentados (material resultante do cultivo da bactéria sobre o suporte sólido durante a etapa de fermentação) resultantes do cultivo com maior atividade lipolítica foram submetidos a uma etapa de liofilização e, em seguida, à reação de transesterificação. Esta foi realizada com razão óleo:álcool 1:3. Assim, foi utilizado óleo de soja (2 mmol) e etanol P.A. (6 mmol). Adicionou-se *n*-heptano P.A. totalizando um volume de 10 mL por reação. Concomitantemente, avaliou-se a capacidade de conversão do óleo de soja em ésteres etílicos em reação sem adição de solvente ao meio reacional. Nesse caso, foram utilizados óleo de soja (10 mmol) e etanol P.A. (30 mmol). Considerou-se ainda ao volume total, em ambas as reações, a adição de água destilada 0,5% (m/m) de forma que houvesse um mínimo de água necessário à manutenção da conformação estrutural e camada de solvatação da enzima (SALUM, 2010). Cada reação foi preparada individualmente em frascos do tipo Erlenmeyer de 100 mL e foram vedados com rolha de borracha para Erlenmeyers. A cada Erlenmeyer foi adicionado o sólido fermentado liofilizado ou o extrato enzimático liofilizado. O controle negativo da reação consistiu de um meio reacional incubado sem adição de enzima. As reações foram realizadas em triplicata. Os Erlenmeyers foram, então, incubados a 37 °C com agitação de 120 rpm por 120 horas e foram retiradas alíquotas de 500 μL para determinação da quantidade de ésteres etílicos por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC).

Quantificação de ésteres etílicos por HPLC

A conversão de óleo de soja a ésteres etílicos foi quantificada por meio de análise por HPLC. Foram pesados 5 mg de amostra e diluídos em 1 mL de solvente

isopropanol:hexano (5:4 v/v). Aplicaram-se 10 μL de amostra diluída em coluna C18 (250 mm x 4,6 mm x 5 μm) a uma temperatura de 40 °C e fluxo de 1 ml/min da fase móvel. A eluição foi feita com gradiente binário da seguinte forma: 100% metanol por 10 minutos, seguido de 50% metanol/50% isopropanol:hexano (5:4 v/v) por mais 10 minutos e, por fim, 100% metanol até totalizar 25 minutos. O detector utilizado foi o de arranjo de fotodiodos (PDA) com comprimento de onda de 205 nm. O cálculo da conversão foi realizado comparando-se as áreas relativas aos picos de ésteres entre as amostras obtidas e um padrão de biodiesel metílico de óleo de soja.

Resultados e Discussão

Em estudos anteriores (dados não apresentados), a bactéria CNPAE 99 (579) A3 vinha sendo utilizada para a produção de lipases por meio do cultivo da mesma por fermentação em estado sólido com farelo de trigo umedecido com tampão fosfato de sódio 100 mM pH 7,0. A fim de selecionar as melhores condições de cultivo para obtenção de maior atividade lipolítica com menor custo de produção, optou-se por avaliar a utilização de um meio mais rico em fontes de carbono, nitrogênio e micronutrientes para umedecer o farelo de trigo, bem como de diferentes óleos indutores. Assim, como teste preliminar a um estudo de otimização da produção de lipases por planejamento fatorial, decidiu-se por avaliar inicialmente se havia diferença na resposta de atividade lipolítica observada entre um cultivo umedecido com meio sintético ou com tampão e induzido pela presença de óleo de oliva ou óleo de soja. Decorridas 96 horas de fermentação, avaliaram-se as atividades lipolíticas dos extratos enzimáticos obtidos das combinações dos fatores propostos (Figura 1).

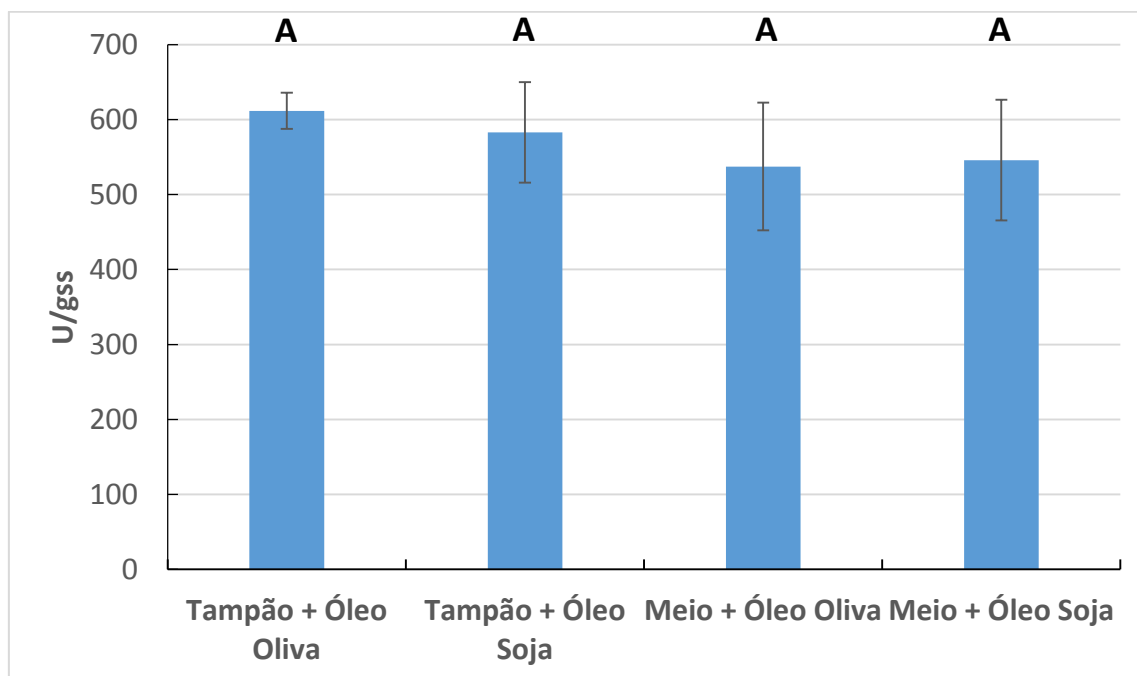


Figura 1. Atividades lipolíticas dos extratos enzimáticos obtidos dos cultivos da bactéria CNPAE 99 (579) A3. Os valores são apresentados em Unidade Internacional ($\mu\text{mol}/\text{min}$) por grama de substrato seco. As letras acima das colunas representam a avaliação estatística (teste de Tukey, nível de significância 5%).

A partir dos resultados dos ensaios enzimáticos obtidos, procedeu-se com a avaliação estatística do teste de hipótese para igualdade de médias dos cultivos. Para essa avaliação, foi aplicado o teste de Tukey considerando um intervalo de confiança de 95%. De acordo com a análise estatística (Tukey), conclui-se que os grupos são iguais entre si quando comparados dois a dois, não havendo diferença estatisticamente significativa da resposta em atividade lipolítica. Desse modo, optou-se pela condição de cultivo umedecida com tampão, pois além de facilitar o processo, ainda é uma forma de baratear a produção das lipases, pois reduz consideravelmente a variedade e a quantidade de reagentes utilizados para o preparo do meio de cultura do cultivo. Optou-se, ainda, pelo uso do óleo de soja como indutor, pois este é mais barato do que o óleo de oliva.

A fim de dar continuidade ao estudo de condições de cultivo da bactéria para a produção de lipases, realizaram-se alguns testes preliminares de produção de biodiesel usando as lipases produzidas pelo cultivo umedecido com tampão e induzido pela adição de óleo de oliva. Tanto o extrato enzimático liofilizado quanto os sólidos fermentados liofilizados foram capazes de sintetizar ésteres etílicos em ambos os tipos de reação testados, com e sem solvente (Tabela 1).

Tabela 1. Conversão em ésteres etílicos das reações de transesterificação. Condições: razão molar óleo:etanol 3:1, 0,5% água (m/m), temperatura de 37 °C, agitação de 120 rpm, 120 horas de reação.

	Reação com solvente		Reação sem solvente	
	Extrato Enzimático	Sólido Fermentado	Extrato Enzimático	Sólido Fermentado
Conversão (%)	77,6 ± 0,1	95,1 ± 0,4	48,7 ± 4,2	55,8 ± 9,6

As amostras de sólidos fermentados apresentaram maior índice de conversão do que as amostras de extrato enzimático, o que caracteriza uma vantagem para a redução dos custos do processo, pois além de eliminar uma etapa de extração da enzima, esta ainda pode ser recuperada e reutilizada em uma nova reação. Uma possível explicação para o fenômeno encontrado seria que a enzima pode estar adsorvida ao sólido fermentado de tal maneira que estabilize a conformação tridimensional da mesma protegendo-a da ação desnaturante do álcool de forma que favoreça a catálise. Observou-se, ainda, que a reação conduzida em meio com *n*-heptano apresentou maior conversão do que a reação conduzida em meio sem o solvente orgânico. Segundo relatou Bu et al. (2010), a adição de cossolventes, como o *n*-heptano, às reações de transesterificação reduz a polaridade do meio reacional, diminuindo a competição entre o etanol e as enzimas pelas moléculas de água, promovendo, assim, uma melhor manutenção da camada de solvatação da enzima, o que acaba por proteger e estabilizar a conformação estrutural e a consequente atividade catalítica das enzimas.

Conclusões

Não foi observada diferença estatística entre as respostas de atividade lipolítica para as quatro condições de cultivo avaliadas. Sendo assim, a condição escolhida foi de cultivo com farelo de trigo umedecido com tampão fosfato de sódio 100 mmol/L pH 7,0 acrescido de 5% de óleo de soja, pois trata-se do meio de composição mais simples e barato, reduzindo assim, os custos associados à produção das lipases. Em testes preliminares, tanto os sólidos fermentados quanto os extratos enzimáticos obtidos do cultivo da bactéria CNPAE 99 (579) A3 foram capazes de sintetizar ésteres etílicos a partir de óleo de soja. O maior índice de conversão encontrado foi de 95,1% para a reação conduzida em *n*-heptano e utilizando sólidos fermentados como catalisador da síntese. A fim de viabilizar o uso da reação de transesterificação sem solvente orgânico, se faz necessária uma etapa de otimização das variáveis do processo.

Agradecimentos

Este trabalho foi realizado com recursos do projeto DendePalm (Finep) e com o apoio da Universidade de Brasília.

Referências

- ADRIO, J. L.; DEMAINE, A. L. Microbial enzymes: tools for biotechnological processes. **Biomolecules**, v. 4, n. 1, p. 117-139. 2014.
- BRASIL. Lei nº 13.263, de 23 de março de 2016. Altera a Lei nº 13.033, de 24 de setembro de 2014, para dispor sobre os percentuais de adição de biodiesel ao óleo diesel comercializado no território nacional. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 24 mar. 2016. Disponível em: <<http://www.in.gov.br>>. Acesso em: 12 jun. 2017.
- BU, B.; VASUDEVAN, P. T. Effect of solvent-co-solvent mixtures on lipase-catalyzed transesterification of canola oil. **Energy and Fuels**, v. 24, p. 4646-4651. 2010.
- CIUDAD, G.; REYES, I.; AZÓCAR, L.; BRIONES, R.; JORQUERA, M.; WICK, L. Y.; NAVIA, R. Innovative approaches for effective selection of lipase-producing microorganisms as whole cell catalysts for biodiesel production. **New Biotechnology**, v. 28, n. 4, p. 375-381, 2011.
- KRIEGER, N. **Produção, purificação e caracterização de lipases de *Penicillium citrinum***. 1995. 260 f. Tese (Doutorado em Ciências: Bioquímica) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR.
- MA, F.; HANNA, M. A. Biodiesel production: a review. **Bioresource Technology**, v. 70, n. 1, p. 1-15. 1999.
- SALUM, T. F. C. **Produção e imobilização de lipase de *Burkholderia cepacia* LTEB11 para a síntese de ésteres etílicos**. 2010. 130 f. il., color. Tese (Doutorado) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR.
- SALUM, T. F. C.; PIGHINELLI, A. L. M. T.; DAMASO, M. C. T. Produção de biodiesel por catálise enzimática. In: MACHADO, C. M. M. (Ed.). **Microorganismos na produção de biocombustíveis líquidos**. Brasília, DF: Embrapa Agroenergia, 2013. p. 257-276.
- SOARES, D.; PINTO, A.F.; GONÇALVES, A.G.; MITCHELL, D.A.; KRIEGER, N. Biodiesel production from soybean soapstock acid oil by hydrolysis in subcritical water followed by lipase-catalyzed esterification using a fermented solid in a packed-bed reactor. **Biochemical Engineering Journal**, v. 81, p. 15-23, 2013.

Seleção de cepa produtora de ácido kójico a partir de glicerina bruta de soja

Rebeca Baiocchi Vianna¹, Flávia Soares Vieira², Augusto Lopes Souto³, Thaís Demarchi Mendes⁴, Patrícia Pinto Kalil Gonçalves da Costa⁵, Patrícia Verardi Abdelnur⁶, Clenilson Martins Rodrigues⁷, Mônica Caraméz Triches Damaso⁸

Resumo

Paralelamente ao crescimento mundial da produção de biodiesel, tem-se o aumento do seu principal coproduto, a glicerina. O excesso desse coproduto tem gerado uma redução substancial no seu valor de mercado. Nesse sentido, cresce o interesse por oportunidades de agregação de valor a essa matéria-prima, seja por processos químicos ou bioquímicos. Esse trabalho teve como objetivo selecionar e avaliar cepas de fungos filamentosos para produção de químicos de valor agregado, mais especificamente ácido kójico, a partir da bioconversão de glicerina bruta de soja. Em trabalhos anteriores, cepas de fungos filamentosos pertencentes à coleção de microrganismos da Embrapa Agroenergia foram avaliadas com base no crescimento em meio contendo somente glicerina bruta de soja ou padrão como fontes de carbono. Cepas com diferentes perfis de crescimento foram selecionadas com base no Índice de Velocidade de Crescimento Micelial (IVCM) para bioconversão de glicerina bruta de soja. No presente trabalho, amostras geradas por fermentação submersa, utilizando as referidas cepas, foram avaliadas por espectrometria de massas por infusão direta. Verificou-se que uma cepa isolada de torta de pinhão-mansão foi capaz de produzir ácido kójico. Testes quantitativos, realizados por cromatografia líquida de ultra eficiência, demonstraram que, após 5 dias de cultivo, o fungo produziu $3,9 \pm 0,7$ g/L do ácido. Após 10 dias de cultivo transcorridos, foram produzidos $11,4 \pm 1,5$ g/L, enquanto todo o glicerol havia sido consumido.

Palavras-chave: glicerina. biodiesel. agregação de valor. cepas fúngicas. ácido kójico.

Introdução

Visando atender à alta demanda por combustíveis e conciliar o desenvolvimento social com a preservação de ecossistemas, a crescente procura por alternativas e matrizes energéticas renováveis induziu ao aumento na produção de biocombustíveis, como biodiesel e, por consequência, do seu principal coproduto, a

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

² Farmacêutica, mestranda em Química, Universidade Federal de Goiás, flavia.soares@colaborador.embrapa.br

³ Farmacêutico, doutor em Produtos Naturais, Universidade Federal da Paraíba, augusto.souto@colaborador.embrapa.br

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

⁵ Química, mestre em Química Orgânica, analista da Embrapa Agroenergia, patricia.costa@embrapa.br

⁶ Química, doutora em Química Orgânica, pesquisadora da Embrapa Agroenergia, patricia.abdelnur@embrapa.br

⁷ Químico, doutor em Química, pesquisador da Embrapa Agroenergia, clenilson.rodrigues@embrapa.br

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

glicerina. Com a maior disponibilidade de glicerina, seu valor de mercado diminuiu significativamente.

Segundo Schultz et al. (2014), as aplicações mais usuais da glicerina bruta atualmente estão concentradas nas áreas de cosméticos, saboaria e fármacos, que requerem um grau de purificação; para exportação, em especial, para a China; e utilização em caldeiras e fornalhas industriais. Para tornar a cadeia de produção do biodiesel mais sustentável e economicamente atrativa, diferentes formas de aproveitamento da glicerina vêm sendo exploradas e estudadas.

De acordo com o trabalho de Almeida et al. (2012), o aproveitamento da glicerina, por via microbiana, possibilita a produção de compostos químicos de alto valor agregado para a indústria, tais como: 1,3-propanodiol, 2,3-butanediol, etanol, n-butanol, cetonas, poliois e ácidos orgânicos.

O interesse pelo ácido kójico, metabólito comumente produzido na fermentação aeróbica de fungos, vem crescendo rapidamente, principalmente na indústria de saúde e cosméticos. Suas aplicações se estendem desde atuar como matéria-prima para produção de cremes de clareamento de pele e dentes, bem como filtros solares, a ser portador de propriedades antibióticas, antifúngicas e analgésicas na Medicina. Além disso, é considerado um bom agente quelante na produção de inseticidas e precursor de potenciadores de sabor, tais como maltol e etil-maltol (MOHAMAD et al., 2010).

O presente trabalho teve como objetivo selecionar e avaliar a produção de compostos químicos por cepas de fungos filamentosos, em especial o ácido kójico, a partir da bioconversão da glicerina bruta, coproduto do biodiesel, utilizando métodos analíticos de espectrometria de massas por infusão direta (DIMS) e de cromatografia líquida de ultra alta eficiência (UHPLC).

Materiais e Métodos

Materiais

Os padrões de ácido kójico e de glicerol foram adquiridos da Sigma-Aldrich. As gliceras brutas de soja foram gentilmente cedidas pela empresa CESBRA Química S.A., localizada em Volta Redonda, RJ, e pela usina ADM, Rondonópolis, MT.

Seleção de cepas e bioconversão da glicerina bruta

No trabalho de Da Silva et al. (2014), cento e duas cepas (102) de fungos filamentosos pertencentes à Coleção de trabalho da Embrapa Agroenergia (Brasília, DF), denominada “Microrganismos e microalgas aplicados à agroenergia e biorrefinarias”, foram avaliadas em relação ao crescimento em glicerina bruta de soja e glicerina padrão. O Índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM) foi calculado para cada uma dessas linhagens. Com base nos valores de IVCM obtidos, as cepas foram divididas em grupos: alto, médio e baixo.

No presente trabalho, cepas representando cada um dos grupos foram submetidas ao processo de bioconversão utilizando glicerina bruta de soja como única fonte de carbono. Os experimentos de bioconversão foram realizados em frascos *Erlenmeyers* de 250 mL, contendo 50 mL de meio de cultivo, tendo como única fonte de carbono glicerina bruta de soja, coproduto do biodiesel. Adicionalmente, o meio continha sais, o pH foi ajustado e foi esterilizado a 121 °C por 20 min. Os

Erlenmeyers, em duplicata ou triplicata, foram inoculados com discos ou esporos de fungos filamentosos crescidos em meio complexo e, em seguida, incubados em agitador rotatório por 10 dias.

Após 5 e 10 dias de cultivo, em condições adequadas, alíquotas foram retiradas e centrifugadas (2902 x g, por 10 min, a 4 °C).

Espectrometria de massas por infusão direta

As amostras obtidas a partir da bioconversão de glicerina por fungos filamentosos foram, primeiramente, homogeneizadas em vortex por 10 s. Em seguida, foram diluídas em *vials* de 1,5 mL, na proporção de 1 µL de amostra para 1.000 µL de metanol:água (1:1). Posteriormente, foram analisadas por espectrometria de massas por infusão direta (DIMS – *Direct Infusion Mass Spectrometry*), utilizando um espectrômetro de massas com fonte de ionização por *eletrospray* (ESI) e analisador tipo TOF (*Time of Flight*) (Maxis 4G, Bruker Daltonics). As análises foram realizadas em modo positivo, ESI(+)-MS, utilizando formiato de sódio como calibrante. As amostras foram injetadas em triplicata, para verificar a reprodutibilidade das análises. O tempo total de análise de cada amostra, incluindo o branco, calibrante e amostra, foi de 5 min por injeção. O pré-processamento dos dados foi executado pelo software “*Profile Analysis*” 2.1 (Bruker Daltonics), a partir da calibração por HPC (*High Precision Calibration*) e normalização pelo maior valor do *bucket* analisado. A faixa de íons de interesse explorado foi de *m/z* 70 a 1.000. Os dados processados foram exportados no formato ASCII para o software “*The Unscrambler*” 10.0 (CAMO Process), para posterior análise quimiométrica utilizando análise de componente principal (PCA).

Cromatografia líquida de ultra-alta eficiência para quantificação de ácidos orgânicos e de glicerol

Para identificação e quantificação dos ácidos orgânicos produzidos pelos microrganismos, foi utilizado um cromatógrafo a líquido, modelo Acquity H-Class UHPLC (WATERS®), com coluna Acquity UPLC HSS T3 (1,8 µm, 2,1 x 150 mm), acoplado a detector de arranjo de fotodiodos (UHPLC-PDA). A eluição foi realizada em modo gradiente, com a fase móvel constituída de A) água tamponada com KH₂PO₄ a 0,01 M (pH 2,0) e B) metanol. Para o monitoramento do consumo de glicerol pelos microrganismos, foi utilizado o mesmo cromatógrafo a líquido, com coluna Acquity BEH amida (1,7 µm, 2,1 x 150 mm), acoplado a detector de índice de refração (RID). A eluição foi realizada em modo isocrático, sendo a fase móvel constituída por acetonitrila e água na proporção 90:10 e 0,1% de ácido trifluoroacético (TFA).

Resultados e Discussão

Amostras de glicerol bioconvertidas por cerca de 10 fungos filamentosos foram analisadas por DIMS, cujos dados espectrais foram submetidos à análise de componente principal (PCA). Dessa forma, foi possível selecionar íons que se destacavam principalmente devido a sua alta intensidade em relação aos demais. A partir da utilização de base de dados pública de metabolômica, foi possível correlacionar esses íons com possíveis compostos de alto valor agregado, como polióis e ácidos orgânicos, os quais foram confirmados por UHPLC, a partir de experimentos

de comparação de espectros, tempo de retenção, bem como por coinjeção de padrões.

Após análise por DIMS das amostras de glicerina biotransformada por uma cepa fúngica isolada de torta de pinhão-manso, foi possível identificar a presença dos íons m/z 143,0338 e m/z 165,0160, correspondentes ao ácido kójico na forma protonada $[M+H]^+$ e como aduto de sódio $[M+Na]^+$, respectivamente (Figura 1). O íon m/z 115,0367 corresponde à molécula de glicerol, presente na glicerina, na forma de aduto de sódio $[M+Na]^+$.

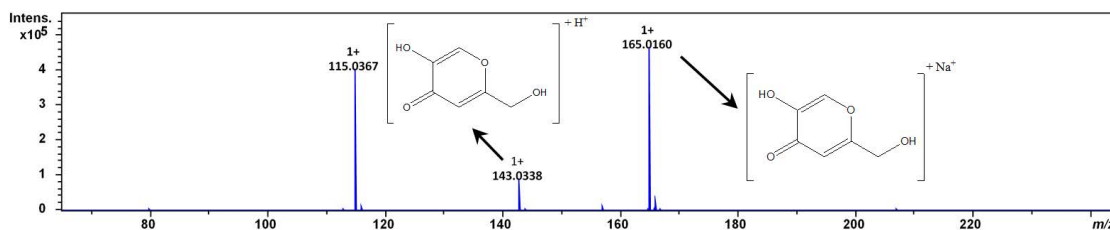


Figura 1. Espectro de massas por ESI(+)-MS da amostra de glicerina biotransformada por cepa isolada de torta de pinhão-manso.

Posteriormente, visando confirmar e quantificar a produção do ácido, as amostras foram analisadas por UHPLC-PDA (Figura 2) e o consumo de glicerol por UHPLC-RID (Tabela 1).

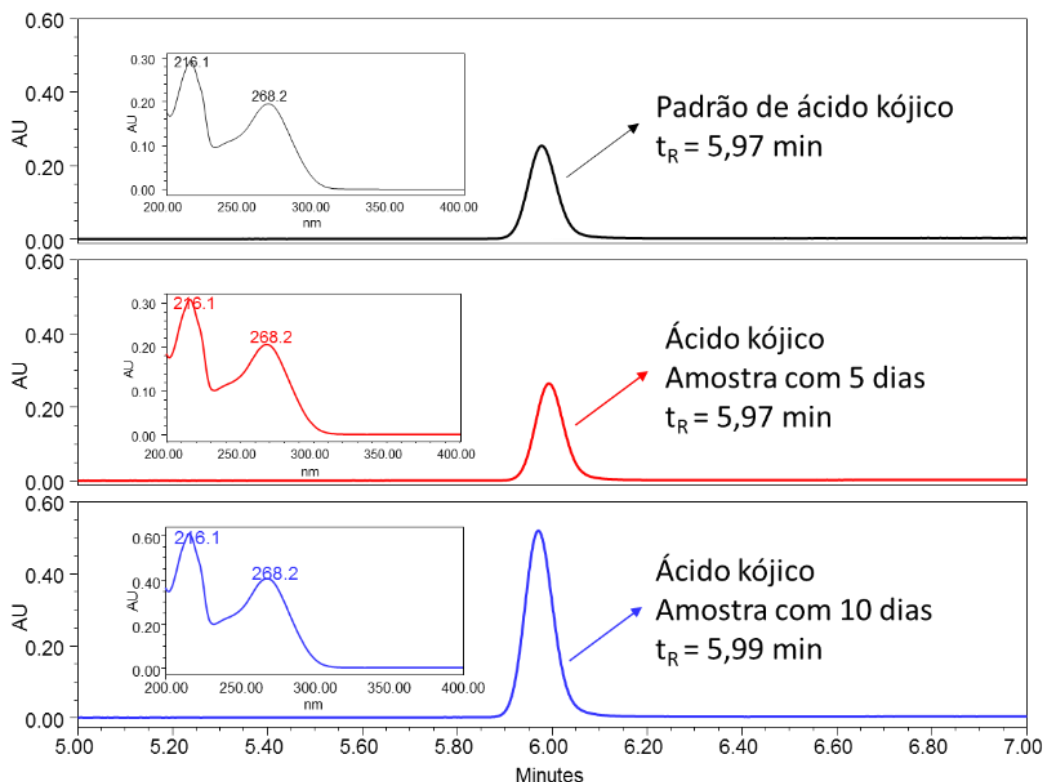


Figura 2. Cromatograma da amostra de glicerina biotransformada por cepa isolada de torta de pinhão-manso obtidos em 210 nm.

A Figura 2 apresenta os cromatogramas com a identificação de ácido kójico nas amostras com 5 e 10 dias de cultivo e o cromatograma do padrão analítico de ácido kójico na concentração de 0,08 g/L. A partir da comparação dos tempos de retenção e dos espectros de absorção na região do ultravioleta, foi possível confirmar a presença desse ácido nas amostras.

A Tabela 1 apresenta as quantidades de ácido kójico e glicerol após 5 e 10 dias de cultivo.

Tabela 1. Ácido kójico produzido e glicerol residual, após bioconversão de glicerina bruta de soja por cepa fúngica.

Dias	Ácido kójico (g/L)	Glicerol residual (g/L)
5	3,90±0,70	24,96±0,57
10	11,40±1,50	0

A cepa isolada de torta de pinhão-mansão apresentou consumo total do glicerol presente na glicerina após 10 dias e a produção concomitante do ácido kójico (Tabela 1). No estudo realizado por Coelho (2011), a produção de ácido kójico por cepa fúngica comercial de *Aspergillus flavus* NRRL 626, por meio da bioconversão de glicerina bruta de soja, foi de 18 g/L após 22 dias de cultivo. A cepa isolada de torta de pinhão-mansão, avaliada neste trabalho, teve maior produtividade 0,048 g/L h do que a avaliada por Coelho (2011), que foi de 0,034 g/L h, o que demonstra maior potencialidade da cepa isolada.

Conclusões

Concluiu-se que a cepa isolada da biodiversidade brasileira, a partir da torta de pinhão-mansão, foi capaz de consumir glicerina bruta de soja, como única fonte de carbono, e produzir ácido kójico. Essa informação foi confirmada por 2 métodos analíticos, DIMS e UPLC-PDA. A cepa consumiu todo o glicerol presente na glicerina após 10 dias de cultivo e a produtividade foi maior do que a obtida por cepa comercial. Sendo assim, sugere-se que a cepa isolada neste trabalho é promissora e possui potencial para agregação de valor à glicerina.

Agradecimentos

Os autores agradecem à CESBRA Química S.A. e à ADM, pela doação da glicerina bruta de soja, ao CNPq e à CAPES pelo suporte financeiro e à Embrapa Agroenergia pela infraestrutura de pesquisa.

Referências

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

COELHO, R. S. **Produção de ácido kójico: estudo e otimização de processo e utilização de matérias primas de baixo custo**. 2011. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP. Orientador: Ranulfo Monte Alegre.

DA SILVA, R. M. C.; PEREIRA, C. B.; POLETTO, C. M.; DAMASO, M. C. T. Avaliação do crescimento de fungos filamentosos em glicerina, coproduto do biodiesel, como única fonte de carbono. In: ENCONTRO DE PESQUISA E INOVAÇÃO DA EMBRAPA AGROENERGIA, 1., 2014, Brasília, DF. **Anais...** Brasília, DF : Embrapa Agroenergia, 2014. p. 45-46.

MOHAMAD, R.; MOHAMAD, M. S.; SUHAILI, N.; SALEH, M. M.; ARIFF, A. B. Kojic Acid: applications and development of fermentation process for production. **Biotechnology and Molecular Biology Reviews**, v. 5, n. 2, p. 24-37, 2010.

SCHULTZ, E. L.; SOUZA, D. T. de; DAMASO, M. C. T. The glycerol biorefinery: a purpose for Brazilian biodiesel production. **Chemical and Biological Technologies in Agriculture**, v. 1, n. 7, 2014.

Obtenção de enzimas lignocelulolíticas de monocultivos e cocultivos de fungos filamentosos em fermentação submersa usando biomassas vegetais da agroindústria do dendê

Ruben Darío Romero-Peláez¹, Thais Demarchi Mendes², Thállyta Fraga Pacheco³, Arailde Fontes Urban⁴, Cristiane Vieira Helm⁵, Simone Mendonça⁶, Félix Gonçalves de Siqueira⁷

Resumo

Determinaram-se as atividades enzimáticas lignocelulolíticas de extratos brutos de basidiomicetos e ascomicetos, em monocultivos e cocultivos com *Trichoderma reesei* ATCC 60787, em fermentação submersa. Para tal, utilizou-se meio sintético (BDA) enriquecido com biomassas vegetais da Agroindústria do dendê, quais sejam: fibra de mesocarpo (FM) e borra do decantador (BD – Resíduo sólido resultante do óleo de dendê processado em tridecantador). Verificou-se que fungos filamentosos mostraram maiores atividades enzimáticas hidrolíticas e oxidativas no meio enriquecido com BD. Os cocultivos mostraram que a presença de *T. reesei* ATCC 60787 induziu a maior liberação de enzimas hidrolíticas e oxidativas por *Panus lecomtei* CC40 e *Lepiota fuscipes* CC402, quando comparadas com os monocultivos.

Palavras-chave: interação fungo-fungo, lacase, fungos da podridão-branca.

Introdução

As análises comparativas entre a fermentação em estado sólido (FES) e a fermentação submersa têm sido avaliados em função de produção de enzimas e bioativos. Tipicamente, a fermentação submersa é usada para microrganismos que precisam de alta quantidade de água livre, como as bactérias e leveduras; já a FES é adequada para organismos como os fungos filamentosos que podem crescer com quantidades de umidade entre 20% e 70% (SINGH et al., 2008). No entanto, a maioria das enzimas celulolíticas comerciais produzidas atualmente são derivadas de fungos

¹ Biólogo, mestre em Biotecnologia, Universidade Federal de Tocantins, ruben.romero2204@gmail.com

² Bióloga, mestre em Microbiologia Aplicada, analista da Embrapa Agroenergia thais.demarchi@embrapa.br

³ Engenheiro químico, mestre em Engenharia Química, analista da Embrapa Agroenergia, thallyta.pachecho@embrapa.br

⁴ Historia Natural, doutora em Biologia, pesquisadora da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, arailde.urben@embrapa.br

⁵ Química Industrial, doutora em Ciências de Alimentos, pesquisadora da Embrapa Florestas, cristiane.helm@embrapa.br

⁶ Química farmacêutica, doutora em Saúde Pública, pesquisadora da Embrapa Agroenergia, simone.mendonca@embrapa.br

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

filamentosos cultivados em fermentação submersa e, inclusive, tem sido demonstrado que esse tipo de fermentação contribui positivamente na liberação de celulasas de fungos da podridão-branca (ELISASHVILI et al., 2008).

O alvo deste trabalho foi explorar a capacidade de produção de enzimas lignocelulolíticas de basidiomicetos e ascomicetos usando fermentação submersa por meio de mono ou cocultivos utilizando biomassas derivadas do dendê. Os cultivos foram feitos usando os basidiomicetos *P. lecomtei* CC40, *T. versicolor* CC124 e *L. fuscipes* CC37, além de organismos modelos para produção de celulasas e hemicelulasas como as linhagens *T. reesei*, *Chrysosporium lucknowense*, *Laetisaria arvalis* e *Schizophyllum commune* e *Coprinus* sp. FPB 125 (isolado da Embrapa Agroenergia). A determinação do potencial de produção de enzimas lignocelulíticas é condição ímpar para que se possam obter coquetéis enzimáticos com potencial para o processo de sacarificação de biomassas vegetais.

Materiais e métodos

Microrganismos

Utilizou-se oito linhagens de fungos filamentosos nos cultivos por fermentação submersa, quais sejam: *P. lecomtei* CC40, *T. versicolor* CC124, *L. fuscipes* CC402, *Schizophyllum commune* CC328 *Coprinus* sp. FPB 125, *Chrysosporium lucknowense* ATCC® 44006, *Laetisaria arvalis* ATCC® 52088 e *Trichoderma reesei* ATCC® 60787. Todos os fungos foram repicados em BDA (placas Petri) e incubados a 28 °C até completa colonização.

Interação de crescimento dos fungos em placa de petri

Para entender a compatibilidade *in vitro* dos basidiomicetos e *T. reesei* ATCC® 60787, foram colocados discos miceliais de cada fungo em extremidades opostas das placas com meio BDA esterilizado, distanciados aproximadamente 4 cm. Foram realizados registros fotográficos e descrição dos cocultivos durante 9 dias. A análise do tipo de interação foi feita com base no critério usado em Molla et al. (2001).

Monocultivos em fermentação submersa

Adicionou-se 1,25 g de biomassa de dendê (borra de decantador- BD ou Fibras de mesocarpo-FM), previamente triturada (diâmetro ≤ 2 mm) e seca a 65 °C por 2 dias, 50 mL de meio Mandels Weber (MW) e PEG6000 0,1% (m/v) em frascos Erlenmeyer de 250 mL. Em seguida, adicionaram-se 5 discos miceliais (5 mm de diâmetro) de ágar totalmente colonizado, fazendo-se incubação em agitador a 150 rpm e 28 °C por 5 dias.

Cocultivos em fermentação submersa

No cocultivo, adotou-se o modelo de Ma e Ruan (2015), mudando-se a forma de inoculação dos fungos, com inoculação dos basidiomicetos 14 horas antes do *T. reesei* ATCC® 60787 e incubação 28 °C por 5 dias.

Obtenção de extrato enzimático e atividades enzimáticas

Após 5 dias de cultivo, o conteúdo dos frascos Erlenmeyer foi filtrado e centrifugado a 10.000 rpm a 5°C por 10 minutos. O sobrenadante foi coletado, adicionando-se solução azida sódica, com concentração final de 0,02% (m/v), para evitar crescimento microbiano. Para a atividade FPase (celulases totais) foram utilizados discos de papel filtro tipo Whatman® como substrato e a reação foi feita em termociclador por 60 minutos a 50 °C. Para as xilanases usou-se xilana de birchwood 2% (m/v) como substrato. A liberação de açúcares foi determinada pelo método DNS (MILLER, 1959), com leitura em espectrofotômetro a 540 nm de comprimento de onda. A atividade β -glicosidase foi feita usando celobiose 15 Mm como substrato, numa reação de 30 minutos a 50 °C. A glicose liberada foi quantificada usando-se o método GOD-POD, com o kit reagente Glicose oxidase - Bioclin®, e leitura em espectrofotômetro a 505 nm. As atividades da lacase e peroxidases totais foram feitas usando ABTS 5 Mm e H₂O₂ 2mM (peroxidases) como substrato, com leitura a 420 nm a cada 30 s, durante 1,5 min. Todos os experimentos foram feitos em triplicata biológica e técnica.

Resultados e discussão

No caso dos monocultivos em FM, as atividades para FPase e xilanase foram detectadas em todas as linhagens de fungos filamentosos utilizadas. Os valores máximos de atividade, de 0,48 U.mL⁻¹ e 0,65 U.mL⁻¹, respectivamente, foram observados no extrato de *T. reesei* ATCC® 60787. Não se verificou valores significativamente altos de atividade da β -glicosidase. *L. fuscipes* CC402 mostrou alta atividade para lacase (180,42 U.mL⁻¹). Quanto às peroxidases totais, verificou-se atividade significativa nos extratos de *L. fuscipes* CC402 (99,39 U.mL⁻¹) e *T. versicolor* CC124 (7,65 U.mL⁻¹), como pode ser visto Figura 1. No cultivo com BD, a atividade FPase em *T. reesei* foi 2,16 vezes maior quando comparada com a do extrato obtido com FM. Para xilanase, os extratos das linhagens *Coprinus* sp. FPB125 e *P. lecomtei* CC40 apresentaram atividade 8,5 e 2,8 vezes maior que dos extratos obtidos do cultivo em FM, respectivamente. A atividade β -glicosidase no extrato de *T. reesei* foi 9 vezes maior que o obtido em FM. Para lacases, verificou-se picos altos de atividade no extrato de *L. fuscipes* CC402 (794,01 $\pm$ 30,5 U.mL⁻¹), *P. lecomtei* CC40 (383,11 U.mL⁻¹) e *T. versicolor* CC124 (270,39 U.mL⁻¹). O padrão de atividades para peroxidases foi similar, com maior atividade no extrato de *L. fuscipes* CC402 (341,43 U.mL⁻¹), *P. lecomtei* CC40 (106,22 U.mL⁻¹), *T. versicolor* CC124 (87,01 U.mL⁻¹) (Figura 2).

T. reesei ATCC® 60787 apresentou interações positivas com os basidiomicetos *P. lecomtei* CC40, *T. versicolor* CC124, *L. fuscipes* CC402 e *Coprinus* FPB125 (Figura 3). Esse resultado contrasta com o observado por Mohammad et al. (2013), que trabalhou com uma linhagem de *T. reesei* que foi inibida quando incubada em cocultivo com basidiomicetos.

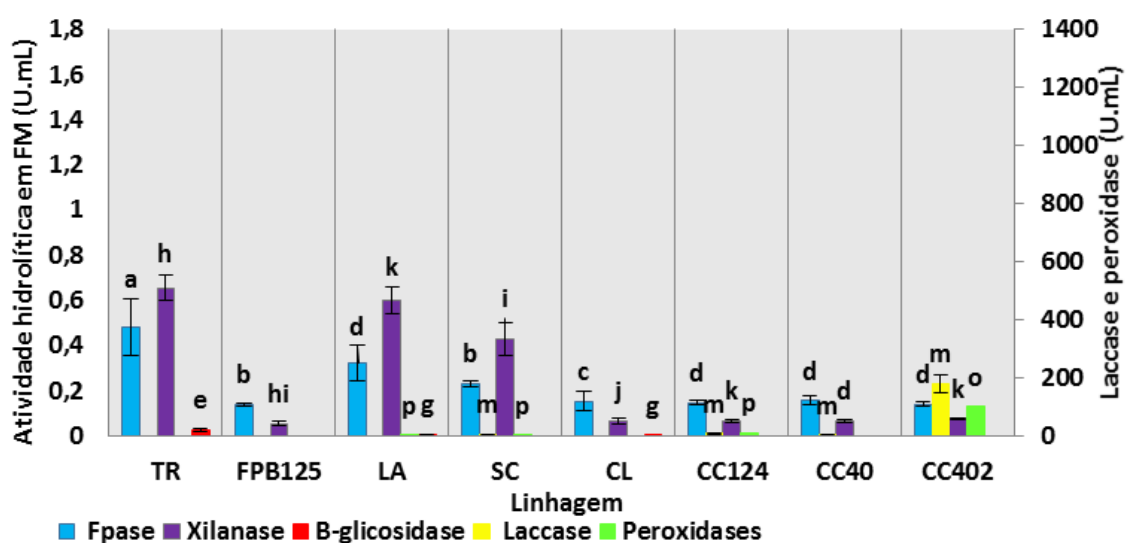


Figura 1. Perfil enzimático dos extratos obtidos em fermentação submersa usando meio MW enriquecidos com fibra do mesocarpo (FM) para os monocultivos dos fungos. Legenda: *T. reesei* ATCC® 60787 (TR); *Coprinus* sp. (FPB125); *L. arvalis* ATCC® 52088 (LA); *S. commune* CC328 (SC); *C. lucknowense* ATCC® 44006 (CL); *T. versicolor* CC124; *P. lecomtei* (CC40); e *L. fuscipes* CC402. Letras diferentes nas barras indicam diferenças significativas a $p < 0.05$ no teste Tukey.

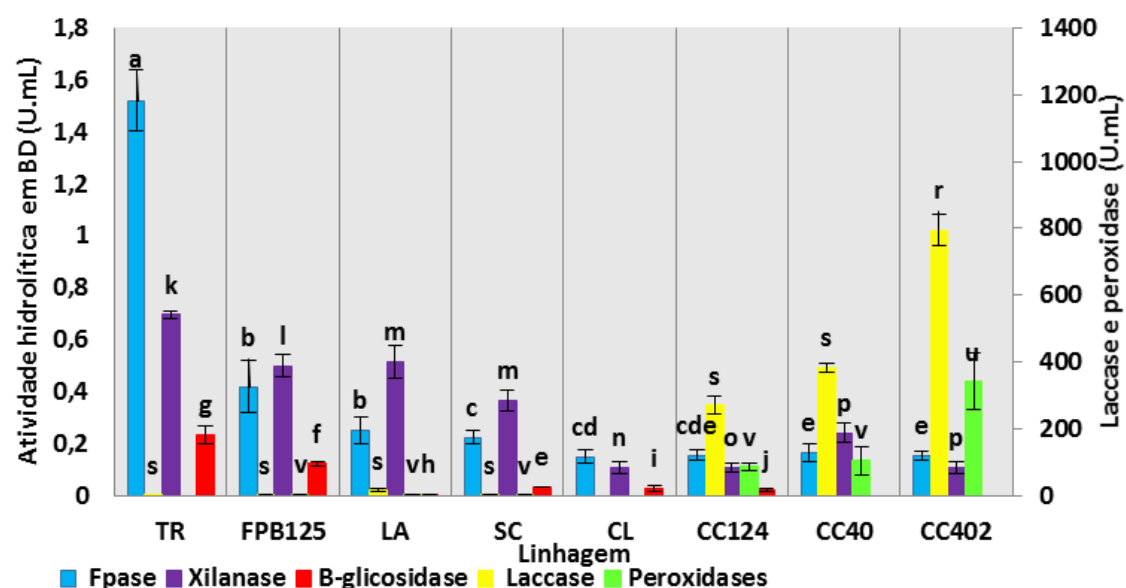


Figura 2. Perfil enzimático dos extratos obtidos em fermentação submersa usando meio Mandels e Weber (1969) enriquecidos com borra do decantador para os monocultivos dos fungos. Legenda: *T. reesei* ATCC® 60787 (TR); *Coprinus* sp. (FPB125); *L. arvalis* ATCC® 52088 (LA); *S. commune* CC328 (SC); *C. lucknowense* ATCC® 44006 (CL); *T. versicolor* CC124; *P. lecomtei* (CC40); e *L. fuscipes* CC402. Letras diferentes nas barras indicam diferenças significativas a $p < 0.05$ no teste Tukey.



Figura 3. Interação entre *P. lecomtei* CC40 – *T. reesei* ATCC® em cultivo em placas (BDA).

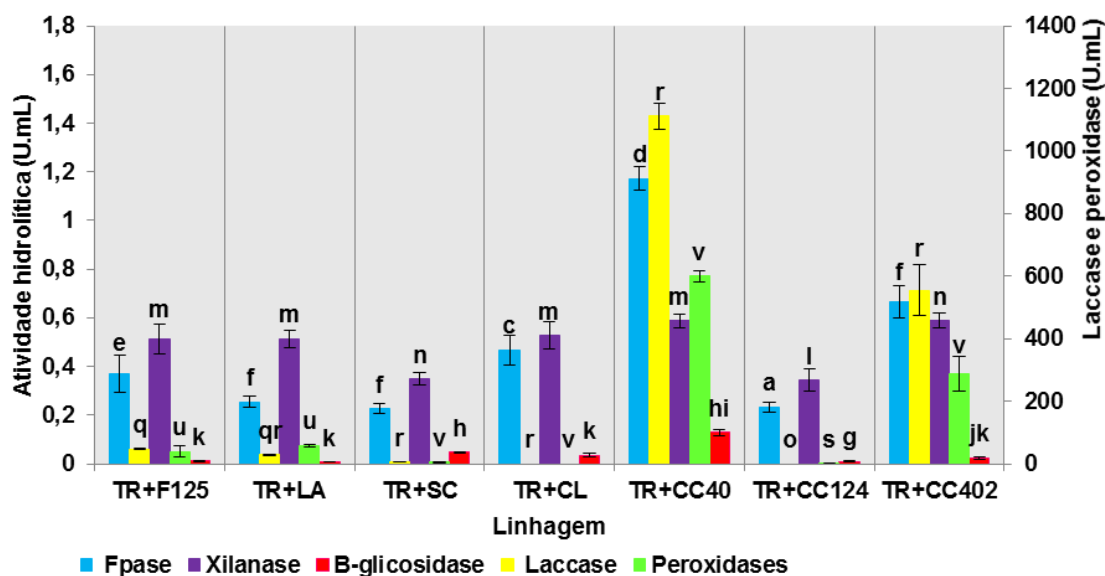


Figura 4. Atividades enzimáticas dos extratos brutos obtidos em fermentação submersa de fungos quando cocultivados com *T. reesei* ATCC® 60787, fazendo uso de meio sintético enriquecido com borra do decantor. Os basidiomicetos utilizados no cocultivo foram *Coprinus* sp. (TR+F125); *L. arvalis* ATCC® 52088 (TR+LA); *S. commune* CC328 (TR+SC); *C. lucknowense* ATCC® 44006 (TR+CL); *P. lecomtei* (TR+CC40); *T. versicolor* (TR+CC124) e *L. fuscipes* (TR+CC402). Letras diferentes nas barras indicam diferenças significativas a $p < 0.05$ no teste Tukey.

Os cocultivos em fermentação submersa com BD mostraram que os extratos de algumas linhagens tiveram atividades em algumas enzimas ausentes nos monocultivos, e incremento em enzimas já detectadas. O cocultivo TR+CC40 com *T. reesei* mostrou maior atividade lacase e peroxidase total ($1111,44$ e $599,74$ U.mL⁻¹, respectivamente) que nos monocultivos, maior atividade FPase ($1,17$ U.mL⁻¹) que do extrato do monocultivo de *P. lecomtei* CC40 e menor que de *T. reesei* ATCC® 60787. As atividades β -glicosidase e xilanase foram maiores que nos extratos dos monocultivos de *P. lecomtei* CC40, porém menores que do monocultivo de *T. reesei* ATCC® 60787 (Figura 4).

Os maiores valores de atividade foram medidos nos extratos obtidos dos cultivos em BD em relação aos obtidos dos cultivos FM, o que pode estar relacionado ao maior conteúdo de proteínas e lipídeos disponíveis no primeiro, uma vez que estes ainda são predominantemente estruturais no segundo. Já foi demonstrado que a composição das biomassas determina o perfil das enzimas liberadas pelos fungos filamentosos, inclusive, em substratos do mesmo tipo e de origens diferentes (SINDHU et al., 2016). O cocultivo TR+CC40 conseguiu melhorar mais o rendimento nas

atividades oxidativas como lacases e peroxidases que o cultivo individual *P. lecomtei* CC40 e teve alta atividade hidrolítica quando comparado com o monocultivo de *T. reesei* ATCC® 60787. Esse resultado é comparável com Ma e Ruan (2015), com cocultivos de *T. reesei* e *Coprinus comatus* quando crescidos em fermentação submersa suplementada com palha de milho. Da mesma forma, como reportado por Qi-He et al. (2011), demonstrando que fungos de podridão-branca tiveram maior atividade específica de lacase do que quando comparados com os cultivos individuais.

Conclusão

O cultivo de alguns fungos filamentosos (basidiomicetos e ascomicetos) em fermentação submersa enriquecida com biomassa vegetal da agroindústria de dendê mostrou-se positivo para a obtenção de enzimas microbianas de degradação da parede celular vegetal.

Observou-se maiores atividades enzimáticas das linhagens fúngicas testadas no meio enriquecido com borra do decantador do que no meio com fibra do mesocarpo.

Cocultivos de *T. reesei* x *P. lecomtei* CC40 e *T. reesei* x *L. fuscipes* CC402 mostraram interação positiva, com aumento das atividades enzimáticas em relação a seus monocultivos.

Agradecimentos

À Embrapa Agroenergia/Capes, pelo financiamento de recursos para a execução do trabalho.

Referências

- ELISASHVILI, V.; PENNINGCKX, M.; KACHLISHVILI, E.; TSIKAURI, N.; METREVELI, E.; KHARZIANI, T.; KVESITADZE, G. Lentinus edodes and Pleurotus species lignocellulolytic enzymes activity in submerged and solid-state fermentation of lignocellulosic wastes of different composition. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 3, p. 457-462, 2008. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960852407000788>>. Acesso em: jul. 2017
- MA, K.; RUAN, Z. Production of a lignocellulolytic enzyme system for simultaneous bio-delignification and saccharification of corn stover employing co-culture of fungi. **Bioresource Technology**, v. 175, p. 586-593, 2015. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960852414016009>>. Acesso em: jul. 2017
- MANDELS, M.; WEBER, J. The Production of Cellulases. In: HAJNY, J.; REESE, E. **Cellulases and their applications**. Washington, DC: American Chemical Society, 1969. p. 391-414. (Advances in Chemistry, v. 95).
- MILLER, G. L. Use of Dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, n. 3, p. 426-428, 1959. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1021/ac60147a030>>. Acesso em: jul. 2017
- MOHAMMAD, N.; ALAM, M. Z.; KABASHI, N. A. Development of composting process of oil palm industrial wastes by multi-enzymatic fungal system. **Journal of Material Cycles and Waste Management**, v. 15, n. 3, p. 348-356, 2013.
- MOLLA, A. H.; FAKHRU'L-RAZI, A.; ABD-AZIZ, S.; HANAFI M.M.; ALAM, M.Z. In-vitro compatibility evaluation of fungal mixed culture for bioconversion of domestic wastewater sludge. **World Journal of**

Microbiology and Biotechnology, v. 17, n. 9, p. 849-856, 2001. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1023/A:1013844306960> >. Acesso em: jul. 2017

QI-HE, C.; KRÜGENER, S.; HIRTH, T.; RUPP, S.; ZIBEK, S.. Co-cultured production of lignin-modifying enzymes with white-rot fungi. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 165, n. 2, p. 700-718, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/s12010-011-9289-9>>. Acesso em: jul. 2017

SINDHU, R.; BINOD, P.; PANDEY, A. Biological pretreatment of lignocellulosic biomass: an overview. **Bioresource Technology**, v. 199, p. 76-82, 2016.

SINGH, S. K.; SCZAKAS, G.; SOCCOL, C.R.; ASHOK PANDEY, A. Production of enzymes by solid-state fermentation. (Ed.). **Current developments in solid-state fermentation**. New York: Springer, 2008. p. 183-204.



QUÍMICA DE BIOCOMBUSTÍVEIS E BIOMASSA

Reforma a vapor do biogás usando catalisadores de óxidos mistos Ni/Mg-La para produção de gás de síntese

Gustavo Alves da Costa¹, Vannia Cristina dos Santos², Emerson Léo Schultz³,
Itânia Pinheiro Soares⁴

Resumo

O biogás é uma mistura gasosa produzida a partir da digestão anaeróbia, processo biológico em que a matéria orgânica é degradada na ausência de oxigênio molecular. Composto majoritariamente por metano (CH_4), esse gás, quando descartado na atmosfera causa inúmeros danos ao meio ambiente. Nesse sentido, novas alternativas ao uso do biogás têm sido estudadas, incluindo a reforma a vapor do biogás, obtendo-se o gás de síntese que pode ser usado para a geração de hidrogênio. O hidrogênio obtido de fontes renováveis, como o biogás, é considerado uma alternativa promissora aos combustíveis fósseis. Sendo assim, o presente trabalho teve como objetivo investigar o uso de catalisadores de óxidos mistos à base de Ni/MgLa com diferentes razões de Mg/La na reação de reforma a vapor do biogás. Os resultados mostraram que o catalisador estruturado Ni10/1Mg5La-poroso apresentou maior conversão de metano e maior estabilidade no decorrer da reação.

Palavras-chave: biogás, hidrogênio, catalisadores.

Introdução

Com o aumento da demanda energética e o declínio das reservas naturais, cresce a cada dia a necessidade de desenvolvimento de tecnologias utilizando novas fontes energéticas com a finalidade de reduzir o impacto ambiental causado pelo uso dos combustíveis fósseis.

O biogás, composto basicamente por metano (CH_4) e dióxido de carbono (CO_2), é produzido por meio da decomposição anaeróbia da matéria orgânica proveniente de diversas fontes (resíduos agrícolas, resíduos de poda de árvores, resíduos animais, lixo doméstico, resíduos industriais, esgoto, entre outras), e pode ser usado diretamente para a geração de energia elétrica, bem como fonte de energia para o aquecimento de instalações industriais e na secagem de grãos (na área agrícola) (NOYOLA et al., 2006; ALVES et al., 2013). Entretanto, a utilização direta do biogás apresenta alguns inconvenientes, como a presença de impurezas (H_2S , água e NH_3) (ALONSO-VICARIO et al., 2010) e o elevado teor de CO_2 na sua composição o que reduz o seu poder calorífico (FERREIRA, 2010). Diante disso, diversos estudos vêm sendo desenvolvidos

¹ Graduando em Engenharia de Energia, Universidade de Brasília, gustavo.alves@colaborador.embrapa.br.

² Química, doutora em Química, Embrapa Agroenergia, vannia.cristina@colaborador.embrapa.br

³ Engenheiro químico, doutor em Engenharia Química, pesquisador da Embrapa Agroenergia, emerson.schultz@embrapa.br

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

para converter o biogás em produtos de maior valor agregado e de maior aplicação, como o gás de síntese (mistura de monóxido de carbono e hidrogênio) Essa mistura gasosa pode ser aplicada na síntese *Fischer-Tropsch* (DIEHL; KHODAKOV, 2009; YATES; SATTERFIELD, 1991;) para obtenção de hidrocarbonetos, na obtenção de hidrogênio e na produção de metanol. O hidrogênio pode ser utilizado como combustível; em diversas aplicações na indústria e possui grande potencial para utilização em células a combustível (ANGELI et al., 2014; ZANOTELI et al., 2014). As principais reações para produção de hidrogênio a partir do biogás estão mostradas na Tabela 1.

Tabela 1. Principais reações para produção de hidrogênio a partir do metano.

	Reação	H _{298K} (KJ/mol)	Equação
Reforma a vapor	$\text{CH}_4 + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{CO} + 3\text{H}_2$	206	1
Reforma com CO ₂	$\text{CH}_4 + \text{CO}_2 \rightleftharpoons 2\text{CO} + 2\text{H}_2$	247	2
Oxidação parcial	$\text{CH}_4 + 1/2\text{O}_2 \rightleftharpoons \text{CO} + 2\text{H}_2$	-36	3

Além dos processos citados, existe ainda a reforma autotérmica, que é a combinação da oxidação parcial com a reforma a vapor. Industrialmente, o hidrogênio tem sido produzido pela reforma a vapor do gás natural. Devido ao caráter endotérmico desse processo, há a necessidade de condições mais drásticas de temperatura, geralmente na faixa de 800 °C, o que tende a elevar os custos do processo (ZANOTELI et al., 2014). Outra forma de se produzir gás de síntese e, consequentemente, hidrogênio seria a partir da reforma do biogás. Para tanto, devem ser utilizados catalisadores que sejam ativos, estáveis em condições de fluxo, resistentes a depósitos de carbono e à temperatura, além de apresentarem baixo custo (ZANOTELI et al., 2014; QUIROGA; LUNA, 2010).

Catalisadores a base de níquel tem se mostrado bastante adequados na reação de reforma a vapor de hidrocarbonetos, por serem consideravelmente mais baratos e apresentarem atividade catalítica similar aos catalisadores à base de platina (Pt), ródio (Rh) e paládio (Pd) (ZHANG; VERYKIOS, 1996). Catalisadores de Ni em alumina tem sido utilizados comercialmente na reação de reforma a vapor do metano. No entanto, observam-se a indesejada formação de coque limitando a conversão do metano (SON et al., 2013). Para que os catalisadores a base de níquel sejam ativos nas reações é importante que as partículas de níquel estejam altamente dispersas na superfície de um suporte estável termicamente e com elevada área superficial e porosidade para facilitar o contato dos gases reagentes com os sítios ativos. Os suportes mais comumente investigados são baseados em misturas de óxidos de alumínio, silício, magnésio, lantânio, cálcio entre outros (NI et al., 2013). Os óxidos de Mg e La têm sido considerados uma excelente alternativa como suporte para a impregnação de espécies ativas de Ni, em virtude da basicidade do suporte e forte interação que tende a promover uma maior estabilidade em altas temperaturas (NI et al., 2013). Outra característica que pode aumentar a atividade catalítica de sólidos à base de Ni está relacionada com o tamanho das partículas. De maneira geral, quanto menor o tamanho das partículas de Ni maior a sua atividade catalítica. Um método simples e eficiente para a obtenção de partículas pequenas e altamente dispersas é por coimpregnação com aditivos orgânicos como o etilenoglicol (QIU et al., 2013).

Dessa forma, a utilização de sistemas catalíticos mais eficientes e/ou a otimização de desempenho em processos tradicionais são de fundamental importância para tornar o processo de reforma de biogás viável técnica e economicamente. Sendo assim, neste trabalho foi avaliado o desempenho de óxidos mistos de Ni/MgLa na reação de reforma a vapor do biogás para a produção de gás de síntese. Além disso, investigou-se a influência das propriedades texturais do suporte e dispersão das espécies ativas de Ni na superfície no desempenho catalítico.

Materiais e Métodos

Materiais utilizados

Nas reações foram utilizados: água destilada, gases (hidrogênio, metano, hélio, argônio e dióxido de carbono) de pureza 99,99%, carvão de silício e óxidos mistos Ni-Mg-La [denominados Ni10/1Mg5La, Ni10/1Mg5La-EG (elilenoglicol)], Ni10/1Mg5La-poroso. Utilizou-se uma razão molar Mg:La de 1:5 e 10% de níquel em massa).

Procedimento experimental para a reforma a vapor do biogás

Os óxidos mistos de Mg-La utilizados como suportes foram sintetizados segundo Podila et al. (2015) e calcinados a 500 °C por 4 horas (taxa de aquecimento 5 °C min⁻¹). As espécies ativas de Ni foram depositadas na superfície do suporte por impregnação aquosa sem e com a adição do etilenoglicol levando à formação dos sólidos Ni10/1Mg5La e Ni10/1Mg5La-EG, respectivamente. Além disso, o sólido Ni10/1Mg5La-poroso foi preparado de maneira similar, porém com algumas modificações, na tentativa de promover a formação de um sólido estruturado. Substituiu-se a mistura de NaOH/Na₂CO₃ por NH₄OH/NH₄CO₂. Além disso, adicionou-se na etapa de preparação do suporte o sólido de sílica mesoestruturado MCM-41, para atuar como uma *hard template*, sendo este removido após a formação do sólido por uma solução de NaOH a quente (ROMBI et al., 2016). As espécies ativas de Ni foram depositadas na superfície do suporte por impregnação aquosa à adição do etilenoglicol.

A reação de reforma a vapor do biogás foi realizada usando uma mistura de CH₄ e CO₂ para simular o biogás proveniente de dejetos suínos, com 70% de CH₄ (15,68 ml min⁻¹) e 30% de CO₂ (6,72 ml min⁻¹). Os testes de reforma a vapor foram realizados em um reator PID Eng&Tech Microactivity Effi de leito fixo de aço inoxidável com volume de 19,51 ml (D.I. de 9,1 mm, L = 300 mm) conectado a um cromatógrafo gasoso Shimadzu, GC-2014, com detector de condutividade térmica e colunas Carboxen 1000 e Porapak N. A temperatura das colunas foi programada para manter a 100 °C por 4 min, seguido por uma rampa de aquecimento de 20 °C min⁻¹ até 150 °C e mantendo por 5 min. Foram pesados 50 mg do catalisador e 50 mg de carvão de silício (SiC). Em seguida, foram misturados e depositados no leito com uma camada de lã de quartzo colocada sobre um suporte de aço inoxidável para evitar o arraste da mistura de catalisador e SiC durante o experimento. O tempo de redução do catalisador e da reação foi respectivamente de 2 h e 6 h. A reação foi realizada a uma temperatura de 750 °C e à pressão atmosférica. A pressão foi controlada pela válvula de saída do reator, não havendo variação significativa no decorrer da reação. A análise foi feita com injeções periódicas (em intervalos de 30 min) de 1 µL do produto no cromatógrafo gasoso acoplado em linha com o reator.

Resultados e Discussão

A conversão do metano e do dióxido de carbono foi calculada pelas Equações 4 e 5, respectivamente.

$$\frac{(CH_4)_{entrada}}{(CH_4)_{saída}} \quad (\text{Equação 4})$$

$$\frac{(CO_2)_{entrada}}{(CO_2)_{saída}} \quad (\text{Equação 5})$$

Em que: CH_4 , entrada e CO_2 , entrada significam a concentração do metano e do dióxido de carbono no reagente; CH_4 , saída e CO_2 , saída são a concentração do metano e do dióxido de carbono no produto.

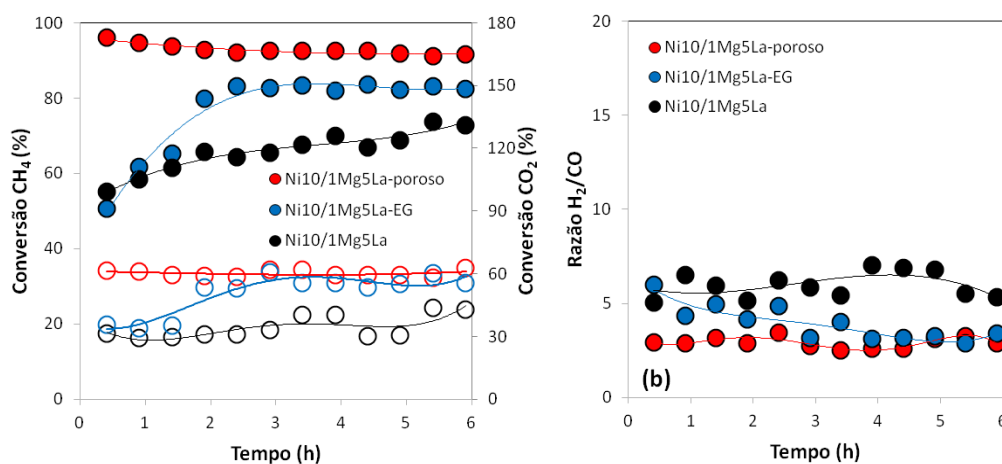


Figura 1. (a) Conversão de CH_4 e CO_2 , (b) Razão H_2/CO , na reação de reforma a vapor utilizando os óxidos mistos Ni/MgLa como catalisadores.

Pode-se observar na Figura 1 (a) que todos os catalisadores foram ativos na reação de reforma a vapor do biogás alcançando conversões de CH_4 superiores a 60%. A conversão do CO_2 foi menor que a de CH_4 (<40%), indicando maior ocorrência de reforma a vapor (Equação 1) que a reforma com CO_2 (Equação 2). A adição de etilenoglicol na etapa de preparação dos catalisadores promoveu um aumento da atividade catalítica, se comparado ao sólido similar sem a adição do etilenoglicol Ni10/1Mg5La. No entanto, o catalisador Ni10/1Mg5La-EG, mesmo sendo superior ao Ni10/1Mg5La, levou aproximadamente 2 h para alcançar o máximo de conversão e estabilidade. O sólido estruturado Ni10/1Mg5La-poroso apresentou um desempenho ainda melhor, alcançando conversões próximas a 100% e estabilidade durante o decorrer da reação. Esse fato pode estar relacionado com as suas propriedades texturais, como a presença de elevada área superficial e porosidade, que pode ter facilitado a difusão dos reagentes e formação dos produtos, ou, ainda, promovido uma

melhor dispersão das espécies ativas de Ni na superfície, tornando-as mais disponíveis na superfície para atuarem na conversão do metano e formação do H₂ como produto.

Com relação à seletividade para a produção de H₂, pode-se observar na Figura 1 (b) que todos os catalisadores apresentam seletividade para a formação de H₂, com razões H₂/CO acima de 2, comparáveis com catalisadores comerciais, que apresentam razões H₂/CO na faixa de 2,0-2,5 (SON, et al. 2013; IZQUIERO et al., 2012).

Conclusões

Os resultados da investigação dos catalisadores à base de óxidos mistos de Ni/MgLa na reação de reforma a vapor se mostraram bastante promissores, indicando potencial na sua utilização no processo de reforma do biogás. Observaram-se conversões de CH₄ próximas a 100% quando se utilizou um catalisador estruturado Ni₁₀/1Mg₅La-poroso. Os catalisadores se mostraram seletivos para a produção de H₂ com relação ao CO. Além disso, deve-se prosseguir com testes alterando parâmetros reacionais, por exemplo, tentando reduzir a temperatura de reação ou ainda a quantidade de vapor utilizada na reação, bem como modificações no catalisador para promover uma melhor dispersão das espécies ativas de Ni na superfície dos suportes.

Agradecimentos

Este trabalho foi conduzido com financiamento do projeto Embrapa/Itaipu – Tecnologias para produção e uso de biogás e fertilizantes a partir do tratamento de dejetos animais no âmbito do plano ABC (BiogasFert, Cod SEG 02.12.08.004.00.00).

Referências

- ALONSO-VICARIO, A.; OCHOA-GÓMEZ, J. R.; GIL-RÍO, S.; GÓMEZ-JIMÉNEZ-ABERASTURI, O.; RAMÍREZ-LÓPEZ, C. A.; TORRECILLA-SORIA, J.; DOMÍNGUEZ, A. Purification and upgrading of biogas by pressure swing adsorption on synthetic and natural zeolites. **Microporous and Mesoporous Materials**, v. 134, n. 1-3, p. 100-107, 2010.
- ALVES, H. J.; BLEY JUNIOR, C.; NIKLEVICH, R. R.; FRIGO, E. P.; FRIGO, M. S.; COIMBRA-ARAÚJO, C. H. Overview of hydrogen production technologies from biogas and the applications in fuel cells. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 38, n. 13, p. 5215-5225, 2013.
- ANGELI, S. D.; MONTELEONE, G.; GIACONIA, A.; LEMONIDOU, A. State-of-the-art catalysts for CH₄ steam reforming at low temperature. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 39, n. 5, p. 1979-1997, 2014.
- DIEHL, F.; KHODAKOV, A. Y. Promotion of Cobalt Fischer-Tropsch Catalysts with Noble Metals: a review. **Oil & Gas Science and Technology - Revue d'IFP Energies Nouvelles**, v. 64, n. 1, p. 11-24, 2009.
- FERREIRA, O. L. S. **Conversão de biogás em gás de síntese via reações de reforma do metano com CO₂ e a vapor sobre catalisadores de Ni-Y-Al**. 2010. 98 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo, São Carlos, SP. Orientadora: Elisabete Moreira Assaf.
- NI, J.; CHEN, L.; LIN, J.; SHREYER, M. K.; WANG, Z.; KAWI, S. High performance of Mg-La mixed oxides supported Ni catalysts for dry reforming of methane: The effect of crystal structure. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 38, n. 31, p. 13631-13642, 2013.
- NOYOLA, A.; MORGA-SAGASTUME, J. M.; LÓPEZ-HERNANDEZ, J. E. Treatment of Biogas Produced in Anaerobic Reactors for Domestic Wastewater: Odor Control and Energy/Resource Recovery. **Reviews in Environmental Science and Bio/Technology**, v. 5, n. 1, p. 93-114, 2006.

PODILA, S.; ALHAMED, Y. A.; ALZHRANI, A. A.; PETROV, L. A. Hydrogen production by ammonia decomposition using Co catalyst supported on Mg mixed oxide systems. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 40, n. 45, p. 15411-15422, 2015.

QIU, S. B.; ZHANG, X.; LIU, Q. Y.; WANG, T. J.; ZHANG, Q.; MA, L. L. A simple method to prepare highly active and dispersed Ni/MCM-41 catalysts by co-impregnation. **Catalysis Communication**, v. 42, p. 73-78, 2013.

QUIROGA, M. M. B.; LUNA, A. E. C. Catalytic activity and effect of modifiers on Ni-based catalysts for the dry reforming of methane. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 35, n. 11, p. 6052-6056, 2010.

ROMBI, E.; CUTRUFELLO, M. G.; ATZORI, L.; MONACI, R.; ARDU, A.; GAZZOLI, D.; DEIANA, P.; FERINO, I. CO methanation on Ni-Ce mixed oxides prepared by hard template method. **Applied Catalysis A: General**, v. 515, p. 144-153, 2016.

SON, I. Z.; LEE, S. J.; SOON, A.; ROH, H. S.; LEE, H. Steam treatment on Ni/-Al₂O₃ for enhanced carbon resistance in combined steam and carbon dioxide reforming of methane. **Applied Catalysis B: Environmental**, v. 134, p. 103-109, 2013.

YATES, I. C.; SATTERFIELD, C. N. Intrinsic kinetics of the Fischer-Tropsch synthesis on a cobalt catalyst. **Energy and Fuels**, v. 5, n. 1, p. 168-173, 1991.

ZHANG, Z.; VERYKIOS, X. E. Carbon dioxide reforming of methane to synthesis gas over Ni/La₂O₃ catalysts. **Applied Catalysis A: General**, v. 138, n. 1, p. 109-133, 1996.

Caracterização química do resíduo pós-cultivo de cogumelos destoxificantes em torta de algodão

Larissa Silva Fonseca¹, Ana Paula Fernandes Araújo², Antony Enis Virginio Machado³, Félix Gonçalves de Siqueira⁴, Marivane Lemos⁵, Simone Mendonça⁶

Resumo

Os cogumelos comestíveis são fungos muito utilizados pelos povos europeus e asiáticos, para fins terapêuticos e culinários. O cogumelo *Agaricus bisporus* (Champignon de Paris) é o mais comercializado, seguido do *Lentinus edodes* (Shiitake) e das diversas espécies do gênero *Pleurotus*. Os cogumelos são corpos de frutificação (estruturas reprodutivas) de espécies de fungos classificados nos filos Basidiomycota e Ascomycota. Essas estruturas possuem excelente valor nutricional, com baixos teores de lipídeos e quantidades significativas de carboidratos e de proteínas, que pode variar entre espécies e sistemas de cultivo. As aplicações biotecnológicas desses microrganismos vão além de alimentos humanos, pois podem ser empregados em técnicas de biorremediação e biodestoxificação de substâncias antinutricionais de biomassas vegetais, por exemplo. Algumas espécies possuem enzimas capazes de transformar substâncias tóxicas presentes no substrato, que poderia ser utilizado na nutrição animal e, também, digerir parcialmente a parede celular vegetal e aumentar o teor de proteína bruta, em função da massa micelial. De acordo com a Food and Agriculture Organization of the United States (FAO), em 2013, a produção mundial de cogumelos frescos foi de aproximadamente 10 milhões de toneladas. A produção de 1 kg de cogumelo fresco pode gerar de 5 kg a 10 kg de pós-cultivo (biomassa vegetal + biomassa microbiana), também conhecido pela sigla em inglês SMS (*Spent Mushroom Substrate*). O SMS gerado de uma ou mais colheitas tem sido objeto de vários estudos em países como China, Estados Unidos e Holanda, evitando assim o descarte desse material de forma inapropriada. O objetivo deste trabalho foi avaliar a composição centesimal de formulações de substratos contendo torta de caroço de algodão como um dos insumos para o cultivo das espécies *Pleurotus ostreatus* CC389, *Pleurotus ostreatus* (Comercial), *Pleurotus eryngii* (Comercial), *Panus lecomtei* CC40 e *Fistulina hepatica* CC102. As espécies *P. ostreatus* CC389, *P. lecomtei* CC40 e *F. hepatica* foram previamente selecionadas por apresentarem resultados significativos quanto à destoxificação do fator tóxico e antinutricional, gossipol. A composição centesimal foi

¹ Graduanda em Farmácia, Universidade de Brasília, larissa.s.fonseca@hotmail.com

² Mestre em Biotecnologia, Universidade Federal do Tocantins, anapaula.araujo1@yahoo.com.br

³ Mestre em Biotecnologia, Universidade Federal do Tocantins, antony-enis@hotmail.com

⁴ Biólogo, doutor em Biologia Molecular, pesquisador da Embrapa Agroenergia, felix.siqueira@embrapa.br

⁵ Marivane Lemos, doutora em Ciências Farmacêuticas, colaboradora da Embrapa Agroenergia, marivane.lemos@gmail.com

⁶ Farmacêutica e Bioquímica, doutora em Saúde Pública, pesquisadora da Embrapa Agroenergia, simone.mendonca@embrapa.br

determinada pelas análises de teor de matéria mineral, extrato etéreo, proteína bruta, fibra em detergente neutro, fibra em detergente ácido e lignina. Os macrofungos demonstraram capacidade de diminuir o teor de lignina nos substratos, tornando o SMS um potencial insumo mais digerível para nutrição animal. Os resultados mostraram que a espécie de macrofungo e o tempo de colheita é determinante quanto às características centesimais do SMS, principalmente quanto ao teor de proteína bruta.

Palavras-chave: macrofungo. composição química. SMS (*Spent Mushroom Substrate*). resíduo da agroindústria. *Gossypium*.

Introdução

Os cogumelos comestíveis têm ganhado espaço no mercado em todos os continentes, uma vez que podem ser utilizados como suplemento alimentar em virtude do seu alto teor de aminoácidos, proteínas, fibras e minerais, e também por terem baixo teor de lipídios e calorias (REIS; ROCHA, 2015). As principais espécies da fungicultura industrial podem variar entre as regiões. Na Europa e em países da América do Norte, predomina o cultivo do *Agaricus bisporus* (champignon de Paris), enquanto no Japão predomina o *Lentinula edodes* (Shiitake) e, na China, o *Flammulina velutipes*, *Ganoderma lucidum*, *Morchella sculenta*, entre outros.

O gênero *Pleurotus* está entre os mais produzidos e disseminados em diversos países. No Brasil, foi realizado um censo em 2016, que mostrou que o estado de São Paulo foi responsável por produzir um total de aproximadamente 1.000 toneladas de cogumelos frescos/mês, sendo o *Pleurotus* spp. o gênero mais produzido, seguido do *Lentinula edodes* (GOMES et al., 2016). Vários fatores influenciam diretamente no cultivo de cogumelos comestíveis, desde fatores físicos (umidade, temperatura), como químicos (pH, composição dos substratos) e biológicos (contaminantes). Substratos como palhas, bagaços e serragens, em quantidades variadas, são fontes lignocelulósicas necessárias para o metabolismo desses fungos. Os cogumelos dispõem de enzimas capazes de hidrolisar tais substâncias, de modo a facilitar sua absorção e/ou utilização por esses organismos (AGUIAR, 2016). O nitrogênio, por sua vez, é essencial para a síntese de proteínas e outras substâncias nitrogenadas. Quando formulado corretamente, o nitrogênio pode aumentar o rendimento da produção de cogumelos, porém, em altas dosagens pode ter o efeito contrário (CHANG; MILES, 2004).

O farelo ou torta da semente de algodão é uma fonte potencial para alimentação animal por seu alto teor proteico (acima de 26%) e lipídico, mas possui limitações de uso, em decorrência da presença do fator tóxico e antinutricional, gossipol. O gossipol é um polifenol que causa efeitos nocivos aos animais monogástricos. A Embrapa Agroenergia tem estudado a destoxificação da torta de caroço de algodão (TCA) por ação de basidiomicetos (macrofungos), de forma que a biomassa passe a ser favorável para a nutrição de monogástricos (ARAUJO et al., 2015). O objetivo do presente trabalho foi avaliar a composição centesimal de biomassas pós-cultivo (SMS) e cogumelos (corpos de frutificação) de diferentes espécies (Embrapa Agroenergia e Comercial) quando cultivadas em substratos que contêm torta de caroço de algodão.

Materiais e Métodos

As amostras para as análises centesimais foram obtidas das misturas de ingredientes (biomassas lignocelulósicas e torta de caroço de algodão), aqui denominada de mistura pré-cultivo, dos cogumelos (corpos de frutificação pós-colheita) e da biomassa pós-cultivo (SMS). Foram realizados quatro experimentos com diferentes formulações e três espécies de fungos. A primeira mistura continha 70% de TCA e 30% de serragem de *Eucalyptus* spp., onde foi inoculado o fungo *Pleurotus ostreatus* CC389, que gerou um cogumelo e um SMS. A segunda mistura continha 70% de TCA e 30% de bagaço de cana-de-açúcar, onde foi inoculado o fungo *Fistulina hepatica* CC102. Nesse caso, o basidiomiceto não frutificou, por isso foi analisado apenas o SMS. A terceira mistura continha 20% de TCA e 80% de serragem, em que foram inoculados os fungos *Fistulina hepatica* CC102 e *Panus lecomtei* CC40, que geraram cogumelos e SMSs, respectivamente. A Hochibra Cogumelos Exóticos (Vitória da Conquista, BA) forneceu os cogumelos *Pleurotus ostreatus* e *Pleurotus eryngii* e seus respectivos pós-cultivos, não sendo informada a formulação do substrato. Os macrofungos *P. ostreatus* CC389, *P. lemcotei* CC40 e *F. hepatica* CC102 apresentaram resultados de degradação de gossipol acima de 95% em trabalhos prévios, por isso foram utilizados neste estudo. Com exceção dos fungos comerciais, todas as coletas dos fungos silvestres foram realizadas sob a autorização de bioprospecção SISBIO / IBAMA n. 41346-1.

As amostras foram secas em estufa com ventilação forçada a 65 °C, por 48 horas, moídas em moinho ultracentrífugo (ZM 200, Retsch, Germany) e caracterizadas quanto à composição centesimal: matéria seca, matéria mineral, extrato etéreo, fibra em detergente neutro, fibra em detergente ácido, proteína bruta e lignina, de acordo com Nogueira e Souza (2005). Todas as análises foram realizadas em triplicata. Os resultados da composição centesimal obtidos foram expressos em média $\pm$ desvio padrão, em base seca, e analisados estatisticamente pela análise de similaridade, sendo utilizado como pós-teste o método de Scott-Knott. Assim, foi considerado como estatisticamente significativo o $p < 0,05$ (nível de significância de 5%), utilizando o software R Core Team® (2017).

Resultados e discussões

A Tabela 1 apresenta os resultados da composição centesimal das amostras das misturas pré-cultivo, cogumelos e SMSs analisadas. As misturas M1 e M3, contendo serragem de eucalipto em sua composição, mesmo em diferentes concentrações, não apresentaram diferença estatística quanto ao teor de matéria mineral (MM). Os pós-cultivos com maior teor de MM foram os de origem comercial (SMS5 e SMS6), inoculados respectivamente pelos fungos *P. eryngii* e *P. ostreatus*, seguido do SMS2, proveniente do cultivo de *F. hepatica*. Os cogumelos com maior teor mineral foram os comerciais *P. ostreatus* e o *P. eryngii*. Pedra et al. (2009) analisaram dois isolados de *P. ostreatus* cultivados em casca de coco moída suplementada com farelos e encontraram teor de MM entre 6,55% e 7,66%. Com exceção do SMS2, todos os pós-cultivos apresentaram valores menores de MM em relação à mistura, indicando a transferência de MM da mistura para os corpos de frutificação. Fatores como a espécie

de fungo, as condições ambientais e o substrato têm influência direta na composição química dos cogumelos, principalmente nos minerais e na qualidade proteica.

Tabela 1. Composição centesimal dos cogumelos e das misturas antes e após cultivo de basidiomicetos em substratos com torta de algodão e substratos comerciais

AM	% MM	% EE	% N	%PB*	% FDN	% FDA	% LIG	%CEL	%HEM
M1	6,44± 0,17 ^{Aa}	3,31± 0,03 ^{Aa}	3,10± 0,08 ^{Ba}	19,05± 0,04 ^{Ba}	61,86± 0,30 ^{Ca}	47,40 ± 0,03 ^{Bb}	11,71± 0,59 ^{Bb}	28,15	14,46
M2	3,95± 0,05 ^{Bb}	1,60± 0,06 ^{Ba}	3,41± 0,11 ^{Aa}	21,28± 0,67 ^{Aa}	64,61± 0,31 ^{Bb}	45,97± 0,28 ^{Cb}	11,12± 0,05 ^{Bb}	34,26	18,64
M3	6,64± 0,30 ^{Aa}	1,60± 0,11 ^{Ba}	1,19± 0,05 ^{Cb}	7,64± 0,04 ^{Cb}	71,74± 0,10 ^{Ab}	60,75± 0,63 ^{Aa}	19,25± 0,15 ^{Aa}	41,51	10,99
SMS1	4,68± 0,05 ^{Cb}	0,78± 0,02 ^{Bb}	3,31± 0,05 ^{Ca}	20,70± 0,30 ^{Ca}	60,95± 0,05 ^{Fa}	48,32± 0,15 ^{Da}	17,36± 0,19 ^{Aa}	30,96	12,62
SMS2	5,82± 0,21 ^{Ba}	1,36± 0,01 ^{Aa}	3,51± 0,08 ^{Ca}	21,92± 0,52 ^{Ca}	67,53± 0,43 ^{Fa}	52,93± 0,53 ^{Ca}	15,58± 0,28 ^{Ba}	37,35	14,61
SMS3	4,64± 0,00 ^{Cb}	0,25± 0,10 ^{Cb}	3,62± 0,14 ^{Ca}	23,07± 0,46 ^{Ca}	71,07± 0,18 ^{Cb}	55,60± 0,30 ^{Bb}	9,00± 0,25 ^{Cb}	46,60	15,46
SMS4	3,86± 0,12 ^{Db}	0,24± 0,04 ^{Cb}	1,51± 0,15 ^{Db}	8,88± 0,21 ^{Db}	72,93± 0,18 ^{Ba}	57,23± 0,17 ^{Aa}	8,75± 0,32 ^{Cb}	48,47	15,71
SMS5	7,14± 0,04 ^A	0,97± 0,08 ^B	4,20± 0,35 ^B	26,24± 2,18 ^B	74,04± 0,27 ^A	56,72± 0,08 ^A	16,62± 0,30 ^A	40,10	17,32
SMS6	6,12± 0,04 ^A	0,75± 0,26 ^B	5,52± 0,11 ^A	34,48± 0,70 ^A	69,38± 0,08 ^D	52,38± 0,15 ^C	16,16± 0,31 ^B	36,21	17,01
Cog1	7,43± 0,31 ^B	1,12± 0,11 ^A	5,87± 0,07 ^B	25,69± 0,32 ^B	29,82± 0,12 ^C	12,95± 0,27 ^C	0,36± 0,03 ^A		
Cog3	4,24± 0,01 ^D	0,68± 0,13 ^B	4,65± 0,15 ^D	20,01± 0,02 ^D	64,87± 0,06 ^A	27,76± 0,28 ^A	0 ^A		
Cog4	4,34± 0,12 ^D	0,72± 0,12 ^B	5,26± 0,00 ^C	23,05± 0,00 ^C	45,38± 0,34 ^B	18,33± 0,06 ^B	0 ^A		
Cog5	6,74± 0,18 ^C	0,76± 0,01 ^B	3,68± 0,16 ^E	15,72± 0,30 ^E	27,94± 0,26 ^D	13,16± 0,00 ^C	0,76± 0,25 ^A		
Cog6	9,52± 0,20 ^A	1,05± 0,07 ^A	7,01± 0,17 ^A	30,30± 0,24 ^A	22,20± 0,07 ^E	12,07± 0,18 ^D	0,41± 0,18 ^A		

AM: amostra; MM: matéria mineral; EE: extrato etéreo; FDN: fibra em detergente neutro; FDA: fibra em detergente ácido; LIG: lignina; N: nitrogênio; PB: proteína bruta; CEL: celulose; HEM: hemicelulose. *: para cálculo de PB a partir do teor de Nitrogênio, foi utilizado o fator 6,25 para as misturas e SMS, e o fator 4,38 para os cogumelos. Foi realizado teste de Scott-Knott entre as misturas, entre os SMSs e entre os cogumelos, representado pelas letras maiúsculas. Foi realizado teste entre as misturas e os SMS, representado pelas letras minúsculas. Foi comparado a M1 com o SMS1, a M2 com o SMS2, a M3 como SMS3 e a M3 com o SMS4. Diferentes letras na mesma coluna indicam diferença estatística entre as amostras, admitindo nível de significância $p < 0.05$.

Dentre as misturas, a M1, com serragem de eucalipto foi a que apresentou maior teor de extrato etéreo (EE) com 3,31%. Os SMS1, SMS5 e SMS6, inoculados com o fungo *Pleurotus* spp., apresentaram teor de EE variando de 0,75 a 0,97%, não apresentando diferença estatística. Os cogumelos *P. ostreatus* (Cog1 e Cog6) foram os que apresentaram maiores valores de EE, 1,12% e 1,05%, respectivamente. Ragunathan e Swaminathan (2003) avaliaram a composição centesimal de *Pleurotus sajor-caju*, obtendo valor médio de 0,95% de EE para o substrato contendo resíduo da parte aérea do algodão, aproximando-se dos resultados obtidos no presente trabalho, com fungo do mesmo gênero. Dessa forma, observamos que, quando o teor de EE é maior na mistura, o cogumelo apresenta maior teor de EE.

Os teores de proteína bruta (PB) das misturas são estatisticamente diferentes um dos outros e apresentam valores entre 8% e 21%. O baixo teor de PB na M3 já era esperado em decorrência da sua composição com 80% de serragem, que não apresenta muita proteína, de acordo com Andrade et al. (2008), que encontraram valores semelhantes de PB em eucalipto (7,70%). Para o cálculo de proteínas, foi utilizado o fator de correção 6,25, para as misturas e SMS; e 4,38, para os cogumelos, isto porque genericamente nos alimentos as proteínas possuem 16% nitrogênio, ao passo que nos cogumelos, pela presença significativa de compostos nitrogenados não proteicos (principalmente a quitina), essa proporção deve ser reduzida em 70% (FURLANI; GODOY, 2007). O cogumelo *P. ostreatus* foi o que apresentou maior teor de proteína bruta, variando de 26% a 30% aproximadamente, confirmando os estudos de Manzi et al. (1999), que analisaram diferentes isolados de *P.ostreatus* e encontraram teores de PB variando entre 20% e 35%, aproximadamente, em base seca. O teor de PB encontrado no *P. erynguii* (Cog5) foi inferior (15,72%) ao encontrado por Manzi et al. (1999) (22,74%) na mesma espécie. Os SMS5 e SMS6 apresentaram maiores valores de proteína, (34,48% e 26,4%), respectivamente. A quantidade de colheita em função do tempo pode ter influenciado a composição de PB entre os SMSs, pois os cogumelos comerciais que geraram o SMS5 e SMS6 foram colhidos uma única vez, enquanto os demais foram colhidos durante 21 dias (três fluxos, aproximadamente). Furlani e Godoy (2007) compararam diferentes espécies de cogumelos e concluíram que a grande variabilidade dos teores de proteína pode ser explicada pela concentração de quitina presente em cada espécie. Assim, a atividade metabólica dos fungos que ficaram por mais tempo sobre o substrato transferiram parte da proteína para os respectivos. O teor de proteína bruta acima de 30% no SMS pode representar um método alternativo para obtenção de insumos para nutrição animal.

As fibras também estão presentes tanto na forma solúvel como na insolúvel. As principais fibras insolúveis são a celulose e a lignina. A fibra em detergente neutro (FDN) é a fração nutricional correspondente à soma de hemicelulose, celulose e lignina. A hemicelulose tem alta digestibilidade, a celulose tem digestibilidade variável e é afetada principalmente pela maturidade das plantas e a lignina é praticamente indigerível por ruminantes. A fibra em detergente ácido (FDA) é a fração correspondente à soma de celulose e lignina. Os valores de hemicelulose (HEM) foram calculados pela diferença entre FDA e FDN, e a celulose (CEL) foi calculada pela diferença entre a lignina (LIG) e a FDA. Nas análises de fibras, quando o meio apresentou maior teor de LIG (M3), os fungos *F. hepatica* e *P. lecomtei* podem ter produzido prioritariamente enzimas deslignificantes e, quando o meio apresentou maior teor de HEM (M1 e M2) do que LIG, os fungos *P. ostreatus* e *F. hepatica*

produziram preferencialmente enzimas que degradaram HEM. Após o cultivo dos diferentes fungos, os valores de CEL encontrados nos pós-cultivo foram maiores, sugerindo que os fungos não produziram nenhuma enzima que quebre a CEL (celulases). O aumento de CEL no pós-cultivo pode ser explicado também em virtude da presença de fibras que compõem a parede celular dos fungos e se comportam como celulose (insolúvel em detergente neutro e em detergente ácido). Por exemplo, a quitina, que é uma fibra encontrada na parede celular dos fungos, é estruturalmente semelhante à celulose, podendo estar sendo contabilizada como celulose na determinação de FDA. As misturas apresentaram teor de HEM variando de 10,99% a 18,64%. Os pós-cultivos de origem comercial apresentaram maior teor de HEM. No entanto, o SMS1 (*P. ostreatus*) apresentou menor teor de HEM. As análises de lignina, celulose e hemicelulose não foram determinadas nos corpos de frutificação, pois estes são constituídos basicamente por quitina e proteínas e, assim, são necessários outros métodos de avaliação.

Conclusões

De acordo com os resultados obtidos na composição centesimal, verificou-se que substrato influencia diretamente na composição de minerais e extrato etéreo dos cogumelos e dos pós-cultivos (SMS). A avaliação do teor proteico sugeriu que os diferentes fungos e tempo de colheita são fatores fundamentais na composição dos pós-cultivos (SMS). Os valores de celulose foram maiores em todos os pós-cultivos, sugerindo que os fungos não produziram nenhuma enzima que quebre a celulose, ou então a quitina pode estar sendo determinada como se fosse celulose na análise de FDA. Os valores de lignina foram menores nos pós-cultivos, demonstrando a ação enzimática desses fungos, degradando a lignina e tornando o SMS um substrato mais digerível para potencial uso como insumo na nutrição animal.

Referências

- ANDRADE, M. C. N. D.; SILVA, J. H. D.; MINHONI, M. T. D. A.; ZIED, D. C. Mycelial growth of two *Lentinula edodes* strains in culture media prepared with sawdust extracts from seven eucalyptus species and three eucalyptus clones. *Acta Scientiarum-Agronomy*, v. 30, n. 3, p. 333-337, 2008.
- AGUIAR, L. V. B. DE. **Cultivo e avaliação nutricional de *Pleurotus ostreatus* de ocorrência na Amazônia, em condições ambientais não controladas**. [s.l.] Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, 2016.
- ARAUJO, A. P. F.; GOMES, T. G.; MACHADO, A. E. V.; CONCEIÇÃO, A. A.; RIBEIRO, J. A. de A.; CAMPANHA, R. B.; URBEN, A. F.; MENDONÇA, S.; SIQUEIRA, F. G. de Fungos como agentes destoxificadores de torta de caroço de algodão (Gossipol). In: ENCONTRO DE PESQUISA E INOVAÇÃO DA EMBRAPA AGROENERGIA, 2., 2015, Brasília, DF. **Anais ...** Brasília, DF: Embrapa Agroenergia, 2015. p. 98-100.
- CHANG, S.-T.; MILES, P. G. **Mushrooms: Cultivation, nutritional value, medicinal effect, and environmental impact**. Boca Raton: CRC Press, 2004.
- FURLANI, R. P. Z.; GODOY, H. T. Valor nutricional de cogumelos comestíveis. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 27, n. 1, p. 154-157, 2007.
- GOMES, D.; AKAMATSU, I.; SOUZA, E.; FIGUEIREDO, G. J. B. Censo paulista de produção de cogumelos comestíveis e medicinais. *Pesquisa & Tecnologia*, v. 13, n. 1, p. 1-6, 2016.
- MANZI, P.; GAMBELLI, L.; MARCONI, S.; VIVANTI, V.; PIZZOFERRATO, L. Nutrients in edible mushrooms: An inter-species comparative study. *Food Chemistry*, v. 65, n. 4, p. 477-482, 1999.

NOGUEIRA, A. R. de A.; SOUZA, G. B. de. (Ed.). **Manual de laboratórios: solo, água, nutrição vegetal, nutrição animal e alimentos**. São Carlos, SP: Embrapa Pecuária Sudeste, 2005.

PEDRA, W. N.; CARNELOSSI, M. A. G.; SILVA, G. F.; YAGUIU, P.; LIRA, M. L.; GONÇALVES, G. B.; MARINO, R. H. Chemical and sensorial analysis of *Pleurotus ostreatus* cultivated on coconut (*Cocos nucifera* Linn.) husk supplemented with wheat and/or rice bran. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 76, n. 1, p. 91–98, 2009.

RAGUNATHAN, R.; SWAMINATHAN, K. Nutritional status of *Pleurotus* spp. grown on various agro-wastes. **Food Chemistry**, v. 80, n. 3, p. 371–375, 2003.

Reforma seca de biogás usando óxidos mistos de Ni-Al e Co-Ni-Al para produção de gás de síntese

Jéssica de Souza Silva¹, André Luiz Alvarenga Marinho,² Fábio Bellot Noronha³
Grace Ferreira Ghesti⁴, Emerson Léo Schultz⁵, Itânia Pinheiro Soares⁶

Resumo

Catalisadores à base de óxidos mistos de cobalto (Co), níquel (Ni) e alumínio (Al) foram avaliados no processo de reforma seca de biogás. Os óxidos mistos foram preparados por coprecipitação, seguida pelas etapas de filtração, lavagem, secagem e calcinação. Foram utilizados os teores de cobalto de 0%, 5%, 10% e 15%. Todos os catalisadores sofreram desativação ao longo do tempo, e os catalisadores Ni-Al e 15Co-Ni-Al desativaram com 30 minutos de reação. A conversão inicial de metano (CH₄) foi de 78,4% e 90,9% para os óxidos com 5% e 10% de cobalto, respectivamente, ocorrendo redução significativa da conversão ao longo das 24 horas de reação. A conversão inicial de dióxido de carbono (CO₂) foi maior que a de CH₄, em virtude da ocorrência da reação reversa de deslocamento. Por isso, a razão H₂/CO foi menor que 1. Os resultados mostram que óxidos mistos Co-Ni-Al possuem potencial para aplicação na reforma seca de biogás, mas ajustes na formulação desses catalisadores se fazem necessários para aumentar a conversão e diminuir a sua desativação, tais como a adição de outros metais.

Palavras-chave: catalisadores. biogás. óxidos mistos.

Introdução

O biogás é obtido pela digestão anaeróbia de efluentes industriais, dejetos de animais e lodo de esgoto, constituído principalmente por metano (CH₄) e dióxido de carbono (CO₂). O processo é realizado em equipamentos conhecidos como biodigestores. O CH₄ é um gás combustível e por isso o biogás é muito usado para geração de energia. No entanto, o biogás possui potencial para geração de produtos de maior valor agregado pela sua conversão em gás de síntese por processos de reforma. Esses processos incluem a reforma a vapor, a reforma seca, a oxidação parcial e a reforma autotérmica (SAIMURA et al., 2017; LUNEAU et al., 2017). O gás de síntese é uma mistura de monóxido de carbono (CO) e hidrogênio (H₂) que possui diversas

¹ Engenharia de energia, mestranda em Materiais de Integridade da Engenharia, Universidade de Brasília, jessica.souza.unb@gmail.com.

² Engenheiro químico, doutorando em Engenharia Química pela Universidade Federal do Rio de Janeiro, andremarinho.eq@gmail.com.br

³ Engenheiro químico, doutor em Engenharia Química pela Universidade Federal do Rio de Janeiro, fabio.bellot@int.gov.br

⁴ Química, doutora em Química, Universidade de Brasília, grace@unb.br

⁵ Engenheiro químico, doutor em Engenharia química pela Universidade Federal de Santa Catarina, emerson.schultz@embrapa.br

⁶ Química, doutora em Química pela Universidade Federal de Minas Gerais, itania.soares@embrapa.br

aplicações, como a produção de metanol, hidrogênio e hidrocarbonetos via síntese de Fischer-Tropsch (YANG et al., 2014; OLAH et al., 2013; SPATH; DAYTON, 2003). Além disso, o uso do gás de síntese em células a combustível também vem sendo estudado. Catalisadores à base de níquel, como $\text{Ni}/\text{Al}_2\text{O}_3$, são os mais empregados na reforma a vapor de metano, devido ao baixo custo e maior disponibilidade (SON et al., 2013). Cobalto é outro metal ativo para reações de reforma de metano, sendo que Co suportado em MgO apresenta considerável atividade para reforma seca de metano (RUCKENSTEIN; WANG, 2000; OMATA et al., 2004; BUDIMAN et al., 2012). Neste trabalho, catalisadores de Ni-Al e Co-Ni-Al foram preparados e usados na reforma seca de biogás.

Materiais e Métodos

Preparo dos Catalisadores

Hidróxidos duplos lamelares de Ni-Al e Co-Ni-Al foram preparados pelo método da coprecipitação. Foi utilizada razão $M^{3+}/(M^{2+} + M^{3+})$ igual a 0,25 e teores de cobalto de 0%, 5%, 10% e 15%. Hidróxido de sódio foi usado como agente precipitante.

Foram preparadas duas soluções: Solução A contendo nitrato de cobalto hexahidratado ($\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$), nitrato de níquel hexahidratado ($\text{Ni}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ - VETEC) e nitrato de alumínio nonahidratado ($\text{Al}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ - Fluka Analytical), e a solução B contendo hidróxido de sódio (NaOH - VETEC) e carbonato de sódio anidro (Na_2CO_3 - VETEC).

A solução A foi inserida numa bureta e adicionada à solução B em aproximadamente 2 mL min^{-1} , sob agitação de 750 rpm a 30°C . Após a adição, a mistura continuou sob agitação por 30 minutos e posteriormente mantida em repouso por 21 horas. A suspensão obtida foi filtrada a vácuo e lavada para remover os íons Na^+ . Por fim, o sólido foi seco em estufa, a 110°C por 18 horas, e moído e peneirado com granulometria $<0,425 \text{ mm}$.

A calcinação da amostra foi realizada em mufla com a seguinte programação:

- Aquecimento da temperatura ambiente até 150°C , a uma taxa de 5°C min^{-1} , mantendo essa temperatura por 1 hora.
- Aquecimento de 150°C até 300°C , a uma taxa de $10^\circ\text{C min}^{-1}$, mantendo essa temperatura por 1 hora.
- Aquecimento de 300°C até 750°C , a uma taxa de $10^\circ\text{C min}^{-1}$, mantendo essa temperatura por 2 horas.

Caracterização dos Catalisadores

A composição química dos catalisadores foi determinada por meio de um espectrômetro da marca Shimadzu, modelo EDX-720, o qual assiste à faixa de elementos do sódio ($_{11}\text{Na}$) ao urânio ($_{92}\text{U}$), com tubos de raios X com alvo de ródio.

Análises termogravimétricas dos catalisadores após a reação de reforma seca de metano foram realizadas em um equipamento TA Instruments (SDT Q600). O procedimento consiste no aquecimento de 10 mg de amostra sob fluxo de ar da temperatura ambiente até 1000°C , com taxa de aquecimento de $20^\circ\text{C min}^{-1}$, monitorando a variação de massa.

Testes Catalíticos

Os testes catalíticos foram realizados na temperatura de 800 °C e pressão atmosférica, utilizando um reator de quartzo. A massa de catalisador utilizada nos experimentos foi de 20 mg, diluída em 30 mg de carvão de silício, evitando a formação de pontos quentes no leito catalítico.

Primeiramente, as amostras foram reduzidas in-situ da temperatura ambiente até 750 °C, sob taxa de 10 °C min⁻¹ e fluxo de 30 mL min⁻¹ de H₂, permanecendo nessa temperatura por 1 hora. Após o processo de redução ocorreu a purga do sistema por 30 minutos sob fluxo de N₂ (30 mL min⁻¹).

A mistura reacional foi composta por 50 mL min⁻¹ de CH₄ e 50 mL min⁻¹ de CO₂, totalizando 100 mL/min e razão molar CH₄/CO₂ igual a 1,0. O gás produzido no reator foi analisado em linha, utilizando um cromatógrafo Agilent 6890A, equipado com detector de condutividade térmica (TCD) e uma coluna Carboxen 1010 (Supelco).

A conversão dos reagentes (X_R) e a distribuição dos produtos (S_P) foram calculadas a partir das equações 1 e 2, respectivamente, sendo n_{Ri} o número de mols do reagente R na entrada do reator, n_{Rf} o número de mols do reagente R na saída do reator, n_p o número de mols do produto P formado e n_{total} a soma do número de mols dos produtos formados em base seca.

Resultados e Discussão

A composição química dos óxidos mistos com diferentes teores de Co está apresentada na Tabela 1. Os resultados de fluorescência de raios X mostram que os teores de Co estiveram um pouco abaixo dos valores nominais (Co: 5, 10, 15%).

A conversão inicial de metano e dióxido de carbono, bem como a razão H₂/CO, para os quatro catalisadores estudados, é apresentada na Tabela 2.

Tabela 1. Composição química dos catalisadores.

Amostra	Composição Química			
	Co	Al ₂ O ₃	Ni	Al/(Al+Co+Ni)
NiAl	0	14,4	66,5	0,20
5CoNiAl	4,1	14,5	62,6	0,21
10CoNiAl	8,3	15,0	57,5	0,23
15CoNiAl	12,3	14,5	53,2	0,24

Tabela 2. Conversão inicial de metano, dióxido de carbono e razão inicial de H₂/CO

Catalisador	Conversão CH ₄ (%)	Conversão CO ₂ (%)	Razão H ₂ /CO
NiAl	83,3	84,6	0,95
5CoNiAl	78,4	81,3	0,94
10CoNiAl	90,9	92,5	0,97
15CoNiAl	95,0	95,1	0,98

Considerando os dados apresentados, poderíamos julgar que os catalisadores com 10% e 15% de cobalto seriam os mais promissores para a reforma. No entanto, esse perfil sofreu variação ao longo das 24 horas de monitoramento da reação. Os catalisadores Ni-Al e 15CoNiAl desativaram em 30 minutos de reação, ocorrendo bloqueio do leito catalítico.

Na Figura 1, são mostrados os dados da conversão de metano e dióxido de carbono e a seletividade para hidrogênio e monóxido de carbono durante a reforma seca do metano, utilizando os catalisadores com 5% e 10% de cobalto.

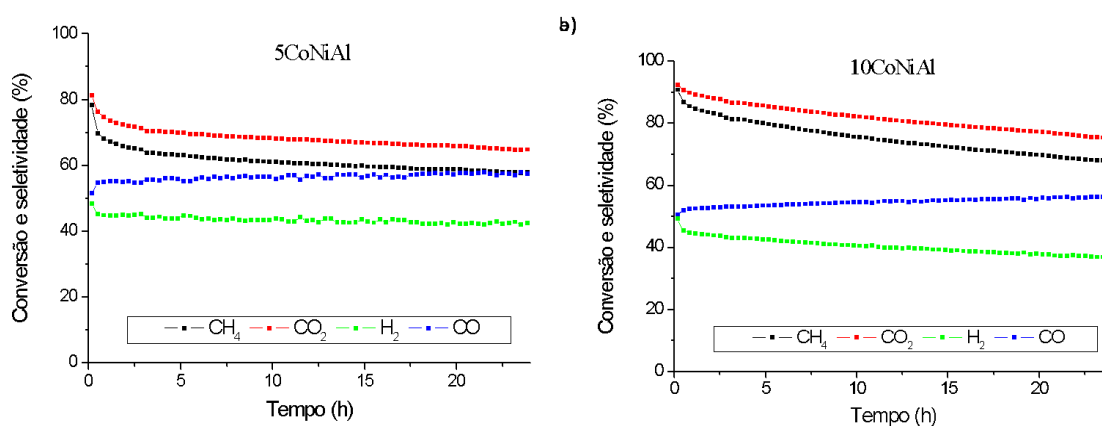


Figura 1. Conversão de metano e dióxido de carbono e seletividade de hidrogênio e monóxido de carbono obtidos na reforma seca do metano para os catalisadores a) 5CoNiAl e b) 10CoNiAl ($T = 800\text{ }^{\circ}\text{C}$, Razão $\text{CH}_4/\text{CO}_2 = 1,0$).

O aumento do teor de 5% para 10% de cobalto favoreceu o aumento da conversão inicial de reagentes, entretanto o mesmo perfil de desativação ao longo das 24 horas de reação é observado para ambos catalisadores. A razão H_2/CO decaiu conforme o catalisador foi desativando ao longo do teste de estabilidade. A conversão do CO_2 foi maior que a do metano, indicando a presença da reação reversa de deslocamento.

A Figura 2 apresenta as curvas de variação de massa em função da temperatura da análise termogravimétrica (TGA) e a termogravimetria derivada (DTG) dos resíduos de reação. Foram identificados picos de oxidação em torno de $560\text{ }^{\circ}\text{C}$ (cerca de 830 K), associados a espécies mais estáveis de carbono, como carbono grafítico ou nanotubos de carbono de parede múltipla (KITIYANAN et al., 2000). A Tabela 3 mostra a quantidade de carbono formada ao longo da reação para os catalisadores 5CoNiAl e 10CoNiAl.

Tabela 3. Quantidade de carbono formada (determinada por meio das análises de ATG), após a reforma seca do metano a $800\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Amostras	Taxa de formação de carbono ($\text{mgC}\cdot\text{g}_{\text{cat}}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$)
5CoNiAl	56,4
10CoNiAl	55,6

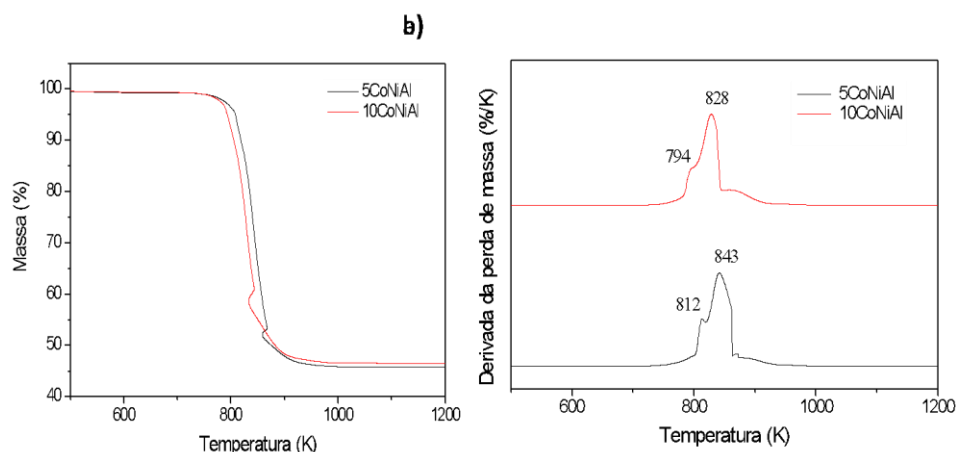


Figura 2. Curvas dos resíduos de reação a) ATG b) DTG.

Observa-se na Tabela 3 que os catalisadores, com 5% e 10% de cobalto apresentaram uma decomposição de carbono próxima, indicando, assim, que a desativação deve ocorrer na mesma magnitude.

Considerações Finais

A conversão inicial de metano foi de 78,4% e 90,9% para os óxidos mistos com 5% e 10% de cobalto, respectivamente. A conversão de CH_4 para esses catalisadores diminuiu durante as 24 h de reação, em decorrência da desativação dos catalisadores, provavelmente pela deposição de carbono, que apresentaram uma taxa de formação de carbono da ordem de $56 \text{ mgC g}_{\text{cat}}^{-1} \text{ h}^{-1}$. A conversão inicial de CO_2 foi maior que a de CH_4 , em virtude da ocorrência da reação reversa de deslocamento, resultando em uma razão H_2/CO menor que 1. Os catalisadores Ni-Al e 15CoNiAl desativaram em 30 minutos de reação, ocorrendo o bloqueio do leito catalítico. Os resultados indicam que ajustes na formulação dos óxidos mistos Co-Ni-Al devem ser realizados para torná-los mais ativos para reforma seca de biogás e diminuir a deposição de carbono, tais como a adição de outros metais.

Agradecimentos

À Embrapa e Itaipu – Projeto Tecnologias para produção e uso de biogás e fertilizantes a partir do tratamento de dejetos animais no âmbito do plano ABC (BiogasFert, Cod SEG 02.12.08.004.00.00).

Referências

BUDIMAN, A. W.; SONG, S.-H.; CHANG, T.-S.; SHIN, C.-H.; CHOI, M.-J. Dry reforming of methane over cobalt catalysts: a literature review of catalyst development. **Catalysis Surveys from Asia**, v. 16, n. 4, p. 183-197, 2012.

KITIYANAN, B.; ALVAREZ, W. E.; HARWELL, J. H.; RESASCO, D. E. Controlled production of single-wall carbon nanotubes by catalytic decomposition of CO on bimetallic Co-Mo catalysts. **Chemical Physics Letters**, v. 317, n. 3-5, p. 497-503, 2000.

LUNEAU, M.; GIANOTTI, E.; MEUNIER, F. C.; MIRODATOS, C.; PUZENET, E.; SCHUURMAN, Y.; GUILHAUME, N. Deactivation mechanism of Ni supported on Mg-Al spinel during autothermal reforming of model biogas. **Applied Catalysis B: Environmental**, v. 203, p. 289-299, 2017.

OLAH, G. A.; GOEPPERT, A.; CZAUN, M.; PRAKASH, G. K. S. Bi-reforming of methane from any source with steam and carbon dioxide exclusively to metgas (CO+2H₂) for methanol and hydrocarbon synthesis. **Journal of the American Chemical Society**, v. 135, n. 2, p. 648-650, 2013.

OMATA, K.; NUKUI, N.; HOTTAIS, T.; YAMADA, M. Cobalt-magnesia catalyst by oxalate co-precipitation method for dry reforming of methane under pressure. **Catalysis Communications**, v. 5, n. 2, p. 771-775, 2004.

SAIMURA, A.; SHIRATORI, Y.; KITAOKA, T. Dual-layered paper-structured catalysts for sequential desulfurization and methane-steam reforming of simulated biogas containing hydrogen sulfide. **Journal of Materials Science**, v. 52, n. 1, p. 314-325, 2017.

SON, I. H.; LEE, S. J.; SOON, A.; ROH, H.-S.; LEE, H. Steam treatment on Ni/ γ -Al₂O₃ for enhanced carbon resistance in combined steam and carbon dioxide reforming of methane. **Applied Catalysis B: Environmental**, v. 134-135, p. 103-109, 2013.

SPATH, P. L.; DAYTON, D. C. **Preliminary screening: technical and economic assessment of synthesis gas to fuels and chemicals with emphasis on the potential for biomass-derived syngas**. Golden: National Renewable Energy Laboratory, 2003. Disponível em: <<http://www.nrel.gov/docs/fy04osti/34929.pdf>>. Acesso em: abr. 2014.

RUCKENSTEIN, E.; WANG, H. Y. Effect of calcination conditions on the species formed and reduction behavior of the cobalt-magnesia catalysts. **Catalysis Letters**, v. 70, n. 1-2, p. 15-21, 2000.

YANG, L.; GE, X.; WAN, C.; YU, F.; LI, Y. Progress and perspectives in converting biogas to transportation fuels. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 40, p. 1133-1152, 2014.

Estudo da vida útil das fibras da prensagem de dendê (*Elaeis guineensis* Jacq.)

Marina Borges Guimarães¹, Paula Andrea Osorio Carmona², Débora Lo Sciuto³, Márcio Waluce P. R. de Santana⁴, Marcos Enê Chaves Oliveira⁵, Félix Gonçalves de Siqueira⁶, Simone Mendonça⁷

Resumo

O óleo de palma possui importância econômica relevante para as indústrias alimentícia, cosmética, farmacêutica e de biocombustíveis. Conforme a Organisation for Economic Co-Operation and Development (2015), na última década a produção mundial superou a de outros óleos vegetais, com um aumento do consumo global de 17,7 milhões de toneladas em 1997, para 52,1 milhões de toneladas em 2012, tornando-se o óleo mais consumido no mundo (EUROPEAN PALM OIL ALLIANCE, 2016). Durante sua produção, são gerados diversos resíduos, dentre os quais se destacam as fibras da prensagem normalmente queimadas em caldeiras para a geração de energia. Essas fibras contêm mais de 8% de óleo residual, que pode ser utilizado como fonte de β -caroteno, um pigmento lipossolúvel, precursor da vitamina A, que possui atividade antioxidante e ampla aplicação industrial. Entretanto, para que suas propriedades sejam mantidas, é importante que não se oxide durante o armazenamento da matéria-prima ou a extração do óleo. Este trabalho objetivou avaliar a vida útil das fibras, em função de fatores que afetam a qualidade do β -caroteno. Estudaram-se ao longo de seis semanas os efeitos da temperatura (25 e 40 °C) e da luz (incidência/ausência) sobre a concentração de carotenoides, a estabilidade oxidativa e a qualidade do óleo extraído. Independentemente do tempo de estocagem, os óleos extraídos das fibras armazenadas nas diferentes condições apresentaram alta acidez. A diminuição do teor de óleo no tempo pode indicar atividade metabólica de microrganismos, como fungos filamentosos, que puderam ser observados a olho nú. Esses microrganismos aparentemente favoreceram a produção de carotenoides a 25 °C na presença ou ausência de luz.

Palavras-chave: óleo de palma, fibras da prensagem do mesocarpo do fruto, β -caroteno.

¹ Farmacêutica, bolsista da Embrapa Agroenergia, marina.borges@colaborador.embrapa.br

² Engenheira de Alimentos, doutora em Agronomia, pós-doutoranda da Embrapa Agroenergia, paula.carmona@colaborador.embrapa.br

³ Bióloga, bolsista da Embrapa Agroenergia, debora.sciuto@colaborador.embrapa.br

⁴ Biotecnólogo, mestrando em Biociências, Universidade Federal da Bahia, marcio_waluce@hotmail.com

⁵ Engenheiro Químico, doutor em Engenharia Mecânica, pesquisador da Embrapa Amazônia Oriental, marcos-ene.oliveira@embrapa.br

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

⁷ Farmacêutica, doutora em Saúde Pública, pesquisadora da Embrapa Agroenergia, simone.mendonca@embrapa.br

Introdução

A palma de óleo (*Elaeis guineensis* Jacq.) ou dendezeiro, como é chamado no Brasil, é cultivado em mais de 45 países e sua área de plantio cobre aproximadamente 18,7 milhões de hectares (cerca de 10,2% de toda a área cultivada do mundo) (FAO, 2017). Dois tipos de óleo podem ser extraídos do processamento dos frutos do dendezeiro: o óleo de palma bruto, a partir do mesocarpo dos frutos e o óleo de palmiste, obtido do endosperma das sementes. Os óleos de palma e palmiste somam apenas 10% do dendezeiro, sendo os 90% restante basicamente constituído por biomassas residuais (torta de palmiste, engaços, fibras da prensagem do mesocarpo, cascas e efluentes líquidos). Apenas cerca de 20% dos resíduos da cultura do dendê são comercialmente empregados (OFORI-BOATENG; LEE, 2013). Em virtude do crescimento da área de cultivo da palma de óleo, a indústria vem gerando grandes quantidades de resíduos, estimadas em 184 milhões de toneladas anualmente em todo o planeta (VAKILI et al., 2015). Apenas uma pequena parte desses resíduos (fibras da prensagem, engaços e cascas) é utilizada como fonte de combustível em caldeiras para geração de bioeletricidade e vapor nas indústrias de óleo de palma, porém, a maior parte é geralmente vertida em áreas abertas ou incinerada, gerando gases nocivos para a atmosfera. Entretanto, o emprego desses resíduos como fonte de combustível nas indústrias pode não ser econômico devido à quantidade de energia necessária para queimá-los. Por outro lado, os resíduos da dendecultura podem ser aproveitados para a obtenção de produtos de maior valor agregado (por exemplo, os fitoquímicos), além de nutrientes usados como aditivos em alimentos para melhorar a saúde pública (OFORI-BOATENG; LEE, 2013).

A fibra de prensagem do mesocarpo é um resíduo de destaque e representa aproximadamente 12% do cacho processado e contém entre 8% e 18% de óleo cru residual (em base seca). O óleo extraído a partir das fibras de prensagem é uma rica fonte de carotenoides (4.000 ppm – 6.000 ppm), sendo que α - e β -caroteno perfazem 90% do total. Esses carotenoides possuem atividade pró-vitamina A (CADENAS-TORO et al., 2014). Como as fibras de prensagem do mesocarpo geradas pela indústria de óleo de palma não são armazenadas em condições controladas, e também devido à escassez de dados na literatura, o presente estudo teve como objetivo investigar fatores físicos que podem interferir na concentração dos carotenoides e na qualidade do óleo residual extraído a partir dessas fibras. As condições de armazenamento foram incidência ou ausência de luz, temperatura e período de armazenamento e os parâmetros de qualidade considerados foram teor de carotenoides, estabilidade oxidativa (índice de substâncias reativas ao ácido 2-tiobarbitúrico - TBARS) e acidez, simulando condições de estocagem que podem ser encontradas na indústria de óleo de palma.

Materiais e Métodos

As fibras de prensagem do mesocarpo do fruto de dendê (FPM) Tenera (*Elaeis guineensis* Jacq.) foram coletadas no dia 21/02/2017 na Empresa Marborges (Moju-PA), na saída do processo e congeladas no mesmo dia na Embrapa Amazônia Oriental (Belém, PA). Foram recebidas congeladas no dia 06/03/2017 na Embrapa Agroenergia (Brasília, DF). Após a recepção, as fibras foram acondicionadas em sacos plásticos transparentes, e parte delas foi recoberta com folhas de alumínio (para simular as

condições de armazenamento expostas ou protegidas contra a luz, respectivamente) e armazenadas em incubadoras tipo BOD a 25 °C ou 40°C contendo soluções saturadas de NaCl a fim de criar ambientes com umidades relativas de 74,3%. Amostras de FPMs de cada condição de armazenamento foram retiradas a cada 7 dias, durante um período de 42 dias, para as análises de qualidade. As FPMs correspondentes a cada tempo de estudo foram secas em estufa com circulação e renovação de ar por 24 h a 65 °C e posteriormente moídas em moinho de facas tipo Willye (STAR FT-60, Fortinox). Os óleos das FPMs foram extraídos em extrator por solvente acelerado (ASE-350, Dionex) com éter de petróleo a 70 °C e analisados quanto ao teor de ácidos graxos livres e índice de TBARS, determinados pelos métodos da American Oil Chemists' Society (AOCS methods ..., 2005) Cd 3d-63 e Cd 19-90, respectivamente.

Os carotenoides totais foram extraídos do óleo com acetona (ACHIR et al., 2010) acrescida de BHT (0,1% m/v) (RIVERA; CANELA, 2012) e quantificados por meio de curva padrão de β -caroteno em acetona, com leitura espectrofotométrica a 450 nm. O teor de extrato etéreo das FPMs foi determinado em equipamento tipo Ankon (AOCS methods ..., 2005) (método Am 5-04). Foi utilizado um delineamento inteiramente ao acaso, em esquema de fatorial, com 3 repetições. Foram avaliados os efeitos da temperatura (25 °C e 40 °C), da luz (incidência/ausência) e do tempo de armazenamento (tempo zero e 7, 14, 21, 28, 35 e 42 dias) das FPMs. Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias agrupadas pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade, utilizando-se o software SISVAR 5.6.

Resultados e Discussão

A comparação dos resultados das FPMs nas diferentes condições de estocagem, considerando luz, temperatura, foi estatisticamente significativa para todas as variáveis analisadas com $p < 0,05$ (Tabela 1), indicadas pelas letras maiúsculas (fixando-se condições de luz e temperatura), minúsculas (para comparar níveis de luz) e gregas (fixando-se fatores de luz e tempo).

Na estocagem das FPMs, a 25 °C, houve aumento na concentração de carotenoides totais na última semana de armazenamento, com relação ao tempo zero, independentemente da exposição ou da proteção das fibras contra a luz (Tabela 1). Para as FPMs armazenadas na ausência de luz, o teor de carotenoides foi superior apenas na sexta semana. Já na presença de luz, foi verificado um aumento significativo na concentração desses compostos a partir da quarta semana de armazenamento, atingindo valores máximos durante a quinta e a sexta semana de estocagem (5.674 $\mu\text{g/g}$ e 5.305 $\mu\text{g/g}$ de óleo, respectivamente). Entretanto, os carotenoides totais foram equivalentes na última semana de estudo para as duas condições de armazenamento (5.305 $\mu\text{g/g}$ e 5.196 $\mu\text{g/g}$ de óleo na presença e ausência de luz, respectivamente).

O aumento constatado no teor de carotenoides do óleo extraído das fibras armazenadas a 25 °C pode estar relacionado com a produção desses compostos pelos microrganismos observados a olho nu (fungos filamentosos) nas FPMs durante o tempo de experimentação. Vale destacar que a escolha da temperatura (25 °C e 40 °C) e da umidade relativa (74,3%) para conduzir o experimento foi realizada buscando simular as condições de estocagem das FPMs observadas nas agroindústrias processadoras de óleo de palma. Esse ambiente pode favorecer o crescimento de fungos filamentosos, por exemplo, que podem se desenvolver em biomassas vegetais com altas atividades de água. As FPMs chegaram da Agroindústria (Moju, PA) até o

laboratório (LQB – Embrapa Agroenergia, Brasília, DF) por meio de transporte terrestre (caminhão-refrigerado) e foram armazenadas conforme recebidas, ou seja, sem passar por processo de esterilização (autoclavagem). Desse modo, acredita-se que a flora microbiana (bactérias, fungos, leveduras, cultiváveis ou não) presente desde o processamento dos frutos até a geração das FPMs (após prensagem dos frutos para a extração do óleo), além do traslado, possa ter influenciado nos resultados da concentração de carotenoides totais observados. Também, é provável que alguns grupos de microrganismos, principalmente fungos filamentosos, tenham sido favorecidos pelas condições físicas de armazenamento testadas neste trabalho. Dentre os fungos filamentosos produtores de β -caroteno podem ser citados *Blakeslea trispora* e *Phycomyces blakesleenus*, que também geralmente produzem utiquinonas, ergosterol, ácidos orgânicos e outros carotenoides como licopeno, γ -caroteno e fitoeno.

Outros fungos filamentosos pertencentes aos gêneros *Monascus*, *Paecilomyces*, *Aspergillus* e *Penicillium*, também se destacam por produzir pigmentos em quantidades elevadas, que são aplicados na indústria de alimentos, por exemplo (DUFOSSÉ, 2006). Na Embrapa Agroenergia, alguns fungos filamentosos presentes nas FPMs já foram isolados (22 espécies diferentes) e identificados por técnicas de biologia molecular em um estudo semelhante ao descrito neste trabalho. Dentre eles, podem se citar os fungos *Aspergillus oryzae* e *Aspergillus flavus*, nas fibras armazenadas a 25 °C, na presença de luz (dados não publicados). Essas espécies são capazes de sintetizar pigmentos avermelhados (JOSHI et al., 2003; ASSANTE et al., 1981), entretanto também podem ser produtoras aflatoxinas. Nas FPMs mantidas a 40 °C, na presença de luz, foi observado incremento expressivo no teor de carotenoides nas duas primeiras semanas de armazenamento, com relação ao tempo zero. Após esse período, verificou-se um decréscimo na concentração desses compostos, que se manteve constante até a última semana de estocagem.

Já nas FPMs mantidas protegidas contra a luz a 40 °C, o conteúdo de carotenoides diminuiu significativamente na quarta, quinta e sexta semana de armazenamento. Independentemente da exposição ou da proteção das fibras contra a luz, a partir da terceira semana de estocagem, a concentração de carotenoides sempre foi inferior nas fibras mantidas a 40 °C com relação às conservadas a 25 °C, sendo a queda mais acentuada nas fibras armazenadas na ausência de luz. Tal resultado pode estar associado com a sensibilidade dos carotenoides ao calor.

O teor de extrato etéreo (lipídios totais) das FPMs diminuiu ao longo das semanas independentemente das condições de armazenamento (Tabela 1), indicando atividade metabólica de microrganismos, tais como os fungos filamentosos, já mencionados anteriormente. As FPMs mantidas a 25 °C, na presença de luz, apresentaram a queda mais acentuada e, paralelamente, o maior teor de carotenoides totais, corroborando com possibilidade do aumento desses pigmentos ocorrer devido à biossíntese de metabólitos secundários produzidos por microrganismos.

Fixando-se os níveis do tempo de armazenamento, a 25 °C, o índice de TBARS do óleo foi equivalente independentemente da exposição ou da proteção das FPMs contra a luz durante as três primeiras semanas de estocagem (Tabela 1). A mesma tendência foi observada para as FPMs mantidas a 40 °C, em um determinado tempo de armazenamento. Na quarta e quinta semana de estudo, para as duas temperaturas avaliadas, foi verificado um maior índice de TBARS no óleo extraído a partir das FPMs

armazenadas na presença de luz, enquanto na sexta semana de estocagem o índice de TBARS foi equivalente. Na presença de luz, a 25 °C e 40 °C, também se verificou a formação mais rápida de produtos estáveis (produtos secundários de oxidação, substâncias reativas ao ácido 2-tiobarbitúrico), pois na sexta semana de armazenamento os valores foram equivalentes aos do tempo zero. De modo geral, a partir da terceira semana de armazenamento, as FPMs armazenadas na presença ou ausência de luz a 25 °C apresentaram óleos com índices de TBARS superiores aos verificados nas FPMs acondicionadas a 40 °C.

Tabela 1. Efeito da temperatura (25 °C e 40 °C) e da luz (incidência/ausência) sobre os teores de carotenoides, índice de acidez, extrato etéreo e TBARS ao longo de seis semanas de armazenamento da fibra de prensagem de dendê.

L	T °C	Tempo de armazenamento das fibras						
		T0	S1	S2	S3	S4	S5	S6
CAROTENOIDES TOTAIS (µg/ g de óleo)								
P	25	2.051Caα	3.308Caα	3.232Caα	3.273Caα	4.227Baα	5.674Aaα	5.305Aaα
	40	2.051Baα	3.679Aaα	3.091Aaα	2.075Bbα	2.475Bbα	1.725Bbα	2.214Bbα
A	25	2.051Baα	3.251Baα	2.817Baα	3.495Baα	3.036Baβ	3.000Baβ	5.196Aaα
	40	2.051Aaα	3.225Aaα	2.341Aaα	1.875Abα	1.283Bbβ	1.000Bbα	767,5Bbβ
EXTRATO ETÉREO (% b.s.)								
P	25	11,23Aaα	9,50Aaα	7,41Baα	6,98Baα	4,65Caβ	3,17Cbβ	3,44Caβ
	40	11,23Aaα	6,93Bbβ	5,60Baβ	6,47Baα	4,35Baβ	5,43Baα	5,24Baβ
A	25	11,23Aaα	9,14Baα	8,47Baα	6,15Caα	8,99Baα	8,06Baα	6,32Cbα
	40	11,23Aaα	9,24Aaα	8,80Aaα	7,47Baα	7,47Baα	7,32Baα	9,75Aaα
ÍNDICE DE TBARS								
P	25	0,055Baα	0,050Baα	0,075Baα	0,105Aaα	0,112Aaα	0,129Aaα	0,076Baα
	40	0,055Baα	0,067Baα	0,069Baα	0,090Aaα	0,091Aaα	0,062Bbα	0,063Baα
A	25	0,055Baα	0,063Baα	0,062Baα	0,109Aaα	0,074Baβ	0,075Baβ	0,084Baα
	40	0,055Aaα	0,064Aaα	0,072Aaα	0,079Abα	0,060Abβ	0,055Aaα	0,036Abα
ACIDEZ (%)								
P	25	12,39Caα	16,78Baα	22,47Aaα	23,77Abα	18,36Bbβ	19,70Abβ	22,12Abβ
	40	12,39Caα	15,34Caα	20,99Baα	33,06Aaα	31,97Aaα	34,18Aaα	35,25Aaα
A	25	12,39Caα	18,59Baα	24,48Baα	26,55Bbα	26,15Bbα	31,17Aaα	29,59Abα
	40	12,39Caα	17,79Baα	22,20Baα	31,58Aaα	33,99Aaα	32,37Aaα	37,34Aaα

T0, S1, S2, S3, S4, S5, S6 = tempo zero e primeira, segunda, terceira, quarta, quinta e sexta semana de armazenamento, respectivamente; P e A = fibras armazenadas na presença e na ausência de luz, respectivamente. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si, pelo teste de Scott-Knott, no nível de 5% de significância. Para a comparação do tempo de estocagem das fibras (linha), fixados os níveis dos fatores luz e temperatura, empregaram-se letras maiúsculas; para a comparação da temperatura de armazenamento das fibras (coluna), fixados os níveis dos fatores luz e tempo, utilizaram-se letras minúsculas e para a comparação dos níveis de luz (coluna), fixados os níveis dos fatores temperatura e tempo, utilizaram-se letras gregas.

Independentemente da condição de armazenamento, houve aumento do índice de acidez dos óleos ao longo do tempo (Tabela 1). A partir da terceira semana de armazenamento, as FPMs armazenadas na presença ou ausência de luz, a 40 °C, apresentaram óleos com índices de acidez mais acentuados que os observados nos óleos das FPMs conservadas a 25 °C. Por sua vez, a 40 °C não houve interferência da proteção ou exposição à luz das fibras sobre o índice de acidez dos óleos, enquanto a 25 °C, analogamente ao índice de TBARS, depois da quarta semana de

armazenamento, as fibras protegidas contra a luz propiciaram óleos com maiores índices de acidez. A acidificação mais rápida observada nos óleos extraídos das FPMs mantidas a 40 °C pode estar relacionada com a alta temperatura de armazenamento associada à alta umidade relativa do ambiente (74,3%), que favorecem o crescimento de microrganismos e a degradação do óleo. A atividade microbiana e os altos teores de umidade, que servem como fonte de moléculas de água para desencadear uma série de reações químicas indesejáveis, ocasionam a hidrólise das moléculas de triacilglicerídeos dos óleos e consequentemente o aumento do teor de ácidos graxos livres. Os óleos extraídos a partir das FPMs armazenadas nas diferentes condições, indicaram baixa qualidade, não atendendo as especificações descritas na Resolução RDC nº 270 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (2005). Esta RDC estabelece que o teor de ácidos graxos livres para óleos não refinados não deve exceder 10 mg KOH/g de óleo (5% de acidez).

Conclusões

No presente estudo, foram armazenadas as fibras resultantes da prensagem do dendê (FPMs) em diferentes condições de temperatura e luminosidade, ao longo de seis semanas, a fim de caracterizar o óleo residual. Os óleos indicaram instabilidade oxidativa e baixa qualidade em função do tempo. O índice de acidez foi o parâmetro que apresentou as mudanças mais significativas. O armazenamento das fibras a 25 °C, na presença ou ausência de luz, foi a condição que favoreceu a produção de carotenoides, como também a maior quantidade visível de fungos filamentosos, ao passo que, o armazenamento a 40 °C ocasionou um decréscimo na concentração desses compostos bioativos. Em estudos posteriores, seria interessante quantificar as densidades de bactérias, leveduras e fungos filamentosos associadas com as fibras durante o armazenamento para se ter um maior controle sobre as condições que favorecem o desenvolvimento desses microrganismos, além de identificar e avaliar quais são os microrganismos produtores de carotenoides e se são reconhecidos como seguros.

Apoio Financeiro

Embrapa Agroenergia, FINEP – Projeto DendePalm.

Referências

- ACHIR, N.; RANDRIANATOANDRO, V. A.; BOHUON, P.; LAFFARGUE, A.; AVALLONE, S. Kinetic study of β carotene and lutein degradation in oils during heat treatment. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 112, n. 3, p. 349-361, 2010.
- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (Brasil). de 22 de set. 2005. Regulamento técnico para óleos vegetais, gorduras vegetais e creme vegetal. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 23 set. 2005, p. 2134.
- AOCS methods for biodiesel feedstock quality: official methods and recommended practices of the AOCS. Urbana: AOCS Press, 2005.
- ASSANTE, G.; CAMARDA, L.; LOCCI, R.; MERLINI, L.; NASINI, G.; PAPADOPOULOS, E. Isolation and structure of red pigments from *Aspergillus flavus* and related species, grown on a differential medium. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 29, n. 4, p. 785-787, 1981.

CADENAS-TORO, F. P.; FORSTER-CARNEIRO, T.; ROSTAGNO, M. A.; PETENATE, A. J.; FILHO, F. M.; MEIRELES, M. A. A. Integrated supercritical fluid extraction and subcritical water hydrolysis for the recovery of bioactive compounds from pressed palm fiber. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 93, p. 42-48, 2014.

DUFOSSE, L. Microbial production of food grade pigments. **Food technology and Biotechnology**, v. 44, n. 3, p. 313-323, 2006.

EUROPEAN PALM OIL ALLIANCE. **El consumo de aceite de palma**. 2016. Disponível em: <<http://www.palmoilandfood.eu/es/el-consumo-de-aceite-de-palma>>. Acesso em: jun. 2017.

FAO. **FAOSTAT Statistic Database - Crops**. 2017. Disponível em: <<http://www.fao.org>>. Acesso em: jun. 2017.

JOSHI, V. K.; ATTRI, D.; BALA, A.; BHUSHAN, S. Microbial pigments. **Indian Journal of Biotechnology**, v. 2, n. 3, p. 362-369, 2003.

OFORI-BOATENG, C.; LEE, K. T. Sustainable utilization of oil palm wastes for bioactive phytochemicals for the benefit of the oil palm and nutraceutical industries. **Phytochemistry Reviews**, v. 12, n. 1, p. 173-190, 2013.

ORGANISATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT. **Semillas oleaginosas y sus productos**. 2015. Disponível em: <<http://www.fao.org/3/a-i4738s/i4738s04.pdf>>. Acesso em: jun. 2017.

RIVERA, S.; CANELA, R. Influence of sample processing on the analysis of carotenoids in maize. **Molecules**, v. 17, n. 9, p. 11255-11268, 2012.

VAKILI, M.; RAFATULLAH, M.; IBRAHIM, M. H.; SALAMATINIA, B.; GHOLAMI, Z.; ZWAIN, H. A review on composting of oil palm biomass. **Environment, Development and Sustainability**, v. 17, n. 4, p. 691-709, 2015.

Avaliação do perfil de oligossacarídeos produzidos por celulose do tipo PASC em diferentes tampões por MALDI-TOF MS

Tallyta Santos Teixeira¹, Jéssica Souza de Barros², Jéssica Kele Arruda Macêdo³, Kelly Barreto Rodrigues⁴, Léia Cecília de Lima Fávaro⁵, Félix Gonçalves de Siqueira⁶, Patricia Verardi Abdelnur⁷

Resumo

Os biocombustíveis vêm se destacando no atual cenário energético. Porém, a necessidade da desconstrução da parede celular vegetal e a obtenção de açúcares fermentescíveis da porção holocelulósica requerem processos adicionais. Nesse sentido, as hidrólises enzimáticas, que fazem uso de celulasas e hemicelulasas, têm recebido atenção quanto à utilização de enzimas acessórias, como monoxigenases líticas de polissacarídeos (LPMOs). As LPMOs são capazes de realizar clivagem oxidativa de polissacarídeos na presença de doador de elétrons, cujos produtos podem ser verificados por meio de espectrometria de massas. Esta técnica é uma ferramenta analítica capaz de identificar compostos, a partir de uma razão massa/carga (m/z). Porém, alguns fatores reacionais, como tampões de incubação, podem influenciar no perfil dos oligossacarídeos obtidos na reação enzimática entre LPMOs (enzimas) e celulose (substrato) na análise espectrométrica. Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi verificar qual o melhor tampão de incubação para o substrato celulósico PASC (*Phosphoric Acid Swollen Cellulose*) por MALDI-TOF MS (do inglês *Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization, Time-of-flight e Mass spectrometry*), a fim de otimizar o método analítico para detecção da atividade de LPMOs. Os tampões de acetato de amônio, fosfato de potássio, fosfato de sódio e fosfato-salino foram testados e apresentaram nítida influência na ionização dos oligossacarídeos. Dentre os tampões avaliados, o fosfato de potássio e fosfato-salino mostraram-se inviáveis, em virtude da possibilidade de dupla interpretação dos valores m/z detectados. Destaca-se que o fosfato de sódio seria o mais indicado, tendo em vista a maior quantidade de oligossacarídeos nativos identificados, sugerindo sua utilização em processo de hidrólise de PASC por LPMOs.

Palavras-chave: oligossacarídeos. sacarificação da biomassa lignocelulósica. monoxigenases líticas de polissacarídeos. espectrometria de massas.

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

² Farmacêutica, Universidade de Brasília, jessica_souza182@hotmail.com

³ Bióloga, doutora em Biologia Molecular, pós-doutoranda na Área de Espectrometria de massas e metabolômica, Universidade de Kentucky, macedojka@gmail.com

⁴ Bióloga, doutora em Ciências Biológicas, pesquisadora colaboradora, Embrapa Agroenergia, kellybiobarreto@gmail.com

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

⁶ Biólogo, doutor em Biologia Molecular (Enzimologia), pesquisador da Embrapa Agroenergia, Universidade Federal do Tocantins, felix.siqueira@embrapa.br

⁷ Química, doutora em Química Orgânica (Espectrometria de Massas), pesquisadora da Embrapa Agroenergia, patricia.abdelnur@embrapa.br

Introdução

Os bicomcombustíveis são fontes renováveis e sustentáveis alternativas aos combustíveis fósseis. Tal energia pode ser obtida a partir de resíduos agroindustriais e/ou florestais (NAIK et al., 2010). Porém, isso envolve processos adicionais de pré-tratamento e hidrólise da biomassa utilizada como matéria-prima (SOREK et al., 2014), o que onera o processo e, consequentemente, o produto final.

Diversos estudos vêm sendo realizados a fim de otimizar a etapa de sacarificação da biomassa lignocelulósica, por meio do emprego de enzimas como celulases e hemicelulases para desconstrução da parede celular (RYTIOJA et al., 2014). Porém, a utilização de enzimas acessórias podem auxiliar na atuação dessas glicosídeo hidrolases. Dentre as enzimas acessórias, as monoxigenases líticas de polissacarídeos (LPMOs) têm sido apontadas como promissoras para a degradação da celulose e de outros polissacarídeos (HORN et al., 2012; AGGER et al., 2014; BEESON et al., 2015).

As LPMOs clivam as ligações β -1,4 glicosídicas dos substratos, que são inacessíveis à clivagem por enzimas hidrolíticas. Tais enzimas atuam com clivagens oxidativas dependentes de oxigênio molecular e doador de elétrons (enzimático ou não enzimático) (EIBINGER et al., 2014). A redução da recalcitrância e a degradação de polissacarídeos por hidrólise enzimática são aceleradas quando se faz uso de LPMOs. Essas monoxigenases aumentam a concentração de terminais redutores e reduzem a presença de inibidores enzimáticos (VERMAAS et al., 2015), facilitando assim a ação sinérgica entre as celulases.

Ensaio enzimáticos na presença de substratos celulósicos sintéticos podem ser realizados a fim de verificar a atividade enzimática das LPMOs. Como substratos celulósicos sintéticos utilizados nesses ensaios, podem ser mencionados Avicel e PASC (*Phosphoric Acid Swollen Cellulose*) (ISACKEN et al., 2014; FORSBERG et al., 2011). O substrato PASC permite melhor atuação enzimática, em decorrência de seu prévio tratamento ácido, que facilita a formação de oligossacarídeos de menor grau de polimerização (ZHANG et al., 2009).

Além do substrato empregado nos ensaios enzimáticos de LPMOs, outros fatores devem ser considerados, tais como: doador de elétrons, temperatura, agitação, tempo e tampão de incubação. Os produtos obtidos nessas reações podem ser analisados a partir da técnica de espectrometria de massa, tendo em vista a baixa concentração dos produtos da reação e a alta sensibilidade da técnica (WESTERENG et al., 2011; BEY et al., 2013; FROMNHAGEN et al., 2015). A espectrometria é uma ferramenta analítica, que permite caracterizar moléculas, por meio da razão massa-carga (m/z) desses analitos (HARRIS, 2008). O tipo de espectrômetro de massas utilizado em uma análise depende das características da amostra (HOFFMANN; STROOBANT, 2007).

O MALDI-TOF MS (do inglês, *Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization e Time-of-flight*) é um equipamento bastante utilizado para análise de moléculas maiores, como carboidratos e proteínas. Esse equipamento emprega a ionização por MALDI e a análise de massas por tempo de voo (TOF). Os íons são então detectados e enviados a um sistema como uma razão m/z em função da intensidade, indicando assim o perfil da amostra (HOFFMANN; STROOBANT, 2007; SKOOG et al., 2010).

O método analítico com maior acurácia, ou seja, que determina o perfil dos componentes envolvidos em reações enzimáticas são de suma importância para validar a ação de uma enzima. Dessa forma, este trabalho tem como objetivo avaliar

por MALDI-TOF MS o perfil do substrato celulósico PASC, que é muito utilizado no ensaio para detecção da atividade de LPMOs, quando incubado em diferentes tampões.

Materiais e Métodos

O substrato PASC (*Phosphoric Acid Swollen Cellulose*) foi preparado conforme a metodologia descrita por Zhang et al. (2009) e Wood (1988).

Para os ensaios, preparou-se uma solução estoque de PASC de 10 mg/mL, sendo utilizado na concentração de 2 mg/mL, em um volume final de 100 µL. O substrato foi incubado com os tampões de acetato de amônio, fosfato de potássio, fosfato de sódio e fosfato-salino (*Phosphate Buffered Saline* - PBS), na concentração final de 50 mM e pH 6,0. Cada tampão foi testado individualmente, e a água foi utilizada como padrão da reação. Os ensaios foram realizados em triplicata. Tais ensaios foram homogeneizados em vórtex por 1 minuto, centrifugados a 14.000 rpm por 5 min, para obtenção do sobrenadante (que continha os oligossacarídeos solúveis), do qual foram retirados 10 µL nos tempos 0 h, 6 h, 24 h e 48 h. Estes foram incubados a 50 °C a 900 rpm até a análise do tempo seguinte.

As alíquotas do sobrenadante foram imediatamente analisadas por espectrometria de massas, conforme metodologia descrita por Rodrigues et al. (2017). As amostras foram preparadas por meio do método *two-layer*, utilizando o ácido 2,5-dihidroxibenzoico (DHB) como matriz aplicada na proporção de 3:1 (matriz-amostra), com adição de cloreto de sódio (2 mM). A análise desses produtos foi realizada em MALDI-TOF/TOF MS (*UltrafleXtreme, Bruker Daltonics*) em modo refletor positivo, adquirindo dados na faixa m/z 0 - 7000 (Full Scan) e, em seguida, de m/z 640 - 2000. Para calibração do equipamento, foi utilizado o Peptide Calibration Standard (Bruker Daltonics), que possui a mesma faixa de massa a ser analisada. Os dados de massas foram obtidos utilizando o software *flexControl* versão 3.4 (Bruker Daltonics) e processados utilizando o software *Flexanalysis* versão 3.4 (Bruker Daltonics).

Resultados e Discussão

O perfil dos oligossacarídeos provenientes do substrato celulósico PASC não se alterou no decorrer do tempo entre 0 e 48 horas de incubação a 50 °C e 900 rpm nos tampões avaliados. Assim, para avaliação da influência dos diferentes tampões, considerou os perfis dos oligossacarídeos do tempo zero, como pode ser visto na Figura 1.

Os oligossacarídeos obtidos após a reação de PASC apresentaram grau de polimerização (DP) de 6 a 10 glicoses, cuja identificação de cada íon (visualizado na Figura 1), pode ser visualizada na Tabela 1.

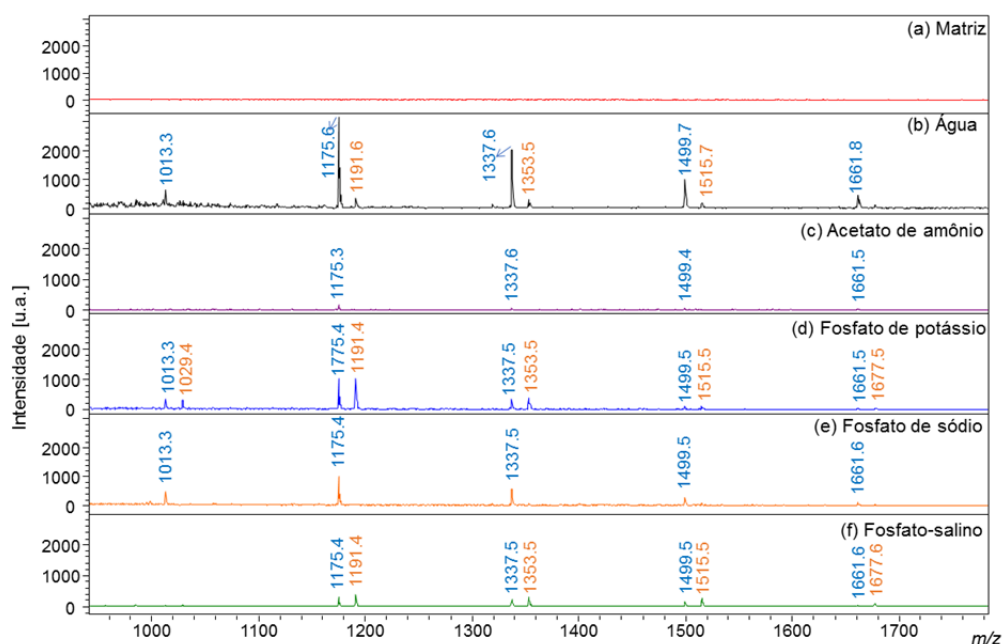


Figura 1. MALDI-(+)-TOF MS do substrato PASC nos diferentes tampões e em água. No primeiro espectro (a) pode ser visualizada a matriz (em vermelho), que é utilizada como branco da reação. Nos demais espectros, são observados o perfil do substrato PASC quando incubado em água (b) e nos tampões de: (c) acetato de amônio – em roxo, (d) fosfato de potássio – em azul, (e) fosfato de sódio – em marrom e (f) fosfato-salino – em verde. Valores m/z em azul referem-se aos oligossacarídeos nativos, com adutos de sódio, enquanto aqueles em laranja referem-se a possíveis oligossacarídeos oxidados, na forma de ácido aldônico ou ainda a adutos de potássio de oligossacarídeos nativos.

Nota-se que, ao utilizar o tampão de acetato de amônio (Figura 1c) e de fosfato de sódio (Figura 1e), os produtos detectados nas reações foram iguais aos oligossacarídeos nativos com adutos de sódio (em azul) em todos os tempos analisados. Sendo a intensidade desses sinais superior quando se empregou o tampão de fosfato de sódio (Figura 1e). Isso era esperado tendo em vista a adição de cloreto de sódio durante o preparo da amostra, além dos íons de sódio provenientes do próprio tampão de incubação (fosfato de sódio). Esses sais podem melhorar a ionização de oligossacarídeos e, por isso, são indicados para esse tipo de análise (BRUKER DALTONICS, 2015).

Ao utilizar o tampão de fosfato de potássio (Figura 1d) e fosfato-salino (PBS) (Figura 1f), foram visualizados valores m/z referentes a oligossacarídeos nativos com aduto de potássio ou a oligossacarídeos oxidados com aduto de sódio (Tabela 1). E esses valores apresentaram alta intensidade em todos os tempos de análise.

Tabela 1. Valores m/z encontrados na análise espectrométrica de PASC em diferentes tampões e suas respectivas relações com celo-oligossacarídeos (nativos e/ou oxidados) com vários graus de polimerização (DPn), detectados como adutos de sódio $[M+Na]^+$ e potássio $[M+K]^+$.

Meio de incubação (Água/Tampões)	Massa/carga (m/z) dos oligossacarídeos	Oligossacarídeos sodiado $[M+Na]^+$	Oligossacarídeos potassiado $[M+K]^+$
Água/Fosfato de Potássio/Fosfato de Sódio	1013	$[DP6 + Na]^+$	-
Fosfato de Potássio	1029	$[DP6aa + Na]^+$	$[DP6 + K]^+$
Todos	1175	$[DP7 + Na]^+$	-
Água/Fosfato de potássio/Fosfato-salino	1191	$[DP7aa + Na]^+$	$[DP7 + K]^+$
Todos	1337	$[DP8 + Na]^+$	-
Água/Fosfato de potássio/Fosfato-salino	1353	$[DP8aa + Na]^+$	$[DP8 + K]^+$
Todos	1499	$[DP9 + Na]^+$	-
Água/Fosfato de potássio/Fosfato-salino	1515	$[DP9aa + Na]^+$	$[DP9 + K]^+$
Todos	1661	$[DP10 + Na]^+$	-
Fosfato de potássio/Fosfato-salino	1677	$[DP10aa + Na]^+$	$[DP10 + K]^+$

*aa refere-se ao oligossacarídeo oxidado na forma de ácido aldônico.

(WESTERENG et al., 2011; FORSBERG et al., 2011; BEY et al., 2013; GHATGE et al., 2015)

É importante destacar que o fosfato-salino é um tampão composto pela mistura dos sais de cloreto de sódio, cloreto de potássio, fosfato de sódio dibásico e fosfato de potássio monohidratado. Como esse tampão possui tanto íons de sódio quanto de potássio, e as amostras do tampão de fosfato de potássio foram preparadas com a adição de cloreto de sódio, a dualidade na interpretação desses valores permanece. Porém, devido ao fato de esse produto estar presente neste ensaio (que é um controle nas reações enzimáticas), sugere que ele se refere a um oligossacarídeo nativo que foi detectado como aduto de potássio e não ao oligossacarídeo oxidado (produto esperado na reação com a enzima LPMO), que, por sua vez, possui mesmo valor m/z .

Destaca-se ainda que os tampões de acetato de amônio e de fosfato de sódio seriam os mais viáveis para o emprego em ensaios de atividade de LPMOs, tendo em vista que os perfis dos oligossacarídeos nesses tampões se assemelham àquele obtido quando o substrato está em água. Entre esses dois tampões, o de fosfato de sódio destacou-se por permitir detecção de mais oligossacarídeos (DP6 a DP10), quando comparado com o tampão de acetato de amônio, que, por sua vez, não detectou o DP6.

Os resultados obtidos demonstram claramente que os tampões podem influenciar na ionização dos produtos avaliados (Tabela 1), evidenciando a necessidade de estudar o perfil dos substratos empregados nos ensaios em diferentes tampões, para garantir a correta interpretação dos produtos detectados durante a análise, além de permitir uma análise mais sensível.

Considerações Finais

Foi possível notar a influência dos tampões na ionização dos oligossacarídeos. Percebeu-se que os oligossacarídeos detectados nos tampões que contêm sais de potássio (fosfato de potássio e fosfato-salino) podem referir-se tanto a oligossacarídeos nativos com adutos de potássio ou a produtos da ação enzimática de LPMOs (oligossacarídeos oxidados). Dessa forma, torna-se inviável a utilização desses tampões, bem como de outro que contenha o íon de potássio em sua composição. Isso permitirá minimizar os possíveis interferentes na detecção da atividade da enzima de interesse. Dentre os tampões avaliados, o mais indicado para ensaios enzimáticos de LPMO foi o fosfato de sódio, uma vez que identificou um maior número de oligossacarídeos nativos (DPs), com destaque para o m/z 1013, que não foi identificado pelos demais tampões.

Agradecimentos

Ao SEG (Sistema Embrapa de Gestão), pelo suporte financeiro por meio do Projeto UPZYME. À Embrapa Agroenergia e à Universidade Federal do Tocantins, pelo apoio técnico, científico e acadêmico.

Referências

- AGGER, J. W.; ISAKEN, T.; VÁRNAI, A.; VIDAL-MELGOSA, S.; WILLATS, W. G.; LUDWIG, R.; HORN, S. J.; EIJSINK, V. G.; WESTERENG, B. Discovery of LPMO activity on hemicelluloses shows the importance of oxidative processes in plant cell wall degradation. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 111, n. 17, p. 6287-6292, 2014.
- BEESON, W. T.; VU, V. V.; SPAN, E. A.; PHILLIPS, C. M.; MARLETTA, M. A. Cellulose degradation by polysaccharide monooxygenases. **Annual Review of Biochemistry**, v. 84, p. 923-946, 2015.
- BEY, M.; ZHOU, S.; POIDEVIN, L.; HENRISSAT, B.; COUTINHO, P. M.; BERRIN, J. G.; SIGOILLOT, J. C. Cello-Oligosaccharide oxidation reveals differences between two lytic polysaccharide monooxygenases (Family GH61) from *Podospora anserina*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 79, n. 2, p. 488-496, 2013.
- BRUKER DALTONICS. **Bruker guide to MALDI sample preparation**: instructions for use. 15 p. [S.l.], 2015. Revision E.
- EIBINGER, M.; GANNER, T.; BUBNER, P.; ROSKER, S.; KRACHER, D.; HALTRICH, D.; LUDWIG, R.; PLANK, H.; NIDETZKY, B. Cellulose surface degradation by lytic polysaccharide monooxygenase and its effect on cellulose hydrolytic efficiency. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 289, n. 52, p. 35929-35938, 2014.
- FORSBERG, Z.; VAAJE-KOLSTAD, G.; WESTERENG, B.; BUNÆS, A.C.; STENSTRØM Y.; MACKENZIE, A.; SØRLIE M.; HORN, S.J.; EIJSINK, V.G.H. Cleavage of cellulose by CBM33 protein. **Protein Science**, v. 20, n. 9, p. 1479-1483, 2011.
- GHATGE, S. S.; TELKE, A. A.; WAGHMODE, T. R.; LEE, Y.; LEE, K. W.; OH, D. B.; SHIN H. D.; KIM, S. W. Multifunctional cellulolytic auxiliary activity protein HcAA10-2 from *Hahella chejuensis* enhances enzymatic hydrolysis of crystalline cellulose. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 99, n. 7, p. 3041-3055, 2015.

HARRIS, D. C. Espectrometria de massas. In: HOFFMANN, E.; STROOBANT, V. **Análise química quantitativa**. 7. ed. Rio de Janeiro: LTC, 2008. p. 523-524.

HOFFMANN, E.; STROOBANT, V. **Mass spectrometry**: principles and applications. 3. ed. Chichester: Wiley, 2007.

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

ISACKEN, T.; WESTERENG, B.; AACHMANN, F. L.; AGGER, J. W.; KRACHER, D.; KITTL, R.; LUDWIG, R.; HALTRICH, D.; EIJSINK, V. G.; HORN, S. J. A C4-oxidizing lytic polysaccharide monooxygenase cleaving both cellulose and cello-oligosaccharides. **The Journal of Biology Chemistry**, v. 289, n. 5, p. 2632-2642, 2014.

NAIK, S. N.; GOUD, V. V.; ROUT, P. K.; DALAI, A. K. Production of first and second generation biofuels: a comprehensive review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 14, n. 2, p. 578-597, 2010.

RODRIGUES, K. B.; MACÊDO, J. K. A.; TEIXEIRA, T.; BARROS, J. S.; ARAÚJO, A. C. B.; SANTOS, F. P.; QUIRINO, B. F.; BRASIL, B. S. A. F.; SALUM, T. F. C.; ABDELNUR, P. V.; FÁVARO, L. C. L. Recombinant expression of *Thermobifida fusca* E7 LPMO in *Pichia pastoris* and *Escherichia coli* and their functional characterization. **Carbohydrate Research**, v. 448, p. 175-181, 2017.

RYTIOJA, J.; HILDÉN, K.; YUZON, J.; HATAKKA, A.; VRIES, R.P.; MÄKELÄ, M. R. Plant-Polysaccharide-Degrading Enzymes from Basidiomycetes. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 78, n. 4, p. 614-649, 2014.

SKOOG, D. A.; WEST, D. M.; HOLLER, F. J.; CROUCH, S. R. **Fundamentos de Química Analítica**. 8. ed. São Paulo: Cengage Learning, 2010.

SOREK, N.; YEATS, T. H.; SZEMENYEI, H. J.; YOUNGS, H.; SOMERVILLE, C. R. The implications of lignocellulosic biomass chemical composition for the production of advanced biofuels. **BioScience**, v. 64, n. 3, p. 192-201, 2014.

VERMAAS, J. V.; CROWLEY, M. F.; BECKHAM, G. T.; PAYNE, C. M. Effects of lytic polysaccharide monooxygenase oxidation on cellulose structure and binding of oxidized cellulose oligomers to cellulases. **Journal of Physical Chemistry B**, v. 119, n. 20, p. 6129-6143, 2015.

WESTERENG, B.; ISHIDA, T.; VAAJE-KOLSTAD, G.; WU, M.; EIJSINK, V. G. H.; IGARASHI, K.; SAMEJIMA, M.; STAHLBERG, J.; HORN, S. J.; SANDGREN, M. The putative endoglucanase PcGH61D from *Phanerochaete chrysosporium* is a metal-dependent oxidative enzyme that cleaves cellulose. **PloS One**, v. 6, n. 11, artigo e27807, 2011.

WOOD, T. M. Preparation of crystalline, amorphous, and dyed cellulase substrates. **Method in Enzymology**, v. 160, p. 19-25, 1988.

ZHANG, J.; ZHANG, J.; LIN, L.; CHEN, T.; ZHANG, J.; LIU, S.; LI, Z.; OUYANG, P. Dissolution of microcrystalline cellulose in phosphoric acid—molecular changes and kinetics. **Molecules**, v. 14, n. 12, p. 5027-5041, 2009.

Uso de catalisadores multifuncionais à base de Ni e Mo para a produção de diesel verde pelo processo de hidroximetilação a partir de materiais residuais da produção de biodiesel

Vannia Cristina dos Santos¹, Bruno Leite Sampaio², Gustavo Alves da Costa³,
Emerson Léo Schultz⁴, Itânia Pinheiro Soares⁵

Resumo

No processo de produção de biodiesel pelo método convencional a partir de oleaginosas, embora seja bem estabelecido, restam algumas lacunas a serem preenchidas. Uma delas é a destinação adequada dos resíduos obtidos. Uma alternativa para essa problemática pode ser a transformação desses materiais residuais em hidrocarbonetos similares ao diesel de petróleo. Para tanto, há a necessidade de se investir no *design* de catalisadores multifuncionais que possam ser eficientes nesse processo, visto que este envolve várias etapas até a formação dos hidrocarbonetos, quando se utiliza a reação de hidroximetilação (HDO). Catalisadores à base de Ni e Mo são considerados promissores, pois apresentam sítios ativos metálicos, bem como sítios ácidos. No presente trabalho, investigou-se a atividade catalítica de catalisadores à base de Ni e Mo em reações HDO e os resultados preliminares indicaram que os catalisadores foram ativos em, ao menos, uma etapa do processo.

Palavras-chave: diesel verde. níquel. hidroximetilação.

Introdução

O biodiesel tem se destacado na matriz energética nacional, como um componente renovável, diminuindo a demanda do diesel de origem fóssil, gerando emprego e renda no País, que está atualmente em segundo lugar no *ranking* mundial de produção do biocombustível. Apesar do grande sucesso do Programa de Produção e Uso do Biodiesel (PNPB), desde seu lançamento em 2004, o setor ainda tem alguns desafios a vencer para alcançar números ainda mais expressivos (AGÊNCIA NACIONAL DO PETRÓLEO, GÁS NATURAL E BIOCOMBUSTÍVEIS, 2017). Um desses desafios está relacionado a uma destinação adequada dos resíduos do processo de produção. Nas etapas de separação e purificação do biodiesel, é gerado um resíduo composto por triglicerídeos remanescentes, ésteres, ácidos graxos livres, glicerol, metanol,

¹ Química, doutora em Química, Embrapa Agroenergia, vannia.cristina@colaborador.embrapa.br.

² Farmacêutico, doutor em Ciências Farmacêuticas, Embrapa Agroenergia, bruno.leite@colaborador.embrapa.br

³ Graduando em Engenharia de Energia, Universidade de Brasília, gustavo.alves@colaborador.embrapa.br

⁴ Engenheiro Químico, doutor em Engenharia Química, Pesquisador, Embrapa Agroenergia, emerson.shultz@embrapa.br

⁵ Química, doutora em Química, Pesquisadora, Embrapa agroenergia, itania.soares@embrapa.br

catalisador e outros. Para aumentar o rendimento, esse resíduo pode ser reprocessado para produzir mais biodiesel. No entanto, acaba por causar danos aos reatores devido ao tratamento ácido (LEE; WILSON, 2015). Apesar das diversas vantagens da utilização do biodiesel, algumas desvantagens estão relacionadas ao fato de ser um combustível oxigenado e, portanto, com menor poder calorífico que o diesel e as insaturações que o tornam menos estável e sujeito a oxidação (PATTANAIK; MISRA, 2017; PEREGO; RICCI, 2012).

Sendo assim, uma alternativa para transformação dos resíduos da produção de biodiesel em biocombustíveis mais estáveis e com propriedades físico-químicas mais próximas às do diesel de petróleo pode-se dar por meio das reações de hidrodessoxigenação (HDO). Essas reações podem ser empregadas em óleos ácidos, residuais ou óleos virgens (PATTANAIK; MISRA, 2017; SUGAMI et al., 2017).

No processo descrito na Figura 1, obtém-se um combustível por meio de reações de redução de triglicerídeos por hidrogênio e também pela eliminação dos átomos de oxigênio em moléculas como H_2O , CO_2 e CO . Os produtos apresentam estrutura química idêntica aos hidrocarbonetos obtidos do petróleo, podendo atuar como um combustível alternativo que pode substituir o combustível fóssil, sem necessidade de adaptação pelo motor automotivo (MELERO et al., 2012). Além disso, o processo pode ser adaptado para a produção de outros combustíveis, como o bioquerosene (MELERO et al., 2012). Os hidrocarbonetos gerados por esse método podem ser denominados de *Green diesel* ou diesel verde.

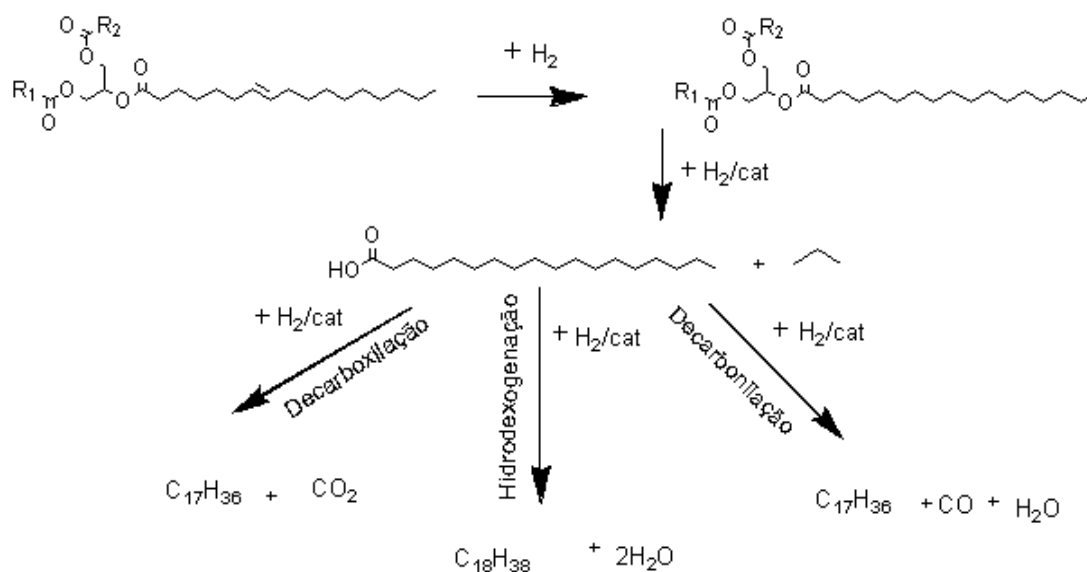


Figura 1. Esquema simplificado da transformação de um triacilglicerol em hidrocarbonetos por meio das etapas de reação de hidrodessoxigenação, decarboxilação e decarbonilação.

Para alcançar eficiência nos processos citados anteriormente, faz-se necessário o *design* de catalisadores adequados. Catalisadores heterogêneos multifuncionais são considerados os mais indicados, pois podem ser moldados de acordo com o processo de interesse, além de serem facilmente recuperados ao final do processo e reutilizados. Todos esses fatores contribuem para o desenvolvimento de um processo sustentável e ambientalmente correto.

As propriedades físico-químicas e estruturais mais importantes que devem ser levadas em consideração no *design* de catalisadores para essas reações são: acidez, porosidade, capacidade de transferência de H, bem como estabilidade térmica e química.

As reações HDO ocorrem por meio de sequência de reações de hidrogenação, desidratação, descarboxilação ou descarbonilação, ou seja, os catalisadores devem conter sítios ativos metálicos que apresentam a capacidade de transferir a molécula de hidrogênio, bem como conter sítios ácidos de Brønsted ou Lewis que possam promover as etapas de desidratação. As reações de craqueamento também ocorrem pela presença de catalisadores contendo sítios ácidos de Brønsted e Lewis (PATTAINAK; MISRA, 2017; SUGAMI et al., 2017).

Os metais mais comumente utilizados para reações de hidrogenação de C=C e C=O são: Pt, Pd, Rh, Ru e Ni (PATTAINAK; MISRA, 2017; SUGAMI et al., 2017). O níquel tem sido amplamente utilizado como catalisador, pois possui baixo custo quando comparado aos metais mais nobres. A adição de metais com características de ácidos de Lewis, como o molibdênio, tungstênio ou nióbio (KON et al., 2014) podem promover a formação de um catalisador multifuncional que pode atuar nas reações de HDO, craqueamento catalítico, bem como em outras etapas das reações de transformação da biomassa em produtos de maior valor agregado. Sendo assim, neste trabalho foi avaliado o desempenho de catalisadores à base de Ni e Mo suportados em sílica, zeólita e alumina na reação HDO para a formação de hidrocarbonetos a partir de um material residual do processamento do biodiesel. Além disso, investigou-se a influência da dispersão das espécies ativas de Ni na superfície no desempenho catalítico.

Materiais e Métodos

Materiais utilizados

Nas reações foram utilizados: ciclohexano como solvente, H₂ de 99,99% de pureza como reagente, e um resíduo do processamento de biodiesel doado por uma usina no Centro-Oeste como substrato. Utilizou-se catalisadores à base de níquel, contendo 15% e molibdênio (5%) incorporados sobre a superfície de suportes inorgânicos como a alumina (Al₂O₃), sílica mesoporosa do tipo MCM-41 e zeólita ZSM-5.

Procedimento experimental para a preparação dos catalisadores

A sílica mesoporosa do tipo MCM-41 foi preparada de acordo com metodologia conhecida (BECK et al., 1992). Inicialmente, preparou-se uma solução aquosa alcalina (NH₃ 0,2 M) de brometo de cetiltrimetilamônio como direcionador de estrutura, seguido da adição do tetraetilortosilicato como fonte de silício. Após etapa de agitação e tratamento hidrotérmico a 80 °C, o sólido resultante foi filtrado e lavado com água, seguido de secagem, sendo na sequência submetido à calcinação a 550 °C para a remoção do surfactante e formação do sólido mesoestruturado. As espécies ativas de Ni e Mo foram depositadas na superfície do suporte por impregnação aquosa com a adição do etilenoglicol levando à formação dos sólidos Ni15/MCM-41 e Ni15Mo5/MCM-4 (QIU et al., 2013; PARLETT et al., 2017). Ni15 refere-se a um teor de 15% de Ni incorporado no suporte MCM-41, e Mo5 refere-se a um teor de 5%.

Realizou-se o mesmo procedimento para os suportes de Al_2O_3 e ZSM-5 obtidos comercialmente.

Procedimento experimental para a reação HDO

Os catalisadores foram investigados na reação HDO utilizando um reator de alta pressão 450CC MetalQuim. Inicialmente, o catalisador passou por uma etapa de redução a 260 °C a uma pressão de H_2 de 8 a 20 bar, por 3 h. Após essa etapa, adicionou-se o substrato, um resíduo oriundo do processo de produção do biodiesel. Utilizou-se 10% de catalisador a 260 °C, 20 bar de H_2 durante 6 h de reação. Ao final da reação, centrifugou-se a suspensão para separar o catalisador e a solução com os produtos da reação. A fase líquida foi rotoevaporada para a remoção do solvente e o catalisador foi recuperado para posterior caracterização. Os produtos de reação foram caracterizados por CG e CG-MS. Para a determinação do perfil de ácidos graxos, as amostras foram convertidas em ésteres metílicos de ácidos graxos (FAME) e, subsequentemente, analisados por CG Shimadzu modelo CG-2010 plus, com detecção por Ionização em chama (AOCS Official Method Ce 1-62 e Ce 2-66). Os resultados são expressos em percentual relativo de ácidos graxos presentes nas amostras.

Resultados e Discussão

Inicialmente, o material residual utilizado como substrato foi caracterizado quanto ao perfil de ácidos graxos e o resultado está apresentado na Tabela 1.

Tabela 1. Perfil de ácidos graxos do material residual utilizado como substrato.

Ácido graxo	Carbonos (insaturações)	Teor (%)
Mirístico	14:0	1,5
Palmítico	16:0	17,8
Palmitoleico	16:1	1,0
Esteárico	18:0	12,1
Eláídico	18:1(cis)	1,6
Oleico	18:1(trans)	30,1
Linoleico	18:2	29,9
Linolênico	18:3	3,3

Pode-se observar que os componentes majoritários são ácidos graxos insaturados correspondentes aos ácidos oleico e linoleico. Sabe-se que a presença de um elevado número de insaturações tende a tornar as moléculas menos estáveis quimicamente, podendo provocar oxidação, degradação e polimerização do biocombustível final, causando inconvenientes se inadequadamente armazenado ou transportado. Além disso, uma acidez elevada acarreta danos nos reatores onde se produz o biodiesel. Sendo assim, essas características não são desejadas para a produção do biodiesel convencional, porém podem ser atrativas para sua transformação em hidrocarbonetos por meio do processo HDO e ser utilizado como um biocombustível similar ao diesel do petróleo.

Com relação aos catalisadores preparados, pode-se observar que o método de impregnação aquosa com a adição de etilenoglicol foi eficiente para promover a

formação de espécies de Ni em escala nanométrica, na faixa de 7 nm, de acordo com a análise de microscopia eletrônica de transmissão (resultados não apresentados) e altamente dispersos na superfície da sílica. Sabe-se que a atividade catalítica de espécies de Ni está intimamente relacionada com o tamanho das partículas e, de maneira geral, quanto menor o tamanho maior tende a ser a atividade catalítica.

De acordo com a Figura 2, pode-se observar a relação entre os componentes saturados/insaturados após a reação de HDO. Uma das primeiras etapas da reação HDO, descrita na Figura 1, está relacionada com a hidrogenação das duplas ligações presentes nos ácidos graxos. No material de partida (substrato), observa-se uma razão de aproximadamente 0,5. Após a reação, observa-se um aumento bastante significativo dessa razão para a maioria dos catalisadores testados, inferindo o aumento no teor de ácidos graxos saturados.

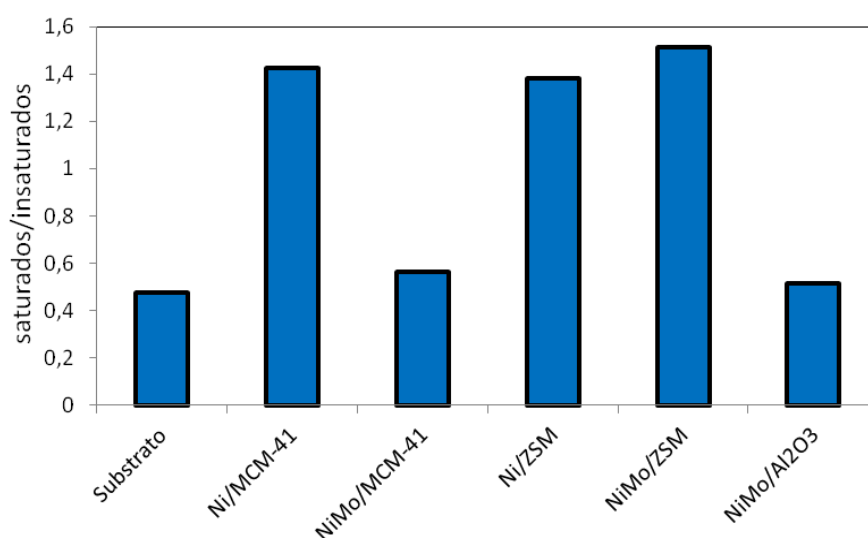


Figura 2. Relação entre o teor de ácidos graxos saturados e insaturados após a reação HDO com os catalisadores preparados.

Observa-se que os catalisadores de Ni/MCM-41 e Ni/ZSM-5 (Figura 2) foram ativos na etapa de hidrogenação. A adição de Mo no sólido de sílica NiMo/MCM-41 não apresentou um resultado significativo. No entanto, quando se utilizou um suporte com característica mais ácida como a ZSM-5 (NiMo/ZSM), observou-se uma atividade levemente superior, sugerindo que a acidez do suporte desempenha um papel importante. Além disso, pode-se confirmar a presença da mistura dos ésteres metílicos de ácidos graxos, por cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massas. Para a reação catalisada por Ni/ZSM e NiMo/ZSM, observou-se a presença de uma molécula de éster metílico de ácido graxo ramificada. Sabe-se que zeólitas são ativas em reações de isomerização. A presença de moléculas de hidrocarbonetos não pôde ser confirmada, provavelmente devido à baixa conversão. Novos experimentos utilizando condições de reação diferentes serão realizados na tentativa de promover a formação desses compostos de interesse. Além disso, os catalisadores serão caracterizados com relação a suas propriedades texturais, físicas e estruturais, por porosimetria, difratometria de raios-X, microscopia eletrônica de transmissão e espectrometria de emissão óptica, entre outras. As caracterizações serão realizadas

para a correlação das propriedades físicas e estruturais com a atividade catalítica, visto que propriedades como área superficial, porosidade, fase cristalina e tamanho de partículas podem influenciar diretamente no desempenho catalítico.

Conclusões

Os resultados da atividade catalítica na reação HDO utilizando os catalisadores à base de Ni e Mo demonstram que os catalisadores foram ativos na primeira etapa da reação HDO, por meio da hidrogenação das duplas ligações, formando ácidos graxos saturados. Acredita-se que a otimização das condições de reação, pode levar à conversão total dos materiais residuais em hidrocarbonetos similares aos do diesel de petróleo.

Agradecimentos

Este trabalho foi conduzido com financiamento do projeto DendePalm – Finep e edital Capes-Embrapa-Edital 15/2014.

Referências

- AGÊNCIA NACIONAL DO PETRÓLEO, GÁS NATURAL E BIOCOMBUSTÍVEIS (Brasil). **Biocombustíveis**. Disponível em: <<http://www.anp.gov.br/wwwanp/biocombustiveis>>. Acesso em: jun. 2017.
- BECK, J. S.; VARTULI, J. C.; ROTH, W. J.; LEONOWICZ, M. E.; KRESGE, C. T.; SCHMITT, K. D.; CHU, C. T. W.; OLSON, D. H.; SHEPPARD, E. W.; MCCULLEN, S. B.; HIGGINS, J. B.; SCHLENKER, J. L. A new family of mesoporous molecular sieves prepared with liquid crystal templates. **Journal of American Chemical Society**, v. 114, n. 27, p. 10834-10843, 1992.
- KON, K.; ONODERA, W.; TKAKUSAGI, S.; SJIMIZU, K. Hydrodeoxygenation of fatty acids and triglycerides by Pt-loaded Nb₂O₅ catalysts. **Catalysis Science & Technology**, v. 4, p. 3705-3712, 2014.
- LEE, A. F.; WILSON, K. Recent developments in heterogeneous catalysis for the sustainable production of biodiesel. **Catalysis Today**, v. 242, p. 3-18, 2015.
- MELERO, J. A.; IGLESIAS, J.; GARCIA, A. Biomass as renewable feedstock in standard refinery units. Feasibility, opportunities and challenges. **Energy and Environmental Science**, v. 5, n. 6, p. 7393-7420, 2012.
- PARLETT, C. M. A.; AYDIN, A.; DURNDELL, J. L.; FRATTINI, L.; ISAACS, M. A.; LEE, A. F.; LIU, X.; OLIVI, L.; TROFIMOVAITE, R.; WILSON, K.; WU, C. Tailored mesoporous silica supports for Ni catalysed hydrogen production from ethanol steam reforming. **Catalysis Communication**, v. 91, p. 76, 2017.
- MISRA, R. D. Effect of reaction pathway and operating parameters on the deoxygenation of vegetable oils to produce diesel range hydrocarbon fuels: a review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 73, p. 545-557, 2017.
- PEREGO, C.; RICCI, M. Diesel fuel from biomass. **Catalysis Science & Technology**, v. 2, n. 9, p. 1776-1786, 2012.
- QIU, S.; ZHANG, X.; LIU, Q.; WANG, T.; ZHANG, Q.; MA, L. A simple method to prepare highly active and dispersed Ni/MCM-41 catalysts by co-impregnation. **Catalysis Communication**, v. 42, p. 73-78, 2013.
- SUGAMI, Y.; MINAMI, E.; SAKA, S. Hydrocarbon production from coconut oil by hydrolysis coupled with hydrogenation and subsequent decarboxylation. **Fuel**, v. 197, p. 272-276, 2017.

Apoio

