



VI Encontro de
Pesquisa e Inovação da
Embrapa Agroenergia

Anais

Simone Mendonça
Thaís Fabiana Chan Salum
Editoras técnicas

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

ISSN 2595-5489



VI Encontro de
Pesquisa e Inovação da
Embrapa Agroenergia

Anais

*Simone Mendonça
Thaís Fabiana Chan Salum*
Editoras técnicas

Embrapa
Brasília, DF
2020

Embrapa Agroenergia
Parque Estação Biológica (PqEB), s/n
Ed. Embrapa Agroenergia
Caixa Postal 40315
CEP 70770-901, Brasília, DF
Fone: +55 (61) 3448-1581
Fax: +55 (61) 3448-1589
www.embrapa.br/agroenergia
www.embrapa.br/fale-conosco/sac/

Responsável pelo conteúdo e pela edição

Embrapa Agroenergia

Comitê Técnico-Científico do VI EnPI

Presidente

Thaís Fabiana Chan Salum

Membros

Adilson Kenji Kobayashi

Alexandre Nunes Cardoso

Bárbara Andrade Dias Brito da Cunha

Cesar Heraclides Behling Miranda

Dasciana de Sousa Rodrigues

Eduardo Fernandes Formighieri

Emerson Léo Schultz

Felipe Brandão de Paiva Carvalho

Félix Gonçalves de Siqueira

Itânia Pinheiro Soares

Leonardo Fonseca Valadares

Lorena Costa Garcia Calsing

Patrícia Abrão de Oliveira Molinari

Simone Mendonça

Wesley Gabriel de Oliveira Leal

Supervisão editorial

Luciane Chedid Melo Borges

Projeto gráfico e editoração eletrônica

Maria Goreti Braga dos Santos

Arte da capa

Leandro Lobo

1ª edição

Publicação digital - PDF (2020)

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 (6. : 2020 : Brasília, DF).

Anais do 6º Encontro de Pesquisa e Inovação da Embrapa Agroenergia, Brasília, DF, 24 e 25 de novembro de 2020 / Simone Mendonça, Thaís Fabiana Chan Salum, editoras técnicas. – Brasília, DF: Embrapa Agroenergia, 2020.

PDF (291 p.) – (Encontro de Pesquisa e Inovação da Embrapa Agroenergia, ISSN 2595-5489; 6)

ISSN 2595-5489

I. Agroenergia – pesquisa – inovação. II. Título. III. Série.

CDD (22 ed.) 333.79

Rejane Maria de Oliveira (CRB-1/2913)

© Embrapa, 2020

Apresentação

Há alguns anos a Embrapa Agroenergia se propôs a realizar um evento que mobilizasse os pesquisadores, analistas, técnicos, assistentes e colaboradores para discussão científica de alto nível. A ideia do grupo de idealizadores, ao qual eu tenho a grata satisfação de estar incluído, foi inicialmente organizar um evento em que os trabalhos técnico-científicos realizados pela Embrapa Agroenergia pudessem ser expostos, apresentados, debatidos e premiados. Nascia assim o Encontro de Pesquisa e Inovação, o qual passamos a chamar de EnPI. A primeira edição do evento, realizada em 2014, seguiu à risca tal ideia e contou com a apresentação e premiação de trabalhos de colaboradores de diversos níveis (graduação, pós-graduação e pós-doutorado).

O sucesso da primeira edição foi tamanho que estimulou a Unidade a seguir realizando o evento. No ano seguinte, 2015, além da apresentação de trabalhos de colaboradores, o encontro ganhou corpo e passou a contar também com um Seminário, o qual denominamos de “Agroenergia em Foco”. A inclusão do seminário na programação do EnPI objetivava estabelecer um fórum de discussões sobre temas relevantes nas áreas de Agroenergia e de Química e Tecnologia de Biomassas. O sucesso desse novo formato fez com que o Seminário passasse a fazer parte permanente da programação do EnPI, pois, além de levar informações de qualidade à sociedade, enriqueceu as discussões científicas de nossas equipes, contribuindo para o planejamento estratégico da Unidade com foco na geração de soluções tecnológicas inovadoras. A partir de sua terceira edição, em 2016, as palestras passaram a ser transmitidas ao vivo por streaming nas mídias sociais da Embrapa e da Unidade, visando ampliar o alcance do evento. Por fim, mais recentemente, passamos também a aceitar trabalhos de colaboradores vinculados a outras instituições em parceria com a Unidade. Isso nos permitiu ampliar a abrangência dos trabalhos apresentados durante o encontro e, ao mesmo tempo, fortalecer o relacionamento com nossos parceiros.

Passados 6 anos da primeira edição, chegamos a 2020 com a 6ª edição do evento. E, como não poderia deixar de ser, continuamos inovando em seu formato e em seu conteúdo. Com as restrições impostas pela pandemia da Covid-19, que infelizmente alterou significativamente o modo como trabalhamos e interagimos, lançamo-nos ao desafio de organizar nosso encontro de maneira totalmente digital, em vez de cancelarmos o evento, ou pularmos um ano em sua organização. Remodelamos, então, o formato das mesas-redondas, palestras, apresentações e da avaliação dos trabalhos. Também incluímos na programação um evento com foco em inovação e negócios, intitulado “InovAR – Diálogos de Inovação Tecnológica”, com o objetivo de prospectar demandas, discutir soluções tecnológicas e possíveis parcerias com o setor produtivo. O resultado final é um evento com formato ágil, objetivo e conciso, mas muito denso em conteúdo.

Em linha com a estratégia de atuação da Unidade, focada na geração de ativos tecnológicos e pré-tecnológicos para aumento da competitividade da bioeconomia brasileira em duas vertentes (biocombustíveis e bioprodutos), para esta edição, escolhemos como tema central do Seminário Agroenergia em Foco “Bioprodutos: agregação de valor às agroindústrias”, com ênfase especial ao desenvolvimento de

novos bioinsumos para uso na agropecuária nacional, em alinhamento com as diretrizes estabelecidas pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (Mapa), que este ano lançou o Programa Nacional de Bioinsumos.

Esperamos que todo o conteúdo deste encontro, incluindo as palestras, que ficarão disponíveis no site do evento, e os trabalhos publicados nestes Anais, sirva como fonte de informação para toda a comunidade acadêmico-científica e também como elemento de aproximação da nossa Unidade com outras instituições de pesquisa e desenvolvimento, públicas e privadas, envolvidas no desenvolvimento de tecnologias nas áreas de biocombustíveis, bioprodutos e bioinsumos.

Alexandre Alonso Alves
Chefe-Geral da Embrapa Agroenergia

O VI 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 da Chefia-adjunta de Transferência de Tecnologia (CHTT), do Comitê Local de Publicações (CLP), do Setor de Prospecção e Avaliação de Tecnologias (SPAT), do Setor de Comunicação e Marketing (SCM), do Setor de Implementação da Programação de Transferência de Tecnologia (SIPT) e do Núcleo de Tecnologia da Informação (NTI).

Objetivos

- Debater e avaliar o cenário externo à Embrapa no que diz respeito a bioinsumos e a bioprodutos, prospectando avanços e oportunidades na área de bioeconomia.
- Debater políticas públicas e novos focos de PD&I para os temas de bioinsumos e outros bioprodutos.
- Divulgar os trabalhos de PD&I desenvolvidos na Embrapa Agroenergia ou em instituições parceiras de projetos, nas áreas de Biomassa para uso industrial, Biotecnologia industrial e Química de renováveis e materiais renováveis.
- Premiar os melhores talentos nas categorias de graduandos, pós-graduandos e profissionais.

Formato

A sexta edição do Encontro, realizada em formato digital, nos dias 24 e 25 de novembro de 2020, pelo canal da Embrapa no YouTube, tem como tema central “Bioprodutos: agregação de valor às agroindústrias”, com especial ênfase em Bioinsumos, e conta com a presença de oito palestrantes convidados, externos ao quadro da Embrapa Agroenergia.

O evento deste ano está subdividido em três momentos:

- I. Simpósio Agroenergia em Foco, com o tema “Biomassa para a Bioeconomia”, composto por duas mesas-redondas que abordam os temas “Bioinsumos” e “Bioprodutos”.
- II. Sessão de divulgação dos trabalhos científicos do VI EnPI, submetidos em formato de artigo, com apresentações ao vivo em salas de reunião públicas (por meio da ferramenta Google Meet). A sessão de encerramento do evento conta com a divulgação e premiação dos melhores trabalhos de PD&I apresentados nas categorias graduandos, pós-graduandos e profissionais, com o patrocínio da Associação Brasileira de Bioinovação (ABBI).

- III. Sessão de Transferência de Tecnologia da Embrapa Agroenergia, intitulada InovAR – Diálogos de Inovação Tecnológica, com foco em materiais renováveis.

Público-alvo

O público-alvo são pesquisadores, professores, estudantes de pós-graduação e graduação envolvidos em pesquisas relacionadas à produção de Agroenergia, em especial nos temas bioeconomia, química, biotecnologia, nanotecnologia e áreas correlatas. Esta sexta edição do EnPI, totalmente on-line e gratuita, amplia seu público-alvo, possibilitando a participação de várias instituições de pesquisa e empresas em âmbito nacional, de forma a abranger profissionais e estudantes vinculados às Unidades de pesquisa da Embrapa e a universidades com as quais a Embrapa mantém parcerias formalizadas. Os setores públicos, agentes reguladores e agentes de fomento estão igualmente contemplados, uma vez que as apresentações e os debates que ocorrem durante o encontro podem servir como norteadores para a formulação de ações governamentais nos âmbitos distrital e federal.

Sumário

BIOMASSA PARA USO INDUSTRIAL

| | |
|--|----|
| Avaliação do potencial antioxidante do extrato da casca de coco (<i>Cocos nucifera</i> L.) em biodiesel | 10 |
| Caracterização de fluorescência de carbon dots visando sua aplicação no cultivo de microalgas | 15 |
| Caracterização do mercado de betacaroteno a partir da microalga <i>Dunaliella</i> sp. | 22 |
| Propriedades antimicrobianas e antioxidantes de extratos produzidos a partir de colonizados de basidiomicetos em tortas oleaginosas | 29 |
| Uso do NDVI para avaliação de <i>Saccharum</i> spp. em ensaio de tolerância à seca | 37 |
| Canola no Cerrado: performance de híbridos para incorporação no sistema de cultivo sob irrigação..... | 44 |
| Metabolômica de <i>Schizophyllum commune</i> cultivados em torta do caroço de algodão por espectrometria de massas | 49 |
| Análise patentométrica e bibliométrica de microrganismos-chave para produção de ácidos carboxílicos de relevância estratégica | 57 |
| Atividade antioxidante de extratos hidroalcoólicos obtidos de diferentes biomassas lignocelulósicas..... | 65 |
| Avaliação do perfil metabólico de extratos aquosos e hidroalcoólicos de sementes de <i>Crotalaria</i> spp. | 73 |
| Efeito de nanopartículas de carbono fluorescentes (Krill A32) no crescimento da microalga <i>Chlorella sorokiniana</i> Embrapa LBA#39..... | 81 |
| Morfotipos de novos isolados de microalgas da Coleção do Laboratório de Biotecnologia de Algas da Embrapa Agroenergia | 87 |
| Uso de concentrador solar para secagem de bagaço de cana-de-açúcar..... | 94 |

BIOTECNOLOGIA INDUSTRIAL

| | |
|---|-----|
| Análise filogenética e expressão heteróloga de uma xilose isomerase bacteriana em <i>Saccharomyces cerevisiae</i> | 101 |
| Aprimoramento de um processo enzimático para a síntese de ácido glicônico..... | 108 |
| Caracterização de Potencial Xilanase de <i>Paenibacillus</i> sp. WS30..... | 114 |
| Expressão heteróloga de uma potencial β -glicosidase de <i>Paenibacillus</i> sp..... | 120 |
| Expressão heteróloga de uma β -glicosidase de <i>Chryseobacterium</i> sp. | 126 |
| Síntese enzimática de ácido xilônico utilizando glicose oxidase | 131 |
| Análise do potencial econômico de variedade de cana geneticamente modificada para produção de açúcar | 136 |

| | |
|--|-----|
| Avaliação do tratamento de efluente da extração do óleo de dendê e potencial de produção de biogás | 144 |
| Expressão Heteróloga e Caracterização Bioquímica de Enzimas Lignocelulolíticas e Proteínas Acessórias do fungo <i>Thermomyces lanuginosus</i> em <i>Komagataella phaffii</i> | 152 |
| Interações fúngicas observadas através de imagem química por espectrometria de massas | 159 |
| Lipases de <i>Burkholderia gladioli</i> CNPAE 99 (579): caracterização do efeito de íons, surfactantes e solventes e determinação de parâmetros cinéticos | 165 |
| Simulação do processo de produção de etanol de arroz BRS AG usando Aspen Plus | 173 |
| Avaliação de estratégias de alimentação para produção de celulases por <i>Penicillium rolfsii</i> BRM052264 em biorreator | 181 |
| Desenvolvimento de método para identificação e quantificação de fito-hormônios produzidos por macro e microalgas utilizando UHPLC-MS/MS | 188 |
| Influência de diferentes fontes de carbono sobre a produção de celulases por cepas de <i>Penicillium</i> e <i>Talaromyces</i> | 195 |
| Percepção das cores com ImageJ: elaboração de um guia para análise de imagens de microrganismos produtores de corantes naturais..... | 201 |
| Produção de uma xilanase fúngica por <i>Komagataella phaffii</i> em biorreator | 209 |
| Produção heteróloga e caracterização funcional das expansinas de cana-de-açúcar SacEXP4 e SacEXP7 | 215 |
| Produção heteróloga e caracterização funcional de mono-oxigenases líticas de polissacarídeos de fungos e bactérias | 224 |
| Prospecção e produção de uma nova xilanase visando aplicação biotecnológica | 233 |
| Prospecção, seleção e identificação de bactérias produtoras de corantes | 238 |
| QUÍMICA DE RENOVÁVEIS E MATERIAIS RENOVÁVEIS | |
| Análise evolutiva dos ácidos carboxílicos de base biológica na indústria internacional | 246 |
| Desidratação do ácido láctico para obtenção de ácido acrílico..... | 254 |
| Hidrodesoxigenação de óleo de palma utilizando catalisadores à base de níquel | 261 |
| Viabilidade técnica e econômica de uso do óleo fúsel em mistura com o etanol combustível | 267 |
| Desenvolvimento de metodologia LC-MS/MS para análise de ácidos dicarboxílicos provenientes da conversão de lignina | 273 |
| Preservação de substâncias bioativas em extrato da casca da semente do algodão durante a secagem por spray-dryer com uso de agentes carreadores | 278 |
| Reforma a vapor de biogás simulado usando óxidos mistos NiMgAl, NiMgAlGd e NiMgAlPr | 285 |

The background features a vertical color gradient from dark teal at the top to light green at the bottom. Large, white, organic, blob-like shapes are scattered across the page, creating a modern, abstract aesthetic.

BIOMASSA PARA USO INDUSTRIAL

Avaliação do potencial antioxidante do extrato da casca de coco (*Cocos nucifera* L.) em biodiesel

Nicolly Luiza Moreira de Melo¹, Patrícia Abrao Oliveira Molinari², Itânia Pinheiro Soares³

Resumo

Desde a inserção do biodiesel na matriz energética nacional um dos temas frequentes nos debates é a qualidade do biocombustível. O fato se deve pela composição do biodiesel, que diferentemente do diesel de petróleo é formado por compostos oxigenados e com ligações duplas conjugadas, o que favorece os processos oxidativos. Assim, a estabilidade à oxidação é um dos parâmetros mais importantes na especificação do biodiesel. Em 2019 a Agência Nacional de Petróleo, Gás Natural e Biodiesel (ANP) publicou uma resolução que alterou de 8 para 12 horas o tempo mínimo de estabilidade no ensaio de oxidação acelerada. Para atingir esse parâmetro de qualidade, os fabricantes utilizam aditivos antioxidantes de base petroquímica que agregam custos ao produto. Dessa forma, o presente trabalho teve como objetivo avaliar o potencial antioxidante de um aditivo obtido de fonte renovável em biodiesel, pelo método de oxidação acelerada, utilizando Rancimat. Foram utilizadas duas amostras do extrato da casca de Coco (*Cocos nucifera* L.), a primeira foi preparada apenas com extração em heptano, e a segunda com extração em 80% heptano e 20% etanol. Em concentrações de 400 ppm e 730 ppm, a primeira amostra apresentou média de período de indução de 4,34 horas e 6,91 horas, respectivamente. A segunda amostra, na concentração de 2.550 ppm, apresentou média de período de indução de 8,54 horas. Ainda que os valores apresentados sejam inferiores as 12 horas mínimas estabelecidas pela norma da ANP, a atividade antioxidante do extrato em questão se mostrou bastante promissora.

Palavras-chave: biocombustíveis, oxidação, rancimat.

Introdução

Os biocombustíveis têm representado uma importante parcela na matriz energética nacional, podendo substituir parcial ou totalmente os combustíveis provenientes do petróleo, em algumas situações. Nesse cenário, o biodiesel tem se destacado como o segundo biocombustível líquido mais utilizado no Brasil (Agência Nacional de Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis, 2020), sem falar do destaque internacional, uma vez que o Brasil é o terceiro maior produtor mundial (Statista, 2020).

A inserção do biodiesel na matriz energética ocorreu em 2005, a partir do lançamento do Programa Nacional de Produção e Uso do Biodiesel (PNPB) e da lei 11.097, que, sancionada, regulamentou a comercialização do biocombustível na mistura com diesel,

¹ Graduanda em Farmácia, Universidade de Brasília, estagiária da Embrapa Agroenergia, n1mm.nicolyluiza@gmail.com

² Farmacêutica, doutora em Química, pesquisadora da Embrapa Agroenergia, patricia.oliveira@embrapa.br

³ Química, doutora em Química, pesquisadora da Embrapa Agroenergia, itania.soares@embrapa.br

em caráter autorizativo, e em 2008, em caráter compulsório. Atualmente, o percentual do biodiesel no diesel de petróleo deve seguir o cronograma preconizado na Resolução CNPE nº 16, de 29 de outubro de 2018, sendo que no ano de 2019 foi autorizada a mistura de 12% de biodiesel no diesel. A referida lei determina, ainda, que o percentual da adição deve sofrer o acréscimo de 1% até alcançar o limite máximo fixado de 15%, em 2023.

Apesar do grande sucesso do PNPB, um fator que inspira cuidados é a estabilidade do biodiesel frente aos processos de oxidação. As duplas ligações conjugadas presentes nos ésteres que formam o biodiesel favorecem esses processos. Dessa forma, um dos importantes parâmetros para a garantia da qualidade do biodiesel é a estabilidade oxidativa, que é obtida pela adição de aditivos antioxidantes, usualmente o TBHQ (Pinheiro, 2013). O limite de aditivação do biodiesel com antioxidantes é estabelecido pela Resolução ANP nº 1, de 06 de janeiro de 2014, não sendo permitidas concentrações que excedam 5.000 ppm.

Desde o início do PNPB o parâmetro de estabilidade oxidativa teve três alterações nos limites mínimos referentes ao tempo que o biodiesel aditivado deve permanecer estável. Em 2019, a exigência passou de 8 para 12 horas, por meio da Resolução ANP nº 798/2019.

Um estudo realizado por Oliveira (2012) testou a atividade antioxidante dos extratos de hortelã, alecrim, erva-mate e saburá (pólen apícula coletado pelas abelhas Jataí, *Tetragonisca angustula*) aditivados no biodiesel a 1.000 ppm. Apenas o extrato de Saburá atendeu as especificações da ANP como antioxidante, apresentando o maior período de indução da oxidação, de 11 horas. O potencial antioxidante do Saburá pode ser explicado pela sua composição rica em polifenóis, tocoferóis e flavonoides.

O trabalho de França (2014) abordou o potencial da *Moringa oleifera* (Moringaceae) como fonte antioxidante para biocombustíveis. A adição do extrato de *Moringa oleifera* ao biodiesel de soja aumentou significativamente o tempo de indução das amostras, tendo como comparativo o biodiesel sem a presença de aditivo antioxidante (biodiesel puro). Porém, apenas na concentração de 2.000 ppm o valor ficou dentro do limite especificado pela norma da ANP (6 horas, na época do estudo).

A adição de antioxidantes de base petroquímica agrega mais custos ao produto. Sendo assim, uma importante frente de pesquisa tem sido a busca por aditivos que possam reduzir os custos ao produtor e, de preferência, que possam ser obtidos de fontes renováveis.

O extrato de Coco (*Cocos nucifera* L.) é amplamente conhecido devido às suas propriedades antioxidantes, que podem ser justificadas pela presença de compostos fenólicos (Oliveira, 2015). Assim, o objetivo deste estudo foi analisar o potencial de extratos da casca de coco (*Cocos nucifera* L.), utilizando heptano e a mistura heptano/etanol como solventes de extração e análise de estabilidade oxidativa por Rancimat.

Material e Métodos

Materiais

Foram utilizados reagentes Sigma Aldrich, etanol pureza 99,8, heptano 99% e sulfato de sódio anidro 99,0%. As cascas de coco coletadas no Distrito Federal foram trituradas em

tritador de facas para coco, Trapp, modelo TRC 40. Em seguida, foram secas em estufa de ar circulante, a temperatura de 35 °C, por 3 dias.

Produção do biodiesel

O biodiesel foi produzido utilizando a razão molar álcool/biodiesel de 6:1 e 0,7% de KOH em relação à massa do óleo. A reação foi processada por um período de 60 minutos, a temperatura de 45 °C. Após o processo de lavagem, o biodiesel foi rotaevaporado, passando ainda por secagem com sulfato de sódio anidro.

Produção do extrato 80% heptano e 20% etanol

O biodiesel é solúvel em solventes orgânicos como o heptano. Porém, os solventes polares costumam extrair compostos que apresentam ação antioxidante, como os fenólicos. Por esse motivo, a mistura dos solventes etanol e heptano foi escolhida para extração de compostos na casca do coco.

Primeiramente, pesaram-se 5g de casca de coco, previamente triturada, adicionaram-se 40 mL de heptano e 10 mL de etanol. Os reagentes ficaram sob refluxo por 3 horas, à temperatura de 45 °C. A amostra foi filtrada a vácuo e em seguida rotaevaporada e concentrada, com volume final de 4 mL.

Produção do extrato 100% heptano

Pesaram-se 5g de casca de coco, previamente triturada, e em seguida foram adicionados 60 mL de heptano. Os reagentes ficaram sob refluxo por 4 horas, a temperatura de 45 °C. A amostra foi filtrada a vácuo e em seguida rotaevaporada e concentrada, com volume final de 5,74 mL.

Preparo das amostras de biodiesel com os extratos

Como continham solventes, os extratos foram adicionados em determinado volume a um béquer, e aguardou-se a evaporação do solvente; adicionou-se biodiesel; fez-se a homogeneização e calculou-se a real concentração do material.

Foram preparadas as seguintes amostras:

- 2 mL de extrato obtido pela extração com etanol/heptano e 10 g de biodiesel – concentração final 2550 ppm.
- 1 mL de extrato obtido pela extração apenas com heptano e 10 g de biodiesel – concentração final 400 ppm.
- 2 mL de extrato obtido pela extração apenas com heptano e 10 g de biodiesel – concentração final 730 ppm.

Análise das amostras

As análises foram feitas em triplicata utilizando um analisador de estabilidade à oxidação, Metrohm (modelo: Rancimat 873), previamente ajustado para o método EN141102. As amostras somente foram inseridas quando o bloco de aquecimento atingiu a temperatura de 110 °C.

Resultados e Discussão

Os resultados das análises das amostras de biodiesel aditivadas com o extrato de heptano 100% e extrato 80% heptano 20% etanol são apresentados na Tabela 1.

As amostras que foram aditivadas com o extrato 100% heptano nas concentrações de 400 ppm e 730 ppm obtiveram média de período de indução de 4,34 horas e 6,91 horas, respectivamente.

As amostras aditivadas com o extrato 80% heptano e 20% etanol, na concentração de 25.50 ppm, obtiveram média de período de indução de 8,54 horas.

Observa-se que houve maior variação entre as replicatas na concentração de 730 ppm. Possíveis causas da diferença entre os valores podem ser atribuídas à falha na homogeneização da amostra, ou a uma evaporação incompleta do solvente, antes da adição do biodiesel ao tubo.

Não foram testadas concentrações mais altas dos extratos em questão, mas, pelos baixos limites testados e pelos resultados obtidos, é possível que se tenham períodos de indução bastante superiores ao estabelecido na norma, dentro do limite de 5.000 ppm.

Tabela 1. Período de indução (horas) das amostras aditivadas com extrato 100% heptano e das amostras 80% heptano 20% etanol e respectivos brancos.

| Concentração (ppm) | Replicata 1 (horas) | Replicata 2 (horas) | Replicata 3 (horas) | Média (horas) | Desvio padrão |
|-------------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------|---------------|
| Heptano - 400 | 4,58 | 4,39 | 4,07 | 4,34 | 0,25 |
| Heptano - 730 | 7,83 | 8,67 | 4,24 | 6,91 | 2,35 |
| Branco (heptano) | 3,01 | 4,01 | - | 3,51 | 0,70 |
| Heptano/etanol 2550 | 8,52 | 8,38 | 8,73 | 8,54 | 0,17 |
| Branco (heptano/etanol) | 1,95 | - | - | - | - |

Conclusão

Os resultados dos extratos da casca de coco como aditivo antioxidante para o biodiesel se mostraram bastante promissores. Ainda que não se tenha atingido o mínimo estabelecido de 12 horas, cabe ressaltar que não foi utilizado o limite máximo de concentração dos extratos no biodiesel. Assim, trabalhos futuros devem ser realizados para encontrar uma condição de extração e concentração que possa atender à especificação exigida na norma da ANP.

Referências

AGÊNCIA NACIONAL DE PETRÓLEO, GÁS NATURAL E BIOCMBUSTÍVEIS (Brasil). **Biodiesel**. Disponível em: <http://www.anp.gov.br/biocombustiveis/biodiesel>. Acesso em: 30 jul de 2020.

AGÊNCIA NACIONAL DE PETRÓLEO, GÁS NATURAL E BIOCMBUSTÍVEIS (Brasil) ANP. **Resolução nº 798, de 01 de agosto de 2019**. Altera a Resolução ANP nº 45/2014, que estabelece as especificações de qualidade de biodiesel, para determinar a obrigatoriedade da aditivação do biodiesel com antioxidante e estabelecer novo limite de especificação da característica estabilidade à oxidação. Diário Oficial da União. 2019.

AGÊNCIA NACIONAL DE PETRÓLEO, GÁS NATURAL E BIOCMBUSTÍVEIS (Brasil). ANP. **Resolução nº 1, de 06 de janeiro de 2014**. Dispõe sobre aditivos para combustíveis automotivos e outros dispositivos. Diário Oficial da União. 2014.

CPNE. **Resolução nº 16 de 29 de outubro de 2018**. Dispõe sobre a evolução da adição obrigatória de biodiesel ao óleo diesel vendido ao consumidor final, em qualquer parte do território nacional. Diário Oficial da União. 2018.

FRANÇA, F. R. M.; MENEZES, D. S.; MOREIRA, J. J. S.; SILVA, G. F.; BRANDÃO, S. T. Potencial da *Moringa oleifera* Lam (Moringaceae) como fonte de antioxidante natural para biocombustível. Congresso Brasileiro de Engenharia Química, Florianópolis, pp.1-8 (2014). Disponível em: <https://doi.org/10.5151/chemengcobeq2014-0474-25313-189089>. Acesso em: 20 jul.2020.

OLIVEIRA, Mônica Bezerra dos Santos. **Avaliação da capacidade antioxidante e perfil químico de extratos etanólicos da fibra da casca de coco (*Cocos nucifera* L.)**. 2015. 99 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Química Biotecnológica, Universidade Federal de Alagoas, Maceió, 2015. Disponível em: <http://200.17.114.109/bitstream/riufal/1531/1/Avaliação%20da%20capacidade%20antioxidante%20e%20perfil%20químico%20de%20extratos%20da%20fibra%20da%20casca%20do%20coco%20%28Cocos%20nucifera%20L.%20Palmae%29.pdf>. Acesso em: 25 set. 2020.

OLIVEIRA, Ricardo Sonsim de. **Avaliação da atividade antioxidante de produtos naturais no biodiesel B100 (glycine max)**. 2012. 73 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Bioenergia, Centro de Engenharias e Ciências Exatas, Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Toledo, 2012. Disponível em: <http://131.255.84.103/bitstream/tede/1806/1/Ricardo%20Sonsim%20de%20Oliveira.pdf>. Acesso em: 05 ago. 2020.

PINHEIRO, Francisco Francielle. **Avaliação de antioxidantes aplicados à produção de biodiesel**. 2013. 154 f. Tese (Doutorado) - Curso de Engenharia Química, Engenharia Química, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2013. Disponível em: http://www.repositorio.ufc.br/bitstream/riufc/5816/3/2013_tese_ffpsantos.pdf. Acesso em: 20 set. 2020.

STATISTA. **Leading biodiesel producers worldwide in 2019, by country (in billion liters)**. Disponível em: <https://www.statista.com/statistics/271472/biodiesel-production-in-selected-countries/>. Acesso em: 23 set. 2020

Caracterização de fluorescência de *carbon dots* visando sua aplicação no cultivo de microalgas

*Samuel Nunes Limberger*¹, *Daniela Flávia Machado Turati*², *Rogério Gomes Faria*³, *Marcelo Oliveira Rodrigues*⁴, *Luiz Fernando Roncaratti Júnior*⁵, *Lorena Costa Garcia Calsing*⁶, *Rossano Gambetta*⁷, *Letícia Jungmann Cançado*⁸

Resumo

O cultivo de microalgas pode representar uma possibilidade interessante para a produção de combustíveis renováveis, porém ainda não é economicamente viável para essa finalidade. Alguns estudos demonstram incremento na produção de biomassa algal ao utilizar, no cultivo, *carbon quantum dots* (CQD), nanopartículas fluorescentes de carbono. Ainda não há um consenso sobre o mecanismo de interação dos CQDs com as microalgas, podendo ser: ou por melhorar a eficiência na captura de luz, ou por gerar carbono inorgânico in situ. Neste trabalho foi feita a caracterização físico-química preliminar de um CQD para sua aplicação no cultivo de microalgas, de modo a fornecer bases para compreensão do mecanismo de ação nas microalgas. Ensaios fluorimétricos foram realizados com um CQD em diferentes pHs (5, 6, 7, 8 e 9) e após diferentes intervalos de tempo expostos à luz (0, 7 e 14 dias). Os resultados indicam que o pH muda o perfil da fluorescência, o que pode ser causado pela existência de grupos carboxila na superfície do CQD estudado. Além disso, há fotodecomposição das nanopartículas, essa reação se estabiliza após 7 dias. Os CQDs são menos afetados em pHs alcalinos do que em pHs ácidos. Dessa forma, os CQDs serão degradados durante o cultivo e sua fluorescência não será estável ao longo do tempo, o que sugere que se faça uma investigação sobre se os fragmentos dos CQDs podem ser utilizados como fonte de carbono pelas microalgas.

Palavras-chave: *carbon quantum dots*, microalgas, fluorescência.

Introdução

A demanda energética mundial aumenta cerca de 1,3% a cada ano, e ainda há grande dependência das energias fósseis como o carvão (IEA, 2018, 2019). Com o aquecimento global, é imperativo encontrar fontes de energia renováveis, a fim de alcançar emissões de gases do efeito estufa líquidas próximas de zero, e que possam suprir esse crescente consumo de energia (IEA, 2020). Nessa busca, a pesquisa com microalgas ganha destaque

¹ Graduando em Química, Universidade de Brasília, bolsista CNPq ITI-A da Embrapa Agroenergia, samuel.n.limberger@gmail.com

² Bióloga, mestre em Ciências Biológicas (Microbiologia Aplicada), bolsista CNPq DTI-B da Embrapa Agroenergia, daniela.flavia@colaborador.embrapa.br

³ Doutorando em Química Inorgânica, Universidade de Brasília, rogerio.faria@unb.br

⁴ Químico, doutor em Química, Universidade Federal de Pernambuco, professor-adjunto da Universidade de Brasília, marcelo.rodrigues@nottingham.ac.uk

⁵ Físico, doutor em Química, professor-adjunto da Universidade de Brasília, lz@fis.unb.br

⁶ Engenheira de alimentos, doutora em Engenharia de Alimentos, analista da Embrapa Agroenergia, lorena.garcia@embrapa.br

⁷ Engenheiro químico, doutor em Engenharia Química, pesquisador da Embrapa Agroenergia, rossano.gambetta@embrapa.br

⁸ Bióloga, doutora em Genética e Biologia Molecular, pesquisadora da Embrapa Agroenergia, leticia.jungmann@embrapa.br

desde 2005, com cerca de 1.000 artigos científicos por ano, desde 2016, segundo a base de dados Scopus. A biomassa algal contém uma variedade de lipídeos, carboidratos, pigmentos, proteínas, enzimas e antioxidantes. Este fato possibilita uma rica gama de aplicações que envolvem: biocombustíveis (biodiesel, lipídeos, etanol e hidrogênio), tratamento de resíduos, materiais, cosméticos, nutracêuticos, indústria alimentícia e nutrição animal. Em especial, o desenvolvimento de biocombustíveis e o tratamento de resíduos podem ser importantes ferramentas para o arrefecimento das mudanças climáticas (Jalilian; Najafpour; Khajouei, 2020).

As microalgas são um conjunto de seres fotossintetizantes. Ao cultivá-las de modo autótrofo, haverá a captura de CO_2 presente no ar e a formação de O_2 e glicose. Apesar de a combustão dos biocombustíveis de microalgas liberarem CO_2 , a emissão líquida de gases do efeito estufa pode ser próxima de zero. Somem-se a isso outros benefícios como menor área de cultivo em relação a outras culturas (como a soja), a ausência de competição com a produção de alimentos e a possibilidade de usar efluentes industriais e urbanos na produção (Schenk et al., 2008). Entretanto, as etapas de cultivo, colheita e pós-tratamento da biomassa são muito onerosas. Para que houvesse uma viabilidade econômica nos produtos combustíveis derivados de microalgas, os preços por quilograma de biomassa deveriam ser menores que um Euro, mas os preços variam entre um e cinco Euros (Fernández; Sevilla; Grima, 2019).

Dessa forma, exige-se grande desenvolvimento científico na produção de biomassa de microalgas a fim de que os produtos combustíveis finais sejam competitivos. Nesse contexto, algumas pesquisas apontam que o uso de nanopartículas de carbono, *carbon quantum dots* (CQD), no cultivo de microalgas pode aumentar a produção de biomassa ou a concentração de biomoléculas desejáveis (Xue et al., 2020). CQDs são aglomerados de centenas ou milhares de átomos, com diâmetros de partícula que variam entre 1 e 10 nanômetros. Tal associação numericamente pequena de átomos permite características óticas e eletrônicas únicas, com grande destaque para a fluorescência. Esta é observada por causa das transições eletrônicas por bandas proibidas de energia (*bandgaps*) dos orbitais π conjugados e defeitos de superfície que aprisionam a energia (Lim; Shen; Gao, 2015). Há inúmeros métodos de síntese dos CQDs; o hidrotermal, o eletroquímico, a irradiação com ultrassom e a pirólise são alguns deles. Também há a possibilidade de adicionar outros compostos em menores quantidades para mudar as propriedades eletrônicas dos CQDs (dopagem). Os compostos mais usados são com nitrogênio, enxofre e sais inorgânicos (Molaei, 2019).

Assim, tanto pela grande variedade de CQDs quanto pela pequena quantidade de estudos, ainda não está claro como ocorre a interação entre os CQDs e as microalgas. Alguns artigos sugerem que o benefício das partículas é a conversão de luz, ou seja, comprimentos de onda não utilizados (ultravioleta) são convertidos em radiação fotossinteticamente ativa (azul visível), melhorando a capacidade de captura da luz pelas células e ampliando a atividade fotossintética (Choi et al., 2020). Outros trabalhos propõem que as microalgas conseguem degradar os CQDs usando enzimas oxidativas, gerando CO_2 dentro da alga, o que facilita a captura de CO_2 e, destarte, aumenta a atividade fotossintética (Zhang et al., 2018).

Este trabalho consiste em um estudo preliminar de um CQD visando sua aplicação no cultivo de microalgas. Amostras de CQD em diferentes condições (tempo, pH, exposição à luz e armazenamento no escuro) tiveram a fluorescência analisada, gerando resultados interessantes que apontam a dependência principalmente do pH e da exposição à

luz na atividade de fluorescência do CQD analisado. Essas análises servirão de base para futuras pesquisas visando compreender tanto a interação destes CQDs com as microalgas, como para possíveis otimizações de características para CQDs sintetizados para essa finalidade.

Material e Métodos

Preparação das amostras

As amostras do Carbon Dot Krill A32 (CDA32) foram cedidas pela *startup* KrillTech. A nanopartícula e a metodologia de síntese são objeto de pedido de proteção patentária (processo de número BR 10 2020 002172 9), de titularidade da Embrapa, da UnB e da KrillTech. O CDA32 é feito por meio de processo hidrotermal e tem dopagem com nitrogênio. Foram preparadas 3 soluções de 50 mg/L com o CDA32. Cada solução foi dividida em 5 recipientes. Utilizando uma solução de hidróxido de sódio 12 mg/L, o pH de cada recipiente foi ajustado para que cada replicata tivesse 5 soluções com o respectivo pH: 5, 6, 7, 8 e 9. Entre os ensaios fluorimétricos, as amostras foram armazenadas em frascos tampados transparentes e irradiadas, a uma mesma distância, por iluminação de lâmpadas fluorescentes tubulares. Em um mesmo pH, foi amostrado um volume de 3 mL de cada replicata para servir de controle. Essa solução de controle foi armazenada no escuro.

Ensaio fluorimétricos

Os ensaios fluorimétricos foram realizados no espectrofotômetro SpectraMax M2 da marca Molecular Devices utilizando uma cubeta de quartzo. As amostras foram excitadas nos comprimentos de onda 320 nm, 335 nm, 350 nm, 365 nm e 380 nm. A fluorescência emitida foi coletada no intervalo de 360 nm a 800 nm. Os ensaios foram feitos nos dias 0, 7 e 14, contados a partir da preparação das soluções.

Testes estatísticos

Por ter a maior intensidade de fluorescência, os dados do comprimento de excitação 365 nm foram utilizados para as comparações com os testes estatísticos. Quando foram comparadas amostras em diferentes condições (pHs diferentes ou número de dias diferentes), foi utilizado o teste T de Student para diferenciar as médias com 95% de confiança, de modo a determinar se os valores eram diferentes estatisticamente. Já as comparações com o controle guardado no escuro foram feitas utilizando um teste T de Student simples com 95% de confiança.

Resultados e Discussão

O ambiente do cultivo de microalgas é bem diferente de uma aplicação pontual de CQDs como a bioimagem. Geralmente os cultivos de microalgas podem durar mais de 14 dias, são muito oxigenados e precisam de iluminação frequente. Todos esses fatores contribuem para um meio de fácil degradação de moléculas orgânicas. Assim, um estudo

em que há a intensidade de fluorescência dos CQDs expostos a essas condições pode dar uma maior clareza sobre o mecanismo de interação dos CQDs com as microalgas. Este estudo dará importantes ferramentas para uma síntese orientada a gerar CQDs com propriedades que maximizem os benefícios dessa interação e, conseqüentemente, proporcionem maior produtividade de biomassa de microalgas.

Além disso, o pH do meio está muito relacionado com o metabolismo da microalga e os nutrientes disponíveis. O consumo de NH_4^+ pelas microalgas causa a acidificação do meio pela liberação de íons H^+ , podendo variar de pH 7 até próximo de 3, enquanto o consumo de íons HCO_3^- está ligado à formação de hidroxilas e alcalinização do meio, o que pode gerar valores de pH próximos de 9 (Ribeiro et al., 2020). Ademais, estudos com controle de pH apontam que pHs alcalinos podem gerar um aumento da densidade celular das microalgas (Gong et al., 2014). Por isso, também optou-se por verificar o comportamento da fluorescência do CDA32 em diferentes pHs.

Influência do pH na fluorescência

A Figura 1 mostra as diferentes curvas de fluorescências em diferentes condições do CDA32. É possível perceber que diferentes pHs tiveram diferentes comportamentos de fluorescência. Os testes estatísticos entre as curvas de fluorescência no dia zero resultaram em dois grupos de fluorescência semelhantes: um grupo ácido (pH 5, 6 e 7) e um grupo básico (pH 8 e 9). O primeiro apresentou uma intensidade de fluorescência média de 1365 a.u., enquanto que, no segundo, houve uma intensidade média um pouco menor de 1060 a.u. O pico de emissão continuou no comprimento de onda de 450 nm.

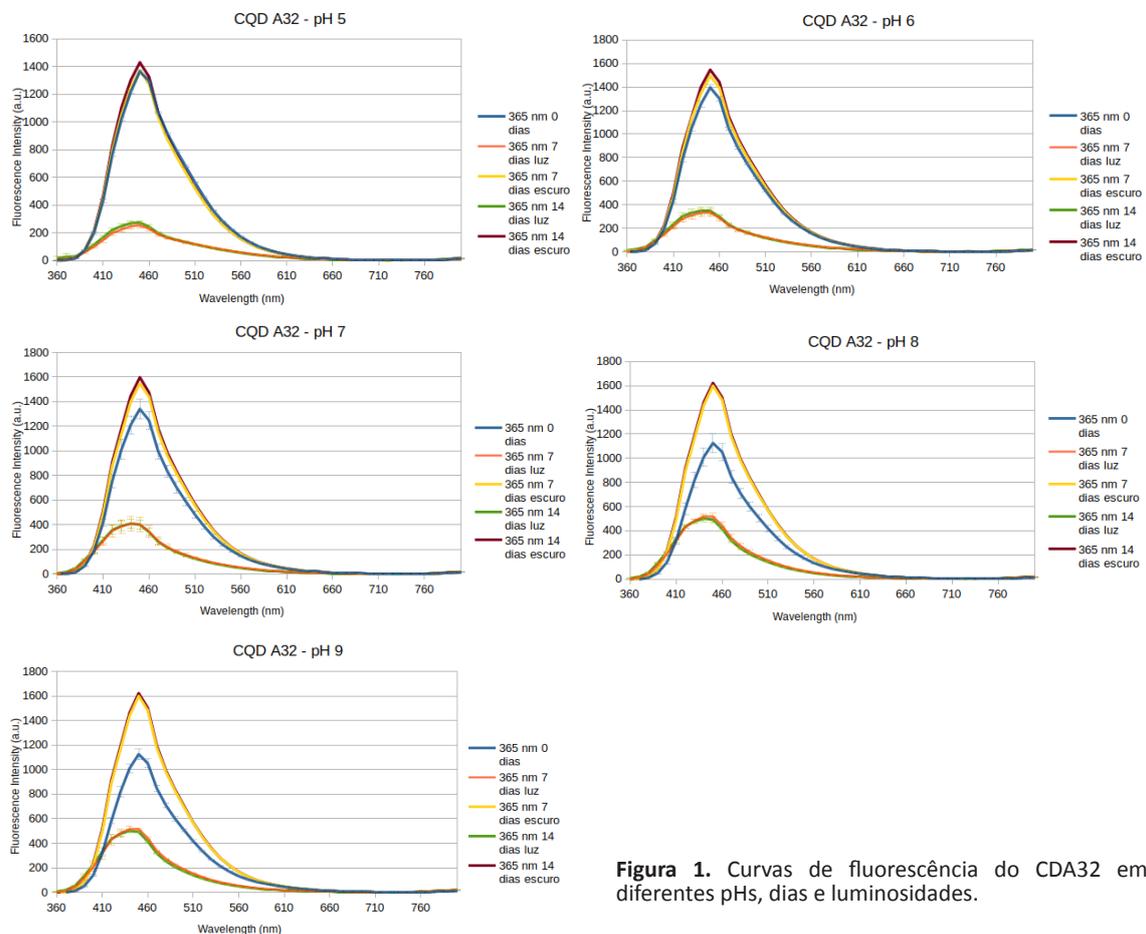


Figura 1. Curvas de fluorescência do CDA32 em diferentes pHs, dias e luminosidades.

A Figura 2 é um espectro de infravermelho do CDA32. A caracterização dos sinais seria: 3196 cm^{-1} , O-H de ácido carboxílico; 1706 cm^{-1} , C=O de ácido carboxílico conjugado; 1553 cm^{-1} , C=C de alceno conjugado. De posse desses dados, é possível admitir que na superfície da nanopartícula há grupos funcionais carboxila (-COOH), que, dependendo do valor de pH, poderão estar protonados ou não. Usando um valor de constante ácida de um ácido orgânico conjugado como referência, o ácido acrílico com $\text{pKa} = 4,72$; significaria dizer que, no pH 5, ainda haveria uma concentração quase igual de carboxilas e carboxilatos (-COO⁻) na superfície do CDA32. Com o aumento do pH, há o aumento de carboxilatos em solução, e, provavelmente, nos pHs 8 e 9, apenas carboxilatos. Assim, como o íon carboxilato apresenta uma carga negativa em ressonância com a ligação dupla da carbonila, há uma diferença na distribuição de cargas na superfície da nanopartícula. Logo, é de se esperar mudanças nas bandas energéticas de orbitais π conjugados e, portanto, curvas de fluorescência diferentes.

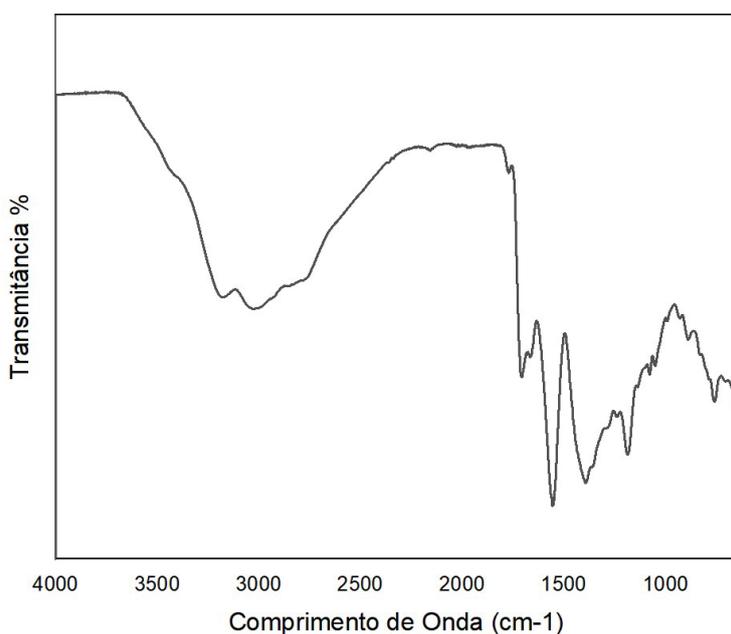


Figura 2. Espectro de Infravermelho com Transformada de Fourier do CDA32.

Influência da luz na fluorescência

As curvas demonstram que houve perdas de intensidade de fluorescência de mais de 55% nas amostras após 7 dias de irradiação luminosa em comparação com o dia 0 (zero). Por outro lado, as amostras armazenadas no escuro não tiveram perda de intensidade de fluorescência. Assim como a luz aparenta ser a principal causa da perda de atividade fluorescente, reações de oxidação fotocatalisadas podem ter causado a perda de arranjos estruturais importantes que geravam a fluorescência.

Interessantemente, todas as amostras no escuro após 7 ou 14 dias apresentaram alguma mudança estatística em relação ao perfil de fluorescência verificado no dia 0. É possível notar que houve um aumento de intensidade de fluorescência em quase todos os pHs. Isso indica que, além da luz, há algum outro fator que possa contribuir para a mudança desses fenômenos de superfície do CDA32, conseqüentemente, gerando curvas de fluorescência distintas.

As curvas de fluorescência em um mesmo pH entre o dia 7 e o dia 14 são estatisticamente equivalentes em quase todos os pHs, com exceção do pH 9. Esse fato sugere que essas reações de degradação possam chegar a uma espécie de equilíbrio em que a taxa de degradação aparente da nanopartícula fique próxima de zero e o perfil de fluorescência permaneça praticamente constante.

Com base na semelhança observada entre os dias 7 e 14, foi feita uma análise comparativa entre os diferentes pHs no dia 7. O grupo básico (pH 8 e 9) permaneceu estatisticamente semelhante entre si e exibiu intensidade de fluorescência média de 500 a.u. (55% de perda em relação à inicial). Já o grupo ácido mostrou diferenças em relação aos perfis observados no dia 0, os pHs 6 e 7 continuaram semelhantes entre si com intensidade média de 375 a.u. (73% de perda) e o pH 5 apresentou intensidade média de 250 a.u. (81% de perda). Essas informações podem indicar que o grupo carboxilato é importante para a proteção da nanopartícula contra a fotodegradação.

Análise dos dados orientada pelo cultivo de microalgas

Considerando os dados apresentados, se adotada a hipótese de que os CQDs aumentam a produtividade das microalgas por meio da fluorescência, o CDA32 estudado apresenta uma estabilidade de fluorescência que não é tão compatível com os longos intervalos de tempo de cultivo sob irradiação luminosa. Considerando um cultivo no pH 7, haverá perdas de intensidade de fluorescência na faixa de 70% após 7 dias. É claro que, após a estabilização da fluorescência, depois de 7 dias a emissão de fótons dos CQDs ainda pode ser útil para as microalgas, mesmo com a intensidade menor. Uma possibilidade seriam cultivos alcalinos com controle de pH, nos quais as perdas na fluorescência seriam menores e, supõe-se, os benefícios, tanto da criação em meios básicos quanto do uso de CQDs, possam ser acrescidos. Entretanto, esse tipo de monitoramento é dispendioso e o cultivo em meio alcalino pode não ser viável.

Por outro lado, se também adotada a hipótese de que os CQDs são uma fonte de carbono para as microalgas, esse tipo de processo de degradação seria muito desejado. Soma-se que, se as nanopartículas não sofressem modificações, na etapa de colheita, seria imperativo uma forma de separar os CQDs das microalgas. Dessa forma a fotodecomposição dos CQDs pode também ser um fenômeno muito interessante para o cultivo das microalgas já que, além de fornecer os fótons de iluminação, pode-se gerar nutrientes no próprio meio.

Conclusão

O carbon dot KrillTech A32 foi analisado em diferentes pHs, sob irradiação luminosa ou não, por 14 dias. Os resultados sugerem interessantes correlações entre estrutura das nanopartículas e emissão de fluorescência, além de indicações da reação de degradação dos CQDs que certamente é catalisada pela luz. Esses dados podem ser utilizados para um melhor esclarecimento sobre como os CQDs geram os benefícios observados no cultivo de microalgas. Também podem ser utilizados para o planejamento de síntese de nanopartículas com propriedades estruturais mais estáveis. A partir deste estudo, seria interessante o uso de espectroscopia de massas para o acompanhamento de como o CQD é fragmentado pela fotodecomposição e se essas frações poderiam ser utilizadas pelas microalgas.

Referências

- CHOI, S. A. et al. Biocompatible liquid-type carbon nanodots (C-paints) as light delivery materials for cell growth and astaxanthin induction of *Haematococcus pluvialis*. **Materials Science and Engineering C**, [S.l.], v. 109, p. 110500, 2020.
- FERNÁNDEZ, F. G. A.; SEVILLA, J. M. F.; GRIMA, E. M. Costs analysis of microalgae production. In: **Biofuels from Algae**. 2nd. ed. Almería, Espanha: Elsevier B.V., p. 551–566, 2019.
- GONG, Q. et al. Effects of light and pH on cell density of *Chlorella vulgaris*. **Energy Procedia**, [S.l.], v. 61, p. 2012–2015, 2014.
- INTERNATIONAL ENERGY AGENCY. **Coal 2018**: relatório técnico. Paris, 2018. Disponível em: <https://www.iea.org/reports/coal-2018>. Acesso em: 20 set. 2020.
- INTERNATIONAL ENERGY AGENCY. **World Energy Outlook 2019**: relatório técnico. Paris, 2019. Disponível em: <https://www.iea.org/reports/world-energy-outlook-2019>. Acesso em: 20 set. 2020.
- INTERNATIONAL ENERGY AGENCY. **Energy Technology Perspectives 2020**: relatório técnico. Paris, 2020. Disponível em: <https://www.iea.org/reports/energy-technology-perspectives-2020>. Acesso em: 20 set. 2020.
- JALILIAN, N.; NAJAFPOUR, G. D.; KHAJOU EI, M. Macro and Micro Algae in Pollution Control and Biofuel Production – A Review. **ChemBioEng Reviews**, [S.l.], v. 7, n. 1, p. 18–33, 2020.
- LIM, S. Y.; SHEN, W.; GAO, Z. Carbon quantum dots and their applications. **Chemical Society Reviews**, [S.l.], v. 44, n. 1, p. 362–381, 2015.
- MOLAEI, M. J. Carbon quantum dots and their biomedical and therapeutic applications: A review. **RSC Advances**, [S.l.], v. 9, n. 12, p. 6460–6481, 2019.
- RIBEIRO, D. M. et al. A low-cost approach for *Chlorella sorokiniana* production through combined use of urea, ammonia and nitrate based fertilizers. **Bioresource Technology Reports**, [S.l.], v. 9, n. October 2019, p. 110500-110519, 2020.
- SCHENK, P. M. et al. Second Generation Biofuels: High-Efficiency Microalgae for Biodiesel Production. **BioEnergy Research**, [S.l.], v. 1, n. 1, p. 20–43, 2008.
- XUE, R. et al. Promoting *Chlorella* photosynthesis and bioresource production using directionally prepared carbon dots with tunable emission. **Journal of Colloid and Interface Science**, [S.l.], v. 569, p. 195–203, 2020.
- ZHANG, M. et al. Pristine carbon dots boost the growth of *Chlorella vulgaris* by enhancing photosynthesis. **ACS Applied Bio Materials**, Washington, v. 1, n. 3, p. 894–902, 2018.

Caracterização do mercado de betacaroteno a partir da microalga *Dunaliella* sp.

*Natália Moreno Viana*¹, *Ana Cristina dos Santos*², *Sérgio Saraiva Nazareno dos Anjos*³, *Cesar Heraclides Behling Miranda*⁴

Resumo

Os carotenoides representam o maior grupo de pigmentos naturais encontrados na natureza, sendo um metabólito de ação antioxidante que os torna competitivos no desenvolvimento de diversos produtos de alto valor agregado, como medicamentos, cosmecêuticos e nutracêuticos. Betacaroteno é o carotenoide de maior uso do mercado, com estimativa de 26% em 2021. Pode ser obtido de diversas fontes naturais, como cenoura, urucum, abóbora e microalgas, ou sintetizado em laboratório. Dentre as microalgas, as do gênero *Dunaliella* sp. são as mais usadas no mercado. Este é um estudo exploratório e quali-quantitativo a partir de dados secundários que caracterizem o mercado de betacaroteno e contextualize as microalgas do gênero *Dunaliella* sp. neste cenário. Apesar do potencial de cultivo de microalgas, capazes de usar resíduos agroindustriais e gases de efeito estufa como fontes de carbono, enxofre e nitrogênio, além de atender à demanda crescente por produtos de origem natural, o betacaroteno de *Dunaliella* tem alto custo se comparado com o sintético, e também tem preço de mercado superior ao extraído de milho, abóbora, pimenta e cenoura. A busca de patentes apontou que o desenvolvimento de sistema de cultivo é um dos temas mais frequentes nos documentos recuperados. Com isso, suscita-se que o desenvolvimento de um sistema de cultivo em larga escala de *Dunaliella* sp. permitirá a obtenção de biomassa a custos menores e competitivos, favorecendo a balança comercial.

Palavras-chave: betacaroteno, *Dunaliella* sp., estudo de mercado.

Introdução

Os carotenoides são isoprenoides lipofílicos que absorvem radiação ultravioleta, azul e verde e que representam o maior grupo de pigmentos naturais encontrados na natureza, de cor amarelo, laranja ou vermelho e presentes em todos os organismos fotossintéticos e em algumas espécies de bactérias e fungos. Os carotenoides têm ação antioxidante e de proteção celular, principalmente sob condições ambientais desfavoráveis, e são responsáveis pela coloração de penas, escamas e pele de animais que consomem as microalgas. Já foram isolados mais de 750 carotenoides diferentes, das quais se destaca o betacaroteno (Uenojo; Maróstica Junior; Pastore, 2007; Varela et al., 2015).

¹ Graduanda em Gestão do Agronegócio, Universidade de Brasília, nataliamviana@gmail.com

² Administradora e jornalista, especialista em Gestão da Comunicação, analista da Embrapa Agroenergia, anacristina.santos@embrapa.br

³ Farmacêutico e administrador, mestre em Administração, analista da Embrapa Agroenergia, sergio.saraiva@embrapa.br

⁴ Engenheiro-agrônomo, doutor em Biologia e Bioquímica do Solo, pesquisador da Embrapa Agroenergia, cesar.miranda@embrapa.br

As projeções de crescimento do mercado de carotenoides são otimistas. Isso porque há uma demanda, também crescente, por produtos naturais (Albuquerque, 2015). Em 2014, os carotenoides sintéticos responderam por 76% da produção mundial, ficando 24% para os corantes naturais. Dados de *market share* indicaram um crescimento de 3,5% para este mercado em 2020, com movimentação de US\$ 1,4 bilhões (Deinove, [s.d.]). No ano de 2019, o mercado global alcançou US\$ 1,2 bilhões, com previsão de alcançar US\$ 1,9 bilhões em 2026, com taxa de crescimento anual composta (CAGR, sigla em inglês *Compound Annual Growth Rate*) de 4,7% durante esse período (Marketwatch, 2020).

Com maior representatividade entre os carotenoides, o betacaroteno natural tem produção estimada em 10-100 ton/ano (Mendoza et al., 2008). Este corante teve uma produção global, em questão de volume produzido, de 343,72 toneladas durante o período de 2014, e por aplicação, 40% foi destinado aos segmentos de comida e bebida em termos de receita (Credence Research, 2019).

As microalgas são microrganismos eucarióticos fotossintéticos de diversidade bioquímica e com capacidade de crescimento em diversos meios, utilizando gases de efeito estufa como CO₂, SO_x e NO_x como fontes de carbono, enxofre e nitrogênio e possibilidade de cultivo em resíduos agroindustriais.

Entre o grupo de microalgas consideradas como fonte de carotenoides, destaca-se o gênero *Dunaliella* sp., que pode produzir de 10 a 100 vezes mais betacaroteno do que a cenoura (Souto; Angelo; Gatti, 2014). O rendimento de betacaroteno a partir de sua biomassa seca é de 13% (Rammuni et al., 2019). A acumulação de betacaroteno depende da quantidade de luz em que a microalga foi exposta (Raja; Hemaiswarya; Rengasamy, 2006). Há outras fontes naturais de carotenoides, como acerola, urucum, milho, abóbora e pimenta (Javeria et al., 2013; Mesquita; Teixeira; Servulo, 2017).

A *Dunaliella salina* é uma das poucas espécies de microalgas aptas para cultivo em sistemas abertos por minimizar o crescimento de seres vivos oportunistas que se tornariam contaminantes, propriedade conferida pela resistência à hipersalinidade (Mendoza et al., 2008) e exercida pela ação antioxidante dos carotenoides (Uenojo; Maróstica Junior; Pastore, 2007).

Contudo, é importante destacar que mesmo sendo considerada uma rica fonte de corante natural, é preciso avaliar outras características que podem impactar a produção de betacaroteno a partir da *Dunaliella* sp. O meio de cultivo da microalga é considerado de alto custo, o que o torna um fator limitante.

O objetivo deste trabalho é apresentar a caracterização do mercado de betacaroteno e contextualizar as microalgas do gênero *Dunaliella* sp. neste cenário.

Material e Métodos

Este estudo tem caráter exploratório e quali-quantitativo a partir de dados secundários. Segundo Cooper e Schindler (2011), um estudo exploratório consiste na coleta de informações de fontes diversas para formular ou refinar atividades gerenciais ou técnicas a partir do melhor entendimento do cenário em análise.

Os dados de mercado foram prospectados na literatura científica, tecnológica e de mercado nacional e internacional, incluindo bases de dados de comércio exterior como o COMEXSTAT (Estatísticas de Comércio Exterior), gerido pelo Ministério da Economia (Brasil, 2020), e *The Observatory of Economic Complexity*, gerido pela universidade

norte-americana *Massachusetts Institute of Technology* (MIT) (MIT, 2020). Em ambos, usou-se o a Nomenclatura Comum do Mercosul (NCM) referente a carotenoides. Na base COMEXSTAT, usou-se o número completo, 3204.19.11.

Os dados de mercado foram complementados com uma busca patentométrica, realizada em setembro de 2020, na base de dados *Derwent Innovation Index (DII)*. A estratégia definida foi o uso da expressão “*Dunaliella* AND betacaroteno”, no escopo temporal de 2010 a 2019. A partir desses documentos, foram destacados os países depositantes, as instituições depositantes e as Classificações Internacionais de Patentes.

Resultados e Discussão

Betacaroteno é o carotenoide mais utilizado pelo mercado. Em 2015, sua receita global alcançou US\$432,2 milhões, sendo 35% a participação de algas como fonte (Hu, 2019). Em 2018, a receita de betacarotenos sintéticos no mercado global foi de US\$223,9 milhões, com o CAGR de betacarotenos estimado em 3,5% por ano até 2027 (Transparency Market Research, 2018). Já em 2019, a receita de betacarotenos no geral estava prevista para alcançar US\$532 milhões (Hu, 2019). A perspectiva para 2021 da participação de carotenoides, separados por cada tipo, no mercado global está na Figura 1. Estimativa de participação de carotenoides no mercado mundial em 2021, segundo Rammuni et al. (2018), na qual metade será representado pelo betacaroteno e pela astaxantina (Rammuni et al., 2018).

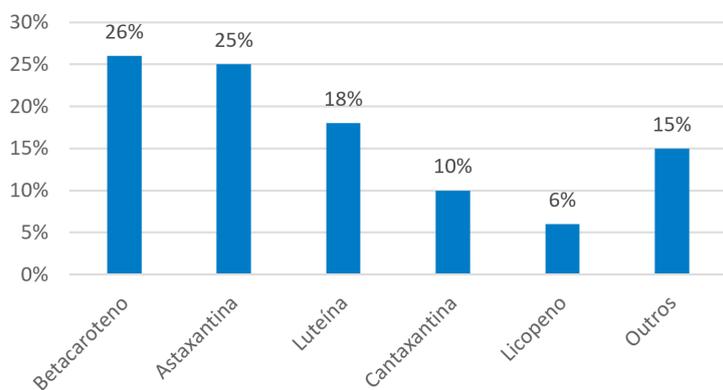


Figura 1. Estimativa de participação de carotenoides no mercado mundial em 2021, segundo Rammuni et al., (2018).

A produção de carotenoides naturais é de alto custo e não é tão ampla, o que tornou carotenoides sintéticos uma alternativa à demanda por terem menor custo de produção, refletido no seu valor de mercado (Figura 2).

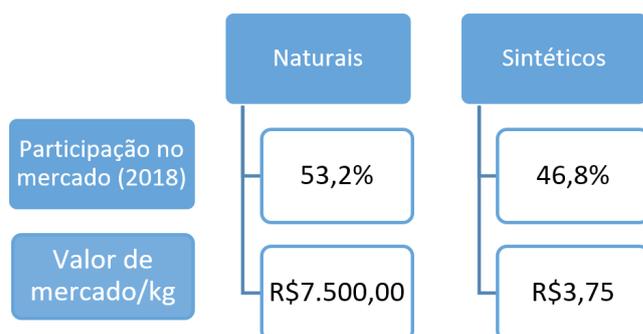


Figura 2. Comparação de valores e participação de mercado de carotenoides naturais e sintéticos.

Fonte: Adaptado de Novoveská et al. (2019) e Mordor Intelligence (2019).

Outro aspecto importante relacionado com a produção de betacaroteno de *Dunaliella* sp. é seu custo de obtenção, que pode chegar a US\$ 3.000,00 por quilograma (Mesquita, 2013). Tal valor supera o custo final de betacaroteno de outras fontes vegetais listadas na Tabela 1. Essa discrepância pode ser atribuída aos custos de cultivo da microalga.

Tabela 1. Custos finais de betacaroteno de outras fontes vegetais

| Fonte | Custo final (em US\$/kg) ⁽¹⁾ |
|--------------------------------|---|
| Milho (cultivar Sahiwal 2002) | 14,95 |
| Pimenta (cultivar Bell Boy) | 15,55 |
| Cenoura (cultivar Autumn King) | 19,74 |
| Abóbora (cultivar Daisy petha) | 37,09 |

⁽¹⁾ Valores convertidos de rúpia paquistanesa para dólar dos EUA segundo cotação do dia 11/09/2020 do Banco Central do Brasil.

Fonte: adaptado de Javeria et al. (2013).

Os principais *players* do mercado em análise são Betatene, empresa australiana adquirida pela BASF (produção de 40 a 50 toneladas por ano); Nature Beta Technologies (NBT), empresa israelense sob gestão da empresa japonesa Nikken Sohonsa Corporation (2 a 3 toneladas por ano); e E.I.D. Parry, empresa indiana (1 a 3 toneladas por ano) (Hu, 2019). Há outras empresas produtoras de betacaroteno de *Dunaliella* sp. nos EUA, China, Mongólia, México, Chile, Cuba, Irã e Taiwan (Albuquerque, 2015).

O mercado brasileiro é dependente de betacaroteno importado. O Brasil importou em 2019 quase US\$ 3,5 milhões de carotenoides, enquanto o Brasil exportou apenas US\$ 409,00 (Comexstat, 2020). Tal tendência se repete nos anos anteriores e até o primeiro trimestre de 2020. Entre os países exportadores de carotenoides em 2018, 15 deles concentraram 91,32% do montante de exportação, com liderança da Alemanha (14,8%), China (14,40%) e França (11,50%). O Brasil representa apenas 0,39% (MIT, 2020).

Para corroborar os dados de mercado, a busca de documentos patentários descrita na seção “Material e Métodos” foi feita de acordo com a estratégia descrita na mesma seção, pela qual foram recuperados 90 documentos. Deste total, há grande concentração de documentos chineses, particularmente das instituições CABIO Biotech (Wuhan) Co., Ltd. e South China University of Technology. Tal resultado é refletido nos países depositantes dos documentos recuperados, na qual há predominância da China (Figura 3).

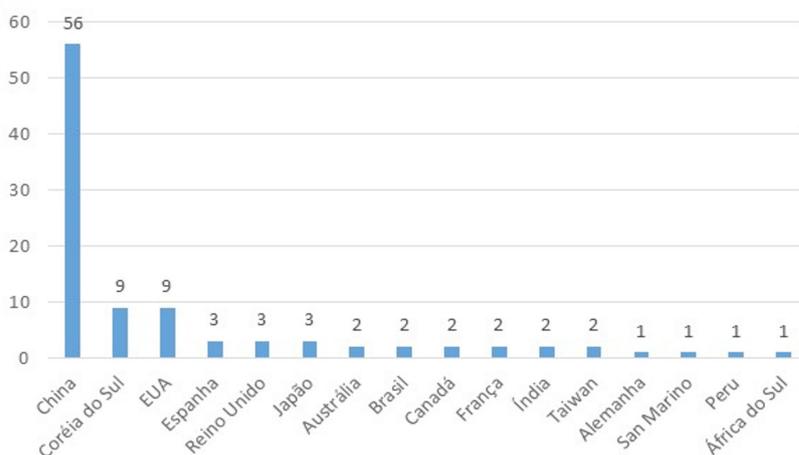


Figura 3. Países depositantes dos documentos de patente recuperados.

Percebe-se que nem todos os países que produzem *Dunaliella* sp. para a extração de betacaroteno coincidem com os países que mais depositaram patentes. Porém, dois dos três maiores produtores constam nesses dados, sendo eles Austrália e Índia. Israel, apesar de estar incluso entre os grandes produtores, não apareceu diretamente, mas a sua empresa produtora do pigmento é gerida por uma empresa japonesa, país que consta entre os que mais depositaram patentes.

Entre as Classificações Internacionais de Patentes (CIP), as mais recorrentes foram C12N-001/12, que se refere a algas unicelulares e seus meios de cultivo, e C12R-001/89, que é uma indexação complementar de algas unicelulares. Com esse dado, depreende-se que o maior foco tecnológico é o desenvolvimento de métodos eficientes de cultivo.

Grande parte dos países que cultivam comercialmente *Dunaliella* sp. adota o sistema de cultivo aberto, que consiste em lagoas e tanques, artificiais ou naturais que permitem a produção em larga escala com um custo menor do que sistemas fechados, que consistem em fotobiorreatores fechados com alto custo de instalação a manuseio. Porém, sistemas abertos contam com algumas desvantagens, como alta possibilidade de contaminações; dificuldade de captação eficiente de luz e CO₂, que varia para cada espécie; controle das condições de cultivo; alto custo de colheita; e dificuldade de *scale-up* (Da Fré, 2016).

Assim, pode-se concluir que apesar da produção de betacaroteno a partir de vegetais e por síntese orgânica ser muito mais barata que de *Dunaliella* sp., o aumento de escala da produção irá diminuir os custos de produção e, conseqüentemente, no preço final do produto. Dessa forma, betacaroteno de *Dunaliella* sp. terá um aumento na sua participação no mercado deste produto. O fato de a CIP C12N-001/12 ser a mais recorrente nos documentos patentários recuperados reforça esta questão. Com isso, o custo de cultivo de *Dunaliella* sp. em tanques abertos poderá ser menor do que o valor médio praticado, de US\$ 36.509,46 (Zardo, 2011).

Considerações Finais

Apesar do aumento de demandas por betacaroteno natural, seu custo de produção ainda é maior se comparado ao sintético. No mesmo sentido, o custo de obtenção de betacaroteno a partir de *Dunaliella* sp. é bem maior se comparado com outras fontes vegetais. Mesmo assim, são positivas as projeções de crescimento do mercado de carotenoides de origem natural, de 3,5% em 2020.

A análise de documentos patentários reforçou os dados de mercado ao mostrar um potencial de crescimento do mercado de betacaroteno, em termos de produção e estudos, principalmente na Ásia e um possível desenvolvimento do mercado na América do Sul.

Uma forma de tornar o betacaroteno de *Dunaliella* sp. mais competitivo em relação a outras fontes é o desenvolvimento de sistema de cultivo em larga escala, com a obtenção de biomassa algal a custos menores. Além disso, a produção nacional de betacaroteno de *Dunaliella* sp. poderá contribuir para diminuir a importação deste produto e, conseqüentemente, favorecer a balança comercial.

Referências

- ALBUQUERQUE, C. D. de. **Estudo da cinética de produção de carotenoides de *Sporobolomyces ruberrimus* e de técnicas de extração de pigmentos**. 2015. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis. Disponível em <https://repositorio.ufsc.br/bitstream/handle/123456789/136351/335957.pdf?sequence=1&isAllowed=y>. Acesso em 12 set. 2020.
- COOPER., D. R.; SCHINDLER, P. S. **Métodos de pesquisa em Administração**. 10ª Edição. Porto Alegre: Bookman, 2011.
- CREDENCE RESEARCH. **Global Beta Carotene Market By Revenue Is Projected To Reach US\$ 572.78 Million By 2022**. 2019. Disponível em <https://www.credenceresearch.com/press/global-beta-carotene-market>. Acesso em 8 set. 2020.
- DEINOVE. **Carotenoids market**. n.d. Disponível em <https://www.deinove.com/en/profile/strategy-and-markets/carotenoids-market>. Acesso em 23 jun. 2020.
- BRASIL, Ministério da Economia. **COMEXSTAT (Estatísticas de Comércio Exterior)**, 2020. Disponível em <http://comexstat.mdic.gov.br/pt/geral>. Acesso em 30 jun. 2020.
- DA FRÉ, N. C. **Influência das condições de cultivo da microalga *Dunaliella tertiolecta* na produção de carotenoides e lipídios**. 2016. Tese (Doutorado em Engenharia Química). Departamento de Engenharia Química, Escola de Engenharia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre. Disponível em <https://lume.ufrgs.br/handle/10183/141119>. Acesso em 30 jun. 2020.
- HU, I-C. Production of potential coproducts from microalgae. In: PANDEY, A.; CHANG, J-S.; SOCCOL, C. R.; LEE, D-J.; CHISTI, Y. **Biofuels from Algae**. 2. ed. Amsterdã: Elsevier, 2019. Cap. 14. p. 345-358. Disponível em <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-64192-2.00014-7>. Acesso em 30 jun. 2020.
- JAVERIA, S.; MASUD, T.; SAMMI, S.; TARIQ, S.; SOHAIL, A.; BUTT, S. J.; ABBASI, K. S.; ALI, S. Comparative Study for the Extraction of B-carotene in Different Vegetables. **Pakistan Journal of Nutrition**, Faisalabad, v. 12, n. 11, p. 983-989, 2013. Disponível em <http://docsdrive.com/pdfs/ansinet/pjn/2013/983-989.pdf>. Acesso em 11 set. 2020.
- MARKETWATCH. **Carotenoids Market Global Industry Analysis, Growth Opportunities, Detailed Analysis And Forecast to 2026**. 2020. Disponível em <https://www.marketwatch.com/press-release/carotenoids-market-global-industry-analysis-growth-opportunities-detailed-analysis-and-forecast-to-2026-2020-07-06?tesla=y>. Acesso em 9 set. 2020.
- MASSACHUSETTS INSTITUTE OF TECHNOLOGY (MIT). **The Observatory of Economic Complexity**. 2020. Disponível em <https://oec.world/>. Acesso em 10 set. 2020.
- MENDOZA, H.; DE LA JARA, A.; FREIJANES, K.; CARMONA, L.; RAMOS, A. A.; DUARTE, V. de S.; VARELA, J. C. S. Characterization of *Dunaliella salina* strains by flow cytometry: a new approach to select carotenoid hyperproducing strains. **Electronic Journal of Biotechnology**, Valparaíso, v. 11, n. 4, p. 1-13, 2008. Disponível em https://www.researchgate.net/publication/27793952_Characterization_of_Dunaliella_salina_strains_by_flow_cytometry_A_new_approach_to_select_carotenoid_hyperproducing_strains. Acesso em 7 set. 2020.
- MESQUITA, S. da S. **Avaliação de estratégias para a indução da produção de β -caroteno por *Dunaliella bardawil***. 2013. Dissertação (Mestre em Ciências) – Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro. Disponível em <http://186.202.79.107/download/producao-de-beta-caroteno-por-dunaliella-bardawil.pdf>. Acesso em 11 set. 2020.
- MESQUITA, S. da S.; TEIXEIRA, C. M. L. L.; SERVULO, E. F. C. Carotenoides: Propriedades, Aplicações e Mercado. **Revista Virtual de Química**, Niterói, v. 9, n. 2, p. 672-688, 2017. Disponível em <http://dx.doi.org/10.21577/1984-6835.20170040>. Acesso em 7 set. 2020.
- MORDOR INTELLIGENCE. **Beta carotene market – growth, trends and forecast (2020-2025)**. 2019. Disponível em <https://www.mordorintelligence.com/industry-reports/beta-carotene-market>. Acesso em 9 set. 2020.
- NOVOVESKÁ, L.; ROSS, M. E.; STANLEY, M. S. et al. Microalgal Carotenoids: A Review Of Production, Current Markets, Regulations, and Future Direction. **Marine Drugs**, Basel, v. 17, n. 540, p. 1-21, 2019. Disponível em <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6891288>. Acesso em 7 set. 2020.
- RAJA, R.; HEMAI SWARYA, S.; RENGASAMY, R. Exploitation of *Dunaliella* for β -carotene production. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Cham, v. 74, n. 3, p. 517-23, 2007. Disponível em <https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs00253-006-0777-8>. Acesso em 7 set. 2020.
- RAMMUNI, M. N.; ARIYADASA, T. U.; NIMARSHANA, P. H. V.; ATTALAGE, R. A. Comparative assessment on the extraction of carotenoids from microalgal sources: Astaxanthin from *H. pluvialis* and β -carotene from *D. salina*. **Food Chemistry**, Amsterdam, v. 277, p. 128-134, 2019. Disponível em <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0308814618318417>. Acesso em 7 set. 2020.

SOUTO, A. R.; ANGELO, E. A.; GATTI, I. C. de A. Sistemas potenciais de cultivo de microalgas. In: ANDRADE, D. S.; COLOZZI FILHO, A. (Editores). **Microalgas de águas continentais – volume 1: potencialidades e desafios do cultivo**. Londrina: IAPAR, 2014. p. 175-211. Disponível em http://www.iapar.br/arquivos/File/zip_pdf/MicroalgasV1.pdf. Acesso em 14 set. 2020.

TRANSPARENCY MARKET RESEARCH. **Beta-Carotene Market**. 2018. Disponível em: <<https://www.transparencymarketresearch.com/beta-carotene-market.html>>

UENOJO, M; MARÓSTICA JUNIOR, M. R.; PASTORE, G. M. Carotenóides: propriedades, aplicações e biotransformação para formação de compostos de aroma. **Química Nova**, São Paulo, v.30, n.3, p. 616-622, May/June 2007. Disponível em <http://www.scielo.br/pdf/qn/v30n3/21.pdf>. Acesso em 9 jul. 2018.

VARELA, J. C.; PEREIRA, H.; VILA, M.; LEÓN, R. Production of carotenoids by microalgae: achievements and challenges. **Photosynthesis Research**, Dordrecht, v. 25, p. 423–436, 2015. <https://doi.org/10.1007/s11120-015-0149-2>. Acesso em 5 set. 2020.

ZARDO, I. **Análise de viabilidade econômica da produção de biodiesel a partir de microalgas**. 2011. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Engenharia Química) – Escola de Engenharia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre. Disponível em <https://www.lume.ufrgs.br/bitstream/handle/10183/38387/000823849.pdf?sequence=1>. Acesso em 8 set. 2020.

Propriedades antimicrobianas e antioxidantes de extratos produzidos a partir de colonizados de basidiomicetos em tortas oleaginosas

Bárbara Monteiro Lyra¹, Marina Borges Guimarães², Lucas Cantalogo Pereira³, Jéssica do Vale⁴, Raquel Bombarda Campanha⁵, Aparecido A. Conceição⁶, Pérola Oliveira Magalhães Dias Batista⁷, Félix Goncalves de Siqueira⁸, Simone Mendonça⁹

Resumo

As tortas (resíduos da extração mecânica de óleo) da semente do pinhão-manso (TSPM) e do caroço de algodão (TCA) já se mostraram de grande interesse devido ao seu potencial como fonte proteica na nutrição animal, entretanto apresentam compostos tóxicos que poderiam limitar aplicações com esta finalidade. Alguns fungos do filo *Basidiomycota*, cogumelos comestíveis, podem ser cultivados nestes materiais e promover a destruição destes compostos tóxicos, além de produzir compostos com atividades antioxidante e antimicrobiana. Sendo assim, as tortas colonizadas por esses macrofungos poderiam ser uma alternativa ao uso de antibióticos utilizados como promotores de crescimento na nutrição animal. Este trabalho avaliou as atividades antioxidante e antimicrobiana de extratos de biomassas lignocelulósica-microbiana após a fase de colonização de TSPM e de TCA misturados com casca de coco-verde em diferentes proporções. Os macrofungos empregados foram da família *Pleurotaceae* (BRM055674) e da família *Panaceae* (BRM 044603), em TSPM e TCA, respectivamente. Extratos metanólicos foram produzidos a partir de cada substrato e após sua colonização com os fungos. A atividade antioxidante foi avaliada por meio de três métodos (FRAP, ABTS e DPPH). Os ensaios de atividade antimicrobiana foram realizados por teste de difusão de disco com os extratos contra bactérias patogênicas, *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Staphylococcus aureus* (ATCC 27154) e *Salmonella enterica* (ATCC 14028) e posteriormente calculada a concentração inibitória mínima (CIM). Em todos os fermentados houve redução na atividade antioxidante, possivelmente devido à produção de enzimas oxidativas pelos basidiomicetos. Os resultados sugerem que os extratos metanólicos obtidos a partir dos colonizados de macrofungo BRM055674 contendo 20% de TSPM em coco verde e com fungo BRM 044603 contendo 80% de TCA em coco verde possuem as melhores combinações de atividades antioxidante e leve atividade antimicrobiana (500 µg/mL), respectivamente.

¹ Graduanda em Farmácia, Universidade de Brasília, bolsista da FAP-DF, bmlyra.97@gmail.com

² Farmacêutica, doutoranda em Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, marinaborgesguimaraes@gmail.com

³ Graduando em Farmácia, Universidade de Brasília, bolsista do CNPq, lucas.cantalogo.pereira@gmail.com

⁴ Graduanda em Farmácia, Universidade de Brasília, bolsista da FAP-DF, jessica.nobrepacheco@gmail.com

⁵ Química, mestre em Engenharia e Ciência de Alimentos, analista da Embrapa Agroenergia, raquel.campanha@embrapa.br

⁶ Biotecnologista, mestre em Biociências, Universidade Federal do Mato Grosso, aparecido.aac@gmail.com

⁷ Farmacêutica, doutora em Biotecnologia (USP), professora-adjunta da Universidade de Brasília, perolam@gmail.com

⁸ Biólogo, doutor em Ciências Biológicas (UnB), pesquisador da Embrapa Agroenergia, felix.siqueira@embrapa.br

⁹ Farmacêutica, doutora em Saúde Pública (USP), pesquisadora da Embrapa Agroenergia, simone.mendonca@embrapa.br

Palavras-chave: tortas oleaginosas, basidiomiceto, atividade antimicrobiana, atividade antioxidante.

Introdução

O pinhão-manso (*Jatropha curcas* L.) tem sido considerado uma das alternativas de interesse para atender a demanda de óleo vegetal a ser usado na produção de biodiesel e bioquerosene no Brasil. Há interesse do uso da torta residual da extração do óleo no mercado de nutrição animal, que é rica em proteínas (de 46% a 63%, dependendo do método de extração do óleo). No entanto, a presença de compostos bioativos tóxicos, alergênicos e antinutricionais ainda restringe o uso da torta para nutrição animal, sendo os ésteres de forbol (EF) os principais componentes tóxicos (Laviola; Rodrigues, 2019).

O caroço de algodão também é uma semente oleaginosa utilizada para a produção de biodiesel e seu subproduto, a torta do caroço de algodão também possui potencial de utilização na alimentação animal devido seu alto teor nutritivo por ser rico em proteicas (>20%), possuir fibras e carboidratos. Entretanto, os problemas provocados na nutrição animal pelo uso do caroço de algodão são relacionados à presença do gossipol livre (GL), um composto polifenólico responsável na planta pela proteção contra insetos, que afeta a fertilidade dos animais e também tem efeitos tóxicos em monogástricos (Conceição et al., 2018).

Pesquisas recentes sugerem que o uso de resíduos agrícolas como substratos em bioprocessos, além de ser economicamente viável, reduz problemas ambientais decorrentes do seu acúmulo após o processamento ou consumo (Conceição, 2018; Gomes et al., 2015). Nesse contexto, os macrofungos do filo *Basidiomycota* desempenham papel fundamental na biodestoxificação desses resíduos agroindustriais, além de produzir metabólitos bioativos com propriedades medicinais, como a atividade antimicrobiana (Barros et al., 2007).

O uso de antimicrobianos como aditivos na agropecuária tem contribuído para o sucesso do agronegócio e conseqüentemente, para o superávit da balança comercial brasileira. Em contrapartida, o mau uso de antibióticos em animais contribui para o aumento de resistência antimicrobiana causada por bactérias resistentes aos fármacos disponíveis, sendo este um problema de saúde mundial, atualmente (Septimus, 2018).

Os fungos filamentosos são fontes de substâncias com atividades antimicrobianas, antioxidantes e imunomodulatórias. O potencial antimicrobiano dos extratos de fungos filamentosos é bem reportado. A implementação dos derivados de macrofungos na alimentação animal com a finalidade de reduzir o uso indiscriminado de antimicrobianos é uma alternativa de grande importância e interesse comercial (Barros et al., 2007).

Diante do potencial dos fungos filamentosos e a busca do direcionamento sustentável das tortas oleaginosas, o objetivo deste trabalho foi analisar atividades antioxidante e antimicrobiana dos extratos de colonizados de dois macrofungos em TSPM em TCA para posterior uso na alimentação animal.

Material e Métodos

Preparo e obtenção dos colonizados

Uma espécie de fungo da família *Pleurotaceae* (BRM055674) e um da família *Panaceae* (BRM044603), oriundos da coleção de microrganismos da Embrapa Agroenergia, foram mantidos em repique contínuo em BDA. Para o preparo das sementes, os microrganismos foram inoculados em trigo (previamente umedecido e autoclavado a 121°C durante 1 hora). As biomassas foram preparadas nas concentrações de TSPM e TCA a 20%, 50% e 80% em casca de coco verde com a umidade ajustada em 60%. Foram pesados 500 g dos substratos em sacos e esterilizados em autoclave durante 1 hora a 121°C. O procedimento de autoclavagem foi repetido novamente para evitar contaminação de microrganismos endófitos. Após o resfriamento, foram adicionados 30 g de inóculo do macrofungo comestível BRM055674 em substratos contendo TSPM e 30 g de inóculo de BRM044603 nos sacos com os substratos de TCA. Os sacos inoculados, juntamente com sacos controle sem inóculo (nomeados como substratos) foram mantidos em ambiente sem controle de temperatura e umidade até a colonização total dos sacos (30 dias). Em seguida, os colonizados foram retirados dos sacos, secos em estufa de circulação de ar a 40 °C durante 48 horas e triturados em moinho de facas tipo Willey (peneira de 0,85 mm).

Produção dos extratos

Para a obtenção dos extratos metanólicos foram utilizados 10 g de colonizados secos e triturados em 200 ml de metanol que foram colocados em erlenmeyer e incubados em shaker (180 rpm), temperatura ambiente (25°C), protegido de luz, por 48 horas. Após as 48 horas, os extratos brutos foram filtrados em papel filtro, recolhidos e evaporados em Rotaevaporador (Rotavapor R210/215, Büchi Labortechnik, Flawil, Suíça) com banho a 40 °C. Em seguida, os extratos foram liofilizados, para a eliminação da água residual e posteriormente mantidos em freezer a -20° até a realização das análises.

Atividade antioxidante

A atividade antioxidante foi avaliada a partir dos extratos dos substratos não colonizadas e dos colonizados por diferentes métodos que simulam a formação de espécies reativas de oxigênio. Foram empregados ensaios da atividade antioxidante, tais como pela captura de radicais (DPPH[•], ABTS^{•+}), diminuição da formação de espécies reativas de oxigênio - EROs (FRAP). O método DPPH (2,2 difenil-1- picrilhidrazil) foi realizado conforme método de Pires et al. (2017). O método de ABTS foi adaptado a partir do método descrito por Re ET AL. (1999). O método de FRAP foi adaptado do método de urrea-Victoria et al. (2016). Os resultados foram expressos em µg de trolox/mg de extrato para os ensaios de DPPH e ABTS, e em µgFe²⁺/mg de extrato pela análise de FRAP. As análises foram realizadas em triplicata, a análise estatística foi realizada com o software RStudio (R Core Team, 2016) e as imagens com o software GraphPrism8 (GraphPad Software, La Jolla, California, EUA).

Atividade antimicrobiana

O teste de difusão de disco foi realizado para avaliar a atividade antimicrobiana dos extratos metanólicos, os quais foram submetidos ao rotavapor, e, posteriormente, ressuspendidos e diluídos em DMSO (dimetilsulfóxido) a 20%. Em cada disco de papel filtro estéril com diâmetro de 6,0 mm foram inoculados 20 µL de extrato. Cada extrato foi diluído em diferentes concentrações (2, 20, 200 e 2000 µL/disco). Os discos foram incubados em placas de Petri estéreis com meio MHA onde foram previamente inoculados os microrganismos patogênicos *Staphylococcus aureus* (ATCC 27154, produtora de enterotoxina), *Salmonella enterica* Typhi (ATCC 14028) e *Escherichia coli* (ATCC 27154), por 24 horas a 35°C. O método de microdiluição de caldo foi realizado nos extratos que apresentaram halos maiores que 10 mm e foi realizado conforme método descrito nos documentos M7-A6 do National Committee for Clinical Laboratory Standards, M100-S15 e M100-S17 (CLSI, 2007), a fim de se obter a concentração inibitória mínima (CIM).

Resultados e Discussão

Todos os fermentados foram submetidos à quantificação de EF e GL em estudo prévio (dados não publicados). As quantificações de EF foram de 10,8 ppm (TSPM20%), 55,0 ppm (TSPM50%) e 46,0 ppm (TSPM80%), sendo todas as concentrações menores da concentração considerada segura para consumo animal de 90 ppm (Gomes et al., 2018). Em relação ao GL, as quantificações foram de 0,11 ppm (TCA20%), 0,13 ppm (TCA50%) e 0,19 ppm (TCA80%). A concentração segura de GL para o consumo animal é de 60 ppm (Saunders, 2017).

Atividade antioxidante

Na concentração de TSPM20% (Tabela 1), não houve diferença na atividade antioxidante dos colonizados em relação àquela dos respectivos substratos não inoculados, em todos os métodos empregados. Pelo método ABTS, houve aumento na atividade antioxidante no colonizado em TSPM20%, sendo este o maior valor encontrado em todos os tratamentos (53,5 µg trolox/mg de extrato). Já nas concentrações de TSPM50% e TSPM80%, pelos métodos FRAP e DPPH, foi possível observar redução na atividade antioxidante dos colonizados em relação aos substratos.

Entre os ensaios realizados em TCA, foi observado que a atividade antioxidante medida pelos métodos de DPPH e ABTS foram inferiores que as observadas para a TSPM; e que quanto maior a concentração de casca de coco (20% TCA) maior a queda da atividade antioxidante percebida após a colonização (Tabela 2) pelos métodos DPPH e FRAP. No teste FRAP, o colonizado TCA80% não apresentou queda em sua atividade após o cultivo; pelo método ABTS apenas a concentração de TCA20% apresentou queda na sua atividade do colonizado em relação à substrato, enquanto pelo método DPPH as atividades antioxidantes dos colonizados foram menores que seus respectivos substratos.

Tabela 1. Atividade antioxidante dos extratos metanólicos dos substratos não fermentados e fermentados de BRM055674 em diferentes concentrações de TSPM, pelos ensaios de DPPH, ABTS e FRAP.⁽¹⁾

| Substrato | Amostra | DPPH [*] (µg de Trolox/ mg de extrato) | ABTS ^{**} (µg de Trolox/ mg de extrato) | FRAP (µg de Fe ²⁺ /mg de extrato) |
|-----------|------------|--|---|---|
| TSPM 20% | Substrato | 33,6 ± 1,2 ^{Aa} | 36,0 ± 1,4 ^{Ab} | 42,7 ± 0,8 ^{Aa} |
| | Fermentado | 22,5 ± 0,4 ^{Aa} | 54,6 ± 3,7 ^{Aa} | 41,1 ± 0,9 ^{Aa} |
| TSPM 50% | Substrato | 9,4 ± 0,1 ^{Ba} | 13,9 ± 0,3 ^{Aa} | 29,2 ± 0,3 ^{Aa} |
| | Fermentado | 8,2 ± 0,1 ^{Bb} | 10,1 ± 1,2 ^{Ba} | 23,4 ± 0,8 ^{Bb} |
| TSPM 80% | Substrato | 18,1 ± 1,0 ^{Aa} | 31,0 ± 0,8 ^{Aa} | 44,7 ± 0,7 ^{Aa} |
| | Fermentado | 8,4 ± 0,3 ^{Bb} | 13,0 ± 2,7 ^{Bb} | 25,6 ± 0,6 ^{Bb} |

⁽¹⁾ BRM055674: espécie da família *Pleurotaceae*; TSPM: torta de semente de pinhão-manso. Médias diferem entre si pelo teste de Tukey (p<0,05). Letras maiúsculas diferem médias de uma amostra (substrato ou fermentado) em diferentes concentrações de TSPM de um mesmo ensaio; letras minúsculas diferem entre si entre substrato e fermentado em uma mesma concentração de TSPM de um mesmo ensaio.

Tabela 2. Atividade antioxidante dos extratos metanólicos dos substratos não fermentados e fermentados de BRM 44603 em diferentes concentrações de TCA, pelos ensaios de DPPH, ABTS e FRAP.⁽¹⁾

| Substrato | Amostra | DPPH [*] (µg de Trolox/ mg de extrato) | ABTS ^{**} (µg de Trolox/ mg de extrato) | FRAP (µg de Fe ²⁺ /mg de extrato) |
|-----------|------------|--|---|---|
| TCA 20% | Substrato | 18,9 ± 0,3 ^{Aa} | 12,9 ± 0,4 ^{Aa} | 35,2 ± 1,5 ^{Ba} |
| | Fermentado | 11,0 ± 0,3 ^{Cb} | 10,2 ± 0,8 ^{Ab} | 22,5 ± 0,5 ^{Bb} |
| TCA 50% | Substrato | 17,9 ± 0,2 ^{Ba} | 11,2 ± 1,4 ^{Aa} | 39,2 ± 1,4 ^{Aa} |
| | Fermentado | 14,6 ± 1,2 ^{Bb} | 11,3 ± 1,2 ^{Aa} | 32,5 ± 0,8 ^{Ab} |
| TCA 80% | Substrato | 16,9 ± 0,4 ^{Ba} | 13,5 ± 1,1 ^{Aa} | 36,7 ± 1,0 ^{Ab} |
| | Fermentado | 16,8 ± 0,7 ^{Ab} | 11,9 ± 0,4 ^{Aa} | 35,3 ± 0,5 ^{Aa} |

⁽¹⁾ BRM44603: espécie da família *Pleurotaceae*; TCA: torta de caroço de algodão. Médias diferem entre si pelo teste de Tukey (p<0,05). Letras maiúsculas diferem médias de uma amostra (substrato ou fermentado) em diferentes concentrações de TCA de um mesmo ensaio; letras minúsculas diferem entre si entre substrato e fermentado em uma mesma concentração de TCA de um mesmo ensaio.

Segundo Floegel et al. (2011) comparando-se os métodos DPPH e ABTS, o último se mostrou mais fiel em relação a compostos antioxidantes lipofílicos e de alta pigmentação. É importante ressaltar que os métodos não têm a mesma sensibilidade, portanto esses fatores podem ser responsáveis por diferenças nos resultados entre os testes. A diminuição da atividade antioxidante após a colonização foi vista também por Lin; Wei; Chou (2006). Os fungos basidiomicetos são conhecidos por serem capazes de degradar lignoceluloses de biomassas e nesse processo libera enzimas com grande potencial oxidativo inespecífico, sendo uma explicação para a diminuição da atividade antioxidante quando as biomassas são colonizadas (Kersten; Cullen, 2007). No entanto, o colonizado de TSPM 20% apresentou resultados mais altos de atividade antioxidante tanto pelo método ABTS quanto FRAP.

Atividade antimicrobiana

Foram considerados com atividade antimicrobiana os extratos que apresentaram em placa halos de inibição maiores de 10 mm, e resistentes quando foram menores que 10mm, ou não houve formação de halo, conforme sugerido na literatura (Oliveira et

al., 2008). Conforme Tabela 3, é possível observar que todos os extratos se mostraram resistentes contra as bactérias gram-negativas (*S. enterica*, *E. coli*). Já contra *S. aureus* os extratos de TCA80, TSPM20 se mostraram sensíveis com halos maiores que 10 mm. Em contrapartida, os extratos de TCA20, TCA50 e TSPM80 com um halo menor que 10 mm, se mostraram resistentes contra a mesma. Esses resultados estão em concordância com o fato já conhecido na literatura, de que a atividade antimicrobiana de cogumelos contra bactérias gram-positivas é maior do que aquele com atividade contra bactérias gram-negativas (Shen et al., 2017). Uma das razões que explica esse fenômeno é que as bactérias gram-negativas possuem uma membrana externa e o espaço periplásmico ao redor da parede celular menos permeável do que outras membranas que permite a difusão livre apenas de água e alguns gases. Outra explicação é sobre um mecanismo ainda inexplicável com relação a abertura e fechamento das porinas que podem dificultar a entrada livre de substâncias, principalmente antibióticos (Venturini et al., 2008).

Tabela 3. Halos de inibição de extratos metanólicos contra *S. aureus* (ATCC 27154), *S. enterica* Typhy (ATCC 14028) e *E. coli* (ATCC 25922) pelo teste de difusão de disco.⁽¹⁾

| Extrato | Conc. (mg/disco) | Halo (mm) | | |
|--------------|------------------|------------------|--------------------|----------------|
| | | <i>S. aureus</i> | <i>S. enterica</i> | <i>E. coli</i> |
| Amoxicilina | 10 | 35,7 ± 0,6 | 36,0 ± 0,0 | 20,6 ± 1,2 |
| Controle (-) | - | N.S. | N.S. | N.S. |
| TCA20 | 2000 | 7,0 ± 0,0 | N.S. | N.S. |
| TCA50 | 2000 | 9,5 ± 1,5 | N.S. | N.S. |
| TCA80 | 2000 | 10,5 ± 0,7 | N.S. | 9,0 ± 1,4 |
| TSPM20 | 2000 | 11,5 ± 0,7 | N.S. | N.S. |
| TSPM50 | 2000 | 9,5 ± 0,7 | N.S. | N.S. |
| TSPM80 | 2000 | 11,5 ± 0,7 | N.S. | N.S. |

(1) N.S.: não sensível; TCA20: extrato metanólico de BRM044603 em TCA a 20%; TCA50: extrato metanólico de BRM044603 em TCA a 50%; TCA80: extrato metanólico de BRM044603 em TCA a 80%; TSPM20: extrato metanólico de BRM055674 em TSPM a 20%; TSPM50: extrato metanólico de BRM055674 em TSPM a 50%; TSPM80: extrato metanólico de BRM055674 em TSPM a 80%;

O ensaio de microdiluição de caldo foi realizado nos extratos TSPM20, TSPM80, e TCA80, os quais apresentaram halo de inibição maior que 10 mm contra *S. aureus*. A concentração inibitória mínima (CIM) foi de 500 µg/mL para todos os extratos, sendo de 125 µg/mL para o controle positivo (amoxicilina). Conforme o documento M7-A6 do CLSI/NCCLS e os suplementos M100-S15 e 17, considera-se CIM de 500 a 1000 µg/mL como atividade antimicrobiana leve. Portanto, os três extratos testados neste ensaio apresentaram atividade antimicrobiana leve (NCCLS, 2003; CLSI, 2007).

Conclusões

O presente estudo demonstrou que os microrganismos não produziram antioxidantes, pelo contrário, houve perda de atividade antioxidante no substrato fermentado que em relação ao substrato não fermentado. Isso pode ocorrer devido a produção de enzimas oxidativas por fungos das famílias *Pleurotaceae* e *Panaceae*, que são degradadores matéria lignocelulósica. As menores perdas de atividade antioxidante dos fermentados

de BRM055674 ocorreram nos extratos na concentração de TSPM20%, em relação ao substrato não fermentado. Para os fermentados de BRM44603, os extratos na concentração de TCA80%, tiveram a menor perda de atividade antioxidante em relação ao substrato não fermentado. A respeito do potencial antimicrobiano, os extratos dos fermentados de TCA80, TSPM20 e TSPM80 apresentaram atividade leve contra *S. aureus*.

Portanto, considerando que na literatura está descrito que a fermentação em estado sólido de basidiomicetos é capaz de degradar EF e GL presentes em nas tortas de pinhão-manso e caroço de algodão, respectivamente, além dos ensaios prévios de degradação que apresentaram resultados dentro dos níveis recomendados para alimentação animal nas concentrações de compostos tóxicos, sugere-se ensaios in vivo para a comprovação do seu uso seguro.

Apoio Financeiro

Embrapa Agroenergia, FAP-DF, CNPq, Capes.

Referências

- BARROS, L.; CALHELHA, R. C.; VAZ, J. A.; FERREIRA, I. C. F. R.; BAPTISTA, P.; ESTEVINHO, L. M. Antimicrobial activity and bioactive compounds of Portuguese wild edible mushrooms methanolic extracts. **European Food Research and Technology**, v. 225, n. 2, p. 151–156, 2007.
- CONCEIÇÃO, A. A. Biodegradação de Substâncias Tóxicas/Antinutricionais Presentes em Tortas de Sementes Oleaginosas e Produção de Lovastina por Cocultivo de Macrofungos e *Aspergillus Terreus*. **Programa de Pós-Graduação em Biociências, Universidade Federal da Bahia**, 2018.
- CONCEIÇÃO, A. A.; SOARES NETO, C. B.; RIBEIRO, J. A. de A.; SIQUEIRA, F. G. de; MILLER, R. N. G.; MENDONÇA, S. Development of an RP-UHPLC-PDA method for quantification of free gossypol in cottonseed cake and fungal-treated cottonseed cake. **Plos one**, v. 13, n. 5, p. e0196164, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0196164>
- FLOEGEL, A.; KIM, D.-O.; CHUNG, S.-J.; KOO, S. I.; CHUN, O. K. Comparison of ABTS/DPPH assays to measure antioxidant capacity in popular antioxidant-rich US foods. **Journal of food composition and analysis**, v. 24, n. 7, p. 1043–1048, 2011.
- GOMES, T. G.; HADI, S. I. I. A.; COSTA ALVES, G. S.; MENDONÇA, S.; DE SIQUEIRA, F. G.; MILLER, R. N. G. Current Strategies for the Detoxification of *Jatropha curcas* Seed Cake: A Review. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 66, n. 11, p. 2510–2522, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.7b05691>
- GOMES, T. G.; MACHADO, A. E. V.; ARAÚJO, A. P.; LAVIOLA, B. G.; RIBEIRO, J. A. de A.; CAMPANHA, R. B.; HELM, C. V.; MENDONÇA, S.; DE SIQUEIRA, F. G. Degradação de ésteres de forbol da torta de pinhão-manso por macrofungos e potencial como substrato para produção de cogumelos comestíveis. In: 2015, **Embrapa Agroenergia-Resumo em anais de congresso (ALICE)**. : In: ENCONTRO DE PESQUISA E INOVAÇÃO DA EMBRAPA AGROENERGIA, 2., 2015 ..., 2015.
- KERSTEN, P.; CULLEN, D. Extracellular oxidative systems of the lignin-degrading Basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. **Fungal Genetics and Biology**, v. 44, n. 2, p. 77–87, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2006.07.007>
- LAVIOLA, B. G.; RODRIGUES, E. V. Pinhão-manso: pesquisas, conhecimentos e práticas. **Embrapa Agroenergia-Livro técnico (INFOTECA-E)**, 2019.
- LIN, C.-H.; WEI, Y.-T.; CHOU, C.-C. Enhanced antioxidative activity of soybean koji prepared with various filamentous fungi. **Food microbiology**, v. 23, n. 7, p. 628–633, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.fm.2005.12.004>
- OLIVEIRA, I. S.; LIMA, J. C. S.; SILVA, R. M.; MARTINS, D. T. O. Triagem da atividade antibacteriana in vitro do látex e extratos de *Croton urucurana* Baillon. **Rev Bras Farmacogn**, v. 18, p. 587–593, 2008.

PIRES, J.; TORRES, P. B.; SANTOS, D.; CHOW, F. Ensaio em microplaca do potencial antioxidante através do método de sequestro do radical livre DPPH para extratos de algas. **Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo**, 2017.

R CORE TEAM. **R: A Language and Environment for Statistical Computing**. 2016.

RE, R.; PELLEGRINI, N.; PROTEGGENTE, A.; PANNALA, A.; YANG, M.; RICE-EVANS, C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free radical biology and medicine**, v. 26, n. 9–10, p. 1231–1237, 1999.

SAUNDERS, W. B. Systemic and Multi-Organ Diseases. *In*: CONSTABLE, PETER; W HINCHCLIFF, KENNETH; DONE, STANLEY; GRUENBERG, W. (org.). **Veterinary Medicine**. 11ª Edição ed. Nova Iorque: Elsevier, 2017. p. 2002-2214.

SEPTIMUS, E. J. Antimicrobial resistance: an antimicrobial/diagnostic stewardship and infection prevention approach. **Medical Clinics**, v. 102, n. 5, p. 819–829, 2018.

SHEN, H.; SHAO, S.; CHEN, J.; ZHOU, T. Antimicrobials from mushrooms for assuring food safety. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 16, n. 2, p. 316–329, 2017.

URREA-VICTORIA, V.; PIRES, J.; TORRES, P. B.; SANTOS, D.; CHOW, F. Ensaio antioxidante em microplaca do poder de redução do ferro (FRAP) para extratos de algas. **Instituto de Biociências: Universidade de São Paulo**, 2016.

VENTURINI, M. E.; RIVERA, C. S.; GONZALEZ, C.; BLANCO, D. Antimicrobial activity of extracts of edible wild and cultivated mushrooms against foodborne bacterial strains. **Journal of food protection**, v. 71, n. 8, p. 1701–1706, 2008.

Uso do NDVI para avaliação de *Saccharum spp.* em ensaio de tolerância à seca

*Gabriel Henrique das Chagas Noqueli Casari*¹, *Nelson Geraldo de Oliveira*²,
*Hugo Bruno Correa Molinari*³, *Adilson Kenji Kobayashi*⁴

Resumo

O trabalho teve como objetivo estabelecer um protocolo de coleta e processamento de imagens multiespectrais para geração de dados NDVI a fim de avaliar plantas de cana-de-açúcar SP80-3280 GMs contendo os genes relacionados com tolerância ao déficit hídrico (denominados genes A, B, C, D e E), utilizando sensores multiespectrais embarcados em aeronave remotamente pilotada, para a captura das imagens foi considerado um plano de voo com cobertura precisa da área de interesse para geração de um ortomosaico com GSD (*Ground Sample Distance*) de pelo menos 5,5 cm/pixel. As imagens foram coletadas mensalmente e processadas em três datas após o término do período de chuvas, os dados de umidade do solo foram monitorados utilizando uma sonda PR2 em seis diferentes profundidades distribuídos na área experimental. Este protocolo foi eficiente para mensurar precocemente a resposta das plantas sob déficit hídrico utilizando o índice de diferença normalizada de vegetação (NDVI). Dados preliminares de NDVI demonstraram que o evento 2 com gene B vem apresentando menor diferença de NDVI entre condições irrigada e não-irrigada, e evento 2 com o gene C, vem apresentando maior diferença entre o mesmo material no campo irrigado.

Palavras-chave: déficit hídrico, fenotipagem por imagem, cana-de-açúcar, sensores multiespectrais.

Introdução

Uma das principais características das empresas de biotecnologia agrícola é a capacidade de inovação no desenvolvimento de novas cultivares que incorporem biotecnologia avançada. Para isso, contam com *pipelines* robustos de pesquisa e desenvolvimento que combinam melhoramento genético (convencional e assistido por marcadores moleculares), modificação genética (transgenia) e fenotipagem de alto desempenho para a geração de novas cultivares mais produtivas. Um dos principais desafios da produção agrícola nas próximas décadas é sua vulnerabilidade às mudanças climáticas. Particularmente nos últimos anos, estresses hídricos severos causaram perdas agrícolas globais da ordem de centenas de milhões de toneladas. Assim, esforços

¹ Graduando em Engenharia de Energia, bolsista da Embrapa Agroenergia, gabrielnoquelicasari@gmail.com

² Doutor em Agronomia, consultor técnico em pesquisa científica da Embrapa Agroenergia, dr.nelson74@gmail.com

³ Engenheiro-agrônomo, doutor em Produção Vegetal, pesquisador da Embrapa Agroenergia, hugo.molinari@embrapa.br

⁴ Biólogo, doutor em Fitopatologia, pesquisador da Embrapa Agroenergia, adilson.kobayashi@embrapa.br

para o desenvolvimento de variedades mais tolerantes à seca são urgentes para garantir a produção de alimentos e energia nas próximas décadas.

A etapa de fenotipagem é um dos principais gargalos na identificação e seleção de plantas melhoradas para tolerância à seca, principalmente durante a avaliação no campo, uma vez que muitas das características desejadas são complexas, exigindo técnicas sensíveis de mensuração. Em programas de melhoramento, nos quais milhares de plantas são avaliadas, é desejável a utilização de um sistema de fenotipagem de alto desempenho. Com a aplicação de tecnologias de aquisição de dados não destrutivas, é possível incrementar a qualidade, quantidade e pluralidade dos dados fenotípicos. O presente trabalho visa estabelecer um protocolo para avaliação de cana-de-açúcar em condições de déficit hídrico utilizando imagens multiespectrais em campo.

Material e Métodos

O objetivo geral deste experimento é avaliar características agrônômicas e fisiológicas, componentes de produtividade, tecnológicos e aspectos fenotípicos em eventos de cana-de-açúcar var. SP80-3280 GM (Geneticamente Modificadas) contendo os genes relacionados à tolerância ao déficit hídrico (denominados A, B, C, D e E), em condições de campo. Tais eventos foram previamente testados e selecionados em casa de vegetação por apresentarem fenótipos tolerantes ao déficit hídrico. A LPMA (Liberação Planejada no Meio Ambiente) para a condução do experimento foi autorizada pela CTNBio, processo: 01250.040987/2018-53 e foi instalada na área de campo credenciada no CQB 345/12 da Embrapa Agroenergia, localizada na Fazenda Sucupira, Rodovia DF 001 km 69, Fazenda Sucupira, Bairro: Riacho Fundo II, Brasília/DF, CEP: 71.882-080.

Ensaio Sucupira 1A e 1B: São compostos de 16 tratamentos, sendo 3 eventos de cada um dos genes e 1 tratamento controle (SP80-3280 não-transgênica - NT), estes genes possuem expressão correlacionada com respostas de tolerância ao déficit hídrico. Cada tratamento é constituído de 4 repetições dispostas em blocos dentro da área do ensaio. As parcelas possuem 4 linhas de 6 metros com espaçamento entre plantas de 0,5m, entrelinha de 1,5m e dispostas aleatoriamente dentro de cada bloco. Cada parcela possui 48 plantas com parcela útil de 20 plantas (2 linhas centrais). O experimento possui área total de 0,518ha, incluindo a bordadura. O ensaio 1A é irrigado e o 1B não irrigado (Figura 1). O plantio foi realizado em outubro de 2019.

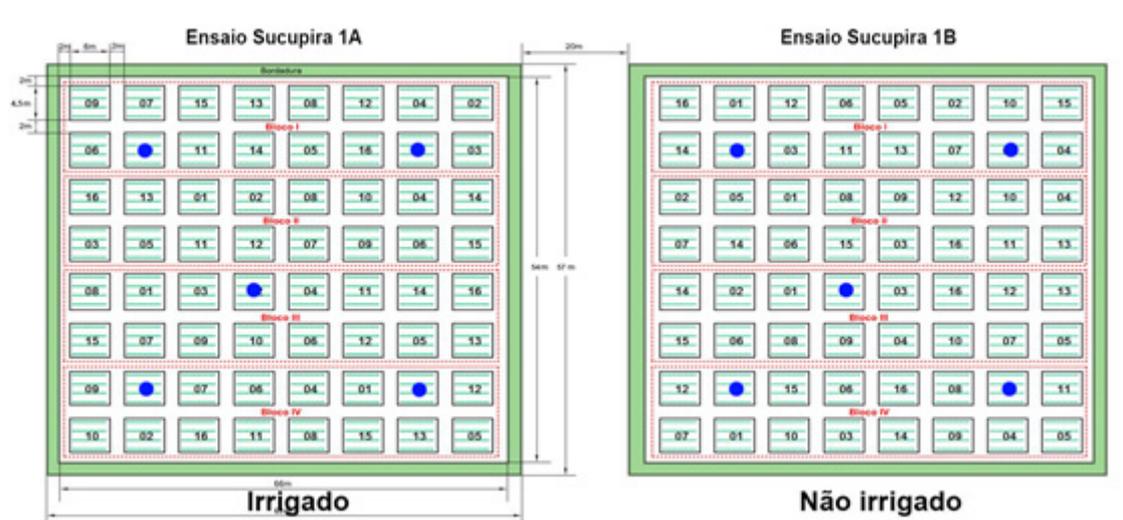


Figura 1. Croqui do experimento de tolerância ao déficit hídrico com cana-de-açúcar geneticamente modificadas instalado na área credenciada no CQB da Embrapa Agroenergia. Os círculos azuis representam o posicionamento dos tubos de acesso para sonda PR2.

A pluviosidade, temperatura, radiação solar, velocidade e direção de vento foram registrados utilizando uma estação meteorológica WS-GP1, posicionada dentro da área credenciada no CQB. Para o monitoramento da umidade do solo durante o experimento, foram instalados 10 tubos de acesso para sonda PR2, 5 no campo 1A e 5 no 1B (Figura 1). A sonda PR2 possui sensores de umidade nas profundidades de 100 mm, 200 mm, 300 mm, 400 mm, 600 mm e 1000 mm.

As imagens multiespectrais foram adquiridas utilizando um sensor multiespectral RedEdge (MicaSense, EUA) com resolução de 1280x960 pixels em cinco bandas espectrais: *Blue* (azul, 465-485 nm), *Green* (verde, 550-570 nm), *Red* (vermelho, 663-673 nm), *RedEdge* (vermelho, 712-722 nm), *Near Infra Red* (Infravermelho próximo, 820-860 nm). O sensor foi embarcado no drone X800 (XFly Tecnologia, SP, BR) para captura de imagens ortogonais ao campo experimental para geração do ortomosaico multiespectral (Figura 3).

Para a captura das imagens, processamento dos dados multiespectrais e obtenção dos valores do índice NDVI, o fluxo de atividade a seguir foi utilizado. Inicialmente, foi elaborado um plano de voo utilizando o *software QGroundControl*, com cobertura completa da área de interesse (Figura 2). Para este experimento, foi definida a altitude de 80 m AGL (*above ground level*), sobreposição de frontal e lateral de 75%, velocidade de 4 m/s, a fim de obter imagens com 5,5 cm/pixel. Para o drone utilizado, foi definido uma área de manobra excedendo a área mapeada em 15 m, para que as imagens coletadas nas fronteiras do experimento não fossem prejudicadas pela manobra.



Figura 2. Plano de voo sobre a área experimental no software QGroundControl.

Os voos foram realizados nos horários entre 10h e 11h para padronização dos registros. Antes de cada voo, uma foto ortogonal ao painel de refletância com comprimento de onda conhecido foi capturada para obter a imagem de calibração das imagens multiespectrais.

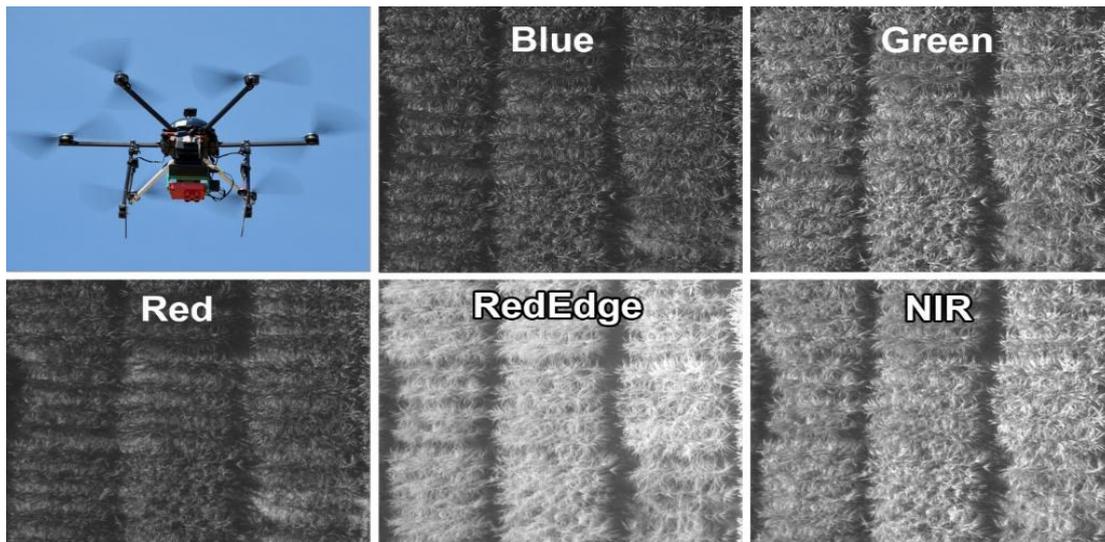


Figura 3. Drone XFly X800 embarcado com sensor Micasense RedEdge (indicado pela seta), e registros do experimento com cinco bandas espectrais.

As imagens obtidas em campo foram processadas no *software Agisoft Metashape*, onde inicialmente é feita a calibração das imagens utilizando a imagem do painel de refletância, e sequencialmente foram feitos o alinhamento das fotos, nuvem de pontos, geração do modelo digital de superfície utilizando como base de dados a nuvem de pontos, e por fim, a geração do ortomosaico com as 5 bandas (*Red, Green, Blue, RedEdge e NIR*).

O índice de vegetação NDVI foi calculado no *software QGIS 3.14.15* utilizando o ortomosaico obtido anteriormente, o cálculo do índice utiliza as bandas *NIR e Red*, pela equação (Camargo, 2013):

$$NDVI = \frac{(NIR - Red)}{(NIR + Red)}$$

Com o NDVI calculado, foram criados 128 arquivos *shapefile* com as dimensões da parcela útil e dispostos sobre cada parcela do experimento. O NDVI foi calculado utilizando os arquivos *shapefile* para delimitar as parcelas úteis e processados com a ferramenta de Estatística Zonal do QGIS.

O NDVI apresentado no mapa (Figura 5) foi calculado considerando a média dos valores dentro da parcela útil. A escala é representada de forma graduada com intervalos iguais e com 10 classes para melhor visualização.

Resultados e Discussão

A avaliação por imagem do experimento teve início após o final do período chuvas. A última precipitação ocorreu no dia 25 de maio de 2020, monitorado pela estação meteorológica posicionada dentro da área credenciada no CQB. O acompanhamento da umidade do solo foi feito utilizando a sonda PR2. No campo não irrigado, em um período de 3 meses, foi observada uma redução significativa da umidade do solo no

decorrer do experimento particularmente na profundidade de até 600 mm, onde está localizada a maior parte da rizosfera da planta (Figura 4). No mesmo tempo amostral, houve também uma redução significativa no NDVI que possui relação com a redução da densidade foliar provavelmente causado pelo déficit hídrico.

O campo irrigado apresentou maiores valores de NDVI quando comparados ao campo sob déficit hídrico. O menor valor do NDVI para o campo não irrigado está relacionado com a menor quantidade de área foliar exposta ao sensor, perda de folhas e senescência mais avançada. Os valores reduzidos de NDVI podem ter relação com a taxa fotossintética e concentração de clorofila (Zhang, 2019).

O índice NDVI está relacionado com as características estruturais e fisiológicas, estas são expressivamente afetadas quando em condições de déficit hídrico. A geometria da parte aérea (distribuição e espaçamento foliar), teor de pigmentos, conteúdo relativo de água, grau de senescência e estresses ambientais são fatores que modificam a refletância da planta (Baret; Guyot, 1991).

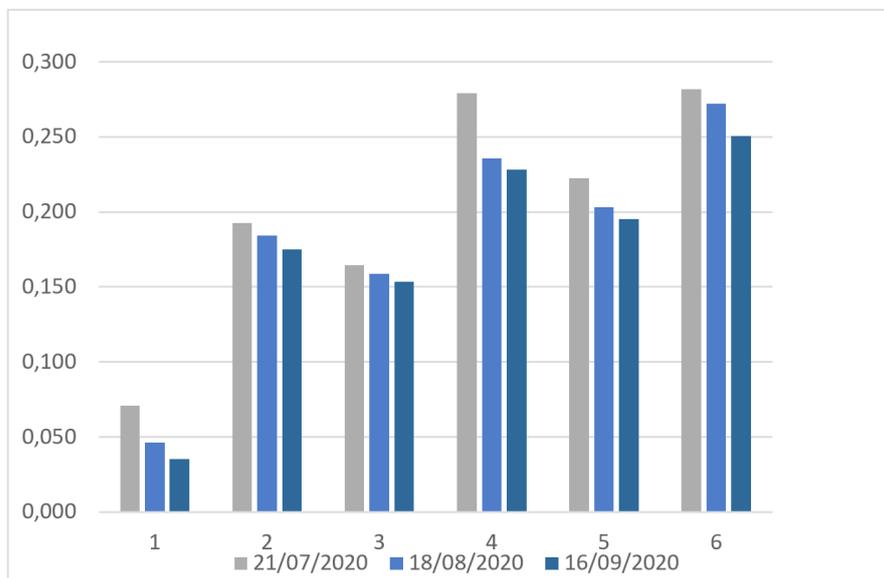


Figura 4. Redução da umidade do solo no campo experimental durante o experimento de tolerância à seca, medida em diferentes profundidades utilizando uma sonda PR2, 1 = 100 mm, 2 = 200 mm, 3 = 300 mm, 4 = 400 mm, 5 = 600 mm, 6 = 1000 mm.

Os mapas NDVI mostram a variação dos valores do índice de vegetação com o decorrer do experimento, onde o campo irrigado retorna valores mais próximos de 1, que indicam que as plantas estão mais saudáveis, e o campo não irrigado sob condições de déficit hídrico, com senescência mais avançada, redução de densidade foliar, retorna valores de NDVI menores em relação ao campo irrigado (Figura 5).

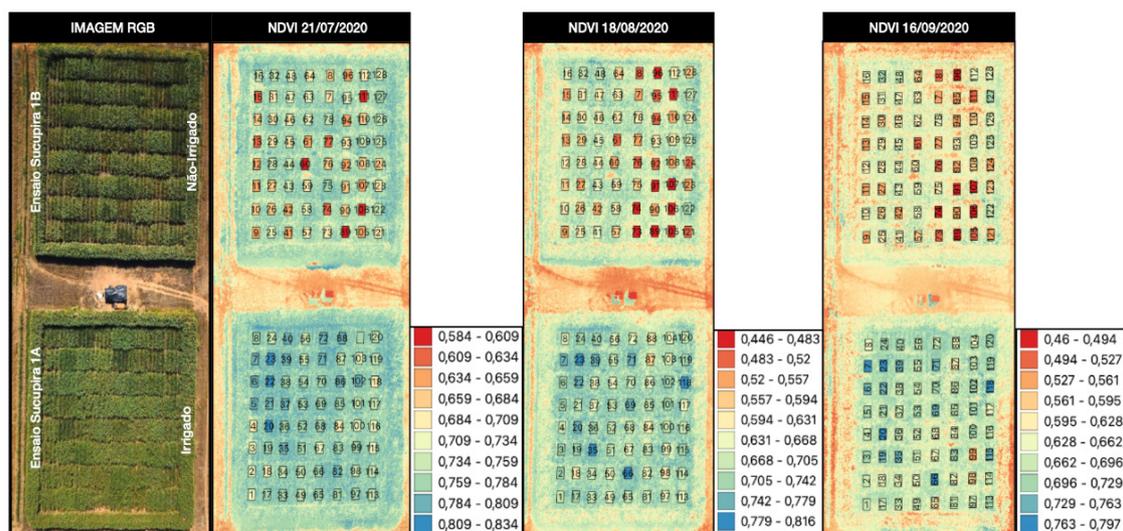


Figura 5. Mapas NDVI demonstrando a redução do índice com a intensificação do déficit hídrico. A imagem à esquerda mostra uma vista aérea da mesma área utilizando sensor RGB.

A menor diferença entre o NDVI dos mesmos eventos em campo irrigado e não irrigado, corresponde a um melhor desempenho do material sob déficit hídrico. O evento que vem apresentando menor diferença entre os tratamentos, no período desta avaliação, foi o Ev.2 Gene B com variação de 0,01, e o evento que vem apresentando a maior diferença foi o Ev.2 Gene C com variação de 0,47, o NT apresentou uma variação de 0,04 (Figura 6).

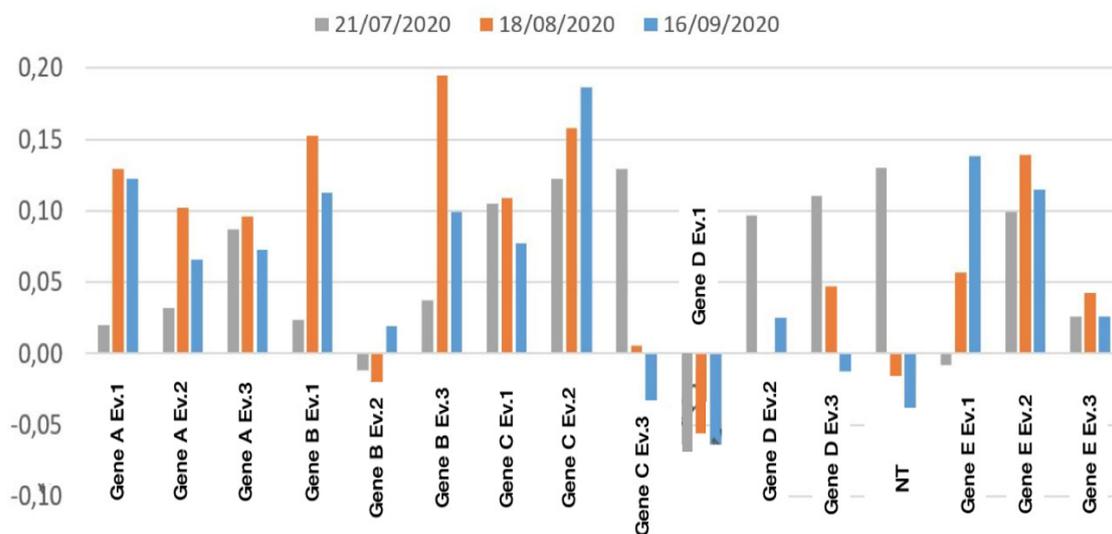


Figura 6. Diferença do NDVI entre o campo irrigado e não irrigado de cada evento, calculado em três períodos distintos.

Conclusão

Foi estabelecido um protocolo para captura e processamento de imagens multiespectrais visando o levantamento de dados NDVI para avaliação de cana-de-açúcar em condições de campo.

Foram plotados mapas de avaliação preliminar capazes de demonstrar diferença de NDVI entre as plantas do campo irrigado e não irrigado.

O experimento encontra-se em andamento, e avaliando apenas os dados de NDVI e umidade do solo, conclui-se que dentro dos eventos observados o material do Gene B Ev.2, foi o que apresentou uma menor redução do índice em relação ao mesmo material em campo irrigado, no material observado em relação ao NT.

Próximas etapas: avaliação de performance dos diferentes eventos em condições de déficit hídrico está em andamento. Os dados de NDVI serão correlacionados com dados da avaliação tecnológica e agrônômica, principalmente TCH (tonelada de cana por hectare) e conteúdo de sacarose.

Referências

BARET, F.; GUYOT, G. Potentials and limits of vegetation indices for LAI e APAR assessment. **Remote Sensing of Environmental**, Basingstone, v. 35, n. 2-3, p.161-173, 1991.

CAMARGO, A. Mapeamento da Expansão Agrícola no Estado do Mato Grosso em 11 anos a partir de técnica baseada em séries temporais de imagens de NDVI. In: SIMPOSIO BRASILEIRO DE SENSORIAMENTO REMOTO, 16., 2013, Foz do Iguaçu. **Anais...** São José dos Campos: INPE, 2013.

ZHANG, L.; ZHANG, H.; Niu, Y.; WENTING, H. Mapping maize water stress based on UAV multispectral remote sensing. **Remote Sensing**, v. 11, n. 605,p. 1-24, 2019.

Canola no Cerrado: performance de híbridos para incorporação no sistema de cultivo sob irrigação

Cíntia Gonçalves Guimarães¹, Adriano dos Santos², Eloisa Silva Gomes³, Ana Clara Oliveira Comby⁴, Rosana Falcão⁵, Júlio César Marana⁶, Erina Vitório Rodrigues⁷, Bruno Galveas Laviola⁸

Resumo

A cultura da canola possui grande importância mundial, ocupando a terceira posição da oleaginosa mais produzida, antecedida pela soja e palma de óleo. O Brasil ainda não consolidou a produção dessa espécie, sendo necessários mais estudos para promover sua tropicalização, principalmente em regiões com temperaturas mais altas. Nesse contexto, o trabalho teve como objetivo avaliar os componentes fenológicos e produtivos de canola sob irrigação visando sua tropicalização. O experimento foi conduzido em área experimental da Embrapa Cerrados, Planaltina, DF, situada a 15°35'30" S e 47°42'30" W, a 1.007 m altitude. Utilizou-se o delineamento experimental de blocos ao acaso, com 16 genótipos de canola e quatro repetições. O híbrido Diamond foi o mais precoce com ciclo próximo aos 100 dias, de forma geral, a maioria dos híbridos foi agrupada como precoce. Os híbridos Diamond, ALHT B4, Hyola 50, Hyola 433 e a população F2 originária da Hyola 50, apresentaram destaque com números de sementes por síliqua superiores a 25, contudo, os demais genótipos apresentaram número de grãos superiores a 20 grãos por síliqua. Os híbridos de canola apresentam redução no seu ciclo quando cultivados no Cerrado. A produtividade de grãos da canola sob irrigação é superior à média nacional em 2019 (1.371 kg ha⁻¹), demonstrando o alto potencial do seu cultivo no Cerrado.

Palavras-chave: *Brassica napus* L., produtividade de grãos, tropicalização da canola.

Introdução

A canola (*Brassica napus* L. var. oleifera) é uma cultura pertencente à família Brassicaceae e ao gênero *Brassica*, sendo resultante do melhoramento genético realizado por melhoristas canadenses, a partir da hibridação de duas espécies de colza, *Brassica oleracea* e *Brassica rapa*. A denominação canola é a abreviação de 'Canadian Oil Low Acid', termo utilizado para designar as cultivares que possuem teor de ácido erúico inferior a 2% no óleo e concentração de glucosinolatos menores que 30 μmols por grama de matéria seca dos grãos (Chavarria et al., 2011; Mendonça, et al., 2016).

¹ Agrônoma, doutora em Biocombustíveis, bolsista da Embrapa Agroenergia, cintia.guimaraes@colaborador.embrapa.br

² Agrônomo, doutor em Genética e Melhoramento de Plantas, adriano.agro84@yahoo.com.br

³ Graduanda em Ciências Naturais, Universidade de Brasília, geloisagomes@gmail.com

⁴ Graduanda em Ciências Naturais, Universidade de Brasília, anacomby.acc@gmail.com

⁵ Bióloga, mestre em Ciências Genômicas e Biotecnologia, analista da Embrapa Agroenergia, rosana.falcao@embrapa.br

⁶ Biólogo, técnico da Embrapa Agroenergia, julio.marana@embrapa.br

⁷ Agrônoma, doutora em Genética e Melhoramento de Plantas, professora da Universidade de Brasília, erina.rodrigues@unb.br

⁸ Agrônomo, doutor em Fitotecnia, pesquisador da Embrapa Agroenergia, bruno.laviola@embrapa.br

Possui variadas formas de utilização de seus produtos, tais como, o óleo produzido para o consumo humano, com alta qualidade, em virtude da elevada quantidade de ômega 3, vitamina E, gorduras monoinsaturadas e menor teor de gordura saturada de todos os óleos vegetais (Mori et al., 2014; Tomm et al., 2009). Outra característica importante é o potencial para produção de biodiesel (Mori et al., 2014). Além disso, o farelo de canola, pode ser utilizado na alimentação animal, em decorrência de seu alto teor de proteínas (34% a 38%) (Tomm, 2005). Outro aspecto relevante do cultivo de canola é a viabilidade na diversificação de culturas e na rotação com milho, soja, trigo e feijão, o que pode aumentar o rendimento e a qualidade desses grãos. O que faz com que a exploração dessa cultura seja rentável e sustentável, com agregação de valor (Chavarria et al., 2011; Tomm et al., 2009).

A cultura da canola possui grande importância mundial, ocupando a terceira posição da oleaginosa mais produzida, antecedida pela soja e palma de óleo. O Canadá, União Europeia e China são os maiores produtores de grãos de canola, com participação de 28,0%, 27,6% e 18,3%, respectivamente, de toda a produção dessa oleaginosa no mundo em 2018/19 (Estados Unidos, 2020).

A produção total de canola, no Brasil foi de aproximadamente 48.600 toneladas de grãos em 2019. O estado do Rio Grande do Sul é o maior produtor da cultura em âmbito nacional (Conab, 2020). Entretanto, em decorrência de fatores intrínsecos às suas exigências edafoclimáticas, o Brasil ainda não consolidou a produção dessa espécie (Dalmago et al., 2010). Assim, mais ações são necessárias na intensificação das pesquisas e desenvolvimento técnico-científicos, de forma a favorecer a consolidação e difusão do cultivo da canola no Brasil de forma a promover sua tropicalização, principalmente em regiões com temperaturas mais altas.

Desse modo, o objetivo deste trabalho foi avaliar os componentes fenológicos e produtivos de canola sob irrigação, visando sua tropicalização.

Material e Métodos

O experimento foi implantado na área experimental da Embrapa Cerrados, Planaltina, DF, situada a 15°35'30" S e 47°42'30" W, a 1.007 m altitude. De acordo com o sistema de classificação de Köppen (1948), o clima da região é do tipo Aw com inverno seco e verão chuvoso. O solo da área experimental apresenta topografia plana, é classificado como Latossolo vermelho com alto teor de argila. O preparo do solo consistiu de uma passada de grade aradora e uso de enxada rotativa. Realizou-se irrigação suplementar por sistema de aspersão convencional.

O plantio foi realizado no dia 23 de abril de 2019, com densidade de plantas de 40 plantas·m⁻². Utilizou-se o delineamento experimental de blocos ao acaso, com 16 genótipos e quatro repetições. A parcela constituiu-se de 8 linhas de 5 m espaçadas 0,18 m entre si. Apenas as seis linhas centrais foram consideradas como área útil.

Avaliaram-se os seguintes caracteres: duração do ciclo (CI, dias), como o número de dias contados a partir da semeadura até a colheita; número de grãos por síliquas (NGS), obtido pela média da contagem dos grãos de 5 síliquas advindas de 5 plantas tomadas ao acaso na área útil da parcela; massa de 1.000 grãos (M1000G, g), obtida pela pesagem de mil grãos advindos de 5 plantas tomadas ao acaso na área útil da

parcela; e, produtividade de grãos (PROD, kg ha⁻¹), determinada pela pesagem de grãos total da área útil da parcela, com posterior conversão para quilogramas por hectare.

Os dados obtidos para cada variável foram submetidos à análise de variância, conforme o seguinte modelo estatístico: $Y_{ij} = \mu + g_i + b_j + \varepsilon_{ij}$, em que: Y_{ij} é o valor observado do i -ésimo genótipo no j -ésimo bloco; μ : constante geral; g_i é o efeito do i -ésimo genótipo; b_j é o efeito do j -ésimo bloco; ε_{ij} é o erro aleatório associado à observação Y_{ij} , com NID (0, σ^2). Para os caracteres que apresentaram diferenças significativas com base na Anova empregou-se, na comparação das médias dos tratamentos, o teste Tukey a 5% de probabilidade.

Resultados e Discussão

Em relação ao ciclo, que se refere aos dias da emergência das plantas até a colheita, o híbrido Diamond foi o mais precoce, com ciclo próximo aos 100 dias. Pode-se observar ainda que os híbridos Hyola 433, Hyola 571 CL e Hyola 575 CL obtiveram ciclo inferior a 120 dias (Figura 1). Os demais híbridos apresentaram médias variando de 120 a 135 dias, o que permite incluir a maioria dos híbridos como de ciclo precoce. Deve-se ressaltar que os híbridos Hyola 50, Hyola 76 e Hyola 61 são pré-classificados como de ciclo médio, longo e médio, respectivamente, com ciclo máximo variando de 150 a 164 dias, os demais apresentam a pré-classificação como precoces. Todavia, os ciclos obtidos neste trabalho foram inferiores as amplitudes estabelecidas.

Um dos principais fatores para incorporação da canola no sistema de produção de grãos da região do Centro-Oeste do Brasil é sua precocidade. Deste modo, fica evidente que a precocidade apresentada por estes híbridos, coloca a canola como excelente alternativa econômica para uso em esquemas de rotação ou sucessão de culturas, principalmente com o milho ou a soja. A incorporação da canola no sistema soja/milho, possibilitará a diversificação de culturas, facilitando a quebra do ciclo de algumas doenças e aumentando a produção de óleos vegetais no período do inverno. Ressalta-se que neste período, muitas vezes, grandes áreas de cultivo no país ficam ociosas.

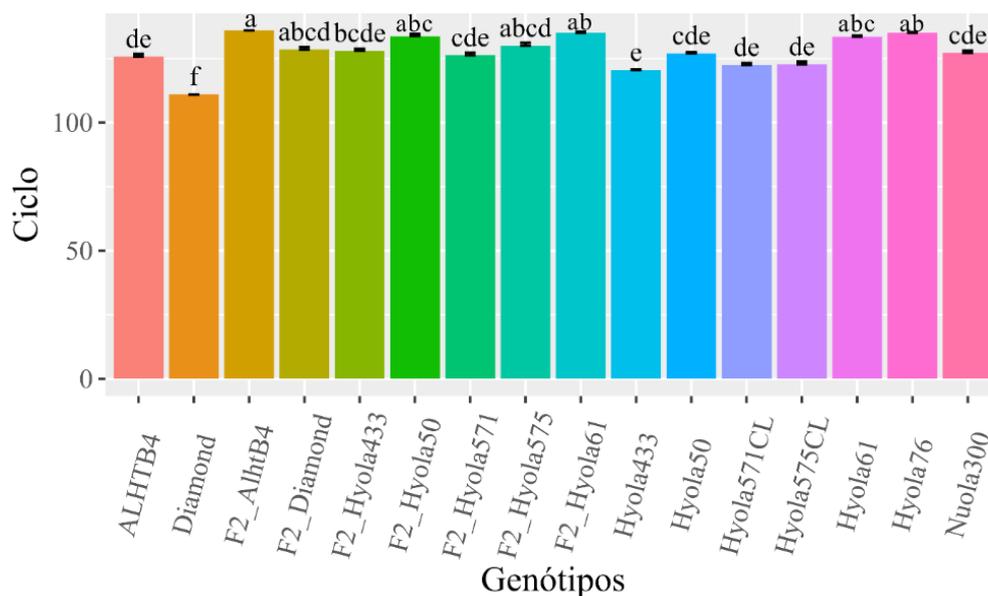


Figura 1. Ciclo médio, em dias, de 16 genótipos de canola avaliados no Cerrado. Planaltina – DF, 2019.

Quanto ao número de grãos por siliqua, pode-se observar grande variação entre os híbridos, com destaque para os híbridos Diamond, ALHT B4, Hyola 50, Hyola 433 e a população F₂ originária da Hyola 50 que obtiveram os números de gr por siliqua superiores a 25. Blochtein et al. (2014) demonstraram que o híbrido Hyola 61 produz, em média, 13 (\pm 6,5) grãos por siliqua com polinização aberta. Contudo, é importante frisar que todos os genótipos apresentaram número de grãos superiores a 20 grãos por siliqua (Figura 2), o que corrobora com as variações médias de 17 a 24 grãos por siliqua, observados em diferentes genótipos de canola (Young et al. 2004; Durán et al. 2010).

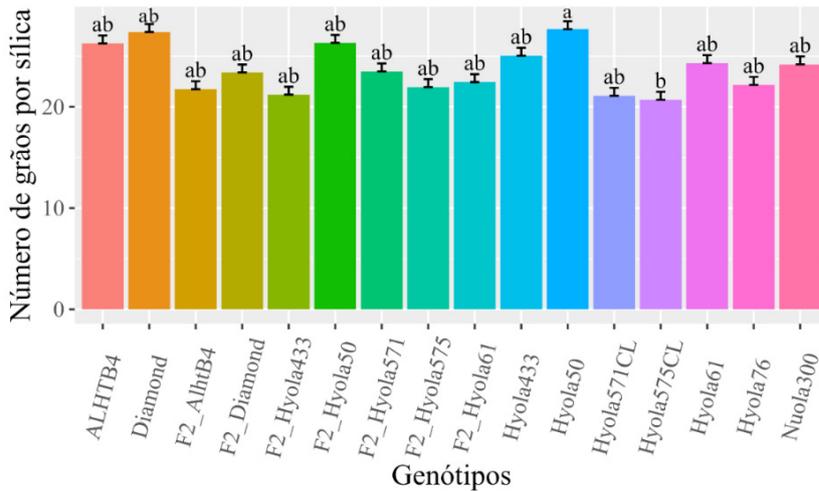


Figura 2. Número médio de grãos por siliqua, de 16 genótipos de canola avaliados na região do Cerrado. Planaltina – DF, 2019.

Como não houve efeito significativo de genótipo para a produtividade de grãos (kg ha^{-1}), apenas foi plotada as médias e os intervalos de confiança para os nove híbridos e sete populações F₂. Observa-se que as médias fenotípicas de todos dos genótipos sob irrigação, foram superiores à média nacional em 2019 (1.371 kg ha^{-1}). Observa-se que todos os híbridos, exceto as populações F₂, apresentaram média superior a 2.500 kg ha^{-1} , ou seja, mais de 1.000 kg ha^{-1} superior à média nacional, demonstrando o alto potencial do cultivo da canola na região do Cerrado (Figura 3).

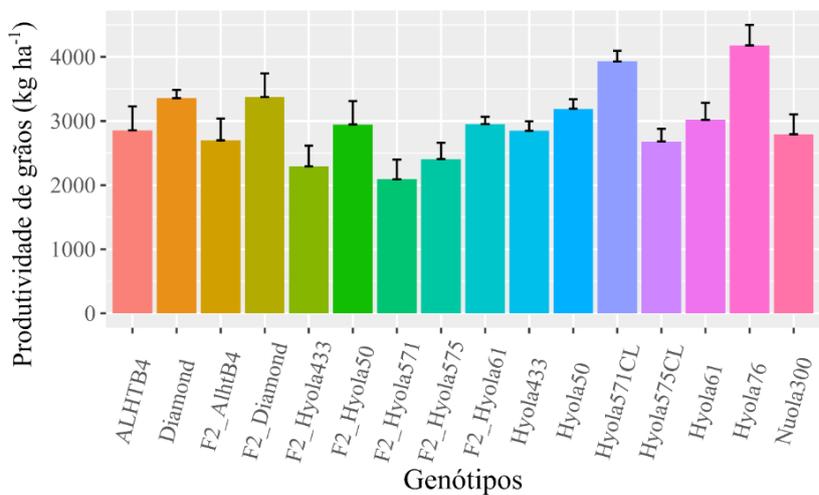


Figura 3. Produtividade de grãos (kg ha^{-1}) de 16 genótipos de canola avaliados na região do Cerrado. Planaltina – DF, 2019.

Não obstante, deve-se observar a produção do híbrido Hyola 76, que apresentou média superior a 4.000 kg ha⁻¹; bem como a produção média dos híbridos Hyola 571 CL, Diamond, Hyola 50 e Hyola 61, que apresentaram média superior a 3.000 kg ha⁻¹. No conjunto, estes resultados ratificam o potencial da canola como ótima alternativa de cultivo para a região do Cerrado.

Conclusão

A produtividade de grãos da canola cultivada na região do Cerrado sob irrigação é superior à média nacional.

Os híbridos de canola apresentam redução no seu ciclo quando cultivados na região do Cerrado.

Agradecimento

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

Apoio financeiro

Embrapa, CNPq e Finep.

Referências

- BLOCHTEIN, B.; NUNES-SILVA, P.; HALINSKI, R.; LOPES, L. A.; WITTER, S. Comparative study of the floral biology and of the response of productivity to insect visitation in two rapeseed cultivars (*Brassica napus* L.) in Rio Grande do Sul. **Brazilian Journal of Biology**, São Carlos, SP, v. 74, n. 4, p. 787-794, nov. 2014.
- CHAVARRIA, G.; TOMM, G. O.; MULLER, A.; MENDONÇA, H. F.; MELLO, N.; BETTO, M. S. Índice de área foliar em canola cultivada sob variações de espaçamento e de densidade de semeadura. **Revista Ciência Rural**, Santa Maria, RS, v. 41, n. 12, p. 2084-2089, dez. 2011.
- CONAB. Companhia Nacional de Abastecimento. **Acompanhamento de safra brasileira: grãos. Nono levantamento, safra 2019/2020**, Brasília, DF, v. 7, n. 9, p. 1-31, jun. 2020.
- DALMAGO, G. A.; CUNHA, G. R. da; SANTI, A.; PIRES, J. L. F.; MÜLLER, A. L.; BOLIS, L. M. Aclimação ao frio e dano por geada em canola. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v. 45, n. 9, p. 933-943, set. 2010.
- DURÁN, X. A.; ULLOA, R. B.; CARRILLO, J. A.; CONTRERAS, J. L.; BASTIDAS, M. T. Evaluation of yield component traits of honeybee-pollinated (*Apis mellifera* L.) rapeseed canola (*Brassica napus* L.). **Chilean Journal of Agricultural Research**, v. 70, n. 2, p. 309-314, apr-jun, 2010.
- ESTADOS UNIDOS. Department of Agriculture. **Oilseeds: World Markets and Trade**. 2020. Disponível em: <https://www.fas.usda.gov/data/oilseeds-world-markets-and-trade>. Acesso em: 09 set. 2020.
- MENDONÇA, J. A.; RIBOLDI, L. B.; SOARES, C. D. F.; CASTRO, P. R. de C. e; KLUGE, R. A. Canola (*Brassica napus* L.). Piracicaba: ESALQ – Divisão de Biblioteca, 2016. 32p. (Série Produtor Rural, 61).
- MORI, C. de; TOMM, G. O.; FERREIRA, P. E. P. **Aspectos econômicos e conjunturais da cultura da canola no mundo e no Brasil**. Passo Fundo: Embrapa Trigo, 2014. 36 p. (Embrapa Trigo. Documentos, 149).
- TOMM, G. O. **Situação em 2005 e perspectivas da cultura de canola no Brasil e em países vizinhos**. Passo Fundo: Embrapa Trigo, 2005. 21 p. (Embrapa Trigo. Boletim de pesquisa e desenvolvimento, 26).
- TOMM, G. O.; FERREIRA, P. E. P.; AGUIAR, J. L. P. de; CASTRO, A.; M. G. de; LIMA, S. M. V.; MORI, C. de. **Panorama atual e indicações para aumento de eficiência da produção de canola no Brasil**. Passo Fundo: Embrapa Trigo, 2009. 27 p. (Embrapa Trigo. Documentos, 118).
- YOUNG, L.; WILEN, R. W.; BONHAM-SMITH, P. C. High temperature stress of *Brassica napus* during flowering reduces micro- and megagametophyte fertility, induces fruit abortion, and disrupts seed production. **Journal of Experimental Botany**, v. 55, n. 396, p. 485-495, feb. 2004.

Metabolômica de *Schizophyllum commune* cultivados em torta do caroço de algodão por espectrometria de massas

Miria de Almeida Souza¹, Marina Borges Guimarães², Jorge Candido Rodrigues Neto³, Simone Mendonça⁴, Félix Gonçalves de Siqueira⁵, Patrícia Verardi Abdelnur⁶

Resumo

A grande demanda de fonte energética despertou o uso de biodiesel derivados de óleos vegetais, tendo destaque para a cultura do algodão. A torta/farelo do caroço de algodão (TCA), oriundo da etapa de extração do óleo, é rica em proteína, lipídeos e carboidratos. No entanto, a TCA possui compostos, como o gossipol e a lignina, os quais necessitam de tratamento adequado para degradá-los. A degradação destes compostos utilizando macrofungos tem se destacado, viabilizando assim a sua utilização na nutrição de animais. Portanto, é necessário prospectar os compostos químicos degradados e/ou produzidos após a fermentação com macrofungos. Esse trabalho teve como objetivo a caracterização de metabólitos presentes em TCA após a fermentação estado sólido de *Schizophyllum commune*, utilizando metabolômica *untargeted* por cromatografia de ultra alta eficiência, acoplado a espectrometria de massas tandem (UHPLC-ESI-MS/MS). Os dados foram submetidos à análise de componentes principais (PCA) e comparados ao banco de dados. O PCA das amostras demonstrou alterações significativas no perfil de compostos químicos da torta de caroço de algodão (in natura) após a fermentação fúngica. Foi possível identificar os compostos químicos N-butil-L-homoserina lactona, di-hidroanticapsina e inosina, os quais não foram relatados na literatura. Foram prospectados compostos das classes dos lipídeos, aminoácidos, oligossacarídeos, nucleosídeos e nucleotídeos, agregando valor a torta de caroço de algodão. Assim, a metabolômica, que ainda é pouco explorada no fungo *S. commune* foi aplicada para detectar diversas classes de metabólitos através da técnica avançada UHPLC-MS/MS. A ferramenta de metabolômica *untargeted* aplicada neste trabalho poderá ser aplicado a outras espécies de fungos. Tais informações contribuem para trabalhos envolvendo a desconstrução da biomassa lignocelulósica e indústria de nutrição animal.

Palavras-chave: basidiomicetos, fermentação em estado sólido, metabólitos bioativos, UHPLC-ESI-MS/MS, insumo animal.

¹ Mestre em Química, Universidade Federal de Goiás, miria17a.souza@gmail.com

² Farmacêutica, mestranda em Ciências da Saúde, marinaborgesguimaraes@gmail.com

³ Químico, mestre em Química, Universidade Federal de Goiás, jorgecni@hotmail.com

⁴ Bióloga, doutora em Saúde Pública, pesquisadora da Embrapa Agroenergia, simone.mendonca@embrapa.br

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

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

Introdução

A alta demanda global de energia e o esgotamento dos resíduos fósseis têm despertado a busca por alternativas que sejam sustentáveis, renováveis e atendam a necessidade energética. Os resíduos agroindustriais são potenciais matéria-prima renováveis que estão ganhando força no setor energético. As biomassas oriundas da etapa de extração possuem características químicas que podem ser aplicadas a outros setores, tais como produtos para nutrição animal (Gangwar; Shankar, 2020).

Neste cenário, encontra-se a cultura agrícola do *Gossypium hirsutum* L., popularmente conhecido como algodão. Essa cultura possui grande importância comercial, onde tem como principal produto a pluma, aplicada na indústria têxtil. As sementes possuem grande quantidade de óleo, e após processadas geram dois novos produtos, óleo e torta/farelo (Lee, 1984).

O óleo tem aplicações para produção de biodiesel, lubrificantes ou alimentos. A torta/farelo tem sua principal aplicação a nutrição de ruminantes, em função dos teores de proteínas e carboidratos. A torta de caroço/semente de algodão (TCA) é rica em proteína, lipídeos e carboidratos, podendo ser aplicada na nutrição animal (Carvalho, 1996). O uso da TCA na nutrição animal possui algumas limitações devido a presença do gossipol, o qual é uma substância antinutricional e tóxica, interferindo na digestibilidade e absorção dos nutrientes. Este afeta o crescimento e ganho de peso e pode levar o animal à infertilidade (Zhang et al., 2007). A recalcitrância da parede celular, principalmente em função da lignina, também limita o uso na nutrição animal. Com isso, faz-se necessários tratamentos que reduzam a toxicidade dos principais compostos presentes nos resíduos agroindustriais, viabilizando o uso deles para nutrição animal (Barbosa, 2016).

Alternativamente, os métodos de pré-tratamentos biológicos, envolvendo os fungos de podridão branca (do inglês, *White – rot fungi*), se destacam por degradarem os materiais lignocelulósicos e os compostos tóxicos (gossipol) presentes neste resíduo (Zhu et al., 2016). Estes fungos são cultivados em sistema de fermentação em estado sólido (FES), catalisando e metabolizando não apenas os compostos recalcitrantes, mas também compostos fenólicos que podem ser bioativos, enriquecendo a biomassa para formulações de dietas nutricionais do animal, podendo ainda melhorar a saúde animal (Zhu et al., 2016).

Contudo, fazem-se necessários estudos mais detalhados de todos os metabólitos produzidos após a fermentação da TCA pelos macrofungos. Permitindo assim conhecer e caracterizar quais metabólitos estão presentes e prospectar os compostos químicos com atividades bioativas que podem trazer benefícios para a saúde animal. Para isso, o uso de ferramentas como a metabolômica por espectrometria de massas torna-se uma excelente opção para este tipo de abordagem.

Portanto, este trabalho tem como objetivo prospectar os metabólitos secundários presentes em torta de caroço de algodão fermentada por *Schizophyllum commune* utilizando metabolômica *untargeted* por cromatografia de ultra-alta eficiência acoplado a espectrometria de massas tandem (UHPLC-ESI-MS/MS, do inglês *Ultra-High Performance Liquid Chromatography- Mass Spectrometry*).

Material e Métodos

Material Biológico

O macrofungo *Schizophyllum commune* (BRM 060008) foi escolhido por se destacar em trabalhos anteriores realizados na Embrapa Agroenergia (Brasília, DF) (Gomes et al., 2015; Machado, 2016; Cunha, 2017). Este faz parte da Coleção de Microrganismos e Microalgas Aplicados a Biorrefinaria da Embrapa Agroenergia (CMMABio), Brasília, Distrito Federal.

O macrofungo foi cultivado em sistema de fermentação em estado sólido (FES) em torta de caroço de algodão (TCA). Foram preparados frascos contendo apenas a TCA, sem inóculo, considerados como controles. Os frascos foram incubados em estufa incubadora de bancada a 28 °C por 15 dias. Todas as amostras foram preparadas em triplicatas biológicas.

O TCA-fermentado foi seco em estufa, a 40 °C durante 48 horas, e triturados em moinho manual. Em seguida, as amostras foram armazenadas em freezer a -80 °C até o momento dos processos de extração de metabolitos e análises químicas.

Extração dos metabolitos de TCA-fermentado

As amostras de TCA-fermentado foram extraídas com etanol 50%. Pesou-se 10 mg da TCA-fermentado e com o auxílio de uma micropipeta, foram adicionados 1000 µL de etanol 50%. As amostras foram homogeneizadas em um agitador tipo vortex (Vortex Lab Dancer Ika - Ika Best Selle) e levadas para o banho ultrassônico por 10 min a 30 °C. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas em uma microcentrifuga de bancada (MiniSpin®, Eppendorf AG, Alemanha) por 3 min e 1200 rpm.

Após o processo de extração, as amostras foram analisadas em sistema constituído por UHPLC (Modelo Prominence LC30AD, Shimadzu) acoplado a um espectrômetro de massas modelo Maxis 4G (Bruker Daltonics, Alemanha) equipado com fonte por electrospray (ESI) e analisador de massas de alta resolução tipo quadrupolo (Q) e tempo de voo (TOF, do inglês *Time of Flight*).

Para separação dos analitos, empregou-se a cromatografia líquida em fase reversa, através do emprego da coluna Acquity UPLC HSS T3 (2,1 x 100 mm x 1,8 µm, Waters) a 35 °C. O solvente A foi ácido fórmico (AF) 0,1% em água (v/v) e o solvente B ácido fórmico 0,1% em acetonitrila (v/v). As corridas cromatográficas foram de 18 min, sendo os 4 min finais para reconstituição da fase móvel para a próxima análise.

O espectrômetro de massas foi operado no modo positivo (ESI(+)-MS) e negativo (ESI(-)-MS), configurado numa voltagem do capilar de 3800 V, pressão do nebulizador 4,0 Bar, gás de secagem a 9,0 L/min a 200 °C, temperatura do cone 200 °C; temperatura da coluna 40 °C; taxa de aquisição de espectros 3 Hz e faixa de massas monitorada m/z 80-1200 Da. O equipamento foi calibrado com cluster de formiato de sódio (1 mM), inserido diretamente no início de cada corrida.

Os dados foram adquiridos por meio dos softwares *Otof Control* (Bruker), acoplado ao *HyStar* (Shimadzu). E a fórmula molecular dos íons foi atribuída com o auxílio da ferramenta *SmartFormula* do software *DataAnalysis* versão 4.2 (Bruker Daltonics). Os metabolitos foram identificados a partir da comparação entre a fórmula molecular e a massa exata, o qual foi atribuído através da ferramenta *Compound Crawler* (*DataAnalysis*

versão 4.2, Bruker Daltonics). Este *software* possui interface com bancos de dados em metabolômica públicos *Enciclopédia Kyoto de Genes e Genomas* (KEGG, do inglês *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*) e/ou *Entidades Químicas de Interesse Biológico* (ChEBI, do inglês *Chemical Entities of Biological Interest*).

Os dados de m/z , tempo de retenção (rt) e intensidade foram processados e tabelados através do *software XCMS Online*, versão 3.7 (xcmsonline.scripps.edu). Uma matriz de variáveis (*bucket table*) foi elaborada, constando as intensidades dos sinais em uma janela de 0,5-10 min, na faixa de m/z 80 a 1200. E depois essa tabela foi submetida ao tratamento estatístico através do *software MetaboAnalyst*, versão 4.0 (Xia Lab, Montreal), no qual os dados foram escalonados com base no método de Pareto para corrigir variâncias de sinais não constantes (Van Den Berg et al., 2006).

Resultados e Discussão

As análises metabolômicas dos metabólitos secundários presentes em TCA-fermentado pelo macrofungo *Schizophyllum commune* (BRM 060008) foram realizadas utilizando UHPLC-ESI-MS/MS, incluindo triplicata biológica e triplicata de extração. Foi desenvolvido um método rápido e robusto, capaz de extrair uma ampla quantidade de metabólitos em TCA-fermentado com BRM 060008. O uso do UHPLC favoreceu um menor tempo de corrida cromatográfica (11 min ESI(+)-MS e 8 min ESI(-)-MS) e melhor resolução dos picos (Goodpaster; Ramadas; Kennedy, 2011).

Análises dos metabólitos por UHPLC-ESI-(+)-MS

A partir das análises por UHPLC-ESI(+)-MS/MS foram detectados 76 picos na amostra TCA-fermentado (Figura 1A) e 51 picos no TCA-controle (Figura 1B).

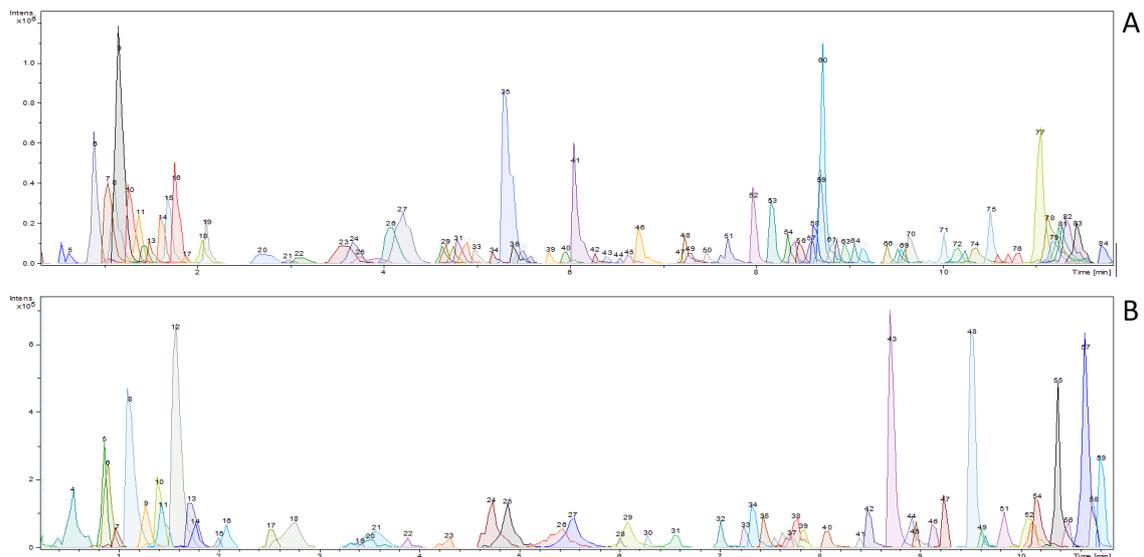


Figura 1. Perfil dissect do cromatograma gerado em UHPLC-ESI(+)-MS de amostras TCA-fermentado extraído com etanol 50% e diluído na proporção de 1:2 (500 μ L de extrato etanólico da amostra em 1000 μ L de solvente). (A) TCA-fermentado *S. commune* BRM 060008 e (B) TCA-controle (sem presença do macrofungo).

Tabela 1. Metabólitos identificados em extrato etanólico de TCA-fermentado de *S. commune* FPB117, analisadas por UHPLC(+)-ESI-MS/MS. Os íons destacados em vermelho foram observados no controle.

| m/z medido | Fórmula neutra | Compostos químicos |
|------------|----------------------|---|
| 175,1196 | $C_6H_{14}N_4O_2$ | Arginina |
| 118,0875 | $C_5H_{11}NO_2$ | Valina + 9 isômeros |
| 118,0864 | $C_5H_{11}NO_2$ | Valina + 9 isômeros |
| 116,0702 | $C_5H_9NO_2$ | Proline |
| 153,0754 | $C_5H_{12}O_5$ | Xilitol, Ribitol ou Arabitol |
| 225,0966 | $C_8H_{16}O_7$ | n.i. |
| 189,1239 | $C_8H_{13}NO_3$ | Lactona N-butil-L-homoserina |
| 286,1512 | $C_{11}H_{16}N_4O_4$ | Desoxicoformicina |
| 136,0755 | C_8H_9NO | Fenacilamina |
| 165,0545 | $C_9H_8O_3$ | Fenilpiruvato + 8 isômeros |
| 227,1025 | $C_{10}H_{11}NO_4$ | N-Benziloxicarbonilglicina + 2 isômeros |
| 352,2485 | $C_{20}H_{30}O_4$ | Resolvina E2 + 13 isômeros |
| 226,1804 | $C_{13}H_{23}NO_2$ | n.i. |
| 318,3013 | $C_{18}H_{39}NO_3$ | Fitosfingosina |
| 158,1541 | $C_9H_{19}NO$ | n.i. |

n.i.: não identificado com o auxílio do banco de dados

Análises dos metabólitos por UHPLC-ESI(-)-MS

A análise UHPLC-ESI(-)-MS foi realizada como análise complementar devido algumas moléculas ionizarem somente no modo de ionização negativo. A partir das análises por UHPLC-ESI(-)-MS/MS foram detectados 50 picos na amostra TCA-fermentado (Figura 3A) e 42 picos no TCA-controle (Figura 3B).

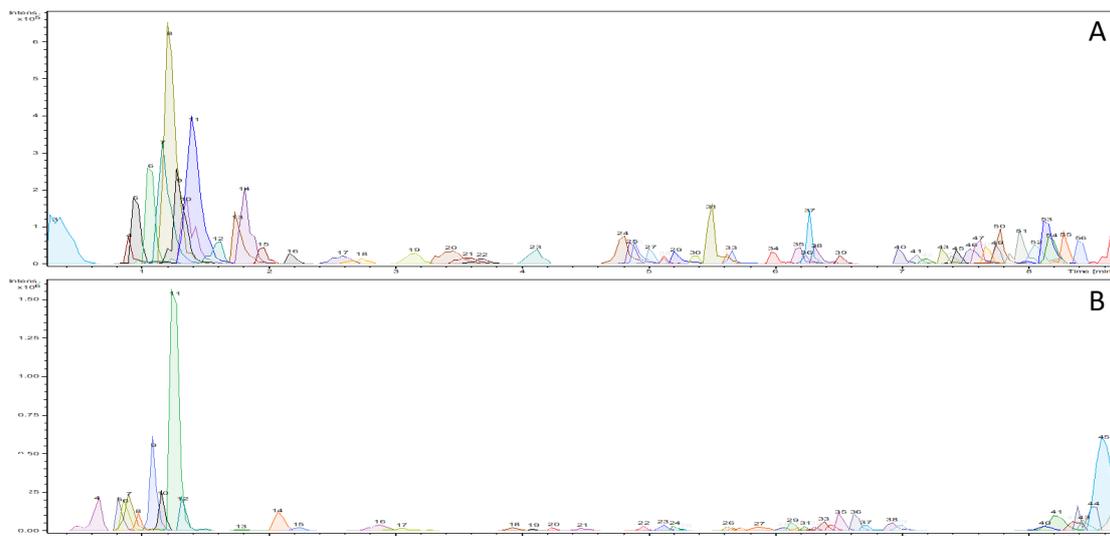


Figura 3. Perfil dissect do cromatograma gerado em UHPLC-ESI(-)-MS de amostras de TCA-fermentados extraído com etanol 50% e diluído na proporção de 1:2 (500µL de extrato etanólico da amostra em 1000 µL de solvente). (A) *S. commune* BRM 060008 e (B) TCA-controle.

Nos testes estatísticos, observou-se a separação de dois grupos referentes as amostras de TCA-fermentado de BRM 060008 e o TCA-controle (Figura 4A).

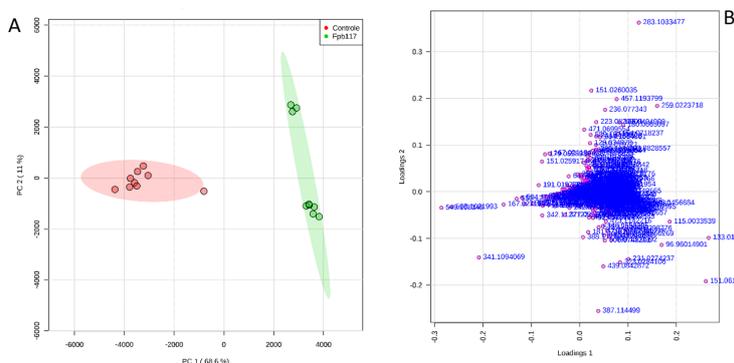


Figura 4. PCA dos dados de UHPLC-ESI(-)-MS de metabólitos gerados de TCA-fermentado de *S. commune* BRM 060008 e TCA-controle e submetidas a extração com etanol 50%. (A) Gráfico de *scores* relativo à separação de grupos. (B) Gráfico *loadings* com projeção com íons com maior influência na separação do modelo.

Os íons mais influentes e intensos foram investigados e um total de 11 fórmulas moleculares foram atribuídas (Tabela 2).

Tabela 2. Metabólitos identificados em extrato etanólico de TCA-fermentado de *S. commune* Fpb117, analisadas por UHPLC(-)-ESI-MS/MS. Os íons destacados em vermelho foram observados no controle.

| <i>m/z</i> medido | Fórmula neutra | Compostos |
|-------------------|----------------------|---|
| 283,1044 | $C_{11}H_{16}N_4O_5$ | Coformicina |
| 133,0137 | $C_4H_6O_5$ | Ácido málico |
| 167,0211 | $C_5H_4N_4O_3$ | Urate |
| 151,0260 | $C_5H_4N_4O_2$ | Xantina |
| 257,0781 | $C_{10}H_{14}N_2O_6$ | Espongotimidina ou (1-ribosilimidazol) -4-acetato |
| 267,0725 | $C_{10}H_{12}N_4O_5$ | Inosina |
| 164,0719 | $C_9H_{11}NO_2$ | Fenilalanina + 6 isômeros |
| 225,0881 | $C_{10}H_{14}N_2O_4$ | Porfobilinogênio |
| 200,0928 | $C_9H_{15}NO_4$ | Dihidroantcapsina |
| 241,1192 | $C_{11}H_{18}N_2O_4$ | n.i. |
| 275,1032 | $C_{14}H_{16}N_2O_4$ | n.i. |

n.i.: não identificado com o auxílio do banco de dados

Conclusão

A TCA-fermentado *Schizophyllum commune* (BRM 060008) apresentou alterações significativas na composição metabólica de torta de caroço de algodão, demonstrando ser favorável para degradar a lignina e produção de novos compostos, agregando valor a torta de caroço de algodão. Compostos químicos das classes dos lipídeos, aminoácidos, oligossacarídeos, nucleosídeos e nucleotídeos foram detectados no presente estudo.

Pela primeira vez foi possível identificar os compostos N-butil-L-homoserina lactona, di-hidroanticapsina e inosina, os quais não foram relatados na literatura relacionados com os fungos em estudo.

A abordagem metabolômica aplicada neste trabalho contribuiu grandemente para o entendimento do metabolismo fúngico de *Schizophyllum commune* em torta de caroço de algodão utilizando cromatografia de ultra-alta eficiência acoplado a espectrometria de massas *tandem* como ferramenta analítica. Esta ferramenta poderá ainda ser aplicada para estudos de outros fungos e biomassas gerando informações relevantes para a integração de cadeias produtivas de biodiesel (caroço de algodão), fungicultura (cogumelos comestíveis) e indústria de nutrição animal (insumos), além de contribuir para estudos envolvendo a desconstrução da biomassa lignocelulósica.

Referências

- BARBOSA, E. N. R. **Torta de algodão com suplementação enzimática para frangos de corte**. Tese (Programa de Pós-Graduação em Zootecnia) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2016.
- CARVALHO, P. P. **Manual do algodoeiro**. Instituto de Investigação Científica Tropical, Portugal, 1996.
- CUNHA, J. R. B. P. **Processo de destoxificação da torta da semente de *Jatropha curcas* L. (pinhão-mansão) utilizando enzimas extracelulares de macrofungos**. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola). Universidade Federal de Lavras, 2017.
- GANGWAR, M.; SHANKAR, J. Molecular Mechanisms of the Floral Biology of *Jatropha curcas*: Opportunities and Challenges as an Energy Crop. **Frontiers in Plant Science**, 11, 2020.
- GOMES, T. G. et al. Degradação de ésteres de forbol da torta de pinhão-mansão por macrofungos e potencial como substrato para produção de cogumelos comestíveis. In: Encontro de pesquisa e inovação da Embrapa Agroenergia. **Anais**, 2015.
- GOODPASTER, A. M.; RAMADAS, E. H.; KENNEDY, M. A. Potential effect of diaper and cotton ball contamination on NMR-and LC/MS-based metabolomics studies of urine from newborn babies. **Analytical chemistry** 83, 896-902, 2011.
- LEE, J. A. Cotton as a world crop. **Cotton**, 1-25, 1984.
- MACHADO, A. E. V. **Casca de coco verde em combinação com outros resíduos agroindustriais para produção de cogumelos comestíveis**. União Pioneira da Integração Social, 2016.
- VAN DEN BERG, R. A. et al. Centering, scaling, and transformations: improving the biological information content of metabolomics data. **BMC genomics** 7, 142, 2006.
- ZHANG, W. J. et al. Advances in gossypol toxicity and processing effects of whole cottonseed in dairy cows feeding. **Livestock Science** 111, 1-9, 2007.
- ZHU, N. et al. Comparative analysis of the secretomes of *Schizophyllum commune* and other wood-decay basidiomycetes during solid-state fermentation reveals its unique lignocellulose-degrading enzyme system. **Biotechnology for biofuels** 9, 42, 2016.

Análise patentométrica e bibliométrica de microrganismos-chave para produção de ácidos carboxílicos de relevância estratégica

Sérgio Saraiva Nazareno dos Anjos¹, Victória Cristina Cardoso da Paixão Hass Gonçalves², Melissa Braga³, Mônica Caraméz Triches Damaso⁴

Resumo

Os ácidos carboxílicos são compostos químicos de importância estratégica e com diversas aplicações industriais, incluindo seu uso como intermediários ou blocos construtores (*building blocks*) para obtenção de outros produtos. O avanço da bioeconomia amplia possibilidade de obtenção e uso desses ácidos a partir de recursos biológicos. Com isso, torna-se um contraponto às fontes fósseis e abrem leques de oportunidades para o crescimento do mercado de produtos de base biológica. Estudos de prospecção tecnológica têm o papel de gerar dados estratégicos para fomentar sistemas de inovação e garantir a competitividade de instituições de Ciência e Tecnologia. Estudos elaborados pela Agência Internacional de Energia (IEA), pelo Laboratório de Energias Renováveis (NREL) do Departamento de Energia Americano, e pela Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura (FAO) apontam a bioeconomia como estratégia para crescimento nas próximas décadas. Dentre as ferramentas utilizadas para prospecção tecnológica, encontram-se as análises bibliométricas e patentométricas. Neste trabalho, estas ferramentas foram utilizadas com o objetivo de desenvolver um estudo exploratório e quantitativo por meio de documentos científicos e patentários recuperados nas bases de dados *Web of Science* e *Derwent Innovation Index*, respectivamente, relacionados com microrganismos usados na obtenção de quatro ácidos orgânicos de relevância estratégica: ácido 3-hidroxiisovalérico, ácido itacônico, ácido fumárico e ácido málico. O estudo tem como propósito identificar oportunidades de desenvolvimento tecnológico com microrganismos pertencentes à Coleção de Microrganismos e Microalgas Aplicados à Agroenergia e Biorrefinarias – CMMAABio. Os resultados obtidos indicam microrganismos de espécies presentes na CMMAABio, que podem ser avaliados em futuros projetos de Pesquisa, Desenvolvimento e Inovação (P,D&I) da Embrapa Agroenergia para obtenção desses ácidos.

Palavras-chave: prospecção tecnológica, ácido 3-HP, ácido fumárico, ácido itacônico, ácido málico.

¹ Farmacêutico e administrador, mestre em Administração, analista da Embrapa Agroenergia, sergio.saraiva@embrapa.br

² Graduanda em Biotecnologia, Universidade de Brasília, vivi_hass@hotmail.com

³ Química, mestre em Físico-Química, analista da Embrapa Agroenergia, melissa.braga@embrapa.br

⁴ Engenheira Química, doutora em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos, pesquisadora da Embrapa Agroenergia, monica.damaso@embrapa.br

Introdução

Com o avanço da bioeconomia, economia baseada no uso de recursos biológicos em detrimento às fontes fósseis, abre-se um leque de oportunidades para o crescimento do mercado de produtos de base biológica, dentre eles os ácidos carboxílicos. Estes ácidos são compostos químicos muito importantes comercialmente, e são obtidos por meio de processos químicos, bioquímicos ou híbridos, podendo ser aplicados diretamente em diferentes setores industriais, além de serem utilizados como blocos construtores (*building blocks*) para obtenção de outros produtos.

Relatórios para o desenvolvimento da bioeconomia elaborados por instituições de renome como o Grupo de Especialistas da União Europeia, a Agência Internacional de Energia (IEA), e o Laboratório de Energias Renováveis (NREL) do Departamento de Energia Americano apontam uma série de ácidos de relevância estratégica capazes de serem obtidos a partir da biomassa lignocelulósica, dentre eles os ácidos 3-hidroxiopropiônico, itacônico, fumárico e málico (Werpy; Peterson, 2004; Newton et al., 2017; De Jong et al., 2020).

O ácido 3-hidroxiopropiônico (3-HP; $C_3H_6O_3$) é um alfa hidroxíácido, ainda em fase de desenvolvimento industrial, sobre o qual recai uma grande expectativa como intermediário do ácido acrílico, um monômero de polímeros de grande consumo pela sociedade. Além disso, também pode ser intermediário de polímeros biodegradáveis - os poli-hidroxicanoatos - e de 1,3-propanodiol (Wang et al., 2016).

O ácido itacônico ($C_5H_6O_4$) e o ácido fumárico ($C_4H_4O_4$) são produtos das vias metabólicas dos microrganismos, especificamente do ciclo de Krebs, e são intermediários da porção oxidativa do ciclo dos ácidos tricarboxílicos. Ambos os ácidos estavam entre os 12 principais *building blocks* derivados de biomassa com aplicações que se estendem desde química fina até farmacêutica (Jimenez-Quero et al., 2017).

O ácido fumárico tem propriedades acidulantes, preservativas e flavorizantes para aplicação em indústria alimentícia. Também é usado como monômero para produção de polímeros e agente de colagem ácido em indústrias de papel e celulose (Araji et al., 2017). Já o ácido itacônico tem importância industrial pelo seu potencial de substituir o ácido acrílico e metacrílico em razão da semelhança estrutural das três estruturas (Robert; Friebel, 2016).

O ácido málico ($C_4H_6O_5$) também é um intermediário no ciclo de Krebs e foi classificado como uma das principais moléculas-alvo de processos bioquímicos, sendo alvo de diversas pesquisas para otimizar condições de produção (Trichez et al., 2018). Sendo enantiomericamente puro, o ácido L-málico é desejável para aplicações nas indústrias alimentícia, farmacêutica e de polímeros. Embora a bioconversão de fumarato a malato seja um processo industrial estabelecido, não há um processo comercial estabelecido para a produção de ácido L-málico a partir de substrato sacaríneo, o que tornaria o método biotecnológico de produção do ácido málico economicamente mais viável (Hronská; Micháliková; Rosenberg, 2017).

Diante da relevância estratégica desses ácidos, o presente trabalho teve como objetivo identificar os microrganismos mais citados em documentos científicos e de patentes para produção de ácido 3-hidroxiopropiônico, ácido itacônico, ácido fumárico e ácido málico. Em posse dessas informações, oportunidades poderão ser criadas para os microrganismos da Coleção de Microrganismos e Microalgas Aplicados à Agroenergia

e Biorrefinarias – CMMAABio, visando o desenvolvimento de novas tecnologias de produção destes ácidos em futuros projetos de Pesquisa, Desenvolvimento e Inovação.

Material e Métodos

As buscas foram realizadas em documentos científicos e patentários, recuperados nas bases de dados *Web of Science* (WoS) e *Derwent Innovation Index* (DII), respectivamente, empregando os termos listados na Tabela 1 no campo “tópico”. Aos termos das buscas foram associados operadores booleanos e caracteres curingas para aumentar a quantidade de documentos recuperados. À busca de documentos patentários, agregou-se também a Classificação Internacional de Patente (CIP) C12P, associadas a processos bioquímicos, para captar todos os documentos referenciados. O intervalo temporal escolhido foi entre de janeiro de 2008 a janeiro de 2020.

Os gêneros e/ou as espécies dos microrganismos foram identificados por mineração de palavras de resumos desses documentos, empregando o sistema Vantage Point®.

Tabela 1. Estratégia de busca para prospecção de microrganismos produtores dos ácidos orgânicos de interesse.

| Nome comum do ácido orgânico | Estratégia de busca (termos associados) | | |
|------------------------------|---|--|-------------------|
| | Sinônimos dos ácidos orgânicos | Microrganismos e processos envolvidos | Busca de patentes |
| 3-HP | “3-Hydroxypropanoic acid” or “3-hydroxypropanoate” or “3-HPA” or “3-Hydroxypropionic acid” or 3-HP | | |
| Fumárico | “fumaric acid” or fumarate or “trans-Butenedioic acid” | AND | |
| Itacônico | “itaconic acid” or itaconate or “2-Methylenesuccinic acid” or “Methylenebutanedioic acid” or “Methylenesuccinic Acid” or “Propylenedicarboxylic acid” or “2-methylidenebutanedioic acid” or “2-Propene-1,2-dicarboxylic acid” | enzym* OR ferment* or yeast* or fung* or bacteri* or microorganism\$ | AND C12P* |
| Málico | “malic acid” or malate or “2-hydroxysuccinic acid” or “2-hydroxybutanedioic acid” | | |

Resultados e Discussão

A Tabela 2 apresenta as quantidades de documentos recuperados por meio das estratégias de buscas apresentadas na seção anterior, incluindo as razões de patente/artigo, em ordem crescente.

A razão numérica entre quantidades de documentos patentários e científicos recuperadas em uma busca suscita o estágio de maturidade de tecnologias existentes no mercado-alvo. Tal relação decorre do aspecto tecnológico de uma patente e a relação de

uma publicação a atividades científicas (Quintella et al., 2011). Partindo dessa premissa, a predominância de documentos patentários em relação aos científicos denotam alta maturidade de tecnologias bioquímicas associadas aos quatro ácidos orgânicos em análise, principalmente para o ácido itacônico.

Tabela 2. Quantidade de documentos recuperados e proporção patente/artigo.

| Ácido | Documentos Patentários | Documentos científicos | Razão patente/artigo |
|-----------|------------------------|------------------------|----------------------|
| 3-HP | 302 | 271 | 1,11 |
| Málico | 4732 | 3299 | 1,43 |
| Fumárico | 2371 | 1609 | 1,47 |
| Itacônico | 624 | 322 | 1,93 |

Nas próximas tabelas, as bactérias e os fungos (leveduriformes e filamentosos) produtores dos ácidos de interesse estarão grifados em amarelo e em azul, respectivamente.

A Tabela 3 apresenta os microrganismos associados à produção de ácido 3-HP e o respectivo número de ocorrência nos documentos científicos e patentários. A busca bibliométrica recuperou 4 microrganismos, enquanto a patentométrica 54, dos quais somente os 14 mais citados estão apresentados. Verificou-se que todos os microrganismos recuperados na pesquisa bibliométrica estão presentes também nos documentos de patente, mesmo que somente em termos de gênero.

Tabela 3. Microrganismos prospectados em documentos patentários e bibliográficos sobre produção de ácido 3-HP.

| Documentos Científicos | | Documentos Patentários | |
|------------------------|---------------------------------|------------------------|----------------------------|
| Número de ocorrências | Microrganismo | Número de ocorrências | Microrganismo |
| 29 | <i>Klebsiella pneumoniae</i> | 95 | <i>Escherichia coli</i> |
| 21 | <i>Escherichia coli</i> | 94 | <i>Escherichia sp.</i> |
| 13 | <i>Lactobacillus reuteri</i> | 62 | <i>Saccharomyces sp.</i> |
| 12 | <i>Saccharomyces cerevisiae</i> | 43 | <i>Pseudomonas sp.</i> |
| | | 39 | <i>Bacillus sp.</i> |
| | | 37 | <i>Klebsiella sp.</i> |
| | | 37 | <i>S. cerevisiae</i> |
| | | 35 | <i>Candida sp.</i> |
| | | 35 | <i>Clostridium sp.</i> |
| | | 33 | <i>Pichia sp.</i> |
| | | 30 | <i>Corynebacterium sp.</i> |
| | | 25 | <i>Kluyveromyces sp.</i> |
| | | 21 | <i>Salmonella sp.</i> |
| | | 20 | <i>Lactobacillus sp.</i> |

Percebe-se que *Escherichia coli* é um dos microrganismos mais usados na produção de ácido 3-HP, com quantidade importante de citações em trabalhos científicos e em documentos de patente. Essa bactéria é utilizada como uma biofábrica celular para expressão heteróloga deste ácido, assim como de vários outros bioprodutos.

A Tabela 4 apresenta os microrganismos associados à obtenção de ácido málico citados na literatura científica e patentária. A busca bibliométrica recuperou 28 microrganismos, enquanto a patentométrica, 22. Serão apresentados os dez mais citados em ambos os tipos de documentos recuperados.

Para o ácido málico, existe uma grande diversidade de microrganismos produtores dentre bactérias, leveduras e fungos filamentosos tanto na pesquisa bibliométrica quanto patentométrica, embora os gêneros *Escherichia* e *Aspergillus* tenham quantidades significativas de documentos relatados. A bactéria *Oenococcus oeni*, mais citada da pesquisa bibliométrica, é o microrganismo responsável pela conversão de ácido málico em ácido láctico no processo de fermentação maloláctica, tornando o vinho menos ácido e mais palatável (Fahimi; Brandam; Taillandier, 2014).

Tabela 4. Microrganismos prospectados em documentos patentários e bibliográficos sobre produção de ácido málico.

| Documentos Científicos | | Documentos Patentários | |
|------------------------|----------------------------------|------------------------|----------------------------|
| Número de ocorrências | Microrganismo | Número de ocorrências | Microrganismo |
| 66 | <i>Oenococcus oeni</i> | 36 | <i>Escherichia coli</i> |
| 62 | <i>Saccharomyces cerevisiae</i> | 29 | <i>Bacillus</i> sp. |
| 43 | <i>Escherichia coli</i> | 29 | <i>Escherichia</i> sp. |
| 33 | <i>Aureobasidium pullulans</i> | 27 | <i>Saccharomyces</i> sp. |
| 27 | <i>Lactobacillus plantarum</i> | 24 | <i>Lactobacillus</i> sp. |
| 22 | <i>Schizosaccharomyces pombe</i> | 19 | <i>Aspergillus</i> sp. |
| 19 | <i>Rhodobacter sphaeroides</i> | 11 | <i>Aspergillus niger</i> |
| 16 | <i>Yarrowia lipolytica</i> | 11 | <i>Clostridium</i> sp. |
| 15 | <i>Bacillus subtilis</i> | 11 | <i>Corynebacterium</i> sp. |
| 10 | <i>Aspergillus oryzae</i> | 11 | <i>Pichia</i> sp. |

A Tabela 5 apresenta os microrganismos e o número de documentos relacionados com a obtenção de ácido fumárico citados na literatura científica e patentária. A busca bibliométrica recuperou 10 microrganismos, enquanto a patentométrica 75, embora somente os 21 mais recorrentes estejam apresentados na tabela.

Da mesma forma que o ácido 3-HP, *Escherichia coli* recombinante também é um dos microrganismos mais usados na obtenção de ácido fumárico, com cenário similar em documentos científicos e patentários. No entanto, os outros microrganismos mais citados em cada tipo de documento diferem de forma considerável, o que leva a crer que há cenários distintos, com maior ou menor maturidade tecnológica, embora todos os microrganismos prospectados na pesquisa bibliométrica também tenham sido identificados na pesquisa patentométrica (dados parcialmente mostrados), ao menos em relação ao gênero, exceto *Desulfovibrio* sp.

Tabela 5. Microrganismos prospectados em documentos patentários e bibliográficos sobre produção de ácido fumárico.

| Documentos Científicos | | Documentos Patentários | |
|------------------------|---------------------------------|------------------------|--------------------------------|
| Número de ocorrências | Microrganismo | Número de ocorrências | Microrganismo |
| 44 | <i>Rhizopus oryzae</i> | 200 | <i>Escherichia coli</i> |
| 32 | <i>Escherichia coli</i> | 89 | <i>Lactobacillus</i> sp. |
| 19 | <i>Saccharomyces cerevisiae</i> | 88 | <i>Pichia</i> sp. |
| 13 | <i>Geobacter sulfurreducens</i> | 80 | <i>Aspergillus</i> sp. |
| 11 | <i>Geobacter</i> sp. | 78 | <i>Clostridium</i> sp. |
| 10 | <i>Shewanella</i> sp. | 75 | <i>Pseudomonas</i> sp. |
| 8 | <i>Rhizopus arrhizus</i> | 74 | <i>Corynebacterium</i> sp. |
| 7 | <i>Aspergillus oryzae</i> | 73 | <i>Kluyveromyces</i> sp. |
| 6 | <i>Desulfovibrio</i> sp. | 66 | <i>Lactococcus</i> sp. |
| 5 | <i>Yarrowia lipolytica</i> | 56 | <i>Candida</i> sp. |
| | | 55 | <i>Rhizopus</i> sp. |
| | | 55 | <i>Y. lipolytica</i> |
| | | 45 | <i>Rhodococcus</i> sp. |
| | | 36 | <i>Debaryomyces</i> sp. |
| | | 34 | <i>Schizosaccharomyces</i> sp. |
| | | 29 | <i>Cupriavidus</i> sp. |
| | | 27 | <i>Streptomyces</i> sp. |
| | | 26 | <i>Klebsiella</i> sp. |
| | | 26 | <i>Salmonella</i> sp. |
| | | 25 | <i>Enterobacter</i> sp. |
| | | 25 | <i>Zymomonas</i> sp. |

A Tabela 6 apresenta os microrganismos associados à produção de ácido itacônico citados na literatura científica e patentária. A busca bibliométrica recuperou 5 microrganismos, enquanto a patentométrica, 45, porém somente os 17 mais representativos estão mostrados.

Diferentemente dos resultados relatados para os ácidos 3-HP e fumárico em que predominava a ocorrência de bactérias, principalmente em relação a patentes, para o ácido itacônico predominam no aspecto científico e tecnológico fungos do gênero *Aspergillus* sp., significativamente pela espécie *A. terreus*. Este resultado é corroborado por Nemestóthy et al. (2020), que afirmam que *A. terreus* é uma linhagem eficiente para produção de ácido itacônico por sistemas de fermentação submersa.

Tabela 6. Microrganismos prospectados em documentos patentários e bibliográficos sobre produção de ácido itacônico.

| Documentos Científicos | | Documentos Patentários | |
|------------------------|----------------------------|------------------------|---------------------------------|
| Número de ocorrências | Microrganismo | Número de ocorrências | Microrganismo |
| 53 | <i>Aspergillus terreus</i> | 64 | <i>Aspergillus</i> sp. |
| 13 | <i>Ustilago maydis</i> | 60 | <i>Saccharomyces</i> sp. |
| 10 | <i>Escherichia coli</i> | 46 | <i>Bacillus</i> sp. |
| 9 | <i>Aspergillus niger</i> | 45 | <i>Escherichia</i> sp. |
| 5 | <i>Yarrowia lipolytica</i> | 45 | <i>Saccharomyces cerevisiae</i> |
| | | 42 | <i>Candida</i> sp. |
| | | 39 | <i>Pichia</i> sp. |
| | | 36 | <i>E. coli</i> |
| | | 35 | <i>Trichoderma</i> sp. |
| | | 31 | <i>Yarrowia</i> sp. |
| | | 26 | <i>Kluyveromyces</i> sp. |
| | | 25 | <i>Corynebacterium</i> sp. |
| | | 24 | <i>Clostridium</i> sp. |
| | | 24 | <i>Fusarium</i> sp. |
| | | 21 | <i>Lactobacillus</i> sp. |
| | | 21 | <i>Schizosaccharomyces</i> sp. |
| | | 20 | <i>Pseudomonas</i> sp. |

Conclusões

A aplicação das ferramentas de prospecção tecnológica permitiu a identificação de diversos microrganismos envolvidos na produção bioquímica de ácidos 3-HP, fumárico, itacônico e málico. Há predomínio de bactérias para a produção de ácidos 3-HP e fumárico, de fungos para a produção de ácido itacônico e equilíbrio entre bactérias e fungos para ácido málico. Essa diversidade cria oportunidades de bioprospecção e agregação de valor à Coleção de Microrganismos e Microalgas Aplicados à Agroenergia e Biorrefinarias – CMMAABio, que podem ser avaliados em futuros projetos de Pesquisa, Desenvolvimento e Inovação da Embrapa.

Agradecimentos

FAPDF e Embrapa pelo apoio financeiro e CNPq pela bolsa PIBIC.

Referências

ARAJI, N.; MADJINZA, D. D.; CHATEL, G.; MOORES, A.; JÉRÔME, F.; VIGIER, K. D. O. Synthesis of maleic and fumaric acids from furfural in the presence of betaine hydrochloride and hydrogen peroxide. **Green Chemistry**, London, v. 19, n. 1, p. 98-101, 2017. Disponível em <https://doi.org/10.1039/C6GC02620F>. Acesso em 19 set. 2020.

DE JONG, E.; STICHNOTHE, H.; BELL, G.; JØRGENSEN, H. **Bio-Based Chemicals: a 2020 Update**. Paris: IEA Bioenergy, 2020. Disponível em: <http://task42.ieabioenergy.com/wp-content/uploads/2020/02/Bio-based-chemicals-a-2020-update-final-200213.pdf>. Acesso em 29 set. 2020.

FAHIMI, N.; BRANDAM, C.; TAILLANDIER, P. A mathematical model of the link between growth and L-malic acid consumption for five strains of *Oenococcus oeni*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, New York, v. 30, n. 12, p. 3163-3172, 2014. Disponível em <https://dx.doi.org/10.1007/s11274-014-1743-8>. Acesso em 18 set. 2020.

HRONSKÁ, H.; MICHÁLIKOVÁ, S.; ROSENBERG, M. Microbial production of specialty C4 dicarboxylic acids from maleic anhydride. **Journal of Food and Nutrition Research**, Newark, v. 56, n. 3, p. 219-231, 2017. Disponível em <https://www.researchgate.net/publication/320346177>. Acesso em 19 set. 2020.

JIMENEZ-QUERO, A.; POLLET, E.; ZHAO, M.; MARCHIONI, E.; AVEROUS, L.; PHALIP, V. Fungal Fermentation of Lignocellulosic Biomass for Itaconic and Fumaric Acid Production. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, Seoul, v. 27, n. 1., p. 1-8, 2017. Disponível em <https://doi.org/10.4014/jmb.1607.07057>. Acesso em 18 set. 2020.

NEMESTÓTHY, N.; KOMÁROMY, P.; BAKONYI, P.; TÓTH, A. L.; TÓTH, G.; GUBICZA, L.; BÉLAFI-BAKÓ, K. Carbohydrate to Itaconic Acid Conversion by *Aspergillus terreus* and the Evaluation of Process Monitoring Based on the Measurement of CO₂. **Waste and Biomass Valorization**, New York, v. 11, p. 1069–1075, 2020. Disponível em <https://doi.org/10.1007/s12649-019-00729-3>. Acesso em 18 set. 2020.

NEWTON, A.; LESCAI, F.; CARREZ, D.; CARUS, M.; GRIFFON, M.; JILKOVA, J.; JUHÁSZ, A.; LANGE, L.; MAVSAR, R.; PURSULA, T.; ORTEGA, C.V. **Expert Grupo Report: review of the EU Bioeconomy Strategy and its action plan**. Luxembourg: Publications Office of the European Union, 2017. Disponível em https://ec.europa.eu/research/bioeconomy/pdf/publications/bioeconomy_expert_group_report.pdf. Acesso em 19 set. 2020.

QUINTELLA, C. M.; CERQUEIRA, G. S.; MIYAZAKI, S. F.; HATIMONDI, S. A.; MUSSE, A. P. S. **CAPTURE DE CO₂: Panorama (Overview) - Mapeamento Tecnológico da Captura de CO₂ baseado em patentes e artigos**. 1. ed. Salvador: Editora da UFBA, 2011. v. 1.

ROBERT, T.; FRIEBEL, S. Itaconic acid – a versatile building block for renewable polyesters with enhanced functionality. **Green Chemistry**, London, v. 18, n. 10, p. 2922–2934, 2016. Disponível em <https://doi.org/10.1039/C6GC00605A>. Acesso em 19 set. 2020.

TRICHEZ, D.; AURIOL, C.; BAYLAC, A.; IRAGUE, R.; DRESSAIRE, C.; CARNICER-HERAS, M.; HEUX, S.; FRANÇOIS, J. M.; WALTHER, T. Engineering of *Escherichia coli* for Krebs cycle-dependent production of malic acid. **Microbial Cell Factories**, New York, v. 17, artigo nº 113, 2018. Disponível em <https://doi.org/10.1186/s12934-018-0959-y>. Acesso em 18 set. 2020.

WANG, Y.; SUN, T.; GAO, X.; SHI, M.; WU, L.; CHEN, L.; ZHANG, W. Biosynthesis of platform chemical 3-hydroxypropionic acid (3-HP) directly from CO₂ in cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. **Metabolic Engineering**, Amsterdam, v. 34, p. 60-70, 2016. Disponível em <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2015.10.008>. Acesso em 18 set. 2020.

WERPY, T.; PETERSON, G. **Top Value Added Chemicals From Biomass Volume I: Results of Screening for Potential Candidates from Sugars and Synthesis Gas**. Oak Ridge: PNNL and NREL, 2004. Disponível em: <https://www.nrel.gov/docs/fy04osti/35523.pdf>. Acesso em 29 set. 2020.

Atividade antioxidante de extratos hidroalcoólicos obtidos de diferentes biomassas lignocelulósicas

Raquel Bombarda Campanha¹, Jessika Layane da Cruz Rocha², Andrea Samara da Silva Moraes³, Patrícia Abrão Oliveira Molinari⁴, Simone Mendonça⁵

Resumo

A incorporação dos princípios da química verde nos processos produtivos é imprescindível para o desenvolvimento sustentável. Produzir biocombustíveis e químicos com alto valor agregado de forma integrada vai de encontro a crescente demanda da bioeconomia. Neste sentido, o objetivo do trabalho foi produzir extratos fluido ricos em compostos bioativos a partir de uma biomassa lignocelulósica selecionada com base sua atividade biológica e perfil químico, paralelamente à produção de energia ou biocombustível. As matérias-primas utilizadas neste estudo foram: sorgo biomassa (*Sorghum bicolor*), casca de soja (*Glycine max*), casca de algodão (*Gossypium hirsutum*), casca de semente de algodão (*Gossypium hirsutum*), casca de coco verde (*Cocos nucifera*), palhada de cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum*), capim setária (*Setaria sphacelata*) e cana-do-reino (*Arundo donax*). Os extratos hidroalcoólicos dessas matérias-primas foram caracterizados quanto ao teor de fenóis e flavonoides totais e a atividade antioxidante foi avaliada através dos métodos de sequestro de radical livre (DPPH e ABTS), poder de redução do ferro (FRAP) e pelo sistema de cooxidação do β -caroteno/ácido linoleico. Os resultados obtidos para o teor de fenóis totais variaram de 23 ± 1 a 138 ± 3 μg EAG/mg de extrato seco, sendo que o extrato que apresentou maior teor de fenólicos totais foi o de casca de semente de algodão. Para o método de DPPH e ABTS os resultados obtidos para a casca da semente do algodão e casca de algodão foram os maiores, mais próximos ao do extrato de alecrim. Fato que se repetiu na avaliação pelo método FRAP. As outras biomassas tiveram atividade antioxidante bastante inferior. Na avaliação que considera a ação na proteção de material lipídico, os extratos de casca de algodão e de sorgo, tiveram as maiores atividades antioxidante.

Palavras-chave: bioeconomia, compostos bioativos, resíduos agroindustriais, TEAC.

Introdução

De acordo com a Farmacopeia Brasileira, extratos fluidos são preparações líquidas obtidas de drogas vegetais ou animais por extração com um líquido apropriado (Brasil, 2010). Extratos vegetais são cada vez mais incorporados a formulações cosméticas,

¹ Química, mestre em Ciência de Alimentos, analista da Embrapa Agroenergia, raquel.campanha@embrapa.br

² Farmacêutica, mestranda em Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, jessikalayanerocha@gmail.com

³ Farmacêutica, estagiária da Embrapa Agroenergia, moares.samara@hotmail.com

⁴ Farmacêutica, doutora em Química, pesquisadora da Embrapa Agroenergia, patricia.oliveira@embrapa.br

⁵ Farmacêutica, doutora em Saúde Pública, pesquisadora da Embrapa Agroenergia, simone.mendonca@embrapa.br

e a adição destes ocorre devido às atividades clínicas atribuídas aos mesmos, como atividade antioxidante, atividade anti-inflamatória e anti-envelhecimento.

Os antioxidantes desempenham um papel importante na inibição e eliminação de radicais livres. Esta propriedade dos extratos pode ser explorada tanto para o efeito in vivo (proteção aos seres humanos prevenindo o envelhecimento dos órgãos, o câncer, a disfunção imunológica e outras doenças que estão intimamente relacionadas com o dano oxidativo em células induzidas por radicais livres (Zhang et al., 2011)) quanto como na prevenção de deterioração de formulações cosméticas, alimentícias ou de biodiesel.

Existe uma tendência de substituição dos antioxidantes sintéticos como hidroxianisole butilado (BHA), o hidroxitolueno butilado (BHT) e a tert-butilhidroquinona (TBHQ) por antioxidantes naturais, formados principalmente de metabólitos secundários de plantas. Grande parte dos antioxidantes naturais são compostos fenólicos, em particular os flavonoides e os ácidos hidroxicinâmicos (Balasundran et al., 2006).

Em decorrência da grande diversidade química existente, em especial entre os compostos fenólicos, vários ensaios têm sido desenvolvidos para avaliação da capacidade antioxidante de amostras. Sendo os mais populares o 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato) (ABTS), o 2,2-difenil-1-picrilhidrazila (DPPH) e o *ferric reducing antioxidant power* (FRAP). Estes ensaios diferem em relação ao mecanismo de ação, às espécies alvo, às condições reacionais e na forma como os resultados são expressos (Oliveira et al., 2009).

A determinação da capacidade sequestrante do radical ABTS^{•+} está baseada na habilidade dos antioxidantes em capturar este radical, causando decréscimo da absorvância. O radical é obtido a partir de um precursor, o ácido 2,2'-azino-bis-3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico, composto cromóforo estável e solúvel em meios orgânicos e aquosos (Torres et al., 2017). O DPPH é um radical livre estável que em metanol possui uma absorção característica a 518 nm de cor roxa. Na presença de sequestradores de radicais, que fornecem átomos de hidrogênio ou doam elétron, a forma reduzida do radical é acompanhada pela perda da cor (Sanchez, 2017). O princípio do método FRAP é baseado na produção do íon Fe²⁺ a partir da redução do íon Fe³⁺, encontrado no complexo 2,4,6-tripiridil-s-triazina (TPTZ) na presença de antioxidantes. Esta propriedade indica que os compostos antioxidantes são doadores de elétrons e podem reduzir os intermediários oxidados do processo de peroxidação lipídica, de forma que possam atuar como antioxidantes primários e secundários (Ghahremani-Majd; Dashti, 2015). Outro teste antioxidante usado neste estudo baseia-se na perda da cor amarela do β-caroteno devido à sua reação com os produtos da oxidação do ácido linoleico em uma emulsão. A avaliação do sistema β-caroteno/ácido linoleico determina a capacidade de uma amostra de proteger um substrato lipídico da oxidação (Duarte-Almeida et al., 2006).

Produzir biocombustíveis e químicos com alto valor agregado de forma integrada, dentro do conceito de biorrefinarias, foi a motivação deste trabalho. A produção de extrato bioativos poderia ser inserida como um processo preliminar antes da produção do etanol de segunda geração ou cogeração, integrado assim ao processo de produção de biocombustíveis. As matérias-primas utilizadas neste estudo foram: sorgo biomassa (*Sorghum bicolor*), casca de soja (*Glycine max*), casca de algodão (*Gossypium hirsutum*), casca de semente de algodão (*Gossypium hirsutum*), casca de coco verde (*Cocos nucifera*), palhada de cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum*), capim setária (*Setaria sphacelata*) e cana-do-reino (*Arundo donax*). Estas biomassas foram selecionadas por estarem ligadas

diretamente a cadeia agroenergética para a produção de biocombustíveis/energia ou serem resíduos gerados em outras cadeias, mas que possuem potencial para a produção de energia.

Material e Métodos

Material

O presente trabalho utilizou extratos hidroalcoólicos liofilizados obtidos a partir das seguintes biomassas: casca de algodão e casca de semente de algodão doados pela empresa Dual (Campo Novo do Parecis-MT), palhada de cana-de-açúcar da empresa Jales Machado (Goianésia-GO), casca de coco verde (CEASA de Brasília-DF) e casca de soja (Cooperativa Agrícola do Rio Preto, localizada em Planaltina-DF); e plantas inteiras: setária e arundo coletados em áreas experimentais da Embrapa Agroenergia no Distrito Federal e sorgo da Embrapa Milho e Sorgo (Sete Lagoas-MG). Um extrato comercial de alecrim foi usado como referência.

Quantificação de Fenóis Totais

A quantificação de fenóis totais foi realizada através do método de Folin-Ciocalteu com adaptações de Waterhouse (2002). Os extratos foram solubilizados em etanol 80:20 (v/v) em diferentes concentrações. Em tubos de ensaio foi pipetado 100 µL de cada extrato, em triplicata, adicionados 7mL de água deionizada e 500 µL de reagente de Folin-Ciocalteu, após um período mínimo de 1 minuto e máximo de 8 minutos foi adicionado 1,5 mL de carbonato de sódio 20%. Os tubos foram deixados ao abrigo da luz por 2h antes da leitura da absorbância a 765 nm em espectrofotômetro. A curva de calibração foi feita com ácido gálico nas concentrações: 10, 100, 200, 300, 400 e 500 µg/mL. Os resultados foram expressos como µg de ácido gálico/mg de extrato.

Quantificação de Flavonoides Totais

A quantificação de flavonoides totais foi realizada de acordo com metodologia descrita por Siatka e Kasparova (2010). Os extratos foram solubilizados em etanol 80:20 (v/v) em diferentes concentrações. Em tubos de ensaio foi pipetado 1 mL de cada extrato, em triplicata, adicionados 100 µL de solução reativa de cloreto de alumínio 2% (p/v) e 1,4 mL de ácido acético 5% em metanol (v/v). Os tubos foram deixados ao abrigo da luz por 30 minutos antes da leitura da absorbância a 425 nm em espectrofotômetro. A curva de calibração foi feita com quercetina nas concentrações: 1, 10, 20, 30, 40 e 50 µg/mL. Os resultados foram expressos como µg de quercetina/mg de extrato.

Atividade antioxidante pelo método de sequestro do radical 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato) (ABTS^{•+})

O ensaio avalia a capacidade que os extratos possuem de sequestrar o radical ABTS^{•+} foi realizado conforme descrito por Re et al. (1999) com modificações. Os extratos foram solubilizados em etanol 80:20 (v/v) em diferentes concentrações. A solução do radical catiônico ABTS^{•+} foi preparada com 5 mL da solução estoque de ABTS (ácido

2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfônico)) a 7 mM e 88 µL da solução de persulfato de potássio a 140 mM, mantida ao abrigo de luz por 16 horas, a temperatura ambiente. Após esse período, uma alíquota da solução foi diluída em metanol até obter absorvância de $0,70 \pm 0,05$ a 734 nm. Em microplaca de 96 poços, foram pipetados 20 µL de cada extrato, em triplicata, e adicionados 280 µL de radical ABTS^{•+}. A microplaca foi deixada por 6 minutos ao abrigo de luz antes da leitura da absorvância a 734 nm em espectrofotômetro. Os resultados foram expressos em µg de trolox/mg de extrato e, para isso, foi feita uma curva de calibração com Trolox nas concentrações: 1, 2,5, 5, 25 e 50 µg/mL.

Atividade antioxidante pelo método de sequestro do radical 2,2 - difenil-1-picrilhidrazila (DPPH)

O método foi realizado conforme descrito por Pires et al. (2017) com modificações. Os extratos foram solubilizados em etanol 80:20 (v/v) em diferentes concentrações. Em microplaca de 96 poços, foram pipetados 22 µL de cada extrato, em sextuplicata, e adicionados 200 µL de solução de DPPH a 0,06 mg/mL. A microplaca foi deixada por 30 minutos ao abrigo de luz antes da leitura da absorvância a 518 nm em espectrofotômetro. Os resultados foram expressos em µg de trolox/mg de extrato e, para isso, foi feita uma curva de calibração com Trolox nas concentrações: 20, 65, 110, 155 e 200 µg/mL.

Atividade antioxidante pelo método de redução do íon férrico (FRAP)

O ensaio foi realizado conforme descrito por Benzie e Strain (1996) com modificações. Os extratos foram solubilizados em etanol 80:20 (v/v) em diferentes concentrações. A solução reagente FRAP foi preparada com 50 mL de tampão acetato de sódio 0,3 M pH 3,6, 5 mL de solução TPTZ 10 mM (em HCl 40 mM) e 5 mL de solução de cloreto férrico 20 mM. Em microtubos de 2 mL, foram pipetados 30 µL de cada extrato, em triplicata, 90 µL de água deionizada e 900 µL de reagente FRAP. Após agitação, três alíquotas de 200 µL foram transferidas de cada microtubo para microplaca de 96 poços. A microplaca foi incubada a 37 °C por 30 minutos ao abrigo de luz antes da leitura da absorvância a 595 nm em espectrofotômetro. Os resultados foram expressos em µg de trolox/mg de extrato e, para isso, foi feita uma curva de calibração Trolox nas concentrações: 25, 50, 100, 200 e 400 µg/mL.

Atividade antioxidante pelo sistema de cooxidação do β-caroteno/ácido linoleico

Esse método foi adaptado do estudo publicado por Duarte-Almeida et al. (2006). Os extratos foram solubilizados em etanol 80:20 (v/v) a 1 mg/mL. Para o preparo da mistura reativa, adicionou-se 80 µL de ácido linoleico, 1600 µL de Tween 20, 1000 µL de solução de β-caroteno a 2 mg/mL em clorofórmio e 5 mL de clorofórmio. A mistura foi submetida à completa evaporação do clorofórmio em rotaevaporador. Adicionou-se água previamente saturada com oxigênio até a mistura apresentar absorvância entre 0,6 e 0,7 em 470 nm. Em microplaca de 96 poços foram 10 µL de cada extrato, em pelo menos quadruplicata, e adicionados de 250 µL de mistura reativa. A microplaca

foi incubada a 50°C por 2 horas ao abrigo de luz, a leitura da absorbância a 470 nm em espectrofotômetro foi registrada no início (tempo inicial) e após os 120 minutos de reação (tempo final). Os resultados foram expressos como porcentagem de inibição da oxidação, calculada em relação ao decaimento da absorbância do controle (etanol 80:20), que deve ser menor que 0,2 de absorbância para ser considerado que houve 100% de oxidação, após 120 min de reação.

Análise Estatística

Todos os ensaios foram realizados em no mínimo triplicata certificando-se que o coeficiente de variação das replicatas analíticas fosse menor que 5%, além disso, foi assegurado que o R^2 da regressão linear das curvas padrão tivesse valor próximo a 1. Os dados foram avaliados pelo emprego software Microsoft Excel (2016), abrangendo a análise descritiva dos dados pela análise de variância por ANOVA e comparação de médias pelo teste Tukey ($p < 0,05$).

Resultados e Discussão

Diversos estudos comprovaram a atividade antioxidante do alecrim na forma natural e sob a forma de extrato, sendo considerado uma das plantas que apresenta maior poder antioxidante (Basaga et al., 1997; Almeida-Doria; Regitano-D'Arce, 2000; Ramalho; Jorge, 2006). Por esse fato, extrato de alecrim comercial foi utilizado como referência em todas as análises realizadas com os extratos estudados no presente trabalho.

Os resultados da quantificação de fenóis totais estão apresentados na Figura 1a. Como era esperado, o extrato de alecrim possui o maior teor de fenóis totais, seguido pelo extrato de casca de semente de algodão, casca de algodão e casca de coco verde (138 ± 3 , 108 ± 3 e 77 ± 2 μg de ácido gálico/mg de extrato, respectivamente), enquanto que a casca de soja foi o extrato com o menor teor de compostos fenólicos totais (23 ± 1 μg de ácido gálico/mg de extrato).

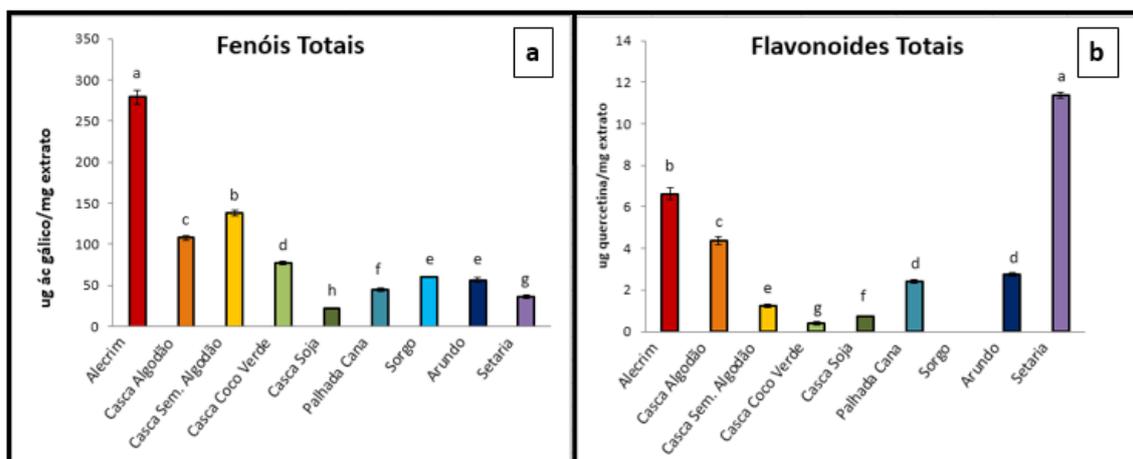


Figura 1. Teor de (a) fenóis totais e (b) flavonoides totais dos extratos hidroalcoólicos estudados. Letras iguais, dentro de cada método, não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

A quantificação de flavonoides totais (Figura 1b) mostrou que, entre os extratos estudados, o de setária teve o maior valor para esse parâmetro ($11,38 \pm 0,14 \mu\text{g}$ de quercetina/mg de extrato), o teor de flavonoides totais do extrato de sorgo encontrado estava abaixo do limite de quantificação do método usado.

A avaliação da atividade antioxidante está apresentada na Figura 2. Os resultados obtidos pelos métodos ABTS, DPPH e FRAP expressam o resultado em equivalentes de Trolox, que permite a comparação direta de resultados executados em laboratórios com diferentes ajustes metodológicos.

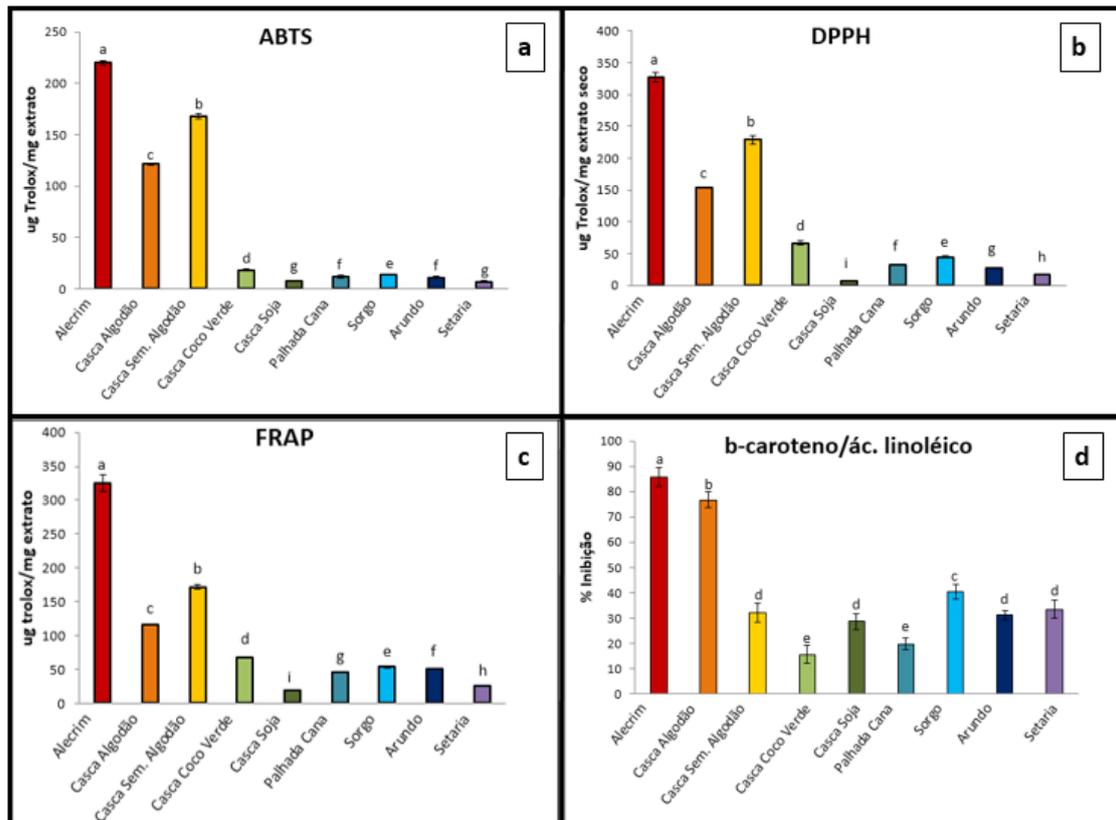


Figura 2. Atividade Antioxidante pelos métodos: (a) ABTS, (b) DPPH, (c) FRAP e (d) sistema β-caroteno/ácido linoleico. Letras diferentes, dentro de cada método, apresentam diferença estatística pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

A Figura 2a mostra que pelo método ABTS os extratos de casca de semente de algodão e casca de algodão foram, apesar de menores, os que apresentaram atividade antioxidante mais próxima ao do alecrim, enquanto os outros extratos avaliados apresentaram valores bem abaixo desses. Um perfil muito próximo foi obtido com o método DPPH (Figura 2b), onde o extrato de alecrim apresentou a maior atividade, seguido por casca de semente de algodão e casca de algodão, respectivamente, e o extrato de casca de coco verde aparece se destacando levemente dos extratos com valores mais baixos. Com o método ABTS pode-se medir a atividade de substâncias com natureza hidrofílica e lipofílica, fator limitante no ensaio de DPPH, que apresenta pouca reprodutibilidade para substâncias com natureza hidrofílica (Rufino et al., 2007). As capacidades antioxidantes obtidas pelo método FRAP (Figura 2c), apesar de seguir o mesmo perfil daqueles encontrados com os métodos ABTS e DPPH, apresentaram maiores diferenças entre os extratos estudados e o alecrim. Em comparação ao

observado nos outros métodos, pelo sistema β -caroteno/ácido linoleico foi possível observar a mudança no perfil da atividade antioxidante (Figura 2d) dos extratos, de modo que o extrato de casca de algodão apresentou valor mais próximo ao alecrim seguido pelo sorgo, e os extratos de casca de coco verde e palhada de cana de açúcar tiveram os valores mais baixos. O método de cooxidação do β -caroteno/ácido linoleico permite a avaliação da atividade de uma amostra ou composto ao proteger um substrato lipídico da oxidação, enquanto que métodos como o de inibição de radicais DPPH, por exemplo, baseiam-se na transferência de elétrons de um composto antioxidante para um oxidante (Duarte-Almeida et al., 2006), fato que explica a mudança no perfil das atividades antioxidantes observadas.

Os polifenóis compreendem o maior grupo dentre os compostos bioativos nos vegetais, sendo subdivididos em classes, de acordo com a estrutura química de cada substância. Os flavonoides formam uma das classes mais importantes quanto a atividades bioativas. No entanto, apesar da atividade antioxidante dos extratos avaliados guardar relação com o teor de fenóis totais, isto não ocorre com o teor de flavonoides. Indicando que possivelmente esta não é a classe de fenóis responsável pela ação antioxidante.

Conclusão

Dentre as biomassas estudadas, as que apresentaram melhor atividade antioxidante foram casca de semente algodão, casca de algodão e casca de coco-verde. Os métodos de avaliação antioxidante que se baseiam em captura de radicais livres ou poder redutor tiveram comportamentos similares, esses resultados estão de acordo com o encontrado na quantificação de fenóis totais. No entanto, no teste que avaliou a proteção de material lipídico contra a oxidação, a casca de algodão é que teve destacada ação antioxidante. Apesar de apresentar o maior teor de flavonoides totais, a setária não se sobressaiu em nenhum dos testes antioxidantes realizados.

Referências

- ALMEIDA-DORIA, R. F.; REGITANO-D'ARCE, Marisa AB. Antioxidant activity of rosemary and oregano ethanol extracts in soybean oil under thermal oxidation. **Food Science and Technology**, v. 20, n. 2, p. 197-203, 2000.
- BALASUNDRAM, N.; SUNDRAM, K.; SAMMAN, S. Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. **Food Chemistry**, 99, 191-203, 2006.
- BASAGA, Huveyda; TEKKAYA, Ceren; ACIKEL, Funda. Antioxidative and free radical scavenging properties of rosemary extract. **LWT-Food Science and Technology**, v. 30, n. 1, p. 105-108, 1997.
- BENZIE, I. F.; STRAIN, J. J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. **Analytical biochemistry**, v. 239, n. 1, p. 70-76, 1996.
- BRASIL. Farmacopeia Brasileira. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília: Anvisa; 2010.
- DUARTE-ALMEIDA, J. M. et al. Avaliação da atividade antioxidante utilizando sistema beta-caroteno/ácido linoléico e método de seqüestro de radicais DPPH. **Food Science and Technology**, v. 26, n. 2, p. 446-452, 2006.
- GHAHREMANI-MAJD, Hojat; DASHTI, Farshad. Chemical composition and antioxidant properties of cultivated button mushrooms (*Agaricus bisporus*). **Horticulture, Environment, and Biotechnology**, v. 56, n. 3, p. 376-382, 2015.
- OLIVEIRA, A. C.; VALENTIM, I. B.; GOULART, M. O. F. Fontes vegetais naturais de antioxidantes. **Química Nova**, Vol. 32, No. 3, 689-702, 2009.
- PIRES, Janaína et al. Ensaio em microplaca do potencial antioxidante através do método de sequestro do radical livre DPPH para extratos de algas. Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, 2017.

RAMALHO, Valéria C.; JORGE, Neuza. Atividade antioxidante do α -tocoferol e do extrato de alecrim em óleo de soja purificado. **Rev. Inst. Adolfo Lutz (Impr.)**, São Paulo, v. 65, n. 1, 2006.

RE, Roberta et al. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free radical biology and medicine**, v. 26, n. 9-10, p. 1231-1237, 1999.

RUFINO, M. D. S. M. et al. Metodologia científica: determinação da atividade antioxidante total em frutas pela captura do radical livre ABTS*. Embrapa Agroindústria Tropical-Comunicado Técnico (INFOTECA-E), 2007.

SÁNCHEZ, Carmen. Reactive oxygen species and antioxidant properties from mushrooms. **Synthetic and systems biotechnology**, v. 2, n. 1, p. 13-22, 2017.

SIATKA, T.; KASPAROVA, M. Seasonal variation in total phenolic and flavonoid contents and DPPH scavenging activity of *Bellis perennis* L. flowers. **Molecules**. V. 15, p. 9450-9461, 2010.

TORRES, Priscila Bezerra et al. Ensaio do potencial antioxidante de extratos de algas através do sequestro do ABTS^{•+} em microplaca. Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, 2017.

WATERHOUSE, A. L. Determination of total phenolics. Current Protocols in Food Analytical Chemistry. Seção I, Capítulo I, Unidade I 1.1, 2002.

ZHANG, J.; YUAN, K.; ZHOU, W.; ZHOU, J.; YANG, P. Studies on the active components and antioxidant activities of the extracts of *Mimosa pudica* Linn. **Pharmacognosy Magazine**, 2011.

Avaliação do perfil metabólico de extratos aquosos e hidroalcoólicos de sementes de *Crotalaria* spp.

Rodrigo Wesley Nascimento de Melo¹, Larissa Andreani Carvalho², José Antônio de Aquino Ribeiro³, Clenilson Martins Rodrigues⁴

Resumo

Extratos vegetais são utilizados há milênios em diversas aplicações, entre as quais destacam-se seu uso medicinal, como inseticidas naturais, antifúngicos e antioxidantes dentre outros. Cada vez mais se buscam alternativas naturais ao uso de produtos derivados da indústria química, e para tanto é necessária a prospecção de extratos com metabólitos secundários ativos para estas aplicações. O gênero *Crotalaria* possui em torno de 600 espécies e é encontrado na África, Índia, México e Brasil. Este trabalho buscou avaliar dois métodos de extração dos metabólitos das sementes de *Crotalaria spectabilis*, *Crotalaria breviflora*, *Crotalaria juncea* e *Crotalaria ochroleuca*, e identificar de maneira preditiva, nesses mesmos extratos, os metabólitos secundários que os compõem. Foram investigados dois métodos de extração, em triplicata, para cada biomassa. Um usando meio hidroalcoólico (etanol/água/ácido acético 7,00/2,95/0,05%) e outro usando meio aquoso. Avaliações do perfil cromatográfico foram realizadas por meio de cromatografia de ultra-alta eficiência (UHPLC) com o sistema UPLC *Acquity H-Class* acoplado ao detector de arranjos de fotodiodos (PDA) com varredura na faixa espectral de 200-400 nm. Para todas as biomassas avaliadas a extração em meio aquoso apresentou o maior rendimento, entretanto as extrações em meio hidroalcoólico também apresentaram rendimentos satisfatórios. De acordo com os dados cromatográficos e espectrais dos extratos de *C. Spectabilis* foi atribuída a provável ocorrência de aminoácidos, alcaloides, derivados da fenilalanina, flavonoides, flavonas e derivados do ácido hidroxicinâmico. Os dados cromatográficos e espectrais dos extratos de *C. breviflora* indicaram a presença de aminoácidos, alcaloides, flavonoides e derivados do ácido hidroxicinâmico. Já nos extratos de *C. Juncea* observou-se dados espectrais que corroboraram com a presença aminoácidos, flavonoides, alcaloides, derivados de fenilalanina e derivados de ácido hidroxicinâmico. Por fim, para os extratos de *C. ochroleuca* observou-se a provável ocorrência de alcaloides, derivados de ácido hidroxicinâmico, flavonas e flavonoides.

Palavras-chave: metabólitos secundários, crotalaria, métodos de extração.

¹ Graduado em Química, Universidade Católica Brasília, rodwesley1995@gmail.com

² Química, doutora em Físico-Química, analista da Embrapa Agroenergia, larissa.andreani@embrapa.br

³ Farmacêutico, mestre em Ciências Farmacêuticas, analista da Embrapa Agroenergia, jose.ribeiro@embrapa.br

⁴ Químico, doutor em Química, pesquisador da Embrapa Agroenergia, clenilson.rodrigues@embrapa.br

Introdução

Extratos vegetais são utilizados há milênios e nas mais variadas aplicações, entre as quais destacam-se o seu uso medicinal, como inseticidas naturais, antifúngicos e antioxidantes. A utilização em grande escala e de forma indiscriminada de produtos sintéticos, derivados da indústria química, têm ocasionado riscos à saúde humana, animal e ao meio ambiente, sendo notória a busca por seus respectivos substituintes menos nocivos. Assim, há grande interesse na prospecção de substâncias químicas de origem renovável que apresentem atividade farmacológica, antifúngica, inseticida, entre outras.

Crotalaria é um gênero que pertence à família *Fabaceae* e que possui em torno de 600 espécies, podendo ser encontrada na África, Índia, México e Brasil (Scupinari et al., 2020). Essas plantas também apresentam grande produção de biomassa verde e capacidade de fixação de nitrogênio atmosférico (Gardiano et al., 2010). Tanto as folhas quanto as sementes de *Crotalaria* apresentam alcaloides pirrolizidínicos (APs), sendo a monocrotalina o principal AP encontrado nas plantas desse gênero (Gardiano et al., 2010; Barreto et al., 2006). Esse composto apresenta alta toxicidade a vertebrados e, com isso, acredita-se que produza metabólitos secundários com potencial utilização inseticida em culturas agrícolas (Wang et al., 2002).

Diante disso, o objetivo deste trabalho foi avaliar a preparação de extratos aquosos e hidroalcoólicos de sementes de *Crotalaria spectabilis*, *Crotalaria breviflora*, *Crotalaria juncea* e *Crotalaria ochroleuca*, visando o alcance do máximo de rendimento de seus extrativos, bem como propor a identificação de classes de metabólitos secundários para viabilizar a estratégia de aplicação desses extratos em estudos futuros.

Material e Métodos

Sementes de *C. spectabilis*, *C. breviflora*, *C. juncea* e *C. ochroleuca* (Sementes Piraí Ltda) foram secas em estufa a 40°C até peso constante. Em seguida, as sementes foram moídas em moinho analítico portátil e tamisadas em agitador eletromagnético utilizando peneiras com tamanho de malha de 850, 425, 300 e 250 µm. Partículas menores que 250 µm também foram coletadas. A fração de 425 µm foi selecionada para os ensaios de extração devido a maior quantidade apresentada de material ao final da tamisação. Em seguida, cada uma das amostras passou por processos de extração em meio aquoso e hidroalcoólico, conforme detalhado a seguir. As atividades envolvendo a *C. breviflora*, por ser espécie nativa, foram registradas no SisGen sob o número A832F15.

Agitação em solução hidroalcoólica

Quantidade conhecida de biomassa (aprox. 10 g) foi mantida sob agitação por 48 h a temperatura ambiente em frasco fechado de 500 mL contendo 215 mL de solução de etanol/água/ácido acético 7,00/2,95/0,05%. Decorridas as 48 h, o conteúdo do frasco foi centrifugado e filtrado à vácuo, o sobrenadante foi reservado e a fração sólida restante foi novamente transferida para frasco fechado na presença de nova alíquota de 215 mL de solução hidroalcoólica, onde permaneceu sob agitação a temperatura ambiente por mais 24 h. O conteúdo do frasco foi novamente centrifugado e filtrado à vácuo e o sobrenadante desta etapa foi agregado ao sobrenadante anterior. Em seguida,

o sobrenadante final foi rotaevaporado para a retirada do etanol, congelado e liofilizado. A massa resultante do processo de liofilização foi utilizada para a determinação do rendimento da extração. Este procedimento foi realizado em triplicata para cada biomassa estudada.

Refluxo em solução aquosa

Quantidade conhecida de biomassa (aprox. 10 g) foi adicionada a um balão de fundo redondo de 500 mL. Em seguida, foi adicionada uma barra magnética e 430 mL de água destilada ao balão. Este balão foi acoplado a um condensador e colocado em banho de óleo a 100°C, onde permaneceu sob agitação magnética por 1 h. Após este período, a agitação foi interrompida, o extrato foi centrifugado e o sobrenadante foi filtrado à vácuo. A fração líquida foi congelada, liofilizada e pesada para a determinação do rendimento da extração. Este procedimento foi realizado em triplicata para cada biomassa estudada.

Análise cromatográfica

As amostras foram analisadas por cromatografia líquida de ultra-alta eficiência (UHPLC) em um cromatógrafo a líquido UPLC *Acquity H-Class* acoplado ao detector de arranjo de fotodiodos (PDA) com varredura na faixa espectral de 200-400 nm.

O extrato seco de cada uma das amostras foi preparado na concentração de 30 mg/mL em água:acetonitrila (1:1). Após esse preparo em béquer de 25 mL, todas as amostras ficaram em banho ultrassônico por 15 min e depois foram transferidas para tubos *falcon* onde foram centrifugadas por 10 min a 9000 rpm. Por fim, as amostras preparadas tiveram o sobrenadante filtrado em membrana omipore de PTFE hidrolifílico com 0,22 µm de poro. Alíquotas de 1 µL das amostras foram injetadas nas seguintes condições:

- Coluna *Acquity UPLC HSST3* 1,8 µm, 2,1 x 150 mm;
- Temperatura da coluna: 40°C;
- Modo de eluição: gradiente (Tabela 1);
- Fase móvel - Solvente A: H₂O/0,1% ácido trifluoracético (TFA); Solvente B: Acetonitrila/0,1% TFA.

Tabela 1. Gradiente de eluição empregado na análise por UHPLC-PDA dos compostos químicos presentes nos extratos obtidos.

| Tempo (min) | Fluxo (mL/min) | %A | %B |
|-------------|----------------|-----|-----|
| Inicial | 0.400 | 100 | 0 |
| 5.00 | 0.400 | 100 | 0 |
| 30.00 | 0.400 | 75 | 25 |
| 32.00 | 0.400 | 50 | 50 |
| 33.00 | 0.400 | 0 | 100 |
| 35.00 | 0.400 | 0 | 100 |
| 35.01 | 0.400 | 100 | 0 |
| 45.00 | 0.400 | 100 | 0 |

Resultados e Discussão

A Tabela 2 apresenta os rendimentos de extratos brutos obtidos para cada biomassa pelos métodos de extração utilizados.

Tabela 2. Rendimentos para as extrações hidroalcoólica e aquosa das sementes de crotalária obtidos em triplicata.

| Biomassa | Rendimento/Agitação hidroalcoólica (%) | Rendimento/Refluxo aquoso (%) |
|-----------------------|--|-------------------------------|
| <i>C. spectabilis</i> | 21,42 ± 0,45 | 31,45 ± 0,71 |
| <i>C. brevisflora</i> | 26,02 ± 0,65 | 31,16 ± 0,60 |
| <i>C. juncea</i> | 21,74 ± 0,25 | 50,61 ± 0,72 |
| <i>C. ochroleuca</i> | 15,47 ± 0,28 | 31,48 ± 0,86 |

Os valores de rendimento obtidos demonstram que o processo de extração por refluxo aquoso fornece maior quantidade de extrato bruto para todas as biomassas avaliadas. Porém as extrações realizadas por processo com agitação hidroalcoólica também resultam em rendimento satisfatório.

A identificação da classe de metabólitos secundários encontrados nos extratos aquosos e hidroalcoólicos foi realizada de forma putativa utilizando a técnica de cromatografia líquida de ultra-alta eficiência (UHPLC) acoplada com detector de arranjo de fotiodios (PDA) por meio da avaliação dos espectros de UV dos principais picos eluídos nos cromatogramas das amostras e também a partir da correlação de dados publicados na literatura para o gênero *Crotalaria*. De forma geral, foi possível verificar a presença de alcaloides (que têm sido relacionados aos efeitos tóxicos para fitonematoides), flavonoides (que possuem atividades antioxidantes e anti-inflamatórias), derivados do ácido hidroxicinâmico (com atividade antioxidante) e aminoácidos que contém grupos cromóforos em sua estrutura.

A Figura 1 apresenta os cromatogramas em 254 nm para os extratos brutos de sementes de *C. spectabilis*. Os picos eluídos em $t_R = 1,638$ min (para agitação hidroalcoólica, Fig. 1A) e $t_R = 1,634$ min (para refluxo aquoso, Fig. 1B) foram atribuídos à presença de aminoácidos contendo grupamentos cromóforos, que absorvem na região do UV apresentando uma banda intensa em 263 nm seguida de um ombro. Espectros com uma banda intensa na região de 259 nm, indicando a presença de alcaloides, foram identificados em $t_R = 1,708$ e $1,693$ min para os extratos hidroalcoólico e aquoso, respectivamente. Picos eluídos entre $t_R = 9,330$ e $9,620$ min apresentam espectros de UV indicativos de substâncias contendo fenilalanina (banda de intensidade média em 257 nm) e guanósina (máximo de absorção em 255 nm com ombro em 280 nm). Os picos relacionados à presença de flavonoide ($t_R = 21,876$ min), flavona ($t_R = 24,188$ min) e derivados do ácido hidroxicinâmico (tempos de retenção em $t_R = 24,357$, $25,227$ e $26,129$ min) foram facilmente identificados no cromatograma do extrato bruto obtido via agitação hidroalcoólica. Para o extrato bruto aquoso estes picos de eluição ou não estavam presentes, ou apresentaram baixa intensidade.

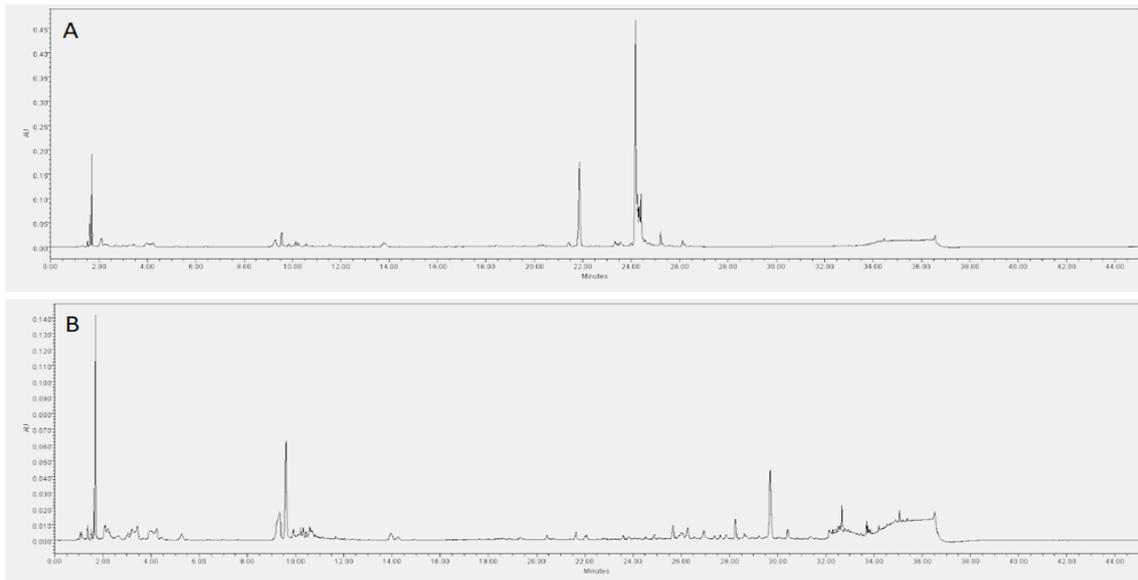


Figura 1. Perfis cromatográficos dos extratos brutos de *C. spectabilis* obtidos pelo processo de agitação hidroalcoólica (A) e refluxo aquoso (B) processados em 254 nm.

Os cromatogramas em 254 nm para os extratos brutos de sementes de *C. breviflora* estão apresentados na Figura 2. Os picos eluídos em $t_R = 1,638$ min (para agitação hidroalcoólica, Fig. 2A) e $t_R = 1,634$ min (para refluxo aquoso, Fig. 2B), a exemplo do exposto para os extratos de *C. spectabilis*, foram atribuídos à presença de aminoácidos. A presença de compostos com absorção UV indicativa de alcaloides foi identificada em $t_R = 1,709$ e 1,697 min para os extratos hidroalcoólico e aquoso, respectivamente. Os picos eluídos em $t_R = 19,080$ min (agitação hidroalcoólica) e $t_R = 19,172$ min (refluxo aquoso) apresentam espectro de UV compatível com o espectro de flavonoides, com máximos de absorção em 257 e 353 nm. Derivados do ácido hidroxicinâmico, com uma banda de máximo de absorção intensa em 288 nm e um ombro em 230 nm, eluíram em $t_R = 19,260$ min, 26,753-26,835 min, 27,651 min e 31,198-31,206 min, tanto para o extrato bruto hidroalcoólico quanto para o aquoso.

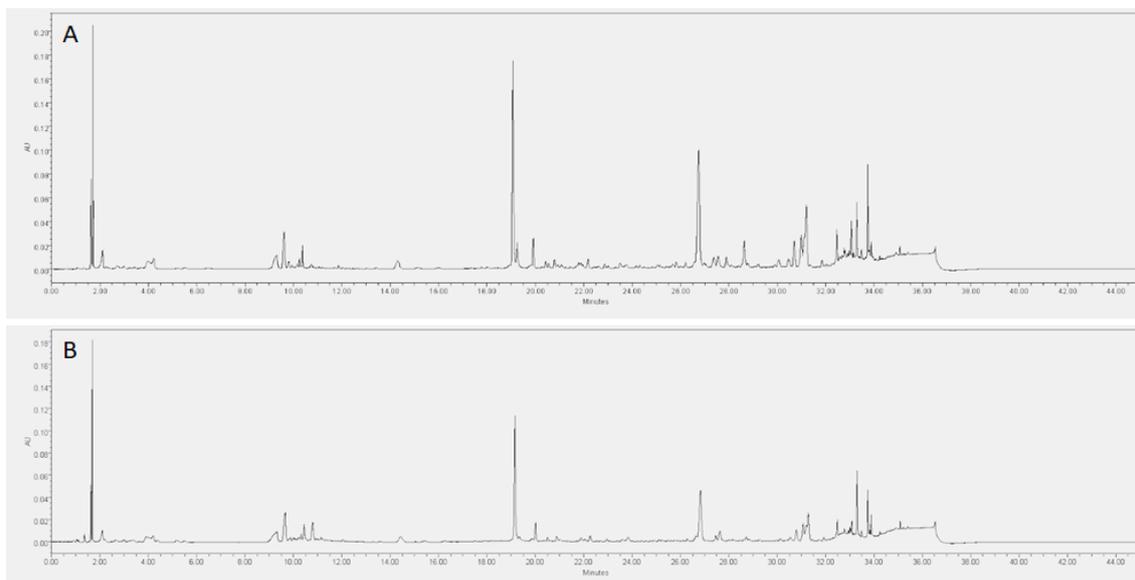


Figura 2. Perfis cromatográficos dos extratos brutos de *C. breviflora* obtidos pelo processo de agitação hidroalcoólica (A) e refluxo aquoso (B) processados em 254 nm.

A Figura 3 apresenta os cromatogramas em 254 nm para os extratos brutos de sementes de *C. juncea*. Novamente, foram observados picos com espectro de absorção UV compatível com a presença de aminoácidos (em $t_R = 1,638$ min para o extrato hidroalcoólico e $t_R = 1,639$ min para o extrato aquoso). O extrato bruto aquoso (Fig. 3B) apresentou um pico eluído em $t_R = 1,686$ min com espectro UV indicativo de alcaloide, enquanto o extrato bruto hidroalcoólico (Fig. 3A) possui um pico em $t_R = 1,703$ com espectro de UV típico de substâncias contendo fenilalanina. Demais picos relacionados à presença de substâncias contendo fenilalanina foram observados em 9,330-9,342 min. O nucleotídeo guanosina também foi identificado em picos eluídos em $t_R = 9,620$ min. Picos relacionados à presença de flavonoide (tempos de retenção em 19,073 e 19,632 min) foram identificados nos cromatogramas dos dois extratos brutos, bem como a presença de um aminoácido eluído em 20,640 min. Por fim, o extrato bruto hidroalcoólico apresenta ainda a indicação da presença de derivados de ácido hidroxicinâmico em $t_R = 26,909$ min e $t_R = 30,545$ min. Estes picos não foram observados para o extrato bruto aquoso.

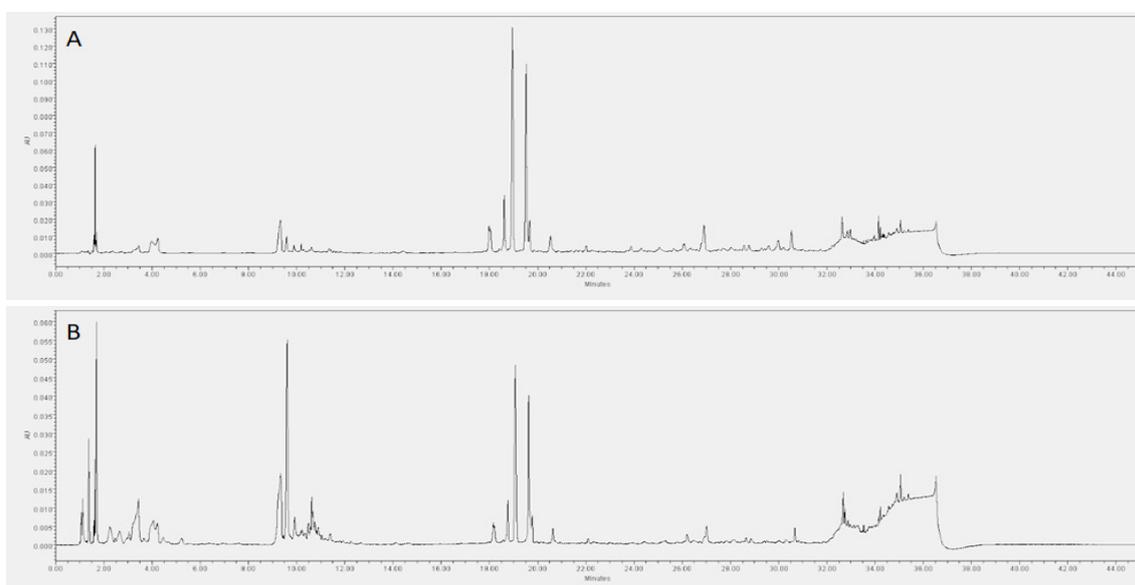


Figura 3. Perfis cromatográficos dos extratos brutos de *C. juncea* obtidos pelo processo de agitação hidroalcoólica (A) e refluxo aquoso (B) processados em 254 nm.

Por fim, os cromatogramas em 254 nm para os extratos brutos de sementes de *C. ochroleuca* estão apresentados na Figura 4. Em comparação com os extratos brutos das demais sementes de crotalária, os extratos da variedade *ochroleuca* apresentaram uma maior quantidade de picos eluídos e maior presença de alcaloides. Espectros de UV compatíveis com a presença de alcaloides foram observados para picos nos tempos de retenção de 1,805, 2,307, 7,965 e 10,206 minutos para o extrato bruto hidroalcoólico (Fig. 4A) e em 1,075, 1,693, 1,780 e 2,299 minutos para o extrato bruto aquoso (Fig. 4B). O extrato bruto obtido a partir de refluxo aquoso ainda apresentou picos indicativos da presença de substância como a fenilalanina ($t_R = 9,307$ e $10,192$ min) e do nucleotídeo guanosina ($t_R = 9,619$ min). Diversos picos, para ambos os extratos, puderam ser correlacionados com a presença de derivados do ácido hidroxicinâmico, nos seguintes tempos de retenção: 20,333, 28,107 e 30,767 min para o extrato hidroalcoólico; 19,339,

20,427 e 28,202 min para o extrato aquoso. Finalmente, espectros de UV indicativos da presença de flavonas e flavonoides foram observados para os picos eluídos em 22,785, 25,371, 27,258, 29,277 e 32,732 min (para o extrato hidroalcoólico) e em 7,957, 22,873, 27,350 e 29,362 min (para o extrato aquoso).

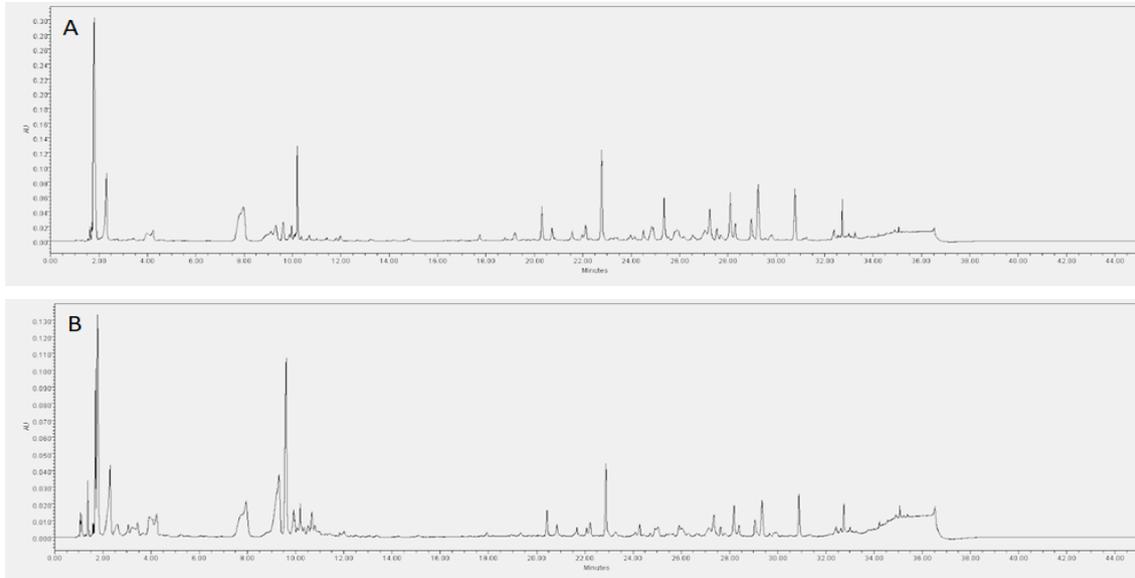


Figura 4. Perfis cromatográficos dos extratos brutos de *C. ochroleuca* obtidos pelo processo de agitação hidroalcoólica (A) e refluxo aquoso (B) processados em 254 nm.

Conclusão

Dentre os perfis comparativos obtidos para os dois modelos de extração, apenas os perfis de *C. spectabilis* demonstraram diferença significativa entre a composição química apresentada nos cromatogramas dos extratos de agitação hidroalcoólica e refluxo aquoso. A partir dos dados cromatográficos e espectrais dos extratos de *C. spectabilis* foi atribuída a provável ocorrência de aminoácidos, alcaloides e derivados da fenilalanina. Porém, a presença de flavonoides, flavonas e derivados do ácido hidroxicinâmico foram observados apenas nos extratos hidroalcoólicos. Os dados cromatográficos e espectrais referentes aos extratos hidroalcoólico e aquoso de *C. breviflora* indicaram a presença de aminoácidos, alcaloides, flavonoides e derivados do ácido hidroxicinâmico. Tanto os extratos hidroalcoólico e aquoso de *C. juncea* também apresentaram dados cromatográficos e espectrais que apontaram a ocorrência de aminoácidos e flavonoides. Já no extrato hidroalcoólico de *C. juncea* observou-se de forma mais acentuada a ocorrência de alguns aminoácidos, provavelmente derivados da fenilalanina, além de derivados do ácido hidroxicinâmico. Além disso, a ocorrência de alcaloides foi notada apenas em seu extrato aquoso. Por fim, para os extratos hidroalcoólico e aquoso de *C. ochroleuca* observou-se maior número de picos cromatográficos separados ao longo da análise, sendo estes associados a uma maior ocorrência de alcaloides. Quando comparada as demais espécies, *C. ochroleuca* também apresentou indícios da presença de derivados do ácido hidroxicinâmico, flavonas e flavonoides.

Referências

BARRETO, R. A.; HUGHES, J. B.; SOUZA, C. S.; SILVA, V. D. A.; SILVA, A. R.; VELOZO, E. S.; BATATINHA, M. J. M.; COSTA, M. F. D.; EL-BACHÁ, R. S.; COSTA, S. L. O alcalóide monocrotalina, extraído de *Crotalaria retusa*, altera a expressão de GFAP, a morfologia e o crescimento de culturas primárias de astrócitos. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v. 7, n. 2, p. 112-127, 2006.

GARDIANO, Cristiane Gonçalves; DALLEMOLE-GIARETTA, Rosangela; LOPES, Everaldo Antônio; ZOOCA, Ronaldo João Falcão; FERRAZ, Silamar; FREITAS, Leandro Grassi de. Atividade nematocida de extratos de sementes de espécies de *Crotalaria* sobre *Meloidogyne javanica*. **Revista Trópica – Ciências Agrárias e Biológicas**, v. 4, n. 1, p. 3-7, 2010.

SCUPINARI, Tamires; RUSSO, Helena Mannocho; FERRARI, Anna Beatriz Sabino; BOLZANI, Vanderlan da Silva; DIAS, Waldir Pereira; NUNES, Estela de Oliveira; HOFFMANN-CAMPO, Clara Beatriz; ZERAIK, Maria Luiza. *Crotalaria spectabilis* as a source of pyrrolizidine alkaloids and phenolic compounds: HPLC-MS/MS dereplication and monocrotaline quantification of seed and leaf extracts. **Phytochemical Analysis**, p. 1-9, 2020.

WANG, Koon-Hui; SIPES, B. S.; SCHMITT, D. P. *Crotalaria* as a cover crop for nematode management: a review. **Nematropica**, v. 32, n. 1, p. 35-58, 2002.

Efeito de nanopartículas de carbono fluorescentes (Krill A32) no crescimento da microalga *Chlorella sorokiniana* Embrapa | LBA#39

Daniela Flavia Machado Turati¹, Samuel Nunes Limberger², Lorena Costa Garcia Calsing³, Rogério Gomes Faria⁴, Marcelo Oliveira Rodrigues⁵, Luiz Fernando Roncaratti Júnior⁶, Rossano Gambetta⁷, Leticia Jungmann Cançado⁸

Resumo

As microalgas são organismos fotossintetizantes de elevado interesse biotecnológico. Visando ao aumento da produção de sua biomassa e bioprodutos derivados, muitas estratégias são desenvolvidas e citadas na literatura. Uma abordagem promissora é o uso de nanopartículas de carbono fluorescentes. Neste trabalho, investigou-se o efeito de diversas concentrações do Cdot Krill A32 no crescimento da microalga *Chlorella sorokiniana* Embrapa | LBA#39 cultivada em microplacas de 96 poços. As concentrações avaliadas foram: 0, 10, 50, 100, 150, 300 e 600 ng/L; 10, 50, 100, 150, 300 e 600 µg/L; e 10, 50, 100, 150, 300 e 600 mg/L. A 50 ng/L o Cdot promoveu aumento do crescimento da microalga em 6%, sendo que as demais concentrações não promoveram alterações estatisticamente significativas ou acarretaram em diminuição do crescimento da microalga, provavelmente devido à indução de estresse oxidativo.

Palavras-chave: microalga, *Chlorella sorokiniana*, nanopartículas de carbono fluorescentes, curva de crescimento.

Introdução

Microalga é um termo genérico usado para se referir a um grupo diverso de microrganismos fotossintéticos que são os principais produtores da vida na Terra (Singh et al., 2015). São organismos ubíquos, encontrados em oceanos, águas doces, fontes termais, lagos salgados e na superfície de todos os tipos de solo (Tomaselli, 2004). Estes microrganismos são interessantes do ponto de vista biotecnológico por apresentarem estrutura relativamente simples, produzirem biomassa e grande variedade de metabólitos, fixarem gás carbônico durante seu crescimento e apresentarem maior produtividade por metro quadrado do que outras culturas, sem competir com terras destinadas à agricultura. Além disso, a água doce pode ser economizada no cultivo de microalgas, usando-se água de resíduo ou água salgada (Schenk et al, 2008). Em termos

¹ Bióloga, mestre em Microbiologia Aplicada, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" – Campus Rio Claro/SP, daniela.flavia@colaborador.embrapa.com

² Graduando em Química, Universidade de Brasília, samuel.limberger@colaborador.embrapa.br

³ Engenheira de Alimentos, doutora em Engenharia de Alimentos, analista da Embrapa Agroenergia, lorena.garcia@embrapa.br

⁴ Engenheiro químico, doutorando em Química Inorgânica, Universidade de Brasília, rogerio.faria@unb.br

⁵ Químico, doutor em Química, professor-adjunto da Universidade de Brasília, marcelo.rodrigues@nottingham.ac.uk

⁶ Físico, doutor em Química, professor-adjunto da Universidade de Brasília, lz@fis.unb.br

⁷ Engenheiro Químico, doutor em Engenharia Química, pesquisador da Embrapa Agroenergia, rossano.gambetta@embrapa.br

⁸ Bióloga, doutora em Genética e Biologia Molecular, pesquisadora da Embrapa Agroenergia, leticia.jungmann@embrapa.br

de aplicações biotecnológicas, a biomassa microalgal e seus derivados podem ser utilizados para diversos fins, dentre eles: produção de biocombustíveis, biofertilizantes, alimentação animal, suplementação humana, nutracêuticos, pigmentos naturais e cosméticos (Gupta et al., 2013).

No entanto, a produção de biomassa microalgal em grandes escalas ainda enfrenta alguns gargalos que precisam ser solucionados para garantir sua viabilidade econômica. Nesse sentido, pesquisas atuais com microalgas envolvem: a seleção ou bioengenharia de cepas altamente produtivas; o desenvolvimento de sistemas de cultivo de microalgas aprimorados; a redução do custo dos meios de cultivo; o aumento da produtividade de biomassa; e o desenvolvimento de novas tecnologias de colheita da biomassa produzida (Fernández et al., 2019). Com base nesse cenário, alguns estudos demonstram que o uso de nanopartículas fluorescentes pode resultar em aumento da eficiência no crescimento de microalgas, destacando-se como uma possibilidade promissora para atingir a viabilidade econômica desse tipo de cultura.

As nanopartículas de carbono, também conhecidas por pontos quânticos de carbono, CQD (do inglês, *carbon quantum dots*) ou Cdots, são pequenas estruturas esféricas com diâmetro variando entre 1 e 100 nm (Dias, 2015). Os Cdots emitem fluorescência quando excitados com determinados comprimentos de onda, característica que os torna interessantes para o estudo com microalgas, as quais utilizam energia fotoquímica para o processo de fotossíntese.

O presente trabalho avaliou o efeito dos Cdots Krill A32 no crescimento da microalga *Chlorella sorokiniana* Embrapa|LBA#39 cultivada em microplacas de 96 poços. Partiu-se da hipótese de que as nanopartículas promoveriam aumento do crescimento da microalga, com base em dois principais mecanismos propostos na literatura: 1) os fótons de fluorescência emitidos pelas nanopartículas seriam usados na fotossíntese pelas microalgas, aumentando a eficiência desse processo metabólico; 2) o processo de degradação das nanopartículas de carbono forneceriam substrato para o crescimento, alterando o metabolismo para o foto-heterotrófico.

Material e Métodos

Preparo do pré-inóculo da microalga *Chlorella sorokiniana* Embrapa|LBA#39: em condições estéreis, adicionou-se 15 mL de cultivo de microalga em 135 mL de meio BG11, em Erlenmeyer de 250 mL. O Erlenmeyer foi incubado em shaker a 25 °C, 110 rpm, 4000 lux, fotoperíodo 12:12h, durante 7 dias.

Uma solução de 1,2 g/L de Cdots foi preparada, pesando-se 120 mg de Cdots em pó e diluindo o conteúdo para um volume final de 100 mL com meio BG11, em balão volumétrico. Esta solução foi filtrada em filtro de 0,22 µm e autoclavada antes de ser adicionada ao cultivo com microalga.

A fim de se avaliar o efeito de diversas concentrações de Cdots no crescimento da microalga *C. sorokiniana* Embrapa|LBA#39, o cultivo foi realizado em microplacas de 96 poços. Para tal, adicionou-se em cada poço o pré-inóculo, a solução de Cdots e o meio BG11. As concentrações finais de Cdots foram: 0, 10, 50, 100, 150, 300 e 600 ng/L; 10, 50, 100, 150, 300 e 600 µg/L; e 10, 50, 100, 150, 300 e 600 mg/L; avolumados para 100 µL com meio BG11. Ademais, adicionou-se mais 100 µL de pré-inóculo, totalizando 200 µL por poço. Foram preparadas desta maneira 3 placas e cada concentração foi

testada em triplicata dentro de uma mesma placa, resultando em 9 réplicas de cada concentração avaliada. Também foram preparadas outras 3 placas com as mesmas concentrações finais de Cdots, mas sem a adição das microalgas, a fim de acompanhar a variação na absorbância a 750 nm das soluções de Cdots expostas à luz. Neste caso, os 200 µL foram completados com meio BG11, sem a adição de pré-inóculo. As placas foram incubadas a 25 °C, 4000 lux, fotoperíodo 12:12h, durante 21 dias. Periodicamente, o crescimento da microalga *C. sorokiniana* Embrapa|LBA#39 foi acompanhado pela leitura em espectrofotômetro a 750 nm.

Resultados e Discussão

O crescimento da microalga *C. sorokiniana* Embrapa|LBA#39 na presença de Cdots foi acompanhado durante 21 dias e as curvas de crescimento são apresentadas nas figuras 1, 2 e 3.

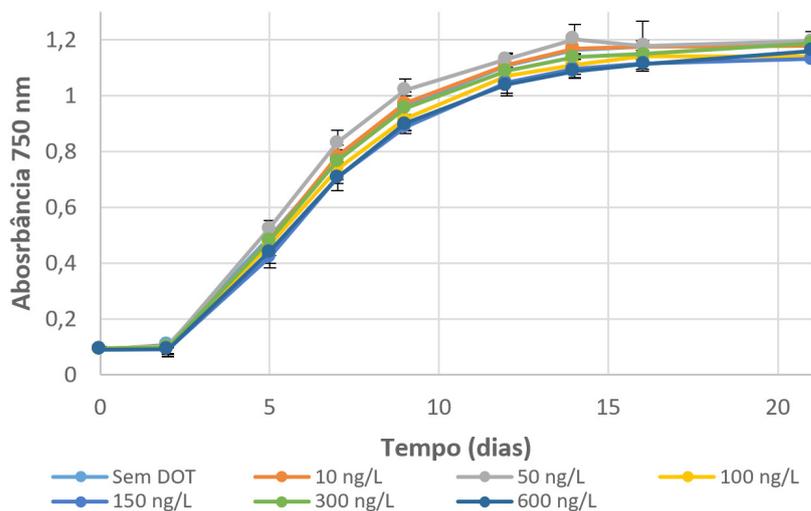


Figura 1. Curvas de crescimento da microalga *C. sorokiniana* Embrapa|LBA#39 na presença de Cdots em concentrações finais de 0, 10, 50, 100, 150, 300 e 600 ng/L.

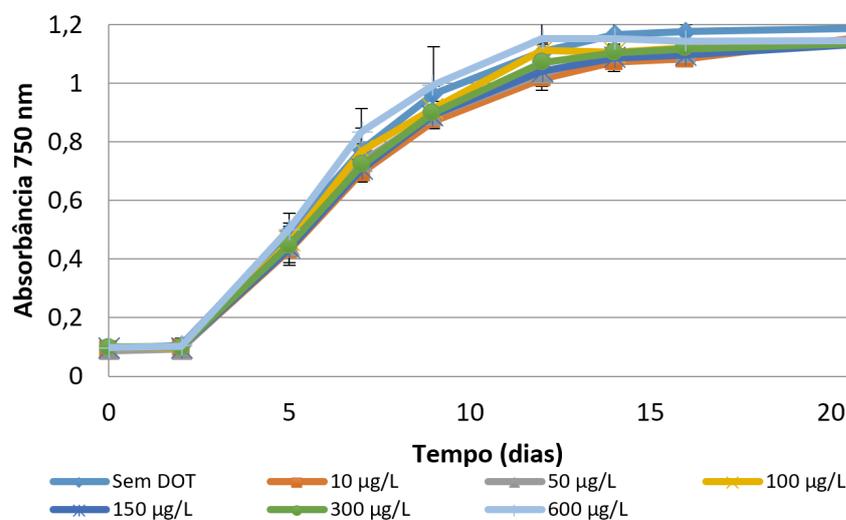


Figura 2. Curvas de crescimento da microalga *C. sorokiniana* Embrapa|LBA#39 na presença de Cdots em concentrações finais de 0, 10, 50, 100, 150, 300 e 600 µg/L.

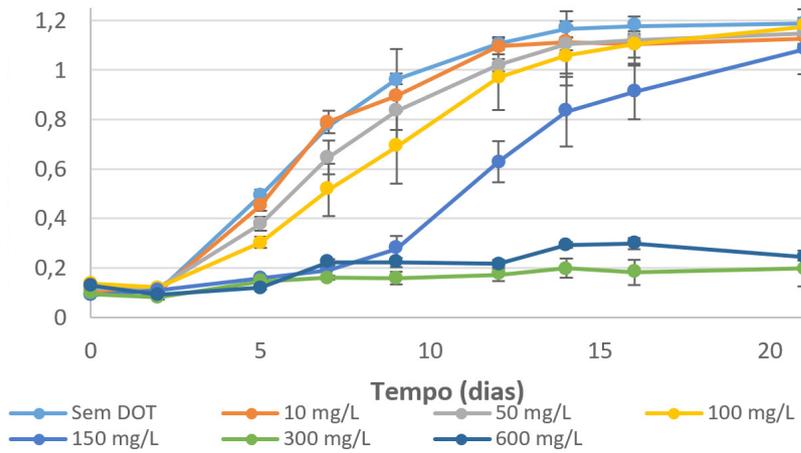


Figura 3. Curvas de crescimento da microalga *C. sorokiniana* Embrapa|LBA#39 na presença de Cdots em concentrações finais de 0, 10, 50, 100, 150, 300 e 600 mg/L.

A partir da observação das Figuras 1 a 3 é possível verificar que o crescimento da microalga é muito semelhante com concentrações de Cdots nas ordens de ng/L e µg/L, com leve aumento observado para as concentrações de 50 ng/L e 600 µg/L. Já para a ordem de mg/L, observou-se diminuição do crescimento com o aumento da concentração de Cdot. Para verificar se as variações observadas são estatisticamente significativas, realizou-se uma ANOVA de um fator com nível de significância de 5% seguida de teste de Tukey, para o 9º dia de cultivo (final da fase exponencial de crescimento). Os resultados das análises estatísticas são apresentados nas Figuras 4, 5 e 6.

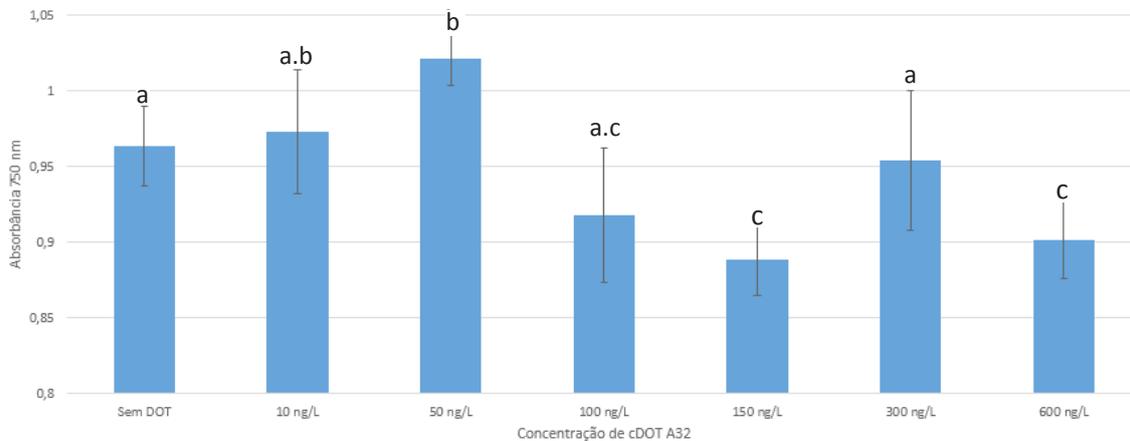


Figura 4. Crescimento da microalga *C. sorokiniana* Embrapa|LBA#39 no 9º dia de cultivo, na presença de Cdots em concentrações finais de 0, 10, 50, 100, 150, 300 e 600 ng/L. Letras iguais não diferem estatisticamente, enquanto letras diferentes diferem com nível de significância de 5% ($p < 0,05$).

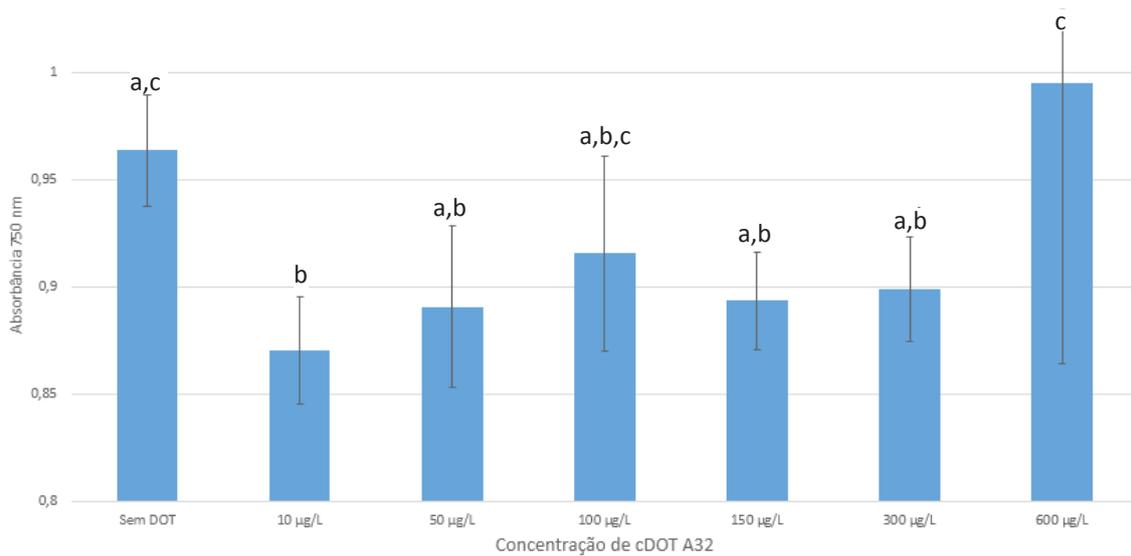


Figura 5. Crescimento da microalga *C. sorokiniana* Embrapa|LBA#39 no 9º dia de cultivo, na presença de Cdots em concentrações finais de 0, 10, 50, 100, 150, 300 e 600 µg/L. Letras iguais não diferem estatisticamente, enquanto letras diferentes diferem com nível de significância de 5% ($p < 0,05$).

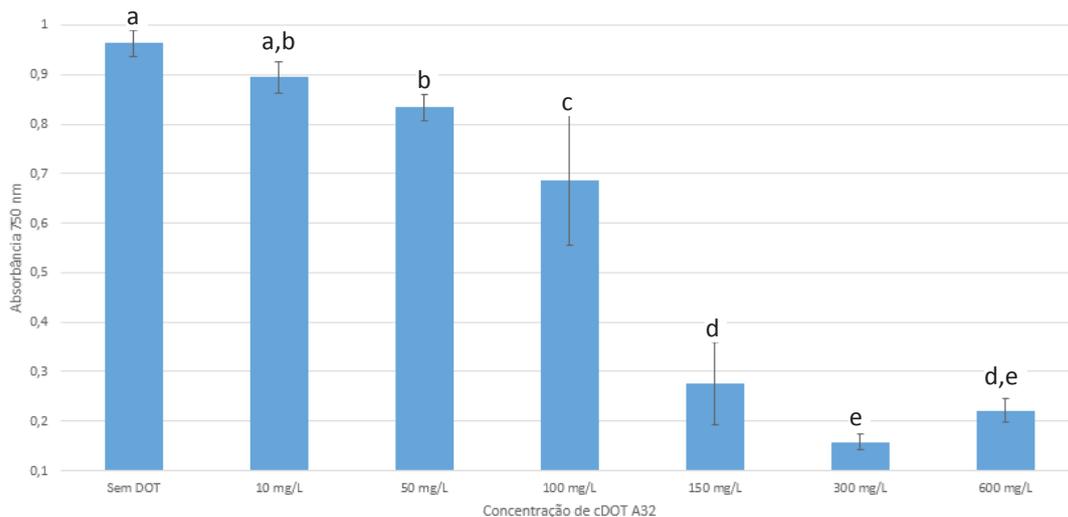


Figura 6. Crescimento da microalga *C. sorokiniana* Embrapa|LBA#39 no 9º dia de cultivo, na presença de Cdots em concentrações finais de 0, 10, 50, 100, 150, 300 e 600 mg/L. Letras iguais não diferem estatisticamente, enquanto letras diferentes diferem com nível de significância de 5% ($p < 0,05$).

É possível observar que apenas a concentração de 50 ng/L promoveu aumento estatisticamente significativo no crescimento da microalga, sendo este aumento da ordem de, aproximadamente, 6%. As demais concentrações não influenciaram no crescimento ou promoveram diminuição no crescimento da microalga, possivelmente pela indução de estresse oxidativo.

Considerações Finais

Os Cdots são uma maneira promissora de aumentar o crescimento de microalgas. No presente estudo, foram avaliados os efeitos de diversas concentrações do Cdot Krill A32 no crescimento da microalga *Chlorella sorokiniana* Embrapa|LBA#39. A concentração de 50 ng/L promoveu incremento de 6% no crescimento da microalga. Experimentos complementares em escalas maiores serão efetuados para validar este incremento e avaliar o mecanismo envolvido neste fenômeno.

Referências

BICUDO, C.E. de M., MENEZES, M. **Gêneros de Algas de Águas Continentais no Brasil** - Terceira Edição, 2017.

DIAS, J. H. **Síntese e caracterização de nanopartículas de carbono**. Trabalho de conclusão de curso, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2015.

FERNÁNDEZ, F.G.A, J.M. FERNÁNDEZ SEVILLA, FRIMA, E. M. **Costs analysis of microalgae production**, Second Edi, Elsevier B.V., 2019. <https://doi.org/10.1016/b978-0-444-64192-2.00021-4>.

GUPTA, V.; RATHA, S. K.; SOOD, A.; CHAUDHARY, V.; PRASANNA, R., New insights into the biodiversity and applications of cyano- bacteria (blue-green algae)—prospects and challenges. **Algal Research**. 2, 79–97, 2013. DOI: 10.1016/j.algal.2013.01.006.

TOMASELLI, L. The microalgal cell, in: A. Richmond (Ed.), **Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology**, Blackwell Publishing Ltd, 2004, pp. 3-19.

SINGH, P., S. K. GUPTA, A. GULDHE, I. RAWAT, F. BUX. Microalgae isolation and basic culturing techniques, in: S. Kim (Ed.), **Handbook of Marine Microalgae: Biotechnology Advances**, Academic Press, Elsevier, pp. 43-54, 2015. <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-800776-1.00004-2>.

SCHENK, P. M., S.R. THOMAS-HALL, E. STEPHENS, U.C. MARX, J.H. MUSSGNUG, C. POSTEN, O. KRUSE, B. HANKAMER, Second Generation Biofuels: High-Efficiency Microalgae for Biodiesel Production, **BioEnergy Res**. 1, 20–43, 2008. <https://doi.org/10.1007/s12155-008-9008-8>.

Morfotipos de novos isolados de microalgas da Coleção do Laboratório de Biotecnologia de Algas da Embrapa Agroenergia

Cesar Heraclides Behling Miranda¹, Rosana Falcão², Brenda Rabello de Camargo³, Daniela Flávia Machado Turati⁴, Lorena Costa Garcia Calsing⁵

Resumo

São reportados os procedimentos realizados com o objetivo de caracterizar os morfotipos obtidos de colônias de microalgas isoladas em meio de cultura tendo como fonte principal de Nitrogênio o nitrato (meio BG11) ou amônio (meio BGUF). Estes isolados resultaram do crescimento de microalgas coletadas de lagoas ou poças de água ao longo da Estrada Parque Pantanal, no Mato Grosso do Sul, em viagem realizada em 11 de novembro de 2019. Após crescimento inicial em meio líquido, amostras foram riscadas em placas com meios semissólidos, com posterior repicagem de colônias selecionadas ao acaso para novo crescimento em meio líquido. Então, frações de 1 mL foram separadas, tratadas com solução fixadora (2,5% glutaraldeído em 0,1M cacodilato de sódio, pH 7,2) e montadas em lamínulas, para observação em Microscópio Óptico Axiolmage Z2, marca Zeiss, em contraste de interferência diferencial. As microalgas presentes foram registradas digitalmente, usando-se câmera digital IcC3 e o software Zen-Zeiss, avaliando-se os descritores morfológicos visíveis de núcleo, estrutura do talo, forma e cor. A fotodocumentação das microalgas isoladas resultou numa variedade significativa de morfotipos, com predominância de formas cocoides ou assemelhadas, em detrimento de formas filamentosas. Tal resultado indica que é necessário cuidado nos procedimentos iniciais de seleção para não serem isolados apenas microalgas de um macrogrupo específico, limitando-se o enriquecimento da diversidade de algas numa coleção de diferentes espécies.

Palavras-chave: biodiversidade, microalgas cocoides, microalgas filamentosas, microscopia de contraste, morfotipos.

Introdução

Microalgas são organismos fotossintéticos que crescem em ambientes úmidos (rios, lagos, mares ou solos) e tem potencial econômico para a sua utilização em vários bioprodutos como óleos combustíveis, produção de pigmentos, formulações cosméticas, ração animal e suplementos alimentares (Khan et al., 2018). As microalgas

¹ Engenheiro-agrônomo, doutor em Microbiologia e Bioquímica do Solo, pesquisador da Embrapa Agroenergia, cesar.miranda@embrapa.br

² Bióloga, mestre em Ciências Genômicas e Biotecnologia, analista da Embrapa Agroenergia, rosana.falcao@embrapa.br

³ Bioquímica, doutora em Ciências, Biologia Molecular, consultora da Embrapa Agroenergia, brendarc@gmail.com

⁴ Bióloga, mestre em Microbiologia Aplicada, bolsista DTI do CNPq, daniela.flavia@colaborador.embrapa.br

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

englobam organismos de dois super-reinos procariontes e eucariontes, por isso a classificação taxonômica acurada dos indivíduos deve ser multidisciplinar atendendo a critérios mínimos de características morfológicas, composição bioquímica (pigmentos e cloroplastos), ultraestrutura celular (disposição dos tilacoides), ciclo de vida, tipo de reprodução e dados de sequências genômicas por técnicas de biologia molecular.

A coleção de microalgas do Laboratório de Biotecnologia de Algas da Embrapa Agroenergia foi iniciada em 2012 (Brasil; Garcia, 2016) e conta atualmente com 24 acessos cadastrados no Banco de Microrganismos e Microalgas Aplicados a Agroenergia e Biorrefinarias no Portal Alelo (<http://alelo.cenargen.embrapa.br/>). Estes acessos foram inicialmente isolados de vários biomas brasileiros, como Pantanal, Amazônia, Mata Atlântica e Cerrados, os quais foram caracterizados por biologia molecular ou por morfologia para designação taxonômica possibilitando assim o seu registro no banco e a sua utilização em estudos para produção de biomassa e metabólitos de interesse, visando o desenvolvimento de bioprodutos.

A coleção é mantida atualizada, por repicagem e limpeza de manutenção das cepas armazenadas, bem como aumentada, por troca com outras coleções ou por coletas próprias. Neste trabalho são apresentados resultados iniciais de estudos morfológicos de um grupo de cepas isoladas a partir de viagem de coleta realizada em 2019, visando avaliar o potencial de cepas individuais para inclusão na coleção e estudos posteriores.

O objetivo deste trabalho é produzir informações preliminares sobre acessos isolados através de fotodocumentação diferencial, para facilitar o reconhecimento e análise dos principais descritores morfológicos individuais para auxiliar sua posterior classificação taxonômica.

Material e Métodos

Em viagem de coleta realizada no dia 11 de novembro de 2019, foram coletadas, principalmente, ao longo da Estrada Parque do Pantanal (rodovias MS 184 e MS 228), amostras de água de lagoas ou poças de água a beira da estrada, cerca de 50 mL de água, que foram armazenadas em tubos Falcon. Para cada local de foram anotadas as coordenadas geográficas (Tabela 1), obtidas usando-se aplicativo interno de telefone celular.

Os tubos com as amostras foram armazenados em caixa de isopor e transportados para a Embrapa Agroenergia, onde amostras de 5 mL foram dispostas em tubos de ensaio fechados contendo 50 mL de meio de crescimento BG11, como descrito por Allen e Steiner (1968), ou meio de crescimento BGUF, como descrito em Ribeiro et al. (2020), respectivamente. Posteriormente, observando-se turbidez do meio e outros sinais característicos de crescimento de algas, especialmente a coloração esverdeada, fez-se de repicagem de cada um dos tubos para placas contendo os mesmos meios semissólidos, pelo acréscimo de Agar. Após o crescimento de colônias individuais nas placas, um total de 40 colônias (20 do meio BGUF e 20 do meio BG11) foi escolhido, sendo repicadas novamente nos respectivos meios líquidos, para conservação e análises posteriores. De forma geral, os procedimentos de isolamento e crescimento das amostras seguiram aqueles preconizados nos trabalhos apresentados na obra de Andersen (2005).

Das 40 amostras obtidas, 1 mL foi colhido após agitação do meio respectivo e disposto em Ependorf para avaliações microscópicas, após processo inicial de fixação e montagem

das lâminas. Para tal, foram retirados 200 uL de amostra e colocados em 400 uL de solução fixadora (2,5% glutaraldeído em 0,1M cacodilato de sódio, pH 7,2), por 24h a 4°C. Após uma centrifugação rápida a solução fixadora foi trocada por tampão 0,05M de cacodilato de sódio, pH 7,2, montando-se rapidamente as lâminas com glicerol 25% sob lamínulas pré-lavadas. As lâminas foram então avaliadas utilizando-se o Microscópio óptico Axiolmage Z2 da marca Zeiss, em contraste de interferência diferencial. Durante as observações, as microalgas presentes foram registradas digitalmente, usando-se câmera digital IcC3 e o software Zen-Zeiss. Foram avaliados para os descritores morfológicos visíveis de núcleo, estrutura do talo, forma e cor, segundo Bellinger e Sigee (2010) e Andrade e Colozzi Filho (2014), utilizando-se os seguintes critérios:

- I. Núcleo
 - A. Presente (eucarioto).
 - B. Ausente (procarioto).
- II. Estrutura do talo
 - A. Talo unicelular
 - i. Imóvel: ausência de flagelos.
 - ii. Móvel: flagelado (geralmente 2).
 - B. Talo colonial
 - i. Cenobial: número de indivíduos e forma de colônia definidos.
 - ii. Tetraspórica: número de indivíduos e forma da colônia indefinidos.
 - C. Talo multicelular
 - i. Filamentoso (filamento unitário ou soldado a outros).
 - ii. Parenquimatoso (tecido mais ou menos compacto).
- III. Forma principal
 - A. Cooide – célula arredondada ou esférica.
 - B. Ovoide/elipsoide – esférica ovalada simétrica.
 - C. Obovoide – oval com uma extremidade mais larga e a outra afilada.
 - D. Cilíndrica – forma de cilindro que pode ser curto ou longo com extremidades arredondadas.
 - E. Fusiforme – forma cilíndrica alongada com as extremidades afuniladas.
 - F. Filamentosa – formato de fios.
- IV. Cor
 - A. Verde azulada.
 - B. Verde débil.
 - C. Verde.
 - D. Verde intenso.
 - E. Parda (amarelo - marrom).

Resultados e Discussões

As características gerais das cepas observadas por microscopia, a partir de isolados da viagem de coleta realizada ao longo da Estrada Parque Pantanal, no Mato Grosso do Sul (Tabela 1) estão dispostas na Tabela 2. De forma geral, verifica-se que predominaram as formas cocoides ou características de microalgas individuais (Tabela 2, Figura 1). Apenas um isolado, o número 9, apresentou forma filamentosa, muito embora fossem observadas várias formas indicativas destes morfotipos de microalgas nas amostras crescidas na primeira fase.

Tabela 1. Identificação das amostras e seus locais de coleta ao longo da Estrada Parque Pantanal, bem como o meio de cultural do isolamento original. Coleta realizada em 11 de Novembro de 2019.

| Número da amostra | Meio de isolamento | Latitude | Longitude | Altitude (m) |
|-------------------|--------------------|------------------|------------------|--------------|
| 1 | BGUF | 20; 27; 32.20000 | 55; 37; 17.37499 | nd |
| 2 | BGUF | 19; 28; 18.52139 | 57; 2; 39.53969 | 99.55 |
| 3 | BGUF | 19; 28; 10.28250 | 57; 2; 40.00810 | 112.517 |
| 5 | BGUF | 20; 27; 32.20000 | 55; 37; 17.3749 | nd |
| 6 | BGUF | 20; 14; 1.259799 | 56;22;52.05710 | 122 |
| 7 | BGUF | 20; 27; 16.74999 | 54; 35; 1.43160 | 580 |
| 8 | BGUF | 20; 27; 16.74999 | 54; 35; 1.43160 | 580 |
| 9 | BGUF | 20; 14; 1.259799 | 56;22;52.05710 | 122 |
| 10 | BGUF | 19; 23; 25.48759 | 57; 2; 59.36656 | 92,667 |
| 11 | BGUF | 19; 23; 25.48759 | 57; 2; 59.36656 | 92,667 |
| 15 | BGUF | 19; 28; 18.52139 | 57; 2; 39.53969 | 99.55 |
| 18 | BGUF | 19; 37; 14.94150 | 57; 2; 4.287099 | 98.44 |
| 23 | BG11 | 20; 14; 1.259799 | 56;22;52.05710 | 122 |
| 24 | BG11 | 20; 27; 32.20000 | 55; 37; 17.3749 | nd |
| 27 | BG11 | 19; 28; 18.52139 | 57; 2; 39.53969 | 99.55 |
| 28 | BG11 | 19; 37; 14.94150 | 57; 2; 4.287099 | 98.44 |
| 31 | BG11 | 19; 23; 25.48759 | 57; 2; 59.36656 | 92,667 |
| 32 | BG11 | 19; 15; 35.87919 | 57; 14; 1.00459 | 106.944 |
| 33 | BG11 | 19; 15; 35.87919 | 57; 14; 1.00459 | 106.944 |
| 36 | BG11 | 20; 4; 56.415099 | 56; 45; 17.2282 | 134,01 |
| 38 | BG11 | 19; 15; 28.89860 | 57; 9; 3.570500 | 112,575 |
| 39 | BG11 | 19; 15; 27.22669 | 57; 18; 6.05489 | 95.776 |

Tabela 2. Resumo dos descritores morfológicos observados nos isolados de microalgas.

| Amostra | Núcleo | Estrutura do talo | Forma | Cor do isolado |
|---------|----------|---------------------------|-------------|----------------|
| 1 | Presente | Unicelular móvel | Cocoide | Verde |
| 2 | Presente | Unicelular imóvel | Cocoide | Verde |
| 3 | Presente | Unicelular imóvel | Cocoide | Verde débil |
| 5 | Presente | Unicelular imóvel | Cocoide | Verde débil |
| 6 | Presente | Colonial cenobial | Fusiforme | Verde |
| 7 | Presente | Unicelular imóvel | Cocoide | Verde |
| 8 | Presente | Colonial cenobial | Fusiforme | Verde |
| 9 | Presente | Multicelular filamentosos | Filamentosa | Pardo |
| 10 | nd | Unicelular | Cilíndrica | Verdestra |
| 11 | Presente | Colonial cenobial | Fusiforme | Verde |
| 15 | Presente | Colonial tetraspórica | Cocoide | Verde |
| 18 | Presente | Colonial tetraspórica(?) | Elipsoide | Verde |
| 23 | nd | Unicelular | Cilíndrica | Pardo |
| 24 | Presente | Colonial tetraspórica(?) | Elipsoide | Verde |
| 27 | Presente | Colonial cenobial | Fusiforme | Verde |
| 28 | nd | Unicelular | Cilíndrica | Pardo |
| 31 | nd | Unicelular | Cilíndrica | nd |
| 32 | Presente | Colonial cenobial | Fusiforme | Verde |
| 33 | Presente | Colonial tetraspórica | Elipsoide | Verde |
| 36 | Presente | Colonial cenobial | Fusiforme | Verde |
| 38 | nd | Unicelular | Cilíndrica | Verde azulada |
| 39 | Presente | Unicelular imóvel | Cocoide | Verde intenso |

Devido à forma de isolamento, em meio líquido e posterior formação de colônias em meio semissólido, é de se esperar que as espécies com taxa de duplicação mais rápidas, como as cocoides, predominem dentre os isolados. Isto, por um lado, é altamente desejável, pois indica que estas espécies podem ser bastante competitivas, crescendo rapidamente. Dependendo do seu conteúdo em metabólitos de interesse e produção de biomassa, podem ser de alto interesse para produção massal (Coelho et al., 2019).

Por outro lado, as espécies filamentosas são mais difíceis de formarem colônias em meio semissólido. Com isto, dificilmente serão selecionadas no tipo de procedimento usado nesse estudo. Entretanto, elas possuem características vantajosas relacionadas ao seu morfotipo, pois são separadas e colhidas do meio do crescimento mais facilmente e com menor custo do que células cocoides de menor diâmetro e massa. Sabe-se que a colheita de biomassa algal é um dos maiores impedimentos para o aproveitamento de microalgas em escala industrial (Pragya et al., 2013).

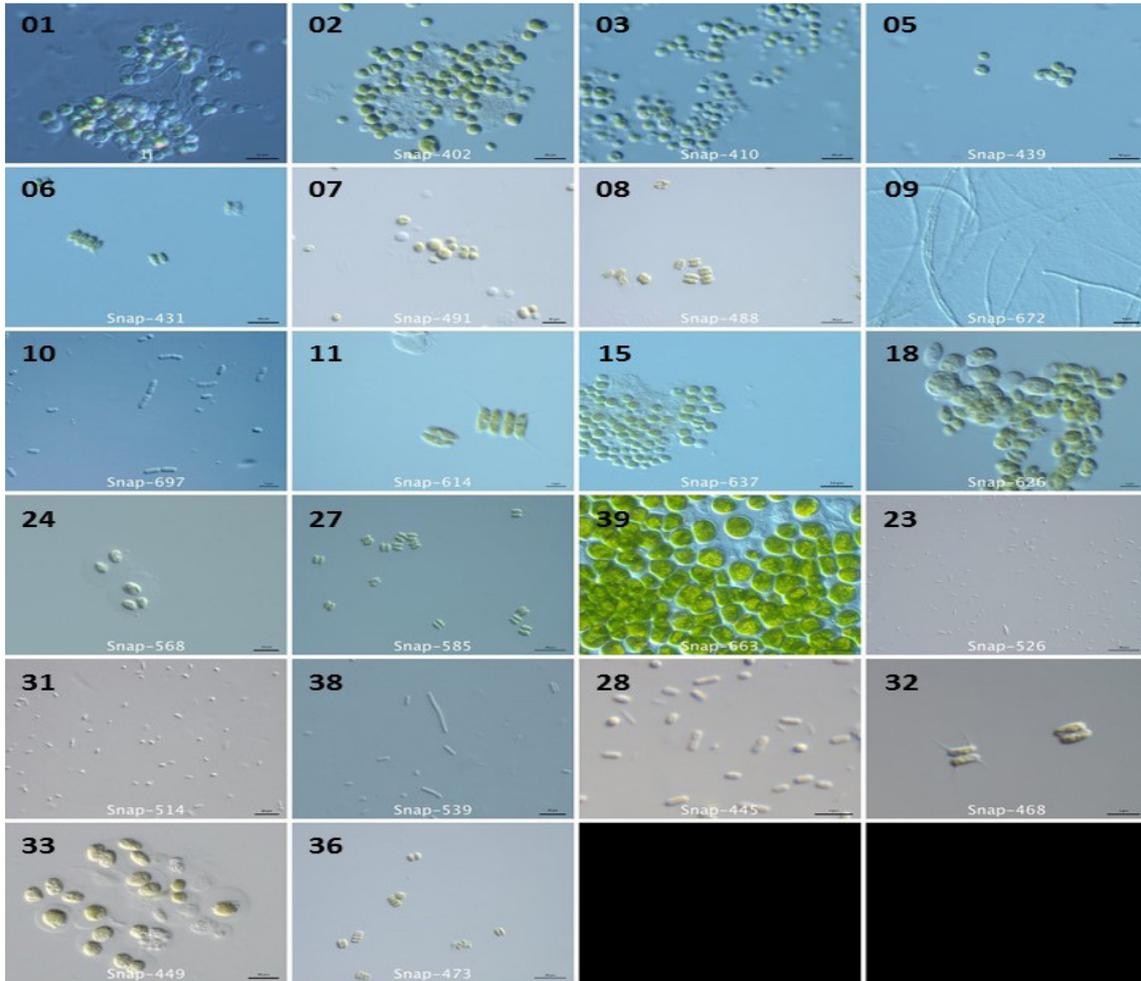


Figura 1. Fotodocumentação em contraste de interferência diferencial das microalgas isoladas.

Assim, neste estudo, de certa forma, foram privilegiadas as microalgas cocoides e assemelhadas, sendo necessário buscarem-se formas alternativas de isolamento para aumentar o número de acessos de microalgas filamentosas.

O procedimento de fixação das células com a técnica utilizada para observação ao microscópio se mostrou bastante favorável para a fase de isolamento e caracterização inicial, pois manteve as características básicas das cepas, permitindo observações com boa riqueza de detalhes. As informações microscópicas coletadas constituem informações importantes dos acessos isolados, suficientes para o preenchimento dos principais descritores morfológicos individuais, sendo úteis para fomentar a classificação taxonômica dos candidatos a cadastro no Banco AleloMicro de microalgas. Desta forma, a coleção de algas da Embrapa Agroenergia está sendo enriquecida com estes novos representantes da biodiversidade brasileira, abrindo-se o leque de opções de espécies para estudos posteriores nos diversos campos de aplicação biotecnológica destes microrganismos.

Conclusões

A fotodocumentação de isolados de microalgas coletados em lagoas ou poças de água da região do Pantanal por microscopia de contraste mostrou variedade de morfotipos, com nível de detalhes que permitirá diferenciação entre isolados e posterior classificação de gêneros ou espécies.

O método de cultivo inicial em meio líquido e seleção de colônias crescidas por repique em meio semissólido favorece a seleção de formas cocoides ou assemelhadas, em detrimento de formas filamentosas.

Referências

- ALLEN, M. M., STEINER R. Y. Selective isolation of blue-green algae from water and soil. **Journal of General Microbiology**, **51**: 203-209, 1968.
- ANDERSEN, R. A. **Algal culturing techniques**. Academic Press, New York, 2005. 504 p.
- ANDRADE, D. S., COLOZZI FILHO, A. **Microalgas de águas continentais. Volume 3. Coleção IPR de microalgas**. Instituto Agrônomo do Paraná, Londrina, PR. 2014. 57 p.
- BELLINGER, E.G.; SIGEE, D.C. A Key to the More Frequently Occurring Freshwater Algae. In: BELLINGER, E.G.; SIGEE, D.C. (Ed.). Chapter 4: **Freshwater Algae: Identification and Use as Bioindicators**. John Wiley & Sons Ltd. 2010. p. 137–244. DOI: 10.1002/9780470689554.
- BRASIL, B. S. A. F., GARCIA, L. C. Microalgas: alternativas promissoras para a indústria. **Agroenergia em Revista – Microalgas** 10: 6-11, 2016.
- COELHO, D. F.; TUNDISI, L. L.; CERQUEIRA, K. S.; RODRIGUES, J. R. S.; MAZZOLA, P. G.; TAMBOURGI, E. B., SOUZA, R. R. Microalgae: cultivation aspects and bioactive compounds. **Brazilian Archives of Biology and Technology** **62**: e19180343, 2019. <http://dx.doi.org/10.1590/1678-4324-2019180343>
- KHAN, M. I.; SHIN, J. H. KIM, J. D. **The promising future of microalgae**: current status, challenges, and optimization of a sustainable and renewable industry for biofuels, feed, and other products. *Microbial Cell Factories*, **17**, 36, 2018. <https://doi.org/10.1186/s12934-018-0879-x>.
- PRAGYA, N.; PANDEY, K. K.; SAHOO, P. K. A review on harvesting, oil extraction and biofuels technologies from microalgae. **Renewable and Sustainable Energy Reviews** **24**: 159-171, 2013.
- RIBEIRO, D. G; ROCARRATTI, L. F.; POSSA, G. C.; GARCIA, L. C.; CANÇADO, L. J.; WILLIAMS, T. C. R., BRASIL, B. S. A. F.. A low-cost approach for *Chlorella sorokiniana* production through combined use of urea, ammonia and nitrate based fertilizers. **Bioresource Technology Reports** **9**: 1-9, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.bitech.2019.100354>

Uso de concentrador solar para secagem de bagaço de cana-de-açúcar

Wellington Rangel dos Santos¹, Felipe Brandão de Paiva Carvalho²,
Larissa Andreani³, Leonardo Fonseca Valadares⁴

Resumo

O setor sucroalcooleiro energético fornece importantes produtos como o açúcar, o álcool combustível e a bioeletricidade. A bioeletricidade é a energia elétrica gerada a partir da queima do bagaço de cana-de-açúcar. Assim, o bagaço é uma importante biomassa para uso industrial responsável por mover as usinas e ser comercializada como eletricidade. Apesar do bagaço de cana ter um papel muito importante na matriz energética nacional, normalmente essa biomassa é conduzida às caldeiras com alto teor de umidade, acarretando em perda de eficiência no processo de cogeração. Este trabalho propõe o uso de concentrador solar para a secagem do bagaço de cana-de-açúcar, a fim de aumentar a eficiência de cogeração. Para tanto, um concentrador solar de 1 m² foi utilizado para aquecer um forno ventilado. A massa, a temperatura interna, a temperatura externa e a potência solar foram medidas. Os resultados mostram que o teor de umidade do bagaço industrial é de 42,72%. Os melhores resultados mostraram que é possível remover 82% da umidade inicial de 100 g de bagaço de cana-de-açúcar após 45 minutos de exposição ao sol.

Palavras-chave: bagaço de cana-de-açúcar, concentrador solar, energia heliotérmica, cogeração de energia, secagem.

Introdução

A matriz energética nacional tem elevada contribuição de fontes de energia renováveis. Em 2017, dentre as fontes de energia renováveis, os produtos de cana-de-açúcar tiveram a maior contribuição, de 17,0%, seguido da energia hidráulica (12,0%), lenha e carvão vegetal (8,0%), lixívia (3,0%), biodiesel (1,1%) e outras fontes (1,8%), totalizando 42,9% da repartição da oferta interna de energia (Bem, 2018).

Como exposto, o setor sucroalcooleiro energético tem grande importância para a geração de energia no Brasil, pois, além do açúcar alimentar, este setor produz o álcool anidro e álcool hidratado, tão como a bioeletricidade, que é gerada a partir da queima do bagaço de cana-de-açúcar nas usinas.

Assim, o bagaço de cana é uma importante biomassa de uso industrial. No entanto, o bagaço possui elevado teor de umidade quando gerado e conduzido às caldeiras – em média a composição do bagaço é 50% de água, 48% fibras e 2% sólidos solúveis (Lobo, 2013) –, o que ocasiona uma perda de eficiência das caldeiras. Da mesma forma, a

¹ Cientista da Computação, mestre em Educação Física, analista da Embrapa Agroenergia, wellington.santos@embrapa.br

² Engenheiro Bioquímico, mestre em Tecnologias Química e Biológica, analista da Embrapa Agroenergia, felipe.carvalho@embrapa.br

³ Química, doutora em Físico-Química, analista da Embrapa Agroenergia, larissa.andreani@embrapa.br

⁴ Químico, doutor em Química, pesquisador da Embrapa Agroenergia, leonardo.valadares@embrapa.br

umidade traz problemas para a armazenagem do bagaço, pois o material pode sofrer ataques microbiológicos e apodrecimento devido à presença de água.

Uma possibilidade de aumentar a eficiência de cogeração de energia do bagaço de cana-de-açúcar é secar este material. Entretanto, é importante ressaltar que processos industriais de secagem apresentam elevado consumo energético pois para tanto é necessário calor e fluxo de gás seco.

Uma alternativa para a secagem de biomassa, sem consumo intensivo de energia é a utilização da energia solar radiante para aquecer e secar o bagaço.

Raios solares podem ser concentrados pelo uso de espelhos a fim de gerar calor. Os raios são concentrados em um receptor, que aquece e utiliza a energia térmica para diversos fins como: aquecimento de água, purificação de água por destilação, geração de energia elétrica, condução de reações químicas, etc.

O concentrador solar é uma tecnologia bastante desenvolvida, entretanto, o Brasil não utiliza amplamente esta forma de energia apesar do seu grande potencial (Pereira, 2017). A irradiação solar no Brasil permite o aproveitamento da energia heliotérmica em todo o território, a não ser em eventos como o inverno no Sul, sendo que as regiões mais próximas do equador podem aproveitar melhor esta forma de energia.

Existem diversos exemplos de estudos internacionais que propõem a aplicação da energia heliotérmica para geração direta de energia elétrica nas torres solares (*solar power towers*), tão como propostas para aumento de eficiência de usinas termoelétricas (Keck et al., 2017). Exemplos interessantes de tratamentos e/ou transformações da biomassa foram encontrados na literatura para a gaseificação de biomassa (Müller et al., 2017) e reforma de biogás (Agrafiotis et al., 2014). Entretanto, não foi encontrado na literatura o emprego de concentradores solares para densificação energética da biomassa, como no processo de secagem, torrefação e carvoejamento do bagaço de cana-de-açúcar.

Deste modo, este artigo tem como objetivo a utilização de concentradores solares para a secagem do bagaço de cana-de-açúcar, gerando uma biomassa agroindustrial beneficiada. Para tanto foi utilizando um concentrador solar de 1 m², acoplado a um forno de secagem com fluxo de gás. A massa, a temperatura interna, a temperatura externa e a irradiação solar foram monitoradas ao longo tempo.

Material e Métodos

O bagaço de cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L.) foi gentilmente doado pela Empresa AlBioma (Usina Jalles Machado) (Goianésia, GO) para a realização da pesquisa. Amostras de bagaço foram pesadas, colocadas em bandejas metálicas e colocadas em estufa com circulação forçada de ar a 105 °C. Após 24 horas a massa das amostras foram novamente medidas para determinar o seu teor de umidade.

Para o estudo de densificação energética do bagaço de cana-de-açúcar, foi utilizado um concentrador solar construído com 25 espelhos planos de 200 x 200 x 4 mm. A Figura 1 mostra fotografias do concentrador solar construído com materiais baratos e acessíveis comercialmente como: espelhos, compensado marítimo, barras de aço de perfil quadrado, perfil “L” e perfil chato, rodas com travas, parafusos com porcas, chapa de aço fina, cola para espelhos, chapa de aço fina, lona de plástico e tinta para acabamento.

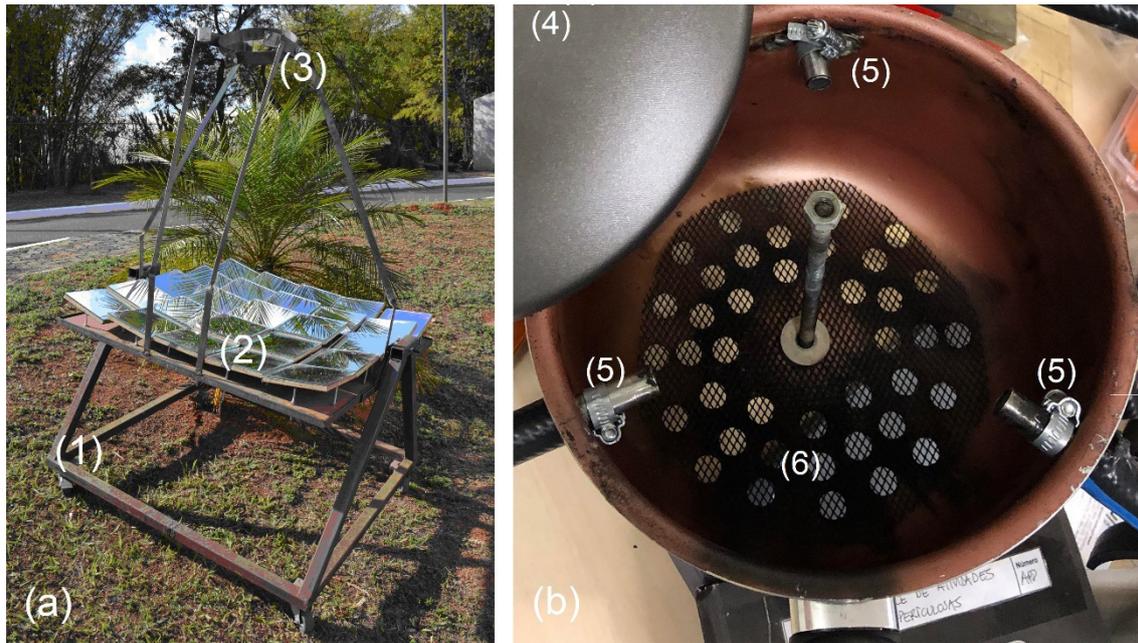


Figura 1. Fotografias mostrando (a) o concentrador solar e (b) o forno de secagem. O concentrador possui as seguintes partes (1) base móvel, (2) painel móvel com 25 espelhos de 20 x 20 cm e (3) suporte para o forno. O forno possui: (4) uma tampa metálica, (5) três entradas de gás e (6) saídas de gás.

A construção do concentrador solar não é o foco principal deste trabalho, ainda assim ressalta-se que esta construção deve ser realizada por profissional serralheiro e soldador e consultando documentos apropriados. Os operadores do concentrador solar devem passar protetor solar e usar óculos escuros.

Para a determinação de eficiência do concentrador foi usado um receptor de alumínio com massa de 597 g contendo 1820 g de água destilada, resultando em um corpo de capacidade térmica (C) de 8175 J/°C, considerando o calor específico (c) do alumínio de 0,92 J/g.°C e c da água de 4,19 J/g.°C

A Figura 1b mostra o forno de secagem. O forno foi construído a partir de panela de alumínio recoberta com teflon, que teve o seu fundo perfurado, para possibilitar a vazão do gás. Uma tela foi alocada no fundo do recipiente para evitar perda do bagaço e em parafuso metálico foi usado para fechar o forno. Para a entrada de gás, três tubulações foram colocadas na parte do forno que fica exposta à reflexão do sol. Um fluxo de ar comprimido foi obtido a partir de 0,5 bar de pressão antes das tubulações, com fluxo dentro do reator estimado em cerca de 100 L/min.

A irradiação solar foi medida com o piranômetro InstruFiber, modelo MES-200, com dados registrados a cada segundo. Para tanto o sensor de irradiação foi acoplado ao concentrador solar de forma a ficar apontado diretamente para o sol.

A temperatura externa foi monitorada com termômetro infravermelho, medindo a temperatura na lateral do forno e no receptor.

Resultados e Discussão

O bagaço de cana-de-açúcar utilizado neste trabalho apresentou teor de umidade médio de 42,47% com desvio padrão de 0,23%.

A Figura 2 apresenta o gráfico utilizado para a determinação de eficiência do concentrador.

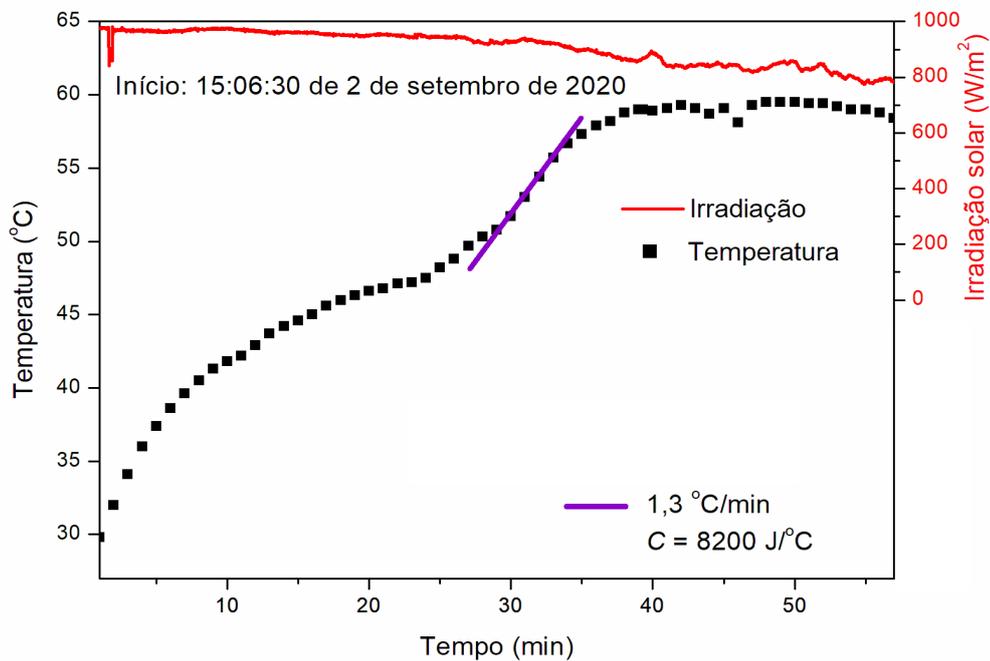


Figura 2. Gráfico utilizado para a determinação de eficiência do sistema. Os quadrados pretos representam a temperatura de 1830 g de água em recipiente de alumínio de 597 g, registrada ao longo do tempo de exposição ao sol, em concentrador solar de 1 m². A irradiação solar é mostrada em vermelho.

A Figura 2 mostra a evolução da temperatura ao longo do tempo de exposição do reator ao sol utilizando o concentrador de 1 m². A temperatura sobe e atinge um platô de temperatura máxima de 59 °C a partir de 39 minutos de exposição. Quando a temperatura chega 59 °C o sistema entra em equilíbrio, onde a energia fornecida ao sistema é a mesma energia perdida para o ambiente. A irradiação solar variou pouco, entre 800 a 1000 W/m², com o clima ensolarado. A irradiação solar decresceu ao longo do tempo, como é esperado para este horário.

A região entre 30 e 33 minutos foi escolhida por apresentar alto aquecimento, de 1,3 °C/min e irradiação solar média de 929 W/m². No caso ideal, com 100% de eficiência, a potência de 929 W (55740 J/min) aqueceria um corpo de 8200 J/°C a 6,8 °C/min. Assim, neste experimento o sistema apresentou máxima de eficiência de 19%.

Considerando todo o tempo para chegar ao platô, partindo de 30 °C e chegando a 59 °C após 39 minutos, tem-se a taxa de aquecimento de 0,74 °C/min. Obtendo-se eficiência de 10,7%, com irradiação média de 943 W/m².

A Figura 3 mostra gráficos representando a perda de umidade do bagaço de cana-de-açúcar, a irradiação solar, em conjunto com temperatura lateral e da fonte de calor do forno de secagem (receptor de luz).

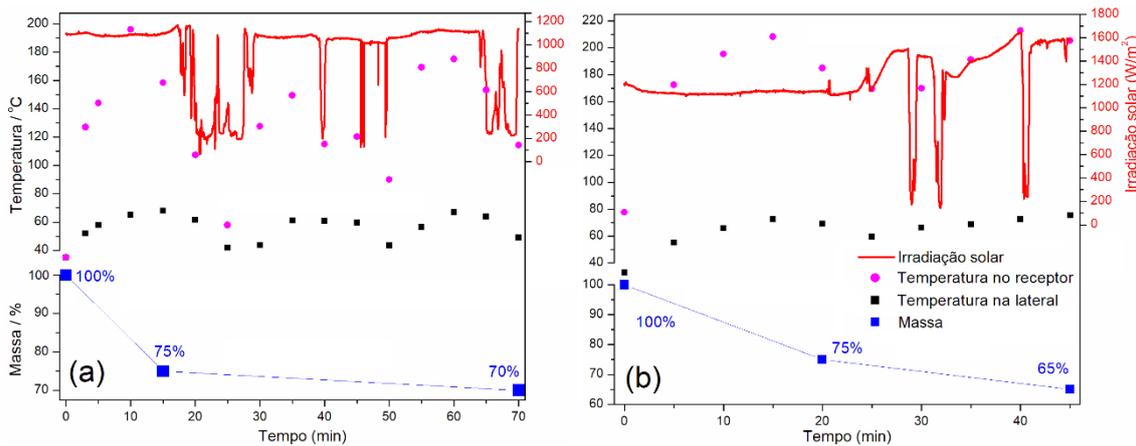


Figura 3. Experimento de secagem de bagaço de cana-de-açúcar utilizando concentrador solar de 1 m². (a) Massa inicial igual a 200 g de bagaço, começando às 14:49 de 16 de setembro de 2020. (b) Massa inicial igual a 100 g de bagaço, começando às 10:58 de 17 de setembro de 2020. Os gráficos mostram a irradiação solar, a temperatura na lateral do forno, a temperatura no receptor e massa da amostra.

A irradiação solar permaneceu acima de 1000 W/m² durante os experimentos, entretanto, quedas bruscas de irradiação são observadas devido à presença de nuvens. A temperatura da lateral do forno varia com a irradiação solar, diminuindo nos momentos nublados. A temperatura do receptor sobe rapidamente quando exposto ao sol, chegando a 200 °C em alguns momentos.

Maior taxa de perda de massa ocorre no início do experimento. O experimento com 200 g de bagaço resulta em 70% da massa inicial após 70 minutos de exposição. O experimento com 100 g de bagaço resulta em 65% da massa inicial após 45 minutos de exposição.

Maior perda de umidade foi obtida utilizando pequenas quantidades de bagaço de cana-de-açúcar. Utilizando 100 g de bagaço foi possível obter 65 gramas de material após 45 minutos de exposição ao sol. Considerando que essa perda de massa ocorre pela evaporação da água, fomos removidos 82% da umidade do material, visto que a amostra inicial possui 42,72% de água. Com quantidades maiores de bagaço, a secagem ocorre de forma heterogênea, sendo que a região mais próxima à fonte de calor seca primeiro.

Conclusão

O concentrador solar apresenta eficiência máxima de 19% para transformar irradiação solar em calor.

Foi possível remover 82 % da umidade de 100 g de bagaço de cana após 45 minutos de exposição ao sol, com fluxo de ar comprimido de 100 L/min em concentrador solar de 1 m². Estes resultados demonstram que é possível remover umidade do bagaço de cana-de-açúcar utilizando concentrador solar, gerando um combustível sólido de maior densidade energética.

Agradecimentos

Os autores agradecem a Juarez Silva pela montagem do concentrador solar.

Esta pesquisa foi financiada pela Fundação de Apoio à Pesquisa do Distrito Federal (FAP-DF), Processo 0193.001631/2017 – TOA 1628/2017.

O bagaço de cana-de-açúcar utilizado neste trabalho foi gentilmente cedido pela Empresa AlBioma.

Referências

AGRAFIOTIS, C.; STORK, H.; ROEB, M.; SATTLER, C. Solar thermal reforming of methane feedstocks for hydrogen and syngas production – A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v. 29, p. 656-682, 2014.

BEN. **Balanco Energético Nacional** 2018, Disponível em: <<https://ben.epe.gov.br/>> Acesso em agosto de 2020.

KECK, T.; BALZ, M.; BLUMENTHAL, Y. Large is Beautiful – Progress of HelioFocus 500 m2 Dish. *Energy Procedia*, v. 69, p. 1597-1602, 2015.

LOBO, C. S. **A importância da cogeração utilizando bagaço de cana-de-açúcar como forma de diversificação da matriz elétrica**. 2013. 113 f. Escola Politécnica da Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro. Orientadora: Carmen Lucia Tancredo Borges. (Mudar essa ref.)

MÜLLER, F.; POZOVIL, P.; EYK, P. J.; VILLARRAZO, A.; HAUETER, P.; WIECKERT, C.; NATHAN, G. J.; STEINFELD. A pressurized high-flux solar reactor for the efficient thermochemical gasification of carbonaceous feedstock. *Fuel*, v. 193, p. 432-443, 2017.

PEREIRA, E. P.; MARTINS, F. R.; GONÇALVES, A. R.; COSTA, R. S.; FRANCISCO J. LOPES de LIMA, F. J. L.; RÜTHER, R.; de ABREU, S. L.; TIEPOLO, G. M.; PEREIRA, S. L.; de SOUZA J. G. **Atlas brasileiro de energia solar**. São José dos Campos, SP. Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais, 2.ed. 2017. 80 p.



**BIOTECNOLOGIA
INDUSTRIAL**

Análise filogenética e expressão heteróloga de uma xilose isomerase bacteriana em *Saccharomyces cerevisiae*

*Gabriel de Souza Colombo*¹, *Ísis Viana Mendes*², *Betúlia de Moraes Souto*³,
*Nádia Parachin*⁴, *João Ricardo Almeida*⁵, *Betania Ferraz Quirino*⁶

Resumo

A crise climática atual pressiona a substituição das fontes de energia de origem fóssil por alternativas sustentáveis. Nesse cenário, o bioetanol de segunda geração, produzido pela levedura *Saccharomyces cerevisiae* a partir da fermentação de açúcares presentes na biomassa lignocelulósica de restos agrícolas, representa uma alternativa para a gasolina. Porém, uma fração desta biomassa é composta por pentoses, como a xilose, incapazes de serem metabolizadas pela *S. cerevisiae*. A inserção de uma via metabólica para conversão direta da xilose em xilulose, um intermediário da via das pentose-fosfato quando fosforilada, por meio da enzima xilose isomerase, permite o consumo deste açúcar por *S. cerevisiae*, possibilitando um melhor aproveitamento da lignocelulose para produção de bioetanol. Contudo, poucas xilose isomerases foram satisfatoriamente expressas em *S. cerevisiae*. Neste trabalho, uma nova xilose isomerase, nomeada Xy1, identificada em uma biblioteca metagenômica de rúmen de cabras brasileiras, permitiu o consumo de xilose por uma cepa de *S. cerevisiae*, denominada LXB. No entanto, houve alta variação no crescimento médio desta cepa. Uma árvore filogenética inferida com sequências codificadoras para xilose isomerases de fungos e bactérias evidenciou a origem bacteriana da Xy1, devido a maior proximidade evolutiva a xilose isomerases de bactérias do filo Firmicutes. A variação no crescimento da LXB pode estar relacionada a problemas pós-traducionais da enzima bacteriana quando expressa em *S. cerevisiae*. Portanto, estudos adicionais da Xy1 são necessários para elucidar e corrigir os fatores que impedem o uso desta enzima para a produção de bioetanol de segunda geração.

Palavras-chave: xilose isomerase, *Saccharomyces cerevisiae*, bioetanol, Firmicutes.

Introdução

A crescente crise climática atual, derivada dos constantes impactos ambientais antropogênicos, como a queima de combustíveis fósseis, um dos principais fatores que impulsionam o aquecimento global, têm representado uma ameaça real para o futuro da humanidade (Easterling et al., 2000; Coumou; Rahmstorf, 2012; Al-Ghussain, 2019). Logo, a necessidade para o uso de alternativas sustentáveis nos diversos setores industriais tem se tornado cada vez mais evidente. Nesse contexto, o uso de biocombustíveis como

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

² Bióloga, mestre em Ciências Biológicas, colaboradora da Embrapa Agroenergia, isis.mendes@colaborador.embrapa.br

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

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

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

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

substituto aos combustíveis fósseis representa uma solução promissora para suprir a demanda global de energia, especialmente para o transporte (Alalwan; Alminshid; Aljaafari, 2019). Entre estes, o bioetanol de segunda geração, produzido a partir da fermentação de açúcares presentes na biomassa lignocelulósica de restos agrícolas pela levedura *Saccharomyces cerevisiae*, destaca-se por ser a principal alternativa sustentável para a gasolina, especialmente por evitar conflitos de uso com biomassa derivada de plantações para consumo, como acontece com o bioetanol de primeira geração (Rulli et al., 2016; Alalwan; Alminshid; Aljaafari, 2019).

No entanto, uma vez que a levedura *S. cerevisiae* é incapaz de metabolizar pentoses, como a xilose, presente em relativa abundância na fração hemicelulósica da biomassa lignocelulósica (Isikgor; Becer, 2015), esta fração não é aproveitada adequadamente para a produção de bioetanol. Desde então, esforços de engenharia metabólica têm sido realizados para a criação de cepas de *S. cerevisiae* capazes de converter xilose em xilulose, implementando uma via de oxirredução, utilizando as enzimas xilose redutase (XR) seguida da xilose desidrogenase (XDH), ou uma via direta utilizando a enzima xilose isomerase (XI). A xilulose é, em seguida, convertida no intermediário da via das pentose-fosfato: xilulose-5-fosfato, pela xiluloquinase, uma enzima já presente em *S. cerevisiae* (Jeffries, 2006; Cunha et al., 2019; Zhao et al., 2020). Porém, devido a problemas de eficiência relacionados a um desequilíbrio redox causado pela preferência distinta de cofatores pelas enzimas da via oxirredutiva, tem-se optado a implementação da via direta utilizando xilose isomerase. Entretanto, poucas xilose isomerases foram expressas com sucesso em *S. cerevisiae* (Walfridsson, 1996; 2002; Kuyper et al., 2005; Brat; Boles; Wiedmann, 2009; Madhavan et al., 2009; Hector et al., 2013).

Por meio de um *screening* funcional de uma biblioteca metagenômica de rúmen de cabras brasileiras, Mendes (2016) identificou um gene codificante para xilose isomerase de origem bacteriana, o qual denominou de *Xy1* e, posteriormente, teve os códons otimizados para expressão em *S. cerevisiae*, sendo renomeado para *XyBet*. No presente trabalho, os resultados da reavaliação da filogenia do gene *Xy1* e a expressão funcional do gene *XyBet* em *S. cerevisiae*, por meio do cultivo em meio com xilose como única fonte de carbono, são apresentados.

Material e Métodos

Análise filogenética do gene *Xy1/XyBet*

A sequência de aminoácidos deduzida do gene *Xy1* foi comparada com sequências presentes no banco de dados RefSeq (Oleary et al., 2015) do NCBI usando a ferramenta blastp (Madden; Tatusov; Zhang, 1996), para identificar sequências similares codificantes para xilose isomerases de outros organismos. No mesmo banco de dados, para fins de comparação, foram também coletadas sequências pertencentes a organismos dos filos Proteobacteria, Bacteroidetes e Actinobacteria e do reino Fungi, assim como sequências de xilose isomerases com atividade funcional confirmada em *S. cerevisiae*. Com essas sequências, uma árvore filogenética foi inferida no programa MEGAX (Kumar et al., 2018) utilizando o método de probabilidade máxima (*Maximum likelihood*) e o modelo baseado em matriz JTT (Jones; Taylor; Thornton, 1992), após alinhamento das sequências pelo algoritmo MUSCLE (Edgar, 2004).

Transformação da cepa LC-7 de *Saccharomyces cerevisiae*

Para a expressão heteróloga do gene *XyBet* em *S. cerevisiae*, foi utilizada a cepa LC-7, desenvolvida por engenharia evolutiva em um trabalho de mestrado realizado na Embrapa Agroenergia (Paes, 2015). O gene *XyBet* foi inserido no vetor plasmidial não integrativo p424GPD (Mumberg; Müller; Funk, 1995). No mesmo vetor, o gene *xylA* de *Piromyces* sp. foi usado como controle positivo. O vetor vazio foi usado como controle negativo. A transformação da levedura foi conduzida segundo o protocolo de Gietz e Schiestl (2007) com LiAc/ssDNA/PEG e os transformantes foram cultivados em meio sólido YNB (1,7 g/L YNB Sigma®, 5 g/L (NH₄)₂SO₄, 15 g/L agar) suplementado com 30 g/L de glicose e 100 mg/L de uracila para recuperação das células. As placas foram incubadas por 48 horas a 30° C. A capacidade de crescimento em meio com xilose como única fonte de carbono foi confirmada pelo cultivo em meio YNB suplementado com 40 g/L de xilose, 100 mg/L de uracila e 15 g/L ágar a 30° C. As cepas transformadas foram renomeadas para LXB (LC-7 + p424GPD-*XyBet*), LXP (LC-7 + p424GPD-*xylA* de *Piromyces* sp.) e LP4G (LC-7 + p424GPD).

Expressão funcional do gene *XyBet* em *Saccharomyces cerevisiae*

Para avaliação quantitativa do crescimento em meio com xilose como única fonte de carbono, as cepas LC-7 de *S. cerevisiae* transformadas foram inicialmente cultivadas em meio sólido YNB suplementado com 20 g/L de glicose, 100 mg/mL uracil e 15 g/L de ágar. As placas foram incubadas por 3 dias a 30° C. Três colônias de cada cepa foram selecionadas e inoculadas separadamente em tubos de ensaio estéreis de 50 mL contendo 10 mL de meio líquido YNB 2X suplementado com 20 g/L de glicose e xilose e 100 mg/L de uracila. Os tubos foram incubados a 30° C e 200 rpm por aproximadamente 3 dias. As células foram lavadas com água destilada estéril e inoculadas a OD₆₀₀ = 0,5 inicial em 40 mL de meio YNB suplementado com 40 g/L de xilose, 100 mg/L de uracila e tampão ftalato de potássio pH 5,5 em frascos erlenmeyers de 250 mL, incubados a 30° C e sob 200 rpm de agitação. Foram retiradas amostras de cada ponto da curva de crescimento para quantificação do crescimento por absorbância em OD₆₀₀.

Resultados e Discussão

Foram coletadas, ao todo, 57 sequências de aminoácidos referentes a xilose isomerases bacterianas e fúngicas para montagem da árvore filogenética comparativa. Evidenciando sua origem bacteriana, o gene *Xy1* localizou-se inserido, como um grupo irmão, em um clado composto por xilose isomerases de organismos do filo Firmicutes (Figura 1), o qual é representado por bactérias gram-positivas de solo capazes de utilizar diferentes fontes de carbono, como pentoses, hexoses e polissacarídeos complexos, como xilana (Gu et al., 2010; Sharmin et al., 2010; Zhao et al., 2020). É interessante notar que a primeira xilose isomerase de um membro do filo Firmicutes, *Lachnoclostridium phytofermentans* (Brat; Boles; Wiedmann, 2009), encontra-se como grupo externo ao clado formado, majoritariamente, por membros do filo Bacteroidetes, no qual também estão incluídas as xilose isomerases de *Piromyces* sp., *Orpinomyces* sp. e *Prevotella ruminicola*, todas com atividade funcional em *S. cerevisiae* (Kuyper et al.,

2005; Madhavan et al., 2009; Hector et al., 2013). Possivelmente, a atividade funcional da primeira em *S. cerevisiae* deriva de sua proximidade evolutiva com as últimas, ou vice-versa.

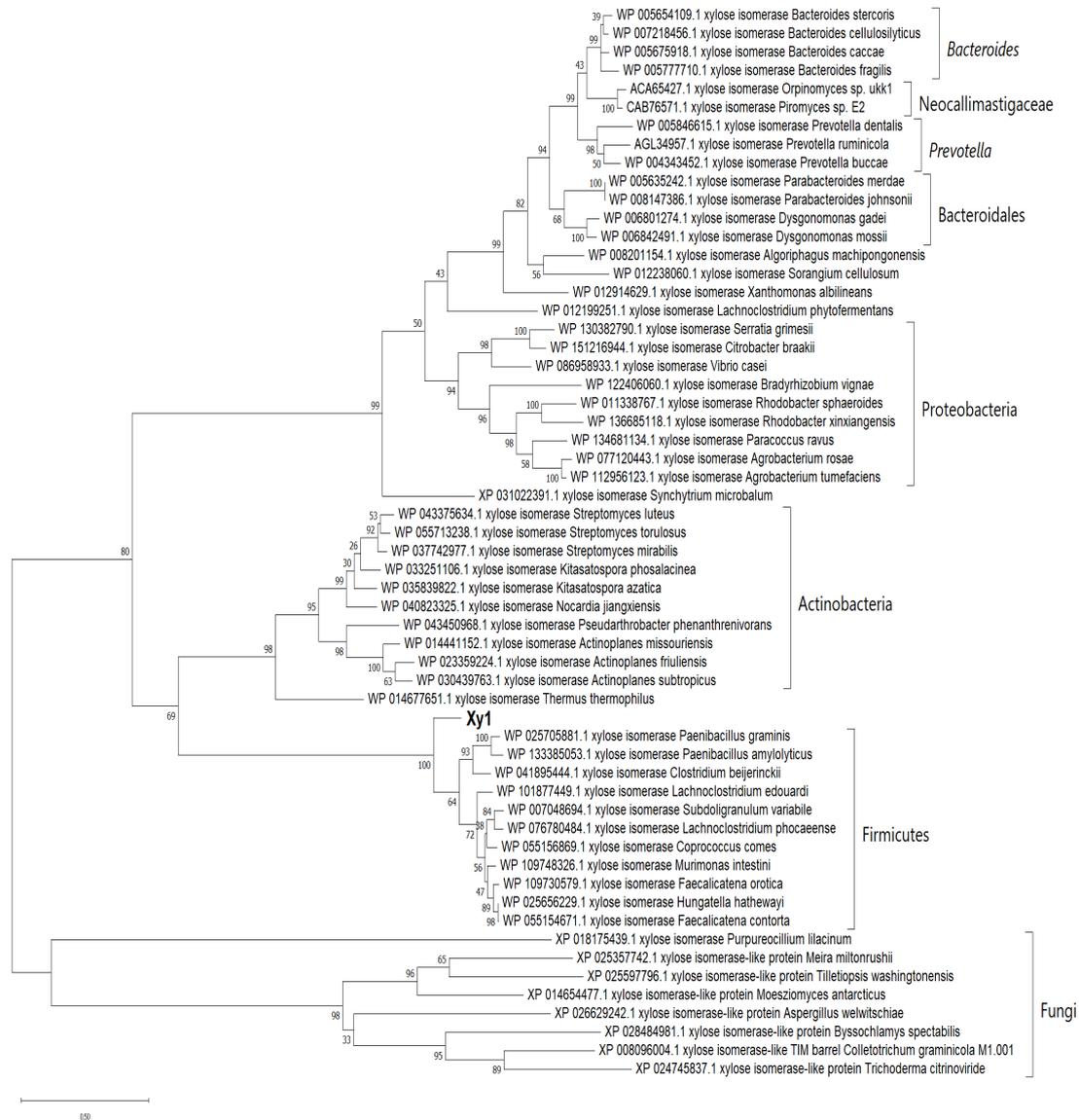


Figura 1. Árvore filogenética construída com 57 xilose isomerases bacterianas e fúngicas. Também foram incluídas xiloses isomerases com atividade funcional confirmada em *Saccharomyces cerevisiae* (Walfridsson, 1996; Kuyper et al., 2005; Brat; Boles; Wiedmann, 2009; Madhavan et al., 2009; Hector et al., 2013). A posição do gene Xy1 encontra-se destacada em negrito. A porcentagem de árvores em que os táxons associados se agruparam encontra-se próxima aos ramos. Foi utilizada o método de Probabilidade Máxima (Maximum Likelihood) (Jones; Taylor; Thornton, 1992) para inferência da árvore filogenética no programa MEGAX (Kumar et al., 2018)

Após confirmação da transformação da LC-7, a capacidade de crescimento das cepas LXB e LXP em meio sólido com xilose como única fonte de carbono foi confirmada após cerca de 14 dias, com um maior crescimento para a LXP em relação a LXB. Não foi

observado crescimento pela LP4G, como esperado para estas condições. A avaliação quantitativa do crescimento em meio com xilose como única fonte de carbono apresentou resultados similares, visto que tanto a LXP quanto a LXB apresentaram crescimento, novamente com a primeira apresentando um crescimento mais rápido em comparação à última. Porém, pode-se observar tanto uma maior variabilidade de crescimento entre as réplicas de cada cepa. O controle-positivo LXP apresentou um crescimento mais homogêneo, com baixa variação das réplicas em relação ao crescimento médio ($s_{312h} = 0,268$), enquanto a LXB, no decorrer do experimento, apresentou uma variação crescente ($s_{312h} = 2,253$), devido ao baixo crescimento de uma das réplicas em comparação as outras (Figura 2A). Em um segundo experimento subsequente, sob as mesmas condições, foi observado um crescimento similar para ambas as cepas, porém, desta vez, duas réplicas da LXB apresentaram baixo crescimento, o que resultou em uma redução considerável da média de crescimento, assim como um alto desvio-padrão ao final do período de cultivo ($s_{312h} = 3,069$) (Figura 2B).

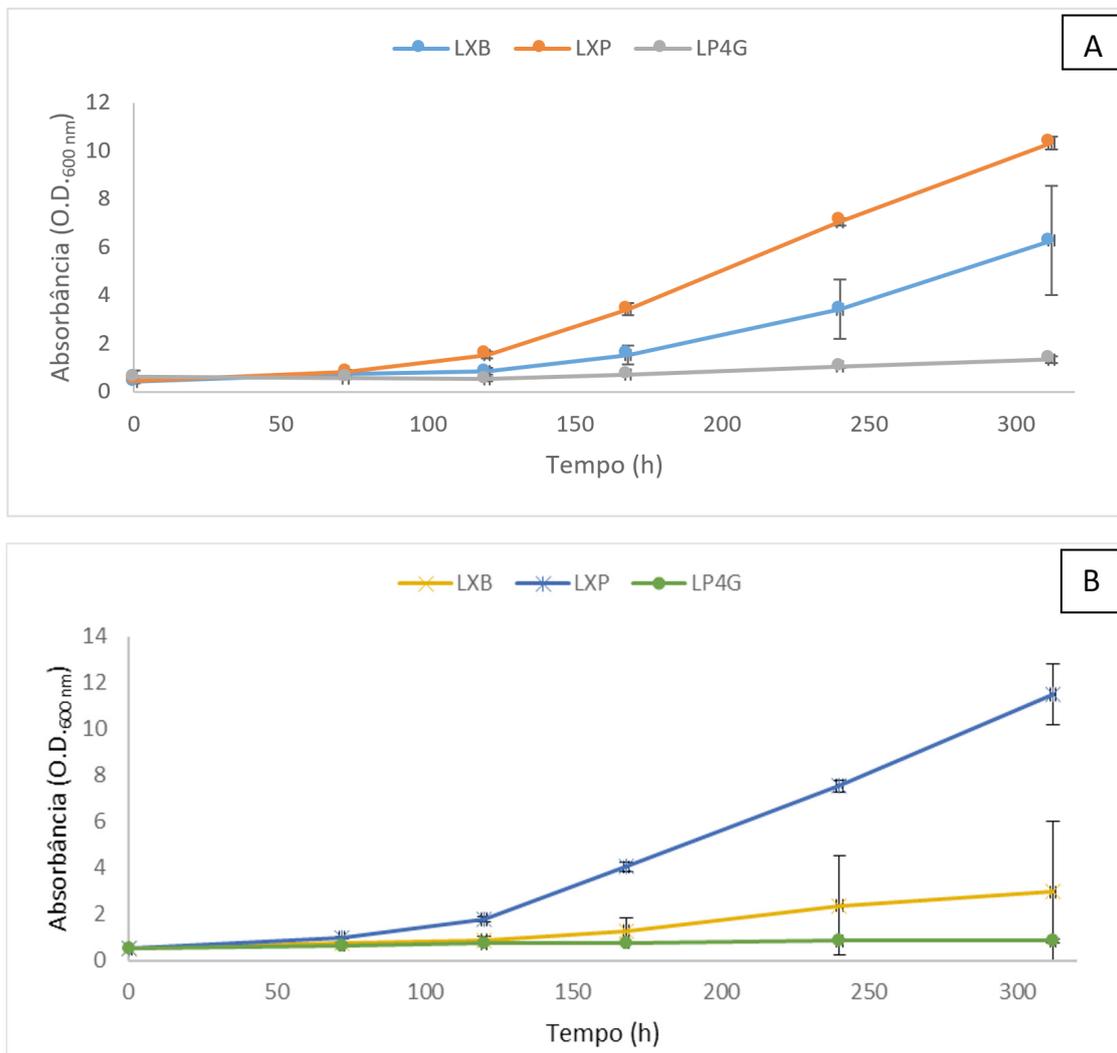


Figura 2. Curvas de crescimento do cultivo em triplicata das cepas LXB, LXP e LP4G em meio suplementado com 40 g/L de xilose, 100 mg/mL de uracila e tampão ftalato de potássio pH 5,5 1X, por um período de 312 horas. A: Primeiro experimento. B: Segundo experimento. Barras de erro indicam desvio-padrão de crescimento médio para cada ponto amostral.

Visto que ambas as cepas-controle (LXP e LP4G) apresentaram o resultado esperado (crescimento do controle positivo LXP e ausência de crescimento do controle negativo LP4G) nos dois experimentos realizados, o que reduz suspeitas de erros experimentais, pressupõe-se que a variabilidade no crescimento médio da LXB deriva de uma instabilidade inerente à xilose isomerase codificada pelo gene *XyBet*, uma vez que o principal fator que diferencia cada cepa é o gene que possuem. Nesse caso, a falta de um crescimento satisfatório de algumas das réplicas da LXB seria um indicativo de problemas pós-traducionais na enzima codificada pelo gene *XyBet* em *S. cerevisiae*, porém insuficientes para impedir o crescimento da cepa em meio com xilose como única fonte de carbono, uma vez que atividade funcional foi observada.

Em um dos primeiros trabalhos sobre esse tema, Sarthy et al. (1987) buscou expressar a xilose isomerase de *Escherichia coli* em *S. cerevisiae*, utilizando cepas e vetores diferentes, porém nenhum transformante foi capaz de crescer em meio com xilose como única fonte de carbono. Análises subsequentes indicaram que os transformantes produziam a enzima, porém a maior parte estaria em uma forma particulada e, portanto, inativa. Outras hipóteses foram levantadas pelos autores para explicar a inatividade da enzima expressa por *S. cerevisiae*, porém a mais provável é o dobramento incorreto da enzima, considerando o trabalho de outros autores que também buscaram a expressão heteróloga de enzimas bacterianas em *S. cerevisiae* (Gárdonyi et al., 2003; Xia et al., 2016a).

Sabe-se que o complexo de chaperonas composto pela proteína GroEL e o cofator GroES, presente em bactérias, mitocôndrias e cloroplastos, é responsável por garantir o correto dobramento proteico nesses sistemas biológicos (Xia et al., 2016b). A ausência deste complexo em eucariotos poderia ser a causa para a inatividade de enzimas bacterianas expressas em *S. cerevisiae* e outros eucariotos. O trabalho de Xia et al. (2016a) corroborou com esta hipótese, demonstrando que a co-expressão do sistema GroEL-GroES da cepa BL21 de *Escherichia coli* em *S. cerevisiae*, junto a uma xilose isomerase da mesma cepa de *E. coli*, permitiu a expressão funcional da enzima pela levedura. Devido a origem bacteriana do gene *Xy1/XyBet*, possivelmente a mesma hipótese explique a falta de um crescimento médio satisfatório da LXB nos experimentos realizados.

Conclusão

Neste trabalho, a expressão funcional de uma nova xilose isomerase bacteriana em *S. cerevisiae* foi apresentada. Ainda que uma alta variação tenha sido observada para o crescimento médio da LXB em meio com xilose como única fonte de carbono, os resultados indicam que a xilose isomerase codificada pelo gene *Xy1/XyBet* possibilita o consumo de xilose pela levedura. Estudos adicionais sobre as características bioquímicas desta enzima são necessários para elucidar os fatores responsáveis pela alta variação observada e obter uma atividade funcional satisfatória para produção de bioetanol de segunda geração. Possivelmente, modificações adicionais na cepa de *S. cerevisiae* também sejam necessárias para atingir este objetivo.

Referências

ALALWAN, H. A.; ALMINSHID, A. H.; ALJAAFARI, H. A. S. Promising evolution of biofuel generations. Subject review. *Renewable Energy Focus*, [S. l.], v. 28, p. 127–139, 2019.

- AL-GHUSSAIN, L. Global warming: review on driving forces and mitigation. **Environmental Progress & Sustainable Energy**, [S. l.], v. 38, n. 1, p. 13–21, 2019.
- BRAT, D.; BOLES, E.; WIEDEMANN, B. Functional Expression of a Bacterial Xylose Isomerase in *Saccharomyces cerevisiae*. **APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY**, [S. l.], v. 75, n. 8, p. 2304–2311, 2009.
- COUMOU, D.; RAHMSTORF, S. A decade of weather extremes. **Nature Climate Change**, [S. l.], v. 2, n. 7, p. 491–496, 2012.
- CUNHA, J. T. et al. Xylose fermentation efficiency of industrial *Saccharomyces cerevisiae* yeast with separate or combined xylose reductase/xylytol dehydrogenase and xylose isomerase pathways. **Biotechnology for Biofuels**, [S. l.], v. 12, n. 1, 2019.
- EASTERLING, D. R. Climate Extremes: Observations, Modeling, and Impacts. **Science**, [S. l.], v. 289, n. 5487, p. 2068–2074, 2000.
- EDGAR, R. C. MUSCLE: Multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. **Nucleic Acids Research**, [S. l.], v. 32, n. 5, p. 1792–1797, 2004.
- GIETZ, R. D.; SCHIESTL, R. H. High-efficiency yeast transformation using the LiAc/SS carrier DNA/PEG method. **Nature Protocols**, [S. l.], v. 2, n. 1, p. 31–34, jan. 2007.
- GU, Y. et al. Reconstruction of xylose utilization pathway and regulons in Firmicutes. **BMC Genomics**, [S. l.], v. 11, n. 1, p. 255, 2010.
- HECTOR, R. E. et al. Growth and fermentation of D-xylose by *Saccharomyces cerevisiae* expressing a novel D-xylose isomerase originating from the bacterium *Prevotella ruminicola* TC2-24. **Biotechnology for Biofuels**, [S. l.], v. 6, n. 1, 2013.
- SIKGOR, F. H.; BECER, C. R. Lignocellulosic biomass: a sustainable platform for the production of bio-based chemicals and polymers. **Polymer Chemistry**, [S. l.], v. 6, n. 25, p. 4497–4559, 2015.
- JEFFRIES, T. W. Engineering yeasts for xylose metabolism. **Current Opinion in Biotechnology**, [S. l.], v. 17, n. 3, p. 320–326, 2006.
- JONES, D. T.; TAYLOR, W. R.; THORNTON, J. M. The rapid generation of mutation data matrices from protein sequences. **Bioinformatics**, [S. l.], v. 8, n. 3, p. 275–282, 1992.
- KUMAR, S. et al. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms. **Molecular Biology and Evolution**, [S. l.], v. 35, n. 6, p. 1547–1549, 2018.
- KUYPER, M. et al. Metabolic engineering of a xylose-isomerase-expressing strain for rapid anaerobic xylose fermentation. **FEMS Yeast Research**, [S. l.], v. 5, n. 4–5, p. 399–409, 2005.
- MADDEN, T. L.; TATUSOV, R. L.; ZHANG, J. Applications of network BLAST server. **Methods in Enzymology**, [S. l.], v. 266, p. 131–137, 1996.
- MADHAVAN, A. et al. Xylose isomerase from polycentric fungus *Orpinomyces*: Gene sequencing, cloning, and expression in *Saccharomyces cerevisiae* for bioconversion of xylose to ethanol. **Applied Microbiology and Biotechnology**, [S. l.], v. 82, n. 6, p. 1067–1078, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00253-008-1794-6>. Acesso em: 16 set. 2020.
- 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, 2016.
- MUMBERG, Dominik; MÜLLER, Rolf; FUNK, Martin. Yeast vectors for the controlled expression of heterologous proteins in different genetic backgrounds. **Gene**, [S. l.], v. 156, n. 1, p. 119–122, abr. 1995.
- O'LEARY, Nuala A. et al. Reference sequence (RefSeq) database at NCBI: current status, taxonomic expansion, and functional annotation. **Nucleic Acids Research**, [S. l.], v. 44, n. 1, p. 733–745, 8 nov. 2015.
- PAES, Bárbara Gomes. **Engenharia metabólica de *Saccharomyces cerevisiae* para aproveitamento de xilose na produção de etanol lignocelulósico**. 2015. 101 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Pós-graduação em Biologia Molecular, Departamento de Biologia Celular, Universidade de Brasília, Brasília, 2015.
- RULLI, M. C. et al. The water-land-food nexus of first-generation biofuels. **Scientific Reports**, [S. l.], v. 6, n. 1, p. 1–10, 2016.
- SARTHY, A. V. et al. Expression of the *Escherichia coli* xylose isomerase gene in *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied and environmental microbiology**, [S. l.], v. 53, n. 9, p. 1996–2000, 1987.
- WALFRIDSSON, M. et al. Ethanolic fermentation of xylose with *Saccharomyces cerevisiae* harboring the *Thermus thermophilus xylA* gene, which expresses an active xylose (glucose) isomerase. **Applied and Environmental Microbiology**, [S. l.], v. 62, n. 12, 1996.
- XIA, P. F. et al. GroE chaperonins assisted functional expression of bacterial enzymes in *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnology and Bioengineering**, [S. l.], v. 113, n. 10, p. 2149–2155, 2016a.
- XIA, P. F.; TURNER, T. L.; JAYAKODY, L. N. The Role of GroE Chaperonins in Developing Biocatalysts for Biofuel and Chemical Production. **Enzyme Engineering**, [S. l.], v. 05, n. 03, 2016b.
- ZHAO, Z. et al. Biochemical routes for uptake and conversion of xylose by microorganisms. **Biotechnology for Biofuels**, [S. l.], v. 13, n. 1, p. 21, 2020.

Aprimoramento de um processo enzimático para a síntese de ácido glicônico

Eduardo Arantes da Silva¹, Matheus Firetti Cunha², Davi Fontenele de Oliveira³, Rossano Gambetta⁴, Thályta Fraga Pacheco⁵, Thaís Demarchi Mendes⁶, Dasciana de Sousa Rodrigues⁷

Resumo

Atualmente, o ácido glicônico é produzido industrialmente pela oxidação microbiana de glicose. Entretanto, esse processo encontra-se em vias de ser substituído pelo processo enzimático, o qual vem sendo fortemente investigado pela comunidade científica, visando melhorar os parâmetros de produção por meio, principalmente, de engenharia das enzimas e ajustes das condições operacionais do processo. O objetivo deste estudo foi aprimorar o processo de produção de ácido glicônico usando uma rota enzimática e glicose com elevado grau de pureza como substrato. A glicose oxidase de *Aspergillus niger* foi utilizada como enzima modelo. Foram avaliados os efeitos da concentração inicial de glicose, da presença de peroxidase e da aeração do meio reacional. A concentração inicial de glicose variou de 10 g/L a 100 g/L nos ensaios de síntese. As reações foram realizadas em microplaca utilizando um volume de trabalho de 110 µL. O melhor resultado alcançado foi obtido usando uma concentração inicial de glicose de 100 g/L em sistema aerado após 72 horas de reação, sendo atingido um rendimento de aproximadamente 92%, equivalente a uma concentração de ácido glicônico de 101,8 g/L. A adição da peroxidase provocou uma redução no rendimento de síntese, provavelmente pela ação dessa enzima complexada ao peróxido de hidrogênio sobre a glicose oxidase.

Palavras-chave: glicose oxidase, ácido xilônico, xilose.

Introdução

O ácido glicônico é um ácido poli-hidroxicarboxílico que pode ser produzido a partir de biomassa lignocelulósica. Este ácido orgânico possui inúmeras aplicações, principalmente nas indústrias de construção civil, química, farmacêutica e de alimentos. Atualmente, o ácido glicônico é produzido industrialmente pela oxidação microbiana de glicose. Entretanto, esse processo encontra-se em vias de ser substituído pelo processo enzimático, o qual vem sendo fortemente investigado pela comunidade científica a fim de aumentar o desempenho das enzimas por meio da engenharia destas, além de ajustes nas condições operacionais (Mano, 2019).

¹ Graduando em Engenharia Química, Universidade de Brasília, matheusfiretti@gmail.com

² Graduando em Engenharia Química, Universidade de Brasília, eduardoarants@gmail.com

³ Graduando em Engenharia Química, Universidade de Brasília, davi.ofontenele@gmail.com

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

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

⁶ Bióloga, mestre em Microbiologia Aplicada, analista da Embrapa Agroenergia, thais.demarchi@embrapa.br

⁷ Química industrial, doutora em Engenharia Química, pesquisadora da Embrapa Agroenergia, dasciana.rodrigues@embrapa.br

As três principais variáveis para a obtenção de soluções com elevada concentração de ácido glicônico são a concentração inicial de glicose, a aeração e a adição de uma peroxidase ao meio reacional. Dados da literatura indicam que concentrações de glicose de até 324 g/L podem ser utilizados e atingir conversões quase completas em ácido glicônico por meio da rota enzimática (Mu et al., 2019). Entretanto, valores convencionalmente utilizados são de aproximadamente 220 g/L de glicose inicial (Pal et al., 2016). Isto ocorre provavelmente em função do grau de pureza da glicose utilizada, quanto mais impureza, menor a quantidade de glicose oferecida ao reator, entretanto, glicose com elevado grau de pureza pode elevar o custo do produto final. A saturação do meio reacional com oxigênio pode aumentar a atividade de glicose oxidase em até 100% (Dados de propriedade e descrição da enzima retirado da página do fornecedor, Sigma-Aldrich). Por último, a adição de uma peroxidase se faz necessária para a remoção de peróxido de hidrogênio, o qual é um coproduto da reação e se acumula no meio causando a inativação de glicose oxidase (Malikkides, 1982; Pezzoti, 2006).

Este estudo teve como objetivo avaliar o efeito da concentração inicial de glicose, assim como comparar meios reacionais aerados com meios não aerados, e contendo ou não uma peroxidase. Isto foi realizado para aumentar o rendimento de oxidação da glicose e, conseqüentemente, a concentração final de ácido glicônico por meio de um processo enzimático.

Material e Métodos

Síntese de ácido glicônico em microplaca

Soluções de glicose (PA) com concentrações de 10, 50 ou 100 g/L foram preparadas em tampão citrato 0,1 M e pH 5, e foram utilizadas como substrato. Uma solução de 100 g/L da glicose oxidase de *Aspergillus niger* da marca Sigma-Aldrich (100.000 unidades/g de sólido, sem adição de oxigênio), foi preparada em tampão citrato 0,1 M e pH 5. A reação foi realizada em microplaca PCR 96 poços e utilizou-se a proporção de 100 µL da solução de glicose para 10 µL da solução de glicose oxidase. Para o branco do substrato, foram utilizados 110 µL da solução de xilose. Para o branco da enzima, foram usados 10 µL da glicose oxidase e 100 µL do tampão. Todas as reações foram realizadas em triplicata. A microplaca foi selada com um filme plástico e mantida em um termociclador para que a reação ocorresse sob a temperatura de 35 °C em diferentes intervalos de tempo.

Para avaliar o efeito de adição de uma peroxidase de "*horseradish*", da marca Sigma-Aldrich, ao meio reacional, um ensaio idêntico ao descrito acima (com concentração inicial de glicose de 100 g/L) foi realizado, entretanto, substituindo os 10 µL da solução de glicose oxidase por 10 µL de uma mistura de glicose oxidase e peroxidase, ambas em uma concentração de 50 g/L.

Síntese de ácido glicônico em reator encamisado

Para realizar o ensaio de síntese de ácido glicônico em um sistema aerado, foi necessário o uso de um reator encamisado com capacidade para 100 mL. Nesse reator, 20 mL de meio reacional foram adicionados, mantendo as mesmas proporções entre os componentes utilizados na microplaca. Ar comprimido foi borbulhado nesse sistema

a fim de manter a concentração de oxigênio suficientemente alta no meio reacional para a ação de glicose oxidase. A entrada de ar no reator foi ajustada para a máxima quantidade possível, sem que o líquido no reator fosse empurrado para fora deste. Este experimento visou apenas uma comparação entre sistema aerado e não aerado.

Monitoramento do avanço da reação

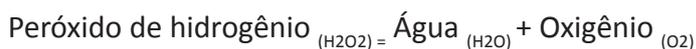
O ácido glicônico produzido foi quantificado indiretamente pela quantificação do consumo de glicose por meio do método do ácido dinitrosalisílico (DNS), ligeiramente modificado (Miller, 1959). Em cada um dos poços de uma microplaca, foram adicionados 20 μL de amostra do meio reacional e 40 μL de tampão citrato. Em seguida 120 μL da solução de DNS foi adicionado, a placa foi selada e mantida em termociclador por 10 minutos a 95 $^{\circ}\text{C}$. Ao final da reação com DNS, uma alíquota de 36 μL de cada amostra foi transferida para uma microplaca, adequada para leitura espectrofotométrica, contendo 160 μL de água em cada poço. As misturas foram homogeneizadas e a leitura de absorbância foi realizada a 540 nm. Os valores de absorbância foram convertidos em concentração de glicose por meio de uma curva de calibração, previamente construída.

Resultados e Discussão

A reação de síntese de ácido glicônico, catalisada por glicose oxidase, ocorre segundo o esquema apresentado abaixo:



Opcionalmente, uma peroxidase pode ser adicionada ao meio reacional para degradar o peróxido de hidrogênio formado, o qual causa a degradação a glicose oxidase quando a concentração deste no meio é elevada. O esquema reacional para a degradação de peróxido de hidrogênio pela peroxidase é:



A glicose consumida na reação de síntese de ácido glicônico foi quantificada pelo método DNS e os valores de concentração de glicose (g/L) foram calculados utilizando a seguinte equação da reta (Equação 1):

$$\text{Concentração de glicose (g/L)} = 13,914 \times \text{Abs}_{540\text{nm}} - 0,4064 \quad (1)$$

O rendimento de síntese de ácido glicônico foi calculado de acordo com a equação abaixo (Equação 2).

$$\text{Rendimento (\%)} = \left(\frac{[\text{Glicose inicial}] - [\text{Glicose final}]}{[\text{Glicose inicial}]} \right) * 100 \quad (2)$$

Os resultados de síntese obtidos para os diferentes ensaios são apresentados na Figura 1.

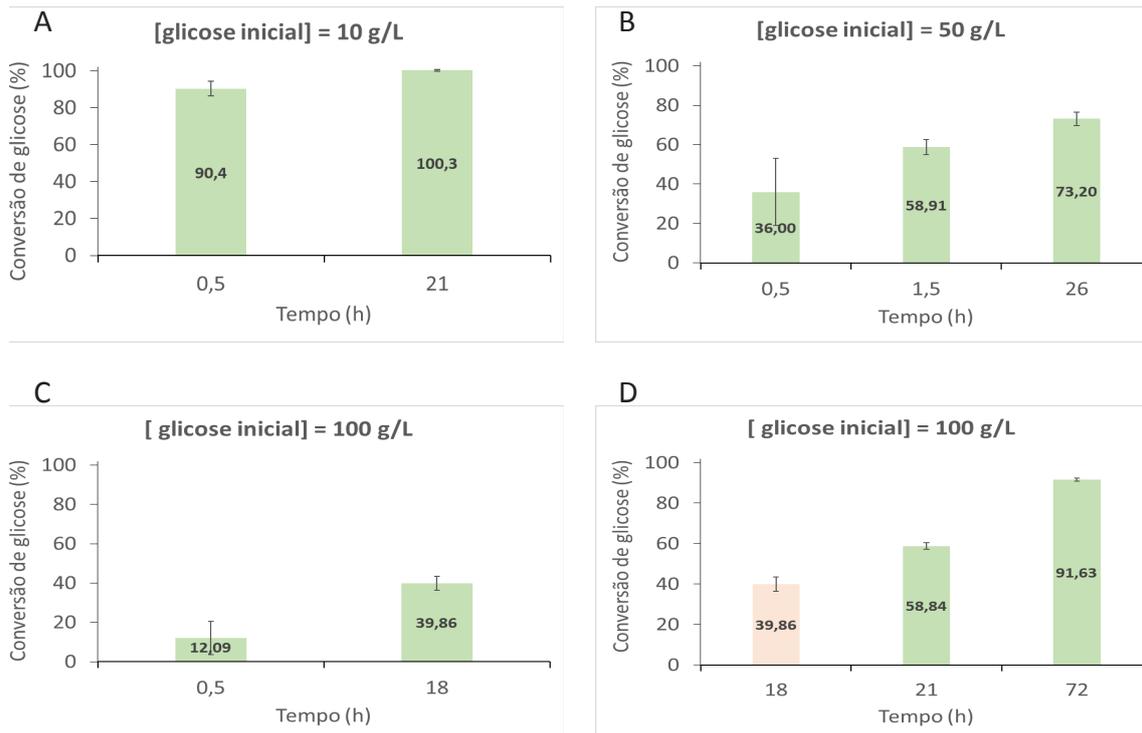


Figura 1. Dados da conversão de glicose em ácido glicônico por meio de processo enzimático, utilizando diferentes concentrações iniciais de glicose em microplaca (A-C) e utilizando concentração inicial de glicose de 100 g/L em reator encamisado (D) aerado (colunas verdes) e não aerado (coluna rosa, ensaio realizado em microplaca).

Os resultados para a síntese de ácido glicônico, na ausência de peroxidase e de aeração, indicam uma sensível desaceleração da velocidade de reação quando a concentração de ácido glicônico no meio reacional atinge aproximadamente 40 g/L. Isso é evidenciado pela conversão obtida após 26 horas no sistema com 50 g/L inicial de glicose que atingiu conversão de 73% (Figura 1B), equivalente a aproximadamente 40 g/L, enquanto no sistema contendo 100 g/L inicial de glicose (Figura 1C), a conversão foi de aproximadamente 40%, equivalente a uma concentração de ácido glicônico de 44 g/L. É possível que ao atingir aproximadamente 40 g/L de ácido glicônico, a concentração de peróxido de hidrogênio (~8 g/L) seja suficientemente elevada, a ponto de causar a inativação da enzima. Também é possível que a concentração de oxigênio no meio reacional tenha atingido níveis muito baixos e por isso a reação foi desacelerada.

Na Figura 1D é possível comparar o desempenho de dois sistemas reacionais com concentração inicial de glicose de 100 g/L, sendo um sistema aerado (barra verde) e outro sistema sem aeração (barra rosa). Observa-se que a conversão atingida no sistema aerado (58,8%) é significativamente superior à do sistema sem aeração (39,9%), após intervalos de reação similares (18 e 21 horas). Também é possível observar elevada taxa de conversão (91,6%) do sistema contendo 100 g/L inicial de glicose após 72 horas de reação. Essa elevada taxa de conversão, mesmo após um longo tempo de reação (72 horas) é justificada pela elevada concentração da enzima no meio reacional (~1 g da preparação enzimática para 10 g de substrato). Vale ressaltar que os dados representados na coluna rosa da Figura 1D foi realizado em microplaca, enquanto os

demais dados desta figura foram obtidos em reatores encamisados. Entretanto, como a enzima principal para este sistema reacional (glicose oxidase) está na forma solúvel, um efeito direto da agitação sobre a ação desta enzima não é significativo, mas é possível que a agitação mecânica utilizada nos reatores encamisados aumente a concentração de oxigênio no meio e indiretamente favoreça a reação. Novos ensaios deverão ser realizados para confirmar esta hipótese.

Visando atingir elevadas taxas de conversão em sistemas com elevada concentração inicial de glicose e usando baixa concentração de glicose oxidase, foi realizado um ensaio aerado contendo peroxidase de “*horsehadish*” no meio reacional. Entretanto, mesmo após 72 horas de reação, a conversão foi de apenas 35,9%. Isto pode ter ocorrido devido a inativação da glicose oxidase pela ação oxidativa do complexo peroxidase-peróxido de hidrogênio. Novos ensaios empregando catalase serão realizados, a fim de aumentar a taxa de conversão em intervalo de tempo o mais curto possível, visto que longos intervalos de tempo não são atrativos do ponto de vista industrial, principalmente para meios reacionais contendo elevada concentração de açúcar em baixas temperaturas, pois há o risco de contaminação biológica.

O melhor resultado alcançado nesse estudo permitiu a obtenção de uma solução de ácido glicônico com concentração de 102 g/L, partindo de uma concentração inicial de glicose de 100 g/L. Esse resultado ainda está distante daqueles obtidos em processos industriais que empregam concentração inicial de glicose de 220 g/L (Pal et al., 2016), e mais distante ainda daqueles que empregam enzimas engenheiradas, 324 g/L (Mu et al., 2019). Entretanto, acredita-se que com os ajustes nas concentrações de catalase e glicose oxidase, juntamente com os ajustes de aeração e concentração inicial de glicose, será possível atingir níveis competitivos de produção de ácido glicônico quando comparados aos processos industriais utilizados atualmente.

Considerações Finais

O processo industrial de produção de ácido glicônico que atualmente ocorre por rota microbiana pode, em um futuro próximo, ser realizado por rota enzimática. Apesar de promissor, o processo enzimático ainda necessita de vários aprimoramentos para que seja bem estabelecido industrialmente. Alguns dos desafios desse novo processo envolve não somente o aprimoramento de enzimas, mas também de condições operacionais e da utilização de glicose proveniente de fontes alternativas ao amido e sacarose.

Neste estudo, buscou-se inicialmente aprimorar as condições operacionais de síntese de ácido glicônico utilizando glicose PA (para análise), mas futuramente, pretende-se substituir a glicose pura por glicose obtida a partir de resíduos agroindustriais.

Referências

CANETE-RODRÍGUEZ, A.M.; SANTOS-DUENAS, I.M.; JIMÉN, J.E. Gluconic acid: Properties, production methods and applications—An excellent opportunity for agro-industrial by-products and waste bio-valorization. **Process Biochemistry**, v. 51, p. 1891–1903, 2016.

MALIKKIDES, C.O.; WEILAND, R.H. On the mechanism of immobilized glucose oxidase deactivation by hydrogen peroxide. **Biotechnology and Bioengineering**, v. XXIV, p. 2419–2439, 1982.

MANO, N. Engineering glucose oxidase for bioelectrochemical applications. **Bioelectrochemistry**, v. 128, p. 218–240, 2019.

MILLER, G. L. Use of Dinitrosalicilic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. **Analytical Biochemistry**, New York, v. 31, p. 426-428, 1959.

MU, Q.; CUI, Y.; TIAN, Y.; HU, M.; TAO, Y.; WU, B. Thermostability improvement of the glucose oxidase from *Aspergillus niger* for efficient gluconic acid production via computational design Author links open overlay panel. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 136, p. 1060-1068, 2019.

PAL, P.; KUMAR, R.; BANERJEE, S. Manufacture of gluconic acid: A review towards process intensification for green production. **Chemical Engineering and Processing**, v. 104, p. 160–171, 2016.

PEZZOTTI, F.; THERISOD, M. Enzymatic synthesis of aldonic acids. **Carbohydrate Research**, v. 341 p. 2290–2292, 2006.

Caracterização de Potencial Xilanase de *Paenibacillus* sp. WS30

*Sarah Conessa de Moura*¹, *Betulia de Moraes Souto*², *Andrêssa de Rezende Bastos Araujo*³, *Betania Ferraz Quirino*⁴

Resumo

Xilanases são enzimas que catalisam a hidrólise da ligação glicosídica β -(1,4) da cadeia linear da xilana, um dos principais polissacarídeos estruturais das células vegetais e o segundo mais abundante na natureza. Bactérias e fungos são eficientes produtores de enzimas xilanolíticas, sendo assim nesse trabalho genes de potenciais xilanases da coleção de microrganismos da Embrapa Agroenergia foram clonados em cepas de *Escherichia coli* Tuner DE3 por meio do plasmídeo pET21a. Oriundo de *Paenibacillus* sp. o gene P_X6 foi expresso em *E. coli* e destacou-se pela atividade da enzima produzida sobre xilana. A proteína P_X6 apresenta 39,65 kDa de massa molecular, tendo o gene que a codifica 1.023 pares de bases. A atividade enzimática de P_X6 foi avaliada nos substratos sintéticos pNPG, pNPGal, pNPC, pNP α G e pNPX e nos naturais xilana, celobiose, maltose, lactose, salicina e xilobiose. Posto isso, após 72 horas de expressão, concentração da amostra e purificação por cromatografia de afinidade, verificou-se a presença de atividade enzimática em pNPX, pNPC e em xilana. A P_X6 se mostrou promissora por apresentar alta atividade em xilana de faia.

Palavras-chave: xilanases, xilana, genoma, bioquímica e aplicação industrial.

Introdução

A hemicelulose é o segundo polissacarídeo mais comum na natureza, compondo cerca de um terço da biomassa lignocelulósica (Saha, 2003). Trata-se de um polímero heterogêneo agrupado em quatro classes: xiloglucanos, xilanas, mananos e glucomananos e β -glucanos (Scheller; Ulvskov, 2010). A bioconversão de xilana tem recebido cada vez mais atenção, tendo em vista suas aplicações em processos industriais com a síntese orgânica de produtos de valor agregado a partir da hemicelulose (Malgas et al., 2019; Nieto-Domínguez et al., 2019).

A hidrólise enzimática de polissacarídeos surgiu como uma tecnologia proeminente para conversão de biomassa lignocelulósica em monômeros de açúcar e posteriormente em produto com valor agregado (Dyk; Pletschke, 2012). As xilanases são importantes enzimas hidrolíticas responsáveis pela clivagem da ligação glicosídica β -(1,4) da cadeia linear da xilana, gerando xilo-oligossacarídeos curtos como, por exemplo, a xilobiose (Irfan et al., 2016; Motta; Andrade; Sant, 2013; Rennie; Scheller, 2014). A grande maioria das xilanases utilizadas na indústria são produzidas por microrganismos como bactérias e fungos (Choi; Han; Kim, 2015).

¹ Graduanda em Biologia, Universidade Católica de Brasília, sarah.conessam@gmail.com

² Bióloga, mestre em Biologia Molecular, analista da Embrapa Agroenergia, betulia.souto@embrapa.br

³ Biotecnologista, mestra em Ciências Genômicas e Biotecnologia, andressa.b.arj@gmail.com

⁴ Bióloga, doutora em Biologia Celular e Molecular, pesquisadora da Embrapa Agroenergia, betania.quirino@embrapa.br

As xilanases microbianas apresentam ampla aceitação no mercado de enzimas industriais, movimentando cerca de 200 a 300 milhões de dólares anuais (Leisola et al., 2011). Dessa forma, despertam cada vez mais o interesse pelo potencial biotecnológico para aplicação em escala industrial que possuem (Burlacu; Cornea; Israel-Roming, 2016). Algumas dessas aplicações, por exemplo, são a clarificação de sucos ou cervejas, panificação, amolecimento e branqueamento de frutas para polpas, processamento de tabaco, extração de óleos vegetais, recuperação de fibras têxteis, bioconversão de resíduos agrícolas e produção de álcool de segunda geração (Kumar et al., 2017; Kumar; Pratyooosh, 2018; Shah; Charlton; Kim, 2017). Porém, cada processo requer enzimas ativas em condições diferentes. Logo, é necessário antes da comercialização a determinação de parâmetros que identifiquem o potencial que cada enzima apresenta em termos de aplicação industrial. Para isso é realizada a caracterização, ou seja, a especificação de seu pH ótimo, temperatura ótima, estabilidade e parâmetros cinéticos.

Nesse contexto, este trabalho propõe a otimização da expressão e a caracterização bioquímica de uma potencial xilanase selecionada da biodiversidade microbiana brasileira, visando determinar seu potencial para aplicação industrial.

Material e Métodos

Seleção do clone a ser trabalhado

Cinco cepas de *Escherichia coli* Tuner DE3 transformadas com o plasmídeo pET21a e contendo os genes de potenciais xilanases (B1096 GH11-1, F43 GH10-2, P_X6, A_X1 e A_X2) foram obtidas. A origem dos genes B1096 GH11-1 e F43 GH10-2 foi do transcriptoma de um fungo, P_X6 do genoma de *Paenibacillus* sp. e A_X1 e A_X2 do genoma de *Arthrobacter*.

As cepas foram estriadas em placas com meio LB agar estéril com 200 µg/mL de ampicilina e dessa forma permaneceram na estufa por 24 horas a 37 °C. Após o crescimento das colônias em placas, para a expressão dos genes clonados, foi realizado um protocolo de autoindução, no qual as células foram primeiramente crescidas em meio MDAG (Studier, 2014) a 37 °C *overnight* e depois inoculadas em meio ZYM5052 (Studier, 2005) a 37 °C *overnight*, e a 20 °C por 48 horas. Após realizar a autoindução, os clones foram avaliados quanto à sua atividade em xilana de faia. Para isso foram testados tanto o sobrenadante quanto o *pellet* da indução, sonicado. A atividade enzimática foi feita com 5 µl de tampão MES pH 6,0, 25 µl de xilana 6% (p/v) e 20 µl do sobrenadante retirado de cada amostra. Os meios reacionais foram colocados em uma placa de PCR e incubados em termociclador por 20 minutos a 50° C. Em seguida, foi adicionado 120 µl de DNS seguido de incubação por mais 10 minutos no termociclador a 99° C. As amostras foram transferidas para uma placa de elisa de fundo chato e foi feita a leitura da absorbância a 540 nm. Uma curva padrão de xilose foi utilizada para quantificação da atividade enzimática.

Expressão de P_X6 em *E. coli*

Tendo em vista a continuidade dos testes de atividade com o clone P_X6 foi realizada uma nova produção em maior quantidade. Logo foi feito um pré-inóculo em

5 mL de meio mínimo de crescimento MDAG (Studier, 2014), com 5 μ L de ampicilina 200 μ g/mL. Para o controle negativo em bioensaios, foi utilizada uma cepa de *E. coli* Tuner com pET21a vazio e, para controle positivo, foi usado o clone Xnd01, que possui comprovada atividade em xilana. As amostras foram incubadas a 37 °C, 300 rpm, *overnight*. A partir do pré-inóculo foi realizado um inóculo de 300 mL de meio ZYM 5052 (Studier, 2005) com ampicilina a 200 μ g/mL. A amostra foi incubada a 37 °C *overnight* e 20 °C por 48 horas.

Concentração, purificação e quantificação proteica em amostras contendo P_X6

Após a expressão da proteína conforme descrito anteriormente, a amostra produzida (300 mL) teve o sobrenadante coletado e levado ao concentrador Amicon Stirred Cells 200 mL. O sobrenadante foi concentrado para 50 mL por meio de uma membrana de 10 kDa.

A purificação da xilanase P_X6 foi feita usando o sistema de purificação de proteínas AKTA PURE (GE Healthcare Life Sciences). O método utilizado foi de cromatografia por afinidade utilizando a coluna GE His-trap HP 5 mL e os tampões Lew e Lew 300 mM imidazol para eluição (segundo o protocolo descrito no manual da Protino Ni-TED/IDA).

Após purificação, o grau de pureza de P_X6 foi determinado em gel SDS PAGE 12%, no qual a amostra purificada, o extrato bruto e as frações coletadas na purificação (passado e lavado) foram submetidos a eletroforese com uma corrente constante de 30 mA.

A concentração proteica na fração coletada após corrida cromatográfica, que continha atividade catalítica de P_X6 foi medida utilizando o Kit Pierce™ BCA Protein Assay conforme o protocolo do fabricante (ThermoFisher Scientific).

Teste de atividade da P_X6 em derivados de pNP

Foram utilizados diferentes substratos sintéticos derivados de para-Nitrofenol (pNP) para avaliar a atividade enzimática, sendo eles pNPC (p-nitrofenil- β -D-celobiosídeo), pNPX (p-nitrofenil- β -D-xylopiranosídeo), pNPG (p-nitrofenil- β -D-glucopiranosídeo), pNP α G (p-nitrofenil- α -D-glucopiranosídeo) e pNPGal (p-nitrofenil- β -D-galactopiranosídeo). Esses substratos foram preparados a uma concentração final de 50 mM.

Com cada substrato foi realizado o teste de atividade enzimática em triplicata. Logo, foi adicionado em poços de uma placa de PCR 10 μ l de cada substrato, 5 μ l da amostra purificada de P_X6, 10 μ l de tampão MES e 75 μ l de água deionizada em sistema Milli-Q. As reações foram incubadas no termociclador por 15 minutos a 50 °C, em seguida foi adicionado 100 μ l de carbonato de sódio 1M e coletado 190 μ l de cada poço para leitura a 405 nm no espectrofotômetro. Os valores de absorbância foram convertidos em concentrações de pNP usando uma curva de calibração previamente construída. As concentrações de pNP determinadas em cada amostra foram utilizadas para o cálculo da atividade enzimática. Uma unidade de atividade (1 UI) foi definida como a quantidade de enzima capaz de liberar 1 μ mol/min nas condições utilizadas nesse estudo.

Teste de atividade da P_X6 em substratos naturais

O teste foi realizado com os substratos celbiose, maltose, lactose, salicina e xilobiose preparados a 150 mM e xilana 4% (p/v). Foi feito em triplicata com a adição

de 15 µl do substrato, 20 µl de P_X6, 30 µl de tampão MES 0,5M e 100 µl de água deionizada em sistema milli-Q em cada poço. A reação foi incubada no termociclador por 30 minutos a 50° C e em seguida a 95° C por 10 minutos. Em seguida, foi adicionado 150 µl de glicose monorreagente do kit Bioclin e a reação permaneceu no termociclador por mais 10 minutos a 37° C. As amostras foram coletadas e a absorbância avaliada no espectrofotômetro em 505 nm.

O teste de atividade enzimática de P_X6 em xilana de faia ocorreu conforme descrito no tópico ‘Seleção do clone a ser trabalhado’.

Resultados e Discussão

Seleção do clone com maior potencial para hidrólise de xilana

Após análise das atividades hidrolíticas em xilana catalisada pelas enzimas obtidas da expressão dos 5 clones (GH11-1, F43 GH10-2, P_X6, A_X1 e A_X2) avaliados nesse estudo, foi possível verificar que o clone *E. coli* pET21a com inserto P_X6 apresentou maior atividade enzimática em xilana, quando comparado aos demais clones. Logo, esse clone foi selecionado para prosseguir com a expressão dessa enzima para caracterização. Para esse clone, a enzima é secretada para fora da célula, ou seja, pode ser extraída diretamente do sobrenadante do cultivo, o que facilita o processo de purificação e elimina a necessidade de sonicar as células como ocorre frequentemente em *E. coli*.

Purificação de P_X6

Após a passagem do sobrenadante, previamente concentrado, do cultivo de *E. coli* contendo a proteína P_X6 no AKTA PURE (GE Healthcare Life Sciences) para a purificação, foram coletadas duas frações compreendidas entre dois intervalos de tempos da corrida cromatográfica, ou seja, regiões do cromatograma em que foram observadas frações de absorção referente a proteínas. Essas frações foram submetidas à análise em gel de SDS PAGE 12%, dessa forma verificou-se que na primeira coletada (B1) várias proteínas indesejáveis estavam presentes, contudo, na segunda (C2) foi possível obter a proteína P_X6 pura, conforme mostra a Figura 1.

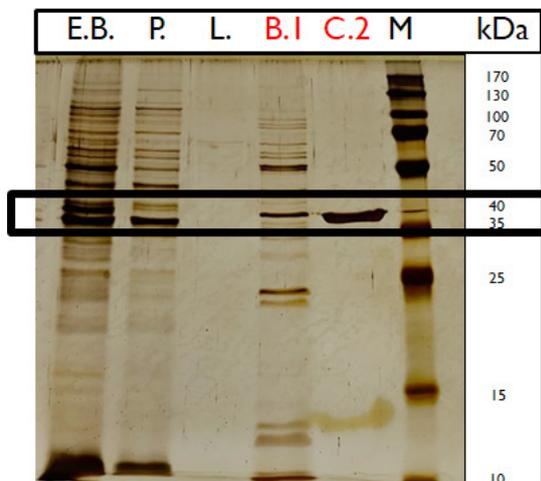


Figura 1. Análise eletroforética em gel de poliácridamida 12% das frações coletadas após a purificação de P_X6 no AKTA PURE (GE Healthcare Life Sciences). A banda na altura de 40 kDa indica que a proteína foi purificada conforme o esperado. E.B: extrato bruto, P: passado, L: lavado, M: marcador de massa molecular “Page Ruler Prestained Protein Ladder” da Thermo Scientific.

Teste de atividade enzimática da P_X6 em derivados de pNP

Por meio da quantificação proteica realizada com o Kit BCA Protein Assay, obteve-se um total de 0,12 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de P_X6 purificada, viabilizando o início dos testes de atividade enzimática em substratos sintéticos e naturais. O primeiro a ser feito foi o teste em derivados de pNP.

Como observado na Figura 2, a potencial xilanase P_X6 demonstrou alta atividade em pNPC (p-nitrofenil- β -D-celobiosídeo) e pNPX (p-nitrofenil- β -D-xylopiranosídeo) e nenhuma atividade em pNPG (p-nitrofenil- β -D-glucopiranosídeo), pNP α G (p-nitrofenil- α -D-glucopiranosídeo) e pNPGal (p-nitrofenil- β -D-galactopiranosídeo). Tal atividade é característica de celobio-hidrolases (pNPC) e β -xilosidases, logo é provável que a hidrólise de derivados de pNP possa ser atribuída a mais de uma especificidade da potencial P_X6.

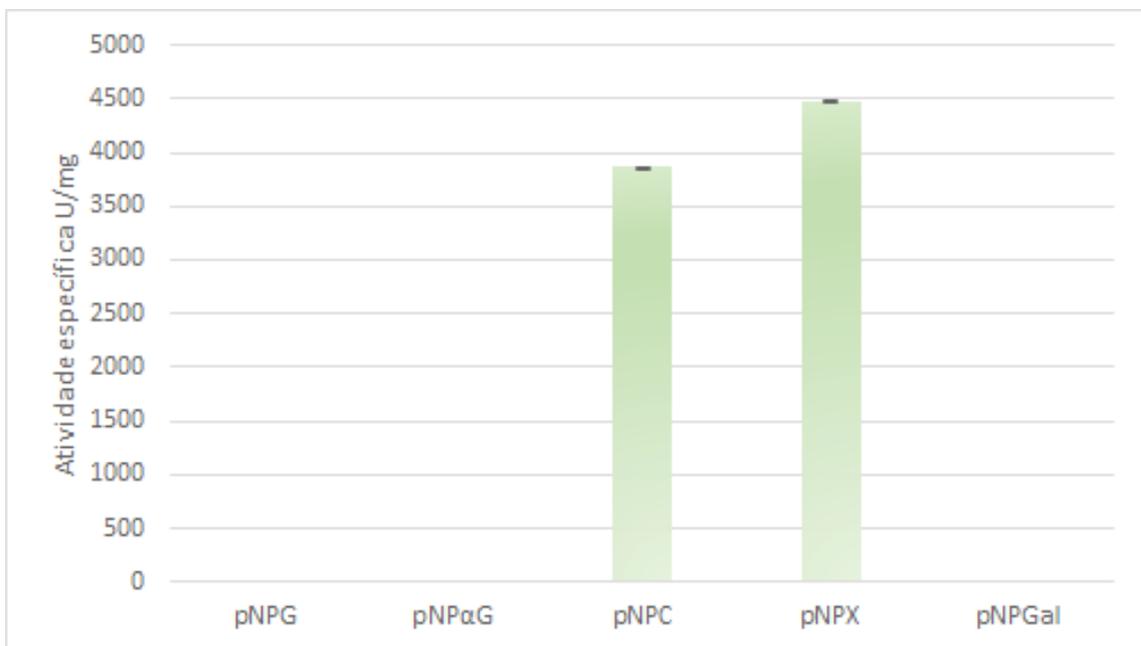


Figura 2. Teste de atividade enzimática da P_X6 em derivados de pNP sendo eles: pNPG (p-nitrofenil- β -D-glucopiranosídeo), pNPGal (p-nitrofenil- β -D-galactopiranosídeo), pNPC (p-nitrofenil- β -D-Celobiosídeo), pNPX (p-nitrofenil- β -D-xylopiranosídeo) e pNP α G (p-nitrofenil- α -D-glucopiranosídeo). O desvio padrão foi calculado com base em triplicatas.

Teste de atividade da P_X6 em substratos naturais

Por fim, foi realizado o teste nos substratos naturais maltose, celobiose, lactose, salicina, xilobiose e xilana. Porém foi observado atividade apenas em xilana de faixa, conforme o protocolo utilizado no início para seleção dos clones. Foi constatado que a P_X6 apresenta atividade catalítica semelhante à do controle positivo GH10-1 (Xnd01), com atividade enzimática de 21, 1957 U/mg. Portanto, P_X6, deve atuar como xilanase.

Conclusão

A enzima P_X6 originada de *Paenibacillus* sp. foi produzida de forma heteróloga em *E. coli*. Esta enzima possui atividade em diferentes substratos, mas atua principalmente como uma xilanase. Novos ensaios estão em andamento para prosseguir com a caracterização bioquímica da P_X6.

Referências

- BURLACU, A.; CORNEA, C. P.; ISRAEL-ROMING, F. Microbial Xylanase: A Review. **Scientific Bulletin. Series F. Biotechnologies**, v. XX, 2016.
- CHOI, J.-M.; HAN, S.-S.; KIM, H.-S. Industrial applications of enzyme biocatalysis: Current status and future aspects. **Biotechnology advances**, v. 33, n. 7, p. 1443–1454, nov. 2015.
- DYK, J. S. VAN; PLETSCHKE, B. I. A review of lignocellulose bioconversion using enzymatic hydrolysis and synergistic cooperation between enzymes — Factors affecting enzymes , conversion and synergy. **Biotechnology Advances**, v. 30, n. 6, p. 1458–1480, 2012.
- IRFAN, M. et al. Optimization of process parameters for xylanase production by *Bacillus* sp . in submerged fermentation ScienceDirect Optimization of process parameters for xylanase production by *Bacillus* sp . in submerged. **Journal of Radiation Research and Applied Sciences**, v. 9, n. 2, p. 139–147, 2016.
- KIM, D. Y. et al. Bioresource Technology Novel intracellular GH10 xylanase from *Cohnella laeviribosi* HY-21: Biocatalytic properties and alterations of substrate specificities by site-directed mutagenesis of Trp residues. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 22, p. 8814–8821, 2010.
- KUMAR, S. et al. Purification , characterization and thermostability improvement of xylanase from *Bacillus amyloliquefaciens* and its application in pre-bleaching of kraft pulp. **3 Biotech**, v. 7, n. 1, p. 1–12, 2017.
- KUMAR, V.; KUMAR, A.; PRATYOOSH, D. Engineering Thermostable Microbial Xylanases Toward its Industrial Applications. **Molecular Biotechnology**, v. 60, n. 3, p. 226–235, 2018.
- L. MOTTA, F.; P. ANDRADE, C. C.; A. SANT, M. H. A Review of Xylanase Production by the Fermentation of Xylan: Classification, Characterization and Applications. **Sustainable Degradation of Lignocellulosic Biomass - Techniques, Applications and Commercialization**, 2013.
- LEISOLA, M. et al. INDUSTRIAL USE OF ENZYMES. **Physiology and maintenance**, v. II, 2011.
- MALGAS, S. et al. A mini review of xylanolytic enzymes with regards to their synergistic interactions during hetero-xylan degradation. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 35, n. 12, p. 1–13, 2019.
- NIETO-DOMÍNGUEZ, M. et al. Exploiting xylan as sugar donor for the synthesis of an antiproliferative xyloside using an enzyme cascade. **Microbial Cell Factories**, v. 18, n. 1, p. 1–12, 2019.
- PASTOR, O. G. P. D. F. I. J. Characterization of a *Paenibacillus* cell-associated xylanase with high activity on aryl-xylosides : a new subclass of family 10 xylanases. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 61, n. 3, p. 226–233, 2003.
- RENNIE, E. A.; SCHELLER, H. V. Xylan biosynthesis. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 26, p. 100–107, 2014.
- SAHA, B. C. Hemicellulose bioconversion. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 30, n. 5, p. 279–291, 2003.
- SCHELLER, H. V.; ULVSKOV, P. Hemicelluloses. **Annual review of plant biology**, v. 61, p. 263–289, 2010.
- SHAH, V.; CHARLTON, T.; KIM, J. R. Laboratory Evolution of *Bacillus circulans* Xylanase Inserted into *Pyrococcus furiosus* Maltodextrin-Binding Protein for Increased Xylanase Activity and Thermal Stability Toward Alkaline pH. **Springer Science, Business Media**, 2017.
- STUDIER, F. W. Protein production by auto-induction in high density shaking cultures. **Protein expression and purification**, v. 41, n. 1, p. 207–234, 2005.
- STUDIER, F. W. Stable expression clones and auto-induction for protein production in *E. coli*. *Methods in molecular biology* (Clifton, N.J.), v. 1091, p. 17–32, 2014.

Expressão heteróloga de uma potencial β -glicosidase de *Paenibacillus* sp.

Rodrigo Mauricio Marinsek Sales¹, Betulia Morais de Souto², Andrêssa de Rezende Bastos Araujo³, Betania Ferraz Quirino⁴

Resumo

O mercado industrial de enzimas cresce em bilhões de dólares todos os anos de acordo com a empresa *Business Communication Company Research* (BCC), pois as enzimas desempenham papel importante na catálise de muitas reações químicas em processos industriais. As β -glicosidases desempenham uma posição importante no mercado de enzimas, devida a sua alta versatilidade, criando a possibilidade de imergi-las em muitas áreas do mercado. Em projetos anteriores da Embrapa Agroenergia, foram construídas bibliotecas metagenômicas e genomas de microrganismos da biodiversidade brasileira foram sequenciados. A partir dessas bibliotecas foi possível fazer triagens funcionais na busca de atividade β -glicosidase. Alguns dos genes encontrados foram expressos em *Escherichia coli*, entretanto, ainda é necessário realizar as etapas de seleção das β -glicosidases com mais atividade e posteriormente sua purificação e caracterização bioquímica. Neste trabalho, uma das β -glicosidases estudadas apresenta alta atividade sobre o substrato sintético pNPG (*p-nitrofenil- β -D-glucopiranosídeo*), podendo ser eficiente no processo de degradação de celulose. Após as etapas de expressão e purificação, a enzima estudada foi submetida a teste de atividade em substratos naturais, como celobiose, e não apresentou resultados significativos. Uma hipótese, para estes resultados é a baixa concentração proteica obtida na expressão, sendo insuficiente para atuação da enzima sobre os substratos. Ou, é possível que tenha se passado muito tempo desde o final da expressão, até a etapa dos testes de atividade, levando a degradação da P_B12 ou a perda de atividade da enzima.

Palavras-chave: β -glicosidase, expressão, celulose, aplicação industrial.

Introdução

No mercado industrial, existem reações químicas que levam um determinado tempo a serem realizadas, porém, com a adição de enzimas específicas, o tempo da reação pode ser reduzido. Além de diminuir o tempo de reação, as enzimas criam a possibilidade de operar as reações em condições mais amenas, com uma excepcional seletividade do produto e produzindo menor toxicidade ambiental e fisiológica (Chapman et al., 2018). De acordo com a empresa *Business Communication Company Research* (BCC), o mercado de enzimas pode crescer de US\$5.5 bilhões em 2018 para US\$7.0 bilhões em 2023, com uma taxa de crescimento anual composta de 4.9% para o mesmo período.

¹ Graduando em Biologia, Universidade Católica de Brasília, marinsekodigo@gmail.com

² Bióloga, mestre em Biologia Molecular, analista da Embrapa Agroenergia, betulia.souto@embrapa.br

³ Biotecnologista, mestre em Ciências Genômicas e Biotecnologia, andressa.b.arj@gmail.com

⁴ Bióloga, doutora em Biologia Celular e Molecular, pesquisadora da Embrapa Agroenergia, betania.quirino@embrapa.br

As β -glicosidases (EC 3.2.1.21) ocupam um espaço importante no mercado de enzimas, devido à possibilidade de usá-las em muitas áreas do mercado. Uma delas é a produção de biocombustíveis de segunda geração a partir da degradação da celulose. Então, para que haja a conversão da celulose em glicose, existe um processo de degradação que envolve diferentes classes de enzima: as endoglucanases, exoglucanases e β -glicosidases (Singhania et al., 2017). As β -glicosidases atuam na etapa final da conversão da biomassa lignocelulósica, hidrolisando resíduos terminais β -D-glicosil não redutores de dissacarídeos como celobiose, convertendo-os em β -D-glicose (Hendriks, Zeeman, 2009).

Em projetos anteriores da Embrapa Agroenergia, foram construídas bibliotecas metagenômicas e genomas de microrganismos da biodiversidade brasileira foram sequenciados. A partir dessas bibliotecas foi possível fazer triagens funcionais na busca de atividade β -glicosidase. Alguns dos genes encontrados foram expressos em *Escherichia coli*, entretanto, ainda é necessário realizar as etapas de seleção das β -glicosidases com mais atividade e posteriormente sua purificação e caracterização bioquímica.

A determinação dos diversos parâmetros bioquímicos é o primeiro passo para se identificar possíveis aplicações industriais, uma vez que cada processo tem características distintas. Dessa forma, neste trabalho foram realizadas as expressões de β -glicosidases, para futuramente purificá-las e caracterizá-las bioquimicamente visando determinar seu potencial para aplicação industrial.

Material e Métodos

Expressão heteróloga

A metodologia escolhida para a expressão de proteínas heterólogas em *E. coli* foi o protocolo de autoindução. Esta metodologia foi desenvolvida por Studier et al. (1990). Foi utilizada a linhagem TunerDE3 e o vetor pET21a(+) para expressão de proteínas heterólogas. Foi produzido 70 mL do meio MDAG-135 descrito por Studier et al (2014) para o pré-inóculo dividido em 7 tubos de 50 mL (um tubo para cada clone e controle) com ampicilina na concentração final de 200 μ g/mL. O pré-inóculo foi incubado em *shaker overnight* à 37 °C e 300 rpm.

Depois, foi produzido 70 mL de meio ZYM-5052 descrito por Studier et al (2005) para um inóculo nas mesmas condições e foram incubado em *shaker overnight* à 37 °C e 300 rpm. Em seguida, os tubos foram centrifugados por 20 minutos a 3000 xg e 4 °C, para separar o pellet do sobrenadante. Os sobrenadantes foram submetidos a um teste de atividade com o substrato pNPG (p-nitrofenil- β -D-glucopiranosídeo) para aferir qual dos clones tinha mais atividade neste substrato e purificar a primeira β -glicosidase.

Atividade enzimática

O teste de atividade enzimática foi realizado montando uma reação com 10 µL de tampão MES 50 mM pH 6.0, 5 µL de pNPG (*p*-nitrofenil-β-D-glucopiranosídeo) e 85 µL de sobrenadante (produto da expressão). Montada a reação, o material foi incubado a 50 °C por 20 minutos em termociclador. Depois, adicionou-se 100 µL de CaCO₃ 1mM, para interromper a reação. O produto das reações foi transferido para uma microplaca de fundo chato e lido em espectrofotômetro à 405 nm. Como controle positivo foi usado a β-glicosidase BGL11, que já foi caracterizada em projetos anteriores da Embrapa Agroenergia, e como controle negativo foi usado um clone com o vetor pET21a(+) vazio.

Expressão em larga escala

Em uma produção em maior escala da P_B12, o pré-inóculo e o inóculo foram feitos conforme já descrito no item 2.1, porém o volume final de cultivo foi de 200 mL para obtenção de maior quantidade proteica no sobrenadante. Os inóculos foram incubados em *shaker* por 24 horas à 300 RPM e 37 °C e depois por 48 horas à 300 RPM e 20 °C. Após a produção, as amostras foram passadas para tubos de 250 mL e foram centrifugados por 20 minutos à 3000 xg e 4 °C para a coleta do sobrenadante.

Purificação e quantificação

A purificação foi feita usando coluna GE His-trap HP 5 mL (GEHealthcare) e com tampões LEW e LEW com Imidazol 300 mM (Seguindo o manual da Protino Ni-TED/IDA). O tampão LEW usado foi composto por: (1) NaH₂PO₄ (fosfato de potássio), concentração final de 50 mM; (2) NaCl (cloreto de sódio), concentração final de 300 mM; e (3) água *milliQ*. O processo foi realizado no equipamento Akta Pure (GEHealthcare).

Após purificação da β-glicosidase de interesse, o grau de pureza da enzima foi analisado em gel SDS PAGE 12%. A concentração da enzima purificada foi calculada utilizando o nanodrop (Thermo Fisher Scientific) em Protein A280 ou utilizando o kit de quantificação BCATM *Protein Assay Kit* conforme indicações do fabricante.

Resultados

Confirmação da atividade dos clones de *E. coli* em pNPG

Algumas potenciais β-glicosidases clonadas em *E. coli* foram selecionadas para serem expressas pelo método de autoindução descrito por Studier et al. (1990). Cinco clones foram selecionados para a expressão, mais um controle negativo e um controle positivo. Após a produção e mensuração da atividade enzimática em pNPG foi possível observar que o clone referente à potencial β-glicosidase P_B12 apresentou a maior absorvância ao avaliar o sobrenadante, indicando que a proteína estava sendo expressa e liberada para o meio extracelular, conforme mostrado na Tabela 1.

O clone escolhido para prosseguir com a produção em maior escala foi o clone *E. coli* pET21a P_B12, devida a alta absorvância que essa enzima apresentou diante das outras enzimas no teste de atividade.

Tabela 1. Avaliação da presença de atividade enzimática após autoindução em meio de cultura descrito por Studier, F.W. et al. (1990), por 24 horas à 37 °C e 48 horas a 20 °C. O ensaio foi feito com o substrato pNPG (*p*-nitrofenil- β -D-glucopiranosídeo). No controle negativo foi usado um clone com o vetor pET21a(+) vazio. No controle positivo foi usado uma β -glicosidase já caracterizada, denominada BGL11.

| Enzimas | Absorbância 405 nm |
|-----------------------|--------------------|
| Controle Negativo | 0,131 |
| Controle Positivo | 1,970 |
| A_B2 | 0,234 |
| C_B8 | 0,140 |
| G11-33 | 0,132 |
| P_B12 | 3,422 |
| E_08-24 ^{GR} | 2,881 |

Purificação por afinidade e SDS-PAGE 12%

Após a produção da potencial β -glicosidase P_B12, o sobrenadante foi submetido ao AKTA Pure para ser purificado, fazendo uso da coluna GE His-trap HP de 5 mL. Na Figura 1, é mostrado o cromatograma da purificação. Acredita-se que o pico indicado com a seta vermelha sejam outras proteínas indesejáveis e a proteína de interesse esteja entre os pontos marcados com as setas azuis.

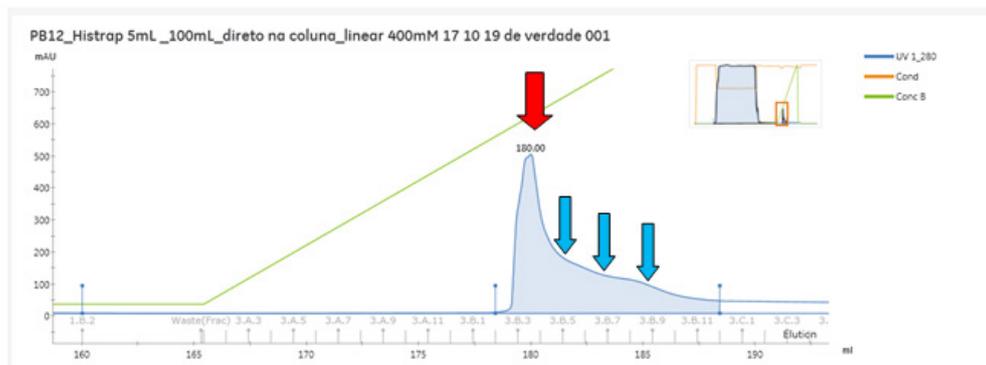


Figura 1. Perfil cromatográfico de purificação por afinidade em AKTA Pure da enzima P_B12 após produção de 200 mL de sobrenadante. A linha azul (UV1_280) indica a absorbância medida a 280 nm. A linha laranja (Cond) indica a condutividade dos tampões. A linha verde (Conc B) indica a concentração do tampão Lew com Imidazol.

A P_B12 possui um tamanho aproximado de 51,43 kDa e, após a sua purificação, foi feito um gel de SDS PAGE 12% para confirmar sua presença, como mostrado na Figura 2. Por meio da análise eletroforética é possível perceber que no pico indicado com a seta vermelha (poço V) houve eluição de muitas proteínas que não são a proteína de interesse, por outro lado, nos picos indicados com as setas azuis (poço A), é possível observar uma banda na altura de 55 kDa que indica ser a P_B12 pura.

O gel de SDS PAGE 12% produzido mostra indícios de que a P_B12 está presente e purificada, porém, foi feita uma quantificação com BCATM Protein Assay Kit e, ao final do experimento não havia quantidade suficiente de proteína pura.

Também foram feitos ensaios enzimáticos com substratos sintéticos (pNPG, pNPGal, pNPC, pNPαG e pNPX) e naturais (celobiose, maltose, lactose, 1,4 β-D-xilobiose) para aferir a atividade da P_B12, contudo, ela não apresentou atividade nesses substratos.

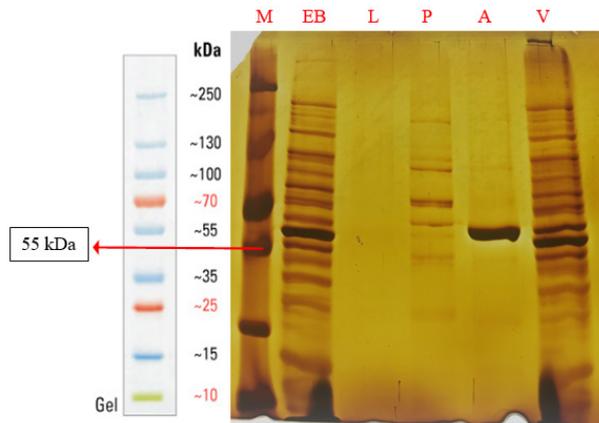


Figura 2. Gel de SDS PAGE 12% referente a purificação da potencial β-glicosidase P_B12. No gel, a letra “M” indica o marcador PageRuler Prestained Protein, as letras “EB” indicam o extrato bruto, a letra “L” indica o lavado, a letra “P” indica o passado, a letra “A” indica as setas azuis da Figura 1 e a letra “V” indica o pico com a seta vermelha da Figura 1.

Uma das hipóteses levantadas para estes resultados, é que talvez tenha passado muito tempo desde o final da expressão, até a etapa dos testes de atividade, levando a degradação da P_B12 ou a perda de atividade da enzima. Outra hipótese, é a baixa concentração proteica obtida na expressão, sendo insuficiente para atuação da enzima sobre os substratos.

Conclusão

Cinco clones foram escolhidos para terem sua atividade enzimática testada. Após o teste, as reações foram lidas em espectrofotômetro e a P_B12 apresentou a maior absorbância, sendo assim, o clone com maior atividade enzimática para o substrato pNPG (*p-nitrofenil-β-D-glucopiranosídeo*). A enzima possivelmente foi purificada, porém, a quantidade de proteína obtida na expressão não foi suficiente para montar um ensaio enzimático que fosse capaz de degradar os substratos sintéticos e naturais. Assim, não foi possível fazer uma caracterização bioquímica da P_B12. A maior meta do projeto é obter uma enzima com alto valor biotecnológico e caracterizada bioquimicamente. Para isso, é necessário realizar mais testes e otimizar as expressões, para que seja possível obter uma maior concentração de proteínas e o ensaio enzimático seja mais eficiente.

Referências

BBC RESEARCH. **Global Markets for Enzymes in Industrial Applications**. Sep, 2018. Disponível em: <<https://www.bccresearch.com/market-research/biotechnology/global-markets-for-enzymes-in-industrial-applications.html>>.

CHAPMAN, J., ISMAIL, A.E., DINU, C.Z. 2018. Industrial Applications of Enzymes: Recent Advances, Techniques, and Outlooks. **Catalysts**. Vol. 8, 238. <https://doi.org/10.3390/catal8060238>.

HENDRIKS, A. T. W. M.; ZEEMAN, G. (2009). Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass. **Bioresource Technology**, 100 (1), 10–18. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2008.05.027>

SINGHANIA, R. R., PATEL, A. K., PANDEY, A.; GANANSOUNOU, E. (2017). Genetic modification: A tool for enhancing beta-glucosidase production for biofuel application. **Bioresource Technology**, 245, 1352–1361. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.05.126>

STUDIER, F.W. 2005. Protein production by auto-induction in high-density shaking cultures. **Protein Expression and Purification**. Vol. 41, Issue 1. Pag. 207-234. ISSN 1046-5928. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2005.01.016>.

STUDIER, F.W., ROSENBERG, A.H., DUNN, J.J., DUBENDORFF, J.W. 1990. Use of T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes. **Methods Enzymol**. 185:60–89.

Expressão heteróloga de uma β -glicosidase de *Chryseobacterium* sp.

*Mateus Florentino Barbosa*¹, *Betulia de Moraes Souto*², *Andrêssa de Rezende Bastos Araujo*³, *Rosângela Vieira de Andrade*⁴, *Betania Ferraz Quirino*⁵

Resumo

As enzimas são utilizadas em muitas áreas da indústria para se conseguir, como resultado da reação, um produto específico ou melhorar a qualidade do produto final. As β -glicosidases são um exemplo disso, possuindo aplicação em diferentes áreas industriais como na indústria alimentícia e na conversão de biomassa, podendo ser usada individualmente ou associada a outras enzimas. No presente estudo uma β -glicosidase triada do genoma de *Chryseobacterium* sp. foi nomeada de C-B1, transformada em *Escherichia coli* TunerDE3 no vetor pET21a(+) e expressa utilizando o método de autoindução. Após a sua expressão, C-B1 foi purificada usando coluna GE His-trap HP 5 mL (GEHealthcare) no sistema de purificação de proteínas ÄKTA Pure, tendo a pureza desta enzima sido comprovada por meio de eletroforese em gel SDS PAGE 12% das frações proteicas coletadas. A fração que continha a proteína pura foi submetida a análise para determinação da concentração proteica usando o Kit BCA ProteinAssay (Pierce) e a atividade enzimática da mesma foi testada nos substratos sintéticos pNPG (p-nitrofenil- β -D-glucopiranosídeo), pNP α G (p-nitrofenil- α -D-glucopiranosídeo), pNPC (p-nitrofenil- β -D-celobiose), pNPX (p-nitrofenil- β -D-xilopiranosídeo), pNPGal (p-nitrofenil- α -D-glucopyranosídeo), e nos substratos naturais celobiose, maltose, lactose e salicina. C-B1 mostrou atividade em pNPG, pNPX, pNPGal, celobiose e salicina, mostrando sua versatilidade para uso industrial, pois sua atividade indica sua atuação como β -glicosidase, β -xilosidase, β -galactosidase, o que demonstra que a enzima pode ser usada para diferentes processos, para a obtenção de diferentes produtos.

Palavras-chave: β -glicosidase, expressão heteróloga, purificação enzimática.

Introdução

Enzimas são catalisadores biológicos que modificam a velocidade de uma reação química, tornando-a mais rápida. Elas realizam essa função em organismos vivos, porém também podem ser extraídas das células e utilizadas com diferentes propósitos, alguns com grande importância industrial (Robinson, 2015). Enzimas possuem grande potencial para utilização industrial, pois quando comparada com processos químicos convencionais elas trazem vários benefícios como, por exemplo, uma redução na geração de subprodutos químicos e tóxicos, além de elevar a qualidade final dos produtos (Arbige; Shetty; Chotani, 2019).

¹ Graduando em Biomedicina, Universidade Católica de Brasília, mateus.barbosa@a.ucb.br

² Bióloga, mestre em Biologia Molecular, analista da Embrapa Agroenergia, betulia.souto@embrapa.br

³ Biotecnologista, mestre em Ciências Genômicas e Biotecnologia, bolsista na Embrapa Agroenergia, andressa.b.arj@gmail.com

⁴ Bióloga, doutora em Bioquímica e Biologia Molecular, professora da Universidade Católica de Brasília, rosangelavand@gmail.com

⁵ Bióloga, doutora em Biologia Celular e Molecular, pesquisadora da Embrapa Agroenergia, betania.quirino@embrapa.br

As β -glicosidases são enzimas com grande importância biológica, fazendo a hidrólise de ligações glicosídicas e liberando os resíduos glicosídeos terminais não redutores de glicosídeos e oligossacarídeos. Essas enzimas podem ser encontradas em diferentes organismos na natureza atuando em diferentes funções biológicas. As β -glicosidases podem ser utilizadas em diferentes áreas da indústria. Uma das suas aplicações é na indústria alimentícia, pois algumas possuem a capacidade de hidrolisar precursores de sabor β -glicosídicos em alimentos e bebidas, melhorando assim o sabor desses produtos e elevando sua qualidade final (Cairns; Esen, 2010).

Além de poderem melhorar o sabor de alimentos e bebidas β -glicosidases podem ser utilizadas para melhorar o aroma de mostos e vinhos. Nestes produtos a proporção de constituintes glicosídicos é alta, sendo que quando encontrados nessa forma eles são não voláteis, ou seja, não emitem odor (Jesús Ibarz et al., 2006). As β -glicosidases podem ser utilizadas para hidrolisar esses precursores aromáticos liberando assim o odor latente desses produtos, o que auxilia na produção de vinhos de alta qualidade (Jesús Ibarz et al., 2006; Loscos et al., 2010).

β -glicosidases também podem ser utilizadas em alimentos à base de soja para a hidrólise de isoflavonas, gerando agliconas. A soja é um componente alimentício utilizado em muitos alimentos e bebidas, mas as suas isoflavonas só se encontram biodisponíveis quando estão em sua forma aglicosídica (agliconas). Assim, a utilização de β -glicosidases no processamento da soja pode elevar significativamente a qualidade nutricional destes alimentos (Hati et al., 2015 apud Park Yk et al., 2002).

Estas enzimas também possuem grande importância na degradação da biomassa, pois a hidrólise enzimática é uma das formas de se conseguir extrair a glicose desta. A glicose extraída pode ser posteriormente utilizada para a conversão em etanol. Para uma hidrólise completa da biomassa são necessárias enzimas distintas como as celulases, que pela grande quantidade de celulose presente na biomassa são as que possuem maior importância (Singhania et al., 2013). As β -glicosidases hidrolisam celodextrinas solúveis e celobiose em glicose, sendo que por conta da celobiose ser um inibidor das celobiohidrolases e das endoglucanases o papel das β -glicosidases é de grande importância para garantir que todo o processo ocorra de forma eficaz (Zhang; Zhang, 2013).

Sendo assim, o objetivo deste trabalho é expressar, purificar e realizar testes de atividade enzimática em uma potencial β -glicosidase proveniente de *Chryseobacterium* sp., dando início a sua caracterização bioquímica por meio de teste de atividade em diferentes substratos, tanto sintéticos como naturais.

Material e Métodos

Expressão Heteróloga: A metodologia escolhida para a expressão da β -glicosidase em *E. coli* foi o protocolo de autoindução. Esta metodologia foi desenvolvida por Studier et al., 1990, para linhagens de *E. coli* DE3 lisogênicas como BL21(DE3) e B834(DE3), que suplementam T7 RNA polimerase quando o promotor do lacUV5 é induzido em combinação com os vetores pET de expressão, nos quais a expressão é controlada pelo promotor T7lac (Studier et al., 1990; Studier, 2005). O meio utilizado permite o crescimento de células em alta densidade, com estabilidade do plasmídeo e promove uma autoindução da expressão heteróloga em shaker. Assim, fica eliminada a indução

espontânea que ocorre em meios complexos (Grossman et al., 1998). Foi utilizada a linhagem TunerDE3 e o vetor pET21a(+) para expressão de proteínas heterólogas.

Uma cepa de *E. coli* contendo o plasmídeo com a possível β -glicosidase nomeada de C-B1, estocada a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ foi utilizada para fazer um segundo estoque onde ela foi cultivada em uma placa de Petri com meio LB Sólido e ampicilina a $200\text{ }\mu\text{g}/\mu\text{L}$, onde ficou *overnight* a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. Após a cepa crescer na placa ela foi inoculada em um tubo falcon de 50 mL contendo 3 mL de meio LB líquido e $3\text{ }\mu\text{L}$ de ampicilina, em seguida foi mantida em um *shaker overnight* a 300 RPM e $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. Deste inóculo foi-se colocado em 2 microtubos, $360\text{ }\mu\text{L}$ como estoque da bactéria, nos microtubos também foram colocados $24\text{ }\mu\text{L}$ de glicerol a 50 %, esses estoques foram congelados a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Do estoque foi usado $2\text{ }\mu\text{L}$ para fazer o pré-inóculo em 2 mL de meio MDAG-135 em um falcon de 50 mL com $2\text{ }\mu\text{L}$ de ampicilina, o falcon foi colocado no *shaker overnight* a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$, 300 RPM. Do pré-inóculo $130\text{ }\mu\text{L}$ foram usados para se fazer o inóculo em 130 mL de meio ZYM 5052 em um erlenmeyer de 1 litro que foi colocado a 300 RPM, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ *overnight* e depois por 2 dias a $20\text{ }^{\circ}\text{C}$, 300 RPM. Depois disso o inóculo foi centrifugado a 3000 xg por 10 minutos, o pellet foi descartado e o sobrenadante foi separado e filtrado em um filtro de $0,45\text{ }\mu\text{m}$ para ser purificado.

A purificação foi feita no sistema de purificação de proteínas ÄKTA Pure com uma coluna GE Histrap 5 ml, usando água MilliQ, Tampão LEW, Tampão LEW com 300 nM de imidazol.

Após purificação da β -glicosidase, o grau de pureza da enzima foi analisado em gel SDS PAGE 12%. A concentração da enzima purificada foi determinada usando o Kit BCA ProteinAssay (Pierce).

Caracterização Bioquímica: Foram realizados ensaios com $10\text{ }\mu\text{L}$ dos substratos sintéticos pNPG, pNPGal, pNPC, pNP α G e pNPX a 50 mM, $10\text{ }\mu\text{L}$ de tampão MES 0.5 M $5\text{ }\mu\text{L}$ da amostra contendo a enzima ou $5\text{ }\mu\text{L}$ da amostra contendo a enzima inativada por fervura (ensaio controle) e $75\text{ }\mu\text{L}$ de água Milli-Q, foram incubados por 15 minutos à $50\text{ }^{\circ}\text{C}$, após isso foi adicionado $100\text{ }\mu\text{L}$ de carbonato de sódio 1 M, foi coletado $190\text{ }\mu\text{L}$ e lido em espectrofotômetro a 405 nm. Dos substratos naturais foram testados celobiose, maltose, lactose e salicina à 150 mM. Neste ensaio utilizou-se, $15\text{ }\mu\text{L}$ da solução de substrato, $20\text{ }\mu\text{L}$ da solução de enzima, $30\text{ }\mu\text{L}$ de tampão MES 0,5 M e $35\text{ }\mu\text{L}$ de água Milli-Q, as misturas foram incubadas por 30 minutos à $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ e por mais 10 minutos a $95\text{ }^{\circ}\text{C}$, foi adicionado $150\text{ }\mu\text{L}$ de glicose monorreagente e incubado por mais 10 minutos à $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. Por fim, foi coletado $200\text{ }\mu\text{L}$ de cada amostra e a leitura de absorvância foi realizada em espectrofotômetro à 505 nm para determinar a atividade específica.

Resultados e Discussão

A cepa de *E. coli* foi usada para expressão da proteína C-B1 seguindo o método de autoindução criado por Studier et al., 1990, resultando em 130 mL de inóculo que foi centrifugado e purificado, depois disso a proteína teve sua pureza comprovada por eletroforese em gel SDS PAGE 12% (Figura 1).

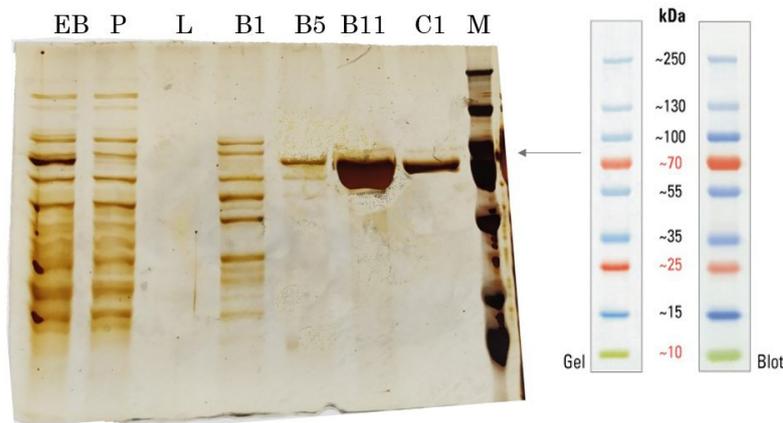


Figura 1. Gel de eletroforese SDS PAGE 12 %. Legenda: EB: Extrato Bruto (Inóculo Filtrado antes da purificação); P: Passado (Proteínas que não se ligaram a coluna GE Histrap durante a purificação); L: Lavado (Amostra resultante da lavagem da coluna após a passagem da amostra); B1: Poço B1 da placa resultante da purificação; B5: Poço B5 da placa resultante da purificação; B11: Poço B11 da placa resultante da purificação; C1: Poço C1 da placa resultante da purificação; M: Marcador PageRuler Plus da ThermoScientific, a imagem das bandas formadas pelo marcador se encontram ao lado do gel.

A quantificação foi feita usando o Kit BCA ProteinAssay (Pierce) onde a concentração proteica medida foi de 0,130 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$. Em seguida, a atividade enzimática foi testada em diferentes substratos, tanto substratos sintéticos como naturais como mostram os resultados na Figura 2.

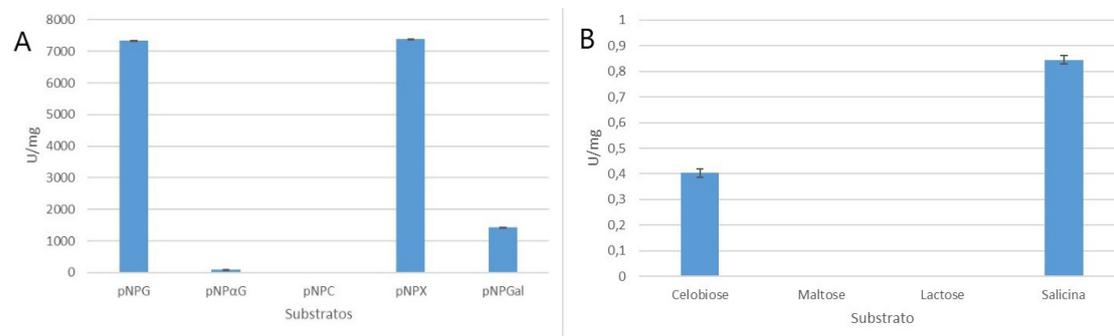


Figura 2. A. Atividade específica da C-B1 em substratos sintéticos; B. Teste de atividade específica da C-B1 em substratos naturais.

Na Figura 2A observa-se que a C-B1 teve atividade de 7348,4 U/mg de atividade em pNPG, 101 U/mg em pNP α G, 0 U/mg em pNPC, 7386,4 U/mg em pNPX e 1429,4 U/mg em pNPGal. Enquanto na Figura 2B observa-se que a C-B1 teve atividade de 0,403 U/mg em celobiose, 0 U/mg em maltose e lactose, e 0,844 U/mg em salicina.

A C-B1 demonstrou atividade em diferentes substratos. Isto é uma vantagem, pois aumenta as possibilidades de seu uso em diferentes áreas da indústria, tendo ela atividade em pNPG indicando sua atuação como uma β -glicosidase, em pNPX o que indica que ela possui atividade como β -xilosidase, em pNPGal indicando atividade como β -galactosidase. A enzima terá ainda sua atividade testada em xilobiose uma vez que

ela possuiu atividade em pNPX. Além disso, a enzima também possui atividade nos substratos naturais celobiose e salicina.

A enzima C-B1 até agora tem se apresentado como uma β -glicosidase bastante promissora, com alta atividade em substratos como pNPG e celobiose. Ela também apresentou alta atividade em salicina. Os produtos gerados pela salicina podem ser utilizados na indústria farmacêutica e estética.

Considerações Finais

No presente estudo uma β -glicosidase, nomeada de C-B1, que havia sido triada de *Chryseobacterium* sp. e que teve seu gene transformado em *E. coli*, foi expressa utilizando o método de autoindução (Studier et al., 1990). Após a sua expressão a enzima foi purificada na coluna GE His-trap HP 5 mL (GEHealthcare), e teve sua purificação acompanhada em gel SDS PAGE. Por fim, ela foi quantificada usando o Kit BCA ProteinAssay (Pierce). A proteína purificada teve sua atividade testada em diferentes substratos, tanto sintéticos como naturais. C-B1 mostrou alta atividade em pNPG, pNPX, celobiose e salicina, demonstrando que há diferentes possibilidades para sua utilização industrial.

Referências

- ARBIGE, M. V.; SHETTY, J. K.; CHOTANI, G. K. Industrial Enzymology: The Next Chapter. **Trends in Biotechnology**, v. 37, n. 12, p. 1355–1366, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2019.09.010>>.
- CAIRNS, J. R. K.; ESEN, A. β -Glucosidases. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 67, n. 20, p. 3389–3405, 2010.
- GROSSMAN, T. H.; KAWASAKI, E. S.; PUNREDDY, S. R.; OSBURNE, M. S. Spontaneous cAMP-dependent derepression of gene expression in stationary phase plays a role in recombinant expression instability. **Gene**, v. 209, n. 1–2, p. 95–103, 1998.
- HATI, S.; VIJ, S.; SINGH, B. P.; MANDAL, S. β -Glucosidase activity and bioconversion of isoflavones during fermentation of soymilk. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 95, n. 1, p. 216–220, 2015.
- JESÚS IBARZ, M.; FERREIRA, V.; HERNÁNDEZ-ORTE, P.; LOSCOS, N.; CACHO, J. Optimization and evaluation of a procedure for the gas chromatographic-mass spectrometric analysis of the aromas generated by fast acid hydrolysis of flavor precursors extracted from grapes. **Journal of Chromatography A**, v. 1116, n. 1–2, p. 217–229, 2006.
- LOSCOS, N.; HERNÁNDEZ-ORTE, P.; CACHO, J.; FERREIRA, V. Evolution of the aroma composition of wines supplemented with grape flavour precursors from different varieties during accelerated wine ageing. **Food Chemistry**, v. 120, n. 1, p. 205–216, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.10.008>>.
- ROBINSON, P. K. Enzymes: principles and biotechnological applications. **Essays in Biochemistry**, v. 59, p. 1–41, 2015.
- SINGHANIA, R. R.; PATEL, A. K.; SUKUMARAN, R. K.; LARROCHE, C.; PANDEY, A. Role and significance of beta-glucosidases in the hydrolysis of cellulose for bioethanol production. **Bioresource Technology**, v. 127, p. 500–507, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2012.09.012>>.
- STUDIER, F. W. Protein production by auto-induction in high density shaking cultures. **Protein expression and purification**, v. 41, n. 1, p. 207–234, 2005.
- STUDIER, F. W.; ROSENBER, A. H.; DUNN, J. J.; WUBENDORFF, J. W. [6] Use of T7 RNA Polymerase to Direct Expression of Cloned Genes. In: **Methods in enzymology**. [s.l.: s.n.]185p. 60–89.
- ZHANG, X.; ZHANG, Y. P. **Bioprocessing Technologies in Biorefinery for Sustainable Production of Fuels, Chemicals, and Polymers**. [s.l.: s.n.]

Síntese enzimática de ácido xilônico utilizando glicose oxidase

Matheus Firetti Cunha¹, Eduardo Arantes da Silva², Davi Fontenele de Oliveira³, Rossano Gambetta⁴, Thályta Fraga Pacheco⁵, Thaís Demarchi Mendes⁶, Dasciana de Sousa Rodrigues⁷

Resumo

O ácido xilônico é uma das principais moléculas de alto valor agregado que podem ser obtidas a partir de biomassa lignocelulósica. Entretanto o processo de produção deste ácido ainda precisa ser aprimorado para atender as exigências industriais, tais como alta produtividade e rendimento, baixo custo de produção e redução na geração de resíduos. O objetivo deste estudo foi aprimorar em escala de bancada a produção de ácido xilônico por meio de rota enzimática usando como substrato xilose PA (para análise) e enzima comercial glicose oxidase, oriunda de *Aspergillus niger*. A fim de aumentar a concentração de ácido xilônico produzido, foram avaliadas diferentes concentrações iniciais de xilose (5 g/L a 100 g/L). Todas as reações foram realizadas em microplaca de 96 poços e um volume total de reação de 110 µL foi utilizado. A maior conversão (92,8 %) foi atingida quando uma concentração inicial de xilose de 10 g/L foi utilizada. Ao aumentar a concentração inicial de xilose para 100 g/L a conversão foi de apenas 11,1%. Os resultados sugerem que a enzima pode ter sido inibida pelo substrato ou pelo coproduto desta reação, o peróxido de hidrogênio. Além disso, a falta de aeração do meio reacional também desfavoreceu a ação de glicose oxidase. Etapas posteriores deste estudo irão investigar o uso de peroxidases e aeração do meio reacional a fim de aumentar o rendimento de ácido xilônico.

Palavras-chave: glicose oxidase, ácido xilônico, xilose.

Introdução

O ácido xilônico é uma das principais moléculas de alto valor agregado que podem ser obtidas a partir de biomassa lignocelulósica (Werpy; Petersen, 2004). Esta molécula pode ser aplicada diretamente como dispersante em cimento, agente complexante ou quelante de íons como o Zn, Fe, Cu e Ca, agente clarificante de poliolefinas, antibiótico, aditivo para melhorar a absorção de vitamina C, redução de acrilamida em alimentos cozidos, branqueamento de têxteis, galvanoplastia, biopesticidas e como aditivos na exploração de poços de petróleo (Zhou et al., 2015; Chun et al., 2006; Pezzotti; Therisod, 2006; Miller et al., 1994; Zamora et al., 2000; Toivari et al., 2012b; Buchert; Viikari 1988). Além disso, o ácido xilônico pode ser utilizado como modificador ou precursor

¹ Graduando em Engenharia Química, Universidade de Brasília, matheusfiretti@gmail.com

² Graduando em Engenharia Química, Universidade de Brasília, eduardoarants@gmail.com

³ Graduando em Engenharia Química, Universidade de Brasília, davi.ofontenele@gmail.com

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

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

⁶ Bióloga, mestre em Microbiologia Aplicada, analista da Embrapa Agroenergia, thais.demarchi@embrapa.br

⁷ Química Industrial, doutora em Engenharia Química, pesquisadora da Embrapa Agroenergia, dasciana.rodrigues@embrapa.br

para a síntese de 1,2,4-butanotriol, copoliamidas, poliéster, hidrogel e etileno glicol (Toivari et al., 2012a; Pezzotti; Therisod, 2006; Toivari et al., 2012b; Liu; Wang, 2012).

Atualmente, ácido xilônico é produzido em pequena escala por meio de rota microbiana (Toivari et al., 2012a), mas, assim como outros ácidos aldônicos, pode também ser produzido por meio de processo eletroquímico (Toivari et al., 2012b; Governo et al., 2004), oxidação química (Toivari et al., 2012b) ou enzimático (Pezzotti; Therisod, 2006; Toivari et al., 2012b). Para cada um desses processos, uma série de obstáculos vem sendo superada ao longo das últimas décadas. Algumas vantagens relacionadas ao processo enzimático envolvem o uso de condições operacionais suaves, baixo requerimento de energia, maior especificidade na obtenção de produto, possibilidade de uso de reator contínuo, e reduzida quantidade de poluentes gerados (Tomotani; Vitolo, 2007; Liu; Wang, 2007).

Apesar das vantagens supracitadas para processos enzimáticos, ainda existem muitos desafios que devem ser vencidos a fim de tornar esses processos mais atrativos industrialmente. Por exemplo, para oxidoredutases deve ser utilizada uma estratégia para regeneração de cofatores e, quando possível, recuperar e reutilizar a enzima. Também devem ser estabelecidas as condições operacionais de tal forma que a concentração de produto no meio reacional seja a máxima possível. Uma das condições operacionais mais importantes a serem estabelecidas é a concentração inicial do substrato, visto que desse valor depende a concentração final do produto. Nesse estudo, uma avaliação do efeito da concentração inicial de xilose foi realizada visando a obtenção de máximo rendimento em ácido xilônico.

Material e Métodos

Síntese de ácido xilônico

A síntese de ácido xilônico ocorre de acordo com a expressão abaixo:



Para o ensaio de síntese deste ácido em laboratório foram utilizadas soluções de xilose (PA) com concentrações de 5, 10, 50 ou 100 g/L, as quais foram preparadas em tampão citrato 0,1 mol/L, pH 5, e foram utilizadas como substrato. Uma solução de 100 g/L da glicose oxidase de *Aspergillus niger* da marca Sigma-Aldrich (100.000 unidades/g de sólido, sem adição de oxigênio), foi preparada em tampão citrato 0,1 mol/L, pH 5. A reação foi realizada em microplaca PCR 96 poços e utilizou-se a proporção de 100 µL da solução de xilose para 10 µL da solução de enzima. Para o branco do substrato foi utilizado 110 µL da solução de xilose. Para o branco da enzima, usou-se 10 µL da enzima e 100 µL do tampão. Todas as reações foram realizadas em triplicata. A microplaca foi selada com um filme plástico e mantida em um termociclador para que a reação ocorresse sob a temperatura de 35 °C em diferentes intervalos de tempo.

Monitoramento do avanço da reação

A formação de ácido xilônico em função do tempo foi monitorada indiretamente pela quantificação do consumo de xilose por meio do método do ácido dinitrosalisílico (DNS), ligeiramente modificado (Miller, 1959). Em cada um dos poços de uma microplaca foram adicionados 20 μL de amostra do meio reacional e 40 μL de tampão citrato. Em seguida 120 μL da solução de DNS foram adicionados, a placa foi selada e mantida em termociclador por 10 minutos a 95 $^{\circ}\text{C}$. Ao final da reação com DNS, uma alíquota de 36 μL de cada amostra foi transferida para uma microplaca, adequada para leitura espectrofotométrica, contendo 160 μL de água em cada poço. As misturas foram homogeneizadas e a leitura de absorbância foi realizada a 540 nm. Os valores de absorbância foram convertidos em concentração de xilose por meio de uma curva de calibração, previamente construída.

Resultados e Discussão

O consumo de xilose nos diferentes ensaios de síntese foi monitorado pelo método do DNS. Os dados de absorbância obtidos foram convertidos em concentrações de xilose por meio da equação da reta apresentada a seguir (Equação 1):

$$\text{Concentração de xilose (g/L)} = 11,537 \times \text{Abs}_{540\text{nm}} - 0,0562 \quad (\text{Equação 1})$$

Os valores de concentração de xilose ao longo do tempo nos diferentes ensaios de síntese de ácido xilônico foram utilizados para calcular o rendimento de síntese de acordo com a Equação 2.

$$\text{Rendimento (\%)} = \frac{([\text{Xilose inicial}] - [\text{Xilose final}])}{[\text{Xilose inicial}]} \times 100 \quad (\text{Equação 2})$$

Os valores de rendimento obtidos para os diferentes ensaios são apresentados na Figura 1.

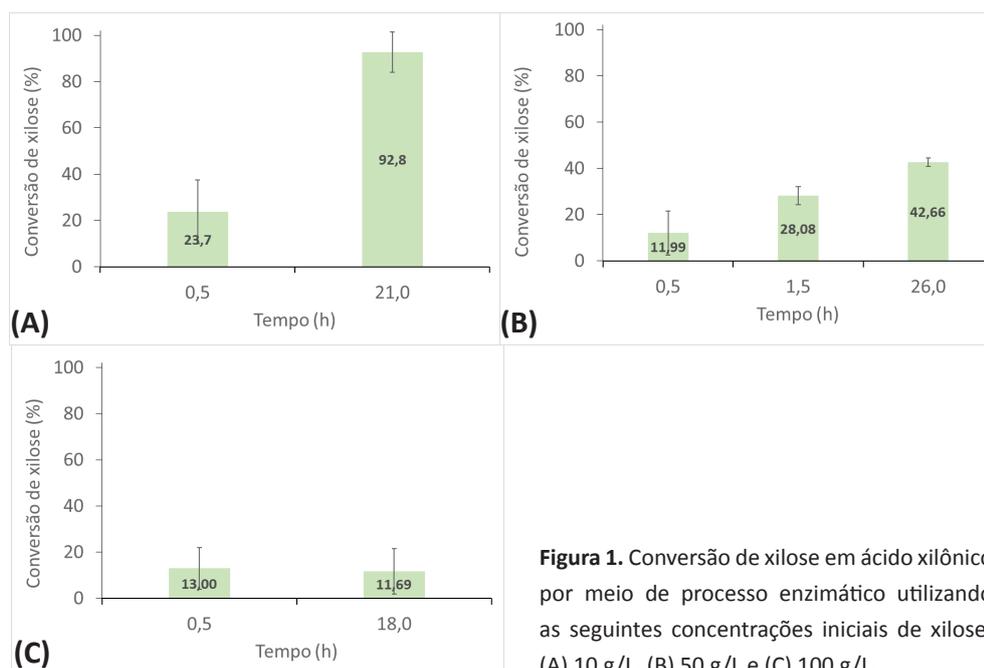


Figura 1. Conversão de xilose em ácido xilônico por meio de processo enzimático utilizando as seguintes concentrações iniciais de xilose: (A) 10 g/L, (B) 50 g/L e (C) 100 g/L.

Os dados para os ensaios realizados com concentração inicial de xilose de 5 g/L não foram apresentados porque apresentaram valores de concentração completamente fora de valores esperados, por exemplo, valores de absorvância negativa para meios contendo xilose. Isso pode ter sido causado por problemas na execução do experimento.

O maior valor de rendimento para a síntese de ácido xilônico obtido nesse estudo foi de 92,8 % quando uma concentração inicial de xilose de 10 g/L foi utilizada. Isto equivale a uma concentração final de ácido xilônico de 10,3 g/L. Pezzotti e Therisod (2006) obtiveram valores de rendimento de 90% quando utilizou glicose oxidase para síntese de ácido xilônico, em um meio reacional com concentração inicial de xilose de 75 g/L, após 100 horas de reação. O resultado superior obtido por Pezzotti e Therisod (2006), pode ser atribuído a um meio reacional aerado e contendo catalase.

Os valores de concentração de ácido xilônico alcançados neste estudo e no estudo realizado por Pezzotti e Therisod (2006), são muito inferiores aos valores encontrados para a síntese microbiana de ácido xilônico. Por exemplo, no estudo realizado por Zhou et al. (2015), valores de 586 g/L de ácido xilônico foram obtidos por meio de um processo microbiano. O processo enzimático possui algumas vantagens em relação ao processo microbiano como, por exemplo, não exigir nutrientes e meio reacional estéril, permitir a conversão quase completa de xilose em ácido xilônico, ou seja, sem reações secundárias, e produzir ácido xilônico com maior grau de pureza, livre de microrganismos e seus debrís ou metabólitos (Tomotani; Vitolo, 2007; Ahmed et al., 2011). Apesar dessas vantagens, vários obstáculos precisam ser superados para aumentar o teor de ácido xilônico nos meios de processo ao utilizar a rota enzimática.

Nas condições operacionais utilizadas nesse estudo, verificou-se que elevados rendimentos de síntese somente foram possíveis em baixas concentrações iniciais de xilose. Considerando os fundamentos teóricos divulgados na literatura científica para a síntese de ácidos aldônicos (ácidos glicônico e xilônico, principalmente) é possível concluir que os resultados obtidos nesse estudo sugerem que a enzima pode ter sido inibida pelo substrato ou pelo coproduto desta reação, o peróxido de hidrogênio. Além disso, a falta de aeração do meio reacional também desfavoreceu a ação de glicose oxidase. Para atingir concentrações mais elevadas de ácido xilônico mantendo o rendimento de síntese será necessário aprimorar outras variáveis do processo, como por exemplo, a adição de uma peroxidase ao meio reacional para reduzir a concentração de peróxido de hidrogênio, o qual é inibidor da glicose oxidase e a aeração do meio reacional, pois a glicose oxidase precisa de oxigênio para a conversão de xilose a ácido xilônico.

Considerações Finais

O ácido xilônico está entre as principais moléculas que podem ser produzidas a partir de biomassa lignocelulósica. Nesse estudo foi identificada a concentração inicial mínima de xilose (10 g/L) em que se pode atingir elevado rendimento (>90%) para a síntese de ácido xilônico sem a necessidade de aeração e adição de uma peroxidase. Entretanto, partindo-se de uma concentração inicial de xilose muito baixa, conseqüentemente a concentração de ácido xilônico também será muito baixa, inviabilizando economicamente a purificação e comercialização do produto final. Para atingir níveis mais elevados na concentração de ácido xilônico é necessário a adição de catalase e aeração do meio

reacional para que elevados valores de rendimento sejam atingidos mesmo quando concentração inicial de xilose de aproximadamente 200 g/L seja utilizada no meio reacional.

Referências

- AHMED, Y.M.; IBRAHIM, I.H.; KHAN, J.A.; KUMOSANI, T.A. Oxidation and reduction of D-xylose by cell-free extract of *Hansenula polymorpha*. **Australian Journal of Basic and Applied Sciences**, v. 5, n. 12, p. 95-100, 2011.
- BECTON DICKINSON AND CO. MILLNER, O.E.; CLARKE, R.P.; TITUS, G.R. **Clarifiers for polyolefins and polyolefin compositions containing same**. C08K 5/15; C07D 407/02, U.S. n. 5283275A, 1994.
- BUCHERT, J.; VIKARI, L. The role of xylonolactone in xylonic acid production by *Pseudomonas fragi*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 27, p. 333–336, 1988.
- CHUN, B.-W.; DAIR, B.; MACUCH, P.J.; WIEBE, D.; PORTENEUVE, C.; JEKNAVORIAN, A. The development of cement and concrete additive based on xylonic acid derived via bioconversion of xylose. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 129–132, p. 645-658, 2006.
- GOVERNO, A.T.; PROENÇA, L.; PARPOT, P.; LOPES, M.I.S.; FONSECA, I.T.E. Electro-oxidation of d-xylose on platinum and gold electrodes in alkaline médium. **Electrochimica Acta**, v. 49, p. 1535–1545, 2004.
- LIU, H.; VALDEHUESA, K.N.G.; NISOLA, G.M.; RAMOS, K.R.M.; CHUNG, W.J. High yield production of D-xylonic acid from D-xylose using engineered *Escherichia coli*. **Bioresource Technology**, v. 115, p. 244–248, 2012.
- LIU, W.; WANG, P. Cofactor regeneration for sustainable enzymatic biosynthesis. **Biotechnology Advances**, v. 25, p. 369–384, 2007.
- MILLER, G. L. Use of Dinitrosalicilic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. **Analytical Biochemistry**, New York, v. 31, p. 426-428, 1959.
- PEZZOTTI, F.; THERISOD, M. Enzymatic synthesis of aldonic acids. **Carbohydrate Research**, v. 341 p. 2290–2292, 2006.
- TOIVARI, M.; NYGARD, Y.; KUMPULA, E.-P.; VEHKOMAKI, M.L.; BENCINA, M.; VALKONEN, M.; MAAHEIMO, H.; ANDBERG, M.; KOIVULA, A.; RUOHONEN, L.; PENTTILA, M.; WIEBE, M.G. Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for bioconversion of D-xylose to D-xylonate. **Metabolic Engineering**, v. 14, p. 427–436, 2012a.
- TOIVARI, M.H.; NYGÅRD, Y.; PENTTILÄ, M.; RUOHONEN, L.; WIEBE, M.G. Microbial D-xylonate production. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 96, p. 1–8, 2012b.
- TOMOTANI, E.J.; VITOLO, M. Immobilized glucose oxidase as a catalyst to the conversion of glucose into gluconic acid using a membrane reactor. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 40, p. 1020–1025, 2007.
- WERPY, T.; PETERSEN, G. Pacific Northwest National Laboratory, National Renewable Energy Laboratory. **Top Value Added Chemicals from Biomass: Results of Screening for Potential Candidates from Sugars and Synthesis Gas**. Department of Energy, Oak Ridge, TN (2004). Disponível em: <<http://www.nrel.gov/docs/fy04osti/35523.pdf>>. Acesso em: 27 set. 2020.
- ZAMORA, F.; BUENO, M.; MOLINA, I.; IRIBARREN, J.I.; MUNOZ-GUERRA, S.; GALBIS, J.A. Stereoregular copolyamides derived from D-xylose and L-arabinose. **Macromolecules**, v. 33, p. 2030–2038, 2000.
- ZHOU, X.; LÜ, S.; XU, Y.; MO, Y.; YU, S. Improving the performance of cell biocatalysis and the productivity of xylonic acid using a compressed oxygen supply. **Biochemical Engineering Journal**, v. 93, p. 196–199, 2015.

Análise do potencial econômico de variedade de cana geneticamente modificada para produção de açúcar

Bruno de Oliveira Garcia¹, Hugo Bruno Correa Molinari², Thályta Fraga Pacheco³, Adilson Kenji Kobayashi⁴, Geraldo Veríssimo Souza Barbosa⁵, Luciano Vilela Paiva⁶, Rosana do Carmo Nascimento Guiducci⁷

Resumo

O objetivo deste trabalho é analisar o impacto econômico *ex ante* de variedade de cana-de-açúcar geneticamente modificada para fabricação do açúcar, considerando o desempenho da variedade na fase industrial, em cenários de adoção da tecnologia. Trata-se de uma variedade de cana geneticamente modificada, que possibilita a redução de 70% do escurecimento do caldo de cana na etapa de processamento. Foram utilizados dados de mercado, relativos ao custo total, custo de insumos e custo da etapa de clareamento do caldo de cana, no processo de produção de açúcar. A partir dos resultados obtidos na pesquisa, estimou-se o impacto da variedade modificada no custo de produção, tendo em vista mudanças no processamento, especialmente na etapa de clareamento. Avaliaram-se ganhos econômicos frente às exportações e produção total de açúcar na safra 2019/2020. O custo de clareamento por tonelada de açúcar foi estimado em R\$ 6,02 na região Centro-Sul e R\$ 11,36 na região Nordeste. Com base nas exportações de 2019/2020, estimou-se ganho econômico de R\$ 103,70 milhões no Centro Sul e R\$ 16,34 milhões no Nordeste, caso a tecnologia fosse adotada. Levando em conta a produção nacional, se a tecnologia fosse adotada em 20% da produção, o ganho estimado por região é de R\$ 32,35 milhões e R\$ 6,61 milhões, respectivamente, podendo chegar a R\$ 161,75 milhões e R\$ 33,06 milhões caso toda a produção derivasse desta tecnologia. Conclui-se que a variedade tem potencial para aumentar a competitividade e as margens líquidas obtidas na indústria brasileira de açúcar.

Palavras-chave: custo de produção, eficiência econômica, açúcar, variedade de cana.

Introdução

A produção mundial de açúcar em 2020/21 é estimada em 188.077 mil toneladas, sendo o Brasil responsável por 39.480 mil toneladas, o que equivale a 21% da produção mundial (USDA, 2020).

¹ Doutorando em Biotecnologia Vegetal, Universidade Federal de Lavras, brunodeoliveiragarcia@gmail.com

² Engenheiro-agrônomo, doutor em Agronomia, pesquisador da Embrapa Agroenergia, hugo.molinari@embrapa.br

³ Engenheira química, mestre em Engenharia Química, analista da Embrapa Agroenergia, thalyta.pacheco@embrapa.br.

⁴ Biólogo, doutor em Ciências Biológicas, pesquisador da Embrapa Agroenergia, adilson.kobayashi@embrapa.br

⁵ Engenheiro-agrônomo, doutor em Agronomia/Produção Vegetal, professor Associado da Universidade Federal de Alagoas e Coordenador do Programa de Melhoramento Genético de Cana-de-açúcar da Ridesa/UFAL, gvsbarbosa@gmail.com

⁶ Engenheiro-agrônomo, doutor em Fitotecnia, professor titular da Universidade Federal de Lavras, luciano@ufla.br

⁷ Economista, doutora em Economia Aplicada, pesquisadora da Embrapa Agroenergia, rosana.guiducci@embrapa.br

Na safra 2019/2020 o Brasil produziu 29.795,7 mil toneladas de açúcar, sendo 2.909,0 mil toneladas na região Norte/Nordeste (9,76%) e 26.886,7 no Centro-Sul (90,24%) (Conab, 2020).

As condições de mercado e as estimativas da safra de cana-de-açúcar 2020/2021, sinalizam que tanto a produção quanto a exportação de açúcar devem aumentar. Estima-se que 45,8% da safra na região Centro-Sul e 52,8% na região Norte/Nordeste sejam destinadas à produção de 39,5 milhões de toneladas de açúcar (Figura 1) (Conab, 2020).

O crescimento estimado da produção mundial de açúcar é de 13% em relação à safra anterior, enquanto no Brasil o aumento esperado é 32% (USDA, 2020). A queda no consumo de etanol no mercado interno brasileiro devido a menor mobilidade da população diante da pandemia é um dos fatores que contribuiu para o aumento da produção de açúcar neste ano. As exportações deverão se elevar em 45%, passando de 18,9 milhões de toneladas em 2019 (Observatório da Cana, 2020) para 28,85 milhões de toneladas em 2020 (USDA, 2020). O aumento das exportações brasileiras é estimulado, sobretudo pela redução na oferta mundial devido as adversidades climáticas em importantes países produtores da Ásia e pela desvalorização cambial. De acordo com dados do Ministério da Economia, na média de abril a julho de 2020, o aumento nos preços de exportação foi de 63% em dólar e 127% em reais.

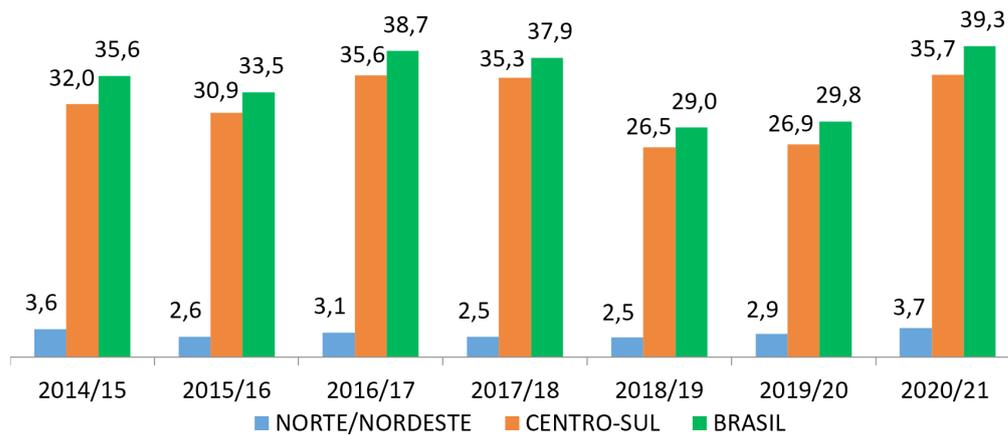


Figura 1. Produção de açúcar no Brasil e regiões, em milhões de toneladas.

Fonte: Conab (2020).

Apesar da importância econômica do açúcar, os produtores no Brasil operam com margens líquidas baixas ou mesmo negativas em determinados períodos. Isso porque embora o país tenha influência na formação de preços, por ser um grande produtor e exportador, o açúcar é uma commodity internacional cujo preço é definido em bolsas de mercadorias no exterior. Estudo do Pecege (2015) aponta que até o 3º trimestre da safra 2019/2020 as Usina do Centro-Sul registravam prejuízos operacionais, já que o custo de produção médio de açúcar VHP (bruto) ficou em R\$ 1.274,66 a tonelada, o que representa uma alta de 0,51% em comparação com a safra anterior, e o preço de venda era de R\$ 968,14 a tonelada (Canaonline, 2020).

O custo total da produção do açúcar é dependente das operações unitárias até o produto final, o que determina a quantidade de operações para o clareamento é a qualidade do caldo extraído cana-de-açúcar.

O processo de produção do açúcar é compreendido pelas etapas de (i) colheita, (ii) extração e peneiração do caldo para retirada do bagacilho, (iii) clarificação do caldo para a retirada de substâncias que proporcionam cor escura ao caldo, (iv) evaporação e concentração do caldo para transformá-lo em xarope, (v) e cristalização em baixa temperatura (Rein, 2016). O processo de clarificação do caldo, após o custeio agrônomico de plantio da cana-de-açúcar, representa a segunda etapa mais onerosa para a obtenção do açúcar. Os pigmentos presentes na cana-de-açúcar, tais como as clorofilas, antocianinas, e principalmente os polifenóis causam o escurecimento do caldo (Hoing, 2013; Bourzutschky, 2005; Mersad et al. 2003). Os polifenóis são os principais substratos da polifenol oxidase responsáveis pela conversão de polifenóis em ortoquinonas que por sua vez reagem formando as melaninas (Bucheli et al., 1996), compostos que conferem cor escura ao caldo. Dentre as técnicas desenvolvidas para a realização da clarificação do caldo, muitas delas são de alto custo ou pouco eficientes. Desta forma, o método de sulfitação é comumente utilizado pela indústria sucroalcooleira. Entretanto, o dióxido de enxofre liberado pela queima controlada do enxofre neste processo, contamina o caldo da cana com substâncias prejudiciais à saúde humana (Machado et al. 2006). Estudos mostram que as polifenóis oxidases contribuem com 70% do escurecimento do caldo da cana da variedade RB92579 (Garcia, 2020). Dados não publicados). Esta variedade é altamente produtiva, com características agrônomicas desejáveis, e ocupa aproximadamente 40% da área plantada de cana na região Nordeste e a quarta variedade mais plantada na região Centro-Sul do país, porém apresenta cor do caldo escuro. Uma alternativa para este problema é a modificação genética para que as enzimas não sejam expressas e não atuem no escurecimento do caldo da cana-de-açúcar.

Neste contexto, o desenvolvimento de tecnologias que possam agregar ganhos de eficiência e retorno econômico é fundamental para o desenvolvimento do setor e manutenção do Brasil como líder no mercado mundial.

O objetivo deste trabalho é avaliar ganhos econômicos com a utilização de variedade de cana-de-açúcar geneticamente modificada desenvolvida pela Embrapa, que apresenta propriedades de redução em 70% do escurecimento do caldo de cana, podendo eliminar parcial ou totalmente a etapa de clareamento do açúcar.

Material e Métodos

A análise proposta neste estudo envolve o levantamento de dados secundários relativos ao custo de produção de açúcar, preços de mercado, estimativa de custo da etapa industrial de clareamento do açúcar, além de dados primários de pesquisa em desenvolvimento na Embrapa.

Foram utilizados dados de custo de processamento de uma tonelada de cana-de-açúcar e custo de produção de uma tonelada de açúcar nas safras 2008/2009 (Marques, 2009) e 2014/2015 (Pecege, 2015). Para a safra 2019/2020 adotou-se o custo total médio da região Centro-Sul, divulgado em Canaonline (2020) e como proxy para o custo total da região Nordeste utilizou-se 5% sobre o valor do Centro Sul, refletindo o diferencial observado na safra 2014/2015.

O detalhamento das despesas da safra 2019/2020 foi feito com base nos percentuais da estrutura de custos observada na safra 2014/2015. O detalhamento de insumos utilizados para a etapa de clareamento foi obtido em Marques (2009).

Os insumos utilizados no processamento da cana de açúcar são classificados em químicos, eletrodos, sacaria, combustíveis, lubrificantes e eletricidade. Os processos industriais correspondentes e os tipos de insumos utilizados são mostrados na Tabela 1. A etapa industrial de clareamento do caldo de cana abrange os processos de “fábrica de açúcar” e “tratamento de caldo”. O custo de produção desta etapa é formado pelos insumos: floculante, polímero, clareador, enxofre, antibiótico e antiespumante.

Utilizou-se o percentual do custo da etapa de branqueamento em relação ao total de despesas com insumos, para estimar o custo de clareamento das safras 2014/2015 e 2019/2020. Portanto, nas análises realizadas considerou-se que este percentual permaneceu inalterado no tempo.

Tabela 1. Processamento de cana-de-açúcar: insumos, processos industriais e tipos de insumos.

| Insumos | Processos industriais | Tipo de insumo |
|--|--------------------------------|---|
| Químicos | Extração de caldo | Bacterida; Cal |
| | Tratamento de caldo | Floculante; Polímeros |
| | Tratamento de água | Decantadores; Desinfectantes; Fosfatos; Sulfitos |
| | Tratamento de caldeira e vapor | Corretor de PH; Neutralizante de vapor; Lubrificante de massa |
| | Fábrica de Açúcar | Clareador, Enxofre, Antibiótico, Antiespumante |
| | Fermentação | Dispersante; Nutrientes; Ácido Sulfúrico |
| Eletrodos | Destilação | Desidratante |
| | Preparo de cana | Facas e desfibradores |
| Sacaria | Extração do caldo | Chapisco; Picotes, Lateral; base/ sobrebase |
| | Fábrica de açúcar | Big bags, Sacos de 50 kg |
| Combustíveis, lubrificantes e eletricidade | Geral | Graxas; Lubrificantes; Combustíveis; Eletricidade |

Fonte: Marques (2009).

As estimativas de ganho econômico com a adoção da variedade modificada levaram em conta resultados da pesquisa que indicam 70% de redução da coloração do caldo de cana. Sendo assim, foram adotadas três hipóteses para avaliar os ganhos econômicos. A primeira admite que com este nível de clareamento, é possível eliminar esta etapa do processo de industrialização, resultando na redução dos custos correspondentes ao clareamento. Na segunda hipótese admite-se um custo remanescente de 25% e na terceira hipótese, considera-se uma redução de 50% do custo de clareamento.

Analisaram-se cenários de adoção da tecnologia equivalente a 20%, 50% e 100% do açúcar produzido no Brasil na safra 2019/2020 e sobre o total de exportações, buscando identificar o impacto econômico da tecnologia.

Resultados e Discussão

O total gasto com insumos para o processamento de uma tonelada de cana na safra 2008/2009, nas regiões Centro-Sul e Nordeste, foi de R\$ 2,48 e 2,41, respectivamente

(Marques, 2009). O custo da etapa de clareamento foi da ordem de R\$ 0,55 no Centro Sul e R\$ 0,70 no Nordeste, o que corresponde a 22,34% e 29,13% do custo de insumos nas duas regiões, respectivamente (Tabela 2). Conforme mencionado anteriormente, este percentual foi utilizado para estimar o custo de clareamento nas safras 2014/2015 e 2019/2020, sendo esta última disponível apenas em R\$ por tonelada de açúcar.

Tabela 2. Custos de produção de açúcar (clareamento, insumos e custo total), R\$/tonelada de cana processada, safras 2008/09 e 2014/2015.

| Custos | 2008/09 | | 2014/2015 | |
|------------------|------------|----------|------------|----------|
| | Centro-Sul | Nordeste | Centro-Sul | Nordeste |
| Clareamento* (A) | 0,55 | 0,70 | 0,52 | 1,10 |
| Insumos (B) | 2,48 | 2,41 | 2,35 | 3,77 |
| Custo total | 64,75 | 73,82 | 123,11 | 129,34 |
| A/B (%) | 22,34% | 29,13% | 22,34% | 29,13% |

*estimativa elaborada pelos autores.

Fonte: Pecege (2015).

Em termos de custo por tonelada de açúcar, o percentual dos insumos em relação ao custo total, na região Centro-Sul, oscilou de 0,43% na safra 2014/2015 para 0,47% na safra 2019/2020 (Tabela 3). Na região Nordeste, permaneceu constante (0,85%).

Tabela 3. Custos de produção de açúcar (clareamento, insumos e custo total), R\$/tonelada de açúcar, safras 2008/09, 2014/2015 e 2019/2020.

| Custos | 2008/09 | | 2014/2015 | | 2019/2020* | |
|------------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| | C-S | NE | C-S | NE | C-S | NE |
| Clareamento* (A) | 4,22 | 5,20 | 4,06 | 8,85 | 6,02 | 11,36 |
| Insumos (B) | 18,87 | 17,86 | 18,17 | 30,38 | 26,93 | 39,01 |
| Custo total (C) | 492,7 | 547,14 | 952,13 | 1.042,22 | 1.274,66 | 1.338,39 |
| A/B (%) | 22,34% | 29,13% | | | | |
| A/C (%) | 0,86% | 0,95% | 0,43% | 0,85% | 0,47% | 0,85% |

*estimativa elaborada pelos autores. CS – Centro Sul; NE – Nordeste.

Fonte: Pecege (2015).

No entanto, em comparação com a safra 2008/2009 nota-se uma redução importante do custo de clareamento em relação ao custo total, especialmente na região Centro-Sul, que vem apresentando custos administrativos, de capital e de terras crescentes. No geral, a região Norte/Nordeste apresenta maior custo de produção, em grande medida, devido à diferença em produtividade média da matéria-prima. Observa-se que o custo estimado de clareamento, por tonelada de açúcar, na safra 2019/2020, foi de R\$ 6,02, no Centro Sul e R\$ 11,36, no Norte/Nordeste.

Levando em consideração o potencial de redução de custos de produção da tecnologia, estimam-se os ganhos econômicos com relação às exportações brasileiras (Figura 2) e parcelas da produção nacional (Tabela 4).

O Brasil exportou 19,3 milhões de toneladas de açúcar em 2019/2020 (USDA, 2020). O preço médio do açúcar VHP (exportação) nesta safra foi de R\$ 48,02 por saca de 50 kg (Cepea, 2020), o que equivale a R\$ 960,45 a tonelada, totalizando R\$ 18,5 bilhões de exportação.

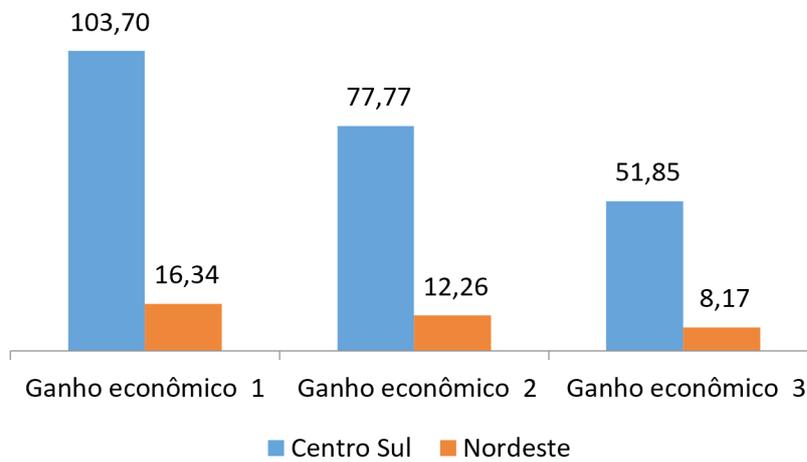


Figura 2. Ganhos econômicos sobre exportação de açúcar, regiões Centro-Sul e Nordeste, safra 2019/2020, em R\$ milhões.

Tabela 4. Cenários de adoção da tecnologia e ganhos econômicos, por região, em R\$ milhões.

| Cenários de adoção / ganhos econômicos | 20% da produção | | 50% da produção | | 100% da produção | |
|--|-----------------|------|-----------------|-------|------------------|-------|
| | CS | NE | CS | NE | CS | NE |
| Produção de açúcar, em t milhões | 5,38 | 0,58 | 13,44 | 1,45 | 26,89 | 2,91 |
| Ganho econômico - 1 | 32,35 | 6,61 | 80,88 | 16,53 | 161,75 | 33,06 |
| Ganho econômico - 2 | 24,26 | 4,96 | 60,65 | 12,40 | 121,32 | 24,79 |
| Ganho econômico - 3 | 16,17 | 3,30 | 40,44 | 8,26 | 80,88 | 16,53 |

CS – Centro Sul; NE – Nordeste.

Se a produção exportada tivesse utilizado a variedade de cana geneticamente modificada, o valor adicionado ao lucro na região Centro-Sul seria de R\$ 103,7 milhões, na hipótese de eliminação total da etapa de clareamento (ganho econômico 1), R\$ 77,8 milhões, caso permaneça um custo residual de clareamento de 25% (ganho econômico 2) e R\$ 51,8 milhões caso a tecnologia elimine apenas metade do custo de clareamento (ganho econômico 3) (Figura 2). Na região Nordeste, os ganhos econômicos variam de R\$ 16,3 milhões a R\$ 8,2 milhões.

Considerando cenários de adoção da tecnologia em que 20%, 50% e 100% da produção de açúcar na safra 2019/2020 utiliza a variedade de cana geneticamente modificada, estimam-se os valores adicionados à margem líquida, mostrados na Tabela 4, resultado da redução do custo de clareamento.

Observa-se que se 20% da produção de açúcar no Centro-Sul e Nordeste tivesse utilizado a variedade geneticamente modificada, haveria um ganho econômico de R\$ 32,35 milhões e R\$ 6,61 milhões, respectivamente, em um cenário em que a redução de 70% no escurecimento do caldo de cana é suficiente para eliminar totalmente a necessidade de clareamento do açúcar (ganho econômico 1). Esses valores podem

chegar a R\$ 161,75 milhões na região Centro-Sul e R\$ 33,06 milhões no Nordeste, se toda a produção da safra 2019/2020 derivasse desta variedade. No cenário mais pessimista (ganho econômico 3), esses valores reduzem para R\$ 16,17 milhões e R\$ 3,30 milhões, respectivamente, já que a tecnologia elimina somente 50% do custo de clareamento, sendo adotada apenas por 20% da produção observada na safra 2019/201920.

Considerações Finais

O Brasil é um importante *player* no mercado mundial de açúcar, com estrutura instalada e um nível de integração consolidado entre setor de produção da cana e o setor de processamento.

Os custos de produção de açúcar no Brasil vêm apresentando tendência de alta, especialmente em função de investimentos em mecanização dos processos. Paralelamente, linhas de pesquisa estão em andamento com vistas a possibilitar ganhos de produtividade e eficiência para este setor produtivo, na etapa agrícola e industrial.

No caso particular da tecnologia em desenvolvimento pela Embrapa, que permite economia de insumos usados para o clareamento do açúcar, no que tange à questão econômica da adoção desta tecnologia, constatou-se um ganho significativo para o setor que vem operando com margens baixas nas últimas safras, da ordem de R\$ 161,75 milhões na região Centro-Sul e R\$ 33,06 milhões no Nordeste, no cenário mais otimista, em que 100% da produção de açúcar derivam da variedade modificada, com eliminação total dos custos de clareamento. Conclui-se que a variedade tem potencial para aumentar a competitividade e as margens líquidas obtidas na indústria brasileira de açúcar.

Porém, o desenvolvimento da tecnologia *per se* não garante a inovação no setor produtivo. Parcerias são fundamentais para que haja alinhamento entre as demandas do setor e a agenda de pesquisa, bem como para que ativos tecnológicos sejam rapidamente incorporados ao processo produtivo, garantindo competitividade e ganhos econômicos.

Referências

- BOURZUTSCHKY, H. C. C. Color formation and removal-Options for the sugar and sugar refining industries: a review. *Zuckerindustrie*, v. 130(6), p. 470-475, 2005.
- BUCHELI, CS, Dry, IB, ROBINSON, SP Isolation of a full-length cDNA codes polyphenol oxidase from sugarcane, a C4 grass. *Plant Molecular Biology*, v. 31, p. 1233-1238, 1996.
- CANAONLINE. **Dólar favorece margem das usinas com açúcar**. 09 mar 2020. Disponível em: <<http://www.canaonline.com.br/conteudo/dolar-favorece-margem-das-usinas-com-acucar.html>>. Acesso em: 04 set. 2020.
- CEPEA. Centro de Estudos Avançados em Economia Aplicada. **Banco de dados**. Disponível em: <<https://www.cepea.esalq.usp.br/br/consultas-ao-banco-de-dados-do-site.aspx>>. Acesso: em 27 ago. 2020.
- CONAB. Companhia Nacional de Abastecimento. **Série histórica das safras**. Disponível em: <<https://www.conab.gov.br/info-agro/safras/serie-historica-das-safras?limitstart=0>>. Acesso: em 27 ago. 2020.
- MACHADO, R. M.; TOLEDO, M. C.; VICENTE, E. Sulfitos em alimentos. *Brazilian Journal of Food Technology*, v. 9(4), p. 265-275, 2006.

MARQUES, P.V. (Coord.) **Custo de produção agrícola e industrial de açúcar e álcool no Brasil na safra 2007/2008**. Piracicaba: Universidade de São Paulo, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Programa de Educação Continuada em Economia e Gestão de Empresas/Departamento de Economia, Administração e Sociologia. 2009. 194 p.

MERSAD, A.; LEWANDOWSKI, R.; HEYD, B.; DECLoux, M. Colorants in the sugar industry. **Int. Sugar Jnl**, v. 105(1254), p. 269-281, 2003.

OBSERVATÓRIO DA CANA. **Exportação Anual de Açúcar pelo Brasil por Estado de Origem**. Disponível em: <<https://observatoriodacana.com.br/listagem.php?idMn=43>>. Acesso em: 17 set. 2020.

PECEGE. **Custos de produção de cana-de-açúcar, açúcar, etanol e bioeletricidade no Brasil: fechamento da safra 2014/2015 e acompanhamento da safra 2015/2016**. Piracicaba: Universidade de São Paulo, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Programa de Educação Continuada em Economia e Gestão de Empresas/Departamento de Economia, Administração e Sociologia. 2015. 78 p.

REIN, P (No. Ed. 2), VERLAG, BARTENS A.K.G. **Cane sugar engineering**, 2016.

USDA. United States Department of Agriculture. **Foreign Agricultural Service**. Disponível em: <<https://apps.fas.usda.gov/psdonline/app/index.html#/app/advQuery>>. Acesso em: 04 set. 2020.

Avaliação do tratamento de efluente da extração do óleo de dendê e potencial de produção de biogás

Jozomar Ferreira Junior¹, Beatriz Fernanda Crotti², Sílvia Belém Gonçalves³, Simone Mendonça⁴, Carmen Luisa Barbosa Guedes⁵

Resumo

O óleo de palma ou dendê é o óleo comestível mais consumido mundialmente, sendo o dendê a oleaginosa que apresenta a maior produtividade por área. Os resíduos e efluentes gerados durante o processo produtivo do óleo vêm sendo utilizados como bioinsumos e biocombustíveis, a partir de diversos métodos físicos, químicos e biológicos de aproveitamento destes coprodutos. O presente estudo tem como objetivo avaliar o tratamento do efluente da extração do óleo de dendê (*POME*), visando a diminuição da carga orgânica e o potencial de produção de biogás, a partir do processo de digestão anaeróbia. Foram avaliados diferentes volumes de inóculo (30, 40 e 50%), a fim de determinar o volume ideal para a redução da carga orgânica do efluente e produção de biogás. Os experimentos foram conduzidos em 10 reatores anaeróbios de bancada, acoplados a manômetros para verificar a pressão interna exercida pelo biogás gerado. Foi utilizado o volume de 100 mL para as misturas de efluente com inóculo, ajustado para pH igual a 7, durante 10 dias de operação, sob temperatura de $35 \pm 2^\circ\text{C}$. Os resultados sugerem que o *POME* apresenta elevado potencial para a produção de biogás. O tratamento que aplicou 30% de inóculo gerou o volume de 338 mL com concentração de 65% de gás metano, além de reduzir a DQO em 47,3%, indicando assim uma diminuição significativa na carga orgânica do efluente. Adicionalmente, o *POME* após o processo de tratamento pode ser utilizado como biofertilizante através de fertirrigação para o cultivo de dendê, agregando valor a esta cadeia produtiva agroindustrial.

Palavras-chave: *POME*, Digestão Anaeróbia, DQO, Metano.

Introdução

O Brasil fundamenta-se economicamente na agroindústria e um setor que possui elevada representatividade na economia do estado do Pará é o da produção do óleo de palma ou dendê (*Elaeis guineensis*), uma palmácea que se destaca em relação às outras oleaginosas por ser a que possui a maior produtividade por área (Silva et al., 2018).

Entre os resíduos gerados durante a extração do óleo, tem-se o efluente líquido conhecido como efluente do óleo de palma ou *Palm Oil Mill Effluent (POME)*, caracterizado com um elevado potencial poluidor, além de excessivos volumes de geração pela alta

¹ Engenheiro ambiental, mestrando em Bioenergia, Universidade Estadual de Londrina, jozomar@uel.br

² Engenheira ambiental, mestranda em Bioenergia, Universidade Estadual de Londrina, beatriz.crotti@uel.br

³ Engenheira química, doutora em Engenharia Química, pesquisadora da Embrapa Agroenergia, silvia.belem@embrapa.br

⁴ Farmacêutica e bioquímica, doutora em Saúde Pública, pesquisadora da Embrapa Agroenergia, simone.mendonca@embrapa.br

⁵ Química, doutora em Química Orgânica, Universidade Estadual de Londrina, carmen@uel.br

demanda hídrica nesta cadeia produtiva, acarretando inúmeros impactos ambientais para o solo, recursos hídricos e biodiversidade quando disposto sem tratamento prévio e adequado no ambiente (Iskandar et al., 2018).

Diante das diferentes tecnologias de tratamento de efluentes e resíduos agroindustriais, a digestão anaeróbia, processo realizado por microrganismos na ausência de oxigênio, se destaca por conciliar a redução da carga poluidora destes por meio da degradação de compostos orgânicos com o aproveitamento energético, através da produção de biogás, evidenciando sua viabilidade ambiental e energética (Choong; Chou; Norli, 2018).

Para tanto, o presente estudo contempla avaliar o tratamento e a produção de biogás a partir do efluente líquido da extração do óleo de dendê (*POME*), através do processo de digestão anaeróbia, conciliando o tratamento com o aproveitamento energético deste efluente. Este estudo faz parte do projeto de pesquisa da Embrapa Agroenergia: DendêPalm – Estratégias genômicas e agregação de valor para a cadeia produtiva do dendê.

Material e Métodos

O *POME* - efluente líquido da produção do óleo de dendê e o cultivo de microrganismos anaeróbios, denominado inóculo, foram fornecidos pela empresa DENPASA – Dendê do Pará S/A localizada no município de Santa Bárbara do Pará, PA. O efluente líquido é proveniente de processamento do dendê híbrido, BRS Manicoré, que é uma cultivar desenvolvida pela Embrapa Agroenergia a partir do cruzamento entre o dendezeiro de origem africana (*Elaeis guineensis*) e o dendezeiro originário da região Amazônica caiuapé (*Elaeis oleifera*).

A coleta do efluente bruto para tratamento em laboratório foi realizada no final do processo produtivo, antes de ser encaminhado para as lagoas de tratamento.

O inóculo, constituído principalmente por microrganismos anaeróbios, foi coletado ao fundo da lagoa anaeróbia de tratamento do próprio efluente *POME*.

Tratamento do efluente *POME* por digestão anaeróbia

Para avaliar o tratamento e a produção de biogás do efluente *POME* híbrido através da digestão anaeróbia, foram empregados 10 reatores de bancada, equipados com tampa de nylon com uma válvula de saída de gás para análises periódicas da composição do biogás gerado e outra acoplada a um manômetro para monitoramento da pressão interna do sistema e verificação do volume de biogás produzido, conforme apresenta a Figura 1.



Figura 1. Reatores anaeróbios de bancada.

Foto: Jozomar Ferreira Junior

Os reatores anaeróbios de bancada possuem capacidade de 250 mL, sendo utilizado o volume de 100 mL para a mistura de *POME* e inóculo, operando em regime de batelada, durante 10 dias de processo fermentativo, variando o volume de inóculo em 30%, 40% e 50%, conforme o planejamento experimental realizado em duplicata, apresentado na Tabela 1, tendo como parâmetro resposta para o tratamento do efluente a variação da demanda química de oxigênio (DQO) e em termos de produção de biogás, o volume total de biogás produzido.

O pH das misturas *POME* e inóculo foi ajustado para valor igual a 7 utilizando solução de hidróxido de sódio NaOH 1M.

A temperatura foi controlada ($35 \pm 2^\circ\text{C}$) através de uma estufa incubadora BOD, modelo 315D, verificando assim, o potencial de produção de biogás em faixa de temperatura mesofílica.

Tabela 1. Planejamento experimental.

| Tratamento | Volume (mL) | |
|------------|-------------|---------|
| | <i>POME</i> | Inóculo |
| A | 100 | - |
| B | 100 | - |
| C | - | 100 |
| D | - | 100 |
| E | 70 | 30 |
| F | 70 | 30 |
| G | 60 | 40 |
| H | 60 | 40 |
| I | 50 | 50 |
| J | 50 | 50 |

Produção de biogás a partir do efluente *POME*

Para a determinação do volume de biogás produzido foi utilizado o método manométrico (VDI 4630, 2016). Dessa forma, a pressão interna dos reatores foi monitorada diariamente através da leitura dos manômetros (kgf cm^{-2}).

A Equação 1 foi utilizada para a transformação dos dados através de formulações matemáticas, obtendo como resultado o volume (mL) de biogás produzido durante o processo de digestão anaeróbia em condições normais de temperatura e pressão (CNTP).

$$V_b \text{ gerado entre } T (T + 1) = \frac{[PF \text{ (mbar)} \times VUF \text{ (L)} \times 22,41]}{[83,14 \times TF \text{ (K)}]} \times 1000 \quad (1)$$

Onde:

V_b = volume de biogás (mL);

T = tempo (dias);
PF = pressão do frasco (milibar);
VUF (L): volume útil do frasco em litros;
TF (K): temperatura do frasco em Kelvin.

Foi realizada uma análise referente a cinética de reação e produção de biogás, conforme apresenta a Equação 2, que considera o volume acumulado de biogás.

$$V_b \text{ acumulado (mL)} = [V_b \text{ gerado entre } T \text{ e } (T + 1)] + V_{GA} \text{ (mL)} \quad (2)$$

Sendo:

V_b = volume de biogás (mL);
T = tempo (dias);
V_{GA} = volume de biogás acumulado do dia anterior (mL).

Monitoramento do biogás

As análises de composição do biogás foram realizadas diariamente, após a leitura dos manômetros, através do kit de análise de biogás da empresa AlfaKit®, com metodologia utilizada pela Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, para determinação de gases como metano (CH₄) e dióxido de carbono (CO₂) através do método de diferença de volume, que envolve absorção e oxidação seletiva. Esta metodologia consiste nas seguintes normas:

- EPA – *Environmental Protection Agency. Emissions Measurement Center, Método 3B CO₂, O₂ Orsat*;
- *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 22ª Ed. 2012. 4500 F. 4-115. Método do Indofenol.*

Resultados e Discussão

Em relação à variação da carga orgânica, a Tabela 2 apresenta os valores iniciais e finais do processo de digestão anaeróbia do *POME* híbrido, bem como a redução (%) em termos de DQO.

A partir da Tabela 2 é possível observar os tratamentos A e B, que utilizaram 100% do efluente *POME*, bem como os tratamentos C e D, que aplicaram 100% de inóculo, não houve redução significativa de DQO, ou seja, isolados, tanto o *POME* quanto o inóculo, não são possíveis de realizar o tratamento do efluente e redução da carga orgânica. Destacando a importância da relação efluente/inóculo no processo de digestão anaeróbia, bem como o volume de inóculo utilizado no tratamento de efluentes. Como é possível verificar valores distintos de redução de DQO conforme o volume de inóculo utilizado nos experimentos.

Tabela 2. Valores iniciais, finais e redução de DQO para os tratamentos aplicados.

| Tratamento | DQO inicial (g O ₂ L ⁻¹) | DQO final (g O ₂ L ⁻¹) | Redução de DQO (%) |
|------------|--|--|-----------------------|
| A | 23,56 ± 0,014 | 20,11 ± 0,015 | 14,6 |
| B | 23,06 ± 0,011 | 19,56 ± 0,021 | 15,2 |
| C | 17,41 ± 0,013 | 14,21 ± 0,005 | 18,4 |
| D | 18,26 ± 0,019 | 15,26 ± 0,032 | 16,4 |
| E | 22,41 ± 0,011 | 11,81 ± 0,004 | 47,3 |
| F | 24,06 ± 0,014 | 12,96 ± 0,006 | 46,1 |
| G | 22,21 ± 0,015 | 13,56 ± 0,012 | 38,9 |
| H | 23,16 ± 0,010 | 13,71 ± 0,003 | 40,8 |
| I | 22,71 ± 0,017 | 14,26 ± 0,009 | 37,2 |
| J | 23,86 ± 0,013 | 15,21 ± 0,001 | 36,3 |

Os tratamentos E e F que utilizaram um volume de 30% de inóculo, ou seja, 30 mL, foram os tratamentos que apresentaram maior redução de DQO, atingindo valores de 47,3 e 46,1%, respectivamente. Já os tratamentos que empregaram volumes maiores de inóculo, como no caso dos tratamentos G e H (40%), I e J (50%), alcançaram valores mais baixos em termos de redução de DQO, atingindo valores entre 36 e 40%. Demonstrando assim, a importância de avaliar o volume de inóculo a ser utilizado para o tratamento do efluente *POME* através do processo de digestão anaeróbia, uma vez que diferenças significativas em termos de redução da carga orgânica são possíveis de observar a partir dos diferentes tratamentos aplicados neste experimento.

Segundo Chernicharo (2005), o processo de digestão anaeróbia é altamente recomendado para o tratamento de efluentes agroindustriais, uma vez que, este processo pode chegar a reduzir entre 40 e 80% da carga orgânica do efluente avaliado.

Fang et al. (2011), avaliaram a eficiência do tratamento de efluente *POME* em reator anaeróbio durante 5 dias de reação, produzindo 440 mL de CH₄ por cada grama de sólidos voláteis removido, obtendo uma redução superior a 90% de demanda química de oxigênio (DQO). Por outro lado, Choorit e Wisarnwan (2007) avaliaram o tratamento do *POME* por digestão anaeróbia, observando em 7 dias de operação 71,1% de redução de DQO em temperatura de 37 °C. Ambos os trabalhos apresentaram valores superiores de redução de DQO quando comparados ao presente trabalho, esta variação ocorre devido ao processo de digestão anaeróbia ser vulnerável à qualquer alteração no meio, podendo prejudicar a eficiência do processo de tratamento, além disso, por se tratar de um efluente da extração de óleo, um elevado teor de óleos e graxas, bem como outros parâmetros de interesse, como metais pesados, podem inibir ou mesmo dificultar o processo de digestão anaeróbia e a produção de biogás consequentemente (Coelho et al., 2018).

A produção de biogás a partir do *POME* híbrido, pode ser observada na Figura 2, que apresenta o volume de biogás produzido a partir de cada tratamento aplicado ao longo dos 10 dias de experimento, exceto os tratamentos A, B, C e D, que foram utilizados como controle, não havendo produção de biogás.

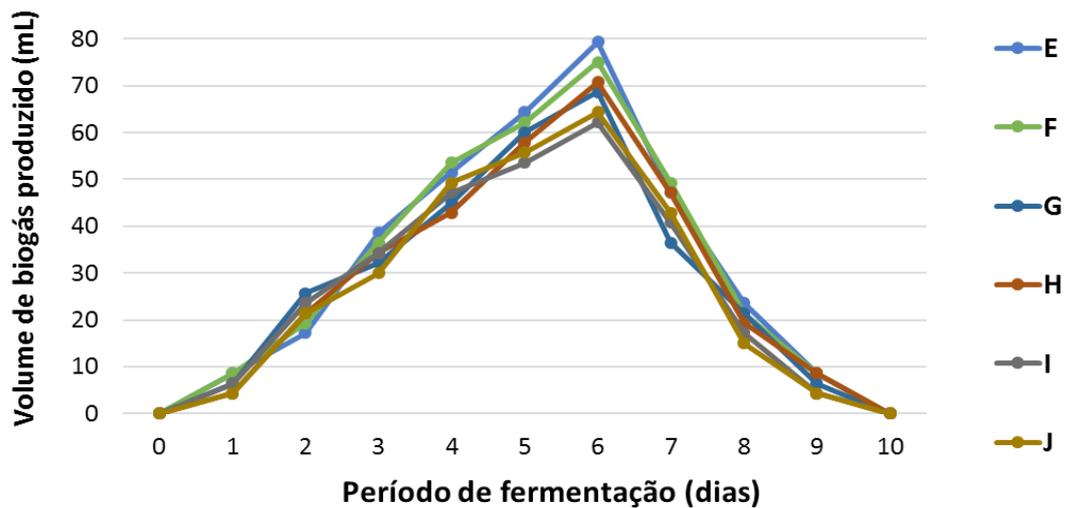


Figura 2. Volume de biogás gerado a partir dos tratamentos aplicados.

A partir da Figura 2 é possível observar valores semelhantes de produção de biogás para todos os tratamentos aplicados, isto ocorre devido ao valor do pH inicial das misturas *POME* e inóculo, que foram todos ajustados para valor igual a 7. Valores de pH próximos da neutralidade apresentam-se mais eficientes em estudos de tratamento de efluentes e produção de biogás através da digestão anaeróbia (Zhang; Hu; Lee, 2016).

É possível observar também, uma elevada produção de biogás no sexto dia de operação para todos os tratamentos, entretanto, os tratamentos E e F que utilizaram o volume de 30% de inóculo, apresentaram os valores mais elevados de produção de biogás, alcançando volumes de 79 e 75 mL, respectivamente.

A Figura 3 que apresenta a produção acumulada de biogás observada ao longo de 10 dias de fermentação, exceto os valores dos tratamentos A, B, C e D, os quais não produziram biogás.

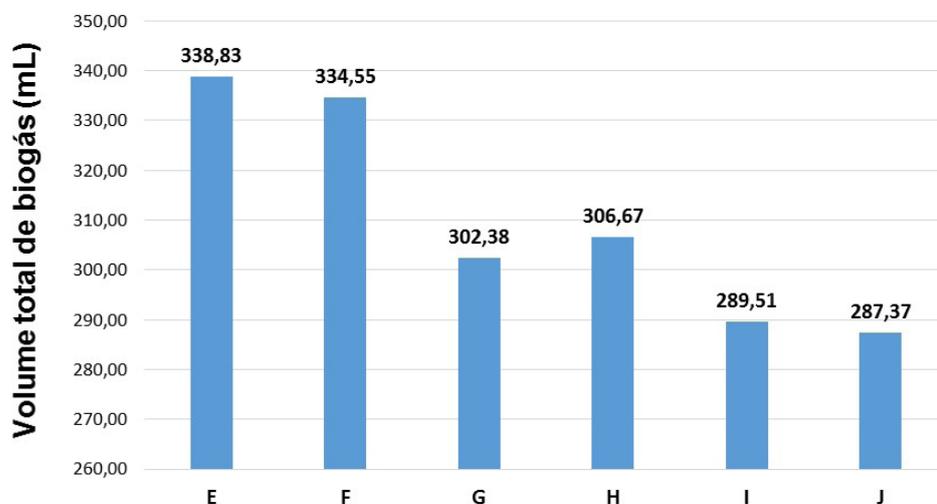


Figura 3. Produção acumulada de biogás.

A partir da Figura 3 é possível observar elevados volumes de produção de biogás a partir dos tratamentos E e F, que apresentaram produção de 338,83 e 334,55 mL de biogás, combinando 30% de inóculo com 70% de *POME*, além disso, verificando que maiores taxas de aplicação de inóculo como nos tratamentos G, H, I e J, (40% e 50%) não apresentaram-se satisfatórias para a produção de biogás a partir do efluente *POME*, produzindo valores na faixa de 290 e 300 mL de biogás ao longo de 10 dias de processo fermentativo.

No estudo realizado por Wang et al. (2015), foi avaliado a produção de biogás a partir de *POME* em reator anaeróbio operado a 37°C com 9 dias de operação, obtendo um volume de 27,65 m³ de biogás para cada m³ do efluente. Observando valores de 65 - 70% de metano na composição do biogás produzido.

A composição química do biogás produzido a partir do efluente *POME* híbrido está expressa na Figura 4, apresentando os percentuais de dióxido de carbono (CO₂) e metano (CH₄) para os tratamentos aplicados.

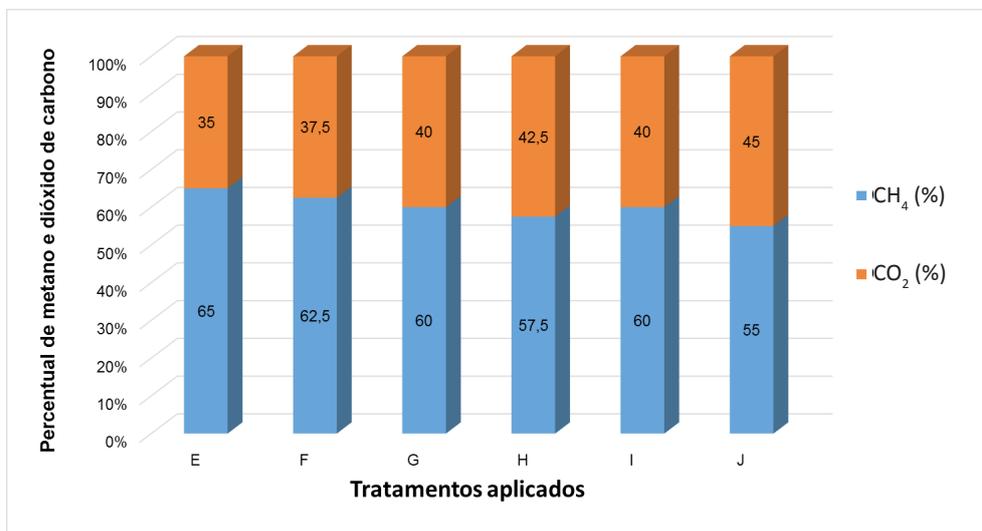


Figura 4. Composição do biogás produzido.

A partir da Figura 4, é possível observar novamente destaque para os tratamentos E e F que apresentaram uma relação E/I (70/30), produzindo uma média de 65 e 62,5% de gás metano, respectivamente, valores mais elevados que os apresentados pelos outros tratamentos aplicados, como 60, 57,5, 60 e 55% para G, H, I e J, respectivamente. Evidenciando assim, um maior potencial energético para E e F, devido a predominância do gás metano na composição química do biogás produzido ao longo de 10 dias de operação.

Conclusão

A combinação de 30% de inóculo em pH igual a 7 apresentou um volume total de 338,83 mL de biogás, sendo a máxima produção observada no sexto dia de operação (79 mL), com composição química média de 65% de gás metano. Além de atingir redução de 47,3% de DQO. Indicando assim, a situação ideal para a produção de biogás a partir do *POME* híbrido, uma vez que, tratamentos que combinaram valores mais elevados de inóculo não apresentaram a mesma eficiência no tratamento do efluente e na produção de biogás e metano.

Referências

- CHERNICHARO, C. A. L. **Reatores anaeróbios**. Belo Horizonte: Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental – UFMG, v. 5, n. 2, 380 p., 2007.
- CHOONG, Y. Y.; CHOU, K. W.; NORLI, I. Strategies for improving biogas production of palm oil mill effluent (POME) anaerobic digestion: A critical review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 82, p. 2993–3006, 2018.
- CHORRIT, W.; WISARNWAN, P. Effect of temperature on the anaerobic digestion of palm oil mill effluent. **Electronic Journal of Biotechnology**. ISSN: 0717-3458. v. 10, n. 3, 2007.
- COELHO, S., T.; GARCILASSO, V., P., FERRAZ JUNIOR, A., D., N.; MARIANOS dos SANTOS, M.; JOPPERT, C., L. **Tecnologias de produção e uso do biogás e biometano**. Instituto de Energia e Meio Ambiente da Universidade de São Paulo, IEE – USP. São Paulo, 209 p. 2018.
- FANG, C.; O-THONG, S.; BOE, K.; ANGELIDAKI, I. Comparison of UASB and EGSB reactors performance, for treatment of raw and deoiled palm oil mill effluent (POME). **Journal of Hazardous Materials**, v. 189, p. 229–234, 2011.
- ISKANDAR, M. J.; BAHARUM, A.; ANUAR, F. H.; OTHAMAN, R. Palm oil industry in South East Asia and the effluent treatment technology - A review. **Environmental Technology, Innovation**, v. 9, p. 169–185, 2018.
- SILVA, I. V.; VIEIRA, N. D. B.; BRUNI DE NÓBREGA, L. G.; BARROS, R. M.; TIAGO FILHO, G. L. Assessment of potential biogas production from multiple organic wastes in Brazil: Impact on energy generation, use, and emissions abatement. **Resources, Conservation, Recycling**, v. 131, p. 54-63, 2018.
- VDI 4630. Verein Deutscher Ingenieure. **Fermentation of organic materials**. Characterization of the substrate, sampling, collection of material data, fermentation tests. Berlin, Germany, 2006.
- WANG, J.; MAHMOOD, Q.; QIU, J. P.; LI, Y. S.; CHANG, Y. S.; LI, X. D. Anaerobic treatment of palm oil mill effluent in pilot-scale anaerobic EGSB reactor. **BioMed Research International**, 7 p., 2015.

Expressão Heteróloga e Caracterização Bioquímica de Enzimas Lignocelulolíticas e Proteínas Acessórias do fungo *Thermomyces lanuginosus* em *Komagataella phaffii*

Luana Assis Serra¹, Janice Lisboa De Marco², João Ricardo M. Almeida³

Resumo

Os combustíveis fósseis apresentam uma parcela significativa na matriz energética e têm sido extensivamente utilizados ao longo do tempo. Estes recursos são finitos e devido ao aumento de demanda de energia estão cada vez mais caros, gerando um aumento de preços em setores essenciais em todo o mundo. Considerando os fatores econômicos e ambientais, processos biotecnológicos para produção de energia e produtos químicos renováveis estão em desenvolvimento como fonte de energia alternativa. A biomassa lignocelulósica apresenta grande potencial para geração de biocombustíveis, como o etanol de segunda geração, e outros produtos bioderivados. As enzimas lignocelulolíticas atuam na desconstrução da biomassa e a identificação e caracterização de novas enzimas é de grande interesse. As celulasas, hemicelulasas e proteínas com atividade acessória auxiliam no processo de conversão da biomassa em produtos de valor agregado. Além disto, estas enzimas possuem importante aplicação em vários setores da indústria: como farmacêutica, alimentos, detergentes e têxtil. Para a produção de alto rendimento destas proteínas e redução de custos, a otimização de sistemas de expressão recombinantes em microrganismos é altamente desejada. Neste trabalho, sequências gênicas provenientes do fungo *Thermomyces lanuginosus* que possivelmente codificam para as proteínas poligalacturonase (TLPG), mono-oxigenases líticas de polissacarídeos (TLPMO), expansinas-like (TLEX2) e feruloil esterases (TLFE1 e TLFE2) foram obtidas para a expressão heteróloga em *Komagataella phaffii* X33. Estas sequências gênicas foram otimizadas e clonadas em vetor de expressão pGAPZB ou pPICZαA. Após a transformação genética de *K. phaffii*, os clones positivos foram selecionados e cultivados. A produção das proteínas TLPG, TLPMO, TLEX2 e TLFE1 foi avaliada por SDS-PAGE e *Western-blot* para detecção da proteína heteróloga. A atividade enzimática foi verificada e ensaios de caracterização bioquímica iniciais foram realizados.

Palavras-chave: biomassa lignocelulósica, biocombustíveis, expressão heteróloga, proteínas lignocelulolíticas.

¹ Bióloga, mestre em Biologia Microbiana, doutoranda em Biologia Microbiana, Universidade de Brasília, luaserra@globo.com

² Bióloga, doutora em Biologia Molecular, professora-adjunta da Universidade de Brasília, janicedemarco@unb.br

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

Introdução

Como uma alternativa aos combustíveis fósseis, diversos estudos estão investigando soluções baseadas em processos biotecnológicos renováveis e sustentáveis. A biomassa lignocelulósica tem sido apontada como uma possível fonte para produção de energia e bioprodutos. Neste contexto, a utilização da biomassa para produção de etanol lignocelulósico e outros compostos químicos de interesse tem sido amplamente avaliado, e assim, apontado como forma de viabilizar economicamente a cadeia produtiva de biocombustíveis, valorizar resíduos e coprodutos e reduzir a eliminação de resíduos industriais (Paes; Almeida, 2014).

Para tal, a biomassa deve ser pré-tratada para que ocorra o afrouxamento das porções de celulose, hemicelulose e lignina. Em sequência, ocorre o processo de hidrólise responsável pela degradação dos carboidratos complexos da biomassa em açúcares monoméricos, que pode ser hidrolisada mediante ação enzimática. Um consórcio de enzimas contendo diferentes classes de proteínas pode ser desenvolvido para aumentar a eficiência da degradação do substrato. Entre estas, estão as proteínas acessórias como, as mono-oxigenases líticas de polissacarídeos (LPMOs) e expansinas-like, que exercem um papel essencial na desconstrução da celulose pois possuem uma ação sinérgica com enzimas celulolíticas. Para a degradação da hemicelulose, proteínas como a feruloil esterase (FE) facilitam o acesso de enzimas hemicelulolíticas ao substrato aumentando a liberação dos açúcares ali presentes. Adicionalmente, proteínas como a poligalacturonase (PG) são capazes de degradar a pectina que é um constituinte da biomassa. Estas enzimas possuem diversas aplicações na indústria, como na de alimentos, sendo utilizada na clarificação de sucos (Mellitzer et al, 2012; Maitan-Alfenas et al., 2015).

Neste sentido, pesquisas em enzimas lignocelulolíticas (celulases, hemicelulases, e proteínas acessórias) provenientes de fungos tem recebido grande atenção, pois estes microrganismos têm se demonstrado altamente eficientes e eficazes na hidrólise da biomassa, tanto pela capacidade de produção de um coquetel enzimático quanto pela possibilidade de isolamento de enzimas específicas para suplementação de coquetéis. Apesar dos grandes avanços técnico-científicos na área, a descoberta de novas enzimas lignocelulolíticas é de grande interesse para as biorrefinarias que estão se desenvolvendo, inclusive para a indústria de bioetanol. Para reduzir o custo e alcançar altas produções destas enzimas, um sistema de expressão heterólogo é altamente favorecido (Silva; Vaz; Filho, 2017).

A levedura *K. phaffii* é um excelente sistema para expressão heteróloga de enzimas lignocelulolíticas. A sua capacidade de realizar modificações pós traducionais, fácil manipulação genética, altos níveis de secreção da proteína heteróloga e o status GRAS (*Generally recognized as safe*) tornam esta levedura um importante sistema de expressão (Gomes et al., 2016). Este trabalho visa a expressão heteróloga das proteínas feruloil esterase (TLFE1), poligalacturonase (TLPG), LPMO (TLPMO1) e expansina-like (TLEX2) provenientes do genoma de *Thermomyces lanuginosus* na levedura *K. phaffii*. Em etapas seguintes, as proteínas recombinantes serão purificadas e caracterizadas bioquimicamente. Por fim, estas serão adicionadas a coquetéis enzimáticos para avaliação da ação sinérgica na desconstrução de substratos sintéticos e da biomassa de cana-de-açúcar.

Material e Métodos

Obtenção das sequências das proteínas de interesse e transformação genética de bactéria e levedura

As sequências referentes às enzimas de interesse foram pesquisadas no genoma do fungo *T. lanuginosus* a partir das informações de bancos de dados online. Desta forma, as sequências selecionadas foram sintetizadas no vetor de expressão escolhido, pGAPZB (TLEX2) e pPICZ α A (TLPMO1, TLFE1 e TLPG). A transformação em bactéria (*Escherichia coli* DH 10BT1) por eletroporação é essencial para a manutenção e multiplicação dos plasmídeos. Confirmados os clones recombinantes de bactérias (marca de seleção por antibiótico e análise de restrição), altas concentrações de DNA plasmidial foram obtidos através de midi-preparações (ThermoScientific). Para a transformação de levedura, 10 μ g de DNA plasmidial foram obtidos e inseridos em células de *K. phaffii* X33 utilizando o protocolo de eletroporação, conforme o manual da Invitrogen (Catalog nos. V200–20).

Confirmação de colônias positivas por PCR e cultivo das leveduras recombinantes

Após o crescimento das colônias de *K. phaffii* transformadas por eletroporação, estas foram analisadas por PCR. Para a PCR, o DNA genômico foi utilizado como molde e oligonucleotídeos específicos para amplificação do fragmento do gene de interesse foram utilizados. As colônias confirmadas foram cultivadas a 28 °C em agitador orbital a 200 rpm, em Erlenmeyer de 1 litro contendo 100 mL de meio de cultura BMMY (para clones contendo pPICZ α A) e BMGY (para clones contendo pGAPZB) [extrato de levedura 10 g/L; Peptona 20 g/L; 100 mM tampão fosfato de potássio, pH 6,0; YNB 1,34% (p/v); biotina 4 x 10⁻⁵ % (p/v); 2 glicerol % (v/v) ou 1% metanol (v/v)]. O cultivo foi realizado durante 96 horas. O extrato enzimático obtido através do cultivo foi analisado por SDS-PAGE (Laemmli, 1970) e Western-blot (*Sigma Aldrich protocol*).

Purificação das proteínas recombinantes e verificação de atividade enzimática

A purificação da proteína recombinante TLPG, TLPMO1 e TLEX2 foram feitas no equipamento AKTA pure (GE healthcare), com a coluna HisTrap, HP histidine-tagged protein purification columns de 5 mL (GE healthcare). As proteínas de interesse foram expressas com cauda de histidina, a qual pode ser utilizada para purificação em colunas de afinidade por níquel. As proteínas foram quantificadas (mg/mL) pelo método colorimétrico BCA (Kit Invitrogen). Para determinação da atividade de TLPG foi feito um ensaio com o extrato bruto de TLPG e a proteína purificada. O substrato utilizado foi o ácido poligalacturônico a 0,5% (p/v) com a curva padrão de ácido galacturônico variando de 0,2 a 2 mg/mL, e o ensaio foi realizado com tampão acetato de sódio/ácido acético 0,2 M pH 4,5 e temperatura de 40 °C. A quantificação do açúcar redutor foi feita pelo método de DNS (Miller, 1959) e baseado no trabalho de Anand et al. (2016). Os ensaios de atividade para a LPMO serão feitos com o kit comercial da *Thermo Scientific, Amplex red Hydrogen Peroxide/ Peroxidase Activity Assay* (Kittl et al, 2012). Devido a ausência de atividade enzimática da proteína expansina-like, um ensaio de sinergismo foi realizado

com celulases (celluclast e enzimas de *Aspergillus* sp.) tendo como substrato papel filtro (FPase), de acordo com o trabalho de Xiao et al. (2004).

Resultados e Discussão

As quatro proteínas recombinantes, TLEX2, TLFE1, TLPMO1 e TLPG foram expressas pela levedura *K. phaffii* X33. A proteína TLEX2C2 se apresentou próximo ao marcador molecular de 25 kDa, sendo uma proteína de baixo peso molecular assim como outras expansinas-like. O seu tamanho predito era de 15,78 kDa, porém, estas proteínas possuem diferentes padrões de glicosilação. Isto pode causar o aumento do peso molecular e também a forma como se apresentam no gel em múltiplas bandas (Figura 1 A). Trabalhos anteriores demonstram os diferentes padrões de migração das expansinas no gel, devido a sua múltipla forma molecular resultante de glicosilações (Wang et al, 2014).

Os resultados do ensaio de sinergismo com celulases (celluclast e enzimas de *Aspergillus* sp.) e a proteína TLEX2 purificada (17 mg/L) não mostraram um efeito sinérgico entre a proteína TLEX2 e as celulases. O resultado do ensaio não foi surpreendente, pois até então não foram reportadas expansinas-like da classe de TLEX2 (cerato-plataninas) que possuam atividade sinérgica com celulases. Porém, estas proteínas devem ser analisadas quanto a sua capacidade sinérgica, já que estas são capazes de afrouxar as fibras de celulose (o mecanismo de ação destas proteínas não foi completamente elucidado) (Cosgrove, 2017). Desta forma, ensaios para a verificação da capacidade do afrouxamento de fibras de celulose posteriores devem ser realizados com TLEX2, como ensaios de sinergismo com maior concentração de TLEX2 purificada e ensaios mecânicos de afrouxamento de celulose.

A TLFE1 foi a única proteína não purificada, e apresentou expressão por diferentes colônias (2, 4, 6 e 12) apresentando tamanho pouco acima de 35 kDa (conforme pode ser observado pela Figura 1B). O seu tamanho predito era de 31,98 kDa e o aumento em seu peso molecular possivelmente ocorreu devido a glicosilações: O (3 sítios preditos) ou N (5 sítios preditos).

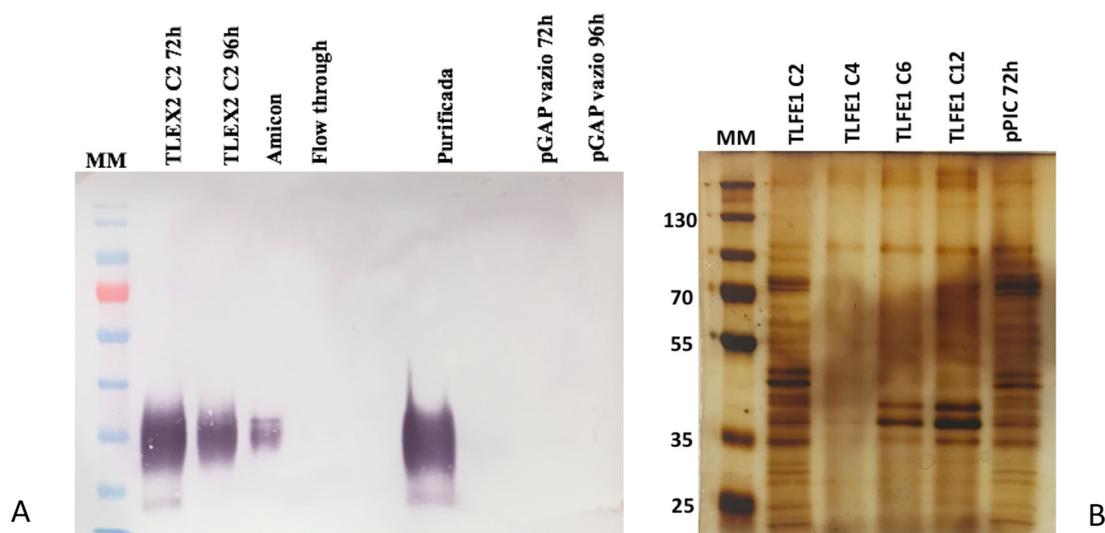


Figura 1. A) Western-blot de TLEX2C2 purificada; B) Análise da expressão de TLFE1 por SDS-page corado com nitrato de prata

A proteína TLPMO1 apresentou tamanho próximo ao marcador molecular de 55 kDa (Figura 2A), com a possibilidade de ter sofrido glicosilações pois o seu tamanho predito era de 29,16 kDa. Após a purificação de TLPMO1C8, esta foi quantificada por BCA e apresentou concentração de 4,4 mg/mL. No trabalho de Kittl et al. (2012), uma LPMO de *Neurospora crassa* foi expressa na mesma linhagem de *K. phaffii* utilizando o vetor pPICZαA, alcançando expressão de 2,76 mg/mL. Desta forma, um bom nível de expressão foi alcançado por TLPMO1 quando comparadas com outras LPMOs descritas na literatura. Com a proteína purificada, o ensaio de atividade amplex-RED foi realizado no qual houve detecção de produção de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) de aproximadamente 4 μ M (Figura 2B). Este valor indica que a proteína está ativa, porém testes futuros precisam ser realizados para a sua caracterização bioquímica.

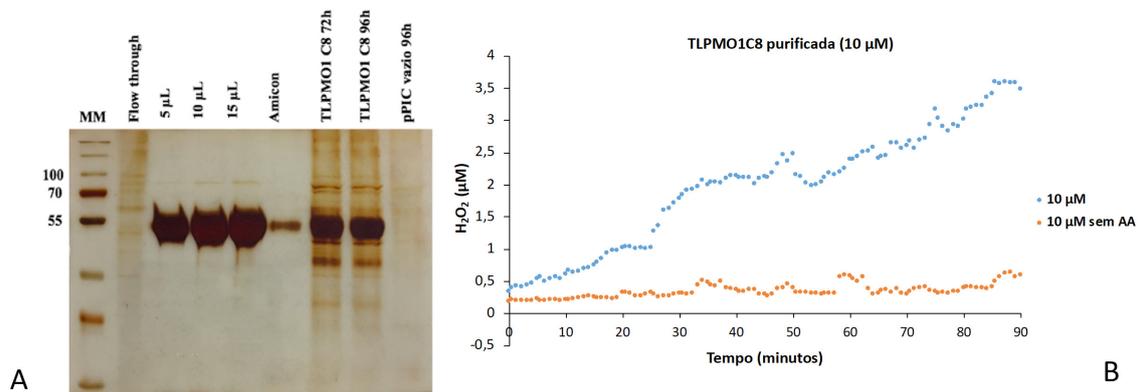


Figura 2. A) Análise da proteína TLPMOC8 purificada por SDS-PAGE corado com nitrato de prata; B) Produção de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) pela enzima TLPMO1C8.

A purificação de TLPGC15 alcançou uma concentração de 9 mg/mL de proteína recombinante pura. O tamanho predito para TLPGC15 era de 39,14 kDa, mas a banda observada ficou pouco acima do marcador de 55 kDa (Figura 3A). Conforme mencionado anteriormente, é possível que tenham ocorrido glicosilações, bastante comuns em proteínas expressas por *K. phaffii*. O ensaio por DNS confirmou a atividade de TLPGC15 purificada e apresentou liberação de açúcar redutor de mais de 7 mg/mL de açúcar redutor (Figura 3B). O ensaio foi realizado novamente após 15 dias para avaliar a estabilidade da enzima e uma redução na atividade foi observada (Figura 3A). Porém, a enzima se manteve ativa mesmo após 15 dias de armazenamento a 4 °C. Experimentos futuros serão realizados para a caracterização bioquímica e avaliação de parâmetros como pH, temperatura e fatores cinéticos (K_{cat} e K_m).

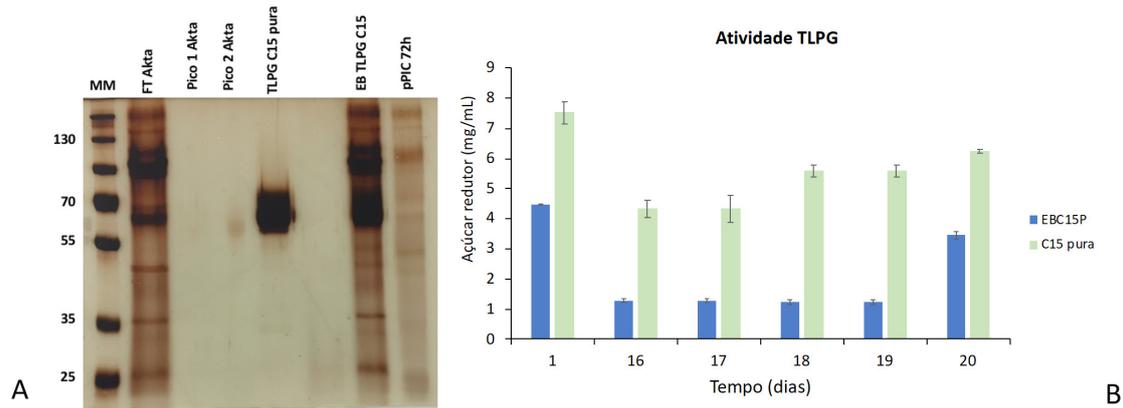


Figura 3. A) Análise da proteína TLPGC15 purificada por SDS-PAGE corado com nitrato de prata; B) Produção de açúcar redutor pela enzima TLP1C15 ao longo do tempo (dias).

Conclusões

As proteínas TLFE1, TLEX2, TLP1C15 e TLP2C15 foram expressas heterologicamente na levedura *K. phaffii*. Assim, as proteínas TLEX2, TLP1C15 e TLP2C15 foram purificadas e as suas atividades foram verificadas em ensaio preliminares. TLP1C15 apresentou a produção de H_2O_2 pelo ensaio amplex-RED e TLP2C15 confirmou sua atividade a partir da liberação de açúcar redutor por DNS. Um ensaio de atividade sinérgica entre celulasas e TLEX2 foi realizada, mas nenhum aumento de atividade foi observado sendo necessário a realização de novos experimentos. Ensaios futuros serão realizados para a caracterização bioquímica de TLP2C15, TLP1C15 e TLFE1. Todas as proteínas provenientes de *T. lanuginosus* descritas neste trabalho foram expressas pela primeira vez sob o controle do promotor GAP ou AOX. Por fim, estas proteínas serão avaliadas em experimentos posteriores quanto ao seu potencial de aplicação em coquetéis contendo diferentes classes de enzimas para a degradação sinérgica dos componentes da biomassa lignocelulósica.

Referências

- AHMAD, M. et al. Protein expression in *Pichia pastoris*: Recent achievements and perspectives for heterologous protein production. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 98, n. 12, p. 5301–5317, 2014.
- ANAND, G.; YADAV, S.; YADAV, D. Purification and characterization of polygalacturonase from *Aspergillus fumigatus* MTCC 2584 and elucidating its application in retting of *Crotalaria juncea* fiber. **3 Biotech**, v.6, n. 2, p. 1–7, 2016.
- COSGROVE, D. J. Microbial Expansins. **Annual Review of Microbiology**, v. 71, p. 479–497, 2017.
- INVITROGEN CORPORATION. Instruction Manual. *Pichia* expression vectors for constitutive expression and purification of recombinant protein. Catalog n. V200–20, 2010.
- KITTL et al. Production of four *Neurospora crassa* lytic polysaccharide monooxygenases in *Pichia pastoris* monitored by a fluorimetric assay. **Biotechnology for Biofuels**, v. 5, n. 79, p. 1–13, 2012.
- LAEMMLI, U. K. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p. 680–685, 1970.
- MAITAN-ALFENAS, G. P.; VISSER, E. M.; GUIMARÃES, V. M. Enzymatic hydrolysis of lignocellulosic biomass: Converting food waste in valuable products. **Current Opinion in Food Science**, v. 1, n. 1, p. 44–49, 2015.

MELLITZER, A. et al. Expression of lignocellulolytic enzymes in *Pichia pastoris*. **Microbial Cell Factories**, v. 11, n.1, p. 1–11, 2012.

MILLER, G. L. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, n. 3, p. 426–428, 1959.

PAES, B. G.; ALMEIDA, J. R. Genetic improvement of microorganisms for applications in biorefineries. **Chemical and Biological Technologies in Agriculture**, v. 1, n. 1, p. 1–10, 2014.

SIGMA ALDRICH, 2020. *Western Blotting* Protocol (Immunoblotting Protocol). Disponível em: <https://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/protocols/biology/western-blotting.html> (Acesso: 29 de setembro de 2020).

SILVA, C. O. G.; VAZ, R. P.; FILHO, E. X. F. Bringing plant cell wall-degrading enzymes into the lignocellulosic biorefinery concept. **Biofuels, Bioproducts and Biorefining**, p. 1–13, 2017.

WANG, W. et al. Improved production of two expansin-like proteins in *Pichia pastoris* and investigation of their functional properties. **Biochemical Engineering Journal**, v. 84, p. 16–27, 2014.

XIAO, Z.; STORMS, R.; TSANG, ADRIAN. Microplate-Based Filter Paper Assay to Measure Total Cellulase Activity. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 88, n. 7, p. 832-837, 2004.

Interações fúngicas observadas através de imagem química por espectrometria de massas

*Tallyta Santos Teixeira*¹, *Jorge Candido Rodrigues Neto*², *Aparecido Almeida Conceição*³, *Félix Gonçalves de Siqueira*⁴, *Patrícia Verardi Abdelnur*⁵

Resumo

Os fungos filamentosos são responsáveis pela produção de vários metabólitos, principalmente em cocultivo, devido às interações microbianas simularem um ambiente complexo de competição ou simbiose, que por sua vez estimula a produção de novos compostos químicos com grande aplicação industrial. Essas interações são facilmente classificadas conforme os efeitos ou ainda as alterações na macromorfologia estrutural do crescimento micelial, mas podem ainda ser complementadas através de ferramentas analíticas robustas. Uma das técnicas que pode ser empregada para esses estudos é a imagem química por espectrometria de massas (do inglês, *Imaging Mass Spectrometry*, IMS), pois permite informações complementares através da localização química espacial. Desta forma, este estudo teve como objetivo avaliar as interações entre os fungos *Aspergillus terreus* (ATCC® 20542™) e *Pleurotus pulmonarius* (BRM 055674) por IMS. Os fungos foram cultivados em meio BDA por 8 dias a 28 °C, desidratados e submetidas a aplicação da matriz HCCA por sublimação. As imagens químicas foram obtidas por MALDI-IMS (do inglês, do inglês *Matrix Assisted Laser Desorption Ionization – Imaging Mass Spectrometry*) e os metabólitos foram identificados por UHPLC-ESI-MS/MS (do inglês, *Ultra High Performance Liquid Chromatography with Electrospray Ionization – Tandem Mass Spectrometry*). Dessa forma, nove íons foram detectados por MALDI-IMS, principalmente na zona do cocultivo entre os fungos, sendo um deles (m/z 346) identificado. Pela imagem química, notou-se ainda que os íons detectados estão relacionados à interação dos microrganismos, por terem sido detectados apenas na zona de cocultivo, ou seja, ausentes no branco e nos monocultivos. Portanto, a imagem química por espectrometria de massas forneceu informações complementares as morfológicas visualizadas, de que os fungos interagem positivamente e por contato. E apesar dos desafios encontrados na identificação dos metabólitos, essa ferramenta pode ser amplamente utilizada para prospectar metabólitos provenientes de cocultivos destinados a aplicações biotecnológicas.

Palavras-chave: *imaging mass spectrometry*, MALDI-IMS, *Aspergillus terreus*, *Pleurotus pulmonarius*, metabolômica, biotecnologia industrial.

¹ Engenheira de Bioprocessos e Biotecnologia, doutoranda em Química, Universidade Federal do Goiás, tallyta.tst@gmail.com

² Químico, doutorando em Química, Universidade Federal do Goiás, jorgecrn@hotmail.com

³ Biotecnologista, mestre em Biociências, Universidade Federal do Mato Grosso, aparecido.aac@gmail.com

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

⁵ Química, doutora em Química, pesquisadora da Embrapa Agroenergia, patricia.abdelnur@embrapa.br

Introdução

Os microrganismos crescem naturalmente em ambientes complexos, repletos de interações inter e intraespécies. Essas interações estimulam a produção de diversos metabólitos especializados, e podem ter efeitos positivos ou negativos. Os efeitos positivos, também chamados de mutualísticos ou neutralista auxiliam, por exemplo, na comunicação com outros microrganismos. Já os efeitos negativos, também chamados de antagonicos, podem promover a produção de antibióticos e ácidos orgânicos, por exemplo, como mecanismo de defesa (Martínez-Buitrago; Ramos; Castellanos, 2019). E ambos os casos são interessantes para a descoberta de novos metabólitos ou análogos mais potentes destinados a aplicações industriais (Netzker et al., 2015).

Os fungos filamentosos são conhecidos por produzirem diversos compostos quando interagem com microrganismos de outro reino (*Aspergillus fumigatus* e *Streptomyces peucetius*), de outro gênero (*Penicillium pinophilum* e *Trichoderma harzianum*) ou espécie (*Fusarium tricinctum* e *Fusarium begoniae*) (Qian et al., 2020). Essas interações são realizadas a partir de experimentos de cocultivo ou pareamento (cultivo em ágar-enriquecido), que consiste no cultivo de um ou mais microrganismo em um mesmo ambiente (Martínez-Buitrago; Ramos; Castellanos, 2019). Esse ambiente competitivo geralmente desafia os microrganismos estimulando a produção de novos metabólitos (Netzker et al., 2015).

Dentre as atividades biológicas dos metabólitos produzidos através destas interações fúngicas podem ser citados os antibióticos (Bertrand et al., 2014; Qian et al., 2020), as enzimas (Sperandio; Ferreira Filho, 2019) e os hormônios (Bertrand et al., 2014), mostrando que diferentes tipos de compostos químicos podem ser gerados por meio da interação microbiana. Já a visualização morfológica da interação de dois fungos, se classifica em apenas quatro tipos, sendo eles: inibição por contato, inibição por distância, zona de confronto e sobreposição (Bertrand et al., 2013). Apesar da facilidade na classificação destes tipos de interações através das alterações morfológicas visíveis (cores, formas de massa micelial, entre outros), é necessário o uso de ferramentas analíticas mais robustas para visualização química dos compostos produzidos, a fim de complementar as informações.

Nesse sentido, a imagem química por espectrometria de massas (IMS) pode ser uma ferramenta útil. Isso porque a IMS relaciona os íons detectados na amostra (razão massa-carga, m/z) ponto-a-ponto, expressando o resultado através de uma imagem química, tendo em vista que possui a distribuição dos íons/metabólitos presentes na amostra (Dunham et al., 2017). Essa técnica é amplamente utilizada na área médica para análise de tecidos e células tumorais (Caprioli et al, 1997), e recentemente vêm sendo expandida para aplicações na área biotecnológica, analisando bactérias e fungos (Yang et al., 2012; Bhandari et al., 2014; Araújo et al., 2017; Liu et al., 2020).

Desta forma, o objetivo deste estudo foi avaliar as interações entre os fungos *Aspergillus terreus* (ATCC® 20542TM) e *Pleurotus pulmonarius* (BRM 055674) através da imagem química por espectrometria de massas (IMS), comparando os metabólitos produzidos individualmente por cada fungo (monocultivo) e em cocultivo, e também complementando as informações morfológicas visíveis.

Material e Métodos

Os fungos utilizados no trabalho foram *Aspergillus terreus* (ATCC® 20542TM) e *Pleurotus pulmonarius* (BRM 055674 – pertencente à Coleção de Microrganismos e Microalgas Aplicados à Agroenergia e Biorrefinarias, CMMABio). O cocultivo foi realizado em placas de petri contendo lâminas de MALDI-IMS (*indium tin oxide coating glass slides*, Bruker Daltonics) e meio de cultura BDA (batata-ágar-dextrose). Os fungos foram então mantidos por 08 dias a 30 °C em incubadora B.O.D., e em seguida as amostras foram preparadas para análise por MALDI-IMS.

O preparo da amostra consistiu na remoção das lâminas de MALDI-IMS das placas de petri, contendo meio BDA e os fungos cultivados, sendo posteriormente submetida a um dessecador a vácuo, até completa desidratação, e a aplicação da matriz HCCA (ácido α -ciano-4-hidróxicinâmico) por sublimação. As lâminas contendo as amostras foram então inseridas na placa *MTP Slide Adapter II* (Bruker Daltonics) e as imagens químicas foram adquiridas por MALDI-MSI (*UltrafleXtreme*, Bruker Daltonics).

Os dados de massas foram obtidos automaticamente no *software flexControl* versão 4.0 (Bruker Daltonics), na faixa de massa entre m/z 500-1500, com *laser* no modo ultra (abertura de 120 μ m) e otimizados para intensidade de 90%, ganho de detector 10x (2550V), 1000 *shots*, 2000 Hz, largura lateral (*rather width*) de 120 μ m e com caminhada parcialmente aleatória (*random walk partial*) pelas amostras no momento da aquisição. Os dados de imagem foram obtidos e processados no *software flexImaging*, versão 4.0 (Bruker Daltonics, Alemanha), atribuindo escala de cores por gradiente, filtro de massa de 1 Da e normalização RMS (do inglês, *Root Mean Square*).

A extração dos metabólitos foi realizada com metanol e a análise química foi feita por UHPLC-ESI-MS/MS para identificação em alta resolução (Prominence LC30AD, Shimadzu e Maxis 4G, Bruker Daltonics). Os padrões de fragmentação obtidos foram comparados com o banco de dados *MetFrag* (Rutkies et al., 2016). A metodologia empregada e descrita acima pode ser visualizada resumidamente na Figura 1.



Figura 1. Esquema do procedimento experimental seguido para análise MALDI-IMS dos fungos *P. pulmonarius* (BRM 055674) e *A. terreus* (ATCC® 20542™).

Resultados e Discussão

Inicialmente, três regiões de uma mesma lâmina foram analisadas, sendo que uma das regiões correspondia à zona de cocultivo e as outras duas, a partes dos fungos *P. pulmonarius* e *A. terreus* individualmente, ou seja, considerando que uma zona em que não houve interação. Além disso, na mesma lâmina analisou-se uma região na ausência dos fungos, tendo apenas o meio BDA, sendo esta quarta região considerada como branco da análise. Isso garantiu que todas as regiões foram submetidas ao mesmo preparo de amostra (desidratação e aplicação de matriz) e aquisição de imagens químicas por MALDI-IMS.

Nove íons foram detectados por MALDI-IMS na zona do cocultivo, sendo eles: m/z 210, 277, 307, 321, 329, 346, 351, 462 e 484 (Figura 2). Nota-se ainda que no branco da amostra não houve imagem química relacionada a estes nove íons, o que confirma que esses íons foram produzidos pelos fungos apenas após o cocultivo.

Os íons m/z 329, 351 e 484 foram mais abundantes e tiveram uma imagem química nítida, em relação aos demais íons detectados. Eles provavelmente estão relacionados a metabólitos envolvidos na Interação entre os microrganismos estudados. Isso porque, durante o crescimento micelial foi visualizada uma interação de efeito positivo (Martínez-Buitrago; Ramos; Castellanos, 2019) e do tipo por contato, no qual os fungos ficam próximos, sem competição aparente de nutrientes do meio (Bertrand et al., 2013).

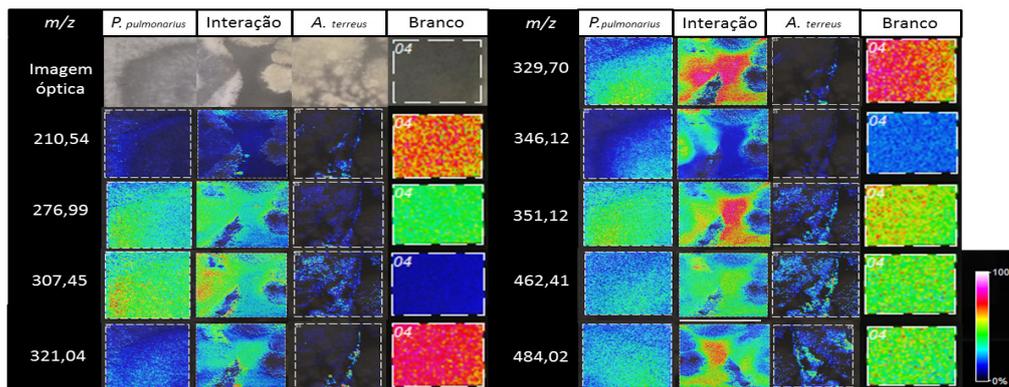


Figura 2. MALDI(-)-IMS de metabólitos produzidos pelos fungos *Pleurotus pulmonarius* (BRM 055674) e *Aspergillus terreus* (ATCC® 20542™) individualmente e na zona de cocultivo (interação), em meio BDA com matriz HCCA aplicada por sublimação (branco).

Todos os íons foram investigados por UHPLC-ESI-MS/MS, e o íon m/z 346 foi identificado. Ele foi detectado na forma desprotonada [M-H] e designado como monofosfato de adenosina ($C_{10}H_{14}N_5O_7P$), que corresponde a um metabólito primário relacionado ao desenvolvimento do microrganismo. Outros métodos de extração de metabólitos e de análise por UHPLC-MS/MS podem ser explorados, em futuros experimentos, na tentativa de identificar uma maior quantidade de compostos.

É importante destacar também que os metabólitos de origem microbiana são produzidos em condições específicas de cultivo e, raramente são relatados em bancos de dados de MS/MS, o que explica a dificuldade na identificação desses compostos ao buscar nos tradicionais bancos de dados. Algumas pesquisas evidenciam esforços

para criar plataformas que reúnam informações de diversos bancos de dados de metabólitos microbianos no *The Natural Products Atlas* (www.npatlas.org) de forma a acelerar e facilitar o processo de identificação molecular e elucidação estrutural (Van Santen et al., 2019). Porém, é amplamente requerida a participação da comunidade científica para alimentação destes dados na plataforma, ou ainda a criação de banco de dados próprios para impulsionar a identificação dos compostos microbianos e posterior aplicação destes.

Considerações Finais

As informações dos íons detectados por MALDI-IMS na zona de interação dos fungos estudados corroboram com as informações visualizadas na interação durante o crescimento. Foi visualizada uma interação de efeito positivo e do tipo por contato, e os íons (m/z 210, 277, 307, 321, 329, 346, 351, 462 e 484) foram detectados apenas quando os fungos estão em cocultivo (ou seja, ausentes em monocultivos).

Apesar dos desafios encontrados na identificação dos metabólitos, o uso de MALDI-IMS para visualização química dos metabólitos provenientes da interação de fungos é uma abordagem promissora para aplicações biotecnológicas. Destaca-se ainda que o trabalho é inovador devido a poucos estudos no campo da imagem química por espectrometria de massas de fungos.

Referências

- ARAÚJO, F. D. D. S.; ARAÚJO, W. L.; EBERLIN, M. N. Potential of *Burkholderia seminalis* TC3. 4.2 R3 as biocontrol agent against *Fusarium oxysporum* evaluated by mass spectrometry imaging. **Journal of The American Society for Mass Spectrometry**, 28, n. 5, p. 901-907, 2017.
- BERTRAND, S.; BOHNI, N.; SCHNEE, S.; SCHUMPP, O. et al. Metabolite induction via microorganism co-culture: a potential way to enhance chemical diversity for drug discovery. **Biotechnology advances**, 32, n. 6, p. 1180-1204, 2014.
- BERTRAND, S.; SCHUMPP, O.; BOHNI, N.; BUJARD, A. et al. Detection of metabolite induction in fungal co-cultures on solid media by high-throughput differential ultra-high pressure liquid chromatography–time-of-flight mass spectrometry fingerprinting. **Journal of chromatography A**, 1292, p. 219-228, 2013.
- BHANDARI, D. R.; SHEN, T.; RÖMPP, A.; ZORN, H. et al. Analysis of cyathane-type diterpenoids from *Cyathus striatus* and *Hericium erinaceus* by high-resolution MALDI MS imaging. **Analytical and bioanalytical chemistry**, 406, n. 3, p. 695-704, 2014.
- CAPRIOLI, R. M.; FARMER, T. B.; GILE, J. Molecular imaging of biological samples: localization of peptides and proteins using MALDI-TOF MS. **Analytical chemistry**, 69, n. 23, p. 4751-4760, 1997.
- DUNHAM, S. J.; ELLIS, J. F.; LI, B.; SWEEDLER, J. V. Mass spectrometry imaging of complex microbial communities. **Accounts of chemical research**, 50, n. 1, p. 96-104, 2017.
- LIU, R.; KHAN, R. A. A.; YUE, Q.; JIAO, Y. et al. Discovery of a new antifungal lipopeptaibol from *Purpureocillium lilacinum* using MALDI-TOF-IMS. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, 2020.
- MARTÍNEZ-BUITRAGO, P. A.; RAMOS, F. A.; CASTELLANOS, L. Binary co-culture selection from marine-derived microorganisms for differential production of specialized metabolites. **Química Nova**, 42, n. 7, p. 713-719, 2019.
- NETZKER, T.; FISCHER, J.; WEBER, J.; MATTERN, D. J. et al. Microbial communication leading to the activation of silent fungal secondary metabolite gene clusters. **Frontiers in microbiology**, 6, p. 299, 2015.

RUTTKIES, C.; SCHYMANSKI, E. L.; WOLF, S.; HOLLENDER, J. et al. MetFrag relaunched: incorporating strategies beyond in silico fragmentation. **Journal of cheminformatics**, 8, n. 1, p. 3, 2016.

SPERANDIO, G. B.; FERREIRA FILHO, E. X. Fungal co-cultures in the lignocellulosic biorefinery context: a review. **International Biodeterioration, Biodegradation**, 142, p. 109-123, 2019.

VAN SANTEN, J. A.; JACOB, G.; SINGH, A. L.; ANIEBOK, V. et al. The natural products atlas: an open access knowledge base for microbial natural products discovery. **ACS central science**, 5, n. 11, p. 1824-1833, 2019.

YANG, J. Y.; PHELAN, V. V.; SIMKOVSKY, R.; WATROUS, J. D. et al. Primer on agar-based microbial imaging mass spectrometry. **Journal of bacteriology**, 194, n. 22, p. 6023-6028, 2012.

Lipases de *Burkholderia gladioli* CNPAE 99 (579): caracterização do efeito de íons, surfactantes e solventes e determinação de parâmetros cinéticos

Pedro Alves Martins¹, Thályta Fraga Pacheco², Brenda Rabello de Camargo³, Janice Lisboa De Marco⁴, Thaís Fabiana Chan Salum⁵

Resumo

Burkholderia gladioli CNPAE 99 (579) é uma linhagem bacteriana recém-isolada que demonstrou potencial para produção e secreção de uma lipase alcalina altamente ativa e estável em solventes orgânicos. O extrato enzimático obtido do cultivo da bactéria por fermentação em estado sólido foi incubado com diferentes compostos de modo que se pudesse observar o efeito de ativadores/inibidores nas lipases produzidas. Alguns cátions bivalentes, como Fe²⁺, Mg²⁺ e Ba²⁺ se comportaram como ativadores da atividade da lipase, exibindo uma atividade relativa de 112,3%, 109,8% e 103,9%, respectivamente. No entanto, EDTA, Fe³⁺, Zn²⁺ e SDS revelaram ser os principais inibidores da atividade lipolítica. As lipases do extrato enzimático permaneceram funcionais em um amplo espectro de solventes analisados, como acetonitrila, éter dietílico e *n*-hexano. O clorofórmio, entretanto, provocou uma perda de 14,2% de atividade lipolítica. Estudaram-se ainda os parâmetros cinéticos V_{max} e K_m, obtendo-se valores de 1,65·10⁻² mol·L⁻¹·min⁻¹ e 7,44·10⁻² mol·L⁻¹, respectivamente. O baixo valor de K_m indica uma alta afinidade da lipase de *B. gladioli* CNPAE 99 (579) por trioleína. Tais características demonstram, portanto, oportunidades para novos estudos e revelam uma lipase com potencial para aplicações tanto em reações de hidrólise quanto de síntese de ésteres.

Palavras-chave: lipase, *Burkholderia gladioli*, fermentação em estado sólido.

Introdução

As lipases (E.C. 3.1.1.3) são carboxil-éster hidrolases que catalisam a hidrólise de triacilgliceróis para produzir ácidos graxos livres e glicerol. A função de hidrólise representa o papel fisiológico dessas enzimas no metabolismo de lipídeos e ocorre em uma interface água/óleo (Kapoor; Gupta, 2012). Além da hidrólise, lipases também são capazes de catalisar reações de transesterificação, interesterificação e esterificação não só de triacilgliceróis, como também de outras variedades de ésteres, quando em ambientes com baixa quantidade de água. Além dessa diversidade catalítica, as lipases

¹ Biólogo, doutorando em Biologia Microbiana, Universidade de Brasília, pedropam.bio@gmail.com

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

³ Bioquímica, doutora em Biologia Molecular, pós-doutoranda na Universidade de Brasília, brendarc@gmail.com

⁴ Bióloga, doutora em Biologia Molecular, professora da Universidade de Brasília, janicedemarco@unb.br

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

apresentam uma especificidade abrangente em relação aos seus substratos, podendo atuar sobre lipídios com diferentes graus de insaturação e comprimentos de cadeia. As lipases são, portanto, consideradas biocatalisadores ideais e com ampla aplicabilidade industrial em seus mais diversos setores.

Burkholderia gladioli é uma bactéria Gram-negativa que pode ser encontrada em vários nichos ecológicos. Foi originalmente classificada como *Pseudomonas marginata*, sendo conhecida por ser um patógeno vegetal que causa manchas foliares, enegrecimento de folhas e podridão de grãos em cultivares de cebola, arroz e gladiolo (Stoyanova et al., 2007). Assim como outras bactérias pertencentes aos gêneros *Burkholderia* e *Pseudomonas*, *B. gladioli* é uma boa produtora de lipases. Entretanto, poucos trabalhos tem sido conduzidos a fim de estudar o potencial destas enzimas, com poucos trabalhos descrevendo a produção de esterases (Ivancic et al., 2007; Chen et al., 2011) e apenas um estudando lipases verdadeiras (Zhu et al., 2019). Recentemente, nosso grupo de pesquisa isolou a linhagem *B. gladioli* CNPAE 99 (579) de frutos de dendê, que se destacou entre outras bactérias isoladas como a melhor produtora de lipase. Deste modo, neste trabalho foram investigados os efeitos da adição de íons, surfactantes e solventes sobre as lipases de *B. gladioli* CNPAE 99 (579). Concomitantemente, determinaram-se os parâmetros cinéticos destas lipases de modo que pudesse ser realizada uma comparação com outras enzimas previamente descritas na literatura.

Material e Métodos

Produção das lipases

O cultivo da bactéria *Burkholderia gladioli* foi realizado por fermentação em estado sólido para a produção de lipases. Adicionaram-se 16 mL de tampão fosfato de sódio 100 mmol·L⁻¹ pH 5,8 a 10 gramas de farelo de trigo (Bünge) para obter uma umidade de 65%. Como indutor foi utilizado óleo de soja refinado 1% (m/m). Após preparo e esterilização do meio de cultivo, este foi inoculado com uma suspensão de bactérias com densidade ótica a 600 nm de 0,904 e mantido a 32,5 °C por 5 dias. Após o cultivo, a extração das lipases foi realizada incubando 5 mL de solução extratora (tampão fosfato de sódio 67 mmol·L⁻¹ pH 6,8; goma arábica 0,1%; e triton X-100 0,66%) por grama de substrato seco e incubando por 1 h sob agitação de 150 rpm a 16,2 °C. Após etapa de extração e centrifugação, o extrato enzimático obtido foi utilizado nas análises de determinação de atividade lipolítica.

Determinação da atividade lipolítica

A atividade lipolítica foi determinada com base na metodologia descrita por Winkler e Stuckmann (1979) com modificações. Para cada ensaio, 1 mL de solução A (3 mg de *p*-nitrofenil palmitato, *p*NPP, em 1 mL de 2-propanol) foi adicionado a 9 mL de solução B (50 mmol·L⁻¹ tampão fosfato pH 7; triton X-100 0,44%; goma arábica 0,11%, m/v), sob agitação. Uma alíquota de 0,9 mL desta mistura foi transferida para uma cubeta e 0,1 mL do extrato enzimático foi misturado. A absorvidade molar do *p*-nitrofenol (*p*NP) a pH 7,0 foi determinada experimentalmente como 4681,1 L·mol⁻¹·cm⁻¹ para as condições

de ensaio. As reações ocorreram a 37 °C e pH 7,0 por 1 min com leituras a cada 10 segundos, medindo o aumento na concentração de *p*NP em 410 nm.

Alternativamente, a atividade lipolítica também foi determinada por titulação (Diaz et al., 2006). O meio reacional foi composto de trioleína 66 mmol·L⁻¹ emulsificada em uma solução de tampão Tris-HCl 2,5 mmol·L⁻¹ pH 9,0 acrescido de NaCl 150 mmol·L⁻¹ e goma arábica (3%, m/v). Para cada reação, 20 mL de emulsão e 1 mL de extrato enzimático foram colocados em um recipiente termostatizado a 50 °C com agitação magnética e a liberação de ácidos graxos livres foi monitorada durante 5 min por titulação com NaOH 20 mmol·L⁻¹ em modo pH-Stat (Metrohm-Titrando Stat 902) definido para um valor de pH constante a 9,0.

Para ambos ensaios, uma unidade de atividade lipolítica (U) foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1 μmol de produto (*p*NP ou ácidos graxos livres) por minuto nas condições de ensaio. A atividade lipolítica foi expressa com base nas gramas originais de sólido seco (gss) a partir do qual o extrato foi preparado. Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

Efeito de íons, solventes e surfactantes

O extrato enzimático teve sua atividade lipolítica avaliada após incubação com diferentes íons. Os íons avaliados foram derivados dos seguintes sais: BaCl₂, CaCl₂, CoCl₂, CuSO₄, FeCl₃, FeSO₄, KF, KI, LiCl, MgCl₂, MnSO₄, NaCl, NH₄Cl, NiSO₄ e ZnSO₄. A influência do EDTA na atividade lipolítica também foi avaliada. O extrato enzimático foi incubado por 5 min com cada composto na concentração final de 10 mmol·L⁻¹. Da mesma forma, o extrato enzimático teve sua atividade lipolítica avaliada frente a incubação com diferentes surfactantes (SDS, Tween 80, Tween 20, Triton X-100 e PEG-6000) e solventes (acetona, acetonitrila, clorofórmio, éter dietílico, *n*-heptano, *n*-hexano, metanol, etanol e 2-propanol). O extrato enzimático foi incubado durante 5 min com cada surfactante a uma concentração final de 1% (m/v). Para os solventes, o extrato enzimático foi incubado durante 5 min a uma concentração final de 10% (v/v).

As atividades lipolíticas foram medidas com base na hidrólise do *p*NPP e sempre foram comparadas à condição controle incubada com água destilada. O teste *t* de Student ($\alpha = 5\%$) foi usado para comparação entre as atividades na presença e ausência de cada composto.

Parâmetros cinéticos

A influência da concentração de substrato nas velocidades de reação foi determinada com trioleína como substrato utilizando o método titulométrico de determinação da atividade lipolítica. O extrato enzimático foi incubado com trioleína emulsificada com concentração variando de 5 a 100 mmol·L⁻¹. Os parâmetros cinéticos *V*_{max} (velocidade máxima) e constante de Michaelis (*K*_m) foram estimados a partir da equação de Michaelis-Menten sem linearização. Um procedimento iterativo de estimativa de mínimos quadrados, baseado no algoritmo de Gauss-Newton, foi utilizado para obter os parâmetros que melhor ajustassem o modelo cinético aos dados experimentais. O critério de convergência adotado foi de 10⁻⁶ com número máximo de iterações de 100.

Resultados e Discussão

Efeito de íons, solventes e surfactantes

O efeito dos aditivos no meio de reação foi avaliado a fim de encontrar possíveis ativadores ou inibidores da lipase (Tabela 1). Ao comparar as atividades lipolíticas, é possível observar que, embora próximos da atividade relativa do controle, muitos íons tiveram efeito estatisticamente significativo. Entre os inibidores, EDTA, ZnSO_4 e FeCl_3 promoveram uma perda de atividade de 91,9%, 48,5% e 37,0%, respectivamente. Por outro lado, FeSO_4 , MgCl_2 e BaCl_2 se comportaram como ativadores, exibindo uma atividade relativa de 112,3%, 109,8% e 103,9%, respectivamente. Embora o mesmo efeito não tenha sido observado para todos os cátions bivalentes avaliados, é interessante notar que todos os ativadores encontrados pertencem a esta categoria. Entre os íons de ferro, destaca-se também a diferença promovida entre o íon ferroso (cátion bivalente) e o íon férrico (cátion trivalente), onde o primeiro atua como ativador e o segundo como inibidor. Como encontrado para a lipase *B. gladioli* CNPAE 99 (579), outros autores também encontraram um efeito inibitório nas lipases na presença de Zn^{2+} (Sun et al., 2009; Esakkiraj et al., 2017; Ai et al., 2018). Da mesma forma, o efeito inibitório do Fe^{3+} também foi relatado (Sun et al., 2009; Esakkiraj et al., 2017; Malekabi et al., 2018). Porém, para outras lipases, os mesmos íons se comportaram como ativadores, como no caso da lipase BTS-3 de *Bacillus coagulans*, que foi ativada na presença de Fe^{3+} (Kumar et al., 2012). Em relação aos ativadores, o Mg^{2+} pode ser destacado por também ser relatado como ativador para outras lipases (Sun et al., 2009; Kumar et al., 2012; Ai et al., 2018). Boran et al. (2019) também relataram um aumento significativo na atividade da lipase de *Streptomyces violascens* na presença de Fe^{2+} . O efeito dos íons metálicos na atividade da lipase pode resultar não só de uma mudança na solubilidade e no comportamento dos ácidos graxos ionizados na interface onde a enzima realiza a catálise da reação, mas também de mudanças nas propriedades intrínsecas da própria enzima, como seu dobramento.

Em relação aos demais aditivos, o extrato enzimático manteve sua atividade lipolítica funcional quando incubado com um amplo espectro de solventes orgânicos e tensoativos estudados (Tabela 1). A resistência a solventes orgânicos é uma característica importante das lipases industriais, uma vez que tais solventes orgânicos podem contribuir para a solubilidade de substratos e produtos hidrofóbicos ou mesmo na acessibilidade do sítio de ligação de lipídios da enzima (Oskolkova; Hermetter, 2002). A atividade lipolítica foi mantida mesmo em incubação com solventes polares, como etanol e metanol. Em um estudo com *Pseudomonas* sp. S1, uma perda de 8,4% na atividade lipolítica foi relatada na presença de 15% de metanol (Sahoo et al., 2014). Desse modo, a tolerância ao álcool de cadeia curta representa uma vantagem da lipase de *B. gladioli* CNPAE 99 (579). Em relação ao efeito inibitório da adição de solventes, o clorofórmio e o 2-propanol tiveram o efeito mais deletério sobre a atividade da lipase, resultando em uma perda de 14,2% e 9,7% da atividade, respectivamente.

Tabela 1. Efeito de íons, solventes e surfactantes sobre a atividade lipolítica do extrato enzimático obtido do cultivo de *Burkholderia gladioli* CNPAE 99 (579). Método: hidrólise do pNPP.

| Aditivos | | Atividade Relativa (%) | Aditivos | | Atividade Relativa (%) |
|---|--------------------|------------------------|------------------------------|-------------------|------------------------|
| Controle | | 100.0 ± 2.9 | | | |
| Compostos (10 mmol·L⁻¹) | | | Solventes (10% v/v) | | |
| * | BaCl ₂ | 103.9 ± 2.0 | * | Acetona | 95.3 ± 1.7 |
| | CaCl ₂ | 100.7 ± 1.8 | | Acetonitrila | 98.1 ± 2.6 |
| * | CoCl ₂ | 96.4 ± 2.3 | * | Clorofórmio | 85.8 ± 3.4 |
| | CuSO ₄ | 94.2 ± 10.1 | | Dietil Éter | 99.6 ± 2.8 |
| * | FeCl ₃ | 63.0 ± 2.4 | * | <i>n</i> -Heptano | 104.8 ± 2.2 |
| * | FeSO ₄ | 112.3 ± 3.5 | | <i>n</i> -Hexano | 101.3 ± 2.5 |
| | KF | 97.9 ± 2.0 | | Metanol | 96.8 ± 2.3 |
| * | KI | 93.2 ± 1.5 | * | Etanol | 97.1 ± 0.4 |
| * | LiCl | 96.9 ± 1.0 | * | 2-Propanol | 90.3 ± 3.1 |
| * | MgCl ₂ | 109.8 ± 1.8 | Surfactantes (1% m/v) | | |
| | MnSO ₄ | 96.2 ± 2.1 | | PEG-6000 | 101.0 ± 4.5 |
| | NaCl | 98.6 ± 2.1 | | Triton X-100 | 96.5 ± 3.8 |
| * | NH ₄ Cl | 96.5 ± 1.1 | * | Tween 20 | 94.6 ± 1.8 |
| * | NiSO ₄ | 81.3 ± 0.9 | * | Tween 80 | 92.4 ± 3.5 |
| * | ZnSO ₄ | 51.5 ± 3.5 | * | SDS | 3.8 ± 0.5 |
| * | EDTA | 8.1 ± 2.0 | | | |

* Diferença estatisticamente significativa (nível de significância 5%)

Entre os surfactantes, a incubação com SDS resultou na condição que mais inibiu a lipase, com perda de 96,2% na atividade. É possível que a adição de SDS promova a ruptura das ligações de hidrogênio que estabilizam a estrutura nativa da enzima, causando perda de funcionalidade. Um comportamento semelhante também foi observado para as lipases de *Rhizopus chinensis* (Sun et al., 2009), *Penicillium chrysogenum* (Kumar et al., 2012), *Bacillus* sp. (Esakkiraj et al., 2017), e *Pseudomonas* spp. (Ali et al., 2019).

Parâmetros cinéticos

A velocidade máxima de reação (V_{max}) e a constante de Michaelis (K_m) foram estimadas a partir da equação de Michaelis-Menten para a trioleína como substrato variando de 5 a 100 mmol·L⁻¹ (Figura 1). Embora não seja uma solução de lipase pura, o comportamento michaeliano foi observado para o extrato enzimático com parâmetros cinéticos comparáveis a lipases purificadas. Determinou-se que o V_{max} aparente era $1,65 \cdot 10^{-2}$ mol·L⁻¹·min⁻¹ e o valor de K_m aparente obtido foi $7,44 \cdot 10^{-2}$ mol·L⁻¹, com um $R^2 = 0,992$.

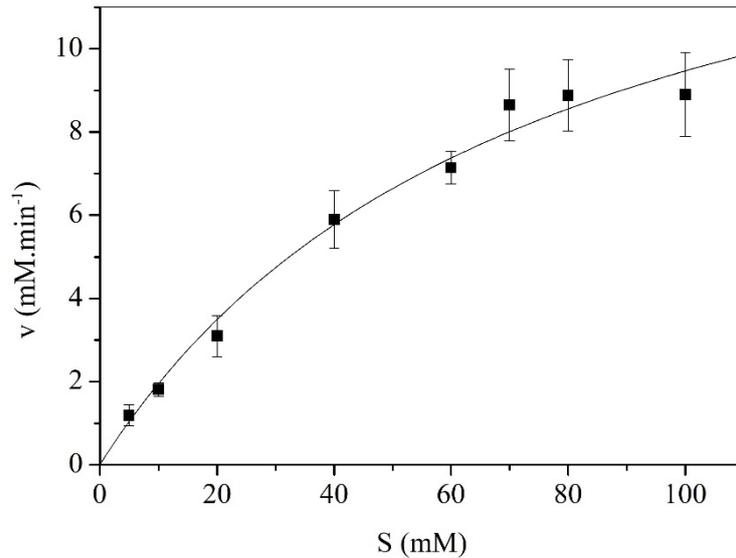


Figura 1. Velocidade de reação (v) em função da concentração de substrato (S). A linha indica a função ajustada de Michaelis-Menten. Método: titulométrico (trioleína).

O K_m aparente observado de *B. gladioli* CNPAE 99 (579) lipase é menor do que o relatado para outras lipases, indicando que esta possui uma alta afinidade para trioleína. Tran e Chang (2014), usando uma lipase de *Burkholderia* sp. (imobilizada em Celite) e azeite de oliva como substrato atingiram valores estimados de V_{max} e K_m de $0,61 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$ e $7,93 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$, respectivamente. Borkar et al. (2009) avaliaram uma lipase extracelular de *Pseudomonas aeruginosa* e encontraram um valor de K_m de $1,11\cdot 10^{-3} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ com trioleína e $3,7\cdot 10^{-5} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ com *p*NPP como substrato. Os valores de V_{max} foram calculados em 55 para trioleína e $0,189 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$ para *p*NPP. Uma lipase alcalina de *B. gladioli* avaliada em éster de ácido graxo *p*-nitrofenol C18 atingiu o valor K_m de $1,65\cdot 10^{-3} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ (Zhu et al., 2019). Demera et al. (2019), trabalhando com um extrato lipolítico de *Guehomyces pullulans* e *p*NPP como substrato, encontraram um V_{max} e um K_m de $6,7\cdot 10^{-3} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$ e $3,68 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ respectivamente e considerou a cinética obtida parâmetros na faixa de lipases industriais ($10^{-1} - 10^{-5}$). É importante notar, no entanto, que as lipases geralmente apresentam maior afinidade para ésteres de *p*-nitrofenila do que triacilgliceróis e que não há substrato universal ou ensaio para quantificar a atividade da lipase, dificultando a comparação dos parâmetros cinéticos e afinidade do substrato.

Conclusões

Quando cultivada por fermentação em estado sólido, a linhagem de *Burkholderia gladioli* CNPAE 99 (579) produz um extrato enzimático com alta atividade lipolítica. Esta atividade pode ser modulada na presença de ativadores como Fe^{2+} , Mg^{2+} e Ba^{2+} ou de inibidores como EDTA, Fe^{3+} , Zn^{2+} e SDS. A atividade lipolítica obtida frente a incubação com solventes como éter dietílico, *n*-heptano e *n*-hexano também ressaltam o potencial destas lipases para processos de catálise em ambientes não convencionais. Assim, novos

estudos devem ser conduzidos a fim de determinar a aplicabilidade tanto em reações de hidrólise quanto de síntese de ésteres.

Agradecimentos

Os recursos para esta pesquisa foram concedidos pelo Ministério da Ciência, Tecnologia, Inovação e Comunicação (MCTIC) por meio da Agência Brasileira de Inovação (FINEP) via Projeto DendePalm (13.01.0315.02). Agradecemos também a bolsa de doutorado concedida pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

Referências

- AI, L.; HUANG, Y.; WANG, C. Purification and characterization of halophilic lipase of *Chromohalobacter* sp. from ancient salt well. **Journal of Basic Microbiology**. v. 58, p. 647-657. 2018.
- ALI, Y.; AHMAD, B.; ALGHAMDI, K.M.; KAMAL, T.; ALI, H.S.H.M.; ANWAR, Y.; HUSSAIN, A.; YOGEZAL, N.U. Characterization of recombinant cold active lipase from a novel *Pseudomonas* spp. MG687270. **International Journal of Agriculture and Biology**. v. 22, p. 855-865. 2019.
- BORAN, R.; UGUR, A.; SARAC, N.; CEYLAN, O. Characterization of *Streptomyces violascens* OC125-8 lipase for oily wastewater treatment. **3 Biotechnololy**. v. 9, p. 5. 2019.
- BORKAR, P.S.; BODADE, R.G.; RAO, S.R.; KHOBRAGADE, C.N. Purification and characterization of extracelular lipase from a new strain – *Pseudomonas aeruginosa* SRT 9. **Brazilian Journal of Microbiology**. v. 140, p. 358-366. 2009.
- CHEN, L.; KONG, X.; LIANG, Z.; YE, F.; YU, K.; DAI, W.; WU, D.; LUO, C.; JIANG, H. Theoretical study of the mechanism of proton transfer in the esterase EstB from *Burkholderia gladioli*. **Journal of Physical Chemistry B**. v. 115, p. 131019-131025. 2011.
- DEMERA, L.L.; BARAHONA, P.P.; BARRIGA, E.J.C. Production, extraction and characterization of lipases from the Antarctic Yeast *Guehomyces pullulans*. **American Journal of Biochemistry and Biotechnology**. v. 15, p. 75-82. 2019.
- DIAZ, J.C.M.; RODRIGUEZ, J.A.; ROUSSOS, S.; CORDOVA, J.; ABOUSALHAM, A.; CARRIERE, F.; BARATTI, J. Lipase from the thermotolerant fungus *Rhizopus homothallicus* is more thermostable when produced using solid-state fermentation than liquid fermentation procedures. **Enzyme and Microbial Technology**. v. 39, p. 1042-1050. 2006.
- ESAKKIRAJ, P.; ANTONYRAJ, C.B.; MELEPPAT, B.; ANKAIAH, D.; AYYANNA, R.; AHAMED, S.I.B.; ARUL, V. Molecular characterization and application of lipase from *Bacillus* sp. PU1 and investigation of structural changes based on pH and temperature using MD simulation. **International Journal of Biological Macromolecules**. v. 103, p. 47-56. 2017.
- IVANCIC, M.; VALINGER, G.; GRUBER, K.; SCHWAB, H. Inverting enantioselectivity of *Burkholderia gladioli* esterase EstB by directed and designed evolution. **Journal of Biotechnology**. v. 129, p. 109-122. 2007.
- KAPOOR, M.; GUPTA, M.N. Lipase promiscuity and its biochemical applications. **Process Biochemistry**. v. 47, p. 555-569. 2012.
- KUMAR, S.; MATHUR, A.; SINGH, V.; NANDY, S.; KHARE, S.K.; NEGI, S. Bioremediation of waste cooking oil using a novel lipase produced by *Penicillium chrysogenum* SNP5 grown in solid medium containing waste grease. **Bioresource Technology**. v. 120, p. 300-304. 2012.
- MALEKABADI, S.; BADOEI-DALFARD, A.; KARAMI, Z. Biochemical characterization of a novel cold-active, halophilic and organic-tolerant lipase from *B. licheniformis* KM12 with potential application for biodiesel production. **International Journal of Biological Macromolecules**. v. 109, p. 389-398. 2018.
- OSKOLKOVA, O.V.; HERMETTER, A. Fluorescent inhibitors reveal solvent-dependent micropolarity in the lipid binding sites of lipases. **Biochimica et Biophysica Acta**. v. 1597, p. 60-66. 2002.
- SAHOO, R.K.; SUBUDHI, E.; KUMAR, M. Quantitative approach to track lipase producing *Pseudomonas* sp. S1 in nonsterilized solid-state fermentation. **Letters in Applied Microbiology**. v. 58, p. 610-616. 2014.
- STOYANOVA, M.; PAVLINA, I.; MONCHEVA, P.; BOGATZEVSKA, N. Biodiversity and incidence of *Burkholderia* species. **Biotechnology, Biotechnological Equipment**. v. 21, p. 306-310. 2017.

SUN, S.Y.; XU, Y.; WANG, D. Novel minor lipase from *Rhizopus chinensis* during solid-state fermentation: biochemical characterization and its esterification potential for ester synthesis. **Bioresource Technology**. v. 100, p. 2607-2612. 2009.

TRAN, D.T.; CHANG, J.S. Kinetics of enzymatic transesterification and thermal deactivation using immobilized *Burkholderia* lipase as catalyst. **Bioprocess and Biosystems Engineering**. v. 37, p. 481-491. 2014.

WINKLER, U.K.; STUCKMANN, M. Glycogen, hyaluronate, and some other polysaccharides greatly enhance the formation of exolipase by *Serratia marcescens*. **Journal of Bacteriology**. v. 138, p. 663-670. 1979.

ZHU, J.; LIU, Y.; QIN, Y.; PAN, L.; LI, Y.; LIANG, G.; WANG, Q. Isolation and characterization of a novel bacterium *Burkholderia gladioli* Bsp-1 producing alkaline lipase. **Journal of Microbiology Biotechnology**. v. 29, p. 1043-1052. 2019.

Simulação do processo de produção de etanol de arroz BRS AG usando Aspen Plus

Isabela Castro de Almeida¹, Sílvia Belém Gonçalves², Fabricio Machado³

Resumo

A simulação computacional é uma ferramenta bastante utilizada na resolução de equações que descrevem sistemas na Engenharia Química, bem como na otimização e acompanhamento de processos. O software Aspen Plus[®] é um simulador da AspenTech, líder de simulação de processos da indústria química, presente há mais de 35 anos no mercado. Pode ser empregado com o intuito de se obter melhora nos rendimentos e na produtividade, bem como redução de custos operacionais. Esse software é abrangente para a indústria química, podendo ser usado para modelagem em processos em batelada e contínuos, desde a inovação até as etapas de operação. Outra finalidade para esse simulador é a análise de segurança e de design de equipamentos. O presente trabalho tem como objetivo utilizar o simulador Aspen Plus[®] para modelagem e simulação do processo de produção de etanol, utilizando como matéria-prima a cultivar de arroz BRS AG. Com a simulação avaliou-se o fluxo mássico e as frações mássicas das correntes de entrada e saída de cada etapa. Para isso, os parâmetros adotados para a simulação foram as quantidades e os rendimentos obtidos em um estudo preliminar de fermentação dessa cultivar de arroz feito em escala de bancada. Com a modelagem e simulação proposta, é possível avaliar e propor uma otimização do processo, visando a produção em larga escala.

Palavras-chave: arroz BRS AG, etanol, simulação computacional, Aspen Plus.

Introdução

No século 20, o petróleo, o carvão e o gás natural tornaram-se a principal fonte de energia em todo o mundo e a principal base da indústria química. No entanto, são recursos não renováveis, com forte impacto ambiental (Cinelli et al., 2015). A busca por fontes renováveis de energia aumenta a cada ano. Dessa forma, o etanol é um combustível promissor e tem sido utilizado como fonte de energia por diversos países (Scholz; Riley; Cuello, 2013).

Atualmente, os Estados Unidos e o Brasil, são os maiores produtores de etanol combustível. Os Estados Unidos utilizam o amido do milho como fonte de carboidratos no processo fermentativo. Já o Brasil, utiliza a sacarose presente na cana-de-açúcar para obtenção de etanol. Juntos, esses dois países são responsáveis por produzir 84% do etanol mundial. Só em 2019, os Estados Unidos produziram mais de 15,7 bilhões

¹ Doutoranda em Química, Universidade de Brasília, isabela.almeida@colaborador.embrapa.br

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

³ Engenheiro químico, doutor em Engenharia química, Universidade de Brasília, fmachado@unb.br

de litros de etanol enquanto o Brasil produziu mais de 8,5 bilhões de litros de etanol (Renewable Fuels Association, 2020).

A produção industrial do etanol consiste em um processo de fermentação, com conversão dos açúcares em álcool, por meio de microrganismos. A levedura *Saccharomyces cerevisiae* é mais comumente usada para fermentação de açúcares e produção de etanol. Biomassas vegetais amilácea, como milho, cevada, trigo, mandioca e arroz mostram-se promissoras para a produção de etanol devido a sua viabilidade econômica e disponibilidade (Rani et al., 2010). A Embrapa vem desenvolvendo novas alternativas para a produção de etanol. A Embrapa Clima Temperado desenvolveu uma cultivar de arroz (BRS AG) com finalidade exclusiva para a produção de etanol (Magalhães Júnior et al., 2015). Essa cultivar é produzida em áreas superalagadas, onde outras cultivares não conseguem crescer. Além disso, o arroz BRS AG apresenta grãos muito grandes, não são do tipo longos e finos, e possuem uma baixa relação de amilose-amilopectina, que resulta em uma qualidade inferior no cozimento, não se enquadrando nos padrões da indústria e do consumo brasileiro. Dessa forma, trata-se da primeira cultivar de arroz destinada à produção de etanol ou a alimentação animal, e não ao consumo humano (Magalhães Júnior et al., 2017).

A indústria química utiliza a modelagem e a simulação como ferramentas que oferecem a possibilidade de prever condições operacionais ou simular equipamentos, sem interferir no sistema operante. Além da economia de insumos, simular um processo de produção antes de operá-lo em larga escala também economiza tempo (Silva, 2012). O software Aspen Plus® é um simulador da AspenTech utilizado na indústria química para o desenvolvimento, otimização e acompanhamento de processos, nos quais os componentes, reagentes e produtos, podem estar nos estados sólidos, líquido e gasoso. Além disso, com este simulador é possível avaliar o comportamento de processos químicos (batelada ou contínuo, em estado estacionário ou dinâmico) através dos balanços de massa, energia e quantidade de movimento, termodinâmica, equilíbrios químicos e cinética das reações. O software pode ser utilizado com o objetivo de se obter uma melhora nos rendimentos e na qualidade dos produtos, bem como melhor produtividade e redução de custos operacionais. Além disso, o programa é utilizado na otimização de processos em plantas de larga escala (Aspentech, 2020).

As quantidades empregadas e os rendimentos obtidos da fermentação realizada em batelada com o hidrolisado de arroz BRS AG em escala laboratorial foram utilizadas como parâmetro para modelagem e simulação do processo contínuo, por meio do software Aspen Plus®. O objetivo é avaliar as etapas envolvidas no processo de produção de etanol, bem como avaliar possível utilização do modelo proposto para uma produção de etanol em grande escala.

Material e Métodos

Simulação do processo de fermentação de arroz com Aspen Plus®

Utilizou-se o software Aspen Plus®, simulador da AspenTech para modelagem e simulação do processo contínuo de fermentação da cultivar de arroz BRS AG. Os valores colocados na simulação foram os obtidos da fermentação do hidrolisado de arroz BRS

AG realizada em batelada e em escala laboratorial, em um estudo anterior (Almeida, 2017). Os componentes presentes no modelo proposto estão apresentados na Tabela 1.

Tabela 1. Componentes químicos presentes no processo do modelo proposto com a utilização do Aspen Plus®.

| Nome | Fórmula |
|--------------------|---|
| Água | H ₂ O |
| Amido | (C ₆ H ₁₀ O ₅) _n |
| Dióxido de Carbono | CO ₂ |
| Etanol | C ₂ H ₅ OH |
| Glicerol | C ₃ H ₈ O ₃ |
| Glicose | C ₆ H ₁₂ O ₆ |

Para a simulação do processo contínuo de produção de etanol a partir do arroz BRS AG, utilizou-se a abordagem proposta no fluxograma típico de um processo de produção de etanol em escala industrial. Utilizando como base um processo contínuo de produção de etanol, nos balanços globais descritos considerou-se: j correntes de entrada e saída, bem como os i componentes de entrada e saída para determinar o balanço de massa global (Figura 1).

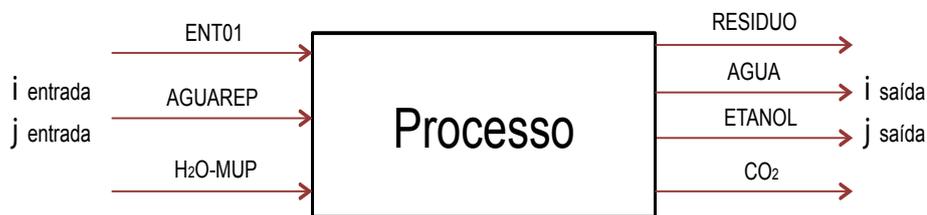


Figura 1. Esquema simplificado do processo contínuo de produção de etanol utilizando arroz BRS AG como matéria-prima.

Levando-se em consideração os componentes (i) e as correntes (j) envolvidas no processo, o balanço global de massa é expresso por:

$$\sum_{j=1}^{NS} \sum_{i=1}^{NC} F_{i,j} \Big|_{Entrada} - \sum_{j=1}^{NS} \sum_{i=1}^{NC} F_{i,j} \Big|_{Saída} = 0 \quad (1)$$

onde, NS corresponde ao número de correntes, NC é o número de componentes e $F_{i,j}$ representa o fluxo do componente i na corrente j.

Dessa forma, simulou-se a produção de etanol para o arroz BRS AG, adotando-se as quantidades e os rendimentos obtidos para a fermentação realizada em um estudo anterior em laboratório e em batelada como parâmetro. No estudo anterior base

experimental para esta simulação, realizado em laboratório, a concentração inicial de amido era 120 g/L. A fermentação transcorreu por 24h, com temperatura de 32 °C e agitação de 150 rpm, a concentração de etanol obtida foi de 29,4 g/L e de glicerol foi de 7,2 g/L. Esses foram os valores utilizados para a simulação destes componentes nas correntes de saída, tornando-se possível a obtenção dos fluxos de massa e das frações mássicas.

Resultados e Discussão

Simulação do processo de obtenção de etanol a partir do arroz BRS AG

Após a simulação do processo de obtenção de etanol utilizando como matéria-prima o arroz BRS AG de acordo com os parâmetros obtidos em escala de bancada e baseando-se no fluxograma proposto na Figura 2, e utilizando a equação (1) de balanço de massa determinou-se o fluxo de massa nas correntes de entrada e saída, conforme Tabela 2, e as frações mássicas, conforme Tabela 3.

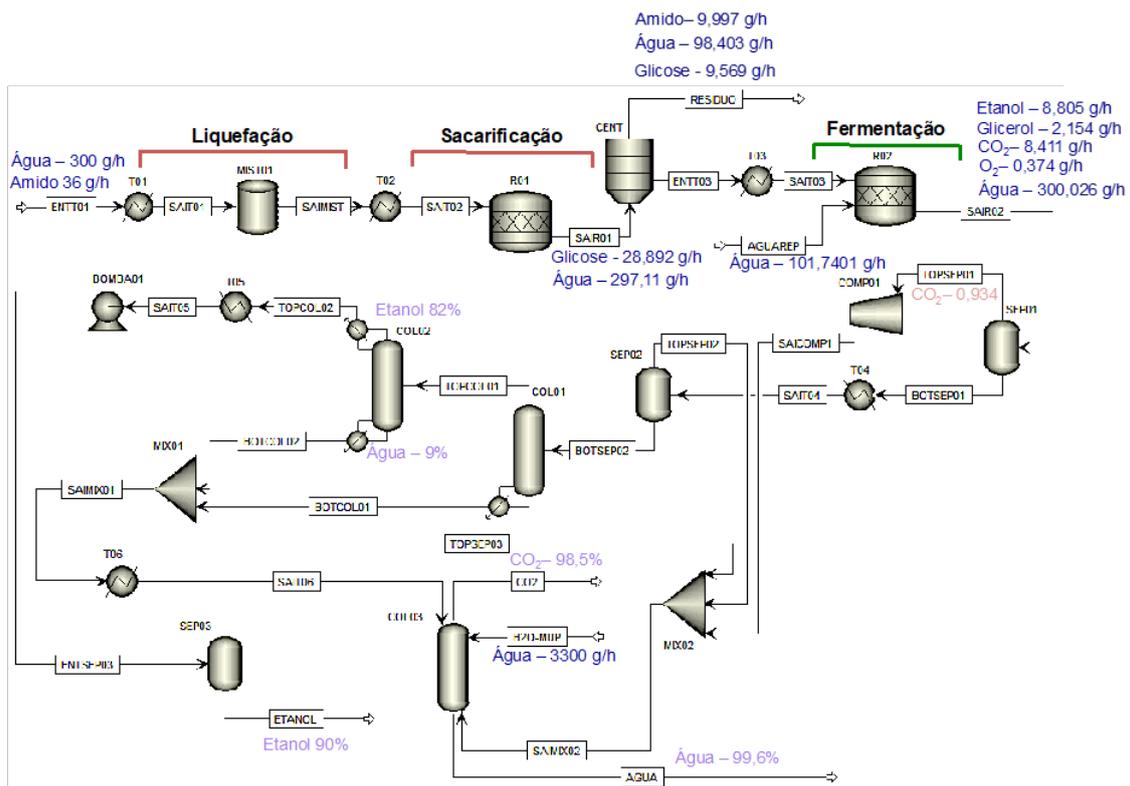


Figura 2. Fluxograma referente ao processo de produção de etanol utilizando arroz BRS AG como matéria-prima, com os respectivos fluxos e frações mássicas das correntes de entrada e saída.

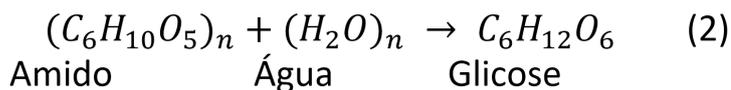
Tabela 2. Fluxo de massa nas correntes de entrada e saída da simulação proposta para o arroz BRS AG.

| Componentes | ENT01 (g/h) | AGUAREP (g/h) | H ₂ O-MUP (g/h) | SAIR01 (g/h) | SAIR02 (g/h) | RESIDUO (g/h) | ÁGUA (g/h) | ETANOL (g/h) | CO ₂ (g/h) |
|------------------|-------------|---------------|----------------------------|--------------|--------------|---------------|------------|--------------|-----------------------|
| ETANOL | 0 | 0 | 0 | 0 | 8,805 | 0 | 5,512 | 3,293 | 2,09E-05 |
| GLICOSE | 0 | 0 | 0 | 28,892 | 0 | 9,569 | 0 | 0 | 0 |
| CO ₂ | 0 | 0 | 0 | 0 | 8,411 | 0 | 8,149 | 0,053 | 0,209 |
| ÁGUA | 300 | 101,74 | 3300 | 297,111 | 300,026 | 98,403 | 3599,72 | 0,309 | 0,0013 |
| GLICEROL | 0 | 0 | 0 | 0 | 2,154 | 0 | 2,154 | 0 | 1,81E-12 |
| AMIDO | 36 | 0 | 0 | 9,997 | 0 | 9,997 | 0 | 0 | 0 |
| O ₂ | 0 | 0 | 0 | 0 | 0,374 | 0 | 0,371 | 0,0014 | 0,0018 |
| Temperatura (°C) | 25 | 32 | 15 | 60 | 32 | 60 | 15,36 | 35 | 15,31 |
| Pressão (atm) | 1 | 1 | 1,5 | 1 | 1 | 1 | 1,2 | 3 | 1,2 |

Tabela 3. Frações mássicas nas correntes de entrada e saída da simulação proposta para o arroz BRS AG.

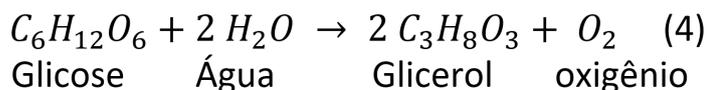
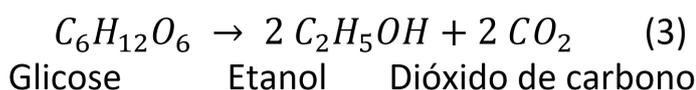
| Componentes | ENT01 | AGUAREP | H ₂ O-MUP | SAIR01 | SAIR02 | RESIDUO | ÁGUA | ETANOL | CO ₂ |
|------------------|-------|---------|----------------------|--------|--------|---------|--------|--------|-----------------|
| ETANOL | 0 | 0 | 0 | 0 | 0,028 | 0 | 0,002 | 0,901 | 9,88E-05 |
| GLICOSE | 0 | 0 | 0 | 0,086 | 0 | 0,081 | 0 | 0 | 0 |
| CO ₂ | 0 | 0 | 0 | 0 | 0,026 | 0 | 0,0023 | 0,015 | 0,985 |
| ÁGUA | 0,893 | 1 | 1 | 0,884 | 0,938 | 0,834 | 0,996 | 0,085 | 0,0059 |
| GLICEROL | 0 | 0 | 0 | 0 | 0,007 | 0 | 0,0006 | 0 | 8,53E-12 |
| AMIDO | 0,107 | 0 | 0 | 0,03 | 0 | 0,085 | 0 | 0 | 0 |
| O ₂ | 0 | 0 | 0 | 0 | 0,001 | 0 | 0,0001 | 0,0004 | 0,0086 |
| Temperatura (°C) | 25 | 32 | 15 | 60 | 32 | 60 | 15,36 | 35 | 15,31 |
| Pressão (atm) | 1 | 1 | 1,5 | 1 | 1 | 1 | 1,2 | 3 | 1,2 |

A primeira etapa do processo consiste na hidrólise do amido à glicose, para posterior fermentação. Para as hidrólises enzimáticas realizadas no reator em escala laboratorial, adotou-se que 80% da composição do arroz corresponde amido, o fluxo mássico do componente Amido na corrente de entrada (ENT01 – Figura 2) corresponde a 36 g/h, e a 300 g/h de água (Tabela 2). A mistura é adicionada ao sistema a uma temperatura ambiente, 25 °C e pressão de 1 atm. Para a liquefação do amido, a mistura é aquecida a 90 °C por meio do primeiro trocador de calor (T01). Ao atingir a temperatura de interesse, a enzima Termamyl 2X (fornecida pela Novozymes) é adicionada ao sistema, e a reação transcorre por 1 hora. Para a etapa de sacarificação, a mistura é resfriada para 60 °C por meio do segundo trocador de calor (T02). Adiciona-se a enzima AMG 300 mL (fornecida pela Novozymes) e a reação transcorre por 3 horas. A reação química envolvida no processo de hidrólise é dada por:



Após a liquefação e sacarificação do amido a glicose, o fluxo mássico na corrente de saída do reator (SAIR01) de glicose de 28,892 g/h, de água é de 297,11 g/h e de amido não hidrolisado é de 9,997 g/h. A corrente é adicionada ao sistema de centrifugação (CENT) para remoção do amido não hidrolisado, eliminado pela corrente de saída RESIDUO. O fluxo mássico de amido nessa corrente é de 9,997 g/h. Além disso, 98,403 g/L de água e 9,569 g/h de glicose também são removidas na corrente RESIDUO, apenas para obtenção dos rendimentos das fermentações realizadas anteriormente em reator.

O hidrolisado antes de ser transferido ao reator de fermentação, passa pelo trocador de calor (T03) para diminuição da temperatura de 60 °C, temperatura oriunda da etapa de sacarificação, para 32 °C. Uma corrente nomeada de AGUAREP com 101,740 g/h de água é adicionada ao fermentador (R02) para reposição da água retirada na etapa de centrifugação e para manter o fluxo de água inicial de 300 g/h. As reações envolvidas no processo de fermentação da glicose a etanol e glicerol são:



Após reação de fermentação, a corrente de saída do reator (SAIR02) apresenta fluxo mássico de etanol de 8,805 g/h, 2,154 g/h de glicerol, 8,411 g/L de dióxido de carbono, 0,374 g/h de oxigênio e 300,026 g/h de água. Os fluxos obtidos de etanol e glicerol correspondem aos valores das concentrações de etanol (29,4 g/L) e glicerol (7,2 g/L) para a fermentação do arroz BRS AG. Após o processo fermentativo, a corrente de saída do fermentador (SAIR02) segue para as etapas de separação em vasos flash (SEP01 e SEP02) para recuperação de correntes ricas em CO₂, colunas destilação (COL01 e COL02) para obtenção de uma corrente rica em etanol de concentração próxima ao ponto de azeótropo em misturas etanol/água, e uma torre de absorção para purificação final da corrente global de CO₂ no processo. A Tabela 4 apresenta as frações mássicas, das principais correntes de entrada e saída da simulação proposta para o arroz BRS AG para compreensão das etapas de separação e purificação.

No primeiro vaso de separação flash, nomeado de SEP01, a maior fração de dióxido de carbono (0,934) sai na corrente de topo (TOPSEP01), por ser o componente mais leve, e segue para o compressor (COMP01), seguindo para o processo de purificação do CO₂. A água e o etanol saem do separador SEP01, cuja corrente de fundo (BOTSEP01) também apresenta pequenas frações de CO₂ e glicerol, e seguem até o segundo separador (SEP02). A fração de CO₂ que ainda continha na corrente BOTSEP01, sai pelo topo do vaso flash (SEP02) para o processo de purificação do CO₂, por meio da coluna de absorção (COL03, contendo três estágios teóricos de separação). As frações de água e etanol seguem para a coluna de destilação COL01 (contendo 10 estágios teóricos de separação). A maior fração de água sai na corrente BOTCOL01, da parte inferior da

coluna (COL01), até a coluna de absorção (COL03) para ser utilizada na purificação do CO_2 . O etanol e uma fração menor de água saem do topo da coluna COL01, por meio da corrente TOPCOL01 até a coluna COL02 (contendo 20 pratos teóricos), onde ocorre a separação do etanol pelo topo da coluna com uma fração de 82%, e a água pela parte inferior da coluna, com uma fração mássica de 9%. O etanol segue pela corrente ENTSEP03 até o terceiro separador (SEP03), e é obtido após o processo com uma fração mássica de 90%.

Tabela 4. Fração mássica em algumas correntes de entrada e saída da simulação proposta para o arroz BRS AG.

| Componentes | SAIR02 | TOPSEP01 | BOTSEP01 | BOTSEP02 | TOPCOL02 | ENTSEP03 | ÁGUA | ETANOL | CO2 |
|------------------|--------|----------|----------|----------|----------|----------|-------|--------|----------|
| ETANOL | 0,028 | 0,006 | 0,028 | 0,028 | 0,824 | 0,824 | 0,002 | 0,901 | 9,88E-05 |
| GLICOSE | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| CO2 | 0,026 | 0,934 | 0,001 | 0,001 | 0,09 | 0,09 | 0,002 | 0,015 | 0,985 |
| ÁGUA | 0,938 | 0,02 | 0,964 | 0,964 | 0,077 | 0,077 | 0,996 | 0,085 | 0,006 |
| GLICEROL | 0,007 | 8,95E-10 | 0,007 | 0,007 | 4,05E-67 | 4,05E-67 | 0,001 | 0 | 8,53E-12 |
| AMIDO | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| O2 | 0,001 | 0,039 | 0 | 0 | 0,008 | 0,008 | 0 | 0 | 0,009 |
| Temperatura (°C) | 32 | 32 | 32 | 75 | 80,43 | 50,54 | 15,36 | 35 | 15,31 |
| Pressão (atm) | 1 | 1 | 1 | 2,3 | 1,2 | 3 | 1,2 | 3 | 1,2 |

As correntes com o componente CO_2 se encontram no misturador MIX02 e seguem para a coluna de absorção COL03 por meio da corrente SAIMIX02. Uma corrente com fluxo mássico de 3300 g/h de água é adicionada a COL03 para purificação do CO_2 . Ao final do processo, o CO_2 apresenta fração mássica de 98,5%. A água sai do processo com uma fração mássica de 99,6%.

Nas simulações realizadas com arroz BRS AG, tanto nas colunas de destilação quanto nas colunas de absorção, foram empregados modelos rigorosos de separação usados para a resolução do sistema de equações MESH, que corresponde aos balanços de massa (M), equilíbrio termodinâmico (E), somatório das frações molares (S) e entalpia (H).

A análise preliminar para o processo de obtenção de etanol, utilizando como matéria-prima o arroz BRS AG, por meio da simulação com o simulador Aspen Plus® demonstrou os processos químicos e os balanços de massa envolvidos. Dessa forma, o modelo pode ser adotado objetivando-se a simulação do processo em escalas maiores, bem como para otimização do processo.

Conclusões

O simulador Aspen Plus® mostrou-se eficaz na modelagem e simulação do processo contínuo de produção de etanol utilizando o arroz BRS AG como matéria-prima. O modelo proposto mostrou-se coerente com todo o processo descrito, uma vez que considerou todas as correntes de entrada, trocadores de calor, sistema de centrifugação, fermentador, sistema de separação em vaso flash, coluna de destilação e correntes de

saída. Dessa forma, o modelo pode ser utilizado para simular um processo de produção de etanol em escala industrial, considerando tanto as etapas de hidrólise e fermentação, como as etapas de destilação e purificação.

Os parâmetros utilizados na simulação foram obtidos de um estudo preliminar, no qual realizou-se a fermentação do hidrolisado de arroz BRS AG em escala de bancada. Dessa forma, o valor adotado na corrente de entrada das componentes água e amido corresponderam as quantidades utilizadas na fermentação. Os valores das correntes de saída corresponderam as concentrações finais obtidas de etanol e glicerol na fermentação realizada em laboratório.

A partir dos resultados da simulação foram obtidos os fluxos mássicos e as frações mássicas das correntes de entrada e saída de cada etapa. Dessa forma, o modelo pode ser utilizado para otimização do processo e/ou para avaliação do rendimento e produtividade em escala industrial.

Referências

- ALMEIDA, Isabela Castro de. **Estudos sobre o uso do arroz BRS AG para a produção de etanol**. 2017. xix, 87 f., il. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade de Brasília, Brasília, 2017.
- ASPENTECH. Design and Optimize Chemical Processes with Aspen Plus®. Disponível em: <<https://www.aspentech.com/en/products/engineering/aspem-plus>>. Acesso em: 10 de Setembro de 2020.
- CINELLI, B. A., CASTILHO, L. R., FREIRE, D. M. G., CASTRO, A. M. A brief review on the emerging technology of ethanol production by cold hydrolysis of raw starch. **Fuel**, v. 150, p. 721-729, 2015.
- MAGALHÃES JÚNIOR, A. M. D., FAGUNDES, P. R. R., FRANCO, D. F., MORAIS, O. P. D., SIQUEIRA, F. G. D., STRECK, E. A., AGUIAR, G. A., FACCHINELLO, P. H. K. BRS AG: first cultivar of irrigated rice used for alcohol production or animal feed. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v. 17, p. 72-77, 2017.
- MAGALHÃES JÚNIOR, A. M., FAGUNDES, P. R. R., FRANCO, D., ANDRES, A., NUNES, C. D. P., JOSÉ A., MARTINS, J. F., MORAES, O. P., MOURA NETO, F. BRS AG: Cultivar de Arroz Irrigado Desenvolvida como Matéria-Prima para Produção de Álcool de Cereais e/ou Alimentação Animal. p. Comunicado Técnico 372, 2015. Disponível em: <<https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/127678/1/Comunicado-327-web.pdf>>. Acesso em: 08 de Dezembro de 2015.
- RANI, P., SHARMA, S., GARG, F. C., RAJ, K., WATI, L. **Ethanol Production from Potato Flour by *Saccharomyces cerevisiae***. 2010.
- RENEWABLE FUELS ASSOCIATION. World Fuel Ethanol production. 2020. Disponível em: <<https://ethanolrfa.org/statistics/annual-ethanol-production/>>. Acesso em: 21 de Setembro de 2020.
- SCHOLZ, M. J., RILEY, M. R., CUELLO, J. L. Acid hydrolysis and fermentation of microalgal starches to ethanol by the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Biomass and Bioenergy**, v. 48, p. 59-65, 2013.
- SILVA, J. L. **Modelagem e simulação de reatores autoclave para produção de PEBD**. 2012. Dissertação (Mestrado em Engenharia, Programa De Pós-Graduação Em Engenharia Química na área de Concentração: Modelagem e Simulação de Processos) - Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2012.

Avaliação de estratégias de alimentação para produção de celulases por *Penicillium rolfsii* BRM052264 em biorreator

*Daiana Wischral*¹, *Helder Andrey Rocha Gomes*², *Thályta Fraga Pacheco*³, *Thais Demarchi Mendes*⁴,
*Thais Fabiana Chan Salum*⁵, *Mônica Caraméz Triches Damaso*⁶, *Sílvia Belem Gonçalves*⁷

Resumo

O objetivo deste trabalho foi avaliar diferentes estratégias de inoculação e de alimentação para a produção de enzimas celulolíticas por *Penicillium rolfsii* BRM052264 em biorreator, utilizando bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado por explosão a vapor. Inicialmente, o fungo foi repicado em placas contendo ágar batata dextrose e incubado a 28 °C por 10 dias. A produção de enzimas foi avaliada em biorreator de 1 L em batelada alimentada e batelada alimentada com carga extra. Em batelada alimentada, investigou-se o efeito da utilização de pré-inóculo; e em batelada alimentada com carga extra, a adição de sais, bagaço, farelo de trigo e esporos. Os extratos enzimáticos obtidos foram quantificados por métodos colorimétricos quanto à concentração de celulases totais (FPase) e de proteínas. Em batelada alimentada, os cultivos atingiram 1,75 UI/mL de FPase e 2,59 mg/mL de proteínas. A utilização de pré-inóculo não levou a uma diferença estatisticamente significativa na produção de celulases, de acordo com teste-t ($p < 0,05$). Por outro lado, a alimentação de 50% de sais, bagaço e farelo, e o aumento do tempo de cultivo para 168 h, aumentaram a produção de FPase em 28% e a concentração de proteínas em 46%, quando comparados aos resultados de 120 horas de cultivo. Assim, a maior produção de FPase foi de 2,34 UI/mL, e a concentração de proteína foi de 4,51 mg/mL, ambas no biorreator em batelada alimentada com carga extra.

Palavras-chave: celulase, *Penicillium rolfsii* BRM052264, bagaço de cana-de-açúcar, batelada alimentada.

Introdução

O aumento da emissão dos gases de efeito estufa e a alta volatilidade do preço do petróleo têm impulsionado a busca por biocombustíveis e produtos químicos a partir de fontes renováveis (Haldar; Purkait, 2020). A biomassa vegetal, incluindo resíduos e coprodutos agroindustriais, é um recurso alternativo aos fósseis e totalmente renovável. Entretanto, não será economicamente viável se o custo do bioproduto ao

¹ Engenheira de alimentos, doutora em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos, consultora da Embrapa Agroenergia, daianawischral@gmail.com

² Biólogo, doutor em Biologia Molecular, consultor da Embrapa Agroenergia, helderargomes@gmail.com

³ Engenheira química, mestre em Engenharia Química, analista da Embrapa Agroenergia, thalyta.pacheco@embrapa.br

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

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

⁶ Engenheira química, doutora em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos, pesquisadora da Embrapa Agroenergia, monica.damaso@embrapa.br

⁷ Engenheira química, doutora em Engenharia Química, pesquisadora da Embrapa Agroenergia, silvia.belem@embrapa.br

utilizar biomassa for muito alto e/ou se a disponibilidade desse recurso for limitada (De Bhowmick et al., 2018).

No Brasil, foram produzidas aproximadamente 642 milhões de toneladas de cana-de-açúcar na safra 2019/2020, o que gerou em torno de 160,5 milhões de toneladas de bagaço (Unica, 2020). Por essa disponibilidade, o bagaço de cana destaca-se entre as opções de resíduos lignocelulósicos para aplicações em biorrefinaria. A celulose presente no bagaço de cana pode ser hidrolisada para a liberação de glicose, a ser convertida em etanol e/ou químicos renováveis. Alguns fungos filamentosos vêm sendo largamente investigados e têm se mostrado promissores para a obtenção de enzimas. No entanto, o principal desafio para a viabilização da conversão de biomassa em açúcares fermentescíveis ainda é o alto custo das enzimas (Gmoser et al., 2019).

As celulasas ocupam o terceiro lugar entre as enzimas industriais mais importantes no mercado global, com 15% de participação, atrás apenas das amilases (25%) e das proteases (18%) (Sajith et al., 2016). De acordo com dados do *The Atlas of Economic Complexity* (2020), em 2018 o Brasil importou mais de 155 milhões de dólares em celulasas, evidenciando uma dependência de importações para suprir a demanda nacional. Uma alternativa a essa situação é estimular a produção dessas enzimas *on site*.

O objetivo deste trabalho foi avaliar diferentes estratégias de produção de extrato enzimático por *Penicillium rolsii* BRM052264 em biorreator, utilizando como fontes de carbono o bagaço de cana-de-açúcar (resíduos agroindustriais) pré-tratado por explosão a vapor.

Material e Métodos

Microrganismo e meios de cultivo

A cepa de *Penicillium rolsii* BRM052264 foi repicada a partir do estoque preservado a -80 °C e cultivada em placas de Petri contendo ágar batata dextrose (BDA) da Sigma-Aldrich, a 32 °C por 10 dias. O meio de cultivo utilizado para obtenção do pré-inóculo foi constituído de sais (uréia 0,75 g/L, sulfato de amônio 1,6 g/L, fosfato de potássio monobásico 3,5 g/L, sulfato de magnésio 0,25 g/L, sulfato de cobre 2,0 mg/L e PEG 6000 1,125 g/L), 12 g/L farelo de trigo e 29,2 g/L de bagaço de cana pré-tratado por explosão a vapor e lavado, além da adição de 4 g/L de glicose. O bagaço foi lavado a exaustão para remoção de açúcares solúveis. O pH inicial do meio foi corrigido para 6,0, antes da autoclavagem.

Com a parte posterior da ponteira de 200 µL, foram feitos discos nas placas de *Penicillium rolsii* BRM052264 crescido em meio BDA. Oito discos foram adicionados em cada 100 mL de meio de cultivo. Após 24 horas, a 32 °C e 180 rpm, o pré-inóculo foi adicionado ao biorreator na proporção de 10% (v/v). A composição do meio de cultivo utilizado para produção de celulasas foi a mesma do meio de pré-inóculo, exceto pela adição de glicose.

O bagaço de cana utilizado foi pré-tratado por explosão a vapor e lavado pelo Centro de Tecnologia Canaveira (CTC). Posteriormente, o bagaço foi seco em estufa de circulação de ar a 50 °C e moído (425 µm), para utilização como fonte de carbono. Todos os meios de cultivo foram esterilizados em autoclave durante 20 minutos, a 121 °C e 1 atm.

Produção de celulases

A produção de enzimas foi avaliada em biorreator instrumentado (STR) de 1 L e volume reacional de 400 mL, em batelada alimentada e em batelada alimentada com carga extra. Devido à alta carga de sólidos nos cultivos, todas as bateladas se iniciaram com o meio composto por sais, 20 g/L de bagaço e 5 g/L de farelo. O restante da carga de bagaço e farelo foi fracionado em 2 adições, contendo 4,6 g/L de bagaço e 3,5 g/L de farelo cada, alimentadas após 48 e 72 horas de cultivo, atingindo assim a concentração do meio otimizado (29,2 g/L de bagaço e 12 g/L de farelo). As condições empregadas em todos os cultivos foram: 220 rpm com agitador Rushton, 32 °C, aeração de 40 L/h e sistema de refrigeração dos condensadores (para minimizar perda de meio por arraste).

A utilização de pré-inóculo foi avaliada em batelada alimentada. As bateladas alimentadas com carga extra foram conduzidas com pré-inóculo, e foram investigadas três condições diferentes de alimentação: 50% extra de sais (Reator 1), 50% extra de sais, bagaço e farelo (Reator 2), e 50% extra de sais e esporos (um quarto de placa de *P. rofsii* BRM052264, previamente cultivado em BDA durante 10 dias) (Reator 3). Essas alimentações foram realizadas após 120 horas de cultivo.

Ao final do cultivo, os meios foram centrifugados a 10.000 rpm por 10 minutos e a 4 °C, para obtenção dos extratos brutos. A esses extratos clarificados, foi adicionada azida sódica (0,01% p/v), e eles foram armazenados a 4 °C para análises posteriores. A atividade celulolítica total dos extratos brutos foi determinada por meio de microensaio de FPase em triplicata (Xiao et al., 2004). A quantificação de proteínas solúveis foi realizada pelo método de BCA (ácido bicinconínico) em triplicata, de acordo com Smith et al. (1985).

Resultados e Discussão

Os cultivos por batelada alimentada de *Penicillium rofsii* BRM052264 com bagaço de cana pré-tratado por explosão a vapor apresentaram atividade FPase de $1,64 \pm 0,08$ UI/mL sem pré-inóculo, e de $1,75 \pm 0,09$ UI/mL com pré-inóculo (Figura 1). De acordo com o teste-t ($p < 0,05$), não houve diferença estatisticamente significativa entre os resultados de FPase obtidos nesses cultivos. O maior incremento de produção de FPase foi observado até 120 horas de cultivo. A concentração de proteínas atingiu $2,45 \pm 0,04$ mg/mL para o cultivo sem pré-inóculo e $2,59 \pm 0,06$ mg/mL para o cultivo com pré-inóculo.

O sistema de batelada alimentada com carga extra foi avaliado com o objetivo de aumentar a produção de celulases. Para avaliação do modo de alimentação foram realizados experimentos conforme descrito em Material e Métodos para os reatores 1, 2 e 3. Ao final de 168 horas de cultivo, a produção de FPase em biorreator variou de $2,00 \pm 0,21$ UI/mL a $2,34 \pm 0,07$ UI/mL entre as três diferentes estratégias de alimentação (Figura 2). A concentração de proteína variou de $4,07 \pm 0,05$ mg/mL, no cultivo alimentado com sais e esporos (Reator 3), até $4,51 \pm 0,09$ mg/mL, no cultivo alimentado com sais, bagaço e farelo (Reator 2) (Figura 3).

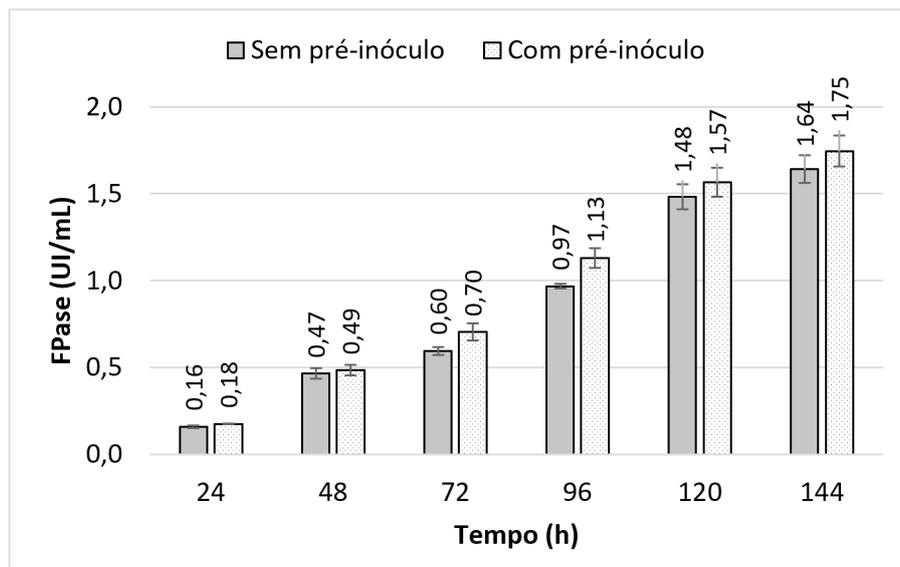


Figura 1. Cinética de produção de FPase por *Penicillium rolsii* BRM052264 em biorreator, a partir de bagaço de cana explodido a vapor. Avaliação de emprego de pré-inóculo de 24 horas em batelada alimentada, com vazão de ar de 40 L/h, a 220 rpm e 32 °C.

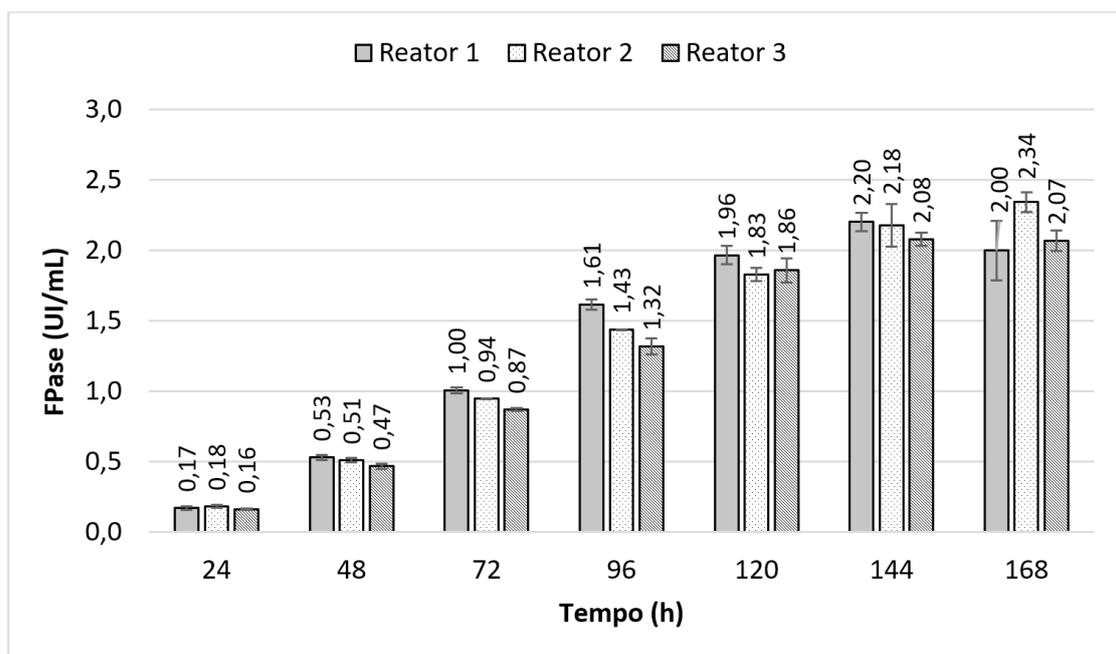


Figura 2. Cinética de produção de FPase por *Penicillium rolsii* BRM052264 em biorreator, a partir de bagaço de cana explodido a vapor, com pré-inóculo de 24 horas, vazão de ar de 40 L/h, a 220 rpm, 32 °C e batelada alimentada com carga extra. As alimentações foram feitas em 120 horas de cultivo: 50% extra de sais (Reator 1), 50% extras de sais, de bagaço e de farelo (Reator 2), e 50% extra de sais e esporos (um quarto de placa de Petri do fungo previamente cultivado em BDA durante 10 dias) (Reator 3).

O Reator 2, alimentado com sais, bagaço e farelo, foi o que apresentou os melhores resultados deste estudo, atingindo 2,34 UI/mL (ou 0,52 FPU/mg) de FPase e 4,51 mg/mL em concentração de proteínas (Figuras 2 e 3). Ao analisar os resultados, foi possível propor as seguintes condições de produção de extrato celulolítico em biorreator: 10% (v/v) de pré-inóculo de 24 horas, vazão de ar de 40 L/h, 32 °C, 220 rpm, pH inicial 6,0, alimentação de 50% extra de sais, de bagaço e de farelo (em 120 horas) e total de 168 horas de cultivo. Comparando-se as produções de 120 horas e 168 horas (Figuras 2 e 3), verificou-se que a alimentação extra em 120 horas proporcionou incrementos de 28% na produção de FPase e de 46% na concentração de proteínas.

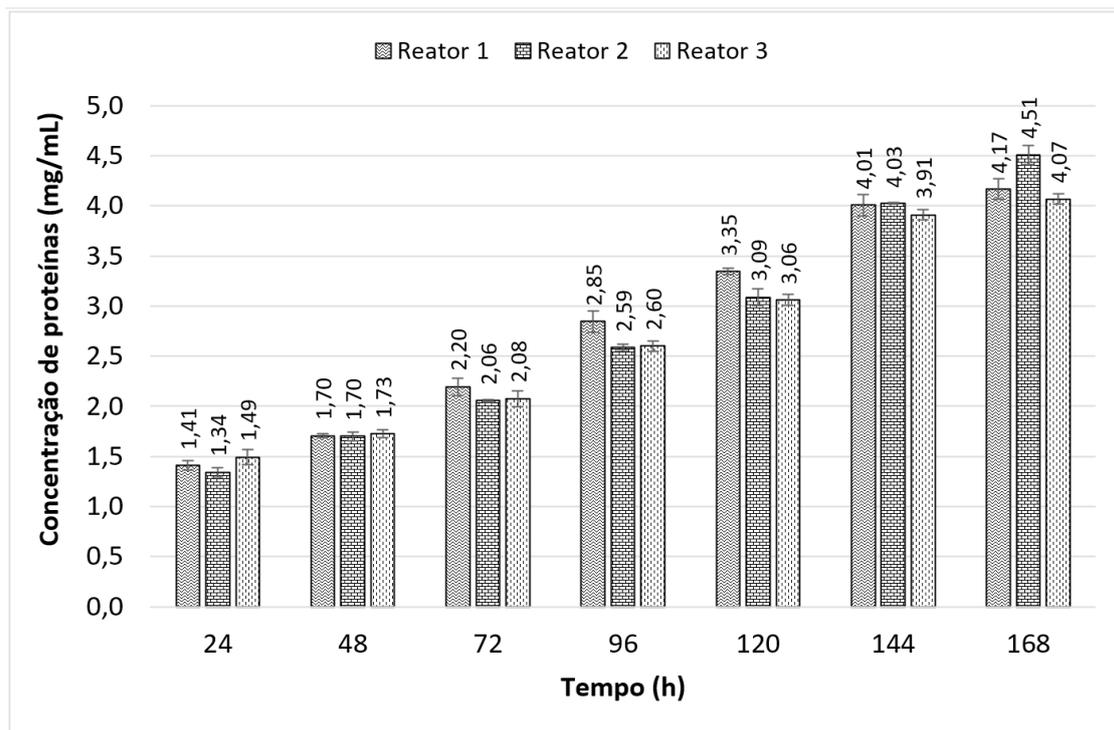


Figura 3. Perfil da concentração de proteínas dos cultivos de *Penicillium rolsii* BRM052264 em biorreator, a partir de bagaço de cana explodido a vapor, com pré-inóculo de 24 horas, vazão de ar de 40 L/h, a 220 rpm, 32 °C e batelada alimentada com carga extra. As alimentações foram feitas em 120 horas de cultivo: 50% extra de sais (Reator 1), 50% extras de sais, de bagaço e de farelo (Reator 2), e 50% extra de sais e esporos (um quarto de placa de Petri do fungo previamente cultivado em BDA durante 10 dias) (Reator 3).

Esses resultados de produção de FPase, com linhagem naturalmente ocorrente e apenas bagaço de cana como fonte de carbono, são melhores que os encontrados na literatura. Da Silva Delabona et al. (2012) produziram 0,69 U/mL de FPase com *Trichoderma harzianum* em bagaço de cana pré-tratado em frascos. Maeda et al. (2013) obtiveram atividade de 1,14 U/mL de FPase em cultivos em biorreator com *Penicillium funiculosum*, utilizando bagaço de cana pré-tratado em batelada alimentada.

Alguns estudos conseguiram melhores resultados empregando estratégias de: concentração dos extratos para formulação de coquetéis, modificação genética da cepa e/ou utilização de outras fontes de carbono (além do bagaço de cana).

Arias et al. (2016) estudaram o sinergismo entre extratos enzimáticos de *Trichoderma harzianum*, *Penicillium funiculosum* e *Aspergillus niger* obtidos em biorreator a partir de bagaço de cana pré-tratado. Os extratos foram concentrados em sistema de filtração tangencial (Hollow Fiber®) e foi obtido um coquetel celulolítico otimizado constituído de *P. funiculosum* 50%, *T. harzianum* 15% e *A. niger* 35%, com 12,9 U/mL (1,3 U/mg) de FPase. Fonseca et al. (2020) modificaram geneticamente *Trichoderma reesei* RUT-C30 para obtenção de uma cepa hiperprodutora de celulasas, atingindo 14,31 U/mL (0,41 FPU/mg) de FPase operando um biorreator em batelada alimentada e utilizando bagaço de cana, glicose e lactose como fontes de carbono.

Conclusão

Os resultados sinalizam a capacidade de aplicação industrial da linhagem para produção de celulasas a partir de bagaço de cana. A utilização de pré-inóculo não proporcionou diferença estatisticamente significativa na produção de FPase, em batelada alimentada no biorreator. A melhor estratégia de batelada alimentada com carga extra foi a alimentação extra de sais, bagaço e farelo. Por fim, neste estudo verificou-se a maior produção de celulasas em biorreator por *Penicillium rolfii* BRM052264 a partir de bagaço de cana explodido a vapor, nas seguintes condições: 10% (v/v) de pré-inóculo de 24 horas, vazão de ar de 40 L/h, 32 °C, 220 rpm, pH inicial 6,0, alimentação de 50% extra de sais, bagaço e farelo, após 120 horas de cultivo.

Agradecimentos

Este trabalho foi desenvolvido no âmbito do projeto Yeastzyme, financiado pelo Banco Nacional de Desenvolvimento Econômico e Social (BNDES) e pelo Centro de Tecnologia Canavieira (CTC).

Referências

- ARIAS, J. M.; MODESTO, L. F. A.; POLIKARPOV, I.; PEREIRA JR, N. Design of an enzyme cocktail consisting of different fungal platforms for efficient hydrolysis of sugarcane bagasse: optimization and synergism studies. **Biotechnology Progress**, v. 32(5), p. 1222-1229, 2016.
- DA SILVA DELABONA, P.; FARINAS, C. S.; DA SILVA, M. R.; AZZONI, S. F.; DA CRUZ PRADELLA, J. G. Use of a new *Trichoderma harzianum* strain isolated from the Amazon rainforest with pretreated sugar cane bagasse for on-site cellulase production. **Bioresource Technology**, v. 107, p. 517-521, 2012.
- DE BHOWMICK, G.; SARMAH, A. K.; AND SEN, R. Lignocellulosic biorefinery as a model for sustainable development of biofuels and value added products, **Bioresource Technology**, v. 247, p. 1144 – 1154, 2018.
- FONSECA, L. M.; PARREIRAS, L. S.; MURAKAMI, M. T. Rational engineering of the *Trichoderma reesei* RUT-C30 strain into an industrially relevant platform for cellulase production. **Biotechnology for Biofuels**, v. 13, p. 1-15, 2020.
- GMOSER, R.; SINTCA, C.; TAHERZADEH, M. J.; LENNARTSSON, P.R. Combining submerged and solid state fermentation to convert waste bread into protein and pigment using the edible filamentous fungus *N. intermedia*. **Waste Management**, v. 97, p. 63-70, 2019.
- HALDAR, D.; PURKAIT, M. K. Lignocellulosic conversion into value-added products: A review. **Process Biochemistry**, v. 89, p. 110-133, 2020.

MAEDA, R. N.; BARCELOS, C. A.; SANTA ANNA, L. M. M.; PEREIRA JR, N. Cellulase production by *Penicillium funiculosum* and its application in the hydrolysis of sugar cane bagasse for second generation ethanol production by fed batch operation. **Journal of Biotechnology**, v. 163(1), p. 38-44, 2013.

SAJITH, S.; PRIJI, P.; SREEDEVI, S.; BENJAMIN, S. An overview on fungal celulasas with na industrial perspective. **Journal of Nutrition & Food Sciences**, v. 6, p. 461, 2016.

SMITH, P. E.; KROHN, R. I.; HERMANSON, G. T.; MALLIA, A. K.; GARTNER, F. H.; PROVENZANO, M.; FUJIMOTO, E. K.; GOEKE, N. M.; OLSON, B. J.; KLENK, D. C. Measurement of protein using bicinchoninic acid. **Analytical biochemistry**, v. 150(1), p. 76-85, 1985.

THE GROWTH LAB AT HARVARD UNIVERSITY. **The Atlas of Economic Complexity**. Disponível em: <<http://www.atlas.cid.harvard.edu>>. Acesso em: 27 de agosto de 2020.

UNICA. **União da Indústria de Cana-de-Açúcar**. Disponível em: <<http://www.unicadata.com.br>> Acesso em: 27 ago. 2020.

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

Desenvolvimento de método para identificação e quantificação de fito-hormônios produzidos por macro e microalgas utilizando UHPLC-MS/MS

Christiane Gonçalves Campos¹, Patrícia Pinto Kalil², Patrícia Abdelnur³, Cesar Heraclides Behling Miranda⁴

Resumo

Diversos estudos têm mostrado os benefícios da aplicação de extratos de diferentes espécies de macroalgas marinhas para fins agrícolas, devido à presença de compostos bioestimulantes de crescimento, denominados de fito-hormônios. A utilização destes compostos com potencial agrícola, promove benefícios ambientais e financeiros para a agricultura. Neste sentido, o desenvolvimento de uma metodologia capaz de identificar e quantificar estes compostos em algas, é essencial para a seleção dos microrganismos mais promissores. Desta forma, a utilização de tecnologias analíticas avançadas, como a espectrometria de massas (MS) acoplada a cromatografia líquida (LC), tem sido amplamente utilizada na identificação destes microrganismos. O objetivo deste trabalho foi desenvolver um protocolo de análise utilizando a cromatografia líquida de ultra alta eficiência acoplada à espectrometria de massas tandem (UHPLC-MS/MS) para a separação simultânea de dez principais padrões de fito-hormônios descritos na literatura (ácido jasmônico, ácido índole-3-acético, ácido índole-3-propionico, ácido índole-3-butírico, ácido giberélico, ácido absícico, ácido salicílico, trans-zeatina, trans-zeatina ribosídeo e giberelina A4). O método analítico desenvolvido e otimizado apresentou boa separação cromatográfica e foi capaz de quantificar, de forma rápida, sensível e seletiva os padrões de fito-hormônios em estudo, os quais apresentaram coeficiente de correlação acima de 0,99. Os valores de LOD (limite de detecção) variaram de 0,001 a 0,05 µg/mL e os valores de LOQ (limite de quantificação) variaram de 0,05 a 0,1 µg/mL. Estes resultados poderão ser aplicados na análise dos fito-hormônios presentes em amostras de macro, microalgas e cianobactérias.

Palavras-chave: algas, fito-hormônios, espectrometria de massas, cromatografia líquida.

Introdução

A crescente demanda para exploração do potencial fisiológico das plantas, através do aumento da produção de biomassa, sem a utilização de agrotóxicos prejudiciais a saúde tem impulsionado os estudos em direção a buscar fontes alternativas na natureza. O uso de substâncias bioestimuladoras do crescimento de plantas tem se mostrado

¹ Química, doutora em Química, colaboradora da Embrapa Agroenergia, camposgchristiane@gmail.com

² Química, mestre em Química, analista da Embrapa Agroenergia, patricia.costa@embrapa.br

³ Química, doutora em Química, pesquisadora da Embrapa Agroenergia, patricia.abdelnur@embrapa.br

⁴ Engenheiro-agrônomo, doutor em Bioquímica e Microbiologia do Solo, pesquisador da Embrapa Agroenergia, cesar.miranda@embrapa.br

promissor em relação à melhoria da germinação de sementes, estabelecimentos de plantas, desenvolvimento, resistência a pragas e doenças, e produtividade.

Estas substâncias bioestimuladoras são denominadas de fito-hormônios, (hormônios) que fazem parte das redes de sinalizações dos processos metabólicos que regulam as respostas fisiológicas das plantas, causando inibição ou modificação, direta ou indiretamente, de processos de desenvolvimento ou adaptação frente algum estímulo externo (Šimura et al., 2018). Por isso, são classificados como substâncias biorreguladoras de crescimento. Seu potencial no desenvolvimento de plantas tem sido amplamente explorado e cerca de 40 ingredientes ativos de fito-hormônios já são comercializados (Rademacher, 2015) com destaque para aqueles originados de algas marinhas (Thuy; Chowanska; Chojnacka, 2013).

Devido ao seu rápido crescimento e adaptabilidade, as algas (macro ou micro, bem como as cianobactérias), podem ser uma boa fonte natural de fito-hormônios (Wang et al., 2014). A identificação e quantificação dos compostos fito-hormônios em amostras de algas é uma etapa crucial para auxiliar na seleção dos microrganismos mais promissores. Um dos desafios para a realização desta etapa é a escolha de metodologias e equipamentos específicos capazes de analisar simultaneamente compostos de diferentes classes químicas, amostras complexas com compostos fito-hormônios em baixa concentração e variabilidade biológica, com diferentes substratos ou meios de cultura.

Neste contexto, a cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa (LC-MS) tem sido amplamente utilizada na análise de compostos fito-hormônios por ser uma técnica versátil e capaz de analisar uma grande variedade de compostos com diferentes classes químicas (Mori et al., 2017). Além disso, a cromatografia líquida de ultra alta eficiência acoplada à espectrometria de massas (do inglês *Ultra high liquid chromatography - mass spectrometry* – UHPLC-MS) permite análises eficientes de alto rendimento, reduzindo o uso de solventes, melhorando a resolução do pico e consequentemente, a separação dos compostos.

O presente trabalho consiste no desenvolvimento e otimização de um método para a identificação e quantificação simultânea de dez principais compostos fito-hormônios descritos na literatura (ácido jasmônico, ácido índole-3-acético, ácido índole-3-propionico, ácido índole-3-butírico, ácido giberélico, ácido absícico, ácido salicílico, trans-zeatina, trans-zeatina ribosídeo e giberelina A4) utilizando UHPLC – MS/MS. Os parâmetros de espectrometria de massas foram determinados individualmente para os compostos em estudo e o método cromatográfico em modo gradiente utilizou uma coluna do tipo BEH C18. Além disso, parâmetros analíticos como limite de detecção e quantificação, foram determinados para o preparo da curva de calibração.

Material e Métodos

Parâmetros MS/MS

O espectrômetro de massas (MS) utilizado possui fonte de ionização electrospray (ESI) e analisador tipo triplo quadrupolo (QqQ) (TQD, Waters). O MS foi operado em modo de ionização negativa (ESI(-)-MS/MS) e positiva (ESI(+)-MS/MS) usando monitoramento de reações múltiplas (MRM). Os parâmetros instrumentais utilizados foram: tensão capilar

3500 V, temperatura de desolvatação: 350 °C, temperatura da fonte: 150 °C, fluxo de gás do cone: 20 L/h e fluxo de desolvatação: 700 L/h. As análises foram realizadas variando-se alguns parâmetros analíticos para garantir a máxima ionização dos compostos e melhor fragmentação, como voltagem do cone e do capilar, temperaturas e energia de colisão. Estes dados foram posteriormente utilizados para o desenvolvimento de um método mais seletivo por MRM.

UHPLC

A separação dos compostos foi realizada utilizando cromatografia de ultra alta eficiência (UHPLC) (Acquity, Waters), utilizando metodologia adaptada de (Delatorre et al., 2017), a coluna cromatográfica utilizada foi do tipo BEH C18 (2,1 x 50 mm, 1,7 µm) (Waters), com temperatura do forno de coluna a 40 °C. A Fase móvel (A: H₂O + 0,1% ácido fórmico + 10 mM de Formiato de amônio e B: MeOH + 0,1% ácido fórmico + 10 mM de Formiato de amônio) foi utilizada em modo gradiente (Tabela 1).

Tabela 1. Gradiente cromatográfico usado na separação dos padrões de fito-hormônios, fase móvel A: H₂O + 0,1% ácido fórmico + 10 mM de formiato de amônio e B: MeOH + 0,1% ácido fórmico + 10 mM de formiato de amônio, a 40°C.

| Tempo (min) | Fluxo (mL/min) | Eluente A (vol. %) | Eluente B (vol. %) |
|-------------|----------------|--------------------|--------------------|
| 7,0 | 0,450 | 50 | 50 |
| 9,0 | 0,450 | 0 | 100 |
| 11,0 | 0,450 | 0 | 100 |
| 12,0 | 0,450 | 90 | 10 |
| 14,0 | 0,450 | 90 | 10 |

Quantificação dos padrões de fito-hormônios

Soluções padrões individuais (SI) dos compostos em estudo foram preparados a uma concentração de 1 mg/mL. Em seguida, foram utilizadas diluições das SI para o preparo de soluções intermediárias dos 10 padrões de fito-hormônios em estudo (ácido jasmônico, ácido índole-3-acético, ácido índole-3-propionico, ácido índole-3-butírico, ácido giberélico, ácido absícico, ácido salicílico, trans-zeatina, trans-zeatina ribosídeo e giberelina A4) a concentração de 100 µg/mL. A curva analítica definitiva foi preparada a partir das soluções estoque e das soluções intermediárias contendo a mistura dos 10 padrões de fito-hormônios nas concentrações 5,0; 2,0; 1,0; 0,5; 0,1; 0,05; 0,02 e 0,005 µg/mL. Os valores reais de concentração foram obtidos plotando-se a área do pico versus a concentração teórica de cada padrão, a curva analítica foi ajustada com o modelo de regressão polinomial de segunda ordem.

Resultados e Discussão

UHPLC-MS/MS

O método analítico baseado em UHPLC-MS/MS foi desenvolvido e otimizado para a análise de fito-hormônios presentes em amostras de algas. A espectrometria de massas de infusão direta (DIMS) foi utilizada para otimizar a fonte de ionização e as tensões das células de colisão para cada fito-hormônio. Os fito-hormônios em estudo foram detectados com melhor sensibilidade usando ESI(-)-MS e ESI(+)-MS. Os valores da energia do capilar e da energia de colisão foram otimizados para cada padrão. No entanto, a energia do capilar foi a mesma para todos os compostos (3500 V). Os íons fragmento mais alto e/ou seletivo foram selecionados para análises por MRM (Tabela 2).

Tabela 2. Parâmetros do espectrômetro de massas: voltagem do cone (V), valores de m/z Q1 e Q3 e energia de colisão (eV), otimizados para cada composto para a realização dos experimentos de MRM.

| Fito-hormônios | Ionização | Voltagem do cone (V) | Q1 (m/z) | Q3 (m/z) | Energia de colisão (eV) |
|---------------------------|-----------|----------------------|----------|----------|-------------------------|
| Ácido Jasmônico | ESI(+) | 20 | 211 | 133 | 15 |
| Ácido indole-3-acético | ESI(+) | 25 | 176 | 130 | 15 |
| Ácido indole-3-propiónico | ESI(+) | 25 | 190.2 | 130 | 15 |
| Ácido indole-3-butírico | ESI(+) | 25 | 204 | 186 | 20 |
| Ácido giberélico | ESI(-) | 30 | 345 | 239 | 20 |
| Ácido abscísico | ESI(-) | 25 | 263 | 153 | 15 |
| Ácido salicílico | ESI(-) | 30 | 137 | 93 | 25 |
| trans-zeatina | ESI(+) | 35 | 220.2 | 136 | 25 |
| trans-zeatina ribosídeo | ESI(+) | 35 | 352.3 | 220.2 | 25 |
| Giberelina A4 | ESI(-) | 30 | 331.1 | 257 | 20 |

A Figura 1 apresenta os cromatogramas obtidos na análise da mistura dos dez padrões de fito-hormônios com concentração de 1,0 µg/mL, utilizados para o desenvolvimento do método analítico por UHPLC-MS/MS. Este método permitiu a separação rápida, sensível e seletiva dos compostos fito-hormônios em estudo. Desta forma poderá ser aplicado em análise de amostras de algas.

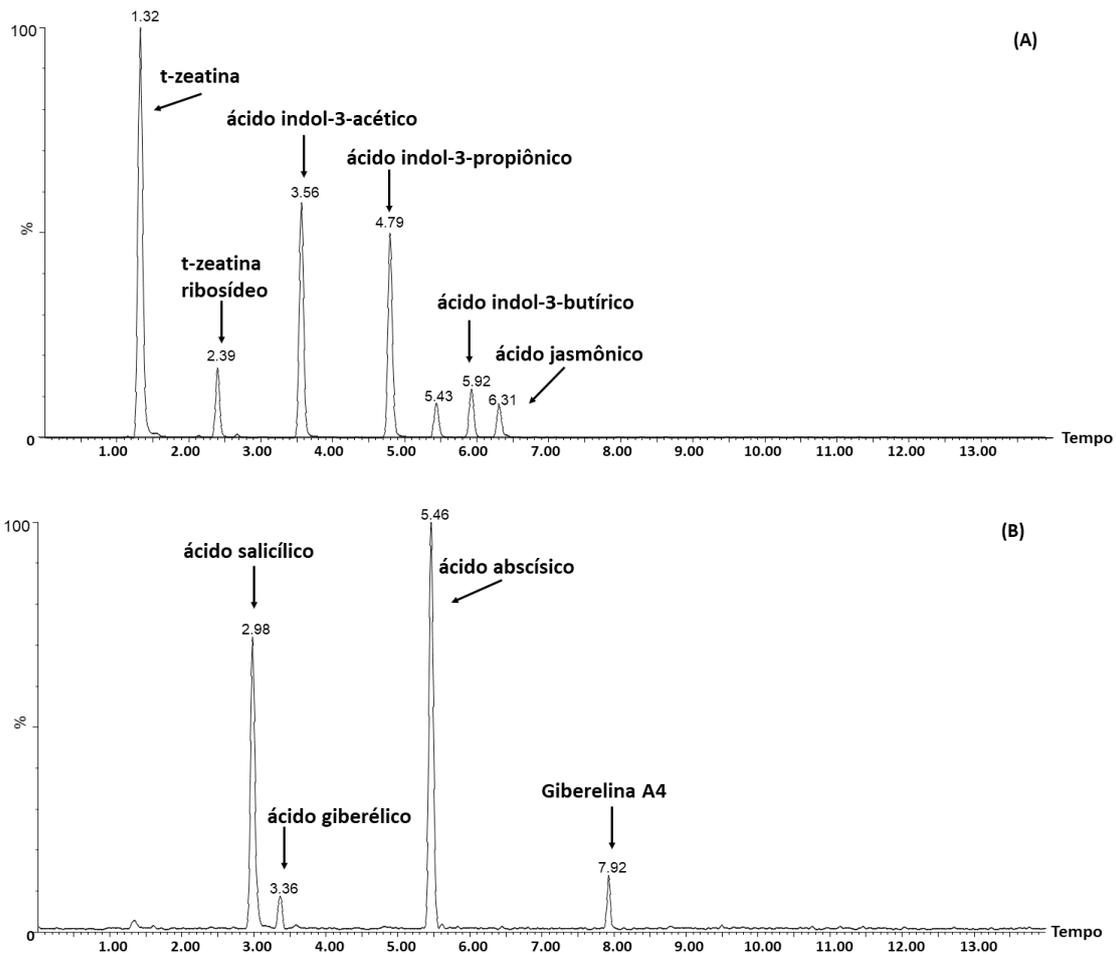


Figura 1. (A) Cromatograma de 6 canais de MRM (*trans*-zeatina, *trans*-zeatina ribosídeo, ácido indol-3-acético, ácido indol-3-propiónico, ácido indol-3-butírico e ácido jasmônico) obtidos na análise da mistura contendo 10 padrões de fito-hormônios por UHPLC-ESI(+)-MS; (B) Cromatograma de 4 canais de MRM (ácido acetil salicílico, ácido giberélico, ácido abscísico e giberelina A4) obtidos na análise da mistura contendo 10 padrões de fito-hormônios por UHPLC-ESI(-)-MS.

Quantificação dos padrões de fito-hormônios

Os limites de detecção (LOD) e quantificação (LOQ), o tempo de retenção e os coeficientes de regressão (R^2) para cada composto foram estabelecidos a fim de serem utilizados na análise quantitativa de fito-hormônios em amostras de algas (Tabela 3). As curvas de calibração variaram de 0,02 a 5,0 $\mu\text{g/mL}$. O limite de detecção (LOD) e o limite de quantificação (LOQ) foram definidos por meio da análise de soluções de concentrações conhecidas e decrescentes do analito, até o menor nível detectável (estabelecido pelo cálculo de três vezes a estimativa do desvio padrão das medidas do sinal do branco) e quantificável, respectivamente. Os valores dos coeficientes de regressão obtidos ficaram acima de 0,99 para todos os padrões analisados. Inicialmente, as curvas foram processadas utilizando o modelo linear, no entanto, observou-se que a

maior parte dos compostos em estudo apresentaram uma tendência quadrática, sendo este o modelo matemático escolhido para o cálculo das concentrações.

Tabela 3. Coeficientes de regressão (R^2), limites de detecção (LOD), limites de quantificação (LOQ) e tempo de retenção (RT) determinados para os padrões de fito-hormônios em estudo.

| Fito-hormônios | LOD ($\mu\text{g/mL}$) | LOQ ($\mu\text{g/mL}$) | R^2 | Tempo de retenção (min) |
|---------------------------|--------------------------|--------------------------|---------|-------------------------|
| Ácido Jasmônico | 0,005 | 0,02 | 0,99961 | 6,31 |
| Ácido indole-3-acético | 0,001 | 0,005 | 0,99996 | 3,56 |
| Ácido indole-3-propiónico | 0,001 | 0,005 | 0,99826 | 4,79 |
| Ácido indole-3-butírico | 0,001 | 0,005 | 0,99794 | 5,92 |
| Ácido giberélico | 0,005 | 0,10 | 0,99148 | 3,36 |
| Ácido abscísico | 0,001 | 0,05 | 0,99673 | 5,46 |
| Ácido salicílico | 0,05 | 0,10 | 0,99652 | 2,98 |
| trans-zeatina | 0,001 | 0,005 | 0,99543 | 1,32 |
| trans-zeatina ribosídeo | 0,001 | 0,005 | 0,99569 | 2,39 |
| Giberelina A4 | 0,05 | 0,10 | 0,99241 | 7,92 |

Conclusões

Embora a análise de fito-hormônios em algas seja um processo desafiador seu emprego em estudos com macro e microalgas pode contribuir grandemente para a seleção de espécies promissoras produtoras de fito-hormônios de interesse. O método analítico desenvolvido e otimizado por UHPLC-MS/MS foi capaz de identificar e quantificar, de forma rápida, sensível e seletiva dez compostos padrões de fito-hormônios. Este método será aplicado na quantificação de compostos fito-hormônios em amostras com matrizes complexas. A utilização deste protocolo de análise em amostra de algas será uma ferramenta auxiliar poderosa no desenvolvimento de processos de produção destes compostos por via biotecnológica.

Referências

- DELATORRE, C.; RODRÍGUEZ, A.; RODRÍGUEZ, L.; MAJADA, J. P.; ORDÁS, R. J.; FEITO, I. Hormonal profiling: Development of a simple method to extract and quantify phytohormones in complex matrices by UHPLC-MS/MS. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, v. 1040, p. 239–249, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2016.11.007>
- MORI, I. C.; IKEDA, Y.; MATSUURA, T.; HIRAYAMA, T.; MIKAMI, K. *Phytohormones in red seaweeds: A technical review of methods for analysis and a consideration of genomic data*. [S. l.: s. n.] Disponível em: <https://doi.org/10.1515/bot-2016-0056>

RADEMACHER, W. Plant Growth Regulators: Backgrounds and Uses in Plant Production. **Journal of Plant Growth Regulation**, v. 34, n. 4, p. 845–872, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00344-015-9541-6>

ŠIMURA, J.; ANTONIADI, I.; ŠIROKÁ, J.; TARKOWSKÁ, D.; STRNAD, M.; LJUNG, K.; NOVÁK, O. Plant hormonomics: Multiple phytohormone profiling by targeted metabolomics. **Plant Physiology**, v. 177, n. 2, p. 476–489, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1104/pp.18.00293>

THUY, L., CHOWANSKA, J., CHOJNACKA, K. Seaweed extracts as biostimulants of plant growth: review. **CHEMIK**, v. 67, n. 7, p. 636–641, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00344-009-9103-x>

WANG, X.; ZHAO, P.; LIU, X.; CHEN, J.; XU, J.; CHEN, H.; YAN, X. Quantitative profiling method for phytohormones and betaines in algae by liquid chromatography electrospray ionization tandem mass spectrometry. **Biomedical Chromatography**, v. 28, n. 2, p. 275–280, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/bmc.3018>

Influência de diferentes fontes de carbono sobre a produção de celulases por cepas de *Penicillium* e *Talaromyces*

Helder Andrey Rocha Gomes¹, Daiana Wischral², Thaís Demarchi Mendes³, Thályta Fraga Pacheco⁴, Mônica Caraméz Triches Damaso⁵, Thaís Fabiana Chan Salum⁶

Resumo

Os isolados fúngicos *Penicillium rolsii* F1880 e *Talaromyces pinophilus* AR155 foram avaliados em cultivo submerso utilizando o meio de Mandels e Weber e um conjunto de 15 fontes de carbono: Avicel, celulose Solka Floc, bagaço de malte, sorgo in natura, sorgo submetido a tratamento hidrotérmico, palha de cana-de-açúcar in natura, palha de cana-de-açúcar submetida a tratamento hidrotérmico, bagaço de cana-de-açúcar in natura, bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado por explosão a vapor lavado e não lavado, bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado por tratamento do tipo organosolv, bagaço de cana-de-açúcar delignificado, casca do grão de soja in natura, casca do grão de soja pré-tratada por tratamento hidrotérmico e farelo de trigo in natura. O isolado F1880 produziu os maiores níveis de celulases totais (FPAse) quando cultivado em palha de cana-de-açúcar pré-tratada por tratamento hidrotérmico, bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado por explosão a vapor (lavado e não lavado), casca do grão de soja pré-tratado por tratamento hidrotérmico e palha de cana-de-açúcar pré-tratada por tratamento hidrotérmico. Entre esses extratos brutos, as maiores concentrações de glicose após sacarificação do bagaço de cana foram observadas utilizando os extratos brutos obtidos após cultivo em palha de cana e bagaço de cana pré-tratado por explosão a vapor lavado. Já o isolado AR155 produziu os maiores níveis de celulases totais, bem como de liberação de glicose, quando cultivado em meio contendo palha de cana-de-açúcar e bagaço de cana pré-tratado por explosão a vapor e lavado. Os resultados reforçam o potencial dos isolados como fontes de enzimas, com vistas à hidrólise de materiais lignocelulolíticos.

Palavras-chave: *Penicillium rolsii* F1880, *Talaromyces pinophilus* AR155, FPAse, sacarificação, bagaço de cana-de-açúcar.

Introdução

A necessidade urgente de busca por fontes renováveis e que provoquem menor impacto ambiental, em substituição aos combustíveis fósseis, tem colocado a biomassa lignocelulósica em destaque. A grande disponibilidade da biomassa lignocelulósica gera um grande potencial para a produção de combustíveis renováveis, como o etanol de segunda geração (Su et al., 2020). Apesar de todo esse potencial, as tecnologias

¹ Biólogo, doutor em Biologia Molecular, consultor da Embrapa Agroenergia, helderargomes@gmail.com

² Engenheira de alimentos, doutora em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos, consultora da Embrapa Agroenergia, daianawischral@gmail.com

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

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

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

⁶ Farmacêutica, doutora em Bioquímica, pesquisadora da Embrapa Agroenergia, thais.salum@embrapa.br

relacionadas ao uso da biomassa lignocelulósica em escala industrial ainda não estão bem estabelecidas, em parte devido à natureza recalcitrante do material, que exige etapas de pré-tratamento, bem como dos custos relacionados ao coquetel de enzimas necessário para a sacarificação dos polissacarídeos (Bhatia et al., 2020; Binod et al., 2019).

Os materiais lignocelulósicos são constituídos por uma rede complexa de polissacarídeos e outros polímeros, formando uma rede bem estruturada, responsável pela proteção das células vegetais. A celulose, um polímero composto por unidades de glicose, é o polissacarídeo responsável pela resistência mecânica da parede celular. Hemiceluloses e pectinas representam classes diversificadas de polissacarídeos, responsáveis por características dinâmicas da parede celular. A lignina, um complexo fenólico, é responsável pela hidrofobicidade e baixa reatividade da lignocelulose (Anderson; Kieber, 2020). A complexidade estrutural da lignocelulose a torna um excelente indutor para a produção de coquetéis multienzimáticos por bactérias e fungos. A utilização de fontes lignocelulósicas para a produção de coquetéis enzimáticos tem sido abordada, e apresenta potencial para redução dos custos associados à etapa de sacarificação, uma vez que os coquetéis poderiam ser produzidos no mesmo local onde a sacarificação seria processada (on-site production) (Siqueira et al., 2020).

Os fungos apresentam potencial como produtores de coquetéis enzimáticos para sacarificação de biomassa lignocelulósica, uma vez que apresentam hábitos saprofíticos, e são capazes de secretar as proteínas no meio de cultura (Payne et al., 2015). As espécies do gênero *Trichoderma* têm sido empregadas com mais frequência para a produção dessas enzimas, mas as espécies do gênero *Penicillium* também têm demonstrado ser boas fontes de enzimas lignocelulolíticas e, portanto, precisam ser exploradas quanto a esse potencial, em especial espécies pouco estudadas (Gusakov e Sinitsyn, 2012).

O objetivo do presente trabalho foi avaliar a produção de celulasas totais (medidas em termos de atividade total sobre papel de filtro – FPAse), bem como a performance de sacarificação de bagaço-de-cana pelos extratos produzidos por *Penicillium rolfsii* F1880 e *Talaromyces pinophilus* AR155.

Material e Métodos

Microrganismos

Os isolados *Penicillium rolfsii* F1880 e *Talaromyces pinophilus* AR155 foram conservados a -80°C, em solução de glicerol. Periodicamente, alíquotas desse estoque foram repicadas nos meios ágar batata dextrose (Sigma-Aldrich, Índia) para crescimento de *P. rolfsii* F1880, e ágar *corn meal* (Himedia, Índia) para crescimento de *T. pinophilus* AR155. As placas foram incubadas a 28°C, durante 10 dias, em incubadora do tipo B.O.D.

Os dois isolados fúngicos pertencem à Coleção de Microrganismos e Microalgas Aplicados à Agroenergia e Biorrefinarias, registrados com os códigos BRM 052263 (AR155) e BRM 052264 (F1880).

Fermentação submersa

Para avaliar a produção de celulases totais pelos isolados fúngicos, foi utilizado o meio de Mandels e Weber (1969): ureia (0,3 g/L), peptona bacteriológica (0,75 g/L), sulfato de amônio (1,4 g/L), fosfato de potássio dibásico (2,0 g/L), sulfato de magnésio hepta-hidratado (0,3 g/L), cloreto de cálcio di-hidratado (0,4 g/L), sulfato de zinco hepta-hidratado (1,4 mg/L), sulfato de ferro II hepta-hidratado (5,0 mg/L), cloreto de cobalto hepta-hidratado (2,0 mg/L), sulfato de manganês II hidratado (1,04 mg/L). Ao meio de Mandels e Weber, foi acrescentado polietilenoglicol (PEG) 6000 na concentração de 1,0 g/L.

As fontes de carbono utilizadas nos cultivos foram: Avicel, celulose Solka Floc, bagaço de malte, sorgo in natura, sorgo submetido a tratamento hidrotérmico, palha de cana-de-açúcar in natura, palha de cana-de-açúcar submetida a tratamento hidrotérmico, bagaço de cana-de-açúcar in natura, bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado por explosão a vapor lavado e o não lavado, bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado por tratamento do tipo organosolv, bagaço de cana-de-açúcar deslignificado, casca do grão de soja in natura, casca do grão de soja pré-tratada por tratamento hidrotérmico, e farelo de trigo in natura. Todas as fontes de carbono foram utilizadas na concentração de 20 g/L, e em todos os meios foram acrescentados de farelo de trigo na concentração de 5 g/L (o meio contendo apenas farelo apresentava, portanto, 25 g/L dessa fonte de carbono).

Os cultivos foram realizados em frascos do tipo Erlenmeyer de 125 mL, contendo 25 mL de meio de cultura. A inoculação dos meios foi realizada por meio de dois discos retirados a partir das bordas da colônia obtida após crescimento em meio sólido, com o auxílio de ponteiras de 200 µL. Os frascos foram incubados a 28°C (para cultivos de *T. pinophilus* AR155) ou 32°C (para cultivos de *P. rolfsii* F1880) em incubadora com mesa agitadora a 180 rpm, durante 5 dias.

Após o período de incubação, os meios de cultura foram coletados e clarificados por centrifugação (10000 rpm/10 minutos/4°C). Os extratos brutos clarificados foram preservados pela adição de azida sódica (0,01% p/v), e armazenados a 4°C, para análises posteriores.

Ensaio enzimático e sacarificação do bagaço de cana-de-açúcar

os níveis de FPAse foram determinados em microensaio, segundo método descrito por Xiao et al. (2004). Para avaliar a performance de alguns dos extratos brutos na sacarificação do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado por explosão a vapor e não lavado, foram realizados ensaios de hidrólise em placas do tipo *deep well*. Os ensaios utilizaram 2,5 mL do respectivo extrato bruto, e teor de sólidos totais de 5% (o volume necessário para se alcançar o teor de sólidos totais foi completado com tampão citrato de sódio 100 mM, pH 5,0). A hidrólise foi realizada a 50°C e 200 rpm durante 24 horas. A glicose liberada foi quantificada por meio de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), utilizando glicose e celobiose como padrões.

Resultados e Discussão

Os níveis de celulases totais produzidos pelos isolados F1880 e AR155 nas diferentes fontes de carbono avaliadas são apresentados na Figura 1. O isolado *P. rolfsii* F1880 produziu maiores níveis de atividade de FPase quando cultivado em meio contendo palha de cana-de-açúcar pré-tratada por tratamento hidrotérmico (PCH), bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado por explosão a vapor, lavado (BCEVL) e não lavado (BCEVNL), bagaço de cana-de-açúcar delignificado (BCD), e casca do grão de soja pré-tratada por tratamento hidrotérmico (CSH) (Figura 1).

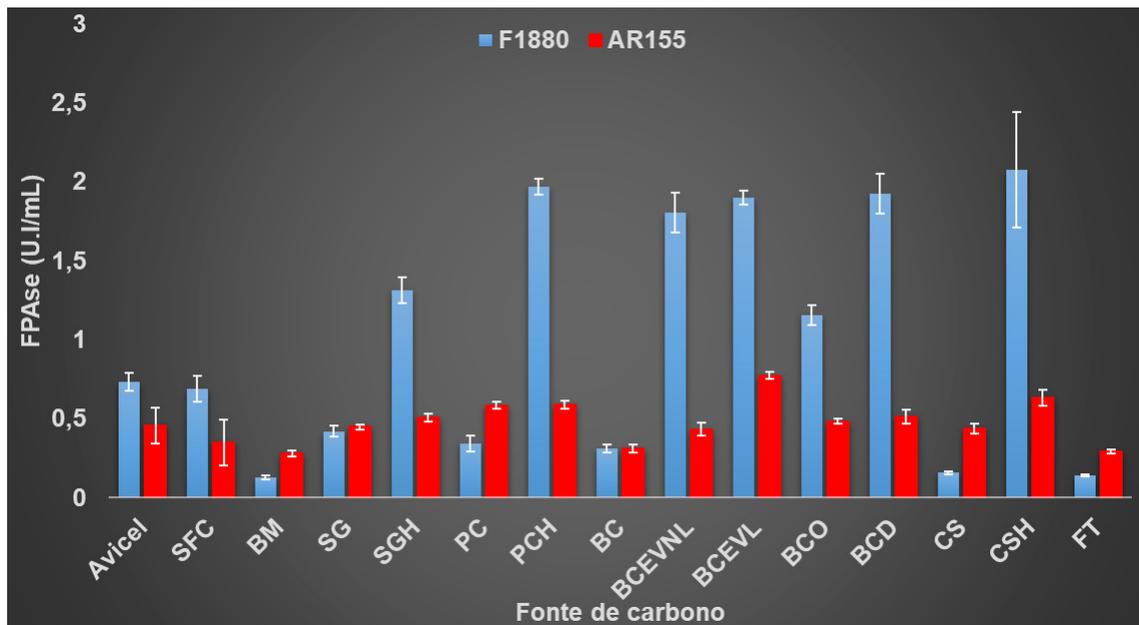


Figura 1. Níveis de celulases totais (FPase) produzidos por *Penicillium rolfsii* F1880 e *Talaromyces pinophilus* em diversas fontes de carbono. As barras representam os desvios-padrão. SFC: Solka Floc Celulose; BM: bagaço de malte; SG: sorgo; SGH: sorgo pré-tratado por tratamento hidrotérmico; PC: palha de cana-de-açúcar; PCH: palha de cana-de-açúcar pré-tratada por tratamento hidrotérmico; BC: bagaço de cana-de-açúcar; BCEVNL: bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado por explosão a vapor não lavado; BCEVL: bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado por explosão a vapor lavado; BCO: bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado por método Organosolv; BCD: bagaço de cana-de-açúcar delignificado; CS: casca do grão de soja; CSH: casca do grão de soja pré-tratado por tratamento hidrotérmico; FT: farelo de trigo.

Os índices de atividade celulolítica total foram consideravelmente superiores nos cultivos do isolado F1880 em comparação aos cultivos do isolado AR155 (Figura 1). Para o isolado *T. pinophilus* AR155, os maiores níveis de FPase foram observados em cultivos contendo bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado por explosão a vapor lavado (BCEVL) (Figura 1). Os maiores valores de FPase foram encontrados em cultivos contendo biomassas pré-tratadas como fonte de carbono (Figura 1), o que indica que os respectivos pré-tratamentos transformaram as biomassas utilizadas em materiais mais acessíveis ao fungo, seja pela remoção da fração hemicelulósica, e aumento da exposição da celulose (como nos tratamentos hidrotérmicos e no tratamento por explosão a vapor), ou seja pela remoção ou modificação da lignina (deslignificação) (Hendriks e Zeeman, 2009; Mosier et al., 2005).

Os extratos brutos produzidos pelos dois isolados com os maiores índices de atividade de FPAse foram avaliados quanto à performance para a hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado por explosão a vapor e não lavado. Os resultados são apresentados na Tabela 1.

Tabela 1. Concentração de glicose (g/L) observada após hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado por explosão a vapor e não lavado, utilizando os extratos brutos obtidos após o cultivo de *Penicillium rolfsii* F1880 e *Talaromyces pinophilus* AR155 em diferentes fontes de carbono. Os valores são acompanhados dos respectivos desvios-padrão.

| Linhagem | Fonte de carbono do cultivo | Glicose (g/L) |
|-------------------------------------|--|---------------|
| <i>Penicillium rolfsii</i> F1880 | Palha de cana-de-açúcar pré-tratada por tratamento hidrotérmico | 10,23 ± 0,72 |
| | Bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado por explosão a vapor e lavado | 10,06 ± 0,4 |
| | Casca do grão de soja pré-tratada por tratamento hidrotérmico | 7,91 ± 0,78 |
| | Bagaço de cana-de-açúcar delignificado | 7,33 ± 0,6 |
| <i>Talaromyces pinophilus</i> AR155 | Palha de cana-de-açúcar in natura | 8,03 ± 0,27 |
| | Bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado por explosão a vapor e lavado | 7,92 ± 0,05 |
| | Palha de cana-de-açúcar pré-tratada por tratamento hidrotérmico | 6,10 ± 0,30 |

Os extratos brutos obtidos após o cultivo do isolado F1880 em bagaço pré-tratado por explosão a vapor e palha de cana-de-açúcar pré-tratada por tratamento hidrotérmico apresentaram o melhor desempenho para a sacarificação do bagaço de cana (Tabela 1). Já os extratos brutos obtidos após o cultivo do isolado AR155 em palha de cana-de-açúcar in natura e bagaço pré-tratado por explosão a vapor e lavado apresentaram o melhor desempenho na sacarificação do substrato (Tabela 1). Surpreendentemente, o isolado AR155 promoveu uma sacarificação da celulose do bagaço de cana em níveis consideráveis, mesmo que os valores de FPAse tenham sido consideravelmente inferiores aos observados nos cultivos do isolado F1880 (Figura 1). Tal fato reforça a necessidade de melhor compreensão do conjunto de enzimas presentes nos extratos brutos do isolado AR155. É possível que o conjunto de enzimas produzido por esse isolado seja mais diverso em termos de enzimas acessórias em comparação ao do isolado F1880.

Conclusões

Os resultados obtidos neste estudo revelam o potencial dos isolados *P. rolfsii* F1880 e *T. pinophilus* AR155 como produtores de enzimas celulolíticas úteis para os processos de desconstrução enzimática da biomassa lignocelulósica. Os resíduos/coprodutos de cana-de-açúcar mostraram-se os melhores indutores da produção de celulasas totais, o que favorece o uso futuro de coquetéis melhorados que possam ser utilizados para produção *on site*, ou seja, nas mesmas instalações onde será realizada a sacarificação de resíduos lignocelulósicos.

Agradecimento

Este trabalho foi desenvolvido no âmbito do projeto YEASTZYME, financiado pelo Banco Nacional de Desenvolvimento Econômico e Social (BNDES) e pelo Centro de Tecnologia Canavieira (CTC).

Referências

- ANDERSON, C. T.; KIEBER, J. J. Dynamic Construction, Perception, and Remodeling of Plant Cell Walls. **Annual Review of Plant Biology**, v. 71, p. 39–69, 2020.
- BHATIA, S. K. Recent developments in pretreatment technologies on lignocellulosic biomass: Effect of key parameters, technological improvements, and challenges. **Bioresource Technology**, v. 300, n. January, p. 122724, 2020.
- BINOD, P. Enzymes for second generation biofuels: Recent developments and future perspectives. **Bioresource Technology Reports**, v. 5, n. April 2018, p. 317–325, 2019.
- GUSAKOV, A. V.; SINITSYN, A. P. Cellulases from *Penicillium* species for producing fuels from biomass. **Biofuels**, v. 3, n. 4, p. 463–477, 2012.
- HENDRIKS, A. T. W. M.; ZEEMAN, G. Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 1, p. 10–18, 2009.
- MANDELS, M.; WEBER, J. The Production of Cellulases. In: HAJNY, G. J.; REESE, E. T. (Org.). **Advances in Chemistry Series: Cellulases and Their Applications**. Washington D.C: American Chemical Society, 1969. v. 95. p. 391–414.
- MOSIER, N. Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. **Bioresource Technology**, v. 96, n. 6, p. 673–686, 2005.
- PAYNE, C. M. Fungal cellulases. **Chemical Reviews**, v. 115, n. 3, p. 1308–1448, 2015.
- SIQUEIRA, J. G. W. Current advances in on-site cellulase production and application on lignocellulosic biomass conversion to biofuels: A review. **Biomass and Bioenergy**, v. 132, n. October 2019, p. 105419, 2020.
- SU, T.. Lignocellulosic biomass for bioethanol: Recent advances, technology trends, and barriers to industrial development. **Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry**, v. 24, p. 56–60, 2020.
- XIAO, Z. Microplate-based filter paper assay to measure total cellulase activity. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 88, n. 7, p. 832–837, 2004.

Percepção das cores com ImageJ: elaboração de um guia para análise de imagens de microrganismos produtores de corantes naturais

Rosana Falcão¹, Paula Fernandes Franco², Aparecido Almeida Conceição³, Glauca Emy Okida Midorikawa⁴, Félix Gonçalves de Siqueira⁵, Patrícia Abrão Oliveira Molinari⁶, Léia Cecília de Lima Fávoro⁷

Resumo

As cores são vistas pelos olhos humanos que traduzem a informação baseada em suas percepções e preferências. As cores podem ser entendidas como fótons percebidos da luz do dia onde vermelho corresponde a fótons de luz de comprimento longo (baixa frequência), amarelo e verde intermediários e azul comprimento de onda curto (alta frequência). Dessa forma a cor pode ser quantificada e analisada em sistemas de computador para determinar a quantidade de vermelho, verde e azul presente em cada cor. Este trabalho teve como objetivo criar uma estratégia baseada em análise de imagem digital para identificação das cores de microrganismos visando auxiliar a seleção de linhagens produtoras de corantes sem a necessidade de manipulação das amostras.

Palavras-chave: microrganismos, corantes, análise de imagens, espectrofotômetro, colorimetria.

Introdução

Qual a cor da bola de tênis? Esta pergunta gerou mais de 30.000 respostas no tweeter onde 52% apontaram verde, 42% amarelo e 6% outros. O resultado dessa enquete foi investigado, analisado e testado pela repórter de um jornal que ao final concluiu que “a cor da bola depende dos olhos de quem vê” (Koren, 2018). Uma empresa fabricante de espectrofotômetros e colorímetros (Konica-Minolta, [s.d.]) utilizando-se de um equipamento indicou que a cor da bola de tênis está mais próxima do amarelo que do verde no padrão de cores industrial.

A ideia de um padrão de cores advém da descrição das cores do arco-íris de forma quantitativa por Isaac Newton no “Opticks: Ou, Um Tratado das Reflexões, Refrações, Inflexões e Cores da Luz”. Ao discutir a natureza física da luz identificou as cores ROYGBIV (red, orange, yellow, green, blue, indigo, violet) (Color in a New Light, [s.d.]) fato que gerou conflito com os artistas da época que consideravam as cores como a mistura de 3 pigmentos (red, yellow, blue). Possebbon (2009) no seu trabalho “A Teoria

¹ Bióloga, mestre em Ciências Genômicas e Biotecnologia, analista da Embrapa Agroenergia, rosana.falcao@embrapa.br

² Bióloga, mestre em Biologia Molecular, analista da Embrapa Agroenergia, paula.franco@embrapa.br

³ Biotecnologista, mestre em Biociências, Universidade Federal do Mato Grosso, colaborador da Embrapa Agroenergia, aparecido.aac@gmail.com

⁴ Bióloga, doutora em Biologia Molecular, Universidade de Brasília, colaboradora da Embrapa Agroenergia, glauciaemy@gmail.com

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

⁶ Farmacêutica, doutora em Química, pesquisadora da Embrapa Agroenergia, patricia.oliveira@embrapa.br

⁷ Bióloga, doutora em Ciências, pesquisadora da Embrapa Agroenergia, leia.favaro@embrapa.br

das Cores de Goethe hoje”, ao ler a versão original escrita em alemão, sugeriu que a tradução coerente seria “Doutrina das cores” pois a abordagem qualitativa das cores nos escritos visa a organização de conceitos e o modo de ensinar a fenomenologia das cores. Backhaus (1998) analisa a visão das cores sob os aspectos fisiológicos e psicofísicos de humanos e animais descrevendo o sistema de visão das cores como um encadeamento de ações no qual a luz atinge as células fotorreceptoras dos olhos; que fazem a tradução para os neurônios; que codificam e processam a informação para a psiquê; que julga e toma decisão baseada em sensações/sentimentos e qualifica a cor. O olho possui fotorreceptores de 2 tipos: bastonetes – mais sensíveis a condições de pouca luz e cones – sensíveis sob condições de luz do dia. Como definição, a luz visível é uma forma de onda eletromagnética com comprimentos de ondas entre 400nm e 700nm, onde vermelho corresponde a fótons de luz de comprimento longo (baixa frequência), amarelo e verde intermediários e azul comprimento de onda curto (alta frequência) (Fortner; Meyer, 1997). A visão dita normal das cores está presente em 90% dos homens e 99% das mulheres e passam por mudanças em decorrência da idade, condição psíquica e saúde do indivíduo, bem como pelas alterações da iluminação do objeto e no campo de visão (National Research Council (US) Committee on Vision 1981), pois o olho humano tem limitações para perceber a cor de imagens com baixo nível de contraste e elevada transparência (Fleming; Bülthoff, 2005).

A definição de um espaço contendo todas as cores foi proposto pelo “Commission internationale de l’éclairage” quando criaram o espaço CIE 1931 XYZ (Smith; Guild, 1931), conhecido pelo seu diagrama de cromaticidade se tornando base para os demais espaços com a mesma finalidade de organização de todas as cores. A aparência das cores é quantificada pelo “espaço de cores” no qual está baseado. Alguns espaços de cores conhecidos são: RGB (do inglês Red, Green, Blue) que é uma mistura aditiva de cores – mais usado em meio digital, CMYK (do inglês Cyan, Magenta, Yellow, Key) que é mistura subtrativa de cores – mais usado em sistemas de impressão e pigmentos; e outros como HSV (do inglês Hue, Saturation, Value), HSL (do inglês Hue, Saturation, Lightness) e catálogos comerciais como SCA/Agtron (café) e catálogos de largo uso como Munsell¹ e Pantone²

Algumas plantas e microrganismos possuem uma coloração característica normalmente oriunda de metabólitos cuja cor quando identificada de forma visual sofre total influência do avaliador; ou por uso de colorímetros e espectrofotômetros correndo risco de contaminação durante a manipulação da cultura e a destruição da amostra analisada. A análise da cor de uma amostra biológica sem risco é de grande interesse para uma triagem de materiais produtores de metabólitos coloridos de interesse industrial, mas apresenta grande complexidade para ser descrita a partir da percepção do olho humano. Assim, a análise da cor de imagem digital pode substituir um colorímetro ou espectrofotômetro para vários procedimentos, desde uma triagem de amostras coloridas até uma análise de ensaios colorimétricos em microplaca, tornando-se uma ferramenta útil e de fácil acesso para a rotina laboratorial.

¹ O sistema Munsell de ordenação de cores é utilizado em várias áreas da comunicação visual para padronizar quadros elétricos; na indústria de fabricação de cores de tintas, cor do solo, etc.

² O catálogo Pantone é um sistema para garantir uma reprodução de cores extremamente precisa em todas as superfícies no plano industrial.

Material e Métodos

Neste trabalho foram utilizadas como input das análises duas imagens coloridas no padrão RGB: a “imagem 1” capturada em câmera fotográfica semiprofissional (Nikon) com iluminação externa e a “imagem 2” capturada em equipamento contador de colônias automático, modelo Scan1200 (Interscience), iluminação de LED branca embarcada e software de captura Scan® versão 6.

O guia de análise de imagens foi elaborado utilizando os comandos disponíveis no programa de processamento de imagens científicas ImageJ versão 1.52k, com Java 1.8.0_172 (64-bit) – Public domain, baseado na utilização do programa em análise de imagens científicas (Abramoff et al., 2004). Os gráficos obtidos foram confrontados no catálogo de cores online do aplicativo web ADOBE COLOR para obter o valor de cor correspondente nesse catálogo organizado de cores. O Processamento e Análise Digital de Imagens (PADI) consiste num conjunto de técnicas organizadas em uma sequência padrão de aquisição, processamento e análise (Grande, 2012). Nesse trabalho foram consideradas as fases de aquisição e análise digital de imagens (ADI) concentrada nas etapas de extração de atributos, reconhecimento e classificação dos dados.

Resultados e Discussões

A etapa de aquisição das imagens foi realizada utilizando como material para a análise digital duas placas de Petri (descartáveis, de poliestireno transparente) de culturas de microrganismos produtores de corantes, obtidas da rotina laboratorial. Uma das placas estava completamente colonizada por um fungo filamentosos e a outra por uma linhagem de fungo leveduriforme. A placa de Petri contendo o fungo filamentosos (com a tampa fechada) foi colocada sobre fundo branco e sob iluminação indireta com luz do dia. Em seguida, usando a câmera fotográfica Nikon no modo automático foram capturadas imagens digitais para análise (Figura 1a). A outra placa de Petri contendo o fungo leveduriforme (com a tampa fechada) foi colocada sobre a plataforma do contador automático de colônias modelo Scan1200 e o software Scan_interscience foi executado para captura da imagem. Uma nova seção abre automaticamente mostrando a imagem que foi capturada; usando a opção <Preset parameters> foi selecionado Default parameters, usando top lights, e as imagens foram salvas na opção Export current image (Figura 1b).

As etapas de extração e reconhecimento dos atributos das imagens estão descritas no guia desenvolvido para uso do ImageJ (Tabela 1), onde cada uma das imagens foi aberta separadamente no programa; uma cópia de trabalho foi criada e analisada sob o guia de uso do ImageJ para percepção de cores.

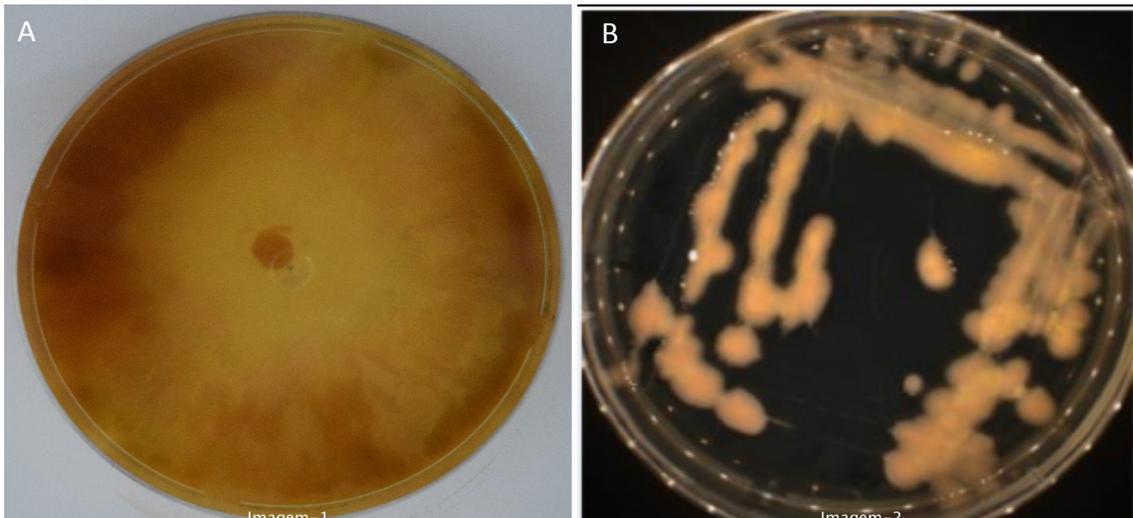


Figura 1. Foto da placa de Petri com cultura de microrganismos. (a) cultura de fungo filamentosos – anverso da placa de Petri (Imagem 1); (b) cultura de fungo leveduriforme – verso da placa de Petri (Imagem 2).

Tabela 1. Guia de análise ImageJ obtido no presente trabalho para análise de imagem digital de microrganismos produtores de corantes cultivados em meio de cultura sólido.

Selecionar a porção da imagem que contenha a área a ser analisada usando os botões do toolbar e eliminar o excesso de informação da imagem.

Selecionar **IMAGE >>CROP**

Selecionar **EDIT>>CLEAR OUTSIDE**

Selecionar a área a ser analisada.

Selecionar **IMAGE>>ADJUST>>COLOR THRESHOLD**

→ Abrirá uma nova janela com os controles e verificar os critérios seleção:

Thresholding method: Default

Threshold color: Red

Color space: HSB

dark background

Ajustar os controles deslizantes de **BRIGHTNESS** e **SATURATION** para colorir de vermelho (RED) a área a ser analisada para identificação de cor.

Clicar no botão **SELECT** uma vez para confirmar a seleção

Obter dados do histograma da área selecionada

Selecionar **ANALYZE>>HISTOGRAM**

→ Abrirá uma nova janela com histogramas correspondentes a seleção.

Clicar o botão **RGB** até mostrar o histograma para cor R separadamente.

Salvar **Histogram-R** no menu superior selecionar: **FILE >> SAVE AS >> (escolher o formato) >> SALVAR**

Clicar o botão **RGB** até mostrar o histograma para a cor G e salvar o histograma.

Clicar o botão **RGB** até mostrar o histograma para a cor B e salvar o histograma.

Os dados dos histogramas obtidos na área selecionada

Count: retrata o número de pixels analisados.

Mode¹: valor de intensidade de cor (0 a 255)² que possui o maior número de ocorrências de pixels com a mesma intensidade.

Obs.: Opcionalmente algumas versões do programa permitem simplesmente colocar o cursor (SETA) no topo da curva e vai aparecer no canto inferior o dado correspondente aquela posição o seguinte dado: **value** = valor de intensidade de cor (0 a 255); **count** = quantidade de pixels desse valor. Considerar esse valor de intensidade de cor com maior número de ocorrências.

¹ Se o número de Mode for igual a 0 ou 255 verificar se realmente representa o topo da curva ou é um valor "outline" que deve ser desconsiderado.

² Onde 0 (zero) corresponde a preto total e o 255 branco total.

Obter a planilha do histograma da cor
 Clicar em **LIST** (em cada histograma separadamente)
 → Abrirá uma nova janela com a planilha
 Lista contendo dados de **value** e **count** considerados para confecção do gráfico. Salvar **planilha** no menu superior selecionar: **FILE >> SAVE AS >> (Histogram.csv) >> SALVAR.**

O colorímetro ou espectrômetro permitem a obtenção de medidas objetivas que possibilitam a identificação da cor utilizando-se e software próprio para análise dos valores obtidos. Entretanto, esse tipo de equipamento tem um recipiente próprio para análise e exige a manipulação da cultura da placa de Petri para retirar fragmentos da área de interesse e colocá-los no suporte adequado para leitura, o que pode ocasionar a contaminação da cultura e a perda da amostra analisada.

Os resultados do campo mode obtidos de cada histograma R , G e B da imagem 1 (Figura 2) e da imagem 2 (Figura 3) na área selecionada da imagem analisada foram anotados separadamente na Tabela 2 para a identificação da cor. A principal função de um histograma é ilustrar a intensidade da luminância da imagem e também dos canais de cores individualmente: O histograma de cada cor fornece uma análise da distribuição de intensidade dentro dos canais de cores individuais.

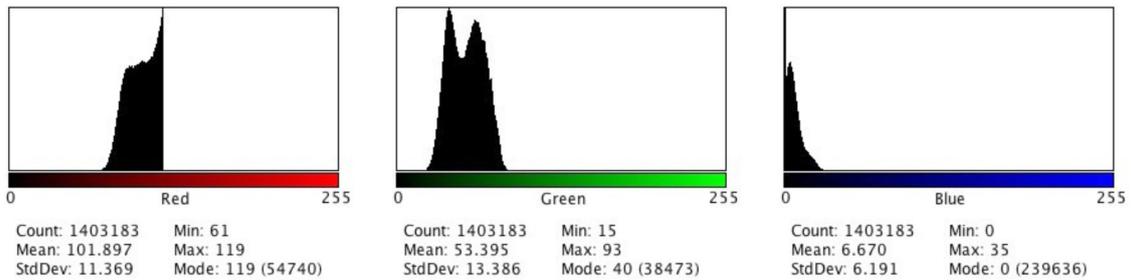


Figura 2. Histogramas Red, Green e Blue da imagem 1, correspondente à imagem de fungo filamentosso crescido em meio de cultura sólido.

Ano calcular o histograma RGB cada canal de cor é considerado como uma imagem

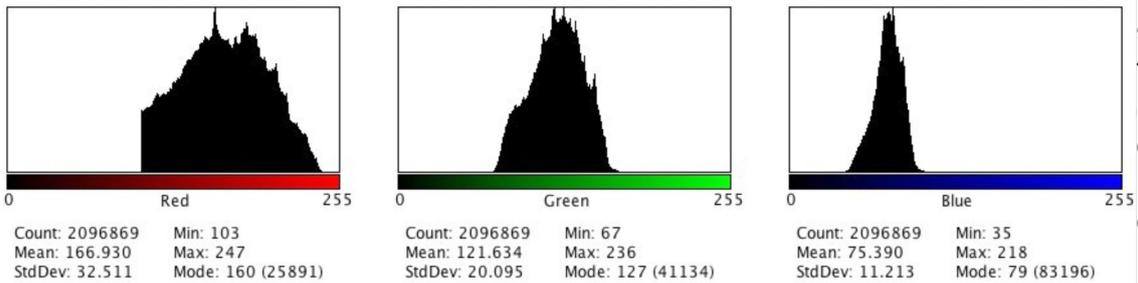


Figura 3. Histogramas Red, Green e Blue da Imagem 2, correspondente a imagem de fungo leveduriforme crescido em meio de cultura sólido.

Tabela 2. Valores de “mode” extraídos dos histogramas de cada imagem.

| mode | Imagem 1 | Imagem 2 |
|-------|----------|----------|
| Red | 119 | 160 |
| Green | 40 | 127 |
| Blue | 0 | 79 |

A cor evidenciada após a utilização do guia para a Imagem 1 é #772800, a qual está no centro da barra de cores análogas da Figura 4, enquanto que para a imagem 2 é #A07F4F, a qual está no centro da barra de cores análogas da Figura 5.

Com a obtenção desses dados iniciais essa cor pode ser transformada em uma cor correspondente em vários outros espaços de cor HSB, HEX, CMYK, LAB ou para catálogos específicos de materiais com densidade e superfície diferentes.

A eficiência da aplicação do guia no processo de identificação das cores está diretamente relacionada as condições de iluminação do objeto no processo de aquisição da imagem, onde o principal ponto é a correta aplicação dos princípios de iluminação do objeto para fotografia e para a identificação de cores. As condições de qualidade da iluminação estão definidas em norma própria (Oliveira, 2006) para avaliação visual de brancura, cor e diferenças de cor.

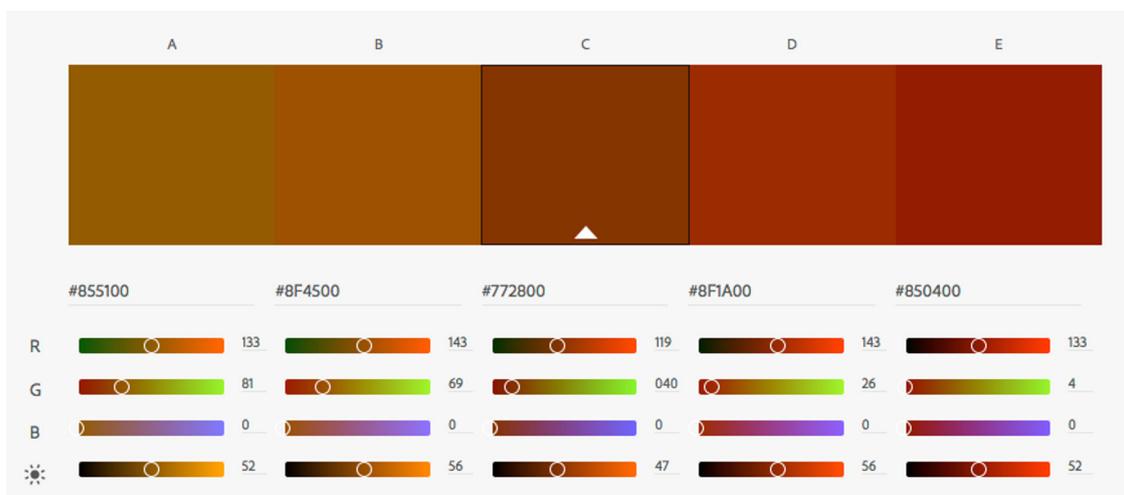


Figura 4. Régua evidenciando as cores análogas harmonizadas no Adobe color correspondente a análise da imagem 1 (fungo filamentososo).

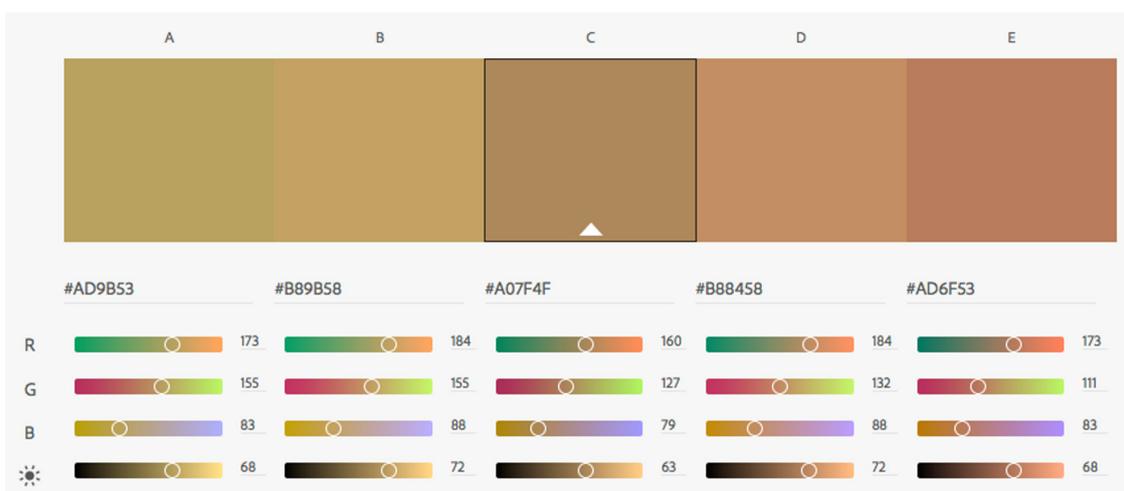


Figura 5. Régua evidenciando as cores análogas harmonizadas do Adobe color correspondente a análise da imagem 2 (fungo leveduriforme).

Considerações Finais

O guia para a percepção das cores construído no presente trabalho pode ser utilizado em etapas iniciais de seleção de microrganismos produtores de corantes. A sua utilização mostrou-se adequada para a aplicação proposta, quando se utiliza material transparente (frascos ou placas de Petri) para o cultivo do microrganismo. A leitura da cor exata ou faixa de cores em recipientes enclausurados, protegidos de contaminação cruzada, com o menor índice de erro dentro de sistemas validados é input para o desenvolvimento, por exemplo, de um sistema de automação semelhante ao sistemas de reconhecimento da cor da pele em uma imagem digital; é uma variável relevante nos programas de reconhecimento facial utilizado em sistemas de segurança (Naji et al., 2012; Shaik et al., 2015; Paracchini et al., 2020); a cor de uma flor é fator de classificação taxonômica em sistemas de reconhecimento de espécies (Rosyani et al., 2018); e a cor diferencial de células é variável determinante nos sistemas de análises clínicas (Laak, Van Der et al., 2000).

No caso específico da seleção de microrganismos produtores de corantes naturais, a observação da coloração das colônias em meio sólido é usada nas etapas iniciais de prospecção de linhagens e é um dos métodos mais utilizados para essa finalidade. O guia desenvolvido no presente trabalho mostrou-se útil para caracterização mais criteriosa das cores das colônias microbianas percebidas visualmente em programas de bioprospecção de linhagens produtoras de corantes naturais para aplicações biotecnológicas.

Referências

- ABRAMOFF, M.D.; MAGALHÃES, P.J.; RAM, S.J. Image processing with ImageJ. **Biophotonics International**, v.11, p.36–42, 2004.
- BACKHAUS, W.G.K. Physiological and Psychophysical Simulations of Color Vision in Humans and Animals. In: BACKHAUS, W.G.K.; KLIEGL, R.; WERNER, J.S. (Ed.). **Color Vision**. Berlin, New York: DE GRUYTER, 1998. p.45–78. DOI: 10.1515/9783110806984.45.
- BURGER, W.; BURGE, M.J. **Digital Image Processing**. London: Springer London, 2008. v.19 574p.DOI: 10.1007/978-1-84628-968-2.
- CHAKI, J.; DEY, N. Histogram-Based Image Color Features. In: **Image Color Feature Extraction Techniques: Fundamentals and Applications**. Singapore: Springer Singapore, 2021. p.29–41. DOI: 10.1007/978-981-15-5761-3_2.
- Color in a New Light**. Disponível em: <<https://library.si.edu/exhibition/color-in-a-new-light>>. Acesso em: 23 jul. 2020.
- FLEMING, R.W.; BÜLTHOFF, H.H. Low-Level Image Cues in the Perception of Translucent Materials. **ACM Transactions on Applied Perception**, v.2, p.346–382, 2005. DOI: 10.1145/1077399.1077409.
- FORTNER, B.; MEYER, T.E. **Number by Colors**. New York, NY: Springer New York, 1997. 374p.DOI: 10.1007/978-1-4612-1892-0.
- GRANDE, J.C. Principles of Image Analysis. **Metallogr. Microstruct. Anal.**, V.1, P.227–243, 2012. DOI: 10.1007/s13632-012-0037-5
- KONICA-MINOLTA. **Que Cor é uma Bola de Tênis?** Disponível em: <<https://sensing.konicaminolta.us/br/blog/que-cor-uma-bola-de-tenis/>>. Acesso em: 31 jul. 2020.
- KOREN, M. What Color Is a Tennis Ball? **The Atlantic**, 2018.
- LAAK, J.A.W.M. VAN DER; PAHLPLATZ, M.M.M.; HANSELAAR, A.G.J.M.; WILDE, P.C.M. DE. Hue-saturation-density (HSD) model for stain recognition in digital images from transmitted light microscopy. **Cytometry**, v.39, p.275–284, 2000. DOI: 10.1002/(SICI)1097-0320(20000401)39:4<275::AID-CYTO5>3.0.CO;2-8.

NAJI, S.A.; ZAINUDDIN, R.; JALAB, H.A. Skin segmentation based on multi pixel color clustering models. **Digital Signal Processing: A Review Journal**, v.22, p.933–940, 2012. DOI: 10.1016/j.dsp.2012.05.004.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL (US) COMMITTEE ON VISION (Ed.). Classification of color vision defects. In: **Procedures for Testing Color Vision: Report of Working Group 41**. Washington (DC): National Academies Press (US), 1981. p.4–13. .

OLIVEIRA, D.F. **Confiabilidade Metrológica e Validação de Procedimentos Espectroradiométricos para Medição de Fontes Luminosas**. 2006. 169p. Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro - RJ,

PARACCHINI, M.; MARCON, M.; VILLA, F.; TUBARO, S. Deep skin detection on low resolution grayscale images. **Pattern Recognition Letters**, v.131, p.322–328, 2020. DOI: 10.1016/j.patrec.2019.12.021.

POSSEBON, E.L. **A teoria das cores de Goethe hoje**. 2009. Universidade de São Paulo, São Paulo. DOI: 10.11606/T.16.2009.tde-10052010-144639.

ROSYANI, P.; TAUFIK, M.; WASKITA, A.A.; APRIYANTI, D.H. Comparison of color model for flower recognition. In: 3RD INTERNATIONAL CONFERENCE ON INFORMATION TECHNOLOGY, INFORMATION SYSTEM AND ELECTRICAL ENGINEERING (ICITISEE)2018, **Anais. IEEE**, 2018. Disponível em: <<https://ieeexplore.ieee.org/document/8721026/>>. Acesso em: 8 jun. 2020 DOI: 10.1109/ICITISEE.2018.8721026.

SHAIK, K.B.; GANESAN, P.; KALIST, V.; SATHISH, B.S.; JENITHA, J.M.M. Comparative Study of Skin Color Detection and Segmentation in HSV and YCbCr Color Space. **Procedia Computer Science**, v.57, p.41–48, 2015. DOI: 10.1016/j.procs.2015.07.362.

SMITH, T.; GUILD, J. The C.I.E. colorimetric standards and their use. **Transactions of the Optical Society**, v.33, p.73–134, 1931. DOI: 10.1088/1475-4878/33/3/301.

Produção de uma xilanase fúngica por *Komagataella phaffii* em biorreator

*Amanda Araújo Souza*¹, *Gisele Soares Anastácio*², *Julia Freitas Daltró Vidal*³, *Sílvia Belém Gonçalves*⁴, *Thaís Fabiana Chan Salum*⁵, *Mônica Caraméz Triches Damaso*⁶

Resumo

As xilanases são enzimas que hidrolisam ligações β -1,4 presentes na hemicelulose que compõe a parede celular vegetal. Essas enzimas são produzidas por bactérias, fungos e plantas. Por apresentarem diversas aplicações, como na fabricação de pães, na indústria farmacêutica, na fabricação de celulose e na geração de biocombustíveis, o objetivo desse trabalho foi escalonar a produção de uma xilanase de origem fúngica (F43 GH 10-03) por *Komagataella phaffii* em biorreatores para futura aplicação biotecnológica. Os cultivos foram realizados com fluxo de ar entre 0,1 a 4,0 vvm, pO_2 fixado em 25%, os inóculos com densidade ótica a 600 nm iniciais fixadas em 2, 4 e 6 e temperatura de 30°C. Após fase de crescimento celular, foi estabelecida uma alimentação com glicose 50% (m/v) (fluxo de 4 g/L/h) por modelo exponencial com fator de crescimento $\mu=0,2$ por 70 h. Inicialmente, a xilanase foi produzida em frascos apresentando atividade de 1,5 UI/mL entre 24 a 72 h de cultivo. A produção da xilanase em biorreator realizada em três condições com DO_{600} inicial fixada em 2, 4 e 6 mostrou que todos os cultivos apresentaram atividade de xilanase a partir de 14,5 h, com secreção de xilanase ascendente, com atividade variando entre 12 e 23 UI/mL, e a DO_{600} variando entre 197 e 234, com produção de proteínas totais entre 0,26 e 0,48 g/L. A análise por eletroforese mostrou uma banda de 55 kDa correspondendo à xilanase F43 GH 10-03. Dos três cultivos realizados, a estratégia com DO_{600} inicial fixada em 4 apresentou a maior atividade específica (70,7 UI/mg de proteína). Essa condição pode ser utilizada para o início de estudos de otimização de produção dessa enzima em biorreator.

Palavras-chave: xilanase, *Komagataella phaffii*, escalonamento, biorreatores.

Introdução

As xilanases são enzimas que realizam a hidrólise da xilana por meio das ligações β -1,4 presentes na hemicelulose que compõe a parede celular vegetal. A xilana junto com a celulose e a lignina formam a parede celular primária e secundária da parede vegetal (Pinto, 2005). As endo β -1,4-xilanases compõem o maior grupo de enzimas que participam da hidrólise da xilana. As endoxilanases são produzidas por diferentes organismos, como bactérias, leveduras, fungos filamentosos e plantas terrestres (Polizeli et al., 2005). As xilanases fúngicas possuem maior aplicação comercial por apresentarem características favoráveis, como atividade em uma ampla faixa de pH,

¹ Bióloga, doutora em Biologia Molecular, colaboradora na Embrapa Agroenergia, amandabernasol@gmail.com

² Bióloga, mestre em Biologia Microbiana, Universidade de Brasília, colaboradora da Embrapa Agroenergia, gisele.sa27@gmail.com

³ Bióloga, mestre em Biologia Molecular, colaboradora na Embrapa Agroenergia, julia.freitasdv@gmail.com

⁴ Engenheira química, doutora em Engenharia Química, pesquisadora da Embrapa Agroenergia, silvia.belem@embrapa.br

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

⁶ Engenheira química, doutora em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos, pesquisadora da Embrapa Agroenergia, monica.damaso@embrapa.br

estabilidade térmica, resistência a proteólise, alta atividade específica e secreção para o meio extracelular, facilitando o processo de obtenção e purificação da enzima (Qiu et al., 2016). As xilanases de origem fúngica apresentam variação de massa molecular entre 7 e 60 kDa, faixa de atividade nos pHs entre 3,5 e 6,0 e em temperaturas de 40 a 60°C (Tan et al., 1987). Essas enzimas também são classificadas segundo sua estrutura primária e os dobramentos dos domínios catalíticos, sendo divididas em diferentes famílias. As endoxilanases então agrupadas nas famílias GH10 e GH11 (Henrissat et al., 1993). As endoxilanases da Família GH10 são enzimas de alta massa molecular com um domínio catalítico acompanhado de um domínio de ligação a carboidratos (CBM), específico para a celulose (Henrissat et al., 1993).

As xilanases apresentam diversas aplicações, como na fabricação de pães, na indústria farmacêutica, na fabricação de papel e celulose e na geração de biocombustíveis, em conjunto com outras enzimas. Apesar de suas inúmeras aplicações industriais, o uso das xilanases com finalidade comercial permanece limitado por diversos fatores, como o alto custo de obtenção das enzimas nativas e baixo rendimento (Sarrouh et al., 2012). Com o desenvolvimento da engenharia genética e de bioprocessos, um novo caminho para produção dessas enzimas se abriu permitindo aplicações de amplo espectro, de forma economicamente mais vantajosa (Datta et al., 2013). A levedura *Komagataella phaffii*, é uma levedura amplamente utilizada na produção de enzimas recombinantes com aplicação biotecnológica e farmacêutica, por secretar grande quantidade de proteínas e atingir altas taxas de densidade celular e possuem maquinaria necessária para realizar modificações pós-traducionais. Portanto, o objetivo deste trabalho foi produzir uma xilanase de origem fúngica (F43 GH 10-03) por *K. phaffii* em biorreatores de bancada.

Material e Métodos

Produção de xilanase em frascos aletados

Um clone da levedura *K. phaffii* expressando a xilanase F43 GH 10-03 contendo o vetor de expressão constitutivo *pGAP α -Xyl10-03* foi crescido em placas contendo o meio YPD/ágar e zeocina (100 μ g/mL). Adicionalmente, um clone de *K. phaffii* contendo o vetor vazio *pGAP α* foi crescido nas mesmas condições e utilizado como controle negativo nos ensaios de expressão em frasco. Uma colônia de cada construção foi inoculada em 5 mL de meio YPD líquido em falcon estéril de 50 mL. Após atingir densidade ótica a 600 nm (DO_{600}) de 1 (EasySelect™ Pichia Expression Kit, ThermoFisher) este foi transferido para frascos de 1 L, contendo 100 mL de meio YPD. Os cultivos foram realizados em shaker a 200 rpm a 30 °C. A cada 24 h, uma alíquota de 1 mL foi retirada, avaliada quanto atividade de xilanase e DO_{600} , e em seguida, a indução foi suplementada com 2% de glicose (m/v), com duração de 72 h.

Produção de xilanase em biorreator de bancada

A produção da xilanase F43 GH 10-03 em biorreator foi realizada a partir do cultivo de um pré-inóculo em frascos aletados de 1 L contendo 100 mL de meio YPD. Após crescimento de 24 h, as células foram inoculadas em biorreatores em diferentes densidades celulares iniciais (DO_{600}): 2, 4 e 6. Para realização desses ensaios foram

utilizados biorreatores Minifors de 2,0 L de capacidade contendo 1 L de meio mineral (Mauher et al., 2006), em cada dorna. Os parâmetros gerais do cultivo foram: pH 5,5, glicose inicial 40 g/L, agitação inicial de 1000 rpm. Após consumo total da fonte de carbono, foi ativada uma cascata com agitação variando entre 100 e 1.200 rpm, para manter a demanda de pO_2 no nível desejado. O fluxo de ar utilizado no sistema foi de 2 vvm (2 litros de ar/minuto/litro de meio) até consumo total da glicose inicial e, posteriormente, na cascata, foi modificado para variar entre 0,1 a 4,0 vvm. O nível de pO_2 dos cultivos foi fixado em 25% (v/v) e as DO_{600} iniciais das fermentações foram fixadas em 2 para a dorna 1; 4 para a dorna 2 e 6 para a dorna 3. Após fase de crescimento celular, iniciou-se a alimentação com glicose 50% (m/v) (fluxo de 4 g/L por hora) por modelo exponencial utilizando-se como fator de crescimento $\mu:0,2$ baseado em dados da literatura (Çalik et al., 2015). O tempo total do cultivo para as três dornas foi de 70 h.

Atividade de xilanase

Para o ensaio foi utilizado o substrato xilana Beechwood (Sigma-Aldrich, EUA) na concentração 7% (m/v) em solução tampão citrato de sódio 100 mmol/L em pH 5,0. A reação foi realizada a partir de 5 μ L de extrato enzimático e 10 μ L da solução de xilana incubada por 15 min a 50 °C. Em seguida, foi adicionado 30 μ L de solução de DNS e a mistura foi aquecida a 95 °C por 10 min. Por fim, adicionou-se 150 μ L de água destilada e transferiu-se 150 μ L do ensaio diluído para uma placa de leitura de 96 poços. Os açúcares redutores produzidos pela reação foram medidos pelo método do DNS (Miller, 1959), com a absorbância medida a 540 nm em leitor de placas. A curva padrão foi construída a partir de uma solução de xilose 10 g/L, utilizando-se diferentes diluições (Miller, 1959). Uma unidade de atividade enzimática (UI) é definida como a quantidade de enzima que produz 1 μ mol de açúcar redutor por minuto, nas condições de ensaio.

Caracterização do cultivo obtido em biorreator

As análises de densidade celular (DO_{600}) foram estimadas por absorbância a 600 nm. Os sobrenadantes do cultivo, utilizados para a quantificação de glicose e proteína foram obtidos por centrifugação a 12.000 x g, por 15 min. A quantificação de glicose foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência – HPLC com detector de índice de refração (RID) em coluna cromatográfica Aminex HPX-87H (Bio Rad). O perfil das proteínas presentes nos sobrenadantes foi caracterizado por eletroforese desnaturante (SDS-PAGE 12%) (Manual Bio Rad) e a coloração das proteínas por prata. A quantificação de proteínas totais dos sobrenadantes foi realizada pelo método BCA (Bicinchoninic acid kit, Sigma). Para a quantificação de proteínas, inicialmente, um procedimento de precipitação desta em amostras do sobrenadante foi realizado com acetona 100% (v/v). As amostras foram pré-incubadas a -20 °C, e a mistura desta com acetona foi incubada por 1 h a -80 °C. Em seguida, as amostras foram centrifugadas (12.000 x g, 30 min), e os precipitados proteicos obtidos foram lavados 1 vez com acetona, secados em temperatura ambiente e ressuspendidos com água destilada na mesma proporção de volume inicial.

Resultados e Discussão

O ensaio de produção da xilanase fúngica F43 GH 10-03 em frascos aletados mostrou que em 24 h, a produção de enzima foi de aproximadamente 1,5 UI/mL (Figura 1A), mantendo-se nessa faixa até 72 h de cultivo, mesmo com a suplementação de glicose 2% (m/v) a cada 24 h. O aumento do crescimento celular foi observado até 48 h, mantendo-se a mesma DO_{600} até o final do cultivo (Figura 1B). Portanto, sugere-se que o tempo máximo de cultivo nessa condição utilizada seja de 48 h.

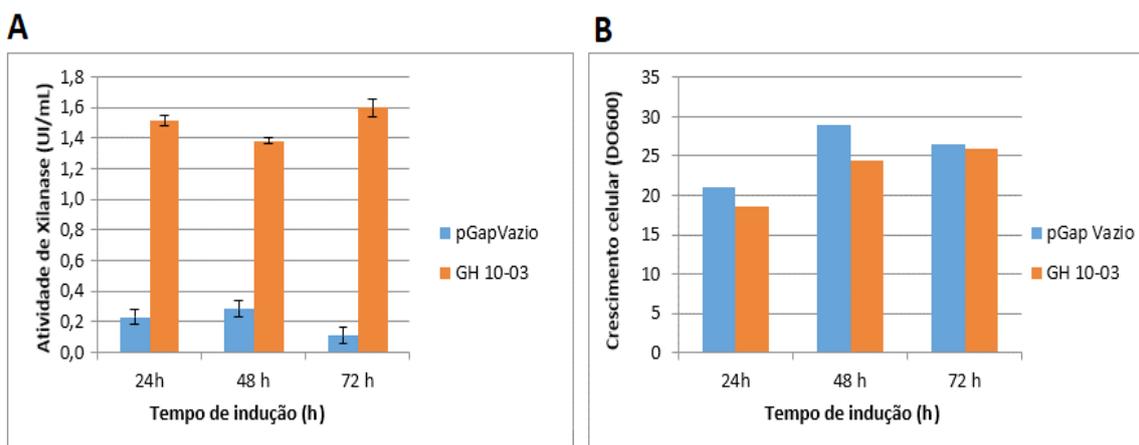


Figura 1. Perfil de produção da xilanase GH 10-03 recombinante (A) e do crescimento celular (B) por *K. phaffii* em meio YPD em 72 h de indução. O controle negativo do experimento foi realizado pelo cultivo de *K. phaffii* contendo o vetor pGapZaA vazio.

A produção da xilanase recombinante em biorreator foi realizada em três condições, variando-se a densidade celular (DO_{600}) inicial dos cultivos em 2, 4 e 6, mantendo-se o nível de pO_2 controlado em 25%. Os resultados obtidos mostraram que todos os cultivos apresentaram atividade de xilanase a partir de 14,5 h de cultivo. O perfil de secreção de xilanase foi ascendente em todos os cultivos, com valores de atividade enzimática variando entre 12 e 23 UI/mL, de densidade celular (DO_{600}) variando entre 197 e 234, e com quantidade máxima de proteína secretada entre 0,26 e 0,48 g/L (Tabela 1). Os resultados obtidos mostraram que dos três cultivos realizados, a estratégia utilizada com DO_{600} inicial de 4 apresentou maior atividade específica (70,7 UI/mg de proteína secretada) (Tabela 1).

Tabela 1. Perfil das fermentações da cepa de *K. phaffii* em biorreator produzindo a xilanase recombinante F43 GH 10-03 com densidade celular inicial dos cultivos em 2, 4 e 6, e níveis de pO_2 controlados em 25% (v/v).

| Xilanase | Tempo (horas) | DO_{600} Inicial | DO_{600} Final | Proteína total g/L | Atividade total (UI/mL) | Atividade específica (UI/mg ptn) |
|----------|---------------|--------------------|------------------|--------------------|-------------------------|----------------------------------|
| Dorna 1 | 70,0 | 2 | 197,3 ± 2,6 | 0,48 ± 0,01 | 12,6 ± 0,3 | 26,2 ± 0,3 |
| Dorna 2 | 70,0 | 4 | 230,6 ± 6,3 | 0,26 ± 0,02 | 18,4 ± 0,4 | 70,7 ± 0,4 |
| Dorna 3 | 70,0 | 6 | 234,6 ± 8,7 | 0,46 ± 0,01 | 23,1 ± 0,1 | 50,2 ± 0,1 |

Os resultados obtidos mostraram que houve consumo da fonte de carbono adicionada aos cultivos até 60 h. Após essa etapa, houve acúmulo de glicose em todas as dornas entre 20 e 25 g/L (dados não mostrados), portanto, o fator de alimentação utilizado neste cultivo pode ser reduzido para concentrações menores que 4 g/L por hora. Ao longo dos cultivos houve crescimento celular de forma ascendente até 70 h, com produção de proteínas solúveis (dados não mostrados). Em todos os cultivos foi observada produção de xilanase recombinante, com bandas mais pronunciadas da xilanase recombinante nos cultivos com DO_{600} inicial de 4 e 6. Os resultados obtidos por eletroforese mostraram que somente duas bandas proteicas foram secretadas por *K. phaffii*, sendo a banda de aproximadamente 55 kDa correspondente à xilanase F43 GH 10-03 (Figura 2). A produção da enzima nos três cultivos foi maior entre 48,5 a 70 h (dados não mostrados).

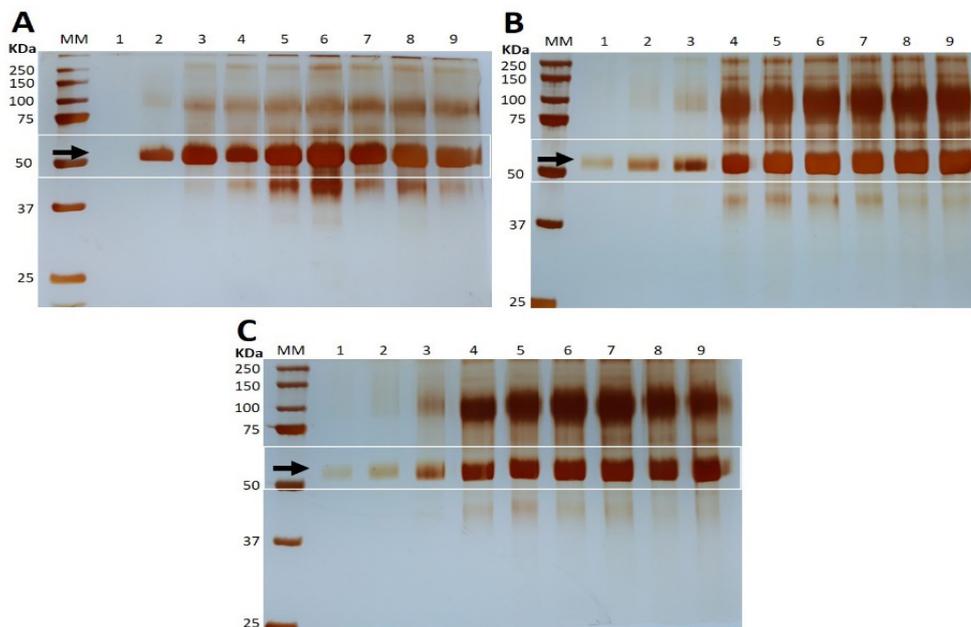


Figura 2. Perfil eletroforético de proteínas solúveis presente no sobrenadante de *K. phaffii* expressando a xilanase F43 GH 10-03 em biorreatores com diferentes densidades celulares (DO_{600}) iniciais. A) Eletroforese do cultivo com DO_{600} inicial 2. B) Eletroforese do cultivo com DO_{600} inicial 4. C) Eletroforese do cultivo com DO_{600} inicial 6. O volume de amostra do sobrenadante aplicado no gel foi de 10 μ L. Raia 1- 14,5 h; raia 2- 17,5 h; raia 3- 23,5 h; raia 4- 39,5 h; raia 5- 42,5 h; raia 6- 48,5 h; raia 7- 51,5 h; raia 8- 66,5 h e raia 9- 70,0 h. Marcador molecular (MM) Bio Rad - Dual Xtra Standards (2- 250 kDa). As setas pretas indicam a banda da xilanase F43 GH 10-03 com 55 kDa.

Conclusão

Os resultados obtidos na produção e escalonamento da xilanase recombinante por *K. phaffii* mostraram que levedura produziu a enzima com atividade em todos os cultivos realizados em biorreator, a partir de 14,5 h, apresentando maior atividade específica de xilanase de 70,7 UI/mg de proteína no cultivo com DO_{600} inicial fixada em 4. Nesta condição uma banda proteica com 55 kDa foi observada correspondendo à xilanase

recombinante. Adicionalmente, o cultivo com DO_{600} inicial fixada em 4 apresentou crescimento celular semelhante ao cultivo com DO_{600} inicial fixada em 6, o que reforça que essa condição pode ser utilizada para o início de estudos de otimização de produção dessa enzima em biorreator.

Agradecimentos

Este trabalho foi desenvolvido no âmbito do projeto YEASTZYME, financiado pelo Banco Nacional de Desenvolvimento Econômico e Social (BNDS) e pelo Centro de Tecnologia Canavieira (CTC).

Referências

- DATTA, S.; CHRISTENA, L. R.; RAJARAM, Y. R. S. Enzyme immobilization: an overview on techniques and support materials. **3 Biotech**, v. 3, p. 1-9, 2013.
- HENRISSAT, B.; BAIROCH, A. New families in the classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. **Biochemical Journal**, v. 293, p. 781-788, 1993.
- MAURER, M.; KUEHLEITNER, M.; GASSER, B.; MATTANOVICH, D. Versatile modeling and optimization of fed batch processes for the production of secreted heterologous proteins with *K. phaffii*. **Microbial Cell Factory**, v. 5, p. 37-47, 2006.
- MILLER, G. L. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, p. 426-428, 1959.
- PINAR, Ç.; ATA, Ö.; GÜNES, H.; MASSAHI, A.; BOYA, E.; KESKINA, A.; ÖZTÜRK, S.; ZERZEA G. H.; ÖZDAMAR T. H. Recombinant protein production in *Pichia pastoris* under glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase promoter: From carbon source metabolism to bioreactor operation parameters. **Biochemical Engineering Journal**, v. 95, p. 20-36, 2015.
- PINTO, G. A. S. et al. Fermentação em Estado Sólido: Uma Alternativa para o Aproveitamento e Valorização de Resíduos Agroindustriais Tropicais. Fortaleza, CE, **Embrapa**, comunicado técnico, p. 1-8, 2005.
- POLIZELI, M. L. T. M.; RIZZATTI, A. C. S.; MONTI, R.; TERENCE, H. F.; JORGE, J. A.; AMORIM, D. S. Xylanases from fungi: properties and industrial applications. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 67, p. 577-591, 2005.
- QIU, J.; HAN, H.; SUN, B.; CHEN, L.; YU, C.; PENG, R.; YAO, Q. Residue mutations of xylanase in *Aspergillus kawachii* alter its optimum pH. **Microbiological research**, v. 182, p. 1-7, 2016.
- SARROUH, B.; SANTOS, T. M.; MIYOSHI, A.; DIAS, R.; AZEVEDO, V. Up-to-date insight on industrial enzymes applications and global market. **Journal of Bioprocessing & Biotechniques**, v. 2012, p. 1-10, 2012.
- TAN, L.U.L.; MAYERS, P.; SADDLER, J.N. Purification and characterization of a thermostable xylanase from a thermophilic fungus *Thermoascus aurantiacus*. **Journal Microbiology**, v. 33, p. 689-692, 1987.

Produção heteróloga e caracterização funcional das expansinas de cana-de-açúcar SacEXP4 e SacEXP7

Kelly Barreto Rodrigues¹, Amanda Araújo Souza², Jéssica de Sá Guimarães Peixoto³, Caio de Oliveira Gorgulho Silva⁴, Larissa Andreani⁵, Thaís Demarchi Mendes⁶, Leonardo Valadares⁷, Patrícia Verardi Abdelnur⁸, Fabrício Machado Silva⁹, Sílvia Belém Gonçalves¹⁰, Dasciana de Sousa Rodrigues¹¹, Thaís Fabiana Chan Salum¹², Monica Caraméz Trichez Damaso¹³, Léia Cecília de Lima Fávoro¹⁴

Resumo

As expansinas são proteínas encontradas em diferentes organismos e especialmente em plantas. Elas estão envolvidas em vários processos e atuam no rompimento das ligações não covalentes entre as microfibrilas de celulose por um mecanismo não enzimático, levando ao afrouxamento e extensão da fibra. Elas têm sido investigadas como um aditivo na sacarificação de lignocelulose e para modificação das propriedades físicas da celulose, entre outras aplicações (papel e celulose, rações, têxtil). Ainda não há expansinas de plantas comercialmente disponíveis, em parte devido à dificuldade de produção heteróloga dessas proteínas. Assim, é necessário viabilizar a produção recombinante de expansinas de plantas em microrganismos em quantidade suficiente para aplicações diversas. O objetivo deste trabalho foi produzir heterologicamente duas novas expansinas de cana-de-açúcar e caracterizá-las funcionalmente. As expansinas SacEXP4 (β -expansina) e SacEXP7 (α -expansina) foram produzidas por *Pichia pastoris* X-33 e o extrato proteico dialisado e concentrado contendo as expansinas foi aplicado em testes de sacarificação de bagaço de cana pré-tratado pelo método organosolv e em testes de extensibilidade de fibras de papel filtro. A β -expansina SacEXP4 apresentou um efeito positivo na liberação de açúcar redutor total na sacarificação de bagaço organosolv com celulase comercial, porém esse efeito foi similar ou menor do que o efeito de uma proteína de sacrifício tal como BSA. As expansinas recombinantes SacEXP4 e SacEXP7 têm a capacidade de romper as ligações de hidrogênio do substrato em pH 4,8 a 30°C. A redução da força tênsil da celulose do papel filtro foi mais pronunciada para a β -expansina SacEXP4 e foi semelhante ao controle positivo (ureia 8M). As expansinas recombinantes SacEXP4 e SacEXP7 são ativas e podem ser aplicadas (conforme testado) sem a necessidade de purificação, para diminuir a resistência à tração de fibras de celulose, como as que compõem o papel filtro ou outros tipos de materiais celulósicos.

¹ Bióloga, doutora em Biologia Molecular, Universidade de Brasília, colaboradora da Embrapa Agroenergia, kellybiobarreto@gmail.com

² Bióloga, doutora em Biologia Molecular, Universidade de Brasília, colaboradora da Embrapa Agroenergia, amandhacoelho@gmail.com

³ Bióloga, doutora em Tecnologias Química e Biológica, Universidade de Brasília, colaboradora da Embrapa Agroenergia, jessica_guimaraes15@hotmail.com

⁴ Biólogo, doutor em Biologia Molecular, Universidade de Brasília, colaborador da Embrapa Agroenergia, caio.gorgulho@gmail.com

⁵ Química, doutora em Química, analista da Embrapa Agroenergia, larissa.andreani@embrapa.br

⁶ Bióloga, mestre em Microbiologia Aplicada, analista da Embrapa Agroenergia, thais.demarchi@embrapa.br

⁷ Químico, doutor em Química, pesquisador da Embrapa Agroenergia, leonardo.valadares@embrapa.br

⁸ Química, doutora em Química, pesquisadora da Embrapa Agroenergia, patricia.abdelnur@embrapa.br

⁹ Engenheiro Químico, doutor em Engenharia Química, professor da Universidade de Brasília, fmachado@unb.br

¹⁰ Engenheira Química, doutora em Engenharia Química, pesquisadora da Embrapa Agroenergia, silvia.belem@embrapa.br

¹¹ Química Industrial, doutora em Engenharia Química, pesquisadora da Embrapa Agroenergia, dasciana.rodrigues@embrapa.br

¹² Farmacêutica, doutora em Bioquímica, pesquisadora da Embrapa Agroenergia, thais.salum@embrapa.br

¹³ Engenheira Química, doutora em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos, pesquisadora da Embrapa Agroenergia, monica.damaso@embrapa.br

¹⁴ Bióloga, doutora em Ciências, pesquisadora da Embrapa Agroenergia, leia.favaro@embrapa.br

Palavras-chave: expansinas, *Saccharum*, *Pichia pastoris*, *Komagataella phaffii*, força tênsil, hidrólise enzimática.

Introdução

A cana-de-açúcar (complexo *Saccharum*) é a principal matéria-prima utilizada para o desenvolvimento de biorrefinarias de lignocelulose no Brasil, não somente pela conhecida produção de biocombustível (etanol de primeira e segunda geração), açúcar, bioeletricidade, biomassa para ração animal, mas também pela obtenção de diversos outros produtos (Conab, 2019). A disponibilidade de informações da sequência genômica da cana-de-açúcar tem facilitado a caracterização funcional de genes e de proteínas visando a alta produtividade e qualidade desta cultura.

As expansinas são proteínas encontradas em diferentes organismos e especialmente em plantas. Elas estão envolvidas em vários processos e atuam no rompimento das ligações não covalentes entre as microfibrilas de celulose por um mecanismo não enzimático, levando ao afrouxamento e extensão da fibra (Santiago et al., 2018). Devido a essas características, elas têm sido investigadas não somente como um aditivo na sacarificação enzimática de biomassa lignocelulósica (o afrouxamento causado pelas expansinas pode facilitar o acesso das celulasas às microfibrilas), mas também para modificação das propriedades físicas da celulose, entre diversas outras aplicações na indústria química, de papel e celulose, de rações e têxtil. No entanto, ainda não há expansinas de plantas comercialmente disponíveis, em parte devido à dificuldade de produção heteróloga dessas proteínas. De fato, sua extração na forma nativa a partir de plantas não é viável pois estão presentes em pequenas quantidades nos tecidos vegetais. Assim, há uma grande necessidade por meios e métodos que viabilizem a produção recombinante de expansinas de plantas em microrganismos em quantidade suficiente para aplicações diversas.

O grupo de pesquisa da Embrapa Agroenergia identificou mais de 90 genes codificadores de expansinas de diferentes famílias no genoma da cultivar de cana-de-açúcar SP80-3280 (Santiago et al., 2018). Também foram identificados dois genes codificadores das β -expansinas SacEXP82 e SacEXP49, que apresentaram expressão gênica preferencial nos tecidos do colmo de plantas adultas (8 meses) da cultivar RB867515 (Pereira et al., 2017). Estas duas β -expansinas foram posteriormente produzidas por *Pichia pastoris* (reclassificada como *Komagataella phaffii*) e caracterizadas funcionalmente. Elas foram capazes de alterar as propriedades físicas da celulose por meio de diminuição significativa da força tênsil de fibras de celulose tratadas com extratos proteicos enriquecidos com essas expansinas (Peixoto, 2019).

O presente trabalho teve como objetivo dar continuidade à caracterização de expansinas de cana-de-açúcar. Uma β -expansina (SacEXP4) e uma α -expansina (SacEXP7) altamente expressas nos tecidos de folhas jovens (2 meses) da cultivar SP80-3280 foram produzidas por *P. pastoris*. Em seguida, extratos proteicos enriquecidos com as novas expansinas foram aplicados em ensaios de hidrólise enzimática de bagaço de cana pré-tratado por método organosolv em condições laboratoriais. Também são apresentados resultados sobre a alteração das propriedades físicas de papel filtro tratado com as novas expansinas recombinantes.

Material e Métodos

Síntese de genes, seleção de transformantes e cultivo em biorreator

Duas expansinas altamente expressas nos tecidos de folhas jovens da cultivar SP80-3280 (β -expansina SacEXP4 e α -expansina SacEXP7) (Santiago et al., 2018) foram escolhidas para produção heteróloga e caracterização funcional. As sequências codificadoras foram selecionadas na base de dados do GenBank (acessos MG204192.1 e MG204152.1) e o DNA complementar (cDNA) foi sintetizado quimicamente de acordo com a seguinte estratégia: vetor de expressão pPICZB, peptídeo sinal nativo, cDNA sintético (sequência nativa), códon de parada nativo. Essa construção permite que a proteína madura secretada pela levedura recombinante não contenha em sua região C-terminal o peptídeo composto pelo epítipo myc e pela cauda de afinidade por histidina (cauda de poli histidina). Os plasmídeos recombinantes foram transformados em células de *Escherichia coli* DH10B. Posteriormente foram purificados, linearizados com a endonuclease *PmeI* e transformados em células de *P. pastoris* X-33 (reclassificada como *Komagataella phaffii*) de acordo com o procedimento padrão descrito em EasySelect™ Pichia Expression Kit (Invitrogen).

Os transformantes validados por PCR (com primers 5' AOX e 3' AOX) foram cultivados em condições indutoras da expressão gênica (metanol), com o objetivo de avaliar a secreção das proteínas. Após a triagem de dezenas de transformantes por SDS-PAGE foram selecionadas duas linhagens que produziram as expansinas recombinantes: *P. pastoris*_pPICZB_SacEXP4 T1 e *P. pastoris*_pPICZB_SacEXP7 T2.

O cultivo das linhagens selecionadas e da linhagem controle (*P. pastoris* X-33 transformada com o vetor vazio pPICZB) foi realizado em biorreatores LabFors 5 (INFORS) com 3,6 L de capacidade, contendo 1,5 L de meio mineral de sais. As condições de cultivo foram as seguintes: pH 5,5, 30°C, agitação inicial em 800 rpm e, após obtenção de biomassa, agitação em cascata entre 600 e 1.200 rpm, fluxo de ar controlado em 1 vvm (litros de ar/minuto/ litro de meio) e concentração de pO₂ fixada em 25%. Para obtenção de biomassa, foram adicionados 40 g/L de glicerol. Em seguida, os cultivos foram suplementados em duas etapas: após finalização do glicerol inicial, iniciou-se a fase de transição, adicionando-se glicerol e metanol na concentração de 1 g/L, em seguida 2 g/L, e por último somente metanol (5 g/L). Essa fase de transição durou em média 5 horas. Em seguida, foi iniciada a fase de indução por metanol, sendo adicionados pulsos de metanol (entre 10 e 20 g/L).

Os sobrenadantes contendo as expansinas recombinantes (bem como o sobrenadante da linhagem controle) foram concentrados [entre 10 e 20 vezes] e dialisados em água (5 vezes) em concentrador Amicon (Millipore) com membrana de polietersulfona de 5 kDa. As amostras foram analisadas por SDS-PAGE e a proteína total foi quantificada utilizando kit comercial do ácido bicinônico (BCA), com albumina de soro bovino (BSA) como padrão de proteína. Os extratos proteicos enriquecidos nas expansinas SacEXP4 e SacEXP7 foram utilizados em diferentes testes.

Confirmação da identidade das expansinas recombinantes por análise proteômica (espectrometria de massas)

Além da análise eletroforética (SDS-PAGE), também foi realizada a análise proteômica (de bandas de gel recortadas) para confirmação da identidade das expansinas recombinantes. No caso, as bandas foram recortadas a partir de gel de poliacrilamida desnaturante corado com Comassie. Essa análise foi realizada por empresa prestadora de serviço na área de proteômica (GENONE). Os dados foram analisados com auxílio do software Proteome Discoverer v2.1 (Thermo Fisher Scientific) usando como base de dados todas as entradas associadas a *Saccharum* existentes na base de dados UniProt.

Efeito das expansinas recombinantes de cana-de-açúcar SacEXP4 e SacEXP7 na sacarificação de substrato celulósico

Os extratos proteicos enriquecidos contendo as expansinas recombinantes SacEXP4 e SacEXP7 foram avaliados na hidrólise do bagaço de cana pré-tratado pelo método organosolv, conforme metodologia desenvolvida na Embrapa Agroenergia. A proteína BSA foi incluída como controle para corrigir efeitos inespecíficos sobre a atividade da celulase. O extrato proteico da cepa controle também foi incluído na análise. Na avaliação da hidrólise do bagaço de cana pré-tratado, os experimentos foram realizados com 5 mg/mL de biomassa incubada a 900 rpm e 30°C. No ensaio de pré-tratamento, a biomassa foi incubada com extrato proteico concentrado ou BSA (10 mg/g) por 24 h. Após a incubação, a celulase comercial Cellulast (0,48 FPU/g) foi adicionada e a reação foi mantida na mesma temperatura por 24 h. Nos ensaios de sinergismo, adicionou-se extrato proteico concentrado ou BSA em combinação com a celulase comercial e incubou-se durante 24 h.

Determinação da força tênsil e deformação de papel de filtro tratado com as expansinas recombinantes

A influência das expansinas recombinantes na tensão máxima e deformação de papel filtro após incubação foi avaliada utilizando a Máquina Universal de Ensaio AROTEC WDW-20E. Tiras de papel filtro Whatman nº 3 foram cortadas (2 cm x 7 cm) e incubadas a 30°C por 1 h em tampão acetato de sódio 50 mmol/L (pH 4,8) contendo 1,2 mg/mL de cada extrato enriquecido. A força tênsil de tiras de papel filtro Whatman nº3 incubadas em tampão acetato de sódio com 1,2 mg/mL de BSA e tampão acetato de sódio com Uréia 8 mol/L também foi avaliada, como controles negativo e positivo, respectivamente. Após o período de incubação, as tiras de papel foram retiradas do meio tamponado e diretamente fixadas às garras da Máquina Universal de Ensaio. Todas as medidas de tensão foram realizadas utilizando uma célula de carga de 50 kgf, distância entre garras de 40 mm e velocidade de deslocamento das garras de 0,5 mm/min. Ao menos 5 corpos de prova foram utilizados para cada condição e os desvios padrão foram calculados. Para a comparação das médias foi utilizado o teste de Tukey com nível de confiança de 95%.

Resultados e Discussão

Produção heteróloga das expansinas SacEXP4 e SacEXP7 por *P. pastoris* X-33

As sequências de cDNA das expansinas de cana-de-açúcar SacEXP4 e SacEXP7 foram clonadas no vetor de expressão pPICZB (com peptídeo sinal nativo; sem uma cauda de afinidade na região C-terminal). Transformantes de *P. pastoris* X-33 resistentes a zeocina foram recuperados e confirmados por análise de PCR (Figura 1).

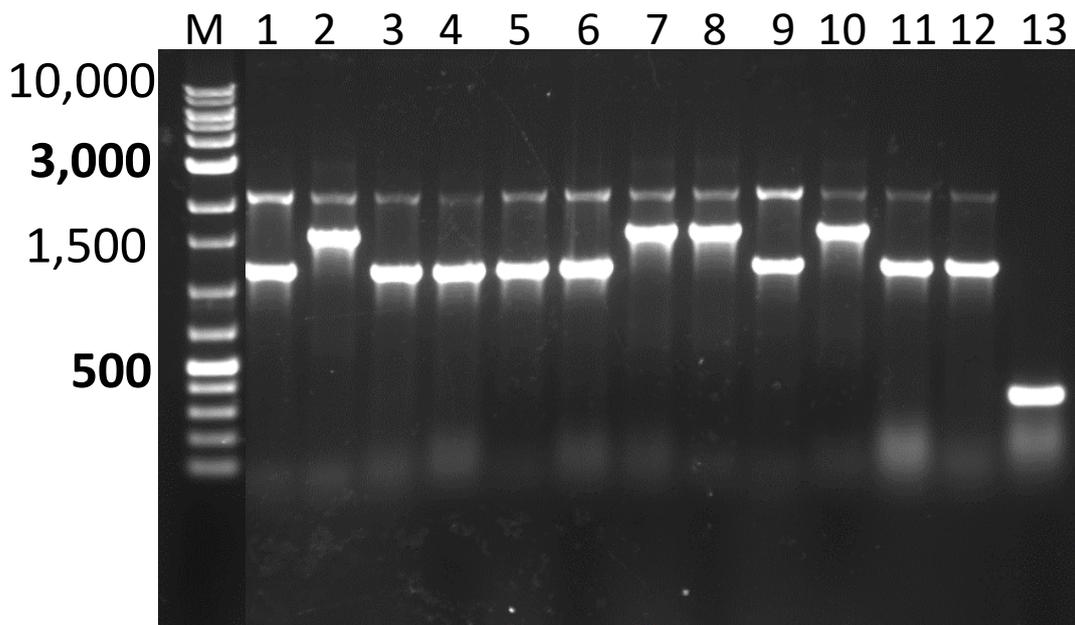


Figura 1. Eletroforese em gel de agarose 1% mostrando o resultado da amplificação por PCR de colônia das expansinas de cana-de-açúcar SacExp4 (linhas 1 a 6 mostram diferentes transformantes avaliados) e SacEXP7 (linhas 7 a 12 mostram diferentes transformantes avaliados). Linha 13: PCR de colônia da linhagem controle transformada com o vetor vazio pPICZB. M - 1 Kb Ladder Plus (Sinapse Inc.).

Como esperado, foram visualizados dois fragmentos: um corresponde ao promotor AOX1 (2.200 pb) e o outro corresponde ao tamanho das sequências alvo (SacEXP4 - 837 pb; SacEXP7 - 804 pb), acrescidas de 323 pb (provenientes do vetor), resultando em fragmentos de aproximadamente 1.200 pb (marcados na Figura 1). Os transformantes confirmados por PCR foram cultivados em meio contendo metanol e o perfil de proteínas secretadas foi avaliado por SDS-PAGE (Figura 2).

Conforme observado na Figura 2, as duas expansinas provavelmente migraram no gel como bandas de massa superior (entre 55 e 100 kDa) a prevista para a proteína secretada (aproximadamente 28,38 kDa para SacEXP4 e 26,45 kDa para SacEXP7, calculadas com a ferramenta Compute pI/Mw ExPASy). Essas diferenças podem ser devidas a modificações pós-traducionais realizadas por *P. pastoris* X-33. De fato, algumas expansinas e expansinas-like expressas em *P. pastoris* migram no gel com massas superiores as previstas ou mesmo como múltiplas bandas de massas distintas, inclusive algumas expansinas da própria cana-de-açúcar (Peixoto, 2019).

Para confirmar a identidade das expansinas recombinantes, foi feita a análise proteômica das prováveis bandas (para esta análise foram escolhidas as bandas entre 55 e 70 kDa) correspondentes as expansinas SacEXP4 e SacEXP7 recortadas do gel de poliacrilamida desnaturante corado com Comassie (Figura 3).

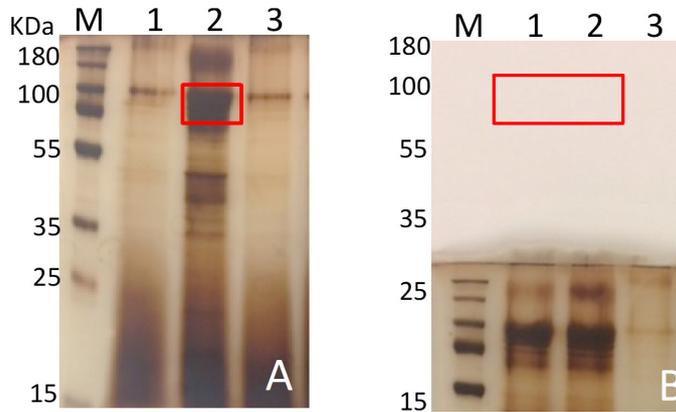


Figura 2. Análise em gel de poliacrilamida desnaturante 12%, corado com nitrato de prata, do sobrenadante do cultivo (72 h) de transformantes produtores das expansinas SacEXP4 (A) e SacEXP7 (B). M - Marcador PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder, 10 to 180 kDa – Thermo Scientific. (A) M - marcador; linhas 1 e 2 - o sobrenadante do cultivo de transformantes produtores da SacEXP4; linha 3 – sobrenadante da linhagem controle (contendo vetor pPICZB vazio). (B) M – marcador; linhas 1 e 2 - sobrenadante do cultivo de transformantes produtores da SacEXP7; linha 3 – sobrenadante da linhagem controle (vetor pPICZB vazio).

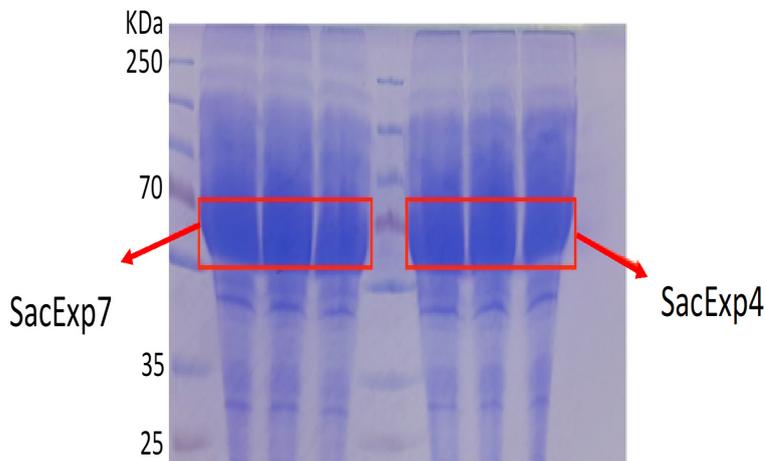


Figura 3. Análise de SDS-PAGE (gel de poliacrilamida desnaturante corado com Comassie) realizada para recorte das bandas que foram analisadas por técnicas de proteômica para confirmação da identidade das expansinas SacEXP4 e SacEXP7. Em cada poço foram aplicados 64 μ g de proteína, em 3 poços separados cada proteína. O cultivo que originou o sobrenadante avaliado é o mesmo obtido a partir do cultivo em biorreatores. M - Marcador PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder, Thermo Scientific.

Os resultados da análise proteômica da provável banda correspondente a SacEXP4 (massa entre 55 e 70 kDa) revelaram alta identidade de peptídeos com uma expansina denominada “Expansin 36” pertencente a “Saccharum hybrid cultivar”. Enquanto que a análise da provável banda referente a SacEXP7 mostrou identidade com a “Expansin

82" de *Saccharum* (accession number A0A2H4YIR5). Esses dados confirmam que os transformantes selecionados (*P. pastoris*_pPICZB_SacEXP4 T1 e *P. pastoris*_pPICZB_SacEXP7 T2) secretam as expansinas recombinantes.

Efeito das expansinas recombinantes na sacarificação de bagaço de cana

Os extratos proteicos concentrados e dialisados contendo as expansinas recombinantes SacEXP4 e SacEXP7 foram avaliados na hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado pelo método organosolv (Figura 4). Os resultados mostraram que a adição dos extratos contendo as expansinas recombinantes não resultou em aumento significativo de açúcares redutores no final da hidrólise no ensaio de sinergismo (Figura 4), em comparação com os controles, nas condições utilizadas (baixa carga enzimática: 0,48 FPU/g de bagaço). No entanto, no ensaio denominado pré-tratamento, observou-se que a adição da expansina recombinante SacEXP4 na hidrólise resultou em aumento significativo de açúcar redutor total (teste de comparação de médias, $\alpha=0,05$) em comparação com pelo menos dois dos três controles experimentais utilizados (Figura 4).

A extensão da melhoria na hidrólise da biomassa lignocelulósica com a adição de proteínas acessórias como as expansinas ou outras proteínas é altamente dependente do tipo de substrato e pré-tratamento, do teor de sólidos, bem como da fonte e da quantidade de celulase utilizada. De maneira geral, os dados obtidos mostraram que, em uma das condições de hidrólise utilizadas (ensaio de pré-tratamento), a expansina SacEXP4 apresentou um efeito positivo na liberação de açúcar redutor total na sacarificação enzimática de bagaço de cana organosolv, porém esse efeito foi similar ou menor do que o efeito de uma proteína de sacrifício tal como BSA (Figura 4). Assim como observado no presente trabalho, alguns estudos relataram uma ausência de interação sinérgica entre celulases e expansina/expansina-like, ou que o sinergismo não foi significativamente maior do que o observado quando uma proteína controle como BSA é usada na hidrólise (Liu et al., 2015).

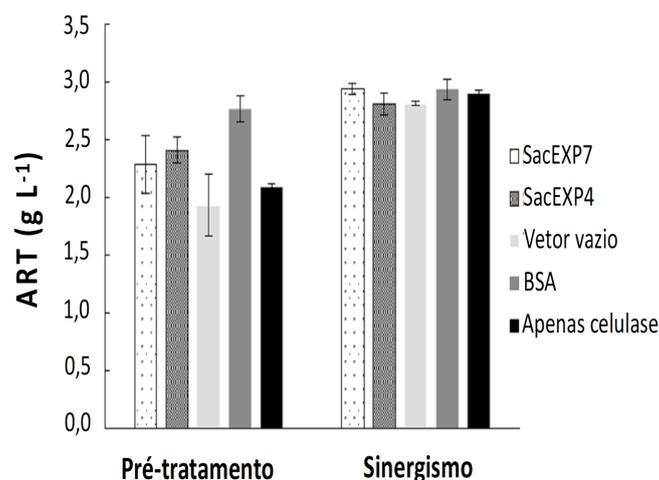


Figura 4. Efeito de expansinas recombinantes de cana-de-açúcar (β -expansina SacEXP4 e α -expansina SacEXP7) na sacarificação de bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado por método organosolv, utilizando dois tipos de ensaio, denominados "pré-tratamento" e "sinergismo". Os testes foram realizados em triplicata utilizando extratos proteicos enriquecidos com as respectivas proteínas; e as barras de erro indicam as médias \pm desvio padrão (teste de comparação de médias, com $\alpha=0,05$).

Portanto, outras condições devem ser avaliadas, a fim de investigar o potencial sinérgico das expansinas recombinantes obtidas no processo de sacarificação. No presente trabalho, outras aplicações foram testadas para indicar o melhor uso das expansinas recombinantes da cana-de-açúcar, por exemplo, foi avaliada a capacidade dessas proteínas de causar mudanças nas propriedades físicas das fibras de celulose.

Determinação da força tênsil e deformação de papel filtro tratado com as expansinas

A avaliação da resistência à tração de papel filtro incubado com extrato proteico contendo SacEXP4 e SacEXP7 foi realizada para verificar se estas expansinas possuem um efeito de “afrouxamento” do substrato celulósico devido à ruptura de pontes de hidrogênio. A Figura 5 apresenta uma comparação da resistência à tração do substrato celulósico (Whatman Filter Paper nº 3) tratado com BSA (controle negativo), SacEXP4, SacEXP7 e ureia 8M (controle positivo) em pH 4,8, 30°C por 1 h.

A aplicação da β -expansina SacEXP4 resultou em amostras de papel filtro com uma redução de aproximadamente 42% nos valores de tensão máxima, em comparação com o controle negativo (Figura 5). Esse resultado mostra que o efeito de SacEXP4 é pronunciado e similar ao obtido por Artzi et al. (2016) para a expansina-like Cc/EXL1 da bactéria *Clostridium clariflavum* e por Peixoto (2019) para a β -expansina recombinante SacEXP82 de cana-de-açúcar. A aplicação da α -expansina SacEXP7 levou a uma redução de aproximadamente 31% na tensão máxima quando comparada ao controle negativo. Este efeito é comparável ao observado por Kim et al. (2009) para a expansina-like EXLX1 de *Bacillus subtilis* e por Peixoto (2019) para a β -expansina recombinante SacEXP49 de cana-de-açúcar em condições de ensaio idênticas.

Conclusão

As expansinas de cana-de-açúcar SacEXP4 e SacEXP7 produzidas por *P. pastoris* X-33 mostraram-se funcionalmente ativas.

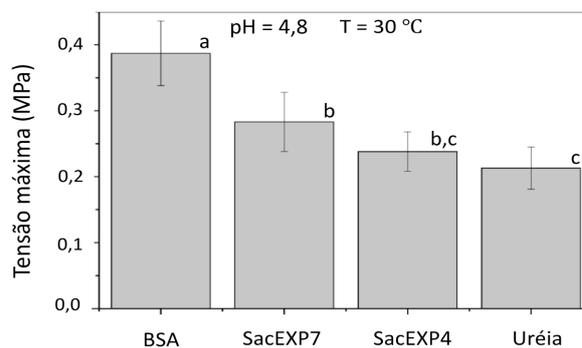


Figura 5. Comparação da resistência à tração de um substrato celulósico (papel de filtro Whatman No. 3) tratado com BSA (controle negativo), SacEXP4, SacEXP7 e ureia 8M (controle positivo). Médias seguidas de letras iguais não diferem estatisticamente de acordo com o teste de Tukey (nível de confiança de 95%).

Isso pode ser concluído devido à acentuada diminuição da força tênsil de fibras de papel filtro tratada com estas proteínas. Quando adicionada 24 h antes da celulase comercial na reação de hidrólise, a β -expansina SacEXP4 apresentou um efeito positivo na liberação de açúcar redutor total na sacarificação de bagaço organosolv, porém esse efeito foi similar ou menor do que o efeito de uma proteína de sacrifício tal como BSA, nas condições utilizadas. As expansinas recombinantes SacEXP4 e SacEXP7 têm potencial para serem aplicadas diretamente (sem etapas de purificação) para modificar as propriedades físicas da fibra de celulose, tal como a do papel de filtro. A produção recombinante mostrada no presente trabalho é o ponto de partida para investigar o potencial dessas expansinas como um bioproduto renovável para aplicações nas indústrias de papel e celulose, ração animal, produtos têxteis, entre outros usos que dependem de mudanças nas propriedades físicas da fibra para obter derivados com características distintas.

Referências

ARTZI, L.; MORAG, E.; SHAMSHOUM, M.; BAYER, E. A. Cellulosomal expansin: functionality and incorporation into the complex. **Biotechnology for Biofuels**, v. 9, n. 61, 2016.

CONAB. Companhia Nacional de Abastecimento. **Acompanhamento da safra brasileira de cana-de-açúcar, V.5 – Safra 2018/2019, n.4** - Quarto levantamento, Brasília, p. 1-75, abril de 2019. – Companhia Nacional de Abastecimento – Brasília: Conab, 2013. ISSN 2318-7921. <https://www.conab.gov.br/info-agro/safra/cana/boletim-da-safra-de-cana-de-acucar>

KIM, E. S.; LEE, H. J.; BANG, W. G.; CHOI, I. G.; KIM, K. H. Functional characterization of a bacterial expansin from *Bacillus subtilis* for enhanced enzymatic hydrolysis of cellulose. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 102, n. 5, p. 1342 – 1353, 2009.

LIU, X.; MA, Y.; ZHANG, M. Research advances in expansins and expansion-like proteins involved in lignocellulose degradation. **Biotechnology Letters**, v. 37, p. 1541-1551, 2015.

PEIXOTO, J. S. G. **Bioprospecção de fungos produtores de enzimas lignocelulolíticas e identificação de novas proteínas auxiliares para aplicação na conversão de biomassa lignocelulósica**. Brasília, DF, 2019. 175 p. Tese de doutorado, Pós-Graduação em Tecnologias Química e Biológica, Instituto de Química, Universidade de Brasília, 2019.

PEREIRA, V. M.; DIAS, B. B. A.; SANTIAGO, T. R.; KOBAYASHI, A. K.; MOLINARI, H. B. C.; FÁVARO, L. C. L. Identification and expression of sugarcane culm-specific expansin genes. In: **Brazilian Bioenergy Science and Technology Conference - BBEST**, 2017, Campos do Jordão, SP. Resumos ...Campinas: SBE, p. Não paginado, 2017.

SANTIAGO, T. R.; PEREIRA, V. M.; SOUZA, W. R.; STEINDORFF, A. S.; CUNHA, B. A. D. B.; GASPAR, M.; FÁVARO, L. C. L.; FORMIGHIERI, E. F.; KOBAYASHI, A. K.; MOLINARI, H. B. C. Genome-wide identification, characterization and expression profile analysis of expansins gene family in sugarcane (*Saccharum* spp.). **PLoS One**, v. 13, p. e0191081, 2018.

Produção heteróloga e caracterização funcional de mono-oxigenases líticas de polissacarídeos de fungos e bactérias

Caio de Oliveira Gorgulho Silva¹, Kelly Barreto Rodrigues², Amanda Araújo Souza³, Antonielle Vieira Monclaro⁴, Gisele Soares Anastácio⁵, Thaís Demarchi Mendes⁶, Sílvia Belém Gonçalves⁷, Thaís Fabiana Chan Salum⁸, Dasciana de Sousa Rodrigues⁹, Mônica Caraméz Trichez Damaso¹⁰, Patrícia Verardi Abdelnur¹¹, Léia Cecília de Lima Fávoro¹²

Resumo

Mono-oxigenases líticas de polissacarídeos (LPMOs) são enzimas de grande interesse industrial por serem capazes de despolimerizar polissacarídeos recalcitrantes, como a celulose, e apresentarem sinergismo com hidrolases na degradação destes polímeros, tendo potencial para aplicação em diversos processos. Este trabalho teve como objetivo produzir e caracterizar LPMOs recombinantes de origem fúngica e bacteriana e desvendar seu potencial para aplicações biotecnológicas. Três LPMOs dos fungos *Neurospora crassa*, *Gloeophyllum trabeum* e *Botryobasidium botryosum* (subfamília AA9) e cinco LPMOs das bactérias extremófilas *Thermobifida fusca*, *Hahella ganghwensis*, *Salinispora pacifica*, *Verrucosipora maris* e *Moritella dasanensis* (subfamília AA10) foram selecionadas e expressas pela levedura metilotrófica *Pichia pastoris* X-33 (reclassificada como *Komagataella phaffii*). As enzimas recombinantes foram caracterizadas combinando ensaio fluorométrico e ensaio de despolimerização de celulose avaliado por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas. Das oito LPMOs recombinantes obtidas, cinco foram caracterizadas e mostraram-se funcionais por pelo menos um dos métodos utilizados, sendo que três foram capazes de despolimerizar a celulose. A LPMO da bactéria *S. pacifica* apresentou regioseletividade C1/C4, enquanto as pertencentes a *H. ganghwensis* e *T. fusca* apresentaram regioseletividade C1, apresentando potencial para diferentes aplicações biotecnológicas. A capacidade de despolimerizar a celulose faz desse conjunto de LPMOs recombinantes um ativo tecnológico que poderá ser avaliado como insumo para o desenvolvimento de novos produtos/processos que dependem da despolimerização da celulose, p. ex.: sacarificação de biomassa lignocelulósica para produção de etanol 2G, ração animal, indústria têxtil, entre outras aplicações.

Palavras-chave: mono-oxigenases líticas de polissacarídeos, bactérias extremófilas, fungos filamentosos, celulose, espectrometria de massas, *Pichia pastoris*.

¹ Biólogo, doutor em Biologia Molecular, Universidade de Brasília, colaborador da Embrapa Agroenergia, caio.gorgulho@gmail.com

² Bióloga, doutora em Biologia Molecular, Universidade de Brasília, colaboradora da Embrapa Agroenergia, kellybiobarreto@gmail.com

³ Bióloga, doutora em Biologia Molecular, Universidade de Brasília, colaboradora da Embrapa Agroenergia, amandhacoelho@gmail.com

⁴ Bióloga, doutora em Biologia Molecular, Universidade de Brasília, colaboradora da Embrapa Agroenergia, antonielle@gmail.com

⁵ Bióloga, mestre em Biologia Microbiana, Universidade de Brasília, colaboradora da Embrapa Agroenergia, gisele.sa27@gmail.com

⁶ Bióloga, mestre em Microbiologia Aplicada, analista da Embrapa Agroenergia, thais.demarchi@embrapa.br

⁷ Engenheira Química, doutora em Engenharia Química, pesquisadora da Embrapa Agroenergia, silvia.belem@embrapa.br

⁸ Farmacêutica, doutora em Bioquímica, pesquisadora da Embrapa Agroenergia, thais.salum@embrapa.br

⁹ Química Industrial, doutora em Engenharia Química, pesquisadora da Embrapa Agroenergia, dasciana.rodrigues@embrapa.br

¹⁰ Engenheira Química, doutora em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos, pesquisadora da Embrapa Agroenergia, monica.damaso@embrapa.br

¹¹ Química, doutora em Química, pesquisadora da Embrapa Agroenergia, patricia.abdelnur@embrapa.br

¹² Bióloga, doutora em Ciências, pesquisadora da Embrapa Agroenergia, leia.favaro@embrapa.br

Introdução

As mono-oxigenases líticas de polissacarídeos (do inglês PMO – polysaccharide monooxygenase, ou LPMO – lytic polysaccharide monooxygenase) são enzimas que clivam as regiões cristalinas das moléculas de celulose e de outros polissacarídeos por um mecanismo oxidativo. Os polissacarídeos que são substrato para essas enzimas são a celulose, hemicelulose, o amido, a quitina, entre outros (Forsberg et al., 2019). A descoberta das LPMOs em fungos e em bactérias revolucionou o conceito de degradação de polissacarídeos na natureza na última década e, atualmente, são reconhecidas por apresentarem um sinergismo com hidrolases (celulases, hemicelulases, amilases, quitinases) na degradação de polissacarídeos, o que contribui para sua ampla aplicação biotecnológica. Este trabalho teve como objetivo produzir LPMOs recombinantes de diferentes fungos e bactérias e caracterizá-las quanto à funcionalidade do sítio ativo e capacidade de despolimerização de celulose, visando desvendar o potencial biotecnológico e possibilitar futuras aplicações.

Material e Métodos

Síntese de genes, clonagem, cultivo e análise de expressão heteróloga

Os genes foram selecionados na base de dados do GenBank e o DNA complementar (cDNA) foi sintetizado seguindo as estratégias de expressão heteróloga da Tabela 1. A clonagem foi confirmada pela análise do padrão de restrição com endonucleases específicas escolhidas de modo a não interferir no processamento N-terminal das LPMOs. A transformação de *P. pastoris* X-33, a análise de integração do gene alvo no genoma, bem como os cultivos foram realizados de acordo com as instruções do manual EasySelect™ Pichia Expression Kit (Invitrogen), considerando cada estratégia escolhida (Tabela 1).

Tabela 1. Estratégias de expressão utilizadas no presente trabalho para obtenção de linhagens de *P. pastoris* X-33 recombinantes produtoras de LPMOs de fungos e de bactérias.

| Origem (Espécie/Filo) | Família (Cazy) | Acesso GenBank | Vetor de expressão | Construção gênica | Peptídeo sinal | Forma recombinante | Cauda de poli histidina |
|---|----------------|----------------|--------------------|---------------------------------|----------------|--------------------|---------------------------|
| <i>Neurospora crassa</i> (Ascomycota) | AA9 | EAA36362.1 | pPICZαA | cDNA sintético; códon otimizado | Alpha-factor | Proteína completa | Sim (His6-tag C-terminal) |
| <i>Gloeophyllum trabeum</i> (Basidiomycota) | AA9 | AEJ35168.1 | pGAPZB | cDNA sintético; códon nativo | Nativo | Domínio AA9 | Sim (His6-tag C-terminal) |
| <i>Botryobasidium botryosum</i> (Basidiomycota) | AA9 | KDQ09879.1 | pPICZB | cDNA sintético; códon nativo | Nativo | Proteína completa | Não |

Continua...

Tabela 1. Continuação.

| Origem (Espécie/Filo) | Família (Cazy) | Acesso GenBank | Vetor de expressão | Construção gênica | Peptídeo sinal | Forma recombinante | Cauda de poli histidina |
|--|----------------|----------------|--------------------|------------------------------|----------------|--------------------|---------------------------|
| <i>Thermobifida fusca</i> (Actinobacteria) | AA10 | AAZ55306 | pPICZαA | cDNA sintético; códon nativo | Alpha-factor | Proteína completa | Sim (His6-tag C-terminal) |
| <i>Hahella ganghwensis</i> (Proteobacteria) | AA10 | WP_020410109 | pPICZαA | cDNA sintético; códon nativo | Alpha-factor | Domínio AA10 | Sim (His6-tag C-terminal) |
| <i>Salinispora pacifica</i> (Actinobacteria) | AA10 | WP_018745623.1 | pPICZαA | cDNA sintético; códon nativo | Alpha-factor | Domínio AA10 | Sim (His6-tag C-terminal) |
| <i>Moritella dasanensis</i> (Proteobacteria) | AA10 | WP_017222644.1 | pGAPZαA | cDNA sintético; códon nativo | Alpha-factor | Domínio AA10 | Sim (His6-tag C-terminal) |
| <i>Verrucosipora maris</i> (Actinobacteria) | AA10 | AEB43663.1 | pGAPZαA | cDNA sintético; códon nativo | Alpha-factor | Domínio AA10 | Sim (His6-tag C-terminal) |

Atividade enzimática: ensaio fluorométrico e de espectrometria de massas

A funcionalidade das LPMOs purificadas foi avaliada indiretamente pela detecção da formação de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) utilizando o teste fluorométrico Amplex Red/Horseradish peroxidase (HRP) (Isaksen et al., 2014). Este teste se baseia na geração de H_2O_2 como subproduto de uma reação secundária catalisada pelo sítio ativo das LPMOs na presença de agente redutor e na ausência de substrato. Os ensaios foram realizados em triplicata utilizando 10 μ M da LPMO purificada.

A capacidade de despolimerização de celulose pelas LPMOs recombinantes foi testada como descrito por Tanghe et al. (2015) e Silva et al. (2019), utilizando 1 μ M de enzima purificada, PASC (do inglês, phosphoric acid swollen cellulose) a 2 mg/mL como substrato e ácido ascórbico (2 mM) como agente redutor em tampão acetato de sódio 5 mM pH 4,5, a 50°C durante 24h sob agitação. Controles negativos na ausência de agente redutor e/ou enzima também foram realizados. Os produtos catalíticos foram analisados por cromatografia líquida de interação hidrofílica acoplada a espectrometria de massas (HILIC-UHPLC-ESI-MS), como descrito por Silva et al. (2019).

Resultados e Discussão

Produção heteróloga de LPMOs de fungos e bactérias por *P. pastoris*

A triagem de centenas de transformantes de *P. pastoris* X-33 resultou na seleção de linhagens recombinantes produtoras das oito LPMOs (três fúngicas e cinco bacterianas). A Figura 1 mostra o perfil proteico de transformantes produtores das LPMOs de *N. crassa*

(proteína completa), *G. trabeum* (domínio catalítico AA9) e *B. botryosum* (proteína completa). A produção recombinante de uma LPMO do fungo *B. botryosum* é relatada pela primeira vez no presente trabalho.

De modo geral, verificou-se que as LPMOs de origem fúngica apresentaram massa molecular superior ao previsto e/ou um perfil diferenciado de bandas com diferentes padrões de migração no gel de poliacrilamida, com massas variando entre 25 e 70 kDa (p. ex.: *N. crassa* e *G. trabeum*). Isso pode ser devido a ocorrência de modificações pós-traducionais conforme relatado para outras LPMOs de fungos produzidas por *P. pastoris* (Gaber et al., 2020).

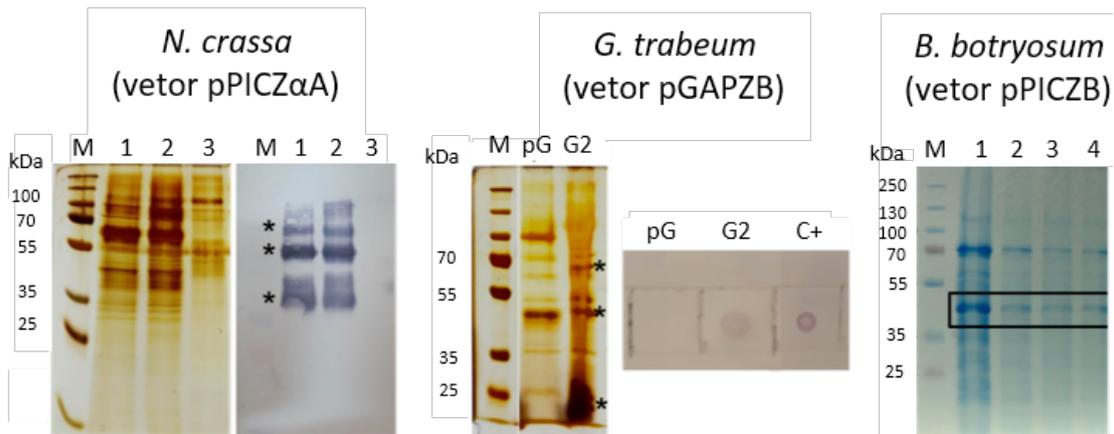


Figura 1. Análise por SDS-PAGE, dot-blot e/ou Western blot do sobrenadante do cultivo de transformantes de *P. pastoris* X-33 produtores de três LPMOs de fungos. *N. crassa*: Na figura é mostrado o gel de poliacrilamida desnaturante 12% corado com nitrato de prata, exemplificando o perfil proteico do sobrenadante após cultivo em frascos (72h) de dois transformantes selecionados (1 e 2). Em 3 é mostrado o controle negativo (sobrenadante do cultivo de *P. pastoris* transformada com o vetor vazio pPICZαA). Também é mostrada a análise de Western blot correspondente, seguindo a mesma ordem. Os asteriscos exemplificam que a LPMO recombinante de *N. crassa* pode ter sido secretada de diferentes formas, com padrão de migração distinto no gel. M - PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder, 10 to 250 kDa, Thermo Scientific. *G. trabeum*: Na figura é mostrado o gel de poliacrilamida desnaturante 12% corado com nitrato de prata, exemplificando o perfil proteico do sobrenadante após cultivo (48h em biorreator) de um transformante selecionado (G2), em comparação com o controle negativo (pG) correspondente a *P. pastoris* transformada com o vetor vazio pGAPZB. É possível observar diferentes formas com padrão de migração distinto, provavelmente correspondentes a LPMO recombinante. M - PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder, 10 to 250 kDa, Thermo Scientific. Também é mostrada a análise de dot-blot correspondente, confirmando a presença da LPMO recombinante no respectivo sobrenadante, em comparação com os controles negativo (pG) e positivo (C+, correspondente a LPMO recombinante da bactéria *H. ganghwensis*). *B. botryosum*: A figura mostra o gel de poliacrilamida corado com Comassie, sendo possível observar 4 transformantes (1 a 4) produtores da LPMO de *B. botryosum* após 72h de cultivo em frascos, conforme destacado no retângulo. Neste gel não é mostrado o controle negativo correspondente ao sobrenadante de *P. pastoris* transformada com o vetor vazio pPICZB. M - PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder, 10 to 250 kDa – Thermo Scientific.

A Figura 2 mostra a expressão heteróloga da LPMO da bactéria *T. fusca* (proteína completa), bem como do domínio catalítico AA10 das LPMOs de *S. pacifica*, *H. ganghwensis*, *M. dasanensis* e *V. maris*. A produção recombinante de uma LPMO da bactéria *S. pacifica* é inédita. Verificou-se que as LPMOs bacterianas também apresentaram massas superiores ao previsto, provavelmente devido a alterações pós-traducionais, porém as proteínas migraram como bandas únicas no gel de poliacrilamida (p. ex.: *T. fusca*, *S. pacifica* e *H. ganghwensis*).

Caracterização da atividade enzimática por ensaios fluorimétricos e por espectrometria de massas

A Tabela 2 mostra os resultados do teste de produção de peróxido de hidrogênio de cinco LPMOs recombinantes. Os ensaios foram realizados utilizando tampão e pH adequados para o funcionamento da peroxidase (fosfato de sódio; pH 7,4). Tais condições podem não ser adequadas para as diferentes LPMOs avaliadas. Em todo o caso, o resultado positivo do teste, comparado a todos os controles, indica que pelo menos o sítio ativo da proteína heteróloga está funcional, o que por sua vez indica que o processamento N-terminal da LPMO foi realizado de forma adequada por *P. pastoris*. Os resultados mostraram que o sítio ativo das cinco LPMOs recombinantes realizou a redução de O₂ para H₂O₂ na presença do doador de elétrons (ascorbato), e ausência de substrato celulósico, nas condições utilizadas.

Tabela 2. Caracterização funcional de LPMOs recombinantes quanto à capacidade de produção de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) em ensaio fluorométrico Amplex Red/Horseradish peroxidase.

| Origem da LPMO | Forma recombinante secretada e purificada | Amplex Red/ Horseradish peroxidase |
|-----------------------------|--|--|
| <i>Neurospora crassa</i> | Proteína completa; His6-tag (C-terminal) | Positivo |
| <i>Gloeophyllum trabeum</i> | Domínio catalítico AA9; His6-tag (C-terminal) | Positivo |
| <i>Thermobifida fusca</i> | Proteína completa; His6-tag (C-terminal) | Positivo |
| <i>Hahella ganghwensis</i> | Domínio catalítico AA10; His6-tag (C-terminal) | Positivo |
| <i>Salinispora pacifica</i> | Domínio catalítico AA10; His6-tag (C-terminal) | Positivo |

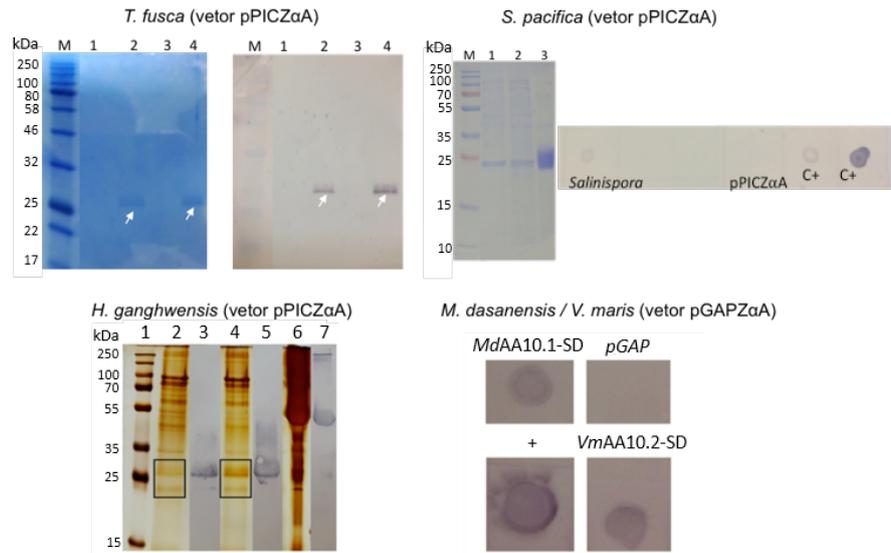


Figura 2. Análise por SDS-PAGE, dot-blot e/ou Western blot do sobrenadante de transformantes de *P. pastoris* X-33 produtores de cinco LPMOs bacterianas. *T. fusca*: Exemplo das análises por SDS-PAGE e Western blot de transformantes selecionados. M - Marcador Color Protein Standard Broad Range, NEB. 1 e 3 - Perfil proteico do sobrenadante do cultivo de 48h e de 72h da cepa controle de *P. pastoris* contendo o vetor vazio pPICZαA. 2 e 4 - Sobrenadante do cultivo de 48h e de 72h de *P. pastoris* produtora da LPMO de *T. fusca*. A análise de Western blot correspondente é mostrada seguindo a mesma ordem, sendo que as setas brancas indicam a LPMO recombinante de *T. fusca*. *S. pacifica*: Exemplo das análises por SDS-PAGE e dot-blot de transformantes selecionados. M - PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder, 10 to 250 kDa, Thermo Scientific. 1 e 2 - sobrenadantes do cultivo (72h) de dois transformantes de *P. pastoris* produtores da LPMO de *S. pacifica* (domínio catalítico AA10). 3 - controle positivo, correspondente a LPMO recombinante de *T. fusca*; o controle negativo não é mostrado neste gel. Também é mostrada a análise por dot-blot, confirmando a secreção da LPMO recombinante de *S. pacifica* no sobrenadante (72h) de um transformante selecionado, em comparação com o sobrenadante da linhagem controle contendo o vetor vazio pPICZαA e com o controle positivo (LPMO recombinante de *T. fusca*). A membrana de nitrocelulose foi marcada com anticorpo Anti-HisTag conjugado à fosfatase alcalina e a revelação foi feita com substrato NBT/BCIP. *H. ganghwensis*: Exemplo das análises por SDS-PAGE e Western blot de transformantes selecionados produtores do domínio AA10 da LPMO de *H. ganghwensis*. 1 - PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder, Thermo Scientific. 2 e 4 - Sobrenadantes do cultivo (72h) de dois transformantes de *P. pastoris* produtores do domínio AA10 da LPMO de *H. ganghwensis*. 3 e 5 - imunodeteção correspondente usando anticorpo contra cauda de poli histidina. 6 e 7 - controle positivo, correspondente a uma xilanase recombinante obtida na Embrapa Agroenergia. *M. dasanensis* / *V. maris*: Exemplo da análise dot-blot do sobrenadante do cultivo (72h) de transformantes de *P. pastoris* produtores dos domínios catalíticos AA10 das LPMOs de *M. dasanensis* (MdAA10.1-SD) e de *V. maris* (VmAA10.2-SD). (+) controle positivo, correspondente a LPMO recombinante de *T. fusca*. pGAP - controle negativo, correspondente ao sobrenadante do cultivo de *P. pastoris* transformada com o vetor vazio pGAPZαA.

As análises HILIC-UHPLC-ESI-MS confirmaram a capacidade da LPMO recombinante da bactéria *T. fusca* (proteína completa), bem como dos domínios catalíticos AA10 recombinantes das bactérias extremófilas *S. pacifica* e *H. ganghwensis* de despolimerizarem a celulose na presença de ácido ascórbico através de mecanismo oxidativo, uma vez que celo-oligossacarídeos oxidados foram detectados como produtos de ação dessas enzimas (Figura 3). O perfil de produtos catalíticos sugere que o domínio catalítico AA10 da LPMO de *S. pacifica* apresenta regioseletividade C1/C4, uma vez que celo-oligossacarídeos oxidados nas posições C1 (GlcGlc1A – Glc₄Glc1A) e C4 (Glc4KGlc – Glc4KGlc₃) foram detectados. O domínio catalítico AA10 da LPMO de *H. ganghwensis*, bem como a LPMO completa de *T. fusca*, por outro lado, liberaram apenas celo-oligossacarídeos C1-oxidados (GlcGlc1A – Glc₄Glc1A), indicando regioseletividade C1. As diferentes regioseletividades das LPMOs e seus domínios catalíticos podem ser exploradas para diferentes aplicações e ampliam o potencial biotecnológico deste grupo de enzimas.

A LPMO do fungo *G. trabeum* não produziu oligossacarídeos oxidados em níveis superiores aos detectados no controle negativo (na ausência de ácido ascórbico), não sendo possível concluir sobre sua atividade. No caso, somente o domínio AA9 da LPMO de *G. trabeum* foi expresso e uma cauda de poli histidina foi incluída na extremidade C-terminal, modificações que podem interferir na atividade oxidativa sobre a celulose, conforme relatado para algumas LPMOs (Gaber et al., 2020). Apesar disso, conforme Tabela 2, o teste fluorométrico mostrou que o sítio ativo desta proteína está funcional.

A presença de cauda de poli histidina na porção C-terminal da LPMO de *T. fusca* e nos domínios AA10 das LPMOs de *S. pacifica* e *H. ganghwensis*, entretanto, não inviabilizaram a capacidade de despolimerizar a celulose. Além disso, com exceção da LPMO da bactéria *T. fusca*, que foi sintetizada de forma completa, as LPMOs de *S. pacifica* e *H. ganghwensis* foram produzidas somente com o domínio catalítico (AA10), e mesmo assim mostraram-se funcionais pelos métodos utilizados (colorimétrico e espectrométrico). Estes dados corroboram estudos anteriores sobre a funcionalidade de domínios catalíticos de LPMOs produzidos em hospedeiros heterólogos e que tal atividade depende da proteína e de outros fatores (Gaber et al., 2020).

As quatro enzimas testadas liberaram celo-oligossacarídeos neutros (Glc₂ – Glc₄) independentemente da adição de agente redutor, provavelmente devido à presença de traços de endoglucanases secretadas por *P. pastoris* nas preparações enzimáticas purificadas que foram utilizadas nos testes. Tal hipótese é corroborada pela detecção de atividade de endoglucanase no sobrenadante de *P. pastoris* transformada com os vetores de expressão pGAPZB e pPICZαA vazios (dados não mostrados).

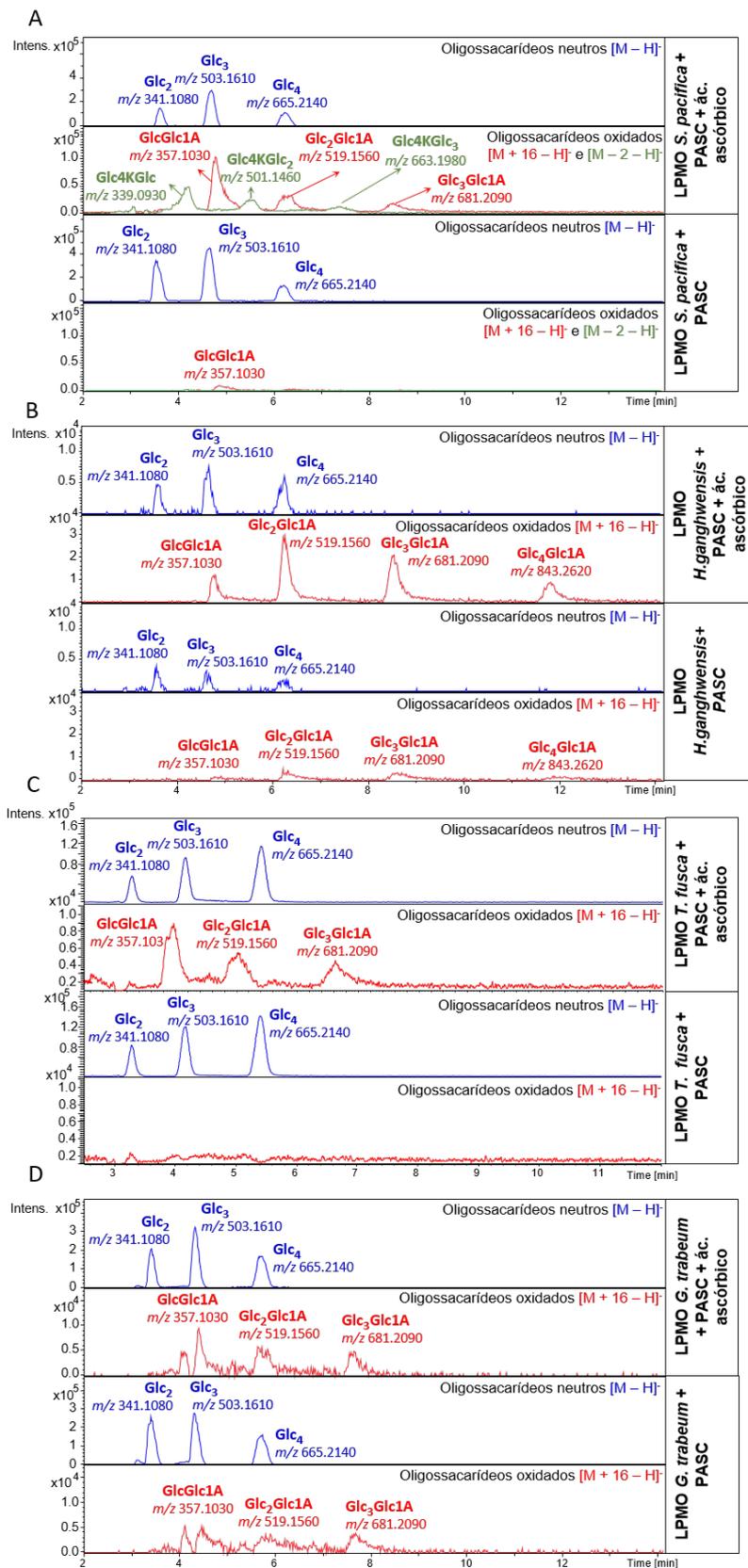


Figura 3. Perfil dos produtos de degradação de PASC resultantes da ação das LPMOs pertencentes a (A) *Salinispora pacifica*, (B) *Hahella ganghwensis*, (C) *Thermobifida fusca* e (D) *Gloeophyllum trabeum* na presença ou ausência de ácido ascórbico (agente redutor), obtidos por análises HILIC-UHPLC-ESI-MS. Glc_n (mostrados em azul) se referem a celo-oligossacarídeos neutros com grau de polimerização igual a n. Glc_nGlc1A (mostrados em vermelho) se referem a celo-oligossacarídeos oxidados na posição C1 na forma de ácidos aldônicos com grau de polimerização igual a n - 1. Glc_nGlc1A apresentam valor m/z M + 16, onde M corresponde à massa molecular de oligossacarídeos neutros com o mesmo grau de polimerização. Glc4KGlC_n (mostrados em verde) se referem a celo-oligossacarídeos oxidados na posição C4 na forma de 4-cetoaldoses com grau de polimerização igual a n - 1. Glc4KGlC_n apresentam valor m/z M - 2, onde M corresponde à massa molecular de oligossacarídeos neutros com o mesmo grau de polimerização. Todos os íons foram detectados na forma desprotonada ([M - H]⁻).

Conclusões

Das oito LPMOs recombinantes obtidas, cinco foram caracterizadas e mostraram-se funcionais por pelo menos um dos métodos utilizados e três foram capazes de despolimerizar a celulose. Estudos futuros comparando as diferentes formas recombinantes das LPMOs avaliadas no presente trabalho (proteína completa versus domínio catalítico) deverão ser realizados para melhor caracterização da funcionalidade destas enzimas.

A capacidade de despolimerizar a celulose faz desse conjunto de LPMOs recombinantes um ativo tecnológico que poderá ser aplicado como um insumo para o desenvolvimento de produtos ou processos que dependem da despolimerização da celulose. Por exemplo, essa coleção de LPMOs pode ser avaliada para desenvolvimento de coquetéis enzimáticos ou suplementação de tais coquetéis para sacarificação enzimática de biomassas lignocelulósicas. Conforme relatado na literatura científica e patentária, as LPMOs encontram aplicações em diferentes tipos de indústria: de alimentos, nas etapas de processamento na indústria de papel e celulose, nas diferentes etapas de processamento de fibras têxteis e tecidos, como insumos na produção de ração animal, na indústria química baseada em celulose, para produção de nanofibras de celulose a partir de diferentes matérias-primas, entre outras aplicações no conceito de biorrefinarias de materiais lignocelulósicos.

Referências

- FORSBERG, Z., SØRLIE, M., PETROVIĆ, D., COURTADE, G., AACHMANN, F., VAAJE-KOLSTAD, G., BISSARO, B., RØHR, Å. AND EIJSINK, V., 2019. Polysaccharide degradation by lytic polysaccharide monoxygenases. **Current Opinion in Structural Biology**, 59:54-64.
- GABER, Y., RASHAD, B., RASHA, H. MAI, A, NOURHAN, A., TAREK, D, VÁRNAI, A., 2020. Heterologous expression of lytic polysaccharide monoxygenases (LPMOs). **Biotechnology Advances**, 43:107583
- ISAKSEN, T., WESTERENG, B., AACHMANN, F.L., AGGER, J.W., KRACHER, D., KITTL, R., LUDWIG, R., HALTRICH, D., EIJSINK, V.G., HORN, S.J., 2014. A C4-oxidizing lytic polysaccharide monoxygenase cleaving both cellulose and cello-oligosaccharides. **Journal of Biological Chemistry**, 289(5):2632-42.
- SILVA, C.O.G., TEIXEIRA, T.S., RODRIGUES, K.B., SOUZA, A.A., MONCLARO, A.V., MENDES, T.D., RIBEIRO, J.A.A., SIQUEIRA, F.G., FÁVARO, L.C.L, ABDELNUR, P.V., 2020. Combination of MALDI-TOF MS and UHPLC-ESI-MS for the characterization of lytic polysaccharide monoxygenase activity. **Analytical Methods**, 12(2):149-161.
- TANGHE, M., DANNEELS, B., CAMATTARI, A., GLIEDER, A., VANDENBERGHE, I., DEVREESE, B., STALS, I. AND DESMET, T., 2015. Recombinant Expression of *Trichoderma reesei* Cel61A in *Pichia pastoris*: Optimizing Yield and N-terminal Processing. **Molecular Biotechnology**, 57(11-12):1010-1017.

Prospecção e produção de uma nova xilanase visando aplicação biotecnológica

Andrêssa de Rezende Bastos Araujo¹, Valquíria Alice Lacerda Michalczechen², Betulia de Moraes Souto³, Dasciana de Sousa Rodrigues⁴, Betania Ferraz Quirino⁵

Resumo

O Brasil é um importador de enzimas. Visando aumentar sua participação neste mercado e desenvolver a sua bioeconomia, novos estudos de prospecção e caracterização de enzimas são necessários. Neste trabalho, o transcriptoma de um fungo brasileiro foi analisado e uma sequência codificante de uma possível xilanase, denominada Xnd01 foi avaliada por bioinformática para identificação de similaridade com outras proteínas e presença de domínios conservados e em seguida, selecionada para expressão heteróloga. A sequência codificante para Xnd01 foi inserida no vetor pGAPZαA para expressão em *Komagataella phaffi*. Após a síntese, o vetor foi transformado em seu respectivo hospedeiro e foi possível obter clones com atividade enzimática em xilana de faia. A enzima Xnd01 foi purificada e submetida a teste de atividade enzimática em CMC, Avicel, xilana de faia, celobiose, xilobiose, maltose e salicina e em seis substratos sintéticos (pNPC, pNPX, pNPαG, pNPG, pNPαAra e pNPGal). Em relação aos substratos naturais, Xnd01 somente apresentou atividade em xilana de faia. Já em relação aos substratos sintéticos testados, Xnd01 apresentou atividade em *p*-nitrofenil-β-D-celobiosídeo (pNPC), indicando que ela pode atuar como uma celobio-hidrolase. Novos ensaios de caracterização e determinação da especificidade desta enzima estão em processos de conclusão.

Palavras-chave: indústria biotecnológica, enzimas, celobio-hidrolase, xilanase.

Introdução

Enzimas são catalisadores biológicos que aceleram reações químicas na conversão de substrato em produto. Elas podem ser encontradas em microrganismos e usadas para acelerar uma gama de processos industriais. A palavra enzima foi utilizada pela primeira vez por Wilhelm Kühne em 1878 e é derivada das palavras gregas 'em' que significa 'dentro' e 'zume' que significa 'fermento' (Robinson, 2015).

A busca por novas enzimas é necessária para as mais diversas indústrias que as utilizam em seus processos, tais como a indústria alimentícia, a indústria têxtil e a indústria de biocombustíveis. Na indústria alimentícia as enzimas são fundamentais pois atuam em diversos processos. Um exemplo, é o processo de clarificação de sucos,

¹ Biotecnologista, mestre em Ciências Genômicas e Biotecnologia, bolsista da Embrapa Agroenergia, andressa.b.arj@gmail.com

² Bióloga, doutora em Biologia Molecular, colaboradora da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, valquiria.michalczechen@gmail.com

³ Bióloga, mestre em Biologia Molecular, analista da Embrapa Agroenergia, betulia.souto@embrapa.br

⁴ Química Industrial, doutora em Engenharia Química, pesquisadora da Embrapa Agroenergia, dasciana.rodrigues@embrapa.br

⁵ Bióloga, doutora em Biologia Molecular e Celular, pesquisadora da Embrapa Agroenergia, betania.quirino@embrapa.br

deixando-os mais visualmente atraentes e melhorando o rendimento da sua extração da fruta. Para isso podem ser utilizadas pectinases, xilanases e outras enzimas (Singh et al., 2019).

Já na indústria de biocombustíveis é possível utilizar enzimas durante a produção do etanol de segunda geração, onde se faz necessário o uso de coquetéis enzimáticos para a desconstrução da biomassa lignocelulósica, que é composta principalmente por celulose, hemicelulose e lignina. A atuação de celulases, xilanases, peroxidases, lacases e outras enzimas acessórias permitem a desconstrução da biomassa e o açúcar gerado em virtude desse processo pode ser utilizado para produção de biocombustíveis (BINOD et al., 2019). Dentro da família de celulases, pode-se encontrar as celobio-hidrolases que atuam nas extremidades redutoras ou não redutoras da cadeia de celulose liberando resíduos de celobiose que serão clivados por β -glicosidases em monômeros de glicose (Woon et al., 2016). Nesse contexto, o objetivo deste trabalho foi prospectar uma enzima de um fungo da biodiversidade brasileira (*Cladosporium cladosporioides*) e caracterizar a mesma após identificar sua atividade enzimática.

Material e Métodos

Análise in silico de endoxilanase Xnd01

A sequência de aminoácidos de Xnd01 foi analisada no servidor web do NCBI usando Blastp (Altschul et al., 1997) e cinco sequências com maior similaridade foram usadas para comparar domínios conservados, usando o software Geneous (Kearse et al., 2012). As bases de dados Gene3D (<https://www.uniprot.org/database/DB-0029>), Pfam (<https://pfam.xfam.org/>), Panther (<http://www.pantherdb.org/>), PROSITE_PROFILES, PROSITE_PATTERNS (<https://prosite.expasy.org/>), ProDom (<http://130.88.97.239/bioactivity/prodomsrchjj.html>), PHOBIUS (<http://phobius.sbc.su.se/>), SIGNALP (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>), SMART e Superfamily foram utilizadas nesta análise. A análise filogenética molecular usando o método de máxima verossimilhança foi conduzida usando MEGA versão 6 (Tamura et al., 2013) com base no modelo baseado em matriz JTT. A confiabilidade da reconstrução filogenética foi estimada usando 1.000 repetições. A árvore filogenética foi construída com 15 sequências de xilanases fúngicas semelhantes a Xnd01 conforme o BLASTPe 5 celobio-hidrolases já caracterizadas estruturalmente de acordo com o banco de dados PDB (<https://www.rcsb.org/>).

Propagação do vetor pGAPZ α A Xnd01 em *Escherichia coli* e expressão em *Komagataella phaffi*

O vetor pGAPZ α A Xnd01 foi sintetizado pela empresa GeneOne e usado para transformar células eletrocompetentes de *E. coli* EPI300 (Sambrook; Russell 2001). As células bacterianas transformadas foram estriadas em meio ágar LB Low salt suplementado com zeocina (25 μ g / mL) e incubadas a 37° C durante a noite. Três

colônias foram selecionadas e submetidas à extração do DNA plasmidial, seguida de digestão com a enzima de restrição XhoI e eletroforese em gel de agarose 1% para verificar se o vetor foi sintetizado corretamente. O pGAPZαA Xnd01 foi linearizado com BspHI para integração no genoma de *K. phaffi* e eletroporado em cepas de *K. phaffi* X-33. Em seguida, doze colônias positivas foram cultivadas em 7 mL de meio YPD em falcons de 50 mL e incubadas a 30 ° C por 3 dias para indução da expressão e avaliação da atividade enzimática em xilana de faia. A colônia com maior atividade enzimática foi selecionada para indução em maior volume. Para a expressão constitutiva (pGAP), o transformante de *K. phaffi* foi cultivado em meio YPD por 3 dias e a produção da enzima foi realizada em um frasco aletado de 2 L a 30° C com agitação constante a 200 rpm. O sobrenadante da cultura foi coletado após 3 dias para purificação por afinidade em Akta Pure e análise da atividade de Xnd01 em diferentes substratos. A concentração da proteína pura foi mensurada no Nanodrop utilizando a massa molecular da proteína e o coeficiente de extinção.

Atividade enzimática

A atividade enzimática de Xnd01 foi avaliada em triplicata em substratos naturais e sintéticos. Os substratos inicialmente testados foram celobiose, xilobiose, CMC, avicel, maltose, salicina e xilana. Para a atividade com xilana de faia, a reação foi incubada a 50° C por 15 min e os açúcares liberados foram quantificados pelo método DNS (Miller, 1959). A curva padrão foi feita com xilose. Além disso, a atividade também foi avaliada em substratos sintéticos (pNPG, pNPX, pNPGal, pNPαG, pNPαAra e pNPC) a 45 ° C por 15 minutos. Após interromper a reação pela adição de 100 µL de carbonato de sódio 1 mol/L, a quantidade de 4-nitrofenol liberada dos substratos foi medida pela leitura da absorbância a 405 nm (SpectraMax M3). Os dados foram comparados a uma curva padrão de 4-nitrofenol (pNP). Uma unidade de atividade foi definida como a quantidade de enzima que liberou substrato a uma taxa de 1 µmol por minuto sob condições padrão.

Resultados e Discussão

Análise in silico de Xnd01

Xnd01 possui alta similaridade com endo xilanases da família GH 10 de origem fúngica. A família GH10 é composta, segundo o Cazy, por endo-1,4-β-xilanase, endo-1,3-β-xilanase, tomatinase, xilana endotransglicosilase e endo-β-1,4-glucanase. Em seguida, os domínios conservados foram analisados. A Figura 1 mostra o alinhamento de sequências e os domínios identificados em Xnd01 e nas cinco xilanases mais próximas de acordo com BlastP, onde é possível identificar a presença do domínio GH10 em todas as sequências.

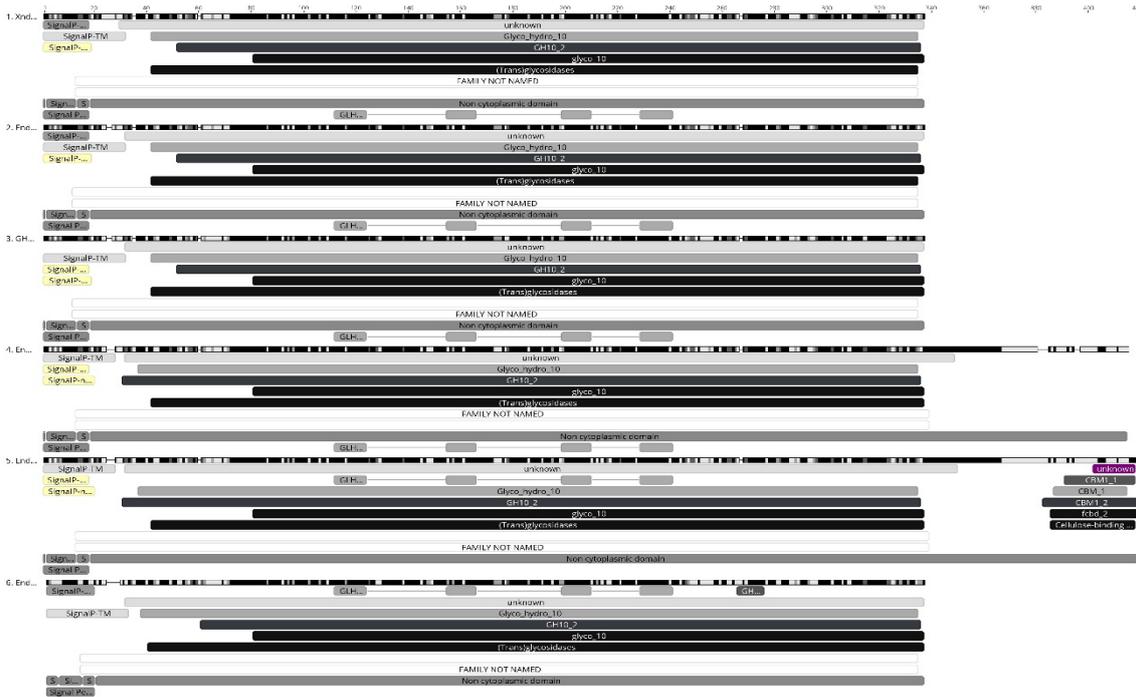


Figura 1. Alinhamento e busca de domínios conservados em Xnd01 e nas cinco seqüências com maior similaridade de acordo com BlastP. 1: Xnd01, 2: Endo-1-4-beta-xilanase F3 TLD04600.1 [*Venturia nashicola*], 3: Glicosil hidrolase da família 10 AQX83204.1 [*Cladosporium acalyphae*], 4: Endo-1,4-beta-xilanase F3 OQO22528.1 [*Rachicladosprium sp. CCFFEE 5018*], 5: Endo-1,4-beta-xilanase F3OQO08885.1 [*Rachicladosprium antarcticum*], 6: Endo-1,4-beta-xilanase XP_025438678.1 [*Aspergillus brunneoviolaceus* CBS 621,78].

Produção e purificação da potencial xilanase multiespecífica Xnd01

A enzima Xnd01 foi produzida em *K. phaffi* e purificada. O pico obtido na purificação foi submetido à análise em gel SDS PAGE 12% e Western Blotting. A Figura 2 mostra o gel SDS PAGE 12%, à esquerda, corado com nitrato de prata e o Western Blot, à direita, onde é possível confirmar a pureza da proteína e seu tamanho de aproximadamente 35 kDa, conforme era esperado.

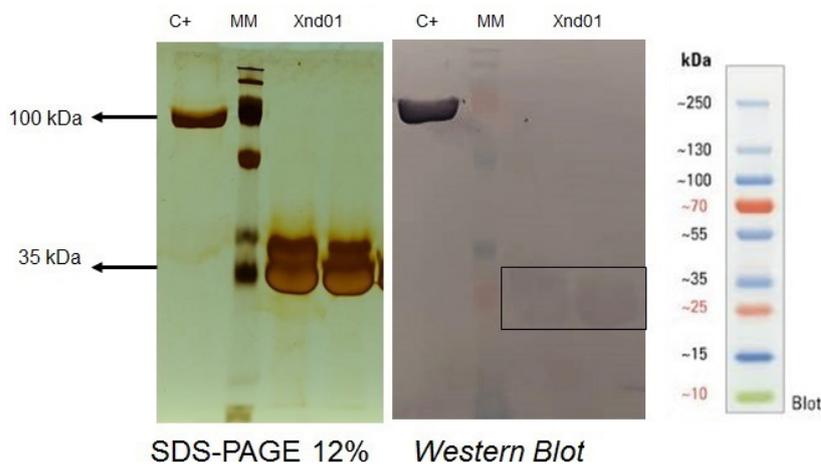


Figura 2. Análise eletroforética em gel SDS-PAGE 12% e Western Blot da proteína Xnd01 após purificação. Os anticorpos utilizados foram o anticorpo monoclonal de rato anti His Tag (Sigma Aldrich) e o anticorpo anti-IgG de cabra (Sigma Aldrich). Controle positivo (C+): beta glicosidase heteróloga CB1. Xnd01: Fração coletada durante a purificação. MM: Page Ruler prestained protein (Thermo Scientific).

Atividade enzimática de Xnd01

O teste de atividade foi realizado com diferentes substratos para determinar a especificidade do substrato da enzima Xnd01 purificada. Ela apresentou atividade enzimática em xilana ($2,57 \pm 0,13$ U/mg) e em *p*-nitrofenil- β -D-celobiosídeo ($6320,28 \pm 0,044$ U/mg). Lee e colaboradores descreveram uma *exo*- β -1,4-celobio-hidrolase de *Streptomyces coelicolor A(3)* da família GH48 que apresentou atividade em xilana de faia, assim como Xnd01 (Lee et al., 2018). Segundo Lee e colaboradores, a celobio-hidrolase descrita por eles apresentou atividade alta em avicel e CMC, sendo que a caracterização foi feita com avicel. Além disso, eles relataram que a enzima apresentou baixa atividade em papel filtro e em xilana de faia. Além disso, Woon e colaboradores (2016) descreveram em seu trabalho a celobio-hidrolase CBH7B que apresentou atividade insignificante em avicel e outros substratos de celulose microcristalina. Segundo eles, essa baixa atividade em substrato natural pode estar relacionada a glicosilações que afetaram sua atividade (Woon et al., 2016).

Os ensaios aqui descritos são iniciais e serão necessários mais ensaios com a Xnd01 utilizando substratos diferentes tais como celotetrase, celotriose, celopentaose a fim de verificar sua ação como celobio-hidrolase.

Conclusão

Neste trabalho foi possível prospectar uma enzima de potencial aplicação biotecnológica e iniciar sua caracterização. Xnd01 foi triada a partir do transcriptoma do fungo *C. cladosporioides* e possui 34,52 kDa, pI de 7,76 e coeficiente de extinção de 71765. Xnd01 apresentou atividade enzimática em xilana de faia ($2,57 \pm 0,13$ U/mg) e em pNPC ($6320,28 \pm 0,044$ U/mg). Novos testes estão em andamento a fim de confirmar a atividade desta enzima como celobio-hidrolase e realizar sua caracterização bioquímica detalhada.

Referências

- ALTSCHUL, S. F. et al. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Research**, v. 25, n. 17, p. 3389-402, Sep 1 1997.
- BIASINI, M. et al. SWISS-MODEL: modelling protein tertiary and quaternary structure using evolutionary information. **Nucleic Acids Research**, v. 42, n. Web Server issue, p. W252-8, Jul 2014.
- KEARSE, M., MOIR, R., WILSON, A., et al. Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. **Bioinformatics**, v. 28(12), p. 1647-1649, 2012.
- MILLER, G. L. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, n. 3, p. 426-428, 1959/03/01 1959.
- NIELSEN, H. Predicting Secretory Proteins with SignalP. **Methods in Molecular Biology**, v. 1611, p. 59-73, 2017.
- ROBINSON, P. K. Enzymes: principles and biotechnological applications. **Essays in biochemistry**, v. 59, p. 1-41, 2015.
- SINGH, J. et al. Chapter 24 - Enzymatic Processing of Juice From Fruits/Vegetables: An Emerging Trend and Cutting Edge Research in Food Biotechnology. In: KUDDUS, M. (Ed.). **Enzymes in Food Biotechnology**: Academic Press, 2019. p.419-432. ISBN 978-0-12-813280-7.
- TAMURA, K., STECHER, G., PETERSON, D., FILIPSKI, A., KUMAR S. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. **Molecular Biology and Evolution**. V. 30, p. 2725-2729, 2013.
- WOON, J. S. et al. Expression and characterization of a cellobiohydrolase (CBH7B) from the thermophilic fungus *Thielavia terrestris* in *Pichia pastoris*. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v. 63, n. 5, p. 690-698, Sep 2016.

Prospecção, seleção e identificação de bactérias produtoras de corantes

Gláucia Emy Okida Midorikawa¹, Larissa Carmona Zonta Santos²,
Patrícia Abrão de Oliveira³, Léia Cecília de Lima Fávoro⁴

Resumo

Os corantes naturais podem ser extraídos de uma variedade de plantas, animais e microrganismos. A maioria dos corantes naturais utilizados para diferentes fins é produzida a partir de plantas, entretanto, pigmentos extraídos de plantas para uso industrial possuem o gargalo da produção, estabilidade e custo. Uma alternativa mais sustentável para a produção de corantes naturais é a via biotecnológica utilizando microrganismos. O conhecimento de técnicas de cultivo, processamento e facilidade de manipulação, tornam a produção de corantes por microrganismos em larga escala um atrativo para a indústria de cosméticos, de alimentos, têxtil, de pintura, entre outras. Este trabalho apresenta a prospecção de uma coleção de bactérias associadas a plantas nativas e cultivadas de diferentes biomas quanto a sua capacidade de produzir corantes. A prospecção foi inicialmente realizada em dois meios de cultura sólidos, sendo selecionadas linhagens produtoras de colônias intensamente coloridas nas tonalidades de amarelo, rosa, vermelho e marrom em pelo menos um dos meios avaliados. A partir das linhagens de bactérias pré-selecionadas foram escolhidas 6 linhagens (Bioenzi B-132A, Bioenzi B-480A, Bioenzi B-586, Bioenzi B-648, Bioenzi B-652 e Bioenzi B-584) para avaliação da produção de corantes em condições de fermentação submersa em diferentes meios de cultura líquidos. A linhagem Bioenzi B-480A (*Serratia marcescens*) destacou-se por ser capaz de produzir corante vermelho intenso em meio NB já nas primeiras 6 h após a inoculação, intensificando a coloração nas horas subseqüentes de cultivo (24, 48, 72h). A identificação taxonômica das bactérias selecionadas revelou novas linhagens de *Sphingomonas endophytica*, *Serratia marcescens*, *Streptomyces olivaceus*, *Luteibacter yejuensis*, *Brevibacterium siliguriense* e *Curtobacterium luteum* com potencial para serem futuramente caracterizadas quanto a identidade de seus metabólitos secundários visando a descoberta de novos corantes naturais com aplicação industrial.

Palavras-chave: bioprospecção, bactérias endofíticas, corantes naturais, metabólitos secundários.

Introdução

Nas últimas décadas, tem-se observado um aumento na demanda pela troca de pigmentos sintéticos por pigmentos naturais devido a conscientização do consumidor por produtos ecológicos e sustentáveis. Os pigmentos oriundos de processos ecológicos e

¹ Bióloga, doutora em Biologia Molecular, Universidade de Brasília, colaboradora da Embrapa Agroenergia, glauciaemy@gmail.com

² Farmacêutica, especialista em Cosmetologia, Grupo Boticário, larissa.zonta@grupoboticario.com.br

³ Farmacêutica, doutora em Química, pesquisadora da Embrapa Agroenergia, patricia.oliveira@embrapa.br

⁴ Bióloga, doutora em Ciências, pesquisadora da Embrapa Agroenergia, leia.favaro@embrapa.br

que resultam em um bioproduto, além de aumentar a comercialização do produto, pode possuir propriedades de atividade biológica como as ações anticâncer e antioxidantes (Tuli et al., 2015).

Os pigmentos naturais podem ser extraídos de uma variedade de plantas, animais e microrganismos, entretanto, pigmentos extraídos de plantas para uso industrial, possuem o gargalo da produção e custo. Já os pigmentos extraídos a partir de microrganismos (fungos, leveduras, bactérias) são fontes em potencial, conhecidos por produzirem uma variedade de pigmentos, de fácil escalonamento e baixo custo de produção (Galaffu, et al., 2015), sendo promissores como fonte de pigmentos para cosméticos. A fermentação é uma estratégia importante e muito utilizada na obtenção dos pigmentos de microrganismos. Ela pode ser por meio de cultivos de fermentação estado sólido (SSF) ou fermentação submersa (SmF), onde fatores como: temperatura, pH, fontes de carbono e nitrogênio, tipo de fermentação, minerais e taxa de aeração, podem influenciar na produção de pigmentos (Kumar et al., 2015).

Diversos grupos de bactérias, fungos, leveduras e algas têm sido amplamente estudados pelo seu potencial como fonte de pigmentos (Malik et al., 2012). As bactérias podem produzir uma variedade de pigmentos como, os carotenoides, melaninas, violaceína, prodigiosina, piocianina, actinorodina e zeaxantina (Venil et al., 2014). Além da ampla variedade de pigmentos, as bactérias apresentam ciclo de vida curto e fácil manipulação, características vantajosas para uso em escala industrial. Dentre os microrganismos presentes no banco de dados de germoplasma da Embrapa, oriundo de diversos nichos ecológicos, estão presentes cepas de bactérias de diversas cores e biomas brasileiros.

Material e Métodos

As bactérias avaliadas quanto à capacidade de produzir corantes foram coletadas em diversos ambientes (endofíticas, epifíticas e da rizosfera) e associadas a plantas de diferentes regiões e biomas do Brasil. As linhagens encontravam-se preservadas na “*Coleção de Microrganismos e Microalgas Aplicados a Agroenergia e Biorrefinarias*” (CMMAABio) da Embrapa Agroenergia.

A estratégia de prospecção de bactérias produtoras de corantes foi baseada no cultivo em 2 meios de cultura sólidos, seguido de seleção de linhagens promissoras e cultivo em diferentes meios líquidos. Na etapa de prospecção em meio sólido, os meios utilizados foram: Tryptic Soy Agar – TSA (Sigma-Aldrich) e Luria Bertani Agar – LBA (Composição por Litro: 10 g de triptona; 5 g de extrato de levedura; 10 g de NaCl; 15 g de ágar bacteriológico; pH 7,2). As bactérias avaliadas foram incubadas em estufa bacteriológica a 28°C na ausência de luz por 7 dias. A avaliação das colônias quanto à coloração das células foi realizada após 3 e 7 dias de incubação por inspeção visual.

A análise da produção de corantes em fermentação submersa foi realizada nos meios Tryptic Soy Broth – TSB (Difco), Luria Bertani Broth Lennox – LB (Sigma-Aldrich) e Nutrient Broth – NB (Difco). O pré -inóculo foi realizado no meio líquido correspondente (TSB, LB e NB) com incubação à 28°C, 200 rpm por 16 h. Após o período de incubação cada linhagem foi inoculada (em triplicata) em um volume final de 50 mL do respectivo meio obtendo-se OD_{600nm} inicial igual a 0,1. Os inóculos foram incubados a 28°C, 180 rpm. As

curvas de crescimento foram obtidas a partir de medições da OD_{600nm} realizadas a cada 2 h no intervalo de 8 h, seguidas de medições após 24, 48 e 72 h de cultivo.

A linhagem *Streptomyces* sp. Bioenzi B-584, devido às suas características morfológicas (bactéria filamentosa), teve o seu crescimento avaliado por meio de medição da biomassa seca em 6 diferentes meios de cultura: Tryptic Soy Broth – TSB (Difco), Luria Bertani Broth Lennox – LB (Sigma-Aldrich), Nutrient Broth – NB (Difco), Mueller Hinton Broth – MH (Difco), M9 Broth - M9 (Fluka) e Peptone Yeast Extract Iron Broth (ISP Medium n° 6) (Tresner; Danga, 1958). A inoculação nos meios líquidos (em triplicata) foi realizada com três discos (8 mm) recortados da cultura crescida em placas completamente preenchidas de colônias. Os frascos foram incubados a 28°C, 180 rpm, por 7 dias. Ao final do cultivo a biomassa bacteriana foi recuperada e seca em estufa por 3 dias à 60°C. Os valores obtidos (três repetições) para o peso seco da massa bacteriana foram submetidos à análise estatística.

O DNA genômico das bactérias selecionadas foi extraído com o Puregene® Yeast/Bact. Kit B (Qiagen). As reações de PCR foram realizadas utilizando como molde a região 16S do DNA ribossômico (Lane, 1999) das bactérias selecionadas. Cada reação foi conduzida em 50 µL de volume final contendo: 20ng de DNA genômico, 0,2 µM de cada *primer* P0 (27F) e R1378, 1 X do Tampão da Taq (Promega), 2,0 U da Taq polimerase (Promega), 0,2 mM de dNTPs e 2 mM de MgCl₂. As condições de amplificação utilizadas em termociclador (Applied Biosystems) foi iniciada por 94°C por 4 min; seguida de 35 ciclos de amplificação a 94°C por 30 seg, 67°C por 1 min, 72°C por 1 min; extensão final de 72°C por 10 min. Os produtos de PCR foram submetidas à purificação, utilizando o Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega). As sequências foram analisadas com auxílio do software Geneious R11 (<https://www.geneious.com>) para verificação da qualidade e obtenção das sequências consenso. As sequências de boa qualidade foram analisadas com a ferramenta BLASTn (Basic Local Alignment Search Tool) contra diferentes bases de dados indicadas para identificação de bactérias, tais como GenBank (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), Ribosomal Database Project (<https://rdp.cme.msu.edu/>).

Resultados e Discussão

Os resultados da prospecção em meio sólido mostraram que todas as 332 bactérias estavam viáveis e a maioria delas estava pura. Das 332 linhagens avaliadas, 26 produziram colônias intensamente coloridas nas tonalidades de amarelo, rosa, vermelho e marrom em pelo menos um dos meios avaliados (LBA e TSA). Em geral, as bactérias produziram pigmentação intracelular, com exceção a bactéria *Streptomyces* sp. Bioenzi B-584, que além de apresentar colônias de cor marrom/castanha, também secretou compostos de cor marrom/castanha ao redor das colônias.

Das 26 bactérias coloridas pré-selecionadas na etapa de prospecção em meio sólido, foram selecionadas 6 linhagens (Figuras 1 e 2) para avaliação da produção de corantes em condições de fermentação submersa (Bioenzi B-132A, Bioenzi B-480A, Bioenzi B-586, Bioenzi B-648, Bioenzi B-652 e Bioenzi B-584) (Figura 3). A linhagem Bioenzi B-132A não apresentou crescimento no pré-inóculo, portanto não foi cultivada na fermentação submersa.

Foto: Gláucia Emy Okida Midorikawa

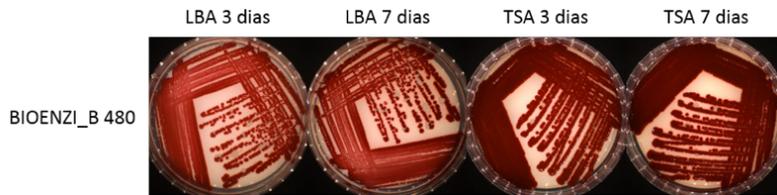


Figura 1. Linhagem de bactéria *Serratia marcescens* Bioenzi B-480A selecionada pela capacidade de produzir colônias de coloração vermelha intensa em meio de cultura sólido. A figura mostra o aspecto do crescimento nos meios sólidos LBA e TSA após 3 e 7 dias de cultivo à 28°C na ausência de luz.

Foto: Gláucia Emy Okida Midorikawa

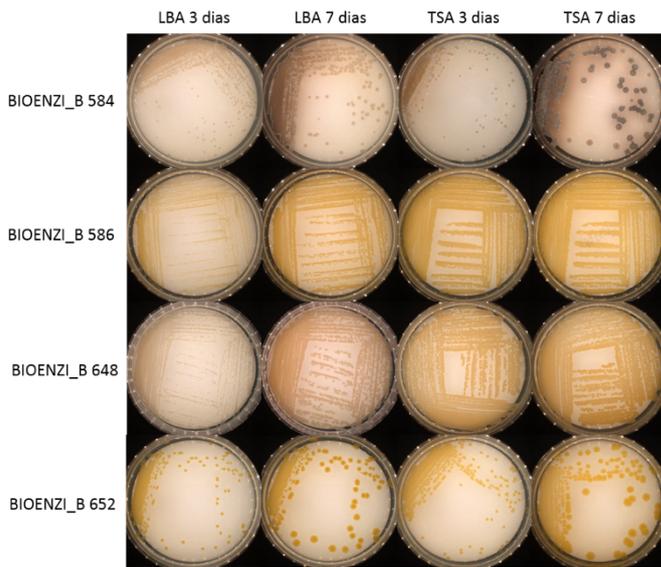


Figura 2. Linhagens de bactérias *Streptomyces* sp. Bioenzi B-584, Bioenzi B-586, Bioenzi B-648 e Bioenzi B-652 selecionadas pela capacidade de produzir colônias de coloração marrom (*Streptomyces* sp. Bioenzi B-584) e amarela (Bioenzi B-586, Bioenzi B-648 e Bioenzi B-652) em meio sólido. A figura mostra o aspecto do crescimento nos meios sólidos LBA e TSA após 3 e 7 dias de cultivo a 28°C na ausência de luz.

Foto: Gláucia Emy Okida Midorikawa

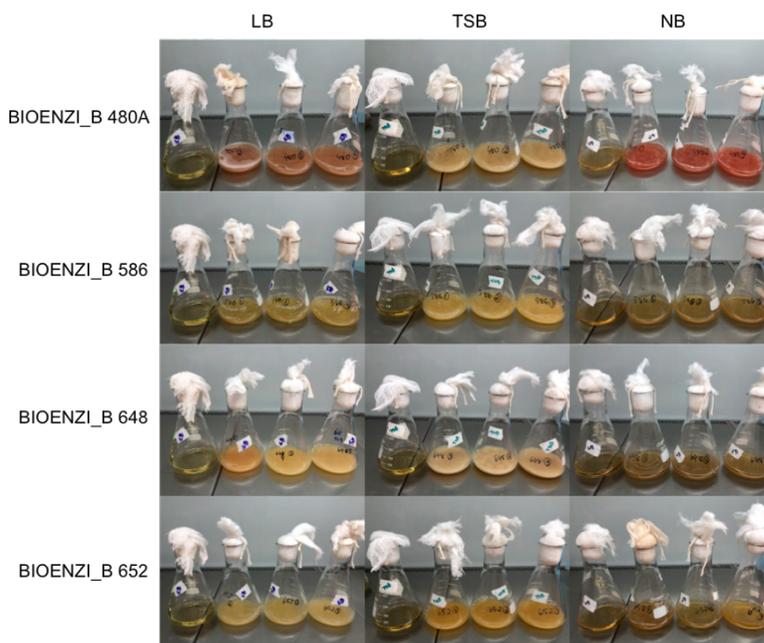


Figura 3. Aspecto visual do crescimento durante 72 horas (28°C, 180 rpm, na ausência de luz) das bactérias selecionadas Bioenzi B-480A, Bioenzi B-586, Bioenzi B-648 e Bioenzi B-652 nos meios Tryptic Soy Broth (TSB), Luria Bertani Broth (LB) e Nutrient Broth (NB). O controle (meio sem inóculo) é mostrado do lado esquerdo das imagens.

A linhagem *Serratia marcescens* Bioenzi B-480A apresentou coloração avermelhada no meio de cultura NB nas primeiras 6 h após a inoculação, intensificando demasiadamente essa coloração nas horas subsequentes de cultivo (24, 48, 72 h). Em 24 h após a inoculação a mesma linhagem apresentou coloração avermelhada no meio LB. No entanto, no meio TSB (Difco, o qual contém glicose na composição) a produção de corante não foi observada mesmo após 72 h de cultivo. Vale ressaltar que no meio sólido TSA (Sigma-Aldrich, o qual não tem glicose na sua composição) essa linhagem produziu colônias intensamente coloridas com 72 h dias de cultivo. De fato, a presença de glicose em alguns meios de cultivo leva a uma diminuição na produção ou inibe a produção de corantes vermelhos por *Serratia marcescens* provavelmente devido ao mecanismo de repressão catabólica por glicose (Darshan et al., 2015).

As linhagens Bioenzi B-586, Bioenzi B-648 e Bioenzi B-652 apresentaram coloração amarelada, levemente amarela/alaranjada e amarelada nos meios TSB, LB e TSB, respectivamente, ao final das 72 h de cultivo. De acordo com os valores de absorvância foi traçado um perfil de crescimento, onde foi possível concluir que a linhagem *Serratia marcescens* Bioenzi B-480A teve um crescimento mais rápido nos três meios de cultura (NB, TSB e LB), quando comparada com as linhagens Bioenzi B-586; Bioenzi B-648; Bioenzi B-652.

A linhagem *Streptomyces* sp. Bioenzi B-584 foi selecionada por produzir colônias de coloração castanha/marrom principalmente no meio TSA (Sigma-Aldrich) e também por ser a única bactéria selecionada capaz de secretar corantes no meio sólido. Por ser uma bactéria filamentosa, o perfil de crescimento em diferentes meios líquidos foi avaliado pela determinação de peso seco da biomassa bacteriana, ao invés de medições da absorvância. Não foi observada coloração visível das células ou do sobrenadante em nenhum dos meios (TSB, LB, NB, MH, M9 e ISP), embora uma tonalidade levemente alaranjada/acastanhada tenha sido observada no cultivo em TSB após 7 dias. A ausência de produção de compostos melanoides pela linhagem Bioenzi B-584 nos meios líquidos avaliados, pode estar relacionada a diferente composição do meio TSA (peptona de caseína, peptona de soja e cloreto de sódio), meio em que foi observada colônias de coloração castanha/marrom. A medição do peso seco da biomassa bacteriana obtida após 7 dias de cultivo nos 6 diferentes meios mostrou que os meios que melhor estimularam o crescimento e formação de biomassa da bactéria *Streptomyces* sp. Bioenzi B-584 foram ISP Medium 6, o qual é um meio específico para *Streptomyces*, MH e TSB, os quais são amplamente usados para cultivo de bactérias.

A fim de caracterizar de maneira mais detalhada, as 6 linhagens de bactérias coloridas selecionadas da biodiversidade brasileira, tiveram a sua identidade taxonômica revelada a partir da região 16S do DNA ribossômico (1.500 pb). De acordo com diferentes bases de dados, GenBank (Type strain e Nucleotide database) e RDP (Classifier tool), as linhagens foram classificadas como: Bioenzi B-132A (*Sphingomonas endophytica*), Bioenzi B-480A (*Serratia marcescens*), Bioenzi B-584 (*Streptomyces olivaceus*), Bioenzi B-586 (*Luteibacter yejuensis*), Bioenzi B-648 (*Brevibacterium siliguriense*) e Bioenzi B-652 (*Curtobacterium luteum*). Todas as sequências apresentaram homologia de 99-100% de identidade com os bancos de dados.

Dentre as linhagens promissoras, a *Serratia marcescens* Bioenzi B-480A, é conhecida pela produção de metabólitos da família das prodigiosinas, que conferem a coloração avermelhada típica dessa espécie, são insolúveis em água e possuem ampla aplicação biotecnológica (Darshan et al., 2015). A produção da coloração avermelhada pela

linhagem *Serratia marcescens* Bioenzi B-480A na fase inicial do cultivo em meio NB é um diferencial, visto que é reconhecido que a produção de prodigiosinas por *Serratia* spp. ocorre na fase estacionária de crescimento (Harris et al., 2004).

A linhagem *Streptomyces olivaceus* Bioenzi B-584 foi selecionada pela capacidade de produzir células de cor marrom e por secretar compostos marrons no meio TSA. A secreção de compostos marrons, como a melanina e similares, é típica do gênero *Streptomyces* e é um critério taxonômico desse grupo. Diferentes espécies de *Streptomyces* produzem melanina e compostos semelhantes. Embora não existam estudos detalhados sobre a produção de melaninas por *Streptomyces olivaceus* e sua caracterização química, essa espécie possui em seu genoma um *cluster* gênico responsável pela síntese de melanina (ZHANG et al., 2019). Além disso, esse actinomiceto produz dezenas de antibióticos conhecidos, muitos de uso comercial, bem como químicos de importância para bioeconomia, como ácidos orgânicos diversos.

As linhagens Bioenzi B-132A (*Sphingomonas endophytica*), Bioenzi B-586 (*Luteibacter yejuensis*), Bioenzi B-648 (*Brevibacterium siliguriense*) e Bioenzi B-652 (*Curtobacterium luteum*), selecionadas por apresentar cor em diferentes tonalidade de amarelo nos meios TSA e LBA, possuem poucos estudos com ênfase na produção de carotenoides (Forquin-Gomez et al., 2014).

Conclusão

Os resultados da triagem de bactérias, tanto em meio sólido como em meio líquido, revelaram várias linhagens com potencial para serem investigadas quanto à extração dos metabólitos secundários e investigação da identidade química dos corantes produzidos. Essas linhagens também são candidatas para o desenvolvimento de bioprocessos visando aumento da produção de corantes de interesse.

Agradecimentos

Este projeto obteve apoio financeiro do Grupo Boticário, Embrapii e Embrapa.

Referências

- DARSHAN N, MANONMANI HK. (2015) Prodigiosin and its potential applications. *J Food Sci Technol*. 52:5393-5407.
- FORQUIN-GOMEZ MP., WEIMER B.C., SORIEUL L., KALINOWSKI J., VALLAEYS T. (2014) *The Family Brevibacteriaceae*. In: Rosenberg E., DeLong E.F., Lory S., Stackebrandt E., Thompson F. (eds) *The Prokaryotes*. Springer, Berlin, Heidelberg.
- GALAFFU N, BORTLIK K, MICHEL M. (2015). An industry perspective on natural food colour stability. *Colour additives for foods and beverages*. Woodhead Publishing Series in Food Science, *Technology and Nutrition*. p. 91–130.
- HARRIS AKP, WILLIAMSON NR, SLATER H, et al. (2004). The *Serratia* gene cluster encoding biosynthesis of the red antibiotic, prodigiosin, shows species- and strain-dependent genome context variation. *Microbiology*.; 150:3547–60.
- MALIK K, TOKKAS J, GOYAL S. (2012). Microbial Pigments: A review. *International Journal of Microbial Resource Technology*. v. 1, n. 4, p. 361-365.
- SHIRLING EB, GOTTLIEB D (1966) Methods for characterization of *Streptomyces* species. *Int J Syst Bacteriol* 16:313-340.
- TULI HS, CHAUDHARY P, BENIWAL V, SHARMA AK. (2015). *Microbial pigments as natural color sources*: current trends and future perspectives. v. 52, n. 8, p. 4669–4678.

VENIL CK, ARULDASS CA, DUFOSSÉ L, ZAKARIA ZA, AHMAD WA. (2014). **Current perspective on bacterial pigments: emerging sustainable compounds with coloring and biological properties for the industry-an incisive evaluation.** v. 4, p. 39523–39529.

ZHANG C, DING W, QIN X, JU J. (2019). Genome Sequencing of *Streptomyces olivaceus* SCSIO T05 and Activated Production of Lobophorin CR4 via Metabolic Engineering and Genome Mining. **Mar Drugs.**; 17(10):593. Published 2019 Oct 20. doi:10.3390/md17100593.



**QUÍMICA DE RENOVÁVEIS
E MATERIAIS RENOVÁVEIS**

Análise evolutiva dos ácidos carboxílicos de base biológica na indústria internacional

Douglas de Lima Belém¹, Melissa Braga², João Ricardo Moreira de Almeida³

Resumo

Iniciativas no setor produtivo para a obtenção de produtos químicos a partir matéria-prima renovável estão se tornando cada vez mais recorrentes, diante da perspectiva de recursos fósseis limitados e restrições ambientais. Dentre esses produtos, destacam-se os ácidos carboxílicos, especialmente os intermediários da indústria de polímeros. Este trabalho apresenta um mapeamento da atividade empresarial relacionada à produção renovável dos ácidos acrílico, adípico, 2,5-FDCA, 3-HP, levulínico e succínico. Para tanto, foram executadas buscas na *web* por notícias relacionadas publicadas em fontes secundárias, destacadamente a imprensa especializada e, para assegurar a verossimilidade ou complementação da informação recuperada, o *website* da empresa foi consultado. Em posse desses dados e informações, foram elaborados infográficos em que as atividades foram cronologicamente posicionadas. Os resultados mostram que nos anos 2010 foi o auge das atividades empresariais no contexto desses ácidos. Grandes empresas se associaram, *startups* e *joint ventures* foram criadas, porém, ao final da década esse movimento desacelerou e muitas dessas uniões foram desfeitas e empresas fechadas, por razões técnicas e econômicas. Dentre as empresas remanescentes de maior notoriedade, estão GF *Biochemicals* para o levulínico, a Avantium para o 2,5-FDCA, a Succinity para o succínico e a Cargill para o acrílico e 3-HP.

Palavras-chave: ácidos carboxílicos, base biológica, *players*.

Introdução

Os ácidos carboxílicos são os compostos orgânicos, cujas estruturas contêm uma ou mais carboxilas. Embora encontrem mercado pelo uso direto, destacadamente na indústria de alimentos, a capacidade dessa carboxila terminal de sofrer reações de redução, aminação, esterificação ou neutralização, caracteriza essa classe de compostos como intermediários importantes na indústria química, através dos quais se obtém uma série de outros produtos tais como álcoois, aldeídos, amidas ésteres e sais, de grandes volumes e relevância, destacadamente a indústria de polímeros.

A grande dependência que a sociedade moderna possui dos plásticos associada à perspectiva de escassez do petróleo impulsiona o desenvolvimento de matérias-primas renováveis para a produção de plásticos de base biológica (Harmsen, 2014).

¹ Graduando em Gestão do Agronegócio, Universidade de Brasília, douglas.belem@colaborador.embrapa.br.

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

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

Assim, é cada vez mais recorrente na literatura científica e patentária a descrição de propostas tecnológicas para produção de ácidos provenientes de matérias-primas renováveis em substituição à de origem fóssil. Entre esses ácidos, estão desde os com altos volumes de produção como o acrílico e adípico, e também outros, com baixo volume ou sem produção comercial estabelecida, que podem vir a ser substitutos de petroquímicos. Neste último caso, estão o 2,5-furanodicarboxílico (2,5-FDCA), como alternativa ao ácido tereftálico; (Pavone, 2015) o 3-hidroxipropiônico (3-HP), como intermediário do acrílico (Vidra; Nemeth, 2018); o levulínico, cujos ésteres são usados como plastificantes e aditivos para resinas ou combustíveis; (Hartweg; Becer, 2018) e o succínico, como precursor do 1,4-butanodiol (Nghiem et al., 2017).

A despeito do grande número de publicações científicas acerca do tema, a indústria, especialmente a de *commodities*, é conservadora e não faz mudanças em processos produtivos estabelecidos sem garantias de sucesso no negócio. O acompanhamento dessas mudanças, entretanto, não é algo simples devido à grande pulverização de informações. Ao contrário das publicações científicas e patentárias, que se encontram concentradas e estruturadas em base de dados, a informação sobre negócios e estratégias do setor privado deve ser minerada em diferentes fontes, especialmente em *websites*.

Se por um lado a busca e consolidação de dados e informações associados ao setor produtivo não é uma tarefa simples, as notícias da *web* podem consistir a única fonte de informações acerca de tecnologias em estágio mais avançado de desenvolvimento tecnológico. Juntamente com publicações científicas patentárias e não patentárias, auxiliam a compor um cenário de uma dada área tecnológica e servir de insumo para o planejamento estratégico de outras instituições cujos negócios estão relacionados (Lezama-Nicolas et al., 2018)

Isso posto, este trabalho tem como objetivo mapear, por meio de dados e informações recuperadas na *web*, as principais iniciativas da indústria em relação à produção renovável dos ácidos acrílico, adípico, 2,5-FDCA, 3-HP, levulínico e succínico.

Material e Métodos

A busca de empresas do setor produtivo (*players*) associadas aos seis ácidos escolhidos foi feita na ferramenta de buscas Google, associando o nome comum do ácido em inglês com as expressões “*renewable*” ou “*bio-based*”. Inicialmente empregou-se fontes secundárias como *websites* de notícias e revistas eletrônicas, destacadamente: *Chemical and Engineering News*, *Chemical Engineering Online*, *Biofuels Digest*, *Biomass Magazine*, *News Biobased EU*, *Bioplastics News*, *Independent Commodity Intelligence Service* (ICIS). Em seguida, os *websites* das empresas foram consultados, para confirmar ou complementar a informação recuperada na primeira fonte.

Em posse desses dados e informações acerca dos *players*, foram construídas linhas temporais dos eventos, associadas a símbolos que representam o estágio de maturidade tecnológica (pesquisa e desenvolvimento, piloto/demonstração ou comercial), o tipo de rota de obtenção (química, bioquímica, híbrida), negócio (*joint venture*, licenciamento e venda de negócio) ou mudança da razão social. Os ingressantes e desistentes do negócio também foram identificados. Quando disponível, as capacidades instaladas para plantas piloto, demonstrativa ou industrial foram apresentadas. Como resultado, obteve-se

infográficos para cada ácido, ordenando as informações em ordem cronológica dos principais *players* associados aos símbolos apresentados na Tabela 1.

Tabela 1. Símbolos usados nos infográficos acerca dos ácidos.

| Símbolo | Significado | Símbolo | Significado | Símbolo | Significado |
|---|--|---|-----------------------|---|-----------------------------|
|  | Licenciamento de tecnologia |  | Pesquisa |  | <i>Players</i> ingressantes |
|  | Joint venture ou parceria para codesenvolvimento |  | Piloto/ Demonstração |  | <i>Players</i> desistentes |
|  | Venda de negócio |  | Comercial/ Industrial | Q | Rota química |
|  | Troca de razão social | | | B | Rota bioquímica |
| | | | | H | Rota híbrida |

Resultados e Discussão

As principais iniciativas divulgadas acerca de pesquisa, desenvolvimento, escalonamento e comercialização dos ácidos acrílico, adípico, 2,5-FDCA, 3-HP, levulínico e succínico, ocorreram nos anos 2000, no continente europeu e nos Estados Unidos da América.

Muitas *joint ventures* foram estabelecidas com o propósito de desenvolvimento e/ou produção comercial de renováveis. Dentre elas, destaca-se a criação de novas empresas, como a Succinity, resultado de união da Basf e Corbion; a Reverdia, resultado da união entre a DSM e Roquette; e a Synvina, da união entre a Basf e Avantium. A criação de uma entidade com personalidade jurídica própria confere um caráter otimista em relação ao negócio, dada a complexidade e custo de manter uma nova instituição cujo negócio é incerto.

As iniciativas dos ácidos acrílico e 3-HP estão diretamente vinculadas, conforme mostram as Figuras 1 e 2, visto que o primeiro pode ser obtido por meio da desidratação do segundo. Assim, todos os *players* apresentados na Figura 1 constam na Figura 2, exceto a Metabolix (atualmente Yield10), cujo objetivo principal era a produção de polialcanoatos. Nota-se a presença de grandes multinacionais, pertencentes à tradicional indústria petroquímica (BASF, Dow, Nippon Shokubai, Arkema) líderes na produção de ácido acrílico, associadas a empresas de biotecnologia como Novozymes, ADM e Cargill. Contudo, tanto BASF, que atualmente é a maior produtora global de ácido acrílico, quanto a Dow, deixaram a parceria em 2015 e 2014, respectivamente.

A Cargill vale-se de sua experiência em produção acidulantes, ácido cítrico e citratos, para expandir seu portfólio de produtos biotecnológicos. Dentre as iniciativas identificadas, está a compra de parte da Nature Works, um dos grandes fabricantes de ácido láctico e as alianças para o desenvolvimento dos ácidos 3-HP em parceria com a Novozymes e acrílico com a BASF.

Além do 3-HP, duas outras matérias-primas destacam-se como potenciais precursores do ácido acrílico: o ácido láctico e a acroleína (Grasselli; Trifiro, 2017). De

modo geral, a rota via ácido láctico apresenta-se como segunda opção diante da via 3-HP, visto que ácidos β -hidroxilados (3-HP) são mais susceptíveis à desidratação do que os α -hidroxilados (ácido láctico). Além disso, a produção biológica de ácido láctico não é economicamente viável para grandes fermentações em escala industrial, devido às exigências de meios nutricionalmente ricos e condições de pH próximo à neutralidade. Somadas, essas podem ser as razões pelas quais as grandes empresas têm optado pelo processo via 3-HP.

O glicerol, coproduto do processo de produção de biodiesel a partir de óleos vegetais, também é considerado matéria-prima renovável. Sua importância neste contexto está no fato de que a remoção de duas moléculas de água gera a acroleína, precursora do ácido acrílico. O processo mais estudado até o momento é uma rota exclusivamente química, avaliada pela empresa francesa Arkema e a japonesa Nippon Shokubai.

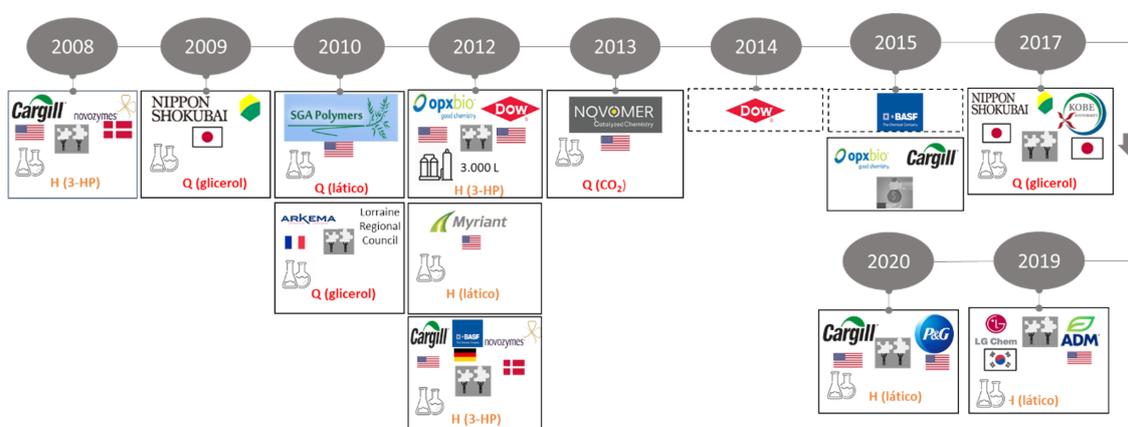


Figura 1. Infográfico da movimentação recente dos players no mercado do ácido acrílico renovável.

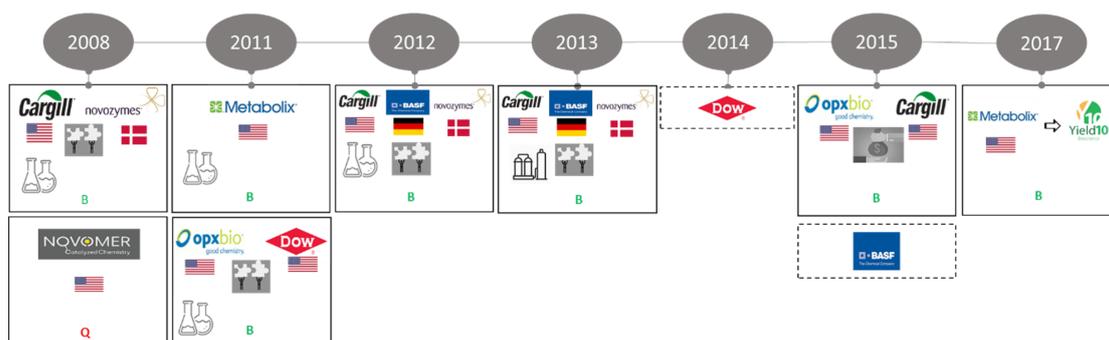


Figura 2. Infográfico da movimentação recente dos players no mercado do ácido 3-HP renovável.

Alternativamente, *startup* Novomer propõe um novo processo de captura do dióxido de carbono residual (da geração de gás industrial), conversão em monóxido de carbono usando um processo de eletrólise de óxido sólido, e finaliza o processo químico-catalítico convertendo o CO e o óxido de etileno em ácido acrílico.

Os casos dos diácidos adípico e succínico são os casos mais singulares dentre os ácidos analisados neste trabalho. No início dos anos 2010 tiveram vários ingressantes, a maior parte *startups* ou empresas de pequeno porte de base biológica concebidas para

desenvolvimento desses ácidos. No entanto, até o final da década, a maioria entrou em colapso por não suportar a concorrência com os petroquímicos diante da baixa do preço do petróleo. O ano de 2018 foi derradeiro para a Rennovia, Verdezyne e Bioamber, todas empresas de biotecnologia que investiram esforços e investimentos em instalações de planta de demonstração para a produção dos ácidos (Figura 3).

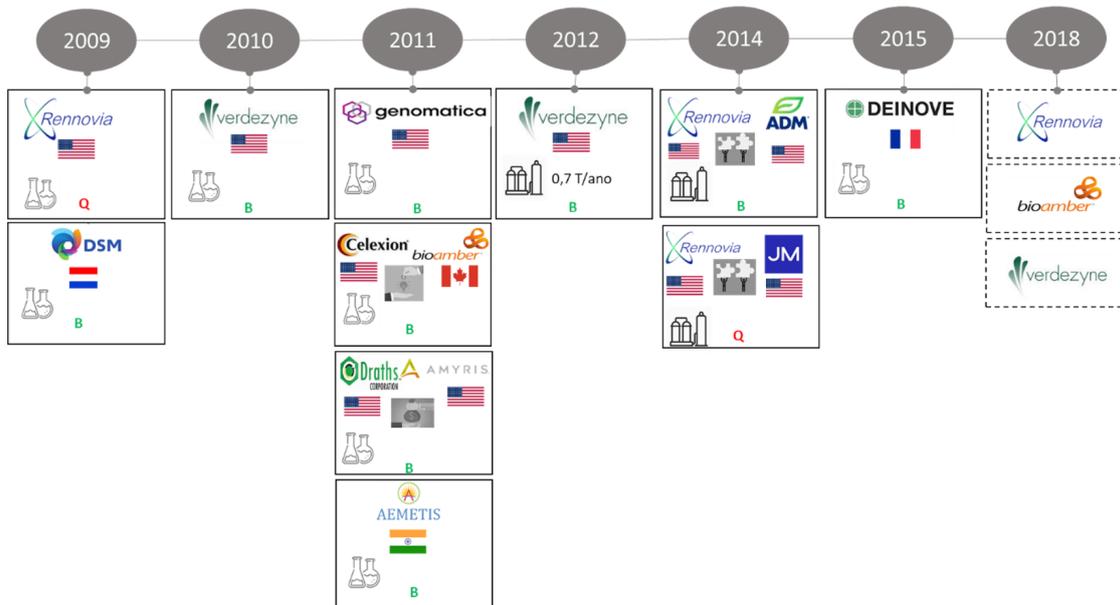


Figura 3. Infográfico da movimentação recente dos *players* no mercado do ácido adípico renovável.

A barreira de entrada no mercado para o ácido adípico é exclusivamente o custo de produção, o qual minimamente deve ser igual ou muito próximo ao do petroquímico. O mercado de 2,85 milhões T/ano é atrativo e estabelecido (Deng et al, 2016). O succínico, por sua vez, cujo mercado não ultrapassa 50 mil T/ano (Rokem, 2020), além de apresentar custo competitivo frente ao petroquímico, deve demonstrar a viabilidade técnica para os grandes consórcios que investiram nesse ácido como intermediário, especialmente do 1,4-butanodiol, cujos volumes industriais são bastante atrativos.

A situação de empresas como Myriant, BioAmber, BASF-Purac (Succinity) e Reverdia (DSM-Roquette), que investiram recursos na construção de plantas comerciais, é extremamente frágil diante das flutuações de preços do petróleo bruto. A DSM e a Roquette dissolveram sua *joint venture* de ácido succínico. Já BioAmber fechou a fábrica e pediu falência em 2018 (Figura 4). A fábrica da Reverdia na Itália continua a ser operada pela Roquette, mas a DSM iniciou processo de licenciamento da tecnologia para terceiros. Além da falência ou desistência das empresas apontadas acima, as remanescentes estão ociosas.

Os ácidos 2,5-FDCA e levulínico não têm mercados estabelecidos e enquadraram-se como substitutos ou alternativas a produtos pré-existentes. Ambos têm rotas similares, com 5-hidroximetilfufural como intermediário, sendo que o primeiro ácido é obtido a partir da hidrólise e o segundo por oxidação desse intermediário. Diante da baixa complexidade das etapas que precedem os produtos, a principal aposta de rotas concentra-se na rota química conforme apresentado no infográfico da Figura 5.

A *GFBiochemicals* está envolvida em pesquisa e desenvolvimento do ácido levulínico desde 2009 e, desde então, fez parcerias com empresas de engenharia para o escalonamento da tecnologia de obtenção do levulínico conjuntamente com o ácido fórmico a partir de biomassa lignocelulósica. Em 2016 adquiriu a *Segetis*, que até então já operava uma planta de demonstração nos EUA para esse ácido. Atualmente, divulga que tem produção comercial do ácido a partir de biomassa, com uma capacidade instalada de 8 mil T/ano. Não foram encontrados registros subsequentes que atestem o progresso da *Biofine* e nem dos outros *players*.

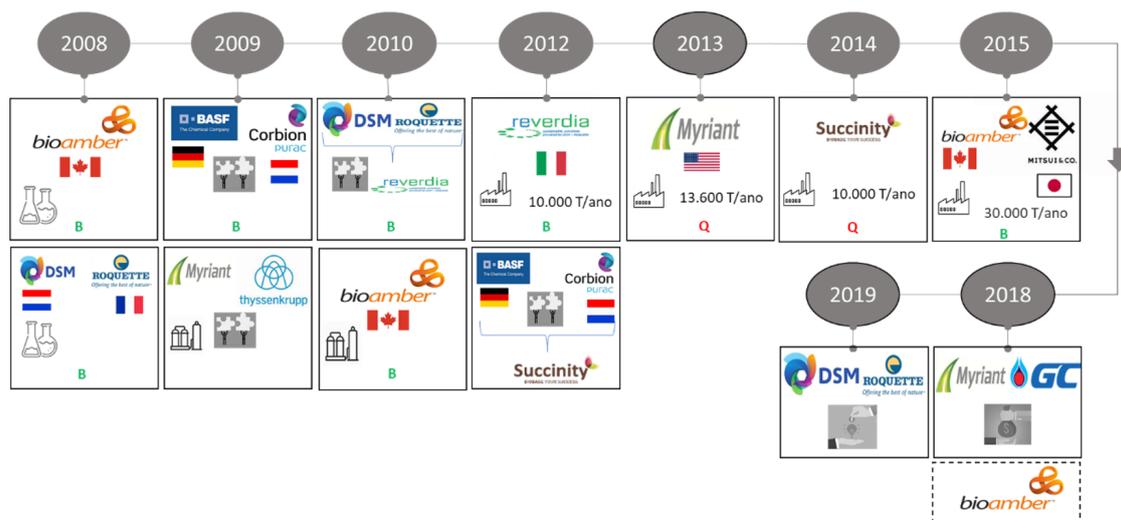


Figura 4. Infográfico da movimentação recente dos *players* no mercado do ácido succínico renovável.

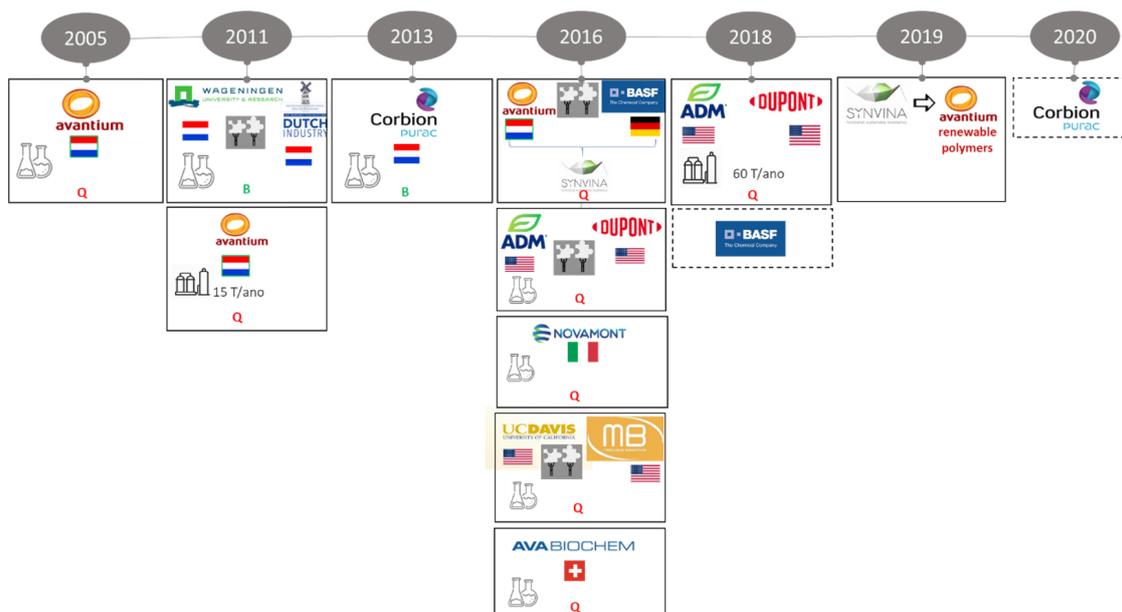


Figura 5. Infográfico da movimentação recente dos *players* no mercado do ácido 2,5-FDCA renovável.

O ácido 2,5-FDCA tem a Avantium como a empresa que há mais tempo investe no furanoato de polietileno (PEF), polímero resultante da condensação desse ácido com o etilenoglicol. Caso a tecnologia intitulada YXY se consolide e se o etilenoglicol também for de origem vegetal, o resultado será um plástico 100% de base biológica, porém não biodegradável. A parceria com a Basf, que resultou na *joint venture* Synvina, previa a instalação de uma planta na Bélgica com capacidade instalada de 50 mil T/ano, mas com a saída da Basf em 2018, o empreendimento passou a se chamar Avantium Renewable Polymers e reduziu os planos para uma planta de 5 mil T/ano.

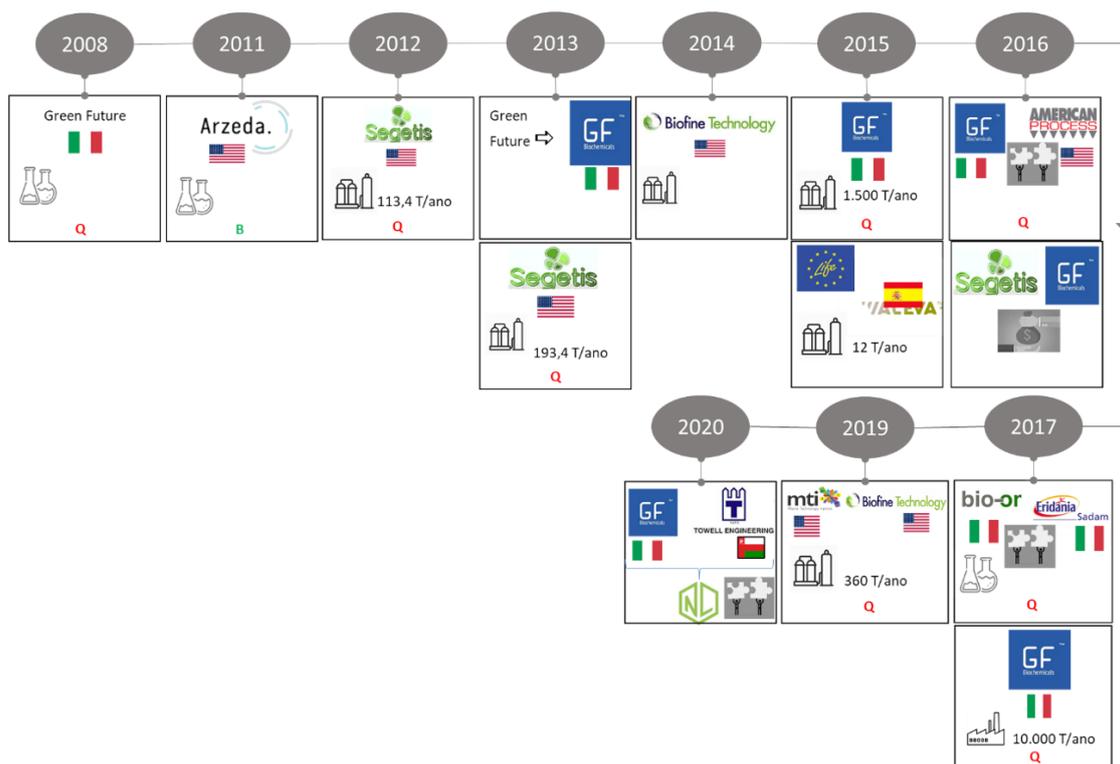


Figura 6. Infográfico da movimentação recente dos *players* no mercado do ácido levulínico renovável.

A abordagem por rota bioquímica da Corbion segue de forma oposta à da Avantium e dos outros *players*, porém recentemente decidiu por pausar o negócio com o 2,5-FDCA.

O levantamento apresentado neste trabalho mostra grande entusiasmo nos anos 2010 acerca da pesquisa e desenvolvimento dos ácidos avaliados, porém o saldo de *players* após uma década demonstra que poucos restaram. Dentre os remanescentes, destaca-se a GF *Biochemicals* para o levulínico, a Avantium para o 2,5-FDCA, a Succinity para o succínico e a Cargill para o acrílico e 3-HP.

Atualmente, a produção de ácidos a partir de matérias-primas renováveis é restrita a mercados capazes de arcar com custos mais elevados de produção, como por exemplo, a área farmacêutica e cosmética, partindo de amido, frutose ou glicose. Dentre os ácidos cujo vínculo de base biológica é efetivo e comercial, estão os ácidos cítrico e láctico. Os demais, como os abordados neste estudo, não têm conseguido superar as barreiras políticas, logísticas ou econômicas à implementação. Entretanto, as mudanças no cenário econômico e as oscilações do preço do petróleo em decorrência das guerras

comerciais entre as nações criam um clima de instabilidade para a criação de negócios no setor de renováveis para substituição de petroquímicos.

Conclusão

A última década foi marcada por uma série de iniciativas no campo empresarial acerca de pesquisa e desenvolvimento de ácidos acrílico, adípico, 2,5-FDCA, 3-HP, levulínico e succínico a partir de matérias-primas renováveis. Embora no começo da década observou-se um cenário otimista, com alianças e surgimento de *startups* compartilhando espaço com grandes multinacionais, no final da década houve uma desaceleração e poucos restaram.

Dentre as justificativas apresentadas pelos desistentes há um reposicionamento de estratégia. Porém, ainda há uma série de obstáculos a serem transpostos para o sucesso do negócio de ácidos carboxílicos renováveis, dentre eles a questão de preço do produto. Até o momento, o mercado não está disposto a arcar com custos mais elevados enquanto houver petroquímicos a preço menores. Os “novos” produtos, como o 2,5-FDCA e levulínico, por sua vez, precisam provar que há um ganho real pela troca, seja ele econômico, ambiental ou tecnológico. Caso essa comprovação seja viável, será possível garantir uma reserva de mercado e o sucesso do negócio.

Referências

- DENG, Y.; MA L.; MAO, Y. Biological production of adipic acid from renewable substrates: Current and future methods. **Biochemical Engineering Journal**, v. 105, p.16-26, 2016.
- GRASELLI, R.K.; TRIFIRO, F. Acrolein and acrylic acid from biomass. **Rendiconti Lincei**, v. 28, n. 1, p.59-67, 2017.
- HARMSSEN, P.F.H.; HACKMANN, M.M.; BOS, H.L., Green building blocks for bio-based plastics. **Biofuels, Bioproducts and Biorefining**, v.8, n.3, p. 306-324, 2014.
- HARTWEG, M.; BECER, C.R. Levulinic acid as sustainable feedstock in polymer chemistry. In: Cheng, H. N.; Gross, R. A.; Smith P. B. (eds) **Green Polymer Chemistry: New Products, Processes, and Applications**. American Chemical Society 2018. p. 331-338.
- LEZAMA-NICOLÁS, R.; RODRÍGUEZ-SALVADOR, M.; RÍO-BELVER, R.; BILDOSOLA, I. A bibliometric method for assessing technological maturity: the case of additive manufacturing. **Scientometrics**, v.117, n.3, p.1425-1452, 2018.
- NGHIEM, N.P.; KLEFF, S.; SCHWEGMANN, S. Succinic acid: technology development and commercialization. **Fermentation**, v.3, n.2, p. 26, 2017.
- PAVONE, A. **A private report by the Process Economics Program**. Santa Clara, California. Disponível em: <https://ihsmarkit.com/pdf/RP284-toc_173767110917062932.pdf>. Acesso em: 14 ago. de 2020.
- ROKEM, J.S. TCA cycle organic acids produced by filamentous fungi: The building blocks of the future. In: Nevalainen H. (ed). **Grand Challenges in Fungal Biotechnology**. Cham: Springer 2020. p. 439-76.
- VIDRA, A.; NÉMETH, Á. Bio-based 3-hydroxypropionic acid: a review. **Periodica Polytechnica Chemical Engineering**, v.62, n.2, p.156-166, 2018.

Desidratação do ácido láctico para obtenção de ácido acrílico

Raquel Maria Vieira Ramos¹, Marina Rodrigues de Amorim Santos², Emerson Leo Schultz³, Wesley Gabriel de Oliveira Leal⁴, Itânia Pinheiro Soares⁵

Resumo

A indústria do petróleo é a maior produtora de ácido acrílico e seus precursores. O ácido acrílico, ou ácido propenoico, é uma comódite química de valor e demanda consideráveis, utilizado principalmente para produção de poliacrilato. Entretanto, as pesquisas sobre energias renováveis vêm sendo bastante discutidas e têm ganhando visibilidade, propondo matérias-primas alternativas e sustentáveis para a obtenção do ácido acrílico, sendo que uma das possíveis rotas a semissintética a partir da desidratação do ácido láctico, obtido por via fermentativa. Esse trabalho tem objetivo de testar catalisadores na reação de desidratação do ácido láctico comercial, visando a obtenção do ácido acrílico.

Palavras-chave: ácido láctico, ácido acrílico, desidratação catalítica.

Introdução

O ácido acrílico, ou ácido propenoico, é uma comódite de valor e demanda consideráveis. A técnica mais comumente utilizada pelas indústrias para a produção do ácido acrílico é pela via sintética utilizando derivados do petróleo, como o propeno. Também, pode ser obtido por rota fermentativa, de fontes renováveis ou por rota semissintética a partir da desidratação do ácido láctico de processo fermentativo (Jaimes, 2013).

O ácido láctico ou ácido 2-hidroxiopropanóico, além de ser o ácido orgânico de maior ocorrência na natureza, pode ser obtido de uma variedade de bioprodutos, e possui ampla faixa de aplicações industriais. Pode ser obtido por síntese química e processos de fermentação baseados em biomassa. A via fermentativa é mais barata e sustentável, além de possibilitar novas rotas para obtenção de produtos químicos de fontes renováveis. A produção de ácido láctico a partir de fungos e bactérias lactâmicas (*Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Streptococcus*) tem vantagens como: as condições operacionais brandas (temperatura e pressão), baixo consumo de energia, uso de matéria-prima renovável, baixa toxicidade dos catalisadores (Lunelli, 2010). Sendo assim, as indústrias teriam outro caminho para produção do ácido acrílico para produtos como polímeros absorventes de água, adesivos e agentes de tratamento têxtil.

A síntese de ácido acrílico a partir da reação de desidratação do ácido láctico foi publicada inicialmente em 1958 por Holmen et al. que descreveram, com catalisadores

¹ Graduanda em Farmácia, Universidade de Brasília, estagiária na Embrapa Agroenergia, raquelvieiraramos@gmail.com

² Graduanda em Farmácia, Universidade de Brasília, estagiária na Embrapa Agroenergia, marinasantos38@gmail.com

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

⁴ Químico, mestre em Química, analista da Embrapa Agroenergia, wesley.leal@embrapa.br

⁵ Química, doutora em Química, pesquisadora da Embrapa Agroenergia, itania.soares@embrapa.br

de fosfato e sulfato, conversão de 68% em temperatura de 400 °C. Embora os avanços posteriores tenham sido pequenos, ainda existem alguns desafios na produção industrial, como a redução de custos no processo, além do baixo rendimento devido às várias reações concorrentes (hidrogenação, condensação, descarboxilação e esterificação). As principais reações competidoras da reação de desidratação são a descarboxilação e a descarbonilação. A Figura 1 mostra os possíveis produtos obtidos pela desidratação do ácido láctico (adaptado de Zhang; Lin; Xu; Cen, 2008).

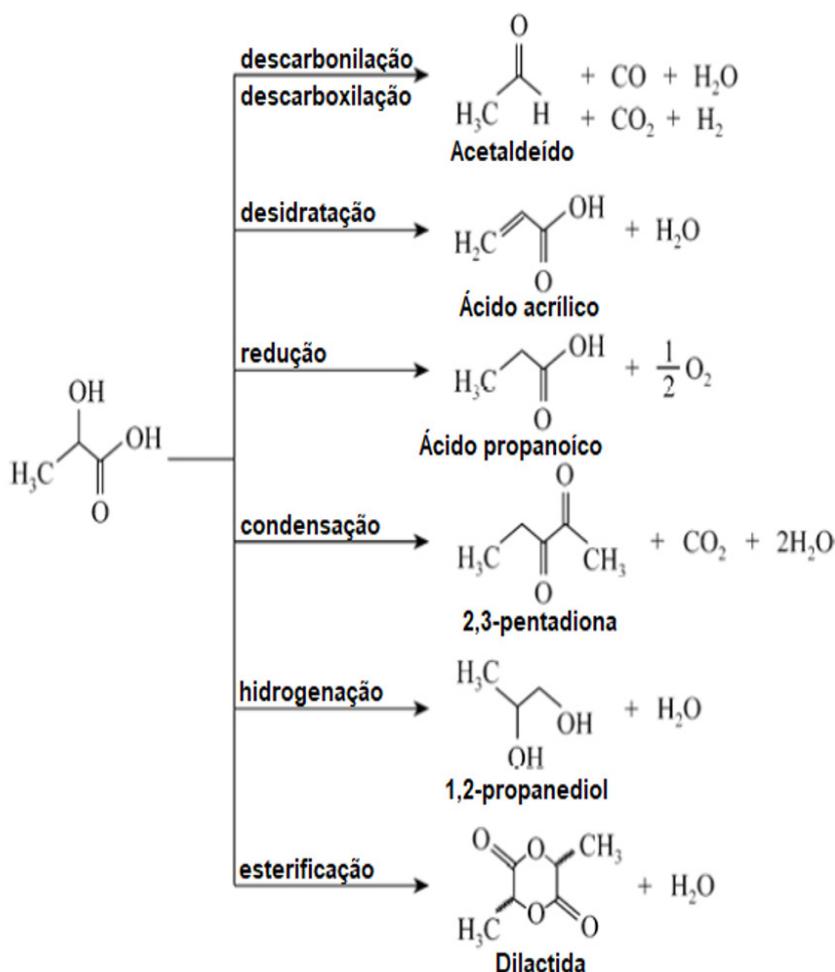


Figura 1. Vias de conversão química do ácido láctico.

Para aumentar os rendimentos da produção de ácido acrílico a partir da desidratação do ácido láctico, principalmente inibindo a produção de acetaldeído, alguns autores propõem o uso de zeólitas (aluminossilicatos cristalinos) com elementos dos grupos I e II, particularmente Na, K, Mg, Ca, Sr e Ba (Jaimes, 2013). Zhang et al. (2014) realizou estudos com a zeólita NaY modificada com sais de potássio tentando correlacionar o desempenho catalítico com estrutura de poros, acidez do catalisador e localização de íons metálicos do NaY modificados, o que ajuda a entender a química catalítica e desenvolver catalisadores sólidos mais eficientes para a desidratação de ácido para ácido acrílico.

Durante a desidratação do ácido láctico para ácido acrílico são usados gases como Ar, N_2 e CO_2 como diluentes, para facilitar a passagem dos reagentes pelo reator. Segundo

Zhang et al. (2009) o CO_2 , teria ainda outra função. Devido ao equilíbrio químico, o gás inibiria a ocorrência das reações de descarboxilação e descarbonilação. A reação de desidratação catalítica do ácido láctico inicia com a formação do estado de transição gerado entre a molécula de ácido láctico, átomos C_2 e C_3 , e os sítios ácidos e básicos do catalisador, átomos O_2 e K^+ , seguido da perda dos grupos β -próton e a α -hidroxila mediante o mecanismo de eliminação, gerando uma molécula de ácido acrílico com posterior geração de uma molécula da água que é eliminada do catalisador (Sun et al., 2010). Vários catalisadores com diferentes locais ativos foram testados para esta reação. A fim de identificar melhor os recentes avanços catalíticos e desenvolvimentos, os catalisadores foram divididos em três grupos: zeólitas, fosfatos e sulfatos (Avasthi; Bohre; Grilc; Likozar; Saha, 2020).

Tendo em vista o grande emprego das zeólitas, o presente trabalho teve como objetivo avaliar o desempenho de zeólitas comerciais, sendo que uma delas foi modificada com sódio e iodeto de potássio, na desidratação de ácido láctico para produção de ácido acrílico.

Material e Métodos

Material

Ácido láctico, Sigma Aldrich Ltda., pureza 85%; nitrato de sódio (NaNO_3); iodeto de potássio (KI) e zeólitas comerciais, da Zeolyst International: NH_4 – ZSM – 5 (CBV2314 com razão Si/Al de 24 e CBV28014 com razão Si/Al de 297) e NH_4 – Y (CBV500 com razão Si/Al de 5,2).

Preparo do catalisador

As zeólitas comerciais na forma amoniacal (NH_4^+) foram calcinadas a $650\text{ }^\circ\text{C}$ por 6 horas, para obtenção das suas formas protônicas (H^+). A zeólita Y foi modificada por troca iônica para obtenção da zeólita NaY. Para isso, 10 g da zeólita Y foram adicionados a 250 mL de solução 1 N de NaNO_3 . A suspensão foi agitada a 350 rpm por 12 horas a $25\text{ }^\circ\text{C}$, filtrada a vácuo e lavada com água deionizada, seguido por secagem e calcinação a $500\text{ }^\circ\text{C}$ por 6 horas. Posteriormente, a zeólita NaY foi modificada com KI, utilizando 10 g da zeólita NaY, adicionado-se em 22 mL de solução 0,4 M de KI. A suspensão foi agitada a temperatura ambiente por 12 horas, filtrada, lavada, seca, calcinada a $500\text{ }^\circ\text{C}$ por 6 horas, moída e peneirada.

Reação de desidratação

A reação foi realizada em um reator tubular de leito fixo da PID ENG & Tech (D.I. de 9,1 mm, L = 300 mm). O catalisador foi colocado no interior do reator sobre uma camada de lã de quartzo contida em um suporte de aço inoxidável. O reator foi aquecido a $350\text{ }^\circ\text{C}$, em fluxo de argônio ($30\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$) e mantido nesta temperatura, com tempo total de 60 min. Em seguida, o fluxo de argônio foi diminuído para $15\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ e a solução de ácido láctico foi bombeada por uma bomba HPLC em um fluxo de $0,05\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$. O produto da reação foi condensado e coletado. Em um dos experimentos, usou-se dióxido de carbono (CO_2) ao invés de argônio. As condições experimentais e os catalisadores usados nos experimentos realizados estão na Tabela 1. A amostra usando o catalisador KI–NaY em atmosfera de CO_2 (última linha da Tabela 1), foi nomeada KI–NaY CO_2 .

Tabela 1. Catalisadores e condições experimentais usados na desidratação do ácido láctico.

| Zeólita | Tempo de reação (h) | Gás usado na reação |
|------------------------------|---------------------|---------------------|
| Zeólita ZSM – 5, Si/Al = 24 | 3 | Argônio |
| Zeólita ZSM – 5, Si/Al = 297 | 3 | Argônio |
| Zeólita Y, Si/Al = 5,2 | 3 | Argônio |
| Zeólita ZSM – 5, Si/Al = 24 | 2 | Argônio |
| Sem catalisador | 1 | Argônio |
| KI–NaY | 2 | Argônio |
| KI–NaY | 2 | CO ₂ |

Análise por cromatografia gasosa e espectrometria de massas (GC/MS)

Para análise do líquido obtido na reação de desidratação do ácido láctico foi utilizado o sistema de cromatografia multidimensional MDGC, Shimadzu GC-2010. Na primeira dimensão (GC – FID): injetor Split, razão de split 100:1, sua temperatura: 280 °C, e o volume de injeção 300 µL, gás de arraste: He com vazão de 1,5 mL.min⁻¹. Coluna ZB – 1701 com dimensões 60 m x 0,25 mm x 0,25 µm. Programação de temperatura: Ti 40 °C, isoterma 3 min, razão de aquecimento 10 °C.min⁻¹ até 150 °C, razão de aquecimento 20 °C até 260°C, isoterma 10 min. O detector FID: H₂ 40 mL.min⁻¹, ar: 400 mL.min⁻¹, gás de auxílio He: 30 mL.min⁻¹ e temperatura: 280 °C. Na segunda dimensão: coluna de sílica 2,3 m x 0,25 mm (sem fase estacionária) com vazão de 1,0 mL.min⁻¹ e temperatura do forno: 260 °C; espectrômetro de massas: triplo quadrupolo, modo Q 3 Scan, razão massa M/Z 35-400, fonte: 235 °C, interface: 245 °C.

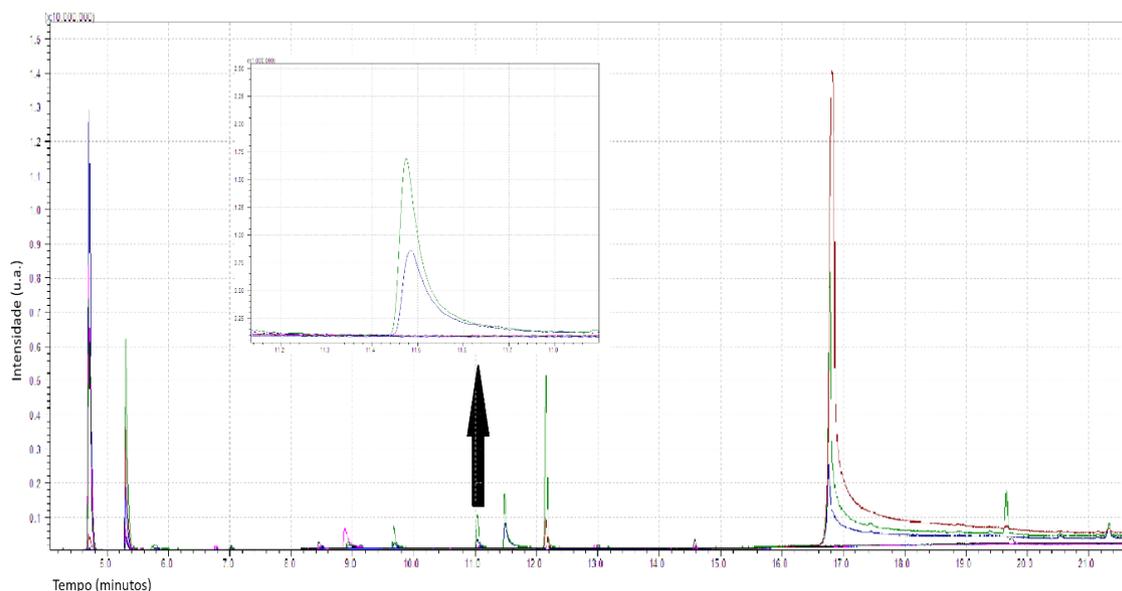


Figura 2. Cromatografia CG-MS. preto: Zeólita CBV 28014; rosa: Zeólita Y CBV 500; marrom: Sem catalisador; verde: KI–NaY; azul escuro: KI–NaY CO₂.

Tabela 2. Identificação dos compostos nas diferentes condições, utilizando CG-MS.

| Nome dos compostos | 1 ZSM-5 24,3 | | 2 Zeólita CBV 28014 | | 3 Zeólita Y CBV500 | | 4 Teste 1h | | 5 Sem catalisador | | 6 KI-NaY | | 7 KI-NaY CO ₂ | |
|--|----------------------|----------|---------------------------|----------|--------------------------|----------|---------------|----------|----------------------|------|-------------|------|-----------------------------|------|
| | Tempo de redenção | Área | Área | Área | Área | Área | Área | Área | Área | Área | Área | Área | Área | Área |
| Acetaldeído | 4,704 | 4,40E+06 | 1,03E+07 | 1,21E+07 | 3,13E+04 | 6,30E+05 | 1,12E+07 | 1,82E+07 | | | | | | |
| Etanol | 5,299 | 1,49E+06 | 6,24E+05 | 1,09E+06 | 3,22E+06 | 5,97E+06 | 1,09E+07 | 7,39E+05 | | | | | | |
| Anidrido acético | 5,785 | ND | ND | ND | ND | 3,77E+03 | 5,79E+05 | ND | | | | | | |
| Metil glicoxal | 5,785 | ND | ND | ND | ND | 3,77E+03 | 5,79E+05 | ND | | | | | | |
| 2-Butanona | 7,014 | 4,72E+04 | 4,93E+04 | 8,27E+04 | 1,48E+03 | 1,09E+03 | 2,24E+05 | 2,18E+05 | | | | | | |
| Ácido acético | 8,919 | 6,55E+05 | 8,63E+04 | 7,56E+05 | ND | ND | 2,43E+05 | 2,12E+05 | | | | | | |
| 2-Propanona, 1-hidroxi- | 9,673 | 4,32E+03 | ND | ND | ND | ND | 1,49E+06 | 3,13E+05 | | | | | | |
| Ácido propanoico | 11,034 | ND | ND | 3,79E+04 | ND | 9,50E+03 | 6,92E+05 | 1,73E+05 | | | | | | |
| Ácido propenoico | 11,475 | ND | ND | ND | ND | ND | 2,31E+06 | 1,16E+06 | | | | | | |
| Ácido propanoico, 2-hidroxi-, éster etílico | 12,155 | 4,97E+03 | 8,49E+04 | 8,93E+04 | ND | 1,79E+06 | 9,30E+06 | 3,76E+04 | | | | | | |
| 1,3-dioxolano, 1,4,5-trimetil- | 13,008 | ND | ND | ND | ND | ND | 6,75E+04 | 5,09E+04 | | | | | | |
| Ácido propanoico, 2-hidroxi-, éster metílico, (+/-) | 16,777 | 1,91E+04 | ND | ND | ND | 5,33E+07 | 2,30E+07 | 5,61E+06 | | | | | | |
| 2 (5H) -Furanona, 3-metil- | 17,444 | ND | ND | ND | ND | ND | 9,16E+04 | ND | | | | | | |
| Ácido propanoico, 2- (metoximetoxi) - | 19,655 | ND | 2,62E+03 | ND | ND | 1,13E+05 | 1,49E+06 | ND | | | | | | |
| Ácido propanoico, 2-hidroxi-, éster butílico | 19,655 | ND | 2,62E+03 | ND | ND | 1,13E+05 | 1,49E+06 | ND | | | | | | |
| 1,4-dioxano-2,5-diona, 3,6-dimetil-, (3S-cis) - | 21,323 | ND | 5,15E+03 | ND | ND | 2,50E+05 | 6,67E+06 | 8,40E+05 | | | | | | |
| Ácido propanoico, 2-hidroxi-, éster butílico | 23,780 | ND | ND | ND | ND | ND | 1,82E+05 | ND | | | | | | |

Resultados e Discussão

Os cromatogramas das diferentes reações foram sobrepostos e apresentados na Figura 2. Foram destacadas as análises das amostras com o catalisador KI-NaY, onde houve formação do ácido acrílico.

Na Tabela 2 são mostrados os compostos formados em cada reação e identificados por cromatografia gasosa e espectrometria de massas (CG/MS).

Conforme mostrado na Tabela 2, além do ácido acrílico (ácido propenoico), houve a formação de outros compostos como: diferentes ácidos carboxílicos, etanol, cetonas e aldeídos, devido às reações concorrentes. A formação de ácido acrílico ocorreu apenas com o catalisador KI-NaY. Quanto à utilização dos gases diluentes argônio e carbônico, também são observados comportamentos diferentes. O gás carbônico teria indicação devido a sua formação nas reações concorrentes de descarbonilação e descarboxilação. Assim, o gás em exceto inibiria essas reações concorrentes. No entanto, ainda que não tenha sido feita uma análise quantitativa, observa-se que a área do pico do ácido acrílico utilizando o gás argônio foi o dobro da área utilizando dióxido de carbono, indicando ser o argônio mais indicado para a síntese, diferente do que foi visto na literatura. Entretanto, outras condições experimentais e outros catalisadores ainda deverão ser testados com o objetivo de minimizar as reações concorrentes e aumentar a seletividade para produção de ácido acrílico.

Conclusão

A reação de desidratação de ácido láctico foi realizada empregando diferentes zeólitas. O melhor resultado foi obtido com a zeólita KI-NaY, utilizando fluxo de gás argônio durante a reação, sendo que esta zeólita foi obtida da modificação da zeólita Y.

Referências

- AVASTHI, K.; BOHRE, A.; GRILC, M.; LIKOZAR, B.; SAHA, B. Advances in catalytic production processes of biomass-derived vinyl monomers. *Catalysis Science & Technology*, [S.L.], v. 10, n. 16, p. 5411-5437, 2020. Royal Society of Chemistry (RSC).
- HOLMEN, R.E. **Production of acrylates by catalytic dehydration of lactic acid and alkyl lactates**. Titular: United State Patent Office. USA n. US2859240A. Depósito: 12 jan. 1956.
- JAIMES J. H. B.; **Produção de ácido acrílico de fonte renovável a partir do ácido láctico por fermentação do melão de cana-de-açúcar**. 2013. 144 p. Dissertação (mestrado). Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Química, Campinas, SP.
- LUNELLI, B.; **Produção e controle da síntese do éster de ácido acrílico através da fermentação do ácido láctico**. 2010. 212 p. Tese (doutorado). Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Química, Campinas, SP.
- SUN, P.; YU, D.; TANG, Z.; LI, H.; HUANG, H. NaY Zeolites Catalyze Dehydration of Lactic Acid to Acrylic Acid: studies on the effects of anions in potassium salts. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, [S.L.], v. 49, n. 19, p. 9082-9087, 6 out. 2010. American Chemical Society (ACS).
- YAN, J.; YU, D.; LI, H.; SUN, P.; HUANG, H. NaY zeolites modified by La³⁺ and Ba²⁺: the effect of synthesis details on surface structure and catalytic performance for lactic acid to acrylic acid. *Journal Of Rare Earths*, [S.L.], v. 28, n. 5, p. 803-806, out. 2010. Elsevier BV.
- ZHANG, J.; LIN, J.; XU, X.; CEN, P. Evaluation of Catalysts and Optimization of Reaction Conditions for the Dehydration of Methyl Lactate to Acrylates. *Chinese Journal Of Chemical Engineering*, [S.L.], v. 16, n. 2, p. 263-269, abr. 2008. Elsevier BV.

ZHANG, J.; ZHAO, Y.; FENG, X.; PAN, M.; ZHAO, J.; JI, W.; AU, C. Na₂ HPO₄-modified NaY nanocrystallites: efficient catalyst for acrylic acid production through lactic acid dehydration. **Catalysis Science & Technology**, [S.L.], v. 4, n. 5, p. 1376-1385, 2014.

ZHANG, Z.; QU, Y.; WANG, S.; WANG, J. Catalytic Performance and Characterization of Silica Supported Sodium Phosphates for the Dehydration of Methyl Lactate to Methyl Acrylate and Acrylic Acid. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, [S.L.], v. 48, n. 20, p. 9083-9089, 21 out. 2009. American Chemical Society (ACS).

Hidrodesoxigenação de óleo de palma utilizando catalisadores à base de níquel

Marina Rodrigues de Amorim Santos¹, Raquel Maria Vieira Ramos², Diogo Keiji Nakai³, Wesley Gabriel de Oliveira Leal⁴, Itânia Pinheiro Soares⁵

Resumo

Nos últimos anos, muitos esforços vêm sendo feitos na tentativa de encontrar substitutos renováveis para os combustíveis fósseis. Atualmente, duas alternativas que têm se destacado é o biodiesel e o diesel verde. Ambos podem ser produzidos a partir de óleos e gorduras. A vantagem do diesel verde é que na reação de obtenção do biocombustível, por hidrodesoxigenação (HDO), podem ser utilizadas matérias-primas com alto grau de acidez, sem restrições. Sendo assim, nesse trabalho foram investigadas as reações de HDO utilizando catalisadores a base de níquel, dispersos em suportes de MCM-41 e Al-MCM-41, sendo que os melhores resultados foram obtidos utilizando Ni/Al-MCM-41.

Palavras-chave: óleos ácidos, diesel verde, hidrodesoxigenação (HDO).

Introdução

Um dos grandes desafios dos últimos anos está centrado na ideia de dar continuidade ao desenvolvimento científico e tecnológico, levando em consideração a manutenção da qualidade de vida do planeta. Neste sentido, especificamente no setor energético, muitos esforços vêm sendo feitos na tentativa de substituir os recursos à base de petróleo, por recursos renováveis para a produção de combustíveis. Desta forma, espera-se que os processos utilizados sejam cada vez mais sustentáveis, menos poluentes e economicamente viáveis (Armaroli; Balzani, 2007; Sheldon, 2014; Perego, 2012).

O biodiesel pode ser produzido pelo processo de transesterificação de óleos vegetais ou gorduras animais com metanol para levar a formação de ésteres metílicos de ácidos graxos. Apesar de ser uma tecnologia consolidada para a produção do biodiesel, o setor ainda tem desafios a vencer para alcançar resultados ainda mais expressivos. Alguns desses desafios estão relacionados ao aproveitamento de resíduos do processo de produção e à utilização de matérias-primas ácidas, que agrega uma etapa a mais no processo. Nas etapas de separação e purificação do biodiesel, é gerada uma grande quantidade de resíduos compostos por tri, di e monoglicerídeos remanescentes, ésteres e ácidos graxos livres. Uma alternativa é reprocessamento para produzir mais biodiesel. No entanto, da mesma forma que para o tratamento da matéria-prima ácida, é necessário um tratamento ácido que pode ocasionar danos aos reatores utilizados.

Além desses inconvenientes na produção, algumas desvantagens estão relacionadas ao fato do biodiesel ser um combustível oxigenado: apresentando menor poder

¹ Graduanda em Farmácia, Universidade de Brasília, bolsista de Pibic da Embrapa Agroenergia, marinasantos38@gmail.com

² Graduanda em Farmácia, Universidade de Brasília, estagiária da Embrapa Agroenergia, raquelvieiraramos@gmail.com

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

⁴ Químico, mestre em Química, analista da Embrapa Agroenergia, wesley.leal@embrapa.br

⁵ Química, doutora em Química, pesquisadora da Embrapa Agroenergia, itania.soares@embrapa.br

calorífico que o diesel, e a presença de insaturações, que o torna menos estável e sujeito a oxidação.

Sendo assim, uma alternativa adequada para a matéria-prima como óleo de palma (*Elaeis guineensis*) com elevada acidez é a produção do diesel verde por meio do processo de hidrodessoxigenação (HDO), amplamente utilizado na indústria petroquímica (hidroprocessamento). Essas reações podem ser empregadas utilizando óleos ácidos/residuais e óleos virgens (Pattanaik; Misra, 2017; Sugami; Minami; Saka, 2017). Os hidrocarbonetos gerados por este método podem ser denominados de diesel verde. Um esquema genérico para as reações de HDO é apresentado na Figura 1.

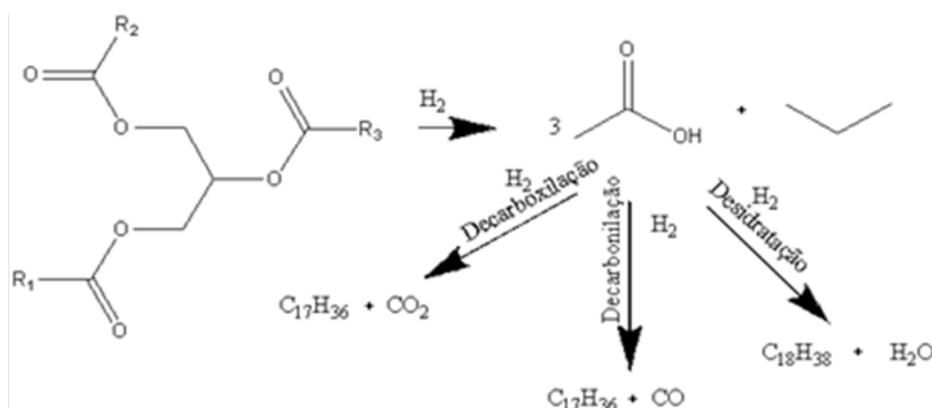


Figura 1. Transformação de um triacilglicerol em hidrocarbonetos por meio das etapas de reação HDO hidrodessoxigenação, descarboxilação e decarbonilação.

As reações HDO ocorrem por meio de sequência de reações de hidrogenação, desidratação, descarboxilação ou decarbonilação, 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 Bronsted ou Lewis que possam promover as etapas de desidratação.

Material e Métodos

Preparo do catalisador

A partir do método de impregnação aquosa (Beck; Vartuli, 1992; Cai; Lin; Xiao, 1999) de uma solução de nitrato de níquel II ($Ni(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$ -Sigma Aldrich) sobre a superfície de sólidos mesoporosos de sílica do tipo MCM-41 e aluminossilicato do tipo Al-MCM-41 foram preparados catalisadores Ni15-MCM-41 e Ni15-Al-MCM-41(55), onde Ni15 refere-se a um teor de 15% de Ni incorporado aos suportes, e 55 refere-se a razão Si/Al (Beck; Vartuli, 1992; Cai; Lin; Xiao, 1999). A impregnação aquosa foi assistida pela presença de etilenoglicol (VETEC 99,5%) para levar a formação de nanopartículas de Ni dispersas na superfície do suporte. As amostras foram calcinadas à temperatura de 550 °C.

Reação de HDO

Para testar a atividade catalítica dos catalisadores (Ni15-MCM-41, Ni15-Al-MCM-41-(55)) foi utilizado um reator de alta pressão Parr 5000. Inicialmente, os catalisadores passaram por uma etapa de redução a 260 °C a uma pressão de H₂ de 20 bar, por 3 horas, utilizando ciclo-hexano (Sigma-Aldrich) como solvente. Após essa etapa, adicionou-se o substrato óleo de palma (*Elaeis guineensis*) cedido pela empresa Denpasa. Utilizou-se 10% de catalisador a 260 °C, de 20 bar de H₂, durante 6 horas. Ao final da reação, o catalisador e a solução resultante foram separadas por centrifugação. A fase líquida foi rotoevaporada para a remoção do solvente e o produto resultante foi reservado para determinação dos produtos.

Análise por cromatografia gasosa e espectrometria de massas

As análises foram feitas utilizando um cromatógrafo gasoso Shimadzu, equipado com coluna Rtx-5MS 30 m x 0,25 mm x 0,25 µm, com volume injeção 1 µL, modo *split* 100:1, temperatura 280 °C. Gás de arraste He, vazão 1,5mL/min. Com programação de temperatura: Ti 70 °C isoterma 3 min, razão de aquecimento 7 °C/min até 320°C, isoterma 20 min. O espectrômetro de massas Shimadzu, foi configurado com temperatura da fonte de íons 280 °C, interface 280 °C. M/Z 45-500, intervalo de aquisição entre 3,5 e 60 minutos.

O solvente utilizado foi o diclorometano grau analítico (Macron Fine Chemicals). O heptadecano (Sigma-Aldrich) foi utilizado como padrão de referência.

Resultados e Discussão

Na Tabela 1 são apresentados os compostos das reações utilizando os catalisadores Ni15-MCM-41 e Ni15-Al-MCM-41 (55).

Tabela 1. Identificação de compostos por cromatografia gasosa e espectrometria de massas (GC/MS).

| Amostras | | Ni15-MCM-41 | Ni/Al-MCM-41(55) |
|-----------------------------------|-------------------|----------------------|----------------------|
| Nome dos compostos | Tempo de retenção | Área | Área |
| Pentadecano | 15,607 | 1,81x10 ⁵ | 2,27x10 ⁶ |
| Hexadecano | 17,306 | 3,59x10 ⁴ | 1,81x10 ⁶ |
| Heptadecano | 18,926 | 4,51x10 ⁵ | 4,84x10 ⁶ |
| Ácido Tetradecanóico | 19,874 | 1,33x10 ³ | 6,11x10 ⁴ |
| Octadecano | 20,449 | 4,31x10 ⁴ | 3,40x10 ⁶ |
| 1-Hexadecanol | 21,642 | 5,80x10 ⁴ | 8,37x10 ⁴ |
| Ácido n-Hexadecanoico | 23,003 | 1,34x10 ⁶ | 4,32x10 ⁶ |
| Ácido Hexadecanoico, etil éster | 23,241 | 3,37x10 ⁴ | 2,51x10 ⁵ |
| 1-Octadecanol | 24,445 | 1,13x10 ⁵ | N/D |
| Ácido Hexadecanoico, propil éster | 24,521 | 7,07x10 ⁴ | 2,99x10 ⁶ |
| Ácido Octadecanoico, metil éster | 24,997 | 2,05x10 ⁴ | 2,03x10 ⁵ |
| Ácido Octadecanoico | 25,746 | 3,10x10 ⁶ | 1,02x10 ⁷ |

Continua...

Tabela 1. Continuação.

| Amostras | | Ni15-MCM-41 | Ni/Al-MCM-41(55) |
|---|-------------------|----------------------|----------------------|
| Nome dos compostos | Tempo de retenção | Área | Área |
| Octadecanoic acid, propyl ester | 27,042 | 1,39x10 ⁵ | 5,44x10 ⁶ |
| Ácido Octadecanoico, 2,3-dihidroxiopropil éster | 28,953 | 1,64x10 ⁵ | 1,15x10 ³ |
| Ácido Octadecanoico, 3-hidroxiopropil éster | 30,142 | 1,58x10 ⁴ | 4,84x10 ³ |
| Stigmastane | 35,192 | 1,46x10 ⁴ | 1,49x10 ⁴ |
| 16-Hentriacontanone | 38,692 | 3,82x10 ⁴ | N/D |
| Ácido Hexadecanoico, octadecil éster | 39,336 | 2,25x10 ⁴ | 3,14x10 ⁶ |

Pode-se observar na Tabela 1 que houve formação de hidrocarbonetos, ácido carboxílico e ésteres. Nos processos de hidrogenação costuma ocorrer a adição de hidrogênio às duplas ligações e posteriormente, pode ocorrer a formação de ácidos graxos livres. Esses ácidos podem ser reduzidos a aldeídos, álcoois e por último, a hidrocarbonetos. Dentre os ácidos formados o mais pronunciado foi o ácido octadecanoico, o que era esperado, uma vez que o óleo de palma é formado principalmente pela trioleína. Dentre os hidrocarbonetos, em ambas as condições foi mais pronunciada a formação do heptadecano e octadecano.

Para efeito de comparação do desempenho dos catalisadores frente às reações HDO são mostradas as áreas dos compostos formadas nas duas condições.

Pode-se observar que o catalisador Ni15-Al-MCM-41(55) foi bastante superior na conversão do óleo de palma, embora tenha formado outros compostos além dos hidrocarbonetos, que formam o diesel verde. Assim com a utilização do aluminossilicato houve a formação de pentadecano, hexadecano, heptadecano e octadecano. Já no caso dos ésteres foram formados o octadecanota e hexadecanoato.

Conclusão

A utilização do aluminossilicato Ni15-MCM-41 (55) mostrou melhor desempenho na formação de hidrocarbonetos nC17 e nC18, embora tenha formado ácido e ésteres. Além das análises quantitativas são necessários testes adicionais, visando otimizar a reação para maior conversão do óleo e maior rendimento em hidrocarbonetos.

Referências

ANP. Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis. Disponível em <<http://www.anp.gov.br/wwwanp/biocombustiveis>>. Acesso em março 2017.

ARMAROLI, N.; BALZANI, V. **The Future of Energy Supply: challenges and opportunities**. *Angewandte Chemie International Edition*, [S.L.], v. 46, n. 1-2, p. 52-66, jan. 2007. Wiley.

BAYAT, A.; SADRAMELI, S.M. Production of renewable aromatic hydrocarbons via conversion of canola oil methyl ester (CME) over zinc promoted HZSM-5 catalysts. **Renewable Energy**, [S.L.], v. 106, p. 62-67, jun. 2017. Elsevier BV.

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.. A new family of mesoporous molecular sieves prepared with liquid crystal templates. **Journal Of The American Chemical Society**, [S.L.], v. 114, n. 27, p. 10834-10843, dez. 1992. American Chemical Society (ACS).

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.. A new family of mesoporous molecular sieves prepared with liquid crystal templates. **Journal Of The American Chemical Society**, [S.L.], v. 114, n. 27, p. 10834-10843, dez. 1992. American Chemical Society (ACS)

BENSON, T. J.; HERNANDEZ, R.; FRENCH, W. T.; ALLEY, E. G.; HOLMES, W.E.; Elucidation of the catalytic cracking pathway for unsaturated mono-, di, and triacylglycerides on solid acid catalysts. **Journal of Molecular Catalysis A: Chemical**, v. 303, p. 117-123, 2009.

BUCHANAN, J.S. The chemistry of olefins production by ZSM-5 addition to catalytic cracking units. **Catalysis Today**, [S.L.], v. 55, n. 3, p. 207-212, jan. 2000. Elsevier BV.

CAI, Q.; LIN, W. Y; XIAO, F. S; PANG, W. Q; CHEN, X. H; ZOU, B. The preparation of highly ordered MCM-41 with extremely low surfactant concentration. **Microporous and Mesoporous Materials**, v.32, p.1-15, 1999.

CORMA, A. **From Microporous to Mesoporous Molecular Sieve Materials and Their Use in Catalysis**. Chemical Reviews, [S.L.], v. 97, n. 6, p. 2373-2420, out. 1997. American Chemical Society (ACS).

CORMA, A. **Inorganic Solid Acids and Their Use in Acid-Catalyzed Hydrocarbon Reactions**. Chemical Reviews, [S.L.], v. 95, n. 3, p. 559-614, maio 1995. American Chemical Society (ACS).

EPE. Empresa de Pesquisa Energética. Balanço Energético Nacional. Disponível em: <<http://www.epe.gov.br/Petroleo/Paginas/default.aspx>>. Acesso em junho de 2020.

EZOJI, H.; RAHIMNEJAD, M. Chapter 12. **Nanoparticles-based Electrochemical Sensors and Biosensors. Nanoparticle Design And Characterization For Catalytic Applications In Sustainable Chemistry**, [S.L.], p. 329-345, 2019. Royal Society of Chemistry.

KUMAR, S.; MALIK, M.M.; PUROHIT, R. **Synthesis Methods of Mesoporous Silica Materials**. Materials Today: Proceedings, [S.L.], v. 4, n. 2, p. 350-357, 2017.

LEE, A. F.; WILSON, K. Recent developments in heterogeneous catalysis for the sustainable production of biodiesel. **Catalysis Today**, Louisiana, USA, 2015, v. 242, p. 3 -18.

LORA, E.S.; ANDRADE, R.V., 2009. **"Biomass as energy source in Brazil,"** Renewable and Sustainable Energy Reviews, Elsevier, vol. 13(4), pages 777-788, May.

MELERO, J.A.; IGLESIAS, J; MORALES, G. Heterogeneous acid catalysts for biodiesel production: current status and future challenges. **Green Chemistry**, [S.L.], v. 11, n. 9, p. 1285-1308, 2009. Royal Society of Chemistry (RSC)

MELERO, J.A; IGLESIAS, J; GARCIA, A. Biomass as renewable feedstock in standard refinery units. Feasibility, opportunities and challenges. **Energy & Environmental Science**, [S.L.], v. 5, n. 6, p. 7393-7420, 2012. Royal Society of Chemistry (RSC).

PATTANAIK, B.P.; MISRA, R.D. Effect of reaction pathway and operating parameters on the deoxygenation of vegetable oils to produce diesel range hydrocarbon fuels: a review. **Renew. Sustain. Energy Rev.** v. 73, p.545-557, 2017

PEREGO, C.; RICCI, M. Diesel fuel from biomass. **Catalysis Science & Technology**, [S.L.], v. 2, n. 9, p. 1776-1786, 2012. Royal Society of Chemistry (RSC).

SERRANO-RUIZ, J.C.; RAMOS-FERNÁNDEZ, E. V.; SEPULVEDA-ESCRIBANO, A. From biodiesel and bioethanol to liquid hydrocarbonfuels: new hydrotreating and advanced microbial technologies. **Energy Environ. Sci.**, [S.L.], v. 5, n. 2, p. 5638-5652, 2012. Royal Society of Chemistry (RSC).

SHELDON, R. A. Green and sustainable manufacture of chemicals from biomass: state of the art. **Green Chem.**, [S.L.], v. 16, n. 3, p. 950-963, 2014. Royal Society of Chemistry (RSC).

SOLER-ILLIA, G. J. de A. A.; SANCHEZ, C.; LEBEAU, B.; PATARIN, J. Chemical Strategies To Design Textured Materials: from microporous and mesoporous oxides to nanonetworks and hierarchical structures. **Chemical Reviews**, [S.L.], v. 102, n. 11, p. 4093-4138, nov. 2002. American Chemical Society (ACS).

SU, F; GUO, Y. Advancements in solid acid catalysts for biodiesel production. **Green Chem.**, [S.L.], v. 16, n. 6, p. 2934-2957, 2014. Royal Society of Chemistry (RSC)

TIAN, R.; WANG, S. Y.; LIAN, C. S.; WU, X.; AN, X.; XIE, X.M. Synthesis of the hierarchical Fe-substituted porous HBeta zeolite and the exploration of its catalytic performance. **Journal Of Fuel Chemistry And Technology**, [S.L.], v. 47, n. 12, p. 1476-1485, dez. 2019. Elsevier BV.

WAN, Y.; ZHAO, D. On the Controllable Soft-Templating Approach to Mesoporous Silicates. **Chemical Reviews**, Urbana, Illinois, 2007, v. 107 (7), p. 2821-2860.

YENUMALA, S. R.; MAITY, S. K.; SHEE, D. Hydrodeoxygenation of karanja oil over supported nickel catalysts: influence of support and nickel loading. **Catalysis Science & Technology**, [S.L.], v. 6, n. 9, p. 3156-3165, 2016. Royal Society of Chemistry (RSC).

ZHAO, D.; FENG, J.; HUO, Q.; MELOSH, N.; FREDRICKSON, G.H.; CHMELKA, B. F.; G. D Stucky. Triblock Copolymer Syntheses of Mesoporous Silica with Periodic 50 to 300 Angstrom Pores. **Science**, [S.L.], v. 279, n. 5350, p. 548-552, 23 jan. 1998. American Association for the Advancement of Science (AAAS)

Viabilidade técnica e econômica de uso do óleo fúsel em mistura com o etanol combustível

Luis Henrique Nogueira Marinho¹, Itania Pinheiro Soares², Cristiane de Conti Medina³, Carmen Luisa Barbosa Guedes⁴

Resumo

Atualmente, o mercado mundial voltado ao consumo de combustíveis vem buscando fontes renováveis, limpas e com resultado financeiro mais atrativo, no que tange à produção de biocombustíveis. No Brasil, o biocombustível mais utilizado é o etanol combustível, derivado do setor sucroenergético, que tem ofertado ao mercado volumes significativos de coprodutos, como o óleo fúsel, que é bastante utilizado como matéria-prima em outros processos. Neste sentido, este estudo teve por objetivo analisar a mistura de etanol combustível com óleo fúsel contendo 14 e 34% de água para verificar o limite máximo da adição no etanol, além de analisar a viabilidade econômica da mistura, a fim de aumentar a rentabilidade deste coproduto. A metodologia utilizada neste estudo foi baseada nas normas vigentes pela Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis (ANP) e reproduzida em laboratório por meio de ensaios técnicos. O estudo mostrou que até 0,5% do óleo fúsel contendo 34% de água pode ser incorporado ao etanol, resultando em um aumento na receita de R\$314.000,00 por safra de 200 dias. Apesar dos dispêndios econômicos necessários para possibilitar o projeto, o cálculo do Valor Presente Líquido – VPL confirmou a viabilidade econômica do projeto, que se paga antes mesmo do primeiro ano, agregando portanto, maior receita a usina.

Palavras-chave: óleo fúsel, etanol combustível, cana de açúcar, setor sucroenergético.

Introdução

Com a eminência da redução das reservas de petróleo mundial, aliada à preocupação da socioambiental, é o principal motivo que leva os governos a buscarem estratégias para aumentar a produção e o consumo de combustíveis renováveis e sustentáveis. Dentre estes combustíveis o etanol recebe grande destaque, pois melhora o processo de combustão e mitiga as emissões de CO (monóxido de carbono); neste sentido, é uma área de conhecimento em que pesquisas têm crescido de forma substancial (Uyumaz et al., 2014; Bôas et al., 2017).

Berger, Krings e Zorn (2010) relatam que entre os coprodutos gerados pela indústria Sucroalcooleira, o óleo fúsel possui grande potencial de reaproveitamento dada sua rica composição em álcoois superiores. Apesar do seu aproveitamento não atuar diretamente na redução do custo final do etanol, sua utilização como insumo em outros

¹ Engenheiro de Produção, mestrando em Bioenergia, Universidade Estadual de Londrina, luishenrique_marinho@hotmail.com.

² Química, doutora em Química, pesquisadora da Embrapa Agroenergia, itania.soares@embrapa.br.

³ Engenheira-agrônoma, doutora em Agronomia, Universidade Estadual de Londrina, medina@uel.br.

⁴ Química, doutora em Química, Universidade Estadual de Londrina, carmen@uel.br.

ramos industriais, tais como indústria farmacêutica, solventes, indústria de plástico e perfumaria (ésteres) pode representar importante iniciativa para aumentar a eficiência global da produção industrial do etanol.

Demartini (2012), salienta que para a cadeia produtiva do etanol se tornar mais competitiva, é necessário agregar valor aos coprodutos, fazendo com que estes coprodutos sejam matéria-prima de base para outros processos.

O óleo de fúsel é um coproduto obtido através da fermentação de produtos agrícolas. Além de ser extraído da cana-de-açúcar, também pode ser extraído de beterraba, grãos, batatas, batata doce, arroz e trigo entre outros (Awad et al., 2017a). A separação do coproduto óleo fúsel nas destilarias mais antigas era realizada em fração e armazenadas em tanques. Atualmente, existem colunas de retificação automatizadas, que fazem a retirada automática de acordo com a temperatura da coluna ou de forma contínua em volume controlado (Garcia, 2008).

A qualidade e a quantidade produzida de óleo fúsel estão ligadas diretamente ao método utilizado no preparo do caldo de cana que é utilizado no processo de fermentação; pois, dependendo da qualidade desta matéria prima, a cepa de levedura pode desviar em seu processo metabólico a rota para produção de álcool e assim produzir outros coprodutos de acordo com as condições e o ambiente que o processo fermentativo está inserido. Esta variação pode ocorrer também de acordo com instalação da planta industrial ou pela estratégia adotada pela organização (Patil et al, 2002). Porém, trabalhos como o de Mayer, Hoffmann e Hoffmann (2013) demonstram que em pequena escala é possível produzir etanol sem a retirada do óleo fúsel atendendo os parâmetros permitidos pela Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis - ANP, o que não ocorre na produção em grande escala, pois a não retirada do óleo fúsel na destilação de grandes volumes, impacta na perda de etanol no processo de destilação.

Neste sentido, o presente estudo tem como objetivo analisar a mistura de etanol combustível com óleo fúsel.

Metodologia

Primeiramente foram conduzidos testes experimentais com misturas de etanol hidratado combustível (EHC) e etanol anidro combustível (EAC), misturadas em dois tipos de óleo fúsel variando o percentual de água. As amostras utilizadas: etanol hidratado combustível, etanol anidro combustível e óleo fúsel, foram fornecidos por uma empresa situada no noroeste do estado do Paraná, constituída sob as leis brasileiras e cadastrada na ANP conforme Resolução ANP n° 43, de 22 de dezembro de 2009 (ANP, 2009). Os produtos fornecidos e a nomenclatura adotada para utilização nos experimentos foram:

- Etanol Anidro Combustível (EHC).
- Óleo Fúsel Bruto retirado da oitava bandeja da coluna de destilação (OF34).
- Óleo Fúsel Bruto retirado da décima quarta bandeja da coluna de destilação (OF14).

O ponto de retirada da amostra de etanol foi na base de carregamento para produtos comercial com grau alcoólico conforme estabelecido pela legislação em vigor. Já para a retirada do óleo fúsel, foram estabelecidos pontos de amostragem na coluna de destilação industrial. Antes das coletas, todos os fracos foram submetidos a lavagem e realizada a

rinsagem com etanol anidro, etanol hidratado e óleo fúsel, respectivamente, de cada bombona.

Para o preparo das misturas de etanol com óleo fúsel bruto, cada amostra de etanol combustível foi aditivada com 0,25; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 3,0; 10,0; 20,0; e 50,0 % (v/v) de óleo fúsel bruto contendo 34% de água (OF34) e óleo fúsel bruto contendo 14% de água (OF14).

Resultados e Discussão

O óleo fúsel é obtido como coproduto no processo de purificação do etanol, mais precisamente na coluna de retificação, denominada em seu projeto como B nas bandejas 08 e 14. Posteriormente, de forma individual, esse coproduto vai para um tanque de decantação no qual foram realizadas as coletas das amostras, que foram caracterizadas pela usina, como mostra a Tabela 1.

Tabela 1. Características do óleo fúsel bruto retirado da bandeja 08 e 14.

| Composição | Óleo Fúsel Bruto | |
|--------------|-------------------|-------------------|
| | Bandeja 08 (OF34) | Bandeja 14 (OF14) |
| % Água | 34% | 14 % |
| % Óleo fúsel | 66% | 86 % |

Qualidade do combustível com óleo fúsel

Todo controle de qualidade tem por objetivo estabelecer padrões para os produtos de forma que o consumidor final não seja prejudicado. A adição do óleo fúsel ao etanol pode impactar nos parâmetros de qualidade estabelecidos pela Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis – ANP, podendo tornar a mistura imprópria para utilização como combustível nos motores disponíveis no mercado.

Mistura do etanol anidro combustível com óleo fúsel bruto

Para realizar a avaliação da mistura de etanol anidro com óleo fúsel, foram utilizados dois tipos de matéria prima, denominado OF34 com maior percentual de água (66% óleo fúsel e 34% água) e OF14 com menor percentual de água (86% óleo fúsel e 14 % água). Na Tabela 2 são apresentados os resultados das amostras provenientes da mistura do etanol anidro com óleo fúsel bruto OF34.

Tabela 2. Avaliação mistura etanol anidro e óleo fúsel contendo 34% água (OF34).

| Propriedade EAC / Unidade | Parâmetros | | | |
|---------------------------|---------------------------|---|--|--------------------------|
| | Acidez total, máx. (mg/L) | Condutividade elétrica ($\mu\text{S}/\text{m}$) | Massa específica a 20°C (kg/m^3) | Teor alcoólico (% massa) |
| Padrão Etanol Anidro | 6,86 | 22,74 | 789,6 | 99,90 |
| Mistura | 0,25 % | 11,10 | 64,27 | 790,3 |
| | 0,50 % | 13,00 | 57,68 | 791,1 |
| | 1,00 % | 16,55 | 67,55 | 792,7 |
| | 1,50 % | 17,49 | 73,58 | 794,3 |
| | 2,00 % | 21,04 | 82,23 | 795,9 |
| | 3,00 % | 29,04 | 103,17 | 799,1 |
| | 10,0% | 77,54 | 3987,56 | 821,2 |
| | 20,0% | 82,14 | 4587,43 | 852,8 |
| | 50,0% | 91,38 | 7985,21 | 946,8 |
| | Limite ANP | 30,0 máx. | 300,0 máx. | 791,5 máx. |

Utilizando-se os mesmos procedimentos, foram realizadas análises alterando o tipo de aditivo, com o objetivo de avaliar o impacto nos parâmetros de qualidade estabelecidos pelo órgão regulamentador. Na Tabela 3, estão os resultados das amostras provenientes da mistura do etanol anidro com óleo fúsel bruto OF14.

Tabela 3. Avaliação mistura etanol anidro e óleo fúsel contendo 14 % água (OF14).

| Propriedade EAC / Unidade | Parâmetros | | | |
|---------------------------|---------------------------|---|--|--------------------------|
| | Acidez total, máx. (mg/L) | Condutividade elétrica ($\mu\text{S}/\text{m}$) | Massa específica a 20°C (kg/m^3) | Teor alcoólico (% massa) |
| Padrão Etanol Anidro | 6,86 | 22,74 | 789,6 | 99,90 |
| Mistura | 0,25 % | 9,93 | 179,04 | 790,5 |
| | 0,50 % | 15,13 | 321,48 | 791,1 |
| | 1,00 % | 23,17 | 597,51 | 792,0 |
| | 1,50 % | 29,79 | 799,56 | 793,3 |
| | 2,00 % | 38,77 | 1060,70 | 795,7 |
| | 3,00 % | 72,52 | 1659,30 | 798,5 |
| | 10,0% | 83,22 | 3998,40 | 818,8 |
| | 20,0% | 91,33 | 4967,21 | 848,5 |
| | 50,0% | 95,44 | 7934,40 | 940,4 |
| | Limite ANP | 30,0 máx. | 300,0 máx. | 791,5 máx. |

Pela tabulação dos dados e avaliação dos experimentos, foi possível verificar que, valores acima de 3,0% na mistura de óleo fúsel contendo 34% de água ultrapassa o limite de 30mg/L estabelecido pela ANP, quando utilizado na mistura o óleo fúsel contendo 14% de água o limite permitido pela legislação em vigor decresce para 1,5%, sofrendo maior influência pela óleo fúsel misturado. No parâmetro condutividade elétrica a mistura do óleo fúsel OF34 permite a adição até 3,0% de modo a atender os parâmetros estabelecidos pela ANP, ao utilizar na mistura o óleo fúsel OF14 maior que 0,25% já existe a inviabilidade para comercialização da mistura, conforme o órgão regulamentador. No parâmetro massa específica em ambos os casos da mistura valores acima de 0,5% de óleo fúsel no etanol anidro ultrapassa o limite de 791,5kg/m³ valor máximo estabelecido pela ANP. Diferentemente dos parâmetros anteriores o teor alcoólico tem maior interferência com a mistura OF34 devido aos seu maior percentual de água, no entanto em ambos os casos misturas acima de 0,5% não atendem as diretrizes estabelecidas pelo órgão regulamentador.

Considerações Finais

Tendo em vista o baixo valor agregado do óleo fúsel de R\$ 0,18 por litro e sua forma atual de comercialização (como coproduto), foi observado grande potencial para utilização como aditivo em misturas com etanol anidro combustível e etanol hidratado combustível. Nos ensaios foram utilizados dois tipos de óleo fúsel: óleo fúsel bruto contendo 34% água (OF34) e óleo fúsel contendo 14% de água (OF14); nos dois casos, a utilização do coproduto como aditivo teve viabilidade técnica, porém existe restrições quanto ao percentual a ser adicionado.

Nos ensaios realizados com óleo fúsel OF34, a mistura se mostrou viável até o percentual de 0,50%, de modo a atender todas as restrições estabelecidas pela Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis (ANP). Acima deste percentual, obteve-se como variável crítica o teor alcoólico e a massa específica, pois há impacto direto devido ao teor de água no óleo fúsel utilizado na mistura. Em ambos os tipos de etanol utilizados (anidro e hidratado), o comportamento de variação teve a mesma singularidade.

Nos ensaios com óleo fúsel contendo 14% de água (OF14), a mistura se mostrou viável até o percentual de 0,25% de modo a atender todas as diretrizes estabelecidas pela Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis (ANP). Acima deste percentual, obteve-se como variável crítica a condutividade elétrica da mistura, que está diretamente ligada ao potencial corrosivo do combustível, que pode prejudicar as linhas de transferência de combustível nos veículos, causando possíveis depósitos no sistema de injeção. Sobre os tipos de etanol utilizados (anidro e hidratado), em ambos os casos, o comportamento de variação teve a mesma singularidade devido ao óleo fúsel concentrado.

Para o cálculo da viabilidade econômica, foi considerado o maior percentual da mistura permitido 0,5% óleo fúsel contendo 34% de água, tendo em vista otimizar o volume adicionado à mistura e o produto comercializado. Ponderando a característica da planta industrial avaliada, foi proposta a adaptação do ponto de mistura, sendo detalhado o cálculo do custo de implantação; diante do cenário analisado, concluímos que o melhor resultado financeiro foi ao adicionar o coproduto óleo fúsel ao etanol hidratado gerando

uma receita financeira por safra de 200 dias no montante de R\$ 314.000,00, pagando já no primeiro ano de implantação o investimento de adaptação da planta industrial.

A utilização do óleo fúsel como aditivo no etanol combustível, mostra-se promissora e uma ótima forma de agregar valor ao coproduto, pois, incorporando-o ao etanol combustível em pequenas proporções, é possível realizar a comercialização do mesmo de forma que atenda a legislação em vigor.

Referências

AWAD, O. I. et al. Calorific value enhancement of fúsel oil by moisture removal and its effect on the performance and combustion of a spark ignition engine. **Energy Conversion and Management**, Oxford, v. 137, p. 86-96, 2017a.

BERGER, R. G.; KRINGS, U.; ZORN, H. Biotechnological flavour generation. In: TAYLOR, A. J.; LINFORTH, R. S. T. (ed.). **Food flavour technology**. Oxford: Wiley-Blackwell, 2010. p. 89-115.

BÔAS, R. N. V. et al. Enzymatic synthesis of isopentyl caprylate using fúsel oil as feedstock. **Química Nova**, São Paulo, v. 40, n. 5, p. 541-547, 2017.

DEMARTINI, F. J. **Agregação de valor a subprodutos da produção de etanol**: uma proposta de modelo de centro tecnológico para o Rio Grande do Sul. 2012. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Produção) – Universidade do Vale do Rio dos Sinos, São Leopoldo, 2012.

GARCIA, V. **Subproduto de destilaria de óleo fúsel**: caracterização da composição química e estudo de sua aplicação industrial. 2008. 112 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Processos Químicos e Bioquímicos) - Escola de Engenharia de Mauá, Centro Universitário do Instituto Mauá de Tecnologia, São Caetano do Sul, 2008.

MAYER, F. D.; HOFFMANN, S. R.; HOFFMANN, R. An innovative project involving an appropriate hybrid distillation system for small-scale ethanol fuel production. **Chemical Engineering Communications**, Philadelphia, v. 200, p. 563-574, 2013.

PATIL, A.; KOOLWAL, S. M.; BUTALA, H. D. Fúsel oil: composition, removal and potential utilization. **International Sugar Journal**, Glamorgan, v. 104, n. 1238, p. 51-58, 2002.

UYUMAZ, A. et al. Experimental examination of the effects of military aviation fuel JP-8 and biodiesel fuel blends on the engine performance, exhaust emissions and combustion in a direct injection engine. **Fuel Processing Technology**, Amsterdam, v. 128, p. 158-165, 2014.

Desenvolvimento de metodologia LC-MS/MS para análise de ácidos dicarboxílicos provenientes da conversão de lignina

Flávia Soares Vieira¹, José Antônio de Aquino Ribeiro², Clenilson Martins Rodrigues³

Resumo

A lignina é um polímero complexo gerado em grandes quantidades como coproduto pela indústria de papel e celulose. A conversão dessa macromolécula em produtos químicos de maior valor agregado tem sido objeto de estudos como forma de implementar o desenvolvimento sustentável para as indústrias baseadas em biomassa lignocelulósica. Dentre os compostos que podem ser obtidos na despolimerização e conversão da lignina, destacam-se os ácidos carboxílicos alifáticos, que possuem aplicações nas indústrias de biopolímeros, farmacêutica e de aditivos alimentares. Assim, este trabalho foi desenvolvido com o objetivo de estabelecer um método baseado em cromatografia líquida de ultraalta eficiência acoplada à espectrometria de massas (UHPLCMS) para detectar e quantificar ácido adípico, ácido oxálico e ácido succínico, provenientes da conversão (bio)catalítica de lignina. Foram avaliadas três colunas cromatográficas, sendo a melhor condição de análise obtida com a coluna HSS T3 (1,8 µm; 2,1x 150 mm, Waters), empregando um sistema de eluição em modo gradiente e constituído de fase móvel A: água acidificada com ácido fórmico 0,1% e B: acetonitrila acidificada com ácido fórmico 0,1%. Todas as fases estacionárias avaliadas apresentaram condições satisfatórias para análise de ácido adípico e ácido succínico, mas apenas com a coluna HSS T3 foi obtida condição de detecção de ácido oxálico, ainda que com baixa sensibilidade. Esse estudo investigou metodologias capazes de analisar três ácidos dicarboxílicos por UHPLC-MS/MS, resultando em um protocolo que viabiliza a detecção simultânea e de forma seletiva dos compostos avaliados.

Palavras-chave: UHPLC-MS/MS, ácidos dicarboxílicos, lignina.

Introdução

A biomassa lignocelulósica corresponde a uma abundante fonte de carbono renovável. É composta principalmente por celulose, hemicelulose e lignina, sendo a lignina o componente mais complexo. A indústria de papel e celulose gera anualmente grande quantidade de lignina, no entanto, a maior parte desta é queimada para produção de calor e energia. Por ser um polímero natural e abundante, a lignina possui grande potencial de uso como matéria-prima renovável. A partir da despolimerização

¹ Farmacêutica, mestre em Química, Universidade Federal de Goiás, sv.flavia@gmail.com,

² Farmacêutico, mestre em Ciências Farmacêuticas, analista da Embrapa Agroenergia, jose.ribeiro@embrapa.br,

³ Químico, doutor em Química, pesquisador da Embrapa Agroenergia, clenilson.rodrigues@embrapa.br.

dessa macromolécula podem ser obtidos outros compostos, de menor tamanho e que possuem maior valor de mercado. Entretanto, por ter uma estrutura complexa e heterogênea, sua conversão em outros produtos é um desafio e tem sido objeto de estudos em diversos países (Mei et al., 2019; Ponnusamy et al., 2019).

Dentre os compostos relatados como produtos da conversão da lignina estão os ácidos carboxílicos, sendo obtidos principalmente os ácidos aromáticos a partir da oxidação dos monômeros de lignina. Ácidos carboxílicos alifáticos são produtos químicos importantes e de grande valor para diversos ramos industriais, tais como as indústrias de biopolímeros, farmacêutica e de aditivos alimentares, possuindo um mercado ainda maior do que o de ácidos carboxílicos aromáticos. Como atualmente a base de produção desses compostos tem sido os combustíveis fósseis, pesquisas têm buscado tecnologias para converter lignina em ácidos alifáticos como uma estratégia renovável de obtenção dessa classe química (Mei et al., 2019; Haldar; Purkait, 2020).

Dentre as diversas abordagens analíticas utilizadas para análise de ácidos orgânicos, a cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas tem sido utilizada na identificação e quantificação de analitos em matrizes complexas (Huang et al., 2012; Xiao et al., 2012). O emprego dessa técnica, no modo de monitoramento de reação múltipla (MRM do inglês, Multiple Reaction Monitoring), permite a detecção de íons específicos em amostras complexas, proporcionando alta seletividade às análises (Putri; Fukusaki, 2014).

Diante disso, o objetivo desse trabalho foi definir um método para quantificação de ácido adípico, ácido oxálico e ácido succínico, provenientes da conversão da lignina, por cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada à espectrometria de massas (UHPLC-MS/MS). Para isso, foram avaliadas três diferentes fases estacionárias: as colunas SeQuant Zic-HILIC, BEH Amida e HSS T3.

Material e Métodos

Reagentes

Foram utilizados acetonitrila grau LC-MS (Biograde), acetato de amônio (LiChropur) e metanol grau LC-MS (Lichrosolv). Hidróxido de amônio, formiato de amônio, ácido fórmico, ácido adípico, ácido oxálico e ácido succínico foram obtidos da empresa Sigma-Aldrich. Água ultrapura foi obtida utilizando um sistema de purificação Milli-Q (Millipore).

Instrumentação

Os experimentos de cromatografia líquida de ultra-alta eficiência, acoplada a espectrometria de massas (UHPLC-MS), foram realizados em espectrômetro de massas (modelo Acquity Xevo TQD, Waters) equipado com fonte de ionização por *electrospray* (ESI) e analisador de massas do tipo triplo quadrupolo (QqQ, TQD, Waters). Os dados espectrais foram adquiridos e processados pelo software MassLynx 4.1 (Waters). O MS foi operado em modo de ionização negativa, ESI(-)-MS, usando monitoramento de reações múltiplas (MRM). Os parâmetros instrumentais (voltagem do capilar e energia do cone) foram otimizados a partir da técnica de infusão direta por espectrometria

de massas (DIMS – do inglês, *Direct Infusion Mass Spectrometry*) de modo a obter os sinais da razão massa/carga (m/z) mais intensos para cada analito analisado. Utilizou-se a espectrometria de massas tandem (MS/MS) para seleção das energias de colisão utilizadas na fragmentação do íon precursor e obtenção dos perfis de fragmentação.

As colunas cromatográficas avaliadas foram: SeQuant Zic-HILIC (3,5 μm ; 100 x 2,1 mm), HILIC BEH Amida (1,7 μm ; 2,1 x 150 mm, Waters) e HSS T3 (1,8 μm ; 2,1 x 150 mm, Waters).

Resultados e Discussão

Os compostos foram detectados no modo negativo (ESI(-)), que promove a identificação das massas na forma desprotonada. Para configurar o modo MRM, ajustou-se as condições de energia do cone e de colisão de modo a obter os sinais da razão massa/carga (m/z) mais intensos para cada analito analisado. A Tabela 1 mostra o resultado final com as melhores energias do cone e de colisão para cada composto, o íon precursor e íon fragmento utilizados para o método MRM.

Tabela 1. Condições experimentais otimizadas para experimentos de MRM de análise dos ácidos orgânicos.

| Composto | Íon Precursor (m/z) | Íon Fragmento (m/z) | Energia do cone (V) | Energia de colisão (V) |
|-----------------|-------------------------|-------------------------|---------------------|------------------------|
| Ácido adípico | 144,95 | 100,94 | 25 | 14 |
| Ácido oxálico | 88,85 | 60,83 | 20 | 7 |
| Ácido succínico | 117,00 | 73,00 | 22 | 10 |

O estudo avaliou três colunas cromatográficas. Para as colunas SeQuant e BEH Amida, empregou-se a fase móvel A: ACN/H₂O (90/10) com tampão acetato de amônio e B: ACN/H₂O (40/60) com tampão acetato de amônio. Os parâmetros avaliados foram: concentração do tampão (10, 20 e 25 mM), gradiente de eluição, temperatura da coluna (25, 35 e 60°C), e uso de tampão formiato de amônio no lugar de acetato. Com a coluna BEH Amida, foram avaliadas fase móvel com pH neutro, fase móvel alcalina com adição de 0,1% hidróxido amônio a ambas as fases, e fase móvel ácida com adição de 0,1% de ácido fórmico. Nas três condições, a temperatura da coluna foi mantida em 40°C.

Foram obtidas boas condições de separação e detecção para ácido adípico e ácido succínico tanto com a coluna SeQuant quanto com a BEH Amida, no entanto, o ácido oxálico apresentou problemas de assimetria de pico e detecção. Utilizando a coluna HSS T3 foi possível detectar todos os três ácidos. A melhor condição foi obtida utilizando fase móvel acidificada pela adição 0,1% de ácido fórmico na fase aquosa (H₂O) e na fase orgânica (Acetonitrila), com a coluna HSS T3. Essa coluna possui fase estacionária apolar (C18) e, portanto, necessita que o equilíbrio da forma não dissociada dos ácidos seja favorecido para que haja maior interação com a coluna. A temperatura da coluna foi mantida em 40°C. A Tabela 2 mostra a melhor condição de análise obtida para detecção simultânea dos três compostos avaliados. Foi obtida boa separação entre os três ácidos, no entanto, a sensibilidade para ácido oxálico foi baixa, comparada com a dos demais compostos (Figura 1).

A dificuldade de detecção de ácido oxálico por MS foi apontada anteriormente por alguns autores (Moldoveanu et al., 2018), enquanto que a detecção de outros ácidos alifáticos como ácido succínico por MS, utilizando colunas HILIC, tem sido mais comumente empregada (Teleki; Takors, 2019; Huang et al., 2012).

Tabela 2. Condições cromatográficas otimizadas para o método utilizando a coluna HSS T3.

| Tempo (min) | Vazão (mL/min) | Eluente A: | |
|-------------|----------------|--------------------------------|-------------------|
| | | H ₂ O + AF 0,1% (%) | ACN + AF 0,1% (%) |
| 0,00 | 0,4 | 100 | 0 |
| 1,00 | 0,4 | 100 | 0 |
| 4,00 | 0,4 | 70 | 30 |
| 6,00 | 0,4 | 0 | 100 |
| 8,00 | 0,4 | 0 | 100 |
| 12,00 | 0,4 | 100 | 0 |

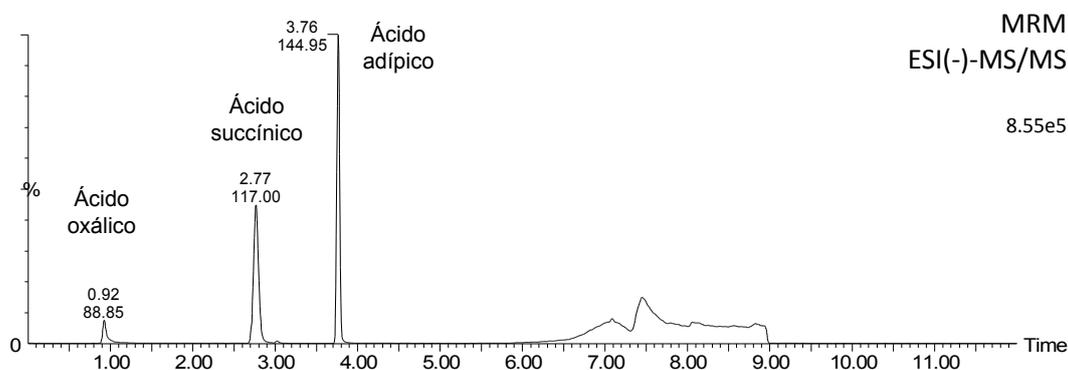


Figura 1. Cromatograma obtido por UHPLC-ESI(-)-MS/MS, utilizando o gradiente de eluição mostrado na Tabela 2 e a coluna HSS T3, da solução contendo os padrões analíticos de ácido oxálico a 100 µg/mL (m/z 88,85; t_R : 0,92), ácido succínico a 50 µg/mL (m/z 117; t_R : 2,77) e ácido adípico a 50 µg/mL (m/z 144,95; t_R : 3,76).

Conclusão

Para o desenvolvimento de um método de análise de ácido adípico, ácido oxálico e ácido succínico por espectrometria de massas UHPLC-MS/MS foram avaliadas três colunas cromatográficas com diversas condições de análise. Foram obtidas boas condições para ácido adípico e ácido succínico com as três colunas investigadas (Zic-HILIC SeQuant, HILIC BEH Amida, HSS T3). O uso coluna HSS T3, no entanto, possibilitou a detecção dos três analitos avaliados, inclusive do ácido oxálico, ainda que com baixa sensibilidade. A metodologia desenvolvida vem sendo aplicada em projeto de codesenvolvimento que avalia a conversão (bio)catalítica de lignina em ácidos dicarboxílicos e, por razões de sigilo industrial, apenas os dados de desenvolvimento (sem aplicação em amostras reais) foram apresentados.

Referências

- HALDAR, D.; PURKAIT, M. K. Lignocellulosic conversion into value-added products: A review. **Process Biochemistry**, v. 89, p. 110-133, 2020.
- HUANG, Y.; TIAN Y., ZHANG Z., PENG C. A HILIC-MS/MS method for the simultaneous determination of seven organic acids in rat urine as biomarkers of exposure to realgar. **Journal of Chromatography B**, v. 905, p. 37-42, 2012.
- MEI, Q.; SHEN, X.; LIU, H.; HAN, B. Selectively transform lignin into value-added chemicals. **Chinese chemical letters**, v. 30, n. 1, p. 15-24, 2019.
- MOLDOVEANU, S. C.; POOLE, T.; SCOTT, W. A. An LC-MS Method for the Analysis of Some Organic Acids in Tobacco Leaf, Snus, and Wet Snuff. **Beiträge zur Tabakforschung International/Contributions to Tobacco Research**, v. 28, n. 1, p. 30-41, 2018.
- PONNUSAMY, V. K.; NGUYEN, D. D.; DHARMARAJA, J.; SHOBANA, S.; BANU, J. R.; SARATALE, R. G.; KUMAR, G. A review on lignin structure, pretreatments, fermentation reactions and biorefinery potential. **Bioresource technology**, v. 271, p. 462-472, 2019.
- PUTRI, S. P.; FUKUSAKI, E. **Mass spectrometry-based metabolomics: a practical guide**. CRC Press, 2014.
- TELEKI, A.; TAKORS, R. Quantitative Profiling of Endogenous Metabolites Using Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry (HILIC-MS/MS). In: **Microbial Metabolomics**. Humana Press, New York, NY, 2019. p. 185-207.
- XIAO, J. F.; ZHOU, B.; RESSOM, H. W. Metabolite identification and quantitation in LC-MS/MS-based metabolomics. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v.32, p.1-14, 2012.

Preservação de substâncias bioativas em extrato da casca da semente do algodão durante a secagem por *spray-dryer* com uso de agentes carreadores

Clarissa Machado e Dias Borges¹, Elias Alves da Silva², Raquel Bombarda Campanha³, Wesley Leal⁴, Patricia Abrão de Oliveira Molinari⁵, Simone Mendonça⁶

Resumo

A casca da semente do algodão é um importante resíduo agroindustrial da cadeia do biodiesel. A obtenção de extratos ricos em bioativos é uma das formas de agregação de valor a este tipo de material no contexto da bioeconomia, economia circular ou de base biológica. Isso pode ser alcançado submetendo o material a uma maceração dinâmica em etanol a 80%. Para se preservar as características físico-químicas de extratos ricos em bioativos, uma estratégia consiste em se utilizar, durante a etapa de secagem, agentes carreadores que impedem a degradação. Nesse sentido, o presente estudo foi realizado com o objetivo de avaliar a performance de dois agentes carreadores, Aerosil 200® e goma arábica, na secagem por atomização em *Spray dryer* do extrato da casca da semente do algodão, verificando a manutenção de certas características (teor de flavonoides e atividades antioxidantes). Ambos permitiram a obtenção do extrato em pó com umidade de $5,5 \pm 0,25\%$ e $8,03 \pm 1,29\%$, e rendimento de secagem de 50,3% e 36,95% para Aerosil 200 e Goma Arábica, respectivamente. Foi evidenciado que a goma arábica mantém algumas características do extrato seco como o teor de flavonoides e principalmente, atividades antioxidantes mesmo após exposição ao calor durante processo de secagem. Os resultados sugerem que a goma pode ser empregada no microencapsulamento do extrato da casca da semente do algodão, mas, outros parâmetros ainda precisam ser investigados.

Palavras-chave: substâncias bioativas, estabilidade química, atomização, antioxidantes.

Introdução

A aplicação de extratos vegetais em alimentos, fitoterápicos e cosméticos vem ganhando destaque no Brasil e no mundo. A existência de substâncias bioativas em matrizes vegetais, originárias principalmente de seu metabolismo secundário, faz com que cresça o interesse em novas matérias-primas.

¹ Graduada em Farmácia, Universidade de Brasília, clarissadiasborges@hotmail.com

² Biólogo, doutor em Biotecnologia Vegetal, mestre em Plantas Medicinais Aromáticas e Condimentares, Universidade Federal de Lavras, elias.bio89@hotmail.com

³ Química, mestre em Engenharia e Ciência de Alimentos, analista da Embrapa Agroenergia, raquel.campanha@embrapa.br.

⁴ Químico, mestre em química, analista da Embrapa Agroenergia, wesley.leal@embrapa.br

⁵ Farmacêutica, doutora em Química, pesquisadora da Embrapa Agroenergia, patricia.oliveira@embrapa.br

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

No Brasil até o ano de 2010 estavam registrados mais de 500 medicamentos fitoterápicos, sendo a maioria em forma sólida em função do maior tempo de conservação (Oliveira, O. W.; Petrovick, 2010).

O preparo de extratos vegetais inclui diferentes etapas como redução da partícula da matriz, que é dissolvida em uma solução extratora, o líquido é filtrado e o solvente é removido obtendo-se o extrato que finalmente pode ser utilizado no produto final em diferentes formas (cápsulas, comprimidos, géis, pomadas e outros) (Lopes et al., 2018).

A secagem dos extratos consiste em etapa crucial que deve garantir a manutenção de suas propriedades. Nesse sentido, a secagem por *spray-dryer* é recomendada em função de menor tempo de exposição do pó ao calor, reduzindo sua degradação (Oliveira, B. E. et al., 2018).

Apesar disso, alguns problemas ainda podem ser observados nesse processo como aglomeração de partículas, endurecimento e aderência que ocorrem em função da presença de algumas substâncias no extrato como açúcares de baixo peso molecular. Estes açúcares apresentam grande afinidade química com moléculas de água o que acarreta em diminuição da temperatura geral de transição vítrea (T_g) do sistema ocasionando os efeitos descritos anteriormente (Saavedra-Leos, M. et al., 2012). Além disso, fatores como temperatura de entrada e saída, pressão de atomização, entre outros, merecem ser observados.

A fim de contornar estes problemas e manter as características físico-químicas dos extratos, o emprego de transportadores na secagem por *spray-dryer* é indicado (Cynthia; Bosco; Bhol, 2015). Estes agentes carreadores são caracterizados por apresentarem alto peso molecular, baixa viscosidade e T_g na faixa de 100 – 188 °C. Dessa forma, durante a secagem por pulverização, aumentam a T_g do sistema contribuindo para manutenção das propriedades de interesse nas amostras (Saavedra-Leos, Z. et al., 2015). Entre os agentes estudados tem-se a maltodextrina, inulina (Araujo-Díaz et al., 2017), aerosil, amido pré-gelatinizado (Asquiere et al., 2020), goma arábica, dextrina, entre outros (Braga; Rocha; Hubinger, 2018).

Neste contexto, a caracterização do extrato da casca da semente do algodão (*Gossypium hirsutum* L.), importante resíduo agroindustrial da cadeia do biodiesel, evidenciou a presença de importantes substâncias bioativas de interesse industrial como compostos fenólicos e atividade antioxidante. Em decorrência da grande diversidade química existente nos extratos vegetais, em especial entre os compostos fenólicos, vários ensaios têm sido desenvolvidos para avaliação da capacidade antioxidante de amostras, abordando diferentes mecanismos. O princípio do método de redução do íon férrico (FRAP) é baseado na produção do íon Fe^{2+} a partir da redução do íon Fe^{3+} , encontrado no complexo 2,4,6- tripiridil-s-triazina (TPTZ) na presença de antioxidantes. Outro teste antioxidante usado neste estudo baseia-se na perda da cor amarela do β -caroteno devido à sua reação com os produtos da oxidação do ácido linoleico em uma emulsão. A avaliação do sistema β -caroteno/ácido linoleico determina a capacidade de uma amostra de proteger um substrato lipídico da oxidação (Duarte-Almeida et al., 2006).

Portanto, o objetivo deste trabalho foi avaliar a produção de extrato seco de semente de algodão (*Gossypium hirsutum* L.) empregando agentes carreadores para secagem em *spray dryer*, com ênfase na manutenção e estabilidade de compostos bioativos e atividade antioxidante. O extrato foi analisado em relação ao teor de umidade, rendimento do processo, teor de flavonoides e atividades antioxidantes.

Material e Métodos

Os extratos hidroalcoólicos foram obtidos por maceração dinâmica em agitador orbital empregando-se a casca da semente do algodão e solução de etanol 80% na proporção 1:5 (m:v) durante 24 horas a 20°C e 150 rpm. Os extratos foram então, submetidos a filtração simples com papel de filtro e em seguida parte do solvente evaporado em rotaevaporador para redução do teor de etanol em aproximadamente 15%. O teor de sólidos totais desta solução ficou em 8 g/L. Na sequência, os extratos foram submetidos a secagem por atomização (spray-dryer) com utilização dos agentes carreadores goma arábica e Aerosil 200® conforme concentrações recomendadas na literatura para cada agente (15% e 30%, respectivamente) (Daza et al., 2016; Vasconcelos et al., 2005). Para secagem foram empregados os seguintes parâmetros: Para extrato + Aerosil (temperatura de entrada: 130°C; Temperatura de saída: 71°C; Pressão: 40bar; Vazão: 30% 9ml/min) e para extrato + goma (temperatura de entrada: 130°C; Temperatura de saída: 80°C; Pressão: 40bar; Vazão: 20% 6ml/min.). Os materiais carreadores foram adquiridos em farmácias de manipulação de Brasília e possuem grau farmacêutico. Como controle utilizou-se uma alíquota deste material liofilizada e sem a adição de carreadores.

Os extratos em pó obtidos foram caracterizados quanto ao rendimento em porcentagem R (%) com base na seguinte fórmula:

$$R(\%) = \{[Mpó \times (1 - Upó)] + [Mal \times (1 - Ual)]\} \times 100$$

Onde,

Mpó: Massa do pó obtido

Upó: Umidade do pó

Mal: Massa da solução de alimentação no secador

Ual: Umidade da solução

A umidade foi determinada gravimetricamente em estufa à vácuo e os compostos bioativos quanto a presença de flavonoides e atividades antioxidantes. A quantificação de flavonoides totais foi realizada de acordo com metodologia descrita por Siatka e Kasparova (2010). As atividades antioxidantes foram avaliadas pelo método de redução do íon férrico FRAP (Benzie; Strain, 1996), e sistema betacaroteno/ácido linoleico (Duarte-Almeida et al., 2006) com modificações. As soluções analíticas foram preparadas na concentração 1,6 mg/mL para todos os testes, exceto para determinação de betacaroteno/ácido linoleico do liofilizado que foi testado a 1mg/mL.

Todos os ensaios foram realizados em, no mínimo, triplicata certificando-se que as médias das triplicatas analíticas não tivessem variação maior que 5%, além disso, foi assegurado que o R² da regressão linear da curva padrão tivesse valor próximo a 1. Os dados obtidos foram submetidos a teste estatístico no software SISVAR (Ferreira, 2011).

Resultados e Discussão

Após a secagem foi observado que os carreadores contribuíram para obtenção de extratos secos com aspecto de pó fino, principalmente o Aerosil® conforme ilustrado na

Figura 1. Ambos permitiram a obtenção do extrato em pó com umidade de $5,5 \pm 0,25\%$ e $8,03 \pm 1,29\%$, e rendimento de secagem de $50,3\%$ e $36,95\%$ para o tratamento contendo 30% Aerosil e 15% Goma Arábica, respectivamente. Os experimentos de secagem foram realizados com quantidade de extrato próximo ao limite mínimo de operação do equipamento, o que contribuiu para o baixo rendimento devido, provavelmente à perda proporcional do material que fica aderido às paredes do *spray dryer*. Dessa forma, novos testes, com maior quantidade de extrato, se fazem necessários para uma melhor avaliação do rendimento e repetibilidade do processo de secagem.



Figura 1. Extrato após evaporação parcial do etanol (A); Extrato obtido com adição de Aerosil 200® e secagem em *spray-dryer* (B); Extrato obtido com adição de goma arábica e secagem em *spray-dryer* (C).

A aplicação da técnica de secagem por *spray dryer* oferece muitos benefícios como a capacidade de escalonamento e processamento de substâncias sensíveis ao calor com menor risco de degradação (Arpagaus; Rütli; Meuri, 2013).

Após solubilizados no solvente utilizado na etapa de extração (Etanol 80%), foram realizadas as análises dos produtos, onde foi verificada a presença de flavonoides e atividades antioxidantes (Figura 2), foi feita a comparação entre a secagem em *spray dryer* com dois agentes carreadores e em liofilizador, esse último foi usado como processo controle.

Os teores de flavonoides não diferiram estatisticamente indicando a possível manutenção dos flavonoides mesmo após a secagem em *spray dryer*, quando comparado com a liofilização. Também não foi observada diferença entre os carreadores.

Os carreadores empregados desempenharam suas funções na proteção do extrato durante o curto período de exposição ao calor no *spray dryer*. O extrato seco juntamente com a goma arábica apresentou maior atividade antioxidante pelo método FRAP do que o seco com Aerosil 200 e o extrato liofilizado. Os agentes carreadores sozinhos não apresentaram atividades antioxidantes mostrando-se inertes (dados não apresentados). Na avaliação da atividade antioxidante pelo sistema betacaroteno/ácido linoleico, o extrato seco por *spray dryer* com goma arábica não diferiu do extrato seco por liofilização, enquanto que a secagem por *spray dryer* com Aerosil 200 apresentou menor atividade.

A goma arábica já foi descrita como um dos melhores carreadores para preservação de compostos bioativos durante a secagem por spray (Da Silva et al., 2013). Em um estudo realizado com extrato de lulo (*Solanum quitoense* L.), o emprego de goma arábica

na concentração de 3% contribuiu para a manutenção das propriedades nutricionais como o teor de flavonoides totais e atividade antioxidante (Igual et al., 2014).

A adição de goma arábica também permitiu maior retenção de compostos redutores, polifenóis e radicais sequestrantes, quando utilizada no encapsulamento da própolis (Busch et al., 2017).

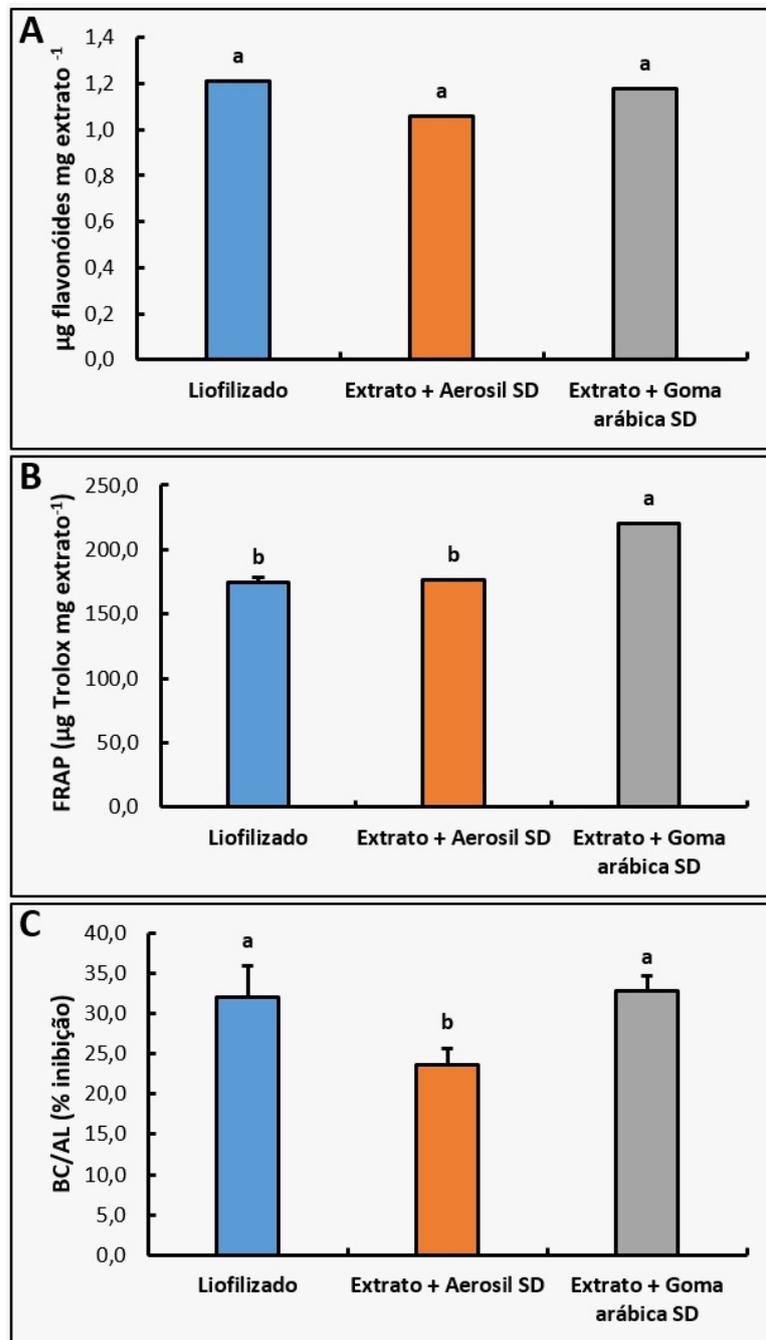


Figura 2. Teor de Flavonoides (A); atividades antioxidantes pelos métodos FRAP (B); e sistema beta caroteno/ácido linoleico (C). Os valores das colunas representam a média de três repetições. As barras representam o desvio padrão. Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

O Aerosil permite a secagem de amostras com diferentes teores de sólidos, inclusive em baixas temperaturas de entrada e pode preservar quantidades significativas de líquido dentro do volume intersticial de seus conglomerados, contudo, resultados anteriores demonstraram que em extratos com baixa concentração de sólidos não são totalmente confinados nessas estruturas (Gallo et al., 2011).

O emprego de Aerosil no óleo essencial de orégano, por exemplo, aumentou a liberação de compostos voláteis, levando a perda da atividade antioxidante (Ansensio et al., 2017).

Considerações Finais

O extrato da casca da semente do algodão apresenta importantes propriedades bioativas como flavonoides e efeitos antioxidantes. Os resultados do presente trabalho sugeriram que a goma arábica parece ser o material mais promissor como adjuvante de secagem quando comparada com o Aerosil 200, visto que o teor de goma arábica utilizado foi metade do teor de Aerosil 200. Além disso, quando comparada com a liofilização, a atomização com goma arábica se mostrou superior ou igual. No entanto, o rendimento da secagem com a goma arábica foi inferior. Mais estudos se mostram necessários, testes com replicatas de processo de secagem, elucidação e variação dos parâmetros de secagem e diferentes avaliações de composição e atividade dos extratos serão ainda realizados a fim de se obter um produto final que mantenha as principais substâncias bioativas do extrato.

Referências

- ARAUJO-DÍAZ, S. et al. Evaluation of the physical properties and conservation of the antioxidants content, employing inulin and maltodextrin in the spray drying of blueberry juice. **Carbohydrate polymers**, v. 167, p. 317-325, 2017.
- ASENSIO, Claudia M. et al. Antioxidant stability study of oregano essential oil microcapsules prepared by spray-drying. **Journal of food science**, v. 82, n. 12, p. 2864-2872, 2017.
- ASQUIERI, E. R. et al. Secagem do extrato de yacon (*Smallanthus sonchifolius*) por Spray Dryer: efeito dos diferentes agentes carreadores e avaliação dos teores de frutooligossacarídeos e compostos fenólicos. **Research, Society and Development**, v. 9, n. 7, p. e591974521-e591974521, 2020.
- BENZIE, I. F.; STRAIN, J. J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. **Analytical biochemistry**, v. 239, n. 1, p. 70-76, 1996.
- BRAGA, M. B.; ROCHA, S. C. D. S.; HUBINGER, M. D. Spray-drying of Milk-Blackberry pulp mixture: Effect of carrier agent on the physical properties of powder, water sorption, and glass transition temperature. **Journal of food science**, v. 83, n. 6, p. 1650-1659, 2018.
- BUSCH, V. M. et al. Propolis encapsulation by spray drying: Characterization and stability. **LWT**, v. 75, p. 227-235, 2017.
- CYNTHIA, S.; BOSCO, J. D.; BHOL, S. Physical and structural properties of spray dried tamarind (*Tamarindus indica* L.) pulp extract powder with encapsulating hydrocolloids. **International Journal of Food Properties**, v. 18, n. 8, p. 1793-1800, 2015.

- DA SILVA, Felipe C. et al. Assessment of production efficiency, physicochemical properties and storage stability of spray-dried propolis, a natural food additive, using gum Arabic and OSA starch-based carrier systems. **Food and Bioproducts Processing**, v. 91, n. 1, p. 28-36, 2013.
- DAZA, L. D. et al. Effect of spray drying conditions on the physical properties of Cagaita (*Eugenia dysenterica* DC.) fruit extracts. **Food and bioproducts processing**, v. 97, p. 20-29, 2016.
- DUARTE-ALMEIDA, J. M. et al. Avaliação da atividade antioxidante utilizando sistema beta-caroteno/ácido linoléico e método de seqüestro de radicais DPPH. **Food Science and Technology**, v. 26, n. 2, p. 446-452, 2006.
- IGUAL, M. et al. Optimization of spray drying conditions for lulo (*Solanum quitoense* L.) pulp. **Powder technology**, v. 256, p. 233-238, 2014.
- LOPES, C. M. C. et al. Phytotherapy: yesterday, today, and forever? **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 64, n. 9, p. 765-768, 2018.
- OLIVEIRA, B. E. et al. Spray-drying of grape skin-whey protein concentrate mixture. **Journal of food science and technology**, v. 55, n. 9, p. 3693-3702, 2018.
- OLIVEIRA, O. W.; PETROVICK, P. R. Secagem por aspersão (spray drying) de extratos vegetais: bases e aplicações. **Revista brasileira de farmacognosia. São Paulo, SP. Vol. 20, n. 4 (Ago./Set. 2010), p. 641-650, 2010.**
- RE, R. et al. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free radical biology and medicine**, v. 26, n. 9-10, p. 1231-1237, 1999.
- SAAVEDRA-LEOS, M. et al. Towards an improved calorimetric methodology for glass transition temperature determination in amorphous sugars. **CyTA-Journal of Food**, v. 10, n. 4, p. 258-267, 2012.
- SAAVEDRA-LEOS, Z. et al. Technological application of maltodextrins according to the degree of polymerization. **Molecules**, v. 20, n. 12, p. 21067-21081, 2015.
- SIATKA, T.; KASPAROVA, M. Seasonal variation in total phenolic and flavonoid contents and DPPH scavenging activity of *Bellis perennis* L. flowers. **Molecules**. V. 15, p. 9450-9461, 2010.
- VASCONCELOS, E. et al. Influência da temperatura de secagem e da concentração de Aerosil® 200 nas características dos extratos secos por aspersão da *Schinus terebinthifolius* Raddi (Anacardiaceae). **Revista brasileira de farmacognosia**, v. 15, n. 3, p. 243-249, 2005.

Reforma a vapor de biogás simulado usando óxidos mistos NiMgAl, NiMgAlGd e NiMgAlPr

Emerson Léo Schultz¹, Itânia Pinheiro Soares²

Resumo

Óxidos mistos NiMgAl, NiMgAlGd e NiMgAlPr foram obtidos a partir da calcinação de compostos tipo hidrotalcita, preparados por coprecipitação a pH variável. No preparo destes materiais foi usado nos cálculos o teor de 15% de níquel. A composição dos óxidos mistos foi determinada por fluorescência de raios X (FRX). Os óxidos mistos preparados foram empregados na reforma a vapor de biogás simulado, com 70% de metano (CH₄) e 30% de dióxido de carbono (CO₂), na temperatura de 750 °C, pressão atmosférica, e razão vapor/carbono (S/C) de 3,2. Este processo de reforma de biogás gera gás de síntese, mistura de hidrogênio (H₂) e monóxido de carbono (CO), que pode ser usado para obtenção de hidrogênio, metanol, hidrocarbonetos, entre outros produtos. Após a reação de reforma, a quantidade de carbono depositada nos catalisadores foi determinada por análise termogravimétrica (ATG). Os óxidos mistos preparados possuem teor de níquel entre 17-18%, acima do valor estabelecido de 15% de níquel no preparo. O óxido misto 15NiMgAlGd possui 1,0% de gadolínio, enquanto 15NiMgAlPr possui 1,1% de praseodímio. As conversões de CH₄ obtidas foram 97,9%, 98,6% e 99,4% para os óxidos mistos 15NiMgAl, 15NiMgAlGd e 15NiMgAlPr, respectivamente. A razão H₂/CO variou entre 3,3 a 3,5, mostrando que o processo é mais indicado para obtenção de hidrogênio a partir do gás de síntese produzido. A quantidade de carbono depositada na superfície dos catalisadores foi maior para 15NiMgAl (5,6%) e menor para 15NiMgAlGd (4,9%) e 15NiMgAlPr (4,8%). Estes resultados indicam que gadolínio e praseodímio atuam como promotores em óxidos mistos NiMgAl obtidos de compostos tipo hidrotalcita.

Palavras-chave: reforma a vapor, biogás, óxidos mistos, níquel, gadolínio, praseodímio.

Introdução

O biogás é obtido da digestão anaeróbia de material orgânico, como dejetos de animais, resíduos agrícolas e efluentes industriais. Normalmente, a digestão anaeróbia é realizada em biorreatores chamados de biodigestores, existindo diferentes configurações destes equipamentos (Atelge et al., 2020).

Os principais constituintes do biogás são metano (CH₄) e dióxido de carbono (CO₂), além de outros compostos minoritários, como sulfeto de hidrogênio (H₂S). Devido à alta concentração de CH₄, normalmente entre 50-75% em volume, o biogás é bastante usado para produção de energia térmica e elétrica (Atelge et al., 2020, Scarlat, 2018).

¹ Engenheiro químico, doutor em Engenharia Química, pesquisador da Embrapa Agroenergia, emerson.schultz@embrapa.br

² Química, doutora em Química, pesquisadora da Embrapa Agroenergia, itania.soares@embrapa.br

Entretanto, o biogás pode ter outras aplicações, como a sua conversão em gás de síntese para produção de compostos químicos, como metanol, dimetil éter, etanol, hidrocarbonetos, entre outros. Processos de reforma são usados para converter o biogás em gás de síntese, que é uma mistura de hidrogênio (H_2) e monóxido de carbono (CO) (Amaral et al., 2020, Hernandez; Martin, 2018).

A reforma a vapor de biogás engloba reações de reforma a vapor e de reforma seca de metano, por isso também é chamada de birreforma de biogás. Este processo normalmente é realizado em temperaturas entre 700 a 850 °C e pressões entre 1 a 7 bar. Dependendo da razão CH_4/CO_2 do biogás e da razão CH_4/H_2O na alimentação do reator, o gás de síntese obtido possui razão H_2/CO entre 2 a 4 (Tuna et al., 2018, Roy et al., 2018).

Catalisadores a base de níquel têm sido usados na reforma a vapor de biogás (Tuna et al., 2018). A partir da calcinação de compostos tipo hidrotalcita contendo níquel são obtidos catalisadores com excelente dispersão do níquel e com bom desempenho catalítico em processos de reforma de metano e biogás (Schultz; Correia; Soares, 2020; Serrano-Lotina et al., 2011). Entretanto, catalisadores a base de níquel sofrem desativação devido a formação de carbono, bloqueando os poros do catalisador e, consequentemente, o fluxo de gás (Tuna et al., 2018).

A adição de promotores aos catalisadores de Ni é realizada para diminuir a formação de carbono. Os elementos de terras raras, que incluem os elementos da série dos lantanídeos, têm sido usados como promotores em catalisadores de níquel, apresentando aumento na redutibilidade do Ni, introdução de novos sítios básicos e melhora do desempenho catalítico, sem rápida desativação pela deposição de carbono (Liu et al., 2016). Dentre estes elementos, estão gadolínio e praseodímio, os quais foram usados como promotores em catalisadores de Ni empregados na decomposição de metano (Anjaneyulu et al., 2015).

Dessa forma, no presente trabalho foram preparados óxidos mistos NiMgAl, sem ou com adição de gadolínio ou praseodímio para serem utilizados na reforma a vapor do biogás simulado, avaliando-se a conversão dos reagentes, a razão H_2/CO e a quantidade de carbono formada na superfície dos óxidos mistos.

Material e Métodos

Material

Foram utilizados níquel hexa-hidratado ($Ni(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$, 98,5%), nitrato de magnésio hexa-hidratado ($Mg(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$, 98,0%), nitrato de alumínio nono-hidratado ($Al(NO_3)_3 \cdot 9H_2O$, 98,0%), nitrato de gadolínio hexa-hidratado ($Gd(NO_3)_3 \cdot 6H_2O$, 99,5%), nitrato de praseodímio hexa-hidratado ($Pr(NO_3)_3 \cdot 6H_2O$, 99,9%), hidróxido de sódio (NaOH) e carbonato de sódio (Na_2CO_3 , 99,5%) da Sigma-Aldrich; lã de quartzo (99,995% de pureza em SiO_2 , tamanho da fibra de 4 μm), da Actquartzo Industrial.

Preparo dos catalisadores

Três compostos tipo hidrotalcita de níquel (Ni), magnésio (Mg) e alumínio (Al) foram preparados por coprecipitação a pH variável, sendo que um foi adicionado de gadolínio

e outro de praseodímio. Estes compostos foram calcinados para sua decomposição e obtenção dos óxidos mistos 15NiMgAl, 15NiMgAlGd e 15NiMgAlPr, sendo que 15 representa o teor de níquel usado nos cálculos relacionados com o preparo dos catalisadores. Para o preparo, duas soluções aquosas foram utilizadas: solução de nitratos (A) contendo $\text{Ni}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, $\text{Al}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$, sem ou com $\text{Gd}(\text{NO}_3)_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ou $\text{Pr}(\text{NO}_3)_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, e com razão molar de $\text{M}^{3+}/(\text{M}^{3+} + \text{M}^{2+})$ de 0,25; e solução (B) de Na_2CO_3 e NaOH (B). A solução (A) foi lentamente adicionada à solução (B), mantida em agitação vigorosa, permanecendo em agitação por mais 30 min após a adição e envelhecida por 21 h em repouso. Em seguida, a suspensão resultante foi filtrada usando bomba de vácuo, sendo o sólido obtido lavado com água deionizada a 60 °C. Os compostos tipo hidrotalcita obtidos foram secos a 110 °C por 18 horas e moídos. A calcinação destes compostos resultou nos óxidos mistos utilizados.

Reação de reforma a vapor de biogás simulado

A reforma a vapor de biogás simulado foi realizada em reator tubular de leito fixo, da marca PID Eng&Tech, na temperatura de 750 °C e pressão atmosférica, empregando 60 mg dos óxidos mistos preparados, os quais foram colocados sobre uma camada de lã de quartzo contida em um suporte de aço inoxidável. O reator foi aquecido por 80 min em um fluxo de argônio de 30 NmL/min, atingindo 750°C nesta etapa. Posteriormente, o catalisador foi reduzido por 2 h em fluxo de hidrogênio de 30 NmL/min. Após o reator foi purgado com fluxo de argônio de 30 NmL/min por 10 min. Em seguida, o reator foi alimentado com a mistura reacional, primeiro sem passar pelo reator (modo By-pass) para sua caracterização e depois passando pelo reator. Uma razão molar $\text{CH}_4:\text{CO}_2$ de 2,33:1 foi usada para simular um biogás com 70% de CH_4 e 30% de CO_2 . Uma razão vapor/carbono (S/C) de 3,2 foi empregada nos experimentos. Os fluxos dos reagentes foram de 15,68 NmL/min de CH_4 , 6,72 NmL/min de CO_2 e 0,04 mL/min de H_2O . O fluxo de saída do reator foi analisado em linha usando um cromatógrafo gasoso (Shimadzu, GC-2014), equipado com detector de condutividade térmica e detector de ionização de chama.

Caracterização dos óxidos mistos

A composição química dos óxidos mistos foi determinada por fluorescência de raios X (FRX). A quantidade de carbono depositada nos óxidos mistos após a reação de reforma a vapor de biogás foi determinada por análise termogravimétrica, aquecendo as amostras em fluxo de ar sintético da temperatura ambiente até 1.000 °C, sob uma taxa de aquecimento de 10 °C min⁻¹, monitorando a variação de massa.

Resultados e Discussão

Os teores de níquel, gadolínio e praseodímio dos óxidos mistos são apresentados na Tabela 1. Os valores de níquel obtidos estão acima dos valores usados nos cálculos do preparo dos compostos tipo hidrotalcita. A lavagem da lama com água destilada levemente ácida durante o preparo pode ter causado a dissolução seletiva do magnésio, provocando o aumento nos teores de níquel (Michalik et al., 2008). Os teores de

gadolínio e praseodímio obtidos estão próximos do valor usado nos cálculos (1,0 % em massa).

Tabela 1. Teores de níquel, gadolínio e praseodímio dos óxidos mistos preparados.

| Óxido misto | Metal (% em massa) | | |
|-------------|--------------------|-----------|-------------|
| | Níquel | Gadolínio | Praseodímio |
| 15NiMgAl | 17,2 | --- | --- |
| 15NiMgAlGd | 18,5 | 1,0 | --- |
| 15NiMgAlPr | 17,8 | --- | 1,1 |

A reforma a vapor de biogás simulado foi realizada usando os óxidos mistos 15NiMgAl, 15NiMgAlGd e 15NiMgAlPr. Os resultados estão nas Figura 1 para o óxido misto 15NiMgAlPr.

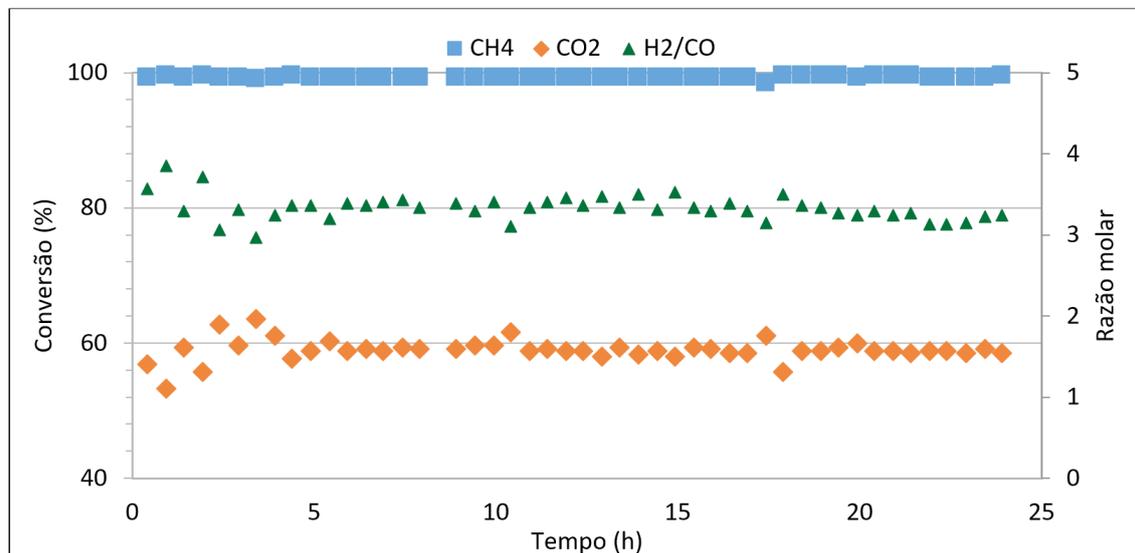


Figura 1. Conversão de CH₄ e de CO₂, e razão molar H₂/CO, na reforma a vapor de biogás simulado a 750 °C e razão S/C de 3,2, usando 15NiMgAlPr.

De acordo com os resultados da Figura 1, a conversão de CH₄ esteve próxima de 99%, enquanto a conversão de CO₂ ficou em torno de 60%, usando o óxido misto 15NiMgAlPr como catalisador. A reação de reforma a vapor de metano é a mais importante no processo de reforma a vapor de biogás, enquanto a reforma seca é inibida na presença de vapor (Guilhaume et al., 2019). Por isso, a conversão de CH₄ é maior que a de CO₂. A razão molar H₂/CO apresentou valores em torno de 3, o que está de acordo com a estequiometria da reforma a vapor de metano (Rahbari et al., 2018).

A Tabela 2 apresenta os valores médios da conversão de CH₄ e de CO₂ e da razão molar H₂/CO na reforma a vapor de biogás simulado a 750 °C e razão S/C de 3,2.

Tabela 2. Valores médios da conversão de CH_4 e de CO_2 e da razão molar H_2/CO na reforma a vapor de biogás simulado a $750\text{ }^\circ\text{C}$ e razão S/C de 3,2.

| Óxido misto | \bar{X}_{CH_4} (%) | \bar{X}_{CO_2} (%) | $\bar{R}_{\text{H}_2/\text{CO}}$ |
|-------------|-----------------------------|-----------------------------|----------------------------------|
| 15NiMgAl | 97,9 | 55,3 | 3,5 |
| 15NiMgAlGd | 98,6 | 59,3 | 3,4 |
| 15NiMgAlPr | 99,4 | 58,9 | 3,3 |

As conversões médias de CH_4 variaram entre 97,9 e 99,4%. Os óxidos mistos contendo terras raras apresentaram valores maiores de conversão média de CH_4 , sendo que a maior conversão foi obtida pelo óxido misto 15NiMgAlPr. A conversão média de CO_2 variou entre 55,3 e 59,3%. A conversão média de CO_2 foi maior para os óxidos mistos com terras raras que para o óxido misto 15NiMgAl. As razões molares H_2/CO médias variaram entre 3,3 e 3,5. Assim, o gás de síntese obtido é mais indicado para produção de hidrogênio. De acordo com a literatura, razões molares entre 3,26 e 5,66 foram obtidas na reforma de biogás simulado, contendo 60% de CH_4 e 40% de CO_2 , a $750\text{ }^\circ\text{C}$ e razão S/C de 1,5 (Roy et al., 2015). Desta forma, os resultados obtidos estão dentro da faixa de valores encontrados na literatura.

Análises termogravimétricas (ATG) foram realizadas para determinar a formação de carbono nos catalisadores usados na reforma a vapor de biogás, sendo que os resultados estão na Figura 2.

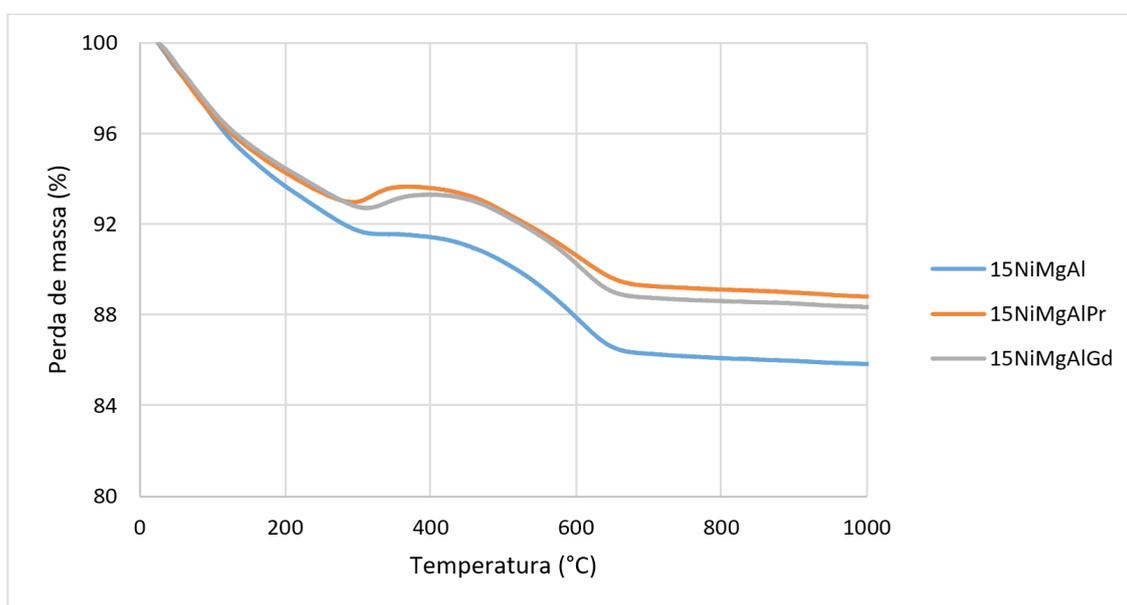


Figura 2. Análises termogravimétricas (ATG) dos óxidos mistos após a reação de reforma a vapor de biogás simulado.

De acordo com os resultados de ATG da Figura 2, inicialmente ocorre uma perda de massa, principalmente, devido a eliminação de umidade. Após, para o óxido misto 15NiMgAl a perda de massa fica estável entre $320\text{--}360\text{ }^\circ\text{C}$, enquanto para os outros óxidos há um aumento de massa em torno de $290\text{--}380\text{ }^\circ\text{C}$ para 15NiMgAlPr, e em

torno de 310-410 °C para 15NiMgAlGd. Este aumento de massa para os óxidos mistos 15NiMgAlPr e 15NiMgAlGd estão relacionados com a oxidação de Ni reduzido (Niu et al., 2019).

Neste trabalho, a quantidade de carbono depositada na superfície dos óxidos mistos foi estimada pela perda de massa após 400 °C, pois em temperaturas inferiores há perda de umidade e de CO₂ adsorvido nos óxidos mistos devido a elevada basicidade destes materiais (Serrano-Lotina et al., 2011). Os valores calculados são mostrados na Tabela 3.

Tabela 3. Quantidade de carbono depositada na superfície dos óxidos mistos.

| Óxido misto | Carbono (%) |
|-------------|-------------|
| 15NiMgAl | 5,6 |
| 15NiMgAlGd | 4,9 |
| 15NiMgAlPr | 4,8 |

Assim, a quantidade de carbono depositada na superfície dos óxidos mistos indica que a adição dos metais de terras raras diminui a formação de carbono durante a reação de reforma de biogás simulado. Estes metais são usados como promotores em catalisadores de níquel devido à melhora no desempenho catalítico, como consequência da maior dispersão e redutibilidade do níquel e menor deposição de carbono na superfície destes catalisadores (Serrano-Lotina et al., 2011). Desta forma, os resultados obtidos indicam que gadolínio e praseodímio atuam como promotores em óxidos mistos NiMgAl.

Conclusão

Os óxidos mistos contendo gadolínio e praseodímio, 15NiMgAlGd e 15NiMgAlPr, apresentaram conversões de CH₄ acima do valor encontrado para o óxido misto 15NiMgAl. Além disso, a quantidade de carbono depositada na superfície dos óxidos mistos 15NiMgAlGd e 15NiMgAlPr foi menor que para 15NiMgAl. Isto mostra que os metais gadolínio e praseodímio atuam como promotores em óxidos mistos NiMgAl obtido a partir de compostos tipo hidrotalcita, incrementando o desempenho catalítico, com menor deposição de carbono na superfície destes catalisadores.

Agradecimentos

À Fundação de Apoio à Pesquisa do Distrito Federal (FAPDF), processo 0193.001586/2017, pelo apoio financeiro.

Referências

- AMARAL, A. F.; PREVITALI, D.; BASSANI, A.; ITALIANO, C.; PALELLA, A.; PINO, L.; VITA, A.; BOZZANO, G.; PIROLA, C.; MANENTI, F. Biogas beyond CHP: The HPC (heat, power & chemicals) process. *Energy*, v. 203, p. 117820, 2020.
- ANJANEYULU, C.; NARESH, G.; KUMAR, V. V.; TARDIO, J.; RAO, T. V.; VENUGOPAL, A. Influence of Rare Earth (La, Pr, Nd, Gd, and Sm) Metals on the Methane Decomposition Activity of Ni-Al Catalysts. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, v. 3, n. 7, p. 1298-1305, 2015.

ATELGE, M. R., KRISA, D., KUMAR, G., ESKICIOGLU, C., NGUYEN, D. D., CHANG, S. W. ATABANI, A. E., AL-MUHTASEB, A., UNALAN, S. Biogas production from organic waste: recent progress and perspectives. **Waste and Biomass Valorization**, v. 11, n. 3, p. 1019-1040, 2020.

GUILHAUME, N., BIANCHI, D., WANDAWA, R. A., YIN, W., SCHUURMAN, Y. Study of CO₂ and H₂O adsorption competition in the combined dry/steam reforming of biogas. **Catalysis Today**, 2020.

HERNANDEZ, B.; MARTIN, M. Optimization for biogas to chemicals via tri-reforming. Analysis of Fischer-Tropsch fuels from biogas. **Energy Conversion and Management**, v. 174, p. 998-1013, 2018.

LIU, H., WIERZBICKI, D.; DEBEK, R.; MOTAK, M.; GRZYBEK, T.; COSTA, P.; GÁLVEZ, M. E. La-promoted Ni-hydroxalcalite-derived catalysts for dry reforming of methane at low temperatures. **Fuel**, v. 182, p. 8-16, 2016.

MICHALIK, A., SERWICKA, E. M., BAHRANOWSKI, K., GAWEL, A., TOKARZ, M., NILSSON, J. Mg, Al-hydroxalcalite-like compounds as traps for contaminants of paper furnishes. **Applied Clay Science**, v. 39, p. 86-97, 2008.

NIU, J., LILAND, S. E., YANG, J., ROUT, K. R., RAN, J., CHEN, D. Effect of oxide additives on the hydroxalcalite derived Ni catalysts for CO₂ reforming of methane. **Chemical Engineering Journal**, v. 377, p. 119763, 2019.

RAHBARI, A., RAMDIN, M., VAN DEN BROEKE, L. J., VLUGT, T. J. Combined steam reforming of methane and formic acid to produce syngas with an adjustable H₂: CO ratio. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 57, n. 31, p. 10663-10674, 2018.

ROY, P. S., PARK, C. S., RAJU, A. S., KIM, K. Steam-biogas reforming over a metal-foam-coated (Pd-Rh)/(CeZrO₂-Al₂O₃) catalyst compared with pellet type alumina-supported Ru and Ni catalysts. **Journal of CO₂ Utilization**, v. 12, p. 12-20, 2015.

ROY, P. S., SONG, J., KIM, K. PARK, C. S., RAJU, A. S. CO₂ conversion to syngas through the steam-biogas reforming process. **Journal of CO₂ Utilization**, v. 25, p. 275-282, 2018.

SCARLAT, N.; DALLEMAND, J.-F.; FAHL, F. Biogas: Developments and perspectives in Europe. **Renewable energy**, v. 129, p. 457-472, 2018.

SCHULTZ, E. L.; CORREIA, J. V. N.; SOARES, I. P. **Preparo de óxidos mistos Ni-Mg-Al com metais de terras raras para aplicação na reforma de biogás**. Comunicado técnico, 14. Brasília, DF: Embrapa Agroenergia, 2020. Disponível em <https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/handle/doc/1123224>, acesso em 19 set. 2020.

SERRANO-LOTINA, A., RODRÍGUEZ, L., MUÑOZ, G., MARTIN, A. J., FOLGADO, M. A., DAZA, L. Biogas reforming over La-NiMgAl catalysts derived from hydroxalcalite-like structure: Influence of calcination temperature. **Catalysis Communications**, v. 12, n. 11, p. 961-967, 2011.

TUNA, C. E., SILVEIRA, J. L., DA SILVA, M. E., BOLOY, R. M., BRAGA, L. B., PÉREZ, N. P. Biogas steam reformer for hydrogen production: Evaluation of the reformer prototype and catalysts. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 43, n. 4, p. 2108-2120, 2018.

