

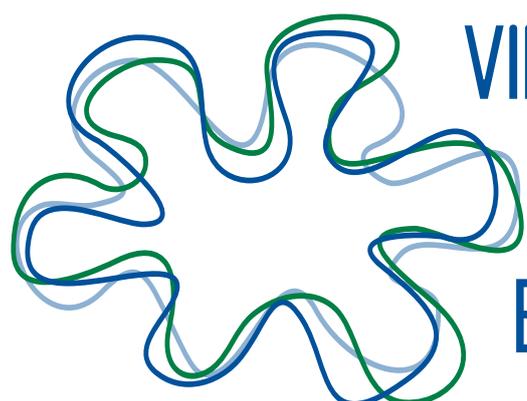
VII Encontro de
Pesquisa e Inovação da
Embrapa Agroenergia

Anais

*Raquel Bombarda Campanha
Lorena Costa Garcia Calsing*

Editoras Técnicas

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



VII Encontro de
Pesquisa e Inovação da
Embrapa Agroenergia

Anais

*Raquel Bombarda Campanha
Lorena Costa Garcia Calsing*

Editoras Técnicas

Embrapa Agroenergia

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

CEP: 70770-901

Fone: (61) 3448-4246

Fax: (61) 3448-1589

www.embrapa.br

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

Unidade responsável pelo conteúdo e pela edição

Embrapa Agroenergia

Comitê de Publicações da Unidade

Presidente: *Patrícia Verardi Abdelnur*

Secretária-executiva: *Lorena Costa Garcia Calsing*

Membros: *Alexandre Nunes Cardoso, Betulia de Moraes Souto, João Ricardo Moreira de Almeida, Leonardo Fonseca Valadares, Diogo Keiji Nakai, Patrícia Abrão de Oliveira Molinari, Priscila Seixas Sabaini*

Supervisão editorial: *Antonio Claudio da Silva Barros e Wyviane Carlos Lima Vidal*

Revisão de texto: *Antonio Claudio da Silva Barros*

Normalização bibliográfica: *Rosameres Rocha Galvão e Rosângela Galon Arruda*

Editoração eletrônica: *Maria Goreti Braga dos Santos*

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

1a edição

Publicação digital - PDF (2023)

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 (7. : 2023 : Brasília, DF).

Anais... / VII Encontro de Pesquisa e Inovação da Embrapa Agroenergia ;

editores, Raquel Bombarda Campanha, Lorena Costa Garcia Calsing – Brasília, DF: Embrapa, 2023.

PDF (273 p.).

ISBN 2595-5489

1. Pesquisa - Brasil. 2. Bioenergia. 3. Biomassa. I. Campanha, Raquel Bombarda. II. Calsing,

Lorena Costa Garcia. III. Título: Bioeconomia e agricultura: vetores de descarbonização e circularidade na indústria.

IV. Embrapa Agroenergia.

CDD (21. ed.) 333.7938

Comissão organizadora

- **Raquel Bombarda Campanha** (Analista da Embrapa Agroenergia/Coordenadora Geral)
- **Maurício Antônio Lopes** (Pesquisador da Embrapa Agroenergia/Assessor de Coordenação)
- **Sílvia Belém Gonçalves** (Pesquisadora da Embrapa Agroenergia/Presidente do Comitê Técnico-Científico)
- **Bruno Galveas Laviola** (Chefe-Adjunto de Pesquisa e Desenvolvimento da Embrapa Agroenergia)
- **Alexandre Alonso Alves** (Chefe-Geral da Embrapa Agroenergia)
- **Patrícia Verardi Abdelnur** (Chefe-Adjunta de Transferência de Tecnologia da Embrapa Agroenergia)
- **Patrícia Pinto Kalil Gonçalves Costa** (Chefe-Adjunta de Administração da Embrapa Agroenergia)
- **Maria Isabela Lourenco Barbirato** (Analista da Embrapa Agroenergia/Supervisor do Setor de Implementação da Programação de Transferência de Tecnologia)
- **Lilian Matheus Silva** (Analista da Embrapa Agroenergia/Supervisora de Setor de Comunicação e Marketing)
- **Leonardo Fonseca Valadares** (Pesquisador da Embrapa Agroenergia/Comitê Local de Publicações)
- **Lorena Garcia Costa Calsing** (Analista da Embrapa Agroenergia/Comitê Local de Publicações)

Comissão científica

- **Sílvia Belém Gonçalves** (Pesquisadora da Embrapa Agroenergia/Presidente da Comissão-Técnico Científico)
- **Alexandre Nunes Cardoso** (Pesquisador da Embrapa Agroenergia)
- **Betúlia de Moraes Souto** (Analista da Embrapa Agroenergia)
- **Diogo Keiji Nakai** (Analista da Embrapa Agroenergia)
- **Guy de Capdeville** (Pesquisador Embrapa Agroenergia)
- **Itânia Pinheiro Soares** (Pesquisadora da Embrapa Agroenergia)
- **João Ricardo Moreira de Almeida** (Pesquisador da Embrapa Agroenergia)
- **Leonardo Fonseca Valadares** (Pesquisador da Embrapa Agroenergia)
- **Maurício Antônio Lopes** (Pesquisador da Embrapa Agroenergia)
- **Patrícia Abrão Oliveira Molinari** (Pesquisadora da Embrapa Agroenergia)
- **Priscilla Seixas Sabaini** (Analista da Embrapa Agroenergia)
- **Raquel Bombarda Campanha** (Analista da Embrapa Agroenergia)
- **Rodrigo da Rocha Fragoso** (Pesquisador da Embrapa Agroenergia)
- **Thais Fabiana Chan Salum** (Pesquisadora da Embrapa Agroenergia)
- **Wesley Gabriel de Oliveira Leal** (Analista da Embrapa Agroenergia)
- **Wyviane Carlos Lima Vidal** (Pesquisadora da Embrapa Agroenergia)

APRESENTAÇÃO

A bioeconomia e a agricultura sustentável são temas de relevância global, com impactos diretos na mitigação das mudanças climáticas, na segurança alimentar e na transição para uma economia circular. A produção de biomassa como fonte renovável de energia e matéria-prima para múltiplas indústrias desempenha um papel fundamental na redução das emissões de carbono e na transição para uma economia limpa e de base renovável. É com base nesse contexto que a Embrapa Agroenergia propõe a realização do VII Encontro de Pesquisa e Inovação abordando o tema: “Bioeconomia e Agricultura: Vetores de Descarbonização e Circularidade na Indústria”, com o objetivo de promover o debate, a troca de conhecimentos e o estabelecimento de parcerias estratégicas entre setores vitais para o desenvolvimento sustentável.

O Brasil possui todas as condições necessárias para se tornar um protagonista na integração da bioeconomia com a agricultura, gerando repercussões significativas nos processos de descarbonização e circularidade em sua indústria. Com uma extensa e diversificada base agrícola, recursos naturais abundantes e uma vasta expertise no setor agropecuário, o país está bem posicionado para impulsionar a produção sustentável de biomassa e fomentar a adoção de práticas circulares em suas cadeias produtivas. Além disso, o Brasil é líder na produção de biocombustíveis, como o etanol, e possui uma ampla capacidade de pesquisa e desenvolvimento em tecnologias sustentáveis. Ao aproveitar esses recursos e conhecimentos, o Brasil pode se consolidar como uma referência global na transição para uma economia de baixo carbono, promovendo soluções inovadoras e desempenhando um papel fundamental na construção de um futuro mais sustentável.

Brasília e o Distrito Federal desempenham um papel crucial nesse contexto, especialmente considerando a exuberância da agricultura na região e todas as possibilidades que a nova economia abre para o agronegócio. A localização estratégica e as condições climáticas favoráveis do Distrito Federal propiciam um ambiente propício para o desenvolvimento de práticas agrícolas sustentáveis e a produção de biomassa de forma responsável. Com áreas apropriadas ao cultivo, diversidade de culturas e uma forte base agroindustrial, a região possui um potencial significativo para se tornar um polo de referência na integração da bioeconomia com a agricultura, impulsionando a descarbonização e a circularidade na indústria. Ao aproveitar sua expertise agrícola, investir em tecnologias inovadoras e promover parcerias estratégicas, o Distrito Federal e seu entorno já se destacam como centro de excelência na produção sustentável, beneficiando tanto a região quanto o Brasil como um todo.

Esperamos que as informações apresentadas nos trabalhos aqui reunidos sirvam de base para avanços no setor agroindustrial e permitam uma maior aproximação com todos os atores envolvidos em processos de descarbonização e circularização da economia.

Alexandre Alonso Alves
Chefe-Geral da Embrapa Agroenergia

O Encontro de Pesquisa e Inovação da Embrapa Agroenergia

Organização

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

Objetivos

- Proporcionar debates em PD&I no tema "Bioeconomia e Agricultura", com ênfase nos desafios para se promover a descarbonização e a circularidade na indústria nacional.
- Avaliar e discutir a bioeconomia aplicada à agricultura sustentável e seus impactos diretos na mitigação das mudanças climáticas, na segurança alimentar e na transição para uma economia circular.
- Fortalecer o protagonismo das instituições locais no debate e na promoção da integração da bioeconomia e agricultura sustentável no Distrito Federal.
- Estabelecer parcerias estratégicas entre setores vitais para o desenvolvimento sustentável.
- Reunir profissionais experientes e estudantes de graduação e pós-graduação, ampliando as oportunidades de networking, colaboração e intercâmbio de conhecimentos entre os participantes, estimulando o surgimento de novas ideias, projetos e parcerias de negócios.
- Divulgar os trabalhos de PD&I desenvolvidos na Embrapa Agroenergia e instituições parceiras nas áreas de Biomassas, Biotecnologia Industrial, Química de Renováveis e Materiais Renováveis.
- Premiar os melhores talentos nas categorias de graduandos, graduados e doutores.

Formato

O VII EnPI foi realizado nos dias 24, 25 e 26 de outubro de 2023, no auditório da Embrapa Sede, localizada em Brasília, DF. Nesta edição, o evento contou com a participação de uma equipe de pesquisa altamente qualificada da Embrapa Agroenergia, composta por 32 pesquisadores e 21 analistas, além de renomados palestrantes, totalizando 17 especialistas no mercado, na pesquisa e nas políticas relacionadas ao tema. A presença dessas referências do mercado e da academia proporcionou uma ampla troca de conhecimentos, experiências e insights, enriquecendo as discussões e contribuindo para o avanço das soluções relacionadas à bioeconomia, descarbonização e circularidade da economia.

Público-alvo

O público-alvo do VII Encontro de Pesquisa e Inovação da Embrapa Agroenergia são pesquisadores, professores, profissionais, estudantes de pós-graduação e graduação envolvidos em pesquisas relacionadas à produção de Agroenergia, em especial nos temas bioeconomia, agronomia, química, biotecnologia, nanotecnologia e áreas correlatas. No Distrito Federal, portanto, esse público engloba profissionais e estudantes vinculados às Unidades de pesquisa da Embrapa (Embrapa Agroenergia, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Embrapa Hortaliças, Embrapa Cerrados, Embrapa Sede) e instituições como a Universidade de Brasília, Universidade Católica de Brasília e outras com as quais a Embrapa mantém parcerias formalizadas. Outras universidades do Brasil também participaram enviando trabalhos e/ou participantes, alunos e professores.

Os setores públicos, agentes reguladores e agentes de fomento estão igualmente contemplados no público-alvo, uma vez que as discussões e os documentos produzidos durante o encontro podem servir como norteadores para a formulação de ações governamentais nos âmbitos distrital e federal.

Sumário

RESUMOS SIMPLES 9

BIOMASSAS.....9

Análise de genomas montados a partir de uma comunidade microbiana enriquecida com lignina	10
Caracterização química de genótipos de capim-elefante	11
Desempenho agrônomo de Brassicas na região do Cerrado: uma alternativa para biocombustíveis	12
Efeito da adubação potássica e manejo hídrico no desenvolvimento inicial da cana-energia	13
Efeito das condições de secagem sobre a umidade de espécies de macroalgas da costa brasileira	14
Efeito do manejo hídrico no desenvolvimento inicial de cana-energia	15
Estimativas de parâmetros genéticos populacionais e avanços do programa de melhoramento genético da canola	16
Identificação de compostos químicos no bio-óleo proveniente da pirólise do endocarpo da macaúba	17
Isolamento e identificação de microrganismos degradadores de lignina do bioma Cerrado	18
Método para avaliação qualitativa do acúmulo de amido intracelular na microalga <i>Chlorella sorokiniana</i>	19

BIOTECNOLOGIA INDUSTRIAL.....20

Biodegradação do organofosforado clorpirifós-metil por <i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG.....	21
Caracterização bioquímica de uma xilanase da família GH-10	22
Caracterização da β -glicosidase Bgl08 de rúmen de caprino com potencial uso na indústria de alimentos	23
Engenharia metabólica para a produção de etileno glicol por <i>Komagataella phaffii</i> a partir de hidrolisados de biomassa	24
Recuperação do ácido xilônico obtido por fermentação com linhagem recombinante P1HL2 de <i>Komagataella phaffii</i>	25
Triagem funcional de β -glicosidases em bibliotecas metagenômicas e colônias isoladas do solo do Cerrado.....	26

QUÍMICA RENOVÁVEL27

Extração com líquido pressurizado de compostos fenólicos da casca de semente de algodão.....	28
--	----

TRABALHOS COMPLETOS 29

BIOMASSAS.....29

Avaliação do uso de fertilizantes minerais no cultivo de <i>Chlorella sorokiniana</i>	30
Biomassa pirolisada como matriz para a produção de fertilizantes especiais	36
Impacto econômico-ambiental da produção de biogás para consumo próprio em estabelecimentos agropecuários de pequeno e médio porte	41
Impactos do <i>Carbon Dot Krill A32</i> na produtividade de biomassa da microalga <i>Chlorella sorokiniana</i> (LBA#39)	46
Influência da iluminação e da aeração sobre o crescimento de <i>Chlorella sorokiniana</i> em meio BG11	51
Medição de qualidade de sementes de canola com visão computacional e aprendizado de máquina	56
Produção de biogás de efluente da indústria de óleo de palma.....	61
Produção de óleo e proteína de canola cultivada no Cerrado brasileiro	67
Quantificação e caracterização de óleos de canola, carinata e crambe produzidos no Centro-Oeste brasileiro.....	72
Seleção e caracterização de leveduras capazes de crescer em compostos aromáticos derivados da lignina.....	77

BIOTECNOLOGIA INDUSTRIAL.....82

Avaliação de estratégias de expressão em <i>Escherichia coli</i> para produção de amilase de <i>Paenibacillus barengoltzii</i>	83
Comparativo metodológico na produção de espidroínas sintéticas de aranhas da biodiversidade brasileira em bactérias	88
Desafios da operacionalização do biorreator com inóculo mesofílico.....	93
Desenvolvimento de biodigestor automatizado para produção de inóculo	98
Efeito de glicose, ácido glicônico e sais sobre o desempenho de celulases.....	103
Estabelecimento de processo enzimático para estonagem de tecidos de algodão em escala de bancada.....	108
Efeito da superexpressão do fator de transcrição HAA1 em <i>Komagataella phaffii</i> produtora de ácido xilônico.....	113
Efeito do cálcio na produção de ácido lático a partir de glicerol por <i>Lactobacillus plantarum</i>	118
Engenharia genética de <i>Komagataella phaffii</i> para aumento da tolerância a inibidores derivados de lignocelulose	123
Estabelecimento de processo enzimático de purga de tecidos de algodão em escala de bancada.....	129
Ferramenta de monitoramento web para apoio em observatórios de tendências: um estudo de caso Lattes.....	134
Identificação e quantificação de fitormônios em biomassa de microalgas utilizando HPLC-PDA.....	139
Linhagem de levedura produtora de ácido cítrico a partir de glicerol bruto	144
Manutenção da coleção de macrofungos e triagem de potenciais produtores de biopigmentos.....	148
Modelagem e produção de espidroína sintética de seda de aranha para aplicações biomédicas.....	153
Produção de biogás a partir de bagaço de cana-de-açúcar e frações pré-tratadas	158
Produção de biogás a partir de biomassas lignocelulósicas sorgo e capim-elefante	163
Produção de biogás com dejetos de bovino leiteiro em uma propriedade de pequeno porte.....	168
Produção de celulases por <i>Trichoderma harzianum</i> a partir de distintas fontes de celulose	173
Produção de nanofibras de algodão: uso de hidrólise enzimática para a quebra da celulose.....	178
Seleção de bactéria produtora de ácido lático por via fermentativa, utilizando diferentes fontes de carbono	183
Seleção de linhagens de leveduras multicompetentes em produção de ácido indolacético e biossolubilização de fósforo.....	189
Síntese de ácido lático a partir de glicose por <i>Pediococcus acidilactici</i> : otimização e produção	194
Sistema automatizado de monitoramento para fotobiorreatores de microalgas.....	199

QUÍMICA RENOVÁVEL205

Adsorção de carotenos de óleo de palma utilizando celulose como adsorvente	206
Análise qualitativa da vinhaça para posterior tratamento e reuso	211
Caracterização química e avaliação nematotóxica de extratos hidroetanólicos de <i>Brassica carinata</i>	216
Influência da temperatura na oxidação de lignina kraft para a produção de ácidos carboxílicos.....	222
Obtenção de ácido acrílico a partir de ácido lático utilizando zeólitas ZSM-5	227
Preparação e caracterização química de extratos brutos de <i>Crotalaria juncea</i> e <i>Crotalaria ochroleuca</i>	231

MATERIAIS RENOVÁVEIS237

Ácido oxálico aumenta a solubilização de potássio de biocarvão de lodo de esgoto	238
Biomassas e biocombustíveis competitivos para estruturação do mercado brasileiro de hidrogênio carbono neutro ou negativo.....	243
Efeito do ácido oxálico na liberação de fósforo de biomassa pirolisada de lodo de esgoto	248
Obtenção de biolubrificante a partir de óleo de palma (<i>Elaeis guineense</i>)	253
Otimização do cultivo de <i>Burkholderia gladioli</i> BRM 58833 por fermentação submersa.....	257
Potássio liberado por biocarvão de lodo de esgoto enriquecido com agromineral e ácido oxálico	262
Preparação e caracterização de aerogéis de celulose e amido.....	267

RESUMOS SIMPLES

BIOMASSAS

Análise de genomas montados a partir de uma comunidade microbiana enriquecida com lignina

Vitória Pinheiro Balestrini¹, Otávio Henrique Bezerra Pinto², Ricardo Henrique Krüger³, Betania Ferraz Quirino⁴

Resumo

A desconstrução de lignina por bactérias possui diversas vantagens, como a maior especificidade das reações e a facilidade de manipulação genética em relação aos fungos. Neste estudo, análises de bioinformática foram utilizadas para caracterizar a diversidade microbiana de três consórcios enriquecidos para microrganismos capazes de degradar lignina, com foco nas bactérias. Os consórcios foram obtidos a partir de três tipos de solo, enriquecidos por meio de sucessivas passagens em meio de cultura na qual a lignina extraída por método alcalino de capim (*switch-grass*) foi usada como única fonte de carbono. Foi extraído e sequenciado o DNA metagenômico da terceira passagem do enriquecimento. A partir dos dados de sequenciamento, foram recuperados 232 genomas, destacando-se 39 genomas após aplicação de critérios de qualidade de montagem. Os filos bacterianos mais abundantes nos três consórcios foram de Proteobacteria, Bacteroidetes e Actinobacteria, com identificação taxonômica de somente dois genomas em nível de espécie. Os consórcios apresentaram funções condizentes com o ambiente de isolamento, solos, além de possíveis vias metabólicas relacionadas à degradação da lignina. Foram escolhidos quatro genomas, duas Alphaproteobacterias e duas Actinobacterias, com base na taxonomia, para análises mais profundas das vias de degradação de lignina focada nos monolignóis. Experimentos de alinhamento genômico mostraram que os genomas de cada filo não foram provenientes da mesma espécie. A análise metagenômica permitiu a identificação de diferentes vias metabólicas relacionadas à degradação dos monolignóis. Entretanto, não se pode afirmar inequivocamente sobre a capacidade ou não de degradação da lignina codificada nesses quatro genomas, pela falta de literatura sobre essas vias específicas.

Termos para indexação: degradação de lignina, metabolismo, bactérias, metagenômica, comunidades microbianas.

¹ Biotecnologista, doutoranda em Biologia Microbiana, Universidade de Brasília, vitoria.balestrini@colaborador.embrapa.br

² Biólogo, doutor em Biologia Molecular, Universidade de Brasília, otaviohenriquebp9@gmail.com

³ Biólogo, doutor em Biologia Microbiana, professor da Universidade de Brasília, kruger@unb.br

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

Caracterização química de genótipos de capim-elefante

Giovanna Adrielle Franco Barcelos¹, Raquel Bombarda Campanha², Patrícia Abrão de Oliveira Molinari³

Resumo

O capim-elefante, de nomenclatura científica *Cenchrus purpureus* (Schumach.) Morrone, é uma gramínea de alta produtividade e tem se mostrado uma opção promissora para a produção de energia renovável. Com o objetivo de auxiliar o melhoramento genético do capim-elefante com ênfase na produção de bioenergia e bioprodutos, trinta e seis materiais do Banco Ativo de Germoplasma de Capim-Elefante (BAGCE) da Embrapa Gado de Leite tiveram sua composição química determinada. Para a análise da composição química, os seguintes métodos foram utilizados: determinação do teor de extrativos aquosos e etanólicos, determinação de lignina solúvel e insolúvel, determinação de matéria seca, determinação de cinzas totais e inorgânicos estruturais realizados de acordo com os protocolos do *National Renewable Energy Laboratory* (NREL). Como resultado da caracterização, foram obtidos os seguintes mínimos e máximos de valores médios (em porcentagem): inorgânicos estruturais: de 1,30 a 6,75; extrativos aquosos: de 10,13 a 18,24; extrativos etanólicos: de 1,52 a 3,93; lignina solúvel: de 3,44 a 5,71; lignina insolúvel: de 14,91 a 19,21; glucana: de 30,86 a 37,59; xilana: de 12,78 a 16,12; arabinana: de 1,40 a 1,93; acetil: de 2,32 a 3,30, obtendo-se como resultado o fechamento de massa do capim-elefante. O melhor fechamento foi de 99,57% e o de valor mais baixo foi de 87,86%. Dessa forma, como resultado da caracterização química feita nas amostras de capim-elefante, foi possível identificar materiais com potencial para geração de bioenergia e outros para processos de desconstrução da parede celular com foco em aproveitamento de carboidratos estruturais, resultados que irão auxiliar o programa de melhoramento dessa espécie.

Termos para indexação: capim-elefante, biomassa, caracterização química.

¹ Graduanda em Química, Instituto Federal de Brasília, giovanna.barcelos@colaborador.embrapa.br

² Química, mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos, analista da Embrapa Agroenergia, raquel.campanha@embrapa.br

³ Farmacêutica, doutora em Química, pesquisadora da Embrapa Agroenergia, patricia.oliveira@embrapa.br

Desempenho agrônômico de Brassicas na região do Cerrado: uma alternativa para biocombustíveis

Cíntia Gonçalves Guimarães¹, Willame dos Santos Candido², Letícia Karen dos Santos³, Simone Palma Favaro⁴, Bruno Galvêas Laviola⁵

Resumo

A carinata (*Brassica carinata*) é uma oleaginosa com potencial para produção de biocombustíveis, contudo, apresenta altos teores de ácidos erúcido e glucosinolatos, fatores antinutricionais que não permitem seu consumo como alimento. A canola (*Brassica napus* L. var. oleifera) possui grande importância mundial, sendo a terceira oleaginosa mais produzida no planeta, ultrapassada somente pela soja e pela palma de óleo, respectivamente. Porém, no Brasil, ainda são necessários mais estudos para possibilitar a consolidação da produção de canola em regiões com temperaturas mais elevadas. Nesse contexto, o presente trabalho objetivou avaliar o desempenho produtivo de genótipos de Brassicas sob irrigação na região do Cerrado. O experimento foi conduzido em área experimental da Embrapa Cerrados, em Planaltina, DF, situada a 15°35'30" S e 47°42'30" W, a 1.007 m altitude, sob sistema de cultivo irrigado. Utilizou-se o delineamento experimental de blocos ao acaso, com quatro repetições e cinco genótipos, sendo eles *Brassica napus* (Diamond, Hyola 433 e Nuola 300) e *Brassica carinata* (Carinata Nucover STH 100 e Carinata Nujet 400). Os dados foram submetidos à análise de variância e à comparação das médias dos tratamentos, utilizando o teste Tukey ($p \leq 0,05$), com o auxílio do software GENES. Houve efeito significativo de genótipos para a produtividade de grãos, sendo que Carinata Nujet, Nuola 300, Diamond e Hyola 433 apresentaram maiores produtividades de grãos com 2.875^a kg/ha; 2.601^a kg/ha; 2.465^a kg/ha e 1.765^a kg/ha, respectivamente. Essas produtividades foram superiores à média nacional para o ano de 2022 (1.743 kg/ha), o que demonstrou alto potencial produtivo dessas Brassicas na região do Cerrado. Contudo, a Carinata Nucover STH 100 apresentou menor rendimento de grãos, com baixa produtividade (302^b kg/ha), o que pode ser atribuído à não adaptação às condições edafoclimáticas da região. Conclui-se que, em geral, as Brassicas estudadas são boas alternativas de biomassas para produção de biocombustíveis e outros produtos no contexto da bioeconomia e podem ser cultivadas na região do Cerrado com resultado produtivo satisfatório.

Termos para indexação: *Brassica carinata*, *Brassica napus* L., produtividade de grãos.

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

² Engenheiro-agrônomo, doutor em Genética e Melhoramento de Plantas, bolsista da Embrapa Agroenergia, willame.candido@colaborador.embrapa.br

³ Doutora em Química, bolsista da Embrapa Agroenergia, leticia.santos@colaborador.embrapa.br

⁴ Engenheira-agrônoma, doutora em Tecnologia de Alimentos, pesquisadora da Embrapa Agroenergia, simone.favaro@embrapa.br

⁵ Agrônomo, doutor em Fitotecnia, pesquisador da Embrapa Agroenergia, bruno.laviola@embrapa.br

Efeito da adubação potássica e manejo hídrico no desenvolvimento inicial da cana-energia

Juan Ricardo Rocha¹, Dalila Lopes da Silva², Flávia Rosana Barros da Silva³, Matheus Vieira Uliana⁴, Jéssica de Souza Aguiar⁵, José Antônio Bressiani⁶, Cassio Hamilton Abreu Junior⁷

Resumo

Deve-se aumentar o consumo de biocombustíveis e expandir a matriz energética brasileira. Assim, a cana-energia é provavelmente a melhor opção de biomassa para atender à crescente demanda por fontes de energia renováveis. No entanto, não existem informações sobre a recomendação de adubação para essa cultura. A hipótese é que o conhecimento da quantidade de nutrientes requeridos para a máxima produtividade da cana-energia, em condições de déficit hídrico e irrigação plena, é fundamental para que o setor sucroenergético brasileiro atenda à crescente demanda por biocombustíveis e energia renovável do País e do exterior. O objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos da adubação potássica (K) sob duas condições de cultivo (de irrigação em déficit e plena), sobre aspectos morfológicos da cana-energia em desenvolvimento inicial. O experimento foi conduzido em casa de vegetação da ESALQ/USP, utilizando-se duas variedades de cana-energia (Vertex 3 – teor médio de fibra e sacarose; e Vertex 2 – teor alto de fibra e baixa sacarose) nas condições de déficit hídrico (reposição de 50% da θ_{cc}) e irrigação plena (reposição de 100% da θ_{cc}), em vasos de 167 dm³, em blocos ao acaso, em esquema fatorial 3x2x2, no qual foram avaliados os efeitos de três níveis de K (60 kg/ha, 180 kg/ha e 300 kg/ha de K₂O cloreto de potássio) e dose fixa de N e P (180 kg/ha de N e P₂O₅ utilizando ureia e superfosfato triplo, respectivamente), com três repetições. Ambas as cultivares responderam à adubação de forma linear, com aumento na altura de colmo para as duas maiores doses em ambas as condições de disponibilidade hídrica. A dose de 180 kg/ha aumentou o número de perfilhos nas duas cultivares. A variedade Vertex 3 teve maior altura de colmo em relação à variedade Vertex 2 em todas as condições de cultivo e doses de adubação de K. O manejo da adubação potássica pode aumentar a produtividade de biomassa de parte área da cana-energia. A cana-energia é suscetível à deficiência hídrica na fase inicial de desenvolvimento.

Termos para indexação: cana-energia, nutrição de plantas, irrigação, energia renovável.

¹ Engenheiro-agrônomo, doutor em Agronomia (Produção Vegetal), Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA/USP), jr.rocha@usp.br

² Engenheira-agrônoma, doutorando em Ciências, Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA/USP), dalila.ls@usp.br

³ Zootecnista, Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA/USP), barrosflaviar@gmail.com

⁴ Graduando em Engenharia Agrônoma, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (ESALQ/USP), matheus.uliana2@usp.br

⁵ Graduanda em Gestão Ambiental, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (ESALQ/USP), jsaguiar@usp.br

⁶ Engenheiro-agrônomo, doutor em Agronomia (Genética e Melhoramento de Plantas), BioVertis Produção Agrícola (Nuseed do Brasil S.A.), bressiani@granbio.com.br

⁷ Engenheiro-agrônomo, doutor em Agronomia (Solos e Nutrição de Plantas), Universidade de São Paulo, cahabreu@cena.usp.br

Efeito das condições de secagem sobre a umidade de espécies de macroalgas da costa brasileira

Izabella Fernanda Ferreira Domingues¹, Carla de Sant'Anna Freitas², Talita Pimenta do Nascimento³, Raquel Bombarda Campanha⁴, Patrícia Abrão de Oliveira Molinari⁵, Simone Mendonça⁶

Resumo

As macroalgas da costa brasileira apresentam potencial comercial, por sua composição rica em produtos naturais bioativos de interesse às indústrias de diversos setores. Além disso, as macroalgas podem contribuir para aumentar a fonte de renda de comunidades caiçaras. No entanto, a logística de distribuição é onerosa em razão da perecibilidade desse material, a qual compromete a manutenção das características físico-químicas das algas. Dentro desse contexto, o estudo das condições de secagem para obtenção da biomassa pode ser uma alternativa para orientar escolhas futuras dessas comunidades. Sendo assim, a eficiência de secagem de duas espécies de algas cultivadas em balsas no mar e de uma mistura de algas coletada na areia da região Nordeste brasileira foi avaliada no presente estudo. Alíquotas foram secas em estufa de circulação de ar forçada a 45 °C e a 65 °C. Adicionalmente, a secagem solar em sombrite foi avaliada a fim de simular o procedimento realizado nas comunidades locais. Após apresentarem peso constante, as amostras foram moídas e colocadas a 105 °C em estufa para determinação do teor de umidade. De acordo com os dados experimentais, foi possível determinar que a umidade reduziu durante a secagem, obtendo-se os seguintes valores para as espécies analisadas: de 6% a 9% a 65 °C, de 8% a 11% a 45 °C e de 10% a 12% ao sol. Analisando-se o teor de umidade como resposta, concluiu-se que foram obtidos valores baixos em todas as condições de secagem. A estufa é uma opção vantajosa por não depender do clima do local para realizar a secagem, além de ser simples e de baixo custo. Dessa forma, estufas podem ser obtidas por essas comunidades e serem utilizadas para o desenvolvimento de novos produtos, o aumento da vida útil e a melhoria da logística de distribuição das macroalgas.

Termos para indexação: macroalgas, secagem, comunidade caiçara, teor de umidade.

¹ Química, mestra em Química, Universidade de Brasília, izabella.domingues@colaborador.embrapa.br

² Bióloga, doutora em Genética e Biologia Molecular, Universidade Estadual de Campinas, carla.freitas@colaborador.embrapa.br

³ Nutricionista, doutora em Ciência de Alimentos, Universidade de São Paulo, talita.nascimento@colaborador.embrapa.br

⁴ Química, mestra em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Embrapa Agroenergia, raquel.campanha@embrapa.br

⁵ Farmacêutica, doutora em Química, Embrapa Agroenergia, patricia.oliveira@embrapa.br

⁶ Farmacêutica, doutora em Saúde Pública, Embrapa Agroenergia, simone.mendonca@embrapa.br

Efeito do manejo hídrico no desenvolvimento inicial de cana-energia

Dalila Lopes da Silva¹, Juan Ricardo Rocha², Timoteo Herculino da Silva Barros³, Lucas Alves de Almeida⁴, Pedro Augusto Ratão de Carvalho⁵, José Antonio Bressiani⁶, Cassio Hamilton Abreu Junior⁷

Resumo

As fontes alternativas de energia se expandiram em razão de vários fatores, como mudanças climáticas e disponibilidade limitada de combustíveis fósseis. A cana-energia é uma alternativa promissora na transição energética, sendo a melhor opção de biomassa para suprir a demanda por energias renováveis. Contudo, ainda não há informações quanto à resposta ao manejo hídrico da cultura. A hipótese era de que em condições de irrigação plena a planta apresentaria maior demanda, por causa da maior produção de biomassa. O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito do manejo da irrigação sobre a produtividade da cultura da cana-energia. O experimento foi conduzido em casa de vegetação da ESALQ/USP, constituído pelo cultivo de duas variedades de cana-energia (Vertex III, com teor médio de fibra e sacarose, e Vertex II, com teor alto de fibra e baixa sacarose) sob duas condições de irrigação, deficitária e plena (reposição de 50% e 100% da θ_{cc} , respectivamente), em vasos de 167 dm³, em blocos ao acaso, em esquema fatorial e três repetições. As variáveis estudadas foram altura de colmo (cm), altura da planta (cm) e número de perfilhos por vaso, e as avaliações foram feitas aos 150 DAP. A variedade Vertex III teve a altura da planta diminuída, enquanto a Vertex II teve aumentadas a altura do colmo e a altura da planta em condição de deficiência hídrica. Ambas as cultivares tiveram menor número de perfilhos nessa condição. Isso pode indicar sensibilidade da cana-energia ao déficit hídrico na produção de perfilhos em fase inicial de cultivo. A variedade Vertex II ficou mais alta que a Vertex III sob deficiência hídrica; já em regime de irrigação plena, apresentou mais perfilhos. Os resultados indicam que o manejo da irrigação da cana-energia variedade Vertex II pode responder com maior perfilhamento inicial em cana-planta.

Termos para indexação: biomassa, transição energética, irrigação.

¹ Engenheira-agrônoma, doutoranda em Ciências, Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA/USP), dalila.ls@usp.br

² Engenheiro-agrônomo, doutor em Agronomia (Produção Vegetal), pesquisador de pós-doutorado no Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA/USP), jr.rocha@usp.br

³ Engenheiro-agrônomo, doutor em Engenharia de Sistemas Agrícolas, pesquisador de pós-doutorado no Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA/USP), timoteo@alumni.usp.br

⁴ Engenheiro-agrônomo, mestrando em Ciências, Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA/USP), lucas.alvesdealmeida@usp.br

⁵ Engenheiro-agrônomo, Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" (ESALQ/USP), predroratao@usp.br

⁶ Engenheiro-agrônomo, doutor em Agronomia (Genética e Melhoramento de Plantas), diretor de tecnologia agrícola do BioVertis Produção Agrícola (Nuseed do Brasil S.A.), jose.bressiani@nuseed.com

⁷ Engenheiro-agrônomo, doutor em Agronomia (Solos e Nutrição de Plantas), professor associado, Universidade de São Paulo, cahabreu@cena.usp.br

Estimativas de parâmetros genéticos populacionais e avanços do programa de melhoramento genético da canola

Willame dos Santos Candido¹, Cíntia Gonçalves Guimarães², Leticia Karen dos Santos³, Simone Palma Favaro⁴, Bruno Galvêas Laviola⁵

Resumo

Estimativas de parâmetros genéticos são necessárias para estabelecer a escolha dos métodos de melhoramento populacional. O presente trabalho tem por objetivos apresentar os primeiros resultados do programa de melhoramento genético da canola (*Brassica napus* L.) da Embrapa Agroenergia, que tem focado no desenvolvimento de linhagens produtivas, com alto rendimento de óleo, adaptadas às condições de altas temperaturas e estresse hídrico, e estimar importantes parâmetros genéticos para caracteres relacionados com o potencial produtivo das plantas. Para isso, foram identificados germoplasma-fontes com maior adaptação às condições ambientais, e formaram-se quatro populações para melhoramento, contendo 500 progênies cada, para iniciar seleção nas gerações segregantes. Na geração F₂, em 80 progênies da população 1, foram realizadas mensurações dos caracteres produtivos de peso total de sílicas (PTSil) e sementes (PTSem) e foram estimados parâmetros genéticos para os caracteres. O programa estatístico Selegen foi utilizado para estimação da variância genética (Vg), herdabilidade média (h²m), relação CVg/CVe e acurácia de seleção de progênie (Acprog). Para avançar gerações F₂ a F₆ utilizou-se o método de melhoramento genealógico. Resultados preliminares apontaram para a existência de variabilidade genética alta entre os indivíduos pertencente à população avaliada, sendo encontrados, para o caráter PTSil, valores de Vg=12878,9; h²m=67,04%; CVg/CVe=1,00 e Acprog=81,9%, enquanto para o caráter PTSem, valores de Vg=1561,7; h²m=66,7%; CVg/CVe=1,00 e Acprog=81,6%. Os valores de Vg e h²m encontrados para os caracteres PTSil e PTSem indicam predominância dos fatores genéticos influenciando a expressão fenotípica e que podem permitir maiores ganhos genéticos com a seleção, enquanto para o parâmetro CVg/CVe observaram-se valores iguais a 1,00, indicando situação favorável para a seleção, ou seja, presença de variabilidade suficiente para a seleção. Para Acprog, os valores altos observados indicam confiança nas avaliações das progênies e nos valores preditos para os caracteres. O programa de melhoramento encontra-se na geração de avanço F₅ e F₆, obtendo-se até o momento um total de 70 linhagens potenciais para serem utilizadas como genitores de híbridos ou como futuras variedades sintéticas. Conclui-se que, para a população de melhoramento avaliada, observaram-se parâmetros genéticos favoráveis para seleção de linhagens geneticamente superiores, contribuindo para o progresso do programa de melhoramento genético da canola.

Termos para indexação: *Brassica napus*, herdabilidade, seleção de linhagens.

¹ Engenheiro-agrônomo, doutor em Genética e Melhoramento de Plantas, bolsista da Embrapa Agroenergia, willame.candido@colaborador.embrapa.br

² Engenheira-agrônoma, doutora em Biocombustíveis, bolsista da Embrapa Agroenergia, cintia.guimaraes@colaborador.embrapa.br

³ Tecnóloga em Biocombustíveis, doutora em Química, bolsista da Embrapa Agroenergia, leticia.santos@colaborador.embrapa.br

⁴ Engenheira-agrônoma, doutora em Tecnologia de Alimentos, pesquisadora da Embrapa Agroenergia, simone.favaro@embrapa.br

⁵ Agrônomo, doutor em Fitotecnia, pesquisador da Embrapa Agroenergia, bruno.laviola@embrapa.br

Identificação de compostos químicos no bio-óleo proveniente da pirólise do endocarpo da macaúba

Isabelle Pandolfo da Motta¹, Wesley Gabriel de Oliveira Leal², Rossano Gambetta³, Simone Palma Favaro⁴

Resumo

A macaúba (*Acrocomia aculeata*) é uma palmeira fonte de biomassas com um elevado potencial no setor da bioeconomia, sobretudo como fornecedora de óleos vegetais. O fruto é composto por epicarpo (casca), mesocarpo (polpa), endocarpo e amêndoa. A produção de endocarpo pode chegar a 7 t/ha e sua composição é rica em celulose, hemicelulose e lignina, portanto, com alto potencial para conversões termoquímicas, como a pirólise para a obtenção de biocarvões. Além da fração sólida do biocarvão, da pirólise obtém-se também a fração líquida, essa última conhecida como bio-óleo ou licor pirolenhoso. Este trabalho teve como objetivo a caracterização por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (CG/MS) dos principais constituintes do bio-óleo resultante da pirólise do endocarpo da macaúba. A pirólise foi realizada em atmosfera inerte a 750 °C/120 min. A ativação do carvão foi feita sob dois tempos de injeção de vapor d'água, 240 min e 320 min. A cromatografia foi realizada em equipamento Shimadzu, modelo MDGC/GCMS – 2010, com coluna capilar ZB – 1701, 60 m x 0,25 mm x 0,25 µm, temperatura inicial de 40 °C e final de 250 °C. Os dados coletados foram analisados utilizando o software OpenChrom v1.5.0 (LABLICATE GmbH) com a extensão MCR-AR para deconvolução dos picos, realizando a comparação dos espectros de massas com os espectros da biblioteca do NIST20 (*The National Institute of Standards and Technology*), com um mínimo de similaridade de 70%. Para este trabalho, os picos com áreas inferiores a 0,01% da soma das áreas totais foram desconsiderados. Os resultados apresentaram uma diversidade de grupos oxigenados e fenóis, destacando-se entre eles o ácido acético, o fenol e o 2,6-dimetóxi-fenol, os quais correspondem aos picos registrados de maior intensidade. O tempo de ativação com vapor d'água não alterou os perfis cromatográficos. Uma vez obtida a identificação de compostos químicos no bio-óleo, é possível buscar alternativas de aplicação desse bioproduto.

Termos para indexação: *Acrocomia*, CG/MS, extrato pirolenhoso.

¹ Graduada em Química, Universidade de Brasília, isabelle.motta@colaborador.embrapa.br

² Químico, mestre em Química, analista da Embrapa Agroenergia, wesley.leal@embrapa.br

³ Engenheiro químico, doutor em engenharia química, pesquisador da Embrapa Agroenergia, rossano.gambetta@embrapa.br

⁴ Agrônoma, doutora em Ciências de Alimentos, pesquisadora da Embrapa Agroenergia, simone.favaro@embrapa.br

Isolamento e identificação de microrganismos degradadores de lignina do bioma Cerrado

Mateus Florentino Barbosa¹, Jessica Carvalho Bergmann², André Rodrigues de Carvalho Junior³, Betulia de Moraes Souto⁴, Laura Carvalho Alves de Oliveira⁵, Ananda de Oliveira Duarte⁶, Rodrigo Maurício Marinsek Sales⁷, Léia Cecília de Lima Fávaro⁸, Clenilson Martins Rodrigues⁹, Betania Ferraz Quirino¹⁰

Resumo

A lignina é o segundo composto orgânico mais abundante na natureza, depois da celulose. É encontrada na parede celular das plantas e é um subproduto industrial da produção de celulose a partir da madeira. Muitas vezes, ela é descartada, pela dificuldade em utilizá-la para gerar produtos de alto valor. Portanto, é preciso entender melhor como desconstruir essa macromolécula, visando gerar produtos de alto valor agregado em um processo industrial rentável. Já existem algumas pesquisas sobre o uso de microrganismos para clivar a lignina, mas a maioria delas se concentra no uso de fungos para fazê-lo, sendo as bactérias menos estudadas. Este trabalho avança principalmente o estudo sobre o uso de bactérias para a desconstrução da lignina. Para tanto, uma amostra de solo do Cerrado brasileiro foi inoculada no meio mínimo M9 com lignina kraft (Sigma Aldrich, lignina alcalina 471003), como única fonte de carbono, e foi incubada a 37 °C. Foram isoladas 79 bactérias, mostrando o grande potencial inexplorado das bactérias para desconstruir a lignina. Para assegurar a pureza dos organismos isolados, foram inoculadas colônias únicas de bactérias. Todas foram armazenadas com glicerol 20%. O DNA dos microrganismos foi extraído pelo método fenol/clorofórmio e utilizado para amplificação por PCR das regiões 16S rDNA. O DNA de 60 bactérias foi extraído com sucesso. Trinta e oito deles tiveram seu rDNA 16S amplificado com sucesso e foram sequenciados para posterior identificação dessas bactérias. O número de bactérias isoladas mostra a importância de estudos com elas para a desconstrução da lignina e contribui para o entendimento da utilização desses organismos que estão diretamente envolvidos na desconstrução da lignina.

Termos para indexação: bactérias, Cerrado, filogenia, identificação de microrganismos, solo, lignina.

¹ Biomédico, mestrando em Biologia Microbiana, Universidade de Brasília, mateus.florentino@colaborador.embrapa.br

² Bióloga, doutora em Ciências Genômicas e Biotecnologia, Universidade Católica de Brasília, jessicacbergmann@gmail.com

³ Biólogo, mestrando em Ciências Genômicas e Biotecnologia, Universidade Católica de Brasília, andrercj5@gmail.com

⁴ Bióloga, mestre em Biologia Molecular, Universidade de Brasília, Embrapa Agroenergia, betulia.souto@embrapa.br

⁵ Biotecnóloga, mestranda em Biologia Microbiana, Universidade de Brasília, lclauracarvalho25@gmail.com

⁶ Graduanda em Biotecnologia, Universidade de Brasília, anandaduarte.unb@gmail.com

⁷ Biólogo, mestrando em Ciências Genômicas e Biotecnologia, Universidade Católica de Brasília, rodrigo.sales@colaborador.embrapa.br

⁸ Bióloga, doutora em Ciências, Embrapa Agroenergia, leia.favaro@embrapa.br

⁹ Químico, doutor em Química, Embrapa Agroenergia, clenilson.rodrigues@embrapa.br

¹⁰ Bióloga, doutora em Biologia Molecular e Celular, Embrapa Agroenergia, betania.quirino@embrapa.br

Método para avaliação qualitativa do acúmulo de amido intracelular na microalga *Chlorella sorokiniana*

Alice de Faria Martins Vieira¹, Rosana Falcão², Letícia Jungmann Cançado³, Hugo Santana⁴, Lorena Costa Garcia Calsing⁵, Wyviane Carlos Lima Vidal⁶

Resumo

O objetivo deste trabalho foi estabelecer um protocolo qualitativo de coloração de amido intracelular em microalgas, para visualização em microscopia. A partir de um pré-inóculo cultivado por 7 dias (meio BG-11, 23±1 °C; intensidade luminosa de 10.000 lux; 12 horas/12 horas claro/escuro; e injeção constante de ar atmosférico) foi feita a inoculação, em triplicata, da cepa *Chlorella sorokiniana* – BRM 051899, nas mesmas condições de cultivo do pré-inóculo. Para a inoculação, foi adicionado o volume de pré-inóculo necessário para uma densidade óptica inicial de 0,01 nm a 680 nm em cultivos com volume final de 1 L. Durante 10 dias, foi feita avaliação diária do crescimento por espectrofotometria a 680 nm e do acúmulo de amido pela coloração com solução de lugol (0,05% I₂ + 0,1% KI) e análise microscópica. Para coloração, foram adicionados 10 µL de solução de lugol a 1 mL de amostra, sendo a solução mantida em banho seco a 90 °C por 5 minutos. Foram preparadas lâminas de amostras coradas e não coradas para observação por microscopia de campo claro (objetiva de 100x), e foram realizados registros de imagens por meio de câmera digital (0,63x) acoplada ao microscópio. Logo após a inoculação, foram observadas algumas células coradas, indicando que as microalgas já estavam acumulando amido nas condições do pré-inóculo. Ao longo dos demais dias, a população de células coradas se manteve em níveis relativamente constantes até o nono dia, a partir do qual não foram mais observadas células coradas. Os dados da densidade óptica indicaram um aumento gradativo da população de células, mas, no experimento realizado, não foi possível identificar uma correlação entre o acúmulo de amido e o crescimento celular. Foi identificado um padrão de coloração mais intenso em volta do pirenoide, o que condiz com os dados da literatura relacionados à estrutura dessa organela no gênero estudado. Os resultados indicam que o protocolo de coloração foi eficiente para a visualização do amido intracelular da cepa de microalga estudada. Ajustes das condições de cultivo são necessários para identificar o momento inicial e a tendência do acúmulo de amido durante as fases de crescimento da microalga.

Termos para indexação: determinação qualitativa, pirenoide, lugol, alga.

¹ Graduanda em Ciências Biológicas, Universidade de Brasília, alice.vieira@colaborador.embrapa.br

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

³ Bióloga, doutora em Genética e Biologia Molecular, Embrapa Agroenergia, leticia.jungmann@embrapa.br

⁴ Biotecnologista, doutor em Tecnologias Químicas e Biológicas, Embrapa Agroenergia, hugo.santana@colaborador.embrapa.br

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

⁶ Bióloga, mestre em Desenvolvimento e Meio Ambiente, Embrapa Agroenergia, wyviane.vidal@embrapa.br



RESUMOS SIMPLES

**BIOTECNOLOGIA
INDUSTRIAL**

Biodegradação do organofosforado clorpirifós-metil por *Lactobacillus rhamnosus* GG

Bruno Cabral de Oliveira¹, Angélica Martiniano da Silva Dias², Dhara Vianna Spinola Coury³, Anna Paula de Souza Silva⁴, Jocimar de Souza⁵, Yoko Oshima-Franco⁶

Resumo

A utilização de microrganismos para a degradação de pesticidas vem sendo estudada há um tempo, o que demonstra a promissora aplicação de bactérias, fungos e leveduras para biorremediar ambientes contaminados. Além disso, essa técnica de biorremediação pode ser empregada em outros segmentos, como na produção de alimentos livres da contaminação por pesticidas, principalmente quando se pensa em microrganismos probióticos. Este estudo visa a avaliar e quantificar a diminuição da concentração do organofosforado (OF) clorpirifós-metil, a partir da biodegradação pela bactéria *Lactobacillus rhamnosus* GG. Para isso, foram realizados ensaios em três tempos (24 horas, 48 horas e 72 horas) de degradação em meio líquido sob agitação. As amostras foram purificadas e então o resíduo do organofosforado foi extraído para posteriores análises e quantificação, utilizando cromatografia a gás acoplada à espectrometria de massas (GC-MS), com a metodologia de análise SIM (*Single Ion Monitoring*), monitorando as massas (m/z) dos íons mais abundantes da molécula. Foi observada a degradação de pelo menos 88% da concentração inicial nas primeiras 24 horas, com decaimento significativo nos demais tempos, chegando a consumir um pouco mais de 95% em 48 horas, e cerca de 97% do OF em três dias de incubação. A bactéria se mostrou eficiente em degradar e resistir ao praguicida em uma concentração de 20 mg/L, comprovando sua aplicabilidade em descontaminar meios complexos, como o meio de cultura. Esses resultados trazem novas perspectivas para o uso de bactérias lácticas na diminuição da quantidade de agrotóxicos nos alimentos. É uma contribuição significativa para a saúde coletiva, tornando mais acessível o consumo de alimentos livres de pesticidas químicos.

Termos para indexação: *Lactobacillus rhamnosus* GG, organofosforado, biodegradação.

¹ Graduando em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, Universidade de Sorocaba, bruncab.ol@gmail.com

² Graduanda em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, Universidade de Sorocaba, angelicamartdias@gmail.com

³ Graduanda em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, Universidade de Sorocaba, dharavsc@outlook.com

⁴ Cientista de alimentos, doutora em Ciência e Tecnologia de Alimentos, pesquisadora de Tecnologia da IHARABRAS, annap.silva93@gmail.com

⁵ Biólogo, doutorando em Ciências Farmacêuticas, Universidade de Sorocaba, jocimar.souza@uniso.br

⁶ Farmacêutica, doutora em Farmacologia, Universidade de Sorocaba, yoko.franco@prof.uniso.br

Caracterização bioquímica de uma xilanase da família GH-10

André Rodrigues de Carvalho Júnior¹, Mateus Florentino Barbosa², Jéssica Bergmann Carvalho³, Betúlia Souto Moraes⁴, Eliane Ferreira Noronha⁵, Dasciana de Sousa Rodrigues⁶, Rodrigo Maurício Marinsek Sales⁷, Ananda de Oliveira Duarte⁸, Betania Ferraz Quirino⁹

Resumo

A biomassa vegetal é composta por celulose, hemicelulose e lignina, e pode ser desconstruída com enzimas de capacidade hidrolítica, para a geração de compostos de interesse industrial. Um exemplo de enzima hidrolítica são as xilanases da família GH-10, que quebram ligações liberando monômeros de açúcar e que podem ser aplicadas na produção de pães (modificação das arabinoxilanas na preparação da massa), de sucos de frutas e vegetais (aumento do rendimento e clarificação), de bebidas e alimentos fermentados (desestruturação do material lignocelulósico dos cereais e liberação de açúcares fermentáveis) e de óleos vegetais (redução da interação de fenóis hidrofílicos com polissacarídeos). O objetivo deste trabalho foi purificar e caracterizar uma xilanase proveniente de *Paenibacillus* sp., da Coleção de Microrganismos da Embrapa Agroenergia, produzida por meio de expressão heteróloga em *Escherichia coli* BL21 DE3. A expressão heteróloga foi feita pelo método de autoindução, utilizando-se o meio ZYM-5052 (crescimento a 37 °C, com agitação a 300 rpm). Para a purificação, foi utilizado o sobrenadante coletado após 2 dias de crescimento com uma coluna de afinidade carregada com níquel. A enzima purificada foi analisada em SDS-PAGE 12%. A quantidade de proteínas totais foi mensurada pelo método de BCA. A atividade enzimática foi determinada por meio da hidrólise da xilana e quantificação dos açúcares redutores liberados pelo método do DNS. Foi possível observar na eletroforese as bandas correspondentes à enzima purificada. O pH ótimo da enzima foi determinado utilizando tampão universal, no intervalo de pH de 4,0 a 8,0. A atividade em pH mostrou ação em uma ampla faixa, abrindo a possibilidade para uso da enzima em diversas indústrias.

Termos para indexação: purificação, bioquímica, xilanase.

¹ Biólogo, mestrando em Ciências Genômicas e Biotecnologia, Universidade Católica de Brasília, andrercj5@gmail.com

² Biomédico, mestrando em Biologia Microbiana, Universidade de Brasília, mateus.florentino@colaborador.embrapa.br.

³ Bióloga, doutora em Ciências Genômicas e Biotecnologia, Universidade Católica de Brasília, jessicabergmann@gmail.com

⁴ Bióloga, mestre em Biologia Molecular, Universidade de Brasília, Embrapa Agroenergia, betulia.souto@embrapa.br.

⁵ Bióloga, doutora em Biologia Molecular, Universidade de Brasília, enoronha@unb.br

⁶ Química industrial, doutora em Engenharia Química, Embrapa Agroenergia, dasciana.rodrigues@embrapa.br

⁷ Biólogo, mestrando em Ciências Genômicas e Biotecnologia, Universidade Católica de Brasília, rodrigo.sales@colaborador.embrapa.br.

⁸ Graduanda em Biotecnologia, Universidade de Brasília, ananda.duarte@colaborador.embrapa.br

⁹ Bióloga, doutora em Biologia Molecular e Celular, Embrapa Agroenergia, betania.quirino@embrapa.br

Caracterização da β -glicosidase Bgl08 de rúmen de caprino com potencial uso na indústria de alimentos

Rodrigo Mauricio Marinsek Sales¹, Betulia de Moraes Souto², Jessica Carvalho Bergmann³, Valquíria Alice Michalczecen Lacerda⁴, André Rodrigues de Carvalho Júnior⁵, Mateus Florentino Barbosa⁶, Betania Ferraz Quirino⁷

Resumo

O uso de enzimas na indústria pode trazer benefícios como qualidade, segurança, redução de resíduos químicos tóxicos e processos ambientalmente mais sustentáveis, entre outros. As β -glicosidases são enzimas que participam da degradação da biomassa lignocelulósica, o que as torna bem estudadas nessa área. Além disso, muitas β -glicosidases podem ser utilizadas na indústria de alimentos e bebidas em razão de sua capacidade de clivar glicosídeos ligados a moléculas que conferem sabor e aroma. A literatura científica conta com diversos artigos que demonstram o uso dessas enzimas para melhorar a qualidade na produção de vinhos, cervejas, chás, sucos, produtos à base de soja, entre outros. É importante que as novas enzimas descritas na literatura possam ser direcionadas para aplicações industriais. Este trabalho apresenta a caracterização inicial de uma β -glicosidase originária de uma triagem feita em uma biblioteca metagenômica do rúmen de caprino com potencial uso na indústria de alimentos. Um clone contendo o gene da enzima nomeada aqui de Bgl08 foi selecionado, seu gene foi amplificado por PCR e clonado no vetor pET21a(+). Esse plasmídeo foi introduzido em *Escherichia coli* BL21DE3, a proteína foi expressa e purificada. As purificações dessa enzima foram realizadas pelo método de afinidade com cauda de histidina, e o grau de pureza foi analisado em um gel de eletroforese de poli(acrilamida) (SDS-PAGE). Foram feitas caracterizações bioquímicas e cinéticas. Nos testes de atividade em diferentes substratos, a Bgl08 apresentou sua maior atividade específica (U/mg) em pNP β G (p-nitrophenyl- β -D- glucopyranoside), seguida de pNPX (p-nitrophenyl- β -D- xylopyranoside), salicilina, pNPGal (p-nitrophenyl- β -D- galactopyranoside), pNP α G (p-nitrophenyl- α -D-glucopyranoside). Ela não apresentou atividade em maltose, lactose e xilbiose. Esse fato mostra a capacidade da Bgl08 em quebrar a ligação de glicosídeos a compostos que possuem anéis aromáticos. Assim, pode ser uma boa candidata para a indústria de alimentos, na quebra de glicosídeos ligados a gliconas que liberam sabores e aromas.

Termos para indexação: β -glicosidases, indústria de alimentos, aromas, sabores.

¹ Biólogo, mestrando em Ciências Genômicas e Biotecnologia, Universidade Católica de Brasília, marinsekdg@gmail.com

² Bióloga, mestre em Biologia Molecular, Universidade de Brasília, Analista da Embrapa Agroenergia, betulia.souto@embrapa.br

³ Bióloga, doutora em Ciências Genômicas e Biotecnologia, Universidade Católica de Brasília, Bolsista DTI A da Embrapa Agroenergia, jessicacbergmann@gmail.com

⁴ Bióloga, doutora em Biologia Molecular, Universidade de Brasília, bolsista pós-doutorado pela FAPDF, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, valquiria.michalczecen@gmail.com

⁵ Biólogo, mestrando em Ciências Genômicas e Biotecnologia, Universidade Católica de Brasília, andrercj5@gmail.com

⁶ Biomédico, mestrando em Biologia Microbiana, Universidade de Brasília, mateus.florentino@colaborador.embrapa.br

⁷ Bióloga, doutora em Biologia Celular e Molecular, pesquisadora da Embrapa Agroenergia, betania.quirino@embrapa.br

Engenharia metabólica para a produção de etileno glicol por *Komagataella phaffii* a partir de hidrolisados de biomassa

Nathalia Aline Monteiro Torres¹, Túlio Marcos Godoy de Andrade², Tales Dumont de Sousa³, Lívia Teixeira Duarte-Brandão⁴, Diogo Keiji Nakai Débora Trichez⁵, Clara Vida Galvão Corrêa Carneiro⁶, Viviane Castelo Branco Reis⁷, João Ricardo Moreira de Almeida⁸

Resumo

O crescente interesse global pela busca de recursos renováveis é impulsionado pela escassez proveniente de matérias-primas de origem fóssil e por preocupações com sustentabilidade e emissões de gases do efeito estufa. A biomassa vegetal é uma opção alternativa, principalmente quando obtida a partir de resíduos agroindustriais. Os carboidratos presentes na composição da biomassa vegetal podem ser usados como matéria-prima em processos de fermentação, para produção de compostos químicos de base biológica. O etileno glicol (EG) é um composto orgânico amplamente empregado como matéria-prima na produção de tereftalato de polietileno (PET), fluidos anticongelantes, solventes, polímeros e resinas. Em nosso grupo de pesquisa, desenvolveu-se uma linhagem de *Komagataella phaffii* capaz de produzir EG a partir de uma via biossintética baseada na via de Dahms, em que ocorre uma clivagem aldolítica de 2-dihidro 3-deoxi xilonato (proveniente do hidrolisado de biomassa rico em xilose) em piruvato e glicolaldeído. Entretanto, observou-se que essa linhagem também foi capaz de oxidar glicolaldeído a ácido glicólico (AG) por meio de um aldeído desidrogenase (ALDH) endógena. Com base nos resultados já alcançados, esse trabalho tem como objetivo identificar e silenciar os genes selecionados que codificam ALDH e superexpressar aldeído reductase (ALDR), enzima que reduz glicolaldeído a EG em *K. phaffii*, visando à construção de linhagens robustas com maior produção de EG. Para isso, foram selecionados seis genes que por análise in silico apresentaram similaridades com ALDH e ALDR de outros microrganismos. Cassetes de deleção foram construídos baseados no sistema mazF. Até o momento das seis construções propostas com esse sistema, apenas uma linhagem com o silenciamento de ALDH putativa foi obtida, denominada *K. phaffii* Δ ALD6. Essa linhagem foi avaliada em cultivo com EG, AG e glicolaldeído como única fonte de carbono para verificar o efeito da deleção na formação de EG, uma vez que o gene ALD6 possivelmente estaria envolvido na conversão de glicolaldeído a AG. De acordo com os resultados do cultivo, a deleção do gene ALD6 não resultou no aumento da produção de EG com relação à linhagem controle (*K. phaffii* X-33), indicando que ele não está envolvido na conversão de glicolaldeído a AG.

Termos para indexação: *Komagataella phaffii*, engenharia metabólica, etileno glicol, hidrolisado de biomassa.

¹ Biotecnologista, mestranda em Microbiologia Aplicada, Universidade de Brasília, nathalia.torres@colaborador.embrapa.br

² Biotecnologista, mestrando em Microbiologia Aplicada, Universidade de Brasília, tulio.andrade@colaborador.embrapa.br

³ Graduando em Biotecnologia, Universidade de Brasília, tales.sousa@colaborador.embrapa.br

⁴ Farmacêutica, mestre em Ciências Farmacêuticas, Embrapa Agroenergia, livia.duarte@embrapa.br

⁵ Engenheiro de bioprocessos e biotecnologia, doutor em Ciências Mecânicas, Embrapa Agroenergia, diogo.nakai@embrapa.br

⁶ Bióloga, doutoranda em Microbiologia Aplicada, Universidade de Brasília, clara.vida@colaborador.embrapa.br

⁷ Odontóloga, doutora em Ciências Biológicas, Universidade de Brasília, viviane.reis@colaborador.embrapa.br

⁸ Biólogo, doutor em Microbiologia Aplicada, Embrapa Agroenergia, joao.almeida@embrapa.br

Recuperação do ácido xilônico obtido por fermentação com linhagem recombinante P1HL2 de *Komagataella phaffii*

Isabela Castro de Almeida¹, Fabricio Machado Silva², Diogo Keiji Nakai³, Silvia Belém Gonçalves⁴

Resumo

O ácido xilônico foi identificado como um dos 30 principais produtos químicos de valor agregado que pode ser obtido pelo uso de biomassa. A produção do ácido xilônico por ação microbiana tem se destacado por ser um processo seguro, ecológico e por ocorrer em condições moderadas de reação. Entretanto, após a produção do ácido xilônico por fermentação, são necessárias etapas de recuperação e purificação. O presente trabalho avaliou alguns parâmetros que influenciam na purificação do ácido xilônico. Em todos os estudos, utilizou-se o ácido xilônico obtido via fermentação com a linhagem recombinante P1HL2, de *Komagataella phaffii*. Avaliou-se a etapa de clarificação com carvão ativo seguida da filtração a vácuo. Observou-se que, quando essa etapa é realizada, ocorre uma adsorção do ácido xilônico pelo carvão ativo, levando a baixos percentuais de pureza (49,59%), e de recuperação (33,21%), comparados aos valores obtidos quando essa etapa não é feita (61,06% de pureza e 41,46% de recuperação). Outro parâmetro de estudo foi a razão entre o agente precipitante (etanol 99%) e o concentrado de ácido xilônico, em que foram feitos ensaios com razões: 3:1; 4:1; 5:1 e 6:1 (v/v). O ensaio com razão 3:1 (v/v) levou a uma pureza de $77,31 \pm 4,28\%$, valor estatisticamente igual aos ensaios com razão 4:1 ($73,05 \pm 4,61\%$) e 6:1 ($75,12 \pm 2,23\%$). Dessa forma, não é necessário um volume maior de EtOH na etapa de precipitação do ácido xilônico. Avaliou-se a concentração do ácido xilônico utilizado na purificação. Nos ensaios onde se utilizou ácido xilônico com concentração 447,80 g/L, obteve-se $74,38 \pm 7,77\%$ de pureza e $91,90 \pm 13,99\%$ de recuperação. Quando se utilizou ácido xilônico com concentração 279,80 g/L, obteve-se $49,22 \pm 8,67\%$ de pureza, e $53,31 \pm 9,88\%$ de recuperação. O estudo mostrou que a concentração é um parâmetro importante na purificação e recuperação do ácido xilônico. Quanto maior a concentração de ácido xilônico no produto da fermentação, mais próximo do ponto de precipitação, e conseqüentemente maior a recuperação do ácido xilônico, com uma pureza maior.

Termos para indexação: ácido xilônico, recuperação, purificação.

¹ Doutoranda em Química, Universidade de Brasília, isabela.almeida@colaborador.embrapa.br.

² Engenheiro químico, doutor em Engenharia Química, Universidade de Brasília, fmachado@unb.br

³ Engenheiro de bioprocessos e biotecnologia, Embrapa Agroenergia, diogo.nakai@embrapa.br

⁴ Engenheira química, doutora em Engenharia Química, Embrapa Agroenergia, silvia.belem@embrapa.br

Triagem funcional de β -glicosidases em bibliotecas metagenômicas e colônias isoladas do solo do Cerrado

Jessica Carvalho Bergmann¹, Luís Fernando Fernandes Marins², Betania Ferraz Quirino³

Resumo

β -glicosidases (BGLs) são uma classe de enzimas que hidrolisam ligações glicosídicas β -1,4 do resíduo terminal não redutor do β -D-glicosídeo, liberando glicose. Na indústria, essas enzimas são utilizadas com diferentes propósitos, como na produção de vinho e sucos, para melhorar sabor e aroma; em biorrefinarias, para a degradação de celulose; em medicamentos e suplementos alimentares, liberando compostos bioativos de glicosídeos encontrados em plantas, entre outras aplicações. Porém as β -glicosidases são inibidas pelo produto de sua própria ação catalítica, ou seja, a glicose. Uma alternativa atraente é gerar β -glicosidases mutantes por meio da engenharia enzimática, de forma a otimizar essas enzimas para que sejam tolerantes à glicose e, portanto, tenham maior aplicação industrial. O objetivo deste trabalho foi buscar clones de β -glicosidases com potencial biotecnológico em bibliotecas metagenômicas construídas a partir do solo da Amazônia, de rúmen de caprino e de comunidade microbiana degradadora de biomassa vegetal, e em colônias de bactérias isoladas do solo do Cerrado. As triagens funcionais para atividade de β -glicosidases foram realizadas plaqueando-se as bibliotecas e colônias em placas contendo citrato férrico e esculina. Clones que produzem β -glicosidase formam um halo preto, pois degradam a esculina formando esculina, que reage com o citrato férrico, formando um precipitado. Os clones positivos foram testados em pNPG (*p-nitrophenyl- β -D-glucoopyranoside*), que é um substrato derivado sintético da glicose e, portanto, mais específico. Foram triados aproximadamente 52.500 clones da biblioteca de solo da Amazônia; 34.500 clones da biblioteca de rúmen de caprino e 105.000 clones da biblioteca da comunidade degradadora de biomassa, e encontraram-se cinco clones com atividade de β -glicosidase. Os clones foram testados para atividade em pNPG, sendo que o clone proveniente da biblioteca de rúmen de caprino foi o único que apresentou atividade nesse substrato. Das 153 colônias isoladas do solo de Cerrado, quarenta e três apresentaram atividade de β -glicosidase em meio com esculina. Os microambientes degradadores de biomassa, como solo e rúmen de caprino, são boas fontes de enzimas β -glicosidases.

Termos para indexação: β -glicosidases, triagem funcional, bibliotecas metagenômicas.

¹ Bióloga, doutora em Ciência Genômicas e Biotecnologia, Universidade Católica de Brasília, jessica.bergmann@colaborador.embrapa.br

² Oceanólogo, doutor em Oceanografia Biológica, Universidade Federal do Rio Grande, dqmluf@furg.br

³ Bióloga, doutora em Biologia Molecular e Celular, Embrapa Agroenergia, betania.quirino@embrapa.br



RESUMOS SIMPLES

**QUÍMICA
RENOVÁVEL**

Extração com líquido pressurizado de compostos fenólicos da casca de semente de algodão

Miquéias Pereira da Silva¹, Raquel Bombarda Campanha², Sílvia Belém Gonçalves³, Fabrício Machado Silva⁴, Simone Mendonça⁵

Resumo

A extração com líquido pressurizado (PLE) tem se mostrado uma abordagem altamente eficaz para a recuperação de compostos, sendo notável tanto por sua eficiência quanto por sua contribuição para a sustentabilidade, por utilizar quantidade reduzida de solventes e menores tempos de extração. O presente estudo tem como propósito principal estabelecer parâmetros de processo significativos para a construção de um protótipo do equipamento de PLE em escala piloto, para produção de extrato rico em fenólicos a partir da casca do caroço de algodão (*Gossypium hirsutum* L.). Para isso, experimentos em equipamento de bancada ASE 350 a 180 °C foram realizados comparando amostras íntegras e moídas, diferentes solventes (etanol e água) e diferentes tempos de extração (de 1 minuto a 29 minutos). A eficiência da extração e a pureza dos fenólicos dos extratos produzidos foram determinadas pelo método de Teor de Fenóis Totais por Follin-Ciocalteau em microplaca. O diâmetro geométrico médio (DGM) obtido para a amostra íntegra foi de $2097,9 \pm 22,2$ μm , enquanto o da amostra moída foi de $1075,9 \pm 154,4$ μm . A média da quantidade de fenólicos extraídos por grama de amostra íntegra ($814,46 \pm 60,93$ $\mu\text{g/g}$) não se diferenciou de maneira significativa da média correspondente às amostras moídas ($851,92 \pm 122,48$ $\mu\text{g/g}$), bem como os períodos de extração, os quais não apresentaram diferenças significativas a partir do intervalo de 5 min, pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). Com a pureza, constatou-se uma redução significativa na quantidade de fenólicos a partir de 21 min. Essa diminuição sugere que períodos prolongados culminam na extração de compostos distintos dos fenólicos, afetando a seletividade do processo. Adicionalmente, a pureza dos fenólicos foi ampliada quando se efetuou a extração utilizando etanol 65% ($7,85 \pm 1,26$ μg fenólicos/mg extrato), em contraste com a extração realizada com água ($1,92 \pm 0,26$ μg fenólicos/mg extrato). Conclui-se que a especificidade do processo sofreu maior influência de certas variáveis estudadas (tipo de solvente e tempo de extração) que a eficiência da extração, e que não há ganhos na adoção de etapas preliminares de moagem da amostra.

Termos para indexação: PLE, fenólicos, fitoquímicos, resíduo agroindustrial.

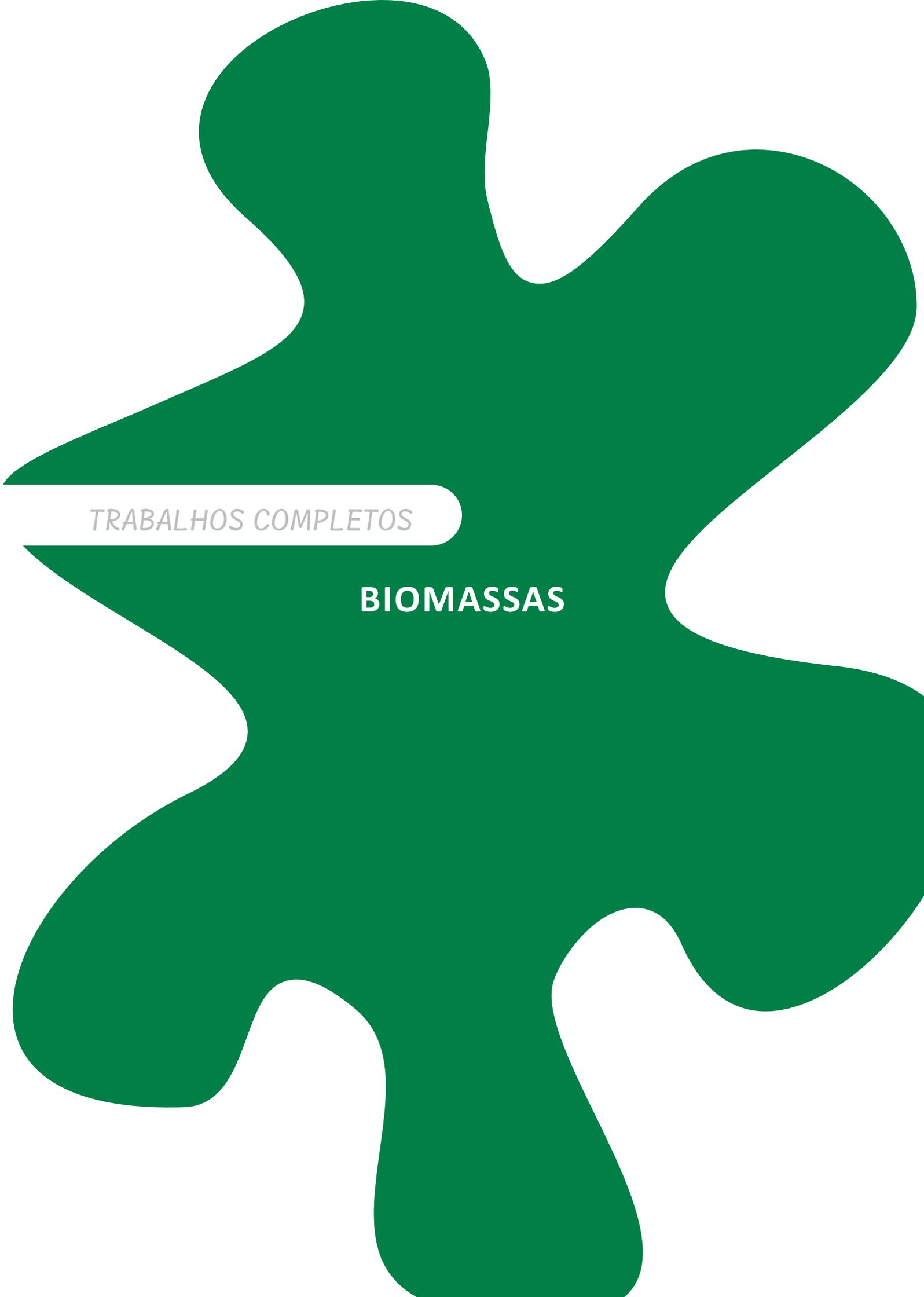
¹ Graduando em Engenharia Química, Universidade de Brasília, miqueias.silva@colaborador.embrapa.br

² Química, mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Embrapa Agroenergia, raquel.campanha@embrapa.br

³ Engenheira química, doutora em Engenharia Química, Embrapa Agroenergia, silvia.belem@embrapa.br

⁴ Engenheiro químico, doutor em Engenharia Química, Professor da Universidade de Brasília, fmachado@unb.br

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



TRABALHOS COMPLETOS

BIOMASSAS

Avaliação do uso de fertilizantes minerais no cultivo de *Chlorella sorokiniana*

Alessa Bembom Garcia¹, Luiz Fernando Roncaratti Júnior², Gabriela Cunha Possa³, Wellington Rangel dos Santos⁴, Lucio Scartezini Lopes⁵, Leticia Jungmann Cançado⁶

Resumo

O potencial das microalgas para realizar a fotossíntese e acumular grandes quantidades de lipídeos, além de vários outros compostos de alto valor agregado, tal como carotenoides e biopolímeros, as torna uma fonte promissora para fins biotecnológicos. Entretanto, o alto custo de produção de biomassa e os problemas relacionados à contaminação por outros microrganismos dificultam o escalonamento do cultivo, desafiando significativamente a comercialização dos bioprodutos gerados. Em estudos anteriores, nosso grupo de pesquisa propôs a formulação de um novo meio de cultivo, denominado *Blue Green Nitrogen Mix* (BGNIM), feito com fertilizante mineral, o qual tornou o cultivo de *Chlorella sorokiniana* 95% mais barato do que quando cultivado no meio padrão (*Blue Green 11*) BG11. O presente estudo tem como objetivo propor dois novos meios de cultivo, a partir da formulação inicialmente proposta para o meio BGNIM, também feitos à base de fertilizantes minerais. Os resultados obtidos demonstram que um dos meios propostos, BGNIM-Fetrilon, foi capaz de produzir mais biomassa de *C. sorokiniana* do que o meio padrão BG11. O outro meio proposto, BGNIM-CXK, produziu biomassa de forma similar ao BGNIM.

Termos para indexação: *Chlorella sorokiniana*, microalgas, meio de cultivo, fotobiorreatores automatizados.

Introdução

Por causa do aumento da população mundial e da melhoria dos padrões de vida, a demanda global por tecnologias inovadoras que auxiliem no aumento do rendimento da produção agrícola e reduzam os impactos ambientais está cada vez mais em alta (Gatamaneni Loganathan et al., 2020). Nesse contexto, as microalgas destacam-se como a nova fonte mais promissora de biomassa (Chisti, 2018), tanto pelo fato de poderem ser utilizadas como fonte de alimento, cosméticos e fármacos (Lee et al., 2017) quanto por poderem atuar na biorremediação de águas contaminadas, logrando gerar bioprodutos, como biofertilizantes e biocombustíveis (Saral et al., 2022).

O fato de o cultivo de microalgas possuir um pequeno ciclo de crescimento, quando comparado aos de culturas vegetais, não precisar de terra arável, não competindo, portanto, por terras, e apresentar, ao longo de todo o ano, uma produtividade dez vezes maior que vegetais superiores (Morocho-Jácome et al., 2020; Hu et al., 2008), confere a esses microrganismos uma grande vantagem para fins biotecnológicos. Além disso, as microalgas são capazes de sintetizar e acumular grandes quantidades de lipídio/óleo (de 20% a 50% do peso seco), possuem menos compostos estruturais, como lignina e celulose, e produzem diversos coprodutos ou subprodutos de alto valor agregado, como biopolímeros, pigmentos e fitormônios (Fontenelle et al., 2017).

¹ Biotecnologista, mestre em Ciências Biológicas, alessa.bembom@gmail.com

² Físico, doutor em Química, Universidade de Brasília, roncaratti@unb.br

³ Física, doutora em Física, Universidade de Brasília, possa@unb.br

⁴ Cientista da computação, mestre em Educação Física, Embrapa Agroenergia, wellington.santos@embrapa.br

⁵ Cientista da computação, Embrapa Agroenergia, lucio.scartezini@embrapa.br

⁶ Bióloga, doutora em Genética e Biologia Molecular, Embrapa Agroenergia, leticia.jungmann@embrapa.br

Entretanto, estima-se que de 50% a 65% do custo de produção de microalgas esteja relacionado aos processos de cultivo e colheitas (Chen et al., 2018), representando esses os principais gargalos para a viabilização do escalonamento das produções de microalgas de formas lucrativa e competitiva (Vandamme, 2013).

Estudos anteriores propuseram um meio de cultivo, chamado *Blue Green Nitrogen Mix* (BGNIM), capaz de reduzir o custo de produção de *Chlorella sorokiniana* em 95%, além de apresentar similaridade de produtividade algal, quando comparado com o meio de cultivo padrão BG11 (Ribeiro et al., 2020). Nesse meio, foi utilizado um coquetel de micronutrientes comercial, Rexolin-BRA, que, após a publicação do trabalho, teve sua comercialização descontinuada pelo fabricante e substituída por um coquetel de micronutrientes com composição distinta, denominado Rexolin-CXK. O objetivo deste trabalho consistiu em avaliar o desempenho da microalga *C. sorokiniana* em meios de cultura formulados com outros coquetéis de micronutrientes comumente disponíveis no mercado, comparando-os com o meio padrão BG11 e o BGNIM proposto.

Materiais e métodos

Cepa microalga

A microalga *C. sorokiniana* Embrapa_LBA#39, isolada na Fazenda Chapada Imperial (Brasília, DF) e identificada por Hadi et al. (2016), foi a cepa escolhida para os estudos comparativos em diferentes meios de cultivo. Tal linhagem compõe a Coleção de Microrganismos e Microalgas Aplicados a Agroenergia e Biorrefinarias (CMMAABio), da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa) (Brasília, DF) e é preservada segundo os protocolos descritos por Fernandes et al. (2019).

Meios de cultivo

Quatro meios de cultivo foram utilizados a fim de avaliar o perfil de crescimento da cepa *C. sorokiniana* Embrapa_LBA#39. O meio padrão utilizado foi o *Blue Green* 11 (BG11), produzido a partir de reagentes com grau analítico. Os demais meios foram o BGNIM BRA, descrito por Ribeiro et al. (2020), e suas variações BGNIM CXK e BGNIM Fetrilon, os quais possuem a mesma composição de macronutrientes: 510 mg/L de ureia, 35 mg/L de fosfato monoamônico (MAP), 75 mg/L de sulfato de magnésio hepta-hidratado e 40 mg/L de nitrato de cálcio; e a mesma concentração de micronutrientes: 100 mg/L, sendo os micronutrientes de cada meio fertilizantes comerciais de diferentes marcas: Rexolin-BRA, YaraTera, Brasil (produto descontinuado pela empresa); Rexolin-CXK, YaraTera, Brasil (substituto do Bra) e Fetrilon Comb 1, Compo Expert, Brasil; respectivamente.

Experimentos

A microalga *C. sorokiniana* Embrapa_LBA#39 foi cultivada nos fotobiorreatores automatizados descritos por Ribeiro et al. (2020), os quais são compostos, resumidamente, por três frascos de vidro Duran GL80 com volume de 1 L, sendo que cada um deles contém, individualmente, agitador magnético, painel de LED, sensores de luz, temperatura, pH e oxigênio dissolvido.

Foram conduzidos quatro experimentos distintos, um para cada meio de cultivo, tendo sido cada experimento realizado em triplicata, adotando-se as seguintes condições: fotoperíodo de 12 horas claro/12 horas escuro, temperatura de 24 ± 1 °C, aeração 2 L/min de ar atmosférico contendo 0,1% (v/v) de CO₂ (1.000 ppm). A concentração inicial dos inóculos foi em média 1×10^5 células/mL. O pH de todos os meios foi ajustado para 7,0. Os experimentos foram conduzidos por 21 dias, e os parâmetros foram monitorados a cada 1 hora.

Após o 21º dia, os cultivos de cada biorreator foram centrifugados separadamente a 10.000 x g por 5 min. O sobrenadante foi descartado, os pellets foram congelados utilizando-se

nitrogênio líquido e liofilizados por 48 horas para obtenção da biomassa seca. O conteúdo foi, em seguida, pesado com auxílio de uma balança de precisão, a fim de calcular a produção de biomassa algal em cada meio de cultivo.

Análise estatística

A análise estatística dos resultados obtidos foi feita por meio de análise de variância (ANOVA), seguida de teste de Tukey, utilizando-se o *software* GraphPad Prism® 4.0 (San Diego, CA, USA), sendo o nível de significância fixado em $p < 0,05$. Os dados foram apresentados em média \pm desvio padrão ($n = 3$).

Resultados e discussão

A linhagem de *C. sorokiniana* foi capaz de crescer em todos os meios de cultivos testados (Figura 1). Análises estatísticas, calculadas no 21º dia de experimento, evidenciaram que não houve diferença significativa no crescimento, em células/mL, de *C. sorokiniana* nos meios BRA e CXK, o que indica que o fertilizante Rexolin-CXK, mesmo apresentando porcentagens diferentes de compostos químicos, é um bom substituto para o Rexolin-BRA, o qual foi descontinuado pelo fabricante (Tabela 1). Tanto o crescimento em meio BG11 quanto em Fetrilon apresentaram diferenças significativas entre si e em relação aos demais meios. O meio Fetrilon apresentou maior crescimento.

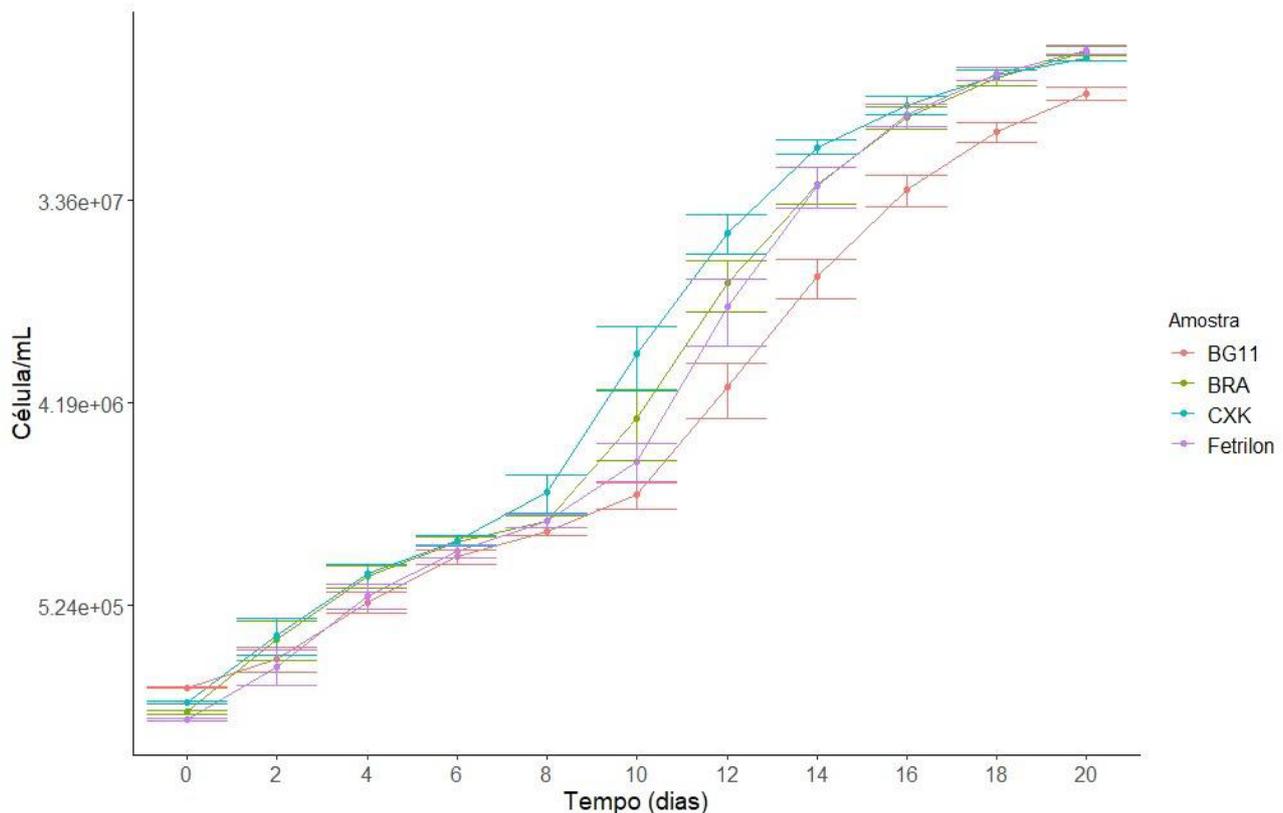


Figura 1. Curva de crescimento *Chlorella sorokiniana* em meios BG11, BRA, CXK e Fetrilon.

Em se tratando de produtividade de *C. sorokiniana*, as biomassas secas médias obtidas nos meios BG11, BRA, CXK e Fetrilon foram de 0,860 g; 0,588 g; 0,630 g e 1,030 g, respectivamente. Tais dados demonstram que a cepa de *C. sorokiniana* apresentou uma maior produtividade no Fetrilon, seguida do meio BG11. Análises estatísticas corroboram com os resultados obtidos no crescimento em células/mL, evidenciando diferença significativa na produtividade tanto no BG11 quanto no

Fetrilon em relação aos demais meios. Não houve diferença significativa entre a produtividade dos meios BRA e CXK (Figura 2).

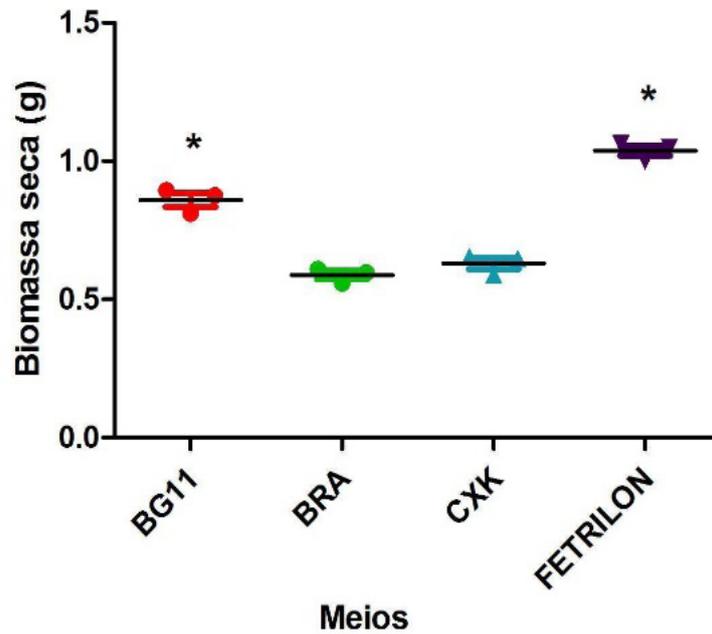


Figura 2. Produtividade algal, em g, obtida no 21º dia de cultivo de *Chlorella sorokiniana* em meios BG11, BRA, CXK e Fetrilon. * indica diferença significativa.

Os resultados relativos ao pH demonstraram que nos três tipos de BGNIM houve, nos primeiros dias de experimento, uma queda de pH, sendo a do meio BRA mais discreta (pH 5,5) e a do Fetrilon mais acentuada (pH 3,2). Após, em média, 10 dias de experimento, a faixa de pH neutro foi restabelecida (Figura 3).

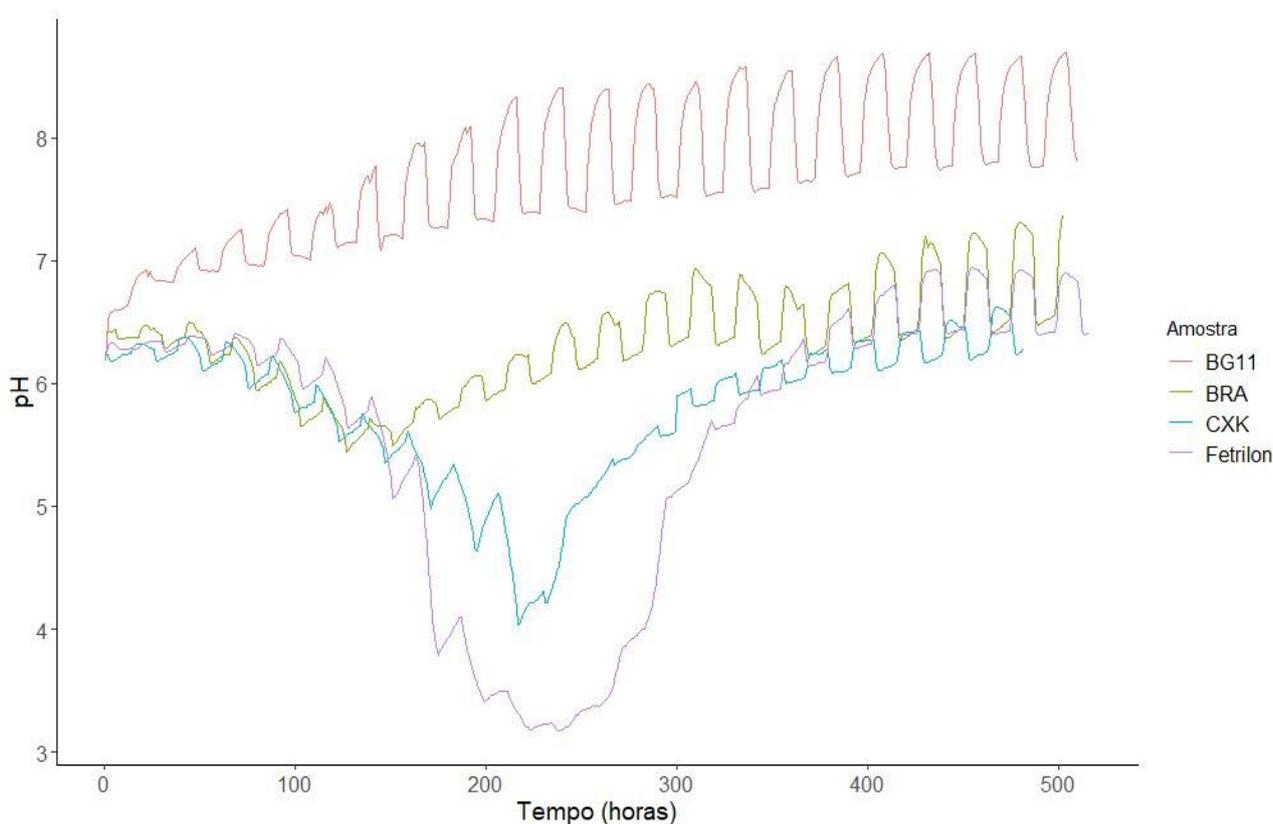


Figura 3. Dinâmica do pH ao longo de 21 dias de cultivo de *Chlorella sorokiniana* em meios BG11, BRA, CXK e Fetrilon.

Assim como em Ribeiro et al. (2020), a redução de pH momentânea não interferiu no crescimento de *C. sorokiniana*, o que sugere uma tolerância dessas microalgas em relação a variações no pH. Tal característica se mostra vantajosa, em se tratando do controle de qualidade em processos de larga escala, uma vez que muitos microrganismos que causam a contaminação do cultivo não resistem à acidificação do meio (Ashraf et al., 2011).

Por fim, os meios CXK e, principalmente, o Fetrilon se mostraram promissores para a viabilização da produção de biomassa de *C. sorokiniana* se tornar competitiva e lucrativa. Assim como o meio BRA (Ribeiro et al., 2020), tais meios são cerca de 95% mais baratos que o meio padrão BG11.

Conclusão

Neste estudo, foram propostos dois novos meios de cultivo, BGNIM CXK e BGNIM Fetrilon, com potencial significativo de reduzir o custo de produção de microalgas, além de esses meios terem sido comparados ao BG11 e ao BGNIM BRA, já descrito na literatura (Ribeiro et al., 2020). A produtividade de *C. sorokiniana*, em g, cultivada em BGNIM Fetrilon foi, inclusive, superior ao meio padrão BG11, amplamente utilizado. Já o BGNIM CXK apresentou produtividade semelhante ao meio BGNIM BRA. Mais estudos se mostram necessários, a fim de avaliar a existência de diferenças na composição bioquímica das biomassas coletadas.

Referências bibliográficas

ASHRAF, M.; JAVAID, M.; RASHID, T.; AYUB, M.; ZAFAR, A.; ALI, S.; NAEEM, M. Replacement of expensive pure nutritive media with low cost commercial fertilizers for mass culture of freshwater algae, *Chlorella vulgaris*. *International Journal of Agriculture & Biology*, v.13, p. 484–490, 2011.

- CHEN, J.; LI, J.; DONG, W.; ZHANG, X.; TYAGI, R. D.; DROGUI, P.; SURAMPALLI, R. Y. The potential of microalgae in biodiesel production. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 90, p. 336-346, 2018.
- CHISTI, Y. Biodiesel from microalgae beats bioethanol. **Trends in Biotechnology**, v. 26, n. 3, p. 126-131, 2008.
- FERNANDES, M. S.; CALSING, L. C. G.; NASCIMENTO, R. C.; SANTANA, H.; MORAIS, P. B.; DE CAPDEVILLE, G.; BRASIL, B. S. A. F. Customized cryopreservation protocols for chlorophytes based on cell morphology. **Algal Research**, v.38, 101402, 2019.
- FONTENELLE, M. R.; LIMA, C. E. P.; BONFIM, C. A.; ZANDONADI, D. B.; BRAGA, M. B.; PILON, L.; MACHADO, E. R.; RESENDE, F. V. **Biofertilizante Hortbio®**: propriedades agronômicas e instruções para o uso. Brasília, DF: Embrapa Hortaliças, 2017. (Embrapa Hortaliças. Circular Técnica, 162).
- GATAMANENI LOGANATHAN, B.; ORSAT, V.; LEFSRUD, M. Utilizing the microalgal biomass of *Chlorella variabilis* and *Scenedesmus obliquus* produced from the treatment of synthetic dairy wastewater as a biofertilizer. **Journal of Plant Nutrition**, v. 44, n. 10, p. 1486-1497, 2020.
- HADI, S. I. A.; SANTANA, H.; BRUNALE, P. P. M.; GOMES, T. G.; OLIVEIRA, M. D.; MATTHIENSEN, A.; OLIVEIRA, M. E. C.; SILVA, F. C. P.; BRASIL, B. S. A. F. DNA barcoding green microalgae isolated from Neotropical inland waters. **PLOS ONE**, v.11, n.2, e0149284, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0149284>.
- HU, Q.; SOMMERFELD, M.; JARVIS, E.; GHIRARDI, M.; POSEWITZ, M.; SEIBERT, M.; DARZINS, A. Microalgal triacylglycerols as feedstocks for biofuel production: perspectives and advances. **The Plant Journal**, v.54, n.4, p.621-639, 2008.
- LEE, S. Y.; CHO, J. M.; CHANG, Y. K.; OH, Y.-K. Cell disruption and lipid extraction for microalgal biorefineries: a review. **Bioresour. Technol.**, v. 244, pt. 2, p. 1317-1328, 2017.
- MOROCHO-JÁCOME, A. L.; RUSCINC, N.; MARTINEZ, R. M.; DE CARVALHO, J. C. M., SANTOS DE ALMEIDA, T.; ROSADO, C.; COSTA, J. G.; VELASCO, M. V. R.; BABY, A. R. (Bio)Technological aspects of microalgae pigments for cosmetics. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 104, n. 22, p. 9513-9522, 2020.
- RIBEIRO, D. M.; RONCARATTI, L. F.; POSSA, G. C.; GARCIA, L. C.; CANÇADO, L. J.; WILLIAMS, T. C. R.; DOS SANTOS ALVES FIGUEIREDO BRASIL, B. A low-cost approach for *Chlorella sorokiniana* production through combined use of urea, ammonia and nitrate based fertilizers. **Bioresour. Technol. Reports**, v. 9, 2020. Article 100354.
- SARAL, J. S.; AJMAL, R. S.; RANGANATHAN, P. Bioeconomy of hydrocarbon biorefinery processes. In: MAITY, S. K.; GAYEN, K.; BHOWMICK, T. K. (Ed.). **Hydrocarbon biorefinery**. [S.l.]: Elsevier, 2022. p. 335-385.
- VANDAMME, D. **Flocculation based harvesting processes for microalgae biomass production**. Dissertation (Bioscience Engineering) - Faculty of Bioscience Engineering, Kortrijk, Belgium, 2013.

Biomassa pirolisada como matriz para a produção de fertilizantes especiais

Jóisman Fachini¹, Ornelle Christiane Ngo Ndoung², Ludmila Raulino de Souza³, Ludmila Soares Peixoto⁴, Jéssica da Luz Costa⁵, Camila Rodrigues Costa⁶, Cícero Célio de Figueiredo⁷

Resumo

A pirólise tem se destacado como uma opção para viabilizar o uso agrícola de resíduos de difícil manejo, como o lodo de esgoto (LE). O produto sólido da pirólise do LE, denominado biochar de LE (BLE), é rico em carbono (C) e nutrientes e livre de contaminantes microbiológicos. No entanto, a baixa concentração de potássio (K) no LE é responsável pelo baixo teor desse nutriente no BLE. Nesse contexto, o enriquecimento do BLE com fontes de K é uma importante alternativa para tornar esse produto um fertilizante mais completo para as plantas e viabilizar sua utilização na agricultura. Este estudo teve por objetivo avaliar o desempenho de um fertilizante à base de BLE quanto à liberação de K e à sua classificação como fertilizante de liberação lenta de K. O BLE foi enriquecido com cloreto de potássio (KCl) (BBF-KCl) e, posteriormente, submetido ao processo de granulação. Os resultados do presente estudo demonstraram que enriquecer o BLE com K representa uma estratégia promissora para produzir fertilizantes de liberação lenta de nutrientes com perdas mínimas para o meio ambiente. O enriquecimento do BLE com K garantiu um teor de K_2O cerca de 75 vezes superior ao do BLE puro, além de apresentar uma liberação de K mais lenta quando comparado ao fertilizante mineral KCl, reduzindo a taxa de liberação em até 54%. Sendo assim, a produção do BBF-KCl se apresenta como uma alternativa com alto potencial para aumentar a eficiência do uso de K na agricultura, resolver o problema de baixo fornecimento de K via BLE puro, contribuir com o Plano Nacional de Fertilizante e diminuir a dependência do Brasil frente à importação de fertilizantes.

Termos para indexação: biochar de lodo de esgoto, fertilizante à base de biochar, potássio, fertilizante de liberação lenta.

Introdução

O biochar de LE (BLE) pertence ao grupo dos biochars que apresentam as mais altas concentrações dos principais nutrientes de plantas, em especial, o fósforo (P) (Yue et al., 2017). Dependendo das condições de pirólise, o BLE pode apresentar até 6% de P em sua composição, dando à pirólise grande potencial para transformar o LE em um produto com alto fornecimento de P para o solo (Figueiredo et al., 2021). Por outro lado, por causa da baixa concentração de potássio (K) no LE, o BLE apresenta baixos níveis desse nutriente, podendo limitar seu uso na agricultura (Fachini et al., 2021).

Biochars enriquecidos com fontes minerais e/ou orgânicas para a produção de fertilizante à base de biochar (BBF) vêm sendo pesquisados por diversos autores com o objetivo de equilibrar e viabilizar o fornecimento de nutrientes às plantas (Borges et al., 2020), além de atuar como

¹ Engenheira-agrônoma, doutora em Agronomia, Universidade de Brasília, joismanfachini@hotmail.com

² Agrônoma, mestranda em Agronomia, Universidade de Brasília, ornellechristiane@gmail.com

³ Graduanda em Agronomia, Universidade de Brasília, ludmilaraulino@gmail.com

⁴ Graduanda em Agronomia, Universidade de Brasília, lud.ludmila.mila@gmail.com

⁵ Graduanda em Agronomia, Universidade de Brasília, jessicadaluzcostta@gmail.com

⁶ Engenheira-agrônoma, doutora em Produção Vegetal, Universidade de Brasília, camilarodcosta@gmail.com

⁷ Agrônomo, doutor em Agronomia, Professor da Universidade de Brasília, cicerocef@unb.br

fertilizantes de liberação lenta por causa de algumas características do biochar, como alta porosidade e grande área de superfície (Schmidt et al., 2017).

Os BBFs são considerados produtos com baixa taxa de aplicação e alta eficiência quando utilizados como fertilizante, por sua capacidade em reduzir as perdas de nutrientes por lixiviação e contribuir para o aumento da absorção de nutrientes e produtividade das culturas (Borges et al., 2020). Além disso, a superfície dos biochars é caracterizada principalmente por grupos funcionais com potencial de gerar cargas negativas, contribuindo para uma maior sorção de cátions, como o K (Mukherjee et al., 2011). Dessa forma, enriquecer o BLE com K é uma alternativa interessante para produzir um fertilizante mais completo, com potencial para fornecer K às plantas de forma gradual e com maior eficiência, solucionando o baixo fornecimento desse nutriente proveniente da aplicação de BLE puro e minimizando as perdas de K de fontes altamente solúveis. Outra vantagem de produzir BBFs é que esses fertilizantes podem ser enriquecidos com nutrientes específicos e adaptados de acordo com as exigências da cultura (Farrar et al., 2018). Nesse contexto, o presente estudo buscou avaliar o efeito do enriquecimento do BLE com KCl nos teores de carbono (C), nitrogênio (N), P e K e na dinâmica de liberação de K de BBF na forma de grânulos.

Materiais e métodos

O BLE foi produzido a partir de amostras de LE coletadas na estação de tratamento de esgoto Melchior, pertencente à Companhia de Saneamento Ambiental de Brasília, DF, Brasil. A pirólise foi realizada em mufla (Linn ElektroTherm, Eschenfelden, Alemanha) com taxa média de aumento de temperatura de 2,5 °C/min e tempo de residência de 5 horas, conforme descrito em Figueiredo et al. (2021).

O BBF foi produzido a partir de uma mistura física de BLE, KCl e amido pré-gelatinizado (BBF-KCl). As matérias-primas foram misturadas para obter uma massa final de 1,0 kg. Considerando os valores de nitrogênio total (TN) e P_2O_5 em BLE, a concentração final de K no BBF foi fixada em 3%. Assim, foram adicionados 50 g de KCl para fornecer 3% de K_2O e, como aglutinante, também foram adicionados 65 g de amido pré-gelatinizado para produzir os grânulos. Como fonte de N e P, adicionou-se BLE para completar 1,0 kg da formulação. Para a granulação, o BLE e o KCl foram trituradas em equipamento industrial (Philco PLQ 1400), e posteriormente passados por peneira de malha 0,500 mm. Os grânulos do BBF (BLE + KCl + amido) foram produzidos em um granulador de laboratório. Durante a granulação, também foi adicionada água destilada por meio de aspersão sobre a matéria-prima para ativar o amido e iniciar o processo de formação dos grânulos.

O carbono total (CT) e o nitrogênio total (NT) foram determinados usando-se um analisador elementar (Euro EA3000 Elemental Analyser, Milão, Itália). A concentração de P foi determinada pelo método colorimétrico do ácido molibdovanadofosfórico (Brasil, 2017), e a concentração de K foi determinada por fotometria de chama (Brasil, 2017).

Para avaliar a dinâmica de liberação de K do BBF-KCl, um experimento de incubação foi realizado conforme descrito em Fachini et al. (2022). Amostras de 5 g de BBF-KCl e 0,25 g de KCl, para garantir um total de 1.245 mg kg^{-1} de K, foram acondicionadas em recipientes com malha de poliéster permeável < 0,5 mm, denominados de “sachês”. O ensaio foi realizado em sala de incubação equipada com controlador de temperatura e umidade. Foram avaliados os seguintes tratamentos, com três repetições: a) controle: apenas a areia de sílica sem adição de fertilizante; b) BBF-KCl granulado; c) KCl mineral. A incubação foi realizada a uma temperatura média de 25 °C, sendo avaliados os seguintes períodos: 12 horas e 1 dia, 2 dias, 3 dias, 4 dias, 5 dias, 10 dias, 20 dias e 30 dias após o início da incubação, totalizando 81 sachês em recipientes de plásticos

de 200 cm³ preenchidos com 100 g de sílica. Decorrido o período de incubação estabelecido para cada tratamento, os frascos foram retirados da sala de incubação separando-se o sachê da areia de sílica. Após o período de incubação, o teor de K disponível (extraído em Mehlich 1) foi determinado.

A taxa de liberação de K (%) durante o período de incubação foi calculada de acordo com a seguinte equação:

$$K \text{ liberado (\%)} = \left(\frac{Kt}{Kt0} \right) \times 100$$

em que, Kt = teor de K liberado durante o período de incubação (mg kg⁻¹ K); Kt0 = teor inicial total de K (mg kg⁻¹) adicionado ao sachê.

De acordo com os valores do coeficiente R² e do valor p (< 0,0001), o melhor modelo para representar os dados de liberação de K foi a equação exponencial de primeira ordem:

$$y = a(1 - b^x)$$

em que, y = liberação de K (%) e x = tempo de incubação (dias).

Resultados e discussão

Os teores de macronutrientes e carbono total (CT) dos BLE e BBF-KCl são apresentados na Tabela 1.

Tabela 1. Macronutrientes e carbono total (CT) do BLE e BBF-KCl.

Tratamento ^b	CT %	NT	P ₂ O ₅ ^a	K ₂ O ^a
BLE	27,1	4,3	5,5	0,04
BBF-KCl	25,0	3,0	5,3	3,00

^a: teor total. ^b: BLE: biochar de lodo de esgoto. BBF: fertilizante à base de biochar de lodo de esgoto.

Os teores de CT e NT do BBF-KCl foram 7,8% e 30,2% menores que os teores de CT e NT do BLE, respectivamente. A menor porcentagem de BLE na mistura total para a produção do BBF-KCl (88,5%) resultou em teores mais baixos de CT e NT quando comparado ao BLE puro, uma vez que a única fonte de C e N utilizada na produção do BBF-KCl foi BLE. O teor de P₂O₅ total do BBF-KCl ficou próximo ao teor de P₂O₅ do BLE. Para a produção do BBF-KCl, a única fonte utilizada para o fornecimento de P foi o BLE, representando uma boa opção de matéria-prima orgânica para o fornecimento de P para a produção de BBF.

De acordo com a porcentagem adicionada de KCl na produção do BBF, o BBF-KCl apresentou 3% de K₂O. O enriquecimento do BLE com K garantiu um aumento de 75 vezes no teor de K₂O do BBF-KCl em relação ao BLE puro (Tabela 1). Esses resultados comprovam a eficiência do enriquecimento do BLE com fontes de K para complementar o baixo suprimento de K ao usar o BLE puro.

A dinâmica de liberação de K do BBF-KCl e do KCl puro é mostrada na Figura 1. Para ambos os fertilizantes, o modelo exponencial de primeira ordem descreveu adequadamente o processo de

liberação de K com alta significância ($p < 0,0001$) e um valor de R^2 superior a 0,94. O fertilizante KCl apresentou rápida liberação de K, totalizando $1.078,4 \text{ mg kg}^{-1}$ (86,6%) de K liberado após o primeiro dia. Posteriormente, a liberação permaneceu constante até o final do processo de solubilização. Por outro lado, para BBF-KCl, até o quarto dia de incubação, a liberação foi somente de $501,4 \text{ mg kg}^{-1}$ de K e na fase final de incubação, aos 30 dias, somente 54% de K foi liberado, sugerindo que o BBF-KCl tem a capacidade de controlar a liberação de K.

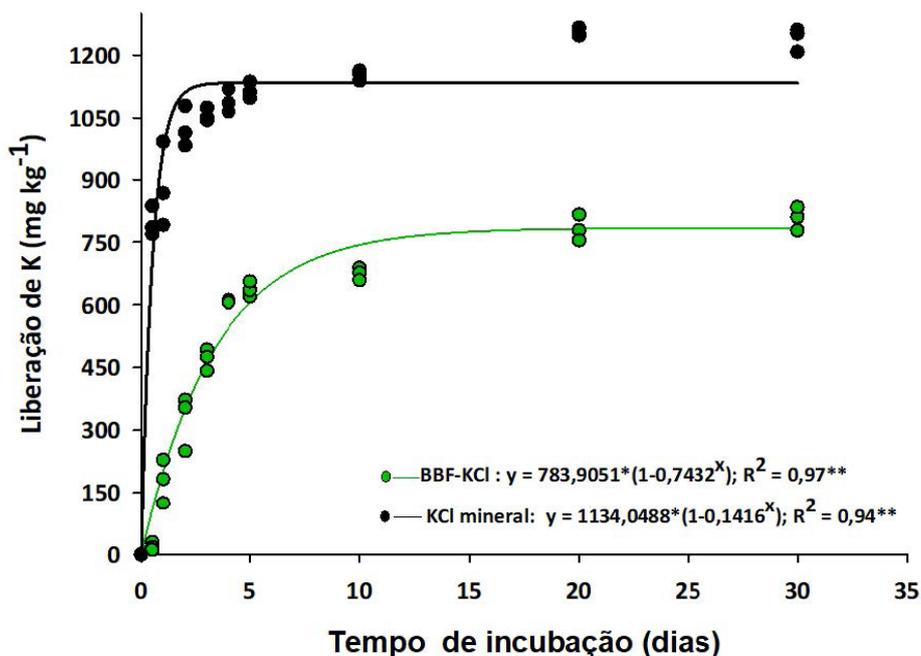


Figura 1. Liberação de K de fertilizante à base de biochar (BBF-KCl) e fertilizante mineral (KCl) ao longo do tempo.

Conclusão

Os resultados confirmam que o enriquecimento de biomassa pirolisada de lodo de esgoto com fonte mineral de K é uma alternativa promissora para a geração de novos fertilizantes à base de biochar. O enriquecimento aumentou o teor de K_2O em 75% comparado ao BLE puro. O BBF-KCl reduziu a liberação de K em 54% comparado ao fertilizante mineral KCl puro, demonstrando excelente desempenho de liberação lenta de K, o que contribui para reduzir a perda de K por lixiviação e aumentar a eficiência do uso do fertilizante. Além de solucionar o baixo teor de K via aplicação de BLE puro e contribuir para a reciclagem do LE na agricultura, este trabalho apresenta uma alternativa sustentável para a produção de novos fertilizantes à base de BLE.

Referências bibliográficas

- BORGES, B. M.; STRAUSS, M.; CAMELO, P. A.; SOHI, S. P.; FRANCO, H. C. Re-use of sugarcane residue as a novel biochar fertilizer: increased phosphorus use efficiency and plant yield. *Journal of Cleaner Production*, v. 262, 2020. Article 121406.
- BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. **Manual de métodos analíticos oficiais para fertilizantes e corretivos**. Brasília, DF, 2017.
- FACHINI, J.; COSER, T. R.; DE ARAUJO, A. S.; VALE, A. T. do; JINDO, K.; DE FIGUEIREDO, C. C. One year residual effect of sewage sludge biochar as a soil amendment for maize in a Brazilian oxisol. *Sustainability*, v. 13, n. 4, p. 1-14, 2021.
- FACHINI, J.; FIGUEIREDO, C. C. de; VALE, A. T. do. Assessing potassium release in natural silica sand from novel K-enriched sewage sludge biochar fertilizers. *Journal of Environmental Management*, v. 314, 2022. Article 115080.

- FARRAR, M. B.; WALLACE, H. M.; XU, C.-Y.; NGUYEN, T. T. N.; TAVAKKOLI, E.; JOSEPH, S.; BAI, S. H. Short-term effects of organo-mineral enriched biochar fertiliser on ginger yield and nutrient cycling. **Journal of Soils and Sediments**, v. 19, n. 2, p. 668-682, 2018.
- FIGUEIREDO, C. C. de; REIS, A. de S. P. J.; ARAUJO, A. S. de; BLUM, L. E. B.; SHAH, K.; PAZ-FERREIRO, J. Assessing the potential of sewage sludge-derived biochar as a novel phosphorus fertilizer: influence of extractant solutions and pyrolysis temperatures. **Waste Management**, v. 124, p. 144-153, 2021.
- MUKHERJEE, A.; ZIMMERMAN, A. R.; HARRIS, W. Surface chemistry variations among a series of laboratory-produced biochars. **Geoderma**, v. 163, n. 3-4, p. 247-255, 2011.
- SCHMIDT, H. P.; PANDIT, B. H.; CORNELISSEN, G.; KAMMANN, C. I. Biochar-based fertilization with liquid nutrient enrichment: 21 field trials covering 13 crop species in Nepal. **Land Degradation & Development**, v. 28, n. 8, p. 2324-2342, 2017.
- YUE, Y.; CUI, L.; LIN, Q.; LI, G.; ZHAO, X. Efficiency of sewage sludge biochar in improving urban soil properties and promoting grass growth. **Chemosphere**, v. 173, p. 551-556, 2017.

Impacto econômico-ambiental da produção de biogás para consumo próprio em estabelecimentos agropecuários de pequeno e médio porte

Rosana do Carmo Nascimento Guiducci¹, Priscila Seixas Sabaini², Jhenifer Aline Bastos³, Silvia Belém Gonçalves⁴, Itânia Pinheiro Soares⁵

Resumo

Com o objetivo de avaliar o impacto econômico e ambiental da adoção de biodigestor de pequena escala em uma propriedade familiar e em um cenário de adoção amplo, com foco em estabelecimentos agropecuários de pequeno e médio porte, foram utilizados dados primários da produção de biogás coletados em propriedade familiar localizada em Luziânia, GO, e um cenário de adoção composto por 50% dos estabelecimentos com efetivo entre dez e 100 cabeças de bovinos. A ferramenta RenovaCalc foi utilizada para calcular emissões de CO_{2eq} evitadas. Os resultados mostram o elevado potencial de impacto econômico (geração de renda anual equivalente a R\$ 1,45 bilhão pela substituição de gás liquefeito de petróleo (GLP) pelo biogás) e ambiental (emissão evitada de 595,2 mil t de CO_{2eq} por ano) no cenário de adoção proposto. Conclui-se que a adoção de biodigestores de menor escala pode ser uma solução tecnológica importante para ampliar a redução de emissões de gases de efeito estufa (GEE) e gerar renda e maior autonomia energética no meio rural.

Termos para indexação: bioenergia, bovinocultura, economia circular, agregação de valor.

Introdução

O Brasil possui o maior rebanho bovino do planeta, formado por 224,6 milhões de cabeças, em 2021, seguido pela Índia (193,2 milhões de cabeças), pela China (120,9 milhões), pelos Estados Unidos (93,8 milhões), pela Etiópia (65,7 milhões), pela Argentina (53,4 milhões) e pelo Paquistão (51,5 milhões de bovinos) (FAO, 2023).

O rebanho brasileiro está distribuído em todo o território nacional (Figura 1), sendo que 54,4% do efetivo bovino concentram-se em cinco estados: Mato Grosso, com 32,4 milhões de cabeças, respondendo por 14,4% do rebanho nacional; Goiás, com 24,3 milhões de cabeças (10,8% do rebanho nacional); Pará, com 23,9 milhões de cabeças (10,7% do rebanho); Minas Gerais, com 22,9 milhões de cabeças (10,2% do rebanho) e Mato Grosso do Sul, com rebanho de 18,6 milhões de cabeças (8,3%) (IBGE, 2021).

¹ Economista, doutora em Economia Aplicada, Embrapa Agroenergia, rosana.guiducci@embrapa.br

² Engenheira de Alimentos, mestre em Ciências de Alimentos, Embrapa Agroenergia, priscila.sabaini@embrapa.br

³ Engenheira Ambiental, doutoranda em Sustentabilidade Ambiental Urbana, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, jhenifer.bastos@colaborador.embrapa.br

⁴ Engenheira Química, doutora em Engenharia Química, Embrapa Agroenergia, silvia.belem@embrapa.br

⁵ Engenheira Química, doutora em Química Analítica, Embrapa Agroenergia, itania.soares@embrapa

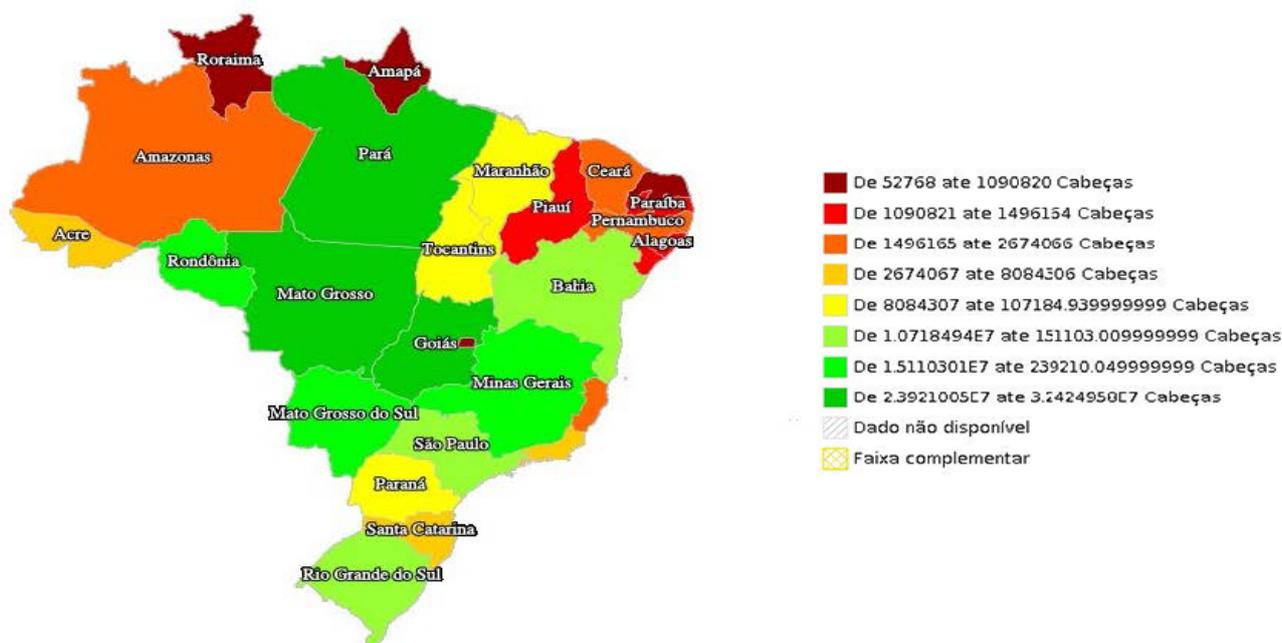


Figura 1. Distribuição geográfica do efetivo bovino no Brasil, em 2021, por número de cabeças.

Fonte: IBGE.

Analisando em termos de estabelecimentos agropecuários, dados do último Censo Agropecuário (IBGE, 2017) mostram elevada concentração de estabelecimentos de pequeno porte (de 0 até 100 cabeças de gado) (Figura 2). De um total de 1.860.519 estabelecimentos agropecuários com efetivo bovino no Brasil, 85% (1,56 milhão) são estabelecimentos com até 100 cabeças de bovinos. Esse contingente de produtores poderia se beneficiar da produção de biogás por meio do aproveitamento de dejetos da bovinocultura, caso houvesse disponibilidade no mercado de biodigestores adaptados para escalas menores de produção, voltada ao consumo próprio, com fins de autonomia energética e redução de custos nessas propriedades.

O biogás é um combustível gasoso, gerado pela decomposição da matéria orgânica, em um processo similar ao de compostagem. É composto basicamente por metano e gás carbônico, podendo ser utilizado com facilidade para geração de energia elétrica ou térmica em propriedades rurais. Tem como vantagem ser estocado com facilidade, garantindo estabilidade e controle da produção ao longo do tempo, ao contrário da energia solar e eólica.

A importância da produção do biogás em estabelecimentos rurais de pequeno e médio porte está relacionada à redução de custos com energia elétrica, substituição do gás liquefeito de petróleo (GLP) e produção própria de biofertilizante, além de impactos ambientais favoráveis frente ao elevado potencial de redução das emissões de gases de efeito estufa.

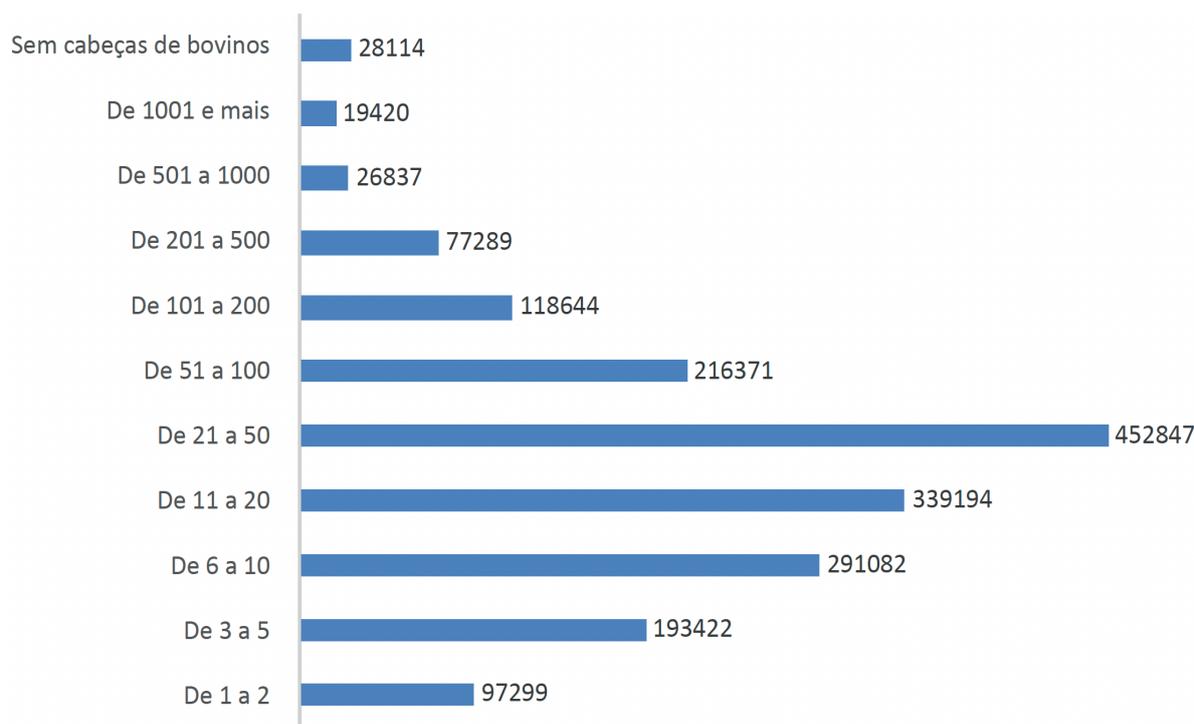


Figura 2. Estabelecimentos com bovinos no Brasil, por grupos de cabeças.

Fonte: Censo Agropecuário.

O objetivo deste trabalho é avaliar os impactos econômico e ambiental da adoção de biodigestor de pequena escala em uma propriedade familiar e avaliar esses impactos em um cenário de adoção amplo, com foco em estabelecimentos agropecuários de pequeno e médio porte.

Materiais e métodos

O impacto econômico foi medido tendo como referência a substituição do consumo mensal de dois botijões de gás GLP pelo biogás produzido na propriedade familiar. Foram levantados dados primários em uma propriedade rural localizada no município de Luziânia, GO, relativos aos coeficientes técnicos de produção do biogás. Calculou-se a produção mensal e anual medida em botijões de 13 kg, com fins de comparação ao gás GLP. É importante ressaltar que o biodigestor pode ser adaptado para produção de um a dois botijões mensais, a depender da necessidade do produtor. Para fins deste estudo, optou-se pela produção otimizada correspondente a dois botijões mensais.

Propôs-se um cenário de adoção do biodigestor em 50% dos estabelecimentos agropecuários com bovinocultura entre 10 e 100 cabeças, considerados como de produtores de pequeno e médio porte neste estudo.

Na avaliação do impacto ambiental utilizou-se a RenovaCalc, ferramenta oficial de cálculo da Política Nacional de Biocombustíveis (RenovaBio), para estimar a intensidade de carbono (IC) do biogás produzido. O cálculo da IC tem como base a avaliação de ciclo de vida atribucional, do berço ao túmulo, com alocação por critério energético. Os parâmetros técnicos da produção do biogás no cenário proposto foram agregados aos dados de inventário de ciclo de vida de processos de *background*, da base de dados Ecoinvent. As emissões de gases de efeito estufa (GEE) foram estimadas segundo o IPCC (2006). A somatória das emissões no processo de produção do biogás resulta na IC do biogás medido em $\text{g CO}_{2\text{eq}}/\text{MJ}$. A diferença entre a IC do biogás e a IC do gás GLP resulta em emissões evitadas – variável de referência para impacto ambiental neste estudo.

Resultados e discussão

A produção de biogás no estabelecimento rural se estabilizou após três meses de operação desde a implementação do biodigestor. Nesse período, houve necessidade de manutenção por causa de problemas operacionais no local. Verificou-se que os parâmetros operacionais do biodigestor devem estar estáveis, com teor de metano de no mínimo 50% para que o biogás possa ser considerado como alternativa para a substituição do gás de cozinha.

O volume de biogás consumido pelo produtor em Luziânia, GO, desconsiderando o período inicial de instabilidade na produção, foi de 28,5 m³ por mês. Sabendo-se que 1 m³ de biogás representa 0,45 kg de GLP, conforme sugerido por Silva et al. (2019), verificou-se que o produtor deixou de consumir cerca de 12,8 kg de GLP/mês, o que corresponde à produção mensal de uma unidade de botijão. Nessa propriedade, o biodigestor foi confeccionado com a capacidade de 4.000 litros. No entanto, é possível tratar o mesmo volume de dejetos e otimizar a produção para até dois botijões por mês, a depender do volume do biodigestor. Para uma produção otimizada, ao preço médio de R\$ 120,00 o botijão de 13 kg, tem-se receita equivalente a R\$ 240,00 por mês ou R\$ 2.880,00 por ano.

No cenário de adoção proposto neste estudo, os impactos econômico e ambiental da produção de biogás alcançam números expressivos, como são mostrados nas Tabelas 1 e 2, respectivamente. Nota-se que a substituição do consumo mensal de dois botijões de gás GLP pelo biogás em 50% dos estabelecimentos de 11 a 100 cabeças gera uma renda adicional ao produtor da ordem de R\$ 1,45 bilhão em um ano, sendo R\$ 488,44 milhões em estabelecimentos com 11 a 20 cabeças, R\$ 652,10 milhões em grupos de 21 a 50 cabeças e R\$ 311,57 milhões em grupos de estabelecimentos com 51 a 100 cabeças (Tabela 1).

Tabela 1. Impacto econômico da adoção do biodigestor, em estabelecimentos agropecuários, por grupo de cabeças de bovinos.

Grupo de cabeças de bovinos	Cenário de adoção (nº de estabelecimentos)	Produção anual em botijões de 13 kg	Valor da produção (R\$ milhões)
De 11 a 20	169.597,00	4.070.328	488,44
De 21 a 50	226.424	5.434.176	652,10
De 51 a 100	108.185	2.596.440	311,57
Total	504.206	12.100.944	1.452,11

O impacto ambiental dessa produção, considerando a categoria de impacto de mudanças climáticas, equivale a evitar a emissão de 595,2 mil toneladas de CO_{2eq} (Tabela 2). Desse total, 200,2 mil t CO_{2eq} (33,6%) são evitados no grupo de 11 a 20 cabeças, 267,2 mil t CO_{2eq} (44,9%), no grupo de 21 a 50 cabeças, e 127,7 mil t CO_{2eq} (21,5%), no grupo de 51 a 100 cabeças.

Tabela 2. Impacto ambiental da adoção do biodigestor, em estabelecimentos agropecuários, por grupo de cabeças de bovinos.

Grupo de cabeças	Produção anual em botijões de 13 kg	Emissão de t CO _{2eq} gás GLP (A)	Emissão de t CO _{2eq} biogás (B)	Emissões evitadas (t CO _{2eq}) C=(A-B)
De 11 a 20	4.070.328	209.024,35	8.828,20	200.196,14
De 21 a 50	5.434.176	279.062,30	11.786,28	267.276,02
De 51 a 100	2.596.440	133.335,49	5.631,46	127.704,03
Total	12.100.944	621.422,14	26.245,95	595.176,19

Para efeitos de comparação, Lacerda et al. (2009) relatam valores de fixação de CO₂ equivalentes entre 103,4 t ha⁻¹ e 689,3 t ha⁻¹ para as florestas tropicais nas Américas. Segundo os autores, os valores encontrados na literatura sobre fixação de carbono na forma de CO_{2eq} são muito variáveis. Trazendo essa informação para as emissões evitadas no cenário de adoção proposto neste estudo, da ordem de 595,2 mil t de CO_{2eq} por ano, a fixação de carbono equivaleria a uma área entre 863,45 e 5.756,06 de hectares de florestas tropicais.

Conclusão

Conclui-se que o sistema de biodigestor adaptado às condições de produção da bovinocultura de pequeno e médio porte tem potencial significativo de gerar renda e evitar a emissão de GEE. Se metade dos estabelecimentos agropecuários com 10 a 100 cabeças de bovinos produzirem biogás na escala analisada neste estudo, seria evitada a emissão de 595,2 mil t CO_{2eq}, o equivalente à fixação de carbono em uma área entre 863,45 e 5.756,06 de hectares de florestas tropicais. O impacto econômico, somente pela substituição do consumo mensal de dois botijões de gás GLP pelo biogás, é expressivo quando analisado em cenário de adoção amplo. Os números discutidos neste estudo revelam o grande potencial do Brasil, via inclusão social – um dos pilares da sustentabilidade – tendo em vista a quantidade de estabelecimentos agropecuários situados nos grupos que possuem entre 10 e 100 cabeças de bovinos. Para esse público, o acesso às tecnologias, capacitação e assistência técnica são condições *sine qua non* para a concretização desse potencial produtivo.

Acrescentam-se ainda ganhos em autonomia e segurança/disponibilidade pela geração própria, podendo gerar excedentes e outros produtos como biofertilizantes, ampliando ainda mais a geração de renda.

Conclui-se que o biodigestor de pequena escala pode contribuir para o desenvolvimento de uma economia local com fluxo financeiro e energético circular sustentável. Todavia, dependerá de esforços conjuntos das iniciativas privada e pública para tornar realidade esse potencial. De um lado, será necessário que a indústria produza biodigestores de pequena escala, eficientes e acessíveis aos produtores; de outro, será fundamental induzir a produção de biogás por esse segmento, por meio de políticas de crédito e assistência técnica.

Referências bibliográficas

- FAO. **FAOSTAT**: crops and livestock products. Disponível em: <https://www.fao.org/faostat/en/#data/QCL>. Acesso em: 3 ago. 2023.
- IBGE. **Censo Agropecuário, 2017**. 2017. Disponível em: <https://sidra.ibge.gov.br/pesquisa/censo-agropecuario/censo-agropecuario-2017/resultados-definitivos>. Acesso em: 2 ago. 2023.
- IBGE. **Pesquisa da Pecuária Municipal, 2021**. 2021. Disponível em: <https://sidra.ibge.gov.br/pesquisa/ppm/quadros/brasil/2021>. Acesso em: 3 ago. 2023.
- LACERDA, J. S.; COUTO, H. T. Z.; HIROTA, M. M.; PASISHNYK, N.; POLIZEL, J. L. Estimativa de biomassa e carbono em áreas restauradas com plantio de essências nativas. **METRVIM**, n. 5, nov/2009.
- SILVA, I. M. **Estudo da viabilidade da implantação de um biodigestor sertanejo no assentamento trangola em currais novos (RN)**. 2019. Tese (Doutorado) - Universidade Federal do Rio Grande do Norte.

Impactos do *Carbon Dot Krill A32* na produtividade de biomassa da microalga *Chlorella sorokiniana* (LBA#39)

Samuel Nunes Limberger¹, Letícia Araújo Silva², Alessa Garcia Bembom³, Marcelo Oliveira Rodrigues⁴, Letícia Jungmann Cançado⁵

Resumo

Há vários esforços para tornar o cultivo de microalgas economicamente viável. Isso porque esses organismos são fontes de diversas biomoléculas de valor econômico, como lipídios, proteínas e enzimas. Entretanto, há desafios na produção que dificultam a lucratividade da atividade. Alguns estudos indicam que tratamentos com *carbon quantum dots* podem incrementar a produtividade da biomassa microalgal produzida. Foram feitos três experimentos com diferentes concentrações do *Carbon Dot Krill A32*, que foram aplicadas em cultivos com a microalga *Chlorella sorokiniana* (LBA#39) para investigar os efeitos na produção de biomassa. Um teste inicial foi feito em biorreatores de 500 mL testando-se 500 µg/L e 500 ng/L da nanopartícula. O segundo foi uma varredura em um volume de 1,5 L em que as concentrações investigadas foram 10 mg/L; 1 mg/L; 500 µg/L; 100 µg/L; 10 µg/L; 1 µg/L e 500 ng/L da nanopartícula. O terceiro foi uma validação em reatores de 2 L utilizando concentrações de 100 µg/L e 10 µg/L da nanopartícula. Os resultados da curva de crescimento dos cultivos não apresentaram diferenças estatisticamente significativas. Para os resultados de biomassa seca, com o aumento do volume de cultivo, os incrementos foram progressivamente menores e estatisticamente iguais ao controle. Os resultados sugerem que nas condições estudadas não há incremento na produtividade da biomassa. São necessárias análises sobre a qualidade da biomassa para melhor interpretação do observado.

Termos para indexação: *carbon quantum dots*, microalgas, biomassa.

Introdução

A emergência climática está relacionada com o grande consumo de combustíveis fósseis, na medida em que o aumento das emissões de gases do efeito estufa, como o CO₂, acarreta o aumento da temperatura média global. Produtos com valor agregado ainda são muito dependentes de derivados de petróleo e fontes não renováveis. A procura por fontes alternativas e renováveis de insumos para a indústria é imperativa. Nesse aspecto, biomassa de microalgas pode ser uma interessante alternativa, já que as microalgas contêm uma grande variedade de substâncias de interesse com as mais diversas aplicações, como lipídeos, carboidratos, pigmentos, antioxidantes, enzimas e proteínas. Sendo assim, os microrganismos são considerados verdadeiras biorrefinarias, e podem prover moléculas complexas sem a necessidade de procedimentos sintéticos ineficientes e dispendiosos de energia e de reagentes (Enzing et al., 2014).

Entre os benefícios do uso de microalgas, pode-se dizer: 1) que as emissões de CO₂ podem ser parcialmente compensadas pela fotossíntese algal; 2) que não há competição com terra arável para

¹ Químico, mestrando em Química Inorgânica, Universidade de Brasília, samuel.n.limberger@gmail.com

² Graduanda em Química, Universidade de Brasília, leticiadearaujo07@gmail.com

³ Biotecnologista, mestre em Eletrofisiologia, Universidade de Brasília, alessa.bembom@gmail.com

⁴ Químico, doutor em Química, Universidade de Brasília, marcelo.rodrigues@nottingham.ac.uk

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

alimentos; 3) que microalgas podem ser cultivadas em estruturas verticalizadas, ocupando área inferior a culturas vegetais; e 4) que água potável pode ser preservada ao utilizar na cultura água salgada ou residual (Schenk et al., 2008).

Apesar das vantagens, alguns gargalos precisam ser recuperados na cultura de microalgas para viabilidade comercial. Cultivo, colheita e pós-tratamento de microalgas demandam muitos recursos financeiros. A literatura indica que o preço da biomassa algal varia entre 5 €/kg e 1 €/kg, mas para a viabilidade comercial. Portanto, preços abaixo de 1 €/kg devem ser obtidos (Fernández et al., 2019). Para a diminuir o custo da biomassa, aumentar a capacidade de produção e diminuir o impacto do preço dos nutrientes utilizados nos meios de cultivo, há um número crescente de estudos que indicam que o uso de pontos quânticos de carbono, *carbon quantum dots*, podem melhorar a qualidade e a produtividade da biomassa de microalgas (Zhang et al., 2018). Esse material unidimensional, de baixo custo, é fluorescente e pode realizar fenômenos de superfície com sais ou membranas. A interação desse tipo de material e desses microrganismos ainda precisa de muita elucidação. Não há um consenso sobre se o modo de atuação das partículas é causado pelas propriedades óticas ou por reações bioquímicas. Ainda também não há descrição das melhores maneiras de aplicação e de quais nanopartículas escolher.

A nanopartícula testada, o *Carbon Dot Krill A32*, foi desenvolvida em parceria com a Universidade de Brasília, a empresa Krilltech e a Embrapa. Essa tecnologia demonstrou resultados positivos em plantas, os ensaios atestaram aumento de eficiência na fotossíntese em cerca de 60%, aumento na eficiência do uso de água em 50% e aumento da massa radicular em 50% (Rodrigues et al., 2021). Para contribuir no entendimento da viabilidade de uso dessas partículas no cultivo de microalgas, no presente trabalho foram avaliados diferentes tratamentos com o *Carbon Dot Krill A32* em diferentes dosagens em uma microalga (*Chlorella sorokiniana* LBA#39) e foram avaliados os impactos na produtividade de biomassa.

Materiais e métodos

O preparo do pré-inóculo da microalga *C. sorokiniana* Embrapa (LBA#39) foi feito em condições estéreis, uma colônia isolada da microalga foi adicionada a um reator de 2 L com meio BG-11, que cresceu durante 14 dias com um fotoperíodo de 12 horas/12 horas e aeração de ar em um fluxo de 4 L/min antes de ser adicionada aos experimentos. O *Carbon Dot Krill A32* concentrado em solução foi fornecido pelo Laboratório de Inorgânica e Materiais da Universidade de Brasília em conjunto com a Empresa Krilltech. Foi feita uma solução diluindo-se 100 vezes as nanopartículas em água, que foi adicionada ao cultivo de acordo com a concentração desejada.

Para o experimento de teste inicial, aproximadamente 250 mL do inóculo da microalga LBA#39 em 4,25 L de meio BG-11 foram distribuídos para nove reatores de 500 mL, resultando em um volume de 500 mL por reator. O tratamento de cada concentração foi realizado em triplicata e foi feito um controle em triplicata. Foram escolhidas para os cultivos as concentrações de *carbon dots* 500 µg/L e 500 ng/L. Os reatores foram deixados sobre a aeração de 2 L/min de ar, sob um fotoperíodo de 12 horas/12 horas. O cultivo durou 21 dias.

Para o experimento de varredura de concentrações, foram adicionados aproximadamente 2 L de inóculo da microalga LBA#39 em 34 L de meio BG-11, que foram depois distribuídos em 24 reatores, resultando em um volume de 1,5 L por reator. O tratamento de cada concentração foi realizado em triplicata e foi feito um controle em triplicata. Foram escolhidas para os cultivos as seguintes concentrações de *carbon dots*: 10 mg/L; 1 mg/L; 500 µg/L; 100 µg/L; 10 µg/L; 1 µg/L e 500 ng/L. Os reatores foram deixados sobre a aeração de 4 L/min de ar, sob um fotoperíodo de 12 horas/12 horas. O cultivo durou 21 dias.

Para o experimento de validação, foram adicionados aproximadamente 500 mL de inóculo da microalga LBA#39 em 15,5 L de meio BG-11, que foram depois distribuídos em 16 reatores, resultando em um volume de 2 L por reator. Todos os testes, assim como o controle, foram conduzidos em quadruplicata. Foram escolhidas para os cultivos as concentrações de *carbon dots* 100 µg/L e 10 µg/L. Os reatores foram deixados sobre a aeração de 4 L/min de ar, sob um fotoperíodo de 12 horas/12 horas. O cultivo durou 21 dias.

Periodicamente, durante os experimentos, o crescimento da microalga foi acompanhado pela leitura de absorvância em espectrofotômetro a 750 nm por meio da amostragem de 200 µL de cada cultivo. Ao final de cada cultivo, a colheita foi realizada por centrifugação a 9.000 g por 5 minutos, seguida de liofilização para obtenção da biomassa seca, que foi pesada para obter os dados de produtividade.

Resultados e discussão

O crescimento da microalga nas condições estudadas pode ser visualizado nas curvas de crescimento retratadas na Figura 1.

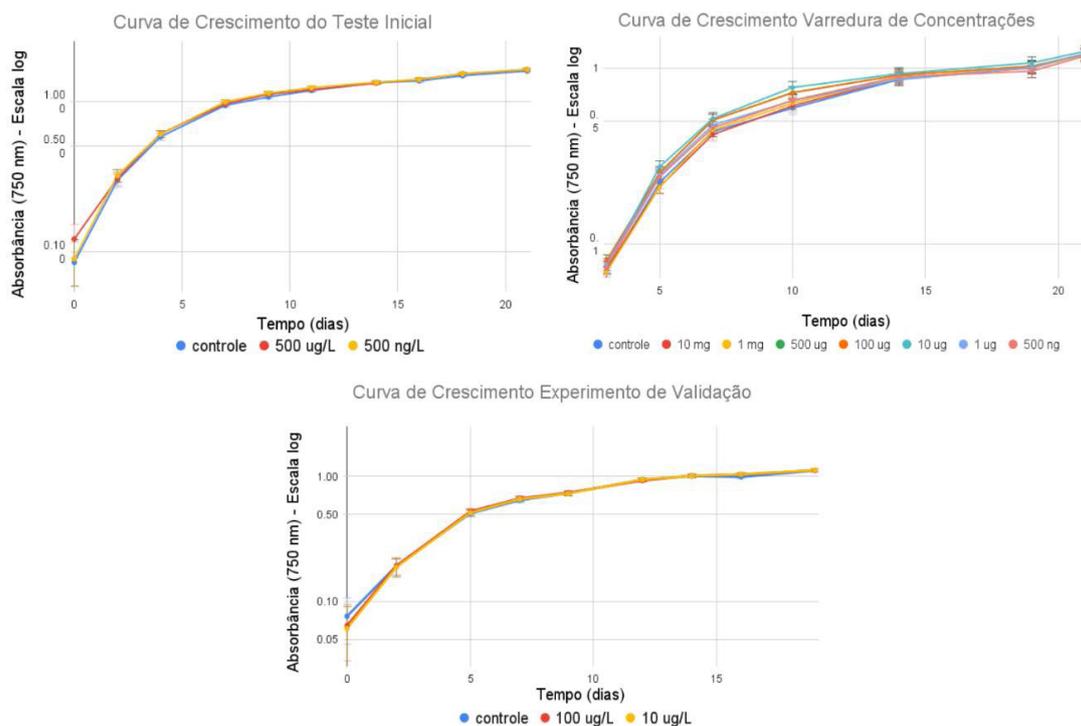


Figura 1. Curvas de crescimento da microalga *Chlorella sorokiniana* (LBA#39) com tratamento de *carbon dots* em diferentes concentrações nos diferentes experimentos.

Uma análise da Figura 1 indica que, independentemente do experimento, as absorvâncias obtidas são muito semelhantes, sendo quase impossível discernir uma curva de crescimento da outra. De fato, a Análise de Variância (ANOVA) com significância de 0,05 realizada entre as absorvâncias em qualquer um dos experimentos não mostra diferença estatisticamente significativa entre as condições estudadas em qualquer um dos experimentos. Isso sugere que os tratamentos não impactaram o crescimento do cultivo.

A produção da biomassa foi avaliada com base no peso seco de biomassa. Os dados de peso seco estão na Tabela 1, na Tabela 2 e na Tabela 3.

Tabela 1. Massas de peso seco de biomassa obtida no experimento de teste inicial (* indica tratamento estatisticamente distinto do controle).

	Controle	500 µg/L*	500 ng/L*
Média (g)	0,6275	0,7352*	0,7333*
Desvio Padrão (g)	0,0399	0,0209*	0,0475*

Tabela 2. Massas de peso seco de biomassa obtida no experimento de varredura de concentrações.

	Controle	10 mg/L	1 mg/L	500 µg/L	100 µg/L	10 µg/L	1 µg/L	500 ng/L
Média (g)	1,1458	1,1938	1,1505	1,2057	1,3182	1,3068	1,1700	1,1529
Desvio padrão (g)	0,0104	0,0762	0,0873	0,1339	0,0521	0,0567	0,0880	0,1568

Tabela 3. Massas de peso seco de biomassa obtida no experimento de validação.

	Controle	100 µg/L	10 µg/L
Média (g)	1,5051	1,5664	1,5638
Desvio padrão (g)	0,1048	0,0196	0,0840

No experimento de teste inicial, a ANOVA de uma via indicou que houve diferença estatisticamente significativa entre as médias [$F(2,6) = 7,973$; $p = 0,02$]. O teste post-hoc de Diferença Significativa das Médias de Tukey com significância de 0,05 indica que o controle é estatisticamente distinto do grupo que contém o tratamento de 500 µg/L e de 500 ng/L nos biorreatores de 500 mL. Esses resultados indicaram um incremento de biomassa nos tratamentos de aproximadamente 17%.

A partir dos dados promissores do primeiro experimento, foi feito o experimento de varredura de concentrações em um volume maior: 1,5 L. O teste de homogeneidade das variâncias indicou que não seria possível executar a ANOVA de uma via [$p = 0,03 < 0,05$]. Assim, foi realizada uma ANOVA de uma via com correção de Welch, que indicou que as médias são estatisticamente distintas [$F(7, 6,202) = 4,712$; $p = 0,037 < 0,05$]. Apesar disso, o teste post-hoc de Games-Howell com significância de 0,05 não conseguiu separar grupos estatisticamente distintos. Ou seja, a expectativa de que nas concentrações de 100 µg/L e 10 µg/L houvesse ocorrido cerca de 15% de incremento não se mostrou estatisticamente significativa.

Para confirmar esse resultado, um terceiro experimento de validação foi realizado, com mais replicatas e em volume maior ainda (2 L). O teste de homogeneidade das variâncias indicou que não seria possível executar a ANOVA de uma via [$p = 0,006 < 0,05$]. Assim, foi realizada uma ANOVA de uma via com correção de Welch, que indicou que as médias não são estatisticamente distintas [$F(2, 4,332) = 0,572$; $p = 0,602 > 0,05$]. Ou seja, apesar de os dados obtidos mostrarem aparente incremento na quantidade final de biomassa seca de aproximadamente 4%, em relação ao controle, a ANOVA mostrou que essa diferença não é estatisticamente significativa.

Conclusão

Os diferentes experimentos sugerem que o *Carbon Dot Krill A32* não impacta a produtividade de biomassa da microalga *Chlorella sorokiniana* (LBA#39) nas condições realizadas. O incremento no rendimento final de biomassa seca obtido no experimento inicial não foi confirmado nos experimentos de varredura de concentrações e de validação, o que demonstra a baixa reprodutibilidade

do incremento de biomassa com o tratamento do *Carbon Dot Krill A32* nos cultivos da microalga *C. sorokiniana*. Uma possível justificativa para esse fato foi o uso de volumes maiores de cultivo. Isso foi feito para diminuir os erros experimentais de pipetagem e de amostragem, que são mais representativos em volumes menores.

Se por um lado não houve incremento no rendimento final de biomassa nos experimentos realizados em volumes maiores, a quantidade de biomassa final obtida nessas condições permitirá a realização de ensaios de caracterização bioquímica dessas biomassas. Tratamentos com *carbon dots* podem também resultar em alteração na qualidade da biomassa por desempenharem um efeito bioquímico capaz de modular vias metabólicas distintas (Zhang et al., 2018). As próximas etapas do trabalho consistirão na avaliação dos teores de proteína, lipídios, carboidratos e carotenoides da microalga cultivada com Krill A32, bem como dos perfis lipídico, de carotenoides e de fitormônios. Somente após a conclusão dessas avaliações será possível determinar se a nanopartícula de carbono avaliada teve algum efeito sobre a qualidade das biomassas obtida nos cultivos, bem como a recomendação de avaliação dessas nanopartículas em processos de escalonamento do cultivo.

Referências bibliográficas

ENZING, C.; PLOEG, M.; BARBOSA, M.; SIJTSMA, L. **Microalgae-based products for the food and feed sector: an outlook for Europe**. Luxemburgo: Publications Office of the European Union, 2014.

FERNÁNDEZ, F. G. A.; SEVILLA, J. M. F.; GRIMA, E. M. Costs analysis of microalgae production. In: PANDEY, A.; CHANG, J.-S.; SOCCOL, C. R.; LEE, D.-J.; CHISTI, Y. **Biofuels from Algae**. Almería, Espanha: Elsevier, 2019. p. 551-566.

RODRIGUES, M. O.; FARIA, R. G.; SILVA, J.; SILVA, A. O.; BUSATO, G. B.; SOUZA, M. H.; RODRIGUES, C. V. S.; LIMA, C. E. P.; GUEDES, I. M. R.; BRAGA, M. B.; FONTENELLE, M. R. **Potencializador de fotossíntese baseados em nanopartículas híbridas de carbono, seu processo de obtenção e seu uso como nanobioestimulantes e nanofertilizantes em cultivos agrícolas**. Int. C01B 32/15. BR 102020002172-9 A2. 26 January 2021.

SCHENK, P. M.; THOMAS-HALL, S. R.; STEPHENS, E.; MARX, U. C.; MUSSGNUM, J. H.; POSTEN, C.; KRUSE, O.; HANKAMER, G. Second generation bio-fuels: high-efficiency microalgae for biodiesel production. **BioEnergy Research**, v. 1, n. 1, p. 20-43, 2008.

ZHANG, M.; WANG, H.; SONG, Y.; HUANG, H.; SHAO, M.; LIU, Y.; LI, H.; KANG, Z. Pristine carbon dots boost the growth of *Chlorella vulgaris* by enhancing photosynthesis. **ACS Applied Bio Materials**, v. 1, n. 3, p. 894-902, 2018.

Influência da iluminação e da aeração sobre o crescimento de *Chlorella sorokiniana* em meio BG11

Maria Eduarda Chaves Ribeiro¹, Alessa Bembom Garcia², Daniela Flavia Machado Turati³, Samuel Nunes Limberger⁴, Felipe Brandão de Paiva Carvalho⁵, Letícia Jungmann Cançado⁶

Resumo

Representando uns dos principais objetos de estudos atualmente, microalgas são, em geral, microrganismos fotossintetizantes altamente capazes de retirar CO₂ atmosférico e gerar biomassa rica em biomoléculas de interesse industrial e comercial. No entanto, para obtenção de altos valores de rendimento e produtividade, condições ideais de crescimento são muito importantes. Diante disso, o objetivo deste trabalho foi comparar a influência de biorreatores, ou modelos utilizados para o cultivo, sobre o crescimento e o rendimento de biomassa de *Chlorella sorokiniana* em meio BG11 e, também, verificar os resultados que o uso de diferentes luzes pode gerar. Para tanto, foram realizados dois experimentos não simultâneos em que, primeiramente, a cepa foi cultivada em dois módulos de cultivos diferentes: módulo novo (MN), com biorreatores e sistema de aeração novos da sala de microalgas; e módulo antigo (MA), utilizando Erlenmeyers, pipeta estéril para passagem de ar e outros componentes. Em um segundo momento, com o intuito de analisar quais luzes e combinações geram maiores crescimentos e, por conseguinte, maiores biomassas secas finais, as microalgas foram cultivadas sob três condições de iluminação diferentes: luz branca (B), luz branca + luz colorida (B+C) e luz colorida (C). Para os dois módulos, temperatura, aeração e pH também foram controlados. Ao longo e/ou ao final dos experimentos, análises de crescimento por meio de leitura por espectrofotometria, contagem de células, leitura de turbidez por OD manual e centrifugação e liofilização das biomassas, para saber o peso de massa seca final, foram feitas. Com isso, as análises e os testes mostraram rendimento de biomassa bem maior em MN em comparação com MA e maior crescimento dos cultivos crescidos sob luz B+C, havendo diferenças significativas em ambos os experimentos. Esses resultados permitiram demonstrar a maior eficiência dos novos módulos de cultivo de microalgas da Embrapa Agroenergia e quais luzes utilizadas geram maiores crescimentos, destacando-se também a importância de se ter condições de cultivo adequadas.

Termos para indexação: microalgas, módulos de cultivo, iluminação, biomassa.

Introdução

Em 2021, no Brasil, a estimativa de emissão de dióxido de carbono (CO₂) na atmosfera foi de mais de 488 milhões de toneladas por ano, com uma média per capita maior que duas toneladas (Ritchie; Roser; Rosado, 2020). Diante desse cenário de alta poluição, o uso de microalgas tem ganhado grande destaque por causa da alta eficiência de fixação de CO₂ por algumas linhagens. No entanto, Li (2013) destacam as dificuldades de utilização desses microrganismos, visto que eles dependem de condições ambientais, como luminosidade e aeração, adequadas que acabam elevando o custo de produção e que, quando não atendidas, diminuem a eficiência de fixação de gás e uso de recursos de crescimento.

¹ Graduanda em Biotecnologia, Universidade de Brasília, mariaeduarda12388@gmail.com

² Biotecnologista, mestre em Ciências Biológicas, Universidade de Brasília, alessa.bembom@gmail.com

³ Bióloga, mestre em Microbiologia Aplicada, Embrapa Agroenergia, daniturati@hotmail.com

⁴ Químico, mestrando em Química Inorgânica, Universidade de Brasília, samuel.n.limberger@gmail.com

⁵ Engenheiro de bioprocessos e biotecnologia, mestre em Tecnologias Químicas e Biológicas, Embrapa Agroenergia, felipe.carvalho@embrapa.br

⁶ Bióloga, doutora em Genética e Biologia Molecular, Embrapa Agroenergia, leticia.jungmann@embrapa.br

Por outro lado, quando a utilização de CO₂ e energia luminosa por microalgas é eficiente, esses seres são capazes de gerar biomassa altamente rica em nutrientes e moléculas de valor agregado, como ácidos graxos, proteínas, carotenoides, vitaminas e outras. Assim, nos últimos anos, além de enriquecer a indústria alimentícia, áreas como a de produção de biocombustíveis, cosméticos, medicamentos, biorremediação e biofertilizantes (Camacho; Macedo; Malcata, 2019) também têm sido beneficiadas e têm investido em mais estudos sobre esses organismos.

Sendo assim, este trabalho consiste em um estudo sobre como o ambiente de cultivo e como fatores, como a luz, podem influenciar no crescimento de microalgas e no rendimento de biomassa. Essas análises servirão como dados que influenciam na escolha de condições de cultivo em escala de bancada e planta-piloto.

Materiais e métodos

Crescimento em meio BG11

Para os experimentos, foi utilizado o meio Blue Green 11 (BG11) e a microalga *Chlorella sorokiniana* Embrapa_LBA#39 (acesso GenBank - KM061456.1) depositada na Coleção de Microrganismos e Microalgas Aplicados a Agroenergia e Biorrefinarias, da Embrapa (Brasília, DF). O inóculo foi retirado de cultivo-mãe mantido em crescimento em meio BG11 líquido em fotobiorreator, em temperatura e aeração constantes (22 °C e 0,4 L/min., respectivamente), e fotoperíodo de 12 horas/12 horas. Para o experimento 1, foram necessários 9.600 mL de meio BG11 e 400 mL de inóculo. Já para o experimento 2, 14.100 mL de meio e 900 mL de cultivo-mãe. O primeiro teve duração de 22 dias enquanto o segundo durou 21 dias.

Montagem dos experimentos

Comparação entre MN e MA (experimento 1)

Para comparação de produtividade entre MA e MN, 10 L de cultivo de LBA 39+BG11 foram distribuídos igualmente, 1 L para cada replicata, em cinco Erlenmeyers de MA e cinco modelos de biorreatores novos (frasco Duran GL80 de 1 L) de MN. Os cultivos de MA foram mantidos em crescimento sob luz branca (B) (lâmpada LED Tube 18W 865 T8 1850 Lúmens Glass, Philips) com fotoperíodo de 12 horas/12 horas e aeração por meio de bomba de aquário, e MN sob luzes branca (lâmpada LED GreenPower TLED W 20W MB 220-240V, 50/60Hz, Philips) e colorida (B+C) (C4 Green Power LED, C4 Biotecnologia), com fotoperíodo igual a MA, e aeração de 0,4 L/min. realizada por sistema de rotâmetros. Ambos foram mantidos na temperatura de 22 °C.

Comparação de luzes de MN (experimento 2)

Nesse experimento, apenas os biorreatores de MN foram utilizados a fim de verificar quais luzes utilizadas nos cultivos geram maior rendimento de biomassa. Para tanto, 15 L de cultivo de LBA 39+BG11 foram distribuídos igualmente entre 15 biorreatores Duran GL 80 de 1 L, todos sendo mantidos sob as mesmas condições de MN no experimento 1, exceto disposição de luz: quintuplicatas foram mantidas em crescimento sob luz B+C, outras cinco somente sob luz B e as demais somente sob luz colorida (C).

Análises de crescimento por espectrofotometria, OD manual e contagem biológica de células

As amostras dos experimentos foram analisadas em triplicata por meio de leitura, de 350 nm a 750 nm, no espectrofotômetro SpectraMax M2 da marca Molecular Devices, OD manual (*Chlorella*

vulgaris) modelo BEH100, marca BugLab e, exceto para o experimento 2, contagem biológica de células por microscopia eletrônica em Câmara de Neubauer e programa ImageJ, do National Institutes of Health (NIH), às segundas-feiras, quartas-feiras e sextas-feiras.

Coleta da biomassa

Após três semanas de experimento, os cultivos foram transferidos para tubos de 800 mL e centrifugados a 10.000 g por 5 min., com aceleração e desaceleração iguais a 9, e temperatura de 15 °C em centrífuga Hitachi. Ao término desse processo, os sobrenadantes foram descartados e os pellets de cada réplica foram lavados com água destilada, coletados e transferidos para tubos Falcon de 50 mL para então serem novamente centrifugados. Com os sobrenadantes tendo sido descartados outra vez, as biomassas restantes foram congeladas em nitrogênio líquido e submetidas à liofilização para obtenção da massa seca. Por fim, essas massas foram pesadas em balanças de precisão e armazenadas em freezer comum.

Testes estatísticos

Para ambos os experimentos, foram utilizados os programas Excel e BioEstat 5.0, sendo que para o primeiro foi feito teste T de Student, e, para o segundo, foram feitos ANOVA de um critério e teste de Tukey. O nível de significância fixado foi de $p < 0,05$.

Resultados e discussão

O crescimento de microalgas pode ser influenciado por diversos fatores, como temperatura, pH, disponibilidade de CO₂, luminosidade e outros. Diante disso, os resultados apresentados a seguir demonstram como a influência ambiental, seja pelo modelo em que diferentes módulos de cultivo foram montados e comparados seja por diferenças de luzes, pode gerar resultados heterogêneos no rendimento de biomassa.

Comparação por curvas de crescimento

Visivelmente, ou seja, sem uso de microscopia, espectrofotometria e outros equipamentos de análise, ao longo de 22 dias do experimento de comparação entre módulos, foi possível observar intensidades de coloração desiguais entre MA e MN, com o primeiro apresentando tonalidade muito mais clara que o segundo. Em contrapartida, isso não ocorreu com o segundo experimento, o que inicialmente poderia sugerir que as diferentes luzes e combinações não geraram muitas diferenças no crescimento da LBA 39 (Figura 1). Contudo, as curvas de crescimento e análises estatísticas de ambos mostraram haver diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os cultivos (Figura 2).



Figura 1. Diferenças visíveis de coloração nos cultivos de LBA 39.

A imagem à esquerda foi tirada no 18º dia do experimento e mostra branco, quintuplicatas de MN (verde-escuro) e quintuplicatas de MA (verde-claro). À direita, no 21º dia, é mostrada homogeneidade visual entre quintuplicatas tratadas com luz B, C+B e C, respectivamente. Todas as réplicas foram analisadas em triplicata.

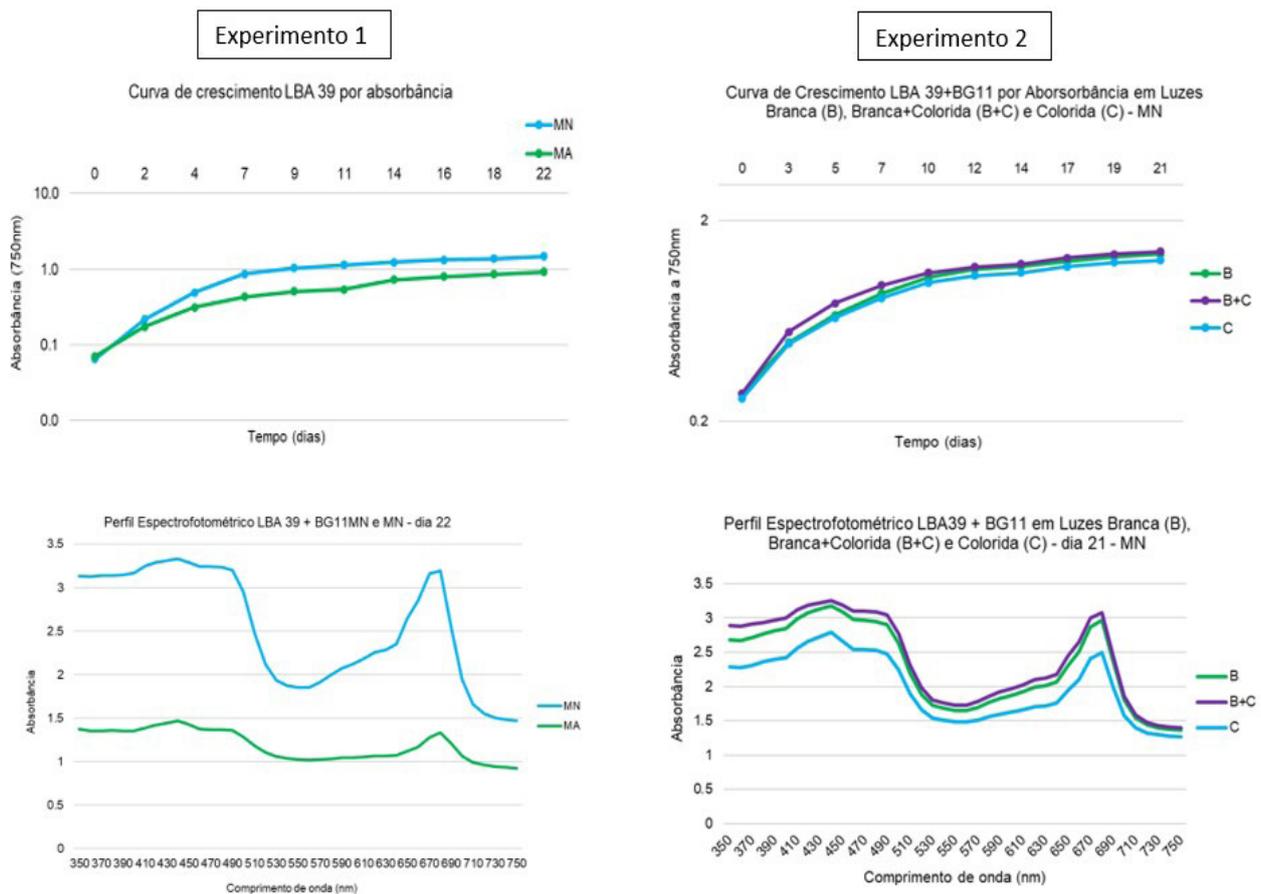


Figura 2. Curvas de crescimento de LBA 39 e perfil espectrofotométrico.

Curvas mostram médias de leitura de absorvância das replicatas totais do dia 0 ao final, com crescimento exponencial e início de fase de estabilização da curva. Curvas montadas a partir dos dados coletados por meio de OD manual e contagem de células também mostraram resultados similares, com correlações superiores a 0,8 de 1. Além disso, tanto no primeiro experimento quanto no segundo, perfil espectrofotométrico e picos nas curvas condizem com dados literários disponíveis sobre faixa de absorção de luz de principais pigmentos produzidos por microalgas, como clorofilas *a* e *b*, carotenoides, etc. Com isso, a partir do perfil observado no experimento 1, pode-se pensar que, ao propiciar o aumento do rendimento de biomassa, mais provável é que também exista maior presença de compostos de interesse associados a ela.

Rendimento de biomassa

À primeira vista, para o segundo experimento, era esperado que a luz C gerasse o maior impacto positivo no crescimento da cepa. No entanto, não foi isso que ocorreu. B sozinha gerou massa seca cerca de 10% maior que C, enquanto B+C de 20% a 30% maior que as médias de biomassa final das duas luzes quando utilizadas não combinadas. Enquanto isso, para o primeiro experimento, era esperado que a biomassa de MN fosse superior à de MA. Essa superioridade foi realmente observada (Figura 3). Valores de *p* mostraram diferenças significativas ($p < 0,05$) em cada comparação.

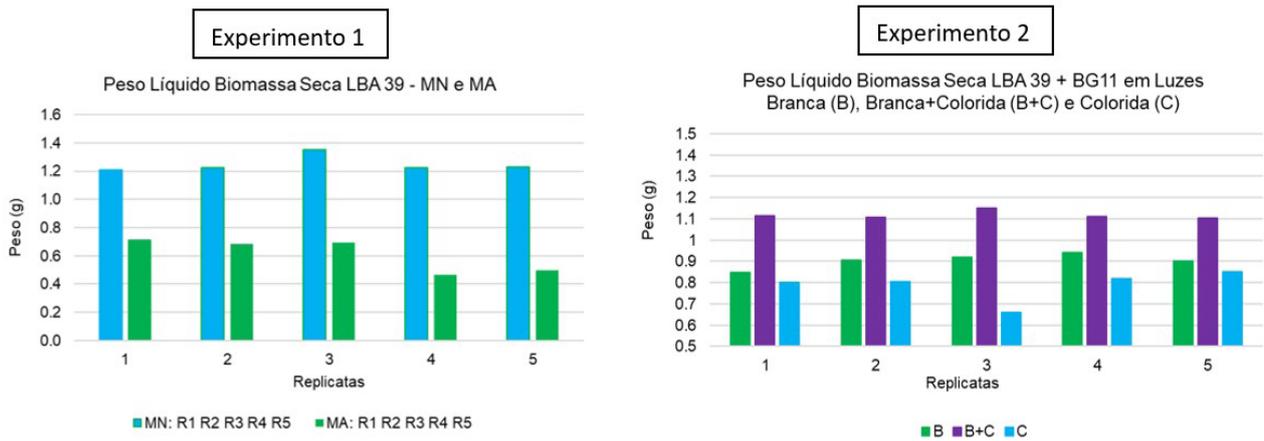


Figura 3. Biomassa seca final de LBA 39.

Conclusão

O crescimento das microalgas foi analisado em relação a diferentes condições de cultivo. Diante disso, os resultados apresentados demonstram a importância de avaliar como as condições ambientais, como a luz, podem influenciar no comportamento e no crescimento desses microrganismos. Assim, a partir deste estudo, também seria interessante avaliar como essas diferenças afetam a qualidade das biomassas geradas.

Referências bibliográficas

CAMACHO, F.; MACEDO, A.; MALCATA, F. Potential industrial applications and commercialization of microalgae in the functional food and feed industries: a short review. *Marine Drugs*, v. 17, n. 6, p. 312, 2019. DOI: 10.3390/md17060312 .

LI, S.; LUO, S.; GUO, R. Efficiency of CO₂ fixation by microalgae in a closed raceway pond. *Bioresource Technology*, v. 136, p. 267-272, 2013. DOI: 10.1016/j.biortech.2013.03.025

RITCHIE, H.; ROSER, M.; ROSADO, P. CO₂ and greenhouse gas emissions, 2020. Disponível em: <https://ourworldindata.org/co2-and-greenhouse-gas-emissions>. Acesso em: 01 ago. 2023.

Medição de qualidade de sementes de canola com visão computacional e aprendizado de máquina

Wellington Rangel dos Santos¹, Rosana Falcão²

Resumo

Produtos originados dos grãos da canola, como óleo, farinha e biodiesel, são diretamente afetados pela qualidade desses grãos. O uso da tecnologia tem contribuído para a identificação dos grãos impuros ou em estágios diferentes de maturidade. A visão computacional em conjunto com o aprendizado de máquina pode gerar ferramentas capazes de avaliar a qualidade das sementes de forma não invasiva, sem destruir amostras e com baixo custo, uma vez que utiliza imagens digitais como insumo. O presente estudo propõe o uso de visão computacional e aprendizado não supervisionado de máquina para análise de sementes de canola a partir de imagens digitais, com o objetivo de contar, identificar cada semente e calcular o percentual de grãos maduros. Os resultados mostraram que o método K-Means pode ser usado para contar e identificar sementes de canola em fotografias com alta precisão. Na amostra, foram identificadas noventa e três sementes maduras, quatro verdes e três secas.

Termos para indexação: Python, Google Colaboratory, sementes de canola.

Introdução

A canola é uma planta oleaginosa que produz pequenas sementes de onde é extraído um óleo com traços inferiores a 2% de ácido erúico e sem gordura trans. O processamento das sementes para produzir o óleo de cozinha e produtos alimentícios passa por processamento adicional de branqueamento (Gaber et al., 2018), e a biomassa, com alto valor proteico, pode ser destinada como torta para ração animal (<<https://www.canolacouncil.org/about-canola/oil/#fact-and-fiction>>). A canola também é usada como matéria-prima para combustíveis renováveis em diversas áreas de cultivo pelo Brasil (Tomm, 2007; Rocha et al., 2019; Silva, 2019). Fatores edafoclimáticos e fitossanitários afetam a qualidade das sementes, o que interfere na qualidade dos subprodutos: óleo de canola, farelo e farinha (Sabbahi et al., 2023). O uso de grãos uniformes e dentro do padrão sugerido pela Comissão Canadense de Grãos (Oilseeds Methods and Tests Used to Measure Quality – 2019, <<https://grainscanada.gc.ca/en/grain-research/export-quality/oilseeds/methods-tests.html>>) e dentro das Regras para análise de sementes (RAS) do Ministério da Agricultura e Pecuária (Mapa) (Brasil, 2009) visa a garantir a qualidade dos subprodutos da canola quando qualifica a densidade, o tamanho e o estágio de maturidade dos grãos com o objetivo de manter, ou até aumentar, a qualidade, visando a boa produtividade (Amaral et al., 2012).

Tecnologias emergentes geram ferramentas cada vez mais rápidas e precisas na tomada de decisão sobre a qualidade em lotes de sementes (Santana et al., 2022). Dentre essas tecnologias, duas se destacam: visão computacional e aprendizado de máquina. A visão computacional vem sendo utilizada em várias aplicações na agricultura já que análises em imagens reduzem custos e evitam manipulações diretas das amostras. Algumas bibliotecas de programação em visão computacional se destacam, como KerasCV (<https://github.com/keras-team/keras-cv>), PlantCV (<https://>

¹ Cientista da computação, analista da Embrapa Agroenergia, wellington.santos@embrapa.br

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

plantcv.readthedocs.io/) e OpenCV (<https://opencv.org/>). Esta última é a mais utilizada, com ampla documentação e código aberto. O aprendizado de máquina amplia as aplicações baseadas em visão computacional na medida em que a extração de informações em imagens pode ser submetida a algoritmos capazes de encontrar padrões, detectar anomalias, classificar objetos e manipular inúmeras variáveis ao mesmo tempo. Nesse campo, o algoritmo K-Means (MacQueen, 1967) é referência no aprendizado de máquina não supervisionado, ou seja, que não precisa de dados históricos. K-Means é uma técnica de agrupamento de dados por K-médias em que, inicialmente, os grupos são formados em torno de um centro aleatório. Em seguida, os pontos de dados são ajustados ao centro. A cada novo ponto, esse centro é revisado, até que a distância entre elementos do mesmo grupo seja minimizada e maximizada entre os grupos diferentes (Jin & Han, 2011). Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi avaliar se o método de agrupamentos (K-Means) pode ser capaz de contar, identificar cada semente de canola em uma fotografia e calcular o percentual de grãos maduros contribuindo com a verificação da qualidade da amostra.

Materiais e métodos

O material biológico foi coletado nos campos experimentais da Embrapa Agroenergia. As sementes foram derramadas sobre a régua perforada, coladas em papel adesivo transparente e esmagadas em folha plástica transparente. A imagem principal foi obtida por digitalização em Impressora Samsung C 406x no formato JPEG e resolução 300dpi. Em seguida, foi editada para ter fundo transparente e incluir sementes verdes e secas para obtermos uma heterogeneidade na imagem de teste (Figura 1).

O software foi programado usando a linguagem Python (3.10.12) com os seguintes pacotes: OpenCV (4.7.0.72), imutils (0.5.4), matplotlib (3.7.1), numpy (1.22.4), pandas (1.5.3), scikit-learn (1.2.2). O ambiente de programação foi o Google Colaboratory.

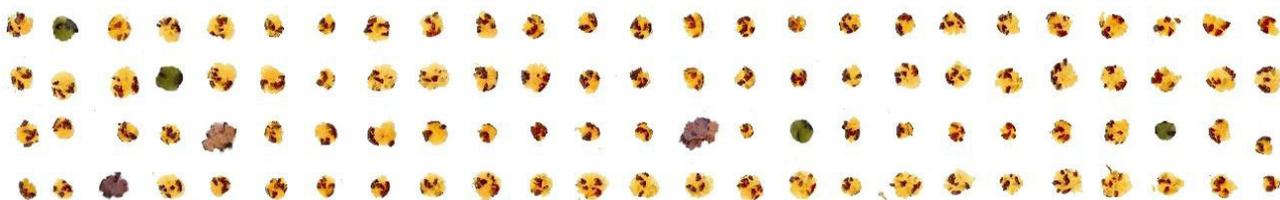


Figura 1. Imagem de teste com amostras de sementes de canola esmagadas.

Resultados e discussão

Segmentação, contagem e classificação das sementes

Um sistema especialista foi desenvolvido em duas etapas para, primeiro, extrair cada semente isoladamente da imagem de teste com o objetivo geral de contar sementes em uma imagem. Em seguida, comparar cada semente segmentada com as demais a partir de suas cores mais determinantes.

A ferramenta computacional que identifica e conta a quantidade de sementes presentes na imagem foi construída usando pacotes de softwares livres e, principalmente, a biblioteca OpenCV. Esse pacote foi escolhido por ser referência em visão computacional em sistemas código aberto, com vasta documentação, estável e de comunidade ativa na manutenção do código-fonte. A imagem de teste (Figura 1) foi, primeiramente, convertida para escala cinza com a função `cvtColor()` (Figura 2a), para, em seguida, ser convertida em uma imagem binária, isto é, reduzindo tons de

cinza em preto e branco. (Figura 2b). A partir das funções `getStructuringElement()` e `morphologyEx()` (Figura 2c), foram determinados quais os pixels relevantes e usados para fechar pequenos orifícios dentro dos objetos.

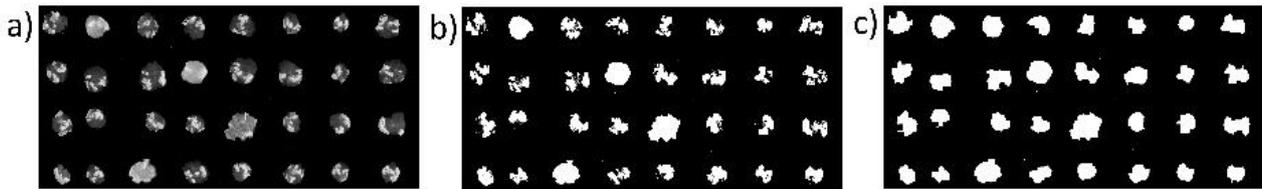


Figura 2. Imagem de teste após as primeiras etapas: (a) transformação em tons de cinza. (b) processo de binarização. (c) fechamento da imagem.

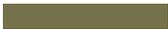
Com a imagem, agora simplificada, foi aplicada uma função `cvFindContours()` para encontrar todos os contornos existentes em uma imagem binária. Os contornos são as bordas externas de objetos presentes na imagem e são úteis em tarefas como detecção de bordas, reconhecimento de formas e contagem de objetos. O número de contornos encontrados se aproxima da quantidade de sementes presentes na imagem, exceto quando há pequenos objetos originados por ruídos na imagem. Nesse caso, foram descartados contornos com dimensões irrelevantes com o auxílio da função `boundingRect()`, que é usada para criar um retângulo aproximado em torno de uma área de interesse. Com isso, o número de sementes na imagem pode ser calculado. Adicionalmente, cada semente foi segmentada e exportada como um arquivo de imagem no formato PNG isoladamente. O tamanho médio resultante foi de 35 KB, com dimensões de, aproximadamente, 120 pixels x 110 pixels. Para a classificação das sementes, o algoritmo de agrupamento K-Means foi utilizado para destacar as dez principais cores de cada semente (Figura 3).



Figura 3. Três amostras de sementes e suas dez cores mais significativas.

O próximo passo foi calcular a média de cores de cada semente desconsiderando a cor branca. Essa cor foi comum a todas as amostras, mas com diferentes percentuais de ocorrência, podendo causar uma distorção na comparação entre sementes. Pelo padrão de cores RGB, cada cor é formada por três valores de Vermelho (R), Verde (G) e Azul (B) limitados de 0 a 255. Calculou-se a média de cada canal RGB separadamente, resultando em uma única cor para cada semente. O resultado dessa operação foi uma tabela com cada semente e sua cor determinante (Tabela 1).

Tabela 1. Exemplo de três sementes e sua média das cores mais determinantes.

Identificador da semente	Vermelho (R)	Verde (G)	Azul (B)	COR
1	176	123	60	
42	154	105	55	
50	180	124	60	

O último passo foi o agrupamento das sementes a partir da cor determinante obtida na etapa anterior. Para isso, novamente, foi aplicada a técnica de agrupamento K-Means agrupado em grupos de sementes mais semelhantes a partir de suas cores. A amostra de sementes foi separada em quatro agrupamentos (Figura 4) como produto do K-Means. Esse resultado demonstrou que houve diferenças entre os grupos.

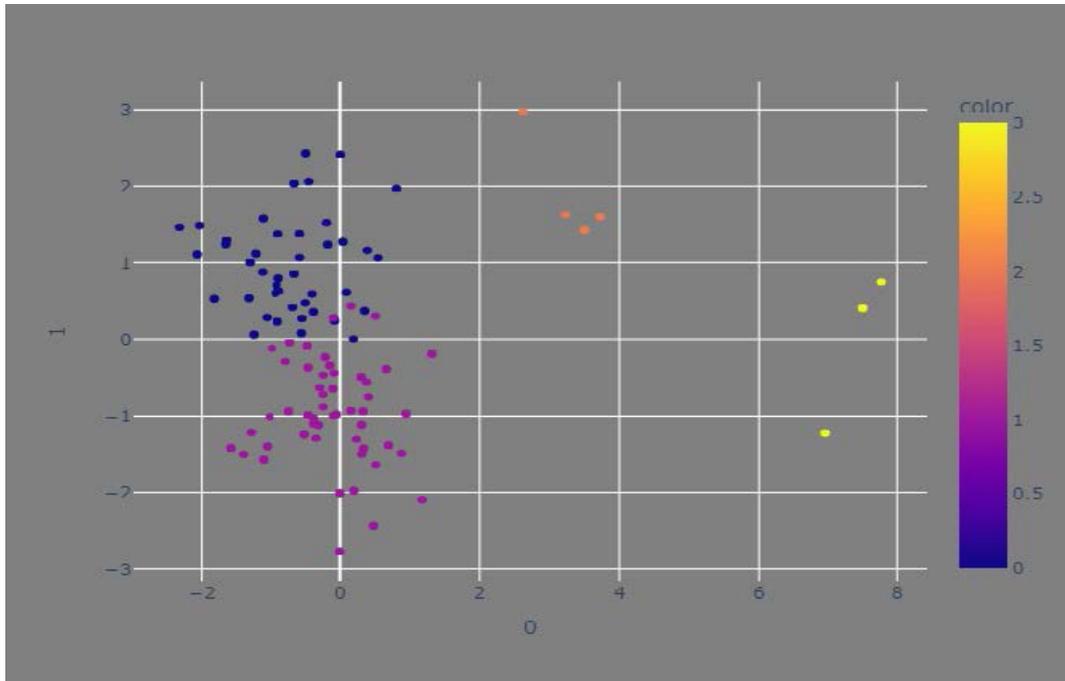


Figura 4. Gráfico de componentes principais (PCA) dos quatro agrupamentos de sementes.

No total, foram contadas 100 sementes. Dessas, três foram identificadas como do tipo “secas”; quatro, como do tipo “verdes”; e 93, “maduras” (Figura 5). Essas últimas foram distribuídas em dois agrupamentos indicando que houve diferenças na relação entre cores da casca e da polpa apesar de estarem no mesmo grau de maturidade.

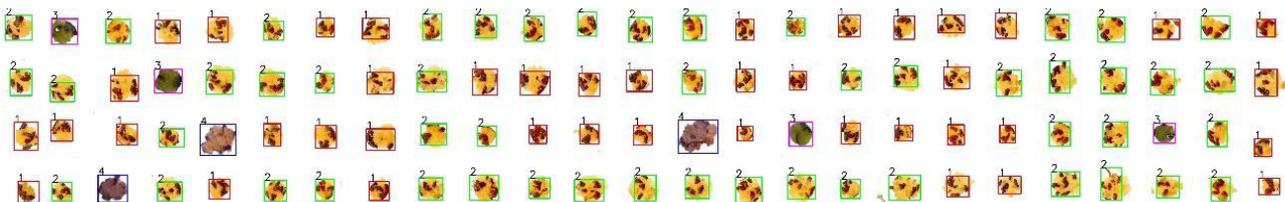


Figura 5. Imagem gerada pelo software com a identificação e classificação das sementes de acordo com os agrupamentos encontrados.

Considerando que as sementes maduras são as que podem apresentar maior produtividade, essa amostra contém 93% desse tipo de sementes. Essa ferramenta, embarcada em aparelhos celulares, pode auxiliar órgãos de controle de qualidade na inspeção de lotes de sementes comerciais. Produtores também podem se beneficiar, avaliando lotes de sementes no momento da aquisição e até mesmo antes do plantio. Na fase da colheita, as plantas estarão prontas para serem colhidas quando há mudanças de coloração dos grãos, do verde para a cor marrom (Embrapa, 2022). Assim, pode-se estender essa técnica para avaliar o ponto de maturação natural de grãos sem o esmagamento, tornando o processo não destrutivo, com menor custo e maior precisão. Finalmente, essa solução pode ser ampliada para inferir o percentual do teor de óleo e de proteínas de amostras de sementes esmagadas, avaliando não somente a cor da casca, mas também seu interior.

Conclusão

Esse resultado mostrou que o algoritmo K-Means associado a análises de cores em imagens pode ser aplicado para identificar sementes de tipos diferentes em uma fotografia digital. Foram contadas 100 sementes, com o percentual 93% maduras. Estudos posteriores serão necessários para medir o desempenho em amostras com sementes mais heterogêneas, com sementes sobrepostas e com imagens de menor qualidade.

Referências bibliográficas

- AMARAL, A. D. do; MEDEIROS, S. L. P.; MENEZES, N. L. de; LUZ, G. L. da; PIVOTO, D.; BIALOZOR, A. Qualidade de sementes de canola classificadas por densidade. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 34, n. 2, p. 302-309, 2012. DOI: 10.1590/S0101-31222012000200016.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. **Regras para análise de sementes**. Brasília, DF, 2009.
- EMBRAPA. **Mais canola**. 2022. Disponível em: <https://play.google.com/store/apps/details?id=com.embrapa.canola&pli=1>. Acesso em: 26/09/2023
- GABER, M. A. F. M.; TUJILLO, F. J.; MANSOUR, M. P.; JULIANO, P. Improving oil extraction from canola seeds by conventional and advanced methods. **Food Engineering Reviews**, v. 10, p. 198-210, 2018. DOI: 10.1007/s12393-018-9182-1.
- JIN, X.; HAN, J. K-means clustering. In: SAMMUT, C.; WEBB, G. I. (Ed.). **Encyclopedia of machine learning**. Boston: Springer, 2011. p. 563-564. DOI: 10.1007/978-0-387-30164-8_425.
- MACQUEEN, J. Some methods for classification and analysis of multivariate observations. In: BERKELEY SYMPOSIUM ON MATHEMATICAL STATISTICS AND PROBABILITY, 5., 1967, Berkeley CA. **Proceedings...** Berkeley, CA: University of California, 1967.
- ROCHA, L. de S.; GOMES, E. S.; CARNEIRO, A. de S.; FERREIRA, A. G. C.; COMBY, A. C. O.; CARVALHO, J. L. R. de; LAVIOLA, B. G.; SANTOS, A. dos; MARANA, J. C.; COSTA, L. T. da; RODRIGUES, E. V. Análise de trilha para produtividade de grãos em canola no Cerrado. In: CONGRESSO DA REDE BRASILEIRA DE TECNOLOGIA E INOVAÇÃO DE BIODIESEL, 7., 2019, Florianópolis. **Empreendedorismo e inovação: construindo um futuro competitivo para o biodiesel: anais**. Florianópolis, SC: Rede Brasileira de Tecnologia e Inovação de Biodiesel, 2019. p. 530-531.
- SABBAHI, R.; AZZAQUI, K.; RHAZI, L.; AYERDI-GOTOR, A.; AUSSENAC, T.; DEPEINT, F.; TALEB, M.; HAMMOUTI, B. Factors affecting the quality of canola grains and their implications for grain-based foods. **Foods**, v. 12, n. 11, 2023. 2219. DOI: 10.3390/foods12112219.
- SANTANA, D. C.; OLIVEIRA CUNHA, M. P. de; SANTOS, R. G. dos; COTRIM, M. F.; TEODORO, L. P. R.; SILVA JUNIOR, C. A. da; BAIO, F. H. R.; TEODORO, P. E. High-throughput phenotyping allows the selection of soybean genotypes for earliness and high grain yield. **Plant Methods**, v. 18, 2022. 13. DOI: 10.1186/s13007-022-00848-4.
- SILVA, R. J. da. **Qualidade de grãos de canola produzidos no cerrado mineiro**. 2019. Monografia (Graduação em Agronomia) - Universidade Federal de Uberlândia-MG.
- TOMM, G. O. **Indicativos tecnológicos para produção de canola no Rio Grande do Sul**. Passo Fundo: Embrapa Trigo, 2007. (Embrapa Trigo. Sistemas de Produção, 4).

Produção de biogás de efluente da indústria de óleo de palma

Jhenifer Aline Bastos¹, Felipe Orcelli Wojcieckowski², Rafael Moreira Marques³, Rossano Gambetta⁴, Silvia Gonçalves Belém⁵

Resumo

O efluente da indústria de óleo de palma (EIOP) tem ganhado destaque no meio científico como uma fonte de energia renovável para a produção de biogás. Nesse contexto, o objetivo do trabalho foi avaliar o desempenho de um reator de regime semicontínuo, utilizando o EIOP como substrato para a produção de biogás. Para isso, foi utilizado um reator de mistura completa com volume útil de 3,5 litros que recebeu diariamente uma carga orgânica volumétrica de 0,16 g SV/L.d de EIOP, operando em temperatura mesofílica (37 °C). Como principais resultados, a produção volumétrica de biogás foi de $0,037 \pm 0,015 L_N$ biogás/L reator/dia, com teor de metano entre 63% e 68% e média de remoção de DQO de 55,4%. Observou-se que o sistema de digestão não foi estável ao longo do ensaio por causa da característica de acidez do EIOP (pH = 4,8), que reduziu a alcalinidade total no reator. Apesar disso, o EIOP ainda tem potencial para produção de biogás, desde que seja feita a correção do pH, antes de ser adicionado no reator, ou a codigestão com outros resíduos que promovam o equilíbrio do sistema.

Termos para indexação: digestão anaeróbia, regime semicontínuo, metano.

Introdução

A extração de óleo de palma (dendê) é uma atividade de grande importância no País e vem crescendo ao longo dos últimos 20 anos. No Brasil, por volta de 236 mil hectares são utilizados para a plantação da palma, sendo o Pará o estado com maior área plantada (88%) no ano de 2018 (Ahmed et al., 2015). O processo de extração do óleo inclui várias etapas, que vão desde a esterilização dos cachos do fruto (dendê) até a clarificação e a purificação do óleo, para gerar como produto final o óleo de dendê encontrado no mercado (American Public Health Association, 2005).

Contudo, a produção industrial do óleo gera grande quantidade de efluentes que, se não tratados adequadamente, representam riscos ao meio ambiente. No caso específico, a cada tonelada de cachos de frutos frescos processado, são produzidos de 0,5 m³ a 0,79 m³ de efluente (Brasil, 2018). Como característica principal, esse efluente possui uma alta demanda química de oxigênio (DQO) até 50.000 mg/L, que deve ser reduzida por processos biológicos em sistemas de tratamento de efluentes (American Public Health Association, 2005). Entre os vários métodos de tratamento do efluente, a digestão anaeróbia é relativamente mais vantajosa por ter maior eficácia no tratamento e pela recuperação energética com o aproveitamento do biogás. O biogás é uma fonte de energia renovável, composto principalmente por metano e dióxido de carbono, e pode ser utilizado para gerar energia térmica, elétrica ou como combustível veicular (Choong et al., 2018).

¹ Engenheira ambiental, doutorando em Sustentabilidade Ambiental Urbana, Universidade Tecnológica, Federal do Paraná, jhenifer.bastos@colaborador.embrapa.br

² Graduado em Química Tecnológica, Universidade de Brasília, felipe.orcelli@colaborador.embrapa.br

³ Graduado em Química Tecnológica, Universidade de Brasília, rafael.marques@colaborador.embrapa.br

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

⁵ Engenheira química, doutora em Engenharia Química, Embrapa Agroenergia, silvia.belem@embrapa.br

Logo, o desenvolvimento de projetos que visam ao uso do efluente da indústria de óleo de palma para a produção de biogás vai ao encontro das premissas do desenvolvimento sustentável, que busca mitigar os impactos ambientais atuais e promover o desenvolvimento de métodos e tecnologias sustentáveis para a geração futura. Portanto, o objetivo do trabalho foi avaliar os parâmetros de monitoramento da monodigestão do efluente da indústria de óleo de palma, em reator anaeróbio de regime semicontínuo, para a produção de biogás.

Materiais e métodos

Caracterização do inóculo e substrato

O inóculo utilizado no presente estudo foi retirado de um reator anaeróbio próprio para ensaios de digestão anaeróbia, contendo 80% de digestato de biodigestor suíno e 20% de dejetos bruto bovino (m/m). O reator estava em operação há 200 dias, sendo mantido em temperatura mesofílica (37 °C) e agitação intermitente. Para garantir a atividade microbiológica, o inóculo recebeu uma alimentação semanal com carga orgânica volumétrica de 0,16 g sólidos voláteis/Litro de reator/dia, contendo fubá de milho (10%), proteína de soja (4%), óleo vegetal (3%) e água destilada (83%).

Já o efluente da indústria de óleo de palma (EIOP) foi coletado de uma indústria localizada na região Nordeste do Brasil. O ponto de coleta foi da lagoa de equalização que recebe a água residuária do processo de clarificação do óleo, da esterilização dos cachos do fruto fresco e do processo de decapagem dos cachos e digestão do óleo. O armazenamento foi feito em bombonas de plástico, que foram mantidas em câmara fria a -20 °C para evitar a degradação do substrato por microrganismos.

O inóculo e o substrato foram caracterizados para quantificar o teor de sólidos totais (ST), sólidos voláteis (SV), pH e demanda química de oxigênio (DQO), de acordo com a metodologia descrita no American Public Health Association (2005).

Monitoramento e produção de biogás em reatores de regime semicontínuo

Para avaliar a produção de biogás utilizando o EIOP como substrato, optou-se pelo uso de um reator de mistura completa (Marca Eppendorf) com volume útil de 3,5 L, agitação constante (100 rpm) e temperatura mesofílica (37 °C). Para a alimentação do reator com EIOP, foi calculada uma carga orgânica volumétrica (COV) de 0,16 g SV/L.d, sendo adicionada água destilada para garantir o tempo de retenção hidráulica de 120 dias e uma vazão de entrada de 29 mL por dia. A escolha da COV abaixo do valor reportado pela literatura (mínimo de 0,5 g SV/L.d) (Choong et al., 2018), foi feita para evitar problemas de acidificação do reator logo nos primeiros dias de ensaio.

A quantificação do volume de biogás foi realizada por meio de um tubo eudiômetro acoplado à saída do reator, contendo uma solução barreira (pH = 2,0) que se desloca verticalmente à medida que o biogás passa pelo tubo. O volume de biogás foi quantificado diariamente e corrigido conforme as condições normais de temperatura e pressão (CNTP). A composição do biogás foi realizada pelo método de cromatografia gasosa para obter o teor de metano (CH₄) e dióxido de carbono (CO₂), sendo, posteriormente, calculado o teor de metano seco. O cromatógrafo (marca Shimadzu GC-2014) possui duas linhas TCD a 180 °C com injeção manual e loop a 150 °C. A primeira linha possui uma coluna Porapak N 2 m x 3 mm com fluxo de 35 mL/min e gás hélio como gás de arraste. Já a segunda linha opera com uma coluna Carboxen 1000 4,6 m x 2,1 mm, fluxo de 45 mL/min e gás nitrogênio como gás de arraste. O monitoramento do reator foi realizado pelas análises de pH, DQO (Edwiges et al., 2018) e alcalinidade total (Holliger et al., 2016) do efluente, sendo calculada a eficiência de remoção da matéria orgânica pelo valor de DQO.

Resultados e discussão

Caracterização físico-química do inóculo e substrato

O teor de ST e SV do inóculo foi de 1,7% e 65,9% (% base seca), respectivamente, e o valor de pH foi de $7,8 \pm 0,1$, o que indica boa qualidade do inóculo para ensaios de produção de biogás (Kunz et al., 2019). Quanto à caracterização do substrato (EIOP), o teor de ST e SV foi de 10,4% e 92,6 (%bs), respectivamente, sendo o teor de ST próximo ao valor reportado por Ahmed et al. (2015) de 11,4% (American Public Health Association, 2005). O baixo valor de pH ($4,8 \pm 0,2$) foi um ponto negativo para o tratamento via digestão anaeróbia, visto que os microrganismos metanogênicos atuam em uma faixa restrita de 6,8–7,5 (Ripley et al., 1986). Contudo, alguns estudos relataram a capacidade do inóculo de manter a produção de biogás com alguns substratos ácidos por um período de tempo, visto que os microrganismos criam mecanismos para se adaptar ao meio (Wadchasit et al., 2021).

Por fim, o valor de DQO do EIOP sem a adição de água foi 175.972 ± 1.082 mg/L, indicando alta quantidade de matéria orgânica quando comparado ao inóculo (16.511 ± 1.430 mg/L). Contudo, ao adicionar água para reduzir o TRH do ensaio e manter uma COV de 0,16 g SV/L.d, o valor da DQO caiu para 31.011 ± 1.502 mg/L, enquanto o pH subiu para 4,8. Esses valores estão dentro da faixa encontrada na literatura, sendo de 15.000 mg/L–180.000 mg/L para DQO e 3,4–5,2 para o pH (Wongfaed et al., 2020).

Produção de biogás em reator anaeróbio de regime semicontínuo

O reator foi operado por 51 dias, e as curvas de produção de biogás indicam instabilidade no processo de digestão anaeróbia, com produtividade média de $0,037 \pm 0,015$ L_N biogás/L reator/dia e coeficiente de variação de 39% (Figura 1). Portanto, observou-se que o inóculo estava consumindo a matéria orgânica até o quinto dia (pico de 0,062 L_N biogás/L), mas após esse período, não suportou a quantidade de matéria orgânica adicionada, apesar de a COV estar abaixo do sugerido pela literatura (0,5 g SV/L.d) (Choong et al., 2018). As fases de aclimação e inicialização são cruciais para o sucesso de um sistema de digestão anaeróbia, visto que o inóculo deve ser pré-aclimatado ao ambiente com a temperatura de operação e tipo de substrato, para que o consórcio microbiano tenha tempo suficiente para se adaptar ao novo ambiente (Ripley et al., 1986). No entanto, a aclimação com o substrato antes do ensaio (período de sete dias) não ocorreu no presente estudo e pode ter sido um dos motivos para a instabilidade da produção de biogás.

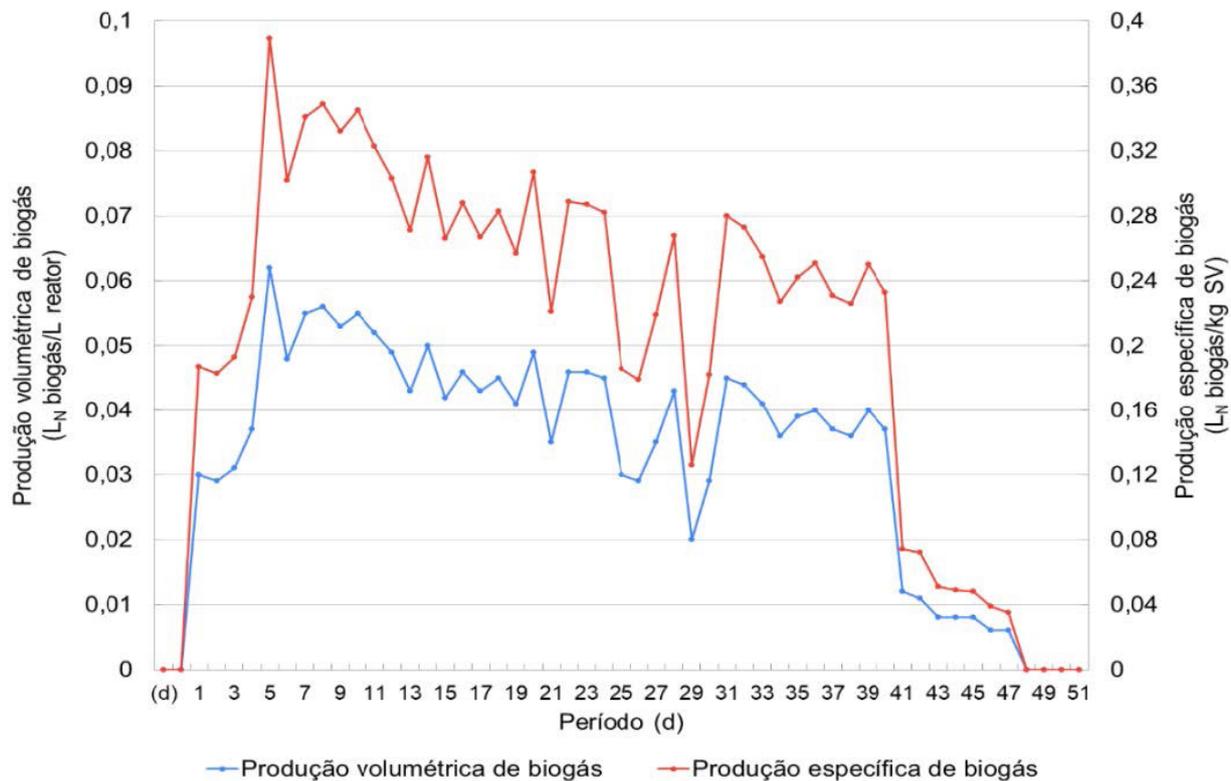


Figura 1. Produção volumétrica e específica de biogás do EIOP.

A média da produtividade específica de biogás foi de $0,23 \pm 0,09$ LN biogás/kg SV, com maior valor obtido no quinto dia de ensaio ($0,389$ LN biogás/kg SV) e teor de metano seco de $68,4 \pm 0,2\%$, o que indica a presença de microrganismos metanogênicos. Contudo, observou-se que a produtividade e o teor de metano reduziram ao longo do ensaio, chegando a $0,0350$ LN biogás/kg SV e $63,5 \pm 0,1\%$ no 47º dia. Alguns ácidos que compõem o EIOP, como ácidos palmítico, oleico e esteárico, são considerados ótimos substratos para a produção de metano, mas que, em grande quantidade, podem ser tóxicos para os microrganismos metanogênicos e acetogênicos (Wongfaed et al., 2020).

O pH variou entre 7,3 e 7,9 e, em alguns momentos, ultrapassou o limite máximo para um processo ideal de digestão anaeróbia (6,8–7,8) (Ripley et al., 1986). Quanto à alcalinidade total, houve uma diminuição ao longo do ensaio, com maior valor obtido na primeira semana (4.382 mg CaCO_3/L) e menor valor obtido na última semana (3.125 mg CaCO_3/L). Embora o valor esteja dentro da faixa relatada na literatura (2.500 mg/L– 5.000 mg/L) (Kunz et al., 2019), esse declínio indica consumo de alcalinidade no processo, principalmente na forma de carbonato e bicarbonato de cálcio, em razão da acidez do EIOP (pH = 4,8). Portanto, a característica do substrato afetou drasticamente a capacidade dos microrganismos de tamponar o sistema, visto que eles convertem os ácidos em biogás enquanto o pH se mantém próximo da neutralidade (Choong et al., 2018).

Quanto à eficiência de remoção da DQO, a média encontrada no estudo foi de $55,9 \pm 6,7\%$ com CV de 12% (Figura 2). Ao se comparar esse valor com os dados encontrados na literatura, observou-se que a eficiência de remoção está abaixo do esperado para um bom processo de digestão anaeróbia em reatores de mistura completa ($63,5\%$ – $93,6\%$) (American Public Health Association, 2005). Entretanto, foram identificados valores de remoção acima de 60%, sendo obtido o maior valor no 12º dia, com 69,8%. Apesar da instabilidade do processo, os microrganismos consumiram a matéria orgânica presente no EIOP, mantendo uma taxa de remoção acima de 60% para treze pontos durante o ensaio.

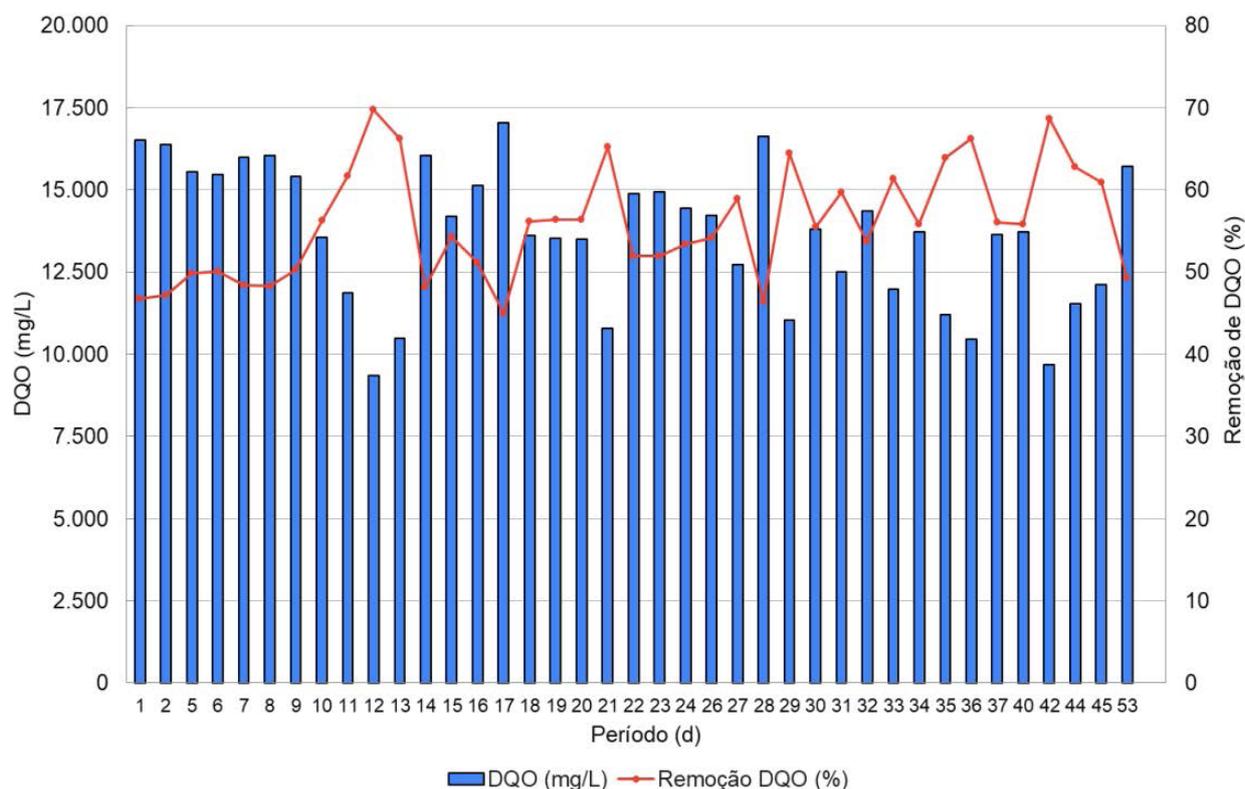


Figura 2. Eficiência de remoção da demanda química de oxigênio do processo.

Portanto, o sistema de digestão anaeróbia com EIOP requer baixa taxa de carga orgânica e tempo de retenção hidráulica longo (40 dias–60 dias) em razão da dificuldade dos microrganismos de digerir lipídios e ácidos graxos de cadeia longa (Wongfaed et al., 2020). A codigestão é uma alternativa para suprir a demanda e equilibrar o sistema, podendo incluir resíduos da própria indústria, como os cachos vazios do fruto dendê (Brasil, 2018). Além disso, a correção do pH do EIOP antes de adicioná-lo nos reatores também é uma maneira de reduzir a instabilidade do processo, garantindo o efeito tampão dentro do reator.

Conclusão

A digestão anaeróbia é uma opção atraente para tratar o EIOP. Porém, é necessário monitorar os parâmetros físico-químicos do processo. No estudo, a produção volumétrica de biogás do EIOP foi, em média, $0,037 \pm 0,015 L_N$ biogás/L reator/dia e indicou instabilidade do processo de digestão anaeróbia por causa da variação do volume produzido diariamente (CV = 39%). Um dos motivos dessa instabilidade é a presença de ácidos na composição do substrato (pH = 4,8), que impacta diretamente na alcalinidade total do processo e na remoção da matéria orgânica pelos microrganismos (média de remoção de DQO = 55,9%). Além disso, a queda do teor de metano seco de 68,4% para 63,5% indica que o pH do substrato precisa ser corrigido antes de ser adicionado ao reator, para que os microrganismos metanogênicos possam converter os ácidos em metano.

Referências bibliográficas

AHMED, Y., JACOB, Z., AKHTAR, P., SOPIAN, K. Production of biogas and performance evaluation of existing treatment processes in palm oil mill effluent (POME). *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v. 42, p. 1260-1278, fev. 2015. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.rser.2014.10.073>

- AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. **N-20: Standard Methods for the examination of water and wastewater**. Washington, 2005. Não paginado.
- BRASIL. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. **Diagnóstico da produção sustentável da palma de óleo no Brasil**. Brasília, DF: MAPA/ACE, 2018. 58 p. Disponível em: https://aprobio.com.br/novosite/wp-content/uploads/2018/08/Diagn%C3%B3stico-Prod-Sust-da-Palma-de-%C3%93leo_MAPA_2018.pdf. Acesso em: 28 set. 2023.
- 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, n. 3, p. 2993-3006, fev. 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.rser.2017.10.036>
- EDWIGES, T.; FRARE, L. M.; MAYER, B; LINS, L.;TRIOLO, J. M.; FLOTATS, X.; COSTA, M. S. S. M. Influence of chemical composition on biochemical methane potential of fruit and vegetable waste. **Waste Management**, v. 71, p. 618-625, Jan. 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2017.05.030>
- HOLLIGER, C.; ALVES, M.; ANDRADE, D.; ANGELIDAKI, I.; ASTALS, S.; BAIER, U.; BOUGRIER, C.; BUFFIÈRE, P.; CARBALLA, M.; WILDE, V.; EBERTSEDER, F.; FERNÁNDEZ, B.; FICARA, E.; FOTIDIS, I.; FRIGON, J.; LACLOS, H. F.; GHASIMI, D. S. M.; HACK, G.; HARTEL, M.; HEERENKLAGE, J.; HORVATH, I. S.; JENICEK, P.; KOCH, K.; KRAUTWALD, J.; LIZASOAIN, J.; LIU, J.; MOSBERGER, L.; NISTOR, M.; OECHSNER, H.; OLIVEIRA, J. V.; PATERSON, M.; PAUSS, A.; POMMIER, S.; PORQUEDDU, I.; RAPOSO, F.; RIBEIRO, T.; PFUND, F. R.; STRÖMBERG, S.; TORRIJOS, M.; EEKERT, M.; LIER, J.; WEDWITSCHKA, H.; E WIERINCK, I. Towards a standardization of biomethane potential tests. **Water Science and Technology**, v. 74, n. 11 p. 2515–2522, 2016. DOI: <https://doi.org/10.2166/wst.2016.336>
- KUNZ, A., STEINMETZ, R. L. R., DO AMARAL, A. C. **Fundamentos da digestão anaeróbia, purificação do biogás, uso e tratamento do digestato**. Concórdia: Sbera: Embrapa Suínos e Aves, 2019, 209 p. Disponível em: <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/197183/1/Livro-Biogas.pdf>. Acesso em: 28 set. 2023.
- RIPLEY, L. E., BOYLE, W. C., CONVERSE, J. C. Improved alkalimetric monitoring for anaerobic digestion of high-strength wastes. **Journal of Water Pollution Control Federation**, v. 58, n. 5, p. 406-411, mai. 1986. Disponível em: <https://www.jstor.org/stable/25042933>. Acesso em: 28 set. 2023.
- WADCHASIT, P., SUKSONG, W., O-THONG, S., NUIHITIKUL, K. Development of a novel reactor for simultaneous production of biogas from oil-palm empty fruit bunches (EFB) and palm oil mill effluents (POME). **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 9, n. 3, p. 105 - 209, jun. 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jece.2021.105209>.
- WONGFAED, N., KONGJAN, P., PRASERTSAN, P., O-THONG, S. Effect of oil and derivative in palm oil mill effluent on the process imbalance of biogas production. **Journal of Cleaner Production**, v. 247, n. 20, p. 110-119, Feb. 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2019.119110>.

Produção de óleo e proteína de canola cultivada no Cerrado brasileiro

Letícia Karen dos Santos¹, Cíntia Gonçalves Guimarães², Willame dos Santos Candido³, Bruno Galveas Laviola⁴, Simone Palma Favaro⁵

Resumo

A canola tem potencial para ser uma cultura de safrinha no Cerrado brasileiro, aumentando a oferta de produtos para o crescente mercado de óleos vegetais. Nesse sentido, foram avaliados os teores de óleo e proteína e foram calculados os rendimentos de três híbridos de canola, Diamond, Nuola 300 e Hyola 433, cultivados em dois sistemas de produção: sequeiro e irrigado. Os teores de óleo variaram entre 23,8% e 42,0%, enquanto os de proteína ficaram entre 18% e 29% (m/m). O rendimento médio de óleo no sistema sequeiro foi de 684,2 kg/ha, enquanto no sistema irrigado foi 63% superior, atingindo 1.115,9 kg/ha. Já o índice de proteína no sequeiro foi de 387,5 kg/ha e no irrigado foi de 738,5 kg/ha. O maior rendimento no sistema irrigado se deve ao potencial produtivo dessas cultivares em condições de maior disponibilidade hídrica, o que demonstra a necessidade do desenvolvimento de cultivares adaptadas e de alto rendimento para as diferentes condições edafoclimáticas dos biomas brasileiros.

Termos para indexação: *Brassica napus* L., tropicalização, rendimento.

Introdução

A canola (*Brassica napus* L.) apresenta uma nova opção para a safrinha no cenário produtivo do Centro-Oeste brasileiro. O nome “canola” é uma abreviação de *canadian oil low acid* (óleo canadense de baixa acidez), e suas sementes foram obtidas por meio de melhoramento genético das espécies *Brassica napus* e *Brassica rapa*. As cultivares de canola são caracterizadas por possuírem baixo teor de ácido erúico e glicosinolatos, e apresentam diferenças químicas, físicas e nutricionais significativas em relação à planta original de colza (FRANKE et al., 2010).

A relevância do cultivo da canola reside em seu alto teor de óleo e proteína nos grãos, o que a torna importante no mercado de óleo vegetal comestível e na produção de biocombustíveis, além do farelo proteico para nutrição animal (Di Lena et al., 2021). Outro fator muito importante dentro do agronegócio brasileiro é a possibilidade do seu cultivo em safrinha, como alternativa às culturas tradicionalmente produzidas nessa época, sobretudo o milho. O crescimento da produção mundial de canola tem sido viabilizado por meio do desenvolvimento de cultivares a partir de estudos de melhoramento genético (Di Lena et al., 2021). Inicialmente trabalhada para cultivo em regiões temperadas, foi introduzida no Brasil, começando pelo Rio Grande do Sul. No entanto, a crescente importância da canola no mercado de alimentos e biocombustíveis tem impulsionado a pesquisa para desenvolver novas variedades capazes de se adaptar a climas com temperaturas mais elevadas e restrição hídrica (Aslam et al., 2009), como as áreas de Cerrado no Brasil (Fairhurst et al., 2022).

¹ Tecnóloga em Biocombustíveis, doutora em Química, Embrapa Agroenergia, leticia.santos@colaborador.embrapa.br

² Agrônoma, doutora em Biocombustíveis, Embrapa Agroenergia, cintia.guimaraes@colaborador.embrapa.br

³ Agrônomo, doutor em Genética e Melhoramento de Plantas, Embrapa Agroenergia, willame.candido@colaborador.embrapa.br

⁴ Agrônomo, doutor em Fitotecnia, Embrapa Agroenergia, bruno.laviola@embrapa.br

⁵ Agrônoma, doutora em Ciência dos Alimentos, Embrapa Agroenergia, simone.favaro@embrapa.br

A safrinha possibilita a intensificação sustentável em áreas já destinadas à agricultura, reduzindo a pressão sobre florestas naturais e incentivando a conversão de pastagens degradadas para produção, com baixo impacto ambiental e ganhos em descarbonização dos sistemas produtivos.

A introdução da cultura em baixas latitudes (entre -6°e -15°), em clima tropical, é uma iniciativa pioneira no Brasil. Nesse contexto, são apresentados os primeiros resultados obtidos nas avaliações em escala de produtor rural, com foco na determinação do teor de óleo e proteína e nos respectivos rendimentos por área de cultivares de canola cultivadas no Cerrado em sistemas de sequeiro e irrigado.

Materiais e métodos

Experimentos de campo

Três cultivares de canola comercial, Diamond e Nuola 300, da empresa Nussed, e Hyola 433, da empresa Advanta, foram plantadas em cinco propriedades de produtores rurais associados à Cooperativa Agrícola do Rio Preto (COARP), em Planaltina, DF. O plantio da canola foi realizado no período de fevereiro a abril de 2021, no sistema de cultivo sequeiro em cinco propriedades rurais, e no sistema de cultivo irrigado em duas propriedades rurais. O delineamento experimental foi totalmente casualizado com quatro repetições de cada cultivar em cada uma das diferentes propriedades parceiras e para cada sistema de produção, totalizando 84 parcelas, sendo 87 ha em sequeiro e 19 ha sob irrigação. Foram realizados tratos culturais fitossanitários e para controle de plantas invasoras. Após a colheita, os grãos foram separados, pesados e armazenados a -18 °C até a realização das análises químicas. A produtividade de grãos foi obtida por meio de extrapolação do rendimento total em cada parcela experimental para 1 hectare.

Caracterizações dos grãos

Determinação de umidade

A determinação de umidade foi realizada pelo método gravimétrico em estufa a 105 ± 3 °C, com circulação de ar, por 24 horas, conforme as Regras para Análise de Sementes (RAS) (Brasil, 2009).

Determinação do teor de óleo nos grãos

O ensaio foi realizado de acordo com as determinações da AOCS Am 5-04 (AOCS, 2017) na qual determina-se o teor de óleo presente no grão utilizando o equipamento ANKOM XT15 e bolsa de filtro ANKOM XT4. A extração é realizada com éter de petróleo em condições de elevada pressão e temperatura. Os resultados foram expressos em teor de óleo (% m/m) em base úmida.

Determinação do teor de proteína

O teor de proteína bruta foi determinado pelo método de combustão de acordo com o método AOCS Ba 4e-93: Método de Combustão Genérico para Proteína Bruta (AOCS, 2017), utilizando o teor de nitrogênio total, com fator de conversão de 6,25. Os resultados foram expressos em teor de proteína (% m/m) em base úmida.

Rendimento por área

O rendimento de óleo e de proteína por área expressa a massa total de óleo e de proteína por área cultivada (quilo/óleo ou proteína/ha) e foi determinado por meio da multiplicação do teor de óleo e do teor de proteína pelo total da massa de grãos produzida em 1 hectare.

Resultados e discussão

Os principais fatores que afetam a qualidade do grão da canola no armazenamento são umidade, temperatura, bolores e presença de grãos verdes. Recomenda-se o armazenamento dos grãos de canola com teor de água menor que 8% (m/m).

Os valores médios de umidade das três cultivares plantadas nos cinco produtores e nos dois sistemas de produção (sequeiro e irrigado) estão apresentados na Tabela 1. Todas as cultivares produzidas na safra 2021 apresentaram umidade abaixo de 10% (m/m), indicando um bom manejo dos produtores na colheita da canola. Para cultivos e comercialização em maior escala, grãos com umidade acima de 8% deverão passar por processo de secagem.

Tabela 1. Umidade de cultivares de canola plantadas por cinco produtores em dois sistemas.

Produtor	Umidade (% m/m)		
	Nuola 300	Diamond Sequeiro	Hyola 433
Produtor 1	5,2 ± 0,2	6,2 ± 0,7	5,9 ± 0,1
Produtor 2	4,9 ± 0,3	7,6 ± 0,5	6,7 ± 0,9
Produtor 3	7,5 ± 1,7	6,7 ± 1,0	6,3 ± 0,1
Produtor 4	6,8 ± 0,2	8,9 ± 0,8	7,0 ± 0,2
Produtor 5	5,7 ± 0,2	6,2 ± 0,1	5,9 ± 0,1
Média	6,0 ± 1,1	7,1 ± 1,1	6,4 ± 0,5
Irrigado			
Produtor 1	4,4 ± 0,3	3,7 ± 0,2	5,3 ± 0,6
Produtor 2	8,1 ± 1,0	5,7 ± 0,1	6,4 ± 0,1
Média	6,3 ± 2,6	4,7 ± 1,4	5,9 ± 0,8

O teor de óleo no grão de canola varia de 35% a 50% (Secchi et al., 2022). No entanto, no Brasil, a faixa comumente encontrada é inferior, ficando entre 34% e 40% (Tomm, 2007). No presente trabalho, foram observados teores entre 23,8% e 42% de óleo (Tabela 2). Deve-se informar que o teor de 23,8% observado na cultivar Diamond provavelmente é reflexo da forte restrição hídrica ocorrida durante o cultivo da canola nessa área específica e, portanto, não reflete um dado compatível com o acúmulo esperado.

Tabela 2. Teor de óleo e proteína em base úmida de cultivares de canola produzidas na safra 2021 na região de Cerrado (Planaltina, DF).

Produtor	Nuola 300		Diamond		Hyola 433	
	Óleo	Proteína	Óleo	Proteína	Óleo	Proteína
(% m/m)						
Sequeiro						
Produtor 1	38,1 ± 1,3	22,70 ± 0,6	36,8 ± 2,5	25,88 ± 0,3	39,1 ± 1,7	25,62 ± 1,9
Produtor 2	40,5 ± 5,2	20,28 ± 2,1	23,8 ± 4,6	26,48 ± 2,0	33,0 ± 2,8	27,18 ± 1,1
Produtor 3	40,3 ± 3,1	18,47 ± 2,6	42,0 ± 1,1	20,05 ± 1,1	40,8 ± 1,7	21,27 ± 1,9
Produtor 4	32,3 ± 1,5	25,55 ± 1,6	30,6 ± 2,3	29,78 ± 0,5	31,7 ± 2,8	28,99 ± 1,4
Produtor 5	36,1 ± 0,9	24,84 ± 2,1	34,2 ± 0,8	24,90 ± 1,2	37,3 ± 0,9	25,02 ± 1,2
Média*	37,5 ± 3,4	22,39 ± 3,0	35,9 ± 4,8	25,55 ± 4,0	36,3 ± 3,9	25,62 ± 2,8

Continua...

Tabela 2. Continuação.

	Irrigado					
Produtor 1	39,2 ± 3,4	21,94 ± 1,8	40,6 ± 1,5	23,97 ± 1,6	38,7 ± 1,0	22,16 ± 0,79
Produtor 2	40,5 ± 2,1	21,27 ± 0,9	38,0 ± 1,8	21,76 ± 1,1	38,4 ± 0,4	23,41 ± 0,8
Média	39,5 ± 0,9	21,61 ± 0,5	39,3 ± 1,8	22,87 ± 1,6	38,5 ± 0,8	22,79 ± 0,9

*A média calculada não inclui os dados do produtor 2 para a cultivar Diamond.

Das três cultivares, a Nuola 300 apresentou uma tendência de maior teor de óleo nos dois sistemas de cultivo. A maior oferta de água dada pela irrigação resultou no incremento da proporção de óleo dela em detrimento da proteína (Tabela 3). Portanto, houve uma interação do genótipo com o ambiente para a expressão do acúmulo dos materiais de reserva no grão de canola nas condições experimentais.

Os teores de proteína da canola já descritos para cultivos na região Sul do Brasil estão entre 24% e 27% (Tomm et al., 2009). Nos experimentos realizados no ambiente de Cerrado, a variação observada foi mais ampla, ficando entre 18% e 29% (Tabela 2), com média geral de 23,2 ± 1,4%. Observou-se uma relação inversa entre os teores de proteína e óleo (Tabela 2).

Os resultados médios de produtividade de cada cultivar, em ambos os sistemas de produção (sequeiro e irrigado), juntamente com os respectivos rendimentos (massa total de cada componente por hectare) estão compilados na Figura 1.

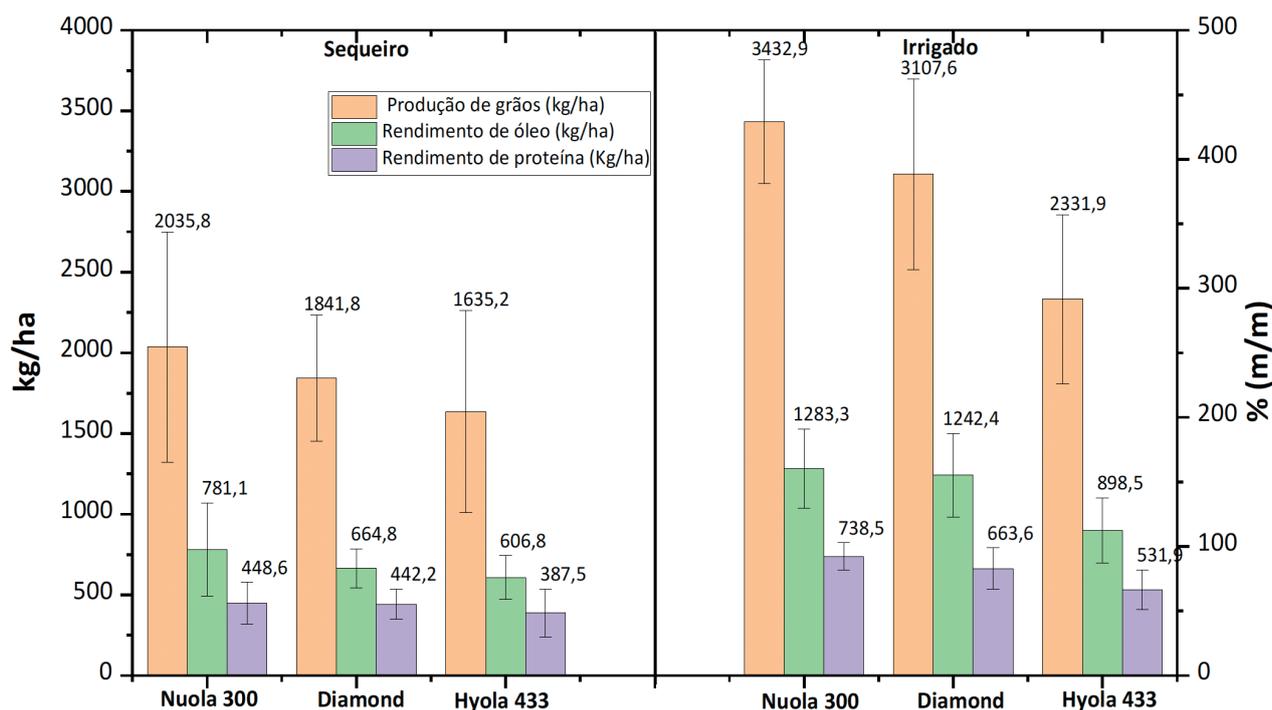


Figura 1. Produtividade de grãos e rendimentos de óleo e proteína em cultivares de canola cultivadas no Cerrado, safra 2021 (Planaltina, DF).

O rendimento médio de óleo no sistema sequeiro foi de 684,2 kg/ha, enquanto no irrigado foi 63% superior, atingindo 1.115,9 kg/ha. O maior rendimento em óleo no sistema irrigado deveu-se tanto ao maior teor de óleo quanto à maior produtividade de grãos, expressando o potencial produtivo dessas cultivares em condições de maior disponibilidade hídrica (Figura 1). A cultivar Nuola 300 rendeu mais óleo por hectare em razão da maior produtividade e do maior teor de óleo no grão, para ambos os sistemas de cultivo (Figura 1). O rendimento de óleo/ha da Nuola 300 superou em 15% e

22% as cultivares Diamond e Hyola 433 em sequeiro e no irrigado 3% e 30%, respectivamente. No sistema de plantio irrigado, as cultivares Diamond e Nuola 300 responderam melhor à irrigação, obtendo maiores rendimentos de óleo/ha (Tabela 2).

Em termos de rendimento de proteína por área, a cultivar Nuola 300 teve o maior potencial de produção em razão da sua maior produtividade em grãos em sequeiro e irrigado, mesmo tendo teor de proteína inferior em sequeiro em relação a Diamond e Hyola 433 (Figura 1).

Comparando-se com a soja, principal commodity agrícola do Brasil, a canola demonstrou potencial como uma alternativa oleaginosa em condições de cultivo no Cerrado em safrinha. A soja produzida como cultura de safra de verão contém cerca de 40% de proteína e 20% de óleo, com produtividade média de 3.560 kg/ha no Centro-Oeste. Isso resulta em aproximadamente 1.424 kg de proteína/ha e 712 kg de óleo/ha (Companhia Nacional de Abastecimento, 2022). As cultivares avaliadas, mesmo não sendo específicas para o cerrado e produzidas em sistemas ainda não bem estabelecidos, demonstraram que a canola em safrinha tem potencial para contribuir na maior oferta de óleos e proteínas, somando-se à soja, que é cultivada como safra principal. Portanto, a canola poderá representar uma alternativa viável para diversificação da matriz produtiva na região tropical do Brasil.

Conclusão

Análises do plantio de canola na safrinha de 2021 mostraram potencial para sua introdução no Cerrado brasileiro. A suplementação hídrica demonstrou ser bastante efetiva para o incremento da produção em todas as cultivares. Destaque para a cultivar Nuola 300, com maiores produtividades e teor de óleo, alcançando 2.036 kg/ha em sequeiro e 3.433 kg/ha em condições irrigadas, e rendimentos de óleo de 781 kg/ha e de 1.283 kg/ha, e de proteína de 449 kg/ha e 734 kg/ha, respectivamente.

Referências bibliográficas

- AMERICAN OIL CHEMIST SOCIETY. **Official methods and recommended practices**. Urbana, USA, 2012.
- ASLAM, M. N.; NELSON, M. N.; KAILIS, S. G.; BAYLISS, K. L.; SPEIJERS, J.; COWLING, S. A. Canola oil increases in polyunsaturated fatty acids and decreases in oleic acid in drought-stressed Mediterranean-type environments. **Plant Breeding**, v. 128, n. 4, p. 348-355, 2009.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. **Regras para análise de sementes**. Brasília, DF, 2009.
- COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Acompanhamento da safra brasileira grãos – safra 2022/2023 – 1o levantamento**. Brasília, 2022.
- DI LENA, G.; SANCHEZ DEL PULGAR, J.; LUCARINI, M.; DURAZZO, A.; ONDREJICKOVA, P.; OANCEA, F.; FRINCU, R.-M.; AGUZZI, A.; FERRARI NICOLI, S.; CASINI, I.; GABRIELLI, P.; CAPORONI, R.; CERVEN, I.; LOMBARDI-BOCCIA, G. Valorization potentials of rapeseed meal in a biorefinery perspective: focus on nutritional and bioactive components. **Molecules**, v. 26, n. 22, 2021. 6787.
- FAIRHURST, S. M.; JACKSON, G. E.; EVANS, A.; COLE, L. J. The effect of pollination on the growth and reproduction of oilseed rape (*Brassica napus*). **Basic and Applied Ecology**, v. 63, p. 164-174, 2022.
- FRANKE, S.; FRÖHLICH, K.; WERNER, S.; BÖHN, V.; SCHÖNE, F. Analysis of carotenoids and vitamin E in selected oilseeds, press cakes and oils. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 112, n. 10, p. 1122-1129, 2010.
- PRZYBYLSKI, R.; MAG, T.; ESKIN, N. A. M.; MCDONALD, B. E. Canola Oil. In: SHAHIDI, F. **Bailey's industrial oil and fat products**. 6. ed. Hoboken: John Wiley & Sons, 2005. p. 61-121.
- SECCHI, M. A.; CORRENDO, A. A.; STAMM, M. J.; DURRETT, T.; VARA PRASAD, P. V.; MESSINA, C. D.; CIAMPITTI, I. A. Suitability of different environments for winter canola oil production in the United States of America. **Field Crops Research**, v. 287, 2022. 108658.
- TOMM, G. O. **Indicativos tecnológicos para produção de canola no Rio Grande do Sul**. Passo Fundo: Embrapa Trigo, 2007. (Embrapa Trigo. Sistemas de Produção, 4).

Quantificação e caracterização de óleos de canola, carinata e crambe produzidos no Centro-Oeste brasileiro

Laura Guimarães Ciciliano¹, Letícia Karen dos Santos², Bruno Galveas Laviola³, Simone Palma Favaro⁴

Resumo

As oleaginosas da família Brassicaceae, como canola (*Brassica napus*), carinata (*Brassica carinata*) e crambe (*Crambe abyssinica*), apresentam alto teor de óleo e composições de ácidos graxos que têm atraído o interesse de diferentes segmentos industriais. O cultivo dessas espécies no Cerrado, em safrinha, é uma alternativa para a rotação de culturas e diversificação da matriz produtiva do Brasil na oferta de óleos vegetais. Este trabalho teve como objetivo quantificar e caracterizar os óleos dessas três espécies a partir de grãos produzidos na região de Cerrado, em safrinha. Os materiais de canola Nuola 300, de carinata e de crambe variedade FMS 1 Brilhante foram produzidos em Planaltina, DF, de março a junho, na safra de 2022, e seus teores de óleo foram determinados pelo método de Ankom. Os óleos foram caracterizados quanto ao perfil de ácidos graxos, acidez e estabilidade oxidativa. A canola apresentou 37,4% de óleo, sendo composto majoritariamente de ácido oleico (62,1%); a carinata teve 35,4% de óleo e 42,1% de ácido erúcido; e o crambe apresentou 35,13% de óleo e 56,3% de ácido erúcido. A maior estabilidade oxidativa foi observada no óleo de crambe, que teve 25,5 horas, seguido da carinata, 9,6 horas, e da canola, 8,7 horas. Todos os óleos apresentaram baixa acidez: óleo de canola, 0,6%; óleo de crambe, 0,42%; óleo de carinata, 0,21%.

Termos para indexação: óleos vegetais, teor de óleo, perfil de ácidos graxos, brassicas, Cerrado.

Introdução

As espécies oleaginosas canola (*Brassica napus*), carinata (*Brassica carinata*) e crambe (*Crambe abyssinica*) pertencem à família Brassicaceae e caracterizam-se pelo ciclo de produção curto, o que permite seu cultivo em safrinha. Para o cenário de aumento de demanda de óleos vegetais, impulsionado sobretudo pelo mercado de biocombustíveis, essas espécies podem contribuir para aumentar a oferta dessa matéria-prima, além de trazerem mais opções aos agricultores que estão concentrados na produção do milho na safrinha. Outro aspecto que deve ser salientado é a introdução dessas espécies para o cultivo em áreas de Cerrado, a chamada tropicalização, que leva à intensificação do uso de áreas já antropizadas, evitando a mudança do uso do solo.

O óleo extraído da canola é rico em ácido oleico e seu uso é consolidado em diversos segmentos industriais, como o alimentício e de biocombustíveis. Os óleos de carinata e crambe não são comestíveis, por possuírem altas proporções de ácido erúcido em sua composição, sendo utilizados nas indústrias farmacêutica e de biolubrificantes. O segmento de biocombustíveis para a produção de biodiesel, diesel verde e combustível sustentável de aviação pode ser também um importante consumidor desses óleos.

Dessa forma, o presente trabalho teve como objetivo determinar o teor e caracterizar alguns aspectos químicos dos óleos de canola, carinata e crambe cultivados no ambiente de Cerrado.

¹ Graduanda em Química Tecnológica, Universidade de Brasília, lauragciciliano@gmail.com

² Tecnóloga em biocombustíveis, doutora em Química. Embrapa Agroenergia, leticia.santos@colaborador.embrapa.br.

³ Agrônomo, doutor em Fitotecnia, Embrapa Agroenergia, bruno.laviola@embrapa.br

⁴ Agrônoma, doutora em Ciência dos Alimentos, Embrapa Agroenergia, simone.favaro@embrapa.br

Materiais e métodos

Os materiais de canola e carinata avaliados são provenientes de grãos de experimentos em campo realizados na Embrapa Cerrados (Planaltina, DF), na safreinha de 2023. Avaliaram-se a cultivar de canola Nuola 300 e uma cultivar não identificada de carinata. O crambe foi fornecido pela Cooperativa Agrícola do Rio Preto (COARP) a partir do cultivo da variedade FMS Brillhante. Os cultivos ocorreram em Planaltina, DF.

O teor de óleo dos grãos foi determinado em equipamento Ankom XT15, método AOCS Am 5-04, (American Oil Chemist's Society, 2017).

Para a determinação da estabilidade oxidativa e da acidez, os óleos foram extraídos previamente partindo-se de grãos moídos (IKA, A11), homogeneizados em peneira (malha de 20 mesh) e secos em estufa a 60 °C por 24 horas. A extração do óleo foi feita utilizando-se o método de Extração Acelerada por Solvente (Thermo Scientific, modelo ASE 350 – Dionex). Utilizou-se o hexano como solvente orgânico, que foi removido ao final por rotaevaporação em banho-maria a 45 °C. Os óleos extraídos foram armazenados a -4 °C até a caracterização.

A estabilidade oxidativa dos óleos foi determinada em método Rancimat, de acordo com ISO 6886:2016 (International Organization for Standardization, 2016), e expressa em horas.

A acidez do óleo foi determinada em titulador automático utilizando-se hidróxido de potássio e foi expresso em porcentagem de ácido oleico para a canola e de ácido erúxico para a carinata e o crambe, seguindo o método AOCS Cd 3d-63 (American Oil Chemist's Society, 2009).

A análise de perfil composicional de ácidos graxos foi realizada a partir da extração e da metilação diretamente na amostra integral do grão. Portanto, não foi utilizado o óleo extraído previamente por solvente como nas demais análises físico-químicas. Os grãos foram homogeneizados (IKA, A11) e secos a 105 ± 3 °C por 1 hora, e o procedimento para determinação do perfil de ácidos graxos foi de acordo com ISO 12966-2:2017 (International Organization for Standardization, 2017). A separação e a identificação dos ésteres de ácidos graxos foram realizadas em cromatógrafo a gás, acoplado a um detector de ionização por chama (DIC) (Shimadzu, GC2010), utilizando-se a coluna SLB-IL111 (100 m × 0.25 mm, 0.2 µm Supelco, Bellefonte, PA), com isoterma de aquecimento a 170 °C por 35 minutos.

Resultados e discussão

Os teores de óleo das oleaginosas avaliadas são próximos entre eles, sendo que a canola apresenta uma concentração ligeiramente superior (Tabela 1). Os valores obtidos estão de acordo com os encontrados na literatura (Albuquerque, 2006; Seepaul et al., 2020; Ataban et al., 2014).

Tabela 1. Teor de óleo dos grãos de canola, carinata e crambe cultivados na região de Cerrado (Planaltina, DF).

Teor de óleo (% m/m)	Canola	Carinata	Crambe
	37,40 ± 0,28	35,38 ± 0,22	35,13 ± 0,40

Um atributo crítico de qualidade do óleo é a sua composição em ácidos graxos, pois essa característica determina a aplicação do óleo para alimentação, produção de biocombustíveis ou outros usos. Os valores obtidos no perfil de ácidos graxos dos óleos estão de acordo com a faixa de valores encontrados na literatura (Albuquerque, 2006; Seepaul et al., 2020; Santos, 2014). As brassicas avaliadas apresentaram alta proporção de ácidos graxos monoinsaturados, majoritariamente o ácido oleico na canola e o erúxico na carinata e no crambe (Tabela 2). O óleo de carinata contém a maior

proporção de poli-insaturados, dadas as quantidades de linoleico e linolênico. O crambe se enquadra na categoria dos chamados “high erucic”, com 56,3% de ácido erúxico. A canola caracteriza-se por ser uma fonte de óleo comestível e que também pode ser aplicada na oleoquímica. Por outro lado, os altos teores de erúxico na carinata e no crambe não permitem consumo como alimento, mas eles encontram usos na produção de biocombustíveis, de biolubrificantes, de polímeros e de emoliente da indústria de cosméticos, por exemplo.

Tabela 2. Perfil de ácidos graxos (%) dos óleos de canola, carinata e crambe cultivados na região de Cerrado (Planaltina, DF).

Ácido graxo	Canola	Carinata	Crambe
Ácido caprílico	0,06 ± 0,01	ND	ND
Ácido cáprico	0,01 ± 0,02	ND	ND
Ácido láurico	0,19 ± 0,03	0,1 ± 0,03	0,1 ± 0,01
Ácido mirístico	0,11 ± 0,01	0,08 ± 0,01	0,09 ± 0,01
Ácido palmítico	4,50 ± 0,01	3,00 ± 0,02	1,86 ± 0,01
Ácido palmitoleico	0,20 ± 0,02	0,11 ± 0,01	0,13 ± 0,01
Ácido esteárico	1,71 ± 0,01	0,91 ± 0,00	0,87 ± 0,01
Ácido oleico	62,11 ± 0,11	9,96 ± 0,04	17,58 ± 0,08
Ácido linoleico	20,23 ± 0,02	17,85 ± 0,03	7,93 ± 0,04
Ácido linoleilaidico	0,03 ± 0,05	ND	ND
Ácido α-linolenico	9,74 ± 0,58	19,99 ± 0,03	9,31 ± 0,05
Ácido γ-linolenico	0,04 ± 0,00	0,05 ± 0,00	ND
Ácido araquídico	0,61 ± 0,61	0,78 ± 0,01	0,96 ± 0,01
Ácido araquidônico	0,01 ± 0,02	0,01 ± 0,02	ND
Ácido eicosapentaenoico	0,18 ± 0,02	0,59 ± 0,01	0,69 ± 0,02
Ácido cis-11,14-eicosadienoico	0,13 ± 0,05	1,08 ± 0,01	0,24 ± 0,01
Ácido behênico	0,34 ± 0,01	0,72 ± 0,00	1,87 ± 0,01
Ácido erúxico	ND	41,08 ± 0,09	56,25 ± 0,09
Ácido cis-13,16-docosadienoico	0,03 ± 0,05	1,35 ± 0,04	0,56 ± 0,02
Ácido clupanodônico	ND	0,06 ± 0,00	0,01 ± 0,02
Ácido nervônico	0,13 ± 0,00	2,27 ± 0,01	1,54 ± 0,01
Σ ácidos graxos monoinsaturados	62,44	53,43	75,50
Σ ácidos graxos poli-insaturados	30,38	40,99	18,73
Σ ácidos graxos saturados	7,53	5,58	5,76

Os óleos das espécies estudadas neste trabalho apresentam em sua composição uma elevada porcentagem de insaturações, o que potencialmente favoreceria a oxidação deles e afetaria, consequentemente, sua qualidade e a qualidade de seus subprodutos. Assim, foi avaliada a estabilidade oxidativa dos óleos extraídos de canola, carinata, crambe sendo o valor expresso em horas, que representam o tempo de oxidação até que o óleo comece a ser considerado rançoso ou que comece a apresentar características como escurecimento, aumento da viscosidade, formação de espuma e fumaça (Souza et al., 2018). Os dados obtidos estão dispostos na Tabela 3. A estabilidade oxidativa do óleo de crambe se destaca em relação aos outros óleos em estudo, atingindo 25,46 horas, seguida pela da carinata, que foi 9,6 horas, e pela da canola, 8,7 horas. Como se trata de óleos brutos, compostos minoritários como tocoferóis e carotenoides contribuem para esse tempo de estabilidade

oxidativa (Silva, 2021), além da composição rica em monoinsaturados. A carinata, mesmo tendo a maior proporção de poli-insaturados, mostrou estabilidade superior à canola, possivelmente em razão do alto conteúdo de ácido erúcido. Óleos com alta estabilidade oxidativa são bastante desejáveis na produção de biodiesel porque resultam no biocombustível também com maior resistência à oxidação.

Tabela 3. Caracterização química de óleos de canola, carinata e crambe cultivados na região de Cerrado (Planaltina, DF).

Amostra	Estabilidade oxidativa (horas)	Acidez* (%)
Canola	8,66 ± 1,56	0,60 ± 0,00
Carinata	9,61 ± 0,49	0,21 ± 0,00
Crambe	25,46 ± 0,01	0,42 ± 0,02

*O cálculo de acidez foi feito com base na massa molar do ácido graxo majoritário do óleo. Para a canola, foi utilizada a massa molar do ácido oleico e para a carinata e o crambe foi utilizada a massa molar do ácido erúcido.

O índice de acidez foi bastante baixo em todos os óleos, abaixo de 0,5% (Tabela 3). Esse resultado indica as boas condições de colheita e armazenamento dos grãos e assegura sua aplicação nos diversos setores industriais (Soares et al., 2014).

Conclusão

As espécies avaliadas apresentaram teor de óleo próximo entre elas, na faixa de 35% a 37%, com diferentes composições em termos de ácidos graxos, predominantemente insaturados. O óleo de canola contém 62,1% de ácido oleico, a estabilidade oxidativa foi de 8,66 horas e a acidez foi de 0,6%. O óleo de carinata apresentou 42,1% de ácido erúcido, estabilidade oxidativa de 9,6 horas e acidez de 0,21%. O óleo de crambe contém o maior teor de ácido erúcido, com 56,23% da composição, e demonstrou também a maior estabilidade oxidativa, com 25,5 horas, e acidez de 0,42%. As diferentes composições de ácidos graxos e as propriedades químicas dos óleos avaliados reforçam a variabilidade de aplicações que eles podem ter para a indústria. Assim, pode-se diversificar a produção agrícola no tocante a matérias-primas oleaginosas nas regiões de Cerrado do Brasil.

Referências bibliográficas

- ALBUQUERQUE, G. A. **Obtenção e caracterização físico-química do biodiesel de canola (*Brassica napus*)**. 2006. 78 f. Dissertação (Mestrado em Química), Centro de Ciências Exatas e da Natureza, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, PB. Disponível em: http://www.quimica.ufpb.br/ppgq/contents/documentos/teses-e-dissertacoes/dissertacoes/2006/Dissertacao_Geuzza_A_Albuquerque.pdf. Acesso em: 27 set. 2023.
- AMERICAN OIL CHEMIST'S SOCIETY. **AOCS Am 5-04**: rapid determination of oil/fat utilizing high-temperature solvent extraction. Urbana, 2017. 2 p.
- AMERICAN OIL CHEMIST'S SOCIETY. **AOCS Cd 3d-63**: acid value. Urbana, 2009. 3p.
- ATABANI, A. E.; SILITONGA, A. S.; ONG, H. C.; MAHLIA, T. M. I.; MASJUKI, H. H.; BADRUDDIN, I. A.; FAYAZ, H. Non-edible vegetable oils: a critical evaluation of oil extraction, fatty acid compositions, biodiesel production, characteristics, engine performance and emissions production. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 18, p. 211–245, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.rser.2012.10.013>
- INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. **ISO: 12966-2:2017**: Animal and vegetable fats and oils – gas chromatography of fatty acid methyl esters – Part 2: Preparation of methyl esters of fatty acids. Geneva, 2017. 15 p. Disponível em: <https://www.iso.org/obp/ui/en/#iso:std:iso:12966:-2:ed-2:v1:en>. Acesso em: 28 set. 2023.
- INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. **ISO: 6886:2016**: Animal and vegetable fats and oils — Determination of oxidative stability (accelerated oxidation test). Geneva, 2016. 13p. Disponível em: https://infostore.saiglobal.com/preview/98708242126.pdf?sku=862122_SAIG_NSAI_NSAI_2050967. Acesso em: 28 set. 2023.
- SANTOS, K. A.; SCHNEIDER, R.; CARDOZO, L. F.; SILVA, C.; SILVA, E. A. **Caracterização do óleo de crambe (*Crambe abyssinica*) extraído com propano em condições subcríticas**. In: XX CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA QUÍMICA, 20, 2014, Florianópolis.

- SEEPAL, R.; KUMAR, S.; IBOYI, J. E.; BASHYAL, M.; STANSLY, T. L.; BENNETT, R.; BOOTE, K. J.; MULVANEY, M. J.; SMALL, I. M.; GEORGE, S.; WRIGHT, D. L. *Brassica carinata*: Biology and agronomy as a biofuel crop. **GCB Bioenergy**, v. 13, p. 582–599, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1111/gcbb.12804>.
- SILVA, J. M.; RASPE, D. T.; STEVANATO, N.; SILVA, C. Óleo de Sementes de Crambe Tratadas com Diferentes Indutores de Resistência: Rendimento em óleo e caracterização química. In: ENCONTRO INTERNACIONAL DE PRODUÇÃO CIENTÍFICA DA UNICESUMAR, 12., 2021, Brasília. Disponível em: <https://www.youtube.com/watch?v=pP6fQhSQm4>. Acesso em: 28 set. 2023.
- SOARES, T. N. S.; PAVÃO, D. P.; SILVA, R. S.; LOPES, I. K.; SANTOS, T. S. M.; LOURENÇO, M. S. N. **Determinação do índice de acidez em óleos vegetais e gorduras utilizados em bares e restaurantes no litoral da cidade de São Luís, MA**. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE QUÍMICA, 54., 2014, Natal, RN, 2014. Disponível em: <https://www.abq.org.br/cbq/2014/trabalhos/4/5515-17047.html>. Acesso em: 28 set. 2023.
- SOUZA, E. F.; SANTOS, M. N.; MULINARI, M. B. DE S.; FIORUCCI, A. R. **Estabilidade oxidativa de óleos vegetais comestíveis**. In: SEMINÁRIO REGIONAL DE EXTENSÃO UNIVERSITÁRIA DA REGIÃO CENTRO OESTE, 8., 2018, Dourados, MS. Disponível em: <https://www.even3.com.br/anais/serex/52385-estabilidade-oxidativa-de-oleos-vegetais-comestiveis/>. Acesso em: 28 set. 2023.

Seleção e caracterização de leveduras capazes de crescer em compostos aromáticos derivados da lignina

Julia Mourão Fernandes¹, Livia Teixeira Duarte-Brandão², João Ricardo Moreira de Almeida³

Resumo

A utilização da biomassa lignocelulósica em biorrefinarias para a produção de biocombustíveis e bioprodutos gera grandes quantidades de lignina, tornando necessária a valorização dessa matéria-prima. Tal valorização pode ser obtida pela conversão de compostos aromáticos derivados da lignina (CADLs) por linhagens microbianas capazes de metabolizá-los em biomassa celular e em outros produtos de alto valor agregado. Nesse cenário, este trabalho buscou selecionar entre 76 linhagens de leveduras de diferentes espécies aquelas capazes de crescer em meios cuja única fonte de carbono fossem CADLs catecol, vanilina, ácido protocatecuico, ácido ferúlico, ácido p-cumárico, ácido vanílico, ácido siríngico e ácido 4-hidroxibenzoico. Para tanto, foram realizados inicialmente ensaios de crescimento em microplaca para determinar o potencial de cada linhagem. De forma geral, as linhagens cresceram nos compostos ácido protocatecuico, ácido vanílico, ácido 4-hidroxibenzoico, catecol, ácido p-cumárico e ácido ferúlico, e nenhuma linhagem foi capaz de crescer em vanilina e ácido siríngico. A partir dos resultados obtidos, foi possível selecionar 11 linhagens para análise da cinética de crescimento nos compostos catecol, ácido 4-hidroxibenzoico, ácido vanílico, ácido protocatecuico, ácido p-cumárico e ácido ferúlico com concentração de 20 mM. Em conclusão, foi possível selecionar três linhagens com capacidade de crescimento elevado (OD600) em até 20 mM de ácido protocatecuico, ácido 4-hidroxibenzoico e ácido vanílico.

Termos para indexação: biomassa lignocelulósica, lignina, CADLs, bioprospecção.

Introdução

No contexto da bioeconomia, a substituição de combustíveis fósseis por alternativas de energia limpa e sustentável tem se tornado cada vez mais relevante, em especial no que tange à utilização de biomassa oriunda de processos agroindustriais para a produção de biocombustíveis, mas que não se resume a isso (Claassen et al., 1999; Nanda et al., 2015). A biomassa lignocelulósica é extremamente abundante, possuindo um grande potencial de aplicação em biorrefinarias, tanto para a produção de biocombustíveis como para a produção de coprodutos de alto valor agregado (Ashokkumar et al., 2022).

A biomassa lignocelulósica é formada majoritariamente por celulose, hemicelulose e lignina, respectivamente. Enquanto a celulose e a hemicelulose são de interesse em biorrefinarias para a produção de bioetanol e diversos outros produtos, a lignina é considerada um subproduto de baixo valor, em razão da sua estrutura complexa e heterogênea. Todavia, por ser o segundo polímero mais abundante no planeta, torna-se imprescindível um melhor aproveitamento em processos bioquímicos, em especial na geração de produtos de alto valor agregado, como aqueles derivados de compostos

¹ Graduanda em Biotecnologia, Universidade de Brasília, julia.fernandes@colaborador.embrapa.br

² Farmacêutica, mestre em Ciências Farmacêuticas Embrapa Agroenergia, livia.duarte@embrapa.br

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

aromáticos, uma vez que a lignina é a maior fonte renovável desses compostos (Abdelaziz et al., 2016; Iram et al., 2021; Weng et al., 2021).

Os compostos aromáticos derivados de lignina (CADLs) são formados a partir do bioprocessamento da lignina, que ocorre por meio de sua despolimerização por microrganismos em monômeros mais simples, formando diversos compostos aromáticos, que podem sofrer bioconversão em outros produtos, como lipídios microbianos, vanilina e poli-hidroxicarboxilatos (PHAs) (Abdelaziz et al., 2016; Iram et al., 2021; Weng et al., 2021). É neste cenário que a bioprospecção pode atuar em dois momentos distintos do processo: durante a despolimerização, com a utilização de microrganismos capazes de produzir enzimas modificadoras de lignina (LMEs); e durante a bioconversão, por meio de microrganismos capazes de catabolizar aromáticos e realizar a clivagem do anel, desse modo gerando produtos de interesse para o mercado (Weng et al., 2021).

Já são descritas na literatura diversas espécies de bactérias, fungos e leveduras que utilizam CADLs como fonte de carbono em seus processos metabólicos (Chen; Wan, 2017; Weng et al., 2021). Alguns estudos mostram o potencial de certas espécies de leveduras para a obtenção de produtos de alto valor agregado, como ácido mucônico, lipídios e terpenos (Almqvist et al., 2021; Yaegashi et al., 2017; Yaguchi et al., 2020). Todavia, ainda existe um número muito limitado de linhagens capazes de metabolizar tais compostos, especialmente em concentrações acima de 10 mM, o que pode ser contornado pela bioprospecção de novas linhagens microbianas (Chen et al., 2009). Desse modo, o objetivo deste trabalho é avaliar a capacidade de crescimento em CADLs de 76 linhagens de leveduras. Para tanto, foram escolhidos oito CADLs como únicas fontes de carbono no meio de cultura: catecol, vanilina, ácido vanílico, ácido p-cumárico, ácido siríngico, ácido ferúlico, ácido protocatecuico e ácido 4-hidroxibenzoico.

Materiais e métodos

Pré-inóculo. Foram analisadas ao total 76 linhagens de leveduras. Setenta e três delas fazem parte da coleção de microrganismos da Embrapa Agroenergia e três são linhagens de *Komagataella phaffii* engenheiradas pelo grupo de pesquisa. Todas as leveduras foram pré-cultivadas durante a noite em 5 mL do meio de cultura YNB (*Yeast Nitrogen Base*) suplementado com 20 g/L de glicose, com agitação de 200 rpm e temperatura de 28 °C. Para início dos experimentos, as células foram centrifugadas a 14.000 rpm por 10 minutos, o sobrenadante foi descartado e o pellet foi lavado com YNB com aminoácidos. O processo foi repetido duas vezes.

Meios de cultivo. Foi analisado o crescimento das leveduras em oito meios distintos, cada um contendo uma diferente fonte de carbono, que incluem os oito CADLs: ácido ferúlico, ácido p-cumárico, ácido vanílico, ácido 4-hidroxibenzoico, ácido siríngico, ácido protocatecuico, vanilina, catecol. Como controle negativo, também foi feita análise de crescimento em um meio sem fonte de carbono. Como controle positivo, glicose 20 g/L foi utilizada como fonte de carbono. Os meios consistiram de YNB, tampão de ftalato de potássio monobásico com pH tamponado para 5,5, e a sua respectiva fonte de carbono em concentração de 10 mM e 20 mM.

Avaliação do crescimento. Foi feita a avaliação da capacidade de crescimento das leveduras nos meios preparados no tópico acima. Para tanto, as leveduras foram inoculadas em triplicata em 250 µL de cada meio com concentração de CADLs 10 mM em microplacas de 24 poços. Após o inóculo, as placas foram seladas com filme adesivo e então incubadas em temperatura ambiente por 120 horas. Foram feitas as medições de absorbância a 600 nm nos tempos 0h e 120h, no espectrofotômetro SpectraMax M2. No caso das placas contendo glicose, foram feitas as leituras da OD nos tempos 0h e 24h. Além das medições de OD, também foi feita análise visual das placas no tempo 120h.

Avaliação da cinética de crescimento. As leveduras foram inoculadas em triplicata em 500 μ L de cada meio com concentração de CADLs 20 mM em microplacas de 48 poços. Após o inóculo, elas foram incubadas a 30 °C no espectrofotômetro de microplaca EPOCH 2 por 92 horas e 120 horas, com leituras de absorbância a 600 nm programadas a cada 2 horas.

Resultados e discussão

Para a análise do crescimento das linhagens estudadas, foi feito o cálculo da diferença de OD final em relação à OD inicial. Para a maioria dos compostos, o tempo final foi de 120 horas, com exceção do meio de glicose (controle positivo), no qual o tempo final foi 24 horas. Visto que o experimento foi realizado em triplicata, foi feita a média dos valores obtidos. Para criação de um *heatmap* e visualização dos resultados, foram adotados os parâmetros demonstrados na Tabela 1.

Tabela 1. Parâmetros analisados.

OD final - OD inicial			
Resultado igual ou menor que 0	Resultado entre 0 e 0,05	Resultado entre 0,05 e 0,1	Resultado maior ou igual a 0,1
Crescimento negativo	Crescimento mínimo	Crescimento médio	Crescimento positivo

Das 76 linhagens de leveduras analisadas, quarenta e uma tiveram crescimento positivo em pelo menos um CADL, o que representa 53,9% das linhagens estudadas. Entre os oito meios analisados, o ácido protocatecuico foi o que obteve maior porcentagem (40,8%) de crescimento de leveduras. Nenhuma das linhagens estudadas obteve crescimento positivo em vanilina ou em ácido siríngico. Na Tabela 2, estão descritas a quantidade e a porcentagem de leveduras com crescimento positivo para cada um dos CADLs analisados no estudo em questão.

Tabela 2. Resultado do screening inicial em CADLs.

Compostos							
Ácido protocatecuico	Catecol	Ácido vanílico	Ácido 4-hidroxibenzóico	Ácido p-cumárico	Ácido ferúlico	Ácido siríngico	Vanilina
31 (40,8%)	12 (15,8%)	11 (14,5%)	11 (14,5%)	9 (11,8%)	6 (7,9%)	0 (0%)	0 (0%)

Dentre os meios contendo CADLs, vinte e duas linhagens de leveduras foram capazes de crescer em pelo menos dois compostos, sendo que 14 conseguiram crescer em ao menos três compostos e somente três linhagens conseguiram crescer em quatro compostos, que foi o máximo observado no experimento. Nenhuma linhagem estudada foi capaz de crescer em todos os CADLs. Foram identificadas três espécies distintas (dados não mostrados), que apresentaram pelo menos três linhagens com capacidade de crescer em CADLs, como mostra a Figura 1.

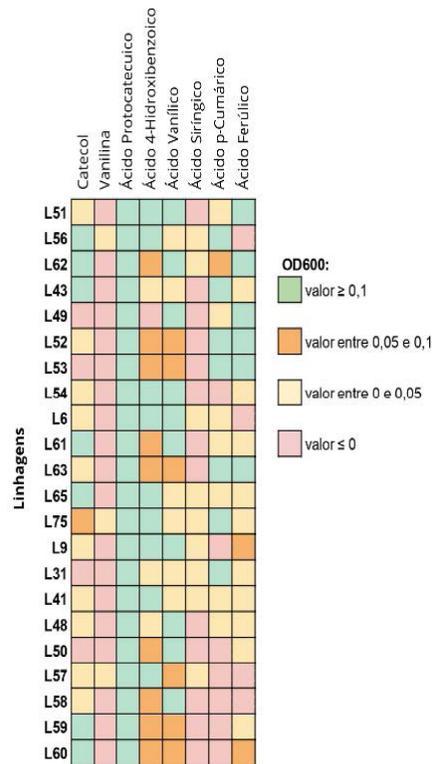


Figura 1. Principais linhagens identificadas com capacidade de crescimento em CADLs.

Entre as 22 linhagens citadas, foram selecionadas 11 que podem ter potencial na conversão de CADLs, sendo elas L6, L9, L41, L48, L49, L50, L52, L53, L56, L62 e L75. A cinética de crescimento de tais linhagens foi realizada em microplacas de 48 poços em concentração de CADLs 20 mM por 92 horas e 120 horas. Foi feita a média das replicatas realizadas. O desempenho das leveduras nas respectivas fontes de carbono em 120h é demonstrado na Figura 2. Com base nessa análise, foram selecionadas três linhagens de leveduras, L48, L50 e L62, com potencial de crescimento nos meios ácido 4-hidroxibenzoico, ácido protocatecuico e ácido vanílico em uma concentração maior que 20 mM.

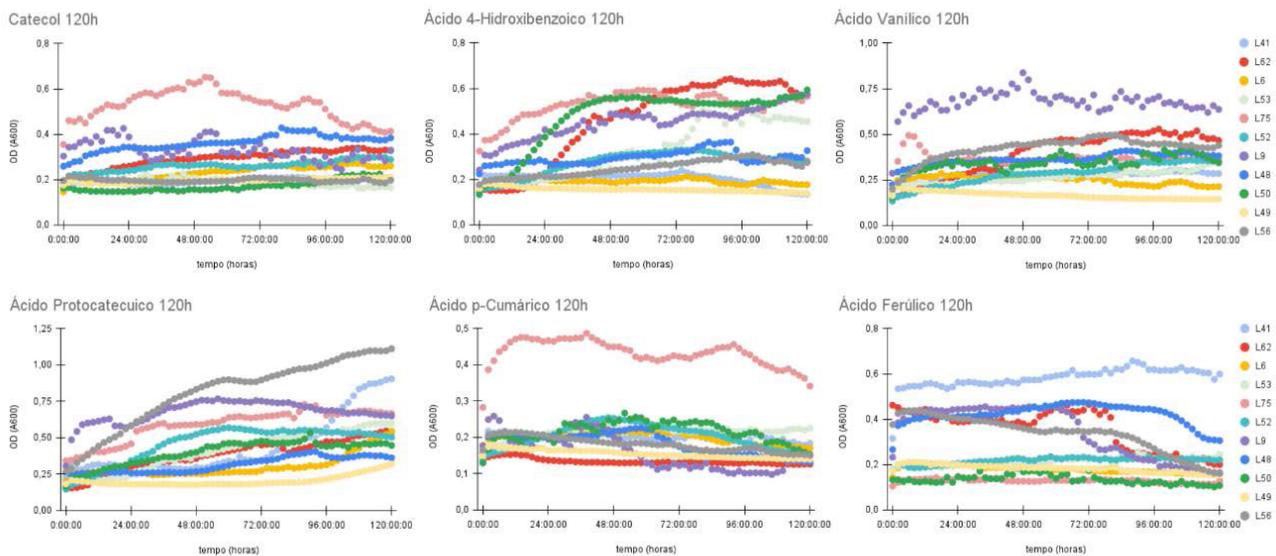


Figura 2. Cinética de crescimento das linhagens em 120h.

A predominância do crescimento das leveduras em determinados meios contendo CADLs, especialmente ácido protocatecuico, está em concordância com o descrito na literatura (Sampaio, 1995). Foi observado durante a realização dos experimentos que diferentes linhagens de uma mesma espécie apresentaram diferentes comportamentos de crescimento, o que pode demonstrar que elas apresentam diferentes fenótipos, o que, por sua vez, pode afetar seu metabolismo.

No estudo, somente foi analisada a capacidade de crescimento das linhagens em CADLs, nas concentrações de 10 mM e 20 mM em microplaca, sendo então de interesse para experimentos posteriores o teste de diferentes concentrações e em maiores volumes, de modo a determinar a concentração ótima, limite e inibitória para o metabolismo das linhagens selecionadas.

Conclusão

Foi possível selecionar três linhagens de leveduras com alto potencial de crescimento nos compostos aromáticos derivados da lignina: ácido protocatecuico, ácido 4-hidroxibenzoico e ácido vanílico. As linhagens selecionadas pertencem a espécies distintas, ressaltando a importância da diversidade genética em estudos de prospecção.

Referências bibliográficas

- ABDELAZIZ, O. Y.; BRINK, D. P.; PROTHMANN, J.; RAVI, K.; SUN, M.; GARCÍA-HIDALGO, J.; SANDAHL, M.; HULTEBERG, C. P.; TURNER, C.; LIDÉN, G.; GORWA-GRAUSLUND, M. F. Biological valorization of low molecular weight lignin. **Biotechnology Advances**, v. 34, n. 8, p. 1318–1346, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2016.10.001>
- ALMQVIST, H.; VERAS, H.; LI, K.; HIDALGO, J. G.; HULTEBERG, C.; GORWA-GRAUSLUND, M.; PARACHIN, N. S.; CARLQUIST, M. Muconic acid production using engineered *pseudomonas putida* kt2440 and a guaiacol-rich fraction derived from kraft lignin. **ACS Sustainable Chemistry & Engineering**, v. 9, n. 24, p. 8097–8106, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.1c00933>
- ASHOKKUMAR, V.; VENKATKARTHICK, R.; JAYASHREE, S.; CHUETOR, S.; DHARMARAJ, S.; KUMAR, G.; CHEN, W.; NGAMCHARUSSRIVICHAI, C. Recent advances in lignocellulosic biomass for biofuels and value-added bioproducts - A critical review. **Bioresource Technology**, v. 344, p. 126195–126195, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.126195>
- CHEN, X.; LI, Z.; ZHANG, X.; HU, F.; RYU, D. D. Y.; BAO, J. Screening of oleaginous yeast strains tolerant to lignocellulose degradation compounds. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 159, n. 3, p. 591–604, 2009. DOI: [10.1007/s12010-008-8491-x](https://doi.org/10.1007/s12010-008-8491-x)
- CHEN, Z.; WAN, C. Biological valorization strategies for converting lignin into fuels and chemicals. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 73, p. 610–621, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.rser.2017.01.166>
- CLAASSEN, P. A. M.; VAN LIER, J. B.; CONTRERAS, A. M. L.; VAN NIEL, E. W. J.; SIJTSMA, L.; STAMS, A. J. M.; DE VRIES, S. S.; WEUSTHUIS, R. A. Utilization of biomass for the supply of energy carriers. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 52, n. 6, p. 741–755, 1999. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s002530051586>. Acesso em: 19 set. 2023.
- IRAM, A.; BERENJIAN, A.; DEMIRCI, A. A review on the utilization of lignin as a fermentation substrate to produce lignin-modifying enzymes and other value-added products. **Molecules**, v. 26, n. 10, 2960, 2021. DOI: <https://doi.org/10.3390/molecules26102960>
- NANDA, S.; AZARGOHAR, R.; DALAI, A. K.; KOZINSKI, J. A. An assessment on the sustainability of lignocellulosic biomass for biorefining. **Renewable & Sustainable Energy Reviews**, v. 50, p. 925–941, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.rser.2015.05.058>
- SAMPAIO, J. P. Utilization of low molecular weight lignin-related aromatic compounds for the selective isolation of yeasts: *Rhodotorula vanillina*, a new Basidiomycetous yeast species. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 17, n. 4, p. 613–619, 1995. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0723-2020\(11\)80083-4](https://doi.org/10.1016/S0723-2020(11)80083-4)
- WENG, C.; PENG, X.; HAN, Y. Depolymerization and conversion of lignin to value-added bioproducts by microbial and enzymatic catalysis. **Biotechnology for Biofuels**, v. 14, n. artigo 84, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1186/s13068-021-01934-w>
- YAEHASHI, J.; KIRBY, J.; ITO, M.; SUN, J.; DUTTA, T.; MIRSIAGHI, M.; SUNDSTROM, E. R.; RODRIGUEZ, A.; BAIDOO, E.; TANJORE, D.; PRAY, T.; SALE, K.; SINGH, S.; KEASLING, J. D.; SIMMONS, B. A.; SINGER, S. W.; MAGNUSON, J. K.; ARKIN, A. P.; SKERKER, J. M.; GLADDEN, J. M. *Rhodospiridium torulooides*: a new platform organism for conversion of lignocellulose into terpene biofuels and bioproducts. **Biotechnology for Biofuels**, v. 10, n. 241, 2017. DOI: [10.1186/s13068-017-0927-5](https://doi.org/10.1186/s13068-017-0927-5)
- YAGUCHI, A.; FRANASZEK, N.; O'NEILL, K.; LEE, S.; SITEPU, I.; BOUNDY-MILLS, K.; BLENNER, M. Identification of oleaginous yeasts that metabolize aromatic compounds. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 47, n. 9-10, p. 801–813, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10295-020-02269-5>



TRABALHOS COMPLETOS

**BIOTECNOLOGIA
INDUSTRIAL**

Avaliação de estratégias de expressão em *Escherichia coli* para produção de amilase de *Paenibacillus barengoltzii*

Augusto Soares Leite Ribeiro¹, Luane Tomé de Paula Campos², Mônica Caraméz Triches Damaso³, Eliane Ferreira Noronha⁴

Resumo

Amilases são hidrolases amplamente utilizadas em processos biotecnológicos, podendo ser aplicadas na indústria alimentícia, produção de biocombustíveis e até mesmo no beneficiamento de tecidos da indústria têxtil. Dessa forma, é notável a necessidade de buscar otimizar a produção dessa enzima em uma escala laboratorial. O presente trabalho busca avaliar condições de cultivo com a bactéria *Escherichia coli* para expressão de amilase de *Paenibacillus barengoltzii*. Com essa finalidade, foram então realizadas quatro condições de expressão com células de *E. coli* BL21 (DE3) AmyPb. As condições se diferem pelo meio utilizado (meio autoindutor com lactose ou meio LB com IPTG) e o tampão de lise (tris-HCl-PMSF ou tampão fosfato). Anteriormente, as condições de expressão utilizavam o meio autoindutor com lactose e tampão tris-HCl-PMSF, gerando atividades enzimáticas relativamente baixas. Mediante o exposto, houve necessidade de buscar alternativas para aprimorar a produção da amilase neste estudo.

Termos para indexação: amilase, meio de cultura, tampão de lise, IPTG, lactose.

Introdução

Atualmente, cerca de 65% das vendas do mercado mundial de enzimas são de amilases (Simair et al., 2017). Na produção têxtil e de papel, as amilases podem ser utilizadas no amaciamento, na modificação, na limpeza e no processo de desengomagem de fibras têxteis (Singh et al., 2016).

O tecido resistente de algodão denim, altamente popular e de aparência versátil, por exemplo, é produzido a partir de fios de algodão que são esticados longitudinalmente na máquina de tecelagem, formando uma base firme para o tecido, denominada urdume (Denin, 2020). Esses fios são dispostos paralelamente uns aos outros e são mantidos tensos durante o processo de tecelagem. Por sua vez, horizontalmente através dos fios do urdume, a “trama” cruza os fios do urdume alternadamente para criar o tecido final. O denim pode ser corado com corantes índigos (geralmente azuis) ou por tramas brancas (Denin, 2020).

A goma (produto à base de amido) é adicionada a esses fios para fornecer uma maior resistência e integridade na tecelagem, impedindo que eles se rompam. Entretanto, a aplicação do amido torna os fios viscosos, e, por essa razão, as amilases, mais precisamente as α -amilases, atuam hidrolisando as ligações α -1,4 presentes no amido da goma, melhorando assim a qualidade do tecido (De Souza; De Oliveira Magalhães, 2010).

O uso de enzimas na indústria têxtil já vem sendo aplicado em vários países. O artigo “Application of enzymes for textile fibers processing” (Araújo et al., 2008) afirma que a necessidade do uso de

¹ Graduando em Biotecnologia, Universidade de Brasília, augusto.leite@colaborador.embrapa.br

² Biotecnologista, mestranda em Biologia Molecular e Beneficiamento de Tecidos, Universidade de Brasília, luane.campos@colaborador.embrapa.br

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

⁴ Bióloga, doutora em Biologia Molecular, Universidade de Brasília, elinoronha@gmail.com

enzimas se dá por vários motivos, e os principais são o consumo de energia e matéria-prima e o uso e descarte de agentes químicos em água, ar e aterros (Araújo et al., 2008).

A bactéria anaeróbica termófila *Paenibacillus barengoltzii* é uma promissora fonte de enzimas termófilas, como é o caso da amilase. As espécies do gênero em questão apresentam características morfológicas e fisiológicas semelhantes às espécies do gênero *Bacillus*, que abrangem uma série de microrganismos envolvidos em aplicações industriais já bem consolidadas, como fonte de enzimas ou sistemas de expressão heteróloga (Läufer, 2017).

Como sistema de expressão da amilase, a bactéria *Escherichia coli* é um organismo adequado por sua facilidade de cultivo e ótima expressão heteróloga de proteínas recombinantes (Gopal; Kumar, 2013; Kaur, Kumar e Kaur, 2017).

Levando em consideração os fatos mencionados, este trabalho consiste em uma avaliação comparativa da atividade enzimática da amilase de *Paenibacillus barengoltzii* expressa em *Escherichia coli* em quatro diferentes condições de expressão. Posteriormente, a amilase será testada em tecidos de algodão para o processo de desengomagem.

Materiais e métodos

Os genes de amilase AmyPb de *Paenibacillus barengoltzii* foram clonados no plasmídeo pET21a e foram expressos em células competentes de *Escherichia coli* BL21 (DE3). As linhagens de *E. coli* BL21 (DE3) com o gene AmyPb e selvagens foram conservadas a -80 °C em criotubos contendo 2 mL de solução de glicerol 25%. Para obter colônias isoladas em placas de Petri estéreis, o meio utilizado foi o Luria-Bertani ágar (Bertani, 1951), tendo seu pH ajustado para 7,0 com solução de NaOH 1 M.

Como marcador de seleção, foi utilizada ampicilina na concentração 1000X (100 mg/mL), visto que o plasmídeo pET21a possui um gene de resistência à ampicilina. As placas contendo 25 mL de meio Luria-Bertani foram inoculadas nas seguintes condições: em duplicata, foram inoculadas, a partir de criotubos, células de *E. coli* BL21 (DE3) selvagens sem ampicilina; células de *E. coli* BL21 (DE3) selvagens com 25 microlitros de ampicilina 1000X; e células de *E. coli* BL21 (DE3) AmyPb com 25 microlitros de ampicilina 1000X.

As placas inoculadas foram incubadas em um *shaker* sem rotação a 37 °C por 18 horas, e posteriormente armazenados a 4 °C. Assim, para realizar um pré-inóculo inicial, foram coletadas colônias isoladas de *E. coli* BL21 (DE3) AmyPb a partir da placa contendo meio LB com ampicilina e inoculadas em 2 Erlenmeyers de 250 mL contendo 30 mL de meio LB líquido e 30 microlitros de ampicilina 1000X.

Os dois pré-inóculos contendo células de *E. coli* com o gene AmyPb em meio LB líquido foram incubados a 37 °C e 200 rpm em um *shaker* por cerca de 16 horas. Seguinte à incubação, foi feita uma leitura de densidade óptica dos pré-inóculos para que o inóculo de indução com IPTG ocorresse com uma densidade óptica inicial de 0,3. Para iniciar a indução, foram inoculados, em cada um dos dois Erlenmeyers contendo 50 mL de meio autoindutor com lactose e antibiótico (Studier, 2005), 2 mL de um dos pré-inóculos. Em outros dois Erlenmeyers contendo 50 mL de meio LB líquido sem lactose, foram inoculados 2 mL do outro pré-inóculo para obter uma densidade óptica inicial de 0,3.

Os dois Erlenmeyers contendo o meio autoindutor com lactose foram incubados no *shaker* a 37 °C e 200 rpm por 24 horas. Para a indução em meio LB sem lactose, os dois Erlenmeyers foram incubando a 200 rpm e 37 °C até obterem uma densidade óptica de 1,3–1,4 (2 horas de incubação). Após se obter essa densidade óptica, foi adicionado ao meio IPTG (isopropil-b-D-1-tiogalactopiranosida) para uma concentração final de 0,75 mmol/L. Os dois cultivos em meio LB contendo IPTG

foram incubados por mais 3 horas (5 horas no total). Após o cultivo, todos os meios foram armazenados em câmara fria a 4 °C.

Para se obter o extrato contendo a amilase de interesse, as células de *E. coli* foram coletadas por centrifugação (18.500 g/4 °C/20 minutos) utilizando-se Falcons de 50 mL e posteriormente descartando o sobrenadante. Em seguida, foi necessário gerar a lise das células por sonicação utilizando-se tampões de lise. Os tampões utilizados foram o tampão fosfato 20 mmol/L pH 7,4, NaCl 500 mM e o tampão 50 mM Tris-HCl pH 7,5, 5 mM EDTA pH 8 e 1 mM PMSF. Foram utilizados 10 mL de cada tampão de lise a cada 50 mL de cultivo. A sonicação ocorreu na amplitude de 35%, *pulse on* 15 segundos, *pulse off* 15 segundos, por 3 minutos.

Finalizando a sonicação, o produto da lise nos Falcons de 50 mL foi coletado e clarificado por centrifugação (18.500 g/4 °C/20 minutos).

Os ensaios de atividade de hidrólise do amido foram realizados por leitura de absorbância, segundo o método de FUWA (1954). O ensaio de atividade consistiu na adição de 50 microlitros de substrato amido 0,5%, 50 microlitros do extrato enzimático e 100 microlitros de tampão fosfato de sódio pH 6,5 50 mM, deixando incubar a 40 °C por 15 minutos. Em seguida, foram adicionados 200 microlitros de ácido acético para parar a reação e 200 microlitros do reagente FUWA. O iodeto presente no reagente de FUWA forma um complexo com o amido, escurecendo a solução. A concentração do complexo amido-iodeto foi lida por um espectrofotômetro na absorbância de 660 nanômetros. Quanto mais clara a solução, menor é a concentração do complexo e maior é a atividade da enzima.

Resultados e discussão

Nas placas de Petri inoculadas, não foi observado crescimento das células de *E. coli* selvagens nos meios com ampicilina. Todavia, as células de *E. coli* com o gene de resistência à ampicilina do plasmídeo pET21a cresceram no meio com ampicilina.

O extrato enzimático foi diluído em 10 vezes e 100 vezes para realizar a comparação, pois nas quatro condições de expressão havia total consumo do substrato amido utilizando o extrato não diluído. Os resultados obtidos no gráfico (Figura 1) foram calculados pela fórmula $(D0-D)$, em que D0 é o valor da média da absorbância dos controles e D é o valor da média dos ensaios. O controle apresenta a coloração mais escura, visto que, com a ausência da enzima, o reagente FUWA consegue interagir com praticamente todo o amido. Os resultados apresentados demonstram como a indução com o IPTG aumentou a atividade do extrato enzimático, e como a escolha do tampão de lise não afetou a atividade de hidrólise do amido significativamente.

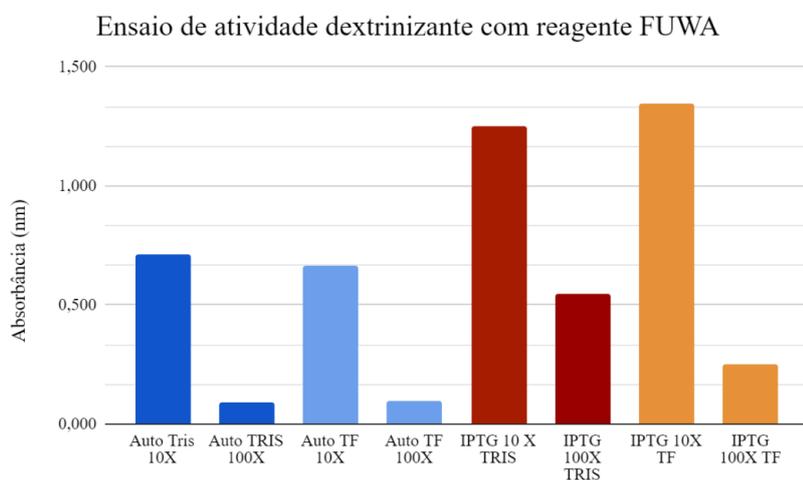


Figura 1. Ensaio de absorbância a 660 nanômetros do extrato enzimático nas diferentes condições de expressão: azul-escuro (meio autoindutor/tampão Tris-HCl-PMSF), azul-claro (meio autoindutor/tampão fosfato), vermelho (meio LB com IPTG/TRIS) e laranja (meio LB com IPTG/tampão fosfato).

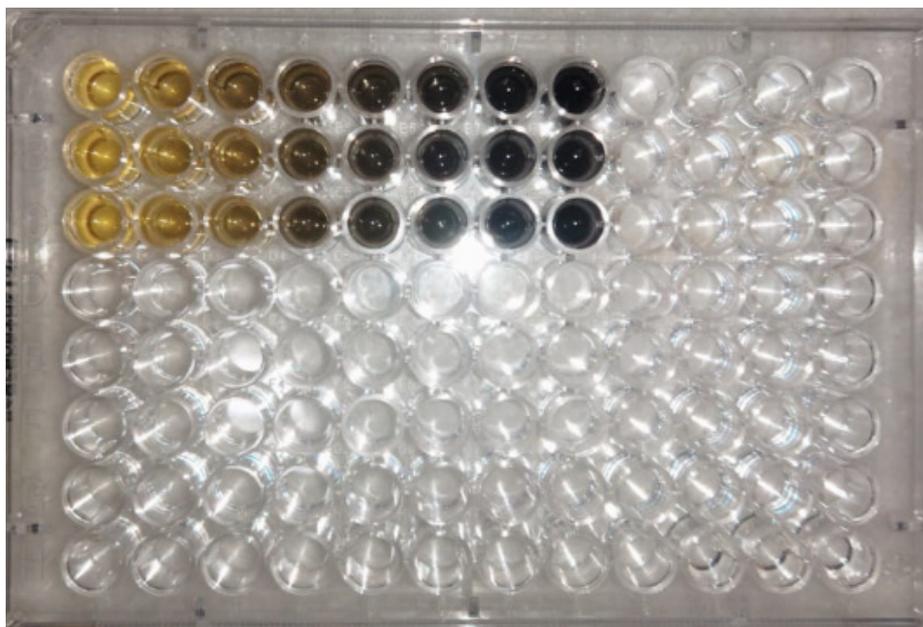


Figura 2. Gradiente de cores utilizando o reagente FUWA sem a amilase em concentrações crescentes de amido 0,5% da esquerda (mais claro) para direita (mais escuro).

Conclusão

A atividade da enzima amilase expressa foi analisada nas quatro condições de expressão, utilizando-se o ensaio de absorvância com reagente de FUWA. Entretanto, há claramente uma necessidade de realizar mais ensaios com a finalidade de quantificar a atividade de hidrólise de amido pela enzima, e também fazer a contagem de proteínas totais por BCA, fazer comparação entre os cultivos por eletroforese em gel SDS-page e futuramente fazer a aplicação da enzima na desengomagem do jeans. O presente trabalho está analisando quatro condições de cultivo para obtenção da amilase em escala laboratorial, visto que o IPTG não é popularmente utilizado em escala industrial como um indutor, por seu alto custo.

Verificou-se que independentemente dos tampões de lise utilizados para extrair a enzima, a indução por IPTG foi mais eficaz para obtenção de maiores atividades enzimáticas se comparada à lactose. Ademais, foi possível observar uma maior atividade da enzima na condição de cultivo com o indutor IPTG em apenas 5 horas de incubação e OD inicial de 0,3, em comparação com a indução em meio autoindutor com lactose e incubação por 24 horas.

Referências bibliográficas

- ARAÚJO, R.; CASAL, M.; CAVACO-PAULO, A. Application of enzymes for textile fibres processing. *Biocatalysis and Biotransformation*, v. 26, n. 5, p. 332-349, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/10242420802390457>. Acesso em: 7 ago. 2023.
- BERTANI, G. Studies on lysogenesis I. *Journal of Bacteriology*, v. 62, n. 3, p. 293-300, 1951.
- DE SOUZA, P. M.; DE OLIVEIRA E MAGALHÃES, P. Application of microbial α -amylase in industry: a review. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 41, n. 4, p. 850-861, 2010.
- DENIN. In: DENINHUNTERS. Horsholm, Demark, 2020. Disponível em: <https://denimhunters.com/denim-wiki/denim-explained/denim/>. Acesso em: 6 Ago. 2023.
- GOPAL, G. J.; KUMAR, A. Strategies for the production of recombinant protein in *Escherichia coli*. *Protein Journal*, v. 32, n. 6, p. 419-425, 2013.
- KAUR, J.; KUMAR, A.; KAUR, J. Strategies for optimization of heterologous protein expression in *E. coli*: Roadblocks and reinforcements. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 106, p. 803-822, 2017.

- LÄUFER, A. Starch biorefinery enzymes. In: WAGEMANN, K.; TIPPKÖTTER, N. (Ed.). **Biorefineries**. Berlin: Springer, 2017. p. 137-152. (Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology, 166).
- MANGRIO, G. S.; LU, C.; RAVINDRA, N. Production and partial characterization of α -amylase enzyme from *Bacillus* sp. BCC 01-50 and potential applications. **BioMed Research International**, v. 2017, 2017. 9173040-9.
- MARYAN, A. S.; MONTAZER, M. A cleaner production of denim garment using one step treatment with amylase/cellulase/laccase. **Journal of Cleaner Production**, v. 57, p. 320-326, 2013. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S095965261300379X?via%3Dihub>. Acesso em: 7 ago. 2023.
- SIMAIR, A. A.; QURESHI, A. S.; KHUSHK, I.; ALI, C. H.; LASHARI, S.; BHUTTO, M. A.;
- SINGH, R.; KUMAR, M.; MITTAL, A.; METTA, P. K. Microbial enzymes: industrial progress in 21st century. **3 Biotech**, v. 6, n. 2, 2016. 174.
- 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. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.pep.2005.01.016>. Acesso em: 6 Ago. 2023.
- SUZUKI, E.; SUZUKI, R. Distribution of glucan-branching enzymes among prokaryotes. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 73, n. 14, p. 2643-2660, 2016.

Comparativo metodológico na produção de espidroínas sintéticas de aranhas da biodiversidade brasileira em bactérias

Valquíria Alice Michalczechen Lacerda¹, Gleiciane Pinheiro de Sousa², Grácia Maria Soraes Rosinha³, Elíbio Leopoldo Rech Filho⁴, João Ricardo Moreira de Almeida⁵, Daniela Matias de Carvalho Bittencourt⁶

Resumo

As proteínas de seda de aranha (espidroínas) são consideradas um material ideal para a produção de biomateriais inovadores com diferentes aplicações biotecnológicas. Dessa forma, diferentes grupos de pesquisa e a indústria têm investido na otimização de sistemas heterólogos de produção, com o objetivo de aumentar a eficiência da produção de espidroínas sintéticas. Assim, procurou-se avaliar dois métodos para a indução da expressão de cinco espidroínas sintéticas distintas em bactéria *Escherichia coli*, a expressão por autoindução e pela adição de IPTG no meio de cultivo. Para tal, ela foi cotransformada com um plasmídeo que adapta o metabolismo da bactéria para a produção de espidroínas, e um plasmídeo para expressão das espidroínas. Essas proteínas foram moduladas de acordo com as espidroínas de aranhas da biodiversidade brasileira, *Parawixia bistriata* e *Nephilengys cruentata*. Após o crescimento do pré-inóculo bacteriano, uma alíquota foi induzida com IPTG e por autoindução (n=3). Ao final, a OD600 e o pH foram adquiridos e as amostras foram precipitadas. As proteínas extraídas foram analisadas qualitativamente por SDS-PAGE, e identificadas por *Western blot*. Nos dois métodos, o pH não foi um fator limitante para o crescimento bacteriano. A indução com IPTG produziu três espidroínas avaliadas, enquanto o processo da autoindução produziu todas as cinco proteínas. Nesse caso, o protocolo da autoindução teve uma eficiência maior quando comparado à indução com IPTG para a produção em *E. coli* de diferentes espidroínas sintéticas de aranhas da biodiversidade brasileira.

Termos para indexação: *Parawixia bistriata*, *Nephilengys cruentata*, MaSp, Flag, autoindução, IPTG.

Introdução

As sedas de aranha apresentam biocompatibilidade, biodegradabilidade e possuem excelentes propriedades mecânicas, como elasticidade e resistência, ao mesmo tempo. Estes biopolímeros são constituídos por proteínas (espidroínas) compostas por três regiões específicas: regiões N (1) e C (2) terminal conservadas, e uma região modular altamente repetitiva (3). Esta é composta por grande quantidade de aminoácidos alanina (A), glicina (G) e prolina (P). Dentre as sedas que a aranha produz, as da glândula ampolada maior são as mais resistentes, sendo formada por espidroínas do tipo MaSp1 e MaSp2. A região modular da MaSp1 é composta por regiões de polialanina (A/GA) e poliglicina GGX (X=aminoácido Y, L ou Q). As sequências de poli-A e poli-GA proporcionam estruturas secundárias do tipo folhas-beta na proteína, enquanto os domínios GGX formam uma hélice 3_{10} . Já a região modular da MaSp2 é formada por regiões de poli-A, poli-GA e domínios GPGGX. Em relação

¹ Bióloga, doutora em Biologia Molecular, Universidade de Brasília, pós-doutora da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, valquiria.michalczechen@gmail.com

² Engenheira de bioprocessos e biotecnologia, mestra em Biotecnologia, Universidade Federal do Tocantins, sousanebio@gmail.com

³ Engenheira-agrônoma, doutora em Bioquímica e Imunologia, pesquisadora da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, gracia.rosinha@embrapa.br

⁴ Engenheiro-agrônomo, doutor em Life Sciences, pesquisador da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, elibio.rech@embrapa.br

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

⁶ Médica-veterinária, doutora em Biologia Molecular, pesquisadora da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, daniela.bittencourt@embrapa.br

às espidroínas Flag, da glândula Flageliforme, elas produzem uma seda altamente elástica, pela estruturação das regiões espaçadoras, GPGXX e GGX (Tokareva et al., 2014).

No entanto, na natureza, a aranha produz quantidade insuficiente desse recurso natural para o desenvolvimento de biomateriais. Assim, nas últimas décadas, diferentes grupos de pesquisa desenvolveram várias maneiras de produzir espidroínas sintéticas usando bactérias, plantas, bichos-da-seda, leveduras e até cabras geneticamente modificadas (Bittencourt et al., 2022). Apesar de alguns desses sistemas heterólogos de produção não serem escalonáveis, métodos como a fermentação com bactérias e leveduras estão sendo usados por empresas como a Spiber, a AMSilk e a Bolt Thread.

Por causa do potencial de aplicação inovador que os biopolímeros sintéticos de sedas de aranhas apresentam, é eminente a necessidade de aprimorar a sua produção por métodos fermentativos. Por consequência, a maioria dos grupos de pesquisa utiliza isopropil β -D-1-tiogalactopiranosídeo (IPTG), um indutor artificial que mimetiza a ação da lactose, que desencadeia a transcrição do *operon lac* e, portanto, é usado para induzir a expressão de proteínas onde o gene está sob o controle desse operador. No entanto, Studier (2014) descreveu um protocolo de autoindução, com potencial para produção de diversas proteínas em alta densidade. Uma das vantagens desse método é não depender de IPTG para a produção das proteínas heterólogas, que é um componente não biodegradável e oneroso (Edlund et al., 2016). Portanto, este trabalho teve por objetivo comparar os métodos de expressão por autoindução com o do IPTG em bactéria *E. coli*, na produção de diferentes espidroínas sintéticas, baseadas nas diferentes proteínas de seda de aranhas da biodiversidade brasileira, *Parawixia bistriata* e *Nephilengys cruentata*.

Materiais e métodos

O metabolismo de bactéria *E. coli* foi modificado por meio da construção de um plasmídeo pTetgly2glyA (XIA et al., 2010). Ele contém duas cópias do gene *glyVXY* e uma cópia do gene *glyA* (GenBank AC_000091.1) da bactéria W3110, que foram introduzidos no plasmídeo pACYC184. Esses genes são responsáveis pelo aumento da disponibilidade de glicil-tRNA e aminoácido glicina, respectivamente.

Os módulos referentes às espidroínas foram identificados a partir da construção de uma biblioteca de cDNA em um estudo anterior (PI 0701826-6; US 10,889,624). Os genes das espidroínas sintéticas foram construídos por engenharia modular utilizando as espidroínas MaSp1 e MaSp2 da aranha do cerrado *P. bistriata* até atingirem 8 módulos a 16 módulos para a MaSp2, e 4 módulos a 8 módulos para a MaSp1+2 (Michalczechen-Lacerda, 2015). Posteriormente, esses genes foram inseridos no plasmídeo de expressão pET28a. O gene referente à espidroína sintética Flag2222, da aranha *N. Cruentata*, da Mata Atlântica, foi sintetizado no mesmo plasmídeo pela empresa *Epoch Life Science*. Nesse processo, a sequência do DNA foi adaptada ao códon de bactéria, contendo uma cauda de dez aminoácidos histidina na porção N-terminal.

Após a transformação dos plasmídeos em *E. coli* BL21(DE03) e pré-inóculo em 3 mL de meio de cultivo, uma alíquota de 0,1 mL foi transferida para 10 mL de cada meio de indução (n=3), e foi cultivada em tubos de 50 mL a 37 °C a 250 rpm. No caso do método com IPTG, assim que a OD600 chegou a 1,0, adicionou-se 1 mM do indutor, permanecendo por 4 horas (Teulé et al., 2009). Já no caso da autoindução, as células cresceram em meio ZYM-5052 por 4 horas a 37 °C, 250 rpm. Assim que a OD600 chegou a 0,6–0,8, a temperatura foi alterada para 18 °C, permanecendo por 48 horas, sob a mesma agitação (Studier, 2014). Ao final, a OD600 e o pH foram medidos, e todas as amostras foram precipitadas com centrifugação, sendo congeladas para processamento posterior.

Após o descongelamento da biomassa, ela foi diluída em 500 μ L de solução tampão de lise (Tris- HCl 50 mM pH 10,0, NaCl 10 mM, $MgCl_2$ 10 mM) contendo lisozima 200 μ g/mL por 30 min. Após aquecimento a 95 °C por 60 min, os tubos foram centrifugados a 13.148 $\times g$ por 15 min. O sobrenadante contendo o extrato proteico total foi transferido para outro tubo e a proteína total foi quantificada por absorbância a 280 nm em espectrofotômetro. A detecção das espidroínas produzidas ocorreu por *Western blot*, utilizando-se um anticorpo comercial contra cauda de histidina conjugado com fosfatase alcalina (A5588, Sigma Aldrich).

Resultados e discussão

As espidroínas sintéticas avaliadas neste experimento são compostas predominantemente pelos aminoácidos glicina, alanina e prolina, os quais representam mais do que 70% da sua estrutura. Portanto, os genes referentes à engenharia metabólica da bactéria são responsáveis por aumentar a disponibilidade dos RNA transportador de glicina do tipo VXY (*glyVXY*), e da enzima serinametiltransferase (*glyA*), que metaboliza a serina em glicina. Isso se fez necessário, uma vez que as espidroínas de aranhas são constituídas de módulos repetitivos, ricos em glicina, apresentando uma composição diferenciada quando comparada às outras proteínas na natureza

A referência de crescimento foi estabelecida pelos valores de OD600 (Figura 1, A e B). No método com IPTG, as células ficaram sob indução por 4 horas, e apresentaram um crescimento menor (Figura 1A) quando comparado ao método da autoindução, que permaneceu em cultivo por 48 horas (Figura 1B). A bactéria que produziu a MaSp1+2 4 \times teve o menor crescimento, média da OD600 igual a 0,93, enquanto a que continha o dobro desse mesmo módulo (MaSp1+2 8 \times) obteve o maior crescimento, média de OD600 igual a 3,73 (Figura 1A). Quando se observam os resultados pela autoindução, o controle negativo foi que apresentou o menor crescimento, média de 3,8, enquanto a bactéria responsável por produzir a MaSp2 8 \times obteve a maior média de OD600, com 6,67. Em relação aos valores de pH, por estarem próximos ao pH neutro, ou levemente ácidos ($\geq 6,0$), pode-se dizer que eles são compatíveis com o crescimento das células (colunas laranjas na Figura 1). Normalmente, sistemas de expressão cultivados que resultam em pH ácidos ($\leq 5,5$) impedem o crescimento das bactérias (Studier, 2005).

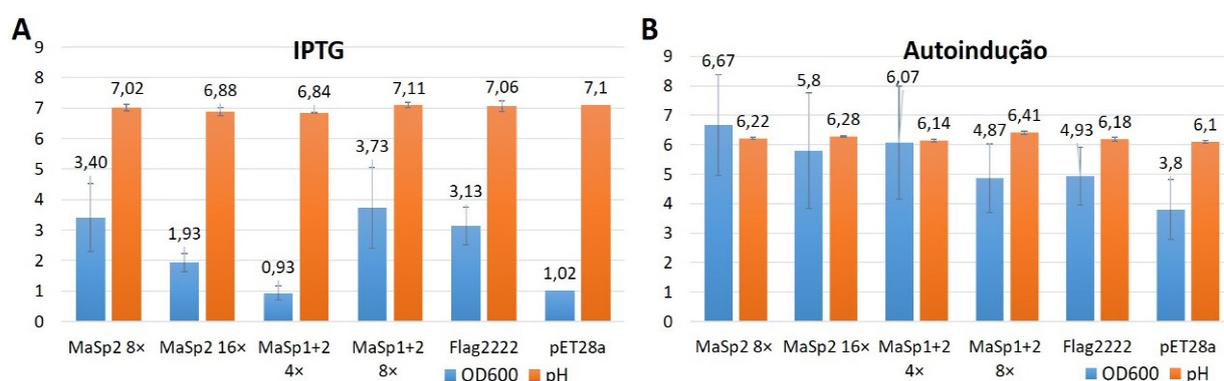


Figura 1. Gráficos representativos dos valores referentes à OD600 (colunas azuis) e ao pH (colunas laranjas) após o cultivo de bactérias para a produção de espidroínas. A) Indução por IPTG. B) Protocolo de autoindução.

Como cada bactéria apresentou um perfil de crescimento específico, os valores referentes à quantificação de proteína do extrato proteico bruto foram normalizados pelos valores de OD600 igual a 1 (menor taxa de crescimento observada) (Figura 2). Estabelecido isso, é possível verificar que os valores médios da quantificação de extrato proteico total para o cultivo com IPTG mantiveram

um perfil bem específico para cada espidroína (Figura 2A). Já no processo da autoindução, os valores de rendimento proteico total estão próximos, com exceção da amostra MaSp1+2 8x, que obteve um rendimento maior (Figura 2B). Esses resultados mostram que o rendimento proteico total não teve relação direta com a composição ou o tamanho da espidroína sintética produzida.

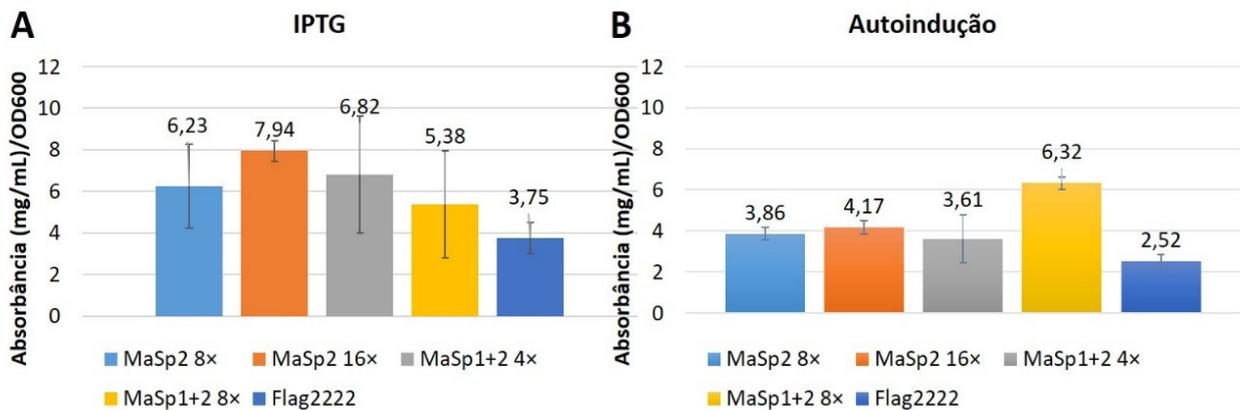


Figura 2. Gráficos representativos dos valores referentes à razão do quantitativo do extrato proteico total pela OD600 (=1). A) Resultados obtidos com indução por IPTG. B) Resultados obtidos com protocolo de autoindução.

Posteriormente, a produção das espidroínas sintéticas foi confirmada por *Western blot* em amostras do extrato proteico bruto. A produção das espidroínas com IPTG foi confirmada para as três espidroínas, MaSp2 8x, MaSp2 16x e Flag2222. Já as outras duas espidroínas, MaSp1+2 4x e MaSp1+2 8x, não apareceram nas três réplicas (Figura 3A), sinalizando a não produção dessas espidroínas com IPTG. No que se refere ao método da autoindução, as cinco espidroínas (MaSp2 8x, MaSp2 16x, MaSp1+2 4x, MaSp1+2 8x e Flag2222) foram identificadas nas três réplicas (Figura 3B). Como esperado, não foram identificadas proteínas no controle negativo nos dois métodos (Figura 3 A e B). A massa molecular de cada espidroína sintética é de ~28 kDa para a MaSp2 8x; para a MaSp2 16x é de ~54 kDa; para a MaSp1+2 4x é ~40 kDa; a MaSp1+2 8x é de ~77 kDa; e, a menor dentre elas, para a Flag2222 a massa é de ~22 kDa.

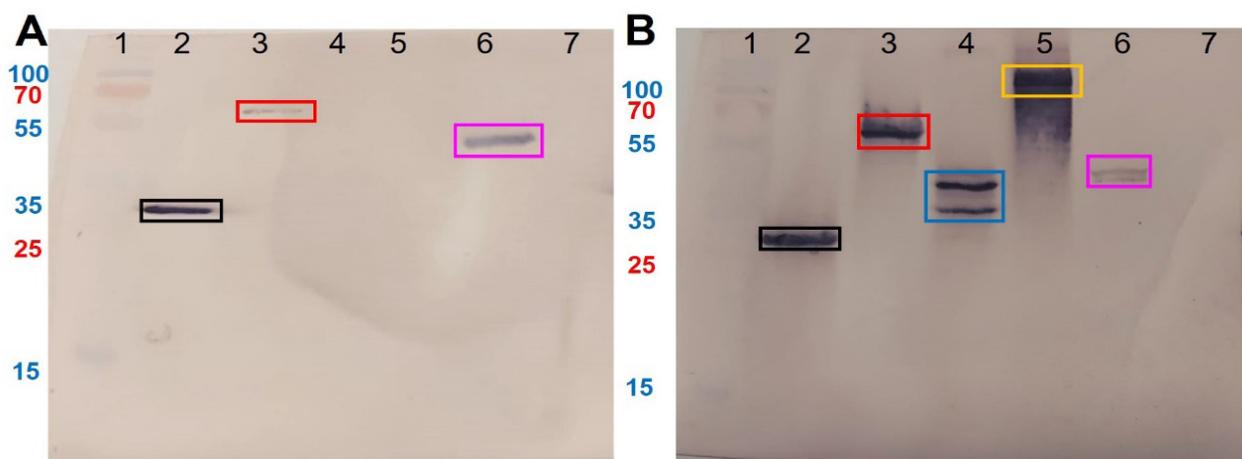


Figura 3. Fotografia representativa do resultado da análise por *Western blot* utilizando anticorpo contra *histag*. A) Indução com IPTG. B) Autoindução. 1) *PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder* (26619 Thermo Scientific). 2) MaSp2 8x (28 kDa). 3) MaSp2 16x (54 kDa). 4) MaSp1+2 4x (40 kDa). 5) MaSp1+2 8x (77 kDa). 6) Flag2222 (22 kDa). 7) Controle negativo.

Como foram utilizadas as mesmas bactérias e os mesmos plasmídeos para as duas metodologias, pode-se dizer que neste estudo o processo de autoindução apresentou uma eficiência maior em relação à diversidade de produção de espidroínas, quando comparado ao método de indução com IPTG. Isso aconteceu porque o processo da autoindução possibilitou a produção de todas as espidroínas avaliadas, enquanto a indução com IPTG produziu apenas três.

Conclusão

A expressão de espidroínas sintéticas pelo protocolo de autoindução em *E. coli* produziu todas as cinco construções avaliadas, enquanto o protocolo com indução por IPTG só conseguiu produzir três delas. Neste caso, houve uma limitação pela indução por IPTG, mesmo com as bactérias apresentando metabolismo adaptado para a produção dessas proteínas. Dessa forma, este trabalho mostra a variabilidade de diferentes métodos na produção de espidroínas sintéticas em tamanhos e composições distintos, que ainda precisam ser investigados quanto ao rendimento. A utilização do método de autoindução, em substituição ao método de indução da expressão por IPTG, tem a capacidade de tornar o processo de produção de espidroínas mais viável para a indústria, por ser um processo mais sustentável e com menor custo. Este trabalho foi financiado pela Fundação de Apoio a Pesquisa do Distrito Federal (FAP-DF), processo #00193-00001028/2021-41

Referências bibliográficas

- BITTENCOURT, D. M. de C.; OLIVEIRA, P.; MICHALCZECHEN-LACERDA, V. A.; ROSINHA, G. M. S.; JONES, J. A.; RECH, E. L. Bioengineering of spider silks for the production of biomedical materials. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 10, 2022. 958486.
- EDLUND, A.; LEWIS, R.; JONES, J.; QUINN, J. C. Optimization of *E. coli* fermented synthetic spider silk for commercial viability. In: TECHCONNECT BRIEFS. **Materials for energy, efficiency and sustainability**. Washington, 2016. p. 126-129.
- MICHALCZECHEN-LACERDA, V. A. **Produção de proteínas MaSp da Aranha *Parawixia bistriata* por bactérias modificadas metabolicamente, e caracterização molecular das fibras sintéticas**. 2015. Tese (Doutorado em Biologia Molecular) - Instituto de Biologia Celular, Universidade de Brasília, Brasília, DF.
- 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.
- TEULÉ, F.; COOPER, A. R.; FURIN, W. A.; BITTENCOURT, D.; RECH, E. L.; BROOKS, A.; LEWIS, R. V. A protocol for the production of recombinant spider silk-like proteins for artificial fiber spinning. **Nature Protocols**, v. 4, n. 3, p. 341-355, 2009.
- TOKAREVA, O.; MICHALCZECHEN-LACERDA, V. A.; RECH, E. L.; KAPLAN, D. L. Recombinant DNA production of spider silk proteins. **Microbial Biotechnology**, v. 6, n. 6, p. 651-663, 2013.
- XIA, X.X., QIAN, Z. G.; KI, C. S.; PARK, Y. H.; KAPLAN, D. L.; LEE, S. Y. Native-sized recombinant spider silk protein produced in metabolically engineered *Escherichia coli* results in a strong fiber. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 107, n. 32, p. 14059-14063, 2010.

Desafios da operacionalização do biorreator com inóculo mesofílico

Felipe Orcelli Wojcieckowski¹, Rafael Moreira Marques², Jhenifer Aline Bastos³, Gabriel de Szechy Vigna⁴, Rossano Gambetta⁵

Resumo

O desenvolvimento do processo de biodigestão com foco em resíduos agropecuários é uma forma de gerar renda no campo, ao gerar energia e fertilizante, e ao mesmo tempo destinar de forma ambientalmente correta os resíduos gerados em suas atividades, inserindo-se na bioeconomia e na descarbonização da economia. Contudo, para a realização de estudos de biodigestão, são importantes a origem e a reprodutibilidade do inóculo utilizado nos experimentos. Nesse contexto, foi necessário montar e operacionalizar um biodigestor para produção de inóculo de 160 L, com 120 L de inóculo inicialmente composto por digestato de biodigestor oriundo da suinocultura (80%) e de dejetos brutos bovinos (20%). Na operação desse biodigestor, foi implementada uma série de métodos para acompanhar as variáveis de processo relevantes, tais como pH, alcalinidade, sólidos voláteis, sólidos totais, demanda química de oxigênio, nitrogênio total Kjeldahl, nitrogênio amoniacal e produção de metano, para assim assegurar uma operação contínua e estável do processo de biodigestão.

Termos para indexação: biodigestor, inóculo, monitoramento.

Introdução

À medida que a população humana cresce, também aumenta a demanda energética necessária para suprir suas atividades, sendo um grande exemplo disso a primeira revolução industrial, que junto com seus avanços tecnológicos também necessitou do uso de grandes quantidades de energia, nesse contexto, principalmente advinda do carvão. Assim sendo, essa maior demanda de energia leva a um maior risco de crise energética e a uma crise ambiental, visto que mais de 85% da energia utilizada pelo mundo é derivada de fontes fósseis (Bertolo et al., 2022), contribuindo para o aumento do efeito estufa, e conseqüentemente para o aquecimento global, por causa das emissões de gás carbônico (CO₂).

Dessa forma, muito esforço de pesquisa tem sido dado ao uso das energias renováveis, ou seja, energias que possuem um ciclo fechado de carbono, reduzindo emissões de CO₂. Um exemplo desse tipo de energia renovável é o biogás. Ele é oriundo da biodigestão de biomassa residual ou cultivada de forma dedicada para esse uso, por exemplo, a torta de filtro e vinhaça, da cadeia produtiva do etanol. A biodigestão ocorre pela ação de microrganismos, que consomem a biomassa, liberando o biogás, que contém metano e pode ser usado para geração de energia elétrica ou como biocombustível (Milanez et al., 2018). Essa fonte de energia é considerada privilegiada (Vieira; Polli, 2020).

Nesse contexto, a Embrapa Agroenergia deu início ao estudo sobre biogás a partir da montagem e do monitoramento de um reator de 160 L, tendo em vista os parâmetros de pH, alcalinidade, sólidos voláteis, sólidos totais, demanda química de oxigênio, nitrogênio total Kjeldahl, nitrogênio amoniacal e produção de metano. Esse reator contém um inóculo, amostra de matéria orgânica que

¹ Químico Tecnológico, Universidade de Brasília, felipe.orcelli@colaborador.embrapa.br

² Químico Tecnológico, Universidade de Brasília, rafael.marques@colaborador.embrapa.br

³ Engenheira ambiental, doutoranda em Sustentabilidade Ambiental Urbana, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, jhenifer.bastos@colaborador.embrapa.br

⁴ Graduando em Engenharia Mecatrônica, Universidade de Brasília, gabriel.vigna@colaborador.embrapa.br

⁵ Engenheiro químico, doutor em Ciência em Engenharia Química, Embrapa Agroenergia, rossano.gambetta@embrapa.br

contém uma microbiota responsável pelo consumo de biomassa, a fim de produzir biogás, composto por digestato de biodigestor de suinocultura (80%) e de dejetos brutos bovinos (20%).

Materiais e métodos

O biodigestor foi alimentado três vezes na semana com um blend nutritivo constituído por proteína de soja, flocão de milho, óleo de soja e água destilada, respectivamente nas quantidades de 19,20 g, 52,33 g, 13,92 g e 432 mL. A respeito do método de alimentação em si, primeiramente é adicionado ao blend nutritivo uma porção do inóculo, retirada na hora através da saída do reator. Após serem misturados, são despejados no reator através de sua entrada. Em seguida, retira-se mais uma porção do inóculo para que também seja despejada pela entrada do reator. Dessa vez, ele se encontra puro e não em mistura com o blend nutritivo, para que por fim se repita o processo pela terceira vez, não só alimentando o sistema, mas também permitindo uma homogeneização maior do inóculo no reator, além da gerada pelo seu sistema de agitação.

Sobre o monitoramento do reator, foram adotados como parâmetros: alcalinidade e acidez total, demanda química por oxigênio (DQO), teor de sólidos totais (ST) e voláteis (SV), pH, teor de proteínas, amônia livre, teor de ácidos graxos voláteis (AGVs) e composição do gás gerado (Ripley et al., 1986; American Public Health Association, 2005; Association of Official Analytical Chemists, 1990; De Prá, 2013; Mesquita et al., 2013). Assim, acompanhou-se semanalmente o comportamento relativo à microbiota, sendo todas as análises feitas uma vez na semana. Ressalta-se que a escolha de tais parâmetros se deu a partir do estudo realizado por Kunz et al. (2019).

A análise de composição do gás gerado é realizada por meio da análise da amostra de gás, coletada na sua respectiva saída no reator, utilizando-se uma bag de amostragem gasosa, por um cromatógrafo gasoso Shimadzu GC-2014, o qual opera através de uma injeção manual de 1 mL de loop a 150 °C por duas linhas TCD a 180 °C. A primeira linha trata-se de uma coluna PorapakN 2 m x 3 mm, utilizando um fluxo 35 mL/min de hélio como gás de arraste. Já a segunda refere-se a uma coluna Carboxen 1000 4,6 m x 2,1 mm, utilizando fluxo de 45 mL/min de nitrogênio como gás de arraste, e que possui um backflush Haysep P 1 m x 3 mm, enquanto a coluna fixa a temperatura de 40 °C por 1 min para em seguida executar uma rampa de aquecimento de 20 °C/min até atingir 150 °C, os quais são mantidos por 8,5 min assim totalizando 15 minutos de corrida.

Resultados e discussão

A alcalinidade total é um indicador para avaliar a estabilidade do reator durante o processo de biodigestão, que, por meio da presença de carbonatos, bicarbonatos e hidróxidos, apresenta um efeito tampão para evitar a variação brusca do pH. Buscando na literatura, recomenda-se que esse indicador seja na faixa de 2.500 mg a 5.000 mg CaCO₃/L (Kunz et al., 2019) e que a relação de alcalinidade intermediária e parcial (AI:AP) esteja entre 0,3 e 0,4 (Kunz et al., 2019). Na Figura 1A, é possível observar que o valor de AT inicialmente estava elevado, porém, a partir da semana de 21 de novembro, passou a condizer com o esperado pela literatura, mantendo-se nesse patamar no decorrer das semanas, apesar de esporadicamente ultrapassar o valor de 5.000 mg. Isso é refletido na estabilização do pH em valores propícios à atividade microbiana desejada. Em contrapartida, a relação AI:AP (Figura 1A) apresenta uma razão menor do que a recomendada, indicando que o reator opera em subcarga. Apesar disso, a alimentação não foi alterada, uma vez que o biodigestor tem como função produzir inóculo, ou seja, sua função principal é manter a microbiota viva e ativa. Caso o reator estivesse tendo uma alimentação com uma carga adequada, o inóculo levado a outros

experimentos ainda carregaria consigo um potencial de produção de biogás, interferindo no próprio experimento.

Por sua vez, os parâmetros de DQO e teor de sólidos totais e voláteis têm como intuito avaliar a quantidade de matéria orgânica presente no reator, sendo o primeiro mais específico em relação à quantidade de carga orgânica, enquanto o segundo, além de apresentar a quantidade de carga orgânica, embora menos precisa (Meegoda et al., 2018), também mostra o seu perfil em relação à umidade. Na Figura 1B, pode ser observado que a DQO apresentou um comportamento em que o valor de concentração de matéria orgânica cresce até um determinado pico para em seguida decrescer a um valor baixo e assim crescer novamente repetindo o comportamento. Isso se dá porque com o passar das semanas ocorreu o acúmulo de matéria orgânica de digestão mais demorada, que com o tempo começou a ser digerida, assim, refletindo na diminuição das concentrações. Nota-se que essa digestão é auxiliada pela homogeneização de inóculo citada anteriormente.

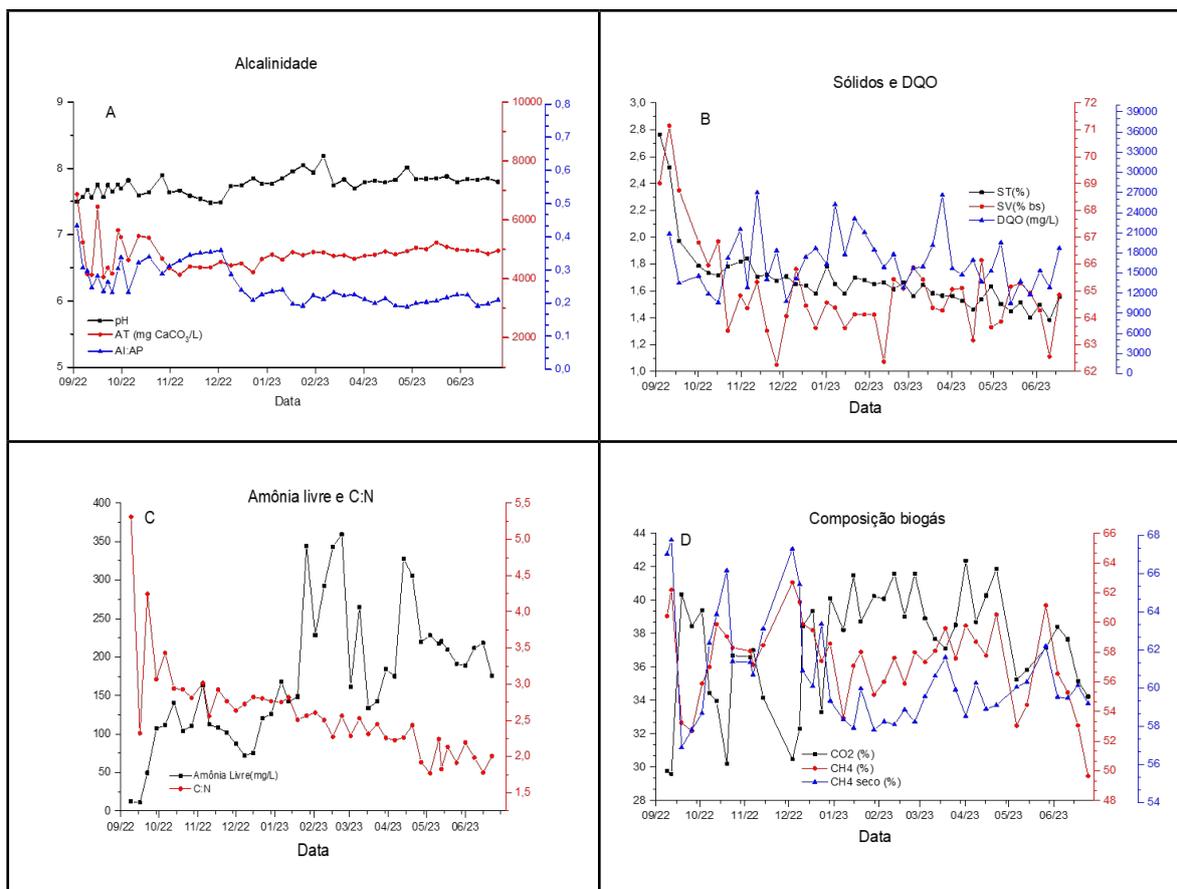


Figura 1. Principais variáveis acompanhadas na operação do biodigestor: (A) Análise de alcalinidade. (B) Análise de sólidos e DQO. (C) Amônia livre (mg/L) e relação carbono:nitrogênio (C:N). (D) Composição do biogás. O tempo total apresentado foi de 287 dias.

Pela análise de sólidos (Figura 1B), é possível observar mais uma vez a estabilidade do sistema ao mostrar poucas variações entre os resultados. Além disso, demonstra que o perfil tratado, o inóculo, apresenta uma alta umidade, sendo que tal constituição se dá graças ao teor de sólidos totais e voláteis de cada componente da alimentação, e de maneira igual sua carga orgânica, as quais foram estudadas de modo a garantir a atividade da microbiota presente no inóculo.

Tratando da presença de nitrogênio no sistema, não há na literatura um consenso bem estabelecido a respeito da quantidade mínima de amônia livre necessária para ocorrer um processo inibitório na produção de gás, sendo possível encontrar valores de 80 mg/L a 375 mg/L (Deublein; Steinhauser, 2011; Rodríguez et al., 2011). Por causa dessas variações, não é possível afirmar

inibições no sistema apenas a partir dos dados apresentados na Figura 1C. Porém nele se observa que a mesma variação de valores presente nos dados de DQO ocorreu nos dados de amônia livre, o que reforça a influência da alimentação e homogeneização do sistema nos parâmetros analisados. Por sua vez, a relação C:N apresenta valores menores aos já definidos na literatura, na qual se recomenda que a proporção esteja entre 20:1 e 30:1 (Kunz et al., 2019). Isso também se justifica pelo fato de o reator ser de inóculo e estar com subcarga.

A respeito da presença de ácidos graxos voláteis, por meio de sua análise, foi observado que nenhum ácido foi identificado, sendo esse um bom indicativo do funcionamento do processo de biodigestão, pois, caso houvesse a produção de ácidos, o processo iria apresentar perdas de produção, uma vez que eles são de difícil digestão.

Por fim, como parâmetro de validação do processo como um todo, está o estudo da composição do gás gerado, do qual se espera a produção de 55% a 60% de metano (CH₄) e de 25% a 40% de dióxido de carbono (CO₂) (Operação..., 2021).

Analisando-se a Figura 1D, observa-se que os valores propostos foram atingidos na maior parte do tempo, apresentando determinadas semanas, principalmente as iniciais, nas quais o valor de metano ficou abaixo dos 55%. Ressalta-se, porém, que mesmo os valores estando acima de 55%, na maioria das semanas, eles começaram a sofrer quedas, sendo que, nas semanas do dia 15 e do dia 29 de junho, os valores ficaram abaixo do esperado. Logo, mesmo sendo o intuito trabalhar em subcarga, a alimentação menor que a necessária pode começar a prejudicar o sistema.

Conclusão

Ao analisar os dados de monitoramento do reator, tem-se que a criação e a manutenção do reator foram validadas, visto que a produção de metano está acima de 55% ao longo das semanas observadas, e os demais parâmetros acompanhados também estão estáveis.

Em contrapartida, ressalta-se que, durante as semanas finais do intervalo analisado, resultados como produção de metano e relação C:N apresentaram tendências de queda, que se persistirem requerem uma reavaliação da alimentação e dos métodos feitos.

Referências bibliográficas

- AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. **Standard methods for the examination of water and wastewater**. 21st ed., Washington DC, 2005. 541 p.
- ASSOCIATION OF OFICIAL ANALYTICAL. **Official methods of analysis**. 11th ed. Washington, DC, 1990. 1051p.
- BERTOLO, A. J.; KOPPLIN, B. W.; BERTOLO, J. P.; SILVA, L.; CASSOL, F. Combustíveis fósseis: panorama de produção e consumo no Brasil. **Gestão e Desenvolvimento em Revista**, v. 8, n. 1, p. 102-123, 18 ago. 2022. Disponível em: <https://e-revista.unioeste.br/index.php/gestaoedesenvolvimento/article/view/28215>. Acesso em: 27 set. 2023
- DE PRÁ, M. C.; KUNZ, A.; BORTOLI, M.; PERONDI, T.; CHI, A. Simultaneous removal of TOC and TSS in swine wastewater using the partial nitrification process. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 88, n. 9, 2013. DOI: 10.1002/jctb.3803.
- DEUBLEIN, D.; STEINHAUSER, A. **Biogas from waste and renewable resources: an introduction**. Weinheim: Wiley-VCH, 2011. DOI:10.1002/9783527632794
- KUNZ, A.; STEINMETZ, R. L. R.; AMARAL, A. C. **Fundamentos da digestão anaeróbia, purificação do biogás, uso e tratamento do digestato**. Concórdia: Sbera: Embrapa Suínos e Aves, 2019. 214 p. Disponível em: <https://www.alice.cnptia.embrapa.br/alice/handle/doc/1108617?mode=simple>. Acesso em: 5 Jul. 2023.
- MEEGODA, J. N.; LI, B.; PATEL, K.; WANG, L. B. A Review of the Processes, parameters, and optimization of anaerobic digestion. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 15, n. 10, [e]2224, 2018. DOI:10.3390/ijerph15102224.
- MESQUITA, P. L.; AFONSO, R. J. C. F.; AQUINO, S. F.; LEITE, G. S. Validação de método de cromatografia líquida para a determinação de sete ácidos graxos voláteis intermediários da digestão anaeróbia. **Engenharia Sanitária e Ambiental**, v. 18, n. 4, p. 295-302, out/dez. 2013. DOI: <https://doi.org/10.1590/S1413-41522013000400001>

MILANEZ, A. Y.; GUIMARÃES, D. Q.; MAIA, G. B. S.; SOUZA, J. A. P. L.; LEMOS, M. L. F. Biogás de resíduos agroindustriais: panorama e perspectivas. **BNDES Setorial**, n. 47, p. 221-275, mar. 2018. Disponível em: https://web.bndes.gov.br/bib/jspui/bitstream/1408/15384/1/BS47__Biogas_FECHADO.pdf. Acesso em: 19 set.2023.

OPERAÇÃO e monitoramento de reatores anaeróbios: guia de boas práticas. Brasília: **MCTI**, 2021. E-book. (Projeto Aplicações do Biogás na Agroindústria Brasileira: GEF Biogás Brasil). Disponível em: <https://datasebrae.com.br/wp-content/uploads/2021/11/212D-Guia-opera%C3%A7%C3%A3o-e-monitoramento-de-biodigestores.pdf>. Acesso em: 19 set. 2023.

RIPLEY, L. E.; BOYLE, W. C.; CONVERSE, J. C. Improved alkalimetric monitoring for anaerobic digestion of high-strength wastes. **Journal Water Pollution Control Federation**, v. 58, n. 5, p. 406-411. 1986. Disponível em: <https://www.jstor.org/stable/25042933>. Acesso em: 19 set. 2013.

RODRÍGUEZ, D.C.; BELMONTE, M.; PEÑUELA, G.; CAMPOS, J.L.; VIDAL, G. Behaviour of molecular weight distribution for the liquid fraction of pig slurry treated by anaerobic digestion. **Environmental Technology**, v. 32, n. 4, p. 419-425, 2011. DOI: 10.1080/09593330.2010.501821

VIEIRA, H. G.; POLLI, H. Q. O biogás como fonte alternativa de energia. Revista **Interface Tecnológica**, v. 17, n. 1, p. 388-400, 2020. DOI: <https://doi.org/10.31510/infa.v17i1.766>

Desenvolvimento de biodigestor automatizado para produção de inóculo

Gabriel de Szechy Vigna¹, Jhenifer Aline Bastos², Felipe Orcelli Wojcieckowski³, Rafael Moreira Marques⁴, Rossano Gambetta⁵

Resumo

A manutenção de uma fonte estável de inóculo é imprescindível para a obtenção de resultados experimentais reprodutíveis e confiáveis no desenvolvimento de pesquisas relacionadas com o processo de biodigestão, principalmente em razão do grande tempo necessário, medido em semanas, para o desenvolvimento e a estabilização dos microrganismos que fazem conversão da matéria orgânica em biogás. Dessa forma, faz-se necessária a utilização de um biodigestor onde seja possível estabelecer um estado estacionário dos microrganismos presentes no reator, e que eles estejam em condições de se desenvolver assim que inoculados em outros frascos ou bioreatores. O presente trabalho trata da montagem de um biodigestor com controle de temperatura e agitação, e medição do biogás produzido, visando à produção estável de inóculo.

Termos para indexação: biodigestor, produção de inóculo, controle de processo.

Introdução

A história brasileira é marcada pela produção e exploração agrícola desde os primórdios, com destaque para produção de açúcar, café e borracha nos períodos colonial e imperial. No entanto, esse domínio de uma única cultura foi motivo de crises econômicas no País (Landau et al., 2020). Após o processo de industrialização e mecanização da agropecuária nacional, a partir de 1950, foi quando a produção agrícola brasileira começou a despontar, com crescimento consistente e diversificação das culturas (Landau et al., 2020). Em 2006, o Brasil já apresentava um destaque no cenário agropecuário mundial, apresentando um grande potencial de expansão de culturas, como cana-de-açúcar, mamona, girassol e dendê (Scolari, 2006). Nesse contexto, é notável a estimativa de 394 Mt de resíduos de biomassa gerada pelo setor agropecuário brasileiro no ano de 2017 (Brasil, 2019), como uma comprovação do potencial de produção agrícola do País. Desse modo, o aproveitamento desses resíduos como uma fonte potencial para geração de energia representa um ganho de eficiência e sustentabilidade na produção agropecuária.

Entre as tecnologias de aproveitamento de resíduos para geração de energia, destaca-se a biodigestão, como um processo capaz de transformar lixo orgânico em gás metano. Esse gás apresenta-se como uma fonte energética importante, pois pode ser queimado para geração de energia elétrica ou utilizado como substituto ao GLP no uso doméstico em fogões e fornos. O resíduo é transformado em metano dentro de um biodigestor por processos de fermentação anaeróbica. Desse modo, várias características devem ser controladas dentro de um biodigestor para permitir eficiência e qualidade da geração de gás combustível.

¹ Graduando em Engenharia Mecatrônica, Universidade de Brasília, gabriel.vigna@colaborador.embrapa.br

² Engenheira ambiental, doutoranda em Sustentabilidade Ambiental Urbana, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, bolsista na Embrapa Agroenergia, jhenifer.bastos@colaborador.embrapa.br

³ Graduado em Química Tecnológica, Universidade de Brasília, felipe.orcelli@colaborador.embrapa.br

⁴ Graduado em Química Tecnológica, Universidade de Brasília, rafael.marques@colaborador.embrapa.br

⁵ Engenheiro químico, doutor em Ciência em Engenharia Química, pesquisador da Embrapa Agroenergia, rossano.gambetta@embrapa.br

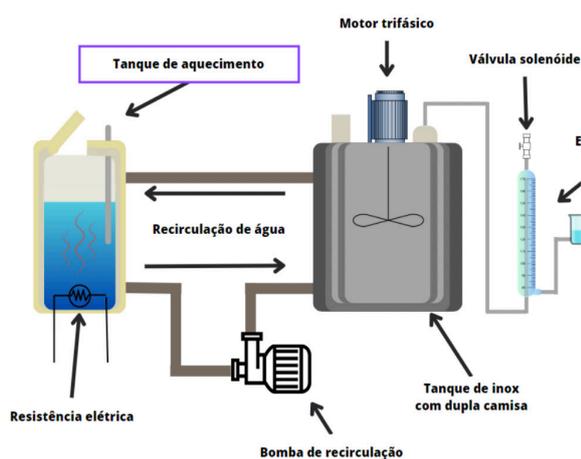
Reatores de maior escala podem ter mecanismos de controle de temperatura e agitação (Kunz et al., 2019). Nesse contexto, observando os fatores computacionalmente controláveis de um biodigestor e a capacidade brasileira de geração de resíduos agropecuários, é objetivo deste trabalho desenvolver um reator de biodigestão com agitação e temperatura controladas, além de gerar estimativas de produção de biogás e permitir acesso aos dados de funcionamento do sistema em um computador. Tudo isso com o intuito de cultivar inóculo dentro do biodigestor para utilização em experimentos de avaliação do potencial metanogênico de diferentes resíduos agropecuários.

Materiais e métodos

O biodigestor montado atende ao propósito de produção de inóculo para utilização em experimentos de avaliação do potencial metanogênico de resíduos orgânicos, logo, é necessário que o biodigestor seja mantido sob condições ideais de funcionamento. Com esse intuito, foi prototipado um sistema eletrônico capaz de regular temperatura e agitação dentro do biodigestor e realizar estimativas de produção de biogás.

Estrutura do biodigestor

A estrutura do biodigestor, apresentada na Figura 1a, é composta por um tanque de aço inoxidável de 160 litros com dupla camisa, um tanque de aquecimento de água de 100 litros, uma bomba para recirculação de água quente e uma resistência elétrica de 750 W. A água é aquecida pela resistência elétrica no tanque de aquecimento e flui pela dupla camisa do tanque de aço inox e, em seguida, escorre de volta para o tanque de aquecimento em razão do fluxo gerado pela bomba. A conexão entre os tanques e a bomba é realizada por meio de espigões e mangueiras flexíveis. Na tampa do tanque de inox, é fixado um motor de indução trifásico ligado a um eixo com pás rotativas usadas para agitação do conteúdo do biodigestor. A fim de estimar a geração de biogás, é utilizado um eudiômetro adaptado com um sistema de liberação automática de gás por meio de uma válvula solenoide. Uma foto do sistema de biodigestão é apresentada na Figura 1b.



(a)



(b)

Figura 1. (a) Esquema do reator de inóculo e (b) foto do reator de inóculo montado.

Sistema de controle

O sistema de controle do biodigestor é composto por um display de cristal líquido, um microcontrolador Arduino Mega 2560, três relés de estado sólido de 40 A, um alarme sonoro, um sensor

de nível do tipo boia, três sensores de temperatura *onewire*, dois sensores infravermelho, uma válvula solenoide e um inversor de frequência. Além desses componentes, foram desenvolvidas placas eletrônicas contendo componentes eletrônicos genéricos para integração dos demais dispositivos.

Todo o sistema é comandado pelo microcontrolador por meio de um código desenvolvido em linguagem C++ e bibliotecas próprias do Arduino. No display de cristal líquido, são apresentadas variáveis de processo, tais como temperatura, ativação da bomba e potência da resistência. Os relés de estado sólido são utilizados para acionamento da bomba, da válvula solenoide e da resistência elétrica. Os sensores de temperatura são fundamentais para monitoramento e regulação da temperatura do inóculo.

Um sensor de nível do tanque de aquecimento é utilizado para verificar se a água está acima do nível da resistência, sendo fundamental para evitar dano à resistência por superaquecimento. O alarme sonoro é utilizado para indicar a ocorrência de alguma falha, a exemplo do nível baixo de água no tanque de aquecimento. Para controle da agitação do biodigestor, é utilizado um inversor de frequência subordinado ao microcontrolador, e é configurada uma rotação fixa de 100 RPM com uma rampa de 5 segundos. No sistema automático de liberação de gás do eudiômetro, são utilizados os dois sensores infravermelhos para identificação do nível de água do dispositivo e a válvula para liberação de gás quando o nível mínimo é percebido.

Lógica de operação e software

O software desenvolvido para controle do sistema se baseia em rotinas desencadeadas por temporizadores e por interrupções de periféricos. A regulação de parâmetros do biodigestor é realizada de modo cíclico. A bomba e o sistema de aquecimento são desligados a cada 1 hora, por 5 minutos, com o intuito de poupar o tempo de uso da bomba. A agitação do inóculo é acionada a cada 12 horas por um período de 15 minutos e o sistema de controle possui um período de amostragem de 10 segundos. O sistema de estimação de produção de gás gera um pulso de interrupção cada vez que os níveis máximo ou mínimo do eudiômetro são detectados pelos sensores.

O pulso do nível mínimo desencadeia a abertura da válvula solenoide, enquanto o pulso do nível máximo gera seu fechamento. É implementado um sistema de controle proporcional integral com base na temperatura. Nesse sistema, a potência necessária na resistência depois de amostragens da temperatura é dada pelas Equações 1 e 2. A potência deduzida pela fórmula é aplicada fragmentando-se o tempo em que a resistência mantém-se ativada durante o ciclo de 10 segundos. Esse ciclo também representa o período de amostragem do controle.

$$P_{res} = P_{max} * \left(\frac{10}{3} * \Delta T_k + \frac{1}{20} * \sum_{a=1}^{a=k} \Delta T_a \right) \quad \text{Equação 1: Dedução da potência necessária na resistência.}$$

$$\Delta T_k = T_{ref} - T_k \quad \text{Equação 2: Diferença de temperatura com relação à referência.}$$

em que:

P_{res}	=	Potência aplicada na resistência após a k-ésima amostragem.
P_{max}	=	Potência máxima da resistência.
T_{ref}	=	Temperatura de referência (valor de temperatura que se deseja atingir).
T_k	=	Temperatura lida na k-ésima amostragem.

Ainda foi desenvolvido um programa em linguagem de programação Python para interpretação e comunicação dos dados obtidos no sistema. Um computador é conectado ao microcontrolador por meio de um cabo USB, e as informações do controle do sistema são escritas em um arquivo de texto nesse computador a cada 10 segundos.

Sistema supervisorio

Como medida de segurança, foi implementado um sistema de supervisão para o controle de temperatura. Um segundo microcontrolador foi programado para verificar a temperatura do banho térmico do biodigestor periodicamente. Esse microcontrolador tem controle sobre a energização da resistência do sistema e pode interromper seu funcionamento caso seja verificado superaquecimento. Os dados coletados no sistema supervisorio também são armazenados no computador por meio de um cabo USB.

Resultados e discussão

O biodigestor está operacional e produzindo inóculo por mais de 6 meses. Durante todo esse período, foram acumulados dados sobre sua dinâmica de funcionamento. O sistema de controle de temperatura conseguiu manter as condições ideais de aquecimento para o inóculo. De modo geral, há uma redução de temperatura menor que meio grau durante o período de 5 minutos em que o sistema é desativado para poupar a bomba, como visto na Figura 2a. Essa diferença de temperatura não é significativa para impactar a geração de inóculo.

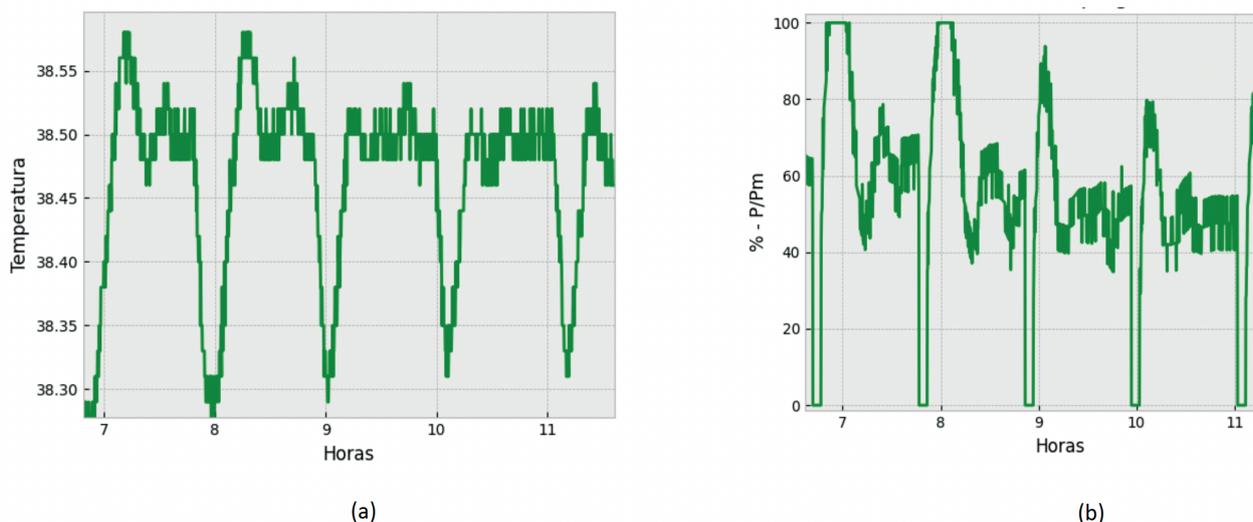


Figura 2. (a) Temperatura média no banho e (b) a potência elétrica aplicada na resistência (das 7h às 11hs do dia 11/7/2023).

Na Figura 2b, é apresentada a potência entregue pela resistência elétrica, onde se observa que o controle de temperatura apresenta uma resposta subamortecida, sendo necessário manter esse comportamento, dado o alto tempo para o equilíbrio térmico. Também é possível observar a saturação da potência nos momentos mais frios do dia, não chegando a afetar o equilíbrio do controle do biodigestor. Contudo, isso indica que uma resistência de maior potência deve ser instalada para garantir maior velocidade de aquecimento.

Cada ativação da válvula solenoide para liberação de gás do eudiômetro é registrada no computador que acompanha o sistema. O intervalo entre ativações pode ser usado para estimar a vazão

de gás produzido com base no volume deslocado de água no eudiômetro. Os sensores infravermelhos identificam um valor fixo de água deslocada no dispositivo. Desse modo, foi possível construir o gráfico da Figura 3a ao se realizar a divisão entre o volume deslocado e o intervalo de tempo entre ativações da válvula solenoide.

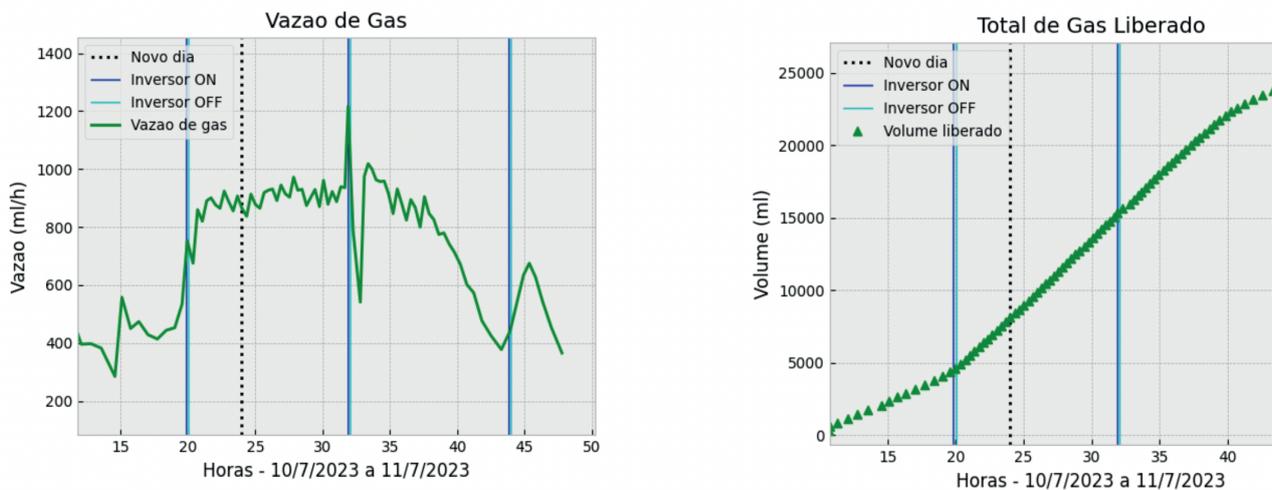


Figura 3. (a) Vazão medida de biogás e (b) produção acumulada de biogás (entre 10/7/2023 e 11/7/2023).

É possível observar na Figura 3 que foi realizada a alimentação do reator, antes das 15h do dia 10/7/2023, por causa do súbito aumento de geração de biogás. Além disso, é possível visualizar com frequência uma elevação da vazão de gás concomitantemente com a ativação da agitação do inóculo. Isso pode ocorrer pela liberação de gases antes presos no substrato do biodigestor, em virtude da movimentação de seu conteúdo. Na Figura 3b, é mostrado o acumulado de gás liberado ao longo dos dias 10/7/2023 e 11/7/2023. É visível um intervalo de tempo entre 20h do dia 10/7/2023 e 15h do dia 11/7/2023 em que a vazão de gás é aproximadamente constante.

Conclusão

O biodigestor foi montado e operacionalizado de forma a manter um inóculo reprodutível ao longo do tempo, para que todos os experimentos subsequentes possam ser comparáveis entre si. Além disso, o biodigestor foi montado com partes de baixo custo, como o Arduino, e equipamentos já presentes no laboratório.

Referências bibliográficas

BRASIL. Empresa de Pesquisa Energética. **Potencial energético dos resíduos agropecuários**. Brasília, DF, 2019. (Informe Técnico: Séries SI Energia). Disponível em: <https://shorturl.at/aACGO>. Acesso em: 28/07/23.

KUNZ, A.; STEINMETZ, R. L. R.; AMARAL, A. C. do (Ed.). **Fundamentos da digestão anaeróbia, purificação do biogás, uso e tratamento do digestato**. Concórdia: Sbera: Embrapa Suínos e Aves, 2019.

LANDAU, E. C.; SILVA, G. A. da; MOURA, L.; HIRSCH, A.; GUIMARAES, D. P. (Ed.). **Dinâmica da produção agropecuária e da paisagem natural no Brasil nas últimas décadas: cenário histórico, divisão política, características demográficas, socioeconômicas e ambientais**. Brasília, DF: Embrapa, 2020. v. 1.

SCOLARI, D. D. G. **Produção agrícola mundial: o potencial do Brasil**. In: VISÃO progressista do agronegócio brasileiro. Brasília, DF: Fundação Milton Campos, 2006. p. 9-86. (Revista da Fundação Milton Campos, v. 25).

Efeito de glicose, ácido glicônico e sais sobre o desempenho de celulases

Carolina Medeiros Romera¹, Dasciana de Sousa Rodrigues², Rossano Gambetta³, Thais Demarchi Mendes⁴

Resumo

O ácido glicônico (AG) é um composto químico versátil com aplicação na indústria de alimentos, metalúrgica, farmacêutica, construção civil, entre outros. Sua produção a partir de biomassa lignocelulósica é uma oportunidade de aproveitamento de biomassas vegetais residuais. Neste trabalho, os principais gargalos para a síntese de AG a partir de biomassa vegetal são apresentados e discutidos. Considerando um processo totalmente enzimático em que a hidrólise de celulose para a liberação de glicose e a conversão dela em AG ocorrem simultaneamente, vários efeitos de inibição podem ocorrer, limitando a ação das enzimas hidrolíticas. Para avaliar esses efeitos, ensaios de hidrólise de bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado foram realizados na presença de diferentes concentrações iniciais de glicose e AG. Além disso, sabendo que a produção de AG causa queda do valor de pH do meio reacional, o efeito inibitório causado por alguns agentes de neutralização do pH também foram investigados. Os resultados obtidos demonstraram que a glicose é um inibidor de celulases mais forte que o AG e que o tampão citrato é o melhor agente para manutenção do pH do meio reacional. Neste estudo, não foi realizado o processo de hidrólise de celulose e síntese simultânea de AG. Entretanto, os ensaios simulando esse processo permitiram concluir que ele pode ser vantajoso, comparado ao respectivo processo com etapas de hidrólise e síntese separados, pois, ao diminuir o efeito de inibição por glicose, a redução do tempo de reação e o aumento do rendimento na produção de AG são reduzidos.

Termos para indexação: inibição de celulases, ácido glicônico, glicose.

Introdução

Ácido glicônico (AG) é um composto químico versátil e aplicado como aditivo em alimentos, agente quelante e de limpeza de superfícies. Além disso, pode ser usado na fabricação de metal e couro, ou como retardador e plastificante na indústria de concreto (Ramachandran et al., 2006).

Dados indicam que a produção de AG pode atingir concentrações de até 422 g/L por rotas fermentativas (Ma et al., 2022) e 324 g/L por rota enzimática (Mu et al., 2019). Entretanto, é necessário utilizar soluções concentradas de glicose para se obter teores maiores de AG. Tais soluções são obtidas a partir de fontes amiláceas ou sacarinas. Visando a reduzir a competição por matérias-primas alimentares e fazer uso de resíduos agroindustriais, as biomassas vegetais ou lignocelulósicas vêm sendo avaliadas como fontes de glicose.

Dados da literatura utilizando celulose para obtenção de glicose e sequencial síntese de AG são escassos, e os baixos teores de glicose obtidos nos processos descritos exigem etapas de concentração antes da aplicação na síntese de AG (Dai et al., 2022).

¹ Química tecnológica, Universidade de Brasília, carolina.romera@colaborador.embrapa.br

² Química industrial, doutora em Engenharia Química, Embrapa Agroenergia, dasciana.rodrigues@embrapa.br

³ Engenheiro químico, doutor em Engenharia Química, Embrapa Agroenergia, rossano.gambetta@embrapa.br

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

A obtenção de elevado teor de glicose a partir da hidrólise de biomassa vegetal é difícil. Além do acesso limitado das enzimas à celulose, o efeito de inibição da glicose (principal produto reacional) e de outras moléculas solúveis presentes no meio comprometem o rendimento (Kim et al., 2011; Mutrakulcharoen et al., 2020; Paulraj Gundupalli et al., 2021).

Neste estudo, a inibição de celulases causada pela glicose, AG e Na^+ foi avaliada com o objetivo de gerar dados que suportem uma futura reação de hidrólise de celulose e síntese de AG simultaneamente (Figura 1).

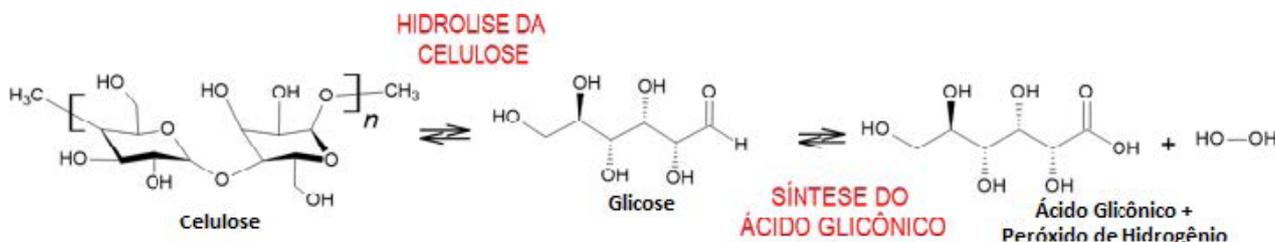


Figura 1. Hidrólise da celulose e síntese do ácido glicônico simultâneo.

Materiais e métodos

Pré-tratamento de bagaço de cana-de-açúcar. Bagaço de cana *Saccharum officinarum* L. (cedido pela usina Jalles Machado) foi pré-tratado por meio do processo organosolv modificado com razão sólido:líquido de 1:6 (m/v), sistema de solvente contendo etanol:água (1:1), (v/v), temperatura de 180 °C por 4 horas (Nogueira et al., 2023).

Hidrólise enzimática da biomassa. Biomassa pré-tratada foi submetida à hidrólise enzimática empregando enzima Cellic CTec3 como agente catalisador (15 FPU/g de biomassa).

Efeito de inibição por glicose e ácido glicônico. No início do processo de hidrólise enzimática, foram adicionadas nove diferentes concentrações de glicose ou ácido glicônico, na faixa de 0,05 mol/L a 0,75 mol/L. Os ensaios foram realizados em placas Deep-Well de 24 poços, volume final de 5 mL, 5% m/v de biomassa pré-tratada, pH 5 (tampão citrato de sódio/ácido cítrico 0,1 mol/L), a 50 °C e agitação de 250 rpm. Como o ácido foi adicionado na forma de ácido D-glicônico sal de sódio, como controle, também foram realizados ensaios na presença das mesmas concentrações de íon Na^+ , adicionado ao sistema na forma de NaCl.

Efeito do agente controlador de pH. O efeito do controle de pH por tampão citrato de sódio/ácido cítrico 0,1 mol/L ou pela adição de hidróxido de amônio ou hidróxido de sódio foi avaliado em biorreator. Volume final do reator de 750 mL, 10% m/v de biomassa pré-tratada (massa total fracionada em quatro alimentações), a 50 °C, agitação de 300 rpm e pH=5.

Análise dos produtos. Concentração de glicose e AG foram determinadas por cromatografia líquida (Agilent Infinity 1260): coluna HPX-87H BioRad a 45 °C; fase móvel H_2SO_4 5 mM com vazão 0,6 mL/min; detector RID a 40 °C e DAD 210 nm.

Resultados e discussão

A hidrólise enzimática da celulose presente em biomassa vegetal é negativamente afetada pela falta de acesso das enzimas à celulose e pela inibição pelo produto (glicose) e outras moléculas

solúveis no meio reacional. Para superar a falta de acesso das enzimas, o bagaço da cana utilizado neste estudo foi pré-tratado por processo organosolv, no qual mais de 90% da lignina é removida e uma celulose com aproximadamente 70% de pureza é obtida. A hidrólise enzimática dessa biomassa atinge rendimento próximo ao máximo teórico e permite a obtenção de hidrolisados com concentração de até glicose 100 g/L na presença de alta carga de sólidos.

O acúmulo de glicose no meio reacional (nesse estudo isto é simulado pela adição de diferentes quantidades de glicose já no início da reação) desacelera sensivelmente a velocidade de reação catalisada por celulases (barras azul-escuras da Figura 2). Para contornar esse problema, a glicose produzida pode ser simultaneamente removida do meio reacional (utilizando reatores de membrana, por exemplo) ou convertida em outra molécula, como o ácido glicônico, por exemplo. Dados publicados por Cannella et al. (2012) indicam que AG é um inibidor de betaglicosidasas (enzimas que convertem oligossacarídeos em glicose) mais forte que a glicose. Entretanto, os autores afirmam que esse efeito pode não ser percebido em reatores em que a concentração de AG é baixa em relação à concentração de glicose. No processo de hidrólise de celulose e síntese simultânea de AG a ser realizado futuramente, haverá elevada concentração de AG no meio reacional durante a hidrólise enzimática. Então, para verificar o efeito de inibição do AG em elevadas concentrações sobre a ação de celulases, ensaios similares ao descrito acima foram realizados substituindo glicose por ácido glicônico, e os resultados obtidos são apresentados na Figura 2 (barras verdes).

A comparação do efeito de inibição causado por glicose e AG pode ser visualizada no gráfico apresentado na Figura 3, em que, para uma mesma concentração inicial do inibidor, a quantidade de glicose liberada pela ação das celulases no sistema inibido por glicose (eixo y) é dividida pela quantidade de glicose liberada pela ação das celulases no sistema inibido por AG (eixo x). Se a quantidade de glicose liberada pela ação das enzimas é a mesma nos dois sistemas, o ponto desse gráfico é posicionado exatamente sobre a reta de referência, cujo coeficiente angular é igual a 1. Nos casos em que há menor quantidade de glicose liberada pelas enzimas no sistema inibido por AG, quando comparado ao sistema inibido por glicose, o ponto é posicionado acima da reta de referência, e nos casos em que a quantidade de glicose no sistema inibido por AG é maior, o ponto é posicionado abaixo da reta de referência. Em outras palavras, para uma mesma concentração inicial de inibidor, se a inibição das enzimas é mais afetada por glicose que por AG, o ponto no gráfico da Figura 3 fica abaixo da reta de referência. Entretanto, se o AG é o inibidor mais forte, o ponto fica acima da reta de referência. O efeito de inibição foi avaliado em três estágios da hidrólise enzimática: 1) com 4 horas de reação: ocorre a liquefação da celulose (liberação de oligossacarídeos pela ação de endoglucanases e exoglucanases); 2) após 7 horas de reação: há elevada concentração de oligossacarídeos e intensa liberação de glicose devida à ação de beta glicosidasas; e 3) após 24 horas de reação: o sistema reacional tende ao equilíbrio, ou seja, um tempo suficiente para hidrólise quase completa em um sistema com baixa carga de sólido. Em todos os estágios da reação, o gráfico da Figura 3 confirma que a inibição causada por glicose sobre as celulases totais é mais forte que a inibição causada por AG.

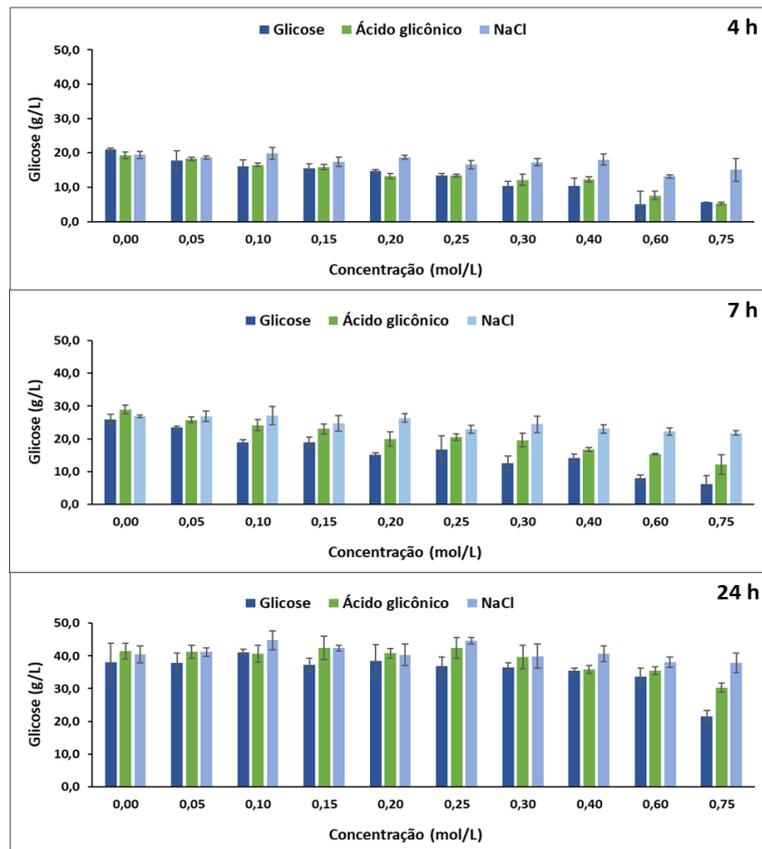


Figura 2. Quantidade de glicose liberada pela ação de celulases em sistemas inibidos por glicose, ácido glicônico e cloreto de sódio.

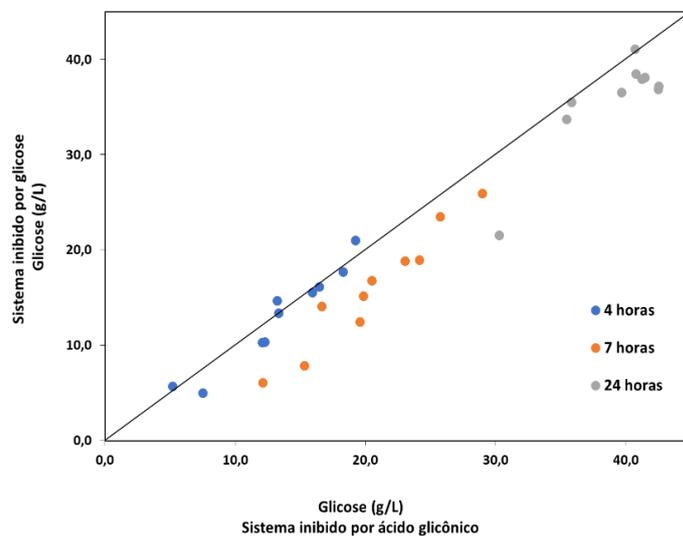


Figura 3. Comparação das quantidades de glicose em sistemas celulolíticos inibidos por diferentes concentrações iniciais de glicose e ácido glicônico.

Pode-se observar que a conversão da glicose em AG durante a hidrólise enzimática de celulose é benéfica, pois reduz a inibição pelo produto da reação, favorecendo a produção de AG. Por outro lado, é preciso considerar que tanto o avanço da hidrólise da celulose quanto a produção de AG causam a queda do valor de pH no meio reacional, e o tipo do agente de neutralização utilizado pode

afetar a ação das celulases. Três agentes de neutralização foram investigados, e os resultados são apresentados na Tabela 1.

Tabela 1. Concentração de glicose após hidrólise enzimática de bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado utilizando diferentes agentes de neutralização de pH.

Amostra	Concentração de glicose (g/L)
Tampão citrato	74,7
Hidróxido de amônio (NH ₄ OH)	66,0
Hidróxido de sódio (NaOH)	58,7

O tampão citrato é o melhor agente de neutralização. Uma redução de quase 12% no teor de glicose ocorre quando NH₄OH substitui o tampão. Para o NaOH a redução na concentração de glicose em relação ao tampão é de 21%. Concentrações de biomassa maiores que 10% m/v intensificam este efeito.

Conclusão

Ácido glicônico apresenta efeito inibitório menor que a glicose sobre a ação de celulases, favorecendo o processo simultâneo de hidrólise de celulose e síntese de AG. Neste processo, alguns gargalos tanto da hidrólise enzimática quanto da síntese de AG são eliminados. Por exemplo, a inibição por glicose sobre as celulases é reduzida e a viscosidade do meio reacional para a síntese de AG se mantém baixa, favorecendo o transporte de massa.

Referências bibliográficas

- CANNELLA, D.; HSIEH, C.-W. C.; FELBY, C.; JØRGENSEN, H. Production and effect of aldonic acids during enzymatic hydrolysis of lignocellulose at high dry matter content. *Biotechnology for Biofuels*, v. 5, n. 1, 2012.
- DAI, L.; LIAN, Z.; ZHANG, R.; NAWAZ, A.; UL HAQ, I.; ZHOU, X.; XU, Y. Multi-strategy in production of high titer gluconic acid by the fermentation of concentrated cellulosic hydrolysate with *Gluconobacter oxydans*. *Industrial Crops and Products*, v. 189, 2022.
- KIM, Y.; XIMENES, E.; MOSIER, N. S.; LADISCH, M. R. Soluble inhibitors/deactivators of cellulase enzymes from lignocellulosic biomass. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 48, n. 4-5, p. 408-415, 2011.
- MA, Y.; LI, B.; ZHANG, X.; WANG, C.; CHEN, W. Production of gluconic acid and its derivatives by microbial fermentation: process improvement based on integrated routes. *Frontiers Bioengineering and Biotechnology*, v. 10, 2022. 864787. Doi: 10.3389/fbioe.2022.864787.
- 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. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 136, p. 1060-1068, 2019.
- MUTRAKULCHAROEN, P.; PORNWONGTHONG, P.; CHEENKACHORN, K.; TANTAYOTAI, P.; RODDECHA, S.; SRIARIVANUN, M. Inhibitory effect of inorganic salts residuals on cellulase kinetics in biofuel production from lignocellulose biomass. In: INTERNATIONAL CONFERENCE AND UTILITY EXHIBITION ON ENERGY, ENVIRONMENT AND CLIMATE CHANGE (ICUE). 2020, Pattaya, Thailand. [Proceedings...]. IEEE Xplore, 2020. p. 1-8. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1109/icue49301.2020.9307055>. Acesso em: 28/09/2023
- NOGUEIRA, B.; SECCHI, A. R.; MACHADO, F.; RODRIGUES, C. V. S.; GAMBETTA, R.; RODRIGUES, D. S. Improvement of enzymatic saccharification by simultaneous pulping of sugarcane bagasse and washing of its cellulose fibers in a batch reactor. *Biotechnology Journal*, v. 18, n. 8, ago. 2023.
- PAULRAJ GUNDUPALLI, M.; SAHITHI S. T. A.; CHENG, Y.-S.; TANTAYOTAI, P.; SRIARIYANUN, M. Differential effects of inorganic salts on cellulase kinetics in enzymatic saccharification of cellulose and lignocellulosic biomass. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, v. 44, n. 11, p. 2331-2344, 2021.
- RAMACHANDRAN, S.; FONTANILLE, P.; PANDEY, A.; LARROCHE, C. Gluconic acid: properties, applications and microbial production. *Food Technology Biotechnology*, v. 44, n. 2, p. 185-195, 2006.

Estabelecimento de processo enzimático para estonagem de tecidos de algodão em escala de bancada¹

Feipe Augusto Navarro Debiasi², Diogo Keiji Nakai³, Thaís Fabiana Chan Salum⁴

Resumo

A estonagem enzimática é um processo no qual celulases são aplicadas em tecidos a fim de proporcionar uma aparência desbotada, com toque mais macio e maleável. Este trabalho teve por objetivo desenvolver uma metodologia de processo de estonagem enzimática de denim (tecido de algodão) utilizando equipamento de bancada. Utilizou-se para isso a enzima Akmevia Biotecnologia Têxtil BioKey STLV. Estudaram-se diversas variáveis, como relação de banho, quantidade e tipo de abrasivos, disposição do tecido no reator e tempo de processo. O melhor resultado de estonagem foi obtido nas seguintes condições de processo: denim disposto de forma cilíndrica encostado nas paredes da caneca, tratado com enzima BioKey STLV a 0,7% (m/m) com tampão de ácido acético/acetato de sódio 0,1 mol/L pH 5,0 utilizando sete esferas de vidro e 30 g de pirâmide PET em 2 horas de processamento. Nessas condições, foi observado que o tecido tratado apresentou coloração desbotada em relação ao controle. A diferença de cor entre o controle e a amostra estonada foi mensurada com auxílio de colorímetro de reflectância e mostrou-se significativa (ΔE igual a 5,14). Estudos posteriores devem ser feitos para avaliar a resistência à tração dos tecidos tratados a fim de garantir que ela é conservada ao final do processamento.

Termos para indexação: algodão, estonagem, colorimetria, celulases.

Introdução

A produção de tecidos passa por processos que necessitam de agentes químicos tóxicos, que geram uma grande quantidade de efluentes prejudiciais ao meio ambiente e à saúde humana. A indústria têxtil é responsável por aproximadamente 20% da poluição de recursos hídricos, liberando metais pesados, detergentes e corantes. Para a melhoria dos processos da indústria têxtil, a fim de torná-los mais sustentáveis, enzimas têm sido utilizadas na eliminação de impurezas e em processos como desengomagem e estonagem. Entre as enzimas aplicadas nesses processos estão as amilases utilizadas durante a desengomagem e as celulases utilizadas durante a estonagem do algodão (Kumar et al., 2021).

Durante a estonagem do denim, ocorre o desbotamento de tecidos de algodão, por meio da remoção do corante índigo da superfície do algodão tingido. Esse processo inicialmente era realizado utilizando substâncias químicas, como permanganato de potássio, hipoclorito de sódio e pedra pomes. Entretanto, esses processos apresentam limitações como o desgaste do tecido, além da grande quantidade de pedra pomes necessária para o tratamento. Celulases são capazes de catalisar a clivagem da celulose e surgem como uma alternativa para realização desse processo por meio da ruptura da ligação química entre as fibras do tecido e o corante (Sen et al., 2021).

¹ Trabalho realizado no âmbito do projeto BIOFIBRAS, em parceria com Senai/CETIQT

² Engenheiro químico, colaborador da Embrapa Agroenergia, felipe.debiasi@colaborador.embrapa.br

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

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

Materiais e métodos

Tecidos e enzimas

Utilizou-se um tecido denim azul 100% algodão de aproximadamente 260 g/m² corado com índigo blue (comprado de Silvenina Uniformes Ltda.). Duas composições enzimáticas comerciais foram utilizadas: composição enzimática alfa amilase para desengomagem Akmey Biotecnologia Têxtil BioKey BLSH e composição enzimática para estonagem Akmey Biotecnologia Têxtil BioKey STLV.

Desengomagem

O tecido foi desengomado no equipamento de tingimento Mathis Alt-FIVE. Foram utilizadas tiras de denim cortadas em medidas que variaram de 4,5 g a 8 g. Foi mantida uma razão de banho de 1:10, que representa a relação entre a massa de tecido e o volume de solução enzimática presente em cada caneca. A enzima BioKey BLSH foi adicionada em cada caneca de 200 mL na quantidade de 1% (v/v) em tampão ácido cítrico/citrato de sódio ou ácido acético/acetato de sódio 0,1 mol/L e pH 5,0. As amostras de tecido foram incubadas no equipamento por 30 min, a 70 °C a 180 rpm.

Estonagem

Após a desengomagem, retirou-se a solução enzimática das canecas. Para a estonagem, a BioKey STLV foi adicionada em cada caneca de 200 mL na quantidade de 0,7% (m/m) em tampão de ácido cítrico/citrato de sódio ou ácido acético/acetato de sódio 0,1 mol/L e pH 5,0. As amostras foram incubadas por 60 min, a 60 °C a 180 rpm. Após o processamento, os tecidos foram lavados em água corrente e secos *overnight* em estufa a 50 °C. Algumas variáveis foram estudadas, como adição de abrasivos, relação de banho, forma de inserção do tecido na caneca e tempo de reação. Para todos os tratamentos, fez-se um controle com solução tampão sem adição da enzima. As variáveis foram estudadas da seguinte forma:

Relação de banho

Os tecidos foram adicionados às canecas e a composição enzimática BioKey STLV foi adicionada de três diferentes formas: a) sólida (pulverizada sobre o tecido úmido), b) dissolvida em 10 mL de tampão ácido cítrico/citrato de sódio e c) dissolvida em 20 mL de tampão de ácido cítrico/citrato de sódio. Nas três condições, utilizou-se a quantidade de 0,7% (m/m) de BioKey STLV e adicionaram-se cinco esferas de vidro (12 mm de diâmetro) como abrasivo.

Forma de inserção do tecido na caneca

Os tecidos foram adicionados às canecas de duas formas diferentes:

x)



y)



Figura 1. Formas de inserção do tecido denim às canecas: x) com o centro do tecido tocando o fundo da caneca e y) em formato cilíndrico, em contato com as paredes da caneca.

Tempo de reação

Testaram-se os tempos de 1 hora e 2 horas de reação.

Abrasivos

Os tecidos e a composição enzimática BioKey STLV são adicionados às canecas juntamente com os abrasivos de três diferentes formas: a) sem abrasivos, b) cinco esferas de vidro de 12 mm de diâmetro e c) sete esferas de vidro, sendo duas de 19 mm e cinco de 12 mm de diâmetro e 30 g de pirâmide PET de aproximadamente 6,5 mm de lado.

Utilizou-se o colorímetro de reflectância modelo CR-400, da marca Konica Minolta, calibrado com iluminante D65. As medições foram realizadas em três pontos de cada corpo de prova no espaço de cor CIE XYZ convertida para o espaço Lab* (CIELAB). A partir disso, foram calculados os deltas L*, a* e b* e E*, em que L* é a variável associada com luminosidade e a* e b* são as coordenadas cromáticas, sendo a* associada com a coordenada vermelha/verde e b* associada com a coordenada amarela/azul nesse espaço de cor Lab*. A distância geométrica entre os pontos do espaço de cor de tecidos diferentes é representada pela variável E*, calculada a partir das variáveis L*, a* e b*.

Resultados e discussão

Após os tratamentos enzimáticos (Tabela 1), as amostras de tecidos foram fotografadas e podem ser observadas na Figura 2.

Tabela 1. Condições de processo das amostras de denim da Figura 2.

Letra	Quantidade de enzima BioKey STLV (% m/m de tecido)	Relação de banho (mL de tampão)	Disposição de tecido	Abrasivos	Tempo (h)
A	Sem enzima (denim bruto)	Não processado	Não processado	Sem abrasivos	Não processado
B	Sem enzima (controle)	20	Formato cilíndrico	Sete esferas e 30g de PET	2
C	7,2	130	Centro tocando fundo da caneca	Sem abrasivos	1
D	0,7	Pulverizada sob tecido	Centro tocando fundo da caneca	Cinco esferas	1
E	0,7	10	Centro tocando fundo da caneca	Cinco esferas	1
F	0,7	20	Centro tocando fundo da caneca	Cinco esferas	1
G	0,7	20	Formato cilíndrico	Sete esferas e 30 g de PET	1
H	0,7	20	Formato cilíndrico	Sete esferas e 30 g de PET	2

Observando-se as imagens obtidas, nota-se que o desbotamento do tecido ocorreu de forma pontual nos tratamentos D, E e F. Nesses tratamentos, a disposição do tecido não foi ideal. Nos tratamentos G e H, o desbotamento mostrou-se mais homogêneo. Esse desbotamento mais bem

distribuído deve-se principalmente à disposição do tecido na caneca, visto que toda a superfície do tecido estava exposta. Além disso, uma maior quantidade de abrasivos também foi utilizada nessas amostras.

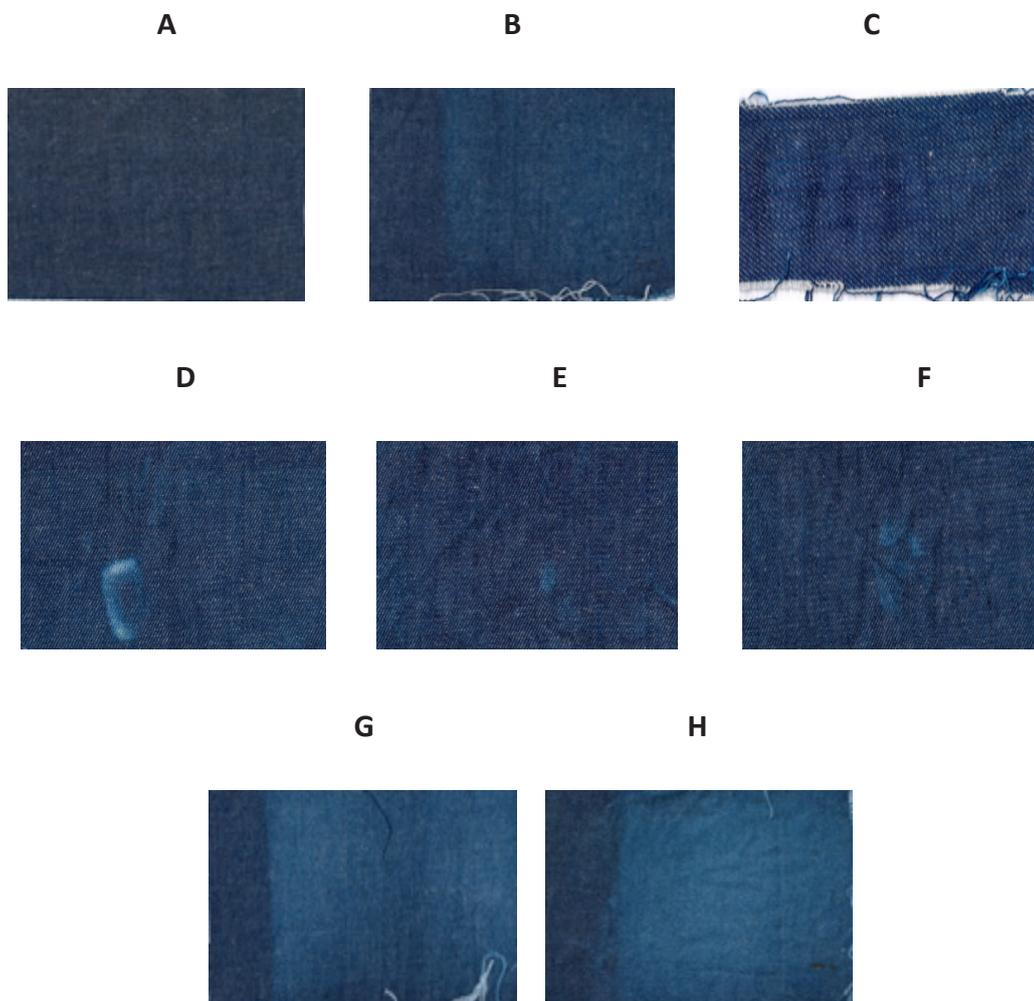


Figura 2. Imagens de amostras de tecido após tratamento enzimático.

A partir dos dados de colorimetria (Tabela 2), é possível comparar a variação dos aspectos colorimétricos observados entre duas amostras diferentes ao se calcular a distância geométrica entre os pontos medidos em um espaço de cor tridimensional. Foram avaliadas somente as amostras que apresentaram uma estonagem no tecido todo.

Tabela 2. ΔE^* entre as amostras de tecido submetidas ao tratamento enzimático.

ΔE^*	C	G	H
B	2,10	1,46	5,14
C		3,06	5,63
G			4,05

ΔE^* foram classificados da seguinte maneira: $\Delta E < 1$ – diferença imperceptível; $1 \leq \Delta E < 2$ – diferença quase imperceptível; $2 \leq \Delta E < 3,5$ – diferença perceptível, mas pequena; $3,5 \leq \Delta E < 5$ – diferença perceptível; $\Delta E \geq 5$ – diferença considerável.

ΔE é a distância geométrica entre pontos no espaço de cor Lab* de dois tecidos diferentes, calculada a partir da raiz quadrada da soma dos quadrados da diferença entre as coordenadas

de dois tecidos processados, indicando a variação de cor dos tecidos em relação a cada par de tratamentos. Os eixos horizontais e verticais representam diferentes tratamentos, e a intercessão desses corresponde à diferença de cor entre esses dois tratamentos. Espaços de intercessão vazios representam diferença nula entre as amostras de tecido comparadas ou que já tiveram sido apresentadas na Tabela 1.

Observando-se os valores obtidos do ΔE , comparando-se diferentes tratamentos de denim, foi notada uma diferença de cor considerável entre o disposto de forma cilíndrica encostado nas paredes da caneca com BioKey STLV e 2 horas de processamento e os demais tratamentos, justificado por apresentarem uma distância geométrica no espaço de cor Lab* entre 4 e 6. Já entre o disposto de forma cilíndrica encostado nas paredes da caneca com BioKey STLV e 1 hora de processamento e o controle e o BioKey STLV sem abrasivos foi observada uma diferença perceptível, embora pequena, como foi constatado com base na escala de valores de ΔE mencionada anteriormente. Entre o controle e o processamento sem abrasivos, foram notadas diferenças pouco perceptíveis também.

Com base na comparação feita, nota-se que existem três fatores capazes influenciar o desbotamento do tecido durante a estonagem enzimática: presença de abrasivos, duração do processo e disposição do tecido na caneca.

Conclusão

Conclui-se que entre as variáveis que influenciam no processo de desbotamento do tecido durante o processo de estonagem utilizando enzimas comerciais, estão o uso de abrasivos, forma de inserção do tecido na caneca e a duração do processo. As melhores condições de processo foram denim disposto de forma cilíndrica encostado nas paredes da caneca, tratado com enzima BioKey STLV a 0,7% (m/m) com tampão de ácido acético/acetato de sódio 0,1 mol/L pH 5,0, utilizando sete esferas de vidro e 30 g de pirâmide PET em 2 horas de processo. Estudos posteriores necessitam ser feitos a fim de avaliar se as propriedades físicas dos tecidos após os tratamentos são mantidas.

Referências bibliográficas

- KUMAR, D.; BHARDWAJ, R.; JASSAL, S.; GOYAL, T.; KHULLAR, A.; GUPTA, N. Application of enzymes for an eco-friendly approach to textile processing. *Environmental Science and Pollution Research*, v. 30, n. 28, 2021. 71838.
- SEN, A., KAPILA, R.; CHAUDHARY, S.; NIGAM, A. Biotechnological applications of microbial enzymes to replace chemicals in the textile industry: a review. *Journal of the Textile Association*, v. 82, n. 2, p. 68-73, 2021.

Efeito da superexpressão do fator de transcrição HAA1 em *Komagataella phaffii* produtora de ácido xilônico

Mariana Jardim Pedrosa¹, Letícia Maria Mallmann Ferreira², Bárbara Gomes Paes³, Diogo Keiji Nakai⁴, João Ricardo Moreira de Almeida⁵

Resumo

A biomassa lignocelulósica se apresenta como uma matéria-prima promissora para produção de compostos químicos de base renovável. Porém a plena utilização dos açúcares presentes em hidrolisados lignocelulósicos exige microrganismos capazes de tolerar os compostos inibidores presentes neles. Dentre os compostos inibidores, destaca-se o ácido acético, o qual pode inibir completamente o metabolismo microbiano. Visando à produção de ácido xilônico (AX) a partir de hidrolisados lignocelulósicos, foi construída uma linhagem de *Komagataella phaffii* expressando a enzima xilose desidrogenase (XDH) – Kp-XDH. Para aumentar a tolerância dessa linhagem a ácido acético e, possivelmente, ao AX, foi superexpresso na levedura o fator de transcrição HAA1 – Kp-XDH-HAA1. Uma terceira linhagem expressa somente o HAA1 – Kp-HAA1 e não é capaz de produzir AX porque não possui a enzima XDH. Este trabalho tem por objetivo avaliar os efeitos da superexpressão de Haa1 na produção de AX. Para tanto, o desempenho das três linhagens de *K. phaffii* contendo XDH, Haa1, XDH-Haa1 foi comparado em diferentes condições de cultivo com a adição de ácido acético e em reciclo de suas células. Os resultados demonstram que o fator de transcrição promove aumento da tolerância da levedura ao ácido acético, sendo que a sua melhor produção de ácido xilônico é em concentrações de 2 g/L de ácido acético. Além disso, o reciclo das células pode ser uma importante chave para o aumento da produção de ácido xilônico, já que as linhagens de levedura se adaptam ao meio de cultivo.

Termos para indexação: *Komagataella phaffii*, biomassa lignocelulósica, ácido acético, ácido xilônico, xilose.

Introdução

O uso de energias renováveis se torna cada vez mais necessário na vida dos seres humanos por causa da diminuição de fontes não renováveis a cada ano. No Brasil, 43,2% da matriz energética advém de energias renováveis (Weber et al., 2018). Por isso, produtos e subprodutos gerados a partir de biomassas para produção de biocombustíveis estão sendo cada vez mais utilizados e criados. A biomassa lignocelulósica pode ser utilizada para obtenção de álcoois (Bull, 1994), precursores de biopolímeros (Govil et al., 2020), ácidos orgânicos, e outros compostos. O ácido xilônico é um ácido orgânico que pode ser utilizado como aditivo de cimento (Byon-Wa et al., 2006), plastificante (Jin et al., 2022) e para obtenção de etilenoglicol (Zhanget al., 2020).

A biomassa lignocelulósica é formada, principalmente, por celulose, hemicelulose e lignina (Junmeng et al., 2017). Apesar de ser um composto de ampla acessibilidade, existem desafios para

¹ Graduanda em Biotecnologia, Universidade de Brasília, mariana.pedrosa@colaborador.embrapa.br

² Bióloga, mestre em Biologia Microbiana, Universidade de Brasília, leticiamallmann.bio@gmail.com

³ Bióloga, doutora em Biologia Molecular, Universidade de Brasília, barbaragpaes@gmail.com

⁴ Engenheiro de bioprocessos e biotecnologista, mestre em Ciências Mecânicas, Embrapa Agroenergia, diogo.nakai@embrapa.br

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

sua utilização, como a obtenção de organismos capazes de tolerar produtos do hidrolisado, como o ácido acético, e que são capazes de metabolizar pentoses e hexoses (Ferreira, 2022). Portanto, o objetivo deste trabalho é avaliar se linhagens geneticamente modificadas para produção de ácido xilônico podem ter melhor desempenho quando superexpressando o fator de transcrição HAA1 – *Kp*-HAA1. Para tanto, utilizou-se de *Komagataella phaffii* para expressar dois genes de interesse, o Haa1 e o XDH_HL. Posteriormente, esses dois genes foram inseridos em uma mesma linhagem *kp*XDH-Haa1. Essas ações possuem como objetivo a criação de uma linhagem que resiste aos ácidos fracos, o que é o papel do gene Haa1, e que, ao mesmo tempo, possui uma maior produtividade de conversão da xilose, por meio do gene XDH. Dessa forma, neste trabalho, o desempenho dessas linhagens de *K. phaffii* foi avaliado em diferentes condições de processo, como a presença e ausência de ácido acético, no reciclo de células e em meio contendo hidrolisado lignocelulósico.

Materiais e métodos

Este trabalho utiliza as linhagens *Kp*-HAA1 (Paes, 2021), *Kp*-XDH (Ramos et al., 2021) e *Kp*-XDH-HAA1 (Ferreira, 2022).

Foram utilizados meios de cultura YPD ágar, YPD, YPX, YPDX e hidrolisado de cana, além de tampão ftalato de potássio para tamponar o pH dos meios de cultura em 5,5. O meio YPD constitui-se de extrato de levedura 1% (peso/vol), peptona 2% (peso/vol) e glicose 20 g/L. Para o meio sólido, foi acrescentado ágar bacteriológico a 2% (peso/vol). No meio YPX, a glicose do YPD foi substituída por xilose 20 g/L. Para o meio com hidrolisado, foi utilizado 20% desse composto diluído em água destilada.

Para a avaliação do desempenho das linhagens, a linhagem desejada foi inoculada em 30 mL de YPD como pré-inóculo. Após o crescimento desse pré-inóculo em um *shaker* durante 12 horas, 200 rpm e 28 °C, inocularam-se as leveduras em 40 mL do meio de cultura desejado em frascos Erlenmeyer de 250 mL. Então, os frascos foram incubados nas mesmas condições anteriores. A cada 24 horas, era medida a densidade óptica a 600 nm em um espectrofotômetro (OD600) e amostras de sobrenadante do meio eram coletadas para análises de cromatografia líquida de alta eficiência.

Resultados e discussão

O efeito da expressão do fator de transcrição HAA1 na tolerância ao ácido acético e na produção de AX foi avaliado pelo cultivo das linhagens *Kp*-XDH, *Kp*-HAA1 e *Kp*-XDH-HAA1 em meio YPX suplementado com 0, 2 g/L e 4 g/L de ácido acético (AA). Os resultados do experimento demonstram que o comportamento das três linhagens é parecido em concentrações de 0 g/L e 2 g/L, exceto pela maior velocidade no consumo de AA pelas linhagens superexpressando HAA1 (Figura 1). O mesmo padrão foi observado no meio com 4 g/L de AA (Figura 2), em que o crescimento celular da levedura foi bastante reprimido. Em relação ao consumo dos 15 g/L de xilose acrescidos no começo do experimento para produção do ácido xilônico, durante o experimento, a linhagem recombinante *Kp*-XDH-HAA1 consumiu melhor a xilose nas concentrações de 0 g/L e 2 g/L do que a linhagem *Kp*-XDH, conseqüentemente, a produção de ácido xilônico teve seu maior desempenho nessa linhagem recombinante.

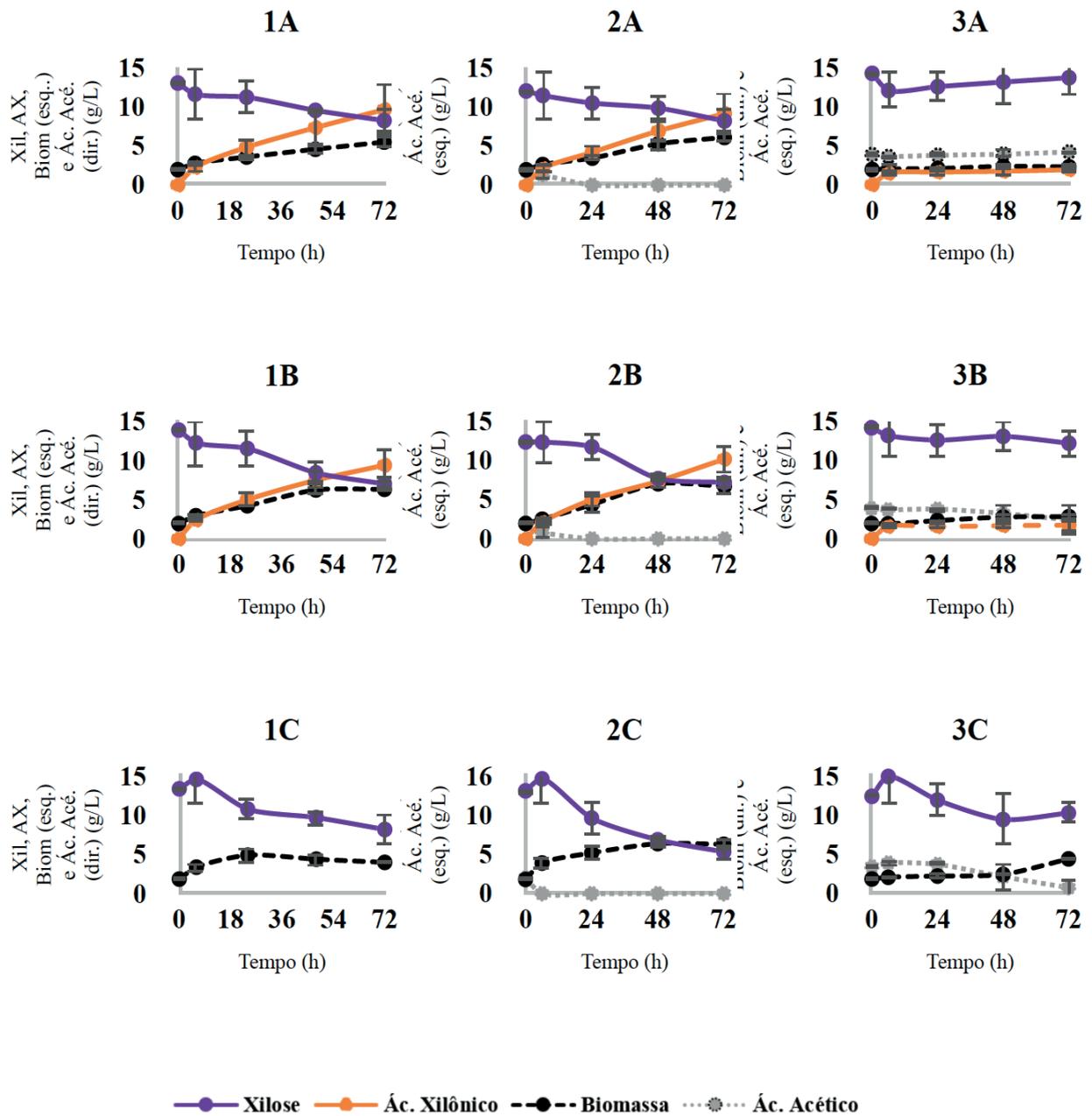


Figura 1. Perfil fermentativo em meio YPX + AA 0 g/L (1), 2 g/L (2) e 4 g/L (3) usando as linhagens *Kp*-XDH (A), *Kp*-XDH-HAA1 (B) *Kp*-HAA1 (C). Experimento realizado em triplicata e dados médios e desvio padrão plotados.

Na concentração de 4 g/L, como havia uma grande condição de estresse, o crescimento celular foi quase inexistente, com uma pequena ênfase na linhagem *Kp*-HAA1 que conseguiu resistir mais a esse composto. Também houve menor produção de ácido xilônico. As linhagens *Kp*-XDH e *Kp*-XDH-Haa1 produziram 9,16 g/L e 10,18 g/L de AX na presença de 2 g/L de AA, enquanto, na presença de 4 g/L de AA, produziram somente 1,93 g/L e 1,76 g/L de AX.

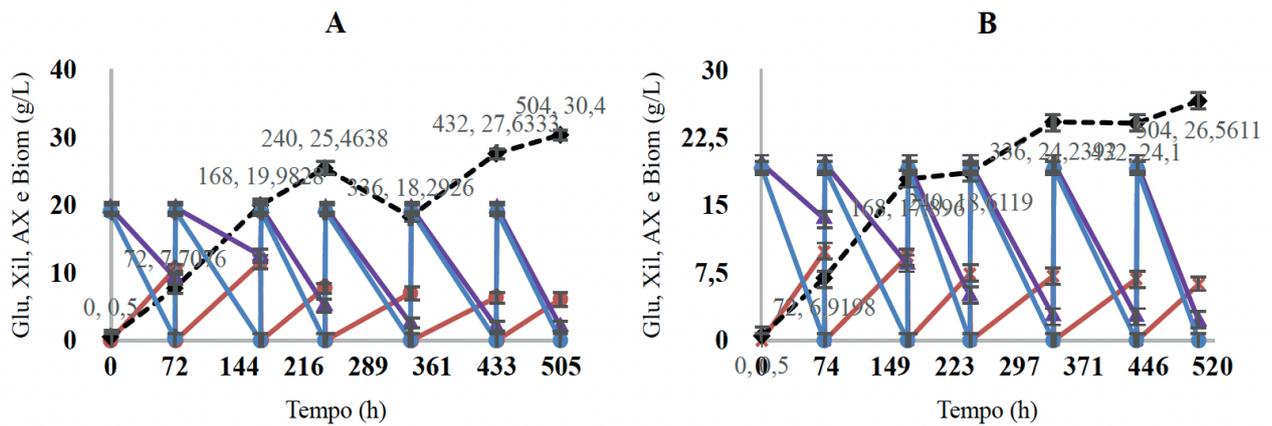


Figura 2. Perfil fermentativo em meio YPDx das linhagens Kp-XDH (A) e Kp-XDH-HAA1 (B). Experimento realizado em triplicata e os valores médios são apresentados.

Para o reciclo das células, todas as células eram coletadas do meio por centrifugação e transferidas para um novo meio a cada ciclo. Conforme esperado, os resultados demonstram que a cada reciclo novo a biomassa das linhagens era maior (Figura 2). Conseqüentemente, com um maior número de células, a quantidade de xilose colocada no meio (10 g/L) foi consumida completamente a cada reciclo. A glicose foi consumida em sua totalidade rapidamente pelas linhagens. Não se observaram diferenças significativas na produção de AX pelas duas linhagens ao longo do experimento (Figura 2). Com base nos resultados, nota-se que a quantidade de xilose pode ter sido limitante para se observar variações na produção de AX, e um novo experimento com concentrações crescente de xilose deve ser realizado.

Finalmente, comparou-se o desempenho das linhagens na presença de hidrolisado de cana. Os resultados demonstram que a linhagem Kp-HAA1 atingiu maior biomassa celular (Figura 3). As linhagens Kp-XDH e Kp-XDH-Haa1 demonstraram perfil semelhante tanto no crescimento celular quanto na produção de AX (Figura 3).

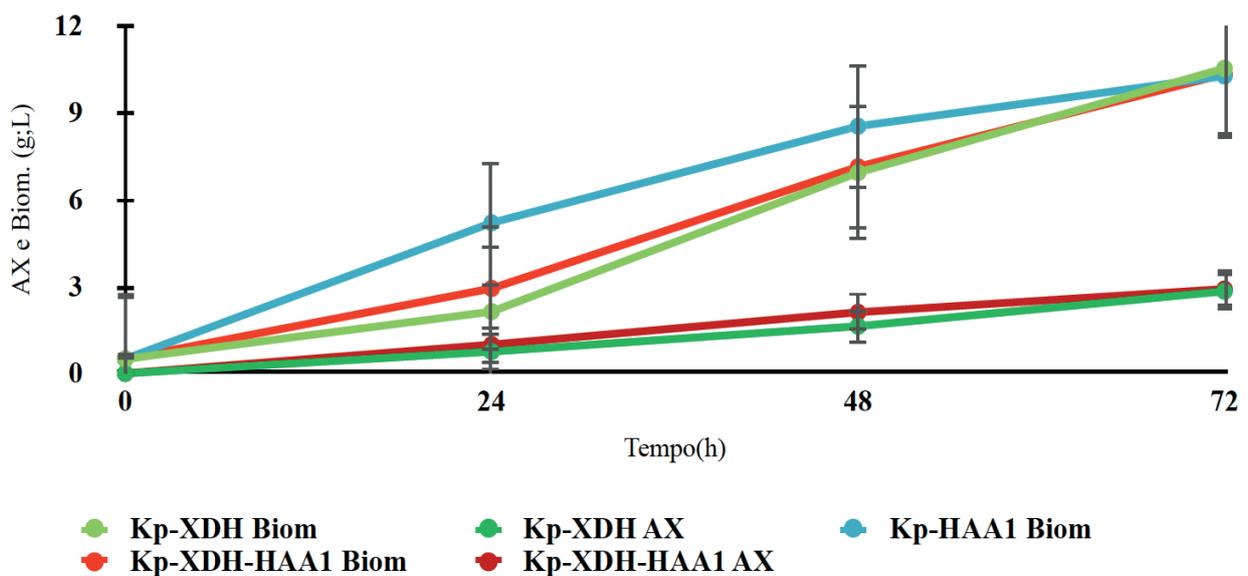


Figura 3. Perfil fermentativo em meio hidrolisado lignocelulósico (20%). Experimento realizado em triplicata e os valores médios são apresentados.

Conclusão

De acordo com as informações discutidas anteriormente, a superexpressão do fator de transcrição HAA1 favorece a resposta de *K. phaffii* ao ácido acético tanto em meio sintético quanto em hidrolisado de biomassa, permitindo melhor crescimento e assimilação desse composto mais rapidamente.

A linhagem recombinante *Kp*-XDH-Haa1 se apresentou como a mais eficiente para produzir ácido xilônico na presença de 2 g/L ácido acético. A concentração de 4 g/L mostrou o pior resultado em comparação com o controle sem ácido acético porque foi a que produziu as menores quantidades de ácido xilônico e biomassa, apesar disso, demonstrou que a linhagem *Kp*-HAA1 é a mais resistente em condições extremas.

Mesmo com a falta de glicose no meio de cultivo, uma quantidade considerável de, aproximadamente, 10 g/L de ácido xilônico foi produzido, demonstrando que talvez não seja necessário o uso de glicose, inicialmente, no meio para produção do ácido xilônico, já que essas linhagens de leveduras conseguem sobreviver e produzir o ácido xilônico assimilando apenas a xilose do meio.

Por último, não foi encontrada diferença significativa no cultivo em hidrolisado, exceto pelo fato de a linhagem *Kp*-HAA1 ter crescido um pouco melhor que as demais linhagens.

Referências bibliográficas

- BULL, S. R. Renewable alternative fuels: alcohol production from lignocellulosic biomass. **Renewable Energy**, v. 5, Part. II, p. 799-806, 1994. DOI: [https://doi.org/10.1016/0960-1481\(94\)90091-4](https://doi.org/10.1016/0960-1481(94)90091-4)
- CAI, J.; HE, Y.; YU, X.; BANKS, S. W.; YANG, Y.; ZHANG, X.; YU, Y.; LIU, R.; BRIDGWATER, A. V. Review of physicochemical properties and analytical characterization of lignocellulosic biomass. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 76, p. 309-322, 2017. DOI: Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.rser.2017.03.072>. Acesso em: 27 jul. 2023.
- CHUN, B. W. The development of cement and concrete additive. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 131, p. 645-658. Mar., 2006. DOI: <https://doi.org/10.1385/ABAB:131:1:645>.
- FERREIRA, L. M. M. **Expressão do fator de transcrição Haa1 em *Komagataella phaffii***: efeito na tolerância a ácido acético e na produção de ácido xilônico. 2022. 82 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade de Brasília, Brasília, 2022. Disponível em: <http://icts.unb.br/jspui/handle/10482/46136>. Acesso em: 27 jul. 2023.
- GOVIL, T.; JIA, W.; DIPAYAN, S.; TRIPATHI, A.; RAUNIYAR, S.; SALEM, D. R.; RAJESH, K. S. Lignocellulosic feedstock: a review of a sustainable platform for cleaner production of nature's plastics. **Journal of Cleaner Production**, v. 270, p. 2-10, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2020.122521>.
- JIN, D.; MA, J.; LI, Y.; JIAO, G.; LIU, K.; SUN, S.; ZHOU, J.; SUN, R. Development of the synthesis and applications of xylonic acid: a mini-review. **Fuel**, v. 314, p. 1-10, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2021.122773>.
- PAES, B. G. **Molecular and physiological responses of *Pichia pastoris* to lignocellulosic hydrolysate components**. 2021. 130 f. Tese (Doutorado) - Universidade de Brasília, Brasília, 2021. Disponível em: http://icts.unb.br/jspui/bitstream/10482/42011/1/2021_B%C3%A1rbaraGomesPaes.pdf. Acesso em: 27 jul. 2023.
- RAMOS, T. G. S. JUSTEN, F.; CARNEIRO, C. V. G. C.; HONORATO, V. M.; FRANCO, P. F.; VIEIRA, F. S.; TRICHEZ, D.; RODRIGUES, C. M. R.; ALMEIDA, J. R.M. Xylonic acid production by recombinant *Komagataella phaffii* strains engineered with newly identified xylose dehydrogenases. **Bioresource Technology Reports**, v. 16, p. 100825, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biteb.2021.100825>.
- WEBER, N. DE A. B.; ROCHA, B. P. DA; SCHNEIDER, P. S.; DAEMME, L. C.; PENTEADO NETO, R. DE A. Energy and emission impacts of liquid fueled engines compared to electric motors for small size motorcycles based on the Brazilian scenario. **Energy**, v. 168, p. 70-79, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.energy.2018.11.051>
- ZHANG, Z.; YANG, Y.; WANG, Y.; GU, J.; LU, X.; LIAO, X.; SHI, J.; KIM, C. H.; LYE, G.; BAGANZ, F.; HAO, J. Ethylene glycol and glycolic acid production from xylonic acid by *Enterobacter cloacae*. **Microbial Cell Factories**, v. 19, n. 89, p. 1-16, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12934-020-01347-8>

Efeito do cálcio na produção de ácido láctico a partir de glicerol por *Lactobacillus plantarum*

Graciane Resende¹, Marcus Fernando Farias Silva Lima², Mônica Caraméz Triches Damaso³, Thaís Fabiana Chan Salum⁴, Sílvia Belém Gonçalves⁵

Resumo

O objetivo principal deste trabalho foi analisar o impacto de dois sais de cálcio, nitrato de cálcio e cloreto de cálcio, na produção de ácido láctico a partir do glicerol, por processo fermentativo utilizando uma cepa de *Lactobacillus plantarum* (BRMCTAA179). Diferentes concentrações dos sais foram avaliadas em experimentos conduzidos em batelada durante 48 horas de cultivo. A condição com melhor desempenho foi selecionada para ensaios posteriores em batelada alimentada com duração de 72 horas, a alimentação foi com meio a 200 g/L e realizada a cada 24 horas. Observou-se que o nitrato de cálcio teve um efeito inibitório significativo na produção de ácido láctico, especialmente em concentrações mais elevadas. Por outro lado, a presença do cloreto de cálcio em uma concentração de 1 g/L mostrou resultados promissores, permitindo uma produção expressiva de ácido láctico a partir do glicerol. A produção de ácido láctico nos ensaios em batelada alimentada também foi expressiva, atingindo um valor de 29,07 g/L, enquanto o glicerol foi quase completamente consumido após 72 horas de cultivo. Consequentemente, a escolha adequada do sal de cálcio revelou-se um fator crucial para a produção eficiente de ácido láctico a partir do glicerol.

Termos para indexação: fermentação, bactéria, biodiesel, ácido láctico, biorrefinaria, sais de cálcio.

Introdução

A produção de ácido láctico tem se destacado como de grande interesse tanto para indústria alimentícia quanto para setores relacionados à saúde e aos materiais renováveis. Esse importante composto tem diversas aplicações, desde a produção de alimentos fermentados até a fabricação de polímeros biodegradáveis. (Hidawati et al., 2023) Dentre os microrganismos utilizados para a obtenção do ácido láctico, a bactéria láctica *Lactobacillus plantarum* surge como um agente fermentativo versátil e promissor. (Fu; Mathews, 1999)

Algumas bactérias são capazes de converter eficientemente substratos como glicose e glicerol em ácido láctico, por meio de uma via metabólica conhecida como fermentação láctica. Além das fontes de carbono, a bactéria necessita de nutrientes para seu desenvolvimento, como aminoácidos, sais, peptídeos e vitaminas. (Hofvendahl; Hahn-Hägerdal, 2000; Evanovich et al., 2019)

Um sal amplamente empregado na rota fermentativa é o carbonato de cálcio. O cálcio desempenha um papel fundamental nesse processo, sendo imprescindível para o funcionamento adequado das enzimas envolvidas na fermentação láctica. Sua presença influencia diretamente a atividade metabólica das bactérias envolvidas. (Pejin et al., 2015) Além disso, o carbonato de cálcio também

¹ Engenheira química, mestra em Engenharia Química, Universidade Federal de Goiás, graciane.resende@colaborador.embrapa.br

² Engenheiro químico, Universidade de Brasília, marcus.lima@colaborador.embrapa.br

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

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

⁵ Engenheira química, Doutora em Engenharia Química, Embrapa Agroenergia, silvia.belem@embrapa.br

desempenha um papel crucial no controle do pH do meio, que é um fator essencial para o crescimento das bactérias durante a fermentação.

A utilização do carbonato de cálcio como fonte de cálcio no meio de cultivo apresenta alguns desafios. Esse composto apresenta baixa solubilidade em água, o que dificulta sua dissolução e disponibilidade para as bactérias durante o processo de fermentação. Além disso, em razão da insolubilidade, o material tende a precipitar, dificultando o bombeamento do material para reatores maiores e sua utilização em larga escala.

Diante dessa dificuldade, o nitrato de cálcio e o cloreto de cálcio surgem como alternativas para suprir a demanda de cálcio no meio de cultivo de *Lactobacillus plantarum*. Esses sais de cálcio apresentam boa solubilidade em água e têm sido investigados pelo nosso grupo como potenciais substitutos do carbonato de cálcio, oferecendo uma solução para melhorar a produção de ácido láctico.

Nesse contexto, este estudo tem como objetivo avaliar a influência do nitrato e do cloreto de cálcio na produção de ácido láctico por uma cepa de *Lactobacillus plantarum*. Serão investigadas diferentes concentrações desses sais em ensaios realizados em batelada e batelada alimentada, visando determinar a melhor condição de cultivo para a produção eficiente de ácido láctico.

Materiais e métodos

A bactéria *Lactobacillus plantarum* (BRMCTAA179), preservada em ultrafreezer a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ na Coleção de Microrganismos e Microalgas Aplicados à Agroenergia e Biorrefinarias (CMMAABio), da Embrapa Agroenergia, foi inoculada em placas de Petri com diâmetro de 90 mm, em meio MRS-ágar por 48 horas a $28\text{ }^{\circ}\text{C}$. Para o preparo do pré-inóculo, foi utilizado Erlenmeyer contendo MRS-caldo. O meio preparado foi submetido à autoclavagem. O pré-inóculo foi mantido em agitação constante em agitador orbital a 150 rpm a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$, por 24 horas.

Para o inóculo foi preparado um meio com 3 g/L de triptona, 6 g/L de extrato de levedura, 10 g/L de acetato de sódio, 0,2 g/L de sulfato de magnésio, 0,005 g/L de sulfato de manganês, 1,5 g/L de fosfato de potássio, 2 g/L de Tween 80, 20 g/L de glicerol. Concentrações de 1 g/L, 4 g/L, 7 g/L e 10 g/L de nitrato de cálcio e o cloreto de cálcio foram avaliadas. O inóculo foi mantido em agitador orbital a 180 rpm a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Para a análise da concentração dos sais de cálcio, os experimentos em batelada foram conduzidos em tubos de fundo cônico de 50 mL por 48 horas, densidade ótica inicial a 600 nm (DO600 nm) de 10 e agitação de 180 rpm. A concentração na qual foi possível observar a maior produtividade foi selecionada e avaliada em ensaios realizados em batelada alimentada em frascos redondos de fundo chato de 65 mL por um período de 72 horas de cultivo, a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ e DO inicial de 5. Nessa condição, adicionalmente, a cada 24 horas, o experimento foi alimentado utilizando um meio 200 g/L de forma que o volume alimentado correspondesse ao necessário para que a concentração de glicerol fosse de 20 g/L. Durante ambos os ensaios, o pH do meio foi monitorado a cada 24 horas e corrigido para pH 7,5, utilizando-se uma solução de hidróxido de potássio 2 mol/L. Todos os experimentos foram realizados em triplicata. As amostras coletadas foram analisadas por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC), e foram injetadas na coluna Aminex HPX-87H a $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ com fase móvel de 0,005 mol/L H_2SO_4 a 0,6 mL/min de vazão.

Resultados e discussão

Avaliação de diferentes concentrações de sais de cálcio na produção de ácido láctico por *L. plantarum*

Os ensaios foram realizados com diferentes concentrações de nitrato de cálcio em batelada. A Figura 1 mostra a concentração de glicerol (A) e a produção de ácido láctico (B) ao longo do tempo de cultivo em diferentes concentrações de nitrato de cálcio. Após 48 horas, para a concentração de 1 g/L de nitrato de cálcio, a produção de ácido láctico atingiu uma concentração de $11,34 \pm 0,45$ g/L. Ao aumentar a concentração de nitrato de cálcio para 4 g/L, observou-se uma redução na produção de ácido láctico para $6,68 \pm 2,69$ g/L. Isso sugere que o aumento da concentração do sal pode ter um efeito inibitório ou limitante sobre a bactéria no processo de produção do ácido láctico. Essa tendência de diminuição na produção se manteve para concentrações ainda maiores de nitrato de cálcio, como na concentração de 7 g/L, na qual a bactéria produziu apenas $0,94 \pm 1,16$ g/L de ácido láctico, e em 10 g/L do sal, em que não foi detectada produção do ácido.

Com isso, é possível observar que, em altas concentrações de nitrato de cálcio, há uma redução significativa na produção de ácido láctico. Isso pode indicar que o aumento da concentração de nitrato de cálcio pode inibir o metabolismo das células e, conseqüentemente, a síntese de ácido láctico. Esse efeito pode acontecer porque altas concentrações de nitrato de cálcio podem favorecer outras vias metabólicas ou levar a alterações no ambiente celular que afetam negativamente a produção de ácido láctico. Observa-se que, mesmo em concentrações menores de nitrato de cálcio, ainda há produção de ácido láctico, mas os valores são relativamente baixos quando comparados com resultados obtidos pelo grupo usando carbonato de cálcio. Como foi observado anteriormente pelo grupo, foram obtidos aproximadamente 20 g/L de ácido láctico a partir de cerca de 21 g/L de glicerol com rendimento de 96% e produtividade de 0,47 g/L/h (dados não publicados). Mazumdar et al. (2010) também produziram 32 g/L de ácido láctico a partir de 40 g/L de glicerol com rendimento de 85% utilizando o carbonato de cálcio como fonte de cálcio do meio.

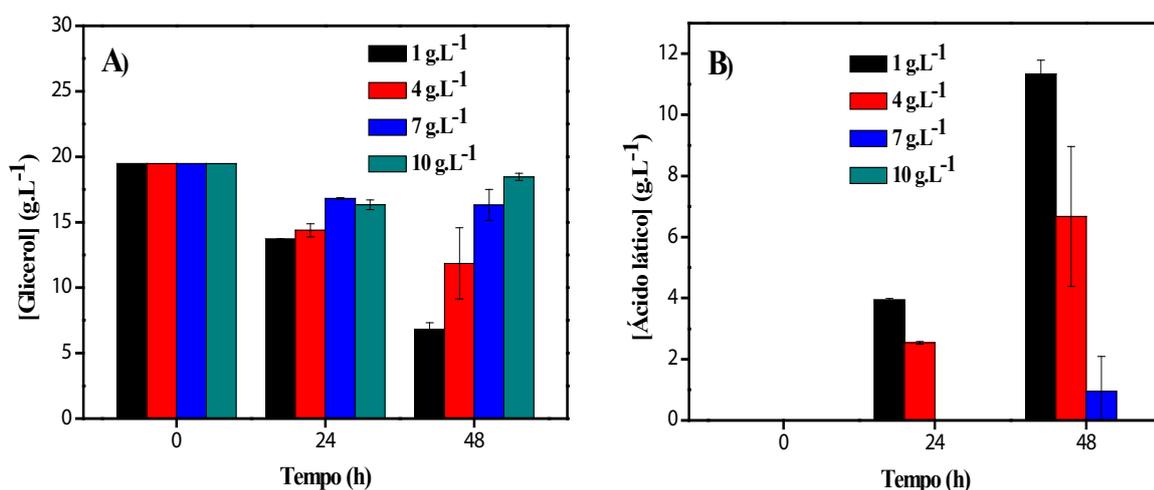


Figura 1. Glicerol remanescente (A) e produção de ácido láctico (B) ao longo do tempo em diferentes concentrações de nitrato de cálcio no cultivo de *Lactobacillus plantarum* para produção de ácido láctico a partir de glicerol.

O cloreto de cálcio também foi testado na fermentação em batelada e sua influência na produção de ácido láctico a partir do glicerol foi investigada, conforme mostrado na Figura 2. O gráfico A da Figura 2 revela que, ao longo de 48 horas, o glicerol foi quase completamente consumido em todas as concentrações de cloreto de cálcio estudadas. Esse resultado sugere que a presença do

cloreto de cálcio não inibiu a utilização do glicerol, independentemente da concentração do sal. No gráfico **B**, pode-se notar que concentração mais baixa de cloreto de cálcio resultou em uma maior produção de ácido láctico em comparação com as concentrações mais elevadas. Ao final das 48 horas, as concentrações de ácido láctico foram de $17,92 \pm 2,41$ g/L, $14,86 \pm 1,49$ g/L, $15,65 \pm 0,41$ g/L e $12,42 \pm 0,64$ g/L para as concentrações de 1 g/L, 4 g/L, 7 g/L e 10 g/L de cloreto de cálcio, respectivamente.

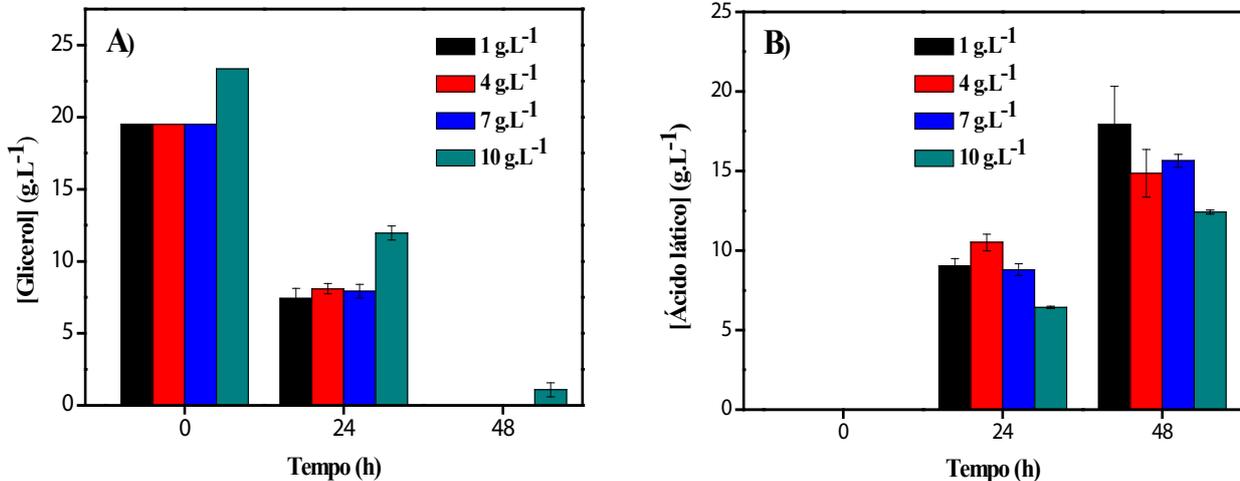


Figura 2. Glicerol remanescente (A) e produção de ácido láctico (B) ao longo do tempo em diferentes concentrações de cloreto de cálcio no cultivo de *Lactobacillus plantarum* para produção de ácido láctico a partir de glicerol.

O resultado obtido para a concentração de 1 g/L de cloreto de cálcio foi bastante promissor, com rendimento de 92% e produtividade de 0,37 g/L/h, motivando os ensaios em batelada alimentada, que estão apresentados na Figura 3.

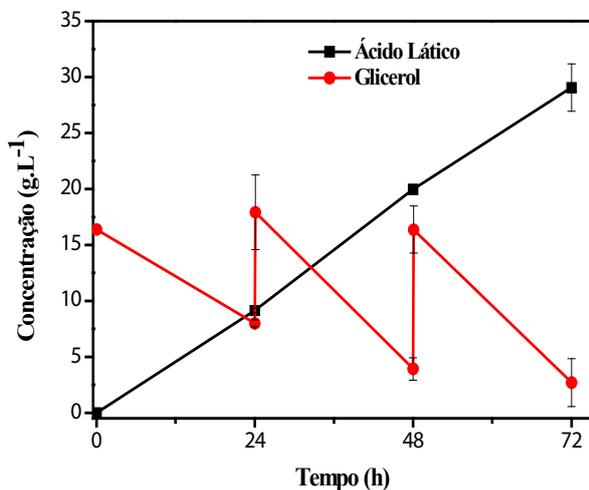


Figura 3. Perfil cinético de consumo de glicerol e produção de ácido láctico na concentração de 1 g/L de cloreto de cálcio com batelada alimentada.

Os dados apresentados na Figura 3 revelam resultados promissores sobre a produção de ácido láctico e o consumo de glicerol durante um período de 72 horas de cultivo. Observou-se que a produção de ácido láctico atingiu 29,07 g/L, enquanto o nível de glicerol quase zerou nesse mesmo intervalo de tempo. É importante destacar que a presença de cloreto não exerceu um efeito negativo sobre o metabolismo da bactéria, evidenciando sua capacidade de converter 36,05 g/L de glicerol em ácido láctico, com um rendimento de 87% e uma produtividade de 0,4 g/L/h. Além disso, é importante notar que o glicerol que não foi convertido em ácido láctico foi utilizado para o crescimento celular.

Comparativamente, em relação aos dados obtidos pelo grupo anteriormente em experimento com as mesmas condições, foi possível produzir 36,63 g/L de ácido lático a partir de 46,24 g/L de glicerol na presença de carbonato de cálcio no meio, alcançando um rendimento de 79% e uma produtividade de 0,51 g/L/h (dados não publicados). Mazumdar et al. (2013) alcançaram a produção de 50 g/L de ácido lático a partir de 56 g/L de glicerol com um rendimento de 93%, ao utilizar o carbonato de cálcio como fonte de cálcio no meio de fermentação. Esses resultados indicam que as condições empregadas com o cloreto de cálcio se aproximam significativamente dos resultados obtidos com carbonato de cálcio, e com a vantagem de não formar o precipitado presente quando este último sal é utilizado. Com isso, planeja-se explorar outras estratégias de fermentação para buscar resultados similares aos obtidos com o carbonato de cálcio. Essas novas abordagens visam a aperfeiçoar o processo de produção de ácido lático, buscando alternativas mais eficientes ou economicamente viáveis e que possibilitem o escalonamento do processo de produção do ácido lático a partir do glicerol.

Conclusão

Foram investigados os efeitos dos sais de cálcio na produção de ácido lático a partir do glicerol. Notou-se que o nitrato de cálcio teve uma influência negativa na produção de ácido lático, especialmente em concentrações mais altas. Por outro lado, o cloreto de cálcio mostrou-se promissor em uma concentração de 1 g/L, possibilitando uma alta produção de ácido lático a partir do glicerol consumido, com rendimento de 91%, e mantendo o metabolismo celular eficiente durante o processo. Esse resultado expressivo também foi observado nos ensaios em batelada alimentada, em que a produção de ácido lático alcançou um valor de 29,07 g/L, e o glicerol foi praticamente todo consumido, após 72 horas de cultivo. Assim, a escolha do tipo de sal de cálcio revelou ser um fator crucial na produção de ácido lático a partir do glicerol. O cloreto de cálcio, quando utilizado em concentrações adequadas, demonstrou ser benéfico para a produção do composto desejado, proporcionando resultados promissores.

Referências bibliográficas

- EVANOVICH, E.; DE SOUZA MENDONÇA MATTOS, P. J.; GUERREIRO, J. F. Comparative genomic analysis of *Lactobacillus plantarum*: an overview. **International Journal of Genomics**, 2019. Article 4973214.
- FU, W.; MATHEWS, A. P. Lactic acid production from lactose by *Lactobacillus plantarum*: kinetic model and effects of Ph, substrate, and oxygen. **Biochemical Engineering Journal**, v. 3, n. 3, p. 163-170, 1999.
- HIDAWATI; SARASWATY, V.; MARGANINGRUM, D.; NISSA, R. C.; ABDULLAH, A. H. D.; HANDAYANI, S. The carrageenan fermentation process for (l)-lactic acid production using *Lactobacillus plantarum*: effect of fermentation time. **IOP Conference Series: Earth and Environmental Science**, v. 1201, n. 1, 2023. 12096.
- HOFVENDAHL, K.; HAHN-HÄGERDAL, B. Factors affecting the fermentative lactic acid production from renewable resources1. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 26, n. 2-4, p. 87-107, 2000.
- MAZUMDAR, S.; BLANKSCHEN, M. D.; CLOMBURG, J. M.; GONZALEZ, R. B. Efficient synthesis of l-lactic acid from glycerol by metabolically engineered *Escherichia coli*. **Microbial Cell Factories**, v. 12, n. 1, p. 1-11, 2013.
- MAZUMDAR, S.; CLOMBURG, J. M.; GONZALEZ, R. *Escherichia coli* strains engineered for homofermentative production of d-lactic acid from glycerol. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 76, n. 13, 4327-4336, 2010.
- PEJIN, J.; RADOSAVLJEVIĆ, M.; MOJOVIĆ, L.; KOCIĆ-TANACKOV, S.; DJUKIĆ-VUKOVIĆ, A. The influence of calcium-carbonate and yeast extract addition on lactic acid fermentation of brewer's spent grain hydrolysate. **Food Research International**, v. 73, p. 31-37, 2015.

Engenharia genética de *Komagataella phaffii* para aumento da tolerância a inibidores derivados de lignocelulose

Lívia Teixeira Duarte-Brandão¹, Mariana Nogueira de Moura Freitas², Diogo Keiji Nakai³, João Ricardo Moreira de Almeida⁴

Resumo

Em razão do crescimento mundial da demanda energética e das preocupações ambientais, torna-se urgente a busca por fontes alternativas de energia e materiais renováveis que poderão diminuir a dependência que a humanidade tem das fontes fósseis. A biomassa lignocelulósica, composta por celulose, hemicelulose e lignina, por ser uma matéria-prima renovável e abundante, atrai grande interesse para a produção de energia, biocombustíveis e produtos químicos de base biológica. Para ser utilizada em processos biotecnológicos, a biomassa lignocelulósica precisa ser submetida a pré-tratamentos e hidrólise, processos que, além de hexoses e pentoses, também liberam furaldeídos, ácidos orgânicos e compostos fenólicos, que são tóxicos para os microrganismos que irão converter os açúcares nos produtos desejados. Com o objetivo de aumentar a tolerância de *K. phaffii* aos compostos inibitórios presentes no hidrolisado lignocelulósico, um gene potencialmente responsável pela conversão de inibidores foi identificado e validado neste trabalho. Para tanto, uma nova linhagem de *K. phaffii* foi construída pela superexpressão de um gene nativo (GX) sob controle do promotor PGK1. O desempenho da linhagem transformante, denominada M12 pKLD-GX, foi avaliado em diferentes condições de cultivo na presença de diferentes inibidores. Os resultados demonstram que tal linhagem apresentou maior tolerância ao inibidor HMF (hidroximetil-furfural) do que a linhagem controle, fazendo com que o composto fosse convertido mais rapidamente. Desse modo, podemos concluir que o gene GX conferiu à levedura um aumento na resistência ao inibidor HMF.

Termos para indexação: *Komagataella phaffii*, *Pichia pastoris*, furfural, HMF, hidrolisado lignocelulósico.

Introdução

A demanda energética mundial tem crescido rapidamente nos últimos anos, ao mesmo tempo em que os combustíveis fósseis têm se tornado cada vez mais escassos e caros. Visando a suprir a demanda energética e considerando também questões ambientais, nos últimos anos tem aumentado o interesse mundial por processos biotecnológicos renováveis e sustentáveis para a produção de energia, biocombustíveis e produtos químicos de base biológica (Mankar et al., 2021). Nesse contexto, a biomassa lignocelulósica, por ser uma matéria-prima renovável, apresenta grande potencial para a produção de biocombustíveis de segunda geração e outros produtos químicos de base biológica, por se tratar de uma alternativa às fontes fósseis de carbono. A biomassa lignocelulósica é majoritariamente composta por três polímeros: celulose (35%—50%), hemicelulose (20%—35%) e lignina (5%—30%), e as proporções de cada componente variam dependendo da fonte da qual a

¹ Farmacêutica, mestre em Ciências Farmacêuticas, Embrapa Agroenergia, livia.duarte@embrapa.br

² Biotecnologista, mestranda em Biologia Microbiana, Universidade de Brasília, mariana.freitas@colaborador.embrapa.br

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

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

biomassa lignocelulósica foi extraída (Buchholz; Seibel, 2008). Entre as fontes de biomassa lignocelulósica, destacam-se os resíduos agroindustriais, florestais e urbanos.

Para ser aproveitada, a biomassa lignocelulósica precisa ser submetida a pré-tratamentos (físico, químico, biológico, mecânico ou combinado) e hidrólise ou despolimerização, para que os açúcares possam ser utilizados como fonte de carbono e energia para os microrganismos em processos biotecnológicos. Além de hexoses e pentoses, os processos de pré-tratamento e hidrólise também liberam compostos que inibem o metabolismo dos microrganismos que irão converter os açúcares nos produtos desejados (Almeida et al., 2007).

Os inibidores lignocelulósicos podem ser classificados em três grupos principais: furaldeídos (2-furaldeído e 5-hidroximetil-2-furaldeído ou HMF), ácidos fracos (ácido acético, ácido fórmico e ácido levulínico) e compostos fenólicos (vanilina, siringaldeído, coniferil aldeído, ácido ferúlico e outros) (Almeida et al., 2007). A construção de uma levedura tolerante a esses compostos inibitórios presentes na biomassa é então de grande interesse.

Estudos preliminares demonstraram que a levedura *Komagataella phaffii* aumenta a expressão de diferentes genes em resposta a inibidores lignocelulósicos (Paes et al., 2021). Este trabalho tem como objetivo identificar e validar um gene capaz de aumentar a tolerância da levedura a compostos inibitórios. Baseado em análises de similaridade e funcionalidade com genes de *Saccharomyces cerevisiae*, o gene GX de *K. phaffii* foi selecionado para superexpressão na levedura. Finalmente, sua funcionalidade foi avaliada em ensaios com a levedura geneticamente modificada.

Materiais e métodos

Linhagens e plasmídeos

Neste trabalho, foram utilizadas as linhagens X33 (Invitrogen) e M12 (Betancur et al., 2017) da levedura *Komagataella phaffii*. Para as transformações por eletroporação foram utilizadas células eletrocompetentes de *Escherichia coli* DH10BT1 (Invitrogen). Os plasmídeos utilizados foram o pGEM-T Easy (Promega) e o pKLD (Betancur et al., 2017), plasmídeo que foi obtido a partir do vetor pKLD-XYD, após digestão com *Bam*HI e *Not*I para a excisão do XYD e posterior inserção do gene de interesse.

Clonagem do gene GX no vetor de expressão pKLD

Inicialmente, o DNA genômico de *K. phaffii* X-33 foi extraído e utilizado como molde para a amplificação do gene GX. Após amplificação, o produto da reação de PCR foi purificado utilizando-se o kit “Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System” (Promega). Após purificação, o fragmento correspondente ao gene GX foi ligado ao vetor pGEM-T Easy (Promega), conforme instruções do fabricante. A seguir, células eletrocompetentes *E. coli* DH10BT1 foram transformadas por eletroporação, utilizando-se 2 µL do sistema de ligação previamente preparado. As células transformadas foram plaqueadas em LB-ágar contendo 50 µg/mL de ampicilina, 100 µL de IPTG 100 mM e 20 µL de X-gal 50 mg/mL, e incubadas a 37 °C, por 16 horas. Os clones pGEM-GX obtidos foram então digeridos com as enzimas de restrição *Bam*HI e *Sal*I, para confirmação deles e obtenção do inserto.

Para clonagem no vetor de expressão pKLD, o inserto e o vetor foram obtidos por digestão com as enzimas *Bam*HI e *Not*I. Após ligação, células de *E. coli* foram transformadas e selecionadas como previamente descrito. A confirmação da clonagem foi realizada por digestões com *Bam*HI/*Not*I e *Eco*RV.

Transformação de *K. phaffii* por eletroporação

O DNA plasmidial pKLD-GX foi digerido com *Bam*HI/ *Not*I e *Eco*RV e utilizado para transformação de *K. phaffii* linhagem M12 por eletroporação, seguindo o protocolo descrito no kit *Pichia* Expression (Invitrogen). Após transformação, a seleção dos clones de *K. phaffii* M12 foi feita em placas contendo meio mínimo MD, que foram incubadas a 30 °C por cinco dias. Os clones obtidos foram crescidos em placa contendo meio mínimo MD e foram escolhidos os clones com melhor crescimento para os experimentos subsequentes em microplacas e fermentação em frascos Erlenmeyer.

Efeito da superexpressão de GX no metabolismo de inibidores e xilose

Para avaliar o efeito da superexpressão de GX no metabolismo de inibidores e xilose, clones transformantes *K. phaffii* M12-GX foram avaliados em diferentes condições de cultivo. Para experimentos em microplacas e frascos Erlenmeyer, foram utilizados os meios de cultivo YNB contendo glicose 40 g/L suplementados com os furaldeídos furfural 2 g/L ou HMF 2 g/L, ou hidrolisado 30% e também YNB contendo xilose 40 g/L. A xilose foi escolhida pois estudos prévios demonstraram que enzima responsável pela redução de xilose também é capaz de reduzir HMF. As placas ou frascos Erlenmeyer foram incubadas a 30 °C, e amostras foram periodicamente coletadas para medição de biomassa por OD600 e também para quantificação de metabólitos.

Análise e quantificação de metabólitos

Amostras retiradas dos cultivos fermentativos foram analisadas por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC, do inglês *High Performance Liquid Chromatography*) para quantificação dos compostos glicose, xilose, xilitol, glicerol, etanol, ácido acético e HMF. Foi utilizado sistema HPLC Acquity H-Class (Waters), equipado com detector de Índice de Refração (RID) e coluna HPX 87H (Bio-Rad). As corridas foram realizadas em fase móvel de ácido sulfúrico (H_2SO_4) a 5 mM, fluxo de 0,6 mL/min e temperatura de 45 °C. Os compostos HMF e furfural também foram analisados no detector Photodiode Array (PDA), na mesma coluna.

Resultados e discussão

Clonagem do gene GX no vetor de expressão pKLD

Inicialmente, o fragmento gênico de 1.134 pb correspondente ao gene GX foi amplificado a partir do DNA genômico de *K. phaffii* X33 por meio de reação de PCR, utilizando-se conjunto específico de primers. Posteriormente, o produto de PCR foi subclonado no vetor pGEM-T Easy, originando o plasmídeo pGEM-T-GX. Para realizar a clonagem do gene GX no vetor de expressão pKLD, os plasmídeos pKLD-XYD e pGEM-T-GX foram digeridos com as enzimas *Bam*HI e *Not*I. As bandas correspondentes ao vetor pKLD e GX foram purificadas e ligadas. Após transformação de *E. coli*, transformantes foram recuperados e o DNA plasmidial foi extraído com sucesso. Para confirmação do plasmídeo pKLD-GX, o DNA plasmidial foi digerido com as enzimas *Bam*HI e *Sall*. Os dois clones analisados apresentaram a banda esperada de aproximadamente 1.134 pb (dados não mostrados). Finalmente, o vetor pKLD-GX foi sequenciado e os resultados de alinhamento de sequência confirmaram mais uma vez a correta clonagem do gene.

Transformação de *K. phaffii* e seleção inicial de transformantes

Na transformação de *K. phaffii* M12 foram obtidos 16 clones, os quais foram plaqueados em meio seletivo com antibiótico (Figura 1). Dentre os 16 clones *K. phaffii* M12 pKLD-GX obtidos, sete foram escolhidos para análise do crescimento em diferentes meios de cultura em microplacas. A levedura *K. phaffii* M12-pKLD foi utilizada como controle em todos os experimentos. Todas as linhagens demonstraram crescimento celular similar no meio YNB-glicose, demonstrando que a

superexpressão do gene GX não afeta negativamente o metabolismo da linhagem. Observou-se que houve maior crescimento da levedura Kp-GX-L2.1 no meio YNB-HMF e houve maior crescimento da levedura denominada Kp-GX-L1.3 no meio YNB-xilose, quando comparadas com o comportamento da levedura *K. phaffii* M12 controle. Nos meios suplementados com furfural e hidrolisado, não foram observadas diferenças entre o crescimento das leveduras transformadas e da levedura M12 controle, por isso esses meios não foram mais utilizados nos cultivos posteriores em frascos Erlenmeyer (dados não mostrados). Os clones Kp-GX-L2.1 e Kp-GX-L1.3 foram escolhidos para análises detalhadas de crescimento e metabolismo.

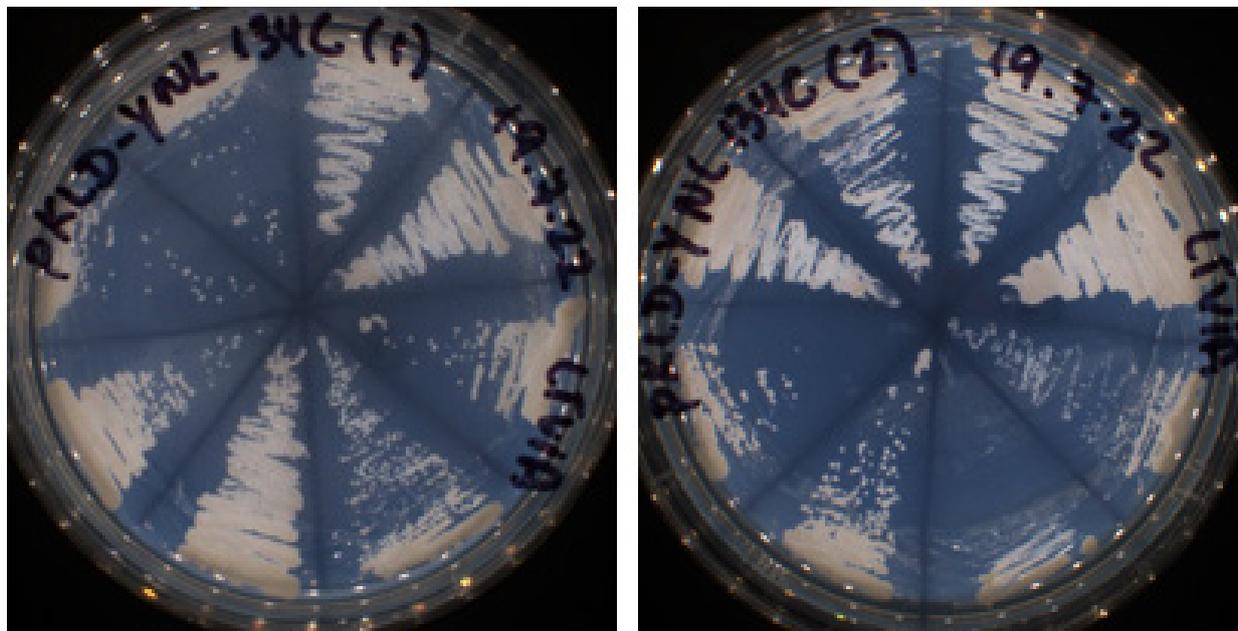


Figura 1. Clones *K. phaffii* M12 pKLD-GX obtidos por eletroporação.

Efeito da superexpressão do gene GX no crescimento e metabolismo de *K. phaffii*

Para avaliar o efeito da superexpressão do gene GX no crescimento e no metabolismo de *K. phaffii*, as linhagens transformantes foram cultivadas em meio YNB suplementado com glicose ou xilose e glicose mais HMF. Nos meios YNB suplementados com glicose e xilose não foram observadas diferenças entre o crescimento das leveduras transformadas e da levedura M12 controle negativo (Kp-C) (Figura 2). Esse resultado indica que o gene GX não afeta o metabolismo de xilose, e é reforçado pelo fato de que os dados de perfil metabólico também não demonstraram diferenças significativas no consumo dos açúcares (dados não mostrados). Entretanto, houve maior crescimento da levedura Kp-GX-L2.1 em meio YNB-HMF, a partir de 31 horas de incubação, quando comparada com o comportamento da linhagem controle (Figura 2).

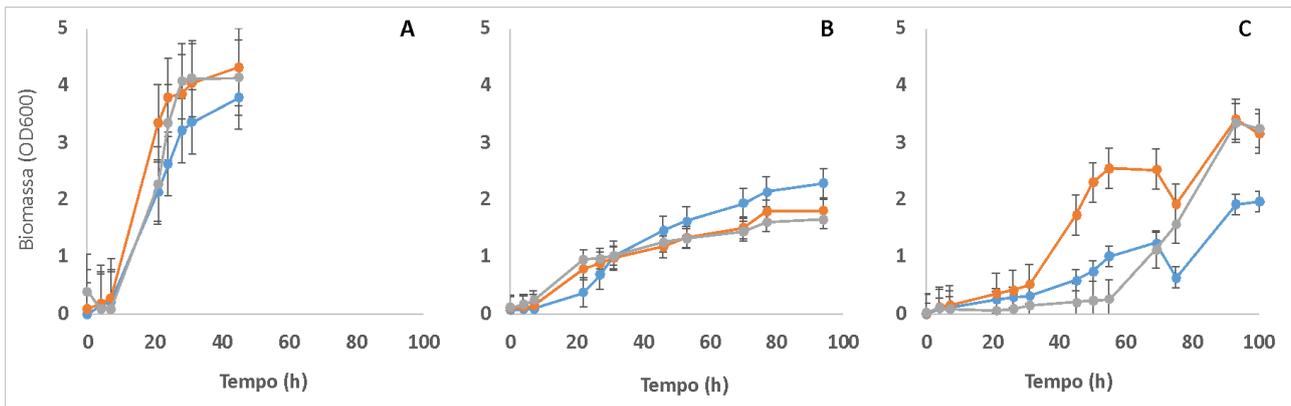


Figura 2. Perfil de crescimento das linhagens recombinantes *K. phaffii* expressando o gene GX na presença e ausência de HMF. Linhagem Kp-GX-L2.1 (laranja), Kp-GX-L1.3 (azul) e Kp-C controle (cinza). (A): meio YNB + glicose 40 g/L. (B): meio YNB + xilose 40 g/L. (C): meio YNB + glicose 40 g/L + HMF 2 g/L. São apresentados valores médios e desvio padrão de experimentos realizados em triplicata.

Para confirmar o efeito positivo da expressão do gene GX sobre o metabolismo de HMF, o perfil metabólico das linhagens também foi analisado. Conforme demonstrado na Figura 3, houve uma diferença significativa entre a conversão de HMF pelas leveduras transformadas e a levedura controle. Para as leveduras transformadas Kp-GX-L1.3 e Kp-GX-L2.1, o HMF foi completamente convertido em cerca de 40 horas de incubação, enquanto para a controle o HMF demorou cerca de 80 horas. Embora as leveduras Kp-GX-L1.3 e Kp-GX-L2.1 tenham sido transformadas com o mesmo gene GX, observou-se que a Kp-GX-L1.3 consumiu mais glicose do que a Kp-GX-L2.1, embora tenhamos observado uma menor formação de biomassa no clone Kp-GX-L1.3 quando comparado com o clone Kp-GX-L2.1 (Figura 3).

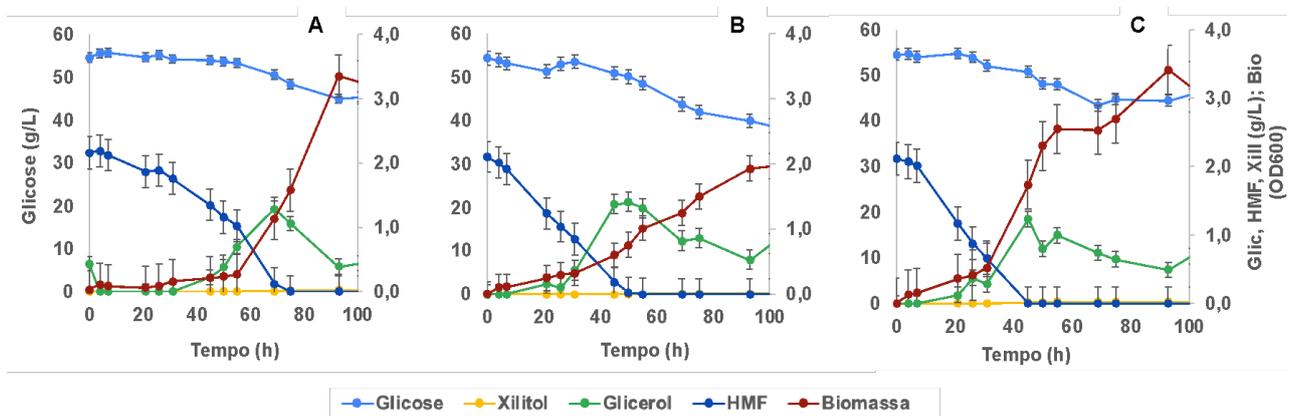


Figura 3. Conversão de HMF e formação de biomassa de linhagens recombinantes *K. phaffii* em meio YNB suplementado com glicose 40 g/L e HMF 2 g/L. (A): *K. phaffii* M12 controle. (B): *K. phaffii* M12-GX L1.3. (C): *K. phaffii* M12-GX L2.1.

Conclusão

O gene GX foi superexpresso com sucesso na levedura *K. phaffii* M12 e gerou uma linhagem mais tolerante ao HMF. Foi demonstrado pela primeira vez que o gene aumenta a capacidade da

levedura converter o HMF, e conseqüentemente permite o melhor crescimento da levedura na presença do inibidor, o que favorece seu uso industrial.

Referências bibliográficas

ALMEIDA, J. R. M.; MODIG, T.; PETERSSON, A.; HÄHN-HÄGERDAL, B.; LIDÉN, G.; GORWA-GRAUSLUND, M. F. Increased tolerance and conversion of inhibitors in lignocellulosic hydrolysates by *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, v. 82, n. 4, p. 340–349, abr. 2007. DOI: <https://doi.org/10.1002/jctb.1676>

BETANCUR, M. O.; REIS, V. C. B.; NICOLA, A. M.; DE MARCO, J. L.; MORAES, L. M. P. de; TORRES, F. A. G. Multicopy plasmid integration in *Komagataella phaffii* mediated by a defective auxotrophic marker. **Microbial Cell Factories**, v. 16, n. 1, article 99, dez. 2017. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12934-017-0715-8>.

BUCHHOLZ, K.; SEIBEL, J. Industrial carbohydrate biotransformations. **Carbohydrate Research**, v. 343, n. 12, p. 1966–1979, ago. 2008. DOI: 10.1016/j.carres.2008.02.007.

MANKAR, A. R.; PANDEY, A.; MODAK, A.; PANT, K. K. Pretreatment of lignocellulosic biomass: A review on recent advances. **Bioresource Technology**, v. 334, Aug., 2021. DOI: 10.1016/j.biortech.2021.125235

PAES, B. G.; STEINDORFF, A. S.; FORMIGHIERI, E. F.; PEREIRA, I. S.; ALMEIDA, J. R. M. Physiological characterization and transcriptome analysis of *Pichia pastoris* reveals its response to lignocellulose-derived inhibitors. **AMB Express**, v. 11, n. 1, p. 2, dez. 2021. DOI: <https://doi.org/10.1186/s13568-020-01170-9>.

Estabelecimento de processo enzimático de purga de tecidos de algodão em escala de bancada

Diogo Keiji Nakai¹, Nádia Gabrielle Silva Sales², Matheus Ramos Guimarães Medeiros³, Mônica Caraméz Triches Damaso⁴, Tháís Fabiana Chan Salum⁵

Resumo

A purga de tecidos é uma etapa essencial na indústria têxtil, visando eliminar impurezas e resíduos antes da produção de roupas. O processo enzimático de purga oferece uma alternativa sustentável e ambientalmente correta, com menor impacto ambiental por utilizar catalisadores biodegradáveis para remover materiais indesejados. Neste estudo, objetivou-se estabelecer um processo de purga eficiente e robusto em tecidos de algodão, empregando enzimas comerciais. A análise comparativa, conduzida por dois analistas, abrangeu os testes de hidrofiliabilidade, colorimetria e resistência à tração. Os resultados indicaram alta consistência e confiabilidade dos dados. A avaliação da hidrofiliabilidade permitiu identificar diferenças estatisticamente significativas entre tratamentos, mostrando a eficácia do processo de purga, visto que houve eliminação de impurezas, principalmente de origem graxa. Na colorimetria, não houve variações significativas nas diferenças de cor (ΔE), conforme esperado. Quanto à resistência à tração, a ausência de diferença relevante entre o tecido purgado e o controle comprovou a segurança do procedimento. Esses resultados respaldam a aplicação futura do processo de purga em pesquisas laboratoriais e na indústria têxtil.

Termos para indexação: purga de tecidos, colorimetria, hidrofiliabilidade, resistência à tração.

Introdução

A purga de tecidos é um processo crucial na indústria têxtil, consistindo na remoção de impurezas e resíduos, principalmente graxos, presentes nos materiais têxteis antes da produção de roupas. Inicialmente, os tecidos são submetidos a uma lavagem para eliminar sujeiras, corantes dispersos e óleos. Em seguida, eles são tratados com agentes químicos ou enzimas para eliminar qualquer material indesejado e melhorar sua qualidade, suavidade e durabilidade. Esse procedimento garante a obtenção de produtos têxteis de alta qualidade, com cores mais vivas e menor risco de defeitos.

O processo enzimático de purga na indústria têxtil oferece uma vantagem significativa, pois é mais sustentável e ambientalmente correto em comparação com métodos tradicionais (químicos e mecânicos). As enzimas são biodegradáveis e eficientes na remoção de impurezas, proporcionando um processo de purga menos agressivo ao tecido, economizando água, energia e reduzindo o impacto ambiental.

Em termos de pesquisa laboratorial de bancada, é essencial estabelecer um processo de purga eficaz e utilizar materiais de referência, como enzimas comerciais. Essa abordagem permite a comparação com futuros extratos enzimáticos proprietários, assegurando resultados confiáveis. Ter um método bem definido de purga garante a validade dos experimentos e fornece uma base sólida para avaliar o desempenho e a eficácia de novas enzimas desenvolvidas.

¹ Engenheiro de bioprocessos e biotecnologista, mestre em Ciências Mecânicas, Embrapa Agroenergia, diogo.nakai@embrapa.br

² Engenheira de energia, Embrapa Agroenergia, nadiasales.eng@gmail.com

³ Biólogo, Embrapa Agroenergia, matramosgm@gmail.com

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

⁵ Farmacêutica, doutora em Bioquímica, Embrapa Agroenergia, thais.salum@embrapa.br

Materiais e métodos

Com o objetivo de estabelecer um processo de purga eficiente e robusto, capaz de possibilitar análises comparativas entre diferentes tratamentos enzimáticos, foram conduzidas avaliações dos efeitos por dois analistas. Eles realizaram a preparação, o processamento e as análises de tecidos de algodão com o intuito de verificar a consistência dos resultados obtidos. Cada analista realizou separadamente e em momentos diferentes os mesmos procedimentos descritos a seguir.

Preparação

Antes de iniciar os experimentos, cento e vinte corpos de prova dos tecidos 100% algodão (comprados de Silvenina Uniformes Ltda.), compreendendo 60 de denim (260 g/m²) e 60 de sarja (360 g/m²), foram preparados. Cada corpo de prova possuía dimensões de 4 cm no sentido do urdume por 30 cm no sentido da trama. Para garantir uniformidade, o corte foi realizado com um estilete e um gabarito.

Processamento

O primeiro passo consistiu na desengomagem prévia de 90 corpos de prova (45 de cada tecido), utilizando a enzima comercial Biokey BSLH, fabricante Akmey, em uma concentração de 10% em relação à massa do tecido. Esse processo ocorreu em um homogeneizador por tombamento modelo ALT-FIVE-B, fabricante Mathis, a 70 °C por 30 min. O homogeneizador foi programado para operar a 50 rpm e realizar inversões de sentido a cada 180 segundos. Utilizou-se uma relação de banho de 1:10 (tecido:solução), utilizando-se tampão acetato de sódio/ácido acético 0,2 mol/L e pH 4,5. Cada vaso (200 mL) do homogeneizador foi preenchido com três corpos de prova. Após a desengomagem, os corpos de prova foram lavados três vezes com água destilada.

Em seguida, o processo de purga foi realizado em 30 corpos de prova (15 de cada tecido), usando-se a enzima comercial Biokey PCRIII, fabricante Akmey, com uma concentração de 10% em relação à massa do tecido. Esse processo ocorreu no mesmo homogeneizador, porém a 50 °C por 45 min. Novamente, o homogeneizador foi programado para operar a 50 rpm e fazer inversões de sentido a cada 180 segundos. Utilizou-se uma relação de banho de 1:10, empregando tampão fosfato de sódio 50 mmol/L e pH 7. Cada vaso do homogeneizador conteve três corpos de prova. Ao término, os corpos de prova foram lavados três vezes com água destilada e, em seguida, foram secos em estufa por 24 horas a 50 °C. Outros 30 corpos de prova desengomados (15 de cada tecido) foram submetidos ao mesmo procedimento de purga, mas sem a presença da enzima, para servir como controle do processo.

Análises

Após a secagem (50 °C *overnight*), todos os corpos de prova foram submetidos a três testes: colorimetria, hidrofiliçidade e resistência à tração.

Utilizou-se o colorímetro modelo CR-400, marca Konica, calibrado com iluminante D65. As medições foram realizadas em três pontos de cada corpo de prova no espaço de cor CIE XYZ e convertidas para o espaço Lab* (CIELAB). A partir disso, foram calculados ΔL^* (L^*1-L^*2), Δa^* (a^*1-a^*2), Δb^* (b^*1-b^*2) e ΔE^* [$(\Delta L^{*2} + \Delta a^{*2} + \Delta b^{*2})^{1/2}$]. Os valores de ΔE foram classificados da seguinte maneira: $\Delta E < 1$ – Diferença imperceptível; $1 \leq \Delta E < 2$ – Diferença quase imperceptível; $2 \leq \Delta E < 3,5$ – Diferença perceptível, mas pequena; $3,5 \leq \Delta E < 5$ – Diferença perceptível; $\Delta E \geq 5$ – Diferença considerável.

A hidrofiliçidade foi avaliada com uma adaptação da metodologia apresentada na norma AATCC 79 (American Association of Textile Chemists and Colorists, 2018). Consistiu em depositar uma gota de 100 µL de água em uma fração (dimensões 4 cm x 4 cm) de cada corpo de prova e cronometrar o tempo que a gota demora para ser totalmente absorvida. Os valores obtidos foram analisados com relação à sua normalidade e homoscedasticidade para verificar se eles atendem aos pressupostos de uma futura análise de variância e seus testes post hoc.

A resistência à tração foi avaliada com uma adaptação da metodologia apresentada na norma ASTM D5035 (American Society for Testing and Materials, 2019). Utilizou-se a máquina universal de ensaios WDW-20E, fabricante Arotec, com uma célula de carga de 500 kg. Foram empregadas garras planas (7~14 mm) juntamente com um adaptador para tecidos (25 mm). A velocidade do ensaio foi de 50 mm/min. Os valores obtidos foram analisados com relação à sua normalidade e homoscedasticidade para verificar se eles atendem aos pressupostos de uma futura análise de variância e seus testes post hoc.

Resultados e discussão

A Tabela 1 apresenta um resumo dos resultados obtidos nos testes de hidrofiliçidade dos corpos de prova, analisados por dois diferentes analistas. Foram realizadas 15 medidas por tratamento, totalizando 120 medidas por analista. Apesar de haver considerável variação nos dados, os tratamentos que não se encontram nos extremos da faixa de mensuração (entre 0 segundo e 3.600 segundos) mostram valores normais e com variância homogênea, o que permite a aplicação do teste post hoc de Tukey. Os tratamentos apresentaram efeitos com intensidades distintas, o que os torna estatisticamente diferentes. A redução do tempo de absorção da gota, ou seja, o aumento da hidrofiliçidade, mostra a eficácia do processo de purga, visto que houve eliminação de impurezas, principalmente de origem graxa. Além disso, os dados mostram resultados congruentes em relação aos tratamentos realizados por analistas distintos. Essa consistência indica que o procedimento de purga é robusto e eficaz, permitindo análises comparativas futuras com confiabilidade.

Tabela 1. Tempo médio (T.) de absorção de água em segundos e seus desvios padrões (D.P.) e coeficientes de variação (C.V.) obtidos no teste de hidrofiliçidade dos corpos de prova dos tecidos após tratamentos diversos. Testes de Anderson-Darling (A.D.), Barlett (B.) e Tukey (T.) com α : 5%.

Denim	Analista 1				Analista 2			
	Cru	Desengomado	Purgado	Controle	Cru	Desengomado	Purgado	Controle
T.	>3.600	600	0	174	>3.600	495	0	179
D.P.	-	50	-	19	-	67	-	18
C.V.	-%	8,3%	-%	10,9%	-%	13,5%	-%	10,1%
A.D.	-	Normal	-	Normal	-	Normal	-	Normal
B.	-	Homo	-	Homo	-	Homo	-	Homo
T.	d*	c	a*	b	d*	c	a*	b
Sarja	Cru	Desengomado	Purgado	Controle	Cru	Desengomado	Purgado	Controle
T.	>3.600	546	0	192	>3.600	498	0	211
D.P.	-	73	-	28	-	60	-	25
C.V.	-%	13,4%	-%	14,6%	-%	12,0%	-%	11,8%
A.D.	-	Normal	-	Normal	-	Normal	-	Normal
B.	-	Homo	-	Homo	-	Homo	-	Homo
T.	d*	c	a*	b	d*	c	a*	b

Os testes de normalidade foram realizados dentro de cada tratamento para cada tecido. Os testes de homoscedasticidade e os testes post hoc de Tukey foram realizados para todos os tratamentos de um mesmo tecido. (*) Dados classificados manualmente, fora do teste de Tukey, por causa da ausência de variação dos dados.

A Tabela 2 apresenta um resumo dos resultados obtidos na colorimetria dos corpos de prova, a partir de experimentos realizados por dois diferentes analistas. A coleta de dados compreendeu a realização de um total de 45 medições específicas para cada tratamento, o que culminou em uma totalização de 360 medidas por cada analista. Ao se debruçar sobre a comparação entre os valores de ΔE obtidos a partir das medições realizadas por esses dois analistas, torna-se evidente que existe pouca ou nenhuma alteração nas cores entre os tratamentos controle e purga, conforme a categorização de variações cromáticas adotada. Os resultados corroboram a observação visual, na qual se notou nenhum efeito de mudança de cor do tecido após processo de purga em relação ao controle, fato que já era esperado. Além disso, o resultado foi consistente para ambos os analistas, indicando que o procedimento de purga é robusto e seguro.

Tabela 2. ΔE , indicando a variação de cor dos tecidos em relação a cada par de tratamento (horizontal x vertical), dividido por analista.

Denim (ΔE)	Analista 1			Analista 2		
	Desengomado	Purgado	Controle	Desengomado	Purgado	Controle
Cru	2,8 (c)	4,6 (d)	4,7 (d)	3,4 (c)	3,9 (d)	3,9 (d)
Desengomado		1,9 (b)	2,0 (b)		0,9 (a)	0,7 (a)
Purgado			0,7 (a)			0,4 (a)
Sarja (ΔE)	Desengomado	Purgado	Controle	Desengomado	Purgado	Controle
Cru	3,0 (c)	3,8 (d)	2,5 (c)	2,5 (c)	3,7 (d)	2,5 (c)
Desengomado		1,2 (b)	1,1 (b)		1,2 (b)	0,6 (a)
Purgado			1,4 (b)			1,4 (b)

Os valores de ΔE foram classificados da seguinte maneira: $\Delta E < 1$ – Diferença imperceptível (a); $1 \leq \Delta E < 2$ – Diferença quase imperceptível (b); $2 \leq \Delta E < 3,5$ – Diferença perceptível, mas pequena (c); $3,5 \leq \Delta E < 5$ – Diferença perceptível (d); $\Delta E \geq 5$ – Diferença considerável (e).

A Tabela 3 apresenta um resumo abrangente dos resultados decorrentes dos rigorosos testes de resistência à tração conduzidos nos corpos de prova. Eles foram minuciosamente analisados por dois diferentes analistas especializados. Cada tratamento envolveu a obtenção de 15 medições individuais, sendo posteriormente excluídas as duas medidas de menor valor, culminando assim em um total de 120 medidas por analista. É relevante observar que os valores obtidos demonstraram uma distribuição que atesta tanto a normalidade quanto a homogeneidade de variância, o que, por sua vez, viabiliza a utilização apropriada do teste post hoc de Tukey para análise adicional. Nesse contexto, foi plenamente viável discernir diferenças estatisticamente significativas entre os diferentes tratamentos, bem como identificar casos em que igualdades também eram estatisticamente significativas. É pertinente notar que essa análise se manteve coerente em relação aos dois analistas, indicando que, independentemente da fonte de análise, o grupo de controle revelou similaridades substanciais com o tecido submetido ao processo de purga. Essa notável consistência respalda a conclusão de que o procedimento de purga pode ser considerado seguro, não produzindo um impacto significativo na resistência mecânica do tecido testado. Portanto, os resultados confirmam a viabilidade e a eficácia desse procedimento no contexto analisado.

Tabela 3. Resistência média à tração (R.T) em MPa e seus desvios padrões (D.P.) e coeficientes de variação (C.V.) obtidos dos corpos de prova dos tecidos após tratamentos diversos. Testes de Anderson-Darling (A.D.), Barlett (B.) e Tukey (T.) com α : 5%.

Denim	Analista 1				Analista 2			
	Cru	Desengomado	Purgado	Controle	Cru	Desengomado	Purgado	Controle
R.T.	22,97	19,12	20,42	19,99	24,06	18,20	19,65	20,73
D.P.	1,14	0,96	1,89	1,45	0,85	1,12	1,05	0,77
C.V.	5,0%	5,0%	9,3%	7,3%	3,5%	6,2%	5,3%	3,7%
A.D.	-	Normal	-	Normal	-	Normal	-	Normal
B.	-	Homo	-	Homo	-	Homo	-	Homo
T.	d	ab	bc	bc	d	a	bc	c

Sarja	Analista 1				Analista 2			
	Cru	Desengomado	Purgado	Controle	Cru	Desengomado	Purgado	Controle
R.T.	26,52	21,37	24,98	22,3	31,25	25,37	23,51	26,64
D.P.	1,26	1,88	2,25	1,4	1,43	1,62	2,33	2,13
C.V.	4,8%	8,8%	9,0%	6,3%	4,6%	6,4%	9,9%	8,0%
A.D.	-	Normal	-	Normal	-	Normal	-	Normal
B.	-	Homo	-	Homo	-	Homo	-	Homo
T.	c	a	bc	a	d	bc	bc	c

Os testes de normalidade foram realizados dentro de cada tratamento para cada tecido. Os testes de homoscedasticidade e os testes post hoc de Tukey foram realizados para todos os tratamentos de um mesmo tecido.

Conclusão

O estudo mostra um processo eficiente e robusto de purga para tecidos de algodão, utilizando enzimas comerciais. As análises de colorimetria, hidrofiliabilidade e resistência à tração, realizadas por dois analistas, verificaram a consistência e confiabilidade dos resultados. Houve um aumento significativo da hidrofiliabilidade dos tecidos após a purga, mostrando a eficácia do tratamento em eliminar impurezas. Além disso, testes de colorimetria e resistência à tração mostraram que após o tratamento os tecidos mantêm suas características. Esses resultados confirmam a segurança e a confiabilidade do procedimento de purga.

Agradecimentos

Trabalho realizado no âmbito do projeto BIOFIBRAS, em parceria com SENAI/CETIQT. Nosso agradecimento ao SEG (Sistema Embrapa de Gestão) pelo suporte ao projeto 20.19.03.053.00.00.

Referências bibliográficas

- AMERICAN ASSOCIATION OF TEXTILE CHEMISTS AND COLORISTS. **AATCC TM79**: Test method for absorbency of textiles - water drop. [S.l.], 2018. 3 p.
- AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS. **ASTM D5035**: Standard test method for breaking force and elongation of textile fabrics (strip method). West Conshohocken, 2019. 8 p.

Ferramenta de monitoramento web para apoio em observatórios de tendências: um estudo de caso Lattes

Paloma Reis Lucas¹, Wellington Rangel dos Santos², Carlos Vinícius Vasconcelos Rodrigues³, Marcelo Vicente de Paula⁴

Resumo

Atualmente a internet produz um grande volume de dados diariamente. Esses dados são utilizados estrategicamente para o monitoramento de assuntos diversos, de interesse de observatórios de tendências. Os observatórios utilizam a Tecnologia da Informação e Comunicação (TIC) para auxiliar nos diagnósticos realizados. Uma das técnicas de TIC utilizadas para esse fim é a raspagem web. O objetivo deste trabalho é propor um software de monitoramento de dados públicos da internet a partir de temas de pesquisa da Embrapa Agroenergia. Foi utilizada a base de currículos do Lattes no experimento para desenvolver um software especialista em duas etapas. A primeira etapa consistiu em extrair dados da internet através de raspagem web e a segunda etapa tratou e transformou os dados brutos em informação. Os resultados forneceram insights que possibilitam a identificação de áreas de interesse, padrões de colaboração e o mapeamento da produção científica no Brasil.

Termos para indexação: observatório de tendências, raspagem web, produção científica.

Introdução

Atualmente a internet produz um grande volume de dados diariamente. Explorar e analisar grandes quantidades de dados para detectar mudanças emergentes podem gerar vantagens competitivas e moldar ambientes futuros (Jamra et al., 2022). Esses dados, gerados a cada instante, precisam ser monitorados de forma contínua e imediata para gerar valor. Essas informações são úteis para estudos de tendências e fazem parte de observatórios, presentes em algumas organizações.

Um observatório de tendências permite que a organização atue como radar que antecipa sinais, tendências e indicadores para serem utilizados de forma estratégica em uma empresa de ciência, tecnologia e inovação (De La Vega, 2007; Enjunto, 2010; Parreiras; Antunes, 2013). A tomada de decisões estratégicas e de ação imediata está se tornando uma tarefa complexa para empresas e formuladores de políticas, uma vez que o ambiente está sujeito a mudanças emergentes (Jamra et al., 2022). Por isso, cada vez mais os observatórios utilizam a Tecnologia da Informação e Comunicação (TIC) para auxiliar nos diagnósticos realizados.

A TIC contribui com técnicas e ferramentas de monitoramento que podem colaborar para a análise de dados massivos em um menor espaço de tempo. Uma das técnicas utilizadas para esse fim é a raspagem web. Essa técnica é usada para obter automaticamente algumas informações de um site ou de serviços web, em vez de copiá-las manualmente (Vargiu; Urru, 2012). A raspagem web consiste na coleta sistemática de páginas da internet por meio de um robô (Mauro et al., 2018). Esses dados são utilizados para o monitoramento de assuntos diversos, de interesse dos observatórios. Sem um robô, esse monitoramento é humanamente inviável.

¹ Analista de Sistemas, mestre em Governança, Tecnologia e Inovação, Embrapa Agroenergia, paloma.lucas@embrapa.br

² Cientista da Computação, Embrapa Agroenergia, wellington.santos@embrapa.br

³ Analista de Sistemas, especialista em administração de redes Linux, Embrapa Tabuleiros Costeiros, vinicius.rodrigues@embrapa.br

⁴ Analista de Sistemas, mestre em Gestão do Conhecimento e da Tecnologia da Informação, Embrapa Agroenergia, marcelo.paula@embrapa.br

De forma prática, essas ferramentas podem rastrear artigos científicos, empresas privadas, canais de notícias, redes sociais, fóruns, fontes oficiais do governo, como a base de dados da plataforma Lattes e do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), ou outros dados na web. A raspagem web permite que uma ampla gama de informações de diferentes fontes seja capturada. Possibilita-se, então, uma visão mais abrangente e detalhada das mudanças comportamentais e do surgimento de necessidades e inovações tecnológicas sobre temas de interesse. É possível também que, nesse monitoramento, sejam identificados perfis de indivíduos atuantes em assuntos de relevância para os observatórios.

Assim, o objetivo deste trabalho é propor um software de monitoramento de dados públicos da internet a partir de temas de pesquisa da Embrapa Agroenergia. Esse software será capaz de extrair dados, tratá-los e transformá-los em informação para apoio à tomada de decisão futura, com o diferencial de se comportar proativamente alertando os interessados, periodicamente, sobre informações relevantes quando elas surgem. A base de currículo do Lattes será utilizada como estudo de caso.

Materiais e métodos

Um software especialista foi desenvolvido em duas etapas. A primeira etapa consiste em extrair informação da internet de acordo com o tema a ser monitorado. Para isso, utilizamos técnicas de consumo de dados na web com a biblioteca Selenium (Nyamathulla et al., 2021). Para a realização deste trabalho utilizamos uma amostra de dados de 698 currículos de pesquisadores da plataforma Lattes, do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq). Selecionamos dois temas relacionados a tecnologias desenvolvidas pela Embrapa Agroenergia: “Hidrogênio verde”, com 167 currículos, e “Organismos geneticamente modificados (OGM)” com 531 currículos. Os seguintes indicadores de produção foram utilizados: a) Artigos Completos Publicados em Periódicos (ACPP); b) Trabalhos Publicados em Anais de Eventos (TPAE); c) Resumos Publicados em Anais de Eventos (RPAE); d) Livros (LV); e) Capítulos de Livros (CLV); f) Apresentações de Trabalho (AT); g) Programas de Computador sem Registro (PCR); h) Produtos (PT); i) Trabalhos Técnicos (TT); j) Orientações Concluídas de Mestrado (OCM); e l) Orientações Concluídas de Doutorado (OCD). A segunda etapa do software foi responsável por tratar e transformar os dados brutos em informação no formato de relatórios gráficos, análises estatísticas e uso de aprendizado de máquina. O software foi programado usando a linguagem Python (versão 3.10.12) com os seguintes pacotes: Selenium (versão 4.10.0), ChromeDriverManager (versão 3.8.6), Matplotlib (versão 3.7.1), Numpy (versão 1.22.4), Pandas (versão 1.5.3), Scikit-learn (versão 1.2.2) e ambientes compartilhados de programação Jupyter Notebook, RStudio e Google Colaboratory.

Resultados e discussão

A ferramenta desenvolvida mostrou eficácia na coleta e transformação dos dados, que identificam perfis de pesquisadores brasileiros e estrangeiros a partir de temas que representam algumas das linhas de pesquisa da Embrapa Agroenergia. A pesquisa avaliou quatro propostas de análises descritivas para cada um dos temas.

Distribuição por formação no doutorado

Para o tema “Hidrogênio verde”, 18% dos pesquisadores são doutores em Química (19 ocorrências) ou Engenharia Química (15 ocorrências) (Figura 1). Doutores em Direito lideram o grupo de pesquisadores “OGM”, provavelmente como especialistas na discussão sobre leis, ética, biossegurança e outros sistemas regulatórios na esfera do Direito.

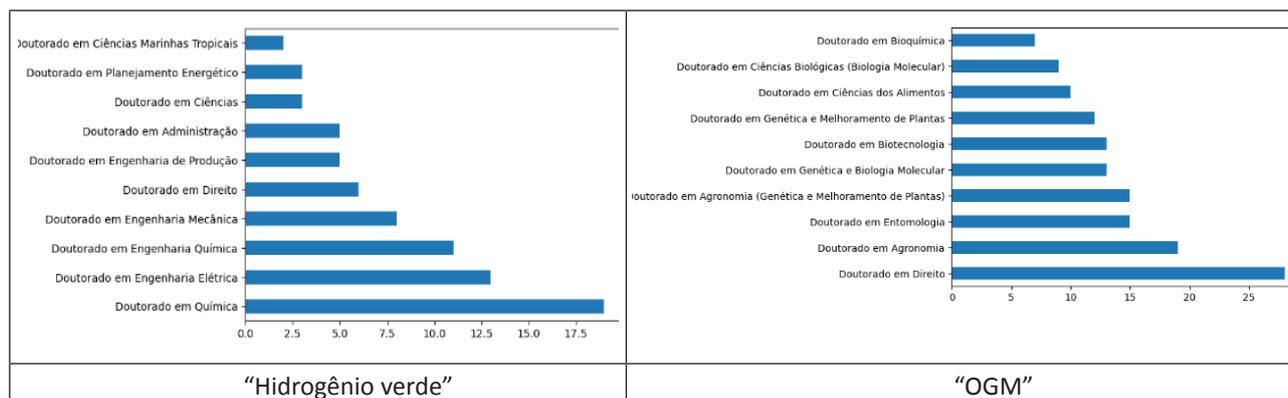


Figura 1. Os dez cursos de doutorado mais frequentes em “Hidrogênio verde” e “OGM”.

Produção científica

Em média, os dois grupos de temas analisados apresentaram algumas diferenças. “OGM” teve maior número médio de artigos completos publicados em periódicos e em resumos publicados em anais de eventos quando comparado com “Hidrogênio verde” (Tabela 1). Este último se difere em trabalhos publicados em anais de eventos, com quase o dobro de média. Entretanto, todas as medidas apresentaram altos valores de desvio padrão. Isso indica que a produção científica não é distribuída entre os pesquisadores, ou seja, poucos têm números elevados e a maioria ainda está construindo uma progressão em publicações. Há uma oportunidade de monitoramento ao longo do tempo desses números a fim de se obter um indicativo de tendência da área avaliada. O crescimento em publicações e sua distribuição mais homogênea podem indicar se a área está ganhando ou perdendo força entre os pesquisadores.

Tabela 1. Média e desvio padrão dos quatro maiores indicadores entre “Hidrogênio verde” e “OGM”.

Tema	Artigos Completos Publicados em Periódicos	Trabalhos Publicados em Anais de Evento	Resumos Publicados em Anais de Eventos	Livros ou Capítulos de Livros
Hidrogênio verde	39,7 (56,2)	37,2 (52,4)	28,1 (47,9)	18,6 (46,1)
OGM	46,9 (62,8)	12,7 (25,0)	67,0 (80,8)	20,9 (34,2)

Bolsa por produtividade

Entre todos os pesquisadores analisados, 15,3% têm bolsa de produtividade. Separamos os pesquisadores em três grupos usando o algoritmo de aprendizado de máquina não supervisionado k-Means (Bock, 2007). Para identificar o melhor número de grupos, usamos o teste Elbow (Cui, 2020). Para ambos os temas “Hidrogênio verde” e “OGM”, o resultado mostrou que o grupo ‘0’ foi composto por pesquisadores com indicadores de produtividade em menor patamar (Figura 2). O grupo ‘1’, por pesquisadores que apresentaram os maiores valores dos indicadores de produção. O último grupo apresentou números em maior equilíbrio entre esses indicadores. Quanto à bolsa de produtividade para o “Hidrogênio verde”, o grupo ‘0’ teve 10,3% de pesquisadores com bolsa, o grupo ‘1’ teve 100% de bolsistas e o grupo ‘2’, 53,6% com bolsa de produtividade. Para “OGM”, o grupo ‘0’ teve 6,1% de pesquisadores com bolsa, o grupo ‘1’ teve 57,5% de bolsistas e o grupo ‘2’ teve 21,9% de bolsistas de produtividade. Esses resultados mostraram que a bolsa de produtividade aumenta à medida que os indicadores de publicação aumentam. Apesar de o grupo de

pesquisadores em OGM apresentar três vezes mais indivíduos, este grupo tem menor percentual de bolsistas (14,1%) do que o grupo dos pesquisadores em “Hidrogênio verde” (19,2%).

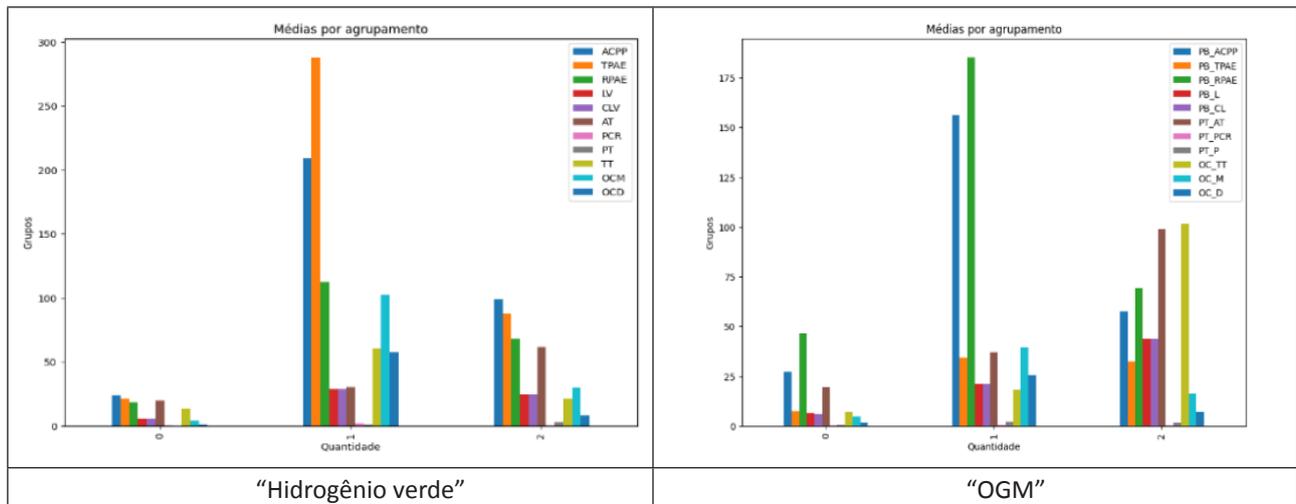


Figura 2. Três agrupamentos de pesquisadores por seus indicadores de produtividade.

Similaridade entre pesquisadores

A partir dos indicadores de produção científica analisados, o resultado da técnica medida de distância euclidiana apresentou-se como uma ferramenta viável como métrica de comparação entre perfis similares. A Figura 3 mostra uma rede onde cada ponto representa um pesquisador avaliado, e as arestas são as distâncias entre eles. Por exemplo, para o “Hidrogênio verde”, o pesquisador “1” (em vermelho) tem nove pontos de distância do pesquisador “2” (em laranja) e 1.141 pontos do pesquisador “167” (em amarelo). Uma rede de colaboração pode ser facilitada a partir dessa métrica. Pesquisadores experientes podem colaborar melhor com pesquisadores mais produtivos no tema de interesse.

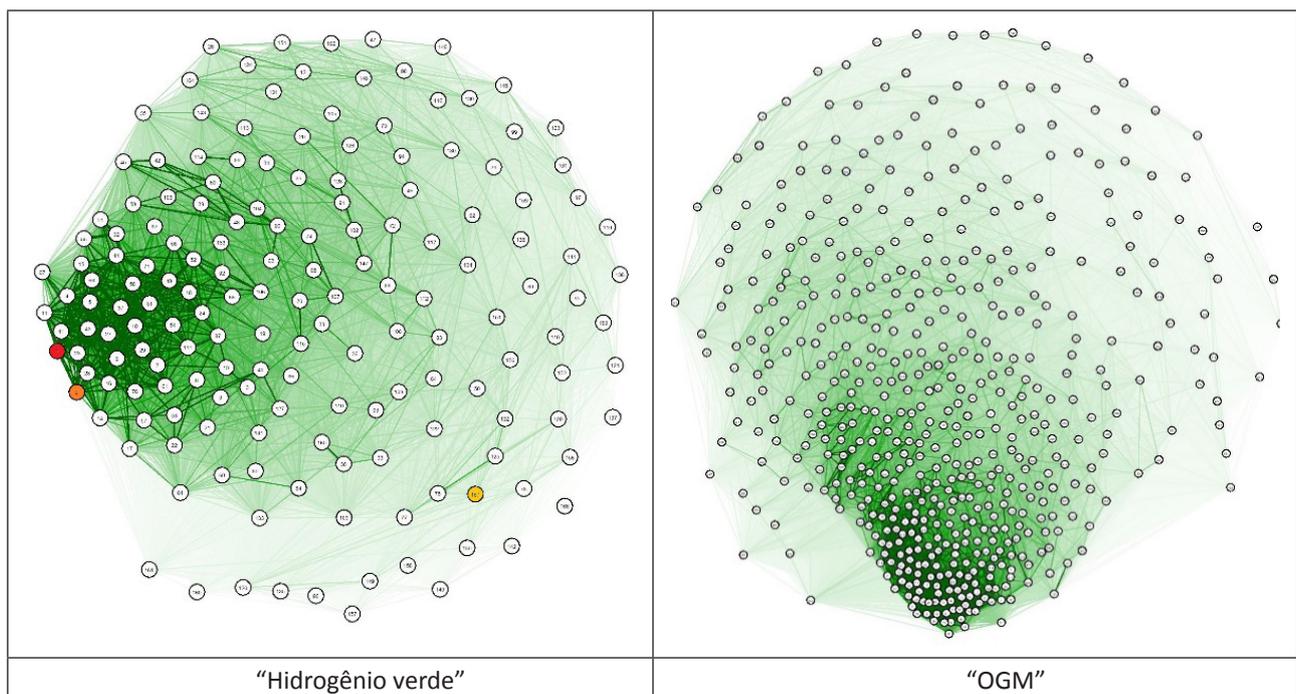


Figura 3. Três agrupamentos de pesquisadores por seus indicadores de produtividade. A área mais densa representa perfis mais similares entre os indicadores de produtividade.

Conclusão

O presente estudo demonstra a importância da análise de dados obtidos por raspagem da web. O estudo de caso da plataforma Lattes contribui para a compreensão das tendências e dos perfis dos pesquisadores de acordo com a linha de pesquisa da Embrapa Agroenergia. Os resultados fornecem insights valiosos para formuladores de políticas públicas, instituições acadêmicas e pesquisadores, possibilitando a identificação de áreas de interesse, padrões de colaboração e o mapeamento da produção científica no Brasil. A abordagem de raspagem se mostrou uma ferramenta poderosa para a extração de informações relevantes de grandes volumes de dados, impulsionando a pesquisa acadêmica e a tomada de decisões em áreas do conhecimento importantes para a corporação.

Referências bibliográficas

- BOCK, H. H. Clustering methods: a history of k-means algorithms. In: BRITO, P.; BERTRAND, P.; CUCUMEL, G.; CARVALHO, F. de. (Ed.). **Selected contributions in data analysis and classification**. Berlin: Springer, 2007. p. 161-172.
- CUI, M. Introduction to the k-means clustering algorithm based on the elbow method. **Accounting, Auditing and Finance**, v. 1, n. 1, p. 5-8, 2020.
- DE LA VEGA, I. Tipología de observatorios de ciencia y tecnología: los casos de América Latina y Europa. **Revista Española de Documentación Científica**, v. 30, n. 4, p. 545-552, 2007.
- ENJUNTO, N. Razón de ser de los observatorios. In: JORNADA OBSERVANDO OBSERVATORIOS: ¿NUEVOS AGENTES EN EL TERCER SECTOR? 2010, Madrid. **[Anais...]** Madrid: Plataforma del Voluntariado de España, 2010. Disponível em: <<https://plataformavoluntariado.org/wp-content/uploads/2018/10/observando-observatorios.-nuevos-agentes-en-el-tercer-sector.pdf>>. Acesso em: 25 jul. 2023.
- JAMRA, H. A.; SAVONNET, M.; LECLERCQ, E. BEAM: a network topology framework to detect weak signals. **International Journal of Advanced Computer Science and Applications**, v. 13, n. 4, p. 16-27, 2022.
- MAURO, A. de; GRECO, M.; GRIMALDI, M.; RITALA, P. Human resources for Big Data professions: a systematic classification of job roles and required skill sets. **Information Processing & Management**, v. 54, n. 5, p. 807-817, 2018.
- NYAMATHULLA, S.; RATNABABU, P.; SHAIK, N. S.; LAKSHMI, B. A review on selenium web driver with python. **Annals of the Romanian Society for Cell Biology**, v. 25, n. 4, p. 16760-16768, 2021.
- PARREIRAS, V. M. A.; ANTUNES, A. M. de S. Aplicação de foresight e inteligência competitiva em um centro de P&D empresarial por meio de um observatório de tendências: desafios e benefícios. **Revista Gestão & Conexões**, v. 1, n. 1, p. 55-73, 2013.
- VARGIU, E.; URRU, M. Exploiting web scraping in a collaborative filtering-based approach to web advertising. **Artificial Intelligence Research**, v. 2, n. 1, p. 44-54, 2012.

Identificação e quantificação de fitormônios em biomassa de microalgas utilizando HPLC-PDA

Letícia Karen dos Santos¹, Hugo Santana², Simone Palma Favaro³, José Antônio de Aquino Ribeiro⁴, Cesar Heraclides Behling Miranda⁵

Resumo

A identificação e a quantificação de fitormônios em matrizes complexas, como biomassa de microalgas, pelo método atualmente utilizado, envolvem várias etapas de preparo da amostra, muitos consumíveis e análise por cromatografia de ultra-alta eficiência (UHPLC) acoplada à espectrometria de massas (MS). Visando a simplificar e reduzir o custo analítico, este trabalho propõe um método que envolve etapas de extração, purificação, concentração e quantificação de fitormônios em um único extrato de biomassa de microalga, com a utilização de cartucho SPE C18 por UHPLC acoplado a detector de arranjo de diodos (PDA). As fontes de biomassas constaram de três microalgas cultivadas em diferentes condições. O método apresentou boa linearidade para o ácido 3-indolaético (AIA) e o ácido salicílico (AS), principais alvos de interesse deste trabalho, com coeficiente de determinação (R^2) > 0,98. Análise de biomassa de algas crescendo isoladamente ou em cocultivo demonstrou que o método é sensível para detectar variações de concentrações de AIA e AS em função das condições de crescimento e competição entre elas.

Termos para indexação: ácido 3-indolacético, ácido salicílico, bioinsumos, estimuladores de crescimento vegetal, cromatografia líquida com arranjo de diodos.

Introdução

Microalgas que produzem bioinsumos tais como fitormônios promotores do crescimento de plantas podem ser benéficas à produtividade agrícola. Os fitormônios são sinalizadores para indução de vários processos fisiológicos necessários ao metabolismo vegetal, incluindo compostos como ácidos abscísicos, auxinas, citocininas, giberelinas, estrigolactonas, brassinosteroides, ácido jasmônico, ácido salicílico e etileno, além de polipeptídeos, aminoácidos, polissacarídeos e sideróforos (Toribio et al., 2020) e outros metabólitos secundários (Vaishampayan et al., 2001). Na literatura, destaca-se a cromatografia líquida de ultra-alta eficiência (UHPLC) acoplada à espectrometria de massa (MS) para identificação e quantificação desses compostos, em razão da sua elevada sensibilidade (Cao et al., 2016). Porém essa técnica envolve várias etapas de preparo da amostra, utiliza metanol 80% por 24 horas para extração e dois tipos de cartuchos (apolar SPE - Blond Elut Plexa PAX e polar SPE - Blond Elut Plexa PCX), além da necessidade de preparo de curvas analíticas com os padrões para calibração a cada vez que se usa a espectrometria de massas (MS) (Campos et al., 2020).

No presente trabalho, objetivou-se desenvolver um método alternativo para simplificação do procedimento de extração, purificação e concentração de fitormônios em amostras de microalgas, empregando-se UHPLC acoplado a detector de arranjo de diodos (PDA). Nessas condições, as amostras podem ser analisadas sem a necessidade de purificação completa do analito de interesse, o que aumenta a eficiência e a economia do processamento e da análise dos compostos de interesse. Em

¹ Tecnóloga em Biocombustíveis, doutora em Química, pesquisadora-colaboradora da Embrapa Agroenergia, leticia.santos@colaborador.embrapa

² Biotecnologia, doutor em Tecnologias Químicas e Biológicas, pesquisador-colaborador da Embrapa Agroenergia, hugo.santana@colaborador.embrapa.br

³ Agrônoma, doutora em Tecnologia de Alimentos, Pesquisadora da Embrapa Agroenergia, simone.favaro@embrapa.br

⁴ Farmacêutico, mestre em Ciência Farmacêuticas, Analista da Embrapa Agroenergia, jose.ribeiro@embrapa.br

⁵ Engenheiro-agrônomo, PhD em Microbiologia e Bioquímica do Solo, Pesquisador da Embrapa Agroenergia, cesar.miranda@embrapa.br

paralelo, com o objetivo de validar o método proposto, analisaram-se amostras de biomassa de microalgas selecionadas por apresentarem concentrações mensuráveis de ácido 3-indol-acético (AIA) e ácido salicílico (AS).

Materiais e métodos

Biomassa de microalgas

Utilizaram-se amostras de três acessos distintos de microalgas da coleção biológica da Embrapa Agroenergia, denominadas A, B e C, cultivadas em diferentes condições. Esses acessos, largamente contrastantes em morfologia, o que sugere pertencerem a diferentes espécies, ainda não foram identificados. O acesso A, que mostrou possuir concentrações mensuráveis de AIA e AS em análises em UHPLC-MS, foi cultivado individualmente, sendo inoculado em todos os casos no início do experimento; ou em mistura (cocultivo) com os acessos B e C, que foram inoculados em paralelo, no início do experimento, ou após 15 dias. O meio utilizado foi o BG11. As condições de cultivo foram: 1) condições controladas em laboratório, em bateladas de 1 L de meio em Erlenmeyer, temperatura ambiente constante a 25 °C, iluminação artificial por 12 horas/dia com luzes LED (500 Lux/m²) e aeração constante com ar comprimido na vazão de 4 cm³/min; 2) condições naturais, em casa de vegetação, em biorreatores com 20 L de meio, acrescidas de injeção de ar constante. Em todos os casos, a biomassa foi colhida após 30 dias da inoculação inicial, seca por liofilização e armazenada a -18 °C até o processamento e a análise.

Fitormônios analisados

Como padrões de fitormônios, foram usados AIA; ácido 3-indolbutírico; ácido 3-indolpropionico; ácido abscísico; ácido jasmônico; ácido giberélico; AS; trans-zeatina; e trans-zeatina ribosídeo, todos da marca Sigma Aldrich. Preparou-se solução estoque de 1 mg/mL com acetonitrila 70% em água ultrapura, a qual foi mantida a -18 °C. Uma solução contendo todos os padrões na concentração de 10 µg/mL foi preparada a partir da solução estoque, e uma curva de calibração de AIA e AS foi construída a partir da solução estoque no intervalo de 0,5 µg/mL até 25 µg/mL.

Extração dos fitormônios na biomassa de microalga

O teste de extração dos fitormônios nas amostras de biomassa das microalgas englobou os seguintes passos consecutivos: pesagem de 200 mg de amostra em tubos de 15 mL; adição de 2,5 mL de metanol 80% e agitação a 1.000 rpm no ThermoMixer por 5 min a 4 °C. Os tubos foram mantidos por 5 min no ultrassom a 20 °C, seguido de centrifugação a 18.928 x g por 5 min, transferindo-se a fração líquida (sobrenadante) para outro tubo Falcon de 15 mL. A biomassa sólida residual foi ressuspendida em metanol 80%, repetindo-se o procedimento de extração por mais duas vezes. Todas as alíquotas obtidas nas sucessivas extrações foram agrupadas, obtendo-se volume total de 7,5 mL, o qual foi seco no concentrador de amostra (Centrivap) a 40 °C overnight. Em paralelo, foi realizado um ensaio de extração utilizando-se a amostra fortificada (spiked) com 1 mL do mix de padrões na concentração de 10 µg/mL, além de um ensaio envolvendo todas as etapas de extração somente com o mix de padrões na concentração de 10 µg/mL.

Separação dos fitormônios em cartucho de extração em fase sólida SPE C18-E

Para separação dos fitormônios presentes na biomassa, utilizou-se uma etapa de extração em fase sólida (SPE) utilizando-se cartuchos Strata C18-E (55 µm capacidade de 3 mL, ativados com acetonitrila e pré-condicionados com água). Os extratos concentrados foram ressuspendidos com 1 mL de água ultrapura, agitados no vórtex, e a mistura solubilizada foi carregada pelo cartucho, descartando-se o eluato. Repetiu-se o procedimento de ressuspensão com mais duas porções de

1 mL de água, sempre se descartando o eluato (etapa de lavagem). Para a eluição dos compostos de interesse, os extratos concentrados foram ressuspensos com três porções de 1 mL de mistura de acetonitrila:água. A cada ressuspensão, a mistura era carregada no cartucho, recolhendo-se e reunindo-se os eluatos em um tubo. Foram testadas as concentrações 50%, 70% e 75% de acetonitrila. Em seguida, os eluatos contendo os compostos de interesse foram evaporados no concentrador de amostra a 40 °C overnight. Depois, as amostras foram ressuspensas com 500 µL de acetonitrila 70%, transferidas para vials tipo taça e analisadas no UHPLC-PDA.

Análise cromatográfica

A análise foi realizada em cromatógrafo líquido de ultra-alta performance (UPLC Acquity H-Class Waters, Estados Unidos) acoplado a um sistema de detector de arranjo de diodos (PDA). Os dados foram processados por meio do software Empower. As amostras foram analisadas na coluna ACQUITY Premier HSS T3 1.8µm VanGuard FIT 2.1 x 100 mm (Waters), na faixa de absorvância de 200 nm a 400 nm, com seleção no comprimento de onda de 210 nm e 220 nm. O volume de injeção foi 2 µL e a temperatura do forno foi mantida em 40 °C. O solvente (A) foi água ultrapura com 0,05% de ácido trifluoroacético e o solvente (B) foi acetonitrila com 0,05% de ácido trifluoroacético. As condições de eluição cromatográfica iniciaram o gradiente com 5% da solução B até 12 min, e 95% da solução B até 15 min, com o fluxo de 0,4 mL/min; entre 15 min e 17 min, o fluxo foi de 0,6 mL/min, com 100% da solução B; depois até 21 min, o fluxo foi 0,4 mL/min com 5% da solução B. Uma vez estabelecidas essas condições, analisaram-se as amostras e os padrões. Para verificação de eventuais perdas na etapa de lavagem das amostras e dos padrões, os eluatos descartados na preparação de cada uma delas foram reunidos e analisados.

Resultados e discussão

As condições cromatográficas desenvolvidas neste trabalho proporcionaram a separação e a identificação de sete dos nove fitormônios analisados. Os tempos de retenção dos compostos apresentados na Figura 1, em minutos, foram os seguintes: pico 1 – trans-zeatina = 2,801; pico 2 – trans-zeatina ribosídeo = 3,088; pico 3 – ácido giberélico = 5,679; pico 4 – ácido 3-indolacético = 6,883; pico 5 – ácido salicílico = 7,117; pico 6 – ácido abscísico = 8,025; pico 7 – ácido 3-indolpropiónico = 8,321. Houve coeluição dos picos de ácido jasmônico e ácido 3-indolbutírico (picos 8+9), com tempo de retenção = 9,428, o que foi confirmado pela análise individual dos padrões desses fitormônios.

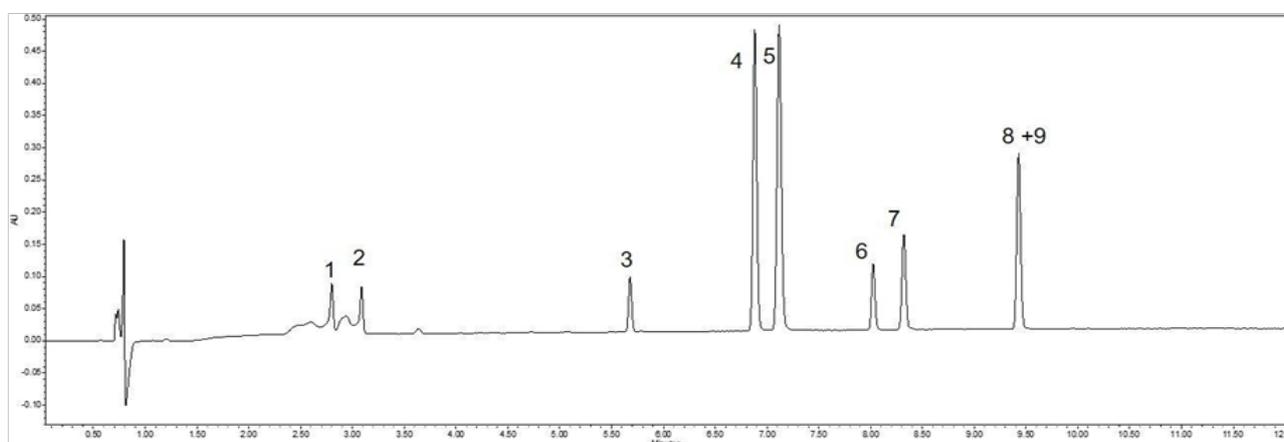


Figura 1. Cromatograma do mix de padrões de fitormônios 25 µg/mL em 210 nm.

A modificação realizada otimizou o processo de extração, que foi reduzido de 24 horas para 45 minutos, além de se usar apenas um cartucho, o SPE C18. Essa redução possivelmente foi por causa do rompimento das estruturas celulares com a agitação no Thermomix, seguida de ultrassom, com posterior concentração dos analitos no concentrador de amostras. Essa etapa não era feita no método anterior. A avaliação da fração aquosa dos eluatos da etapa de lavagem do cartucho com água mostrou que tal procedimento não causa perdas de fitormônios nas amostras e nos padrões. Essa etapa de limpeza é fundamental para garantir a vida útil da coluna cromatográfica, em razão da complexidade da matriz da amostra biológica, permitindo a remoção de uma quantidade significativa de compostos polares que não tem interesse analítico para o método proposto.

A melhor solução de acetonitrila:água para a eluição foi de 75%, que proporcionou recuperação acima de 99% para todos os fitormônios analisados. AIA, AS, abscísico, 3-indolpropionico, jasmônico e 3-indolbutírico apresentaram interações hidrofóbicas com a fase estacionária do cartucho, ocorrendo perdas na eluição quando se utilizou o extrator com menor força iônica. Suas recuperações foram reduzidas, variando de 49% (ácido 3-indolbutírico) a 70% (AIA), quando se utilizou acetonitrila:água 70%. Com acetonitrila:água 50%, a recuperação foi ainda menor, variando de 9% a 14% para esses mesmos fitormônios, ficando os demais em faixas intermediárias.

Após a otimização das condições experimentais de extração, foram construídas curvas de calibração para AIA e para AS, na faixa de 0,5 µg/mL a 25 µg/mL, em 210 nm, obtendo-se coeficiente de determinação (R^2) > 0,98. A análise de biomassa algal demonstrou que a metodologia é sensível para detectar variação das concentrações desses fitormônios em função das condições de crescimento das microalgas (Tabela 1).

Tabela 1. Concentrações (µg/g de biomassa seca) de ácido 3-indolacético (AIA) e ácido salicílico (AS) em microalgas cultivadas isoladamente ou em cocultivo, determinadas em HPLC-PDA.

Ambiente	Volume do biorreator (L)	Microalgas e dia da inoculação			AIA	AS
		A	B	C		
Controlado	1	1	-	-	1,59 ± 0,14	3,44 ± 1,15
Controlado	1	1	1	-	2,51 ± 0,21	16,66 ± 3,21
Controlado	1	1	15	-	2,84*	19,27*
Controlado	1	1	-	1	3,03 ± 0,39	11,23 ± 1,07
Controlado	1	1	-	15	1,32*	8,38*
Controlado	1	1	1	1	3,51*	29,41*
Controlado	1	1	15	15	1,60 ± 0,01	10,82 ± 1,14
Natural	20	1	-	-	1,07*	7,63*
Natural	20	1	15	-	2,16 ± 0,21	17,49 ± 2,82
Natural	20	1	15	15	2,40 ± 0,07	13,92 ± 0,37

*Amostra única.

De maneira geral, o cocultivo da espécie A com qualquer uma das outras duas espécies avaliadas resultou em aumento da concentração de AIA e AS na biomassa algal resultante, tanto em condições controladas como em ambiente natural. É relatado que o AS favorece a competição de microalgas a variações ambientais (Xu et al., 2020), o que pode explicar esses aumentos nos cocultivos, uma vez que as microalgas estariam em competição e acionariam suas melhores estratégias de sobrevivência. Essa poderia ser uma forma de se obter maiores concentrações de fitormônios num processo de exploração de microalgas. Ainda não há reportado de tal efeito na literatura.

Conclusão

O método proposto com HPLC/PDA apresentou potencial como procedimento eficiente para a identificação de fitormônios e quantificação dos ácidos 3-indolacético e salicílico em concentrações superiores a 0,5 µg/mg em biomassa algal, com redução do tempo de análise, economia de consumíveis e sem a necessidade de acoplar espectrometria de massas. A validação do método requer ainda outras etapas, mas os resultados obtidos indicam que o procedimento avaliado é promissor. O cocultivo de microalgas selecionadas pode induzir aumento da concentração de fitormônios na biomassa algal, especialmente ácido salicílico.

Referências bibliográficas

- CAO, Z.-Y.; SUN, L.-H.; MOU, R.-X.; ZHANG, L.-P.; LIN, X.-Y.; ZHU, Z.-W.; CHEN, M.-X. Profiling of phytohormones and their major metabolites in rice using binary solid-phase extraction and liquid chromatography-triple quadrupole mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1451, p. 67-74, 2016.
- CAMPOS, C. G.; COSTA, P. P. K. G.; ABDELNUR, P. V.; MIRANDA, C. H. B. Desenvolvimento de método para identificação e quantificação de fito-hormônios produzidos por macro e microalgas utilizando UHPLC-MS/MS. In: ENCONTRO DE PESQUISA E INOVAÇÃO DA EMBRAPA AGROENERGIA, 6., 2020, Brasília, DF. **Anais...** Brasília, DF: Embrapa, 2020. p. 188-194. Disponível em: <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/218777/1/Desenvolvimento-de-me769todo-para-identificac807a771o-e-quantificac807a771o-de-fito-hormo770nios-produzidos-por-macro-e-microalgas.pdf>. Acesso em: 26/09/2023.
- TORIBIO, A. J.; SUÁREZ-ESTRESSA, F.; JURADO, M. M.; LÓPEZ, M. J.; LÓPEZ-GONZÁLEZ, J. A.; MORENO, J. Prospection of cyanobacteria producing bioactive substances and their application as potential phyto-stimulating agents. **Biotechnology Reports**, v. 26, 2020.
- VAISHAMPAYAN, A.; SINHA, R. P.; HÄDER, D.-P.; DEY, T.; GUPTA, A. K.; BHAN, U.; RAO, A. L. Cyanobacterial biofertilizers in rice agriculture. **The Botanical Review**, v. 67, n. 4, p. 453-516, 2001.
- XU, Q.; SHI, M.; WANG, S.; QING, Y. Y. V.; QIN, W.; WANG, L. Study on the effect of exogenous salicylic acid on algae growth in the environment. **E3S Web of Conferences**, v. 165, 2020.

Linhagem de levedura produtora de ácido cítrico a partir de glicerol bruto¹

Ana Clara Alves Braga Rodrigues², Thályta Fraga Pacheco³, Thais Demarchi Mendes⁴, José Antônio de Aquino Ribeiro⁵, Diogo Keiji Nakai⁶, Clenilson Martins Rodrigues⁷, Mônica Caraméz Triches Damaso⁸

Resumo

Três linhagens comerciais de *Yarrowia lipolytica* (*Y. lipolytica* Y 1095, *Y. lipolytica* ATCC 8661 e *Y. lipolytica* YB 423) disponíveis na Coleção de Microrganismos e Microalgas Aplicados a Agroenergia e Biorrefinarias (CMMABio), da Embrapa Agroenergia, foram avaliadas quanto à capacidade de produção do ácido cítrico. Além disso, foram avaliadas diferentes composições de meios de cultivo selecionados a partir da literatura, com a finalidade de avaliar qual binômio: meio e linhagem apresentaria o maior potencial produtivo do ácido. Os cultivos foram realizados em escala laboratorial, utilizando-se frascos cônicos, e como fonte de carbono foi usada a glicerina, glicerol bruto, coproduto do biodiesel. Tanto a fonte de carbono como o produto de interesse foram quantificados por Cromatografia Líquida de Ultra Performance (UPLC). Três variações de método de quantificação do substrato, glicerol; do ácido de interesse, ácido cítrico; e do subproduto formado, ácido isocítrico foram testadas. Dentre as condições de cultivo avaliadas, nas quais variaram-se pH, composição do meio e concentração de glicerol, e os métodos de quantificação, a linhagem *Yarrowia lipolytica* ATCC 8661 alcançou o melhor resultado de ácido cítrico, com 34,5 g/L, e rendimento de 0,76 g/g de glicerol consumido, após 96 horas de cultivo.

Termos para indexação: ácido cítrico, biodiesel, biorrefinaria do glicerol, bioconversão, biotecnologia industrial.

Introdução

A produção de ácido cítrico por fermentação microbiana tem sido objeto de pesquisa, por causa de sua ampla aplicação na indústria alimentícia, farmacêutica e química (Cirimina et al., 2017). A levedura *Yarrowia lipolytica* é capaz de produzir ácido cítrico a partir de diferentes fontes de carbono, como açúcares, etanol, glicerol, entre outras (Rymowicz et al., 2010; Morgunov et al., 2018). Neste estudo, foram avaliados diferentes meios de cultivo e linhagens da levedura *Yarrowia lipolytica*, conhecida como boa produtora de ácido cítrico (Papanikolaou et al., 2002), visando a melhorar a produção do ácido de interesse, a partir de glicerina comercial, um coproduto do biodiesel, e, paralelamente, obter o mínimo do coproduto da reação, o ácido isocítrico. Além disso, foram comparadas diferentes metodologias cromatográficas para a quantificação precisa do ácido cítrico e do ácido isocítrico, durante o processo de fermentação da levedura.

¹Trabalho financiado pela Finep (Dendepalm), FAP-DF (176/2020) e Embrapa

²Engenheira de bioprocessos e biotecnologista, Embrapa Agroenergia, analvesbragar@gmail.com

³Engenheira química, mestre em engenharia química, Embrapa Agroenergia, thalyta.pacheco@embrapa.br

⁴Bióloga, mestre em microbiologia aplicada, Embrapa Agroenergia, thais.demarchi@embrapa.br

⁵Farmacêutico, mestre em ciências farmacêuticas, Embrapa Agroenergia, jose.ribeiro@embrapa.br

⁶Engenheiro de bioprocessos e biotecnologista, mestre em ciências mecânicas, Embrapa Agroenergia, diogo.nakai@embrapa.br

⁷Químico, doutor em química, Embrapa Agroenergia, clenilson.rodrigues@embrapa.br

⁸Engenheira química, doutora em tecnologia de processos químicos e bioquímicos, Embrapa Agroenergia, monica.damaso@embrapa.br

Materiais e métodos

Os cultivos foram realizados em escala laboratorial por fermentação submersa em frascos cônicos, utilizando-se glicerina comercial como fonte de carbono. O grau de pureza da glicerina foi de 81,85% (m/m), em termos de glicerol.

Determinação da concentração inicial de glicerol

Primeiramente, foram testadas diferentes concentrações iniciais de glicerol (50 g/L, 100 g/L e 150 g/L) em um meio contendo extrato de levedura, KH_2PO_4 , NH_4Cl e com pH 5,5. Foram utilizadas três linhagens de *Yarrowia lipolytica*: YB 423, Y 109 5 e ATCC 8661. Após 120 horas de cultivo a 28 °C e 180 rpm, as amostras foram coletadas e avaliadas por Cromatografia Líquida de Ultra Performance (UPLC) para a quantificação dos substratos e produtos formados.

Definição do método para quantificação de substrato e produtos

Três metodologias cromatográficas foram testadas para a separação e quantificação dos compostos de interesse:

- Metodologia 1: coluna HPX87H a 45 °C; fase móvel isocrática (5 mmol/L H_2SO_4); detectores UV (PDA 210 nm) e RID (45 °C).
- Metodologia 2: coluna HSST3 a 30 °C; gradiente de eluição entre solução aquosa de ácido fosfórico 0,125% e metanol puro; detector UV (PDA 210 nm).
- Metodologia 3: coluna BEH amida a 50 °C; gradiente de eluição entre acetonitrila: H_2O (80:20) e acetonitrila: H_2O (40:60), ambos com acetato de amônio 10mmol/L + 0,2% NH_4OH ; detector: ELSD (ganho: 200, pressão: 40 psi, nebulizer mode: cooling; drift tube: 35 °C).

Definição do meio de cultura base

Em seguida, com base em informações da literatura, foram avaliados três meios de cultivo com diferentes composições, e foi verificada a performance das três linhagens de *Yarrowia lipolytica*. A Tabela 1 apresenta a composição dos meios de cultura 1, 2 e 3.

Tabela 1. Composição dos meios de cultivo.

Componentes	Meio 1	Meio 2	Meio 3
Glicerina ADM (g/L)	50	50	50
Extrato de levedura (g/L)	5	0.25	0.5
KH_2PO_4 (g/L)	0.2	1.7	7
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (g/L)	-	0.25	-
Na_2HPO_4 (g/L)	-	12	2.5
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (g/L)	-	1.25	1.5
Cloridrato de tiamina (g/L)	-	0.006	-
CaCl_2 (g/L)	-	-	0.15
$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (g/L)	-	-	0.15
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (g/L)	-	-	0.02
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (g/L)	-	-	0.06
Sulfato de amônio (g/L)	-	-	0.5
pH	5.0	6.0	5.5

Avaliação de meios de cultura

Um novo experimento foi elaborado utilizando o meio 2 como base, e algumas variáveis foram alteradas para identificar os fatores que influenciariam a produção do ácido cítrico. A Tabela 2 resume as principais diferenças entre os novos meios testados. Foram investigados os efeitos das impurezas e dos inibidores presentes na glicerina bruta em comparação com o glicerol P.A. (puro), a variação da relação C/N (carbono/nitrogênio) com aumento ou redução, a exclusão do extrato de levedura do meio e o controle do pH ao longo do cultivo pela adição de KOH 5 mol/L.

Tabela 2. Variações do meio 2.

Variante	Glicerola (g/L)	(NH ₄) ₂ SO ₄ (g/L)	Levedurab (g/L)
1	Bruto (50)	0,25	0,25
2*	Bruto (50)	0,25	0,25
3	P.A. (80)	0,25	0,25
4	Bruto (50)	0,50	0,50
5	Bruto (50)	0,50	0,00
6c	Bruto (50)	0,25	0,25

^aTipo de glicerol; ^bextrato de levedura; ^ccontrole, composição igual ao meio 2.

*Na variante 2, o inóculo inicial ocorreu com densidade ótica (OD)=1,5, enquanto em todos os outros foi OD=0,5.

Esses experimentos foram realizados em triplicata, e foram avaliadas as três linhagens de *Yarrowia lipolytica*. Ao final dessa etapa, a linhagem que apresentou os melhores resultados de produção de ácido cítrico foi selecionada como a linhagem-elite para dar continuidade ao trabalho.

Análise estatística

A análise estatística se deu por meio do teste de Dunnett com intervalo de confiança de 95%.

Resultados e discussão

Durante o processo de seleção da concentração inicial de glicerol, o meio com 50 g/L foi o que apresentou as maiores produtividades para todas as três linhagens comerciais testadas. Após a seleção da concentração inicial de glicerol, dos três meios avaliados, o meio 2 foi o que obteve os melhores resultados.

Dentre as metodologias testadas para a quantificação do substrato e dos produtos formados, apenas a metodologia 3 mostrou-se eficaz para separar os analitos de interesse. A Tabela 3, a seguir, condensa a média dos resultados obtidos na cromatografia líquida após os cultivos nas variantes do meio 2.

Tabela 3. Variáveis resposta do cultivo de linhagens de *Y. lipolytica* para produção de ácido cítrico em diferentes meios de cultivo.

Meio	<i>Y. lipolytica</i> ATCC 8661			<i>Y. lipolytica</i> YB 423			<i>Y. lipolytica</i> Y1095		
	ACd (g/L)	AICe (g/L)	Glicerolf (g/L)	ACd (g/L)	AICe (g/L)	Glicerolf (g/L)	ACd (g/L)	AICe (g/L)	Glicerolf (g/L)
1	18,0	20,3	40,2	13,0	21,2	30,5	10,0	20,7	34,7
2	16,0	14,7	39,7	14,8	14,4	31,9	10,0	14,3	34,9
3	19,3	25,2	32,1	12,6	24,9	20,5	10,0	25,0	25,4

Continua...

Tabela 3. Continuação.

Meio	<i>Y. lipolytica</i> ATCC 8661			<i>Y. lipolytica</i> YB 423			<i>Y. lipolytica</i> Y1095		
	ACd (g/L)	AICe (g/L)	Glicerolf (g/L)	ACd (g/L)	AICe (g/L)	Glicerolf (g/L)	ACd (g/L)	AICe (g/L)	Glicerolf (g/L)
4	16,9	20,7	53,0	7,7	20,8	34,6	4,6	20,5	41,6
5	20,4	20,7	52,5	10,0	20,3	32,6	9,6	20,5	41,0
6	12,8	19,5	43,0	3,8	19,2	25,1	3,9	18,9	34,7

^dácido cítrico; ^eácido isocítrico; ^fglicerol consumido.

Utilizando-se o teste de Dunnett com intervalo de confiança de 95% para analisar os resultados obtidos, concluiu-se que o controle do pH ao longo do cultivo é crucial para obter uma maior produção de ácido cítrico. Além disso, verificou-se que o extrato de levedura, como fonte de nitrogênio orgânico, não é fundamental para a produção do ácido desejado, não sendo uma exigência para a linhagem de *Yarrowia lipolytica* utilizada.

Após os vários experimentos, analisando-se diferentes composições de meios de cultivo e, por fim, utilizando-se a metodologia de quantificação que consegue quantificar corretamente tanto ácido cítrico como isocítrico, a linhagem que alcançou o melhor resultado em termos do produto de interesse (ácido cítrico) foi *Yarrowia lipolytica* ATCC 8661. Essa levedura produziu 34,5 g/L de ácido cítrico, 9,5 g/L de ácido isocítrico e rendimento de ácido cítrico de 0,76 g/g de glicerol consumido após 96 horas de cultivo. A condição de produção foi densidade ótica inicial de 0,5, em meio de cultivo contendo: 50 g/L de glicerol (glicerina ADM); 0,5 g/L de sulfato de amônio; 0,006 g/L de cloridrato de tiamina; 1,25 g/L $MgSO_4$; 1,7 g/L de KH_2PO_4 e 12 g/L de Na_2HPO_4 . Esse resultado representa um aumento significativo em comparação ao início dos experimentos.

Conclusão

As três linhagens comerciais da levedura *Yarrowia lipolytica* foram capazes de produzir ácido cítrico a partir de glicerol bruto, glicerina, coproduto do biodiesel. Dentre as condições de cultivo avaliadas, variando-se pH, composição do meio e concentração de glicerol, a linhagem *Yarrowia lipolytica* ATCC 8661 apresentou o maior potencial para produção de ácido cítrico, e por isso essa linhagem foi selecionada como elite para trabalhos futuros.

Referências bibliográficas

- CIRIMINA, R.; MENEGUZZO, F.; DELISI, R.; PAGLIARO, M. Citric acid: emerging applications of key biotechnology industrial product. **Chemistry Central Journal**, v. 11, n. 1, 2017.
- MORGUNOV, I. G.; KAMZOLOVA, S. V.; LUNINA, J. N. Citric acid production by *Yarrowia lipolytica* yeast on different renewable raw materials. **Fermentation**, 4, n. 2, 2018. 36.
- PAPANIKOLAOU, S.; MUNIGLIA, L.; CHEVALOT, I.; AGGELIS, G.; MARC, I. *Yarrowia lipolytica* as a potential producer of citric acid from raw glycerol. **Journal Applied Microbiology**, v. 92, n. 4, p. 737-744, 2002.
- RYMOWICZ, W.; FATYKHOVA, A. R.; KAMZOLOVA, S. V.; RYWINISKA, A.; MORGUNOV, I. G. Citric acid production from glycerol-containing waste of biodiesel industry by *Yarrowia lipolytica* in batch, repeated batch, and cell recycle regimes. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 87, n. 3, p. 971-979, 2010.

Manutenção da coleção de macrofungos e triagem de potenciais produtores de biopigmentos

Kamilla Martins Borges¹, Thaís Demarchi Mendes², Guilherme Conceição da Silva³, Léia Cecília de Lima Fávaro⁴, Félix Gonçalves de Siqueira⁵

Resumo

Algumas espécies de macrofungos são amplamente exploradas como alimentos, em razão, além de seu sabor, das suas propriedades nutricionais e terapêuticas. Nos últimos anos, o interesse tem se voltado para a aplicação biotecnológica das propriedades desse grupo de fungos, como a produção de enzimas lignocelulósicas, de pigmentos e de compostos bioativos. A preservação desses microrganismos em coleções de cultura garante a conservação do germoplasma para investigações e aplicações futuras. A preservação de macrofungos por longos períodos ainda é um desafio, fazendo-se necessária a aplicação de diferentes métodos, como criopreservação, Castellani e repique contínuo. Este estudo apresenta resultados de ações vinculadas ao projeto Regen, que incluem a reativação, a purificação e a preservação de 140 cepas de macrofungos da Coleção de Microrganismos e Microalgas Aplicados a Agroenergia e Biorrefinarias (CMMAABio). Além disso, para contribuir com o objetivo de agregar informações sobre potenciais aplicações biotecnológicas dos microrganismos, foi feita uma triagem, por análise visual, de cepas com potencial para produção de pigmentos. Foram selecionadas 23 cepas que apresentaram coloração nos tons de amarelo, laranja, rosa, vermelho e roxo, seja no micélio ou secretada no meio ao redor das colônias. Adicionalmente à preservação dos microrganismos, foram também prospectadas características que demonstram o potencial biotecnológico do acervo da CMMAABio.

Termos para indexação: macrofungos, coleção de microrganismos, pigmentos naturais.

Introdução

Macrofungos são organismos que, na natureza, desempenham papel fundamental na decomposição de matéria orgânica e ciclagem de nutrientes. As propriedades únicas desse grupo de fungos, como produção de compostos bioativos, de pigmentos/corantes, de enzimas e composição nutricional, têm despertado o interesse em sua exploração comercial em diversos setores, como indústria farmacêutica, de alimentos, de materiais, de nutrição animal e de bioinsumos para o setor agropecuário, entre outras (Kijpornyongpan, et al., 2022).

A manutenção desses microrganismos em coleções de cultura não só garante a disponibilidade do germoplasma para pesquisas e aplicações futuras como também mantém preservada a diversidade biológica. De maneira institucional, a Embrapa tem promovido a implementação e a manutenção de coleções de microrganismos. Um exemplo desse compromisso é a integração das coleções das Unidades da Empresa e o registro dos microrganismos no sistema Alelomicro. Outro exemplo é o desenvolvimento do projeto REGEN, financiado pelo Sistema Embrapa de Gestão (SEG), que tem como objetivo o enriquecimento, a documentação, a conservação e a caracterização de dez coleções de microrganismos. Entre elas, está a Coleção de Microrganismos e Microalgas Aplicados a

¹ Biotecnologista, Embrapa Agroenergia, kamilla.borges@colaborador.embrapa.br

² Bióloga, mestre em Microbiologia Aplicada, Embrapa Agroenergia, thaís.demarchi@embrapa.br

³ Biólogo, Embrapa Agroenergia, guilherme.silva@colaborador.embrapa.br

⁴ Bióloga, doutora em Ciências, Embrapa Agroenergia, leia.favaro@embrapa.br

⁵ Biólogo, doutor em Ciências Biológicas, Embrapa Agroenergia, felix.siqueira@embrapa.br

Agroenergia e Biorrefinarias (CMMAABio), que possui em seu acervo milhares de microrganismos, dentre cepas de bactérias, leveduras, microalgas e fungos filamentosos, incluindo os macrofungos.

A preservação de macrofungos por longos períodos ainda é um desafio. O método mais utilizado é o de repique contínuo, porém essa técnica é muito laboriosa e a transferência sequencial para um novo meio de cultura pode levar ao acúmulo de mutações, mudanças fenotípicas e perda da diversidade genética. Outras estratégias de preservação por longos períodos, como criopreservação e preservação por Castellani, têm se demonstrado eficazes para a manutenção de algumas espécies.

Além da preservação do germoplasma dos microrganismos, a CMMAABio também tem como propósito caracterizá-los quanto às suas potenciais aplicações biotecnológicas, incluindo a produção de pigmentos naturais. A crescente demanda por substituição de corantes sintéticos por corantes naturais tem sido uma tendência nas últimas décadas. A produção de corantes por microrganismos é uma alternativa mais vantajosa em comparação com outras fontes naturais, como plantas e insetos, por causa da viabilidade de cultivo em condições controladas e otimizadas. Nesse contexto, algumas espécies de macrofungos se destacam pelas chamativas cores de seus corpos de frutificação. Além de coloridos, alguns desses compostos possuem propriedades bioativas, como ação antioxidante, antimicrobiana e anticancerígena (Suthar, et al., 2021).

O objetivo deste trabalho é organizar, preservar e manter cepas de macrofungos da coleção CMMAABio e selecioná-las visualmente quanto ao potencial de produção de pigmentos.

Materiais e métodos

Verificação da viabilidade e pureza

Cento e oitenta e cinco cepas de macrofungos previamente armazenadas na CMMAABio tiveram sua viabilidade e pureza checadas. Utilizando a técnica de repique, uma pequena quantidade de micélio do fungo foi transferida para o meio de cultura batata-dextrose-ágar (BDA), e as placas foram incubadas a 28 °C por sete dias a 15 dias. O crescimento dos fungos nas placas foi monitorado e sua pureza foi verificada, garantindo a ausência de contaminações por bactérias ou outros fungos. As cepas categorizadas como puras foram encaminhadas para a etapa de preservação e triagem das cepas com potencial para a produção de pigmentos.

Triagem de cepas com potencial para a produção de pigmentos

As placas com fungos com bom crescimento em meio BDA foram fotografadas de ambos os lados (frente e verso) para documentação das características morfológicas e fenotípicas das colônias. O meio BDA é indicado para promover o crescimento de macrofungos e por ser adequado para produção de pigmentos. Foram selecionados os macrofungos que apresentavam algum tipo de coloração rosa, roxa, laranja, amarelo, vermelho e marrom, tanto no micélio quanto secretada no ágar.

Preservação das cepas

Método de Castellani: discos de 10 mm de micélio crescido em meio BDA por sete dias a 14 dias foram transferidos para cinco criotubos e submersos em água destilada. Os tubos estão mantidos em temperatura ambiente.

Criopreservação: discos de 10 mm de micélio crescido em meio BDA por sete dias a 14 dias foram transferidos para cinco criotubos e submersos em solução crioprotetora de glicerol 20% (m/v). Os criotubos estão mantidos em ultrafreezer a -80 °C.

Repique contínuo: fragmentos de micélio crescido em ágar BDA foram transferidos para meio BDA solidificado de forma inclinada (slant) em tubos Falcon (duplicata). Os tubos foram incubados

na temperatura de 28 °C por sete dias a 14 dias. Após o desenvolvimento do micélio, os tubos foram armazenados a 10 °C. Esse método não garante a viabilidade do fungo por longos períodos, por isso, esse procedimento é repetido a cada quatro meses ou cinco meses.

Resultados e discussão

Verificação da viabilidade, pureza e preservação das cepas

O acervo de macrofungos da CMMAABio conta com cerca de 200 cepas. A criopreservação é o principal método de preservação da coleção. No entanto, por causa dos desafios de preservação dos macrofungos por esse método (sobrevivência após congelamento), as cepas também estão mantidas pelo método de Castellani e repique contínuo. A manutenção de macrofungos em coleções de cultura requer um trabalho cuidadoso e contínuo de verificação de viabilidade e pureza das cepas e renovação dos estoques do germoplasma preservado. Atualmente, esse trabalho é possibilitado pelo desenvolvimento do projeto REGEN. Até o momento, foi possível obter 140 cepas viáveis e livres de contaminação. Essas cepas foram fotografadas para a documentação das características morfológicas das colônias e foram preservadas pelos métodos de criopreservação, repique contínuo e Castellani.

Triagem de cepas potencialmente produtoras de corantes

Dentre as 140 cepas que se mostraram viáveis e puras, 23 apresentaram coloração intensa, seja no micélio ou secretada no ágar. Uma diversidade de colorações foi observada, sendo elas: rosa, roxa, laranja, amarela, vermelha e marrom. Informações referentes às cepas com potencial produtor de corante estão registradas na Tabela 1, enquanto a Figura 1 apresenta as imagens das cepas fotografadas em meio BDA após um período de cultivo de sete dias a 15 dias.

Tabela 1. Macrofungos selecionados como potencialmente produtores de corantes.

	Código BRM	Espécie ou grupo taxonômico	Coloração do meio	Coloração do micélio
1	BRM 067553	Basidiomycetes	Marrom	Branca/Amarela
2	BRM 062449	Basidiomycetes	Marrom	Branca/Marrom
3	BRM 063103	Basidiomycetes	Marrom	Branca
4	BRM 062453	Basidiomycetes	Roxa	Roxa
5	BRM 062377	Basidiomycetes	Amarela	Branca
6	BRM 062381	Basidiomycetes	Laranja	Branca
7	BRM 060013	<i>Pycnoporus sanguineus</i>	Laranja	Branca/Laranja
8	BRM 067565	Basidiomycetes	Marrom	Branca
9	BRM 067568	Basidiomycetes	Marrom	Branca
10	BRM 062542	Basidiomycetes	Laranja	Branca
11	BRM 063322	Basidiomycetes	Roxa/Rosa	Branca
12	BRM 067591	<i>Panellus stipticus</i>	Laranja	Branca
13	BRM 067593	<i>Laetiporus cincinnatus</i>	Laranja	Branca
14	BRM 067588	<i>Pholiota adiposa</i>	Marrom	Branca
15	BRM 055652	<i>Chlorophyllum molybdites</i>	Marrom/Laranja	Branca
16	BRM 059975	<i>Oudemansiella canarii</i>	Marrom/Amarela	Branca
17	BRM 056513	<i>Pleurotus pulmonarius</i>	Roxa/Vermelha	Roxa/Vermelha

Continua...

Tabela 1. Continuação.

	Código BRM	Espécie ou grupo taxonômico	Coloração do meio	Coloração do micélio
18	BRM 059978	<i>Tyromyces pulcherrimus</i>	Vermelha	Vermelha
19	BRM 056056	<i>Xylaria cubensis</i>	Roxa/Vermelha	Roxa/Branca
20	BRM 044248	<i>Ganoderma lobatum</i>	Marrom/Amarela	Branca
21	BRM 044601	<i>Flammulina velutipes</i>	Laranja	Branca
22	BRM 051906	Pleurotaceae	Amarela	Branca/Amarela
23	BRM 052849	Pluteaceae	Marrom	Branca

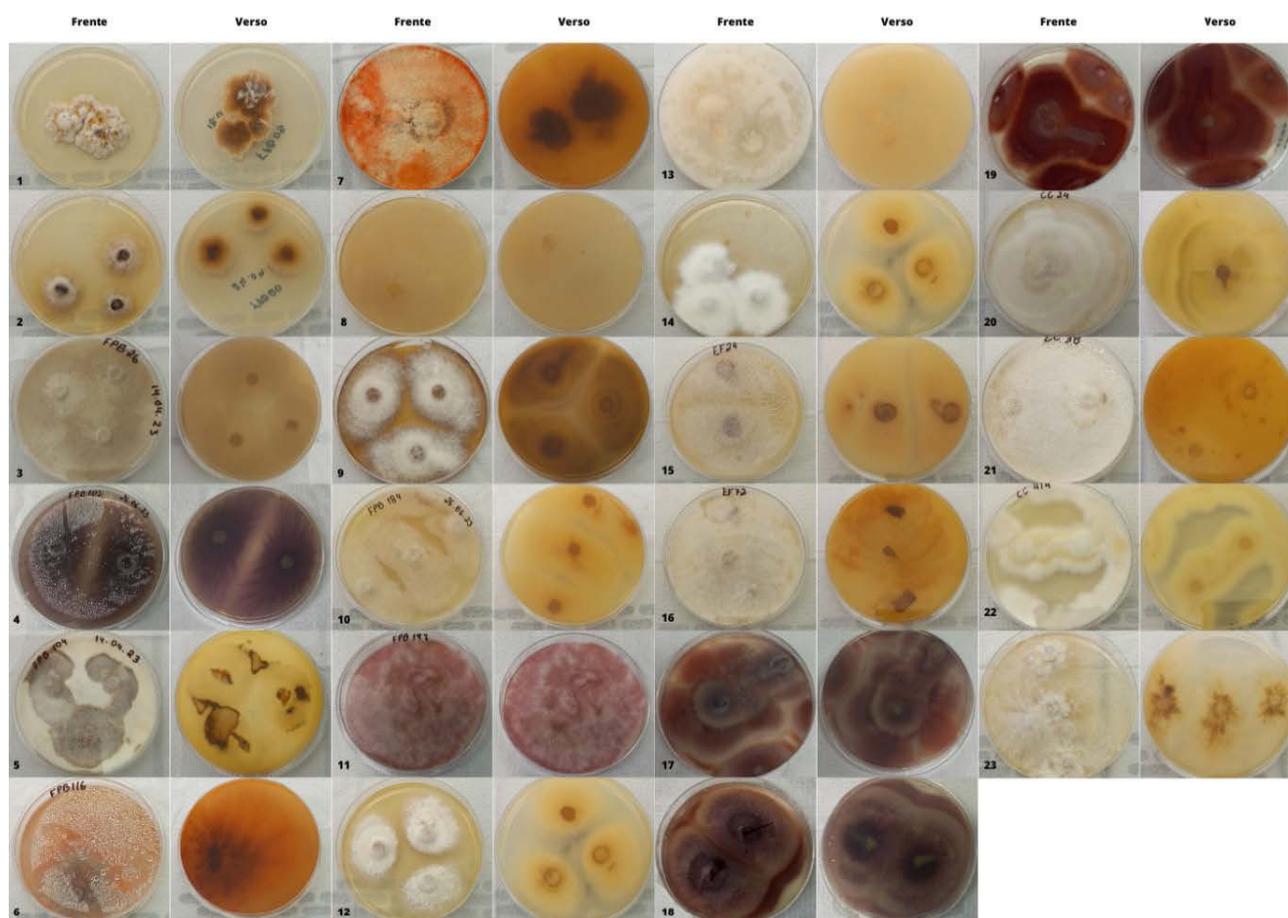


Figura 1. Imagens das cepas de macrofungos potencialmente produtoras de corantes.

1: BRM 067553; 2: BRM 062449; 3: BRM 063103; 4: BRM 062453; 5: BRM 062377; 6: BRM 062381; 7: BRM 060013 - *Pycnoporus sanguineus*; 8: BRM 067565; 9: BRM 067568, 10: BRM 062542; 11: BRM 063322; 12: BRM 067591 - *Panellus stipticus*; 13: BRM 067593 - *Laetiporus cincinnatus*; 14: BRM 067588 - *Pholiota adiposa*; 15: BRM 055652 - *Chlorophyllum molybdites*; 16: BRM 059975 - *Oudemansiella canarii*; 17: BRM 056513 - *Pleurotus pulmonarius*; 18: BRM 059978 - *Tyromyces pulcherrimus*; 19: BRM 056056 - *Xylaria cubensis*; 20: BRM 044248 - *Ganoderma lobatum*; 21: BRM 051906 - *Flammulina velutipes*; 22: BRM 051906 - Pleurotaceae; 23: BRM 0528944 - Pluteaceae.

A Tabela 1 apresenta informações que indicam se a coloração foi observada no micélio, indicando a produção de pigmentação intracelular, ou se foi observada no ágar (ao redor das colônias), indicando a secreção dos compostos coloridos. Para um processo de produção desses corantes,

a secreção para o meio extracelular é mais vantajosa, pois elimina uma etapa de extração intracelular a partir da massa micelial. Nesse sentido, merecem destaques as cepas BRM 062381 (6), BRM 060013 - *Pycnoporus sanguineus* (7), BRM 067568 (9) e BRM 063322 (11) e BRM 051906 - *Flammulina velutipes* (11), em razão da capacidade de secretar compostos de coloração intensa no meio ao redor das colônias.

Pode-se destacar, como potenciais produtoras de pigmentos amarelo/laranja, as cepas BRM 062381 (6), BRM 060013 - *Pycnoporus sanguineus* (7), BRM 059975 - *Oudemansiella canarii* (16) e BRM 051906 - *Flammulina velutipes* (21). *Pycnoporus sanguineus*, cogumelo orelha-de-pau, apresenta corpo de frutificação com coloração laranja intensa. Segundo Meng et al. (2022), os compostos majoritários responsáveis pela coloração, cinabarina, ácido cinabarínico e tramesaguin, apresentam também propriedades antivirais, antibacterianas e anti-inflamatórias.

As cepas BRM 062453 (4), BRM 063322 (11), BRM 056513 - *Pleurotus pulmonarius* (17), BRM 059978 - *Tyromyces pulcherrimus* (18) e BRM 056056 - *Xylaria cubensis* (19) podem ser destacadas como produtoras de intensa coloração rosa/vermelha. *Tyromyces pulcherrimus*, cogumelo “strawberry bracket”, possui corpo de frutificação com coloração rosa/vermelha, e a composição de seu pigmento ainda não está descrita na literatura.

A caracterização de cepas com potencial para a produção de pigmentos e a documentação dessas informações agrega valor à CMMAABio ao fornecer dados que podem ser futuramente utilizados como ponto de partida para a prospecção e avaliação da aplicação biotecnológica dessas cepas.

Conclusão

Cento e oitenta e cinco cepas de macrofungos foram reativadas e 140 tiveram a pureza checada e foram preservadas por criopreservação, repique contínuo e pelo método de Castellani. As cepas foram triadas visualmente e foi possível selecionar 23 macrofungos com potencial para serem posteriormente investigados quanto à produção de pigmentos. Além da preservação dos microrganismos, este trabalho contribuiu para a inclusão de informações que demonstram o potencial biotecnológico do acervo da CMMAABio.

Referências bibliográficas

- KIJPORNYONGPAN, T.; SCHWARTZ, A.; YAGUCHI, A.; SALVACHU, D. Systems biology-guided understanding of white-rot fungi for biotechnological applications: a review. *iScience*, v. 25, n. 7, p. 1-24, 2022. 104640.
- MENG, D.; SHAO, X.; LUO, S.-P.; TIAN, Q.-P.; LIAO, X.-R. Pigment production by a newly isolated strain *Pycnoporus sanguineus* SYBC-L7 in solid-state fermentation. *Frontiers in Microbiology*, v. 13, 2022. 1015913.
- SUTHAR, M.; LAGASHETTI, A. C.; RÄISÄNEN, R.; SINGH, P. N.; DUFOSSÉ, L.; ROBINSON, S. C.; SINGH, K. S. Industrial applications of pigments from macrofungi. In: SRIDHAR, S. K.; DESHMUKH, S. K. (Ed.) *Advances in microfungi*. Boca Raton: CRC Press, 2021. p. 221-251.

Modelagem e produção de espidroína sintética de seda de aranha para aplicações biomédicas

Gleiciane Pinheiro de Sousa¹, Valquíria Alice Michalczechen Lacerda², Grácia Maria Soares Rosinha³, Elíbio Leopoldo Rech Filho⁴, Betúlia de Moraes Souto⁵, Betania Ferraz Quirino⁶, João Ricardo Moreira de Almeida⁷, Daniela Matias de Carvalho Bittencourt⁸

Resumo

Sedas de aranhas são biopolímeros com extraordinárias características físico-químicas. Elas podem ser processadas e utilizadas em diversos biomateriais inovadores como partículas, além da forma natural de fibras. Entretanto, por causa da limitação da obtenção desse material in natura, é necessário o desenvolvimento de sistemas de produção heteróloga de proteínas de seda de aranha (espidroínas). Neste trabalho, buscou-se, por meio da biologia sintética, a produção de uma espidroína em *Escherichia coli* BL21(DE3). A espidroína sintética foi baseada na sequência da proteína MaSp2 da aranha do Cerrado brasileiro *Parawixia bistriata*, aqui denominada Engenheirada 1 (Eng1). Para isso, a espidroína Eng1 foi sintetizada no plasmídeo pET24a, contendo um peptídeo-sinal de secreção de uma β -xilosidase e mais oito repetições da região de interesse da MaSp2, além de regiões bioativas para endereçamento celular. As bactérias foram transformadas, e as proteínas foram produzidas por autoindução em frasco Erlenmeyer de 2 L. Logo após, as células foram precipitadas por centrifugação, e o sobrenadante foi concentrado por ultrafiltração para posterior purificação das espidroínas por cromatografia de afinidade. A produção da Eng1, com 33,54 kDa, foi confirmada por SDS-PAGE corado com nitrato de prata e *Western blot*. A partir deste trabalho, foi possível desenvolver um sistema heterólogo para a produção de espidroínas sintéticas de sedas de aranhas. A vantagem deste sistema está na capacidade do peptídeo-sinal de secretar a espidroína sintética para o meio de cultura.

Termos para indexação: *Parawixia bistriata*, *Escherichia coli*, MaSp2, espidroína sintética.

Introdução

As proteínas de seda de aranha (espidroínas) inspiram pesquisadores, por suas propriedades mecânicas, pois são elásticas e resistentes ao mesmo tempo, além de manterem essas propriedades em temperaturas extremas (-70 °C a 200 °C). Isto as torna um material de alto valor visando a aplicações biomédicas, por exemplo, na Odontologia, Dermatologia e Medicina Regenerativa (Johari et al., 2022). As aranhas que formam redes orbiformes podem ter até sete tipos diferentes de glândulas produtoras de seda: a ampolada maior, a ampolada menor, a flageliforme, a tubuliforme, a aciniforme, a agregada e a piriforme. A seda *dragline* (linha de segurança) é produzida na glândula ampolada maior, e é composta pelas espidroínas MaSp 1 e MaSp 2 (Bhattacharyya et al., 2021). As fibras formadas por essas duas espidroínas apresentam extraordinárias características mecânicas, sendo cinco vezes mais resistentes do que o aço e três vezes mais resistentes do que a fibra sintética de alta qualidade Kevlar (Connor et al., 2023).

¹ Engenheira de bioprocessos e biotecnologia, mestra em Biotecnologia, Universidade Federal do Tocantins, sousanebio@gmail.com

² Bióloga, doutora em Biologia Molecular, Universidade de Brasília, valquiria.michalczechen@gmail.com

³ Engenheira-agrônoma, doutora em Bioquímica e Imunologia, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, gracia.rosinha@embrapa.br

⁴ Engenheiro-agrônomo, doutor em Life Sciences, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, elibio.rech@embrapa.br

⁵ Bióloga, mestra em Biologia Molecular, Embrapa Agroenergia, betulia.souto@embrapa.br

⁶ Bióloga, doutora em Biologia Molecular e Celular, Embrapa Agroenergia, betania.quirino@embrapa.br

⁷ Biólogo, doutor em Microbiologia Aplicada, Embrapa Agroenergia, joao.almeida@embrapa.br

⁸ Médica-veterinária, doutora em Biologia Molecular, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, daniela.bittencourt@embrapa.br

As espidroínas são constituídas por três regiões: a região N-terminal e a região C-terminal, que não se repetem e são altamente conservadas, e a terceira, que é formada por uma região central contendo módulos repetitivos e ricos em aminoácidos alanina (A), glicina (G) e prolina (P) (Finnigan et al., 2020). As unidades repetitivas presentes nas espidroínas podem ser agrupadas em quatro categorias: 1) GPGXX/GPGQQ; 2) (GA)_n/An; 3) GGX; e 4) regiões espaçadoras (*spacers*). Tais motivos estruturais são considerados responsáveis por proporcionar elasticidade, resistência mecânica, leveza, extensibilidade e flexibilidade às fibras de seda de aranhas (Bittencourt et al., 2007).

No entanto, o acesso às fontes naturais da seda de aranha e os métodos de processamentos são limitados. Graças aos avanços tecnológicos da biologia sintética, hoje é possível sintetizar novas sequências genéticas que codificam proteínas de seda de aranha sintéticas. Esse processo de design in silico de novas espidroínas, utilizando módulos diferentes das proteínas de sedas de aranhas, e a inclusão de regiões bioativas específicas podem resultar em proteínas que adotem novas funções para a produção de biomateriais voltados para aplicações biomédicas (Connor et al., 2023; Finnigan et al., 2020). No entanto, mesmo com os avanços tecnológicos, ainda se faz necessário o desenvolvimento de sistemas de produção heterólogos eficientes e que permitam o escalonamento da produção de espidroínas sintéticas para diferentes aplicações.

Desse modo, este trabalho teve por objetivo modelar uma espidroína sintética para o desenvolvimento de nanopartículas carreadoras de ácidos nucleicos, denominada Engenheirada 1 (Eng1), baseada na seda da aranha *Parawixia bistrata*, natural do Cerrado brasileiro, e otimizar sua produção em *Escherichia coli*, por meio da inserção de um peptídeo-sinal para secretar a espidroína sintética produzida para o meio de cultivo e facilitar o seu processo de purificação.

Material e métodos

Clonagem da espidroína, expressão e purificação da proteína

O plasmídeo contendo a espidroína Eng1 foi sintetizado pela empresa *Epoch Life Science* (Texas, Estados Unidos), no plasmídeo pET24a para a expressão em bactéria *E. coli* BL21(DE3). A espidroína foi modulada contendo cinco partes de interesse: 1) o peptídeo-sinal de secreção da β -xilosidase Bgl11 inserido antes da cauda de histidina na porção N-terminal do próprio plasmídeo (Souto et al., 2021); 2) um peptídeo internalizador celular; 3) a espidroína MaSp2 contendo oito módulos *in tandem*; 4) uma região de polilisina (15) para ligação de ácido nucleico; e 5) peptídeo de localização nuclear (Figura 1).

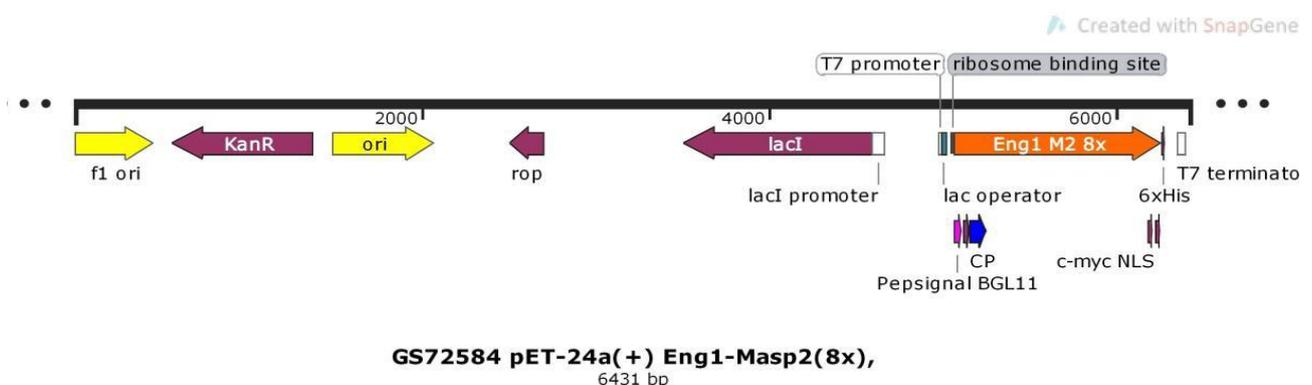


Figura 1. Mapa do plasmídeo pET24a contendo o material genético da proteína Eng1.

O plasmídeo foi inserido em bactéria *E. coli* BL21(DE3) por transformação de choque térmico. A bactéria foi cultivada em meio MDAG-135, uma alíquota foi retirada para realização de

minipreparação de plasmídeo, e a confirmação dele foi feita por enzimas de restrições. Em seguida, 1 mL do pré-inóculo foi transferido para 500 mL de meio ZY(2X)M-5052 pH 8,0 (Studier, 2005) em Erlenmeyer de 2 L, contendo antibiótico canamicina 100 µg/mL. O cultivo ocorreu a 37 °C com agitação a 300 rpm por ~4 horas, momento em que a OD600 chegou a 0,8. Nesse momento, a temperatura foi diminuída para 18 °C, e as bactérias foram cultivadas por mais 48 horas, na mesma rotação.

Após o cultivo, as células foram precipitadas por centrifugação a 8.000 ×g por 30 min em temperatura ambiente. O sobrenadante foi separado e concentrado pelo sistema de ultrafiltração por agitação/pressão. Uma alíquota desse volume concentrado foi aquecida a 95 °C por 30 min, centrifugada a 14.000 rpm por 2 min. O sobrenadante foi avaliado por SDS-PAGE para verificar a produção da espidroína.

A partir do restante do volume concentrado (~50 mL), a espidroína sintética Eng1 foi então purificada por cromatografia de afinidade (AKTA-GE), utilizando-se uma coluna de sefarose carregada com níquel (5 mL Histrap FF -GE). Para isso, adicionou-se o mesmo volume de solução tampão de ligação (20 mM Tris-HCl pH 10,0, 50 mM NaCl, 20 mM imidazol) na amostra, antes de iniciar o processo de purificação. Após a passagem de toda a amostra na coluna, ela foi lavada com 100 mL da mesma solução tampão de ligação, e, ao final, a proteína foi eluída em 10 mL de solução tampão 20 mM Tris-HCl pH 10,0, 50 mM NaCl, 500 mM imidazol. Para verificação da eficiência do processo de purificação, as frações do volume passado, lavado e eluído foram avaliadas por SDS-PAGE corado com nitrato de prata 20% ao final (Nesterenko et al., 1994). Após purificação, a proteína foi quantificada por Nanodrop (Thermo Fischer) na absorvância de 280 nm, para verificação do rendimento de produção e foi avaliada qualitativamente por *Western blot*, utilizando um anticorpo comercial contra cauda de histidina, conjugado com fosfatase alcalina (A5588-Sigma).

Resultados e discussão

Decorrido o cultivo da bactéria, a OD600 estava em 7,8 e o pH diminuiu de 8 para 7,05. Após a centrifugação, a massa celular úmida precipitada foi medida, rendendo 10,13 g. Apesar de Studier (2005) afirmar que essa metodologia permite um crescimento de células em alta densidade (OD600 ≥ 10), com estabilidade do plasmídeo, não foi o que ocorreu neste caso. Observando o valor encontrado do pH, a sua queda não foi o fator limitante do crescimento da bactéria. Normalmente isso acontece quando o pH fica muito ácido (~5,5). Uma possível explicação da OD600 não ter alcançado os valores de referência pode estar relacionado à composição da espidroína, que demanda uma alta quantidade de aminoácidos glicina (29,6%), alanina (24,8%), glutamina (10,9%) e prolina (9,6%), o que pode ter limitado o metabolismo basal da *E. coli*. Outra possibilidade está relacionada ao fato de a proteína não estar na porção intracelular, ou seja, à medida que a bactéria produziu a proteína, ela foi secretada, e a energia utilizada neste processo pode ter interferido na multiplicação bacteriana.

A proteína de seda Eng1 tem 33,54 kDa com ponto isoelétrico em 10.26, e foi identificada na porção do extrato proteico do meio de cultura (500 mL para 50 mL). Desse meio, uma amostra de 1 mL foi fervida, centrifugada e submetida a SDS-PAGE corado com prata (Figura 2B) e *Western blot* contra cauda de histidina (Figura 2A), o que permitiu sua identificação (Figura 2). Em razão de sua natureza hidrofóbica, é natural que ela migre pelo gel de poliacrilamida, diferentemente do padrão esperado.

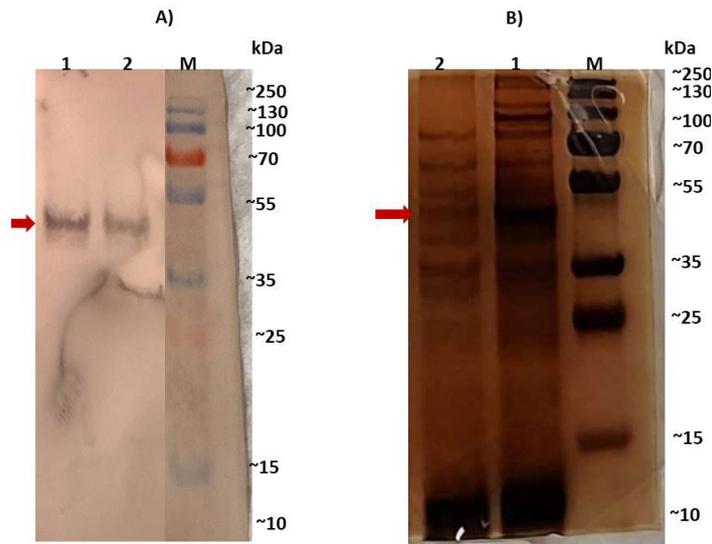


Figura 2. Extrato proteico de seda Eng1 (seta vermelha) separada em SDS-PAGE e analisada por (A) Western blot e (B) nitrato de prata. 1–Amostra não fervida. 2–Amostra fervida. M– Marcador de peso molecular.

Esse resultado confirmou a produção da espidroína sintética Eng1 em *E. coli* e a sua secreção para o meio de cultivo, além de confirmar sua termoestabilidade similar à apresentada pelas espidroínas naturais. Isso facilita não só o processo de purificação da espidroína sintética, uma vez que a elevada temperatura normalmente tem a capacidade de desnaturar proteínas, mas também a posterior aplicação da Eng1 no desenvolvimento de diferentes biomateriais.

A Eng1 foi purificada a partir do meio de cultivo concentrado por cromatografia de afinidade, e as frações referentes ao volume passado E1A1 a E1A3 (Figura 3A), ao lavado E1B1 a E1B3 (Figura 3A) e às eluições A1 a B5 (Figura 3) foram analisadas qualitativamente por SDS-PAGE corado com nitrato de prata (Figura 3). Como a Eng1 possui uma cauda com dez histidinas, isso permitiu uma aderência eficiente da molécula na coluna, beneficiando o processo da purificação. Com esse processo foi possível adquirir um rendimento de produção de 11,46 mg de proteína.

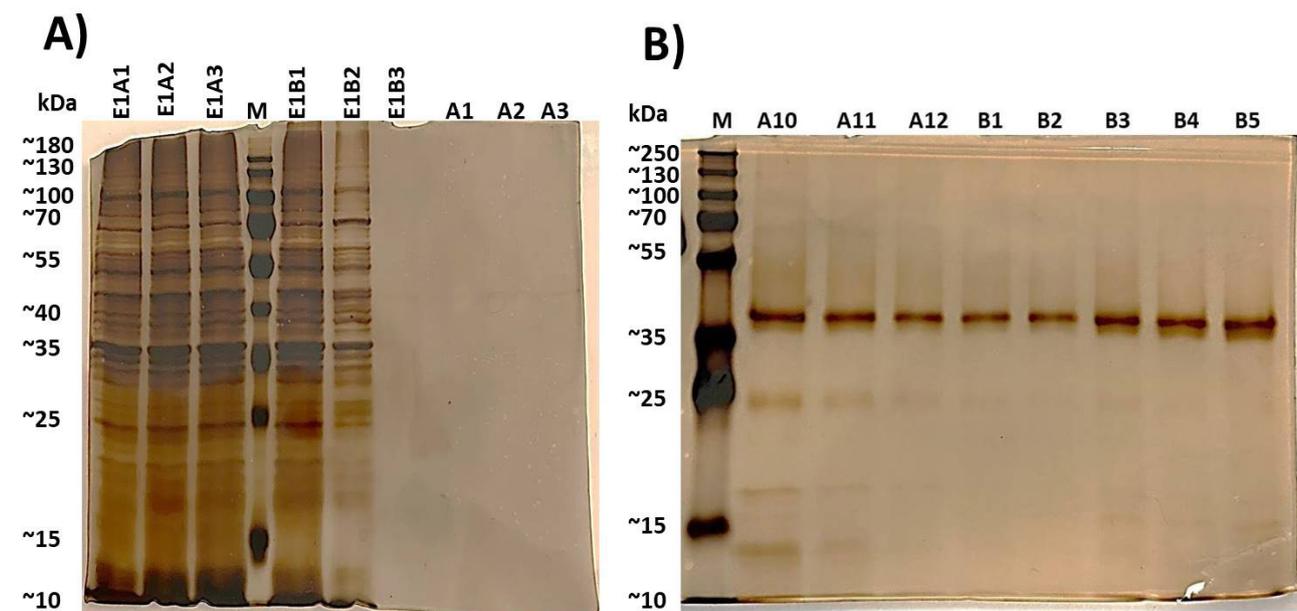


Figura 3. A proteína de seda Eng1 purificada foi separada em gel SDS-PAGE e analisada por nitrato de prata. Amostras E1A1 a E1A3 volume passado; E1B1 a E1B3 lavado; A1 a B5 frações de purificação; M–Marcador de peso molecular.

Interessantemente, durante a quantificação da Eng1 em Nanodrop, foi possível verificar a contaminação da proteína purificada com ácidos nucleicos. Embora a presença de ácidos nucleicos no extrato proteico puro seja indesejada, esse resultado traz indícios de que inserção da região rica em lisina na Eng1 contribuirá para a produção de nanopartículas carreadoras de ácidos nucleicos.

Conclusão

A partir do conhecimento da composição e da estrutura das espidroínas produzidas por aranhas, foi possível desenvolver espidroínas híbridas sintéticas para aplicação de interesse biomédico nas condições do estudo. A proteína Eng1 derivada da aranha do cerrado *P. bistrata* foi produzida por bactéria *E. coli* e secretada no meio de cultivo de autoindução. Foi utilizado um peptídeo-sinal proveniente da enzima Bgl11, uma β -xilosidase produzida por uma bactéria não cultivada, previamente identificada em uma biblioteca metagenômica de rúmen de caprinos. Esse processo permitiu a purificação da espidroína diretamente do meio de cultivo, evitando uma etapa de lise celular. Além disso, a espidroína mostrou-se termoestável e com capacidade de ligação a ácidos nucleicos. Os resultados alcançados neste trabalho serão utilizados para o escalonamento da produção da espidroína Eng1 em biorreatores, objetivando a produção de nanopartículas capazes de carrear e entregar ácidos nucléicos em células de mamíferos.

Este trabalho foi financiado pela Fundação de Apoio a Pesquisa do Distrito Federal (FAP-DF), processo #00193-00001028/2021-41.

Referências bibliográficas

- BHATTACHARYYA, G.; OLIVEIRA, P.; KRISHNAJI, S. T.; CHEN, D.; HINMAN, M.; BELL, B.; HARRIS, T. I.; GHAZITABATABAEI, A.; LEWIS, R. V.; JONES, J. A. Large scale production of synthetic spider silk proteins in *Escherichia coli*. **Protein Expression and Purification**, v. 183, 2021. Article 105839.
- BITTENCOURT, D.; SOUTO, B. M.; VERZA, N. C.; VINECKY, F.; DITTMAR, K.; SILVA, P. I.; ANDRADE, A. C.; SILVA, F. R. da; LEWIS, R. V.; RECH, E. L. Spidroins from the Brazilian spider *Nephilengys cruentata* (Araneae: Nephilidae). **Comparative Biochemistry and Physiology Part B**, v. 147, n. 4, p. 597-606, 2007.
- CONNOR, A.; WIGHAM, C.; BAI, Y.; RAI, M.; NASSIF, S.; KOFFAS, M.; ZHA, R. H. Novel insights into construct toxicity, strain optimization, and primary sequence design for producing recombinant silk fibroin and elastin-like peptide in *E. coli*. **Metabolic Engineering Communications**, v. 16, 2023. Article e00219.
- FINNIGAN, W.; ROBERTS, A. D.; LIGORIO, C.; SCRUTTON, N. S.; BREITLING, R.; BLAKER, J. J.; TAKANO, E. The effect of terminal globular domains on the response of recombinant mini-spidroins to fiber spinning triggers. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, 2020. Article 10671.
- JOHARI, N.; KHODAEI, A.; SAMADIKUCHAKSARAEI, A.; REIS, R. L.; KUNDU, S. C.; MORONI, L. Ancient fibrous biomaterials from silkworm protein fibroin and spider silk blends: biomechanical patterns. **Acta Biomaterialia**, v. 153, p. 38-67, 2022.
- NESTERENKO, M. V.; TILLEY, M.; UPTON, S. J. A simple modification of Blum's silver stain method allows for 30 minutes detection of proteins in polyacrylamide gels. **Journal of Biochemical and Biophysical Methods**, v. 28, n. 3, p. 239-242, 1994.
- SOUTO, B. D. M.; DE ARAUJO, A. C. B.; HAMANN, P. R. V.; BASTOS, A. de R.; CUNHA, I. de S.; PEIXOTO, J.; KRUGER, R. H.; NORONHA, E. F.; QUIRINO, B. F. Functional screening of a Caatinga goat (*Capra hircus*) rumen metagenomic library reveals a novel GH3 β -xylosidase. **Plos one**, v. 16, n. 1, 2021. e0245118.
- 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.

Produção de biogás a partir de bagaço de cana-de-açúcar e frações pré-tratadas

Rafael Moreira Marques¹, Felipe Orcelli Wojcieckowski², Gabriel de Szechy Vigna³, Dasciana Rodrigues⁴, Jhenifer Bastos⁵, Rossano Gambetta⁶

Resumo

O ensaio de Potencial Bioquímico de Metano (PBM), ou *Biochemical Methane Potential* (BMP), é um método usado para avaliar a quantidade de metano que pode ser produzido a partir da decomposição anaeróbica de diferentes matérias orgânicas. A finalidade do estudo foi analisar o potencial de geração de biogás e biometano a partir do bagaço de cana-de-açúcar e de produtos provenientes da auto-hidrólise, sendo eles o sólido pré-tratado, o hidrolisado e a combinação dos dois. Além disso, houve o objetivo de observar se existe algum tipo de inibição, por meio da relação inóculo e substrato (RIS). A auto-hidrólise foi realizada a uma temperatura de 180 °C, durante 40 minutos e com uma proporção de 10 gramas de água para cada grama de bagaço de cana seco. Os quatro substratos foram capazes de gerar biogás. No entanto, na RIS 1:1, tanto o hidrolisado quanto o sólido pré-tratado mais o hidrolisado não apresentaram geração de gás metano.

Termos para indexação: PBM, bagaço de cana-de-açúcar, auto-hidrólise, RIS.

Introdução

Os resíduos lignocelulósicos são compostos principalmente por celulose, hemicelulose e lignina. Estão presentes em materiais vegetais, como madeira, palha, bagaço de cana-de-açúcar e outros subprodutos da indústria agrícola, são altamente biodegradáveis por causa da presença de enzimas específicas em microrganismos, como bactérias e fungos, que são capazes de quebrar os componentes da lignocelulose em açúcares simples. Esses açúcares podem então ser convertidos em produtos úteis, como bioetanol, biogás ou outros produtos químicos. Apesar das vantagens potenciais, o processamento dos resíduos lignocelulósicos exhibe desafios significativos. A lignocelulose é altamente resistente à degradação e requer pré-tratamento adequado para quebrar as ligações químicas e facilitar a liberação dos açúcares. Os principais tipos de pré-tratamento são os físicos, químicos, térmicos e bioquímicos, mas também podem ter combinações entre eles. A auto-hidrólise é um processo hidrotérmico que utiliza água como agente para quebrar as ligações químicas da lignocelulose. Ela oferece a vantagem de evitar o uso de agentes químicos adicionais, mas requer controle preciso de temperatura e tempo de reação para maximizar a eficiência da quebra da lignocelulose (Baêta, 2016). O ensaio de Potencial Bioquímico de Metano (PBM) é um método utilizado em laboratório para avaliar a quantidade de metano que pode ser produzido a partir da decomposição anaeróbica de diferentes matérias orgânicas. Ele é comumente usado para avaliar a capacidade de produção de biogás de materiais biodegradáveis (Holliger et al., 2016).

No ensaio de PBM, o substrato orgânico é colocado em um reator fechado chamado biodigestor, juntamente com um inóculo contendo microrganismos anaeróbios, como bactérias metanogênicas,

¹ Químico Tecnológico, Universidade de Brasília, rafael.marques@colaborador.embrapa.br

² Químico Tecnológico, Universidade de Brasília, felipe.orcelli@colaborador.embrapa.br

³ Graduando em Engenharia Mecatrônica, Universidade de Brasília, gabriel.vigna@colaborador.embrapa.br

⁴ Química industrial, doutora em Ciência em Engenharia Química, Embrapa Agroenergia, dasciana.rodrigues@embrapa.br

⁵ Engenheira ambiental, doutoranda em Sustentabilidade Ambiental Urbana, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, jhenifer.bastos@colaborador.embrapa.br

⁶ Engenheiro químico, doutor em Ciência em Engenharia Química, Embrapa Agroenergia, rossano.gambetta@embrapa.br

responsáveis pela decomposição da matéria orgânica e produção de metano. O reator é mantido em condições anaeróbias, sem oxigênio, com temperatura e pH adequados para crescimento e atividade desses microrganismos. Ao longo do tempo, a produção de metano é monitorada por meio de medidas regulares do volume acumulado de gás metano gerado. A quantidade de metano produzida no ensaio de PBM é um indicativo do potencial de geração de biogás e pode ser usada para estimar a eficiência da degradação da matéria orgânica, bem como comparar diferentes substratos em termos de sua capacidade de produção de metano (Holliger et al., 2016; Verein Deutscher Ingenieure, 2006).

Nos testes de PBM, a quantidade de inóculo e substrato utilizada é baseada na relação inóculo/substrato (RIS). Esse parâmetro é crucial para o experimento, pois por meio dele é possível avaliar o potencial de produção do biogás ou a inibição de determinadas matérias orgânicas. Essa relação é calculada por meio dos sólidos voláteis, uma vez que essa medida indica a quantidade de resíduo orgânico. Na avaliação de produção do biogás, recomenda-se que a parte de sólidos voláteis do inóculo seja no mínimo o dobro do substrato. Já na verificação da inibição são necessárias frações iguais ou menores do inóculo (Holliger et al., 2016; Verein Deutscher Ingenieure, 2006). O objetivo do trabalho foi verificar o potencial de geração de biogás e biometano com o bagaço de cana-de-açúcar e com os produtos provenientes da auto-hidrólise, sendo eles o sólido pré-tratado, o hidrolisado e a combinação dos dois. Além disso, buscou-se observar se existe algum tipo de inibição por meio da variação de inóculo/substrato.

Materiais e métodos (T1)

Características do inóculo e substrato (T2)

O inóculo é originário do reator anaeróbio situado na área de plano piloto (APP) da Embrapa Agroenergia e contém 80% de digestato de biodigestor utilizado no tratamento de resíduos da suinocultura e 20% de resíduos brutos de bovinos. O reator está em funcionamento há 6 meses e recebe uma carga de alimentação de 0,5 g SV/L três vezes por semana. A alimentação é composta por uma mistura de farinha de milho, proteína de soja, óleo vegetal e água, mantendo o teor de sólidos totais abaixo de 10%. O substrato utilizado foi o bagaço de cana-de-açúcar, proveniente de uma usina de produção de etanol e açúcar localizada em Goiás, chamada Jalles Machado.

Aplicação do pré-tratamento por auto-hidrólise (T2)

O pré-tratamento do bagaço de cana-de-açúcar foi processado em um reator de aço inoxidável com capacidade interna de 5 galões e controle de pressão e temperatura (marca Parr, modelo 4555). O reator foi alimentado com 0,8 Kg de bagaço de cana-de-açúcar e misturado com 8 L de água da torneira até que todo o material estivesse completamente absorvido e uniformemente misturado. A mistura foi levada para o reator e, sob agitação, foi aquecida até atingir a temperatura de 180 °C, mantida por 40 minutos nessa temperatura. Após essa etapa, o reator foi resfriado utilizando a recirculação de água fria na camisa, e o conteúdo foi coletado para a separação da fração líquida (hidrolisado) e da fração sólida (sólido pré-tratado). O conteúdo líquido totalizou cerca de 8 L, enquanto a parte sólida correspondeu a aproximadamente 0,7 Kg. Ambas as frações foram armazenadas em recipientes de vidro e mantidas a uma temperatura de -20 °C para evitar a degradação.

Ensaio de potencial bioquímico de biogás e metano (T2)

Os ensaios de potencial de produção de biogás (PBB) e metano (PBM) foram realizados seguindo uma metodologia descrita por Holliger et al. (2016), e os critérios foram mantidos na norma VDI 4630 (2005). Essa abordagem envolveu a realização de testes em batelada utilizando frascos de penicilina de 100 mL, empregados em temperatura mesofílica (37 °C). O volume de inóculo e substratos adicionados aos frascos foi calculado com base no balanço de massa, considerando o teor

de sólidos voláteis em base úmida. A relação inóculo/substrato (RIS) utilizada foi de 1:1, 3:1 e 5:1 (m/m). Um total de 42 frascos foi utilizado para incubar o inóculo, celulose microcristalina (padrão), bagaço de cana-de-açúcar in natura, receita sólida, receita líquida (hidrolisado) e mistura da receita sólida e líquida na proporção de 10:90 (m/m). Para avaliar a qualidade do inóculo em relação ao potencial de produção de biogás e metano, foram incubadas três garrafas contendo celulose microcristalina como amostra padrão, utilizando a relação inóculo/substrato de 3:1, conforme recomendado por Holliger et al. (2016). Para medir o volume de biogás produzido diariamente, utilizou-se uma seringa de vidro acoplada a um manômetro digital portátil, que foi conectado aos frascos de penicilina. O volume de biogás foi determinado pela movimentação do êmbolo da seringa, juntamente com a equalização da pressão interna com a pressão ambiente. O volume de gás medido na seringa de vidro foi verificado com base na temperatura e na pressão ambiente, levando em conta as Condições Normais de Temperatura e Pressão (CNTP).

Resultados e discussão (T1)

Na decomposição anaeróbia, as bactérias metanogênicas degradam a matéria orgânica e produzem biogás (gás metano e carbônico principalmente). A análise que mostra a quantidade dessa matéria presente na biomassa são os sólidos voláteis (Operação..., 2021). Neste trabalho, foi feita essa análise no inóculo e nos substratos. A Tabela 1 mostra os valores de sólidos totais (ST%) e sólidos voláteis em base úmida (SV%bu). A partir dos resultados, percebe-se que o bagaço de cana possui os maiores valores, seguidos do sólido pré-tratado, da mistura do sólido com o hidrolisado e por último somente o hidrolisado. Na Tabela 2, verifica-se que todas as relações inóculo/substrato (RIS) produziram biogás, sendo que todos os substratos produziram mais na RIS 5:1, em que que a proporção de sólidos voláteis de inóculo é cinco vezes maior que a de substrato. Percebe-se também que aumentou a produção de biogás com o crescimento da RIS. Referente ao gás metano, observa-se que houve inibição na produção tanto no hidrolisado quanto no hidrolisado mais sólido na relação 1:1, porém, nas outras RIS, esses dois substratos geraram mais gás metano que os outros.

Tabela 1. Teor de sólidos totais (ST%) e voláteis em base úmida (SV %bu).

Amostra	ST (%)	SV (%bu)
Bagaço de cana	92,7	89,9
Sólido pré-tratado	16,8	14,9
Hidrolisado	1,1	0,9
Sólido + hidrolisado	1,2	1,1

Nota-se também que a composição de metano no biogás foi maior na RIS 5:1 em todos os substratos. Comparando-os, identifica-se que o teor de metano ficou maior com o bagaço e o sólido pré-tratado na relação 1:1 e 3:1. No hidrolisado e na mistura, a produção de metano é praticamente zero na RIS 1:1, porém esses substratos produziram biogás. Desse modo, esse gás deve ser composto predominantemente por dióxido de carbono. Na Tabela 3, foram calculadas as quantidades de biogás e biometano em litros normalizados por quilograma de substrato seco (LN/Kg Sub) por meio dos valores de sólidos voláteis em base úmida e dos sólidos totais. Considerando-se como exemplo o bagaço de cana (RIS 5:1), que detém 89,9% de SV bu e 92,7% de ST, multiplicando-se o volume de biogás 601 ± 12 LN/Kg SV pelos SV bu e dividindo pelos ST, obtém-se o volume de biogás por quilograma de bagaço seco 583 ± 11 LN/Kg Substrato seco.

Segundo a Tabela 3, verifica-se que o hidrolisado e a mistura produziram mais biogás e biometano por quilograma, uma vez que nesses substratos há substâncias mais simples quimicamente e solúveis em meio aquoso e, portanto, mais fáceis de serem degradadas pelos microrganismos, pois passaram por um processo de auto-hidrólise (Baêta, 2016). Entretanto na relação 1:1,

em que a quantidade de hidrolisado e da mistura é maior que as outras relações, não houve produção de metano. Uma das razões podem ser altas concentrações de determinados compostos que inibem a atividade das metanogênicas (Operação..., 2021), por exemplo, ácidos orgânicos, compostos fenólicos e furanos, sendo que essas substâncias são geradas em auto-hidrólise de bagaço de cana (Baêta, 2016).

Tabela 2. Produção acumulada de biogás e biometano por Kg de SV e composição de metano seco nos diferentes substratos e RIS.

Substrato	Bagaço de cana	Sólido pré-tratado	Hidrolisado	Mistura (sólido+líquido)
RIS	Produção acumulada de biogás (LN/Kg SV)			
1:1	439 ± 11	270 ± 1	47 ± 5	67 ± 9
3:1	523 ± 10	360 ± 7	1100 ± 28	1050 ± 22
5:1	601 ± 12	474 ± 6	1296 ± 25	1181 ± 18
RIS	Composição de metano seco (%)			
1:1	57,20	55,80	0,00	0,00
3:1	52,20	55,40	26,30	28,80
5:1	61,10	64,70	48,30	63,00
RIS	Produção acumulada de metano (LN/Kg SV)			
1:1	251 ± 6	151 ± 0,3	0 ± 0	0 ± 0
3:1	273 ± 5	200 ± 4	289 ± 7	303 ± 7
5:1	367 ± 7	306 ± 4	626 ± 12	745 ± 11

Tabela 3. Produção acumulada de biogás e biometano por Kg de substrato seco nas diferentes RIS.

Substrato	Bagaço de cana	Sólido pré-tratado	Hidrolisado	Mistura (sólido + líquido)
RIS	Produção acumulada de biogás (LN/Kg Substrato)			
1:1	436 ± 11	239 ± 1	40 ± 4	58 ± 8
3:1	507 ± 9	319 ± 6	952 ± 24	916 ± 20
5:1	583 ± 11	419 ± 5	1121 ± 22	1030 ± 15
RIS	Produção acumulada de metano (LN/Kg Substrato)			
1:1	249 ± 6	133 ± 0	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
3:1	265 ± 5	176 ± 4	250 ± 6	264 ± 6
5:1	367 ± 7	306 ± 4	626 ± 12	745 ± 11

Conclusão

A partir dos resultados experimentais, compreende-se que os quatro substratos podem ser utilizados na produção de biogás e biometano. Entretanto, depende da quantidade de sólidos voláteis do inóculo e do substrato, uma vez que não foi apresentada geração de gás metano na RIS 1:1, tanto do hidrolisado quanto do sólido pré-tratado mais o hidrolisado. Um dos motivos pode ser a presença de substâncias tóxicas em maiores quantidades, como compostos fenólicos e furanos, além de altas concentrações de ácidos orgânicos. Nas relações 5:1 e 3:1, em que a fração dos

substratos são menores em relação ao inóculo, houve uma grande produção de biogás e biometano para o hidrolisado e a mistura, logo os microrganismos não são significativamente afetados com essas substâncias inibidoras em menores quantidades. A melhor condição de todos os substratos foi na relação 5:1, ou seja, foi nessa RIS que houve a maior produção de biogás e biometano. De modo que o bagaço gerou 583 ± 11 LN biogás/Kg e 367 ± 7 LN biometano/Kg; o sólido pré-tratado produziu 419 ± 5 LN biogás/Kg e 306 ± 4 LN biometano/Kg; o hidrolisado gerou 1121 ± 22 LN biogás/Kg e 626 ± 12 LN biometano/Kg; e a mistura produziu 1030 ± 15 LN biogás/Kg e 745 ± 11 LN biometano/Kg.

Referências bibliográficas

BAÊTA, B. E. L. **Aproveitamento energético a partir da digestão anaeróbia de hidrolisado hemicelulósico gerado pelo pré-tratamento por auto-hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar considerando o contexto da biorrefinaria**. 2016. 159 p. Tese (Doutorado em Engenharia Ambiental), Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, 2016. Disponível em: <http://www.repositorio.ufop.br/handle/123456789/7124>. Acesso em: 19 set. 2023.

HOLLIGER, C.; ALVES, M.; ANDRADE, D.; ANGELIDAKI, I.; ASTALS, S.; BAIER, U.; BOUGRIER, C.; BUFFIÈRE, P.; CARBALLA, M.; WILDE, V.; EBERTSEDER, F.; FERNÁNDEZ, B.; FICARA, E.; FOTIDIS, I.; FRIGON, J.; LACLOS, H. F.; GHASIMI, D. S. M.; HACK, G.; HARTEL, M.; HEERENKLAGE, J.; HORVATH, I. S.; JENICEK, P.; KOCH, K.; KRAUTWALD, J.; LIZASOAIN, J.; LIU, J.; MOSBERGER, L.; NISTOR, M.; OECHSNER, H.; OLIVEIRA, J. V.; PATERSON, M.; PAUSS, A.; POMMIER, S.; PORQUEDDU, I.; RAPOSO, F.; RIBEIRO, T.; PFUND, F. R.; STRÖMBERG, S.; TORRIJOS, M.; EEKERT, M.; LIER, J.; WEDWITSCHKA, H.; E WIERINCK, I. Towards a standardization of biomethane potential tests. *Water Science and Technology*, v. 74, n. 11 p. 2515–2522, 2016. DOI: <https://doi.org/10.2166/wst.2016.336>

OPERAÇÃO e monitoramento de reatores anaeróbios: guia de boas práticas. Brasília, DF: MCTI, 2021. E-book. (Projeto Aplicações do Biogás na Agroindústria Brasileira: GEF Biogás Brasil). Disponível em: <https://datasebrae.com.br/wp-content/uploads/2021/11/212D-Guia-opera%C3%A7%C3%A3o-e-monitoramento-de-biodigestores.pdf>. Acesso em: 19 set. 2023.

VEREIN DEUTSCHER INGENIEURE. **VDI 4630**: Fermentation of organic materials Characterisation of the substrate, sampling, collection of material data, fermentation tests. Düsseldorf, 2006.

Produção de biogás a partir de biomassas lignocelulósicas sorgo e capim-elefante

Rossano Gambetta¹, Rafael Moreira Marques², Rafael Augusto da Costa Parrella³, Anderson Carlos Marafon⁴, Jhenifer Bastos⁵, Felipe Orcelli Wojciechowski⁶

Resumo

O Brasil se destaca como um grande produtor agropecuário no cenário mundial. O setor do agro tem como contribuir muito com o desenvolvimento social e econômico, com um grande desafio de alcançar excelência no que se refere ao meio ambiente. O processo de biodigestão é uma forma de dar uma destinação adequada aos resíduos gerados na agropecuária ou na agroindústria, dando origem ao biogás, um biocombustível, e ao digestato, onde os nutrientes presentes nos resíduos são concentrados, podendo ter uso como biofertilizante. No entanto, há uma vertente em que a biomassa é cultivada de forma dedicada para uso na biodigestão, alternativamente ou complementar ao uso de biomassa residual. O objetivo do trabalho foi avaliar os potenciais de produção de biogás/biometano do sorgo e do capim-elefante (variedades Madeira e BRS Capiapu). Os resultados obtidos mostram que o capim-madeira cortado com 90 dias foi o que mais produziu biogás, chegando em 279 NL de biogás/Kg de SV com cerca de 57% de biometano, em pequena escala. Porém o capim-madeira cortado com 120 dias foi o maior produtor em larga escala, totalizando 6.421,62 Nm³ de biometano/ha.

Termos para indexação: sorgo, capim-elefante, capiaçu, capim-madeira, biodigestão.

Introdução

Dentre os diferentes aspectos da gestão agropecuária, um dos mais cruciais é a alimentação. Por essa razão, a escolha da alimentação é feita levando em conta questões estratégicas, como custo, valor nutricional, versatilidade, dentre outras. Nesse cenário, tem-se o uso de plantas como o sorgo, que apresenta resistência ao estresse hídrico; versatilidade, por possuir diferentes espécies; e baixo custo de produção (Duarte, 2023); e como o capim-elefante, que tem um grande potencial produtivo e adaptação às variadas condições encontradas em território nacional (Moraes et al., 2009).

Nota-se que são biomassas atrativas para serem utilizadas na alimentação de animais, mas também podem ser utilizadas como substratos para sistemas de biodigestão. O processo de biodigestão ou digestão anaeróbia gera o biogás como produto principal, que pode ser convertido em energia térmica, elétrica ou até mesmo em combustível veicular (biometano).

Nesse sentido, o objetivo do presente trabalho foi avaliar a produção de metano de três tipos de biomassas lignocelulósicas (capim-madeira, BRS Capiapu e sorgo), sendo o capim-madeira e o BRS Capiapu colhidos em dois tempos diferentes (90 dias e 120 dias).

¹ Engenheiro químico, doutor em Ciência em Engenharia Química, Embrapa Agroenergia, rossano.gambetta@embrapa.br

² Graduado em Química Tecnológica, Universidade de Brasília, rafael.marques@colaborador.embrapa.br

³ Engenheiro-agrônomo, doutor em genética e melhoramento de plantas, Embrapa Milho e Sorgo, rafael.parrella@embrapa.br

⁴ Engenheiro-agrônomo, doutor em Fisiologia Vegetal, Embrapa Tabuleiros Costeiros, anderson.marafon@embrapa.br

⁵ Engenheira ambiental, doutoranda em Sustentabilidade Ambiental Urbana, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, jhenifer.bastos@colaborador.embrapa.br

⁶ Graduado em Química Tecnológica, Universidade de Brasília, felipe.orcelli@colaborador.embrapa.br

Materiais e métodos

As biomassas utilizadas no presente estudo foram o sorgo híbrido BRS 716 (*Sorghum bicolor* (L.) Moench), cedido pela Embrapa Milho e Sorgo, o capim-elefante (*Pennisetum purpureum* Schum. sinônimo de *Cenchrus purpureus* (Schumach.) Morrone) das variedades madeira e BRS Capiáçu colhidos, com 90 dias e 120 dias de idade cada um e pertencentes ao Banco Ativo de Germoplasma da Embrapa Gado de Leite. O sorgo foi colhido na maturidade fisiológica do grão (150 dias–160 dias após o semeio) e seco em estufa por 72 horas a 60 °C. Já os capins foram colhidos e triturados em moinho de facas e armazenados em minissilos por 30 dias.

Foram avaliadas as produções de biogás e metano (PBM) das biomassas por meio de ensaios em batelada, conforme o método descrito por Bastos et al. (2016). Neste ensaio, é utilizado inóculo proveniente do reator de biodigestão da Embrapa Agroenergia, iniciado com 80% de digestato oriundo de biodigestor utilizado no tratamento de resíduos da suinocultura e 20% de resíduos bruto de bovino, que está em operação há 284 dias. Como amostra padrão, foi utilizada celulose microcristalina (Verein Deutscher Ingenieure, 2006) para verificar a qualidade do inóculo quanto à degradação do material de referência.

Para o ensaio de PBM, foram utilizados frascos com volume total de 100 mL, sendo 50% destinados ao *headspace* (reserva do gás). O ensaio foi feito em triplicata para cada amostra, sendo considerada a relação inóculo/substrato de 3:1 (v/v). As análises de sólidos totais (ST) e sólidos voláteis (SV) foram realizadas utilizando-se a metodologia de American Public Health Association (2005) para caracterizar as biomassas (substrato).

Por fim, para avaliar a concentração de metano (CH₄) e dióxido de carbono (CO₂) do biogás, utilizou-se um cromatógrafo gasoso (marca Shimadzu GC-2014), que opera por meio de uma injeção manual de 1 mL de amostra com loop a 150 °C e duas linhas TCD a 180 °C. A primeira linha possui uma coluna Porapak N 2 m x 3 mm com fluxo de 35 mL/min e gás hélio como gás de arraste. Já a segunda linha opera com uma coluna Carboxen 1000 4,6 m x 2,1 mm, fluxo de 45 mL/min e gás nitrogênio como gás de arraste.

Resultados e discussão

Para a validação do ensaio, é necessário atingir pelo menos 85% do valor de referência para a produção de biogás utilizando a celulose microcristalina (750 NL biogás/Kg SV). No presente estudo, esse valor foi atingido ao final do ensaio (total de 53 dias) com produção acumulada de biogás de 643 NL biogás/Kg SV.

O maior valor de produção acumulada de biogás foi do capim-madeira colhido com 90 dias (436±16,0 NL biogás/Kg SV), seguido do capim-madeira colhido com 120 dias (389±9,0 NL biogás/Kg SV) (Figura 1A). Essa diferença pode ser explicada pela perda de matéria orgânica de fácil degradação pelos microrganismos anaeróbios durante o período de maturação das plantas. Quanto ao sorgo e ao BRS Capiáçu, observaram-se valores de produção de biogás próximos, sendo de 376±25,0 NL biogás/Kg SV para o BRS de 90 dias, 350±4,3 NL biogás/Kg SV para o BRS de 120 dias e 345±6,3 NL biogás/Kg SV para o sorgo.

Quanto ao comportamento das curvas de produção de biogás, nota-se que há um atraso para o BRS Capiáçu (120 dias) e o sorgo, sendo necessários cerca de 15 dias a 19 dias para chegar a 200 NL biogás/kg SV (Figura 1). Em contrapartida, o capim-madeira (90 dias) ultrapassou esse valor com apenas sete dias de ensaio, enquanto o capim-madeira (120 dias) e o BRS Capiáçu (90 dias) levaram por volta de 10 dias. Essa diferença dos valores de produção de biogás nos dez primeiros dias

de ensaio pode estar atrelada à diferença da composição da biomassa, como celulose, hemicelulose e lignina, que pode dificultar o acesso dos microrganismos ao material de fácil degradação nos primeiros dias de ensaio.

Ao se observar a produção acumulada de metano, notou-se que o valor obtido para o capim-madeira com idade de corte de 90 dias foi maior ($279 \pm 9,6$ NL CH₄/Kg de SV), seguido do capim-madeira de 120 dias ($234 \pm 5,4$ NL CH₄/Kg de SV) e do BRS Capiapu de 90 dias ($233 \pm 15,5$ NL CH₄/Kg de SV) (Figura 1B). Já os valores obtidos pelo BRS Capiapu 190 dias e pelo sorgo foram de $212 \pm 2,6$ NL CH₄/Kg de SV e $200 \pm 4,0$ NL CH₄/Kg de SV, respectivamente.

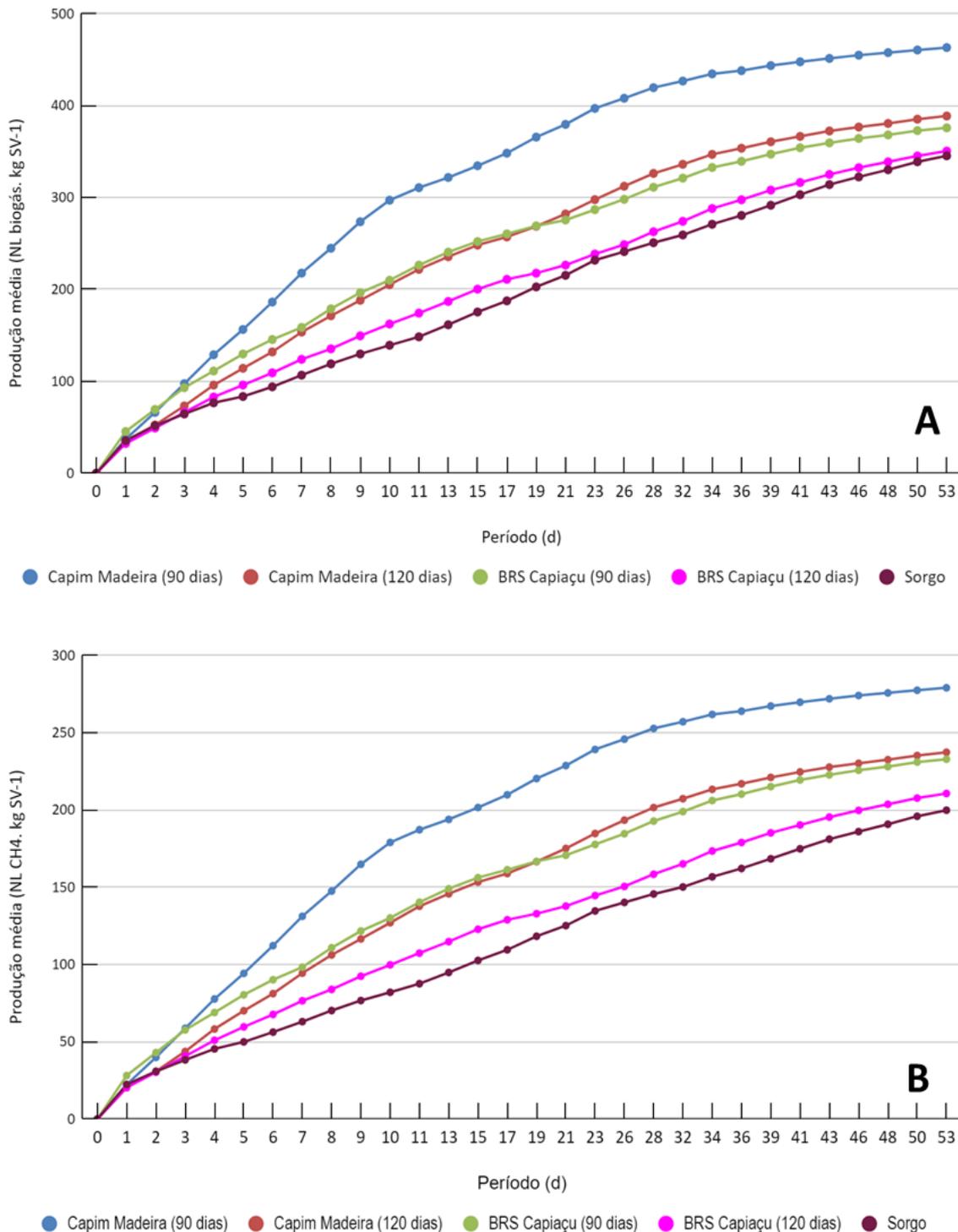


Figura 1. Produção acumulada de biogás (A) e metano (B) dos substratos.

Além da produção de gás por massa de SV, é importante levar em conta a quantidade de biomassa produzida por cada espécie, pois, ao se combinar essa informação com os dados obtidos do ensaio de PBM, é possível estimar a produção de biogás/metano por hectare desse cultivo (Tabela 1). Para calcular a produção de metano por hectare, multiplicou-se o valor de metano produzido pelo seu valor de biomassa por hectare e pelo seu valor de sólidos voláteis em base úmida.

Tabela 1. Produtividade de metano do substrato em relação a massa seca e por área de plantação (hectare).

Substrato	SV base úmida (Kg/ Kg) Biomassa* (ton/ha)	Produtividade		
		Metano NL CH ₄ / Kg SV	Metano Nm ³ CH ₄ / ha	Metano Nm ³ CH ₄ / ha
Madeira (90 dias)	0,1644	140,0	279	6421,46
Capim- elefante Madeira (120 dias)	0,2079	132,0	234	6421,62
BRS Capiapu (90 dias)	0,1883	125,5	233	5506,17
BRS Capiapu (120 dias)	0,1900	114,0	212	4591,92
Sorgo	0,8436	25-30**	200	4218-5061,6

*Dados fornecidos pela Embrapa Milho e Sorgo e pela Embrapa Tabuleiros Costeiros.

**A amostra original veio seca.

Ao se observar a produção de metano por hectare, nota-se que, em razão de uma quantidade maior de sólidos voláteis em base úmida, a variedade capim-elefante Madeira (120 dias) apresentou uma maior produção por hectare (6.421,62 Nm³ CH₄/ha), embora com pouca diferença, superando a mesma variedade com saturação de 90 dias (6.421,46 Nm³ CH₄/ha). Em contrapartida, as produções de metano da variedade de capim BRS Capiapu e do sorgo foram menores quando comparadas à do capim-madeira, sendo de 5.506,17 Nm³ CH₄/ha e 4.591,92 Nm³ CH₄/ha para BRS Capiapu de 90 dias e 120 dias, respectivamente, e uma faixa de 4.218 Nm³ CH₄/ha– 5.061,6 Nm³ CH₄/ha para o sorgo. Portanto, a variedade de capim-madeira 90 dias pode ser uma escolha vantajosa para projetos em larga escala, visto que houve uma diferença ínfima na produtividade de metano quando comparada com a variedade de 120 dias.

Conclusão

A partir dos testes realizados, conclui-se que todos os substratos possuem potencial de produção de biogás/biometano, sendo que o capim-elefante, variedade Madeira, com tempo de corte de 90 dias, foi o que apresentou maior produção de metano, 279 NL CH₄/Kg SV, o que representa cerca de 6.421,46 Nm³ CH₄/ha. A mesma variedade com uma maturação maior, 120 dias, apresentou uma maior produtividade, 6.421,62 Nm³ CH₄/ha. O capim BRS Capiapu, colhido com 90 dias, tem potencial de produção de 5.506,17 Nm³ CH₄/ha; o colhido com 120 dias tem potencial de produção de 4.591,92 Nm³ CH₄/ha. Já o sorgo tem um potencial de produção entre 4.218 Nm³ CH₄/ha e 5.061,6 Nm³ CH₄/ha.

A partir do estudo, foi identificado que a idade de corte influencia tanto na produção de biogás/biometano na etapa de biodigestão como na produção da própria biomassa no campo.

Referências bibliográficas

AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. (2005) *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*. 21st ed., 2005. 541p.

BASTOS, J. A.; REMOR, P. V.; ALINO, J. H. L.; FRARE, L. M.; LOFHAGEN, J. C. P.; EDWIGES, T. Hydrolysate recycling improves economic feasibility of alkaline pretreatment for bioenergy production. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 9, n. 5, 105935 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jece.2021.105935>

DUARTE, N. L. **Cultura do sorgo (*Sorghum bicolor* [L.] Moench)**: uma revisão sobre sua versatilidade tecnológica, processamento e pós-colheita. 2021. 52 f. TCC (Graduação) - Curso de Engenheiro Agrícola, Universidade Federal da Grande Dourados, Dourados, 2021. Disponível em: <https://repositorio.ufgd.edu.br/jspui/bitstream/prefix/4704/1/NaiaraLopesDuarte.pdf>. Acesso em: 25 jul. 2023.

MORAIS, R. F.; SOUZA, B. J.; LEITE, J. M.; SOARES, L. H. B.; ALVES, B. J. R.; BODDEY, R. M.; URQUIAGA, S. Elephant grass genotypes for bioenergy production by direct biomass combustion. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v. 44, n. 2, p. 133-140, 2009. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0100-204X2009000200004>

OPERAÇÃO e monitoramento de reatores anaeróbios: guia de boas práticas. Brasília: MCTI, 2021. E-book. (Projeto Aplicações do Biogás na Agroindústria Brasileira: GEF Biogás Brasil).

VEREIN DEUTSCHER INGENIEURE. **VDI 4630: Fermentation of organic materials Characterization of the substrate, sampling, collection of material data, fermentation tests**. Düsseldorf, 2006.

Produção de biogás com dejetos de bovino leiteiro em uma propriedade de pequeno porte

Jhenifer Aline Bastos¹, Sílvia Gonçalves Belém², Itânia Pinheiro Soares³, Felipe Orcelli Wojcieckowski⁴, Rafael Moreira Marques⁵, Gabriel de Szechy Vigna⁶, Rossano Gambetta⁷

Resumo

O objetivo do estudo foi avaliar o desempenho de um biodigestor, localizado em uma propriedade produtora de leite de pequeno porte, e estimar o custo evitado com a substituição do gás de cozinha pelo biogás. Foram feitas análises físico-químicas com amostras coletadas no ponto de entrada (dejetos) e saída (digestato) do biodigestor e foi determinado o teor de metano de dióxido de carbono do biogás. Como principais resultados, obteve-se, aproximadamente, 20% de remoção de matéria orgânica (SVbs) no ponto de saída e teor de metano no biogás próximo de 60%. Ao estimar a substituição do gás de cozinha pelo biogás consumido, o produtor economizou um botijão de gás por mês e obteve receita de R\$ 120,00/mês. Logo, a instalação de biodigestores em pequenas propriedades traz benefícios econômicos e ambientais ao produtor por transformar um passivo ambiental em ativo econômico.

Termos para indexação: digestão anaeróbia, metano, substituição do GLP.

Introdução

A intensificação da pecuária tem gerado desafios ambientais, exigindo práticas agropecuárias de baixo carbono para reduzir as emissões de gases de efeito estufa (GEE). A criação de bovino leiteiro é uma das principais atividades agropecuárias no Brasil, estando presente em 98% dos municípios brasileiros com produção de, aproximadamente, 34 bilhões de litros de leite por ano (Anuário..., 2023). A digestão anaeróbia surge como uma alternativa promissora para mitigar essas emissões, convertendo os dejetos animais em biogás. Segundo o Relatório de Potencial de Produção de Biogás da Bovinocultura Leiteira de 2020 (Empresa de Pesquisa Energética, 2020), apenas em propriedades de pequeno e médio porte, o potencial de produção de metano foi de 363,7 milhões de Nm³/ano, suficiente para substituir um botijão de gás de cozinha (modelo P-13) a cada 16,8 Nm³ de metano.

Logo, o tratamento dos dejetos por digestão anaeróbia não apenas se apresenta como uma opção de negócio para pequenos produtores de leite, mas também transforma um passivo ambiental em ativo econômico. Nesse contexto, o objetivo do trabalho foi avaliar o desempenho de um biodigestor em uma propriedade de leite de pequeno porte e estimar os custos evitados com a substituição do gás de cozinha pelo biogás.

¹ Engenheira ambiental, doutoranda em Sustentabilidade Ambiental Urbana, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, jhenifer.bastos@colaborador.embrapa.br.

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

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

⁴ Graduado em Química Tecnológica, Universidade de Brasília, felipe.orcelli@colaborador.embrapa.br

⁵ Graduado em Química Tecnológica, Universidade de Brasília, rafael.marques@colaborador.embrapa.br

⁶ Graduado em Engenharia Mecatrônica, Universidade de Brasília, gabriel.vigna@colaborador.embrapa.br

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

Materiais e métodos

Descrição da unidade de estudo

A propriedade está localizada na área rural do município de Luziânia, GO e se dedica principalmente à criação de bovinos leiteiros. Em julho de 2022, foi instalado um biodigestor como parte de um projeto desenvolvido pela Embrapa Agroenergia em parceria com a Cooperativa Mista da Agricultura Familiar do Meio Ambiente e da Cultura do Brasil (Coopindaiá). A propriedade possui cerca de 20 cabeças de bovinos leiteiros, mantidos em regime de confinamento apenas durante a ordenha. A planta de biogás inclui uma área de armazenamento de dejetos, o biodigestor com um volume total de 4 m³, um tanque para armazenar do digestato, um reservatório de biogás e uma linha de transmissão para levar o biogás até a residência do produtor.

O biodigestor foi dimensionado para tratar 12,5 kg de dejetos brutos por dia, contendo até 10% de sólidos totais, sem sistema de aquecimento e agitação. Para medir o volume de biogás produzido, utilizou-se um manômetro de gás, que registra o consumo de biogás por hora, especialmente quando o produtor utiliza o biogás para cocção de alimentos.

Caracterização físico-química do dejetos e monitoramento do biodigestor

A caracterização físico-química do dejetos foi realizada com as amostras coletadas do ponto de entrada (área de armazenamento do dejetos) e as análises de monitoramento do biodigestor foram realizadas com as amostras do ponto de saída (tanque de armazenamento do digestato). O período de coleta das amostras estendeu-se entre agosto de 2022 até julho de 2023, com exceção do intervalo entre os meses de novembro de 2022 até janeiro de 2023, em que o biodigestor estava em manutenção, totalizando oito amostragens. Para isso, foi analisado o teor de sólidos totais (ST), sólidos voláteis (SV) e pH, conforme APHA (2005), além da alcalinidade total (AT) (Ripley et al., 1986) e nitrogênio total Kjeldahl (NTK) (Association of Official Analytical Chemists, 1990), respectivamente. Para estimar a quantidade de carbono orgânico total (COT), foi dividido o teor de SV em base seca pelo fator 1,8, conforme sugerido por Kiehl (2010). A relação carbono:nitrogênio (C:N) foi obtida utilizando-se o valor de COT e teor de NTK. A composição do biogás foi obtida pelo método de cromatografia gasosa para determinar a concentração de metano (CH₄) e dióxido de carbono (CO₂).

Resultados e discussão

Caracterização físico-química do substrato (ponto de entrada)

O teor de sólidos totais (ST) variou de 0,6% a 6,0%, permanecendo dentro do limite adequado para biodigestores domésticos (abaixo de 10%) (Tabela 1). O teor de ST da amostra 5 foi menor (0,6%) enquanto o teor de ST da amostra 2 foi maior (6,0%). Essa diferença, possivelmente, está relacionada ao manuseio do dejetos e à interferência da água da chuva no período de coleta.

Tabela 1. Caracterização físico-química do substrato (ponto de entrada).

Amostra	ST (%)	SV (%bs)	pH	NTK (%ST)	COT (%ST)	C:N
1	5,1±0,9	88,1±1,0	5,3±0,03	1,8±0,2	49,0±0,6	27,7
2	6,0±0,2	86,6±0,2	6,4±0,01	1,4±0,1	48,1±0,1	35,8
3	4,1±0,1	85,7±0,1	6,7±0,02	1,6±0,0	47,6±0,1	29,7
4	1,4±0,2	68,8±1,4	6,5±0,01	1,7±0,3	38,2±0,8	22,2
5	0,6±0,0	76,6±0,4	7,1±0,03	1,4±0,1	42,6±0,2	31,5
6	2,4±0,3	81,5±0,9	6,7±0,01	2,3±0,0	45,3±0,5	19,6
7	4,3±0,1	85,9±0,2	5,8±0,02	1,3±0,1	47,7±0,1	36,7
8	2,6±0,1	85,7±0,1	5,9±0,01	3,1±0,2	47,6±0,1	15,4

ST: sólidos totais; SV: sólidos voláteis; bs: base seca; NTK: nitrogênio total Kjeldahl, COT: carbono orgânico total; C:N: relação carbono:nitrogênio.

Quanto ao teor de sólidos voláteis (SVbs), a maioria das amostras apresentou valores acima de 75%, exceto pela amostra 4, que resultou em 68,8% (Tabela 1). A manutenção do biodigestor antes das amostragens levou ao acúmulo de dejetos na área de armazenamento, causando a perda de SV para o ambiente. Após o período de manutenção, observou-se um aumento gradual do teor de SV nas amostras 5 a 8, chegando próximo de 85%. Esse valor está próximo ao encontrado na literatura (80%) e representa a matéria orgânica volátil disponível no substrato para conversão em biogás (ONUDI, 2021). O pH manteve-se entre 5,3 e 7,1, com o maior valor registrado para a amostra 5 (7,1) e o menor valor para a amostra 1 (5,3) (Tabela 1). Essa variação também está relacionada ao manejo do dejetos e às condições climáticas, uma vez que o tanque de armazenamento estava a céu aberto. Valores de pH entre 6,7 e 7,5 são desejados para o bom funcionamento do processo de digestão anaeróbia, por causa da limitação da atividade metanogênica em meio ácido (Kunz et al., 2019).

Quanto ao teor de NTK, observou-se menor valor para a amostra 7 (1,3%) e maior valor para a amostra 8 (3,1%) (Tabela 1), sendo essa variação associada ao teor de proteína bruta contida na alimentação dos animais. O nitrogênio faz parte da estrutura molecular das proteínas (ligações peptídicas), e pode variar de acordo com o tipo de ração, pastagem ou silagem adicionada à alimentação do animal (Salman et al., 2011). Logo, o teor de nitrogênio deve ser monitorado na digestão anaeróbia, pois, quando convertido em amônia (NH_3), pode inibir as metanogênicas em concentração acima de 80 mg/L (Organização das Nações Unidas para o Desenvolvimento Industrial, 2021).

Por outro lado, o teor de COT da amostra de entrada foi superior a 40% ao longo do estudo, exceto pela amostra 4, que resultou em 38,6% (Tabela 1). Essa diferença é atribuída ao baixo valor de SVbs (68,8%), pois o cálculo do teor de COT é obtido pela divisão do valor de SV pelo fator 1,8. Logo, nota-se que o valor de COT da amostra 1 é maior quando comparado com as demais (49,0%), mas quando relacionada ao teor de NTK (relação C:N) obteve uma relação C:N de 28:1. Contudo, os valores da relação C:N obtidos no estudo estão dentro do recomendado pela literatura (15 - 35:1) (Kunz et al., 2019), indicando que o processo possui carbono como fonte de energia para o desenvolvimento do metabolismo celular e nitrogênio como componente para a reprodução dos microrganismos.

Monitoramento dos parâmetros físico-químicos do biodigestor (ponto de saída)

A análise dos parâmetros de monitoramento do biodigestor resultou em valores de ST próximos a 1,4%, exceto para a amostra 6, que foi de 3,1% (Tabela 2). Essa variação está associada ao acúmulo de sólidos no encanamento que conecta o biodigestor ao tanque de armazenamento do digestato, o que interferiu nesta amostra em particular. Contudo, observou-se redução do teor de ST em relação às amostras do ponto de entrada, como esperado em sistemas de biodigestão, onde parte do substrato é convertido em biogás enquanto outra parte dos sólidos é decantada no fundo do biodigestor.

Tabela 2. Parâmetros de monitoramento do biodigestor (ponto de saída).

Amostra	ST (%)	SV (%bs)	pH	AT (mg CaCO_3 /L)	CH4 (%)
1	1,1±0,0	73,5±0,7	7,2±0,01	1.181±57,2	46,5±0,5
2	1,4±0,0	76,1±0,9	6,9±0,03	1.705±134,4	49,9±1,7
3	1,3±0,0	75,7±0,1	6,9±0,01	1.748±80,1	Nd
4	0,6±0,0	63,4±0,7	7,3±0,02	846±17,7	57,8±0,8
5	0,5±0,0	72,5±1,1	7,0±0,05	747±3,9	60,4±0,8
6	0,8±0,2	65,6±0,4	7,6±0,03	833±19,3	62,5±1,6
7	0,8±0,0	68,7±0,3	6,9±0,01	746±17,8	50,2±1,3
8	3,1±0,1	79,3±0,5	7,3±0,07	942±11,8	50,5±1,6

ST: sólidos totais; SV: sólidos voláteis; bs: base seca; AT: alcalinidade total; mg CaCO_3 /L: miligrama de carbonato de cálcio por litro; CH4: teor de metano no biogás.

Quanto ao teor de SVbs, também foi observada redução dos valores em relação às amostras do ponto de entrada, chegando a atingir 63,4% de SV (amostra 4) (Tabela 2). Essa diminuição do teor de SV do substrato após o processo de digestão anaeróbia é um fator positivo, indicando a conversão da matéria orgânica volátil em biogás (Organização das Nações Unidas para o Desenvolvimento Industrial, 2021). Ao se calcular a remoção de SV comparando com as amostras do ponto de entrada, notou-se que as amostras 6 e 7 apresentaram maiores valores de remoção, sendo 19,5% e 20,0%, respectivamente. Isso sugere um aumento na eficiência do processo de digestão nessas datas específicas, porém é essencial otimizar a operação do biodigestor para alcançar uma taxa de remoção ainda maior.

Por outro lado, os valores de pH aumentaram quando comparados com os valores da amostra do ponto de entrada, chegando a 7,6 para a amostra 6 (Tabela 2). Esse comportamento também é desejado na digestão anaeróbia, uma vez que as metanogênicas atuam em uma faixa de pH de 6,7 a 7,5 (Kunz et al., 2019). Em relação aos valores de AT, foi observado que apenas as amostras 2 e 3 ficaram dentro do limite indicado pela literatura (1.500 mg/L–5.000 mg/L) (Organização das Nações Unidas para o Desenvolvimento Industrial, 2021), sendo de 1.705 mg/CaCO₃/L e 1.748 mg/CaCO₃/L, respectivamente (Tabela 2). A alcalinidade atua como agente tampão dentro do biodigestor e garante a sinergia entre os microrganismos metanogênicos e as bactérias da etapa de hidrólise e acidogênese. Logo, o biodigestor do presente estudo requer maior atenção quanto ao parâmetro de AT, mesmo que o teor de metano esteja na faixa de 60% para algumas amostras, como o caso da amostra 6, que apresentou teor de metano (62,5%) e valor de AT igual a 833 mg/L.

Uso do biogás para cocção de alimentos na propriedade

O biodigestor operou efetivamente por três meses, sendo consumido pelo produtor cerca de 28,5 m³ de biogás por mês. Segundo Silva (2019), um botijão de gás (GLP, P13) equivale a 28,5 m³ biogás e o custo médio de um botijão no estado de Goiás é R\$ 120,00. Logo, estima-se que o produtor economizou, aproximadamente, um botijão de GLP por mês, o que resultaria em uma receita de R\$ 120,00/mês. Portanto, nota-se que a digestão anaeróbia pode ser considerada como alternativa para a substituição do gás de cozinha pelo biogás, desde que os parâmetros operacionais do biodigestor estejam estáveis e o teor de metano no biogás seja de, no mínimo, 50%.

Conclusão

A produção de biogás a partir dos dejetos da bovinocultura leiteira é uma estratégia viável e promissora para o manejo sustentável dos resíduos e para a redução dos custos na propriedade rural. No estudo, verificou-se que a substituição do gás de cozinha pelo biogás para cocção de alimentos reduziu os gastos com um botijão de gás por mês (durante três meses) e gerou uma receita mensal de aproximadamente R\$ 120,00. No entanto, é fundamental monitorar os parâmetros físico-químicos do processo de digestão anaeróbia, uma vez que qualquer alteração no manejo dos resíduos ou interferência externa pode afetar a qualidade do biogás e ter impactos negativos no sistema.

Referências bibliográficas

AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. **Standard methods for the examination of water and wastewater**. Washington, 2005.

ANUÁRIO leite 2023: Leite de baixo carbono. Juiz de Fora: Embrapa Gado de Leite, 2023.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis**. 11th ed. Washington, D.C., 1990.

EMPRESA DE PESQUISA ENERGÉTICA. **Nota Técnica 013/2020**: recursos energéticos distribuídos: potencial técnico de metano da pecuária bovina. Brasília-DF, 2020.

KIEHL, E. J. **Novos fertilizantes orgânicos**. Piracicaba: Degaspari, 2010.

KUNZ, A.; STEINMETZ, R. L. R.; AMARAL, A. C. do (Ed.). **Fundamentos da digestão anaeróbia, purificação do biogás, uso e tratamento do digestato**. Concórdia, Sbera: Embrapa Suínos e Aves, 2019.

ORGANIZAÇÃO DAS NAÇÕES UNIDAS PARA O DESENVOLVIMENTO INDUSTRIAL. **Operação e monitoramento de reatores anaeróbios**: guia de boas práticas. Brasília-DF, Ministério da Tecnologia Ciência e Inovação, 2021.

RIPLEY, L. E.; BOYLE, W. C.; CONVERSE, J. C. Improved alkalimetric monitoring for anaerobic digestion of high-strength wastes. **Journal of Water Pollution Control Federation**, v. 58, n. 5, p. 406-411, 1986.

SALMAN, A. K. D.; OSMARI, E. K.; SANTOS, M. G. R. dos. **Manual prático para formulação de ração de vacas leiteiras**. Porto Velho, RO: Embrapa Rondônia, 2011. (Embrapa Rondônia. Documentos, 145).

SILVA, I. M. **Estudo da viabilidade da implantação de um biodigestor sertanejo no assentamento trangola em currais novos (RN)**. 2019. Monografia (Graduação Engenharia Química) - Universidade Federal do Rio Grande do Norte.

Produção de celulases por *Trichoderma harzianum* a partir de distintas fontes de celulose

Fernando Kahrin Cardoso da Costa¹, Dasciana de Sousa Rodrigues², Thaís Demarchi Mendes³, Rossano Gambetta⁴

Resumo

A biomassa da cana-de-açúcar foi utilizada para a produção de celulases por *Trichoderma harzianum* como estratégia para reduzir os custos do processo, bem como diminuir a incidência das alterações climáticas ocorridas pelo uso de combustíveis fósseis. O fungo foi cultivado em meio Mandels modificado contendo Avicel (AVI), biomassa de cana-de-açúcar pré-tratada por organosolv modificado (Bio-OS), biomassa pré-tratada por auto-hidrólise (Bio-AH) e biomassa não tratada (Bio-NT). As atividades FPase, CMCase, Celobiase e Avicelase foram avaliadas em microplacas de 96 poços. Os resultados mostraram que o substrato melhor indutor para a produção de celulases foi Avicel, com 0,28 FPU/mL. Entretanto, a Bio-OS apresentou atividade de 0,2 FPU/mL, resultado próximo ao obtido por Avicel. Utilizar Bio-OS como indutor da produção de enzimas pode ser uma estratégia interessante para reduzir os custos de produção.

Termos para indexação: atividades enzimáticas, pré-tratamento, bagaço de cana-de-açúcar.

Introdução

O uso de combustíveis fósseis é um dos principais contribuintes para o acúmulo de gases na atmosfera e para as consequentes alterações climáticas. Esse problema tem incentivado a comunidade científica a buscar fontes alternativas com o objetivo de minimizar os efeitos nocivos ao meio ambiente (Gelain, et al., 2015). A produção de biocombustíveis a partir da biomassa residual do processo de bioetanol apresenta vantagem econômica por causa da geração significativa de bagaço de cana-de-açúcar (material lignocelulósico) no processo (Robak; Balcerek, 2018). O material lignocelulósico é complexo e requer degradação para a produção de bioetanol de segunda geração, a partir de pré-tratamentos físicos, químicos ou biológicos, visando melhorar a digestibilidade enzimática da celulose e a liberação de açúcares (Tse et al., 2021). Entretanto, a conversão em larga escala ainda é desafiadora, pelo alto custo do processo e pela dependência de coquetéis de enzimas celulolíticas de alto valor comercial (Balan, 2014). Portanto, a produção de celulases a partir de biomassa lignocelulósica tem sido estudada para aprimorar a economia do processo de etanol de segunda geração (Libardi et al., 2017; Souza et al., 2018).

Enzimas celulolíticas industriais incluem endoglicanases, celobiohidrolases (exoglicanases) e β -glicosidases, predominantemente sintetizadas por fungos filamentosos (Delabona et al., 2016). *Trichoderma reesei* é amplamente usado como produtor de celulases. Por outro lado, estudos com *Trichoderma harzianum* revelaram sua capacidade de produzir um complexo celulolítico com alta atividade de β -glicosidases e endoglicanase em comparação ao *T. reesei* (Benoliel et al., 2013). Contudo, a produção das demais celulases é crucial para a conversão da celulose em glicose.

¹ Engenheiro de alimentos, doutor em Engenharia de Alimentos, Embrapa Agroenergia, fernando.costa@colaborador.embrapa.br

² Química industrial, doutora em Engenharia Química, Embrapa Agroenergia, dasciana.rodrigues@embrapa.br

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

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

A fonte de celulose desempenha papel importante na indução de enzimas. Estudos recentes destacaram que biomassas pré-tratadas têm potencial de indutor na secreção de enzimas com boa eficiência na etapa de hidrólise da biomassa (Liu et al., 2021; Novy et al., 2021; Xiang et al., 2021). Nesse contexto, este estudo teve como objetivo avaliar a produção de celulases por *T. harzianum* em fontes de celulose oriundas de biomassa de cana-de-açúcar pré-tratada pelos métodos organossolv modificado e auto-hidrólise, alternativamente à celulose pura, cujo alto valor comercial limita sua utilização industrial.

Materiais e métodos

Microrganismo e preparação do inóculo

A cepa de *Trichoderma harzianum* CFAM 422 (Coleção de Fungos da Amazônia) utilizada neste estudo foi cultivada em ágar extrato de malte 2% a 30 °C por 7 dias. Cinco discos de 5 mm da mesma região da placa de Petri foram utilizados para inocular frascos Erlenmeyer de 500 mL contendo 100 mL meio de cultivo.

Pré-tratamento da biomassa

A biomassa de cana-de-açúcar foi submetida aos pré-tratamentos por organossolv modificado e auto-hidrólise em um reator de alta pressão (Parr modelo 4555) com controle de agitação, temperatura e rotação. No método de organossolv modificado, 3 L de solvente (etanol: - 1:1 (v/v)) foram adicionados ao reator e 500 g de bagaço foram adicionados em um cesto perfurado para separar a biomassa do solvente. A reação ocorreu a 180 °C por 4 horas a 4 rpm. O processo de auto-hidrólise foi realizado a 192 °C por 38 minutos a 4 rpm, com proporção de bagaço:água de 1:10 (Nogueira et al., 2023). Após os pré-tratamentos, o bagaço foi lavado com água destilada, seco, triturado e empregado como fonte de carbono e indutor para a produção de enzimas celulolíticas.

Meio de cultivo e Produção de celulases

O cultivo foi realizado em meio Mandels e Weber (1969) modificado que consistia em (g/L): 2,0 de KH_2PO_4 ; 0,3 de CaCl_2 ; 0,3 de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,005 de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,02 de $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$; 0,0016 de $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$; 0,0014 de $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 5,0 de peptona; 12,143 de NaH_2PO_4 ; 3,218 de Na_2HPO_4 e 10 para as fontes de celulose: Avicel (AVI), biomassa pré-tratada por organossolv (Bio-OS), biomassa pré-tratada por auto-hidrólise (Bio-AH) ou biomassa não tratada (Bio-NT). A massa de Avicel foi ultra-homogeneizada a 20.000 rpm/120 min (IKA Ultraturrax T 25) com seis intervalos de 20 min. Os frascos foram incubados em agitador orbital a 30 °C por 7 dias sob agitação de 180 rpm (Souza et al., 2018). Amostras coletadas no 5º e no 7º dias foram centrifugadas a 14.000 rpm/10 min (Centrifuge 5418-Eppendorf), e o sobrenadante foi utilizado para os ensaios de atividades enzimáticas.

Ensaio de atividade das celulases

Os ensaios de atividade foram conduzidos em microplacas de 96 poços, seguindo o método descrito pela IUPAC (Ghose, 1987). Os ensaios de FPase, CMCase, Avicelase e β -Glicosidase foram realizados usando papel de filtro de 7 mm, CMC 2%, Avicel 5% e 15 mmol/L de Celobiose, respectivamente, como substratos. O extrato enzimático foi diluído em tampão citrato/ácido cítrico 0,1 mol/L em todos os ensaios (Tabela 1). As reações ocorreram em placas PCR, incubadas em termociclador (Applied Biosystems Veriti™ Thermal Cycler) a 50 °C/60 min para FPase e Avicelase, e a 50 °C/30 min para CMCase e β -glicosidase. Em seguida, foram adicionados 120 μL de DNS, seguindo nova incubação a 95 °C/10 min, exceto para o ensaio de β -glicosidase, no qual utilizou-se o reagente glicose Bioclin, cuja reação ocorreu a 37 °C/10 min. Após a reação, 10 μL de cada poço foram

transferidos para placa Elisa contendo 250 μL de glicose monorreagente e foi realizada a leitura a 505 nm (SpectraMax[®] 190 microplate reader). Após as reações com DNS, uma alíquota de 36 μL de cada poço foi transferida para placas Elisa de fundo chato contendo 160 μL de água deionizada para leitura da absorbância a 540 nm (SpectraMax[®] 190 microplate reader) para FPase e Avicelase. Para a leitura da atividade de CMCase, foram transferidos 100 μL de cada poço para placa Elisa contendo 100 μL de água deionizada. Uma curva padrão de glicose foi utilizada para calcular a glicose gerada nos ensaios. As atividades foram expressas conforme a Equação 1. Subtraiu-se a glicose gerada pela glicose obtida nos brancos.

$$UI = \frac{\mu\text{mol de glicose gerada}}{\text{min} \cdot \text{enzima (mL)}} \quad (1)$$

Tabela 1. Volumes para o preparo dos ensaios enzimáticos.

FPase				
	Zero espectro	Branco substrato	Branco enzima	Ensaio enzimático
Enzima (μL)			20	20
Tampão (μL)	60	60	40	40
Substrato		Disco de papel		Disco de papel
CMCase				
	Zero espectro	Branco substrato	Branco enzima	Ensaio enzimático
Enzima (μL)			20	20
Tampão (μL)	40	20	20	
CMC 2% (μL)		20		20
Celobiase				
	Zero espectro	Branco substrato	Branco enzima	Ensaio enzimático
Enzima (μL)			30	30
Tampão (μL)	60	30	30	
Celobiose (μL)		30		30
Avicelase				
	Zero espectro	Branco substrato	Branco enzima	Ensaio enzimático
Enzima (μL)			20	20
Tampão (μL)	60	20	40	
Avicel 4% (μL)		40		40

Resultados e discussão

Os dados das atividades estão expostos na Figura 1. O maior nível de FPase foi obtido com a produção de enzimas induzida por Avicel (0,28 FPU/mL). De acordo com a Anova, os níveis de FPase entre as biomassas diferem significativamente ($p < 0,05$) no 5^o e no 7^o dia de cultivo. Porém, de acordo com o teste-t ($p < 0,05$) não houve diferença significativa da atividade de FPase induzida por cada biomassa entre o 5^o e o 7^o dia, indicando que o cultivo pode ser encerrado no 5^o dia.

A máxima atividade de FPase observada foi de 0,28 UI/mL, utilizando Avicel como fonte de celulose. Essa atividade está abaixo do valor documentado por Souza et al. (2018), que apresentaram uma atividade de 1,63 UI/mL. No estudo de Delabona et al. (2016), os autores confirmaram alta atividade de β -glicosidase (26,1 UI/mL) quando o fungo foi cultivado em bagaço de cana

pré-tratado por explosão de vapor. No presente estudo, o maior nível de atividade da Celobiase (β -glicosidases) foi de 0,05 UI/mL utilizando Avicel como fonte de celulose. Para CMCase (endoglicanase) o melhor nível de atividade obtido foi 0,18 UI/mL, tanto no cultivo do fungo em Avicel (5º dia) quanto em Bio-NT (7º dia) (Figura 1). Os dados de atividades discordam do que foi relatado na literatura. Uma hipótese plausível para a baixa atividade observada neste estudo pode ser atribuída à esporulação do fungo após o 5º dia de cultivo. Isso indica o esgotamento de uma fonte específica de nutrientes no meio, resultando em um declínio na produção enzimática.

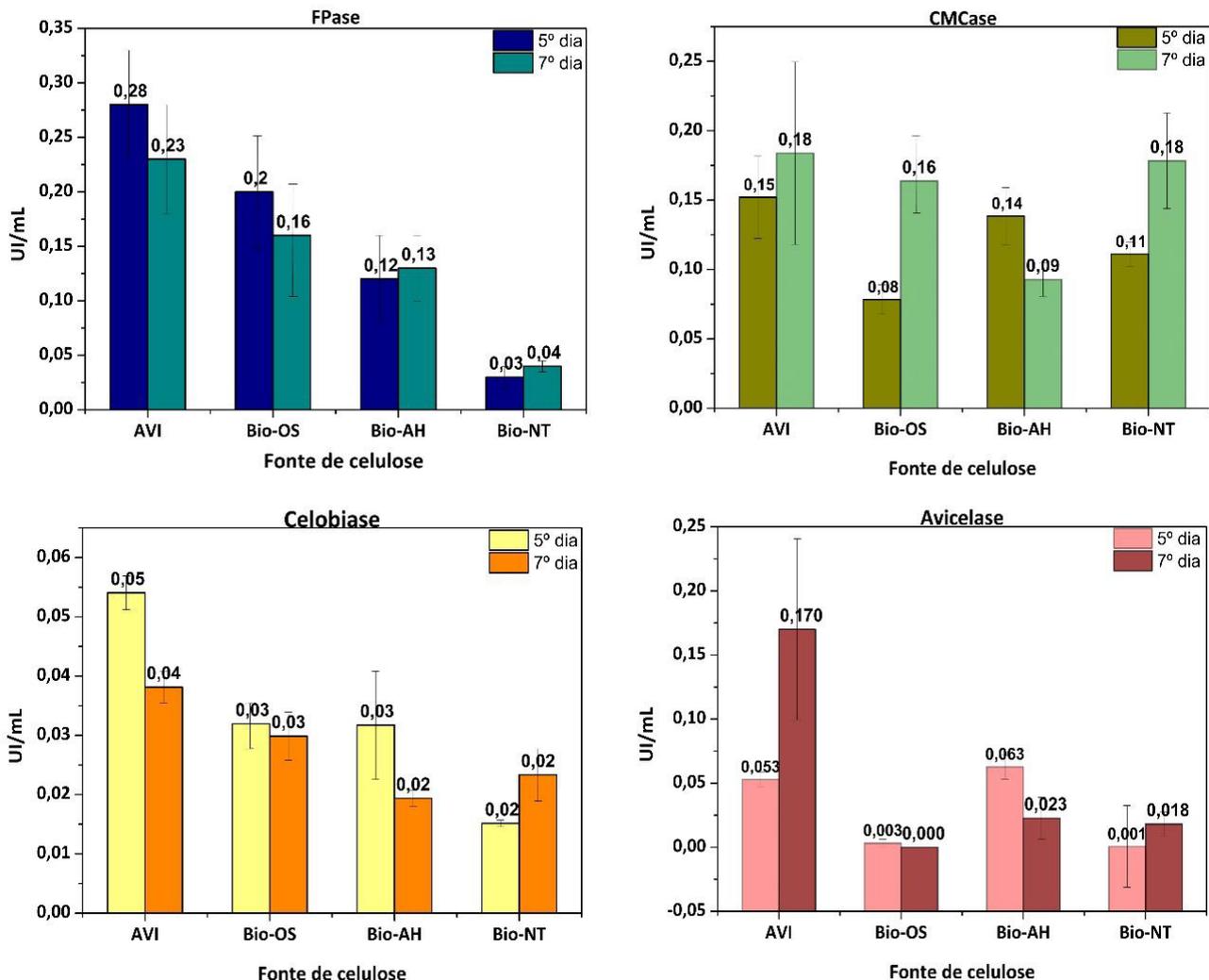


Figura 1. Atividades de celulases produzidas em meios de cultivo utilizando diferentes fontes de celulose no 5º e no 7º dias de cultivo.

Apesar da baixa atividade observada neste estudo, a síntese de celulases pelo fungo *T. harzianum*, estimulada pela aplicação de Bio-OS, desperta interesse. Esse interesse surge da observação de que a Bio-OS possui cerca de 70% de celulose em sua composição (Nogueira et al., 2023). A celulose desempenha o papel de indutor na produção de celulases, motivando a exploração da produção enzimática utilizando Bio-OS. No entanto, otimizar nutrientes do meio e concentração do inóculo é crucial, dada a proliferação fúngica intensa, sinal de limitação nutricional.

Conclusão

A cepa de *Trichoderma harzianum* CFAM 422 mostrou consumir bem os nutrientes do meio de cultivo, assim como a biomassa insolúvel indutora da produção de enzimas. Observou-se que o fungo foi capaz de produzir um coquetel enzimático de celulases necessárias para a despolimerização da celulose em glicose utilizando as diferentes fontes de celulose. A maior produção de celulases foi obtida no meio de cultivo contendo Avicel. No entanto, a biomassa pré-tratada por organossolv modificado pode ser considerada promissora para futuros estudos de produção de celulases com otimização das condições operacionais.

Referências bibliográficas

- BALAN, V. Current challenges in commercially producing biofuels from lignocellulosic biomass. **ISRN Biotechnology**, v. 2014, maio 2014.
- BENOLIEL, B.; TORRES, F. A. G.; DE MORAES, L. M. P. A novel promising *Trichoderma harzianum* strain for the production of a cellulolytic complex using sugarcane bagasse in natura. **SpringerPlus**, v. 2, n. 1, 2013.
- DELABONA, P. da S.; LIMA, D. J.; ROBL, D.; RABELO, S. C.; FARINAS, C. S.; PRADELLA, J. G. da C. Enhanced cellulase production by *Trichoderma harzianum* by cultivation on glycerol followed by induction on cellulosic substrates. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 43, n. 5, p. 617-626, 2016.
- GELAIN, L.; DA CRUZ PRADELLA, J. G.; DA COSTA, A. C. Mathematical modeling of enzyme production using *Trichoderma harzianum* P49P11 and sugarcane bagasse as carbon source. **Bioresource Technology**, v. 198, p. 101-107, 2015.
- GHOSE, T. K. Measurement of cellulase activities. **Pure and Applied Chemistry**, v. 59, n. 2, p. 257-268, 1987.
- LIBARDI, N.; SOCCOL, C. R.; GÓES-NETO, A.; OLIVEIRA, J. de; VANDENBERGHE, L. P. de S. Domestic wastewater as substrate for cellulase production by *Trichoderma harzianum*. **Process Biochemistry**, v. 57, p. 190-199, 2017.
- LIU, P.; LI, A.; WANG, Y.; CAI, Q.; YU, H.; LI, Y.; PENG, H.; LI, Q.; WANG, Y.; WEI, X.; ZHANG, R.; TU, Y.; XIA, T.; PENG, L. Distinct *Miscanthus lignocellulose* improves fungus secreting cellulases and xylanases for consistently enhanced biomass saccharification of diverse bioenergy crops. **Renewable Energy**, v. 174, p. 799-809, 2021.
- MANDELS, M.; WEBER, J. The production of cellulases. In: HAJNY, G. J.; REESE, E. T. **Cellulases and their applications**. [S.l.]: American Chemical Society, 1969. p. 391-414.
- NOGUEIRA, B. L.; SECCHI, A. R.; MACHADO, F.; RODRIGUES, C. V. S.; GAMBETTA, R.; RODRIGUES, D. S. Improvement of enzymatic saccharification by simultaneous pulping of sugarcane bagasse and washing of its cellulose fibers in a batch reactor. **Biotechnology Journal**, v. 18, n. 8, 2023.
- NOVY, V.; NIELSEN, F.; CULLEN, D.; SABAT, G.; HOUTMAN, C. J.; HUNT, C. G. The characteristics of insoluble softwood substrates affect fungal morphology, secretome composition, and hydrolytic efficiency of enzymes produced by *Trichoderma reesei*. **Biotechnology for Biofuels**, v. 14, n. 1, p. 105, 2021.
- ROBAK, K.; BALCEREK, M. Review of second-generation bioethanol production from residual biomass. **Food Technology and Biotechnology**, v. 56, n. 2, p. 174-187, 2018.
- SOUZA, M. F. de; SILVA, A. S. da; BON, E. P. S. A novel *Trichoderma harzianum* strain from the Amazon forest with high cellulolytic capacity. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 14, p. 183-188, 2018.
- TSE, T. J.; WIENS, D. J.; REANEY, M. J. T. Production of bioethanol: a review of factors affecting ethanol yield. **Fermentation**, v. 7, n. 4, 2021. 268.
- XIANG, J.; WANG, X.; SANG, T. Cellulase production from *Trichoderma reesei* RUT C30 induced by continuous feeding of steam-exploded *Miscanthus lutarioriparius*. **Industrial Crops and Products**, v. 160, 2021.

Produção de nanofibras de algodão: uso de hidrólise enzimática para a quebra da celulose

Caroline Cibir Ribeiro¹, Larissa Andreani², Felipe Brandão de Paiva Carvalho³, Simone Monteiro⁴, Leonardo Fonseca Valadares⁵

Resumo

A crescente conscientização em relação à sustentabilidade impulsiona a utilização do método bioquímico para a produção de nanoestruturas, o qual oferece a vantagem de operar em condições suaves. Este estudo tem como objetivo produzir nanofibras de celulose a partir de fibras de algodão via rota enzimática, sem processos químicos adicionais. Enzimas comerciais de *Trichoderma reesei* foram empregadas para obter microfibras e nanofibras de celulose em formato agulha. Após 96 horas de hidrólise, as nanofibras apresentaram dimensões médias de 289 nm de comprimento e 33 nm de espessura, com potencial Zeta de $-15,7 \pm 1,7$ mV e $-12,0 \pm 2,3$ mV em dispersões aquosas de 0,01 M KCl e 0,01 M KNO₃, respectivamente. A reação resultou em um rendimento de 7,5% de nanofibras isoladas.

Termos para indexação: nanopartículas, processamento coloidal, celulose de algodão, hidrólise enzimática, microscopia eletrônica de transmissão.

Introdução

O desenvolvimento de materiais biodegradáveis de alto desempenho tem atraído o interesse da comunidade científica como uma possibilidade para reduzir o uso de plásticos e mitigar o impacto ambiental. Neste contexto, a conversão da celulose em nanopartículas assume relevância para o desenvolvimento de novos compósitos, em áreas como saúde e alimentos (Jacob, 2022). Contudo, enfrenta-se o desafio de obter nanomateriais com viabilidade econômica e sustentabilidade ambiental. Para superar essa questão, a hidrólise enzimática surge como uma alternativa promissora, oferecendo maior seletividade por meio da ação da celulase, ao mesmo tempo em que reduz os custos de produção e minimiza os resíduos químicos prejudiciais.

Dentre as fontes naturais, incluindo resíduos agroindustriais e madeira, o algodão emerge como uma opção promissora para a obtenção de nanocelulose, em razão da sua ampla disponibilidade e do seu alto teor de celulose. Além disso, o algodão não requer etapas adicionais de remoção de hemicelulose e lignina, o que pode reduzir custos de operação (Jacob, 2022).

No entanto, a hidrólise enzimática do algodão ainda é um desafio, por causa da recalcitrância de sua celulose, o que resulta em um número limitado de estudos nessa área. Satyamurthy et al. (2011) obtiveram nanofibras de algodão por meio da hidrólise da celulose microcristalina usando o fungo *T. reesei*, embora as fibras de algodão tenham sido pré-tratadas com ácido clorídrico antes do ataque enzimático. Meyabadi e Dadashian (2012) realizaram hidrólise enzimática de resíduos de fibras de algodão para a produção de nanoesferas de celulose. Hiden et al. (2016) combinaram tratamento enzimático com fibrilação mecânica e obtiveram uma rede de nanofibrilas de algodão. Notavelmente,

¹ Engenheira química, mestranda em Engenharia Química, Universidade Federal de Goiás, caroline.ribeiro@colaborador.embrapa.br

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

³ Engenheiro de bioprocessos e biotecnologia, mestre em Tecnologias Químicas e Biológicas, analista da Embrapa Agroenergia, felipe.carvalho@embrapa.br

⁴ Engenheira de alimentos, doutora em Engenharia de Alimentos, professora da Universidade de Brasília, simonems@unb.br

⁵ Químico, doutor em Química, pesquisador da Embrapa Agroenergia, leonardo.valadares@embrapa.br

esses dois estudos não alcançaram a morfologia desejável de nanofibras em formato de agulha. Neste trabalho, apresentamos uma nova metodologia para a produção de nanofibras em formato de agulha a partir de algodão, utilizando a hidrólise enzimática, sem tratamentos químicos adicionais.

Materiais e métodos

O algodão empregado neste estudo é algodão hidrófilo, comercializado pela marca Farol. O acetato de sódio tribásico PA e o ácido cítrico anidro PA foram obtidos das marcas Êxodo científica e Dinâmica Química Contemporânea, respectivamente. O coquetel enzimático *Celluclast*[®] de *Trichoderma reesei* foi obtido da Sigma Aldrich.

Hidrólise enzimática

Os extrativos das fibras de algodão hidrofílicas comerciais foram removidos com extração acelerada por solvente (Thermo Scientific, Dionex ASE-350) usando uma solução de éter de petróleo e etanol (2:1) a 105 °C. Os processos enzimáticos foram realizados com uma carga enzimática de 30 FPU/g utilizando o coquetel enzimático *Celluclast*[®], com atividade inicial de FPase de 40,7 FPU/mL. Uma carga de substrato de 0,5% (m/v) foi embebida em um tampão de citrato de sódio/ácido cítrico (50 mM, pH 4,8), e a reação foi realizada a 50 °C, sob agitação constante a 200 rpm em *shaker*. As amostras foram retiradas do agitador nos tempos especificados e aquecidas a 95 °C por 45 minutos para desativar as enzimas.

Separação de celulose

As enzimas, a solução tampão e o açúcar foram removidos da dispersão coloidal de celulose por meio de centrifugação (Beckman Coulter, Optima-XE100) a 35.000 g por 20 minutos. O sobrenadante foi descartado, e o sedimento foi redisperso em água destilada. O processo foi repetido três vezes. As amostras foram sonicadas com um processador ultrassônico (Sonics & Materials, GEX500) por 30 minutos a 200 W.

As microfibras e nanofibras de celulose foram separadas por meio de uma série de etapas de centrifugação sequenciais. Inicialmente, a amostra foi submetida à centrifugação a 5.000 g por 15 minutos, onde o sobrenadante foi coletado. O sedimento foi redisperso em água destilada e submetido à centrifugação sob os mesmos parâmetros. Esse procedimento foi repetido três vezes. Posteriormente, todos os sobrenadantes coletados foram submetidos a uma etapa final de centrifugação a 16.000 g por 15 minutos. Isso resultou em três frações, denominadas F1 (material sedimentado a 5.000 g), F2 (material sedimentado a 16.000 g) e F3 (sobrenadante a 16.000 g). Por fim, todas as frações foram liofilizadas. Os rendimentos de microfibras e nanofibras foram determinados por gravimetria.

Caracterização das fibras

A morfologia das fibras de celulose do algodão foi analisada por Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) (Zeiss, SIGMA-HV) a 30 kV. Para as análises, uma gotícula de amostra obtida após 96 horas de hidrólise foi depositada sobre grade de microscopia recoberta (400 *mesh*) e armazenada em dessecador. Aproximadamente 150 medições das dimensões de fibras foram realizadas em cada fração, com base nas imagens de MET, usando o software *ImageJ*. O comportamento coloidal foi avaliado por meio de medidas de potencial Zeta (Brookhaven, ZetaPALS). As amostras liofilizadas foram redispersas em água destilada a 4% (m/v) e sonicadas por 10 minutos usando o processador ultrassônico. As suspensões foram diluídas em 1:100 (v/v) em cloreto de potássio 0,01 M (KCl) e nitrato de potássio 0,01 M (KNO₃).

Determinação de glicose

Para avaliar o progresso da hidrólise enzimática, que transforma as cadeias de celulose em fibras menores e glicose, o conteúdo de glicose no sobrenadante foi quantificado a 45 °C usando cromatografia líquida de alta eficiência. A análise foi conduzida em sistema HPLC Agilent (1260 Infinity) equipado com uma coluna Bio-Rad (Aminex HPX-87H) e um detector de índice de refração.

Resultados e discussão

Caracterização das fibras

A Figura 1 apresenta as imagens de microscopia eletrônica de transmissão das frações centrifugadas após a hidrólise enzimática do algodão. A Fração F1 contém microfibras com dimensões maiores que 3 μm , bem como nanofibras (Figura 1a, b), apresentando médias de comprimento de 652 ± 641 nm e espessura de 124 ± 168 nm. A Fração F2 apresentou uma redução na presença de microfibras (Figura 1c, d) em comparação com a F1, resultando em dimensões médias de 508 ± 240 nm de comprimento e 37 ± 23 nm de espessura. Por outro lado, a Fração F3, que consiste em partículas que não sedimentaram a 16.000 g, exibiu morfologia em formato de agulha, com dimensões de 377 ± 127 nm de comprimento e 29 ± 12 nm de espessura (Figura 1e, f).

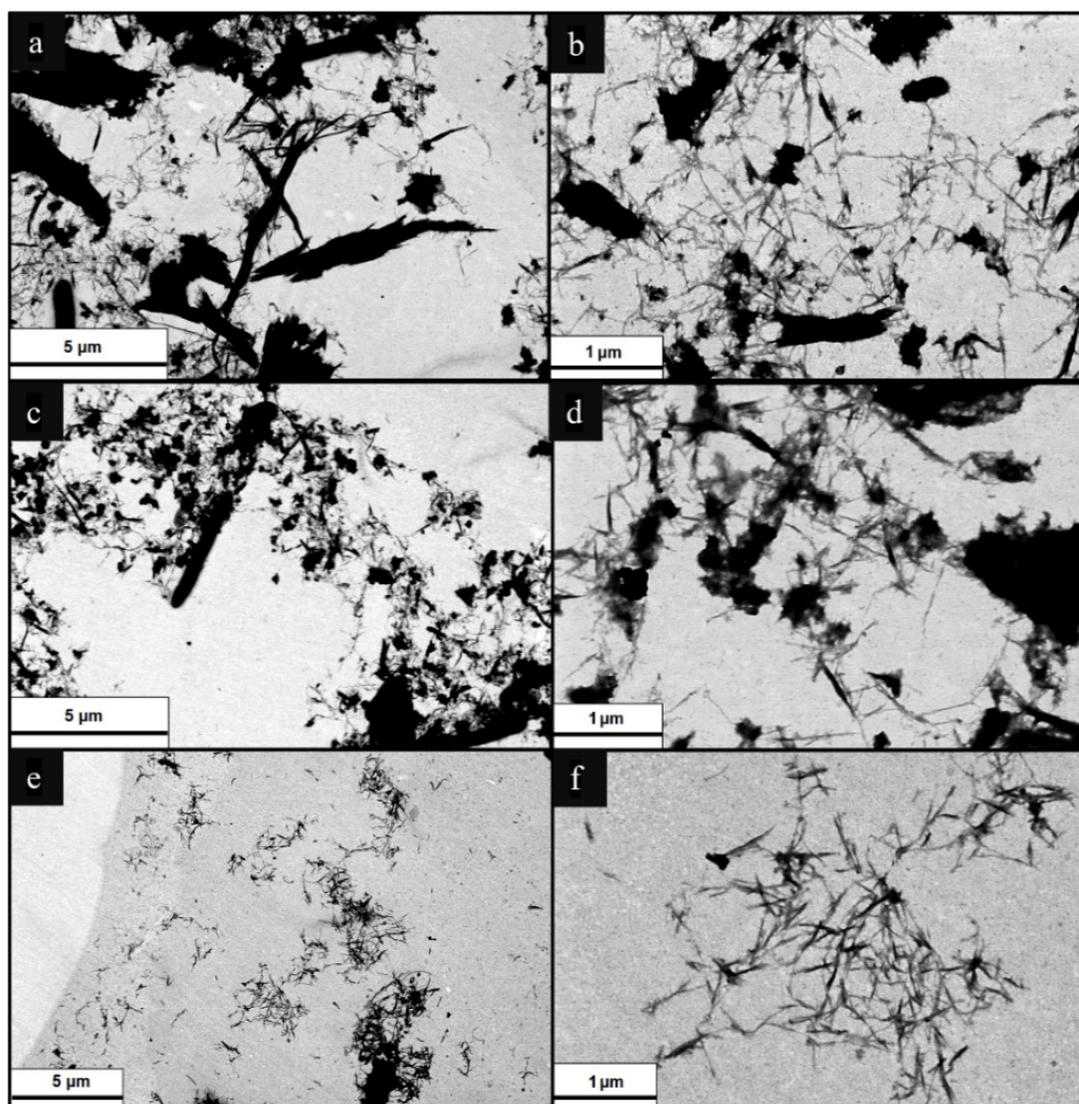


Figura 1. Imagens de microscopia eletrônica de transmissão (MET) das frações de celulose: (a, b) F1; (c, d) F2; (e, f) F3.

A fração F3 representa as nanofibras de celulose isoladas obtidas por hidrólise enzimática, caracterizadas por um comprimento médio de 377 nm e uma espessura de 29 nm. Essas dimensões são consistentes com resultados da literatura para nanofibras de celulose obtidas por um processo combinado de hidrólise enzimática e homogeneização de alta pressão, com comprimentos médios entre 100 nm e 250 nm e espessuras entre 5 nm e 10 nm (Zhai et al., 2021). Além disso, estudos anteriores relataram dimensões semelhantes para nanofibras obtidas por hidrólise com ácido clorídrico e posterior hidrólise com *T. reesei*, com dimensões médias de 120,3 nm de comprimento e 29,7 nm de espessura (Satyamurthy et al., 2011).

A presença de fibras nanométricas em todas as frações pode ser atribuída ao fenômeno conhecido como “arraste de partículas” durante a centrifugação, em que partículas maiores carregam partículas menores, incorporando as nanofibras no sedimento, mesmo com forças centrífugas relativamente baixas (Rickwood; Graham, 2015).

Rendimento

A Figura 2 avalia o progresso das reações de hidrólise, por meio do rendimento de microfibras e nanofibras e da produção de glicose.

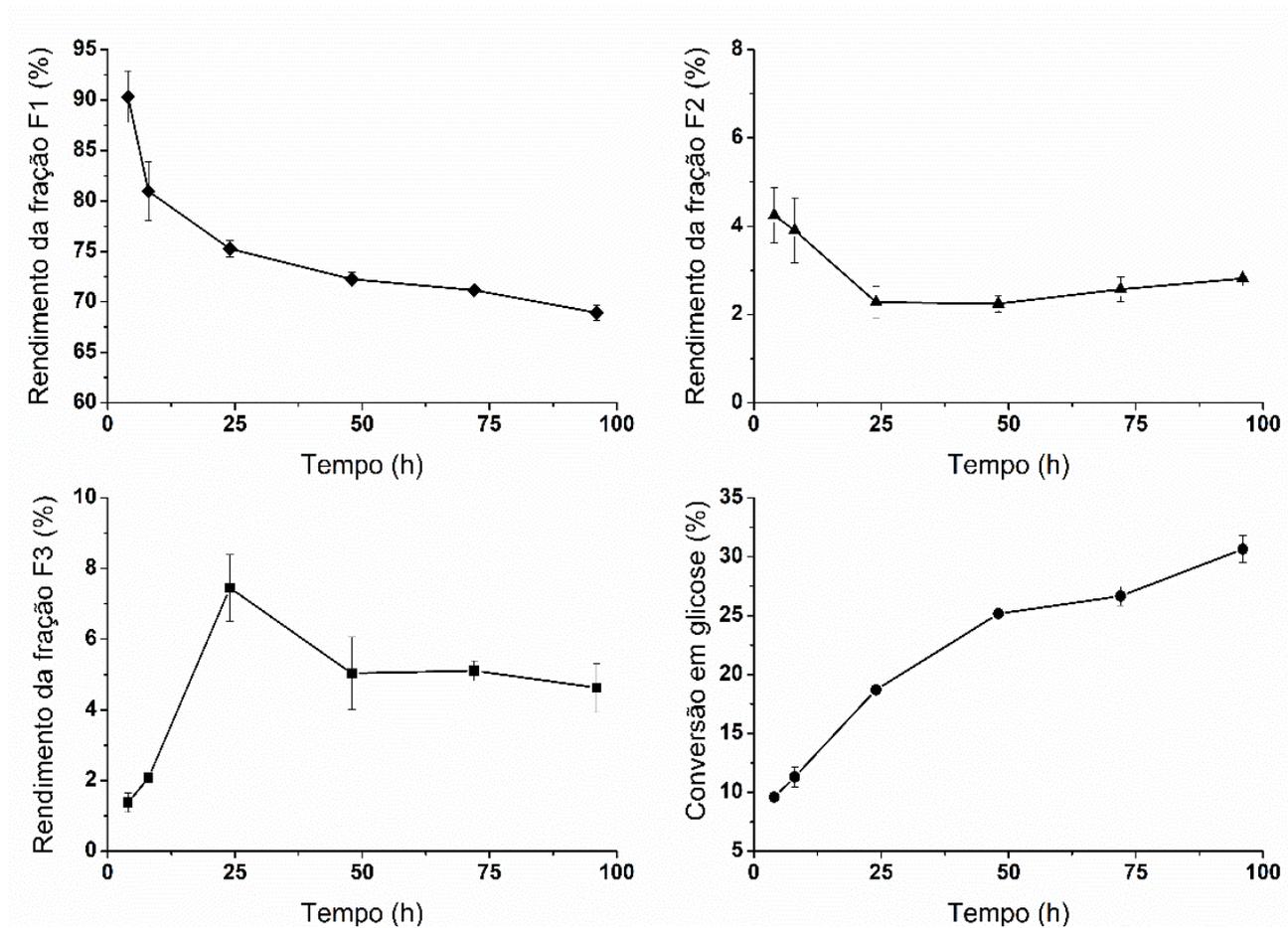


Figura 2. Rendimento das fibras das frações F1, F2, F3 e produção de glicose ao longo do tempo.

À medida que o tempo de hidrólise aumenta, observa-se uma diminuição na porcentagem das frações de microfibras (F1 e F2), indicando uma eficiente quebra enzimática das microfibras em componentes menores, incluindo nanofibras (F3) e glicose. O rendimento médio de nanofibras observado foi de aproximadamente 7,5% após 24 horas de hidrólise. Rendimentos mais altos durante esse período podem ser atribuídos à ação contínua e sinérgica das enzimas, seguida por subsequente redução do rendimento por causa da conversão das fibras em açúcares. É amplamente aceito que

períodos mais longos de hidrólise enzimática resultam em uma maior degradação das fibras em açúcares (Hideno et al., 2016).

Esses resultados oferecem informações valiosas sobre a hidrólise enzimática do algodão e seu potencial para a produção de nanofibras de celulose. No entanto, destacam a importância da otimização da reação para aumentar os rendimentos. Mais investigações são necessárias para ajustar os parâmetros da reação e alcançar rendimento de nanofibras de celulose.

Potencial Zeta

O comportamento coloidal foi avaliado pelo potencial Zeta (PZ), um parâmetro crítico para avaliar as tendências de agregação em diferentes meios e pHs (Kumar, 2021). As nanofibras de celulose apresentaram valores de $-15,7 \pm 1,7$ mV e $-12,0 \pm 2,3$ mV em dispersões aquosas de 0,01 M KCl e 0,01 M KNO_3 , respectivamente. Esses valores são consistentes com as cargas relatadas para materiais de celulose, que geralmente variam de -10 mV a -15 mV. Estudos anteriores relataram valores de PZ para hidrolisados de algodão tratados enzimaticamente de -14,63 mV em meio aquoso (Satyamurthy et al., 2011) e -15,87 mV em 0,001 M KCl (Buschle-Diller et al., 2005). Em comparação com as nanofibras hidrolisadas com ácido, geralmente caracterizadas por um PZ variando de -30 mV a -50 mV, por causa da sulfonação da celulose, as produzidas por hidrólise enzimática exibem menor estabilidade coloidal. No entanto, os resultados mostram coloides relativamente estáveis sem a adição de grupos funcionais na superfície das nanofibras, como observado durante a hidrólise ácida com H_2SO_4 (Kumar, 2021). Essa ausência de grupos funcionais adicionados apresenta potenciais vantagens para futuras aplicações.

Conclusão

Este estudo contribui para o avanço de materiais biodegradáveis, produzindo com sucesso microfibras e nanofibras em formato de agulha a partir de algodão por meio de hidrólise enzimática. O maior rendimento de nanofibras foi obtido após 24 horas de reação. As nanofibras produzidas são estáveis, com potencial Zeta negativo. Esses resultados sugerem que a hidrólise enzimática do algodão tem o potencial de produzir nanofibras de celulose em condições brandas sem uso de produtos químicos. Estudos adicionais são necessários para otimizar as condições de reação e explorar aplicações específicas.

Referências bibliográficas

- BUSCHLE-DILLER, G.; INGLESBY, M. K.; WU, Y. Physicochemical properties of chemically and enzymatically modified cellulosic surfaces. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, v. 260, n. 1-3, p. 63-70, 2005.
- HIDENO, A.; ABE, K.; UCHIMURA, H.; YANO, H. Preparation by combined enzymatic and mechanical treatment and characterization of nanofibrillated cotton fibers. *Cellulose*, v. 23, n. 6, p. 3639-3651, 2016.
- JACOB, P. J. S. Cotton based cellulose nanocomposites: synthesis and application. In: JACOB, P. J. S. *Cotton*. [S.l.]: IntechOpen, 2022.
- KUMAR, D. *Nanocellulose and its composites for water treatment applications*. Boca Raton: CRC Press, 2021.
- MEYABADI, T. F.; DADASHIAN, F. Optimization of enzymatic hydrolysis of waste cotton fibers for nanoparticles production using response surface methodology. *Fibers and Polymers*, v. 13, n. 3, p. 313-321, 2012.
- RICKWOOD, D.; GRAHAM, J. Centrifugation techniques. In: *ENCYCLOPEDIA of Life Sciences*. [S.l.]: John Wiley & Sons, 2015. p. 1-7.
- SATYAMURTHY, P.; JAIN, P.; BALASUBRAMANYA, R. H.; VIGNESHWARAN, N. Preparation and characterization of cellulose nanowhiskers from cotton fibers by controlled microbial hydrolysis. *Carbohydrate Polymers*, v. 83, n. 1, p. 122-129, 2011.
- ZHAI, X.; XIANG, Y.; TIAN, Y.; WANG, A.; LI, Z.; WANG, W.; HOU, H. Extraction and characterization of cellulose nanocrystals from cotton fiber by enzymatic hydrolysis-assisted high-pressure homogenization. *Journal of Vinyl and Additive Technology*, v. 27, n. 4, p. 781-794, 2021.

Seleção de bactéria produtora de ácido láctico por via fermentativa, utilizando diferentes fontes de carbono

Raissa Gabriela Martins Reis Barroso¹, Fabricio Machado², Mônica Caraméz Triches Damas³, Sílvia Belém Gonçalves⁴

Resumo

O ácido láctico é um ácido orgânico com aplicações em diversas indústrias e que é obtido por rota química ou biológica (fermentação). Dentre os diferentes microrganismos utilizados em fermentações, as bactérias lácticas apresentam vantagens, visto que naturalmente produzem o ácido láctico, são resistentes a pH ácido e a uma ampla faixa de temperaturas, além de muitas vezes produzirem o ácido láctico como metabólito principal. Neste trabalho, quatro cepas de bactérias (*Enterococcus durans*, *Lactococcus lactis*, *Pediococcus acidilactic* e *Weissella thailandensis*) isoladas de leite de búfalas foram submetidas a fermentações com diferentes fontes de carbono (lactose, sacarose, glicose). *E. durans* teve o melhor desempenho, exaurindo as fontes de carbono, produzindo 18,44 g/L de (L)-ácido láctico com pureza óptica com um rendimento de 0,92 g/g e produtividade de 0,29 g/L h⁻¹ a partir de glicose associada com sacarose ou lactose. O ácido láctico produzido tem potencial para ser recuperado do meio fermentativo e ser utilizado em diversas aplicações.

Termos para indexação: *Pediococcus acidilactici*, *Enterococcus durans*, *Weissella thailandensis* e *Lactococcus lactis*, fermentação, L-(+)-ácido láctico.

Introdução

O ácido láctico é um ácido carboxílico amplamente utilizado nas indústrias química, farmacêutica, de alimentos e de polímeros. Além disso, é um ácido orgânico com grupos funcionais que possibilita sua transformação química em novas moléculas para diversas aplicações (Ouyang et al., 2013).

Uma das principais aplicações do ácido láctico é na indústria de polímeros, uma vez que pode ser modificado quimicamente e ser empregado como unidade monomérica para a produção de derivados do poli (ácido láctico) (PLA). Além disso, como os plásticos derivados do petróleo têm gerado considerável acúmulo de resíduos no meio ambiente, demandando períodos longos para sua degradação, torna-se fundamental a produção de plásticos renováveis. (Esmaeili et al., 2017)

A fermentação é uma das principais formas de obtenção do ácido láctico. Diversas fontes de carbono, microrganismos e processos fermentativos são estudados visando à otimização da produção desse ácido. (Komesu et al., 2017) Açúcares como lactose, glicose e sacarose são amplamente utilizados nos processos fermentativos, uma vez que podem ser fermentados diretamente a ácido láctico. (Li; Cui, 2010) No mercado global atual, o ácido láctico é proveniente da cana-de-açúcar e do milho. O baixo custo e a abundância desses insumos viabilizam sua utilização na produção. (Jamshidian et al., 2010) Durante o processo fermentativo, as bactérias são capazes de produzir os isômeros dextrogiro ou levogiro. As enzimas L(+) ou D(-) lactato desidrogenase (nLDH), presentes nas células bacterianas, são as responsáveis pela produção dos enantiômeros. (Hofvendahl; Hahn-Hägerdal, 2000)

¹ Química industrial, doutoranda em Química, Universidade de Brasília, raissa.barroso@colaborador.embrapa.br.

² Engenheiro químico, doutor em Engenharia Química, Universidade de Brasília, fmachado@unb.br

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

⁴ Engenheira química, doutora em Engenharia Química, Embrapa Agroenergia, silvia.belem@embrapa.br

As bactérias lácticas são bactérias gram-positivas que usam carboidratos como principal fonte de carbono (George et al., 2018). Tais microrganismos são geralmente cocos ou bastonetes e têm forte tolerância a pH ácido. Os gêneros mais utilizados em fermentações são *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Enterococcus* e *Weissella*. (Mokoena, 2017) Tais bactérias também são capazes de produzir acetato, propionato, formato e succinato. (Kuley et al., 2020)

Neste trabalho, quatro cepas (*Pediococcus acidilactici*; *Enterococcus durans*; *Weissella thailandensis* e *Lactococcus lactis*) foram estudadas com a finalidade de avaliar a produção de ácido láctico, explorando diferentes fontes de carbono e parâmetros de fermentação, possibilitando a otimização da formação do produto de interesse.

Materiais e métodos

Pré-inóculo – por causa da estocagem em ultrafreezer a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, primeiramente, os microrganismos foram submetidos a uma fase de adaptação no mesmo meio utilizado no processo de bioconversão. Essa primeira etapa foi realizada em meio MRS ágar, em estufa, por 48 horas a $30\text{ }^{\circ}\text{C}$. O pré-inóculo foi cultivado em Erlenmeyers de 125 mL contendo 50 mL do meio MRS autoclavado. Os frascos foram então incubados em shaker a 180 rpm e $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 72 horas.

Fermentação – a concentração do inóculo usado foi de aproximadamente 1,5 (OD_{600nm}) e foi realizado para as três fontes de carbono em tubos tipo Falcon de 50 mL contendo 30 mL de meio MRS modificado com 20 g/L de sacarose ou lactose (fontes para produção de ácido láctico) e 10 g/L de glicose (fonte preferencial para crescimento celular). De 24 horas em 24 horas, amostras foram retiradas para análises quantitativas de ácido láctico e da fonte de carbono e da densidade óptica (OD_{600nm}) para verificar o crescimento celular.

Análises – as alíquotas coletadas durante as fermentações foram analisadas em HPLC. As amostras foram injetadas em coluna Aminex HPX-87H a $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ com fase móvel de 0,005 mol/L H₂SO₄ a 0,6 mL/min. de vazão. As quantificações foram realizadas com detector de índice de refração, de acordo com a curva-padrão para cada analito. Para a identificação do enantiômero do ácido láctico produzido, o detector de arranjo de diodo DAD (254 nm) e a coluna Chirex 3126 (D)-Penicillamine foram utilizados. A fase móvel foi CuSO₄ 0,001 mol/L com vazão de 1 mL/min. a $30\text{ }^{\circ}\text{C}$. (López-Gómez et al., 2020)

Resultados e discussão

Avaliação da produção de ácido láctico e consumo de substrato por *P. acidilactici*

Os experimentos foram conduzidos por 96 horas. Ao final desse tempo, a bactéria *P. acidilactici* exauriu a glicose para ambos os ensaios, e a melhor condição para a *P. acidilactici* foi a fermentação com sacarose. A Figura 1 mostra a produção de ácido láctico e o consumo de cada fonte.

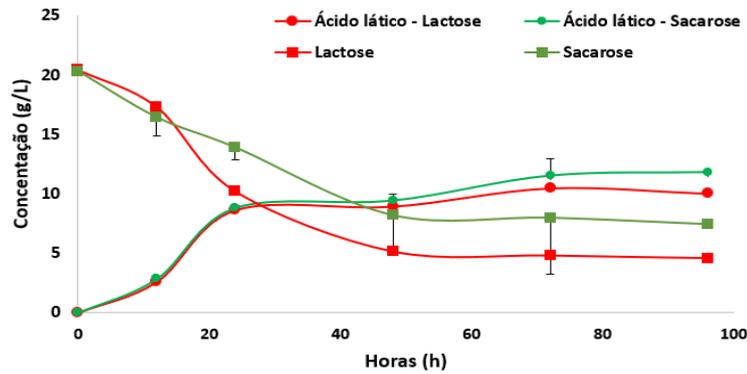


Figura 1. Fermentação com *P. acidilactici* utilizando glicose e sacarose ou lactose como fontes de carbono para produção de ácido láctico e crescimento celular.

A bioconversão das fontes de carbono avaliadas apresentou valores absolutos de produção menores (Tabela 1) do que os relatados por Juodeikiene e colaboradores (2016), que avaliaram a bioconversão de subprodutos agroindustriais sólidos em ácido láctico usando a cepa *P. acidilactici* KTU05-7 e obtiveram 20,18 g/kg de ácido láctico em 48 horas de fermentação. Porém, o resultado do experimento com sacarose e glicose aqui apresentado alcançou rendimento maior (0,94 g/g) do que aquele relatado por Zhang et al. (2021), que utilizaram a *P. acidilactici* para produzir ácido láctico, alcançando 31,9 g/L, com rendimento de 0,742 g/g com glicose e xilose.

Avaliação da produção de ácido láctico e consumo de substrato por *W. thailandensis*

A melhor condição de fermentação para a *W. thailandensis* foi a fermentação com glicose e sacarose como fontes de carbono. A bactéria exauriu a glicose nas primeiras 24 horas de experimento para ambas as fontes. A Figura 2 apresenta os resultados de consumo das fontes de carbono correlacionadas com a produção de ácido láctico, e a Tabela 2 mostra os resultados dos parâmetros de produção, rendimento e produtividade obtidos para as diferentes fontes de carbono.

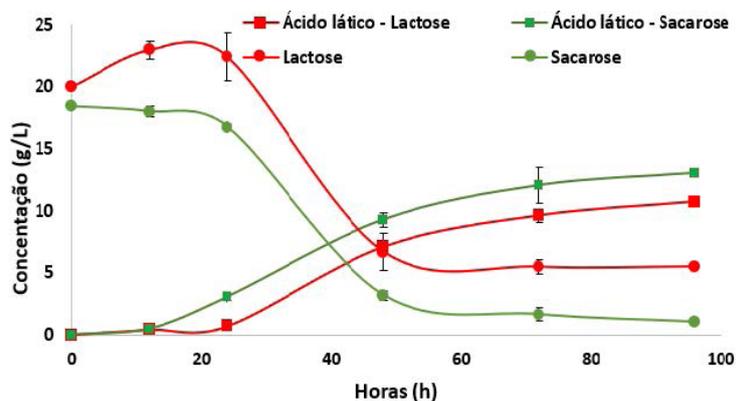


Figura 2. Fermentação com *W. thailandensis* utilizando glicose e sacarose ou lactose como fontes de carbono para produção de ácido láctico e crescimento celular.

Nagarajan et al. (2022) relataram que, por meio de fermentações em batelada, utilizando glicose a 40 g/L no meio com algas marinhas hidrolisadas, produziram 17,48 g/L de ácido láctico com *Weissella* sp. e 20 g/L de ácido láctico com *W. paramesenteroides*, consumindo 88% da glicose, com rendimento de 0,68 g/g. *W. thailandensis* foi capaz de produzir ácido láctico com rendimento maior (Tabela 1) que o obtido em fermentações com glicose realizadas por Nagarajan et al. (2022). Além disso, a bactéria exauriu a glicose e consumiu 94,75% da sacarose (Figura 2). Os resultados indicam que a associação desses dois açúcares é uma alternativa eficiente para aumentar a bioconversão ao produto de interesse.

Avaliação da produção de ácido láctico e consumo de substrato por *L. lactis*

A melhor condição para produção de ácido láctico por *L. lactis* foi a fermentação com sacarose e glicose como fontes de carbono. Em todos os experimentos, houve esgotamento da glicose antes de 12 horas de fermentação. A Tabela 1 mostra os parâmetros da produção de ácido láctico, os valores de rendimento e a produtividade para cada fonte.

Tabela 1. Produção de ácido láctico, rendimento e produtividade para as bactérias *P. acidilactici*, *W. thailandensis*, *L. lactis* e *E. durans* em 96 horas de fermentação em tubos.

Microrganismo	Fonte de carbono	Ácido láctico (g/L)	Rendimento (g/g)	Produtividade (g/L×h)
<i>P. acidilactici</i>	Lactose e glicose	10,03 ± 0,66	0,30	0,37
	Sacarose e glicose	11,81 ± 0,11	0,94	0,37
<i>W. thailandensis</i>	Lactose e glicose	10,74 ± 0,28	0,74	0,14
	Sacarose e glicose	13,05 ± 0,57	0,75	0,19
<i>L. lactis</i>	Lactose e glicose	10,58 ± 2,09	0,41	0,33
	Sacarose e glicose	12,57 ± 2,34	0,44	0,44
<i>E. durans</i>	Lactose e glicose	18,44 ± 0,62	0,92	0,29
	Sacarose e glicose	11,55 ± 0,72	0,91	0,18

A Figura 3 indica os perfis de consumo de substrato e a produção de ácido láctico por *L. lactis*.

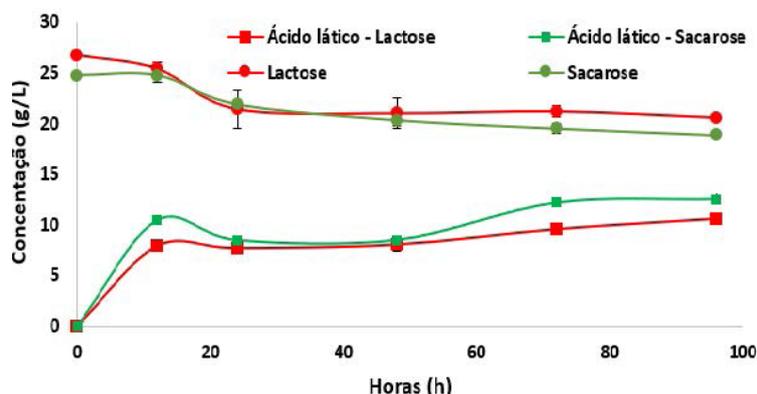


Figura 3. Fermentação com *L. lactis* utilizando glicose e sacarose ou lactose como fontes de carbono para produção de ácido láctico e crescimento celular.

Pelo gráfico obtido, percebe-se que o consumo das fontes suplementares foi pouco expressivo. Mesmo com 96 horas de experimento, a bactéria não metabolizou as fontes suplementares.

Cock e Stouvenel (2006) obtiveram uma produção de ácido láctico de 13,7 g/L utilizando 60 g/L de glicose sem controle de pH. Resultados próximos foram alcançados neste experimento, utilizando menos substrato. Souza et al. (2017) também utilizaram a bactéria *L. lactis* e obtiveram concentrações de ácido láctico semelhantes às apresentadas neste trabalho. Aproximadamente 13 g/L de ácido láctico foram produzidas, utilizando-se 20 g/L de glicose como fonte de carbono em 24 horas de fermentação em biorreator sem o controle de pH, não sendo capaz de exaurir a glicose.

Avaliação da produção de ácido láctico e consumo de substrato por *E. durans*

A melhor condição para *E. durans* foi a fermentação com lactose e glicose como fontes de carbono. A Tabela 1 mostra os parâmetros de produção de ácido láctico, os valores de rendimento, a concentração final e a produtividade para cada conjunto de fontes de carbono.

A Figura 4 mostra os perfis de consumo de ácido láctico e o consumo de substrato. A melhor condição para a *E. durans* foi com lactose como fonte de carbono suplementar, sendo capaz de exaurir os açúcares antes de 96 horas de fermentação.

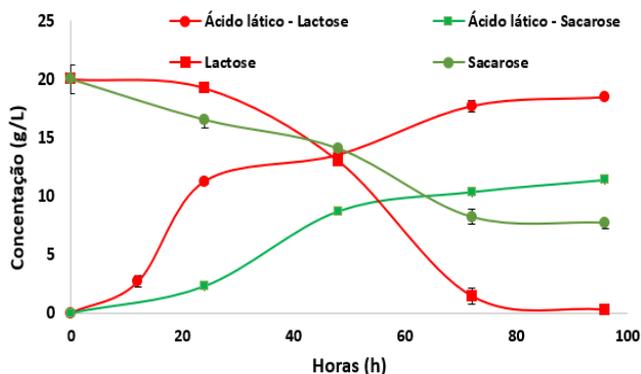


Figura 4. Fermentação com *L. lactis* utilizando glicose e sacarose ou lactose como fontes de carbono para produção de ácido láctico e crescimento celular.

Os resultados obtidos na fermentação com lactose são semelhantes aos relatados por Pessione et al. (2014), que utilizaram a bactéria *E. faecium* LLAA-1 em fermentações com glicose, produzindo aproximadamente 18 g/L de ácido láctico, com conversão de aproximadamente 90%.

Avaliação do enantiômero de ácido láctico produzido por via fermentativa

Constatou-se por HPLC que as bactérias analisadas produziram o enantiômero (L)-ácido láctico com pureza óptica, cenário que possibilita utilizá-lo como monômero para produção de polímeros à base de ácido láctico. (López-Gómez et al., 2020).

Conclusão

A avaliação de quatro diferentes espécies de bactérias para produção de ácido láctico com estratégia de cultivo associando glicose com sacarose ou lactose mostrou que o melhor resultado foi obtido por *E. durans*, após 96 horas de cultivo, utilizando lactose e glicose. Sendo assim, esta bactéria foi selecionada como cepa-elite, e a estratégia de suplementar lactose ao meio com glicose será mantida para estudo de outros parâmetros visando a otimizar a produção de ácido láctico em maiores escalas. As demais cepas produziram entre 10 g/L e 13 g/L de ácido láctico com as duas condições, sendo que a *P. acidilactici* alcançou o maior rendimento (0,94 g/g).

Referências bibliográficas

- COCK, L. S.; DE STOUVENEL, A. R. Lactic acid production by a strain of *Lactococcus lactis* subs *lactis* isolated from sugar cane plants. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 9, n. 1, p. 40-45, 2006.
- ESMAEILI, N.; JAHANDIDEH, A.; MUTHUKUMARAPPAN, K.; AKESSON, D.; SKRIFVARS, M. Synthesis and characterization of methacrylated star-shaped poly (lactic acid) employing core molecules with different hydroxyl groups. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 134, n. 39, 2017. 45341.
- GEORGE, F.; DANIEL, C.; THOMAS, M.; SINGER, E.; GUILBAUD, A.; TESSIER, F. J.; REVOL-JUNELLES, A.-M.; BORGES, F.; FOLIGNÉ, B. Occurrence and dynamism of lactic acid bacteria in distinct ecological niches: a multifaceted functional health perspective. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, 2018. 2899.
- HOFVENDAHL, K.; HAHN-HÄGERDAL, B. Factors affecting the fermentative lactic acid production from renewable resources. **Enzyme Microbial Technology**, v. 26, n. 2-4, p. 87-107, 2000.
- JAMSHIDIAN, M.; TEHRANY, E. A.; IMRAN, M.; JACQUOT, M.; DESOBRY, S. Poly-lactic acid: production, applications, nanocomposites, and release studies. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 9, n. 5, 552-571, 2010.

- JUODEIKIENE, G.; KLUPSAITE, D.; ZADEIKE, D.; CIZEIKIENE, D.; VIDZIUNAITE, I.; BARTKIENE, E.; CERNAUSKAS, D. Bioconversion of agro-industrial by-products to lactic acid using *Lactobacillus sakei* and two *Pediococcus* spp. strains. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 51, n. 12, p. 2682-2691, 2016.
- KOMESU, A.; OLIVEIRA, J. A. R. de; MARTINS, L. H. da S.; MACIEL, M. R. W.; MACIEL FILHO, R. M. Lactic acid manufacture. **BioResources**, v. 12, n. 2, p. 4364-4383, 2017.
- KULEY, E.; OZYURT, G.; OXOGUL, I.; BOGA, M.; AYOL, I.; ROCHA, J. M.; OZOGUL, F. The role of selected lactic acid bacteria on organic acid accumulation during wet and spray-dried fish-based silages. Contributions to the winning combination of microbial food safety and environmental sustainability. **Microorganisms**, v. 8, n. 2, 2020. 172.
- LI, Y.; CUI, F. Microbial lactic acid production from renewable resources. In: SINGH, O.; HARVEU, S. (Ed.). **Sustainable biotechnology: sources of renewable energy**. Dordrecht, Netherlands: Springer, 2010. p. 211-228.
- LÓPEZ-GÓMEZ, J. P.; ALEXANDRI, M.; SCHNEIDER, R.; LATORRE-SÁNCHEZ, M.; COLL LOZANO, C.; VENUS, J. Organic fraction of municipal solid waste for the production of L-lactic acid with high optical purity. **Journal of Cleaner Production**, v. 247, 2020. Article 119165.
- MOKOENA, M. P. Lactic acid bacteria and their bacteriocins: classification, biosynthesis and applications against uropathogens: a mini-review. **Molecules**, v. 22, n. 8, 2017. 1255.
- NAGARAJAN, D.; OKTARINA, N.; CHEN, P.-T.; CHEN, C.-Y.; LEE, D.-J.; CHANG, J.-S. Fermentative lactic acid production from seaweed hydrolysate using *Lactobacillus* sp. and *Weissella* sp. **Bioresource Technology**, v. 344, pt. A, 2022. Article 126166.
- OUYANG, J.; MA, R.; ZHENG, Z.; CAI, C.; ZHANG, M.; JIANG, T. Open fermentative production of L-lactic acid by *Bacillus* sp. strain NL01 using lignocellulosic hydrolyzates as low-cost raw material. **Bioresource Technology**, v. 135, p. 475-480, 2013.
- PESSIONE, A.; ZAPPONI, M.; MANDILI, G.; FATTORI, P.; MANGIAPANE, E.; MAZZOLI, R.; PESSIONE, E. Enantioselective lactic acid production by an *Enterococcus faecium* strain showing potential in agro-industrial waste bioconversion: physiological and proteomic studies. **Journal Biotechnology**, v. 173, p. 31-40, 2014.
- SOUZA, E. C.; AZEVEDO, P. O. de S. de; DOMÍNGUEZ, J. M.; CONVERTI, A.; OLIVEIRA, R. P. de S. Influencia de la temperatura y pH en la producción de biosurfactantes, bacteriocinas y ácido láctico por *Lactococcus lactis* CECT-4434. **CyTA: Journal of Food**, v. 15, n. 4, p. 525-530, 2017.
- ZHANG, Z.; TSAPEKOS, P.; ALVARADO-MORALES, M.; ANGELIDAKI, I. Bio-augmentation to improve lactic acid production from source-sorted organic household waste. **Journal of Cleaner Production**, v. 279, 2021. Article 123714.

Seleção de linhagens de leveduras multicompetentes em produção de ácido indolacético e biossolubilização de fósforo

Eduardo Franco Brandalise¹, Lorena Costa Garcia Calsing², Livia Teixeira Duarte-Brandão³, João Ricardo Moreira de Almeida⁴

Resumo

O uso de fertilizantes químicos na agricultura brasileira se intensificou com a expansão da fronteira agrícola. Porém, a utilização desses insumos em culturas agrícolas gera danos ambientais. Assim, a substituição deles por biofertilizantes se torna essencial para um futuro sustentável. Este trabalho possui como objetivo a caracterização e a seleção de linhagens selvagens de leveduras multicompetentes para a produção de ácido indolacético (IAA) e para a biossolubilização de fósforo (P) em meios com $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, FePO_4 e AlPO_4 , a fim de buscar linhagens com potencial para biofertilização. Para a determinação da solubilização de P, setenta e duas linhagens de leveduras de diferentes espécies foram inoculadas em meio sólido NBRIP contendo $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, FePO_4 ou AlPO_4 . A avaliação foi realizada por meio do índice de solubilização (IS), calculado por meio da razão da média das medidas de halos formados por solubilização do meio pela média do diâmetro das quatro colônias, por placa. Para a quantificação de IAA, as leveduras foram inoculadas em meio líquido de YPD com L-triptofano (L-Trp) 0,1% e amostras foram retiradas após 120 horas para quantificação do fitormônio por método colorimétrico. Por fim, doze linhagens que demonstraram produção de IAA entre 13 $\mu\text{g/mL}$ e 65 $\mu\text{g/mL}$ foram selecionadas e avaliadas quanto à solubilização de P em meio líquido NBRIP com as fontes fosfóricas $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, FePO_4 e AlPO_4 . Os resultados revelaram que as leveduras estudadas somente apresentam capacidade de formação de halos de solubilização em meio sólido com $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$. No entanto, houve solubilização de P em meio líquido com todas as fontes fosfóricas. Quanto à multicompetência, os dados apontam que, dentre as 72 linhagens avaliadas de 29 espécies diferentes, destacaram-se três linhagens de diferentes espécies. Desse modo, tais linhagens são candidatas promissoras para a biofertilização de culturas comerciais.

Termos para indexação: ácido indolacético, biofertilização, biossolubilização, fósforo, leveduras.

Introdução

O Brasil é um dos principais consumidores de fertilizantes químicos do mundo. No entanto, é dependente do mercado internacional para obtenção deles, uma vez que o País não figura como um grande produtor. Além disso, a eficiência da utilização de fertilizantes nitrogenados, fosfatados e potássicos é reduzida por frequentes perdas por volatilização, imobilização ou outros processos geoquímicos (Gomes et al, 2021). Dessa forma, os biofertilizantes surgem como uma alternativa sustentável aos fertilizantes convencionais, com impacto ambiental associado reduzido sem perda de produtividade.

¹ Graduando em Biotecnologia, Universidade de Brasília, eduardo.brandalise@colaborador.embrapa.br.

² Engenheira de alimentos, doutora em Engenharia de Alimentos, Embrapa Agroenergia, lorena.garcia@embrapa.br.

³ Farmacêutica, mestre em Ciências Farmacêuticas, Embrapa Agroenergia, livia.duarte@embrapa.br.

⁴ Biólogo, doutor em genética e biotecnologia microbiana, Embrapa Agroenergia, joao.almeida@embrapa.br.

Em meados da década de 1970, surgiu a utilização de microrganismos eficientes (EM) como biofertilizantes, que atuam como promotores do crescimento, ao disponibilizar formas inicialmente não assimiláveis de nutrientes ao metabolismo vegetal. Além disso, os EM são ainda capazes de produzir e disponibilizar hormônios fitoestimuladores, como auxinas, giberelinas, jasmonatos, dentre outros. Entretanto, o uso de biofertilizantes é ainda muito incipiente e há poucos estudos na literatura que tratam da utilização, dos mecanismos e da eficácia deles (Bonfim; Fontenele, 2017). Desse modo, apesar de promissores, os EM para biofertilização ainda necessitam de pesquisas para sua caracterização e possível aplicação no campo.

A produção de auxinas importantes para o crescimento vegetal, como o ácido indolacético (IAA), e a capacidade de biossolubilização de fósforo (P) em diferentes substratos, por microrganismo, têm sido amplamente estudadas. O ácido indol-3-acético (IAA) estimula o rápido crescimento e desenvolvimento vegetal, e há avanços em estudos recentes do seu papel em interações planta-microrganismo, principalmente com bactérias.

Deste modo, outros microrganismos, como fungos filamentosos e leveduras, também presentes no solo, estão ganhando destaque como EM para o crescimento vegetal. A levedura *Meyerozyma guilliermondii* CC1 foi avaliada como agente indutor de crescimento de milho e couve-chinesa, e demonstrou um potencial de elevar o índice de vigor das sementes (Nakayan et al., 2013). Por sua vez, *Candida tropicalis* CtHY inoculada em sementes de arroz elevou em 35% o peso seco da planta em detrimento das sementes controle sem inóculo (Amprayn et al., 2012). Nesse contexto, percebe-se o grande potencial de linhagens selvagens de leveduras como microrganismos promotoras de crescimento vegetal, e, subsequentemente, como biofertilizantes eficazes e sustentáveis.

Este trabalho possui como objetivo a identificação e a caracterização de linhagens selvagens de leveduras competentes na produção de IAA e na biossolubilização de P em $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, FePO_4 e AlPO_4 . Para realização do trabalho, setenta e duas linhagens de leveduras, provenientes da coleção interna da Embrapa, foram caracterizadas quanto à produção de ácido indolacético e à biossolubilização de P.

Materiais e métodos

Potencial de solubilização de P em meios sólido e líquido por leveduras

As 72 leveduras foram plaqueadas em meio sólido de YPD e incubadas por 24 horas, a 28 °C. Em seguida, pré-inóculos foram preparados em meio líquido YNB + 20 g/L de glicose e incubados em shaker a 28 °C e 200 rpm por 24 horas. Por fim, quatro inóculos de 10 µL de cada uma das 72 linhagens foram aplicados em placas contendo meio NBRIP (Murphy e Riley, 1962) com as seguintes fontes de fosfato: $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, AlPO_4 e FePO_4 .

As amostras em placas foram incubadas em estufa a 28 °C e a avaliação de crescimento de halos de solubilização foi realizada após 24 horas, 72 horas e 144 horas de incubação. Para determinação do índice de solubilização (IS) de P em meio sólido NBRIP de $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, FePO_4 e AlPO_4 , os halos de solubilização visíveis nas placas, após 144 horas de incubação, foram mensurados com a utilização de paquímetros. O IS foi calculado da seguinte forma:

$$\text{IS} = \text{Média diâmetro halo} / \text{Média diâmetro colônia}$$

Para cada amostra, foram obtidos quatro valores de IS, e, portanto, uma média desses quatro valores foi calculada.

Para determinação da capacidade de biossolubilização de P em meios líquidos NBRIP de $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, AlPO_4 e FePO_4 , utilizou-se o protocolo de Murphy e Riley (1962) para 12 linhagens pré-selecionadas a partir da competência em produzir IAA. Em resumo, as linhagens foram crescidas

conforme previamente descrito em meio NBRIP por cinco dias. Ao final, amostras foram retiradas e o P foi quantificado por método colorimétrico.

Potencial de produção de IAA por leveduras

Para quantificação de IAA produzido por cada levedura, cada linhagem foi cultivada em meio líquido YPD e em YPD + Triptofano 0,1%, a 28 °C e 200 rpm por 120 horas. Ao final, amostras foram retiradas e o IAA foi quantificado por método colorimétrico de Sun et al. (2014).

Para avaliação da multicompetência das leveduras, doze amostras foram selecionadas, as melhores linhagens na produção de IAA, para repetição do ensaio de biossolubilização de P em meio líquido. Os dados foram plotados em planilha e convertidos em gráficos.

Resultados e discussão

Para avaliar a capacidade de leveduras solubilizarem fosfato em meio sólido, setenta e duas linhagens de leveduras de 29 espécies diferentes foram selecionadas a partir da coleção da Embrapa e inoculadas em meio NBRIP contendo diferentes fontes de P. Dentre as placas de meio NBRIP $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, FePO_4 e AlPO_4 , foi observada a formação de halos em placas com $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ com 38 leveduras distintas. Os dados de IS foram calculados e 15 leveduras demonstraram valores de IS superiores ao valor médio (Figura 1).

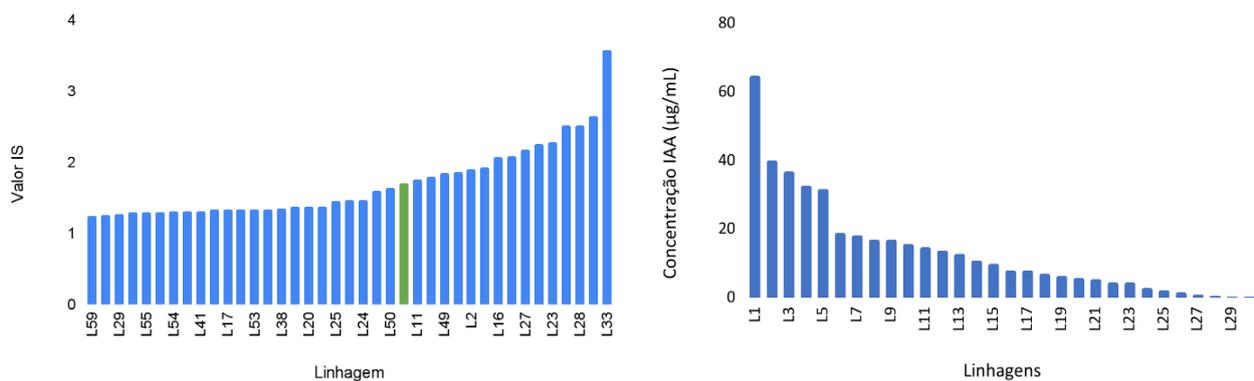


Figura 1. À esquerda, índice de biossolubilização de P em meio NBRIP $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ por leveduras. A média de IS obtida para essas amostras é de 1,70. À direita, produção de IAA, em µg/mL, por linhagem.

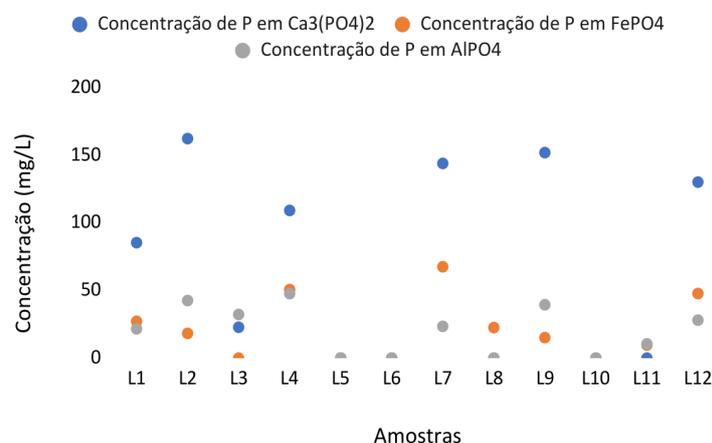


Figura 2. Biossolubilização de P em meio líquido NBRIP $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, FePO_4 e AlPO_4 por diferentes leveduras. Apenas as 12 amostras selecionadas pelo *screening* estão representadas no gráfico.

De forma complementar, a solubilização de fosfato pelas 72 leveduras também foi avaliada em meio líquido NBRIP $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, FePO_4 e AlPO_4 . Os resultados demonstraram que as leveduras são mais competentes na solubilização $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ (Figuras 1 e 2). Quanto à solubilização em meio com FePO_4 e AlPO_4 , houve pouca variação para cada amostra, com exceção de uma linhagem L7, que demonstrou maior competência no meio com Fe.

A produção de IAA foi avaliada em meio YPD-trip, uma vez que as leveduras se mostraram mais competentes na produção do fitormônio no meio com o aminoácido. Das 72 linhagens, doze foram capazes de produzir entre 13 $\mu\text{g/mL}$ e 65 $\mu\text{g/mL}$ de IAA (Figura 1). Finalmente, buscou-se identificar linhagens com capacidade de solubilizar P e produzir IAA. Para tanto, os dados gerados foram analisados em conjunto (Figuras 3, 4, 5). É possível observar a predominância de algumas linhagens na multicompetência para todos os meios: as linhagens L1, L2 e L4.

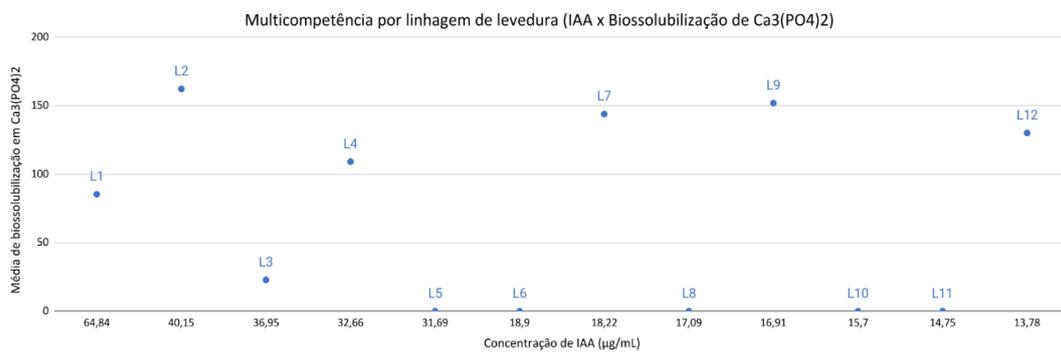


Figura 3. Gráfico de dispersão com os valores de concentração, em mg/L, de P biossolubilizado em meio líquido NBRIP $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, no eixo Y, e os dados de produção de IAA, em $\mu\text{g/mL}$, no eixo X.

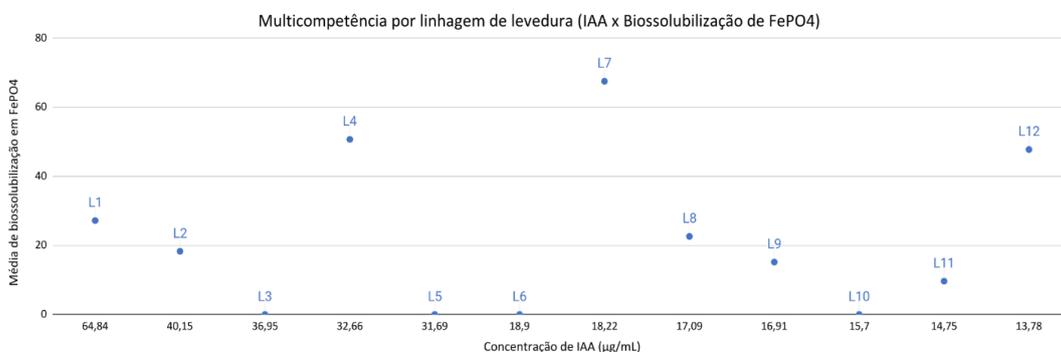


Figura 4. Gráfico de dispersão dos valores de concentração, em mg/L, de P biossolubilizado em meio líquido NBRIP FePO_4 , no eixo Y, e os dados de produção de IAA, em $\mu\text{g/mL}$, no eixo X.

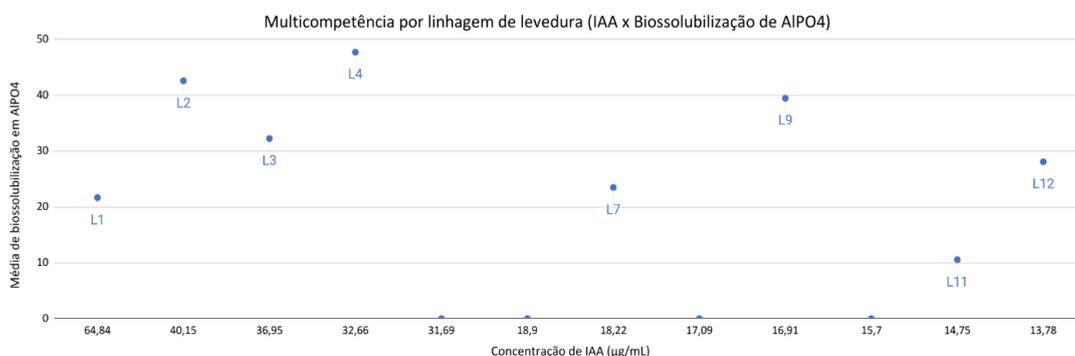


Figura 5. Gráfico de dispersão dos valores de concentração, em mg/L, de P biossolubilizado em meio líquido NBRIP AlPO_4 , no eixo Y, e os dados de produção de IAA, em $\mu\text{g/mL}$, no eixo X.

Conclusão

A avaliação da multicompetência das 72 linhagens de leveduras utilizadas neste trabalho, para a produção de IAA e para a biossolubilização de P em meios com $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, FePO_4 e AlPO_4 , concomitantemente, permitiu a identificação de três linhagens promissoras para utilização como biofertilizantes.

Referências bibliográficas

- AMPRAYN, K.-O.; ROSE, M. T.; KECSKÉS, M.; PEREG, L.; NGUYEN, H. T.; KENNEDY, I. R. Plant growth promoting characteristics of soil yeast and its effectiveness for promoting rice growth. **Applied Soil Ecology**, v. 61, p. 295-299, 2012.
- BONFIM, C. A.; FONTENELLE, M. R. Microrganismos benéficos em biofertilizantes. **Hortaliças em Revista**, ano 6, n. 21, p. 10-11, abr. 2017. Disponível em: <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/171456/1/digitalizar0248.pdf>. Acesso em: jul. 2023.
- GOMES, J. P. A.; SOUZA, M. N.; SANTOS JUNIOR, A. C.; MOULIN, M. M. Uso de microrganismos eficientes como alternativa para agricultura sustentável: um referencial teórico. In: SOUSA, C. da S.; SABIONI, S. C.; LIMA, F. de S. (Org.). **Agroecologia: métodos e técnicas para uma agricultura sustentável**. Guarujá, SP: Científica Digital, 2021. v. 5. p. 340-355.
- FERNANDEZ-SAN MILLAN, A.; FARRAN, I.; LARRAYA, L.; ANCIN, M.; ARREGUI, L. M.; VERAMENDI, J. Plant growth-promoting traits of yeasts isolated from Spanish vineyards: benefits for seedling development. **Microbiological Research**, v. 237, 2020. 126480.
- MURPHY, J.; RILEY, J. P.; A modified single solution method for the determination of phosphate in natural waters. **Analytica Chimica Acta**, v. 27, p. 31-36, 1962.
- NAKAYAN, P.; HAMEED, A.; SINGH, S.; YOUNG, L.-S.; YOUNG, C.-C. Phosphate-solubilizing soil yeast *Meyerozyma guilliermondii* CC1 improves maize (*Zea mays* L.) productivity and minimizes requisite chemical fertilization. **Plant Soil**, v. 373, p. 301-315, 2013.
- SUN, P.-F.; FANG, W.-T.; SHIN, L.-Y.; WEI, J.-J.; FU, S.-F.; CHOU, J.-Y. Indole-3-acetic acid-producing yeasts in the phyllosphere of the carnivorous plant *Drosera indica* L. **Plos One**, v. 9, n. 12, 2014.

Síntese de ácido láctico a partir de glicose por *Pediococcus acidilactici*: otimização e produção

Marcus Fernando Farias Silva Lima¹, Fabricio Machado², Sílvia Belém Gonçalves³

Resumo

O processo de produção de ácido láctico por meio do metabolismo fermentativo das bactérias lácticas apresenta um grande potencial para ser utilizado como um importante bloco construtor no setor de materiais. Neste trabalho, o objetivo principal foi determinar os parâmetros ideais para otimizar a produção de ácido láctico através da rota fermentativa. Foram conduzidos experimentos em Falcon de 50 mL, utilizando uma temperatura de 30 °C e uma frequência de agitação de 120 rpm, durante 96 horas. O primeiro parâmetro testado foi a concentração de glicose no meio de cultura, com experimentos realizados em concentrações de 20 g/L, 40 g/L e 100 g/L. A bactéria utilizada foi a *Pediococcus acidilactici*, e seu melhor rendimento foi obtido com uma concentração de glicose de 20 g/L. O segundo parâmetro avaliado foi o pH do meio de fermentação. Por meio de experimentos conduzidos em um reator a 30 °C e 180 rpm, observou-se que o crescimento bacteriano foi considerado ideal em pH igual a 6, o que resultou na produção de 30 g/L de ácido láctico. Por fim, o número de ciclos necessários para aumentar a produção de ácido láctico foi avaliado utilizando um processo batelada alimentada. Verificou-se que, com quatro ciclos de cultivo, foi possível obter 45 g/L de ácido láctico em 86 horas. Dessa forma, por meio das ferramentas experimentais utilizadas, foram estabelecidos os parâmetros ótimos para a produção eficiente de ácido láctico via rota fermentativa utilizando a bactéria *Pediococcus acidilactici*.

Termos para indexação: *Pediococcus acidilactici*, ácido láctico, glicose, fermentação.

Introdução

Diferentes indústrias utilizam o ácido láctico em diversas aplicações. Por exemplo, na indústria alimentícia, ele é empregado como acidulante para evitar o crescimento indesejado de bactérias. Além disso, o ácido láctico é utilizado na produção de bases químicas, solventes orgânicos e também encontra aplicação na indústria farmacêutica, principalmente na formulação de pomadas. Trata-se de um ácido orgânico que pode formar uma mistura racêmica por causa dos seus dois isômeros óticos, L(+) e D(-), quando produzido pela rota química, em razão do seu centro quiral no β -carbono. Sua produção ocorre também por meio da fermentação de glicose por bactérias lácticas (Lopes et al., 2008).

No contexto desta pesquisa, a bactéria utilizada é a *Pediococcus acidilactici*, um coco gram-positivo, homofermentativo, capaz de crescer em uma ampla faixa de pressão osmótica, temperatura e pH. Essa bactéria é anaeróbia facultativa que prospera em meio MRS com pH ótimo entre 5 e 6, e sua viabilidade ocorre em temperaturas de até 65 °C, embora a temperatura ideal para o crescimento esteja em torno de 30 °C (Pereira, 2019).

A eficiência do processo de fermentação láctica é determinada pelo consumo de substrato e pela produtividade. Diversos fatores podem influenciar negativamente a produtividade, incluindo

¹ Engenheiro químico, Universidade de Brasília, marcus.lima@colaborador.embrapa.br.

² Engenheiro químico, doutor em Engenharia Química, Universidade de Brasília, fmachado@unb.br

³ Engenheira química, doutora em Engenharia Química, Embrapa Agroenergia, silvia.belem@embrapa.br

a temperatura do fermentador, variações de pH, inibição da atividade biossintética por causa de altas ou baixas concentrações de substrato, alta concentração celular ou o acúmulo de subprodutos (Boudrant et al., 2005).

A homofermentação é o processo em que o ácido láctico é o único produto final, resultante da conversão do ácido pirúvico em ácido láctico pela ação da enzima desidrogenase (LDH). Esse processo gera um ganho líquido de dois ATP, ou seja, dois lactatos por molécula de glicose fermentada. Além de glicose, a bactéria requer nutrientes como aminoácidos, sais, peptídeos e vitaminas para seu desenvolvimento (Garvie; Mabbitt, 1967).

O ácido láctico possui fórmula molecular $C_3H_6O_3$, ponto de fusão de 53 °C e massa molar de 90,08 g/mol. Ele pode formar sais com vários metais, sendo os mais solúveis em água aqueles formados pelo DL ácido láctico em mistura racêmica. Em muitos casos, diferentes espécies de bactérias produzem apenas um tipo de ácido láctico, L(+) ou D(-), com o isômero D sendo mais prevalente na fase estacionária e o isômero L predominando na fase inicial da fermentação (Garvie; Mabbitt, 1967).

O objetivo deste trabalho é avaliar a produção de ácido láctico por meio da fermentação de glicose, utilizando a bactéria *Pediococcus acidilactici* como microrganismo em diferentes condições operacionais.

Materiais e métodos

A bactéria foi inicialmente retirada do ultrafreezer (-80 °C) e, em seguida, foi estriada e cultivada em placas de Petri com ágar MRS, previamente preparadas, permitindo o crescimento das colônias isoladas. Para o pré-inóculo, foi preparado meio MRS comercial em frascos Erlenmeyer, que foram autoclavados por 15 minutos para esterilização e armazenados em geladeira.

Também foi preparado meio MRS para o inóculo, sem fonte de carbono, pois a concentração de glicose variava em cada experimento, e havia risco de caramelização do meio durante a esterilização na autoclave.

As colônias de bactérias foram transferidas das placas de Petri para os frascos Erlenmeyer de 125 mL contendo 50 mL de meio do pré-inóculo cada, preparado previamente, utilizando uma alça de Drigalski estéril. Em seguida, os frascos foram colocados em um *shaker* a 120 rpm, a 30 °C, por um tempo definido para cada experimento.

Quando os experimentos foram conduzidos em frasco tipo Falcon de 50 mL, após três dias, o pré-inóculo foi centrifugado, e a densidade óptica (OD) do concentrado foi medida. O concentrado foi distribuído em volumes iguais para os frascos tipo Falcon de 50 mL, que continham 30 mL do meio MRS previamente preparado em cada um. Cada concentração foi replicada em triplicata, variando para cada experimento. Os frascos tipo Falcon foram, então, colocados em um *shaker* a 120 rpm, a 30 °C, por até 96 horas. Durante o experimento, foram coletadas amostras no primeiro dia em 0 hora, 4 horas e 12 horas, e nos dias seguintes, uma amostra de 1 mL foi retirada a cada 24 horas. Ao final do experimento, as amostras coletadas foram analisadas por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC), na coluna Aminex HPX-87H a uma temperatura de 40 °C, utilizando-se uma fase móvel de 0,005 mol/L de H_2SO_4 , com uma vazão de 0,6 mL/min.

No caso dos experimentos realizados em reator, após o tempo determinado para cada experimento, o pré-inóculo foi centrifugado, e a OD do concentrado foi medida. O concentrado foi distribuído em volume, de acordo com a concentração inicial calculada para cada reator. Os reatores foram preparados previamente, e os sensores de pH foram calibrados com soluções padrão do laboratório. O volume de meio necessário para cada experimento foi adicionado a cada reator

e, em seguida, foi autoclavado. Após o resfriamento, a solução de glicose foi adicionada ao reator, preparando-o para receber o inóculo.

Ao final do experimento, as amostras coletadas foram analisadas no HPLC. O restante dos experimentos foi feito em reator. O pré-inóculo ficou por apenas 8 horas no *shaker*, e foi inoculado no mesmo dia. Foram preparados três reatores com 600 mL de meio MRS tamponado com 20 g/L de glicose como substrato, em cada. Foram colocados 16,6 mL de inóculo em cada reator no início do experimento, a OD inicial foi de 7,8 e o pH estava em 6,5, com duração de 86 horas. O reator foi alimentado quatro vezes com uma solução de glicose de 200 g/L.

Resultados e discussão

A Figura 1 mostra que a concentração de 20 g/L obteve o maior rendimento na produção de ácido láctico em comparação às outras concentrações, chegando à concentração final de 7,66 g/L. Uma explicação para esse resultado pode ser o pH do meio, que mesmo para o experimento com a concentração de 100 g/L obtinha-se 6,65 g/L de ácido láctico. O pH correto para favorecer a levedura e inibir o desenvolvimento de muitos tipos de bactérias está entre 4,0 e 5,0 (Menezes, 1980). Para manter o pH estável foi utilizado um meio tamponado, fazendo com que a produção de ácido láctico melhorasse um pouco também, principalmente para a concentração de 20 g/L. Isso pode ser observado na Figura 2.

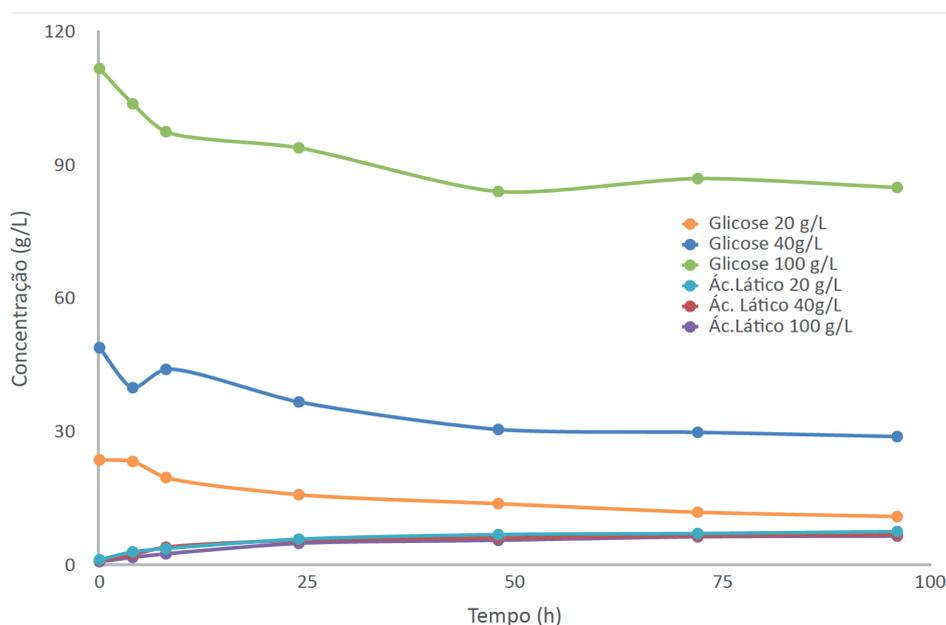


Figura 1. Estudo da influência da concentração de glicose na produção de ácido láctico.

Contudo, como se pode observar na Figura 2, mesmo com o ajuste de pH por meio de tampão, nos experimentos conduzidos, em que as quantidades de substrato inicial eram maiores, não foi possível obter uma boa produção, o que indica que a bactéria pode estar sofrendo inibição pelo substrato. Isso acontece porque quando o substrato é adicionado de uma vez só no início da fermentação ocorrem efeitos de inibição, repressão ou o metabolismo celular é desviado para formação de produtos que não interessam (Carvalho; Sato, 2001). Os resultados podem ser observados na Figura 3.

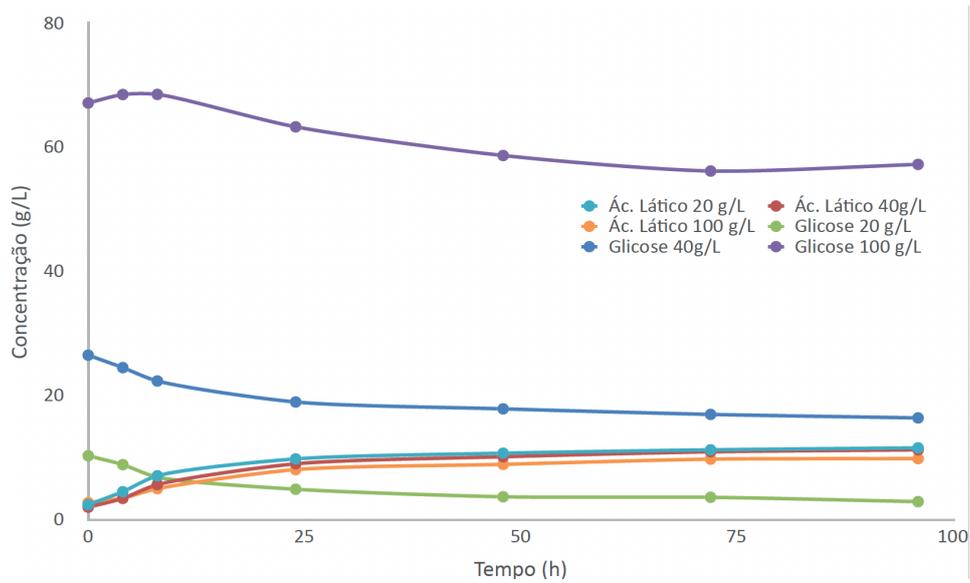


Figura 2. Estudo da influência da concentração de glicose para a produção de ácido láctico com meio tamponado.

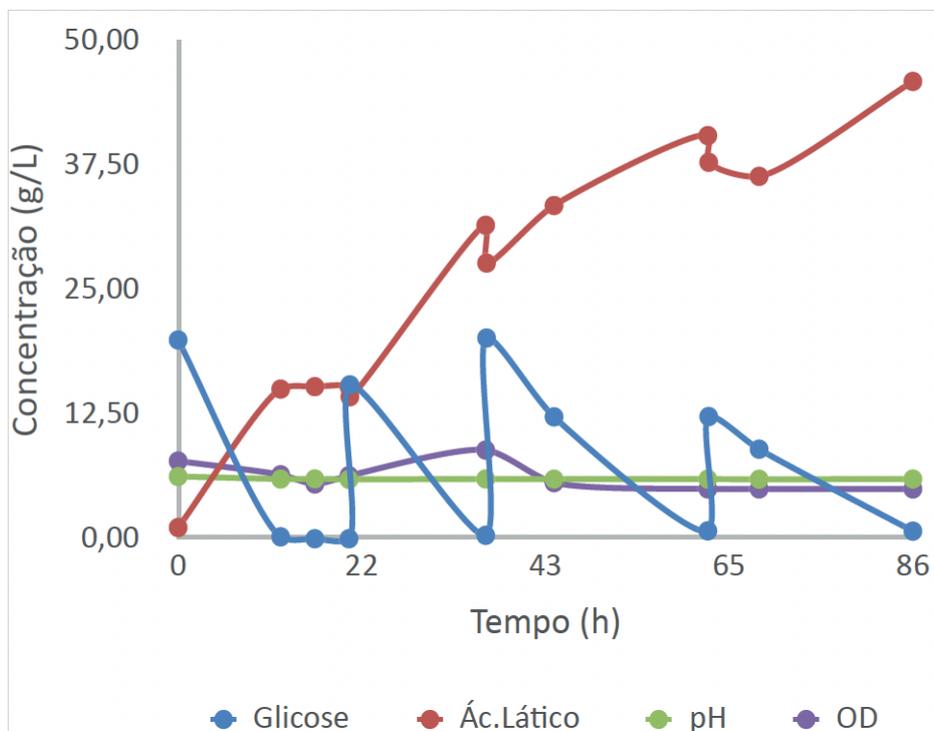


Figura 3. Produção de ácido láctico a partir de glicose em sistema de batelada alimentada.

Observa-se que ao final da última alimentação as células já começaram a apresentar morte celular. Neste experimento, foi obtida uma produção de ácido láctico de 45,9 g/L, com o rendimento de 79% e uma produtividade de 62%.

Conclusão

Utilizando-se diferentes concentrações de glicose (20 g/L, 40 g/L e 100 g/L), constatou-se que a concentração de 20 g/L apresentou os melhores resultados, indicando sua maior efetividade para a aplicação estudada.

A bactéria escolhida, *Pediococcus acidilactici*, mostrou um desempenho satisfatório ao longo dos experimentos. A temperatura ideal de 30 °C e a agitação a 180 rpm favoreceram seu crescimento, enquanto o pH 6 proporcionou as melhores condições para sua proliferação. Além disso, a concentração ótima de glicose foi determinada como 20 g/L, resultando na máxima concentração de ácido láctico de 45 g/L após 86 horas de experimento.

Dessa forma, por meio do controle desses parâmetros e da seleção da bactéria adequada, foi possível alcançar uma produção eficiente de ácido láctico, contribuindo para o avanço do conhecimento nessa área de pesquisa.

Referências bibliográficas

- BOUDRANT, J.; MENSUTINA, N. V.; SKOROHODOV, A. V.; GUSEVA, E. V.; FICK, M. Mathematical modelling of cell suspension in high cell density conditions: application to L-lactic acid fermentation using *Lactobacillus casei* in membrane bioreactor. **Process Biochemistry**, v. 40, n. 5, p. 1641-1647, 2005.
- CARVALHO, J. C. M.; SATO, S. Fermentação descontínua. In: SCHMIDELL, W.; LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. (Coord.). **Biotecnologia industrial: engenharia bioquímica**. São Paulo: Edgard Blücher, 2001. v. 2. p. 193-204.
- GARVIE, E. I.; MABBITT, L. A. Stimulation of the growth of *Leuconostoc oenos* by tomato juice. **Archives of Microbiology**, v. 55, n. 4, p. 398-407, 1967.
- LOPES, A. R. **Produção de ácido láctico por lactobacilos em diferentes meios de cultivo**. 2008. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Rio Claro.
- MENEZES, T. J. B. de. **Etanol, o combustível do Brasil**. São Paulo: Agronômica Ceres, 1980. p. 141-178.
- PEREIRA, N. T. **Produção de ácido láctico com resíduos agroindustriais: uma revisão da literatura**. 2019. Monografia (Graduação em Engenharia Química) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

Sistema automatizado de monitoramento para fotobiorreatores de microalgas

Álamo Conrado Monteiro Junior¹, Wellington Rangel dos Santos², Lúcio Scartezini Lopes³, Samuel Nunes Limberger⁴, Luiz Fernando Roncaratti Junior⁵, Letícia Jungmann Cançado⁶

Resumo

O presente artigo apresenta e discute a construção de um sistema de monitoramento e gerenciamento de dados automatizado para fotobiorreatores de microalgas destinados à produção de biomassa. A montagem do projeto de automação fez uso de hardware de baixo custo destinado à prototipagem rápida, adaptado para atender às condições do ambiente laboratorial no intuito de monitorar inicialmente o pH dentro do sistema fechado, porém criando bases sólidas para a integração de monitoramento de outros parâmetros de interesse à produção, como temperatura, iluminação e oxigenação. O presente trabalho explora aspectos dessa implementação, como os protocolos de comunicação, implementação de *datalogger*, instalação de calibração de sensores e desenvolvimento de código para microcontrolador Arduino. Os resultados obtidos neste trabalho permitem concluir que o emprego do sistema automatizado fornece previsões otimistas em relação ao uso desse tipo de tecnologia no ambiente de cultivo de microalgas, reduzindo a carga de trabalho repetitivo e manual do operador, aumentando a produtividade e contribuindo para a viabilização dos processos industriais que envolvem a produção da biomassa de microalgas.

Termos para indexação: fotobiorreatores, automação, *datalogger*, monitoramento, Arduino.

Introdução

O cultivo de biomassa a partir de microalgas, além de atender a uma demanda industrial consistente por seus produtos, pode promover benefícios ambientais importantes, uma vez que os processos de produção de biomassa podem ser feitos com o consumo de CO₂ e a energia solar. A taxa de fotossíntese (RP) de organismos fototróficos, como diversas microalgas, atinge de 10 a 50 vezes a taxa das plantas terrestres (Suali; Sarbatly, 2012), e, com isso, além dos benefícios econômicos, a prática está alinhada com os Objetivos de Desenvolvimento Sustentável (ODS), estabelecidos pela ONU em 2015.

No entanto, a produtividade atual de biomassa de microalgas ainda não é alta o suficiente para que seja competitiva no mercado, principalmente por causa do uso ineficiente da energia solar, aliado aos demais fatores de produção (Cho et al., 2019). Por isso, a importância de se investir nas alternativas de energia renovável (Carrasco et al., 2006), pois reduzem o uso de CO₂ no processo.

As tecnologias que envolvem a automação têm grande relevância no cultivo de microalgas, por viabilizarem a coleta automatizada de informações e gerenciarem dispositivos para otimizar o processo (Naghdi et al., 2014), permitindo um cultivo bem-sucedido de microalgas, que requerem controle e monitoramento precisos das condições ambientais, o que é assegurado pela automação. As seguintes vantagens podem ser observadas:

¹ Graduando em Engenharia Mecatrônica, Universidade de Brasília, alamoconrado.am@gmail.com

² Cientista da computação, mestre em Educação Física, Embrapa Agroenergia, wellington.santos@embrapa.br

³ Cientista da computação, mestrando em Agroenergia, Embrapa Agroenergia, lucio.lopes@embrapa.br

⁴ Químico, mestrando em Química Inorgânica, Universidade de Brasília, samuel.n.limberger@gmail.com

⁵ Físico, doutor em Química, professor da Universidade de Brasília, roncaratti@unb.br

⁶ Bióloga, doutora em Genética e Biologia Molecular, Embrapa Agroenergia, leticia.jungmann@embrapa.br

Monitoramento em tempo real. Dispositivos integrados aos biorreatores e sistemas de cultivo monitoram parâmetros essenciais. A coleta de dados em tempo real permite ajustes imediatos para garantir condições ideais de crescimento.

Controle automatizado. Com sensores e atuadores, os sistemas de cultivo podem ser automatizados para, por exemplo, ajustar a dosagem de nutrientes ou regular a exposição à luz com base nos requisitos de crescimento da microalga e informações coletadas no sistema.

Gerenciamento remoto. Tecnologias IoT (*Internet of Things*), ou internet das coisas, que representam a integração de dispositivos de uso diário em uma rede de internet, e permitem o monitoramento e gerenciamento remoto de instalações de cultivo de microalgas. Esse recurso é particularmente útil em fazendas de grande escala ou geograficamente dispersas, permitindo que os operadores acessem e controlem o sistema de qualquer lugar.

Eficiência de recursos. Ao controlar com precisão as condições ambientais, as tecnologias de automação ajudam a minimizar o desperdício de recursos, como água e nutrientes. Isso aumenta a sustentabilidade geral dos processos.

Controle de qualidade. Sistemas equipados com automação garantem condições consistentes e padronizadas, levando a um maior rendimento de microalgas e qualidade do produto. Isso é particularmente crítico quando as microalgas são cultivadas para produtos de alto valor, como nutracêuticos ou compostos bioativos.

O objetivo deste trabalho, portanto, foi desenvolver um sistema automatizado de coleta de dados que agregue esses benefícios e possa ser integrado a fotobiorreatores utilizados para cultivo e produção de biomassa de microalgas, visando à obtenção de dados robustos e de forma sistemática, bem como maiores autonomia aos sistemas de cultivo e controle dos processos de produção de biomassa.

Materiais e métodos

O trabalho foi realizado a partir da integração dos seguintes componentes:

- a) Arduino Mega 2560 R3 Ch340.
- b) Eletrodo hidropônico, tipo sonda, da marca Atlas Scientific.
- c) Módulo de controle da marca Atlas Scientific.
- d) Módulo *Real Time Clock*–RTC DS1307.
- e) Módulo leitor micro SD.
- f) *Jumpers*.

Foi realizada, a princípio, a implementação da sonda de pH, para a visualização dos dados em monitor serial, que é uma ferramenta presente na interface de desenvolvimento do Arduino e que permite acompanhar qualquer impressão ou transferência de dados, de modo a possibilitar a calibração do sensor e atestar a funcionalidade dele sem a necessidade de armazenamento de dados.

Portanto, foram utilizados os módulos de controle dispostos no esquemático eletrônico presente na Figura 1. A sonda de pH é do tipo prata/cloreto de prata de junção dupla. A faixa de medição está entre 0 e 14 com uma resolução de 0,001. A sonda pode suportar a pressão máxima de 100 psi e funciona na faixa de temperatura entre -5 °C e 99 °C.

A Figura 1 apresenta a ligação do módulo de controle utilizando o protocolo de comunicação i2c (*inter-integrated circuit*), que é um protocolo que descreve o barramento de comunicação serial utilizando apenas dois fios. Nessa mesma figura, pode-se ver o módulo de controle que faz a intermediação com o Arduino, sendo conectado através dos pinos de alimentação, 5v e gnd (*ground*), e os pinos tx (transmissor), e rx (receptor) nas portas do Arduino 3 e 2, respectivamente. O modo de comunicação i2c foi escolhido pelo artifício da comunicação síncrona, o que significa que os dispositivos conectados ao barramento compartilham um relógio comum (linha *Serial Clock Line*–SCL), permitindo uma sincronização de dados precisa.

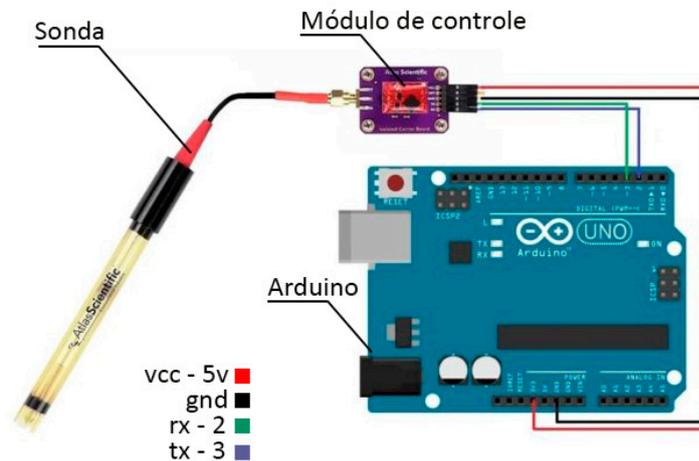


Figura 1. Esquemático eletrônico.

A calibração do sensor é realizada mediante o uso de soluções padrão de pH 4, 7 e 10. O prompt de comando é um programa que emula o campo de entrada em uma tela de interface do usuário baseada em texto, tendo sido utilizado para chamar as funções que referenciam os valores exatos de pH, os quais são armazenados como referência pelo microcontrolador. A sonda foi mantida por 10 minutos em cada solução antes da chamada das funções, para a devida estabilização dos valores lidos.

O módulo leitor SD foi então implementado para permitir o microcontrolador Arduino ler e gravar dados em cartões de memória SD. Esse método é comumente utilizado como uma solução de armazenamento externo para projetos que exigem a coleta e o registro de dados, como um *datalogger*, possibilitando que o módulo funcione sem conexão a microcomputador. Portanto, para facilitar a comunicação entre o Arduino e o módulo leitor SD, foram utilizadas bibliotecas específicas que permitem essa comunicação do leitor com o Arduino, e a montagem física se dá na Figura 2.

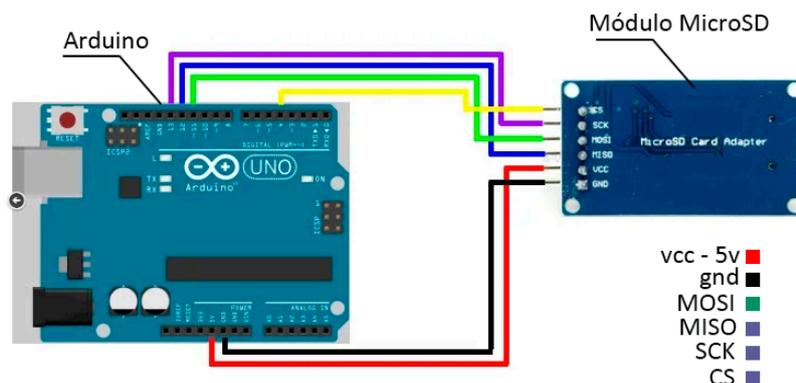


Figura 2. Esquemático com leitor SD para *datalogger*.

A representação esquemática mostrada na Figura 2 ilustra a conexão do módulo micro SD, com suas ligações para alimentação, e as respectivas ligações MOSI, MISO, SCK e CS, que são portas de arquitetura mestre-escravo, em que um dos dispositivos (mestre) comanda a alocação de tarefas para os demais dispositivos (escravos), dessa forma, tornando possível a comunicação.

O módulo de relógio indica o tempo real (RTC) para a devida atribuição dos dados cronológicos. Esse módulo fornece ao microcontrolador a capacidade de manter e acompanhar data e hora em tempo real, sendo utilizado para manter o registro preciso de data e hora, mesmo quando o sistema é desligado ou reiniciado, porque possui bateria própria. A Figura 3 mostra a implementação do módulo RCT.

Na Figura 3 é possível ver a ligação do módulo RTC por protocolo i2c com o Arduino. A linha SCL (*Serial Clock Line*) é usada para sincronizar a informação entre os dispositivos, e a linha SDA (*Serial Data Line*) é usada para a transmissão dos dados. As linhas SCL e SDA se encontram nas portas analógicas 4 e 5 do Arduino. Dessa forma, foi possível registrar os dados com carimbo de tempo, associando a data e a hora a cada medição feita, o que é de fundamental importância para qualquer análise referente ao cultivo das microalgas.

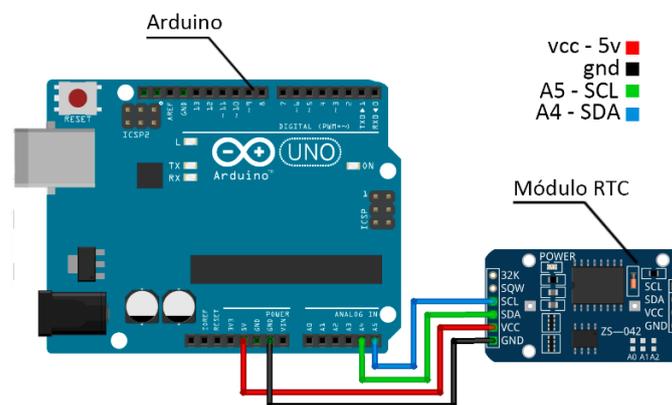


Figura 3. Esquemático RTC.

Resultados e discussão

Com o devido sistema implementado, foi possível realizar a tomada de dados de um experimento que mostrou a variação de acidez na água para atestar o funcionamento do sistema. Portanto, primeiramente foi montado o sistema em água destilada, no qual foi borbulhado CO_2 a uma vazão de $200 \text{ cm}^3/\text{min}$. O sistema foi ajustado para realizar medições a cada segundo, rodando dessa forma por 20 minutos. A Figura 4 mostra o valor de pH analisado pelo sistema em função do tempo.

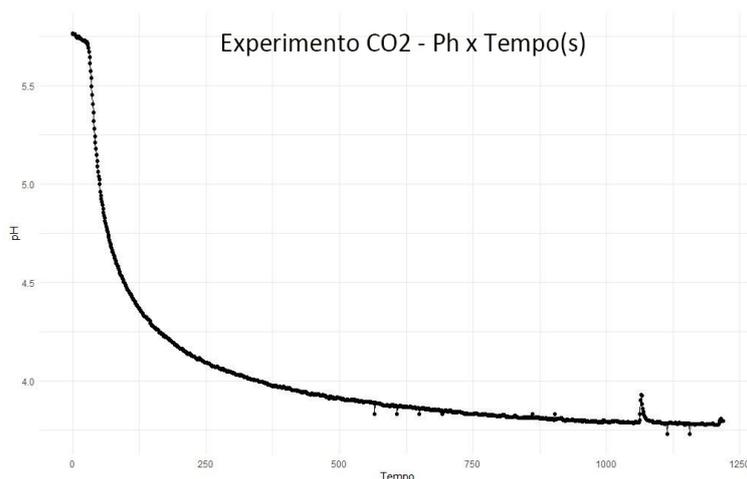


Figura 4. pH x Tempo.

As leituras foram realizadas com sucesso pelo módulo de pH conectado ao Arduino, mostrando a já esperada acidificação da água em forma de curva logarítmica causada pelo CO₂.

Os dados foram tomados a cada segundo para um melhor ajuste de curva. No entanto, é importante ressaltar que o intervalo de leitura pode ser facilmente ajustado para atender a diferentes demandas e necessidades específicas de outras aplicações.

Conclusão

O sistema desenvolvido demonstrou ser eficiente e confiável para o monitoramento de pH ao longo do tempo. A implementação do código permitiu a leitura automática do pH no intervalo de tempo especificado, e as leituras apresentam valores condizentes para o experimento proposto. É possível notar, a partir da análise gráfica da curva gerada, alguns pontos de desvio que se diferem do comportamento típico esperado, porém não são preocupantes, e já eram de se esperar, em razão da característica de protótipo eletrônico do sistema. Vale a pena salientar que, em um teste real em funcionamento contínuo por vários dias, esses valores seriam desprezíveis em razão da magnitude dos dados.

Além disso, o sistema foi capaz de armazenar os dados de pH em um cartão micro SD. As leituras foram registradas em um arquivo de *log* com a devida marcação temporal, possibilitando a posterior análise dos dados coletados, e criando uma base sólida para a implementação dessa tecnologia e de parâmetros que auxiliem o trabalho de pesquisa. A próxima etapa será a implantação desse sistema nos processos de cultivo de diferentes cepas de microalgas que são utilizadas no Laboratório de Genética e Biotecnologia Microbiana da Embrapa Agroenergia, para o desenvolvimento de biocombustíveis e bioprodutos. Serão adicionadas também sondas de medição de oxigênio dissolvido, nesse mesmo sistema e seguindo o mesmo padrão de implementação, de modo que sejam tomados dados tempo real dos cultivos dos microrganismos e se possa inferir a eficiência fotossintética das cepas de microalgas quando submetidas a diferentes condições de crescimento.

Referências bibliográficas

CARRASCO, J. M.; FRANQUELO, L. G.; BIALASIEWICZ, J. T.; GALVAN, E.; PROTILO GUIASADO, R. C.; PRATS, M. A. M.; LEON, J. I.; MORENO-ALFONSO, N. Power-electronic systems for the grid integration of renewable energy sources: a survey. *IEEE Transactions on Industrial Electronics*, v. 53, n. 4, p. 1002-1016, 2006.

CHO, C.; NAM, K. S.; SEO Y. H.; KIM, K.; PARK, Y.-K.; HAN, J.-I.; LEE, J.-Y. Study of optical configurations for multiple enhancement of microalgal biomass production. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, 2019. Article 1723. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41598-018-38118-w>. Acesso em: 2 Ago. 2023.

DERNER, R. B.; OHSE, S.; VILELLA, M.; CARVALHO, S. M. de; FETT, R. Microalgas, produtos e aplicações. **Ciência Rural**, v. 36, n. 6, p. 1959-1967, 2006. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/cr/a/PYnJkQqkcTfNqmrCTthMdS/>. Acesso em: 4 Ago. 2023.

NAGHDI, F. G.; DURAIRATNAM, R.; SKY, R. T. Comparative effects of biomass pre-treatments for direct and indirect transesterification to enhance microalgal lipid recovery. 2. Vol. **China: Frontiers in Energy Research**, 2014.

SUALI, E.; SARBATLY, R. Conversion of microalgae to biofuel. **Renewable & Sustainable Energy Reviews**, v. 16, n. 6, p. 4316-4342, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.rser.2012.03.047>. Acesso em: 4 Ago. 2023.

TRABALHOS COMPLETOS

QUÍMICA
RENOVÁVEL

Adsorção de carotenos de óleo de palma utilizando celulose como adsorvente

Erislene Silva de Almeida¹, Raquel Campanha Bombarda², Leonardo Valadares³, Marcos Ene Oliveira⁴, Simone Mendonça⁵

Resumo

Carotenos são compostos antioxidantes com importante função na manutenção da saúde humana. O óleo de palma é uma importante fonte natural de carotenos, sendo os isômeros α -caroteno e β -caroteno presentes majoritariamente. O processo industrial de refino desse óleo leva à destruição dos carotenos durante o branqueamento com terras diatomáceas (que também podem favorecer a oxidação) e durante a etapa de desodorização. Diferentes tipos de celulose que passaram por pré-tratamento com gordura refinada de palma se mostraram um material promissor e alternativo às terras diatomáceas. Por outro lado, as celulosas puras, nas condições estudadas, não foram capazes de concentrar quantidade significativa de carotenos. Considerando α -celulose, celulose microfibrilada e celulose nanocristalina com pré-tratamento, essa última apresentou maior potencial em adsorver os carotenos do óleo de palma.

Termos para indexação: óleo de palma, carotenos, celulose, cromatografia.

Introdução

Carotenoides podem ser precursores da vitamina A em humanos e podem desempenhar um papel na prevenção de alguns tipos de câncer, doenças cardíacas, doença de Alzheimer, doença de Parkinson, hipertensão, diabetes, além de auxiliar no crescimento e na renovação celular (Corrêa-Filho et al., 2019; Embrapa, 2023)

O β -caroteno é um pigmento com atividade antioxidante e de alto valor agregado, porém é suscetível à degradação por ação de luz, presença de oxigênio e temperatura (Corrêa-Filho et al., 2019). O processo de refino industrial leva à destruição de quase a totalidade dos carotenos do óleo de palma. Na etapa de branqueamento, são utilizadas terras diatomáceas, que são adsorventes que podem favorecer a oxidação, além de promover adsorção irreversível e consequente destruição de parte dos carotenos do óleo. Já os carotenos remanescentes dessa etapa são degradados durante a desodorização em processo chamado *heat bleaching* (Ribeiro et al., 2018; Almeida et al., 2019). Desse modo, estudos sobre materiais adsorventes que garantam maior preservação e possibilidade de outros usos dos carotenos são importantes por agregar valor à cadeia produtiva do dendê. Nesse sentido, este trabalho estuda a eficiência de diferentes tipos de celulose (α -celulose, celulose microfibrilada e celulose nanocristalina) na adsorção de carotenos do óleo de palma, para que posteriormente possam ser adicionados em ração animal, já que a terra diatomácea destrói os carotenos após a adsorção, e não é material seguro para a alimentação.

¹ Química, doutora em Tecnologia Química, Embrapa Agroenergia, erislene.almeida@colaborador.embrapa.br

² Química, mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Embrapa Agroenergia, raquel.campanha@embrapa.br

³ Químico, doutor em Química, Embrapa Agroenergia, leonardo.valadares@embrapa.br

⁴ Engenheiro químico, doutor em Bioengenharia, Embrapa Amazônia Oriental, marcos-ene.oliveira@embrapa.br

⁵ Farmacêutica e bioquímica, doutora em Saúde Pública, Embrapa Agroenergia, simone.mendonca@embrapa.br

Materiais e métodos

Para realização dos experimentos, foram utilizadas α -celulose (Sigma-Aldrich); celulose nanocristalina (CNC) (CelluForce); celulose microfibrilada (MFC), produzida na Unidade Embrapa Floresta, em Colombo, PR; gordura refinada de palma da marca Tauá, adquirida via comércio; óleo de palma híbrido (*Elaeis guineenses x Elaeis oleifera*), cedido pela indústria de óleo Marborges, localizada no Pará; e padrões de α -caroteno, β -caroteno e 9-*cis*- β -caroteno (Sigma-Aldrich).

Pré-tratamento dos adsorventes α -celulose, celulose microfibrilada e celulose nanocristalina

Em béquer de 100 mL, foram pesados 50 g de gordura refinada de palma. Em seguida, 1,5 g (3%) do respectivo adsorvente: α -celulose, CNC ou MFC foi adicionado à gordura em três alíquotas de 0,5 g. O béquer contendo a mistura (gordura e primeira alíquota) foi levado ao ultraturrax por 2 minutos a 10.650 x g. A cada 2 min, foi adicionada uma alíquota de adsorvente. A agitação foi mantida por 30 minutos, e a cada 10 min a mistura era levada ao banho de gelo para resfriar até cerca de 30 °C. O adsorvente foi separado do óleo por centrifugação a 10.650 x g, temperatura ambiente, por 5 minutos. Com auxílio de pipeta, as fases foram separadas; por fim, o excesso de gordura da fração sólida foi extraído com de papel toalha. Os materiais foram preparados em duplicata.

Adsorção dos carotenos em celulose

Os ensaios de adsorção foram realizados com os adsorventes pré-tratados, e com α -celulose, CNC e MFC puras, conforme procedimento descrito a seguir, em triplicata. Em balão de fundo redondo de 250 mL foram pesados 50 g de óleo de palma e adicionado aproximadamente 0,15 g de solução aquosa de ácido cítrico 30% (m/m), seguido da adição de 0,50 g do material adsorvente. A mistura foi agitada manualmente para homogeneizar o sistema, e o balão foi levado ao rotaevaporador nas seguintes condições: temperatura de 80 °C e tempo de processamento de 1 hora.

A seguir, o óleo branqueado com as celulosas foi centrifugado, com o material ainda quente, a 10.000 x g por 20 min. A fração oleosa (óleo branqueado) foi coletada em frasco âmbar para posterior determinação de isômeros de caroteno por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). A fração adsorvente impregnada com óleo residual foi seca com auxílio de papel toalha, para se extrair o excesso de óleo ainda presente nesses materiais, para posteriormente realizar a dessorção de carotenos dos adsorventes e a avaliação de possível degradação de carotenos.

Dessorção dos carotenos da celulose

Em microtubos com capacidade de 2 mL, foi pesado, aproximadamente, 0,05 g dos adsorventes obtidos no tópico anterior. Foi adicionado 1 mL de uma mistura metanol:MTBE (1:1); foi realizada agitação em vórtex por aproximadamente 1 min e em seguida os microtubos foram centrifugados por 2 min a 650 x g. A fração líquida foi coletada em balões de 50 mL, previamente pesados. Essa extração dos carotenos da celulose foi repetida até o solvente permanecer incolor. Os balões foram levados ao rotaevaporador a 40 °C. O óleo obtido foi pesado para posterior realização de análise dos carotenos dessorvidos dos diferentes tipos de celulose por HPLC.

Perfil de carotenoides HPLC

As análises de HPLC foram realizadas para se determinar o conteúdo de α -caroteno, β -caroteno e 9-*cis*- β -caroteno, nos óleos branqueados com α -celulose, MFC e CNC com e sem pré-tratamento, e também no material obtido da dessorção.

Extração dos carotenos

Em tubo de ensaio, foi pesado 0,13 g de óleo branqueado, e foi utilizado todo material obtido da dessorção. Para extração dos carotenos, primeiramente foram adicionados 2 mL de acetona, seguido de homogeneização em banho ultrassônico durante 1 min. Posteriormente, foram adicionados 3 mL de éter de petróleo e 10 mL de água destilada. A fase superior (éter de petróleo + carotenoides) foi coletada e, com o auxílio de uma pipeta de Pasteur de vidro, foi transferida para um tubo de ensaio com tampa. Uma nova extração na fase aquosa foi realizada com 2 mL de acetona, com posterior agitação em vórtex durante 5 seg, adição de 3 mL de éter de petróleo e sonicação durante 1 min. As frações ricas em carotenos foram coletadas e agregadas ao primeiro extrato. A extração foi repetida até que a fase etérea ficasse incolor.

Saponificação

A saponificação foi feita com uma solução de 10% de KOH em metanol. Em tubos de ensaio com tampa, essa solução foi adicionada aos carotenos extraídos anteriormente, permanecendo no escuro *overnight* em temperatura ambiente. Após esse período, a fase rica em carotenos foi coletada com pipeta de Pasteur e transferida para um funil de separação, e 5 mL de éter de petróleo foram adicionados ao extrato metanólico do tubo de ensaio, sendo a fase etérea coletada, juntando-a com a anteriormente retirada. À fase rica em carotenos coletada em funil de separação, foram adicionados 50 mL de água destilada. A lavagem da fase etérea do funil com água destilada foi repetida por três vezes. O extrato etéreo foi recolhido e passado através de um funil contendo algodão e sulfato de sódio anidro para eliminar o excesso de umidade, alíquotas de éter foram utilizadas para 'lavar' o sulfato e minimizar perda dos carotenos. A filtração foi feita diretamente para um balão. O extrato final obtido foi concentrado em rotaevaporador em balões de 50 mL. O extrato rico em carotenos obtidos da dessorção foi ressuscitado em 2 mL de metanol:MTBE e o extrato obtido do óleo branqueado foi ressuscitado em 3 mL de metanol:MTBE.

HPLC

A análise cromatográfica foi executada em um cromatógrafo a líquido de alta eficiência (HPLC) (Agilent 1290 Infinity LC), equipado com detector de arranjo de diodos, ajustado para aquisição de dados em 450 nm. Os carotenoides foram separados em uma coluna C30 YMC Carotenoid (250 × 4.6 mm) a 25 °C. Empregou-se eluição por gradiente, utilizando-se diferentes proporções de misturas de metanol:MTBE:água 81:15:4 v/v/v (A) e metanol:MTBE:água 46:50:4 v/v/v (B), com fluxo de 1 mL/min e volume de injeção de 10 µL. O tempo da corrida cromatográfica foi de 40 minutos. Padrões comerciais foram usados para identificar os picos dos carotenoides. Os padrões de α -caroteno, β -caroteno e 9-*cis*- β -caroteno foram solubilizados em diclorometano grau HPLC, e preparam-se oito diluições em metanol: MTBE 50:50 em concentrações abrangendo a faixa de 0,1 µg/mL a 50 µg/mL para realizar a calibração.

Resultados e discussão

O pré-tratamento das celuloses foi realizado em duplicada. Para cada replicata das celuloses tratadas, bem como para as celuloses puras, realizou-se o ensaio de adsorção com três repetições.

Para determinar a influência das condições experimentais na degradação dos carotenos, foram realizados três tipos de controles, que seguiram o procedimento descrito na metodologia, porém sem adição dos adsorventes. No controle C1, o experimento foi realizado em temperatura ambiente e adição de ácido cítrico. O C2 foi realizado com temperatura de 80 °C e adição de ácido cítrico. Já C3 foi realizado com temperatura de 80 °C e sem o ácido cítrico. Os resultados foram comparados

pela aplicação do teste de Tukey ($p \leq 0,05$), indicando que a temperatura tem alguma influência na degradação de carotenos.

Para comparação do teor dos carotenos destruídos e adsorvidos, uma amostra de óleo bruto (CPO) foi saponificada e analisada em HPLC. O CPO apresentou, respectivamente, 175 μg de α -caroteno, 663 μg de β -caroteno e 97 μg de 9-*cis*- β -caroteno por grama de óleo. Esses valores foram comparados aos encontrados nos óleos branqueados (Figura 1). Os óleos branqueados com as celuloses que passaram pelo pré-tratamento apresentaram um menor teor de carotenos que o CPO, indicando que houve adsorção. As celuloses sem tratamento com gordura, por sua vez, não foram capazes de adsorver significativamente nenhum dos três carotenos em estudo, nas condições experimentais trabalhadas. Uma possível explicação é o fato de a gordura utilizada no pré-tratamento ser hidrofóbica, assim como os carotenos presentes majoritariamente no óleo, enquanto a celulose pura é um material de caráter hidrofílico.

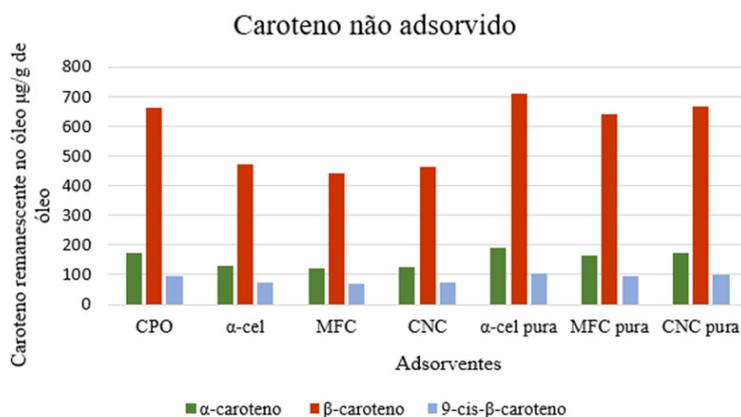


Figura 1. Comparação entre os carotenos quantificado no CPO e os carotenos remanescentes no óleo após adsorção.

Considerando a quantidade de cada caroteno presente no óleo de palma bruto (CPO) como 100%, foi calculada a porcentagem de cada isômero adsorvido utilizando apenas 1% em massa dos adsorventes. As celuloses com pré-tratamento adsorveram percentual considerável dos três carotenos estudados, enquanto entre as celuloses pura apenas a MFC mostrou pequena capacidade adsorptiva, o que pode ser explicado pela forma como a MFC é preparada, a partir de celulose microcristalina (Sigma) que passa por tratamento com ácidos graxos, semelhante ao descrito na metodologia deste trabalho. Porém, como essa celulose passou por processo de lavagem com hexano e secagem em estufa, acredita-se que, mesmo sendo feita a lavagem, algum percentual de ácidos graxos permanece aderido à celulose, favorecendo a interação com os carotenos.

Tabela 1. Porcentagem de carotenos adsorvidos pela celulose em comparação com o CPO.

	% caroteno adsorvido do óleo branqueado		
	α -caroteno	β -caroteno	9- <i>cis</i> - β -caroteno
α -cel	25,45	28,82	23,94
MFC	30,28	33,45	28,19
CNC	27,82	30,25	25,33
α -cel pura	0	0	0
MFC pura	4,95	3,72	2,1
CNC pura	0	0	0

A Figura 2 mostra os carotenos desorvidos das celuloses com pré-tratamento. Pôde ser observado um aumento na concentração de α -caroteno no final do processo, o que ocorreu com os três tipos de celulose estudadas. O 9-*cis*- β -caroteno também teve um aumento considerável em sua concentração. Dos três tipos de celulose estudados, a CNC foi a que demonstrou maior capacidade de concentrar os carotenos citados. Considerando o β -caroteno, a α -celulose foi o adsorvente que apresentou maior capacidade de concentrar esse caroteno.

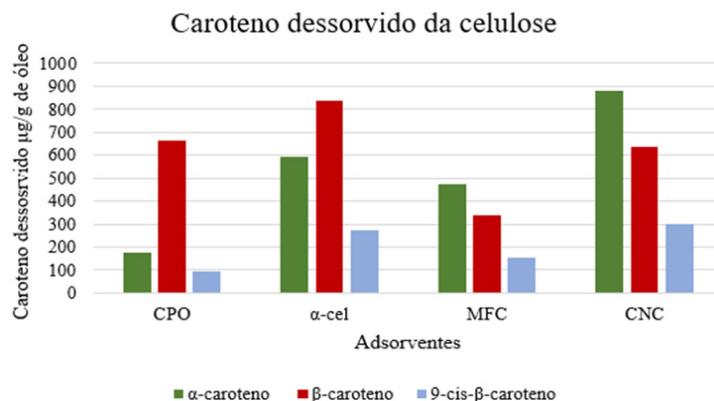


Figura 2. Comparação entre o teor de carotenos do CPO e o extraído dos adsorventes.

Conclusão

Os ensaios de adsorção de carotenos do óleo de palma mostraram que é possível concentrá-los em diferentes tipos de celulose, desde que essas passem por pré-tratamento com a gordura, que possui maior afinidade com os carotenos. Um possível seguimento para o estudo será testar novas condições experimentais, como temperaturas mais brandas e diferentes concentrações de adsorventes para se aumentar a quantidade de carotenos recuperados/adsorvidos pela celulose, além de celulose de fontes renováveis, como a nanofibra de celulose, que é produzida na Embrapa Agroenergia, a partir de engajo de dendê.

Referências bibliográficas

ALMEIDA, E. S.; CARVALHO, A. C. B.; SOARES, I. O. DE S.; VALADARES, L. F.; MENDONÇA, A. R. V.; SILVA JR, I. J.; MONTEIRO, S. Elucidating how two different types of bleaching earths widely used in vegetable oils industry remove carotenoids from palm oil: Equilibrium, kinetics and thermodynamic parameters. *Food Research International*, v. 121, p. 785-797, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.12.061>

CORRÊA-FILHO, L. C.; LOUERENÇO, M. M.; MOLDÃO-MARTINS, M.; ALVES, V. D. Microencapsulation of β -Carotene by spraydrying: effect of wall material concentration and drying inlet temperature. *International Journal of Food Science*, e8914852, 2019. DOI: 10.1155/2019/8914852

EMBRAPA. **Pesquisadores desenvolvem método para microencapsular betacaroteno presente na fibra do dendê**. Disponível em: <https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/65866779/pesquisadores-desenvolvem-metodo-para-microencapsular-betacaroteno-presente-na-fibra-do-dende>. Acesso em: 19 set. 2023.

RIBEIRO, J. A. A.; ALMEIDA, E. S.; NETO, B. A. D.; ABDELNUR, P. V.; MONTEIRO, S. Identification of carotenoid isomers in crude and bleached palm oils by mass Spectrometry. *LWT - Food Science and Technology*. v. 89, p. 631-637, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.11.039>

Análise qualitativa da vinhaça para posterior tratamento e reuso

Caroline Ramos Pereira¹, Marcela Marques de Freitas Lima²

Resumo

A vinhaça é um subproduto proveniente da produção de etanol. Assim, conforme aumenta a demanda por etanol, cresce também a produção dos subprodutos e resíduos gerados com esse processo. A vinhaça pode ser conhecida também como vinhoto e atualmente é utilizada na fertirrigação, em virtude da grande quantidade de benefícios que apresenta. A quantidade de vinhaça produzida por litro de etanol é muito alta, tornando isso um problema para a indústria. O vinhoto é mais contaminante que o esgoto doméstico, por sua composição, que possui altos valores de Demanda Química Oxigênio (DQO) e Demanda Bioquímica Oxigênio (DBO), além de ser corrosivo e ácido ao sair da torre de destilação (Silva et al., 2007). Existem diversos métodos reportados na literatura para a destoxificação parcial do resíduo para que ele possa ser aplicado na fertirrigação. A combinação das técnicas de coagulação, floculação e fotocatalise apresentou uma melhora no vinhoto, deixando-o dez vezes menos tóxico que no início, com uma redução de aproximadamente 68% de DQO (Souza et al., 2016). Contudo, não há estudos sobre a composição ou mesmo a toxicidade desse resíduo. Neste trabalho, foram analisadas amostras de vinhaça utilizando a técnica de cromatografia, sendo ela em papel e em coluna. Dessa forma, posteriormente, será possível analisar individualmente cada analito. Foram estabelecidas as técnicas que melhor atendiam ao processo, que se dá início com a concentração da vinhaça, seguida dos testes de solventes com melhor interação, utilizando a técnica de cromatografia em papel, e assim sendo possível a realização da cromatografia em coluna. As amostras obtidas a partir da coluna foram analisadas no espectrômetro UV-VIS para separação dos principais componentes de cada extrato. Todo o processo foi realizado novamente após o tratamento da vinhaça. A partir de 1 L de vinhaça foram obtidos 48,3718 g de extrato, em que o componente majoritário foi caracterizado por espectrofotometria UV-VIS e reconcentrado para futura caracterização estrutural por RMN e espectrometria de massas.

Termos para indexação: vinhaça, vinhoto, DQO, DBO, etanol.

Introdução

A vinhaça é um subproduto proveniente da produção de etanol, considerado um resíduo. Apresenta coloração marrom-escura, odor desagradável e forte, pH baixo, alta proporção de potássio, além de elevados valores de Demanda Química Oxigênio (DQO) e Demanda Bioquímica Oxigênio (DBO) (Silva et al., 2014). Ela proveniente da fermentação do caldo para a obtenção do etanol e pode ser conhecida por vários nomes, entre eles vinhoto, restilo, tiborna, garapão e calda. Para cada litro de álcool produzido são gerados em média de 10 L a 15 L de vinhaça, que é constituída principalmente de água (Souza et al., 2013).

Ao longo dos anos, o mundo viu a necessidade da utilização de biocombustíveis como uma alternativa às misturas fósseis (Pedro-Escher et al., 2016). Em novembro de 1975, o Brasil criou um decreto governamental com o intuito de reduzir a dependência do petróleo, o que deu origem ao

¹ Engenheira química, mestranda em Química, Unesp- Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas- Campus de São José do Rio Preto, caroline.ramos@unesp.br

² Química, doutora em Química, Unesp- Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas- Campus de São José do Rio Preto, marcela-marques.lima@unesp.br

Programa Nacional do Álcool ou Proálcool (Agência FAPESP, 2016). Em relação a outros países na atualidade, o Brasil é um dos maiores produtores e consumidores de etanol anidro, em razão do consumo de gasolina, e até na forma de etanol hidratado (Brasil, 2016).

Segundo a Companhia Nacional de Abastecimento (2022), estima-se a produção de 596,1 milhões de toneladas de cana-de-açúcar para a safra de 2022/2023, um acréscimo de 1,9% no que refere à safra 2021/2022. Já a produção de etanol deve chegar a 28,66 bilhões de litros, provenientes da cana-de-açúcar e do milho.

Atualmente, a vinhaça é utilizada na fertirrigação do cultivo de cana-de-açúcar, por ser uma forma mais viável para o seu descarte (Freire; Cortez 2000). Além disso, possibilita redução na mão de obra, compactação do solo e morte de soqueiras, proporcionando melhor aproveitamento para a plantação (Dourado Neto et al., 2001). A fertirrigação proporciona integração de nutrientes, entre eles potássio, fósforo, magnésio, nitrogênio, cálcio e enxofre (Camargo, 2022).

Apesar de a vinhaça apresentar muitos benefícios, ainda assim apresenta diversos fatores que dificultam o seu uso. Por exemplo, o vinhoto possui metano (CH_4), que contribui com cerca de 99,84% para os gases de efeito estufa (GEE); já o óxido nitroso (N_2O) tem a atuação insignificante no problema (Oliveira et al., 2013).

A vinhaça chega a ser cem vezes mais contaminante que a água de esgoto doméstico, e é prejudicial à flora, à fauna, à microfauna, à microflora das águas doces, e pode espantar a fauna marinha que se aproxima das costas brasileiras para a reprodução (Freire; Cortez, 2000). Apesar de a vinhaça ser utilizada na fertirrigação, ainda é um problema para as indústrias sucroalcooleiras, pois o volume produzido é muito maior do que o utilizado nos campos. Por isso, ainda se vê a necessidade de pesquisas para minimizar os danos causados pela vinhaça (Lima et al., 2012).

A combinação das técnicas de coagulação, floculação e fotocatalise provocou uma melhora na vinhaça, deixando-a dez vezes menos tóxica que no início, com uma redução de aproximadamente 68% de DQO (Souza et al., 2016). A destoxificação parcial do resíduo permite que ele possa ser aplicado na fertirrigação, contudo, não há estudos sobre a composição ou mesmo toxicidade desses resíduos. Neste trabalho, selecionou-se a melhor mistura de solventes para cromatografia de um extrato de vinhaça concentrado por evaporação rotativa a vácuo, usando cromatografia planar, com posterior cromatografia em coluna, em que o analito majoritário foi pré-caracterizado por espectrofotometria UV-VIS e reconcentrado para futura caracterização estrutural por ressonância magnética e espectrometria de massas.

Materiais e métodos

Foi realizada uma parceria com a Usina Tereos, estabelecida na cidade de Olímpia, SP, que forneceu em média 40 litros para o estudo. A vinhaça foi armazenada em recipientes de plástico de 5 L no congelador a aproximadamente $-38\text{ }^\circ\text{C}$.

Primeiro, foi realizada a concentração da vinhaça. Para isso, foi utilizado sistema de evaporação rotativa acoplado a um banho ultratermostático com temperatura de $85 \pm 5\text{ }^\circ\text{C}$ e a um sistema de bombas compressoras que permitiu atingir a pressão de $425 \pm 25\text{ mbar}$. O tempo total de concentração foi de cerca de 12 horas. Após o processo, restou um concentrado de 48,3718 g de vinhaça.

Alíquotas de 0,5 g da vinhaça concentrada foram usadas em ensaios de solubilização com 4 mL dos seguintes solventes: clorofórmio, metanol, acetona, hexano, álcool isopropílico e água. Para a análise de cromatografia por camada delgada (TLC), foi utilizada a placa de sílica como fase fixa e para a determinação do melhor eluente de arraste foram testadas diferentes proporções de metanol

e álcool isopropílico, que apresentaram melhores solubilizações. Conforme descrito na Tabela 1, em todos os testes diluiu-se a vinhaça com água destilada. Na análise, usou-se cuba de 250 mL, mas foram necessários apenas 10 ml da fase móvel. As placas foram analisadas fora e dentro da câmara escura UV, e foram utilizados comprimentos de ondas de 365 nm e 254 nm.

Tabela 1. Composições testadas como eluente de arraste da TLC.

Solventes	Metanol	Álcool isopropílico
Teste 1	50%	50%
Teste 2	75%	25%
Teste 3	25%	75%

Para a cromatografia de coluna rápida (flash), foi usada uma pera insufladora para pressão positiva, a fase estacionária usada foi a sílica gel da marca Supelco (40 μm –63 μm) previamente seca a 95 ± 5 °C por 2 dias. A melhor fase móvel encontrada foi a mistura de metanol e álcool isopropílico. O extrato teve que ser diluído em uma pequena fração da mistura dos solventes utilizados na coluna, e na sequência foi depositado na superfície da sílica e deixado em repouso por alguns minutos. As alíquotas da cromatografia foram armazenadas em tubos de ensaio com tampa e analisadas por espectrofotometria UV-VIS faixa de 200 nm a 800 nm.

Resultados e discussão

Na concentração do teste 1, observou-se o arraste por TLC (cromatografia plana), mas ele ainda não apresentou o resultado esperado, ou seja, a definição e a separação das manchas dos analitos. No teste 2, observou-se arraste e foi o resultado mais próximo do esperado. Já no teste 3, foi observado o arraste, mas ele não apresentou o resultado esperado.

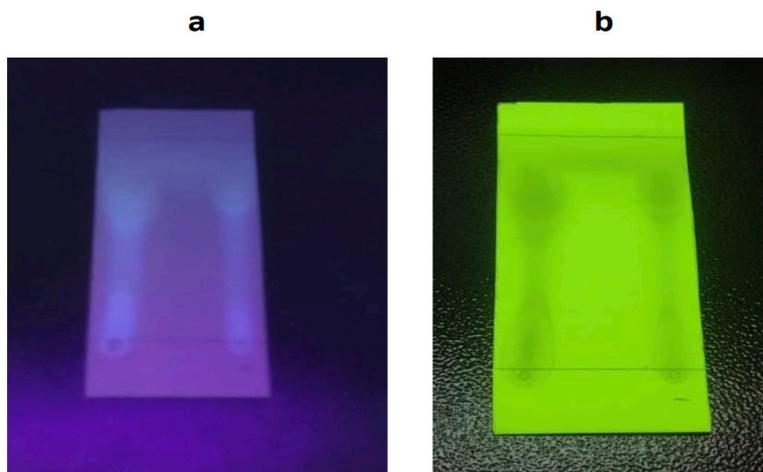


Figura 1. Placas cromatográficas do teste 2, fase estacionária sílica, fase móvel 75% de metanol e 25% de álcool isopropílico, analisadas nos comprimentos de ondas (a) 365 nm e (b) 254 nm.

Dentro das concentrações testadas, o teste 2 foi o que melhor atendeu aos requisitos esperados. Como mostrado na figura, a imagem da esquerda foi analisada no comprimento de onda 365 nm e a da direita, no comprimento de onda 254 nm.

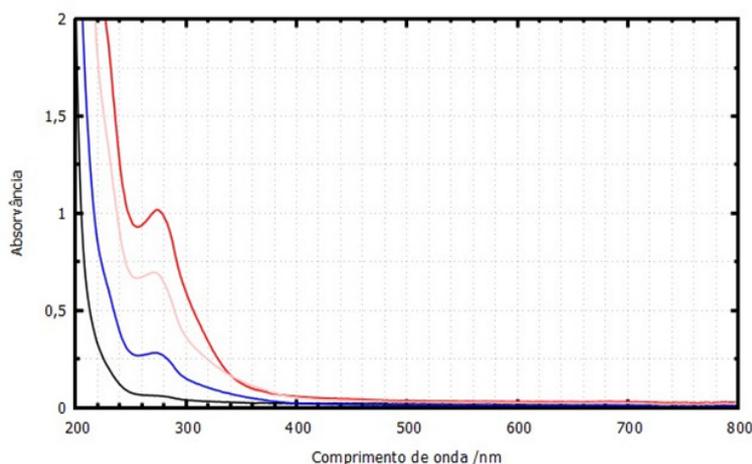


Figura 2. Espectro de varredura UV-VIS das frações 08, 11, 16 e 21 da cromatografia em coluna flash com fase estacionária sílica, fase móvel 75% de metanol e 25% de álcool isopropílico. A fração 08 está sendo representada na cor preta; a fração 11, na cor rosa; a fração 16, na cor vermelha; e a fração 21, na cor azul.

Em seguida, realizaram-se as análises em UV-VIS para rastrear os compostos. Nas primeiras 71 frações, foi identificado apenas um tipo de espectro com comprimento de onda máximo na região de 275 nm. As 71 frações foram reconcentradas e encaminhadas para RMN e espectrometria de massas.

Conclusão

Neste trabalho, foi selecionada a melhor mistura de solventes para extração dos componentes polares da vinhaça, obtida na Usina Tereos. Por meio de concentração a vácuo, foi obtido um extrato, que após análise cromatográfica foi caracterizado qualitativamente por meio de espectrofotometria UV-VIS. Foi possível constatar pelo menos um analito, que merece investigação para sua caracterização estrutural. Por meio deste estudo, pretende-se analisar também os componentes da vinhaça após tratamento de destoxificação usando biopolímeros derivados de biomassa.

Referências bibliográficas

- AGÊNCIA FAPESP. **Proálcool**: uma das maiores realizações do Brasil baseadas em ciência e tecnologia. FAPESP, 2016. Disponível em: <https://agencia.fapesp.br/proalcool-uma-das-maiores-realizacoes-do-brasil-baseadas-em-ciencia-e-tecnologia/24432>. Acesso em: jun. 2022.
- BRASIL. Ministério de Minas e Energia. Agência Nacional de Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis. **Etanol**. 2016. Disponível em: <https://www.gov.br/anp/pt-br/assuntos/producao-e-fornecimento-de-biocombustiveis/etanol>. Acesso em: jun 2022.
- CAMARGO, R. **Vinhaça**: do resíduo ao produto. São Paulo: União da Indústria de Cana-de-Açúcar e Bionergia, 2022. Disponível em: <https://unica.com.br/noticias/artigo-vinhaca-do-residuo-ao-produto/>. Acessado em: Jun. 2022.
- COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Cana-de-açúcar deve ter aumento de produção na safra 2022/2023**. Brasília, 2022. Disponível em: <https://www.conab.gov.br/ultimas-noticias/4601-cana-de-acucar-deve-ter-aumento-de-producao-na-safra-2022-2023>. Acesso em: jun. 2022.
- DOURADO NETO, D.; FRIZZONE, J. A.; FANCELLI, A. L.; PIRES, R. C. de M. Fertirrigação. In: MIRANDA, J. H. de; PIRES, M. R. de M. **Irrigação**. Piracicaba: FUNEP, 2001.
- FREIRE, W. J.; CORTEZ, L. A. B. **Vinhaça de cana-de-açúcar**. Guaíba: Agropecuária, 2000.
- LIMA, H. H. S, BEZERRA, A. F., RODRIGUES, E. G. S., JAGUARIBE, E. F., SENA, R. F. Tratamento físico-químico da vinhaça por coagulação e adsorção em carvão ativado do bagaço da cana de açúcar. In: ENCONTRO NACIONAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA/UEPB, 2012. **Anais...** [João Pessoa]: Universidade Estadual da Paraíba, 2012. Disponível em: https://www.editorarealize.com.br/editora/anais/enect/2012/Poster_665.pdf. Acesso em: jun de 2022.

- OLIVEIRA, B. G. de; CARVALHO, J. L. N.; CERRI, C. E. P.; CERRI, C. C.; FEIGL, B. J. Soil greenhouse gas fluxes from vinasse application in Brazilian sugarcane areas. **Geoderma**, v. 200-201, p. 77-84, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.geoderma.2013.02.005>. Acesso em: jul. 2022.
- PEDRO-ESCHER, J.; CHISTOFOLETTI, C. A.; ANSOAR-RODRÍGUEZ, Y.; FONTANETTI, C. S. Sugarcane toxic vinasse, a residue of ethanol industry: cytotoxic and genotoxic potential using the *Allium Cepa* test. **Journal of Environmental Protection**, v. 7, n. 5, p. 602-612, 2016. Disponível em: https://www.scirp.org/pdf/JEP_2016040714035991.pdf. Acesso em: jul. 2022.
- SILVA, A. P. M. da; BONO, J. A. M.; PEREIRA, F. de A. R. Aplicação de vinhaça na cultura de cana-de-açúcar: efeito no solo e na produtividade de colmos. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 18, n. 1, p. 38-43, 2014. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/rbeaa/a/YSZnrzRVh39DRYz4KmpWSFg/?format=pdf&lang=pt> Acesso em: jun. 2022.
- SILVA, M. A. S.; GRIEBELER, N. P.; BORGES, L. C. Uso de vinhaça e impactos nas propriedades do solo e lençol freático. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 11, n. 1, p. 108-114, 2007. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/rbeaa/a/vxTJ6yw3YP7bsCx7qC3Qcdj/?format=pdf&lang=pt>. Acesso em: maio 2022.
- SOUZA, R. P. de; LIMA, A. M. F.; PEZOTI, O.; SANTANA, V. S.; GIMENES, M. L.; FERNANDES-MACHADO, N. R. C. Photodegradation of sugarcane vinasse: evaluation of the effect of vinasse pre-treatment and the crystalline phase of TiO₂. **Acta Scientiarum: Technology**, v. 38, n. 2, p. 217-226, 2016. Disponível em: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=303245370011>. Acesso em: jun. 2022.
- SOUZA, R. P., GIRARDI, F., SANTANA, V. S., MACHADO, N. R. C. F., GIMENES, M. L. Vinasse treatment using a vegetable-tannin coagulant and photocatalysis. **Acta Scientiarum: Technology**, v. 35, n. 1, p. 89-95, 2013. Doi: 10.4025/actascitechnol.v35i1.11011. Acesso em: jul de 2022.

Caracterização química e avaliação nematotóxica de extratos hidroetanólicos de *Brassica carinata*

Rodrigo Wesley Nascimento de Melo¹, Larissa Andreani², José Antônio de Aquino Ribeiro³, Thales Lima Rocha⁴, Bruno Galvêas Laviola⁵, Clenilson Martins Rodrigues⁶

Resumo

Novos biocidas naturais, com princípios ativos mais específicos e ambientalmente seguros, têm sido estudados como uma forma de contrapor os efeitos ambientais negativos do uso de nematicidas sintéticos de amplo espectro. As espécies pertencentes à família *Brassicaceae*, tal como a *Brassica carinata*, são conhecidas por apresentarem diversos glicosinolatos em seus tecidos vegetais. Sendo assim, a caracterização química e a avaliação do potencial nematotóxico dessas espécies são relevantes para o potencial desenvolvimento de novos biocidas. Os extratos hidroetanólicos de *B. carinata* avaliados forneceram bons rendimentos de extrativos. A variedade NuJet 400 apresentou menor número de metabólitos em comparação com a variedade NuCover STH100. Os extratos apresentaram ação nematostática expressiva. No entanto, o efeito nematicida da variedade NuJet 400 foi mais pronunciado em relação ao da variedade NuCover STH100, provavelmente em razão de uma maior concentração de compostos ativos nessa amostra.

Termos para indexação: *Brassica carinata*, metaboloma vegetal, nematicidas naturais, avaliação nematotóxica.

Introdução

Os efeitos ambientais negativos do uso de nematicidas sintéticos de amplo espectro de atuação dão impulso à busca por estratégias de controle de pragas agrícolas que utilizem princípios ativos específicos e ambientalmente seguros. Entre as soluções estudadas, diversos estudos na literatura avaliam a utilização de espécies *Brassicaceae* como cultura de rotação, adubo verde ou farinhas desengorduradas de sementes no controle de pestes e patógenos do solo (Nicola et al., 2013; Curto et al., 2016).

A família *Brassicaceae* conta com mais de 3.500 espécies, dentre as quais encontra-se a *Brassica carinata*. As plantas dessa família apresentam, em seus tecidos vegetais, cerca de 200 glicosinolatos que se diferenciam quanto à sua cadeia lateral orgânica: alifática, aromática ou heteroaromática (Curto et al., 2016). Esses glicosinolatos, quando em contato com a enzima endógena mirosinase, sofrem hidrólise, gerando cianetos orgânicos e isotiocianatos, compostos tóxicos para um grande número de fitopatógenos (D'Addabbo et al., 2020). Como a ação biocida de compostos ativos é dependente do perfil e da concentração desses compostos, que por sua vez variam conforme as espécies vegetais e os tecidos analisados, a caracterização química e a avaliação do potencial nematotóxico de diferentes espécies da família *Brassicaceae* são relevantes para o desenvolvimento de novos defensivos de origem renovável.

¹ Graduado em Química, Embrapa Agroenergia, rodwesley1995@gmail.com

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

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

⁴ Biólogo, doutor em Bioquímica, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, thales.rocha@embrapa.br

⁵ Agrônomo, doutor em Fitotecnia, Embrapa Agroenergia, bruno.laviola@embrapa.br

⁶ Químico, doutor em Química, Embrapa Agroenergia, clenilson.rodrigues@embrapa.br

Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi caracterizar o perfil químico de extratos de *B. carinata* e avaliar seu potencial nematotóxico contra juvenis de segundo estágio (J2) de *Meloidogyne incognita*, também conhecido como nematoide-das-galhas. Este fitonematoide, um dos mais comuns no Brasil, é responsável por severas perdas nas culturas da soja, do algodão, do café, do feijão, do milho e da cana-de-açúcar, com perdas anuais estimadas em R\$ 15 bilhões somente para a cultura da soja.

Materiais e métodos

Extração hidroetanólica - Esse processo foi avaliado em escala laboratorial empregando as variedades comerciais NuJet 400 e NuCover STH100 de sementes de *B. carinata* (fornecedor: Nuseed). As sementes foram secas até massa constante e foram moídas. Em sequência, as amostras passaram por processo de extração hidroalcoólica (não detalhada por questões de sigilo). Após a extração, os sobrenadantes foram filtrados por gravidade, rotaevaporados para a retirada do etanol, congelados e liofilizados. A massa resultante após processo de liofilização foi utilizada para a determinação do rendimento da extração (realizado em triplicata).

Atividade nematotóxica - Testes in vitro avaliaram a atividade nematotóxica dos extratos hidroetanólicos de *B. carinata* contra juvenis de segundo estágio (J2) de *M. incognita* obtidos a partir de ovos extraídos de raízes de plantas de tabaco (*Nicotiana tabacum*). Os testes foram realizados em triplicata e utilizaram água destilada e DMSO como controles negativos e etanol como controle positivo. Inicialmente, foi preparada solução estoque (50 mg/mL) de cada amostra utilizando DMSO para a solubilização. Foram transferidos 20 µL de cada solução estoque para um microcubo contendo: a) solução com 70 J2 e b) água destilada suficiente para completar 1 mL de solução total. Os microtubos foram homogeneizados e mantidos em temperatura ambiente sob proteção de luz. Após 48 horas, com auxílio de microscópio ótico e câmara de contagem de Peters, foi realizada a contagem dos J2 paralisados. Em seguida, foi realizado o “teste de recuperação”, com o objetivo de verificar a atividade nematicida ou nematostática dos extratos avaliados. As amostras foram centrifugadas de 650 a 700 x g com posterior retirada do sobrenadante e adição sequencial de água para enxague dos fitonematoides, processo que foi repetido por três vezes para garantir a remoção dos compostos nematicidas da solução. Por fim, os microtubos com fitonematoides foram mantidos em temperatura ambiente por mais 24 horas. Ao término desse período, a partir de observação em microscópio ótico, foram considerados mortos os fitonematoides que permaneceram paralisados (ação nematicida) e considerados paralisados os nematoides que recobriram a movimentação (ação nematostática).

Caracterização química por UHPLC-PAD e UHPLC-HRMS/MS - Análises por UHPLC-PAD foram realizadas em coluna cromatográfica Acquity UHPLC HSS-T3 RP18 (1,8 µm, 2,1 mm x 150 mm) na temperatura de 40 °C e volume de injeção de 1 µL. O gradiente de separação empregado foi composto pelas fases móvel: A1: H₂O + ácido trifluoroacético (TFA) 0,05% e B1: Acetonitrila + TFA 0,05%, com tempo total de análise de 32 min. A varredura foi realizada no intervalo de 200 nm a 400 nm e em quatro canais 2D (210 nm, 254 nm, 280 nm e 330 nm). Amostras também foram analisadas em espectrômetro de massas de alta resolução do tipo Q-TOF-MS MaXis 4G (Bruker), operado em modo de ionização positiva (ESI(+)-MS/MS) e negativa (ESI(-)-MS/MS). Os parâmetros instrumentais utilizados foram tensão capilar: 3.800 V; pressão do nebulizador: 4,0 bar; temperatura da fonte: 200 °C; e fluxo de gás N₂: 9,0 L/min. A separação dos compostos foi realizada em UHPLC (Nexera X2, Shimadzu) com coluna cromatográfica de fase reversa HSS-T3 (2,1 mm x 150 mm, 1,8 µm, Waters) e temperatura de 40 °C. A fase móvel consistiu de A: H₂O + 0,1% ácido fórmico e B: acetonitrila + 0,1% ácido fórmico. O sistema de eluição empregou programação em modo gradiente linear com tempo total de 25 min., sendo iniciado com 100% da fase A e vazão de 400 µL/min.

Resultados e discussão

A extração hidroetanólica apresentou rendimento de $18,10 \pm 0,18\%$ para a variedade comercial NuJet 400 e $16,81 \pm 0,22\%$ para a NuCover STH100. Esses resultados estão próximos ao observado para amostra de crambe ($18,60 \pm 1,59\%$) e são inferiores à extração hidroetanólica de canola ($24,37 \pm 1,79\%$), espécies de Brassica avaliadas anteriormente pelo grupo. A avaliação de atividade nematotóxica, por sua vez, indicou que ambas as amostras possuíam efeito nematostático, apresentando $100,00 \pm 0,00\%$ e $98,81 \pm 2,06\%$ de fitonematoides paralisados para os extratos das variedades NuJet400 e NuCover STH100, respectivamente. O extrato de *B. carinata* NuJet 400, no entanto, apresentou efeito nematocida mais pronunciado ($98,06 \pm 1,81\%$) em comparação com o extrato de *B. carinata* STH100 ($80,20 \pm 8,65\%$).

Técnicas analíticas de caracterização foram utilizadas na avaliação de metabólitos com grupos cromóforos por UHPLC-PAD, revelando que os extratos hidroetanólicos das duas variedades comerciais de *B. carinata* apresentavam complexa composição química com inúmeras bandas cromatográficas registradas nas análises. A Figura 1 apresenta os cromatogramas obtidos para as amostras avaliadas em 210 nm. No entanto, cromatogramas dos extratos em 254 nm, 280 nm e 330 nm (não mostrados) também foram levados em consideração para a avaliação do perfil químico do material. Os metabólitos detectados eluíram majoritariamente na porção inicial dos cromatogramas (t_r entre 1 min. e 11 min.), indicando que os extratos são compostos, em sua maioria, por moléculas polares. Observou-se que o extrato da variedade NuJet 400 (Figura 1A) apresentou dois compostos majoritários e muito intensos ($\lambda = 210$ nm, $t_r = 1,441$ min. e 7,560 min.). A avaliação do perfil espectral da amostra (espectros UV não mostrados) indicou a ocorrência de compostos fenólicos, aminoácidos, flavonóis e flavonas. Além disso, foram observados picos cromatográficos com perfil UV similar ao da amina alcaloidal sinapina. Já a variedade NuCover STH100 (Figura 1B) apresentou extrato com picos cromatográficos menos intensos, mas com uma maior distribuição de metabólitos, destacando-se quatro compostos majoritários ($\lambda = 210$ nm, $t_r = 1,445$ min., 7,550 min., 8,351 min. e 9,200 min.). O perfil espectral dos picos cromatográficos eluídos sugeriu a ocorrência de compostos fenólicos, derivados do ácido sinapílico, aminoácidos, flavonas e, como observado para a variedade NuJet 400, picos cromatográficos com o perfil UV similar ao da amina alcaloidal sinapina.

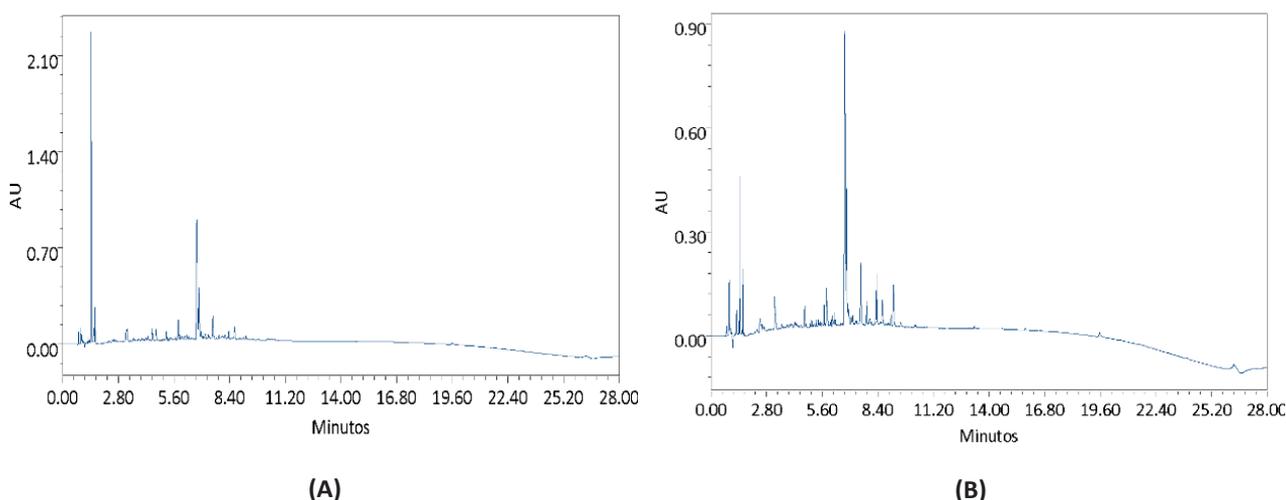


Figura 1. Cromatogramas obtidos por UHPLC-PAD para os extratos hidroetanólicos das sementes de *Brassica carinata* (A) NuJet 400 e (B) NuCover STH100 em 210 nm.

A caracterização metabolômica por UHPLC-HRMS/MS do extrato hidroetanólico das sementes de *B. carinata*, variedade NuJet 400, detectou 29 picos pertencentes a íons precursores no

modo positivo e 13 no modo negativo, após os tratamentos de *deconvolution* e *dissect* (cromatogramas não apresentados). Esses íons precursores foram fragmentados e seus perfis de alta resolução foram contrastados com bancos de dados, o que resultou na indicação de compostos compatíveis com o perfil de fragmentação observado. A Tabela 1 destaca alguns dos compostos atribuídos putativamente.

Tabela 1. Metabólitos identificados de forma putativa a partir de análises de UHPLC-HRMS/MS para o extrato de sementes de *B. carinata*, variedade NuJet 400.

Entrada	Tempo de retenção (t_R , min.)	Razão m/z e massa neutra	FM iônica e neutra (Da)	Composto provável
Modo positivo				
1	0,680	175,1198 174,1120	$C_6H_{15}N_4O_2^+$ $C_6H_{14}N_4O_2$	Arginina
2	0,710	133,0612 132,0535	$C_4H_9N_2O_3^+$ $C_4H_8N_2O_3$	Asparagina
3	0,900	325,1159 324,1070	$C_{13}H_{17}N_4O_6^+$ $C_{13}H_{16}N_4O_6$	Levofuraltadona
4	1,020	295,0964 294,0890	$C_{18}H_{15}O_4^+$ $C_{18}H_{14}O_4$	Dehidrocicloguanandina
5	3,130	268,1040 267,0970	$C_{10}H_{14}N_5O_4^+$ $C_{10}H_{13}N_5O_4$	Adenosina
Modo negativo				
6	0,770	195,0513 196,0580	$C_6H_{11}O_7^-$ $C_6H_{12}O_7$	Ácido glucônico
7	0,990	133,0140 134,0215	$C_4H_5O_5^-$ $C_4H_6O_5$	Ácido málico
8	1,200	358,0280 359,0340	$C_{10}H_{16}NO_9S_2^-$ $C_{10}H_{17}NO_9S_2$	Sinigrina
9	1,710	358,0275 359,0340	$C_{10}H_{16}NO_9S_2^-$ $C_{10}H_{17}NO_9S_2$	Sinigrina
10	3,540	463,0486 464,0560	$C_{16}H_{19}N_2O_{10}S_2^-$ $C_{16}H_{20}N_2O_{10}S_2$	4-Hidroxiglucobrassicina
11	4,540	447,0539 448,0610	$C_{16}H_{19}N_2O_9S_2^-$ $C_{16}H_{20}N_2O_9S_2$	Glucobrassicina

A caracterização metabolômica do extrato hidroetanólico das sementes de *B. carinata*, variedade NuCover STH100, indicou 33 picos pertencentes a íons precursores no modo positivo e 18 no modo negativo, após os tratamentos de *deconvolution* e *dissect* (não apresentados). Esses íons precursores foram fragmentados e seus perfis de alta resolução foram contrastados com bancos de dados, entre os quais destacam-se os compostos putativamente atribuídos na Tabela 2.

Em ambas as amostras, observou-se a presença de aminoácidos e nucleosídeos (entradas 1, 2 e 5 – Tabela 1; 2 e 3 – Tabela 2), compostos com ação biocida reconhecida (entradas 3 e 4 – Tabela 1; 1 e 4 – Tabela 2), ácidos carboxílicos (entradas 6 e 7 – Tabela 1; 5 e 6 – Tabela 2) e glicosinolatos e seus derivados (entradas 8 a 11 – Tabela 1; 7 a 9 – Tabela 2). Também foram identificadas moléculas com grupamentos cianeto. Destaca-se que a identificação do glicosinolato sinigrina para os extratos de *B. carinata* está de acordo com os estudos realizados por Curto et al. (2016).

Tabela 2. Metabólitos identificados de forma putativa a partir de análises de UHPLC-HRMS/MS para o extrato de sementes de *B. carinata*, variedade NuCover STH100.

Entrada	Tempo de retenção (t _R , min.)	Razão m/z e massa neutra	FM iônica e neutra (Da)	Composto provável
Modo positivo				
1	0,800	266,1233 265,1170	C ₁₁ H ₁₆ N ₅ O ₃ ⁺ C ₁₁ H ₁₅ N ₅ O ₃	2'-Deoxi-N ⁶ -metiladenosina
2	2,990	268,1030 267,0970	C ₁₀ H ₁₄ N ₅ O ₄ ⁺ C ₁₀ H ₁₃ N ₅ O ₄	Adenosina
3	4,340	205,0982 204,0900	C ₁₁ H ₁₃ N ₂ O ₂ ⁺ C ₁₁ H ₁₂ N ₂ O ₂	Triptofano
4	6,420	486,1479 485,1430	C ₂₃ H ₂₄ N ₃ O ₉ ⁺ C ₂₃ H ₂₃ N ₃ O ₉	Nocardicina D
Modo negativo				
5	0,760	195,0515 196,0580	C ₆ H ₁₁ O ₇ ⁻ C ₆ H ₁₂ O ₇	Ácido glucônico
6	1,010	133,0146 134,0220	C ₄ H ₅ O ₅ ⁻ C ₄ H ₆ O ₅	Ácido málico
7	1,200	358,0285 359,0340	C ₁₀ H ₁₆ NO ₉ S ₂ ⁻ C ₁₀ H ₁₇ NO ₉ S ₂	Sinigrina
8	1,700	358,0282 359,0340	C ₁₀ H ₁₆ NO ₉ S ₂ ⁻ C ₁₀ H ₁₇ NO ₉ S ₂	Sinigrina
9	4,410	463,0502 464,0560	C ₁₆ H ₁₉ N ₂ O ₁₀ S ₂ ⁻ C ₁₆ H ₂₀ N ₂ O ₁₀ S ₂	4-Hidroxioglucobrassicina

Conclusão

Os extratos hidroetanólicos de *B. carinata* forneceram bons rendimentos em termos de seus extrativos e respostas expressivas quanto ao efeito de paralisação dos fitonematoides. Quanto ao efeito nematicida, o extrato da variedade NuJet 400 foi mais efetivo em relação ao extrato da variedade NuCover STH100. Do ponto de vista da composição química, a variedade NuJet 400, em comparação com a NuCover STH100, apresentou menor número de metabólitos que absorvem na região do ultravioleta, bem como menor quantidade de metabólitos atribuídos por UHPLC-HRMS/MS. No entanto, a análise metabolômica indicou maior variedade de glicosinolatos para o extrato de *B. carinata* NuJet 400. Além disso, os metabólitos majoritários observados para essa amostra são mais intensos, o que indica que estão presentes em maior dose, e essa característica pode ter resultado em seu efeito nematicida mais pronunciado. Também foram identificados compostos que apresentam inúmeros relatos associados com suas funções biológicas, contribuindo para a ação nematotóxica dos extratos avaliados.

Referências bibliográficas

CURTO, G.; DALLAVALLE, E.; MATTEO, R.; LAZZERI, L. Biofumigant effect of new defatted seed meals against the southern root-knot nematode, *Meloidogyne incognita*. **Annals of Applied Biology**, v. 169, n. 1, p. 17-26, 2016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1111/aab.12275>. Acesso em: 26/09/2023

D'ADDABBO, T.; MIGUNOVA, V. D.; RENCO, M.; SASANELLI, N. Suppressiveness of soil amendments with pelleted plant materials on the root-knot nematode *Meloidogyne incognita*. **Helminthologia**, v. 57, n. 4, p. 376-383, 2020.

NICOLA, G. R. de; D'AVINO, L.; CURTO, G.; MALAGUTI, L.; UGOLINI, L.; CINTI, S.; PATALANO, G.; LAZZERI, L. A new biobased liquid formulation with biofumigant and fertilising properties for drip irrigation distribution. **Industrial Crops and Products**, v. 42, p. 113-118, 2013.

Influência da temperatura na oxidação de lignina kraft para a produção de ácidos carboxílicos

Yago Silva de Oliveira¹, Anna Paula Garcia Nascimento², Raquel Bombarda Campanha³, Larissa Andreani⁴, Clenilson Martins Rodrigues⁵

Resumo

A lignina apresenta uma estrutura macromolecular interessante, levando a perspectivas de utilização desta matéria-prima na obtenção de produtos de alto valor agregado. Este trabalho destaca a utilização de lignina kraft para a obtenção de ácidos carboxílicos, que podem ser utilizados na produção de polímeros, produtos farmacêuticos, solventes, entre outros. O efeito da temperatura na conversão de lignina, no rendimento e na seletividade dos ácidos oxálico, cítrico, malônico, succínico e acético foi avaliado. Verificou-se incremento na conversão de lignina com valores de até 96% em temperaturas mais elevadas. O rendimento geral de ácidos carboxílicos foi maior com o aumento da temperatura reacional, enquanto a seletividade sofreu decréscimo nas mesmas condições, indicando que altas taxas de conversão de lignina não estão relacionadas, necessariamente, com a maior especificidade de obtenção de ácidos carboxílicos. No entanto, foram observadas exceções para os casos de conversão do ácido succínico e, especialmente, para o ácido acético.

Termos para indexação: lignina kraft, reação de oxidação, ácidos carboxílicos.

Introdução

Aproximadamente 100 milhões de toneladas de lignina são geradas por ano mundialmente, das quais grande parte consiste em lignina residual proveniente de processos de produção de pastas celulósicas e papel (Fabbri et al., 2023). Pelo fato de possuir alto poder calorífico, a lignina tem sido empregada como matéria-prima na cogeração de energia na forma de eletricidade e vapor. Entretanto, tendo em vista suas interessantes propriedades funcionais, a lignina oferece perspectivas de utilização na obtenção de produtos de alto valor agregado, tais como compostos químicos renováveis, ligantes, dispersantes, emulsificantes e sequestrantes (Química..., 2010). Dentre as opções citadas, destaca-se a obtenção de ácidos carboxílicos como uma forma mais racional de se agregar valor à cadeia de produção dessa macromolécula aromática. De forma geral, os ácidos carboxílicos e seus derivados podem ser utilizados na produção de polímeros, produtos farmacêuticos, solventes, aditivos alimentares e produtos biocidas.

A maioria dos ácidos carboxílicos é produzida por processos de oxidação utilizando catalisadores de sais metálicos, tais como Co, Mn, Fe e Cu, na presença de oxigênio (O_2) ou peróxido de hidrogênio (H_2O_2) como agentes oxidantes. Embora processos de produção de ácidos carboxílicos sejam bem consolidados e estejam em fase de produção industrial (Solmi et al., 2019), grande parte emprega reagentes de origem petroquímica. No entanto, processos industriais sustentáveis que contribuam com a utilização da lignina na lógica de biorrefinarias são ainda muito incipientes. A principal razão é a complexidade da macromolécula de lignina e a ocorrência de modificações não seletivas durante seu isolamento, tornando a matéria-prima heterogênea e recalcitrante (Hasegawa et al., 2011).

¹ Graduado em Engenharia Química, Embrapa Agroenergia, yagoso97@gmail.com

² Graduada em Engenharia Química, Embrapa Agroenergia, anna.nascimento@colaborador.embrapa.br

³ Química, mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Embrapa Agroenergia, raquel.campanha@embrapa.br

⁴ Química, doutora em Físico-Química, Embrapa Agroenergia, larissa.andreani@embrapa.br

⁵ Químico, doutor em Química, Embrapa Agroenergia, clenilson.rodriques@embrapa.br

Portanto, é muito desafiador obter produtos químicos de alto valor comercial a partir de lignina altamente transformada. A literatura mostra que a conversão de lignina a ácidos carboxílicos ainda é obtida em rendimentos baixos a moderados. Por exemplo, Ma et al. (2014) apresentaram uma rota de produção de ácidos carboxílicos a partir de lignina proveniente de biorrefinaria com rendimentos de 14%, valor próximo ao obtido por Vega-Aguilar et al. (2021) para a oxidação de lignina kraft.

Frente ao exposto, o projeto “Produção renovável de ácidos carboxílicos por solvólise catalítica a partir do reaproveitamento de lignina kraft industrial” (LIGNOXIACIDS) estuda rotas de produção de ácidos carboxílicos a partir de lignina kraft, avaliando o efeito de pH, tempo, temperatura e catalisadores na produção desses compostos-alvo. Os resultados apresentados aqui são um excerto de uma ampla etapa de *screening* de processos oxidativos de lignina executados no âmbito desse projeto.

Materiais e métodos

Reações de oxidação - A lignina kraft, cedida pela empresa Suzano, foi pesada, transferida para frascos com tampa, solubilizada em NaOH 0,25 M (em proporção fixa) e mantida sob agitação em temperatura ambiente por 24 horas. Em seguida, a solução foi transferida para vasos do tipo *Hastelloy C276* e seu pH foi ajustado com H_2SO_4 2 M. Por fim, várias condições de solvólise empregando H_2O_2 foram avaliadas (não detalhadas por questões de sigilo). Os vasos foram fechados e a agitação e o aquecimento do reator foram acionados. Cada vaso foi mantido por 1 hora em cada temperatura estudada, a saber: 60 °C, 100 °C, 140 °C e 180 °C. Finalizado o tempo, o aquecimento do reator foi interrompido e uma alíquota do meio reacional foi imediatamente separada para a avaliação da conversão de lignina por espectrofotometria no ultravioleta (UV). O restante da amostra foi centrifugado e filtrado utilizando volume conhecido de água destilada para as etapas de transferência e filtragem. Alíquotas dos filtrados foram retiradas para determinação dos ácidos carboxílicos por HPLC-RID.

Conversão de lignina - As alíquotas do meio reacional foram solubilizadas em NaOH 0,25 M e analisadas por espectrofotometria no UV em 240 nm (Cary 60, Agilent). A quantificação foi baseada na curva de calibração feita com a lignina kraft solubilizada em NaOH 0,25 M.

Quantificação dos ácidos carboxílicos - Os ácidos carboxílicos foram identificados e quantificados por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) usando um cromatógrafo Agilent 1290 Infinity, equipado com detector de índice de refração (RID) em coluna Aminex® HPX-87H (300 x 7,8 mm) com pré-coluna (30 x 4,6 mm). A eluição isocrática com H_2SO_4 5 mM foi realizada a 45 °C por 40 min., com vazão de 0,6 mL/min. e volume de injeção de 10 μL . Os ácidos carboxílicos foram identificados com base nos tempos de retenção e os ácidos oxálico, cítrico, malônico, succínico e acético foram quantificados a partir das curvas de calibração preparadas com padrões analíticos dos compostos de interesse. As amostras foram previamente centrifugadas a 10.000xg por 10 min., e os sobrenadantes foram injetados no sistema HPLC-RID.

Resultados e discussão

As reações, realizadas em vasos reacionais fechados, atingiram pressões variadas para as reações efetuadas em 60 °C, 100 °C, 140 °C e 180 °C, respectivamente. Verificou-se que a reação realizada a 60 °C possuía uma coloração mais próxima à da lignina original em comparação com as demais reações, dando indícios de que as condições utilizadas foram insuficientes para a oxidação completa da lignina.

A conversão de lignina após as reações de oxidação e os resultados de rendimento e seletividade obtidos estão apresentados na Figura 1 (eixos esquerdo e direito, respectivamente). Fica claro que a temperatura afeta a conversão de lignina, aumentando de 29,94% a 60 °C para 74,73% a 100 °C e atingindo um platô de aproximadamente 96% de consumo da lignina inicial nas reações a 140 °C e 180 °C. O efeito da temperatura na despolimerização de lignina pode ser explicado pela maior liberação de radicais hidroxila do H_2O_2 em altas temperaturas aumentando, em consequência, o poder oxidante do peróxido de hidrogênio durante as reações (Xiang; Lee, 2000).

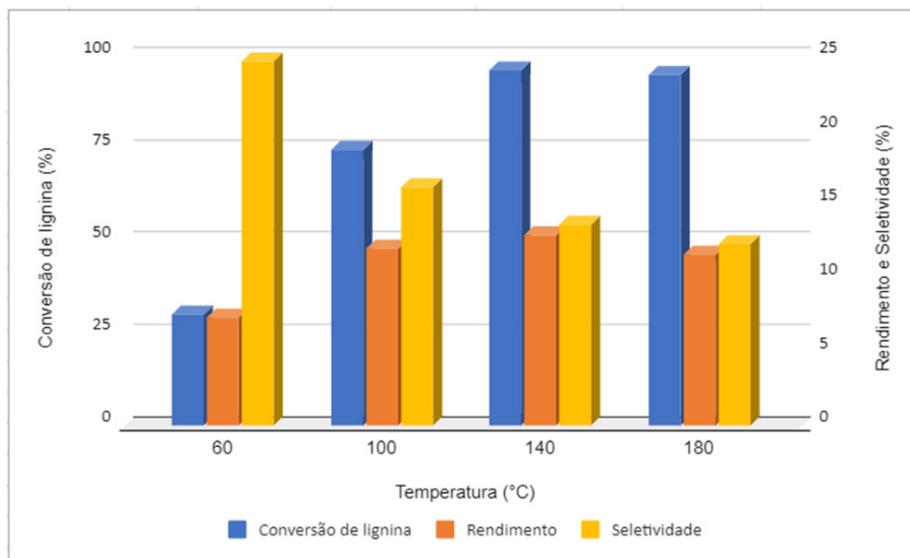


Figura 1. Conversão de lignina (ordenada à esquerda), rendimento e seletividade (ordenados à direita) da oxidação de lignina kraft realizada em diferentes temperaturas.

Os meios reacionais foram analisados por HPLC-RID e, a partir dos tempos de retenção (t_R) dos picos cromatográficos observados, foram identificados os ácidos oxálico ($t_R = 6,847$ min.), cítrico ($t_R = 8,168$ min.), tartárico ($t_R = 8,712$ min.), málico ($t_R = 9,721$ min.), malônico ($t_R = 10,087$ min.), succínico ($t_R = 11,981$ min.), fórmico ($t_R = 14,104$ min.), fumárico ($t_R = 14,672$ min.), acético ($t_R = 15,388$ min.) e levulínico ($t_R = 16,612$ min.). Destaca-se, ainda, a ocorrência de picos que não puderam ser identificados por HPLC-RID e que serão investigados futuramente por outras técnicas de caracterização. Dos ácidos carboxílicos identificados, os ácidos oxálico, cítrico, malônico, succínico e acético apresentaram comportamento interessante frente ao aumento da temperatura de oxidação. Optou-se, portanto, por realizar a quantificação desses cinco ácidos carboxílicos.

A Figura 1 (eixo direito) apresenta o rendimento total dos ácidos carboxílicos quantificados em relação à quantidade de lignina inicialmente adicionada à reação. Observou-se aumento no rendimento de 7,28% para 11,96% quando a temperatura reacional aumentou de 60 °C para 100 °C. No entanto, a partir dessa temperatura, não foi observada alteração pronunciada no rendimento total de ácidos carboxílicos. A Figura 1 (eixo direito) também apresenta a seletividade, calculada com o objetivo de avaliar quanto da lignina convertida resultou em ácidos carboxílicos previamente identificados. Verificou-se que com o aumento da temperatura e do grau de conversão houve redução na seletividade, ou seja, o maior grau de conversão de lignina não resulta em maior obtenção de ácidos carboxílicos, tendo em vista que outros fragmentos de baixa massa molar também são formados (Vega-Aguilar et al., 2021).

A Figura 2A apresenta o rendimento de cada um dos ácidos quantificados. O ácido oxálico manteve rendimento relativamente constante de cerca de 3,5% nas reações realizadas entre 60 °C e 140 °C. Porém, a 180 °C, seu rendimento reduziu-se a zero. O ácido cítrico apresentou rendimento bastante baixo, menor que 1%, e apenas para as reações feitas a 60 °C e 100 °C. O rendimento de ácido malônico

aumentou de 1,53% para 2,59% quando a temperatura aumentou de 60 °C para 100 °C. No entanto, para as temperaturas mais elevadas, não foi detectada a presença desse ácido. O ácido succínico, ao contrário, não foi formado na reação mais branda. Porém com o aumento de temperatura passou de 0,85% para 2,28% quando a temperatura reacional aumentou de 100 °C para 180 °C. Incremento expressivo foi observado para o rendimento de ácido acético com o aumento de temperatura, que partiu de 1,39% a 60 °C para 9,26% a 180 °C.

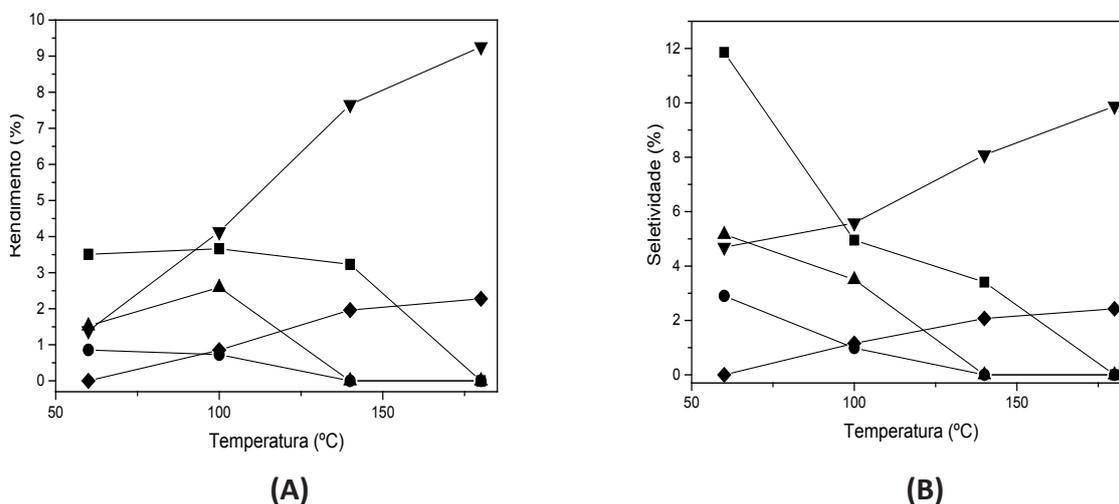


Figura 2. Rendimento (A) e seletividade (B) de ácidos carboxílicos após reações de oxidação de lignina kraft em diferentes temperaturas, em que: (■) ácido oxálico; (●) ácido cítrico; (▲) ácido malônico; (◆) ácido succínico; e (▼) ácido acético.

A Figura 2B detalha a seletividade das diferentes reações de oxidação para cada um dos ácidos carboxílicos em relação à quantidade de lignina convertida. Destaca-se que, a 60 °C, o ácido oxálico possuía seletividade relevante, de cerca de 12%, indicando que parte considerável da lignina oxidada estava sendo convertida em ácido oxálico. Com o aumento da temperatura reacional, foi observada redução na seletividade para este ácido. Efeito diverso foi observado para o ácido acético, que apresentou aumento na seletividade com o aumento de temperatura, atingindo aproximadamente 10% quando aplicada a temperatura reacional de 180 °C. As diferenças nos valores de seletividade e rendimento de ácidos carboxílicos observadas neste estudo dão indicativos de que é possível modular as condições reacionais para a obtenção de determinados ácidos carboxílicos de interesse.

Conclusão

As reações de oxidação de lignina kraft realizadas em pH específico por 1 hora e na ausência de catalisadores indicaram que a conversão de lignina, nas condições avaliadas, aumentou com o aumento de temperatura, assim como o rendimento geral dos ácidos carboxílicos quantificados. A seletividade, por sua vez, reduziu com o aumento de temperatura e o conseqüente grau de conversão de lignina. O somatório do rendimento dos ácidos carboxílicos quantificados atingiu o valor máximo de 12,85% a 140 °C, valor próximo aos encontrados na literatura para este tipo de processo. A seletividade e o rendimento de cada um dos ácidos carboxílicos indicou que é possível modular as condições reacionais para a obtenção de ácidos carboxílicos de interesse em maior quantidade. A atribuição dos picos, efetuada por HPLC-RID, será confirmada por outras técnicas cromatográficas, bem como a caracterização de picos cromatográficos que não foram identificados pela técnica descrita neste trabalho.

Referências bibliográficas

FABBRI, F.; BISCHOF, S.; MAYR, S.; GRITSCH, S.; BARTOLOME, M. J.; SCHWAIGER, N.; GUEBITZ, G. M.; WEISS, R. The biomodified lignin platform: a review. **Polymers**, v. 15, n. 7, p. 1694-1724, 2023.

HASEGAWA, I.; INOUE, Y.; MURANAKA, Y.; YASUKAWA, T.; MAE, K. Selective production of organic acids and depolymerization of lignin by hydrothermal oxidation with diluted hydrogen peroxide. **Energy & Fuels**, v. 25, n. 2, p. 791-796, 2011.

MA, R.; GUO, M.; ZHANG, X. Selective conversion of biorefinery lignin into dicarboxylic acids. **Chemsuschem**, v. 7, n. 2, p. 412-415, 2014.

QUÍMICA Verde no Brasil: 2010-2030. Brasília, DF: Centro de Gestão e Estudos Estratégicos. Brasília, 2010.

SOLMI, M. V.; SCHMITZ, M.; LEITNER, W. CO₂ as a building block for the catalytic synthesis of carboxylic acids. In: ALBONETTI, S.; PERATHONER, S.; QUADRELLI, E. A. (Ed.) **Horizons in sustainable industrial chemistry and catalysis**. [S.L.]: Elsevier, 2019. (Studies in Surface Science and Catalysis, 178). p. 105-124.

VEGA-AGUILAR, C. A.; BARREIRO, M. F.; RODRIGUES, A. E. Lignin conversion into C₄ dicarboxylic acids by catalytic wet peroxide oxidation using titanium silicalite-1. **Industrial Crops and Products**, v. 173, 2021. 114155.

XIANG, Q.; LEE, Y. Y. Oxidative cracking of precipitated hardwood lignin by hydrogen peroxide. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 84-86, n. 1-9, p. 153-162, 2000.

Obtenção de ácido acrílico a partir de ácido láctico utilizando zeólitas ZSM-5

Anna Paula Garcia Nascimento¹, Emerson Leo Schultz², Diogo Keiji Nakai³, Itânia Pinheiro Soares⁴

Resumo

A indústria do petróleo é a maior produtora de ácido acrílico e seus precursores. O ácido acrílico, ou ácido propenoico, possui elevado volume de produção, sendo utilizado principalmente para produção de poliacrilato. Com o advento das biorrefinarias, o desenvolvimento de produtos renováveis vem sendo bastante discutido, ganhando visibilidade e propondo matérias-primas alternativas e sustentáveis para a obtenção do ácido acrílico. Dessa forma, uma das possíveis rotas disponíveis para estudo é a semissintética, que ocorre a partir da obtenção do ácido láctico, por via fermentativa, e desidratação do ácido láctico por rota química. 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 aplicação industrial. Neste trabalho foi tratada apenas a conversão do ácido láctico em ácido acrílico. Para tanto, foram preparados dois catalisadores utilizando a zeólita ZSM-5 modificadas com fosfato, onde os catalisadores modificados apresentaram grande potencial para transformar o ácido láctico em ácido acrílico.

Termos para indexação: ácido láctico, ácido acrílico, desidratação.

Introdução

O ácido acrílico (AA) ou ácido propenoico é uma commodity de grande relevância no cenário industrial, sendo essencial para a produção de ésteres e polímeros com diversas aplicações, como na fabricação de adesivos, aditivos de tinta e produtos têxteis (Feng et al., 2014). O ácido pode sofrer polimerização, gerando principalmente os polímeros superabsorventes utilizados na construção e na indústria de cosméticos. O AA é obtido a partir de processos petroquímicos, principalmente por oxidação parcial do propeno, gerando dióxido de carbono e ácido acético em reações paralelas (Sobus; Czekaj, 2022). Existe também a possibilidade de obtenção do AA por rota semissintética a partir da desidratação do ácido láctico, obtido por via fermentativa de biomassas e seus derivados. Dentre vários derivados de biomassa, o glicerol aparece como alternativa interessante para a produção do ácido láctico. O glicerol é um coproduto da produção de biodiesel, representando em torno de 10% da massa de óleo utilizada na transesterificação. Do ponto de vista econômico, é uma molécula bastante relevante para ser utilizada como plataforma de obtenção de outros compostos, além das diferentes rotas que podem ser exploradas e da economia de carbono, no caso da obtenção do ácido láctico (Dos Santos et al., 2019).

A conversão do ácido láctico em ácido acrílico é realizada na fase gasosa usando catalisadores heterogêneos. A reação química que resulta no ácido acrílico é a desidratação. Entretanto, reações secundárias ocorrem, como a descarbonilação e a descarboxilação, que resultam em acetaldeído; a condensação, que forma 2,3-pentanodiona; a hidrogenação (hidrogênio produzido durante a reação), que produz o ácido propiônico; e a autoesterificação, que resulta em dilactídeo. Dentre os

¹ Química, Universidade de Brasília, anna.nascimento@colaborador.embrapa.br.

² Engenheiro químico, Doutor em Engenharia Química, pesquisador da Embrapa Agroenergia, emerson.schultz@embrapa.br

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

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

catalisadores heterogêneos empregados no processo, estão zeólitas modificadas, hidroxiapatitas, fosfatos e sulfatos (Bonnotte et al., 2018; Zhang et al., 2017; Li et al., 2019; Nekkala et al., 2022; Dongare et al., 2015; Peng et al., 2014).

A desidratação catalítica do ácido láctico comercial (solução 40%) foi realizada por Sobus e Czekaj (2022), usando zeólitas modificadas com Sn, Co, Cu e Fe, obtendo-se rendimento próximo de 60% em ácido acrílico. Zhang et al. (2008) exploraram a desidratação catalítica do ácido láctico utilizando como catalisador uma mistura de sulfatos e fosfatos como promotores $m(\text{CaSO}_4)/m(\text{CuSO}_4)/m(\text{Na}_2\text{HPO}_4)/m(\text{KH}_2\text{PO}_4)$. Obtiveram, assim, uma seletividade de 63,7% em ácido acrílico, partindo de uma solução 26% de ácido láctico.

No presente trabalho, foram testadas zeólitas ZSM-5 fosfatadas na desidratação de duas soluções de ácido láctico: uma solução comercial de ácido láctico 8,5% e uma solução preparada, simulando os componentes obtidos em rota fermentativa de glicerol para obtenção de ácido láctico.

Materiais e métodos

Preparo dos catalisadores para obtenção do ácido acrílico

Preparo de Na-ZSM-5: a troca iônica da zeólita comercial NH_4 -ZSM-5 (Zeolyst International, com razão Si/Al = 50) foi realizada usando-se solução aquosa de NaNO_3 , sob agitação por 24 horas em temperatura ambiente, seguida por filtração, lavagem com água destilada, secagem em estufa a 105 °C, moagem e calcinação a 550 °C por 4 horas.

Preparo das zeólitas Na-ZSM-5 impregnadas com fosfatos (KH_2PO_4 -ZSM-5 e NaH_2PO_4 -ZSM-5): a zeólita foi impregnada com Na_2HPO_4 e KH_2PO_4 usando-se soluções aquosas $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ e KH_2PO_4 preparadas para obtenção de 14% dos sais no catalisador. As zeólitas foram adicionadas às soluções e as misturas foram agitadas a 60 °C por 4 horas. O sólido foi filtrado e seco em estufa a 105 °C, moído e calcinado a 550 °C por 4 horas.

Caracterização dos catalisadores

A área superficial específica pela equação de Brunauer-Emmett-Teller (BET) (Thommes et al., 2015), o diâmetro e o volume de poros dos catalisadores foram obtidos utilizando-se um analisador Micromeritics, ASAP 2020 Plus, usando-se N_2 a -196 °C como adsorbato.

Testes catalíticos

A desidratação de ácido láctico foi realizada em reator tubular de leito fixo de aço inoxidável, da marca PID Eng&Tech, com diâmetro de 9,1 mm e comprimento de 300 mm. Foram utilizadas duas soluções. Uma solução aquosa comercial (8,5% de ácido láctico) e uma solução de ácido láctico preparada com os seguintes constituintes: ácido succínico 0,3 g L⁻¹, ácido láctico 48 g L⁻¹, ácido acético 6 g L⁻¹ e etanol 8 g L⁻¹. O catalisador foi colocado dentro do reator, sobre uma camada de lã de quartzo mantida em um suporte. O reator foi aquecido a 350 °C, em fluxo de argônio (30 mL min⁻¹) e mantido nessa temperatura até o tempo total de 60 min. Em seguida, o fluxo de argônio foi diminuído para 15 mL min⁻¹ e a solução de ácido láctico foi bombeada por uma bomba HPLC em um fluxo de 0,05 mL min⁻¹; ao entrar em contato com ambiente reacional, a solução foi vaporizada, alcançando o catalisador. Esse processo reacional se deu durante 180 minutos. O produto da reação foi condensado e coletado durante a reação, sendo armazenado em geladeira após a reação.

Identificação dos produtos

O estudo empregou a técnica de cromatografia líquida de ultra alta eficiência (UHPLC) com detector de arranjo de fotodiodos (PDA). O equipamento utilizado foi o Acquity UPLC, da fabricante

Waters, com a coluna ACQUITY UPLC HSS T3 de 100 mm e pré-coluna ACQUITY UPLC HSS T3 VanGuard de 5 mm. A fase móvel consistiu em ácido fosfórico 0,125% (fase A) e metanol (fase B), com um gradiente de eluição que variou de 0 minuto a 1,5 minuto com 100% da fase A; de 1,5 minuto a 5 minutos, modificando linearmente até 95% da fase A e 5% da fase B; de 5 minutos a 8 minutos, modificando linearmente até 75% da fase A e 25% da fase B; de 8 minutos a 9 minutos com 75% da fase A e 25% da fase B; e de 9 minutos a 15 minutos com 100% da fase A. A temperatura da coluna foi mantida a 30 °C, a leitura do detector foi realizada em 210 nm e a vazão foi de 0,3 mL min⁻¹. O software utilizado para controle e processamento dos dados foi o Empower 3. As amostras foram mantidas a 10 °C e analisadas, sem diluição prévia.

Resultados e discussão

A avaliação das propriedades texturais das zeólitas modificadas e da zeólita original comercial foi realizada usando-se N₂ a -196 °C. Os resultados da área superficial, o volume e os diâmetros de poros são apresentados na Tabela 1.

Tabela 1. Caracterização dos catalisadores quanto à área superficial, ao volume e ao diâmetro de poros.

Catalisador	Área superficial BET (m ² g ⁻¹)	Volume de poros (cm ³ g ⁻¹)	Diâmetro dos poros (Å)
KH ₂ PO ₄ -ZSM-5	203,97	0,13	25,8
NaH ₂ PO ₄ -ZSM-5	252,39	0,16	25,0
ZSM-5	389,67	0,25	25,8

Observa-se que as zeólitas fosfatadas apresentaram menor área superficial e menor volume de poros que a Na-ZSM-5, o que também foi verificado em zeólitas NaY modificadas com Na₂HPO₄ (Zhang et al., 2014). Já no diâmetro de poros, não houve alteração, provavelmente porque KH₂PO₄ e NaH₂PO₄ devem ter sido depositados em todo o poro da zeólita comercial e não como uma camada superficial do poro, diminuindo o volume dos poros, sem diminuir o diâmetro. Quando comparadas entre si, houve apenas uma pequena variação entre as zeólitas fosfatadas.

Os resultados de conversão de ácido láctico e rendimento em ácido acrílico utilizando as duas zeólitas fosfatadas, solução comercial e solução simulada da fermentação são apresentados na Tabela 2.

Tabela 2. Resultados da conversão de ácido láctico e rendimento em ácido acrílico.

Catalisadores	Fermentado simulado		Solução comercial	
	Conversão (%)	Rendimento (%)	Conversão (%)	Rendimento (%)
KH ₂ PO ₄ -NaZSM-5	95	6,64	96	7,22
NaH ₂ PO ₄ -NaZSM-5	97	7,84	97	25,99

Observa-se que não houve grande variação na conversão do ácido láctico nem entre as zeólitas e nem entre os tipos de solução. No entanto, o rendimento utilizando a zeólita NaH₂PO₄-NaZSM-5 na solução comercial foi bastante superior. Como na reação são formados outros produtos, o rendimento é o parâmetro de maior importância a ser observado nas reações.

Conclusão

O resultado evidencia que pequenas modificações na estrutura da zeólita podem impactar no rendimento da reação, favorecendo a desidratação do ácido láctico em ácido acrílico. Houve uma queda de rendimento quando se utilizou a solução simulando o produto da fermentação do glicerol para produção de ácido láctico, sinalizando que os componentes presentes na solução interferem no rendimento da reação, possivelmente competindo para obtenção de outros produtos. Dessa forma, é importante que o produto obtido da fermentação do glicerol passe por uma etapa de purificação antes da reação química de desidratação do ácido láctico.

Referências bibliográficas

- BONNOTTE, T.; PAUL, S.; ARAQUE, M.; WOJCIESZAK, R.; DUMEIGNIL, F.; KATRYNIOK, B. Dehydration of lactic acid: the state of the art. **ChemBioEng Reviews**, v. 5, n. 1, p. 34-56, 2018.
- DONGARE, M. K.; UMBARKER, S. B.; LOMATE, S. T. **Process for catalytic dehydration of lactic acid to acrylic acid**. US8957250B2. 17/02/2015.
- DOS SANTOS, M. B.; ANDRADE, H. M. C.; MASCARENHAS, A. J. S. Oxidative dehydration of glycerol over alternative H,Fe-MCM-22 catalysts: sustainable production of acrylic acid. **Microporous and Mesoporous Materials**, v. 278, p. 366-377, 2019.
- FENG, X.; SUN, B.; YAO, Y.; SU, Q.; JI, W.; AU, C. Renewable production of acrylic acid and its derivative: new insights into the aldol condensation route over the vanadium phosphorus oxides. **Journal of Catalysis**, v. 314, p. 132-141, 2014.
- LI, C.; ZHU, Q.; CUI, Z.; WANG, B.; TAN, T. Insight into deactivation behavior and determination of generation time of the hydroxyapatite catalyst in the dehydration of lactic acid to acrylic acid. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 58, n. 1, p. 53-59, 2019.
- NEKKALA, N.; BALLA, P.; GINJUPALLI, S. R.; SEELAM, P. K.; HUSSAIN, S. K.; PONNALA, B.; KOMANDUR, V. R. C. Lanthanum phosphate: an efficient catalyst for acrylic acid production through lactic acid dehydration. **Biomass Conversion and Biorefinery**, v. 12, p. 3535-3546, 2022.
- PENG, J.; LI, X.; TANG, C.; BAI, W. Barium sulphate catalyzed dehydration of lactic acid to acrylic acid. **Green Chemistry**, v. 16, n. 1, p. 108-111, 2014.
- SOBUS, N.; CZEKAJ, I. Lactic acid conversion into acrylic acid and other products over natural and synthetic zeolite catalysts: theoretical and experimental studies. **Catalysis Today**, v. 387, p. 172-185, 2022.
- THOMMES, M.; KANEKO, K.; NEIMARK, A. V.; OLIVIER, J. P.; RODRIGUEZ-REINOSO, F.; ROUQUEROL, J.; SING, K. S. Physisorption of gases, with special reference to the evaluation of surface area and pore size distribution (IUPAC Technical Report). **Pure and Applied Chemistry**, v. 87, n. 9-10, p. 1051-1069, 2015.
- ZHANG, J.; LIN, J.; CEN, P. Catalytic dehydration of lactic acid to acrylic acid over sulfate catalysts. **Canadian Journal of Chemical Engineering**, v. 86, p. 1047-1053, 2008.
- ZHANG, J.; ZHAO, Y.; FENG, X.; PAN, M.; ZHAO, J.; JI, W.; AU, C.-T. Na_2HPO_4 -modified NaY nanocrystallites: efficient catalyst for acrylic acid production through lactic acid dehydration. **Catalysis Science & Technology**, v. 4, n. 5, p. 1376-1385, 2014.
- ZHANG, L.; THENG, D. S.; DU, Y.; XI, S.; HUANG, L.; GAO, F.; WANG, C.; CHEN, L.; BORGNA, A. Selective conversion of lactic acid to acrylic acid over alkali and alkaline-earth metal co-modified NaY zeolites. **Catalysis Science & Technology**, v. 7, n. 24, p. 6101-6111, 2017.

Preparação e caracterização química de extratos brutos de *Crotalaria juncea* e *Crotalaria ochroleuca*

Jeniffer Gomes Feitosa¹, Larissa Andreani², José Antonio de Aquino Ribeiro³, Clenilson Martins Rodrigues⁴

Resumo

Entre as vertentes que promovem a bioeconomia, estão o estudo e o desenvolvimento de bioinsumos com a capacidade de substituir produtos petroquímicos prejudiciais à saúde e ao ambiente. A utilização de produtos naturais ricos em metabólitos secundários como agentes de controle de pragas é um dos exemplos da aplicação dos bioinsumos. Destaca-se que algumas espécies da família Fabaceae são utilizadas como adubo verde e apresentam uma vasta quantidade de metabólitos secundários com propriedades antimicrobianas e biocidas interessantes. Sendo assim, este trabalho teve como objetivos a preparação de extratos aquosos e hidroalcoólicos de *Crotalaria juncea* e *Crotalaria ochroleuca* a partir de diferentes frações do material moído e a avaliação do seu perfil químico. Os extratos foram obtidos, em sua maioria, em rendimentos superiores a 15% e houve diferença estatística significativa quando a biomassa foi tamisada e segregada antes da preparação dos extratos. Nos extratos produzidos, foi verificada a presença de aminoácidos, nucleotídeos, flavonoides, alcaloides e derivados de ácido hidroxicinâmico, indicando que as espécies estudadas possuem potencial para utilização como ingredientes de formulações biocidas.

Termos para indexação: *Crotalaria* spp., metabólitos secundários, bioinsumo.

Introdução

Os metabólitos secundários são compostos químicos produzidos por organismos vivos, como plantas, animais, fungos e microrganismos, e que não estão diretamente envolvidos em seu crescimento e desenvolvimento. Estima-se que mais de 100.000 deles sejam produzidos por plantas, e muitos desses compostos têm sido alvo de grande interesse para a medicina, indústria alimentícia, agricultura e outras áreas de pesquisa, principalmente por a suas características benéficas (Pérez-Alonso et al., 2011). Na agricultura, os metabólitos secundários podem ser explorados no desenvolvimento de pesticidas naturais a partir da seleção de plantas que apresentam maiores teores de metabólitos secundários com atividade biológica.

Diversas espécies de leguminosas, pertencentes à família Fabaceae, são consideradas plantas antagonistas e utilizadas como bioinsumos: nematicida natural e adubo verde. O gênero *Crotalaria* é considerado um dos maiores desta família, contando com 690 espécies espalhadas por regiões de clima tropical ou semitropical. No continente americano, são conhecidas 74 espécies, 59 endêmicas e 35 de ocorrência na América do Sul (Mauad et al., 2019). A atividade antagônica de espécies como *Crotalaria juncea* foi comprovada no controle de fitonematoides, podendo assim favorecer grandes plantações que se encontram comprometidas em razão dos elevados níveis populacionais desses fitoparasitas (Schwan, 2003).

¹ Graduanda em Química, Universidade de Brasília, jeniffer.feitosa@colaborador.embrapa.br

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

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

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

Frente ao exposto, o objetivo deste trabalho foi avaliar o rendimento de extração e composição química de extratos preparados a partir de *C. juncea* e *C. ochroleuca*, correlacionando com modelos distintos de extração e com o tamanho da biomassa empregada nos processos extrativos. Dessa forma, as informações desses resultados podem favorecer a sua futura utilização em formulações nematicidas e/ou no desenvolvimento de novos produtos agroecológicos.

Materiais e métodos

Sementes de *C. juncea* e *C. ochroleuca* (Sementes Piraí Ltda.) foram secas até massa constante, moídas e tamisadas em agitador de peneiras vibratório. As partículas foram separadas nas seguintes faixas de tamanhos: integral (material triturado não tamisado), >850 μm , 849 μm –425 μm , 424 μm –300 μm , 299 μm –250 μm e <250 μm . Em sequência, as amostras passaram por processos de extração padronizados (proporção biomassa/solvente mantidos), sendo empregadas quatro condições distintas (refluxo aquoso, refluxo aquoso acidificado, percolação hidroalcoólica e agitação hidroalcoólica), as quais não serão detalhadas por questões de sigilo. Após as extrações, as soluções resultantes foram rotaevaporadas (no caso de extrações hidroalcoólicas), congeladas e liofilizadas. Todas as extrações foram realizadas em triplicata. O rendimento dos processos de extração foi calculado considerando a massa inicial de sementes moídas usadas e a massa do extrato bruto obtido. A análise estatística foi realizada a partir da média \pm desvio padrão dos dados de rendimento dos processos extrativos/tratamentos, efetuando-se análise de variância *one-way* (ANOVA), seguida do teste de Tukey. Em todas as análises, foi selecionada a probabilidade de erro inferior a 0,05% (critério para a significância).

Análises cromatográficas - A Cromatografia Líquida de Ultra-Alta Eficiência (UHPLC) foi empregada na avaliação do perfil cromatográfico dos extratos obtidos. Os compostos separados foram avaliados e monitorados com o detector de arranjo de fotodiodos (PAD) com varredura na faixa espectral de 200 nm a 400 nm. Alíquotas de 1 μL das amostras foram injetadas nas seguintes condições: coluna de fase reversa *Acquity UPLC HSST3* 1,8 μm , 2,1 mm x 150 mm; vazão: 0,400 mL/min; temperatura da coluna: 40 °C; modo de eluição: gradiente composto pelas fases móveis: a) $\text{H}_2\text{O}/0,1\%$ TFA; b) Acetonitrila/0,1% TFA; curva gradiente: 5%–55% B (0,0 min–15,0 min, linear), 55%–100% B (15,0 min–18,0 min, linear), 100% B (18,0 min–20,0 min, isocrático), 5% B (20,0 min–25,0 min, reequilíbrio, isocrático).

Resultados e discussão

Para *C. juncea*, a Figura 1 apresenta os valores médios dos rendimentos obtidos para cada tipo de processo de extração e a análise de variância, aplicada intratamentos, indica que há diferença estatística notável apenas no grupo de tratamentos do processo de extração por refluxo aquoso. Nessa condição, a extração que empregou partículas das sementes de *C. juncea* com tamanho < 250 μm forneceu o maior rendimento ($40,85 \pm 2,12\%$) dentro do conjunto de tratamentos. No processo de extração por agitação, é provável que o elevado coeficiente de variação obtido para o tratamento com as sementes de *C. juncea* com tamanho integral tenha impedido a diferenciação estatística, o que será revisado futuramente.

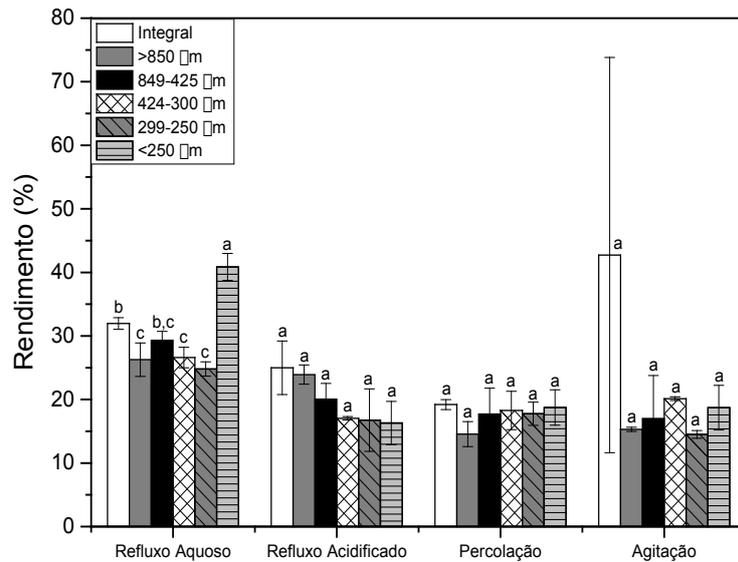


Figura 1. Rendimentos de extratos brutos de *C. juncea*. Letras distintas indicam diferença estatística.

De forma análoga, para *C. ochroleuca* os resultados estatísticos, ilustrados na Figura 2, evidenciam que dois modelos de extração se destacaram e apresentaram resultados que diferem estatisticamente dos demais. No processo de extração por refluxo aquoso, os tratamentos que empregaram as sementes de *C. ochroleuca* com tamanhos de partículas de 299 µm–250 µm e < 250 µm foram os que apresentaram os maiores valores de rendimento ($37,37 \pm 3,23\%$ e $39,00 \pm 2,49\%$, respectivamente) e eles diferem estatisticamente dos demais intratratamentos. No caso do processo de extração por refluxo aquoso acidificado, fica evidente a seletividade de extração dos metabólitos para as sementes de *C. ochroleuca* com tamanho de partícula > 850 µm, tratamento que fornece o maior valor de extrativos recuperados ($40,03 \pm 3,36\%$), sendo que este resultado difere estatisticamente dos demais intratratamentos (Figura 2).

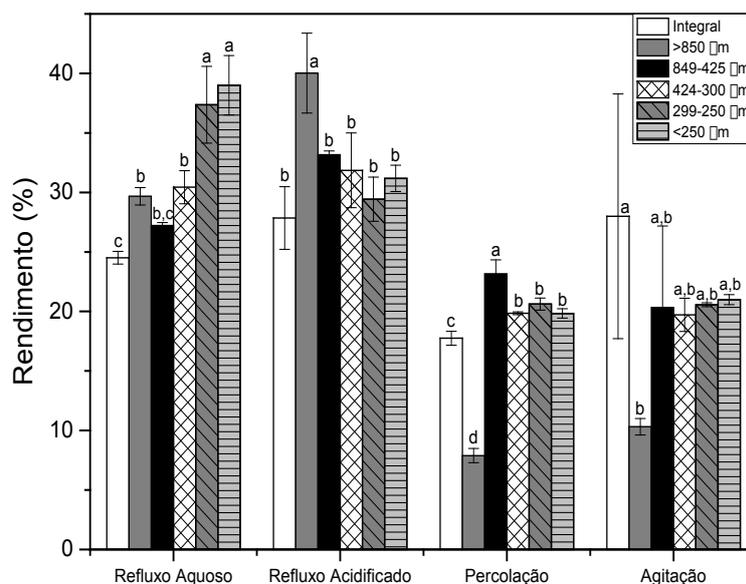


Figura 2. Rendimentos de extratos brutos de *C. ochroleuca*. Letras distintas indicam diferença estatística.

Embora haja intratratamentos para os processos de extração por percolação e por agitação que se diferenciam estatisticamente, os valores de extrativos recuperados são menos eficazes

($7,89 \pm 0,59\%$ a $28,00 \pm 10,29\%$) que aqueles observados para os processos envolvendo refluxo aquoso e refluxo aquoso acidificado. Muito provavelmente serão processos preteridos em fases de escalonamento, tendo em vista que recuperam menor quantidade dos metabólitos de interesse. Para ilustrar a composição química, os perfis cromatográficos dos extratos de *C. juncea* e *C. ochroleuca* foram comparados, e as Figuras 3 e 4 ilustram os resultados obtidos com os extratos preparados a partir de material integral e avaliados por UHPLC/PAD.

A partir do perfil cromatográfico da *C. juncea* (Figura 3) é possível notar que há eluição de compostos ao longo de toda faixa de separação, o que indica a ocorrência de compostos com variada polaridade. No comparativo entre os cromatogramas nota-se grande similaridade dos perfis, sendo as principais diferenças de ordem quantitativa, ou seja, intensidade dos picos eluídos entre os diferentes extratos. A única exceção nesse caso foi a ocorrência de dois picos cromatográficos ($t_R = 4,700$ min e $4,900$ min) que ocorrem apenas no extrato obtido pelo processo de refluxo aquoso.

Em *C. juncea*, os dados espectrais de UV indicam a ocorrência de aminoácidos ($t_R = 1,384$ min), nucleotídeos como a guanosina ($t_R = 0,742$ min; $8,180$ min e $8,469$ min), substâncias contendo fenilalanina ($t_R = 1,432$ min), flavonoides ($t_R = 3,149$ min; $3,234$ min; $3,487$ min e $15,556$ min), alcaloides ($t_R = 3,681$ min) e derivados do ácido hidroxicinâmico ($t_R = 4,204$ min; $6,274$ min e $8,469$ min). Todas essas classes de metabólitos foram observadas em estudos preliminares realizados pelo grupo (Melo et al., 2021).

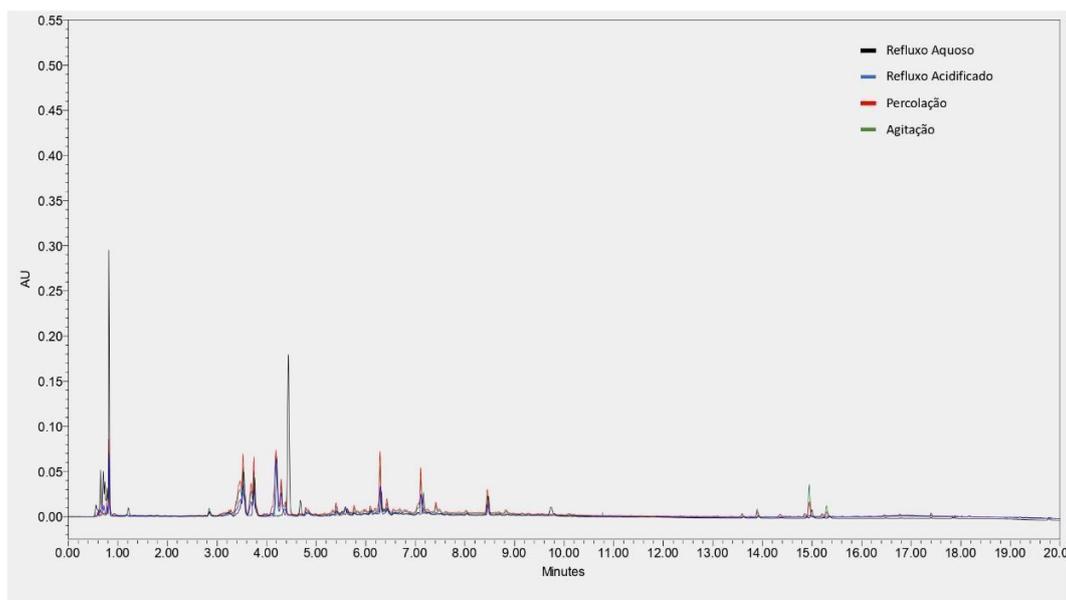


Figura 3. Cromatogramas obtidos por UHPLC/PAD (290 nm) para extratos das sementes de *C. juncea* usando a granulometria integral.

Quanto aos perfis cromatográficos de *C. ochroleuca* (Figura 4), observa-se que a intensidade dos compostos é muito maior do que aquela observada nos perfis de *C. juncea* (Figura 3), o que indica haver maior teor desses compostos nos respectivos extratos de *C. ochroleuca*. Embora haja muita semelhança entre os perfis cromatográficos, percebe-se ainda que os compostos mais apolares, eluídos entre $t_R = 13,500$ min e $15,000$ min, não ocorrem nos extratos de *C. ochroleuca* (Figura 4) como ocorrem em *C. juncea* (Figura 3). A única diferença observada foi para o pico eluído em $t_R = 3,110$ min, exclusivo para o extrato obtido pelo processo por refluxo aquoso.

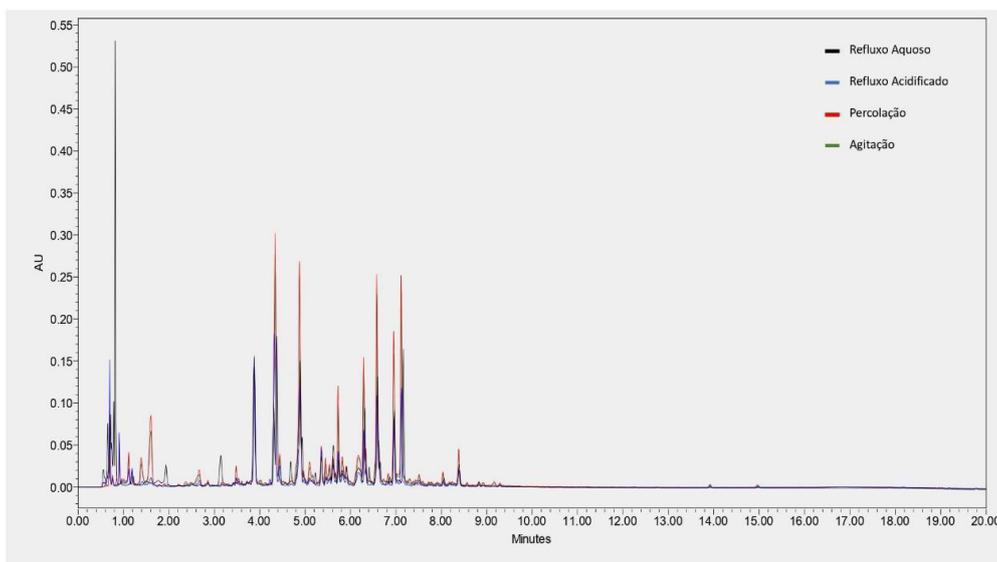


Figura 4. Cromatogramas obtidos por UHPLC/PAD (290 nm) para extratos das sementes de *C. ochroleuca* usando a granulometria integral.

Na avaliação dos espectros de UV de *C. ochroleuca*, é possível verificar que há a ocorrência das mesmas classes químicas citadas para a *C. juncea*. Na faixa de $t_R = 0,00$ min a $t_R = 3,00$ min, estão destacados os compostos químicos mais polares, sendo identificada em $t_R = 0,575$ min; 0,660 min; 0,784 min e 0,869 min a presença de alcaloides. Em $t_R = 0,997$ min, 1,207 min e 5,007 min, foram identificadas substâncias similares a fenilalanina; derivados do nucleotídeo guanósina foram sugeridos em $t_R = 1,335$ min; e absorção UV compatível com a classe de flavonoides foi observada em $t_R = 4,879$ min; 4,964 min; 5,724 min; 6,949 min; 6,992 min e 8,384 min. Também foram identificados, em $t_R = 1,459$ min; 1,587 min; 3,909 min; 4,374 min; 4,922 min; 5,599 min; 6,359 min; 6,569 min; 6,612 min e 7,119 min, derivados do ácido hidroxicinâmico e, em $t_R = 4,460$ min, foi observado espectro UV compatível com o aminoácido triptofano.

Conclusão

Os extratos de *C. juncea* e *C. ochroleuca* apresentaram, de maneira geral, maiores rendimentos para as extrações realizadas pelos processos com refluxo aquoso e refluxo aquoso acidificado. A avaliação dos rendimentos obtidos indicou que há diferença estatística entre os intratamentos que forneceram as melhores respostas de recuperação de extrativos. A comparação dos perfis cromatográficos revelou que *C. ochroleuca* apresenta um conjunto maior de metabólitos eluídos no intervalo de t_R entre 0,045 min e 10,000 min. Esses metabólitos também são mais intensos do que aqueles observados nos perfis cromatográficos de *C. juncea*, sugerindo que seus teores sejam maiores nos extratos de *C. ochroleuca*. Essas informações indicam que a *C. ochroleuca* pode ser a espécie mais promissora para etapas futuras.

Referências bibliográficas

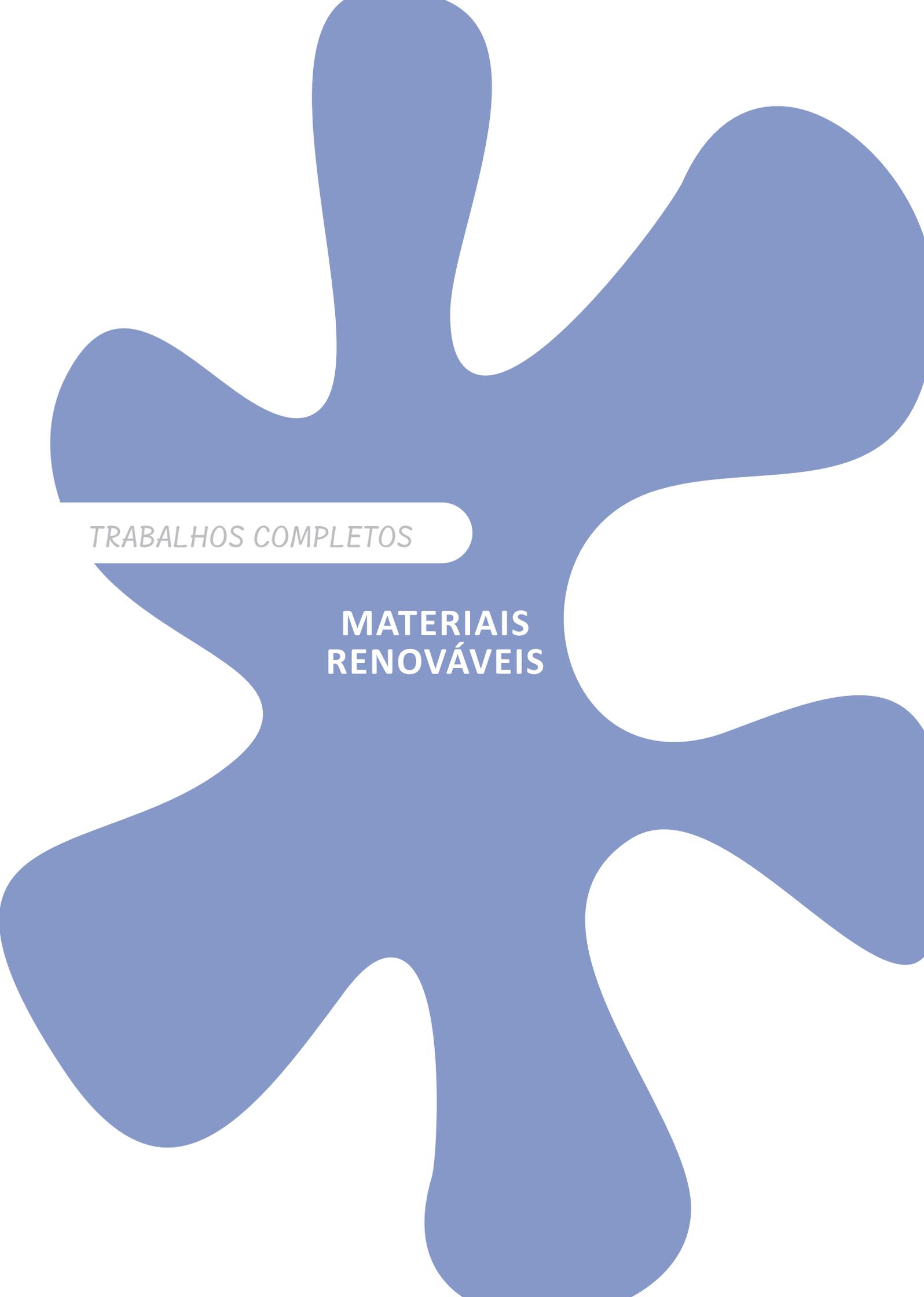
MAUAD, M.; SANTANA, R. S.; CARLI, T. H.; CARLI, F.; VITORINO, A. C. T.; MUSSURY, R. M.; RECH, J. Dry matter production and nutrient accumulation in *Crotalaria spectabilis* shoots. *Journal of Plant Nutrition*, v. 42, n. 6 p. 615-625. 2019. DOI: <https://doi.org/10.1080/01904167.2019.1567779>

MELO, R. W. N.; FEITOSA, J. G.; ANDREANI, L.; RIBEIRO, J. A. A.; RODRIGUES, C.M. Estudo metabolômico de *Crotalaria juncea* por cromatografia de ultra alta eficiência acoplada a espectrometria de massas de alta resolução. In: ENCONTRO NACIONAL DE QUÍMICA E SUSTENTABILIDADE, 1. 2021.

Disponível em: <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/225290/1/Estudo-metabolo770mico-de-Crotalaria-2021.pdf>. Acesso em 19 set. 2023.

PÉREZ-ALONSO, N.; JIMÉNEZ, E. L. Producción de metabolitos secundarios de plantas mediante el cultivo in vitro. **Biotecnología Vegetal**, v. 11, n. 4, p. 195-211, 2011. Disponível em: <https://revista.ibp.co.cu/index.php/BV/article/view/255/837>. Acesso em: 10 set. 2023.

SCHWAN, A.V. **Antagonismo de espécies de Crotalaria ao nematoide de cisto da soja: heterodera glycines ichinohe**. 2003. 59 f. Tese (Doutorado) - Curso de Engenharia Agrônoma, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campus de Dourados, 2003. Disponível em: <https://files.ufgd.edu.br/arquivos/arquivos/78/MESTRADO-DOUTORADO-AGRONOMIA/Disserta%C3%A7%C3%A3o%20Adriana%20Viana%20Schwan.pdf>. Acesso em: 19 set. 2023.



TRABALHOS COMPLETOS

**MATERIAIS
RENOVÁVEIS**

Ácido oxálico aumenta a solubilização de potássio de biocarvão de lodo de esgoto

Marcela Granato Barbosa dos Santos¹, Camila Rodrigues Costa², Andressa Blasi Paiva³, Gilberto de Oliveira Mendes⁴, Éder de Souza Martins⁵, Giuliano Marchi⁶, Rhaila da Silva Rodrigues Viana⁷, Cícero Célio de Figueiredo⁸

Resumo

O biocarvão de lodo de esgoto (BLE) tem sido apresentado como um melhorador do solo capaz de substituir fertilizantes convencionais. Por possuir altos teores de P, N, Ca e Zn, o BLE pode ser considerado um fertilizante multinutriente. Entretanto, o BLE apresenta baixos teores de K, predominantemente em formas químicas de difícil disponibilização. Uma possível alternativa para aumentar a eficiência do BLE como fornecedor de K seria o seu tratamento com ácidos orgânicos. O ácido oxálico tem se destacado pela sua eficiência em solubilizar K de agrominerais. Considerando que o BLE apresenta formas químicas diversas de K, o presente estudo busca entender o efeito do ácido oxálico na solubilização de K presente em BLEs produzidos em diferentes temperaturas de pirólise (300 °C (BLE300) e 500 °C (BLE500)). Os BLEs foram incubados em soluções de ácido oxálico em diferentes concentrações (0,33 mol/L; 0,67 mol/L e 1 mol/L). Após cada tempo de incubação (3 horas, 12 horas, 24 horas, 2 dias, 5 dias, 7 dias e 10 dias), o BLE foi separado das soluções por meio de filtragem. Os resultados indicaram que o ácido oxálico aumenta a solubilização de K dos biocarvões. Na maior concentração, o ácido oxálico solubilizou cerca de cinco e sete vezes mais K presente no BLE300 e BLE500, respectivamente, comparados ao controle (em água). Os resultados também mostraram que a reação acontece de forma rápida e a maior parte da liberação de K acontece logo nas três primeiras horas. Portanto, conclui-se que o ácido oxálico foi eficiente em liberar K dos BLE, aumentando assim o potencial fertilizante dos biocarvões. Estudos devem ser realizados para entender a ação do ácido oxálico na liberação de K de BLE no sistema solo-planta.

Termos para indexação: biochar de lodo de esgoto, solubilização de potássio, ácido oxálico.

Introdução

A crise alimentar causada pelo acelerado aumento da população, aliada às alterações climáticas e aos problemas geopolíticos, causa uma pressão sobre recursos disponíveis no solo. A produção de alimentos é predominantemente obtida pela fertilização dos solos. Porém, quando utilizados de maneira inadequada, os fertilizantes convencionais são facilmente perdidos por causa de escoamento superficial, lixiviação e volatilização por sua alta solubilidade, e podem causar problemas ambientais, como a eutrofização em águas superficiais e subterrâneas (Wang et al., 2023). Como alternativa aos fertilizantes convencionais, diversos insumos de origem orgânica têm sido utilizados na agricultura. O biocarvão tem sido visto como uma opção de grande potencial para aumentar a qualidade do solo e, conseqüentemente, a produção agrícola (Singh et al., 2022).

¹ Engenheira ambiental e sanitária, doutoranda em Agronomia, Universidade de Brasília, marcelagbsantos@gmail.com

² Engenheira-agrônoma, doutora em Produção Vegetal, Universidade de Brasília, camilarodcosta@gmail.com

³ Engenheira-agrônoma, Universidade de Brasília, andressabpd@hotmail.com

⁴ Engenheiro-agrônomo, doutor em Microbiologia Agrícola, Universidade Federal de Uberlândia, gilbertomendes@ufu.br

⁵ Geólogo, doutor em Geologia, Embrapa Cerrados, eder.martins@embrapa.br

⁶ Engenheiro-agrônomo, doutor em Agronomia, Embrapa Cerrado, giuliano.marchi@embrapa.br

⁷ Engenheira-agrônoma, Universidade de Brasília, rhailaviana@gmail.com

⁸ Engenheiro-agrônomo, doutor em Agronomia, Universidade de Brasília, cicerocef@unb.br

O biocarvão é o produto sólido da pirólise, que é o tratamento termoquímico de biomassas ricas em carbono (C). Entre as matérias-primas utilizadas, o lodo de esgoto (LE) possui alto potencial para se transformar em fertilizante sustentável após a pirólise (Figueiredo et al., 2017). O biocarvão de LE (BLE) é livre de patógenos, rico em C, nitrogênio (N), fósforo (P), cálcio (Ca) e zinco (Zn), contudo, possui níveis baixos de potássio (K). O K é um nutriente solúvel em água, sendo pouco incorporado à fase sólida do LE (Kirchmann et al., 2017; Fachinil et al., 2022).

Um mecanismo crucial para a liberação dos nutrientes do biocarvão no solo é a presença dos ácidos orgânicos de baixo peso molecular. Contudo, tal liberação ainda é pouco conhecida (Zhang et al., 2020). Os ácidos orgânicos de baixo peso molecular estão geralmente presentes na rizosfera, possuem um grande papel na melhoria das condições químicas e físicas do solo, e suas principais fontes são os exsudados de raízes de plantas, decomposição de matéria orgânica e metabólitos microbianos (Liu et al., 2017; Zhang et al., 2020).

As estruturas de K presentes no BLE, em sua maioria, estão na forma de sais e minerais (Liu et al., 2017), de difícil solubilização. O ácido oxálico apresenta grande potencial na liberação de K. Estudos anteriores mostram que esse ácido tem grande efeito na liberação tanto de K como de P presentes em rochas (Mendes et al., 2020; Duarte et al., 2021). Em razão da presença de compostos químicos inorgânicos de K no BLE, semelhantes aos presentes em rochas, o ácido oxálico pode atuar como solubilizador de K de biocarvões. O presente estudo busca avaliar o efeito do ácido oxálico na solubilização de K presente em diferentes BLEs.

Materiais e métodos

O BLE foi produzido a partir de amostras de LE coletadas na estação de tratamento de esgoto Melchior, pertencente à Companhia de Saneamento Ambiental do Distrito Federal (Caesb)/Brasília, Distrito Federal. As amostras do LE foram secas ao ar até atingir uma umidade de aproximadamente 10%, trituradas e peneiradas em peneira de 4 mm e, em seguida, foram submetidas a pirólise a 300 °C e a 500 °C em forno mufla (Linn Elektro, Eschenfelden, Alemanha). A taxa média de aumento de temperatura foi de 2,5 °C/min e o tempo de permanência foi de 5 horas. Em seguida, foi feita a caracterização química dos biocarvões, cujos resultados são apresentados na Tabela 1.

Tabela 1. Características químicas dos biocarvões produzidos a 300 °C (BLE300) e 500 °C (BLE500).

Características	Unidade	BLE300	BLE500
pH	-	6,00	6,4
Matéria orgânica	%	41,8	25,9
C orgânico	%	24,2	15
N	%	2,1	2,8
Relação C/N	-	11,5	5,4
K ₂ O (total orgânico)	%	0,24	0,43
P ₂ O ₅ (total)	%	5,70	5,90

Para o teste de liberação de K, foi pesada 0,4 g de BLE pirolisada a 300 °C (BLE300) e 500 °C (BLE500) em tubos Falcon de 50 mL. Em seguida, foram adicionados 40 mL de solução de ácido oxálico com concentrações de 0 mol/L (controle); 0,33 mol/L; 0,67 mol/L e 1 mol/L. Em seguida, os tubos foram agitados continuamente a 110 rpm, retirados nos períodos de 3 horas, 12 horas, 24 horas, 48 horas, 120 horas, 168 horas e 240 horas. Após o período de incubação, as amostras foram centrifugadas por 5 minutos a 3.300 rpm e filtradas em filtro de 8 µm e poros de 80 g m⁻². O K dissolvido foi medido com o uso do fotômetro de chama.

Modelos estatísticos foram ajustados aos dados de K liberados durante o período de incubação, usando-se regressão não linear. Na escolha dos melhores modelos de regressão foram considerados a significância (valor de P) e o coeficiente de determinação (R^2).

Para verificar se houve tendência de efeito de alteração estatística ao longo dos períodos avaliados, foi feito teste de tendência Mann-Kendall. Os resultados do teste que apresentaram valores “S” positivo e $p < 0,05$ indicam tendência de acréscimo significativo. Os testes de Mann-Kendall foram realizados pelo software R (R Development Core Team 2019).

Resultados e discussão

Na Figura 1, são apresentados os teores de K liberado pelos biocarvões, nos períodos de 3 horas, 12 horas, 24 horas, 2 dias, 5 dias, 7 dias e 10 dias. A presença do ácido oxálico, em todas as concentrações, permitiu uma maior liberação de K tanto para o BLE300 quanto o BLE500. Foi possível observar a influência do ácido oxálico logo no início do experimento. No período de 3 horas, na maior concentração, o ácido oxálico aumentou em mais de cinco vezes a liberação de K do BLE300 e em quase sete vezes o K liberado do BLE500 (Figura 1). Zhang et al. (2020) relataram resultados que sugerem o efeito de ácidos orgânicos de baixo peso molecular na liberação de K em biocarvão. Esse efeito é dominado pela estrutura molecular dos ácidos, pelo grau de dissociação e pela razão estequiométrica do elemento mineral nos biocarvões.

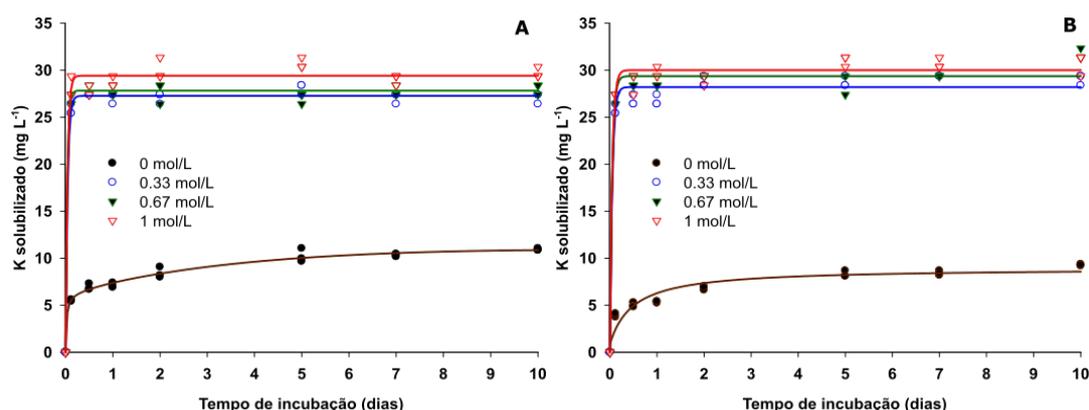


Figura 1. Liberação do K em biocarvão 300 °C (A) e 500 °C (B) em água e diferentes concentrações de ácido oxálico.

O aumento do tempo de incubação não influenciou a liberação do K em todas as concentrações do ácido oxálico para o BLE300, pelo teste de Mann-Kendall (Tabela 2). Já o BC500 apresentou tendência de aumento significativa com o aumento do tempo de incubação, em todas as concentrações. Apesar da tendência significativa de aumento, os resultados indicam que a ação do ácido oxálico sobre os dois tipos de biocarvões acontece logo nas primeiras horas da reação, ocorrendo apenas um pequeno aumento na liberação com o passar do tempo (Figura 1).

Quando avaliados os biocarvões em água, o teste de Mann-Kendall indicou uma tendência de aumento com altíssimo nível de confiança ($p < 0,01$) na solubilização do K (Tabela 2). A liberação do K no BLE500 em água foi menor e mais lenta, quando comparada ao BLE300 em água (Figura 1). No entanto, quando comparanda a ação do ácido oxálico nos biocarvões, observa-se uma maior liberação de K no BLE500. O aumento da temperatura de pirólise aumenta a concentração do K, mas também acarreta aumento na área de superfície específica, volume de poros e estruturas aromáticas de carbono, o que dificulta a liberação do nutriente (Yuan et al., 2015; Figueiredo et al., 2017). Provavelmente, o ácido oxálico forneceu prótons (H^+) que reagiram com o K pouco solúvel, liberando íons de K solúvel (Duarte et al., 2021; Rossati et al., 2023). Rossati et al. (2023) observaram

maior liberação de P em BLE300 e BLE500 na presença do *Aspergillus niger*, fungo produtor do ácido oxálico, o que reforça o potencial do ácido oxálico como solubilizador de nutrientes.

Tabela 2. Valores de p e S pelo teste de Mann-Kendall e Análise de regressão.

Tratamento	Mann-Kendall		Análise de regressão	
	p	S	Equação	R ²
BC 300 + Ac. oxálico 0	0,003**	1	$y = 7,7x/(0,05+x)+0,37$	0,98**
BC 300 + Ac. oxálico 0,33	0,738	-	$y = 27,3(1-e^{(-23,9x)})$	0,99**
BC 300 + Ac. oxálico 0,67	0,610	-	$y = 27,8(1-e^{(-29,9x)})$	0,99**
BC 300 + Ac. oxálico 1	0,764	-	$y = 29,4(1-e^{(-25x)})$	0,99**
BC 500 + Ac. oxálico 0	0,003**	1	$y = 0,9+8,1x/(0,5+x)$	0,92**
BC 500 + Ac. oxálico 0,33	0,012*	0,851	$y = 28,2(1-e^{(-20,3x)})$	0,99**
BC 500 + Ac. oxálico 0,67	0,031*	0,751	$y = 29,4(1-e^{(-24,2x)})$	0,99**
BC 500 + Ac. oxálico 1	0,023*	0,781	$y = 30(1-e^{(-20,3x)})$	0,99**

*, **: significativo a 5% ($p < 0,05$) e 1% ($p < 0,01$) de probabilidade, respectivamente.

Conclusão

Os resultados mostram que o ácido oxálico permitiu maior solubilização do K tanto do BLE300 quanto do BLE500. O BLE300 e o BLE500, em contato com o ácido oxálico, solubilizaram cerca de cinco e sete vezes mais K, respectivamente, do que a solubilização em água. Portanto, a aplicação conjunta do BLE e do ácido oxálico é uma alternativa promissora para o aumento da eficiência desses fertilizantes. No entanto, pouco se sabe a respeito da interação do biocarvão e do ácido oxálico no sistema solo-planta, e sobre solubilização de outros elementos. Sendo assim, novos estudos são necessários para uma segura e eficiente aplicação desses materiais.

Referências bibliográficas

- DUARTE, L. M.; XAVIER, L. V.; ROSSATI, K. F.; OLIVEIRA, V. A. D.; SCHIMICOSCKI, R. S.; ÁVILA NETO, C. N. D.; MENDES, G. O. Potassium extraction from the silicate rock Verdete using organic acids. *Scientia Agricola*, v. 79, n. 2, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1590/1678-992X-2020-0164>
- FACHINI, J; FIGUEIREDO, C. C.; VALE, A. T. Assessing potassium release in natural silica sand from novel K-enriched sewage sludge biochar fertilizers. *Journal of Environmental Management*, v. 314, [e]115080, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2022.115080>
- FIGUEIREDO, C.; LOPES, H.; COSER, T.; VALE, A.; BUSATO, J.; AGUIAR, N.; CANELLAS, L. Influence of pyrolysis temperature on chemical and physical properties of biochar from sewage sludge. *Archives of Agronomy and Soil Science*, v. 64, n. 6, p. 881-889, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1080/03650340.2017.1407870>
- KIRCHMANN, H.; BÖRJESSON, G.; KÄTTERER, T.; COHEN, Y. From agricultural use of sewage sludge to nutrient extraction: a soil science outlook. *Ambio*, v. 46, n. 2, p. 143-154, 2017. DOI: [10.1007/s13280-016-0816-3](https://doi.org/10.1007/s13280-016-0816-3)
- LIU, G.; CHEN, L.; JIANG, Z.; ZHENG, H.; DAI, Y.; LUO, X.; WANG, Z. Aging impacts of low molecular weight organic acids (LMWOAs) on furfural production residue-derived biochars: porosity, functional properties, and inorganic minerals. *Science of the Total Environment*, v. 607, p. 1428-1436, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.07.046>
- MENDES, G. O.; MURTA, H. M.; VALADARES, R. V.; DA SILVEIRA, W. B.; DA SILVA, I. R.; COSTA, M. D. Oxalic acid is more efficient than sulfuric acid for rock phosphate solubilization. *Minerals Engineering*, v. 155, 106458, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.mineng.2020.106458>
- R DEVELOPMENT CORE TEAM. R: A language and environment for statistical computing. *R Foundation for Statistical Computing*, Vienna, Austria, 2019. Disponível em: <https://www.R-project.org/>. Acesso em: 19 set. 2023.
- ROSSATI, K. F.; FIGUEIREDO, C. C.; MENDES, G. O. *Aspergillus niger* Enhances the Efficiency of Sewage Sludge Biochar as a Sustainable Phosphorus Source. *Sustainability*, v. 15, n. 8, 6940, 2023. DOI: <https://doi.org/10.3390/su15086940>

- SINGH, H.; NORTHUP, B. K.; RICE, C. W.; PRASAD, P. V. Biochar applications influence soil physical and chemical properties, microbial diversity, and crop productivity: a meta-analysis. **Biochar**, v. 4, n. 8, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1007/s42773-022-00138-1>
- WANG, K.; HOU, J.; ZHANG, S.; HU, W.; YI, G.; CHEN, W.; CHENG, L.; ZHANG, Q. Preparation of a new biochar-based microbial fertilizer: Nutrient release patterns and synergistic mechanisms to improve soil fertility. **Science of The Total Environment**, v. 860, 160478, 2023. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.160478>
- YUAN, H.; LU, T.; HUANG, H.; ZHAO, D.; KOBAYASHI, N.; CHEN, Y. Influence of pyrolysis temperature on physical and chemical properties of biochar made from sewage sludge. **Journal of Analytical and Applied Pyrolysis**, v. 112, p. 284-289, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jaap.2015.01.010>
- ZHANG, H.; LI, Q.; ZHANG, X.; CHEN, W.; NI, J.; YANG, L.; WEI, R. Insight into the mechanism of low molecular weight organic acids-mediated release of phosphorus and potassium from biochars. **Science of The Total Environment**, v. 742, 140416, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.140416>

Biomassas e biocombustíveis competitivos para estruturação do mercado brasileiro de hidrogênio carbono neutro ou negativo

Natália Moreno Viana¹, Andressa Ribeiro de Araújo², Emerson Léo Schultz³, Ana Cristina dos Santos⁴, Rossano Gambetta⁵, Sérgio Saraiva Nazareno dos Anjos⁶

Resumo

O hidrogênio pode ser considerado atualmente a fonte de energia limpa mais promissora para cumprimento das diretrizes do Protocolo de Kyoto, do Acordo de Paris e da COP 27. O Brasil tende a se destacar no mercado mundial de hidrogênio carbono neutro ou negativo pela sua alta representatividade no mercado internacional de biocombustíveis e pela diversidade de biomassas. O objetivo deste trabalho foi apresentar biomassas e biocombustíveis mais representativos em projetos brasileiros de Pesquisa, Desenvolvimento e Inovação (PD&I) para desenvolvimento de soluções tecnológicas para produção de hidrogênio carbono neutro ou negativo. Realizou-se uma análise prospectiva de projetos de PD&I executados entre janeiro de 2007 e julho de 2023 e recuperados de currículos cadastrados na plataforma Lattes/CNPq. Dos projetos selecionados, destacaram-se os termos etanol, biogás e cana-de-açúcar (incluindo biomassa, coprodutos e resíduos) como fontes de hidrogênio carbono neutro ou negativo. Mesmo que os resultados dos projetos de PD&I sejam alcançados e entregues nas próximas décadas, a prospecção de biomassas e biocombustíveis obteve resultados que fortalecem segmentos de mercado relevantes atualmente no Brasil (etanol e cana-de-açúcar) e que estão em expansão (biogás), que apresentam tendência científica favorável à competitividade no País no mercado mundial.

Termos para indexação: hidrogênio renovável, energia limpa, competitividade, projetos de PD&I.

Introdução

A busca por novas fontes de energia é um objetivo mundial para, além de mitigar os gases de efeito estufa, frear o aquecimento do planeta e cumprir os Objetivos do Desenvolvimento Sustentável (ODS), como ODS 7 (Energia Limpa e Acessível) e ODS 13 (Ação Contra a Mudança Global do Clima). Tais iniciativas compõem o cumprimento do Protocolo de Kyoto, do Acordo de Paris, visando a mitigação da emissão de gases de efeito de estufa, e da COP 27, para substituição de combustíveis fósseis por renováveis (Goldemberg, 2023).

O hidrogênio (H₂) é um elemento abundante no planeta, sendo encontrado na natureza essencialmente em combinação com outros elementos (Nazir et al., 2020). É considerado uma fonte de energia limpa, dependendo do método de obtenção, já que sua combustão não emite dióxido de carbono (CO₂), vantagem que tornou o H₂ alvo de interesse na exploração comercial para aplicação nos setores de energia industrial, residencial, comercial e de transporte, com o intuito de mitigar

¹ Bacharel em Gestão do Agronegócio, Embrapa Agroenergia (bolsa do projeto TED-Biogás, recursos SDI/Mapa), natalia.viana@colaborador.embrapa.br

² Graduada em Engenharia Química, Universidade de Brasília, andressaribeiro08@gmail.com

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

⁴ Administradora e jornalista, mestranda do Programa de Pós-Graduação em Propriedade Intelectual e Transferência de Tecnologia para a Inovação, Embrapa Agroenergia, anacristina.santos@embrapa.br

⁵ Engenheiro químico, doutor em Engenharia Química, Embrapa Agroenergia, rossano.gambetta@embrapa.br

⁶ Farmacêutico e administrador, doutorando em Ciências Ambientais, Embrapa Agroenergia, sergio.saraiva@embrapa.br

gases de efeito estufa (Nazir et al., 2020; Karmaker, et al., 2022; Goldemberg, 2023). Dentre os métodos de obtenção do hidrogênio, o mais utilizado atualmente é a reforma do gás natural, que, apesar de ser um processo de baixo custo, é baseado em fonte fóssil, portanto, emite CO_2 , que contribui para o agravamento do efeito estufa. Esse H_2 é utilizado principalmente na indústria petroquímica para a produção de amônia e no refino de petróleo (Dash et al., 2023).

A busca por combustíveis que contribuem para descarbonização desencadeou o desenvolvimento de tecnologias para a obtenção de hidrogênio com menor emissão de CO_2 . Uma alternativa em debate é o hidrogênio proveniente de fontes renováveis. No âmbito mercadológico, tem-se utilizado o termo “hidrogênio verde” para abarcar todas as fontes renováveis. No entanto, o termo refere-se apenas ao hidrogênio obtido a partir do processo de eletrólise da água usando energia elétrica obtida de fontes como eólica e solar, sendo esse o método mais utilizado pela indústria atualmente (*International Renewable Energy Agency*, [s.d.]).

Outro termo que tem sido utilizado é o “hidrogênio verde-musgo”, que se refere à produção de H_2 a partir de biomassas ou biocombustíveis, com ou sem captura de CO_2 , por métodos de gaseificação, reforma catalítica ou biodigestão anaeróbia (Oliveira, 2022). Contudo, por não serem essas as únicas rotas sustentáveis de produção e também em razão de divergência em relação às nomenclaturas, considera-se mais adequado utilizar o termo “hidrogênio carbono neutro ou negativo” para o hidrogênio obtido de fontes renováveis diversas (Brasil, 2022b).

A adoção de outras rotas de produção de hidrogênio carbono neutro ou negativo, além da eletrólise de água, como o que é obtido por meio da utilização de biomassa e biocombustíveis produzido por reformas catalíticas, gaseificação ou biodigestão (hidrogênio verde-musgo) (Oliveira, 2022), poderia tornar o Brasil mais competitivo no cenário global em razão da grande disponibilidade de resíduos agropecuários para aproveitamento energético (Empresa de Pesquisa Energética, 2019). Sendo assim, o objetivo deste trabalho é apresentar as biomassas e os biocombustíveis mais representativos em projetos brasileiros de Pesquisa, Desenvolvimento e Inovação (PD&I) e discutir o desenvolvimento de soluções tecnológicas para produção de hidrogênio carbono neutro ou negativo e estruturação do mercado nacional.

Materiais e métodos

Foi realizado um estudo prospectivo de caráter semiquantitativo e exploratório para evidenciar a obtenção de biomassas e biocombustíveis em projetos de Pesquisa, Desenvolvimento e Inovação (PD&I) em execução no Brasil. Os dados foram extraídos de currículos na Plataforma Lattes/CNPq, independentemente da fonte de financiamento, considerando a produção de hidrogênio carbono neutro ou negativo. Por ser a primeira etapa do desenvolvimento tecnológico, a análise prospectiva de projetos de PD&I permite levantar tendências científicas para posterior apoio na análise de tendências futuras (Motta et al., 2017). Em complemento, foram recuperados dados mercadológicos e produtivos sobre hidrogênio a partir de literatura científica, relatórios de mercado e legislação, com o intuito de analisar o atual cenário produtivo em relação às ações de PD&I.

A busca de projetos na Plataforma Lattes/CNPq foi realizada por nomes de pesquisadores brasileiros prospectados na base de dados *Web of Science* a partir de artigos científicos recuperados usando as palavras-chaves “renewable hydrogen” OR “moss green hydrogen” e depois refinada para o Brasil. Outros nomes foram recuperados em busca na própria plataforma Lattes/CNPq, considerando a palavra “hidrogênio”.

Em seguida, de cada currículo, foram extraídas as descrições fornecidas pelos autores de projetos com abordagem sobre hidrogênio carbono neutro ou negativo. No total, 194 currículos com

projetos abordando hidrogênio carbono neutro ou negativo foram recuperados, e desses foram selecionados 114 projetos para análise, sendo os dados consolidados em uma planilha eletrônica.

Resultados e discussão

Em 2020, a demanda global por hidrogênio alcançou 90 milhões de toneladas, com expectativa de atingir 175 milhões de toneladas até 2050, com custo de produção variando entre 1,20 US\$/kg–2,50 US\$/kg (Global..., 2022). Apesar de o hidrogênio se mostrar promissor para a transição energética, o elemento atraiu apenas 0,08% do total dos investimentos mundiais em 2022, contando com US\$ 1,1 bilhão, sendo a América o continente que mais contribuiu com os investimentos, 44% de participação (International Renewable Energy Agency, 2023).

No Brasil, a disponibilidade de energia proveniente de fontes renováveis atraiu investimentos nacionais e internacionais para a produção de hidrogênio no País, somando US\$ 27 bilhões em 2022. Por volta de 66,7% dos investimentos estão concentrados no Porto do Pecém, município de São Gonçalo do Amarante, CE, fato que se dá principalmente pela localização em uma zona de exportação, com conexão com portos marítimos da Europa, e pelo potencial de energia eólica e solar da região, possibilitando a produção via eletrólise da água, rota de produção de interesse da maioria dos investidores (Oliveira, 2022).

Apesar de a maioria dos investimentos se voltarem para a produção de hidrogênio via eletrólise da água, existe interesse na diversificação de rotas para a obtenção do elemento. Na busca de projetos em currículos na plataforma Lattes/CNPq, identificou-se que desde 2007 há projetos no Brasil voltados para a produção de hidrogênio a partir de biomassa e biocombustíveis. Foram identificados cerca de 20 biomassas e biocombustíveis nos 114 projetos analisados, conforme apresentado em nuvem de palavras na Figura 1. Dentre os termos mais recorrentes, destacam-se etanol, biogás e cana-de-açúcar, seguidos por resíduos agroindustriais, microalga e biomassa não especificada nos projetos.



Figura 1. Nuvem de palavras com recorrência de biomassas e biocombustíveis nos projetos para hidrogênio carbono neutro ou negativo.

Além dos investimentos em projetos de pesquisa e infraestrutura industrial que buscam contribuir para a descarbonização, percebe-se um esforço governamental para instituir normas legais e políticas públicas de regulação do uso de hidrogênio para fins energéticos no País. Em 2022, foi instituído o Programa Nacional do Hidrogênio, por meio da Resolução nº 6, de 23 de junho de 2022, com o objetivo de fortalecer o mercado e a indústria do hidrogênio como fonte energética e incentivar o desenvolvimento tecnológico nacional (Brasil, 2022a).

Ainda em 2022, foi elaborado o Projeto de Lei nº 1.878, de 2022, que propõe Política Nacional do Hidrogênio Verde, com o intuito de traçar diretrizes sobre produção, utilização, transporte, armazenamento e comércio de hidrogênio de carbono neutro ou negativo. Posteriormente, foi apresentada a Emenda 1 PLEN - PL 1.878/2022, que traz definições sobre as diferentes rotas de obtenção

de hidrogênio de forma sustentável como a partir de biomassa e biocombustíveis. Propõe também a inclusão delas no projeto de lei, ressaltando a importância de ampliar as rotas produtivas, sem evidenciar o hidrogênio verde obtido da eletrólise de água (Brasil, 2022b).

A produção de hidrogênio via fontes renováveis para a transição energética ainda enfrenta desafios, como no sistema de transporte, estocagem e viabilidade técnico-econômica, sendo que o custo de produção ainda não é competitivo em comparação ao obtido de fontes fósseis (Ahmed et al., 2021; Yin; Wang, 2022). O custo produtivo de hidrogênio obtido de biomassa pode alcançar entre 1,34 US\$/kg e 4,7 US\$/kg, enquanto o custo de obtenção do hidrogênio de fontes fósseis é entre 0,8 US\$/kg e 1,7 US\$/kg. Contudo, a rota produtiva via biomassa se mostra mais vantajosa em relação a outras rotas, como a partir de energia hidrelétrica, eólica e fotovoltaica para eletrólise, cujo custo produtivo alcança de 4,23 US\$/kg a 9,8 US\$/kg (Yin; Wang, 2022), o que norteia e estimula a confecção de novos projetos para avanço em escala de maturidade visando à obtenção de tecnologias prontas para licenciamento.

Conclusão

A diversificação da produção de energia é uma tendência mundial, particularmente para controle e mitigação de gases de efeito estufa, controle do aumento da temperatura do planeta e desenvolvimento de fontes limpas e sem emissão de carbono, segundo metas e diretrizes globais.

O hidrogênio é considerado uma das fontes mais promissoras de energia limpa e renovável e a maior parte do que é disponibilizado no mercado é obtida por eletrólise de água (hidrogênio verde). Biocombustíveis e biomassas também são fontes para obter hidrogênio verde-musgo, nos quais o Brasil tem destaque pela alta disponibilidade e diversidade de biomassas, bem como pela representatividade no mercado internacional de biocombustíveis.

Este estudo indica que desde 2007 há interesse em rotas de produção de hidrogênio a partir de biomassas e biocombustíveis, com ênfase para as cadeias produtivas do agronegócio do etanol, biogás e cana-de-açúcar. Assim, a partir da análise de projetos de PD&I no Brasil sobre hidrogênio carbono neutro ou negativo, suscitou-se tendência científica favorável à competitividade do País no mercado mundial. Houve também a indicação de prospecção de novas fontes além de etanol, biogás e cana-de-açúcar, como outros resíduos agroindustriais e microalgas, que podem tornar o Brasil competitivo no mercado mundial.

Referências bibliográficas

- AHMED, S. F.; RAFA, N.; MOFIJUR, M.; BADRUDDIN, I. A.; INAYAT, A.; ALI, M. S.; FARROK, O.; YUNUS KHAN, T. M. Biohydrogen production from biomass sources: metabolic pathways and economic analysis. *Frontiers in Energy Research*, v. 9, 2021. Article 753878.
- BRASIL. Ministério de Minas e Energia. **Resolução nº 6 de 23 de junho de 2022**. Institui o Programa Nacional do Hidrogênio, cria o Comitê Gestor do Programa Nacional do Hidrogênio, e dá outras providências. Brasília, DF, 2022a. Disponível em: <https://www.gov.br/mme/pt-br/assuntos/conselhos-e-comites/cnpe/resolucoes-do-cnpe/2022/Res62022.pdf>. Acesso em 24 jul. 2023.
- BRASIL. Senado Federal. **Projeto de Lei nº 1878, de 2022**. Cria a Política que regula a produção e usos para fins energéticos do Hidrogênio Verde. Brasília, DF, 2022b. Disponível em: https://legis.senado.leg.br/sdleg-getter/documento?dm=9180876&ts=1681996223718&disposition=inline&_gl=1*_qs1995*_ga*NTM5MTQ3MDY0LjE2OTUwNjM0MDU.*_ga_CW3ZH25XMK*MTY5NTA2MzQwNS4xLjEuMTY5NTA2MzUzNS4wLjAuMA. Acesso em: 24 jul. 2023.
- DASH, S. K.; CHAKRABORTY, S.; ELANGO VAN, D. A brief review of hydrogen production methods and their challenges. *Energies*, v. 16, n. 3, 2023. 1141.
- EMPRESA DE PESQUISA ENERGÉTICA. **Potencial energético dos resíduos agropecuários**. Brasília, 2019. (Informe Técnico, Série SUenergia). Disponível em: <https://shorturl.at/aACGO>. Acesso em: 26/09/2023
- GLOBAL hydrogen flows: hydrogen trade as a key enabler for efficient decarbonization. [S.l.]: Hydrogen Council: Mckinsey & Company, 2022.

- GOLDEMBERG, J. Trinta anos da convenção do clima. **Estudos Avançados**, v. 37, n. 107, p. 277-187, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/s0103-4014.2023.37107.016>. Acesso em: 22 jul. 2023.
- INTERNATIONAL RENEWABLE ENERGY AGENCY. **Policies for green hydrogen**. Abu Dhabi, [2023]. Disponível em: <https://www.irena.org/Energy-Transition/Policy/Policies-for-green-hydrogen>. Acesso em 19/07/2023.
- INTERNATIONAL RENEWABLE ENERGY AGENCY. **Global landscape of renewable energy finance**. Abu Dhabi, 2023.
- KARMAKER, S. C.; CHAPMAN, A.; SEN, K. K.; HOSAN, S.; SAHA, B. B. Renewable energy pathways toward accelerating hydrogen fuel production: evidence from global hydrogen modeling. **Sustainability**, v. 15, n. 1, 2022. 588.
- MOTTA, L. J.; FERRAZ, R. R. N.; QUONIAM, L.; MENA-CHALCO, J. P. Prospecção acadêmica dos projetos financiados sobre dengue no Brasil: uso da ferramenta Sciplattes como apoio ao planejamento de pesquisas em saúde pública. **Encontros Bibli: Revista Eletrônica de Biblioteconomia e Ciência da Informação**, v. 22, n. 50, p. 114-127, 2017. DOI: 10.5007/1518-2924.2017v22n50p114.
- NAZIR, H.; LOUIS, C.; JOSE, S.; PRAKASH, J.; MUTHUSWAMY, N.; BUAN, M. E. M.; FLOX, C.; CHAVAN, S.; SHI, X.; KAURANEN, P.; KALLIO, T.; MAIA, G.; TAMMEVESKI, K.; LYMPEROPOULOS, N.; CARCADEA, E.; VEZIROGLU, E.; IRANZO, A.; KANNAN, A. M. Is the H2 economy realizable in the foreseeable future? Part I: H2 production methods. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 45, n. 27, p. 13777-13788, 2020.
- OLIVEIRA, R. C. dos. **Panorama do hidrogênio no Brasil**. Brasília: Instituto de Pesquisa Econômica Aplicada, 2022. (Texto para Discussão, 2787). Disponível em: <https://repositorio.ipea.gov.br/handle/11058/11291>. Acesso em: 22 jul. 2023.
- YIN, Y.; WANG, J. Production of biohydrogen. In: CASTRO, F. I. G.; GUTIÉRREZ-ANTONIO, C. (Ed.). **Biofuels and biorefining**. Amsterdam: Elsevier, 2022. p. 283-337.

Efeito do ácido oxálico na liberação de fósforo de biomassa pirolisada de lodo de esgoto

Ludmila Soares Peixoto¹, Camila Rodrigues Costa², Jóisman Fachini³, Gilberto de Oliveira Mendes⁴, Juscelina Arcanjo dos Santos⁵, Isabela Dias de Souza⁶, Anselmo de Deus Santos⁷, Ivan Gabriel Rocha da Silva⁸, Lourival Alves Neto⁹, Cícero Célio de Figueiredo¹⁰

Resumo

O biocarvão obtido por meio da pirólise do lodo de esgoto (LE) representa uma alternativa para viabilizar o uso do LE na agricultura. O biocarvão de LE (BLE) é um insumo rico em carbono e nutrientes, principalmente fósforo (P). Apesar disso, muitas vezes os nutrientes presentes no BLE não estão disponíveis para absorção pelas plantas. O BLE apresenta diferentes frações de P (orgânico e inorgânico) que variam em função da temperatura de pirólise. Nesse sentido, o objetivo do estudo foi avaliar a influência de ácidos orgânicos na liberação de P do BLE no solo ao longo do tempo. Para isso, foram avaliados o efeito do ácido orgânico (oxálico) na disponibilização de P em dois BLE produzidos a 300 °C (BLE 300 °C) e a 500 °C (BLE 500 °C). O fertilizante convencional (MAP) também foi avaliado. Todos os fertilizantes foram incubados e avaliados nos períodos de 12 horas, 2 dias, 5 dias, 15 dias, 30 dias e 60 dias. Os resultados mostraram que o ácido oxálico foi crucial para a liberação do P nos biocarvões, principalmente para o biocarvão 500 °C (BC500). O presente estudo indicou que a aplicação conjunta do biocarvão de lodo de esgoto com ácido oxálico tem potencial para aumentar a liberação do P e, conseqüentemente, aumentar a eficiência agrônômica do biocarvão como fertilizante de base orgânica.

Termos para indexação: biochar de lodo de esgoto, ácido oxálico, solubilização de fósforo.

Introdução

O crescimento da população global tem acarretado um aumento na produção de lodo de esgoto (LE). Em razão de suas características, o LE apresenta potencial para ser utilizado na agricultura, como fertilizante e/ou condicionador do solo (Romanos et al., 2019). No entanto, a aplicação direta do LE apresenta limitações, pela possível presença de patógenos e outros poluentes (Fang et al., 2021). A pirólise do LE é uma alternativa para viabilizar o uso do LE na agricultura. O biocarvão de LE (BLE), produto sólido da pirólise do LE, é um insumo livre de patógenos e rico em nutrientes (Paz-Ferreiro et al., 2018; Chagas et al., 2021, 2022).

Dentre os principais nutrientes presentes no BLE, o fósforo (P) é aquele que normalmente se destaca com maior concentração (Figueiredo et al., 2018; Adhikari et al., 2019). Estudos indicam que a maior parte do P presente no BLE está em formas inorgânicas com diferentes níveis de estabilidade química (Figueiredo et al., 2021), nem sempre estando disponível para absorção pelas

¹ Graduanda em Agronomia na Universidade de Brasília, lud.ludmila.mila@gmail.com

² Agrônoma, doutora em Produção Vegetal, Universidade de Brasília, camilarodcosta@gmail.com

³ Agrônoma, doutora em Agronomia, Universidade de Brasília, joismanfachini@hotmail.com

⁴ Agrônomo, doutor em Microbiologia Agrícola, Universidade Federal de Uberlândia

⁵ Engenheira florestal, doutora em Engenharia Florestal, Universidade de Brasília, celinarcnjo@hotmail.com

⁶ Agrônoma, Universidade de Brasília, isabela99dias99@gmail.com

⁷ Lic. Ciências Agrícolas, doutor em Zootecnia, Instituto Federal de Sergipe, anselmo.santos@ifs.edu.br

⁸ Graduando em Agronomia, Universidade de Brasília, ivangabrielrs@gmail.com

⁹ Graduando em Agronomia, Universidade de Brasília, lourival4591@gmail.com

¹⁰ Agrônomo, doutor em Agronomia, Universidade de Brasília, cicerocef@unb.br

plantas. Uma alternativa para aumentar a solubilização do P presente no BLE é a sua utilização conjunta com ácidos orgânicos (Gadd, 2007).

Vários estudos vêm mostrando a eficiência do ácido oxálico para a solubilização do P de rochas fosfatadas (Amaro et al., 2023). No entanto, ainda são escassos os estudos sobre as interações entre o BLE e ácidos orgânicos. Sendo assim, o objetivo deste estudo foi avaliar a influência do ácido oxálico na liberação de P do BLE no solo ao longo do tempo.

Materiais e métodos

Para produção do BLE, foram utilizadas amostras de LE da estação de tratamento de esgoto (ETE) Melchior, localizada em Samambaia, DF, Brasil. O LE seco foi triturado e passado em peneira de 4 mm.

A pirólise do LE foi realizada nas temperaturas de 300 °C e 500 °C em forno de pirólise (Linn Elektro Therm, Eschenfelden, Alemanha), a uma taxa média de aumento de temperatura de 2,5 °C/min, e tempo de residência de 5 horas.

Antes de realizar o ensaio de incubação e após o processo de pirólise, foi feita a caracterização química e física dos BLEs. Para o ensaio de incubação, foram coletadas amostras de solo na camada de 0 cm–20 cm de um Neossolo Quartzarênico. O solo coletado foi seco ao ar, peneirado (2 mm), e submetido a análises químicas e de textura (Teixeira et al., 2017). Foi feita a correção do pH, conforme a análise de solo.

O experimento foi montado em delineamento inteiramente casualizado com três repetições. Os seguintes tratamentos foram avaliados: solo sem fertilizante (controle); aplicação de fertilizante fosfatado solúvel (MAP); biocarvão 300 °C (BC300); e biocarvão 500 °C (BC500). Os tratamentos foram duplicados, na presença ou ausência de ácido oxálico, aplicado na concentração de 10%.

A dinâmica de liberação de P nos BLEs e no MAP foi realizada conforme procedimento adaptado de Bley et al. (2017). Cinco gramas dos biocarvões e do MAP foram colocados em pequenos “sachês” com malha permeável de poliéster e selados nas extremidades. Os sachês foram cobertos por 100 g de solo.

O solo permaneceu incubado com os sachês pelos seguintes períodos: 12 horas, 2 dias, 5 dias, 15 dias, 30 dias e 60 dias após o início da incubação. Após cada período de incubação, os sachês foram separados do solo. Toda a massa de solo foi homogeneizada, e foi retirada uma alíquota para determinação dos teores de P pelo extrator Mehlich 1.

Os teores de P foram estimados por espectrofotometria, com densidade ótica no fotocolorímetro usando filtro vermelho, comprimento de onda 660 nm (Silva, 2009). Os teores de P acumulados após 60 dias foram submetidos à análise de variância, e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). Todas as análises foram realizadas utilizando o software XLSTAT (Addinsoft, 2013).

Resultados e discussão

A análise química e de textura do solo utilizada neste estudo encontra-se na Tabela 1 abaixo.

Tabela 1. Coleta do solo, peneiramento e solo peneirado.

Atributo	Unidade	Neossolo
pH (CaCl ₂)	.	5,2
Ca	cmol/dm ³	2,0

Continua...

Tabela 1. Continuação.

Atributo	Unidade	Neossolo
Mg	cmol _c /dm ³	0,8
Al	cmol _c /dm ³	0,00
H + Al	cmol _c /dm ³	1,6
CTC*	cmol _c /dm ³	4,47
P (Mehlich I)	mg/dm ³	1,0
K	mg/dm ³	26
Mat. Org.	%	2,0
Sat. Base (V%)	%	64
Argila	g/kg ⁻¹	105,3
Areia	g/kg ⁻¹	846,8
Silte	g/kg ⁻¹	47,9

*CTC: capacidade de troca de cátions.

Na Tabela 2, encontra-se o resultado da caracterização química dos biocarvões de lodo de esgoto.

Tabela 2. Características químicas dos biocarvões de lodo de esgoto.

Característica	Unidade	LE ¹	BLE300 ²	BLE500 ³
K ₂ O	%	0,2	0,3	0,3
pH	.	6,4	6,5	6,2
P ₂ O ₅ (Total)	%	5,70	5,50	6,0
Ca	%	0,74	0,70	0,64
Mg	%	0,20	0,18	0,20
S	%	0,96	0,86	1,0
Cu	mg/kg	100	115	148
C. Org	%	7,8	7,5	15,2

¹Lodo de esgoto; ²biocarvão 300 °C; ³biocarvão 500 °C.

A disponibilidade de P no solo ao longo de 60 dias pode ser vista na Figura 1. De maneira geral, praticamente não ocorreu a liberação do P do BC300 e do BC500 em água (Figuras 1ab). Por outro lado, o ácido aumentou a solubilização de P dos biochars.

A liberação de P foi mais rápida e maior no fertilizante mineral (MAP) do que nos biocarvões. O MAP apresentou um teor de 48% de P₂O₅ (Brasil, 2020), valor esse muito superior aos encontrados nos dois biocarvões (5,5% e 6,0% no BLE300 e BLE500, respectivamente). Diferentemente dos biocarvões, a liberação do P no MAP foi maior em água do que na solução ácida.

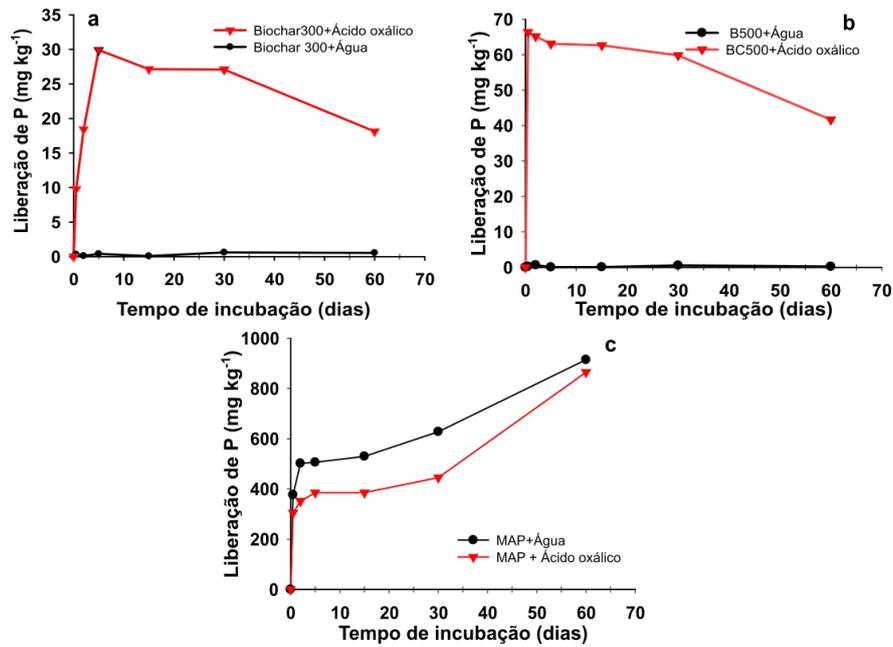


Figura 1. Liberação de fósforo: (a) MAP em água e ácido oxálico; (b) biocarvão 300 °C em água e ácido oxálico; (c) biocarvão 500 °C em água e ácido oxálico.

O ácido oxálico permitiu uma maior liberação do P dos biocarvões nas primeiras horas após a aplicação (Figuras 1a,b), principalmente para o BC500. Estudos vêm mostrando o potencial do ácido oxálico em solubilizar rochas fosfatadas de diferentes origens (Mendes et al., 2022; Amaro et al., 2023), sendo muitas vezes mais eficiente que o ácido sulfúrico.

Aos 60 dias do início da incubação, quando excluído o MAP, o BLE500 na presença de ácido oxálico possibilitou a maior concentração de P no solo ($p < 0,05$; Figura 2). Normalmente, os biocarvões produzidos a 500 °C apresentam maior teor de P total quando comparados àqueles obtidos a 300 °C (Figueiredo et al., 2021; Rossati et al., 2023).

Provavelmente, por essa razão, ocorreu maior liberação do P no BC500. O ácido oxálico pode ter fornecido prótons (H^+) que reagiram com os minerais de fosfato pouco solúveis e liberaram os íons solúveis de fosfato.

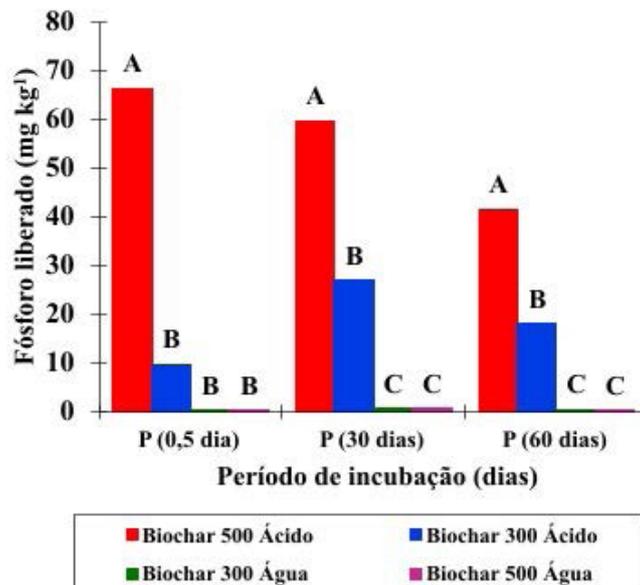


Figura 2. P presente nos biocarvões liberado no solo após diferentes períodos de incubação.

Conclusão

O presente estudo indicou que a aplicação conjunta do biocarvão de lodo de esgoto com ácido oxálico tem potencial para aumentar a liberação do P e, conseqüentemente, aumentar a eficiência agrônômica do biocarvão como fertilizante de base orgânica. No entanto, novos estudos devem abordar a interação do biocarvão e do ácido oxálico no sistema solo-planta.

Referências bibliográficas

ADDINSOFT. **XLSTAT**: statistical software for Microsoft Excel. 2013.

ADHIKARI, S.; GASCO, G.; MENDEZ, A.; SURAPANENI, A.; JEGATHEESAN, V.; SHAH, K.; PAZ-FERREIRO, J. Influence of pyrolysis parameters on phosphorus fractions of biosolids derived biochar. **Science of the Total Environment**, v. 695, 2019. Article 133846.

AMARO, J. K. C.; XAVIER, L. V.; RIBEIRO, M. M. A. de C.; VIEIRA, B. S.; MENDES, G. de O. Optimization of oxalic acid production by fungi for biotechnological solubilization of rock phosphate. **Scientia Agricola**, v. 80, 2023. e20210076.

BLEY, H.; GIANELLO, C.; SANTOS, L. da S.; SELAU, L. P. R. Nutrient release, plant nutrition, and potassium leaching from Polymer-Coated fertilizer. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 41, 2017. e0160142.

BRASIL. Ministério da Agricultura. Especificações dos fertilizantes minerais simples. Disponível em < <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/insumos-agropecuarios/insumos-agricolas/fertilizantes/legislacao/anexo-i-in-39-2018-inclui-observ-nos-nitratos-e-sol-nitrog-21-02-20.pdf>>. Acessado em 30 de maio de 2023.

CHAGAS, J. K. M.; FIGUEIREDO, C. C. de; PAZ-FERREIRO, J. Sewage sludge biochars effects on corn response and nutrition and on soil properties in a 5-yr field experiment. **Geoderma**, v. 401, 2021. Article 115323.

CHAGAS, J. K. M.; FIGUEIREDO, C. C. de; RAMOS, M. L. G. Biochar increases soil carbon pools: evidence from a global meta-analysis. **Journal of Environmental Management**, v. 305, 2022. Article 114403.

FANG, L.; WANG, Q.; LI, J.-S.; POON, C. S.; CHEESEMAN, C. R.; DONATELLO, S.; TSANG, D. C. Feasibility of wet-extraction of phosphorus from Incinerated Sewage Sludge Ash (ISSA) for phosphate fertilizer production: a critical review. **Critical Reviews in Environmental Science and Technology**, v. 51, n. 9, p. 939-971, 2021.

FIGUEIREDO, C. C. de; REIS, A. de S. P. J.; ARAUJO, A. S. de; BLUM, A. S. de; SHAH, L. E.; PAZ-FERREIRO, J.; KALPIT, S.; PAZ-FERREIRO, J. Assessing the potential of sewage sludge-derived biochar as a novel phosphorus fertilizer: influence of extractant solutions and pyrolysis temperatures. **Waste Management**, v. 124, p. 144-153, 2021.

FIGUEIREDO, C.; LOPES, H.; COSER, T.; VALE, A.; BUSATO, J.; AGUIAR, N.; NOVOTNY, E.; CANELLAS, L. Influence of pyrolysis temperature on chemical and physical properties of biochar from sewage sludge. **Archives of Agronomy and Soil Science**, v. 64, n. 6, p. 881-889, 2018.

GADD, G. M. Geomycology: biogeochemical transformations of rocks, minerals, metals and radionuclides by fungi, bioweathering and bioremediation. **Mycological Research**, v. 111, n. 1, p. 3-49, 2007.

MENDES, G. D. O.; DYER, T.; CSETENYI, L.; GADD, G. M. Rock phosphate solubilization by abiotic and fungal-produced oxalic acid: reaction parameters and bioleaching potential. **Microbial Biotechnology**, v. 15, n. 4, p. 1189-1202, 2022.

PAZ-FERREIRO, J.; NIETO, A.; MÉNDEZ, A.; ASKELAND, M.; GASCÓ, G. Biochar from biosolids pyrolysis: a review. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 15, n. 5, 2018. 956.

ROMANOS, D.; NEMER, N.; KHAIRALLAH, Y.; ABI SAAB, M. T. Assessing the quality of sewage sludge as an agricultural soil amendment in Mediterranean habitats. **International Journal of Recycling of Organic Waste in Agriculture**, v. 8, n. suppl. 1, p. 377-383, 2019.

ROSSATI, K. F.; FIGUEIREDO, C. C. de; MENDES, G. de O. *Aspergillus niger* enhances the efficiency of sewage sludge biochar as a sustainable phosphorus source. **Sustainability**, v. 15, n. 8, 2023. 6940.

SILVA, F. C. da (Ed.). **Manual de análises químicas de solos, plantas e fertilizantes**. 2. ed. rev. e ampl. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica; Rio de Janeiro: Embrapa Solos, 2009.

TEIXEIRA, P. C., DONAGEMMA, G. K., FONTANA, A., TEIXEIRA, W. G. **Manual de métodos de análise de solo**. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica; Rio de Janeiro: Embrapa Solos, 2017.

Obtenção de biolubrificante a partir de óleo de palma (*Elaeis guineense*)

Ingrid dos Santos Cavalcanti¹, Itânia Pinheiro Soares²

Resumo

Os óleos lubrificantes são constituídos de óleos básicos (minerais e/ou sintéticos) e aditivos. Os óleos básicos, os principais constituintes, são predominantemente oriundos do petróleo. O mercado global de lubrificantes em 2021 foi de 39,71 bilhões de litros. O mercado nacional fechou o ano com alta nas vendas de 9,4%, em comparação ao ano de 2020, com um volume total de 1.477.351 m³. O aumento da demanda desse importante produto, atrelado à consciência ambiental, tem impulsionado a busca por processos de obtenção mais eficientes e por matérias-primas renováveis. Os óleos vegetais têm se mostrado uma interessante matéria-prima para a produção de lubrificantes, principalmente por sua biodegradabilidade e baixa ecotoxicidade. Além dessas características, os óleos vegetais possuem outras vantagens, no que se refere às características físico-químicas, como a lubrificidade, o índice de viscosidade e a volatilidade superior. No entanto, a aplicabilidade dos óleos vegetais na lubrificação é parcialmente limitada. Os óleos vegetais apresentam menor estabilidade oxidativa do que os óleos minerais e degradam-se ao serem utilizados como lubrificantes, gerando compostos insolúveis, o que aumenta a viscosidade e a acidez do produto. Isso se deve às insaturações nas cadeias dos triglicerídeos. Uma alternativa seria a modificação química do óleo na tentativa de aumentar a estabilidade oxidativa e melhorar as características. Assim, neste estudo, foram realizadas reações de transesterificação do óleo de palma (*Elaeis guineense*), seguidas de reação de epoxidação, para obtenção do óleo básico para biolubrificante. As análises de estabilidade oxidativa mostraram maior tempo de indução, ou seja, maior estabilidade oxidativa do óleo epoxidado, comparado ao éster de óleo.

Termos de indexação: biolubrificante, epoxidação, transesterificação, óleo de palma, estabilidade oxidativa.

Introdução

Os óleos lubrificantes podem ser definidos como substâncias que se interpõem entre superfícies, formando uma película que evita ou minimiza o atrito, diminuindo o desgaste. Os óleos lubrificantes apresentam características que lhes são conferidas pela composição e pelos aditivos adicionados (Brasil, 2020).

O componente principal de um óleo lubrificante acabado é o óleo básico, que pode ser de origem mineral (primeiro refino ou rerrefinado), sintética ou vegetal.

O mercado brasileiro de lubrificantes apresentou uma recuperação importante no mês de março, fechando o 1º trimestre de 2023 com um volume de 364.847 m³, representando uma alta de 3,8% em relação ao mesmo período do ano anterior. As importações de óleos básicos aumentaram em 23,3%, atingindo um total de 152.315 m³ no trimestre (Mordor Intelligence, 2023).

¹ Química, mestre em Ciências de Materiais, Universidade de Brasília, ingrid.cavalcanti@colaborador.embrapa.br

² Química, doutora em Química Analítica, Embrapa Agroenergia, itania.soares@embrapa.br

Diante do exposto, fica evidente a necessidade de ampliar a utilização dos recursos renováveis, em detrimento dos recursos fósseis, na obtenção de biocombustíveis e derivados, como é o caso dos biolubrificantes.

Os óleos vegetais, além de serem utilizados na produção de biodiesel, têm se mostrado como uma interessante matéria-prima, com potencial para produção de lubrificantes, principalmente pela biodegradabilidade e pela baixa ecotoxicidade. Os biolubrificantes são considerados uma nova classe de lubrificante, diferente dos convencionais, apresentando um importante avanço na área de produtos considerados altamente ecológicos. Os ésteres de ácidos graxos presentes em óleos vegetais são comumente usados como lubrificante com características favoráveis ao ambiente e ao bom desempenho nas máquinas. Além dessas características, os óleos vegetais possuem outras vantagens, no que se refere às características físico-químicas, como a lubricidade, o índice de viscosidade e a volatilidade superior. Porém os óleos vegetais apresentam menor estabilidade oxidativa do que os óleos minerais e, ao serem utilizados como lubrificantes, degradam-se, gerando compostos insolúveis, o que aumenta a viscosidade e a acidez do produto. Isso se deve às insaturações nas cadeias dos triglicerídeos. Uma alternativa seria a modificação química do óleo na tentativa de aumentar a estabilidade oxidativa. Apesar de alguns trabalhos sugerirem a utilização de ésteres de ácidos graxos como lubrificantes, eles ainda apresentam certa disponibilidade à oxidação. Dessa forma, o objetivo do trabalho foi de transesterificar o óleo e em seguida realizar modificações químicas por epoxidação para obtenção de um óleo-base para utilização como biolubrificante, objetivando o aumento da estabilidade comparada aos seus ésteres.

Materiais e métodos

Foram utilizadas duas amostras de óleo de palma (*Elaeis guineense*), com diferentes datas de aquisição (2016 e 2021) na produção de óleo-base para lubrificante com a expectativa de aumentar o tempo de estabilidade oxidativa, em relação aos respectivos ésteres. Assim, os óleos foram transesterificados e, em seguida, foram epoxidados, gerando um novo produto (biolubrificante).

Produção de ésteres metílicos

O óleo de palma *Elaeis guineense* (100 g), 18 g de metanol e 1 g de ácido sulfúrico foram adicionados em um balão de fundo chato, sob aquecimento (60 °C) e agitação durante 1 hora. Após a reação, a amostra foi rotaevaporada para retirada de excesso de solvente e água. À amostra resultante (massa 100 g), foram adicionados 25 g de metanol e 1 g hidróxido de potássio, mantidos a 60 °C, com vigorosa agitação por 1 hora. Obtiveram-se assim os ésteres metílicos (biodiesel), que foram utilizados na produção do biolubrificante.

Produção do biolubrificante

Em um balão de fundo redondo, foram adicionados 30 g de biodiesel produzido anteriormente, 100 mL de tolueno e 0,3 g de ácido fórmico, sob agitação, em temperatura ambiente. Com o auxílio de um funil de adição, lentamente foram adicionados 100 mL de peróxido de hidrogênio. A reação foi mantida sob agitação por 18 horas. Em seguida, foi realizada a separação da fase orgânica (superior), que foi neutralizada com solução de bicarbonato de sódio 10%. Foram utilizados em torno de 100 mL dessa solução para a completa neutralização, e também foram realizadas lavagens utilizando-se água destilada, até a amostra apresentar pH 7. Ao produto obtido, foram adicionados 5 g de sulfato de sódio anidro; ele agitado e deixado em descanso por 1 hora. Após descanso, a amostra foi filtrada a vácuo, e o solvente foi retirado por rotaevaporação. Obteve-se uma massa de ésteres epoxidados em torno de 29 g a 30 g. Em seguida, aos ésteres epoxidados obtidos, foi adicionado 0,5 g de ácido metanossulfônico (2% em relação ao éster), sob agitação e temperatura de 80 °C, por 1 hora, enquanto foi feita a adição gradativa e lenta de 6,25 g de álcool isoamílico. A reação permaneceu por mais 3 horas a 90 °C.

Ao término da reação, o produto foi transferido para um funil de separação, lavado com solução de bicarbonato de sódio 10% e água destilada até a completa neutralização. O excesso de solvente e água foi rotaevaporado, obtendo-se o biolubrificante.

Estabilidade oxidativa

As análises de estabilidade oxidativa dos ésteres e dos respectivos lubrificantes foram feitas segundo norma EN ISO 14102, utilizando-se um Rancimat 873, Metrohm.

Resultados e discussão

A partir dos triglicerídeos presentes no óleo de palma, obtém-se o biodiesel (ésteres). Esses ésteres são epoxidados. Em seguida, é feito o tratamento do produto obtido em meio ácido. A reação em meio ácido promove a protonação do epóxido que pode ter o anel de três membros aberto por qualquer nucleófilo fraco tal, como álcool e água. Na abertura do anel oxirano catalisada por ácido de um epóxido assimétrico, o nucleófilo ataca preferencialmente o átomo de carbono mais substituído. Esse mecanismo pode ser visualizado na Figura 1. O carbono do epóxido protonado assimétrico mais substituído contém uma densidade parcial de carga positiva maior. No estado de transição, assemelha-se a um carbocátion terciário mais estável. Logo, a reação ocorre preferencialmente nesse carbono mais substituído.

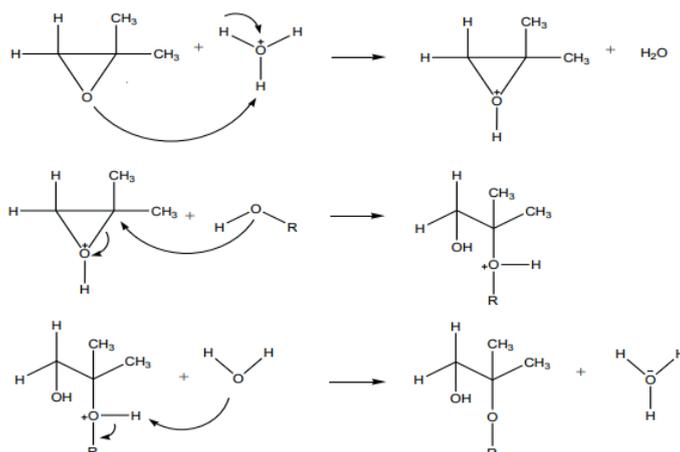


Figura 1. Mecanismo de abertura do anel oxirano em meio ácido de um epóxido assimétrico.

Fonte: Adaptado de Solomons e Fryhle (2005).

A Figura 2 ilustra o aspecto visual das amostras. Percebe-se, no caso do óleo de palma bruto, que a amostra aparece mais opaca e turva comparada aos ésteres (biodiesel) e ao óleo lubrificante.

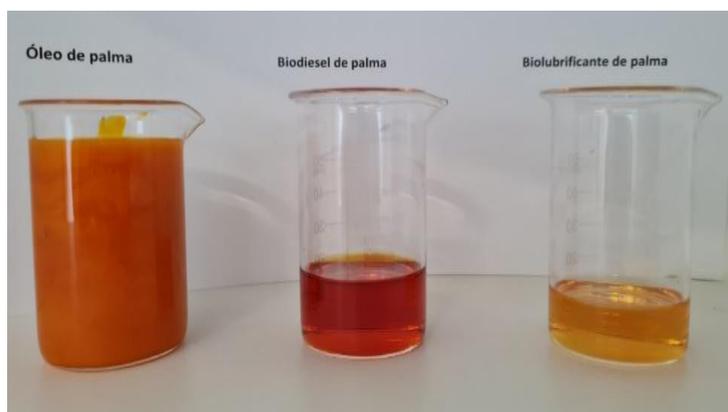


Figura 2. Óleo de palma, ésteres metílicos (biodiesel) e biolubrificante, respectivamente.

Após produzir os ésteres e epoxidá-los, foram feitas as análises de estabilidade oxidativa do biodiesel e dos respectivos biolubrificantes. Os resultados das análises de estabilidade oxidativa são apresentados na Tabela 1.

Tabela 1. Resultados das análises de estabilidade oxidativa.

Ésteres metílicos	Replicata	Tempo/h	Biolubrificante correspondente	Replicata	Tempo/h
Amostra 2016	1	9,08	Biolubrificante 2016	1	15,10
	2	9,07		2	15,08
	Média	9,07		Média	15,09
	Desvio P	0,00		Desvio P	0,01
Amostra 2021	1	10,33	Biolubrificante 2021	1	15,25
	2	10,71		2	14,75
	Média	10,52		Média	15,00
	Desvio P	0,19		Desvio P	0,35

A utilização de amostras com diferentes datas de armazenamento teve o objetivo de verificar a influência que poderia ter na estabilidade, em razão da presença de diferentes teores de ácidos graxos na amostra. Quando se comparam os ésteres obtidos com as amostras nos dois períodos, observa-se que a amostra estocada há menos tempo (2021) apresentou maior estabilidade. Isso indica que a degradação do óleo impactou no produto gerado. No entanto, quando se comparam os ésteres epoxidados, as médias são similares. Ou seja, o fato de o óleo estar estocado há mais tempo não alterou a qualidade do produto. Além disso, constata-se que as reações de epoxidação dos éteres foram efetivas para o aumento da estabilidade oxidativa.

Conclusão

Observa-se pelos métodos e resultados obtidos que o óleo de palma tem grande potencial para o uso na obtenção do biolubrificante, já que os processos para produção e obtenção são relativamente simples.

A modificação proposta por epoxidação altera as características do óleo, elevando a estabilidade oxidativa em aproximadamente 6 horas em comparação ao biodiesel, seus ésteres precursores. Existem diversas aplicações para os óleos lubrificantes. Uma das principais características a ser monitorada quando se fala em utilização de óleos vegetais é a estabilidade oxidativa. A partir daí, são adicionados aditivos de acordo com a necessidade de uso. No entanto, outras propriedades físico-químicas podem ser investigadas para melhor caracterizar o produto.

Referências bibliográficas

BRASIL. Ministério de Minas e Energia. **Lubrificantes**. Brasília, DF, 2020. Disponível em: <https://www.gov.br/anp/pt-br/assuntos/producao-de-derivados-de-petroleo-e-processamento-de-gas-natural/producao-de-derivados-de-petroleo-e-processamento-de-gas-natural/lubrificantes>. Acesso em: jul. 2023.

MORDOR INTELLIGENCE. Mercado global de lubrificantes: tamanho, compartilhamento, impacto da Covid-19 e previsões até 2026. Disponível em: <https://www.mordorintelligence.com/pt/industry-reports/global-lubricants-market-industry>. Acesso em: jul. 2023.

Otimização do cultivo de *Burkholderia gladioli* BRM 58833 por fermentação submersa

Pedro Alves Martins¹, Diogo Keiji Nakai², Thaís Fabiana Chan Salum³

Resumo

O objetivo do estudo foi entender as melhores condições de fermentação da *Burkholderia gladioli* BRM 58833 submersa a partir de condições encontradas na literatura para a produção de enzima com atividade lipolítica elevada. Para isso, foi realizado um Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR), considerando três variáveis (pH, concentração de fosfato de amônio e óleo de dendê) em cinco níveis e em cinco diferentes tempos. Resultou-se então em cinco conjuntos de análises estatísticas e 15 cinéticas. As análises estatísticas dos dados indicaram que apenas o cultivo de 24 horas apresentou um coeficiente de ajuste adequado do modelo gerado, porém com atividades lipolíticas inferiores aos tempos mais longos. O modelo gerado indica que menor concentração de fosfato de amônio e pH próximo da neutralidade tendem a mostrar atividades lipolíticas mais elevadas. Essa tendência foi verificada nos tempos subsequentes (48 horas, 72 horas, 96 horas e 168 horas).

Termos para indexação: *Burkholderia gladioli*, otimização, cinética, lipase.

Introdução

A produção de lipases por microrganismos tem sido objeto de intensa pesquisa, por sua ampla aplicação em diversas indústrias, incluindo a de alimentos, detergentes e biocombustíveis. *Burkholderia* é um gênero de bactérias conhecido por sua capacidade lipolítica, e a espécie *Burkholderia gladioli* BRM 58833 mostrou-se promissora para essa finalidade.

Com o objetivo de determinar as melhores condições para a produção da lipase de *B. gladioli* BRM 58833 por fermentação submersa, realizou-se uma pesquisa bibliográfica detalhada sobre a produção de lipases de outras espécies de *Burkholderia* por esse método. Oliveira et al. (2015) observaram que o cultivo de *B. lata* em meio contendo gordura de frango e fosfato de amônio resultou em uma alta atividade lipolítica em seu extrato.

O presente estudo teve como objetivo otimizar as condições de fermentação submersa para a produção de lipase por *B. gladioli* BRM 58833, partindo das condições ótimas para o mesmo gênero encontradas na literatura. Buscou-se, assim, obter um extrato enzimático com atividade lipolítica elevada, que pudesse ser potencialmente utilizado em diversas aplicações industriais.

¹ Biólogo, doutor em Biologia Microbiana, Embrapa Agroenergia, pedropam.bio@gmail.com

² Engenheiro de bioprocessos e biotecnologista, mestre em Ciências Mecânicas, Embrapa Agroenergia, diogo.nakai@embrapa.br

³ Farmacêutica, doutora em Bioquímica, Embrapa Agroenergia, thais.salum@embrapa.br

Materiais e métodos

Planejamento experimental

A otimização da produção de lipases por fermentação submersa utilizando a cepa *B. gladioli* BRM 58833 foi planejada por meio de um Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) em cinco tempos diferentes, que consideraram três variáveis (pH, concentração de fosfato de amônio e óleo de dendê) em cinco níveis, conforme apresentado nas Tabelas 1A e 1B a seguir. Assim, foram originados cinco DCCRs e 15 cinéticas.

Tabela 1A. Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) com três variáveis.

Experimento	pH	[(NH ₄) ₃ PO ₄]	[óleo de dendê]
1	-1	-1	-1
2	1	-1	-1
3	-1	1	-1
4	1	1	-1
5	-1	-1	1
6	1	-1	1
7	-1	1	1
8	1	1	1
9	-1,68	0	0
10	1,68	0	0
11	0	-1,68	0
12	0	1,68	0
13	0	0	-1,68
14	0	0	1,68
15	0	0	0
16	0	0	0
17	0	0	0

Tabela 1B. Codificação de cada condição do DCCR.

Variável	-1,68	-1	0	1	1,68
pH	6	6,81	8	9,19	10
[(NH ₄) ₃ PO ₄]	5	9,05	15	20,95	25
[óleo de dendê]	1	5,655	12,5	29,345	24

Preparo do inóculo

A cepa bacteriana *Burkholderia gladioli* BRM 58833 utilizada neste trabalho pertence à Coleção de Microrganismos e Microalgas Aplicados a Agroenergia e Biorrefinarias (CMMAABio) da Embrapa Agroenergia. Retirou-se a cepa do estoque no ultrafreezer (-80 °C) e estriou-se em uma placa de Petri contendo meio Luria-Bertani (LB) com ágar para obtenção de colônias isoladas. A placa foi incubada na estufa a 30 °C para o crescimento das colônias.

Após o crescimento de colônias isoladas, uma colônia foi inoculada em frasco contendo o meio de cultivo LB e incubada sob agitação a 150 rpm a 28 °C por 24 horas. Quando a densidade

ótica (DO) atingiu a absorvância de 0,5, retirou-se 1 mL para cada um dos 17 experimentos descritos na Tabela 2B.

Preparo dos meios de cultivo

Foram preparadas as soluções descritas na Tabela 2A a seguir.

Tabela 2A. Composição e preparação das soluções A, B, C, D e E utilizadas no experimento. Os pesos e volumes indicados foram utilizados para obter as concentrações desejadas de cada componente nas soluções.

Solução	Componente	Peso (g)	Volume (mL)
A	K_2HPO_4 10 g/L (10x concentrada)	1,02	100
B	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 5 g/L (10x concentrada)	0,50	100
C	NaCl 3,8 g/L (10x concentrada)	0,382	100
D	$FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 1 g/L (100x concentrada)	0,0103	10
E	$(NH_4)_3PO_4$ 50 g/L	15,04	300

A seguir, foram preparados os meios de cultivo conforme a Tabela 2B a seguir.

Tabela 2B. Quantidades de cada componente (A, B, C, D e E) e volumes de água e óleo de dendê utilizados em cada um dos 17 experimentos de preparo de meio de cultivo.

Experimento	A (ml)	B (ml)	C (ml)	D (μ L)	E (ml)	Água (ml)	Óleo de Dendê (μ L)
1	5	5	5	500	9,05	25,45	282
2	5	5	5	500	9,05	25,45	282
3	5	5	5	500	20,95	13,55	282
4	5	5	5	500	20,95	13,55	282
5	5	5	5	500	9,05	25,45	967
6	5	5	5	500	9,05	25,45	967
7	5	5	5	500	20,95	13,55	967
8	5	5	5	500	20,95	13,55	967
9	5	5	5	500	15	19,5	625
10	5	5	5	500	15	19,5	625
11	5	5	5	500	5	29,5	625
12	5	5	5	500	25	9,5	625
13	5	5	5	500	15	19,5	50
14	5	5	5	500	15	19,5	1200
15	5	5	5	500	15	19,5	625
16	5	5	5	500	15	19,5	625
17	5	5	5	500	15	19,5	625

Análise da atividade lipolítica

Uma curva padrão de *p*-nitrofenol foi preparada em microplaca de 96 poços, com nove pontos em triplicata (200 μ L por poço) nas seguintes concentrações em μ mol/L: 450, 300, 150, 90, 60, 45, 30, 15 e 7.

Prepararam-se as seguintes soluções: solução A*, contendo, 3 mg/mL de *p*-NPP (palmitato de *p*-nitrofenila) em isopropanol; e a solução B*, contendo tampão fosfato de sódio 50 mmol/L (pH 7), triton X-100 0,44% e goma arábica 0,11%.

Após 24 horas, 48 horas, 72 horas, 96 horas e 168 horas de cultivo, alíquotas de 1.200 μ L de cada frasco foram retiradas em ambiente estéril e centrifugadas a 10.000 rpm e 4 °C por 15 min para separar a fração das células e o sobrenadante do cultivo. Então, 20 μ L de cada sobrenadante foram misturados com 180 μ L da solução C* (A*:B*, 1:9) em triplicatas na placa de 96 poços. A placa foi então incubada a 37 °C, e a leitura foi feita em intervalos de 10 s por 1 min a 410 nm. A atividade foi calculada em função de U/mL, em que U é definido como a quantidade de enzima necessária para produzir 1 μ mol de *p*-nitrofenol por minuto sob as condições de ensaio.

Análise estatística do DCCR

Os dados de atividades enzimáticas de cada tempo foram tratados no programa PROTIMIZA, gerando cinco conjuntos de análises estatística. Dentre eles, estão a ANOVA, a análise de Pareto para avaliação do efeito de cada variável e suas interações, a equação gerada para modelar os valores experimentais, o gráfico de superfície das variáveis estatisticamente significativas e o coeficiente de determinação (R^2) que mede o ajuste entre os valores experimentais e preditos pelo modelo.

Cinética

De forma a complementar, os dados de atividades enzimáticas de cada um dos 15 tratamentos do DCCR foram compilados num gráfico que permite visualizar comparativamente os níveis de atividades obtidas no decorrer do tempo.

Resultados e discussão

As análises estatísticas (Tabela 3) indicaram que os dados referentes ao cultivo de 24 horas atendem aos critérios para construção de um modelo preditivo. A análise de Pareto (nível de significância de 0,1) mostrou que as variáveis pH e concentração de fosfato de amônio são estatisticamente significativas para o modelo de cultivo no tempo de 24 horas. A Figura 1 mostra a superfície de contorno para essas variáveis, mostrando uma tendência de melhores resultados em pH mais neutro e menores concentrações de fosfato de amônio. No entanto, observou-se que as atividades lipolíticas obtidas em 24 horas são consideravelmente inferiores às observadas em tempos mais avançados de cultivo (Figura 2). As condições de cultivo referentes aos frascos 1 e 2 resultaram em atividades lipolíticas mais elevadas e em menor tempo. A terceira condição com maior atividade lipolítica correspondeu ao ponto central do experimento estatístico e foi considerado o ponto de ótimo para o trabalho de referência com *B. lata*.

Tabela 3. Dados estatísticos do DCCR. x1 – pH do cultivo. x2 – concentração de fosfato de amônio. x3 – óleo de dendê.

Tempo (h)	ANOVA	Pareto (<0,1)	R^2 (%)
24	Há diferença entre os tratamentos	x1 ² , x2, x1.x2, x1.x3	91,49
48	Não há diferença entre os tratamentos	-	-
72	Não há diferença entre os tratamentos	-	-
96	Não há diferença entre os tratamentos	-	-
168	Não há diferença entre os tratamentos	-	-

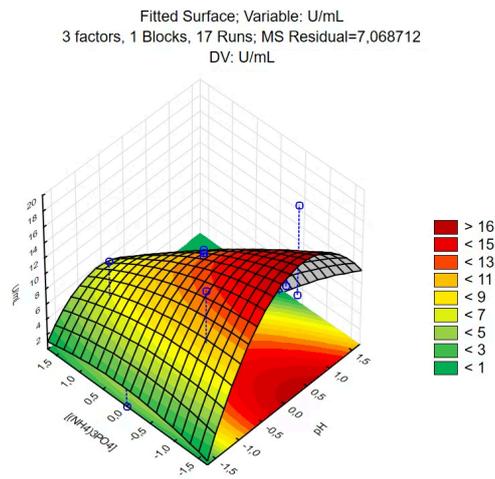


Figura 1. Superfície de resposta do cultivo para as variáveis estatisticamente significativas (pH e concentração de fosfato de amônio) no tempo de 24 horas.

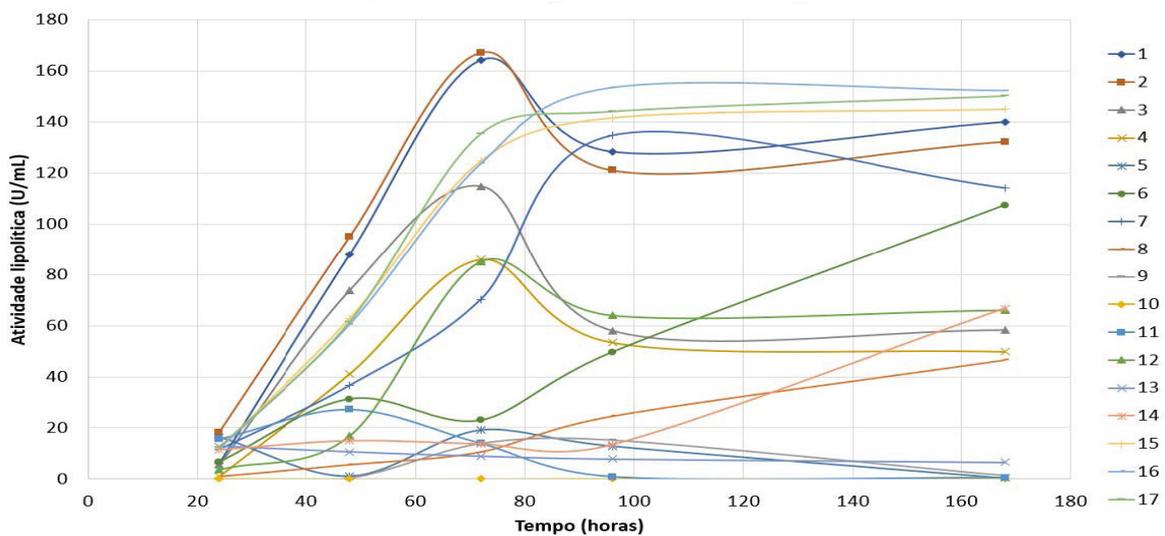


Figura 2. Cinéticas de cultivo por fermentação submersa. *Burkholderia gladioli* BRM 58833 nas diferentes condições do DCCR.

Conclusão

As análises estatísticas dos dados indicaram que apenas o cultivo de 24 horas apresentou um coeficiente de ajuste adequado do modelo gerado, porém com atividades lipolíticas inferiores aos tempos mais longos. O modelo gerado indica que uma menor concentração de fosfato de amônio e um pH próximo da neutralidade tendem a mostrar atividades lipolíticas mais elevadas. Essa tendência foi verificada nos tempos subsequentes (48 horas, 72 horas, 96 horas e 168 horas). Os resultados sugerem que a produção da lipase de *Burkholderia gladioli* BRM 58833 por fermentação submersa apresenta potencial de melhoria.

Referências bibliográficas

OLIVEIRA, B. H.; SANTOS, R. É.; LOIOLA, L. E. A.; NASCIMENTO, F. G. Overproduction and properties of lipase by a wild strain of *Burkholderia lata* LBBO-BL02 using chicken fat. *Annals of Microbiology*, v. 65, n. 2, p. 865-877, 2015.

Potássio liberado por biocarvão de lodo de esgoto enriquecido com agromineral e ácido oxálico

Jéssica da Luz Costa¹, Camila Rodrigues Costa², Gilberto de Oliveira Mendes³, Éder de Souza Martins⁴, Giuliano Marchi⁵, Marcela Granato Barbosa dos Santos⁶, Juscelina Arcanjo dos Santos⁷, Andressa Blasi Paiva⁸, Isabela Dias de Souza⁹, Cícero Célio de Figueiredo¹⁰

Resumo

A correta destinação do lodo do esgoto (LE) tem se tornado um grande desafio para sociedade. O uso do LE in natura como fertilizante pode acarretar contaminação por microrganismos patogênicos e metais tóxicos. O biocarvão de LE (BLE), obtido pela pirólise do LE, é uma alternativa segura para viabilizar o uso agrícola do LE. O BLE é um fertilizante multinutrientes, porém apresenta baixa concentração de potássio (K). Uma forma de tornar o BLE um fertilizante completo seria a adição de fontes alternativas de K, produzidas a partir da moagem de rochas silicáticas, como os sienitos. No entanto, a baixa solubilidade do agromineral tem se tornado um empecilho para o uso desse insumo. Nesse sentido, este trabalho tem por objetivo avaliar a dinâmica de liberação de K oriundo dos fertilizantes à base de BLE enriquecidos com pó de rocha e ácido orgânico (oxálico) (FEs). Para isso, os FEs foram incubados e avaliados nos períodos de 12 horas e 20 dias. Os resultados indicam que o ácido oxálico potencializou a solubilização de K oriundo dos fertilizantes à base de biocarvão e agromineral. Como essa é uma nova linha de pesquisa, mais estudos devem ser realizados para ajustar as concentrações e a forma de aplicação do ácido oxálico a fim de aumentar a eficiência desses fertilizantes.

Termos para indexação: biocarvão de lodo de esgoto, solubilização de potássio, ácido oxálico, novos fertilizantes.

Introdução

O lodo de esgoto (LE) é um resíduo gerado em grandes volumes nas estações de tratamento. A destinação correta desse resíduo ainda representa um grande desafio para a sociedade. Entre as alternativas, em termos mundiais, destacam-se a reutilização em solos agrícolas e a recuperação de áreas degradadas. No entanto, a utilização do LE in natura na agricultura é limitada em razão da presença de microrganismos patogênicos e metais tóxicos (BRASIL, 2006). Uma possibilidade para contornar esses problemas e viabilizar o uso LE é a realização do tratamento térmico por pirólise (Deenik; Cooney, 2016).

O produto sólido obtido pela pirólise é denominado biocarvão e tem sido usado como condicionador do solo ou fertilizante capaz de substituir fontes minerais industrializadas (Faria et al., 2018). O biocarvão de LE (BLE) é um fertilizante multinutrientes, principalmente C, P, N e Fe, mas apresenta baixa concentração de K (Fachini et al., 2022).

¹ Graduanda em Agronomia, Universidade de Brasília, jessicadaluzcosta@gmail.com

² Agrônoma, doutora em Produção Vegetal, Universidade de Brasília, camilarodcosta@gmail.com

³ Agrônomo, doutor em Microbiologia Agrícola, Universidade Federal de Uberlândia, gilbertomendes@ufu.br

⁴ Geólogo, doutor em Geologia, Embrapa Cerrado, eder.martins@embrapa.br

⁵ Agrônomo, doutor em Agronomia, Embrapa Cerrado, giuliano.marchi@embrapa.br

⁶ Engenheira ambiental e sanitária, doutoranda em Agronomia, Universidade de Brasília, marcelagbsantos@gmail.com

⁷ Engenheira florestal, doutora em Engenharia Florestal, Universidade de Brasília, celinarcanjo@hotmail.com

⁸ Agrônoma, Universidade de Brasília, andressabpd@hotmail.com

⁹ Agrônoma, Universidade de Brasília, isabela99dias99@gmail.com

¹⁰ Agrônomo, doutor em Agronomia, Universidade de Brasília, cicerocef@unb.br

Uma alternativa para tornar os BLE um fertilizante mais completo é o seu enriquecimento com fontes de K. Estudos já demonstraram que o enriquecimento do BLE com fontes solúveis de K gera um fertilizante de liberação lenta de K, com bom desempenho agrônômico e reduzidas perdas por lixiviação (Fachini et al., 2022).

Uma linha de pesquisa ainda pouco estudada é a mistura de remineralizadores (agrominerais) como fonte de K para enriquecer biocarvões e produzir novos fertilizantes com matérias-primas sustentáveis. A baixa solubilidade desses materiais ainda é uma limitação para a expansão do seu uso. Uma possível alternativa para aumentar a solubilidade de agrominerais é a adição de ácidos orgânicos.

Já é conhecido o potencial dos ácidos orgânicos para solubilizar rochas potássicas (Duarte et al., 2022). Logo, as informações já disponíveis na literatura permitem levantar a hipótese de que fertilizantes à base de BLE enriquecidos com pó de rocha na presença de ácidos orgânicos podem aumentar a liberação de K. Portanto, o objetivo deste trabalho foi avaliar a dinâmica temporal de liberação de K oriundo dos fertilizantes à base de BLE enriquecidos com agromineral (sienito silicático) e ácido orgânico (oxálico).

Materiais e métodos

O BLE foi produzido a partir de amostras de LE coletadas na estação de tratamento de esgoto (ETE) Melchior, localizada em Samambaia, DF. O LE seco ao ar foi triturado e posteriormente submetido à temperatura de 300 °C em forno de pirólise (Linn Elektro Therm, Eschenfelden, Alemanha), a uma taxa média de aumento de temperatura de 2,5 °C min⁻¹, totalizando 120 minutos para atingir 300 °C, e tempo de residência de 5 horas. Antes da produção dos fertilizantes, o BLE, foi caracterizado física e quimicamente conforme metodologia padrão para fertilizantes orgânicos (Silva, 2009), cujos resultados são apresentados na Tabela 1.

Os fertilizantes foram produzidos pela mistura física do BLE, agromineral (sienito silicático) e do amido como agente aglutinador. A quantidade total do agromineral e do agente aglutinador foi estipulada de acordo com as características do BLE. A mistura foi submetida aos processos de peletização e granulação para obtenção de pellets e grânulos (FEs).

Para avaliar a dinâmica de liberação de K dos fertilizantes, foi realizado o experimento de incubação conforme descrito em Bley et al. (2017). Os fertilizantes foram incubados em recipientes contendo amostras de um Neossolo Quartzarênico. Antes do ensaio de incubação, foi feita análise química e física do solo, conforme metodologia padrão (Silva, 2009), cujos resultados são apresentados na Tabela 2.

Os FEs e o fertilizante mineral KCl foram colocados em sachês com malha permeável de poliéster e selados nas extremidades. Os sachês contendo os fertilizantes foram cuidadosamente inseridos no meio da massa de solo de cada recipiente. Toda a massa de solo foi homogeneizada, e foi retirada uma alíquota para determinação dos teores de P pelo extrator Mehlich 1.

Os dados foram submetidos à análise de variância com dois fatores, e as médias de três repetições foram comparadas pelo teste LSD de Fisher ($p < 0,05$). Para tal, foi utilizado o software XLSTAT.

Resultados e discussão

As características químicas do biocarvão e dos fertilizantes à base de biocarvão são apresentadas na Tabela 1. De maneira geral, por causa da mistura do biocarvão com o agromineral, a concentração final dos nutrientes é reduzida nos fertilizantes.

Tabela 1. Caracterização do biocarvão e dos fertilizantes à base de biocarvão de lodo.

Característica	Unidade	Biocarvão	FE - Pellet	FE - Grânulo
K ₂ O	%	0,3	0,3	0,24
pH	.	6,5s	6,1	6,4
Mat. Org.	%	47,20	41	41,3
Umidade	%	9,2	5,4	5,6
Relação C/N	.	2,2	9,5	8,4
P ₂ O ₅ (Total)	%	5,50	4,2	4,0
N	%	3,4	2,5	2,8
Ca	%	0,70	0,63	0,64
Mg	%	0,18	0,24	0,19
S	%	0,86	0,77	0,80
Cu	mg/kg	115	88	81
Fe	mg/kg	24900	20330	21440
Mn	mg/kg	134	395	368
Zn	mg/kg	400	453	415
C. Org	%	7,5	23,8	23,9

Os atributos químicos e físicos do solo antes da incubação dos fertilizantes são apresentados na Tabela 2. Os atributos indicam um solo com alto teor de areia e baixa disponibilidade de nutrientes.

Tabela 2. Características químicas e físicas do Neossolo Quartzarênico.

Atributo	Unidade	Neossolo
pH (CaCl ₂)	-	5,2
Ca	cmol _d /dm ³	2,0
Mg	cmol _d /dm ³	0,8
Al	cmol _d /dm ³	0,00
H + Al	cmol _d /dm ³	1,6
CTC*	cmol _c /dm ³	4,47
P (Mehlich 1)	mg/dm ³	1,0
K	mg/dm ³	0,067
K	%	26
Mat. Org.	%	20,0
Sat. Al (m)	%	0
Sat. Base (V)	%	64
Argila	g/kg	105,3
Areia	g/kg	846,8
Silte	g/kg	47,9

*CTC: capacidade de troca de cátions.

Na Figura 1, são apresentados os teores de K liberados pelos FEs no início (12 horas) e ao final do período de incubação (20 dias). A liberação de K não foi afetada pelo tipo de fertilizante (pellet ou grânulo) em ambos os períodos avaliados. Entretanto, a adição de ácido orgânico estimulou a liberação de K dos fertilizantes ($P < 0,05$). Na primeira avaliação, doze horas após o início da incubação, houve uma forte influência do ácido orgânico na liberação de K dos fertilizantes à base de biocarvão,

tanto na forma de pellet quanto de grânulo. Nesse período, a adição de ácido orgânico aumentou a liberação de K em cerca de quatro vezes tanto para grânulos quanto para pellet (Figura 1). Esses resultados estão em consonância com os encontrados em estudos de solubilização de rochas potássicas pelo ácido oxálico (Lodi et al., 2021; Duarte et al., 2022).

Mesmo após vinte dias do início da incubação, também foi verificado o efeito do ácido oxálico aumentando a liberação de K. A manutenção do efeito aos 20 dias indica duas possíveis explicações: a) não há degradação do ácido e o seu efeito se preserva por pelo menos 20 dias após a aplicação ao solo; b) mesmo que tenha havido degradação do ácido, não houve formação de compostos insolúveis de K no solo. Por fim, no presente trabalho, não foi possível identificar a origem do K liberado (se do agromineral ou do próprio biocarvão). Isso suscita a necessidade de novos estudos que contemplem a identificação do K liberado.

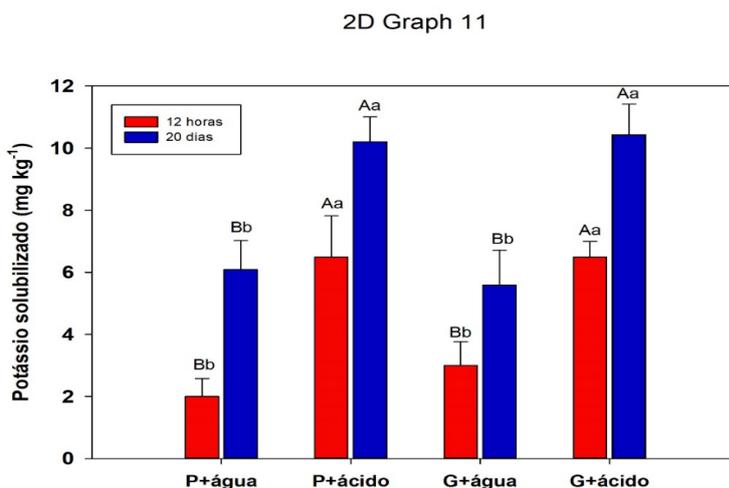


Figura 1. Solubilização de potássio de fertilizantes à base de biocarvão em dois períodos, 12 horas e 20 dias. Médias seguidas por letras iguais, maiúsculas entre tipos de fertilizantes e minúsculas entre tipo de aditivo (água ou ácido), não apresentam diferenças estatísticas entre fertilizantes de acordo com o teste LSD de Fischer ($p < 0,05$).

Conclusão

O ácido oxálico potencializou a solubilização de K oriundo dos fertilizantes à base de biocarvão e pó de rocha (rico em sienito). Os efeitos do ácido se preservaram por pelo menos 20 dias após a sua aplicação ao solo. Novos trabalhos devem ser realizados para ajustar as concentrações e a forma de aplicação do ácido para elevar o seu efeito na solubilização de K dos fertilizantes à base de biocarvão e agromineral.

Referências bibliográficas

- BLEY, H.; GIANELLO, C.; SANTOS, L. da S.; SELAU, L. P. R. Nutrient release, plant nutrition, and potassium leaching from polymer-coated fertilizer. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, v. 41, 2017. e0160142.
- BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. Resolução nº 375, de 29 de agosto de 2006. Define critérios e procedimentos, para o uso agrícola de lodos de esgoto gerados em estações de tratamento de esgoto sanitário e seus produtos derivados, e dá outras providências. *Diário Oficial da União*, Brasília, DF, nº 167, Seção 1, p. 141-146, 29 ago. 2006.
- DEENIK, J. L.; COONEY, M. J. The potential benefits and limitations of corn cob and sewage sludge biochars in an infertile Oxisol. *Sustainability*, v. 8, n. 2, 2016. Article 131.
- DUARTE, L. M.; XAVIER, L. V.; ROSSATI, K. F.; OLIVEIRA, V. A.; SCHIMICOSCKI, R. S.; ÁVILA NETO, C. N. de; MENDES, G. de O. Potassium extraction from the silicate rock Verdete using organic acids. *Scientia Agricola*, v. 79, n. 2, 2022. e20200164.
- FACHINI, J.; FIGUEIREDO, C. C. de; VALE, A. T. do. Assessing potassium release in natural silica sand from K-enriched sewage sludge biochar fertilizers. *Journal of Environmental Management*, v. 314, 2022. 115080.

FARIA, W. M.; FIGUEIREDO, C. C. de; COSER, T. R.; VALE, A. T.; SCHNEIDER, B. G. Is sewage sludge biochar capable of replacing inorganic fertilizers for corn production? Evidence from a two-year field experiment. **Archives of Agronomy and Soil Science**, v. 64, n. 4, p. 505-519, 2018.

LODI, L. A.; KLAIC, R.; RIBEIRO, C.; FARINAS, C. S. A. Green K-fertilizer using mechanical activation to improve the solubilization of a low-reactivity potassium mineral by *Aspergillus niger*. **Bioresource Technology Reports**, v. 15, 2021. Article 100711.

SILVA, F. C. da (Ed.). **Manual de análises químicas de solos, plantas e fertilizantes**. 2. ed. rev. e ampl. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica; Rio de Janeiro: Embrapa Solos, 2009.

Preparação e caracterização de aerogéis de celulose e amido

Laiane Carvalho dos Santos¹, Larissa Andreani Carvalho², Simone Monteiro e Silva³, Leonardo Fonseca Valadares⁴

Resumo

Aerogéis são materiais sólidos com alta área de superfície específica, alta porosidade e baixíssima densidade. Em razão dessas e outras propriedades, os aerogéis encontram aplicações diversas, como liberação controlada de compostos ativos, processos de sorção e isolamento térmico, dentre outras. Quando feitos a partir de materiais de origem biológica, como polissacarídeos, são denominados bioaerogéis. Neste trabalho, aerogéis puros e compósitos foram produzidos a partir de amido de batata e celulose de algodão microfibrilada. Os aerogéis foram caracterizados quanto à morfologia e microestrutura, além da cristalinidade e interação entre os biopolímeros.

Termos para indexação: bioaerogéis, celulose microfibrilada, algodão, compósito, liofilização.

Introdução

Os aerogéis são uma nova classe de materiais sólidos porosos, obtidos a partir da secagem de um gel e produzidos principalmente à base de materiais inorgânicos. Com o crescente interesse por materiais mais sustentáveis, uma nova classe de aerogéis tem ganhado atenção: os bioaerogéis, aerogéis produzidos a partir de materiais renováveis dentre os quais estão os biopolímeros, como amido, celulose, alginato e pectina. As características inerentes desse material, como alta porosidade, alta área de superfície específica e baixa densidade, proporcionam um vasto campo de aplicação que inclui desde processos de sorção até isolamento térmico.

A celulose e o amido são polissacarídeos abundantes. A celulose possui alta resistência mecânica, enquanto o amido possui a propriedade de formação de gel quando aquecido em meio aquoso, sendo um dos materiais mais versáteis para aplicações em diferentes áreas, como engenharia de materiais, área médica e alimentícia, dentre outras.

Neste trabalho, aerogéis de celulose de algodão e amido de batata, puros e compósitos, foram produzidos e caracterizados. A celulose de algodão foi produzida em meio aquoso por processamento mecânico, e a solução de amido foi obtida por gelatinização. Os compósitos foram produzidos a partir da mistura da dispersão aquosa de celulose com a solução de amido. Os aerogéis foram obtidos pelo congelamento e pela posterior liofilização.

Materiais e métodos

Os materiais utilizados neste trabalho foram basicamente algodão hidrófilo comercial puro, da marca Farol, e amido de batata (Sigma Aldrich, S2004).

¹ Engenheira química, mestranda em Engenharia Química, Universidade Federal de Goiás, laiane.santos@colaborador.embrapa.br

² Química, doutora em Química, Analista da Embrapa Agroenergia, larissa.andreani@embrapa.br

³ Engenheira de alimentos, doutora em Engenharia de Alimentos, professora da Universidade de Brasília, simonems@unb.br

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

Inicialmente, prepararam-se os materiais precursores do aerogel: a celulose microfibrilada e o amido gelatinizado. Uma dispersão aquosa de celulose aproximadamente 0,25% (m/m) foi produzida cisalhando o algodão em liquidificador (Britânia, BLQ1280, 1150W) com um filtro acoplado. Depois de todo o algodão ter sido disperso, o cisalhamento da celulose prosseguiu em homogeneizador ultraturrax (IKA, T25 D S32) em 10 ciclos de 5 min na velocidade de 20.000 rpm. O amido gelatinizado foi produzido misturando amido de batata solúvel em água destilada na proporção de 4% (m/m). Antes de aquecer, o amido foi dispersado manualmente com uma espátula. Por último, a mistura foi mantida a 70 °C com agitação constante em banho maria por 30 minutos.

Os aerogéis foram produzidos com as seguintes composições de celulose/amido: 100/0, 80/20, 50/50, 20/80 e 0/100. Para formar os compósitos, os dois polímeros foram misturados naquelas proporções com o auxílio do ultraturrax na velocidade de 15.000 rpm por 1 minuto, para homogeneizar a mistura. Em seguida, os hidrogéis foram adicionados em placas de Petri e tubos Falcon para moldagem na forma de monólitos, e congelados em freezer -18 °C por 24 horas e por mais 4 horas no freezer a -80 °C. Por fim, o material foi seco em liofilizador (LIOTOP, K120) por 96 horas (Figura 1).



Figura 1. Etapas da preparação dos aerogéis de celulose e amido.

Os aerogéis foram caracterizados quanto à densidade aparente (ρ_a), à porosidade (P) e ao encolhimento volumétrico (EV), de acordo com as seguintes equações:

$$\rho_a = \frac{m}{V} \quad (1)$$

$$EV = \frac{V_h - V}{V_h} \quad (2)$$

$$P = 1 - \frac{\rho_a}{\rho_b} \Rightarrow P = 1 - \rho_a \times \left(\frac{w_{celulose}}{\rho_{celulose}} - \frac{w_{amido}}{\rho_{amido}} \right) \quad (3)$$

Em que m é a massa e V é o volume do aerogel, V_h é o volume do hidrogel, $w_{celulose}$ e w_{amido} são a fração mássica da celulose e do amido no aerogel, respectivamente, $\rho_{celulose}$ é a densidade da celulose e ρ_{amido} é a densidade do amido. De acordo com a literatura, a densidade da celulose da fibra de algodão é 1,50 g/cm (Cheng et al., 2017) e a densidade do amido de batata é igual a 0,76 g/cm

(Stasiak et al., 2013). A morfologia dos aerogéis foi analisada em microscópio eletrônico de varredura (JEOL, JSM 7001F). A cristalinidade foi avaliada por meio de difratometria de raios X (Bruker, D8 FOCUS). A interação entre os biopolímeros foi avaliada por espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (Shimadzu, Affinity-1).

Resultados e discussão

Os valores de densidade aparente, porosidade e encolhimento volumétrico dos aerogéis puros e compósitos podem ser observados na Tabela 1.

Tabela 1. Densidade aparente (ρ_a), porosidade (P) e encolhimento volumétrico (EV) dos aerogéis.

Composição Celulose/Amido	ρ_a (g.cm ⁻³)	P (%)	EV (%)
100/0	0,004 ± 0,001	99,7 ± 0,1	35,5 ± 7,6
80/20	0,012 ± 0,004	99,1 ± 0,3	33,0 ± 3,2
50/50	0,029 ± 0,000	97,2 ± 0,0	29,5 ± 1,2
20/80	0,046 ± 0,003	94,6 ± 0,4	36,8 ± 1,1
0/100	0,058 ± 0,007	92,3 ± 0,9	34,3 ± 1,2

A densidade aparente dos aerogéis ficou na faixa de 0,004 g/cm³ e 0,058 g/cm³, e a porosidade ficou entre 92,3% e 99,7%. As densidades dos aerogéis, mesmo para o amido puro, são bem menores do que as reportadas para outros materiais porosos, como o poliestireno expandido (isopor), que é aproximadamente 0,1 g/cm³ (Arboleda et al., 2013). Na produção de aerogéis também é comum observar uma diminuição no volume após a liofilização. Isso se deve a fatores como a remoção do solvente (água), a composição e o grau de gelificação do material precursor. O encolhimento volumétrico de todos os aerogéis foi relativamente próximo, não apresentando relação com a densidade aparente do aerogel, variando de 29,5% a 36,8%. Os valores obtidos são menores do que os relatados no trabalho de Dogenski et al. (2020) para amido de milho e celulose microcristalina, utilizando secagem supercrítica com CO₂ (39%–48%), e também no trabalho de Luo et al. (2019) com esses mesmos materiais utilizando liofilização (35,9%–44,5%).

Imagens obtidas no estereomicroscópio são mostradas na Figura 2 e apresentam as diferenças das estruturas porosas para os cinco aerogéis em baixa magnificação. A aparência dos aerogéis apresenta diferença considerável entre seus extremos de composição. É possível ver que a estrutura porosa diminui com a adição de amido, de modo que o aerogel se torna mais denso e compacto. Analogamente, o aerogel de celulose puro é visto como uma esponja, enquanto o aerogel de amido puro assemelha-se a um isopor.

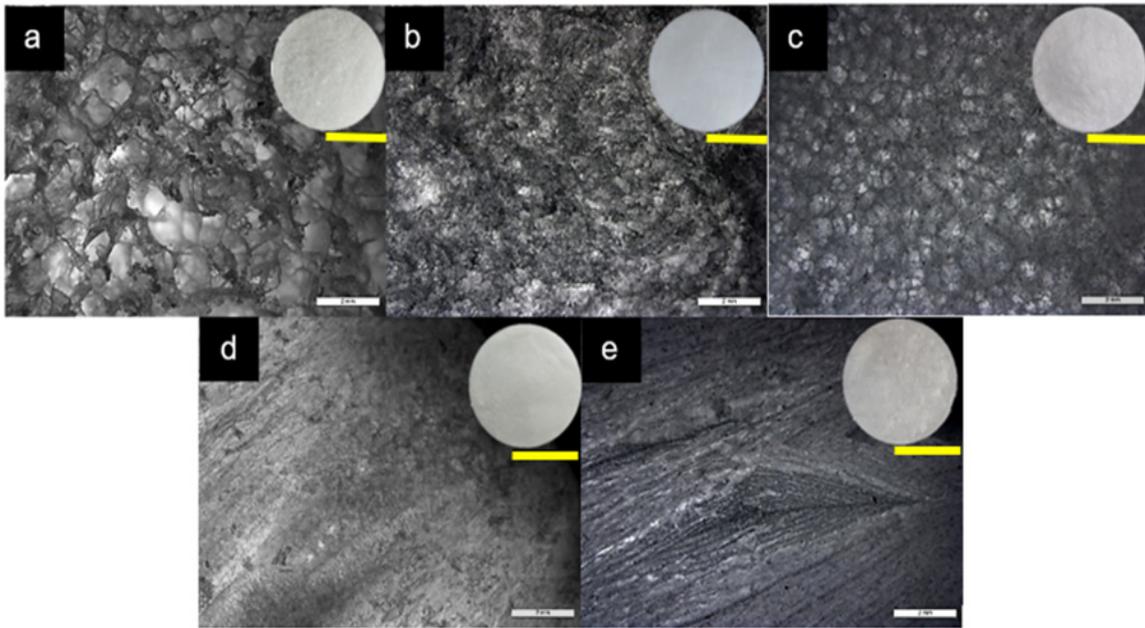


Figura 2. Imagens da superfície dos aerogéis obtidas por estereomicroscopia (fundo) e fotografias (canto superior direito): a) 100/0, b) 80/20, c) 50/50, d) 20/80, e) 0/100. As barras amarelas correspondem a 25 mm e as barras brancas correspondem a 2 mm de comprimento.

A Figura 3 apresenta imagens de microscopia eletrônica de varredura (MEV) dos aerogéis onde é possível observar que o aerogel de celulose pura (Figura 3a) apresenta a forma de uma rede tridimensional, análoga a uma teia de aranha, que é resultado da formação dos cristais de gelo durante a fase de congelamento e a adesão das fibras celulósicas por ação das forças capilares durante a liofilização.

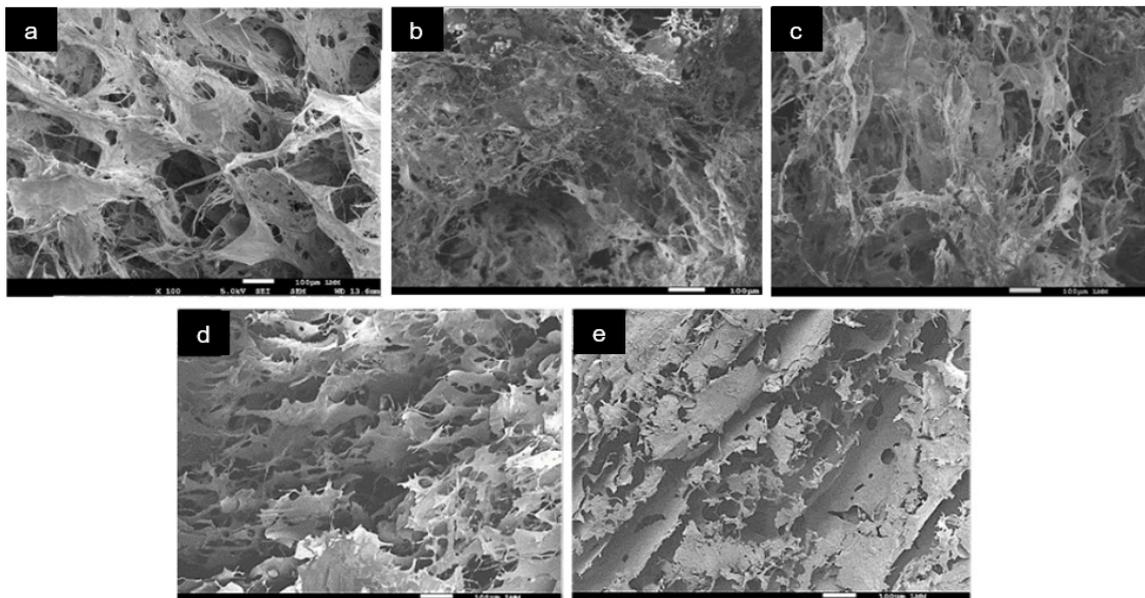


Figura 3. Imagens de microscopia eletrônica de varredura dos aerogéis de celulose/amido: a) 100/0, b) 80/20, c) 50/50, d) 20/80, e) 0/100.

Nos aerogéis com concentrações baixa e intermediária de amido (Figura 3b, 3c), observam-se as microfibras embutidas dentro de uma matriz de amido. Por outro lado, com uma concentração maior de amido (Figura 3d, 3e), verificam-se estruturas mais compactas e densas, em formato de

folhas, que são geralmente atribuídas ao crescimento lento de cristais de água que comprimem a rede do gel em agregados planares (Baudron et al., 2019).

A Figura 4 mostra os padrões de difração de raios X (DRX) dos aerogéis, e algumas diferenças com respeito à cristalinidade são observadas. Como esperado, o material de celulose pura apresenta picos de difração referentes à presença de estrutura cristalina em $2\theta \approx 22,9^\circ$ decorrente do plano cristalino (200), e os picos sobrepostos e 110 ($14,8^\circ$ e $16,7^\circ$, respectivamente), característicos do polimorfo I da celulose (Nindiyasari et al., 2015). Verifica-se que esses picos diminuem com a adição de amido, não sendo observados na amostra 0/100, o que indica que o amido nos aerogéis é amorfo, por causa do processo de gelatinização e da posterior secagem dele.

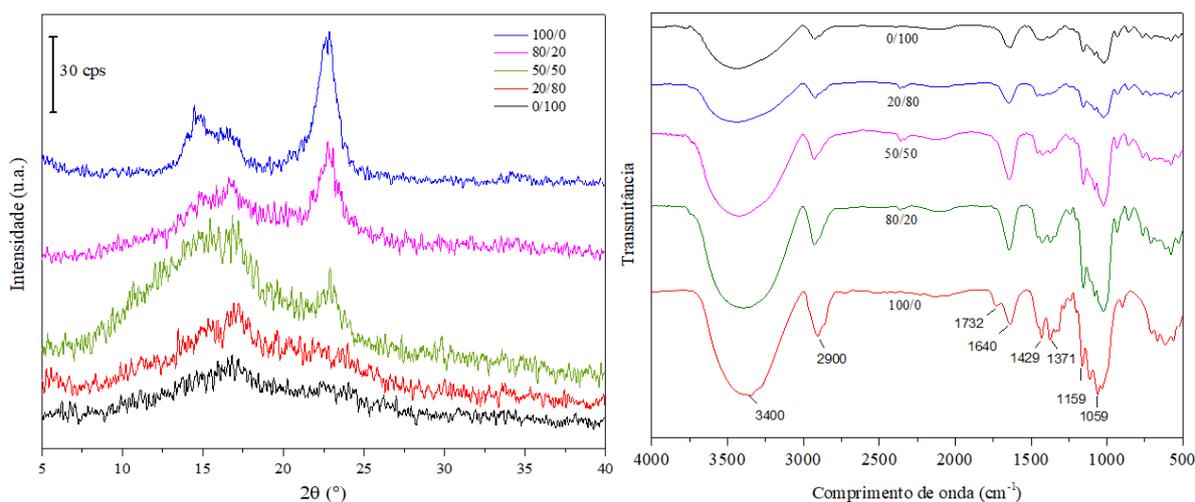


Figura 4. Difração de raios X (DRX) (esquerda) e espectros de FTIR (direita) dos aerogéis.

Como pode ser observado na Figura 4, os espectros no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) dos aerogéis se assemelham bastante, apresentando variações sutis na região do *fingerprint* (1.640 cm^{-1} – 700 cm^{-1}). Bandas características foram detectadas a 3.400 cm^{-1} , 2.900 cm^{-1} , 1.640 cm^{-1} , 1.429 cm^{-1} – 1.371 cm^{-1} , 1.159 cm^{-1} – 1.059 cm^{-1} , as quais representam, respectivamente, estiramento O–H, estiramento C–H, água fortemente absorvida, estiramento éster C–O e estiramento C–O de grupos funcionais álcool (Hivechi et al., 2020). Um pico em 1.732 cm^{-1} foi observado apenas para o espectro de celulose pura, o qual é atribuído à vibração de C=O do grupo carboxila. As bandas menos intensas, observadas em 2.400 cm^{-1} , são atribuídas a adsorção de CO_2 gasoso na superfície do material (Silverstein et al., 2006). A diminuição na intensidade dos picos dos aerogéis contendo amido em relação ao espectro de celulose pura pode ser explicada pelo recobrimento das fibras pela matriz de amido.

Conclusão

Neste trabalho, aerogéis com baixa densidade e alta porosidade foram sintetizados a partir de celulose e amido por meio da técnica de liofilização. Imagens de MEV e de estereomicroscópio mostraram uma estrutura tridimensional interconectada para aerogéis com maiores teores de celulose e estruturas densificadas para os aerogéis de amido, enquanto análises de DRX mostraram uma diminuição na cristalinidade com a adição de amido, indicando que o amido nos aerogéis é amorfo. Ademais, espectros de FTIR mostraram que não houve interação química significativa entre os biopolímeros, apenas uma redução na intensidade dos picos dos aerogéis contendo amido em relação aos de celulose pura, provavelmente em razão do recobrimento das fibras pela matriz de amido. Verificou-se que a celulose proporciona maior porosidade enquanto o amido proporciona maior

densidade. Dessa forma, esse material encontra aplicações que variam desde processos de sorção e liberação controlada de compostos bioativos até aplicações como embalagens de alimentos, isolamento térmico, dentre outros.

Referências bibliográficas

- ARBOLEDA, J. C.; HUGHES, M.; LUCIA, L. A.; LAINE, J.; EKMAN, K.; ROJAS, O. J. Soy protein–nanocellulose composite aerogels. **Cellulose**, v. 20, n. 5, p. 2417-2426, 2013.
- BAUDRON, V.; GURIKOV, P. I.; SMIRNOVA, I.; WHITEHOUSE, S. Porous starch materials via supercritical: and freeze-drying. **Gels**, v. 5, n. 1, 2019. 12.
- CHENG, H.; GU, B.; PENNEFATHER, M. P.; NGUYEN, T. X.; PHAN-THIEN, N. Cotton aerogels and cotton-cellulose aerogels from environmental waste for oil spillage cleanup. **Materials & Design**, v. 130, p. 452-458, 2017.
- DOGENSKI, M.; NAVARRO-DÍAZ, H. J.; DE OLIVEIRA, J. V.; FERREIRA, S. R. S. Properties of starch-based aerogels incorporated with agar or microcrystalline cellulose. **Food Hydrocolloids**, v. 108, 2020. Article 106033.
- HIVECHI, A.; BAHRAMI, S. H.; SIEGEL, R. A.; MILAN, P. B.; AMOUPOUR, M. In vitro and in vivo studies of biaxially electrospun poly(caprolactone)/gelatin nanofibers, reinforced with cellulose nanocrystals, for wound healing applications. **Cellulose**, v. 27, n. 9, p. 5179-5196, 2020.
- LUO, Qi; HUANG, X.; GAO, F.; LI, D.; WU, M. Preparation and characterization of high amylose corn starch–microcrystalline cellulose aerogel with high absorption. **Materials**, v. 12, n. 9, 2019. 1420.
- NINDIYASARI, F.; GRIESSHABER, E.; ZIMMERMANN, T.; MANIAN, A. P.; RANDOW, C.; ZEHBE, R.; FERNANDEZ-DIAZ, L.; ZIEGLER, A.; FLECK, C.; SCHMAHL, W. W. Characterization and mechanical properties investigation of the cellulose/gypsum composite. **Journal of Composite Materials**, v. 50, n. 5, p. 657-672, 2015.
- SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X.; KIEMLE, D. J. Spectrometric identification of organic compounds. 7th ed. Rio de Janeiro: LTC, 2006.
- STASIAK, M.; MOLENDNA, M.; OPALIŃSKI, I.; BŁASZCZAK, W. Mechanical properties of native maize, wheat, and potato starches. **Czech Journal of Food Sciences**, v. 31, n. 4, p. 347-354, 2013.

Embrapa

Agroenergia

Patrocínio

Diamante



Prata



ABBI
ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA
DE BIOINOVAÇÃO

Apoio



MINISTÉRIO DA
AGRICULTURA E
PECUÁRIA

