ISBN 978-85-65615-02-0

6º Congresso da Rede Brasileira de Tecnologia de Biodiesel
9º Congresso Brasileiro de Plantas Oleaginosas, Óleos, Gorduras e Biodiesel

BIODIESEL: 10 ANOS DE PESQUISA, DESENVOLVIMENTO E INOVAÇÃO NO BRASIL

VOLUME 2

ANAIS - ARTIGOS CIENTÍFICOS
2016

6° Congresso da Rede Brasileira de Tecnologia de Biodiesel
9° Congresso Brasileiro de Plantas Oleaginosas, Óleos, Gorduras e Biodiesel

BIODIESEL:
10 ANOS DE PESQUISA, DESENVOLVIMENTO E INOVAÇÃO NO BRASIL

Anais - Trabalhos Científicos

Editores:
Pedro Castro Neto
Antônio Carlos Fraga
Rafael Silva Menezes
Gustavo de Lima Ramos

Natal, 22 a 25 de Novembro de 2016
Rio Grande do Norte - Brasil

Ficha Catalográfica Elaborada pela Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca da UFLA

Congresso da Rede Brasileira de Tecnologia de Biodiesel (6. : 2016 : Natal, RN).

Anais do 6. Congresso da Rede Brasileira de Tecnologia de Biodiesel, 9. Congresso Brasileiro de Plantas Oleaginosas, Óleos, Gorduras e Biodiesel, Natal, RN, 22 a 25 de novembro de 2016 / Editores: Pedro Castro Neto ... [et al.]. – Lavras : UFLA, 2016.

1432 p.

Bibliografias

ISBN 978-85-65615-02-0

1. Biodiesel. 2. Plantas oleaginosas. 3. óleos vegetais. I Castro Neto, Pedro et al. II. Congresso Brasileiro de Plantas Oleaginosas, óleos, Gorduras e Biodiesel.

CDD – 633.85

APRESENTAÇÃO

O Ministério da Ciência, Tecnologia, Inovações e Comunicações (MCTIC) possui papel fundamental no processo de aprimoramento tecnológico do biodiesel brasileiro. No âmbito do Programa Nacional de Produção e Uso do Biodiesel (PNPB), o módulo de Desenvolvimento Tecnológico é coordenado pelo MCTIC e objetiva organizar e fomentar a base tecnológica existente no País e norteá-la a gerar resultados que atendam às demandas do PNPB.

Nesse sentido, foi implantada a Rede Brasileira de Tecnologia de Biodiesel (RBTB), que articula os diversos atores envolvidos, permitindo a convergência de esforços e a otimização de investimentos públicos na busca por soluções para os desafios tecnológicos da cadeia produtiva, levando em consideração aspectos de sustentabilidade, geração de empregos e desenvolvimento regional.

Como ferramenta de avaliação e divulgação dos resultados dos projetos fomentados, o MCTIC promove, desde 2006, o Congresso da Rede Brasileira de Tecnologia de Biodiesel e a Universidade Federal de Lavras promove, desde 2004, o Congresso Brasileiro de Plantas Oleaginosas, Óleos, Gorduras e Biodiesel. Eventos que em suas edições anteriores foram um sucesso, tanto em termos de público, como na divulgação do conhecimento gerado por pesquisadores de inúmeras universidades e institutos de pesquisa de todo o país. A partir de 2010 esses dois eventos foram realizados simultaneamente constituindo o maior evento técnico científico em biodiesel do mundo. Este evento é referência para as áreas de produção de plantas oleaginosas, óleos, gorduras e biodiesel.

APRESENTAÇÃO

É estratégico para o setor de biodiesel possuir fóruns de discussão para se debater temas ligados à pesquisa, desenvolvimento e inovação em Biodiesel, como também promover encontros entre especialistas, estudantes, empresários e a sociedade civil para discutir meios para o desenvolvimento desse novo combustível.

Para o evento deste ano os organizadores receberam 884 trabalhos, dos quais 715 foram aprovados e serão expostos nas sessões de apresentação de pôster. Foram destacados trabalhos que também serão apresentados oralmente nas sessões temáticas. Busca-se atingir com a divulgação dos Anais do evento a difusão do conhecimento gerado, servindo como base para a continuidade das ações e como motivação para que a inovação tecnológica contribua de forma efetiva para os objetivos do PNPB.

Cordialmente,

Professor Pedro Castro Neto
Presidente do Congresso

Professor Antônio Carlos Fraga
Presidente da Comissão Técnico-Científica

Rafael Silva Menezes
Coordenador de ações de desenvolvimento energético RBTB-MCTIC

COMISSÃO ORGANIZADORA

Pedro Castro Neto
Presidente do Congresso Brasileiro de Plantas Oleaginosas, Óleos, Gorduras e Biodiesel

Rafael Silva Menezes
Presidente do Congresso da Rede Brasileira de Tecnologia de Biodiesel

Gustavo de Lima Ramos
Secretário-Geral

Antônio Carlos Fraga
Presidente da Comissão Técnico-Científica

Juliana Espada Lichston
Presidente da Comissão Local da UFRN

Rafael Peron Castro
Anderson Lopes Fontes
Secretários Comissão Local da UFRN

COMISSÃO TÉCNICO-CIENTÍFICA

Antônio Carlos Fraga (UFLA) - Presidente
Pedro Castro Neto (UFLA) – Vice-Presidente
Lucas Ambrosano (UEM) – Secretário
Geovani Marques Laurindo (G-Óleo/UFLA) – Secretário
Douglas Pelegrini Vaz-Tostes (G-Óleo/UFLA) – Secretário

MEMBROS DAS ÁREAS TEMÁTICAS

Aristeu Gomes Tininis (IFSP)
Bill Jorge Costa (TECPAR)
Bruno Galvêas Laviola (EMBRAPA)
Cláudio José de Araujo Mota (UFRJ)
Danilo Luiz Flumignan (IFSP)
Donato Alexandre Gomes Aranda (UFRJ)
Eduardo Homem de Siqueira Cavalcanti (INT)
Fátima Menezes Bento (UFRGS)
Gustavo Lima Ramos (SETEC/MCTIC)
Iêda Maria Garcia dos Santos (UFPB)
Luiz Pereira Ramos (UFPR)
Maria Aparecida Ferreira César-Oliveira (UFPR)
Nelson Roberto Antoniosi Filho (UFG)
Paulo Anselmo Ziani Suarez (UnB)
Rafael Silva Menezes (SETEC/MCTIC)
Roberto Bianchini Derner (UFSC)
Rosenira Serpa da Cruz (UESC)
Sérgio Peres Ramos da Silva (UPE)
Simoni Margaretti Plentz Meneghetti (UFAL)

COMISSÃO EXECUTORA

Associação dos
Pesquisadores em Plantas Oleaginosas,
Óleos, Gorduras e Biodiesel

Rede Brasileira de
Tecnologia de Biodiesel

SECRETARIA DE
DESENVOLVIMENTO TECNOLÓGICO E INOVAÇÃO

MINISTÉRIO DA
CIÊNCIA, TECNOLOGIA, INOVAÇÕES E COMUNICAÇÕES

REVISÃO E EDITORAÇÃO

Pedro Castro Neto (UFLA)
Antônio Carlos Fraga (UFLA)
Lucas Ambrosano (UEM)
Douglas Pelegrini Vaz-Tostes (G-Óleo/UFLA)
Geovani Marques Laurindo (G-Óleo/UFLA)

COMISSÃO DE TECNOLOGIA DA INFORMAÇÃO

Pedro Castro Neto (UFLA) – Presidente
Antônio Carlos Fraga (UFLA)
Gilson Miranda Júnior (BCC/UFLA)
Jaime Daniel Corrêa Mendes (BCC/UFLA)
João Paulo de Araújo (BCC / G-Óleo/UFLA)
Fergunson Antônio Gomes Peres de Souza (G-Óleo/UFLA)
Henrique Fidencio (G-Óleo/UFLA)
Arnon de Castro Oliveira (G-Óleo/UFLA)
Saulo Kirchmaier Teixeira (G-Óleo/UFLA)

AGRADECIMENTOS

Apoiadores, Autores, Congressistas, Expositores e Palestrantes.

MEMBROS DA G-ÓLEO

Associação dos Pesquisadores em Plantas Oleaginosas, Óleos, Gorduras e Biodiesel

Pedro Castro Neto (Presidente)
Lucas Ambrosano (Vice-Presidente)
Douglas Pelegrini Vaz-Tostes (Tesoureiro)
Vinícius Reis Bastos Martins (Secretário)
Antônio Carlos Fraga
Arnon de Castro oliveira
Bárbara Lemes
Camilla Freitas Maia
Camilo José Rodrigues Dal Bó
Carlos Henrique Santos Fonseca
Carlúcio Queiroz Santos
Clara de Almeida Filippo
Daniel Augusto de Souza Borges
Danilo da Silva Souza
Diego Flausino Brasileiro
Erika Tokuda
Fergunson Antonio Gomes Peres de Souza
Gabriel Dlouhy Alcon
Gabriele de Faria Castro
Geovani Marques Laurindo
Gilson Miranda Júnior
Guilherme de Oliveira Martins
Gustavo de Almeida Adolpho
Hamilton Olinto Pimenta Lima Junior
Henrique Fidencio
Jaime Daniel Corrêa Mendes
Janice Alvarenga Santos Fraga
João Paulo de Araújo
Julia Andrade de Ávila
Juliana de Xisto Silva
Maraiza Assis Mattar Silva
Marcela Santos Moreira
Matheus Sterzo Nilsson
Paulo Rogério Ribeiro Pereira
Pedro Henrique Barcelos Mota
Pedro Rodolfo Bianchim de Oliveira
Rafael Peron Castro
Rodrigo Martins Santos
Sandra Regina Peron Castro
Sandro Freire de Araújo
Saulo Kirchmaier Teixeira
Stênio Carvalho
Thalita Caroline Azevedo Gonçalves
Thiago Matiolli
Vitor Favareto Silva

REALIZAÇÃO

O Núcleo de Estudos em Plantas Oleaginosas, Óleos, Gorduras e Biocombustíveis (G-Óleo) idealizado pelos professores Antônio Carlos Fraga do Departamento de Agricultura e Pedro Castro Neto do Departamento de Engenharia da Universidade Federal de Lavras, desde 2006 promove a produção científica e realiza eventos acadêmicos voltados a estudantes, pesquisadores e empreendedores que atuam nas diversas etapas da cadeia produtiva do biodiesel, transferindo ao produtor rural por meio de eventos de extensão, onde inovações da pesquisa e indústria são levadas e apresentadas à comunidade.

A diversidade das áreas de atuação do grupo torna os projetos amplamente diversificados, englobando atividades em fitotecnia, química, projetos e manutenção de máquinas agrícolas e industriais, gerência e tecnologia de informação, administração, extração e purificação de óleos e gorduras, gestão de coprodutos e resíduos, todas associadas à produção científica visando inovação para a indústria e melhoria na produção rural.

REALIZAÇÃO

Com o objetivo de impulsionar o desenvolvimento tecnológico e a inovação do biodiesel no Brasil, o Ministério da Ciência, Tecnologia, Inovações e Comunicações (MCTIC) promove diversas ações, principalmente por meio da Rede Brasileira de Tecnologia de Biodiesel (RBTB), que envolve diversos atores da cadeia produtiva. Isso permite a convergência de esforços e a otimização de investimentos públicos, buscando soluções para os desafios tecnológicos do setor. Desde 2006, a Secretaria de Desenvolvimento Tecnológico e Inovação (SETEC/MCTIC) promove o Congresso da RBTB com objetivo de disseminar os conhecimentos tecnológicos gerados, a divulgação das potencialidades da Rede, as competências e os trabalhos em andamento. A realização do evento envolve a comunidade científica e empresarial e abrange sete diferentes áreas temáticas: Matéria Prima; Armazenamento, Estabilidade e Problemas Associados; Caracterização e Controle da Qualidade; Co-Produtos; Produção do Biocombustível; Uso de Biodiesel; e Políticas Públicas e Desenvolvimento Sustentável.

REALIZAÇÃO

SECRETARIA DE
DESENVOLVIMENTO TECNOLÓGICO E INOVAÇÃO

MINISTÉRIO DA
CIÊNCIA, TECNOLOGIA, INOVAÇÕES E COMUNICAÇÕES

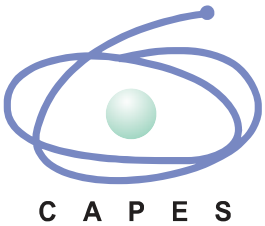
BRASIL
GOVERNO FEDERAL

UFLA
UNIVERSIDADE FEDERAL DE LAVRAS

UFRN
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE

APOIO

CNPq


CAPES

Finep
INOVAÇÃO E PESQUISA

FAPEMIG

FAPERN

APROBIO
Associação dos Produtores de Biodiesel do Brasil

Olea

TECNINT
Indústria de Equipamentos

ABIOVE

Ubrabio
União Brasileira do Biodiesel
e Bioquerosene

Embrapa

INSTITUTO
NACIONAL DE
TECNOLOGIA
INT

6° Congresso da Rede Brasileira de Tecnologia de Biodiesel
9° Congresso Brasileiro de Plantas Oleaginosas, Óleos, Gorduras e Biodiesel

TRABALHOS CIENTÍFICOS APROVADOS

Produção de lipases bacterianas e sua utilização na síntese de biodiesel etílico

Karoline Costa Almeida (Embrapa Agroenergia, karolx121@hotmail.com), Patrícia Pinto Kalil Gonçalves Costa (Embrapa Agroenergia, patricia.costa@embrapa.br), Itânia Pinheiro Soares (Embrapa Agroenergia, itania.soares@embrapa.br), Léia Cecília de Lima Fávaro (Embrapa Agroenergia, leia.favaro@embrapa.br), Thaís Fabiana Chan Salum (Embrapa Agroenergia, thais.salum@embrapa.br)

Palavras Chave: lipase, biodiesel, bactéria

1 - Introdução

Atualmente, praticamente todo o biodiesel comercialmente produzido no mundo é obtido por processo alcalino. Entretanto, a catálise alcalina possui diversos problemas: o consumo de energia é muito alto, a recuperação do glicerol é difícil e o catalisador alcalino solúvel precisa ser removido do produto[1]. Assim, a necessidade de tratamento do efluente alcalino gerado e o alto consumo de água durante a lavagem nos passos de purificação, faz com que o processo alcalino tenha um impacto significativo no meio ambiente. Além disso, se o óleo contém ácidos graxos livres, como o óleo de dendê e o óleo de fritura, por exemplo, há a formação de sabões (sais de ácidos graxos), o que leva a uma redução no rendimento da reação, além de dificultar o processo de purificação[2].

A transesterificação enzimática utilizando lipases tem potencial para superar os problemas da catálise alcalina: não ocorrem reações de saponificação durante a reação, as lipases esterificam os ácidos graxos livres, o glicerol pode ser facilmente recuperado sem tratamento complexo, o consumo de energia no processo é mais baixo, há uma drástica redução na quantidade de efluentes e as enzimas podem ser reutilizadas[1].

Neste trabalho foram avaliadas 15 linhagens de bactérias isoladas de frutos de dendê para a produção de lipases por fermentação no estado sólido. A lipase com a maior atividade lipolítica foi utilizada em reação de transesterificação para a síntese de biodiesel etílico.

2 - Material e Métodos

Microrganismos

As 16 linhagens bacterianas utilizadas neste trabalho foram previamente isolados de frutos de dendê (Bioma Cerrado) e selecionadas por meio de dois testes qualitativos em placas de Petri com meios de cultura contendo: a) óleo de oliva e Rodamina B e b) trioleína e Azul de Nilo A[3].

Fermentação no estado sólido

Para a fermentação no estado sólido utilizou-se Erlenmeyers de 250mL, contendo 4g de farelo de trigo como substrato e 5% de óleo de oliva como indutor, 65% de umidade (tampão fosfato de sódio 100 mmol/L pH 7,0). Os meios de cultura foram autoclavados por 30 min a 121°C para esterilização antes de serem inoculados. Os frascos foram mantidos em estufa a 30°C, por 96 h.

Extração da lipase e determinação da atividade enzimática

Após a fermentação, a extração foi feita com uma solução de tampão fosfato de sódio 50 mmol/L, pH 7,0, Triton X-100 (4,44 g/L) e goma arábica (1,11 g/L). A incubação foi realizada a 25°C e 150 rpm, por 1 h. O extrato foi centrifugado por 10 min, 10.000 rpm a 4°C.

A atividade lipolítica do extrato foi determinada pelo método *p*NPP (palmitato de *p*-nitrofenila). O método foi inicialmente descrito por Winkler e Stuckmann[4] sendo modificado por Krieger[5].

O ensaio foi realizado a 37°C e a atividade enzimática foi expressa em $U.gSS^{-1}$ (unidades por grama de substrato seco), onde U é definido como a quantidade de enzima necessária para produzir 1 μmol de *p*-nitrofenol por minuto sob as condições de ensaio.

Reação de transesterificação para síntese de biodiesel

A reação foi conduzida em Erlenmeyers. O meio reacional consistiu de óleo de soja (2 mmol), etanol P.A. (6 mmol) previamente seco com sulfato de sódio anidro, 0,5% de água e *n*-heptano como solvente (q.s.p. 10 mL). Os dois diferentes preparados enzimáticos testados foram: o extrato enzimático liofilizado e o sólido fermentado (sem extração) liofilizado. Para o sólido fermentado, a quantidade adicionada ao meio reacional foi 1 g. Para a amostra de extrato enzimático liofilizado, adicionou-se o equivalente a 10 mL do extrato inicial. O controle negativo da reação consistiu de um meio reacional sem a adição da enzima. Os frascos foram incubados a 37°C e 120 rpm, por 144 h. O solvente e o etanol remanescente foram evaporados e a amostra foi diluída em isopropanol:hexano (5:4 v/v) para a análise do teor de ésteres.

Análise do teor de ésteres

Para análise por cromatografia líquida de alta eficiência, utilizou-se um cromatógrafo modelo Agilent 1290 com detector de arranjo de fotodiodos no comprimento de onda 205 nm equipado com uma coluna C18 (250 mm x 4,6 mm, 5 μm). As condições de análise foram: temperatura da coluna 40°C, volume de injeção 10 mL, fluxo da fase móvel 1 mL/min, com gradiente de eluição. Foram utilizadas duas fases móveis: fase A (50% metanol: 50% isopropanol:hexano 5:4 v/v) e fase B 100% metanol. O tempo de corrida foi de 25 min. Utilizou-se padrão FAME (ésteres metílicos).

3 - Resultados e Discussão

Dentre os microrganismos selecionados qualitativamente por testes com corantes, escolheu-se 15 cepas para o teste de produção de lipases em fermentação no estado sólido. Das 15 cepas avaliadas, somente os extratos das cepas CNPAE 97 (418) C10, CNPAE 97 (385) A1 e CNPAE 99 (579) A3 apresentaram atividade lipolítica nas condições testadas (Figura 1).

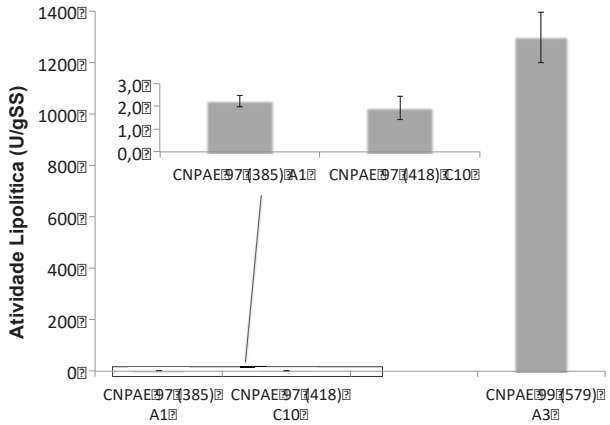


Figura 1. Atividade lipolítica do extrato das cepas bacterianas CNPAE 97 (385), CNPAE 97 (418) C10, A1 e CNPAE 99 (579) A3.

Dentre as bactérias que apresentaram atividade lipolítica, a bactéria CNPAE 99 (579) A3 teve a maior produção de lipases (1298 ± 99 $U.gSS^{-1}$), sendo essa produção cerca de 650 vezes maior do que a obtida para as outras bactérias avaliadas. Esta atividade é bastante alta se comparada às atividades lipolíticas reportadas na literatura obtidas por cepas bacterianas utilizando fermentação no estado sólido. Por exemplo, Salum *et al*.[6] obtiveram uma atividade frente ao *p*NPP de 234 $U.gSS^{-1}$ quando cultivaram uma cepa de *Burkholderia cepacia* em uma mistura de farelo de semente de girassol e bagaço de cana-de-acúcar. Mahanta *et al*.[7] quando cultivaram uma cepa de *Pseudomonas aeruginosa* em torta de pinhão-manso obtiveram uma atividade lipolítica (*p*NPP) de 625 $U.gSS^{-1}$

Assim, a lipase produzida pela bactéria CNPAE 99 (579) A3 foi testada para a síntese de biodiesel, de duas formas: extrato o e sólido fermentado liofilizado. Os teores de ésteres obtidos são apresentados na Tabela 1.

Tabela 1. Teor de ésteres obtidos nas reações de transesterificação utilizando o extrato lipolítico liofilizado e o sólido fermentado pela cepa CNPAE 99 (579) A3.

Amostra	Teor de ésteres (%)
Extrato liofilizado	77,5
Sólido fermentado	95,1

O sólido fermentado apresentou maior atividade de transesterificação do que o extrato lipolítico liofilizado, apresentando um teor de ésteres ao final da reação, de 95,1%, enquanto a reação utilizando o extrato apresentou um teor de ésteres de 77,5%. Uma possível explicação para este resultado, é que a enzima deve estar adsorvida no sólido fermentado em uma posição que facilite a catálise ou estabilize a conformação tridimensional da enzima, protegendo-a da ação desnaturante do álcool.

4 – Conclusões

A bactéria CNPAE 99 (579) A3, isolada de frutos de dendê, apresentou uma atividade lipolítica muito alta quando cultivada por fermentação no estado sólido utilizando farelo de trigo como substrato.

A lipase produzida pela bactéria se mostrou muito promissora para sua utilização em reação de transesterificação, sendo capaz de produzir biodiesel etílico de óleo de soja.

Testes futuros serão realizados sem a utilização de solvente na reação de transesterificação para a produção de biodiesel.

5 – Agradecimentos

À Embrapa pelo aporte financeiro e pela infraestrutura de pesquisa que possibilitaram o desenvolvimento deste trabalho.

6 - Bibliografia

[1] Fjerbaek, L.; Christensen, K. V.; Norddahl, B. *Biotechnol. Bioeng*. **2009**, 102, 5.
[2] Marchetti, J. M.; Miguel, V. U.; Errazu, A. F. *Renew. Sust. Energ. Rev*. **2007**, 11, 6.
[3] Cunha, J. R.; Leite, L. S.; Poletto, C. M.; Franco, P. F.; Santos, J. A.; Salum, T. F. C.; Favaro, L. C. de L. *Anais do Encontro de pesquisa e inovação da Embrapa Agroenergia*, Brasília, DF: Embrapa Agroenergia, **2015**.
[4] Winkler, U. K.; Stuckmann, M. *J. Bacteriol*. **1979**, 138, 3.
[5] Krieger, N. Produção, purificação e caracterização de lipases de *Penicillium citrinum*. Tese (Doutorado em Ciências - Bioquímica) UFPR, **1995**.
[6] Salum, T.F.C., Villeneuve, P. , Barea, B., Yamamoto, C. I., Côcco, L. C., Mitchell, D. A., Krieger, N. *Process Biochem*. **2010**, 45, 8.
[7] Mahanta, N.; Gupta, A.; Khare, S. K. *Bioresource Technol*. **2008**, 99, 6.