

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



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)

lêda 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





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







APOIO



























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

TRABALHOS CIENTÍFICOS APROVADOS

Armazenamento simulado de diesel, misturas (B5, B10, B50) e B100: monitoramento da biomassa, composição da população microbiana (rDNA 16S e 18S) e de genes funcionais (alk B) por qPCR

Francielle Bücker (PPGMAA/UFRGS, franbucker@gmail.com), Tiane Martin de Moura (PPGMAA/UFRGS, tianedemoura@gmail.com), Patricia Dorr de Quadros (PPGMAA/UFRGS, patiquadros11@yahoo.com.br), Sabrina Becker (PPGMAA/UFRGS, sabrinabeker@gmail.com), Juciana Clarice Cazarolli (PPGMAA/UFRGS, jucianacazarolli@gmail.com), Ana Paula Guedes Frazzon (PPGMAA/UFRGS, ana.frazzon@ufrgs.br), Fátima Menezes Bento (PPGMAA/UFRGS, fatima.bento@ufrgs.br)

Palavras Chave: qPCR, bactérias, fungos, bactérias degradadoras de alcanos, biodegradação

1 - Introdução

A falta de rotinas rígidas de manutenção, durante o armazenamento de diesel e biodiesel, pode promover o estabelecimento de uma comunidade microbiana na interface óleo-água. O entendimento da microbiana e seu impacto sobre o combustível é fundamental para garantir a qualidade do produto no mercado^{1,2}. A avaliação da adição do biodiesel ao diesel na estrutura e dinâmica de populações microbianas durante o armazenamento, utilizando técnicas independentes de cultivo, como PCR quantitativo (qPCR) e o PCR-DGGE (Eletroforese em Gel com Gradiente Desnaturante) vêm sendo utilizadas. A detecção e quantificação de cópias de genes por PCR quantitativo (qPCR) é uma ferramenta molecular que pode mostrar alterações na comunidade microbiana através do uso de oligonucleotídeo iniciadores (primers) específicos. Assim, pode-se verificar a abundância de fungos e bactérias, a partir de primers que amplificam regiões dos genes 18S rRNA e 16S rRNA, respectivamente. Outra possibilidade é quantificar e avaliar a presença de microrganismos com genes específicos, também chamados de genes funcionais, relacionados ao metabolismo, como o gene alcano mono-oxigenase (alk B), relacionado à degradação de alcanos 3-5.

Os objetivos do estudo foram avaliar o crescimento microbiano na interface óleo-água, quantificando a biomassa (mg), e análise da estrutura microbiana da biomassa pela quantificação de bactérias, bactérias degradadoras de n-alcanos e fungos por PCR em tempo real.

2 - Material e Métodos

2.1 Crescimento Microbiano

Simulou-se uma condição de armazenamento de B0, B5, B10, B50 e B100, em frascos de vidro (200 mL) com 20 mL de Meio Mineral Bushnell-Hass (Bushnell and Haas, 1941), e 10 mL do combustível previamente esterilizado por filtração com membrana. O experimento foi conduzido em triplicata, em estufa a 28°C. Contaminou-se o combustível com um inóculo microbiano não caracterizado (Norma ASTM E1259-106). A estimativa da contaminação inicial foi de 5 log UFC.ml-1 de bactérias, 4 log UFC.ml-1 para fungos.

A biomassa formada na interface óleo-água foi recuperada e quantificada de acordo com Bücker et al. $(2011)^7$ aos 0, 10, 20, 30 e 60 dias.

2.2- Quantificação microbiana por qPCR real time

Toda a biomassa formada na interface óleo-água foi removida dos frascos e utilizada para a extração de DNA, utilizando-se o kit para extração PowerSoil DNA Isolation Kit (MO BIO Inc., Laboratories, USA). A qualidade do DNA foi verificada por espectrofotometria com Biospec (Shimadzu, São Paulo, Brasil) (razão 260/280) e quantificado por Qubit 2.0 Fluorometer (Invitrogen, São Paulo, Brasil), utilizando-se o kit dsDNA BR Assay (InvitrogenTM).

A população de fungos foi estimada quantificandose o DNA total extraído por qPCR, utilizando os primers alvo 18S rRNA: com no gene 18S F5'GGGGGGAGTATGGTCGCAAG3' e 18S R1196 5'TCTGGACCTGGTGAGTTTCC3'; bactérias rRNA) 16F-5' TCCTACGGGAGGCAGCAGT3' e 16R-5'CGTATTACCGCGGC TGCTGGCAC3'; e, as bactérias degradadoras de alcanos com base no gene alkB alkB F 5'GGAGCRTTTMKTCGTRGTTG3' e alkB 5'CGWAKGCCATYTGAABYGGV3'. O número cópias dos genes alk B, 16S rRNA e 18S rRNA em cada amostra foi quantificado por qPCR utilizando-se Platinum® SYBR® Green qPCR SuperMix-UDG w/ROX (Invitrogen, são Paulo Brasil) em placas ópticas de 96 poços MicroAmp Fast Optical (0.1 mL) (Applied Biosystems®, São Paulo, Brasil) no equipamento StepOneTM Real-Time PCR Systems (Applied Biosystems®, São Paulo, Brasil). A amplificação foi realizada em duplicata em reações de 20 μl, contendo 1 μl de DNA, 200 mM de cada primer (foward e reverse) 10 μl do SuperMix, 0,4 μl de ROX e água deionizada esterilizada (Mili Q, Milipore) para completar a reação. As condições de amplificação foram 2 min a 50°C, 2 min a 95°C seguidos por 40 ciclos de 95°C por 15s; 55°C por 30s e 60°C por 30s. O número de cópias do gene alvo foi calculado a partir da padronização de curvas (curva padrão) contendo concentrações conhecidas dos respectivos oligonucleotídeos controles (gDNA) em diluições seriadas de 1:10 em triplicata. A especificidade da amplificação por PCR foi determinada pelas curvas de melting e pela eletroforese em gel de agarose.

3 - Resultados e Discussão

Na Figura 1 são apresentados os valores do peso seco da biomassa formada na interface óleo-água. Para a condição de biodiesel puro, B100, a biomassa formada aos 60 dias foi 91,3% maior que a produzida na condição com

B0. Verificou-se aos 10 dias de incubação, em todas as condições em que o biodiesel foi adicionado, um maior crescimento na interface óleo-água, assim a biomassa formada em B50, B10 e B5 foi 71,4%, 56,5 % e 53,4,3%, respectivamente, maior que a biomassa formada em B0. Aos 60 dias, o valor da biomassa formada em B50, B10 e B5 foi 83,3%, 72,2% e 75,0%, respectivamente, maior que a biomassa formada em B0.

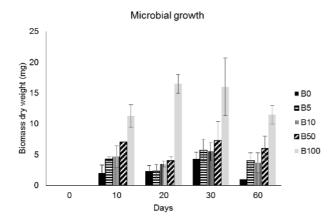


Figura 1. Valores de peso seco (mg) da biomassa formada na interface óleo-água nos tratamentos contendo B0, B5, B10, B50 e B100; aos 10, 20, 30 e 60 dias.

A quantificação dos microrganismos e análise da estrutura microbiana do biofilme foi acessada por qPCR. A quantificação dos microrganismos mostra que o biofilme formado na interface óleo água é composto por cerca de 70% de fungos e 30% de bactérias, em todos os tratamentos e tempos avaliados.

Em relação a quantificação da população fúngica, observou-se que esta variou entre 10^9 e 10^{12} cópias por miligrama de biomassa. A estimativa da população bacteriana variou entre 10^5 e 10^6 cópias por miligrama, nos tratamentos com B0, B5, B10 e B50. Em B100, foi observado uma menor população bacteriana nos tempos avaliados, sendo que foram observadas entre 10^3 e 10^4 cópias.mg⁻¹.

Em B0, B5 e B10 o percentual bactérias com gene *alk B* foi em torno de 70 - 80 %, (10³ e 10⁴ cópias.mg⁻¹) em relação ao total de bactérias estimadas pela análise do gene *16S rRNA*. Em B50, houve uma variação nestes percentuais, sendo que foram de 80, 50, 60, e 30%, aos 10, 20, 30 e 60 dias de avaliação, respectivamente. Em B100, a estimativa de bactérias com gene *alk B* em relação ao total de bactérias, foi em torno de 25% do total. 10 cópias.mg⁻¹, aos 20, 30 e 60 dias, não sendo detectado aos 10 dias de avaliação

Cyplik et al. (2010)¹¹, em estudo para avaliar a degradação de diesel, B20 e biodiesel puro (previamente esterilizados) por um consórcio de sete bactérias verificaram, por PCR quantitativo relativo, que a estrutura da comunidade microbiana não foi afetada pelo teor de biodiesel, assim como observado neste trabalho. Martin-Sanches et al. (2016)¹² utilizaram somente da fase aquosa, coletada juntamente com *ultra low sulfur diesel* (ULSD) de tanques de armazenamento, para extração de DNA e posterior análise por qPCR de fungos e bactérias, e verificaram que a quantidade de bactérias era superior a de fungos. Resultado distinto ao encontrado pelo presente

trabalho, em que foi analisada a biomassa formada na interface óleo água, em que predomina a biomassa fúngica (70%). Ambos estudos mostram que a metodologia de qPCR pode ser uma ferramenta no estudo de amostras de combustível contaminadas, como uma metodologia de monitoramento do crescimento microbiano.

A análise por qPCR foi conduzida utilizando-se um gene considerado funcional nessa comunidade, o gene alk B que codifica para a enzima alcano mono-oxigenase, responsável pela degradação de alcanos. Pode-se verificar que nos tratamentos com diesel puro (B0) e nas misturas com biodiesel, B5 e B10, o gene alk B está presente em cerca de 70-80% da população bacteriana total (gene 16S rRNA). Indicando que o diesel pode estar selecionando e favorecendo o crescimento de bactérias com o gene alk B, uma vez que em B50 e B100, a relação diminuiu, ou seja, apresentou menos bactérias com a capacidade em degradar alcanos, em relação ao total de bactérias (gene 16S rRNA). Esperava-se a menor abundância de bactérias com o gene alk B em B100, pois as enzimas alcano mono-oxigenases não são necessárias, pois não temos alcanos. A detecção de bactérias degradadoras de alcanos, em B100, está relacionada ao inóculo adicionado, confeccionado a partir de borras diversificadas (de B5, biodiesel puro) e aclimatado em B10, o que previamente selecionou bactérias com o gene alk B, e que foram adicionadas a todos os tratamentos.

4 – Conclusões

Verificou-se que a presença do biodiesel favoreceu o crescimento microbiano na interface óleo-água, e na condição de B100, foi observado maior biomassa. As análises por q-PCR informaram sobre a composição do biofilme, assim, baseada na relação entre número de cópias de fungos e bactérias, verificou-se que a proporção destes microrganismos no biofilme foi em torno de 70% e 30%, respectivamente. Verificou-se que em B0, B5 e B10 o percentual de bactérias com gene *alk B* foi em torno de 70 - 80% do total de bactérias estimadas, B100, esta relação foi de apenas 25%.

5 – Agradecimentos

Ao LABBIO-UFRGS pelo financiamento da pesquisa; CAPES ao CNPq, pelo apoio financeiro e concessão de bolsas.

6 - Bibliografia

- ¹ Suflita, J. M. et al.. *Biofouling* **2012**, *28* (9), 1003–1010.
- ² Passman, F.J. Int. Biodeterior. Biodegrad. **2013**, 81 (0), 88–104.
- ³ Powell, S. M. et al. I. *Microb. Ecol.* **2006**, *52* (3), 523–532.
- ⁴ Jurelevicius, D.; et al.. PLoS One 2013, 8 (6).
- ⁵ Li, H.; et al.. Int. Biodeterior. Biodegrad. **2013**, 76 (0), 49–57.
- ⁶ ASTM E1259-10; Procedures, **2011**, 1–5.
- ⁷ Bücker, F. et al. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* **2011**, *65*(1), 172–178.
- ⁸ Sørensen, G.et al. Bioresour. Technol. 2011, 102 (8), 5259–5264.
- ⁹ Owsianiak, M.; et al. *Bioresour*. Technol. **2009**, 100 (3), 1497–1500.
- Schleicher, T. et al. *Bioresour. Technol.* **2009**, *100* (2), 724–730.
 Cyplik, P. et al. *Bioresour. Technol.* **2011**, *102* (6), 4347–4352.
- ¹² Martin-Sanchez, P.M. et al. J. Int. Biodeterior. Biodegrad. in press.