

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO TECNOLÓGICO
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE
ALIMENTOS**

BIANCA MARTINS CAPPELLETTI

**FEITO DA CONCENTRAÇÃO INICIAL DA ÁGUA RESIDUAL
DO PROCESSAMENTO DA MANDIOCA NA PRODUÇÃO DE
BIOHIDROGÊNIO POR *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824**

**FLORIANÓPOLIS – SC
Julho de 2009**

BIANCA MARTINS CAPPELETTI

**EFEITO DA CONCENTRAÇÃO INICIAL DA ÁGUA RESIDUAL
DO PROCESSAMENTO DA MANDIOCA NA PRODUÇÃO DE
BIOHIDROGÊNIO POR *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824**

Dissertação submetida ao Curso de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito à obtenção do Título de Mestre em Engenharia de Alimentos.

Orientadora:

Prof^a. Dr^a. Regina Vasconcellos Antônio

Co-orientadora:

Prof^a. Dr^a. Valéria Reginatto Spiller

**FLORIANÓPOLIS – SC
Julho de 2009**

*It's time to place your bets in life,
I've played the loser's game of life,
dream about the sun you queen of rain.*
Per Gessle / Marie Fredriksson (Roxette)

*There's a time and place for everything
A time to act, a time to dream
There's time to wait
But no time to waste*
Anouk Teeuwe

AGRADECIMENTOS

Agradeço às Professoras Regina Vasconcellos Antônio e Valéria Reginatto Spiller, pelo apoio e orientação no decorrer deste trabalho.

Aos Professores do Programa de Pós-Graduação que contribuíram para minha formação.

À Prof^ª. Rozangela Curi Pedrosa por disponibilizar seu laboratório para o uso de alguns equipamentos.

Aos colegas do INTELAB: Claudimir Carminatti, Derce Recouvreux e Júlia Castro, pelos conhecimentos compartilhados.

À amiga Gisanara Dors, não só pela experiência partilhada, mas pela gentileza em ceder o banho termostatizado para os experimentos desta dissertação.

Aos amigos e colegas de Mestrado, Janaina Debon, Jaqueline Moraes, Cristiane Fagundes, Andréia Neves, Aline Viancelli, Franciele Lamaison, Rossana Podestá, Cristhiane Krueger e Jamile Rampinelli, e ao colega Luiz Gustavo Rodrigues pelas horas de estudo em conjunto e os momentos de descontração.

À amiga Heloísa Fernandes, pelas conversas, pelo incentivo, pela diversão, pelo ombro amigo, enfim, pela amizade.

À minha família e amigos, que apesar da distância me apoiaram para que mais este sonho fosse realizado.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	16
2. OBJETIVOS	18
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	19
3.1 Energias Renováveis no Brasil	19
3.2 Hidrogênio como fonte de energia.....	20
3.3 Produção Biológica de Hidrogênio	22
3.3.1 Microbiologia da Digestão Anaeróbia	23
3.3.2 Produção Fermentativa de Hidrogênio.....	25
3.4 Substratos utilizados na produção de Hidrogênio	27
3.5 Industrialização da Mandioca	29
3.5.1 Água Residual do Processamento da Mandioca (Manipueira)	31
3.5.2 Aproveitamento da manipueira para a produção de Hidrogênio..	33
3.6 <i>Clostridium acetobutylicum</i>	34
3.6.1 Metabolismo Energético e Subprodutos	34
3.6.2 Estrutura celular e Desenvolvimento	35
3.6.3 Aplicações na Biotecnologia.....	37
4. MATERIAL E MÉTODOS	39
4.1 Material	39
4.1.1 Microrganismo	39
4.1.2 Meios de Cultura	39
4.2 Procedimentos Experimentais	41
4.2.1 Preparo e Caracterização do Resíduo Líquido do Processamento da Mandioca.....	41
4.2.2 Reativação e avaliação da viabilidade da cepa de <i>Clostridium acetobutylicum</i>	43
4.2.3 Curva de Crescimento da bactéria <i>Clostridium acetobutylicum</i> ..	43
4.2.4 Preparo do Inóculo e Meio de cultura para fermentação.....	44
4.2.5 Ensaios para produção de Hidrogênio.....	44
4.2.5.1 Efeito da concentração de substrato sobre a produção de hidrogênio	45
4.2.5.2 Determinação do volume de hidrogênio produzido no reator...	46
4.2.6 Análise microscópica de <i>Clostridium acetobutylicum</i>	47
4.3 Métodos Analíticos	48
4.3.1 Determinação da Demanda Química de Oxigênio (DQO).....	48
4.3.2 Determinação do índice de acidez total (ATT)	48

4.3.3	Quantificação dos açúcares redutores (ART).....	49
4.3.4	Quantificação dos açúcares totais (AT).....	49
4.3.5	Determinação de ácidos orgânicos voláteis (AOV)	49
4.4	Modelagem Cinética	50
4.4.1	Análise cinética do crescimento celular	50
4.4.2	Modelagem cinética da produção de hidrogênio.....	51
4.5	Cálculos Estequiométricos do Rendimento molar de H ₂	53
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	54
5.1	Caracterização Físico-Química da manipueira.....	54
5.2	Crescimento de <i>Clostridium acetobutylicum</i>	55
5.2.1	Determinação da correlação entre o crescimento de <i>Clostridium acetobutylicum</i> e a absorvância da suspensão bacteriana.....	55
5.2.2	Efeito do meio de cultivo sobre crescimento de <i>C. acetobutylicum</i>	56
5.3	Efeito da concentração de manipueira e do inóculo sobre produção de hidrogênio por <i>C. acetobutylicum</i>	58
5.3.1	Estudos preliminares com concentrações de manipueira e inóculo elevadas	58
5.3.2	Cinética de Crescimento para concentrações iniciais de 30 e 15 gDQO/L de substrato	62
5.3.3	Estudos com concentrações de manipueira e inóculo reduzidos..	64
5.3.4	Cinética de crescimento para concentrações iniciais de 10, 7,5 e 5 gDQO/L de substrato	69
5.3.5	Produção de ácidos orgânicos e Acidez	72
5.3.6	Avaliação da Eficiência de Conversão de manipueira em hidrogênio	75
5.4	Análise Microscópica.....	78
6.	CONCLUSÕES.....	81
	REFERÊNCIAS.....	82
	ANEXOS.....	97

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Etapas metabólicas do processo de digestão anaeróbia.	24
Figura 2: Fases de crescimento de <i>Clostridium acetobutylicum</i>	36
Figura 3: <i>Clostridium acetobutylicum</i> observado por microscopia de varredura eletrônica.....	38
Figura 4: Fluxograma de preparação da manipueira.....	42
Figura 5: Procedimento de preparação em laboratório do resíduo líquido da mandioca: (A) sedimentação do amido e (B) retirada da sobrenadante após decantação do amido.....	43
Figura 6: Biorreatores com manipueira para os ensaios	45
Figura 7: Sistema de medição de gás.....	47
Figura 8: Curva típica de crescimento microbiano em função do tempo, apresentando os parâmetros biológicos de crescimento.....	52
Figura 9: Correlação entre Unidades Formadoras de Colônia (UFC) e Absorbância durante a curva de crescimento de <i>C. acetobutylicum</i> em meio CGM com 0,7% de glicose.....	55
Figura 10: Curva de crescimento de <i>C. acetobutylicum</i> expressa em medida de absorbância em função do tempo, em diferentes meios de cultivo: YPD e CGM + amido.....	56
Figura 11: Volume de hidrogênio produzido e acompanhamento da variação do pH durante o cultivo de <i>C. acetobutylicum</i> , realizado com 30 gDQO/L de substrato.....	60
Figura 12: Volume de hidrogênio produzido e acompanhamento da variação do pH durante o cultivo de <i>C. acetobutylicum</i> , realizado com 15 gDQO/L de substrato.....	60
Figura 13: Acompanhamento de matéria orgânica (DQO) durante o cultivo de <i>C. acetobutylicum</i> , realizado com 30 gDQO/L de substrato.....	61
Figura 14: Acompanhamento de matéria orgânica (DQO) durante o cultivo de <i>C. acetobutylicum</i> , realizado com 15 gDQO/L de substrato.....	62

Figura 15: Aplicação do modelo de Gompertz modificado à curva exponencial de produção de hidrogênio por <i>Clostridium acetobutylicum</i> utilizando manípueira como fonte de carbono em concentração de 30 gDQO/L.....	63
Figura 16: Aplicação do modelo de Gompertz modificado à curva exponencial de produção de hidrogênio por <i>Clostridium acetobutylicum</i> utilizando manípueira como fonte de carbono em concentração de 15 gDQO/L.....	64
Figura 17: Volume de hidrogênio produzido e acompanhamento da variação do pH durante o cultivo de <i>C. acetobutylicum</i> , realizado com 10 gDQO/L de substrato.....	65
Figura 18: Volume de hidrogênio produzido e acompanhamento da variação do pH durante o cultivo de <i>C. acetobutylicum</i> , realizado com 7,5 gDQO/L de substrato.....	66
Figura 19: Volume de hidrogênio produzido e acompanhamento da variação do pH durante o cultivo de <i>C. acetobutylicum</i> , realizado com 5 gDQO/L de substrato.....	66
Figura 20: Acompanhamento de matéria orgânica (DQO) durante o cultivo de <i>C. acetobutylicum</i> , realizado com 10 gDQO/L de substrato.	67
Figura 21: Acompanhamento de matéria orgânica (DQO) durante o cultivo de <i>C. acetobutylicum</i> , realizado com 7,5 gDQO/L de substrato.	68
Figura 22: Acompanhamento de matéria orgânica (DQO) durante o cultivo de <i>C. acetobutylicum</i> , realizado com 5 gDQO/L de substrato.	68
Figura 23: Aplicação do modelo de Gompertz modificado à curva exponencial de produção de hidrogênio por <i>Clostridium acetobutylicum</i> utilizando manípueira como fonte de carbono em concentração de 10 gDQO/L.....	71
Figura 24: Aplicação do modelo de Gompertz modificado à curva exponencial de produção de hidrogênio por <i>Clostridium acetobutylicum</i> utilizando manípueira como fonte de carbono em concentração de 7,5 gDQO/L.....	71
Figura 25: Aplicação do modelo de Gompertz modificado à curva exponencial de produção de hidrogênio por <i>Clostridium</i>	

acetobutylicum utilizando manípueira como fonte de carbono em concentração de 5 gDQO/L..... 72

Figura 26: Microscopia óptica de contraste de fase dos biorreatores operando durante 4 horas com (A) 30g/L e (B) 15g/L de manípueira..... 78

Figura 27: Microscopia óptica de contraste de fase dos biorreatores operando durante 8 horas com (A) 30g/L e (B) 15g/L de manípueira..... 79

Figura 28: Microscopia óptica de contraste de fase dos biorreatores (diluição 1:1) operando durante 10 horas com (A) 30g/L e (B) 15g/L de manípueira..... 79

Figura 29: Microscopia óptica de contraste de fase dos biorreatores operando após 24 horas com (A) 30g/L e (B) 15g/L de manípueira..... 80

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Estrutura da Oferta de Energia no Brasil.....	19
Tabela 2: Composição do meio de cultivo YPD	39
Tabela 3: Composição do meio de cultivo CGM modificado ...	40
Tabela 4: Composição do meio padrão PCA para contagem ...	40
Tabela 5: Composição da solução de oligoelementos	40
Tabela 6: Condições experimentais dos ensaios de produção de hidrogênio	46
Tabela 7: Caracterização química da manipueira.....	54
Tabela 8: Variáveis cinéticas e parâmetros estatísticos para o microrganismo cultivado nos meios YPD e CGM + amido, calculados pelo modelo de Gompertz.	58
Tabela 9: Parâmetros estimados pelo modelo de Gompertz para a produção de hidrogênio nas concentrações iniciais de substrato de 30 gDQO/L e 15 gDQO/L de substrato.....	63
Tabela 10: Parâmetros estimados pelo modelo de Gompertz para a produção de hidrogênio nas concentrações iniciais de substrato de: 10, 7,5 e 5,0 gDQO/L de substrato.....	70
Tabela 11: Composição dos metabólitos solúveis durante as fermentações em batelada com pH final 4,5.	74
Tabela 12: Valores da Produção de Hidrogênio utilizando diferentes concentrações de substrato ^(a)	75
Tabela 13: Rendimentos de Hidrogênio utilizando diferentes substratos.....	77

RESUMO

Devido à vasta biodiversidade encontrada em seu território, o Brasil dispõe de uma grande variedade de resíduos agrícolas e agroindustriais, cujo bioprocessamento é de grande interesse econômico e social. É importante fomentar a demonstração das vantagens existentes e encorajar o investimento no desenvolvimento de novas tecnologias para se obter ganho energético a partir de recursos renováveis, que são produzidos em grande quantidade. O resíduo industrial, depois de gerado, necessita de destino adequado, pois, além de criar potenciais problemas ambientais, representam perdas de matérias-primas e energia, exigindo investimentos significativos em tratamentos para controlar a poluição. A produção de hidrogênio através de resíduos orgânicos não somente favorece o ambiente, mas também produz uma fonte de energia limpa. O resíduo líquido do processamento da mandioca, manipueira, constitui-se em um substrato de baixo custo, renovável e abundante no setor agrícola, além de ser rico em carboidratos. O objetivo deste trabalho foi estudar o efeito da concentração do substrato (manipueira) no crescimento celular e na produção de gás hidrogênio, por uma cultura pura de *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824. Uma série de ensaios em batelada foi aplicada para tal fim, com concentrações de 30, 15, 10, 7.5 e 5 g DQO/L. A digestão anaeróbia da manipueira foi realizada em bioreatores de 500 mL, operando com temperatura de 36°C e pH 7. Resultados indicaram que não houve consumo total da matéria orgânica existente no substrato. Os resultados obtidos revelaram que a aplicação de concentrações de 30 e 15 gDQO/L, resultou em menor rendimento de hidrogênio, bem como numa eficiência menor de conversão de substrato. Por outro lado, concentrações menores, como 10, 7,5 e 5 gDQO/L resultaram em maiores rendimentos, sendo que o melhor rendimento de hidrogênio se deu na menor concentração de manipueira (5 gDQO/L), e alcançou 2.41 moles/mol glicose, com base no limite teórico por fermentação, de 4 moles de H₂ a partir de 1 mol de glicose. Os resultados indicam que a mandioca pode ser utilizada para produção de hidrogênio, o que confirma a habilidade de uma cultura de *Clostridium acetobutylicum* em fermentar resíduos agroindustriais ricos em carboidratos.

Palavras-chave: *Clostridium acetobutylicum*, produção de hidrogênio, manipueira, digestão anaeróbia, resíduo

ABSTRACT

Due to the large biodiversity found in its territory, Brazil has a wide variety of agricultural and agro-industrial wastes, generating a big social and economical interest in bioprocessing these wastes. It is important to encourage the demonstration of the existing benefits and investments in developing new technologies to gain more energy from renewable resources, which are produced in large quantity. The industrial waste, when generated, needs appropriate destination because, besides creating environmental problems in potential, represents losses of raw materials and energy, requiring significant investments in treatments to control pollution. The production of hydrogen from organic wastes not only favors the environment, but also produces a clean source of energy. The liquid residue from the processing of cassava, manipueira, is a low cost substrate, renewable and abundant in the agricultural sector, besides being rich in carbohydrates. The aim of this work was to study the effect of substrate concentration (manipueira) in cell growth and hydrogen gas production by a pure culture of *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824. Series of batch tests were applied for this purpose, with concentrations of 30, 15, 10, 7.5 and 5 g COD / L. The anaerobic digestion of manipueira was performed in 500-mL bioreactors, operating with 36°C temperature and pH 7. Results confirmed what authors stated earlier, that there wasn't total consumption of organic matter in the experiments. Results showed that application of 30 and 15 gCOD/L, resulted in lower yields of hydrogen and a lower substrate conversion efficiency. Furthermore, lower concentrations, as 10, 7.5 and 5 gCOD/L resulted in higher incomes, and the best hydrogen yield was obtained with the lowest concentration of manipueira (5 gCOD/L), reaching 2.41 mol/mol glucose, based on the theoretical limit of 4 mol hydrogen/ mol glucose. The results indicate that cassava can be used to produce hydrogen, which confirms the ability of *Clostridium acetobutylicum* in bioprocesses with agroindustrial wastes rich in carbohydrates.

Keywords: *Clostridium acetobutylicum*, hydrogen production, manipueira, anaerobic digestion, wastes

NOMENCLATURA

A: Potencial de produção de hidrogênio (mL)
ABE: Acetona – Butanol – Etanol
Abs.: Absorbância (nm)
Abs0: Absorbância inicial (nm)
ANVISA: Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AOV: Ácidos orgânicos voláteis (g/L)
APHA: American Public Health Association
ART: Açúcares redutores totais (g/L)
AT: Açúcares totais (g/L)
ATT: Acidez total titulável (mL NaOH/100mL manipueira)
BR: Biorreator
CGM: Clostridium Growth Medium
CLAE: Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CONAMA: Conselho Nacional do Meio Ambiente
D.O: Densidade óptica
DNS: Método do ácido 3,5-Dinitrosalicílico
DQO: Demanda Química de Oxigênio (g/L)
EMATER: Empresa de Assistência Técnica e Extensão Rural
MSE: Erro médio quadrático
NAD: Nicotinamida adenina dinucleotídeo
n: Número de graus de liberdade
PCA: Plate Count Agar
pH: Potencial Hidrogeniônico
R: Rendimento de hidrogênio (mol H₂/mol glicose)
R2: Coeficiente de correlação
RSS: Soma dos quadrados residuais
t: Tempo de incubação (h)
tg: Tempo de geração (h)
UFC: Unidades formadoras de colônia (UFC/mL)
YPD: Yeast Extract/Peptone/Dextrose
μ: Velocidade específica de crescimento (h⁻¹)
μ_{máx}: Velocidade máxima de crescimento dos microrganismos (h⁻¹)
μ_{máxH}: Velocidade máxima de produção de hidrogênio (mL/h)
μ_p: Produtividade volumétrica de produção de hidrogênio (mL/h.L)
λ: Duração da fase *lag* (h)

1 INTRODUÇÃO

As consequências do uso extensivo de combustíveis fósseis para produção de energia têm agravado dois grandes problemas da sociedade atual: o esgotamento dessas fontes de energia e a mudança climática global (LIN *et al.*, 2007). Conforme Chen *et al.* (2006), atualmente enfrentamos um novo desafio em termos energéticos, que se traduz por uma transição para fontes de energia renováveis e menos poluentes. Neste contexto, o hidrogênio surge como uma alternativa válida, dado que é o elemento mais abundante no universo e a sua combustão direta produz uma quantidade significativa de energia e libera apenas água.

Como descrevem Benemann (1996) e Momirlan e Veziroglu (2002), o interesse no hidrogênio começou a ganhar importância no início dos anos noventa quando ficou evidente que a poluição atmosférica causada pelos combustíveis fósseis poderia causar mudanças significativas na climática mundial. Como resultado, a produção biológica de hidrogênio foi focada e recebeu apoio governamental, principalmente na Alemanha, Estados Unidos e Japão, com algumas tentativas ainda em outros países. Atualmente a pesquisa na área da produção biológica é difundida em diversos países.

Existe então um interesse considerável em tecnologias alternativas incluindo os processos biológicos. A principal motivação para os estudos de processos biológicos para a produção de hidrogênio é obter um combustível “limpo”, sem utilização prévia de energia e sem geração de gases poluentes que contribuem para alterações no clima, sendo, portanto, ecologicamente correto. Adicionalmente, existe também a necessidade de um descarte de maneira segura ambientalmente para resíduos derivados dos humanos. Alguns desses resíduos são co-produtos ou simplesmente resíduos de plantas de processamento de alimentos e agroindústrias e são ricos em carboidratos. A produção de hidrogênio via microbiana através de fermentação anaeróbia pode ser um processo bioenergético que associa a necessidade do tratamento/redução de resíduos e recuperação de subprodutos.

O Estado de Santa Catarina tem sua economia fortemente baseada em suas atividades agroindustriais, gerando deste modo, vários resíduos do processamento de produtos agrícolas, entre os quais se destacam os resíduos líquidos resultantes dos processos de industrialização da mandioca. Wosiacki e Cereda (2002) destacam que

estes resíduos são ricos em matéria orgânica e, se descartados sem o devido tratamento, podem gerar sérios problemas ambientais.

Clostridium acetobutylicum é uma bactéria muito utilizada industrialmente e tem um metabolismo fermentativo complexo, produzindo vários metabólitos, incluindo hidrogênio. Recentemente, a fermentação utilizando essa espécie tem chamado a atenção devido ao seu uso na produção de combustível para veículos, atuando como substituto para gasolina e diesel. Assim, pretende-se estabelecer condições adequadas à produção de biohidrogênio por fermentação de manipueira como substrato carbônico, através de fermentação em biorreatores anaeróbios em batelada, utilizando-se como inóculo uma cultura pura da bactéria anaeróbia *Clostridium acetobutylicum*.

2 OBJETIVOS

Este trabalho teve como objetivo geral estudar a influência da concentração inicial da água residual do processamento da mandioca na produção de hidrogênio através de fermentação por *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824.

E como objetivos específicos:

Avaliar a capacidade de crescimento de *Clostridium acetobutylicum* em meio sintético com suplementos, simulando um resíduo da indústria de processamento da mandioca como substrato.

Caracterizar a água de processamento da mandioca obtida sob condições laboratoriais, quanto ao teor de DQO e açúcares, para utilizá-la na fermentação;

Determinar os parâmetros cinéticos de produção de biohidrogênio com a água residuária do processamento da mandioca nas diferentes concentrações de substrato, utilizando o modelo cinético de Gompertz.

Avaliar os rendimentos de produção de hidrogênio obtidos pela fermentação da manipueira e compará-los com os rendimentos da literatura recente da área.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Energias Renováveis no Brasil

O Brasil utiliza várias fontes de energia, conforme mostra a Tabela 1 (MINISTÉRIO DE MINAS E ENERGIA, 2008). O petróleo ocupa a maior parte da matriz energética mundial. No futuro, espera-se que ocupe um espaço menor em favor de outras fontes limpas de energia. Como pode ser observado nesta tabela, apesar da energia renovável dentro da estrutura da matriz energética brasileira ter se mantida praticamente estável entre 2006 e 2007, observa-se que as fontes de energia não renováveis vêm caindo em virtude do aumento de fontes renováveis. Esse quadro pode ser observado no mundo todo, procurando uma melhor qualidade de vida e amenizando os impactos causados pelo uso de combustíveis fósseis.

Tabela 1: Estrutura da Oferta de Energia no Brasil

ENERGÉTICO	2004	2005	2006	2007
ENERGIA NÃO RENOVÁVEL	56,2	55,5	54,9	54,2
PETRÓLEO E DERIVADOS	39,1	38,7	37,7	37,4
GÁS NATURAL	8,9	9,4	9,6	9,3
CARVÃO MINERAL E DERIVADOS	6,7	6,3	6,0	6,0
URÂNIO (U3O8) E DERIVADOS	1,5	1,2	1,6	1,4
ENERGIA RENOVÁVEL	43,8	44,5	45,1	45,8
HIDRÁULICA E ELETRICIDADE	14,4	14,8	14,8	14,9
LENHA E CARVÃO VEGETAL	13,2	13,0	12,6	12,0
DERIVADOS DA CANA-DE-AÇÚCAR	13,5	13,8	14,6	15,7
OUTRAS RENOVÁVEIS	2,7	2,9	3,0	3,2
TOTAL	100	100	100	100

Fonte: MINISTÉRIO DE MINAS E ENERGIA, 2008

UNIDADE: %

Da oferta interna de energia total do Brasil, 109,3 milhões ou 45,8% correspondem à oferta interna de energia renovável. Essa proporção é das mais altas do mundo, contrastando significativamente com a média mundial, de 12,7%, e mais ainda com a média dos países

que compõem a OECD (Organisation de Coopération et de Développement Économiques), em sua grande maioria países desenvolvidos, de apenas 6,2%. Nos últimos anos, os constantes aumentos na produção do petróleo e do gás natural vêm permitindo ao país, importantes e sucessivas reduções no índice de dependência externa global de energia.

Muito do desenvolvimento tecnológico na área de combustíveis utilizando fontes renováveis no Brasil, é devido a estudos com o biodiesel, em substituição total ou parcial do óleo diesel de petróleo em motores ciclodiesel automotivos (de caminhões, tratores, camionetas e automóveis) ou estacionários (geradores de eletricidade e calor).

3.2 Hidrogênio como fonte de energia

Antes da Revolução Industrial, a economia global era fortemente baseada na extração direta de carbono ou indireta através das plantas. Nos dias de hoje, a economia é basicamente dependente dos combustíveis fósseis (RAGAUSKAS *et al.*, 2006). Algumas das mais preocupantes conseqüências do uso crescente de combustíveis fósseis, demandado pelo crescimento econômico, incluem o efeito estufa, o aquecimento global, a diminuição da camada de ozônio, a chuva ácida e ainda o esgotamento destes combustíveis, como bem citado por Das e Veziroglu (2001). O aquecimento global tem efeito cada vez mais evidente no clima da terra e conseqüentemente no cultivo de alimentos e os ecossistemas aquáticos.

Com base nesse fato, a questão das fontes de energia é assunto em pauta mundialmente. A busca por fontes renováveis de energia é um assunto importante para atingir tanto um desenvolvimento sustentável quanto uma maior eficiência em termos de performance industrial nas sociedades modernas. Além do petróleo que demora milhares de anos para se reconstituir na natureza, e de seus derivados - a gasolina, o óleo diesel, o óleo combustível, o GLP ou gás de cozinha, são recursos não-renováveis outros combustíveis fósseis, como o carvão e o gás natural, e a energia produzida nas usinas nucleares. Já entre as fontes renováveis encontram-se o sol (energia solar), o vento (energia eólica), os oceanos e a biomassa (bioenergia ou agroenergia).

No final do século vinte e um, uma combinação de desenvolvimento econômico, tecnológico e político estão levando ao descobrimento de uma nova economia baseada em carboidratos (MORRIS, 2006). No Canadá, indústrias de alimentos já estão operando segundo um indicador de eco-eficiência desenvolvido por Maxime *et al.* (2006), levando em conta os seguintes fatores: uso da energia, emissão

de gases, uso da água e geração de água residuária, resíduos orgânicos e de embalagens. Deste modo, a busca por fontes de energia renováveis se torna extremamente importante para que se alcance um desenvolvimento sustentável.

Neste contexto, Yamin *et al.* (2000), destacam que o hidrogênio é uma das fontes de energia alternativas com características muito interessantes, porque é uma fonte de energia limpa, cuja queima produz apenas água ao invés do monóxido e dióxido de carbono, um dos principais gases emitidos pela queima do petróleo e um dos responsáveis pelo efeito estufa. Além disso, o hidrogênio pode ser produzido a partir de matéria orgânica renovável.

Segundo Penteadó (2003) *apud* Muccillo (2007), o hidrogênio possui características combustíveis desejáveis, porque apresenta alto conteúdo de energia por massa, maior velocidade de combustão, limites alto de inflamabilidade, temperatura de detonação mais alta, menor energia de ignição, menor densidade e é um bom condutor de calor e eletricidade. É um elemento quimicamente muito ativo, por isso só se encontra na forma combinada: na água, em ácidos, em bases, em hidretos e em compostos orgânicos em geral. Por isso não se trata de uma fonte de energia, e sim de um vetor: é necessário primeiro produzi-lo e armazená-lo para depois ser usado como combustível.

Boyles (1984) *apud* Kotay e Das (2007) indica que o hidrogênio molecular possui o mais alto conteúdo energético por massa dentre os combustíveis gasosos (143 kJ.g^{-1}), o que constitui-se em quase três vezes mais que os combustíveis com hidrocarbonetos, e é o único combustível livre de carbono que sua oxidação resulta em água como produto da combustão. Em comparação com os combustíveis fósseis como fonte de energia tradicional, o hidrogênio se torna um candidato promissor como energia limpa para o futuro devido ao seu alto nível energético (LIN e LAY, 2004; PINTO *et al.*, 2002; FAN *et al.*, 2004).

Células combustíveis baseadas em hidrogênio já estão sendo comercializadas e as grandes indústrias automobilísticas estão investindo bilhões de dólares no desenvolvimento de carros, ônibus e caminhões cujo combustível usado é o hidrogênio. No entanto, atualmente o hidrogênio é obtido a partir de combustíveis fósseis, o que sustenta a dependência e gera dióxido de carbono na atmosfera.

Conforme Abdel-Fattah e Olama (2002), a otimização das condições de fermentação, particularmente parâmetros nutricionais, ambientais e de processamento, são de grande importância para o desenvolvimento dos bioprocessos e tais melhorias podem diminuir o custo da produção do biohidrogênio.

3.3 Produção Biológica de Hidrogênio

Segundo Ike *et al.* (1997); Melis e Happe (2001) e Smith *et al.* (1992), o hidrogênio pode ser produzido quimicamente como um subproduto do processamento de petróleo/carvão, através da eletrólise da água, e outros processos que não satisfazem a condição de custo-benefício devido ao alto nível de energia que requerem. A produção biológica de hidrogênio tem vantagens significativas sobre os métodos químicos. Existem principalmente dois sistemas para a obtenção de hidrogênio por via microbiana, sendo estes os processos fotoquímicos e fermentativos. O primeiro consiste em produzir hidrogênio através de microrganismos fotossintéticos tais como algas e bactérias fotossintéticas. Já os processos fermentativos consistem em microrganismos produtores de hidrogênio tais como os anaeróbios facultativos e obrigatórios.

As pesquisas de Fan *et al.* (2004); Fang *et al.* (2002) e Ginkel *et al.* (2001) mostram que, em comparação com os processos tradicionais que utilizam métodos físicos e químicos, a conversão microbiana da biomassa (tais como os resíduos industriais e agroindustriais) em biohidrogênio usando bactérias fermentativas é um processo ambientalmente correto e bastante econômico do ponto de vista energético, e tem atraído interesse como uma possível alternativa na conversão de biomassa em hidrogênio.

Espécies microbianas pertencentes aos gêneros *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Bacillus*, e *Clostridium* são bastante pesquisadas para a produção através de fermentação escura (NANDI e SENGUPTA, 1998). Além das culturas puras, várias microfloras mistas e co-culturas têm sido exploradas para a produção de hidrogênio via carboidratos (DAS e VEZIROGLU, 2001; LEVIN *et al.*, 2004). Todavia, a busca pelo microrganismo ideal para a produção microbiológica de hidrogênio tem motivado os pesquisadores a testar várias fontes.

A produção de biohidrogênio por fermentação ocorre porque alguns organismos heterotróficos, anaeróbios facultativos, crescendo sob condições anaeróbias, são capazes da oxidação de compostos orgânicos, dos quais retiram elétrons, transferindo-os para coenzimas oxidadas. Lehninger *et al.* (2000) explicam que, à medida que este processo metabólico ocorre, as coenzimas oxidadas vão se esgotando. Sendo assim, estas células devem dar um destino a estes elétrons sob pena de ter suas reações metabólicas de produção de energia cessadas. Muitos destes organismos são capazes de desviar o excesso de elétrons para a produção de hidrogênio molecular, através da atividade de hidrogenases. Os organismos degradam moléculas energéticas como

forma de obter energia livre, a qual é transformada em ATP, que é o principal transportador de energia química em todas as células. A produção de hidrogênio molecular é usada para manter o balanço de elétrons, no qual os prótons atuam como receptor de elétrons e os equivalentes redutores atuam como doadores de elétrons (VIGNAIS *et al.*, 2001).

Sendo assim, quando os compostos orgânicos são a única fonte de carbono e energia que promovem a força metabólica, o processo é denominado fermentação escura. Em ambientes anóxicos ou anaeróbios, o hidrogênio é comumente produzido durante a quebra de compostos orgânicos pelos microrganismos (VRIJE e CLAASSEN, 2003).

3.3.1 Microbiologia da Digestão Anaeróbia

A digestão anaeróbia é um processo complexo envolvendo um consórcio de microorganismos que atuam de forma simbiótica onde o produto de um grupo é substrato de outro. As reações bioquímicas principais que ocorrem no processo caracterizam os grupos de microorganismos predominantes, podendo o mesmo ser dividido em três etapas: hidrólise e acidogênese, acetogênese, e metanogênese, conforme descrevem Van Haandel e Lettinga (1994). A Figura 1 representa o fluxo de carbono durante a decomposição anaeróbia da matéria orgânica complexa ao metano.

Na decomposição bioquímica da matéria orgânica presente, uma larga variedade de bactérias hidrolisa e converte o material complexo em compostos de menor peso molecular. Entre os compostos de menor peso molecular formados, os principais são os ácidos graxos de menor cadeia molecular tais como o acético, o propiônico, o butírico, que aparecem misturados a outros componentes importantes. Estes ácidos são chamados de ácidos voláteis porque eles podem ser destilados sob pressão atmosférica. O acúmulo de ácidos voláteis pode ter um efeito indesejado sobre a digestão anaeróbia se a capacidade de tamponação for extrapolada e o pH descer para níveis desfavoráveis (SAWYER e MCCARTY, 1978).

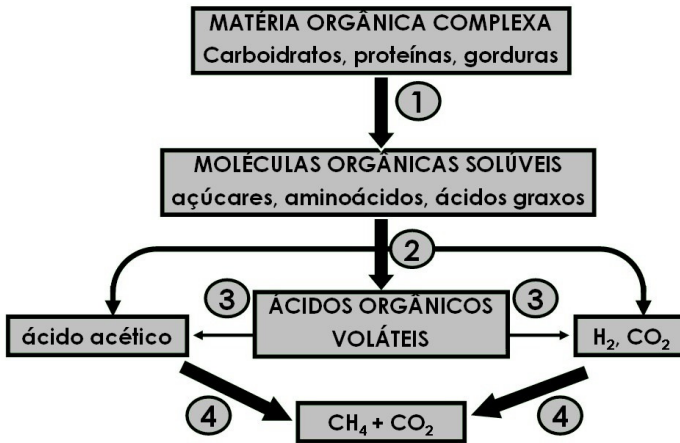


Figura 1: Etapas metabólicas do processo de digestão anaeróbia.
1. Hidrólise; 2. Fermentação/Acidogênese; 3. Acetogênese; 4. Metanogênese. Adaptado de Menes (2007)

O primeiro estágio da digestão anaeróbia consiste de uma hidrólise onde as moléculas orgânicas complexas são degradadas em oligômeros e monômeros para que possam ser assimilados pelas bactérias fermentativas. Carboidratos, proteínas e lipídios são hidrolisados a açúcares, aminoácidos e ácidos graxos livres, respectivamente. Os monômeros gerados podem ser fermentados à ácidos graxos voláteis, lactato, álcoois, succinato, etc. Durante esta fase, as concentrações de gás podem chegar a níveis de oitenta por cento de dióxido de carbono e vinte por cento de hidrogênio. Esta fase é também chamada de acidogênese e, usualmente conhecida como fermentação, já que ocorre na ausência de oxigênio.

Nesta etapa, os álcoois e os ácidos graxos, produtos da fase de hidrólise e fermentação, são posteriormente degradados a acetato, hidrogênio e dióxido de carbono por um grupo de bactérias fermentadoras acetogênicas. Os ácidos graxos de cadeia longa são degradados por um processo conhecido como β -oxidação, no qual há uma liberação sucessiva de unidades de acetato. Se a cadeia possui um número ímpar de carbonos, além dos produtos anteriores, há a geração de propionato. Durante a formação do ácido acético e propiônico, uma grande quantidade de íons hidrogênio é formada, fazendo com que o valor do pH no meio decresça.

De todos os produtos metabolizados pelas bactérias acidogênicas, apenas o hidrogênio e o acetato podem ser utilizados diretamente pelas metanogênicas. Porém, pelo menos 50% da DQO biodegradável é convertida em propionato e butirato, os quais são posteriormente decompostos em acetato e hidrogênio pela ação das bactérias acetogênicas (MENES, 2007). De acordo com as pesquisas realizadas por Breure e Van Andel (1984), a distribuição dos ácidos orgânicos voláteis dependerá principalmente da natureza do substrato e das condições às quais os microrganismos estão sendo expostos. Com isto a etapa de acetogênese pode ser mais ou menos intensa no processo de degradação do substrato.

O processo de degradação do substrato é finalizado na etapa, que consiste na transformação dos produtos formados (com um ou dois átomos) anteriormente em metano e dióxido de carbono. A formação do metano é executada por dois mecanismos distintos, conforme descreve Speece (1995). Os produtos finais da acetogênese são os substratos essenciais para o terceiro estágio, que por sua vez constitui dois diferentes grupos de arqueas metanogênicas. Um grupo usa o acetato, transformando-o em metano e dióxido de carbono, enquanto o outro produz metano, através da redução do dióxido de carbono (CHERNICHARO, 1997).

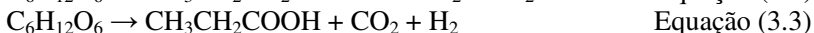
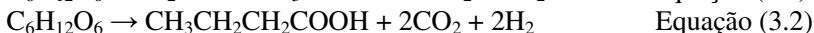
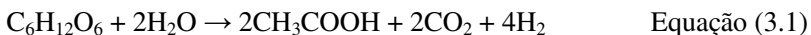
3.3.2 Produção Fermentativa de Hidrogênio

Segundo Manish e Banerjee (2008), os processos biológicos de produção de hidrogênio têm sido foco de muitas pesquisas no mundo. Bactérias fermentativas são as candidatas favoritas para a produção de hidrogênio. Elas degradam matéria orgânica e liberam hidrogênio e dióxido de carbono, e parte dessa matéria orgânica permanece na forma de ácido acético e ácido butírico ou outros ácidos, dependendo da bactéria que a fermenta. As diferentes quantidades de rendimento de glicose a hidrogênio dependem das vias fermentativas e dos subprodutos.

Os principais ácidos formados na produção heterotrófica de hidrogênio são o ácido acético, o butírico e o propiônico. O valor máximo estequiométrico de conversão de 4 moles de hidrogênio por mol de glicose pode ser atingido com acetato (CH_3COOH) como subproduto da fermentação (Equação 3.1) (LEVIN *et al.*, 2004). Se o ácido butírico ($\text{CH}_3(\text{CH}_2)_2\text{COOH}$) for o principal produto da fermentação, então o rendimento é de somente 2 moles de hidrogênio (UENO *et al.*, 1996; KATAOKA *et al.*, 1997). Rendimento esse que é ainda menor quando mais compostos orgânicos reduzidos, tais como

ácido láctico, propiônico e etanol, são produtos da fermentação, porque representam produtos finais das vias metabólicas que a maioria das reações de produção de hidrogênio na fermentação de carboidratos.

No caso do ácido propiônico ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{COOH}$), o rendimento é de 1 mol de hidrogênio por mol de glicose, respectivamente. Estes rendimentos são os obtidos estequiometricamente e, experimentalmente, os pesquisadores têm encontrados valores bastante variáveis dependendo do substrato e da bactéria utilizada (VALDEZ-VAZQUEZ *et al.*, 2005).



A produção de hidrogênio por fermentação é afetada por vários parâmetros tais como o pH, temperatura e concentração de substrato, assim como a natureza da comunidade microbiana. O controle do pH é crucial devido ao seu efeito na atividade da hidrogenase (DARBROCK *et al.*, 1992), nas vias metabólicas e nos microrganismos (LAY, 2000). A produção de hidrogênio também é acompanhada pela produção de ácidos orgânicos voláteis e álcoois. Estes ácidos formados também contribuem para o abaixamento de pH. Se o pH ficar muito baixo, as bactérias irão tentar reduzir a concentração de íon hidrogênio (H^+) e não irão produzir hidrogênio. Sendo assim, as bactérias com atividade em baixos pHs podem resultar em rendimentos maiores de hidrogênio, ou as reações que produzem os ácidos podem ser bloqueadas.

Sob várias condições, alguns microorganismos fermentativos, como o *C. acetobutylicum*, muda da fermentação acidogênica para a fase solventogênica, na qual os produtos finais incluem a acetona, o butanol e o etanol. Isto ocorre quando a produtividade de hidrogênio decresce ou tem seu fim. O início da fase solventogênica tem relação com a alta pressão parcial de hidrogênio, alta concentração de ácidos orgânicos, e/ou baixo pH. Estas condições podem alterar o fluxo de elétrons causando inibição por pH e mudanças na composição dos produtos finais (GRUPE e GOTTSCHALK, 1992).

Os organismos degradam moléculas energéticas como forma de obter energia livre, a qual é transformada em ATP, que é o principal transportador de energia química em todas as células. O substrato é degradado na primeira fase da fermentação em uma série de reações catalisadas por enzimas para liberar o piruvato e produzir ATP. A energia também é conservada em moléculas de NADH. Os elétrons gerados nessas reações são transferidos para coenzimas especializadas

no transporte de elétrons, no caso o NAD⁺, que passa para sua forma reduzida, NADH. Quando um composto é oxidado ele perde elétron ou hidrogênio, o NAD⁺ é o carregador de elétron, e quando reduzido fica na forma NADH. O NADH formado durante a degradação deve ser regenerado a NAD⁺. Na segunda fase da fermentação o ácido pirúvico é, então, reduzido através do hidrogênio do NADH em alguns compostos. (LEHNINGER *et al.*, 2000).

No caso do *Clostridium*, os compostos reduzidos produzidos a partir do piruvato são: lactato, etanol, ácido butírico, ácido acético e hidrogênio. Juntamente com os ácidos voláteis, a fermentação também leva à formação de álcoois. Estes compostos reduzidos, tais como etanol, butanol e lactato, contém átomos de hidrogênio que não são liberados como gás. Para maximizar o rendimento, o metabolismo bacteriano precisa ser afastado dos álcoois (etanol e butanol) e ácidos reduzidos (lactato) em direção aos ácidos orgânicos voláteis (HAWKES *et al.*, 2002; LEVIN *et al.*, 2004).

3.4 Substratos utilizados na produção de Hidrogênio

Koku e Eroglu (2002) e Fang *et al.* (2006) afirmam que a produção microbiana de hidrogênio é um processo atrativo porque existe uma grande variedade de bactérias fermentativas capazes de produzir hidrogênio com baixo custo de capital em relação ao uso de células viáveis por longos períodos. O processo de produção do biohidrogênio se impõe como um processo ambientalmente inofensivo utilizando recursos renováveis. O hidrogênio é um intermediário chave na degradação anaeróbia dos componentes orgânicos e pode ser produzido de efluentes (UENO *et al.*, 1996) ou resíduos sólidos (SPARLING *et al.*, 1997; LAY *et al.*, 1999; MIZUNO *et al.*, 2000) usando culturas mistas ou ainda através de culturas puras.

Os critérios para a seleção do substrato a ser usado na produção de gás são a disponibilidade, o custo, o conteúdo de carboidrato e a biodegradabilidade. Açúcares simples como a glicose, sacarose e a lactose são substratos preferidos para esta finalidade. Entretanto, fontes puras de carboidratos se tornam caras para o processo e, sendo assim, resíduos com o mesmo potencial podem ser utilizados (KAPDAN e KARGI, 2006). Deste modo, os carboidratos aparecem como substrato preferido nas fermentações para produzir hidrogênio. Ueno *et al.* (2001) e Fang *et al.* (2006) informam que a maioria dos estudos na produção de hidrogênio até hoje, entretanto, tem se limitado ao uso de fontes puras de carboidratos, tais como glicose, sacarose e amido, e pouco ainda é conhecido sobre a viabilidade do uso de resíduos agroindustriais ricos

em carboidratos. Tais resíduos puros não são economicamente viáveis devido ao seu alto custo.

Assim, resíduos e efluentes que contêm uma alta concentração de carboidratos gerados pelos processos industriais, são mais indicados por razões econômicas. Collet *et al.* (2004) fizeram uso da abundância de lactose disponível no permeado do leite, utilizando este efluente da indústria de laticínios para produzir acetato, e consequentemente hidrogênio, através da bactéria *Clostridium thermolacticum*, tendo como vantagens a redução do custo do substrato para a fermentação e também a eliminação dos custos dos resíduos. Matsumoto e Nishimura (2007) utilizaram chorume de shochu, bebida japonesa com graduação alcoólica de 15% a 35% em volume, obtida da destilação do mosto fermentado de arroz, para a produção de hidrogênio pela bactéria *Clostridium diolis* JPC H-3. Yang *et al.* (2007) investigaram a possibilidade da formação de hidrogênio através de fermentação anaeróbia por culturas mistas utilizando soro do queijo como substrato. Também trabalhando com uma microflora, Wu e Lin (2004) utilizaram bactérias termofílicas para degradar um efluente contendo melão como fonte de carbono.

Na mesma linha de utilização de efluentes com grande quantidade de proteínas e polissacarídeos, Wang *et al.* (2003) utilizaram um filtrado de resíduos sólidos que apresentaram uma quantidade extra de nutrientes para as bactérias anaeróbias. Na linha do aproveitamento de resíduos agroindustriais, Hussy *et al.* (2005) estudaram o aproveitamento da água extraída do açúcar de beterraba, rica em sacarose, e verificaram um ótimo aproveitamento deste resíduo para a produção de hidrogênio.

Surpreendentemente poucas informações são encontradas na literatura quando se deseja saber sobre o potencial do amido para produção de hidrogênio, embora seja um dos compostos orgânicos mais abundantes na terra e bem mais barato que os açúcares (ZHU *et al.*, 2002; ZHANG *et al.*, 2003; LIU e SHEN, 2004). Wang e Chang (2008) monitoraram a produção de subprodutos e hidrogênio via fermentação escura por uma cultura mista utilizando amido como única fonte de carbono. Já Chen *et al.* (2007) avaliaram a eficiência de bioconversão do amido em hidrogênio através de uma amilase recombinante originária de *Caldimonas taiwanensis* On1, já que a hidrólise desta macromolécula em açúcares redutores pode ser um passo limitante do processo.

Yokoi *et al.* (2001) estudaram a recuperação de um resíduo amiláceo de batata-doce, rico também em celulose e hemicelulose, para a produção de hidrogênio, através de uma batelada alimentada

envolvendo *Clostridium butyricum* e *Enterobacter aerogenes*. No seguimento do trabalho, Yokoi *et al.* (2002) otimizaram essa produção combinando a utilização de um resíduo com a adição de um líquido residual do processamento de milho perfazendo a função de fonte de nitrogênio no meio de cultura. O resíduo líquido do processamento do arroz foi estudado por Fang *et al.* (2006) usando um lodo anaeróbio pré-tratado, assim como Zurawski *et al.* (2005) que testaram diferentes fontes de carbono incluindo resíduos agroindustriais do processamento de batata e beterraba.

3.5 Industrialização da Mandioca

A mandioca (*Manihot esculenta*, Crantz) é uma planta tipicamente brasileira e caracteriza-se por ser tolerante às condições de seca e baixa fertilidade do solo. Já estava presente no Brasil desde antes do seu descobrimento. Os índios nativos brasileiros dela já tiravam o seu sustento e vêm ensinando de geração em geração as diferentes opções para o processamento da matéria-prima.

Sua cultura tem grande adaptabilidade aos diferentes ecossistemas (solos pobres, ácidos e tempos de seca) o que possibilita seu cultivo em todo o território nacional (LIMA, 2001). A industrialização das raízes de mandioca é uma boa alternativa para se agregar valor a essa cultura tradicional do Brasil, diminuindo as perdas pós-colheita dessas raízes altamente perecíveis, proporcionando maior retorno financeiro aos produtores e geração de empregos.

A importância econômica da cultura da mandioca deriva do interesse em suas raízes, ricas em amido, utilizadas na alimentação humana e animal, e de seu uso na fabricação de produtos alimentícios e de uso industrial. Além dos aipins ("mandiocas mansas" de consumo "in natura"), da sua raiz também se produz álcool combustível, a farinha, o polvilho, a tapioca e a fécula. Essa última é matéria-prima para inúmeros produtos utilizados na indústria alimentícia, têxtil, petrolífera, plástica e siderúrgica, entre outras. A mandioca pode ainda ser usada com ingrediente ou aditivo na fabricação de embutidos, chocolates, balas, bolachas, pães e sopas. Alguns desses produtos podem ser fabricados em diferentes escalas industriais e outros apenas em indústria de maior porte, pois necessitam de grandes investimentos e de tecnologias mais sofisticadas.

Estima-se que no Brasil a cadeia produtiva da mandioca movimenta 2,5 bilhões de dólares e gere cerca de 150 milhões de dólares em impostos por ano (FELIPE e BROEK, 2008). Há que se considerar ainda o potencial de uso e de renda de seus atuais rejeitos

industriais, desafio que o setor e a pesquisa já tratam com interesse crescente. Em Santa Catarina, a mandioca destaca-se na agricultura do Estado pela histórica identidade e importância sócio-econômica junto a mais de 60 mil unidades familiares de produção, nas quais está presente como fonte geradora de renda e/ou subsistência. Os 32.000 hectares colhidos anualmente, média das últimas 5 safras apuradas, têm produzido cerca de 600 mil toneladas de raízes, gerando cerca de 6.400 empregos diretos nas lavouras. Do total de raízes produzidas, estima-se que 150 mil toneladas sejam destinadas para a fabricação da farinha, 150 mil toneladas para a produção de polvilho e fécula e 300 mil toneladas sejam consumidas "in natura" na alimentação animal e humana (SAMPAIO e NEUBERT, 2007).

Quando o processamento ocorre em grande escala, os subprodutos podem apresentar sérios problemas ambientais, pois mesmo as pequenas unidades fabris, como as casas de farinha, podem gerar quantidades significativas de resíduos, uma vez que normalmente se agrupam em um determinado local ou município (CEREDA, 2001).

Do início das pesquisas até hoje, muitas tecnologias e informações foram geradas para os agricultores e processadores. Instituições governamentais estão ampliando suas pesquisas sobre a mandioca, a fim de melhorar a produção e a produtividade, a qualidade dos produtos e reduzir os custos. Esse conjunto de tecnologias faz com que os agricultores catarinenses produzam raízes de qualidade e obtenham produtividades bem acima da média nacional. Também as pesquisas realizadas contribuem em muito para que os engenhos, polvilheiras e fecularias sejam competitivos nos mercados em que atuam. Santos *et al.* (2001) propuseram silagens alternativas de resíduos industriais usando cascas de laranja e partes aéreas da mandioca. Marques *et al.* (2000) estudaram a substituição do milho por mandioca e resíduos de sua produção como fonte de alimentação de novilhas confinadas. Vandenberg *et al.* (2000) observaram que na produção de ácido cítrico por *Aspergillus niger* em bagaço de mandioca, ocorreu um enriquecimento protéico do material cultivado, de 13,1% para 23,1% em 120h de cultivo.

Importante salientar ainda que entre as tecnologias produzidas, parte delas orienta a produção e o processamento das raízes respeitando os recursos naturais, permitindo que a atividade se desenvolva com ganhos na qualidade ambiental. Conforme Lima (2001), além do aspecto de agressão ao meio ambiente, deve ser também considerado que o despejo indevido dos subprodutos da mandioca constitui em desperdício de rendimentos para os produtos, quando se consideram as quantidades

geradas e a composição dos subprodutos. São muitas as possibilidades a serem criadas para o aproveitamento de todos os resíduos, propiciando o aumento da receita para as empresas.

3.5.1 Água Residual do Processamento da Mandioca (Manipueira)

Considerando-se os principais tipos de processamento de raízes de mandioca no Brasil como a fabricação de farinha de mandioca e a extração de fécula, os resíduos gerados podem ser sólidos ou líquidos (CEREDA, 1994). Devido à composição química e de acordo com a destinação final, esses materiais geram elevadas cargas poluidoras que causam impactos negativos ao meio ambiente. Os resíduos da mandioca são partes constituintes da própria planta, gerados em função do processo tecnológico adotado (FLOGIO *et al.*, 2000). É indiscutível a necessidade do controle de poluentes industriais, independentemente do porte da empresa envolvida.

Denomina-se manipueira, a água de constituição da raiz extraída na prensagem da massa ralada na fabricação de farinha que até pouco tempo era praticamente desprezada sem qualquer aproveitamento econômico (PONTE, 1992). Em tupi-guarani, manipueira significa “o que brota da mandioca” e caracteriza-se como um extrato líquido, com aspecto leitoso, contendo de 5 a 7 % de fécula, glicose, ácido cianídrico, bem como outras substâncias orgânicas (carboidratos, proteínas e lipídeos) e nutrientes minerais (FIORETTO, 2001).

Existe uma grande variabilidade no processo industrial da mandioca com relação aos métodos empregados para a obtenção do produto final. O amido é recuperado das raízes da mandioca através de um processamento úmido o qual gera um grande volume de líquido que é considerado água residual. Um quilograma de raízes frescas de mandioca gera em torno de 0,2 kg de amido, 0,4 - 0,9kg de torta e em torno de 5 - 7 litros de efluente na produção de amido (PLEVIN e DONELLY, 2004). Os produtos mais tradicionais como a farinha, requerem um volume relativamente baixo de água se comparado com o processo de obtenção do amido, que necessita de água em todos os estágios da produção, consumindo em média 2 a 6 vezes mais água.

Feiden (2001), em seu estudo sobre tratamento de águas residuárias de indústria de fécula de mandioca através de biodigestor anaeróbio com separação de fases em escala piloto, utilizou o efluente bruto de uma fecularia que apresentou uma demanda química de oxigênio (DQO) de 11.484 mgL⁻¹. Já Lima (2001), afirma que as indústrias de fécula são produtoras de resíduos perigosos, que podem ser agravados com a falta de tratamento e no seu estudo, este trabalhou com

efluente contendo uma DQO média de 15.720 mg/L. Comparando com outros autores, este concluiu que a composição da água residuária de fecularia e de farinha difere substancialmente, sendo que a última é de seis a dez vezes mais concentrada.

De acordo com Fioretto (2001), a composição química do efluente de fecularia é variável, dependendo da variedade utilizada, que por sua vez está correlacionada com as condições edafoclimáticas do local onde é cultivada. É importante ressaltar que a composição do substrato e os requerimentos nutricionais da cepa afetam consideravelmente o desempenho da fermentação.

Barana (2008) estudou o potencial poluente da manipueira, sendo que sua carga orgânica pode chegar a 100 gDQO.L⁻¹. A maior parte da matéria orgânica da manipueira é devida à presença de açúcares solúveis e, portanto foram determinados os teores dos açúcares glicose e frutose em dez lotes do resíduo líquido de uma farinha. Os resultados indicaram a presença de 14,7 gL⁻¹ de glicose, que correspondeu a 29% da matéria orgânica presente e, 22 gL⁻¹ de frutose, equivalente a 42% da matéria orgânica. Já que o amido é constituído basicamente por polímeros de α -D-glicose e por serem açúcares solúveis, de fácil fermentação, degradam-se rapidamente à ácidos orgânicos. Esta característica inviabiliza o tratamento deste resíduo por processos físicos. É importante ressaltar que o crescimento microbiano também depende de fatores ambientais, como pH, temperatura e acúmulo de produtos finais do metabolismo dessas bactérias.

Portanto, a crescente preocupação com o meio ambiente vem mobilizando vários segmentos do mercado e inúmeros órgãos governamentais e indústrias a se prepararem para aplicar uma política ambiental que diminua os impactos negativos à natureza. Constantes revisões têm ocorrido em resoluções ligadas a resíduos, tais como as da ANVISA e do CONAMA, que classificam e propõem tratamentos, formas de manipulação e descarte dos resíduos, além da Gestão Ambiental e certificação ISO 14000, visando o desenvolvimento de atividades dos mais diversos segmentos, sem transgredir as leis ambientais vigentes. Deste modo, a eliminação deste resíduo líquido do processamento da mandioca consiste em uma ameaça para o ambiente, já que contém ácidos orgânicos voláteis, que são intermediários para a produção de hidrogênio, como o ácido acético, butírico e propiônico. Neste caso, a manipueira se torna candidata para a produção de biohidrogênio.

3.5.2 Aproveitamento da manipueira para a produção de Hidrogênio

A manipueira vem sendo objeto de estudo nos últimos anos devido ao grande interesse no controle da poluição ambiental e nos problemas acarretados pela mesma. Deste modo, a minimização de resíduos e a contribuição para as tecnologias limpas ganham em importância. Cardoso (2005) investigou o emprego da manipueira como biofertilizante para cultivo do milho e seus efeitos no solo e nas águas subterrâneas. Outra alternativa de aproveitamento deste resíduo, já em fase de implementação em indústrias de médio porte, é a fermentação anaeróbia em fases separadas para produção de biogás, no qual o objetivo fundamental é a substituição parcial ou total da lenha usada na secagem da farinha de mandioca.

No Brasil, a manipueira já é utilizada por vários pesquisadores que vêm colhendo seus benefícios. No Nordeste do país, a EMATER (Empresa de Assistência Técnica e Extensão Rural), já usa a manipueira em substituição da água na produção de tijolos, que misturada ao barro e a matéria orgânica presente, faz uma espécie de liga. Os elementos químicos presentes no líquido fazem o papel do fogo, pois sua evaporação endurece o tijolo do mesmo modo que o fogo faria. Esse processo reduz o uso de água, poupa a matriz calorífica que é a lenha, evitando o desmatamento e evita a emissão de gases com a queima.

Com relação à produção de hidrogênio, Reungsang *et al.* (2004) estudaram o aproveitamento do resíduo do processamento do amido de mandioca para gerar gás utilizando um lodo anaeróbio e uma cultura de *Rhodospirillum rubrum*. A presença da cultura de *R. rubrum* melhorou a produção específica de hidrogênio e aumentou a produtividade em duas vezes se comparada com o uso do lodo nas mesmas condições. Deste modo, Reungsang *et al.* (2007) investigaram a influência de parâmetros como pH inicial, concentração de fósforo e nitrogênio, iluminação e agitação na produção de hidrogênio pela bactéria fototrófica *R. Rubrum* associada com um lodo anaeróbio. Neste experimento, o pH 7,0 foi o valor ótimo encontrado, assim como uma produção maior de hidrogênio foi alcançada quando se trabalhou com um meio agitado do que em uma fermentação estática. Sangyoka *et al.* (2007) ainda estudaram o efeito da melhor concentração de substrato ao trabalhar com um sistema de batelada alimentada.

3.6 *Clostridium acetobutylicum*

Clostridium acetobutylicum é um bacilo gram-positivo classificado como anaeróbico obrigatório. Em fase vegetativa, se movimenta através de flagelos localizados em toda sua superfície. Em ambientes aeróbios, os endósporos são formados e podem sobreviver por anos nestas condições. Somente quando estes esporos estiverem em condições anaeróbicas favoráveis, o crescimento vegetativo terá continuidade (CATO *et al.*, 1986). Com relação à inocuidade, *C. acetobutylicum* é completamente benigno para plantas e animais, entretanto, outras espécies do mesmo gênero são conhecidos patógenos e alguns produzem neurotoxinas que podem levar a morte, como *C. botulinum* e *C. tetani*.

De acordo com Nolling *et al.* (2001), é comumente encontrado no solo embora possa ser encontrado em vários ambientes. É mesofílico e cresce bem em temperaturas entre 10 e 65°C. Além disso, este organismo é sacarolítico, ou seja, é capaz de degradar açúcares e ainda é capaz de produzir um grande número de diferentes produtos comercialmente importantes, como a acetona, o etanol e o butanol.

São conhecidos por serem microrganismos clássicos produtores de ácidos e normalmente fermenta glicose a butirato, acetato, dióxido de carbono e hidrogênio molecular. Estudos prévios a respeito da fermentação clostridial de culturas puras têm recebido bastante atenção, principalmente no campo da produção de solventes, enquanto pouco ainda é conhecido sobre sua habilidade de produzir hidrogênio (LIN *et al.*, 2007).

A fermentação de açúcares e amido para gerar solventes e combustíveis pode ser considerada um dos processos mais antigos na biotecnologia principalmente na fermentação de etanol para a produção de vinho e cerveja. Depois de tentativas realizadas por Louis Pasteur e outros, a fermentação do amido para produzir acetona, butanol e etanol (fermentação ABE), foi desenvolvida por Chaim Weizman em 1912 (DÜRRE, 1998 *apud* ANDRADE e VASCONCELOS, 2003). Por este motivo, muitas vezes esse microrganismo é denominado 'Organismo Weizmann'. Ele isolou a cepa que mais tarde foi chamada de *Clostridium acetobutylicum* e iniciou a primeira planta de produção de acetona através do amido.

3.6.1 Metabolismo Energético e Subprodutos

Clostridium acetobutylicum é um quimio-organotrófico e obtém energia através da oxidação de substratos orgânicos na fermentação. Tal como acontece em todas as fermentações, o substrato são moléculas

orgânicas que agem como doador e aceptor de elétrons. Em particular, *C. acetobutylicum* exige uma fonte de carboidratos fermentável para seu crescimento e sobrevivência (CATO *et al.*, 1986).

Além disso, *C. acetobutylicum* é um anaeróbio obrigatório. Segundo Zhang *et al.* (2001), após exposição de apenas algumas horas ao oxigênio, a bactéria pode sofrer esporulação como um mecanismo de sobreviver por longos períodos de tempo neste ambiente. Não possui atividade de catalase, uma enzima importante para a detoxicação de um subproduto tóxico do metabolismo de oxigênio; ou seja, a conversão do peróxido de hidrogênio, a água e oxigênio. Embora seja um anaeróbio obrigatório, *C. acetobutylicum*, como descrito por Kawasaki *et al.* (2005), contém algumas enzimas, tal como a superóxido dismutase, que lhe permitem sobreviver em ambientes com baixas concentrações de oxigênio. Estas enzimas são reguladas na presença de oxigênio e contribuem para a sobrevivência da célula por curto prazo em ambientes micro-óxicos.

C. acetobutylicum é capaz de usar diferentes carboidratos fermentáveis como fonte de carbono e energia. O seqüenciamento de seu genoma mostrou que a bactéria possui genes que codificam proteínas que atuam na degradação da pectina, amido e outros polissacarídeos (NOLLING *et al.*, 2001).

É caracterizada por um metabolismo rápido e com capacidade de formar esporos em resposta a condições desfavoráveis do meio ambiente, ou quando submetidas a um aumento de temperatura ou à falta de nutrientes (GIRBAL *et al.*, 1995a, 1995b).

O complexo metabolismo da *C. acetobutylicum* tem sido estudado em detalhes nos últimos anos e freqüentemente mostra um padrão de fermentação bifásico. Após produzir ácido acético, ácido butírico e hidrogênio, durante a fase de crescimento exponencial, inicia-se a formação de solventes (etanol, acetona e butanol), a qual ocorre bem próxima à fase estacionária e tem mostrado estar associado ao efeito do pH ácido. Em culturas em batelada o início e a manutenção da produção de solventes estão associados ao baixo pH extracelular e intracelular e à alta concentração de ácido butírico não dissociado (ou protonada) (TERRACCIANO e KASHKET, 1986).

3.6.2 Estrutura celular e Desenvolvimento

Diferentes subprodutos são formados em diferentes fases durante o crescimento de *C. acetobutylicum*. Durante a fase exponencial de crescimento, os produtos primários são o ácido acético e o butírico. Estudos anteriores mostram que esta cepa de *Clostridium* não produz

ácido propiônico através do metabolismo fermentativo (REUNGSANG *et al.*, 2004). As diferentes fases de crescimento podem ser observadas na Figura 2.

Segundo Chen *et al.* (2001), ao longo desta fase, acontece também a fixação de nitrogênio. Algum tempo após a célula entrar em fase estacionária, a produção de butanol e acetona tem um pico. Essa separação temporal do nitrogênio fixado e da produção de solvente é vantajosa, pois evita que ocorra competição por redutores entre os dois processos.

Durre e Hollergschwandner (2004), explicam que o maior estágio do desenvolvimento celular é caracterizado pela formação de endósporos. Após algumas condições ambientais, a célula vegetativa produz um septo subterminal, um evento que pode ser visto com microscopia eletrônica. Esse septo eventualmente se torna outra célula, chamada de pré-esporo, englobada pela célula original, chamada célula-mãe. Uma lise desta célula libera o esporo maduro que é resistente à altas temperaturas, químicos e muitos tipos de radiação, permitindo com que sobreviva por vários anos. Em condições anóxicas, por exemplo, a célula irá germinar novamente e reiniciar o ciclo vegetativo. A formação de esporos inicia quando a célula é exposta a condições desfavoráveis. Condições aeróbias, formação de produtos orgânicos e dissipação do gradiente próton através da membrana citoplasmática, leva à esporulação. Isto acontece em contraste ao organismo modelo da formação do endósporo, *Bacillus subtilis*, que forma endósporos primeiramente devido a limitação de nutrientes.



Fonte: Modificado de Olaf Wolkenhauer's lab, Rostock

Figura 2: Fases de crescimento de *Clostridium acetobutylicum*

A maioria das espécies deste gênero não forma colônias na presença de 1% de oxigênio, entretanto, elas podem aceitar condições quase anóxicas quando crescem em meios líquidos (KARNHOLZ *et al.*, 2002; KAWASAKI *et al.*, 2004).

3.6.3 Aplicações na Biotecnologia

Conforme Nuyts *et al.* (2002), *C. acetobutylicum* tem sido foco de pesquisas na área da terapia gênica, como um agente transportador de genes que quando expressos em tumores, produzem proteínas capazes de matá-los. Sugere-se que o fato de ser obrigatoriamente anaeróbio permitiria a injeção intravenosa de esporos de *Clostridium* que resultariam em germinação somente em regiões hipóxicas de tumores sólidos. A manipulação genética de *C. acetobutylicum* para a produção de proteínas que podem ativar fatores de necrose tumoral, especificamente no seu interior, fornece um mecanismo aplicável à terapia gênica. Cabe salientar que estes estudos têm sido experimentalmente realizados ainda usando-se ratos, como modelo animal.

Algumas das mais novas pesquisas têm investigado métodos alternativos para produzir solventes, nos quais *Clostridium acetobutylicum* tem sido empregado para esta produção. O butanol, principalmente, tem recebido uma atenção especial como um combustível alternativo para automóveis, sendo este um dos produtos da fermentação de *C. acetobutylicum*. Portanto, estudos têm sido direcionados para novos métodos utilizando substratos de baixo custo. Em um estudo de Qureshi *et al.* (2006), a fermentação do butanol via um novo processo foi proposta, substituindo assim o processo anterior, chamado ABE. Foram utilizadas fibras do milho (especificamente xilema), como substrato para *C. acetobutylicum* produzir butanol de uma forma viável economicamente. A maior vantagem dessa técnica é que a fibra do milho é um subproduto em muitos dos processos agroindustriais e fornece assim uma fonte abundante de substrato.

Outra fonte intensa de estudo para *Clostridium acetobutylicum* é a produção de gás hidrogênio como uma fonte alternativa de geração de energia. A maioria da produção de gás hidrogênio é gerada através do uso de fontes renováveis e a produção pela via fermentativa seria extremamente valiosa se os rendimentos pudessem ser aumentados. Então, métodos diferentes de fermentação que podem ser utilizados para melhorar esses rendimentos estão sendo explorados nas pesquisas mais recentes.

A recente crise dos combustíveis fósseis impulsionou pesquisas sobre a aplicação de *C. acetobutylicum* para a produção de solventes e hidrogênio. Chin *et al.* (2003) estudaram um processo em batelada alimentada usando *Clostridium acetobutylicum* e verificaram a influência do pH e da temperatura, assim como o efeito inibitório dos principais metabólitos, acetato e butirato. Zhang *et al.* (2006) também utilizaram uma cultura pura de *C. acetobutylicum* ATCC 824 e estudou o efeito da concentração glicose e velocidade de fluxo de alimentação em um reator de fluxo insaturado.

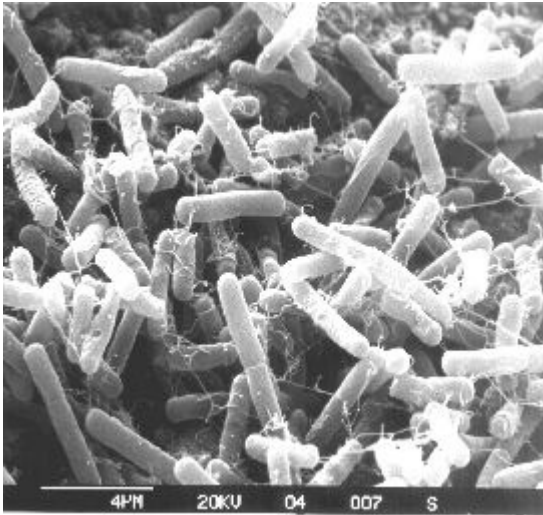


Figura 3: *Clostridium acetobutylicum* observado por microscopia de varredura eletrônica. Fonte: SIEMERINK (2008)

4 MATERIAL E MÉTODOS

Nesta seção serão apresentadas as descrições dos procedimentos laboratoriais, métodos e equipamentos utilizados durante a fase experimental do trabalho.

4.1 Material

4.1.1 Microrganismo

Uma cepa de *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824, bactéria anaeróbia, proveniente da Coleção de Cultura Tropical “André Tosello” - Campinas/SP foi o microrganismo utilizado nesse estudo. Após crescimento, a cepa foi mantida em meio CGM (*Clostridium Growth Medium*) contendo 0,7% (m/v) de glicose, sob refrigeração a 4°C.

4.1.2 Meios de Cultura

Para reativação da cepa, a bactéria *C. acetobutylicum* foi cultivada em meio YPD (Yeast Extract/Peptone/Dextrose) (pH 6.5) com a composição indicada na Tabela 2.

Tabela 2: Composição do meio de cultivo YPD

Componentes	Concentração (g/L)
Glicose	20
Peptona	20
Extrato de levedura	10

O meio utilizado na pré-cultura e na fermentação, CGM, modificado de Chin *et al.*, 2003, foi preparado usando a manipueira como substrato carbônico e os componentes do meio mencionados na Tabela 3.

Tabela 3: Composição do meio de cultivo CGM modificado

Componentes	Concentração (g/L)
NH ₄ Cl	1,75
K ₂ HPO ₄	2,4
KH ₂ PO ₄	1,8
Na ₂ HPO ₄	0,6
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,1

Fonte: Modificado de Chin *et al.* (2003)

Tabela 4: Composição do meio padrão PCA para contagem (Plate Count Agar)

Componentes	Concentração (g/L)
Triptona	5
Extrato de Levedura	2,5
Glicose	1
Ágar	15

Com objetivo de evitar uma deficiência de elementos traços requeridos pelo microrganismo, 0,1 % (v/v) de uma solução de oligoelementos, dissolvidos em HCl 5M, foi adicionada a cada meio nutritivo. A solução de oligoelementos é composta dos seguintes compostos, mostrados na Tabela 5.

Tabela 5: Composição da solução de oligoelementos

Componentes	Concentração (g/L)
FeSO ₄ . 7H ₂ O	10
CaCl ₂ . 2H ₂ O	2
ZnSO ₄ . 5H ₂ O	2
MnSO ₄ . 4H ₂ O	0,5
CuSO ₄ . 5H ₂ O	1
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ . 4H ₂ O	0,1
Na ₂ B ₄ O ₇ . 10H ₂ O	0,02

Fonte: Fonseca (2003)

4.2 Procedimentos Experimentais

Os procedimentos experimentais foram desenvolvidos no Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular de Microrganismos do Departamento de Bioquímica da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), as análises de matéria orgânica foram realizadas no Laboratório de Tratamento de Resíduos Agroindustriais (UFSC) e as análises microscópicas foram feitas no Laboratório de Ecologia do Fitoplâncton e Microrganismos Marinhos (FURG – Rio Grande/RS).

4.2.1 Preparo e Caracterização do Resíduo Líquido do Processamento da Mandioca

Para a preparação do resíduo líquido utilizado no experimento, foi obtida mandioca em mercado local e preparada, em escala laboratorial segundo o fluxograma apresentado na Figura 4. As amostras foram mantidas em congelador (Electrolux R280) à -20°C , até uso. A preparação e caracterização do resíduo, como descrita a seguir, eram realizadas quando necessário.

Durante o processo de obtenção do resíduo, as raízes de mandioca foram lavadas, descascadas e raladas para a obtenção de uma massa. A uma parte de mandioca fresca ralada, adicionou-se 2 partes de água e procedeu-se o processamento em um liquidificador. A pasta obtida foi filtrada através de um pano de algodão (tipo saco de farinha) e espremida, para separação do bagaço da parte líquida, contendo amido. A parte líquida coletada foi reservada para decantar. O amido decantado foi descartado e o líquido sobrenadante (manipueira) foi utilizado, como substrato nas fermentações. Após cada preparação a manipueira foi imediatamente congelada, até o momento do uso e três lotes foram utilizados durante o trabalho.

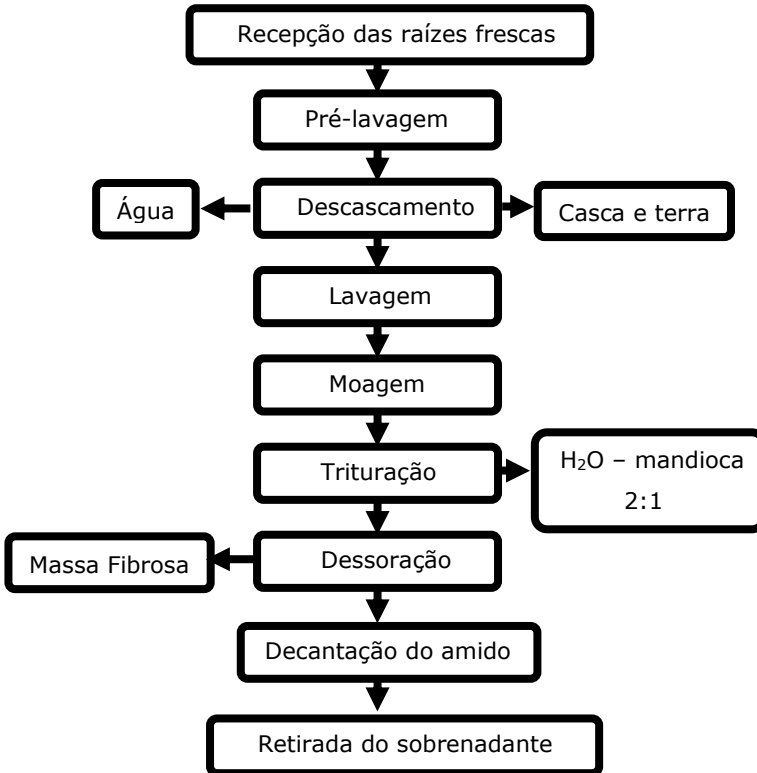


Figura 4: Fluxograma de preparação da maniveira

Os três lotes de maniveira foram caracterizados quanto aos seguintes parâmetros: pH, demanda química de oxigênio (DQO) e acidez total titulável (ATT), segundo metodologia padrão (APHA, 1998). As análises de açúcares redutores totais (ART) foram realizadas pelo método DNS (MILLER, 1959) e açúcares totais (AT) realizada pelo método proposto por Oliveira *et al.* (2007). As metodologias utilizadas são apresentadas no item 4.3, Métodos Analíticos, descritas nessa mesma seção.

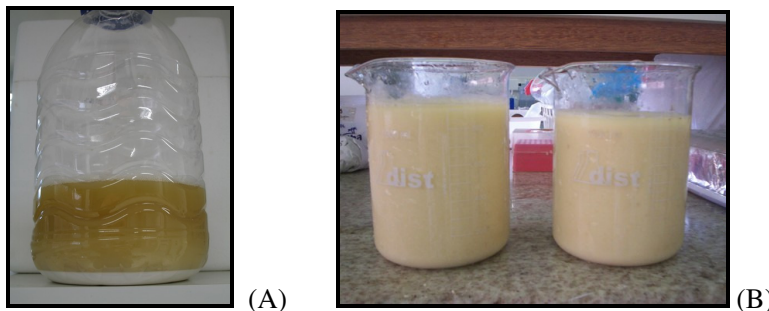


Figura 5: Procedimento de preparação em laboratório do resíduo líquido da mandioca: (A) sedimentação do amido e (B) retirada da sobrenadante após decantação do amido.

4.2.2 Reativação e avaliação da viabilidade da cepa de *Clostridium acetobutylicum*

A bactéria objeto de estudo, foi estocada a 4°C e necessitou de uma reativação antes de utilizá-la. O procedimento de reativação realizou-se através do cultivo do microrganismo em placas de Petri contendo meio PCA (Plate Count Agar) e incubada em jarra aneróbia (JA 0403, Permutation) na presença de um gerador de anaerobiose (AnaeroGen AN0025A, Oxoid), por 48h, a 36°C. O manuseio do microrganismo se deu em câmara de fluxo laminar ValiClean - Modelo CFLV-01 (Série 039).

4.2.3 Curva de Crescimento da bactéria *Clostridium acetobutylicum*

A avaliação do crescimento microbiano foi feita através do método de diluição, contagem de unidades formadoras de colônia (UFC) e a densidade óptica (D.O) de suspensões diluídas de bactéria. Para tal, realizou-se o seguinte procedimento, em frascos Erlenmeyer de 125 mL, contendo 50 mL de meio YPD (2% de glicose), foram inoculados 100 microlitros de uma suspensão da bactéria. A cultura foi incubada por 24 horas, em jarra anaeróbica, a 37°C. Após este período uma alíquota de 100 microlitros foi retirada e transferida para tubo contendo 5 mL de solução salina esterilizada 9,9% (p/v). Após homogeneização, retirou-se deste tubo outros 100µL de suspensão e transferiu-se para um novo tubo contendo 5 mL de solução salina. Repetiu-se este procedimento por cinco vezes e obteve uma série de diluições da suspensão bacteriana. De cada uma das suspensões diluídas foram tomados 10µL de amostra e transferidos para placas de Petri, contendo meio Ágar YPD (2% de

glicose). Após 24 horas de incubação em jarra aneróbica a 36°C, o número de unidades formadoras de colônias foi contado. A leitura da absorbância (densidade óptica) das suspensões foi realizada em espectrofotômetro a 600nm (UV8500II Série Double-beam com PC interno, TECHCOMP), e permitiu relacionar absorbância das suspensões em diferentes diluições, ao número de unidades formadoras de colônias.

4.2.4 Preparo do Inóculo e Meio de cultura para fermentação

Após a confirmação de ativação da cepa, como preparação para a fermentação, o inóculo foi pré-cultivado e enriquecido novamente, porém em condições específicas para a produção de hidrogênio com a finalidade de adaptar a cultura às novas condições de cultivo, utilizando o meio CGM, específico para bactérias do gênero *Clostridium*. O microrganismo foi ativado para a fermentação através da transferência de 1mL da cultura estoque em 10 mL de meio CGM, seguido de uma incubação anaeróbia promovida a 36°C.

4.2.5 Ensaios para produção de Hidrogênio

Os experimentos foram realizados em recipientes de 500mL (volume útil), hermeticamente fechados, contendo 250 mL ou 300 mL de meio de cultura, constituído de manípueira em concentrações variáveis, expressas em DQO, enriquecida com macro e micronutrientes. Os biorreatores contendo os meios foram esterilizados a 121°C por 30 min (Figura 6). Como condições iniciais, o pH do meio foi definido como 7 e, em alguns experimentos ajustado com NaOH 1 M, para obtenção deste valor. O pH inicial do cultivo foi definido como 7 com base no estudo de Liu e Shen (2004), que estudaram valores de pH na faixa de 4 a 9 para resíduos amiláceos e obtiveram os melhores valores nesse pH.

Como inóculo, foi utilizada uma cultura de 24 horas, realizada nas seguintes condições: meio de cultura CGM, pH 6.5, temperatura de 36°C, usando 7,5 g/L de glicose, como substrato. Foi utilizado um volume de 20 ou 4% (v/v) de uma cultura de $Abs_{600nm}=0,10$.

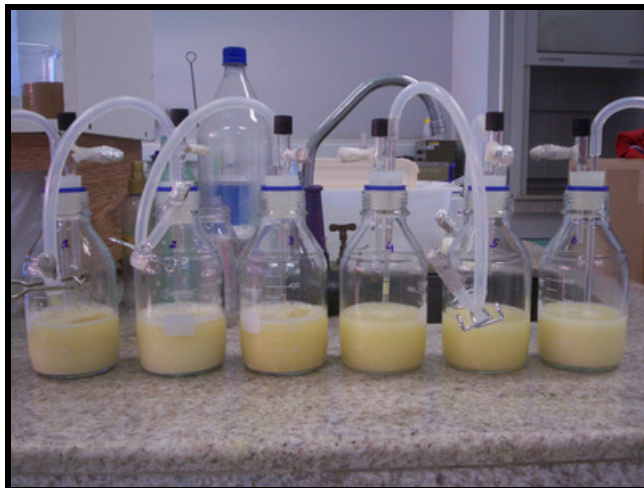


Figura 6: Biorreatores com manípulo para os ensaios de produção de hidrogênio

Os biorreatores foram então conectados a um sistema de medição de gás (Figura 7). Para remover o oxigênio das garrafas, gás nitrogênio, previamente esterilizado através de um filtro 0.2 μm (PALL CORPORATION ACRO @50), foi injetado a uma pressão menor que 2kgf/cm^2 , por 20 min, a fim de manter o ambiente anaeróbico. Procedeu-se a seguir a incubação a $36^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ em banho termostaticado (Dubnoff, modelo 304), com agitação de 100 rpm. O tempo de fermentação foi definido pelo acompanhamento do pH da cultura e da produção de gás hidrogênio, tendo sido cessada quando o pH tornava-se inferior a 5 ou, com exceção de alguns ensaios, onde foi realizado um reajuste do pH com NaOH, para valor 7,0.

4.2.5.1 Efeito da concentração de substrato sobre a produção de hidrogênio

Para avaliar o efeito da concentração de substrato sobre a produção de hidrogênio, a concentração da manípulo foi ajustada por diluição com água, para as seguintes concentrações finais: 30; 15; 10; 7,5 e 5 g/L, expressas em DQO (ou teor de matéria orgânica). Nos primeiros experimentos (I e II), a concentração de inóculo foi de 20% (v/v) de *Clostridium acetobutylicum*, obtido a partir de uma cultura de 24 horas, realizada em meio CGM, pH 6,5, temperatura 36°C , usando glicose 7.5 g/L, como substrato. Nos demais experimentos a

concentração do inóculo foi reduzida para 4% (v/v). Um resumo das condições experimentais está apresentado na Tabela 6, ressaltando que os Ensaio I e II foram realizados com a manipueira do Lote 1. No Ensaio IV, utilizou-se manipueira do Lote 2 e os demais Ensaio foram preparados com a manipueira do Lote 3.

Tabela 6: Condições experimentais dos ensaios de produção de hidrogênio

Ensaio	pH inicial	Concentração de DQO na Manipueira (g/L)	Volume de inóculo (mL)	Volume do meio (mL)	Volume de manipueira adicionado (mL)	H ₂ O destilada (mL)
I	7	30	50	250	188	12
II	7	15	50	250	93,8	106,2
III	7	10	12	300	88,1	199,9
IV	7	7,5	12	300	220,4	67,6
V	7	5	12	300	44	244

Foram realizados cinco ensaios em triplicata (com exceções dos ensaios de 30 e 7,5 gDQO/L, realizados em duplicata). Em tempos definidos para cada experimento, foram retirados 100 mL de volume do reator, nas quais foram quantificados: DQO, pH, acidez e ácidos orgânicos. O volume de hidrogênio produzido foi medido utilizando-se um sistema de frasco invertido, o qual está esquematizado na Figura 7 e detalhado no próximo item.

Realizou-se também um acompanhamento na morfologia das células de *Clostridium acetobutylicum* com objetivo de relacioná-las à mudança morfológica da bactéria em cada fase de crescimento celular. Uma alíquota era retirada e fixada com lugol 4% para posterior observação em microscópio.

4.2.5.2 Determinação do volume de hidrogênio produzido no reator

Para a determinação do volume de hidrogênio produzido no reator foi utilizado o sistema de frasco invertido, o qual pode ser observado na Figura 7. O hidrogênio produzido no reator entra no sistema pelo ponto 1, passando por frasco de segurança, ponto 2, que tem o objetivo de proteger o reator de possíveis vazamentos de hidróxido de sódio que está presente no frasco invertido, ponto 3. Após passar pelo frasco de segurança, o biogás é borbulhado no frasco, que

contém uma solução de NaOH 5% (p/v), fazendo com que o CO_2 que está presente no biogás reaja com a soda cáustica. Desta maneira o CO_2 é eliminado do biogás restando apenas o H_2 , que fica retido na parte superior do frasco invertido. À medida que o hidrogênio vai sendo acumulado no sistema, a soda cáustica vai sendo deslocada para o frasco de coleta, ponto 4. Com auxílio de uma proveta, em determinados períodos de tempo este volume foi quantificado, representando a produção de hidrogênio. A medida do volume de hidrogênio está relacionada com a diferença do volume de soda no frasco coletor no início e no final do período de operação.

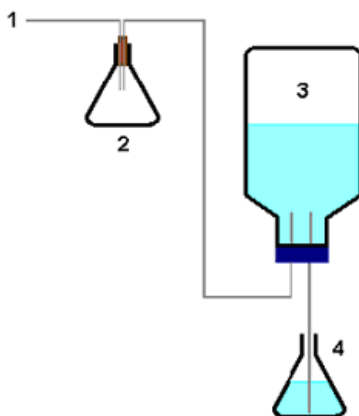


Figura 7: Sistema de medição de gás:

- 1 – Entrada de biogás; 2 – Frasco de segurança; 3 – Frasco invertido e
4 – Frasco coletor de NaOH.

4.2.6 Análise microscópica de *Clostridium acetobutylicum*

As características morfológicas do inóculo e da carga microbiana presente nos ensaios de produção de hidrogênio, foram observadas através de microscopia óptica de contraste de fase, utilizando microscópio invertido Zeiss Axiovert, em magnificação final de 100, 400 e 630x e as imagens digitais foram capturadas utilizando-se uma câmera SPOT Insight QE.

4.3 Métodos Analíticos

4.3.1 Determinação da Demanda Química de Oxigênio (DQO)

A DQO do efluente foi medida pelo Método Padrão Colorimétrico de Refluxo Fechado, segundo procedimento do Standard methods for the examination of water and wastewater (APHA, 1998). A DQO é quantidade de O₂ necessária para a oxidação da matéria orgânica, através de um agente químico e expressa a quantidade de matéria orgânica presente na amostra analisada. Para o preparo da curva de calibração, foi utilizado padrões de biftalato de potássio com DQO equivalentes entre as concentrações de 0 a 500 mg de O₂. L⁻¹. Para os testes colocou-se 2,5 mL da amostra num tubo, adicionou-se 1,5 mL da solução digestora e em seguida 3,5 mL do ácido sulfúrico concentrado com Ag₂SO₄ cuidadosamente. As amostras foram diluídas adequadamente e digeridas em bloco digestor a 150 °C por 2 horas. Resfriavam-se os tubos e a leitura foi feita diretamente em espectrofotômetro a 600 nm. Para a curva padrão (curva de calibração), primeiramente adiciona-se a solução digestora, em seguida adiciona-se cuidadosamente o ácido sulfúrico reagente e por último as proporções de água destilada e biftalato.

4.3.2 Determinação do índice de acidez total (ATT)

Para a determinação do índice de acidez total transferiu-se 10mL da amostra para um frasco erlenmeyer, adicionou-se 2 gotas de indicador fenolftaleína (1%) e agitou-se. Titulou-se com solução de hidróxido de sódio 0,1N até aparecimento de coloração rósea (MORETTO e FETT, 1998). O valor da acidez total titulável (ATT) foi obtida através da Equação 4.1.

$$ATT(\%v/v) = \frac{V \times C_{NaOH} \times f_{NaOH} \times 100}{A} \quad (\text{Equação 4.1})$$

onde:

V: volume da solução de NaOH gastos na titulação (mL);

C_{NaOH} : concentração de NaOH (M);

A: quantidade de amostra (g);

f_{NaOH} : fator de correção de NaOH

4.3.3 Quantificação dos açúcares redutores (ART)

A dosagem de açúcares presentes nas amostras foi realizada pelo método do ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) (MILLER, 1959), o qual baseia-se redução do ácido 3,5 dinitro-salicílico, pelo açúcar, a ácido 3-amino-5-nitrosalicílico, ao mesmo tempo em que o grupo aldeído do açúcar é oxidado a grupo carboxílico, com o desenvolvimento de uma coloração alaranjada, a qual pode ser lida em espectrofotômetro a 540nm. Para a determinação da concentração de açúcares foi utilizada uma curva padrão de glicose nas concentrações de 0 a 1g/L. A 0,5 mL de solução padrão de glicose ou de amostra diluída apropriadamente, de modo a conter concentração de açúcares, na faixa de concentração dos padrões, foi adicionado 0,5 mL de DNS. A mistura foi aquecida por 5 minutos, resfriada em água corrente e adicionou-se 5 mL de água destilada. Após este procedimento, realizou-se a leitura da absorbância, em espectrofotômetro a 540nm contra um branco de água destilada, submetido ao mesmo tratamento das amostras. que passou pela mesma reação.

4.3.4 Quantificação dos açúcares totais (AT)

Para tal quantificação foi utilizado o método proposto por Oliveira *et al.* (2007), no qual se faz uma hidrólise ácida dos açúcares com HCl 10%, na proporção de 1:10 (ácido:solução do resíduo). Leva-se à ebulição por 2,5 horas e resfria-se à temperatura ambiente. Logo após a amostra é neutralizada com NaOH 1M. A seguir, o meio é decantado e centrifugado. Procedeu-se a seguir, a análise de açúcares redutores nas amostras tratadas pelo método do DNS (descrito anteriormente).

4.3.5 Determinação de ácidos orgânicos voláteis (AOV)

As determinações dos ácidos orgânicos, acético, láctico e propiônico foram feitas através de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) de acordo com metodologia descrita por Zotou *et al.* (2004). As amostras foram filtradas em papel filtro qualitativo, procedendo-se a adição de 20 mL de solução de ácido sulfúrico 4 mM a 10 mL da amostra. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 6000 rpm por 15 min., sendo o pH do sobrenadante ajustado para 8,0. Após esta etapa procedeu-se uma filtração à vácuo do sobrenadante em membrana de acetato-celulose 0,45 µm. O filtrado obtido foi acondicionado a um cartucho de extração em estado sólido (SPE quaternary amino N+, de 500mg/6mL – marca Applied Separations), previamente condicionado com metanol (10 mL), seguido de lavagem

com água ultra pura (10mL). Ao cartucho acondicionado adicionou-se 1 mL da amostra, lavando-se a coluna com a amostra, primeiramente com 10 mL de água ultra pura, seguida de eluição com 5mL de HCl 1N. Vinte microlitros (20 µL) desta amostra foi injetada no cromatógrafo. O equipamento utilizado foi um cromatógrafo de alta eficiência da marca Gilson modelo 712 com coluna C₁₈ de fase reversa marca Hichrom (150 x 4.5 mm), com fluxo de fase móvel isocrático e detecção em UV a 230 nm com detector marca Gilson modelo 118. A fase móvel foi constituída por solução de KH₂PO₄ 0,02 mol/L e 2% de metanol com pH 2,8 ajustado com ácido fosfórico. A vazão foi de 1mL/min. A identificação dos ácidos foi feita através dos tempos de detenção e espectros de absorção. A quantificação foi realizada por curva de padronização externa com 6 pontos para cada ácido orgânico.

4.4 Modelagem Cinética

4.4.1 Análise cinética do crescimento celular

Para a quantificação celular foi adotada leitura de absorbância. Para tal, 3,0 mL de amostra foram retiradas de maneira asséptica, colocadas em tubos Falcon estéreis e centrifugadas a 10.000 rpm e 20°C durante 5 minutos. O sobrenadante foi descartado, o pellet ressuspenso em água destilada e, então, submetido à leitura de absorbância a 600 nm, em espectrofotômetro.

A análise cinética do crescimento celular foi realizada através da curva de crescimento do microrganismo, a partir do $\ln(Abs/Abs_0)$ pelo tempo, onde a velocidade específica de crescimento da fase exponencial é dada pelo coeficiente angular da parte linear da curva. O ajuste dos dados experimentais foi realizado estatisticamente através erro médio quadrático (MSE), coeficiente de correlação (R^2), fator bias e fator de exatidão. Para tal, foi utilizado um *software* desenvolvido no Laboratório de Propriedades Físicas dos Alimentos (PROFI – EQA-UFSC).

Quanto menor o valor do MSE, melhor é o ajuste do modelo aos dados experimentais, conforme mostra a Equação 4.2.

$$MSE = \frac{RSS}{n} = \frac{\sum (\text{Valor}_{\text{observado}} - \text{Valor}_{\text{predito}})^2}{n} \quad (\text{Equação 4.2})$$

onde: RSS é a soma dos quadrados residuais e n é o número de graus de liberdade (número de pontos experimentais – número de parâmetros do modelo).

O fator bias representa a diferença média entre os valores observados e preditos. Pode ser calculado através da equação (4.3):

$$fator\ bias = 10^{\left(\frac{\sum \log(\text{Valor}_{\text{observado}} / \text{Valor}_{\text{predito}})}{n} \right)} \quad (\text{Equação 4.3})$$

O fator bias procura dar o mesmo peso na média dos valores que sobreestimam e subestimam a média, ou seja, é um desvio relativo médio. Se bias igual 1, a resposta observada é igual à resposta predita. No entanto, quando bias maior 1, significa que o valor predito é maior que o observado. Quando bias menor 1 significa que o valor predito é menor que o observado (ROOS, 1996).

O fator de exatidão (Equação 4.4) é uma medida da diferença média absoluta entre os valores preditos e observados.

$$fator\ de\ exatidão = 10^{\left(\sum \frac{|\log(\text{Valor}_{\text{observado}} / \text{Valor}_{\text{predito}})|}{n} \right)} \quad (\text{Equação 4.4})$$

Conforme aumenta o valor deste fator, o modelo é menos exato na média, ou seja, no cálculo do fator bias como se obtém uma média dos valores, os com sinais opostos, tendem a se cancelar; já no cálculo do fator de exatidão, por se tratar de valores absolutos será sempre maior que 1. Quanto maior seu valor, menor a exatidão da estimativa da média.

Estabelecida a fase exponencial de crescimento, e a partir do cálculo da velocidade específica de crescimento (μ), foi possível calcular o tempo de geração da cultura (tg), a partir da seguinte equação:

$$tg = \frac{\ln 2}{\mu} \quad (\text{Equação 4.5})$$

4.4.2 Modelagem cinética da produção de hidrogênio

O modelo utilizado para o ajuste das curvas de evolução do hidrogênio para cada cultivo foi o Modelo de Gompertz Modificado. Os parâmetros, velocidade máxima de produção de gás ($\mu_{\text{máxH}}$), duração da fase *lag* (λ) e potencial de produção de hidrogênio (A), que são

mostrados na Figura 8, foram calculados para o modelo que melhor se ajustou às curvas de crescimento de *C. acetobutylicum*.

O potencial de produção de hidrogênio (mL) é o valor máximo possível de gás a ser atingido em determinado tempo, ou seja, o pico de gás do ensaio. A duração da fase *lag* (h), indica o tempo que foi necessário para o início da produção de hidrogênio e a velocidade máxima de produção de gás (mL/h) corresponde à inclinação da curva (Figura 8), indicando a velocidade máxima de gás produzido em sua fase exponencial.

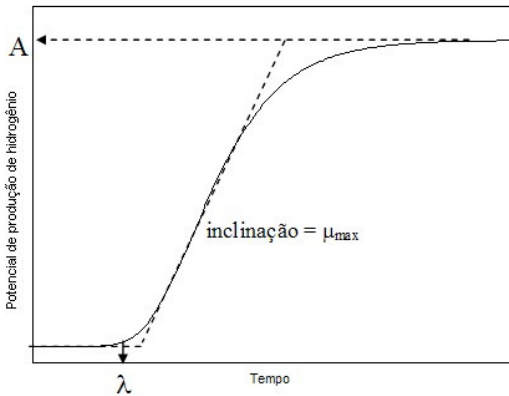


Figura 8: Curva típica de crescimento microbiano em função do tempo, apresentando os parâmetros biológicos de crescimento.

O ajuste dos dados experimentais pelo modelo de Gompertz modificado é expresso pela equação 4.6 (ERKMEN, 2001).

$$H = A \exp \left\{ - \exp \left[\frac{\mu_{\text{máxH}} \cdot e}{A} (\lambda - t) + 1 \right] \right\} \quad (\text{Equação 4.6})$$

onde, “*t*” é o tempo de incubação (h), “*e*” igual a 2,7182, sendo a exponencial de 1 e *H* é o valor máximo de gás produzido no experimento, dado em mL.

Os parâmetros para cada batelada foram obtidos através do software estatístico *OriginPro* versão 7.5. A produtividade volumétrica de produção de hidrogênio, μ_p (mL/h.L) foi calculada pela divisão de $\mu_{máxH}$ pelo volume de trabalho do biorreator. Já o rendimento de hidrogênio, R, foi definido como o número de moles de hidrogênio produzido por mol de glicose, em relação à máxima quantidade teórica que poderia ser obtida tendo o acetato como produto primário.

4.5 Cálculos Estequiométricos do Rendimento molar de H₂

A quantidade de açúcares totais para cada ensaio utilizando manípueira diluída, foi analisada segundo o método proposto por Oliveira *et al.* (2007). Primeiramente a quantidade de açúcar total (em g/L) é calculada para cada biorreator, levando em consideração o volume de trabalho do fermentador. Utilizou-se 250 mL para os Ensaios I e II, e 300 mL para os demais. Esse valor (em g de glicose) foi então comparado a 1 mol desse açúcar, sabendo que esse contém 180g. Desta forma, obtem-se a quantidade de glicose inicialmente existente no biorreator. Com o volume de gás total produzido no ensaio, e através da Equação de Van der Waals para os gases ideais ($P.V = n.R.T$), obtemos o número de moles de hidrogênio produzido com o volume observado. A temperatura foi 36°C (309K) e a constante universal dos gases, R, vale 0,082 atm.L/mol. Assim, a razão molar de H₂ por mol de glicose determina o rendimento da fermentação.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Caracterização Físico-Química da manipueira

Uma vez que as características químicas da manipueira podem variar para cada novo lote de matéria prima (mandioca) processada, a caracterização química de cada lote da água residual do processamento da mandioca foi realizada, como descrita no item 4.2.1 da seção de Material e Métodos. Os valores médios das análises realizadas para as três produções laboratoriais de manipueira são apresentados na Tabela 7.

Tabela 7: Caracterização química da manipueira

Análises	Resultados		
	*C ₁	C ₂	C ₃
pH	7,0	6,0	5,15
Acidez Total (mL NaOH/100mL)	1,6	0,61	1,85
Demanda Química de Oxigênio (DQO) (g/L)	39,85	10,21	34,04
Açúcares Totais (g/L)	32,12	8,16	27,57
Açúcares Redutores Totais (g/L)	15,37	3,55	13,12
Relação AT/DQO	0,81	0,80	0,81
Relação ART/DQO	0,39	0,35	0,39

* C₁: Lote 1 (Mar/2008); C₂: Lote 2 (Ago/2008); C₃: Lote 3 (Nov/2008)

Os dados da Tabela 7 mostram que cerca de 80% da matéria orgânica, expressa como DQO presente nas preparações, é composta de açúcares totais e, entre 35 e 39%, de açúcares redutores. No entanto, o pH de cada preparação de manipueira variou de 7,0 a 5,2, indicando a necessidade do ajuste de pH para sua utilização como substrato nos bioprocessos. Quanto à acidez, observa-se pelos resultados que houve variação entre as diferentes matérias primas, mostrando que há influência do conteúdo dos ácidos orgânicos nas amostras analisadas. Considerando que a manipueira é rica em carboidratos, a produção dos ácidos pode ocorrer pelo metabolismo destes devido à presença da carga microbiana na raiz. A variação apresentada é função provavelmente das diferentes raízes usadas para a obtenção do resíduo líquido, adquiridas em diferentes épocas.

A utilização de diferentes lotes de manipueira, ainda que preparada em condições laboratoriais, tem paralelo com o que se esperaria caso se obtivesse um resíduo industrial, para realização destes estudos. Isto porque, o processo de industrialização da mandioca é realizado em vários estágios que dependem do produto final desejado. Deste modo, resíduos com características diferentes são gerados para cada processo. Del Bianchi (1998) explica que as diferenças entre os

resíduos dependem do tempo de colheita, da idade das raízes, do tipo de equipamento usado na produção da farinha/fécula e a variedade da mandioca.

Além disso, a produção laboratorial da manipueira e sua caracterização permitiram que se ajustasse a concentração de matéria orgânica aplicada, nos diferentes ensaios, bem como o pH inicial. Partindo-se dos dados de caracterização prévia da manipueira, procederam-se diluições com o objetivo de avaliar a influência da concentração de substrato na produção de hidrogênio, sendo esta a fonte essencial de carbono utilizada para os ensaios em batelada.

5.2 Crescimento de *Clostridium acetobutylicum*

5.2.1 Determinação da correlação entre o crescimento de *Clostridium acetobutylicum* e a absorvância da suspensão bacteriana

Foi realizado experimento, para avaliar a correlação entre o número de células bacterianas viáveis, expresso como número de unidades formadoras de colônias, para uma cultura de *C. acetobutylicum*. O experimento correlacionando o número de unidades formadoras de colônia (UFC) por mililitro e a absorvância do caldo de cultivo, resultou em uma relação linear, como pode ser observado na Figura 9, correspondendo a um coeficiente de correlação de 0,9911. O número de indivíduos por mililitro na solução pode ser considerado proporcional à absorvância a 600nm (A_{600}) e pode ser calculado de acordo com a seguinte relação: Número de indivíduos/mL = $37,176(A_{600}) - 2,8187$

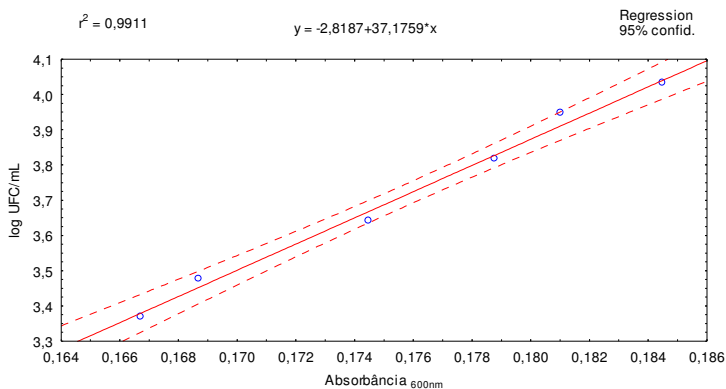


Figura 9: Correlação entre Unidades Formadoras de Colônia (UFC) e Absorvância durante a curva de crescimento de *C. acetobutylicum* em meio CGM com 0,7% de glicose

Assim, as medidas de crescimento realizadas durante os ensaios foram feitas através da leitura da densidade óptica da suspensão celular, visto que essa apresenta uma boa relação de linearidade com o número de células viáveis, necessárias para a produção de biohidrogênio.

5.2.2 Efeito do meio de cultivo sobre crescimento de *C. acetobutylicum*

Visando estabelecer as melhores condições de cultivo para *C. acetobutylicum*, que propiciassem seu crescimento e a produção de hidrogênio, a partir de substrato amiláceo, realizou-se estudos avaliando o crescimento da bactéria em glicose, por ser um substrato facilmente assimilado, e posteriormente em amido de mandioca comercial. Foram avaliados dois meios de cultivo: YPD e CGM + amido de mandioca. Enquanto YPD (extrato de levedura/peptona/glicose) é um meio complexo e, portanto rico em nutrientes, o meio CGM é composto apenas de sais minerais. A Figura 10 apresenta as curvas de crescimento para a cultura pura de *C. acetobutylicum* nestes meios de cultivo, onde foram utilizados 10% de inóculo no meio com CGM e 1% .

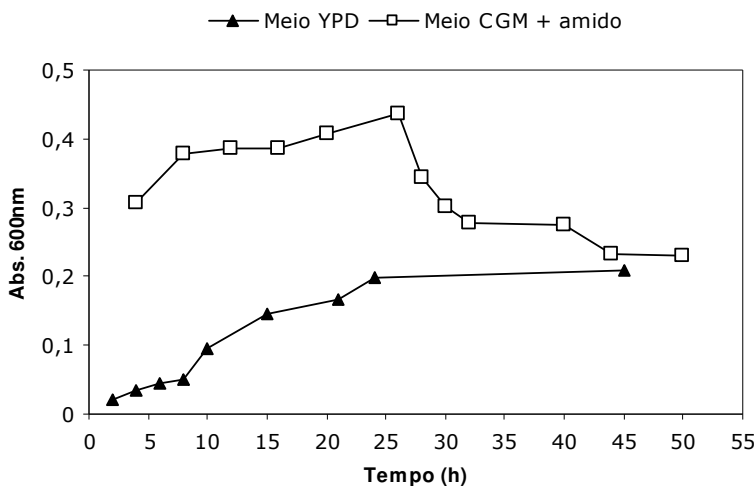


Figura 10: Curva de crescimento de *C. acetobutylicum* expressa em medida de absorbância em função do tempo, em diferentes meios de cultivo: YPD e CGM + amido.

No meio YPD observa-se uma cinética típica de crescimento (Abs) para cultivo em batelada. A cultura não apresentou fase *lag* e uma fase estacionária se estabeleceu após 25 horas de cultivo. Na Tabela 8 são apresentadas as análises estatísticas dos resultados e os parâmetros cinéticos de crescimento. Em meio YPD obteve-se que o tempo de geração (tg) calculado foi de 24,75 h e a velocidade máxima de crescimento ($\mu_{\text{máx}}$) foi de $0,028 \text{ h}^{-1}$.

Uma vez que tem sido relatada a produção de α -amilases e glucoamilases, por *C. acetobutylicum* (Hockenhull e Herbert *apud* Paquet *et al.* 1990), foi adicionado ao meio CGM, amido de mandioca comercial, para avaliar a capacidade de crescimento a partir deste substrato. *C. acetobutylicum* apresentou um bom crescimento no meio CGM + amido (10g/L), como apresentado na Figura 10, na qual se observa um aumento na D.O em até 24 horas de cultivo, sem que uma fase *lag* de crescimento tenha sido observada. Com a adição de amido ao meio CGM, tg foi 14 h e $\mu_{\text{máx}}$ $0,0496 \text{ h}^{-1}$.

Os resultados apresentados na Figura 10 e na Tabela 8 mostram que a bactéria possui capacidade de crescimento em substrato amiláceo. Em termos estatísticos, os dados apresentados na Tabela 8, mostram um bom ajuste dos dados experimentais ao modelo proposto, para as três condições testadas, o que é comprovado pelos baixos valores do erro quadrático médio (MSE). O fator bias e de exatidão dão uma indicação objetiva da adequação do modelo. Os valores do fator bias estiveram próximos de 1,0 e mostram que os valores preditos são um pouco menores que os observados. Os valores do fator de exatidão obtidos também estão próximos de 1 para os três meios. No entanto, para o meio CGM + amido de mandioca, esses valores apresentam uma exatidão menor que a da estimativa da média. Os coeficientes de correlação obtidos no modelo de Gompertz Modificado estiveram acima de 0,99. Embora para os ensaios com meio CGM + amido tenha se obtido um coeficiente menor, igual a 0,97, estes valores indicam que estes modelos apresentaram um bom ajuste aos dados experimentais, podendo desta forma serem utilizados para a predição do crescimento da bactéria.

Tabela 8: Variáveis cinéticas e parâmetros estatísticos para o microrganismo cultivado nos meios YPD e CGM + amido, calculados pelo modelo de Gompertz.

*Variáveis Cinéticas e parâmetros estatísticos	Meio YPD	Meio CGM + amido de mandioca
$\mu_{\text{máx}}$ (h^{-1})	0,028	0,0496
λ	7,3	2,1
tg (h)	24,75	13,97
MSE	$2 \cdot 10^{-5}$	$1,9 \cdot 10^{-3}$
Fator Bias	0,9993	0,9991
Fator Exatidão	1,0049	1,0476
R^2	0,9926	0,9715

* $\mu_{\text{máx}}$: Máxima velocidade específica de crescimento; tg: Tempo de geração; λ , R^2 : Coeficiente de correlação e MSE: Erro médio quadrático.

5.3 Efeito da concentração de manipueira e do inóculo sobre produção de hidrogênio por *C. acetobutylicum*

5.3.1 Estudos preliminares com concentrações de manipueira e inóculo elevadas

Visando estudar o efeito da concentração de manipueira, expressa como DQO, sobre a produção de hidrogênio por *C. acetobutylicum*, preliminarmente, foram realizados ensaios utilizando concentrações de 30 e 15 gDQO/L de manipueira e concentração de inóculo de 20% (v/v). A duração de cada ensaio foi determinada através do acompanhamento da produção de gás, tendo-se cessado o cultivo quando produção de gás, já não era observada. Em ambos os ensaios este período foi de 24 horas.

Com relação à cinética de produção de hidrogênio, como apresentado nas Figuras 11 e 12, observou-se um comportamento similar para as duas condições experimentais. Resultados estão apresentados na literatura, como os de Minton e Clarke (1989) *apud* Khanal *et al.* (2004), mostraram que a produção de hidrogênio começa durante a fase exponencial de crescimento do *Clostridium*. Em ambos os experimentos, houve também um declínio acentuado da produção de hidrogênio após a 12^a hora de cultivo. Enquanto na concentração inicial de 30 gDQO/L de manipueira, obteve-se um volume total de hidrogênio acumulado em 24 horas, igual a 505 mL, este volume foi igual a 423 mL, quando foi utilizado 15gDQO/L de substrato. Observa-se porém que, nos dois ensaios, a produção de hidrogênio não se sustenta durante todo o período estudado e que após uma fase estacionária de liberação de gás, ocorreu uma queda brusca. Isto pode ser devido a diminuição do

pH que tem um efeito inibitório sobre a produção de hidrogênio, como será mostrado mais adiante, neste trabalho.

O acompanhamento do pH em ambos ensaios mostra que ambos comportaram-se de maneira semelhante até a 23^a hora, quando se observa um decaimento maior, no ensaio realizado na concentração inicial de 30gDQO/L. Chang e Lin (2004) indicaram que as bactérias do gênero *Clostridium* fermentam os açúcares produzindo acetato, butirato, CO₂ e água e, sabe-se que a produção destes ácidos orgânicos atua promovendo um efeito inibitório na produção de H₂. O pH final abaixo de 4,5 em cada condição experimental também está relacionado com a produção destes ácidos voláteis. Nota-se, observando as Figuras 11 e 12, que a partir de 11h e de 12h respectivamente, a produção de hidrogênio começa a decrescer rapidamente, o que ocorre concomitantemente com o decréscimo do pH, que cai para valores abaixo de 5. Roychowdhury *et al.* (1988) *apud* Chen *et al.* (2006) reportaram que a produção de hidrogênio por espécies de *Clostridium* foi inibida na faixa de pH situada entre 4 e 5.

Valores ótimos de pH para a produção de hidrogênio na literatura variam desde 9,0 estudado por Lee *et al.* (1999) em produção de fotohidrogênio, a pH 4,0-5,5, encontrado por Morimoto *et al.* (2004), utilizando um lodo anaeróbio do tratamento de óleo de palma e uma cultura mista tratada previamente. Os resultados mostraram que o pH inicial afetou todos os parâmetros cinéticos testados. Em pH 4,0 nenhum hidrogênio foi produzido, indicando que a produção de hidrogênio por amido pode ter sido inibida em pH abaixo de 4,0. Essa queda revela um acúmulo de ácidos intermediários em um nível superior ao tolerado pela capacidade tampão do meio e pode gerar um desequilíbrio entre a produção e o consumo dessas substâncias. A produção de gás se deu na faixa de pH de 5-7. Estes resultados estão de acordo com os encontrados por Lee *et al.* (2002) e Zhang *et al.* (2003), ambos trabalhando com amido.

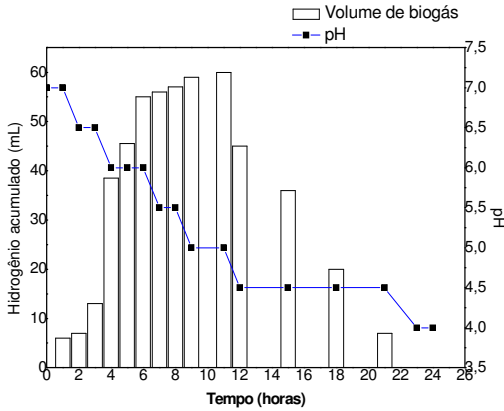


Figura 11: Volume de hidrogênio produzido e acompanhamento da variação do pH durante o cultivo de *C. acetobutylicum*, realizado com 30 gDQO/L de substrato.

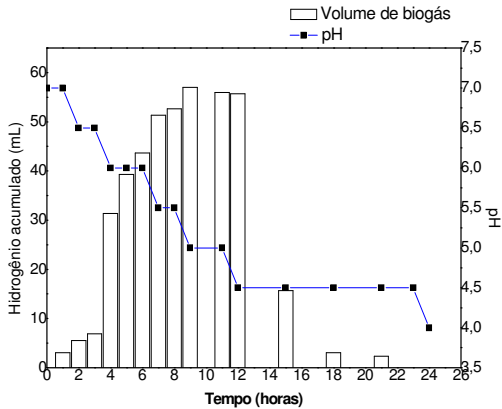


Figura 12: Volume de hidrogênio produzido e acompanhamento da variação do pH durante o cultivo de *C. acetobutylicum*, realizado com 15 gDQO/L de substrato.

Os resultados das cinéticas de consumo de substrato por *C. acetobutylicum*, nas duas condições experimentais são apresentados nas Figuras 13 e 14. Observa-se que em ambas as condições, a velocidade máxima de consumo de substrato coincidiu com a fase exponencial de

produção de hidrogênio. Após 24 horas de cultivo, o consumo de matéria orgânica foi de 16,63 e 35,26% (g/g), quando as concentrações iniciais de matéria orgânica foram iguais a 30 e 15 gDQO/L, respectivamente. Observou-se, portanto, que a redução no teor de matéria orgânica foi quase duas vezes maior no ensaio realizado com 15 gDQO/L. Além disso, em nenhum dos dois ensaios houve consumo total da matéria orgânica, o que não é surpreendente, uma vez que, durante a produção fermentativa do hidrogênio, deve ocorrer a conversão de parte do substrato carbônico em ácidos orgânicos, os quais contribuem no valor da matéria orgânica total remanescente (VRIJE e CLAASSEN, 2003).

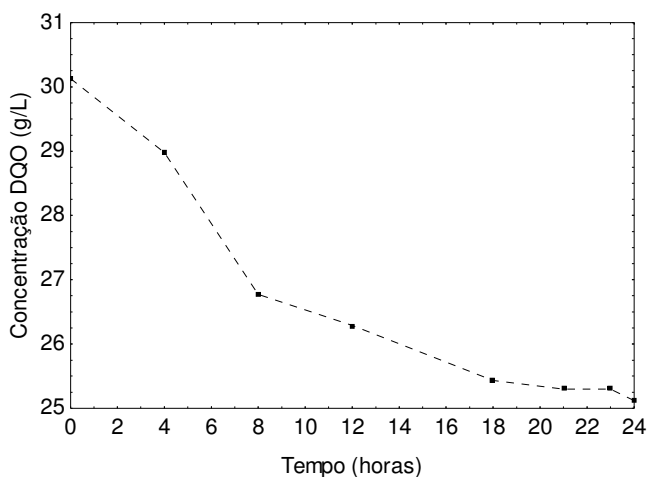


Figura 13: Acompanhamento de matéria orgânica (DQO) durante o cultivo de *C. acetobutylicum*, realizado com 30 gDQO/L de substrato.

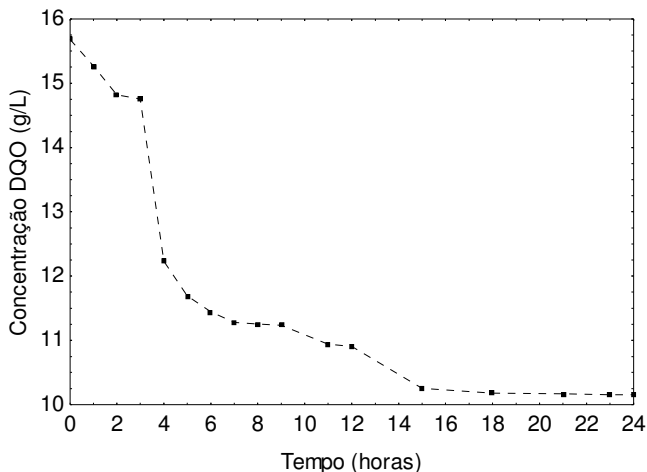


Figura 14: Acompanhamento de matéria orgânica (DQO) durante o cultivo de *C. acetobutylicum*, realizado com 15 gDQO/L de substrato.

5.3.2 Cinética de Crescimento para concentrações iniciais de 30 e 15 gDQO/L de substrato

A cada batelada, o modelo de Gompertz modificado era usado para descrever o processo de produção cumulativa de hidrogênio. Os parâmetros do modelo encontram-se na Tabela 8 e os valores dos coeficientes de correlação (R^2) indicam o bom ajuste dos dados ao modelo. Para a análise dos dados utilizou-se o tempo compreendido desde o início da inoculação até o término da fase exponencial de produção de hidrogênio.

As Figuras 15 e 16 apresentam as curvas ajustadas para volume de hidrogênio produzido em função de tempo, pelo modelo de Gompertz modificado, enquanto na Tabela 9 são apresentados os parâmetros cinéticos calculados a partir do modelo. Observa-se, pela Tabela 9, que potencial de produção de hidrogênio, calculado pelo modelo, nestes dois primeiros ensaios (30 e 15 gDQO/L de substrato) foram iguais a 64,24 e 49,67 mL, respectivamente, em 24 horas. Entretanto, com duração de 24 horas de fermentação, o ensaio I atingiu um volume máximo observado de 60 mL (em 11 h) e o ensaio II, 57 mL (em 9 h). Ambos ensaios apresentaram uma fase *lag* de aproximadamente 1 hora (0,7 e 1,07h, para os ensaios I e II, respectivamente, vide Tabela 9), seguida de uma fase exponencial e o estabelecimento de uma fase estacionária,

após 7 horas de cultivo. Os valores de μ_p (velocidade máxima de produção de gás) foram iguais a aproximadamente 13 mL/L.h, para as duas concentrações (30 e 15 gDQO/L). A velocidade volumétrica máxima de produção de hidrogênio ($\mu_{\text{máxH}}$) teve comportamento semelhante para as duas concentrações, também, e foram aproximadamente iguais a 3,3 mL/h. Em anexo, podem ser encontradas as curvas típicas de hidrogênio produzido com os valores modelados.

Tabela 9: Parâmetros estimados pelo modelo de Gompertz para a produção de hidrogênio nas concentrações iniciais de substrato de 30 gDQO/L e 15 gDQO/L de substrato.

Concentração (gDQO/L)	Simulação Matemática				μ_p (mL/h.L)
	*A (mL)	$\mu_{\text{máxH}}$ (mL/h)	λ (h)	R ²	
30	64,24	3,35	0,71	0,9643	13,4
15	49,67	3,46	1,07	0,9717	13,84

*A: Potencial de produção de hidrogênio; $\mu_{\text{máxH}}$: velocidade máxima de produção de hidrogênio; λ : Duração da fase lag; μ_p : Taxa volumétrica de produção de hidrogênio e R²: coeficiente de correlação.

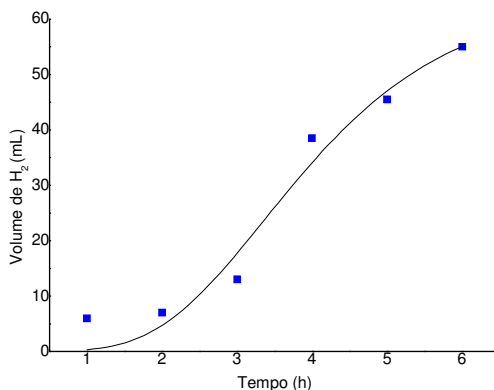


Figura 15: Aplicação do modelo de Gompertz modificado à curva exponencial de produção de hidrogênio por *Clostridium acetobutylicum* utilizando manipueira como fonte de carbono em concentração de 30 gDQO/L.

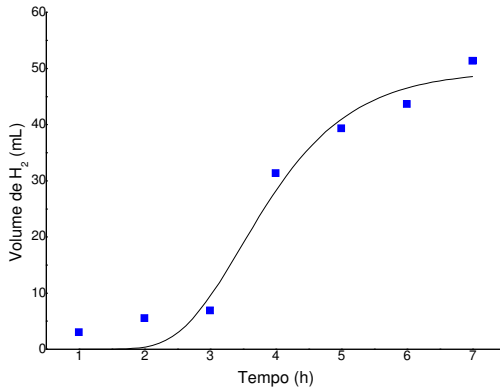


Figura 16: Aplicação do modelo de Gompertz modificado à curva exponencial de produção de hidrogênio por *Clostridium acetobutylicum* utilizando manipueira como fonte de carbono em concentração de 15 gDQO/L.

5.3.3 Estudos com concentrações de manipueira e inóculo reduzidos

Visando-se estudar condições em que se tivesse uma maior conversão de substrato em hidrogênio, foram realizados ensaios aplicando-se três outras concentrações de manipueira inferiores às anteriores, a saber: 10 gDQO/L (ensaio III), 7,5 gDQO/L (ensaio IV) e 5 gDQO/L (ensaio V). Além disso, a concentração de inóculo foi reduzida de 20 %, utilizada nos ensaios preliminares, para 4% (v/v), nestes três ensaios.

As Figuras 17, 18 e 19, mostram o comportamento da produção de hidrogênio nas menores concentrações, onde as fases de adaptação variaram de 14 h (Ensaio V) até 21 h (Ensaio III) e, quanto maior a concentração de substrato, maior foi a fase lag.

A Figura 17 apresenta o comportamento da produção de hidrogênio quando a concentração inicial de substrato foi de 10 gDQO/L onde observa-se que a produção de gás se inicia após 24 horas de inoculação, e após 16 horas, ou seja na 40ª hora, a produção de hidrogênio alcançou o valor máximo. Após 55 h de experimento, a produção decresce, sendo o volume total produzido igual a 476 mL.

A Figura 18 mostra o ensaio IV onde a produção inicia-se após 30 horas e o volume máximo de gás produzido acontece em 46 h de

fermentação. O declínio de produção é observado após 60 horas de ensaio e o valor total de gás neste período foi de 307 mL. Já no ensaio V, indicado na Figura 19, depois de 14 horas a produção de gás é iniciada, prolongando-se por 36 horas para atingir seu valor máximo. O valor máximo de hidrogênio após 90 h de experimento foi de 418 mL. Como podemos observar, os três ensaios comportaram-se de maneira bastante semelhante com relação à produção de biogás, até mesmo no tempo necessário para a produção de hidrogênio ter seu pico, diferenciando-se basicamente no volume de gás produzido.

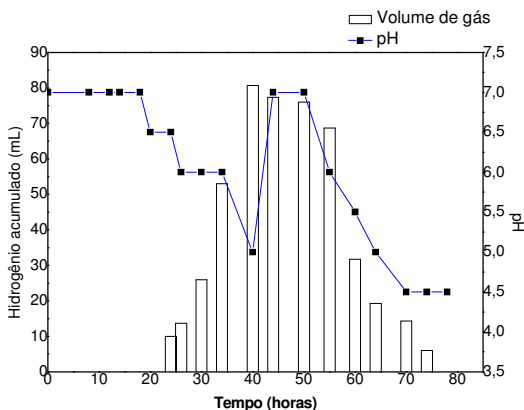


Figura 17: Volume de hidrogênio produzido e acompanhamento da variação do pH durante o cultivo de *C. acetobutylicum*, realizado com 10 gDQO/L de substrato.

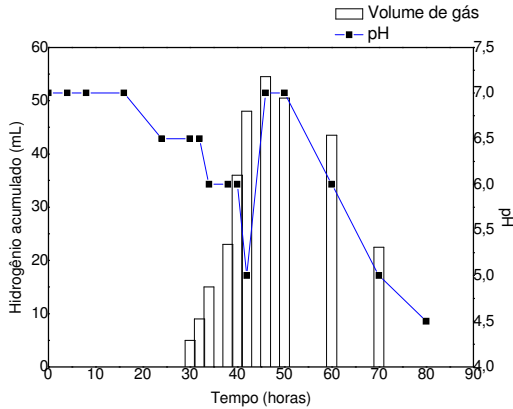


Figura 18: Volume de hidrogênio produzido e acompanhamento da variação do pH durante o cultivo de *C. acetobutylicum*, realizado com 7,5 gDQO/L de substrato.

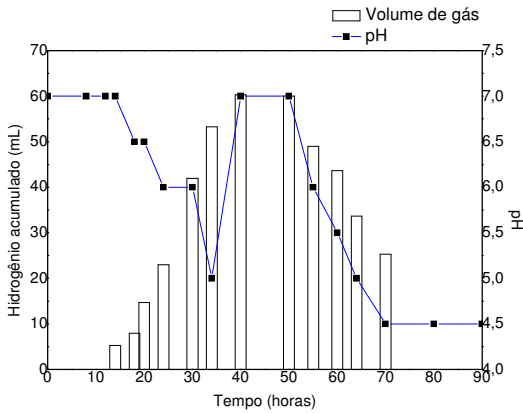


Figura 19: Volume de hidrogênio produzido e acompanhamento da variação do pH durante o cultivo de *C. acetobutylicum*, realizado com 5 gDQO/L de substrato.

Nos ensaios preliminares, observou-se que o estabelecimento do processo fermentativo e a conseqüente produção de ácidos orgânicos, se

refletiu na queda do valor do pH, durante o processo. Esta diminuição no valor de pH, por sua vez pareceu afetar a produção de hidrogênio.

Sendo assim, nos ensaios III, IV e V, foi realizada a correção de pH, através da adição de uma solução de NaOH 1 mol/L, assim que o pH do meio de cultivo atingiu valor inferior a 5, como observado nos testes preliminares. Ao se atingir o pH 5, era adicionada ao meio de cultivo solução de NaOH 1 mol/L suficiente uma para qpara que este valor se elevasse até 7 novamente. Fang e Zhang (2005) *apud* Morimoto *et al.* (2004) demonstraram que a produção de hidrogênio que iniciou em pH neutro, foi reduzida com o abaixamento do pH e cessou em pH 4. As Figuras 17, 18 e 19, mostram que a correção do pH efetuada fez com que a produção de hidrogênio se sustentasse por mais 34, 28 e 36 horas, nos ensaios III, IV e V, respectivamente.

Com relação à remoção de matéria orgânica nos ensaios III, IV e V, esta foi maior no experimento com a concentração mais elevada de DQO na manípueira (10g/L) no biorreator. Este efeito da remoção de DQO pode ser observado nas Figuras 20, 21 e 22. Como se nota, o ensaio III apresentou o maior percentual de consumo de matéria orgânica (41,96%), a qual era inicialmente igual a 10,77 gDQO/L e foi reduzida para 6,25 gDQO/L.

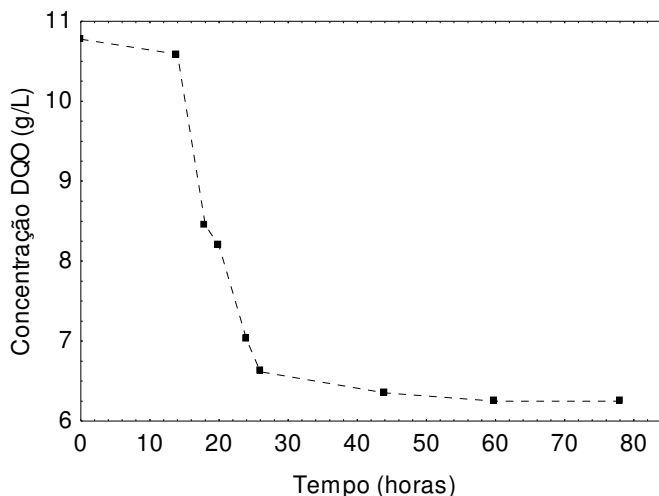


Figura 20: Acompanhamento de matéria orgânica (DQO) durante o cultivo de *C. acetobutylicum*, realizado com 10 gDQO/L de substrato.

No ensaio IV, o consumo de matéria orgânica foi de 24,91%, partindo de 7,45 gDQO/L até 5,59 gDQO/L de matéria orgânica. A segunda maior remoção foi obtida no ensaio V, alcançando um percentual de redução de 33,07, diminuindo de 5,23 gDQO/L para 3,5 gDQO/L.

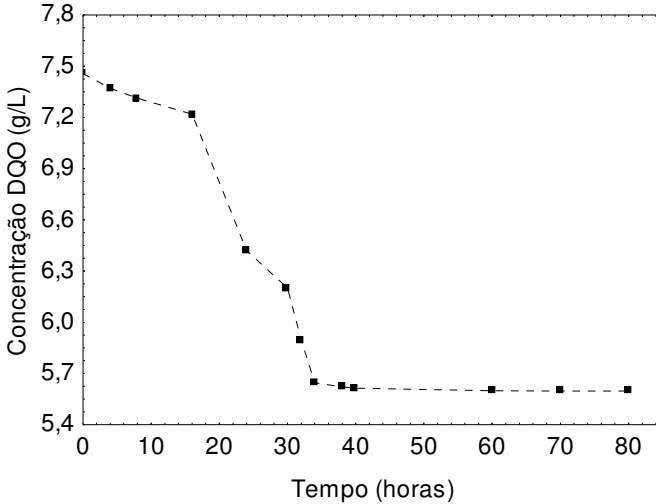


Figura 21: Acompanhamento de matéria orgânica (DQO) durante o cultivo de *C. acetobutylicum*, realizado com 7,5 gDQO/L de substrato.

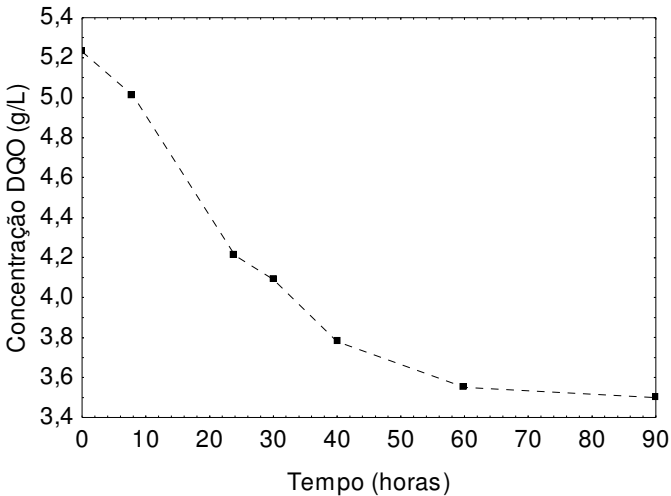


Figura 22: Acompanhamento de matéria orgânica (DQO) durante o cultivo de *C. acetobutylicum*, realizado com 5 gDQO/L de substrato.

Os resultados mostraram que, quanto maior a remoção, maior o volume de hidrogênio produzido. Em comparação com os testes preliminares, estes três ensaios obtiveram melhores percentuais de consumo de substrato, indicando que, com concentrações mais baixas, a redução da carga poluente foi mais eficaz.

5.3.4 Cinética de crescimento para concentrações iniciais de 10, 7,5 e 5 gDQO/L de substrato

Os parâmetros do modelo de Gompertz encontram-se na Tabela 10 e os valores dos coeficientes de correlação indicam o bom ajuste dos dados ao modelo. Como pode ser visto, os potenciais de produção de hidrogênio aumentaram com o aumento da concentração de substrato de 74,14 mL em 5 g/L até 92,20 mL com 10 g/L. Os experimentos preliminares registraram potenciais de 64,24 mL com 30 g/L e 49,67 mL com 15 g/L. Tanto os valores encontrados para A (potencial máximo de produção de hidrogênio), quanto os valores de μ_p (produtividade volumétrica de gás), alcançaram seus máximos quando a concentração inicial de manipueira foi 10 gDQO/L.

Reungsang *et al.* (2004), trabalhando com resíduo líquido da mandioca fermentado por uma cultura mista, com pH inicial 7, temperatura 35°C e concentração 10 g/L, utilizou um sistema de batelada dupla. No primeiro estágio era realizada uma conversão do amido em ácidos orgânicos por uma cultura mista e no segundo estágio, a bactéria *Rhodospirillum rubrum* era utilizada para a produção de hidrogênio mediante uso dos ácidos orgânicos obtidos no primeiro ensaio. Nas condições de pH 7, temperatura 30°C, o potencial máximo de hidrogênio obtido foi de 67 mL.

Reungsang *et al.* (2007) em seu trabalho usando a manipueira fermentada por uma bactéria fototrófica, *R. rubrum*, juntamente com uma cultura de um lodo anaeróbio, reportaram que a velocidade máxima de produção e o potencial de produção de hidrogênio de 1,20 mL/h e 127,02 mL, foram obtidos em pH inicial 7, sugerindo que este pH seja o ótimo para a produção do hidrogênio. Este mesmo trabalho indica que uma fermentação com agitação de 100 rpm melhorou a produção do gás em até duas vezes se comparada com uma fermentação estática. A agitação mecânica pode prevenir a formação de flocos na cultura, distribuindo melhor as células no reator e facilitando a exposição do microrganismo ao substrato, desse modo promovendo a remoção do gás hidrogênio do caldo fermentativo.

A eficiência do reator é usualmente investigada com base na produção do gás normalizada ao volume total do reator. Como mostra a

Tabela 10, μ_p aumentou, se comparado aos experimentos preliminares. Nos ensaios III, IV e V, μ_p atingiu valores de 86,3, 19,33 e 55,0 mL/h.L, respectivamente.

Também em concentração de 10 g/L de glicose, Oh *et al.* (2004) obtiveram uma velocidade volumétrica de 8.8 mL/h.L e Mizuno *et al.* (2000) alcançaram uma taxa de 7.9 mL/h.L, ambos trabalhando com uma cultura mista em um reator de membrana e usando como substrato, glicose pura. *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 foi o microrganismo utilizado por Zhang *et al.* (2006) para a fermentação de um meio sintético contendo glicose que alimenta um reator de colunas empacotadas a 1,6 mL/min. Velocidades de produção de H₂ aumentaram de 89 até 220 mL/h.L em concentração variando de 1 a 10,5 g/L de glicose.

Segundo Ginkel e Logan (2005), as concentrações de substrato utilizadas ultimamente para produção de hidrogênio têm sido na faixa de 10 g/L de carboidrato. Concentrações maiores devem permitir uma operação, mais energeticamente eficiente, mas a inibição pelos produtos formados durante a fermentação provavelmente será maior. Com concentrações de glicose entre 2,5 e 10 gDQO/L, o aumento da velocidade inicial de alimentação do sistema fez com que houvesse uma diminuição no rendimento de 2,8 para 1,7 mol H₂/mol glicose em 30°C e pH 5,5.

Tabela 10: Parâmetros estimados pelo modelo de Gompertz para a produção de hidrogênio nas concentrações iniciais de substrato de: 10, 7,5 e 5,0 gDQO/L de substrato.

Concentração (gDQO/L)	Simulação Matemática				μ_p (mL/h.L)
	*A (mL)	μ_{maxH} (mL/h)	λ (h)	R ²	
10	92,20	25,9	21,4	0,9959	86,3
7,5	85,62	5,8	30,8	0,9994	19,33
5	74,14	16,5	14,83	0,9962	55,00

*A: Potencial de produção de hidrogênio; μ_{maxH} : velocidade máxima de produção de hidrogênio; λ : Duração da fase lag; μ_p : Taxa volumétrica de produção de hidrogênio e R²: coeficiente de correlação.

As Figuras 23, 24 e 25 apresentam os valores dos ensaios III, IV e V, ajustados pela equação modificada de Gompertz. É possível notar pela Tabela 10, que estes ensaios (10, 7,5 e 5 gDQO/L de substrato) foram os ensaios com maior potencial de produção de hidrogênio.

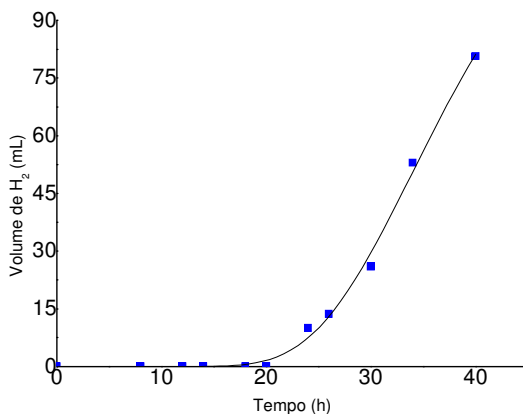


Figura 23: Aplicação do modelo de Gompertz modificado à curva exponencial de produção de hidrogênio por *Clostridium acetobutylicum* utilizando manipueira como fonte de carbono em concentração de 10 gDQO/L.

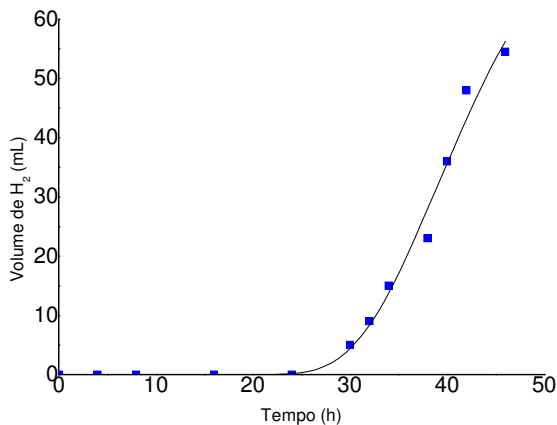


Figura 24: Aplicação do modelo de Gompertz modificado à curva exponencial de produção de hidrogênio por *Clostridium acetobutylicum* utilizando manipueira como fonte de carbono em concentração de 7,5 gDQO/L.

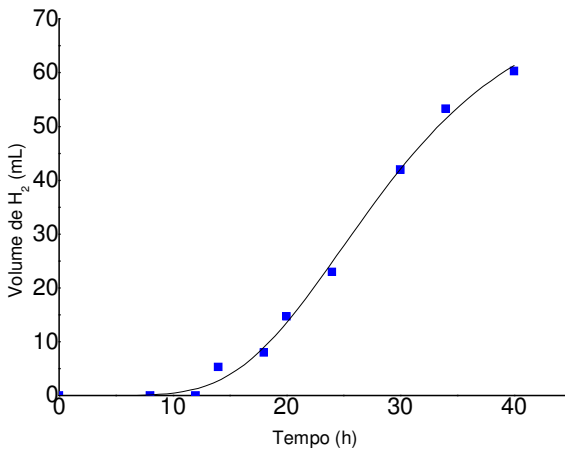


Figura 25: Aplicação do modelo de Gompertz modificado à curva exponencial de produção de hidrogênio por *Clostridium acetobutylicum* utilizando manipieira como fonte de carbono em concentração de 5 gDQO/L.

O ensaio III teve a duração de 78 horas, apresentando um pico de produção de hidrogênio, em 40 horas alcançando 80,7 mL. Na seção Anexos encontram-se as curvas típicas de hidrogênio produzido. O mesmo foi observado para os Ensaio IV e V, onde os picos se deram com 46 h (54,5 mL) e 40 h (60,3 mL), respectivamente, sendo que poderiam ter sido atingidos volumes de 85,62 e 74,14 (em 28 horas).

O modelo confirmou o tempo necessário para adaptação da bactéria ao meio de fermentação, até que houvesse início à produção de gás. A Tabela 10 mostra que o tempo de duração da fase *lag* (14-30h) foi relativamente pequeno. Lay e Noike (1999) encontraram uma fase de adaptação de três dias até o início da produção de gás, trabalhando com lodo como inóculo.

5.3.5 Produção de ácidos orgânicos e Acidez

Pesquisas de Chin *et al.* (2003) divulgam que usualmente o acetato e o butirato são os metabólitos presentes em maior quantidade quando se usa uma cultura de *C. acetobutylicum* para a produção de hidrogênio. Preferencialmente, é desejada a presença de acetato ou acetona no sistema, devido aos maiores rendimentos desses metabólitos

quando a glicose é anaerobicamente fermentada. Rendimentos baixos estão usualmente associados à presença de propionato e compostos reduzidos (álcoois e ácido lático).

Em um processo anaeróbio típico o hidrogênio é produzido durante a fase de crescimento exponencial da *Clostridium*. Quando a população atinge o estado estacionário, inicia-se a produção de solventes e as reações de produção de ácidos e hidrogênio cessam (KHANAL *et al.*, 2004). Deste modo, para as análises cromatográficas, foram selecionadas amostras do pico de liberação de gás em cada ensaio e do tempo final de experimento, quando houve o cessar de hidrogênio.

Os produtos intermediários que puderam ser identificados foram o ácido acético, o ácido lático e o etanol. A Tabela 13 mostra os valores para esses produtos intermediários nos tempos de maior produção de hidrogênio (pico) e no tempo final de fermentação. Com relação à concentração de 10 g/L, observa-se que, em 40 horas de experimento, onde ocorreu a máxima de produção de gás, a quantidade de ácido acético era de 0,63 g/L e o pH do meio se encontrava em declínio, atingindo o valor de 5. Entrando na fase estacionária, quatro horas depois já se nota um aumento na concentração de etanol e a diminuição de ácido acético até 0,13 g/L, o que indica uma mudança da rota acidogênica para a solventogênica.

Com 78 horas de experimento, a concentração de ácido acético atingiu 0,02 g/L, e esta diminuição nos níveis de acetato foi acompanhada do aumento de um composto mais reduzido, o ácido lático, o que pode explicar o decréscimo na produção de hidrogênio a partir de 60 h. Lay (2000) verificou que o decréscimo no rendimento de hidrogênio pode ser resultante do aumento nos ácidos orgânicos voláteis totais, os quais podem inibir essa produção.

No Ensaio com 7,5 gDQO/L, foi quantificado 0,12 g/L de acetato no pico de hidrogênio. Em 80 h, momento em que não havia mais liberação de gás observa-se um decréscimo até 0,05 g/L de acetato, onde provavelmente a fase de produção de álcoois já era predominante, justificada pelo aumento do valor de ácido lático de 0,03 g/L em 46 horas para 0,18 g/L em 80 horas e do aumento da concentração de etanol de 2 para 3 µg/L. Durre (2005) *apud* Hawkes *et al.* (2007), explica que quando a população bacteriana atinge a fase estacionária de crescimento, as reações passam de uma fase de produção hidrogênio/ácido para uma fase de produção de solventes que ocorre quando o pH cai na faixa de 4,5 – 5. Esta fase é considerada indesejável para a produção de hidrogênio, já que acúmulo dos subprodutos da fermentação pode

ocasionar uma mudança da produção de solventes para a esporulação pelo *Clostridium*.

Já no último ensaio, com 5 g/L de substrato, a quantidade de acetato foi extremamente baixa se comparamos com os outros experimentos. Não foi possível identificar a presença de etanol e ácido láctico no sistema. No que diz respeito à concentração de etanol e ácido láctico, estas ainda foram bastante baixas em todos os ensaios, sendo a quantidade de etanol praticamente zero e inexistente no Ensaio com 5 g/L (Tabela 9). O ácido láctico se apresenta como um intermediário-chave da fermentação dos carboidratos e é subsequentemente degradado de forma rápida na acidificação. Isso indica que a formação de ácidos foi predominante sobre a produção de solventes nestas condições operacionais.

Uma comparação entre os experimentos mostra que a quantidade de ácido acético aumentou com o aumento na concentração de maniveira. Essa variação nos ácidos orgânicos voláteis pode ser justificada por uma alteração nas vias metabólicas do processo de digestão anaeróbia. Já foi reportado por Yu e Fang (2001) *apud* Liu e Shen (2004) que um aumento na concentração inicial de substrato resultou em uma alteração nas vias metabólicas durante a fermentação, onde houve a formação de compostos mais reduzidos quando o fluxo de elétrons foi interrompido. O aumento na quantidade de ácidos orgânicos voláteis com a concentração de amido confirma essa hipótese.

Tabela 11: Composição dos metabólitos solúveis durante as fermentações em batelada com pH final 4,5.

Concentração de maniveira (gDQO/L)	Tempo de fermentação (h)	Etanol (µg/L)	Ácido Láctico (g/L)	Ácido Acético (g/L)
10	40	2	0,04	0,63
	44	3	-	0,13
	78	3	0,08	0,02
7.5	46	3	0,03	0,12
	80	4	0,18	0,05
5	50	-	-	0,01

5.3.6 Avaliação da Eficiência de Conversão de manipueira em hidrogênio

Um critério frequentemente usado para avaliar o potencial para a aplicação biotecnológica de um substrato é a eficiência de sua conversão no produto desejado. A eficiência de conversão constitui-se no número de moles de hidrogênio produzido em relação à quantidade teórica que poderia ser obtida se todo o substrato fosse utilizado para a produção do hidrogênio. Neste caso, visto que os experimentos preliminares (30 e 15g/L) foram realizados com inóculos maiores (20%), e sem uma absorbância inicial padronizada, não houve a possibilidade de comparação do rendimento final com os ensaios de 10, 7,5 e 5g/L.

Tabela 12: Valores da Produção de Hidrogênio utilizando diferentes concentrações de substrato ^(a)

Matéria orgânica (gDQO/L)	Glicose Inicial (g)	Hidrogênio produzido (mol)	H ₂ Produzido		Eficiência de Conversão (%)
			V _{final} (mL)	R (mol H ₂ / mol gli)	
30	6,02	0,020	505	0,60	15
15	3,02	0,017	423	1,00	25
10	2,51	0,019	476	1,34	34
7,5	1,79	0,012	307	1,20	30
5	1,23	0,016	418	2,41	60

(a) Eficiências de conversão de substrato (glicose), assumindo a produção de acetato como subproduto para o cálculo da produção de H₂ máxima (4 moles H₂/mol glicose)

Na tabela 12, observa-se que as conversões de substrato em hidrogênio, variaram de 15 a 60% (mol/mol) e foram maiores à medida que se diminui a concentração de manipueira. Zhang *et al.* (2006) utilizando a mesma bactéria *Clostridium acetobutylicum*, metabolizando glicose, mas trabalhando com batelada alimentada, encontrou eficiências de conversão que variaram entre 15% e 27%, sendo que os maiores valores foram encontrados com concentrações de alimentação de 4,5 e 10,5 g/L de glicose. Van Ginkel e Sung (2001) concluíram que nos ensaios em batelada com as maiores concentrações de substrato (15-45 gDQO/L), registraram-se as menores eficiências de conversão para hidrogênio, sugerindo que o substrato estaria em excesso e este excesso poderia ser convertido à álcoois ao invés de ácidos e hidrogênio. Esse

decréscimo pode ser resultante do aumento das concentrações totais dos ácidos orgânicos voláteis/álcoois, o que irá inibir a produção de gás.

A Tabela 13 resume os rendimentos de hidrogênio obtidos por diferentes autores com substrato e inóculos variados. Os rendimentos máximos de hidrogênio observados em pH inicial 7 neste estudo variaram entre 0,60 e 2,41 moles H_2 /mol baseado em glicose. Os baixos rendimentos dos experimentos preliminares podem ser explicados devido aos menores consumos de substrato, resultantes das altas concentrações de amido no meio. Ao analisar separadamente os experimentos finais nas menores concentrações, nota-se que existe uma dependência da concentração de substrato, pois quanto menor a concentração, maior foi o rendimento. Para as concentrações de 15, 10 e 7,5 g/L, os valores de hidrogênio são comparáveis às recuperações de 0,5 a 1,0 mol H_2 /mol hexose, encontrados por Tanisho e Ishiwata (1994) usando *Enterobacter aerogens* e melaço como substrato. Esses rendimentos também podem ser comparados com os trabalhos de Cheong e Hansen (2006) e Logan *et al.* (2002), utilizando culturas mistas, cujos rendimentos se encontram na mesma Tabela.

Já o rendimento de 2,41 moles H_2 /mol de glicose alcançado com 5 g/L de manipueira é bastante similar ao resultado encontrado por Chin *et al.* (2003), utilizando *Clostridium acetobutylicum* (aproximadamente 2 moles H_2 /mol glicose) trabalhando com batelada alimentada em pH 6, temperatura de 37°C. Com o mesmo pH, outro resultado semelhante é o obtido por Kumar e Das (2000), de 2,2 moles H_2 /mol glicose através da fermentação do amido por uma cultura pura de *Enterobacter clocae*. Utilizando *Clostridium butyricum* em pH 6,7, Kataoka *et al.* (1997) obteve rendimentos entre 1,4 e 2,3 moles H_2 /mol glicose. Também utilizando cultura pura, Fabiano e Perego (2002) trabalharam com amido hidrolisado como substrato, em concentração de 20 g/L, e obtiveram um rendimento de 1,09 moles H_2 /mol glicose.

De acordo com Kapdan e Kargi (2006), os maiores rendimentos encontrados nos últimos anos em fermentações de glicose estão na faixa de 2,0 a 2,7 moles de hidrogênio por mol de hexose e incluem o trabalho de Yokoi *et al.* (2001), no qual o amido da batata doce foi utilizado previamente seco, com uma cultura de *C. butyricum* e *E. aerogenes* em um sistema de batelada alimentada, trabalhando com pH 5,25, e alcançando 2,4 moles de gás hidrogênio. Yokoi *et al.* (2002) aprimoraram o estudo anterior obtendo 2,7 moles de gás hidrogênio por mol de glicose, quando utilizaram além do amido da batata doce, o líquido do processamento do milho como fonte de nitrogênio.

Tabela 13: Rendimentos de Hidrogênio utilizando diferentes substratos

Substrato	Tipo de reator	Cultura	Rendimento de H ₂ (mol/mol hexose)	Referência
Glicose	Batelada	Mista	0,8 – 1,0	Cheong e Hansen (2006)
Glicose, sacarose	Batelada	Mista	0,9	Logan <i>et al.</i> (2002)
Glicose	Contínuo	<i>Clostridium sp.</i>	0,9	Mizuno <i>et al.</i> (2000)
Glicose	Batelada Alimentada	<i>C. acetobutylicum</i>	2,0	Chin <i>et al.</i> (2003)
Glicose	Batelada	<i>Klebsiella oxytoca</i>	1,0	Minnan <i>et al.</i> (2005)
Glicose	Batelada	<i>Clostridium sp.</i> no.2	2,0	Taguchi <i>et al.</i> (1994)
Glicose	Contínuo	<i>E. clocae</i>	2,2	Kumar e Das (2000)
Glicose	Batelada	<i>C. butyricum</i>	1,4 – 2,3	Kataoka <i>et al.</i> (1997)
Amido	Batelada repetida	<i>C. butyricum</i> e <i>E. aerogenes</i>	2,4	Yokoi <i>et al.</i> (2001)
Glicose	Batelada	<i>Citrobacter sp.</i>	2,49	Oh <i>et al.</i> (2003)
Amido	Batelada repetida	<i>C. butyricum</i> e <i>E. aerogenes</i>	2,7	Yokoi <i>et al.</i> (2002)
Glicose	Batelada	<i>Rhodospseudomonas palustris</i>	2,76	Oh <i>et al.</i> (2002)

Resíduos ricos em amido são abundantes na natureza e têm um grande potencial para serem usados como fonte de carboidrato para a produção de hidrogênio. É possível utilizar o resíduo líquido da produção da mandioca para este fim, desde que não utilizado em altas concentrações. As diluições no resíduo foram importantes e proporcionaram um entendimento com relação à carga orgânica residual. Do ponto de vista das tecnologias limpas, é ambientalmente interessante trabalhar com o resíduo diluído, ou seja, um resíduo com carga poluente similar ao resíduo de fecularias.

5.4 Análise Microscópica

A microscopia óptica de contraste de fase das culturas foi utilizada nos ensaios alimentados com 30 e 15g/L de manipueira e primeiramente confirmou o crescimento da cultura nos biorreatores, permitindo assim a visualização das fases de crescimento da bactéria, sendo possível relacionar com a produção de hidrogênio.

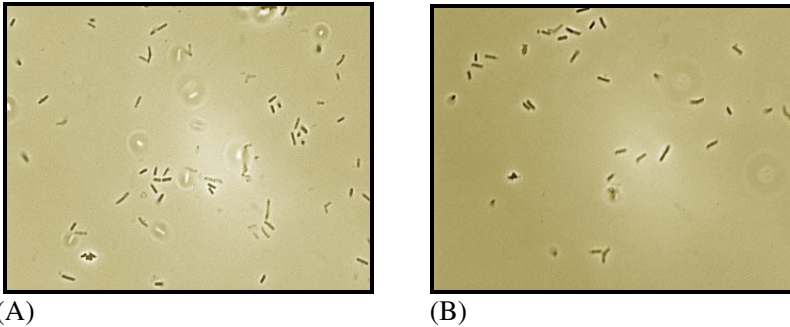
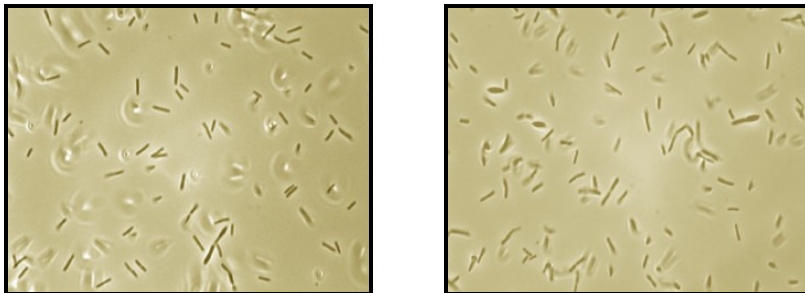


Figura 26: Microscopia óptica de contraste de fase dos biorreatores operando durante 4 horas com (A) 30g/L e (B) 15g/L de manipueira.

Na Figura 26, após 4 horas de cultivo, nota-se a presença de células vegetativas, ainda em pequeno número, o que acontece simultaneamente com o início da produção de hidrogênio nestes dois ensaios, caracterizando o início da fase exponencial. A fase exponencial apresentou uma predominância de bastonetes, com células duplas e triplas durante sua fase exponencial.

Com 8 horas de cultivo, a concentração celular é bastante expressiva e há um domínio de células vegetativas, não existindo praticamente nenhuma célula em forma de esporo na cultura (Figura 27). Nestas amostras, foi necessária uma diluição 1:1 para a posterior observação. A presença de células em processo de duplicação está em concordância com a produção de gás que neste momento estava em fase exponencial já que seu máximo foi alcançado entre 9 e 11 horas para os ensaios de 15g/L e 30g/L.

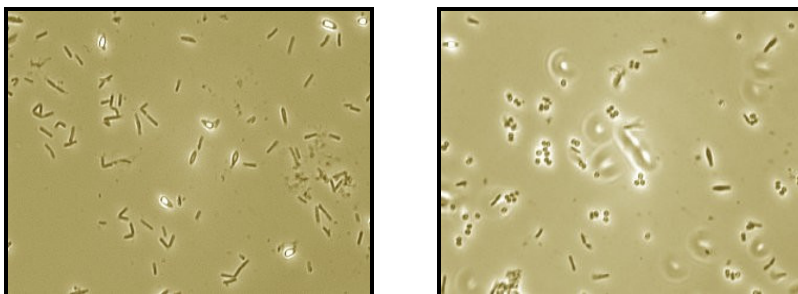


(A)

(B)

Figura 27: Microscopia óptica de contraste de fase dos biorreatores operando durante 8 horas com (A) 30g/L e (B) 15g/L de manipueira.

A microscopia de 10h de cultivo revelou o aparecimento de um início de esporulação em ambas as culturas, sendo maior no cultivo de menor concentração (Figura 28) e correlacionando com os experimentos, verifica-se que neste estágio já existia uma redução no valor do pH, causando a diminuição no volume de gás produzido.

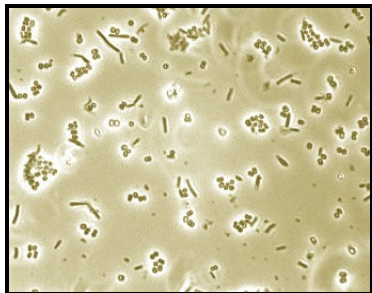


(A)

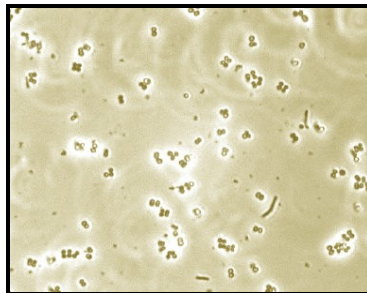
(B)

Figura 28: Microscopia óptica de contraste de fase dos biorreatores (diluição 1:1) operando durante 10 horas com (A) 30g/L e (B) 15g/L de manipueira.

A fase que demonstra claramente o início de morte celular é vista na Figura 29, com 24 horas de cultivo, e onde há uma presença, quase que total, de esporos. Neste ponto, com 24h de fermentação, não há mais produção de gás.



(A)



(B)

Figura 29: Microscopia óptica de contraste de fase dos biorreatores operando após 24 horas com (A) 30g/L e (B) 15g/L de manipueira.

6. CONCLUSÕES

Como conclusões deste estudo tem-se:

- O crescimento de *Clostridium acetobutylicum* nos diferentes meios de cultivo testados previamente aos ensaios com os biorreatores, indicou uma boa adaptação da cepa às condições às quais foi submetida, e uma $\mu_{\text{máx}}$ encontrada de 0,0496, foi obtida com o meio sintético suplementado com amido de mandioca, comprovando que a bactéria cresce bem em resíduo amiláceo.

- Nos ensaios com menor quantidade de substrato (10, 7,5 e 5 gDQO/L) foi possível prolongar a fase de produção de hidrogênio por mais 34, 28 e 36 horas, respectivamente, com o uso de uma solução de NaOH, corrigindo o pH para 7,0 no momento em que o mesmo atingia 5. Consequentemente, acumulou-se 476 mL de hidrogênio em 78 h no experimento de maior concentração, e 418 mL em 80 h no experimento de menor concentração.

- O modelo de Gompertz Modificado foi satisfatório para os ajustes dos parâmetros de crescimento: velocidade específica máxima de crescimento ($\mu_{\text{máxH}}$), tempo de fase *lag* (λ) e potencial máximo de hidrogênio (A) de *Clostridium acetobutylicum* em todas as condições de estudo testadas. Com esse modelo foi possível prever as condições específicas de cada cultivo e o momento da limitação de cada ensaio. A modelagem revelou que o potencial máximo de hidrogênio foi dependente da concentração do substrato e alcançou 92,20 mL na concentração de 10 g/L, 85,62 mL para 7,5 g/L e 74,14 mL com 5 g/L.

- O melhor rendimento de hidrogênio se deu na menor concentração de manieira (5 gDQO/L) e alcançou 2,41 moles/mol glicose. Os rendimentos dos ensaios de 10 e 7,5 gDQO/L atingiram resultados esperados de: 1,34 e 1,20 moles/mol de glicose, e foram similares à maioria das pesquisas da área.

REFERÊNCIAS

- ABDEL-FATTAH, Y.R.; OLAMA, Z.A. L-Asparaginase production by *Pseudomonas aeruginosa* in solid-state culture: Evaluation and optimization of culture conditions using factorial designs. **Process Biochemistry**, v.38, p.115–122, 2002.
- ANDRADE, J. C.; VASCONCELOS, I. Continuous cultures of *Clostridium acetobutylicum*: culture stability and low-grade glycerol utilisation. **Biotechnology Letters**, v.25, p. 121-125, 2003.
- APHA - AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. **Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater**. 20^a ed. 1998.
- BARANA, A C. Tecnologias sócio-ambientais para aproveitamento agropecuário e tratamento do resíduo líquido da mandioca. In: **I Simpósio Nacional sobre a Manipueira**, 2008, Vitória da Conquista – BA. Palestra. 2008.
- BENEMANN, J. Hydrogen biotechnology: progress and prospects. **Nature Biotechnology**, v.14, p.1101–1103, 1996.
- BREURE, A.; VAN ANDEL, J. G. Hydrolysis and acidogenic fermentation of a protein gelatin in anaerobic conditions culture. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.20, p.40-45, 1984.
- CARDOSO, E. **Uso de manipueira como biofertilizante no cultivo do milho: avaliação do efeito do solo, nas águas subterrâneas e na produtividade do milho**. Criciúma, 2005. 53 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Ambientais) - Universidade do Extremo Sul Catarinense.
- CATO, E.P.; GEORGE, W.L.; FINEGOLD, S.M. Genus *Clostridium*. In: SNEATH, P. H.; MAIR, N. S.; SHARPE, M. E.; HOLT, J. G. (eds.). **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**. Baltimore, MD: Williams and Wilkins, v.2, p. 1141-1200, 1986.
- CEREDA, M. P. Caracterização dos subprodutos da industrialização da mandioca. In: CEREDA, M. P. **Manejo, uso e tratamento de subprodutos da industrialização da mandioca**. São Paulo: Fundação CARGILL, v.4, cap.1, p.13-37 (Séries culturas de tuberosas amiláceas Latino americanas), 2001.

CEREDA, M.P. Caracterização dos Resíduos da industrialização da mandioca. In: **Resíduos da Industrialização da mandioca no Brasil**. São Paulo: Editora Paulicéia, p.11-50, 1994.

CHANG, F.Y.; LIN, C.Y. Biohydrogen production using an up-flow anaerobic sludge blanket reactor. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 21, p. 33-39, 2004.

CHEN, J.S.; TOTH, J.; KASAP, M. Nitrogen-fixation genes and nitrogenase activity in *Clostridium acetobutylicum* and *Clostridium beijerinckii*. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 27, p. 281–286, 2001.

CHEN, S. D.; SHEU, D.S.; CHEN, W. M.; LO, Y. C.; HUANG, T. I.; LIN, C. Y.; CHANG, J. S. Dark Hydrogen Fermentation from Hydrolyzed Starch Treated with Recombinant Amylase Originating from *Caldimonas taiwanensis* On1. **Biotechnology Progress**, v. 23, p. 1312-1320, 2007.

CHEN, W.; CHEN, S.; KUMAR KHANAL,S.; SUNG, S. Kinetic study of biological hydrogen production by anaerobic fermentation. **International Journal of Hydrogen Energy**, v.31, p. 2170-2178, 2006.
CHEONG, D.Y.; HANSEN, C.L. Acidogenesis characteristics of natural, mixed anaerobes converting carbohydrate-rich synthetic wastewater to hydrogen. **Process Biochemistry**, v.41, p. 1736-1745, 2006.

CHERNICHARO, C.A.L. **Princípio do Tratamento Biológico de Águas Residuárias - Reatores Anaeróbios**, Volume 5. Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental – DESA da UFMG, Belo Horizonte - MG, 1997.

CHIN, L.H.; CHEN, Z. S.; CHOU, C.P. Fed-batch Operation Using *Clostridium acetobutylicum* Suspension Culture as Biocatalyst for Enhancing Hydrogen Production. **Biotechnology and Bioprocess**, v. 19, p. 383-388, 2003.

COLLET, C.; ADLER, N.; SCHWITZGUEBEL, J. P.; PERINGER, P. Hydrogen production by *Clostridium thermolacticum* during continuous fermentation of lactose. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 29, p. 1479-1485, 2004.

DARBROCK, B.; BAHL, H.; GOTTSCHALK, G. Parameters affecting solvent production by *Clostridium pasteurianum*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.58, p.1233–1239, 1992.

DAS, D.; VEZIROGLU, T. Hydrogen production by biological processes: a survey of literature. **International Journal of Hydrogen Energy**, v.26, p.13–28, 2001.

DEL BIANCHI, V. L. **Balanços de massa e energia do processamento de farinha de mandioca em uma empresa de médio porte do Estado de São Paulo**. Botucatu, 1998. 107p. Tese (Doutorado em Ciências Agrônômicas) - Universidade Estadual Paulista (UNESP).

DURRE, P.; HOLLERGSCHWANDNER, C. Initiation of endospore formation in *Clostridium acetobutylicum*. **Anaerobe**, v.10, p. 69–74, 2004.

ERKMEN, O. Mathematical modeling of *Escherichia coli* inactivation under high-pressure carbon dioxide. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 92, p. 39-43, 2001.

FABIANO, B.; PEREGO, P. Thermodynamic study and optimization of hydrogen production by *Enterobacter aerogenes*. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 27, p. 149–156, 2002.

FAN, Y.T.; LI, C.L.; LAY, J.J.; HOU, H.H.; ZHANG, G.S. Optimization of initial substrate and pH levels for germination of sporing hydrogen producing anaerobes in cow dung compost. **Bioresource Technology**, v. 91, p. 189–193, 2004.

FANG, H. H. P.; ZHANG, T.; LIU H. Microbial diversity of mesophilic hydrogen producing sludge. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 58, p. 112–118, 2002.

FANG, H.; LI, C.; ZHANG, T. Acidophilic biohydrogen production from rice slurry. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 31, p. 683–92, 2006.

FANG, H.P.; ZHANG, T.; LIU H. Effect of pH on hydrogen production from glucose by a mixed culture. **Bioresource Technology**, v. 82, p.87–93, 2002.

FEIDEN, A. **Tratamento de águas residuárias de indústrias de fécula de mandioca através de biodigestor anaeróbio com separação de fases em escala piloto**. Botucatu, 2001. 120p. Tese (Doutorado em Agronomia/Energia na Agricultura) - Universidade Estadual Paulista.

FELIPE, F. I.; BROEK, L. **A polêmica adição de derivados de mandioca à farinha de trigo**. In. Centro de Estudos Avançados em Economia Aplicada/Esalq-USP. Disponível em: <http://www.cepea.esalq.usp.br/pdf/Cepea_mandioca_trigo.pdf>. Acesso em: 17 de Abril, 2008.

FIORETTO, R.A. Uso direto da manipueira em fertirrigação. In: CEREDA, M.P (coord): **Manejo, Uso e Tratamento de Subprodutos da Industrialização da Mandioca**. São Paulo: Fundação CARGILL: v. 4., p.67 – 79 (Séries culturas de tuberosas amiláceas Latino americanas), 2001.

FLOGIO M. A.; PANORATO, S.; CEREDA, M.; CAGNON, J. Biorremediação do resíduo líquido (manipueira) produzido por indústrias de farinha de mandioca (*Manihot esculenta crantz*). In: **Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia**, 2000, Fortaleza - CE. Livro de Resumos. 2000.

FONSECA, G.G. **Produção de Polihidroxialcanoatos por *Escherichia coli* recombinante**. Florianópolis, 2003. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) - Universidade Federal de Santa Catarina.

GINKEL, S.V.; LOGAN, B. Increased biological hydrogen production with reduced organic loading. **Water Research**, v.39, P. 3819-3826, 2005.

GINKEL, S.V.; SUNG, S.W.; LAY, J.J. Biohydrogen production as a function of pH and substrate concentration. **Environmental Science and Technology**, v.35,p.4726–4730, 2001.

GIRBAL, L.; CROUX, C.; VASCONCELOS, I.; SOUCAILLE, P. Regulation of metabolic shifts in *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824. **FEMS Microbiol Rev.**, v. 17, p. 287- 297, 1995(a).

GIRBAL, L.; VASCONCELOS, I.; SAINT-AMANS, S.; SOUCAILLE, P. How neutral red modified carbon and electron flow in *Clostridium acetobutylicum* grown in chemostat culture at neutral pH. **FEMS Microbiol Rev.**, v. 16, p.151-162, 1995(b).

GRUPE, H.; GOTTSCHALK, G. Physiological events in *Clostridium acetobutylicum* during the shift from acidogenesis to solventogenesis in continuous culture and presentation of a model for shift induction. **Applied and Environmental Microbiology**, v.58, p.3896- 3902, 1992.

HAWKES, F. R.; DINSDALE, R.; HAWKES, D. L.; HUSSEY, I. Sustainable fermentative hydrogen production: challenges for process optimization. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 27, p. 1339-1347, 2002.

HAWKES, F. R.; HUSSY, I.; KYAZZE, G.; DINSDALE, R.; HAWKES, D. Continuous dark fermentative hydrogen production by mesophilic microflora: Principles and progress. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 32, p. 172-184, 2007.

HUSSY, I.; HAWKES, R.R.; DIMDALE, R.; HAWKES, D.L. Continuous fermentative hydrogen production from sucrose and sugarbeet. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 30, p. 471-483, 2005.

IKE, A., TODA, N., TSUJI, N., HIRATA, K., MIYAMOTO, K. Hydrogen photoproduction from CO₂-fixing microalgal biomass: Application of halotolerant photosynthetic bacteria. **J. Journal of fermentation and bioengineering**, v.84, p.606–609, 1997.

KAPDAN, I. K.; KARGI, F. Bio-hydrogen production from waste materials. **Enzyme and Microbial Technology**, v.38, p. 569-582, 2006.
KARNHOLZ, A.; KUSE, K.; GOSSNER, A.; SCHRAMM, A.; DRAKE, H. L. Tolerance and metabolic response of acetogenic bacteria toward oxygen. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, p. 1005–1009, 2002.

KATAOKA N.; MIYA A.; KIRIYAMA K. Studies on hydrogen production by continuous culture system of hydrogen-producing anaerobic bacteria. **Water Science and Technology**, v.36, p.41–47, 1997.

KAWASAKI, S.; ISHIKURA, J.; WATAMURA, Y.; NIIMURA, Y. Identification of O₂-induced peptides in an obligatory anaerobe, *Clostridium acetobutylicum*. **FEBS Letters**, v. 571, p. 21–25, 2004.

KAWASAKI, S.; WATAMURA, Y.; ONO, M.; WATANABE, T.; TAKEDA, K.; NIIMURA, Y. Adaptive responses to oxygen stress in obligatory anaerobes *Clostridium acetobutylicum* and *Clostridium aminovalericum*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, p. 8442-8450, 2005.

KHANAL, S. K.; CHEN, W. H.; LI, L.; SUNG, S. Biological hydrogen production: effects of pH and intermediate products. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 29, p. 1123–1131, 2004.

KOKU, H., EROGLU, I. Aspects of metabolism of hydrogen production by *Rhodobacter sphaeroides*. **International Journal of Hydrogen Energy**, v.27, p.1315– 1329, 2002.

KOTAY, S.; DAS, D. Microbial hydrogen production with *Bacillus coagulans* IIT-BT S1 isolated from anaerobic sewage sludge. **Bioresource Technology**, v.98, p.1183-1190, 2007.

KUMAR, N.; DAS, D. Enhancement of hydrogen production by *Enterobacter cloacae* IIT-BT 08. **Process Biochemistry**, v. 35, p.589–593, 2000.

LAY, J.J. Modeling and optimization of anaerobic digested sludge converting starch to hydrogen. **Biotechnology and Bioengineering**, v.68 p. 269–278, 2000.

LAY, J.J.; LEE, Y.J.; NOIKE, T. Feasibility of biological hydrogen production from organic fraction of municipal solid waste. **Water Research**, v.33, p. 2579–2586, 1999.

LAY, J. J.; NOIKE, T. Hydrogen production and conversion of cellulose by anaerobic. digested sludge. *J. Environ. Syst. Eng*, v.13, p. 97-104, 1999.

LEE, C. M.; CHEN, P. C.; WANG, C.C.; TUNG, Y. C. Photohydrogen production using purple nonsulfur bacteria with hydrogen fermentation reactor effluent. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 27, p. 1297-1302, 2002.

LEE, Y. J.; MIYAHARA, T.; NOIKE, T. Effect of pH on the microbial hydrogen fermentation. Asian Waterqual '99, IWAQ Asia-Pacific Regional Conference, 1, p. 215-220, 1999.

LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de bioquímica**. Editora: Sarvier, São Paulo, 2000.

LEVIN, D.B.; PITT, L.; LOVE, M. Biohydrogen production: prospects and limitations to practical application. **International Journal of Hydrogen Energy**, v.29, p.173–185, 2004.

LIMA, J.W.C. **Análise ambiental: processo produtivo de polvilho em indústrias do extremo sul de Santa Catarina**. Florianópolis, 2001. 131f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Produção) – Universidade Federal de Santa Catarina.

LIN, C.Y.; LAY, C.H. Carbon/nitrogen-ratio effect on fermentative hydrogen production by mixed microflora. **International Journal of Hydrogen Energy**, v.29, p.41–45, 2004.

LIN, P. Y.; WHANG, L. M.; WU, Y. R.; REN, W. J. HSIAO, C. J.; LI, S. L.; CHANG, J. S. Biological hydrogen production of the genus *Clostridium*: Metabolic study and mathematical model simulation. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 32, p. 1728-1735, 2007.

LIU, G.; SHEN, J. Effects of culture and medium condition on hydrogen production from starch using anaerobic bacteria. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 98, p. 251–256, 2004.

LOGAN, B. E.; OH, S. E. Biological hydrogen production measured in batch anaerobic respirometers. **Environmental Science & Technology**, v. 36, p. 2530-2535, 2002.

MANISH, S.; BANERJEE, R. Comparison of biohydrogen production processes. **International Journal of Hydrogen Energy**, v.33, p.279-286, 2008.

MARQUES, J. A.; PRADO, I.N.; ZEOULA, L.M.; ALCADE, C.R. Avaliação da Mandioca e Seus Resíduos Industriais em Substituição ao Milho no Desempenho de Novilhas Confinadas. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 29, p. 1528-1536, 2000.

MATSUMOTO, M.; NISHIMURA, Y. Hydrogen production by fermentation using acetic acid and lactic acid. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v.103, p. 236-241, 2007.

MAXIME, D.; MARCOTTE, M.; ARCAND, Y. Development of eco-efficiency indicators for the Canadian food and beverage industry. **Journal of Cleaner Production**, v.14, p.636-648, 2006.

MELIS, A.; HAPPE, T. Hydrogen production. Green algae as a source of energy. **Plant. Physiology**, v.127, p. 740-748, 2001.

MENES, R. J.; Microbiologia, Ecologia y Bioquímica. In: SCHMIDELL, W.; SOARES, H. M.; ECHEBERRERE, C.; MENES, R. J.; BERTOLA, N.; CONTRERA, E. M. **Tratamento Biológico de Águas Residuárias**. Florianópolis: Editora Tribo da Ilha, v. 1, cap. 5, p. 367-380, 2007.

MILLER, G. L; Use of dinitrosalicylle acid for determination of reducing sugar. **Anal. Chem.**, v.11, p. 426-428, 1959.

MINISTÉRIO DE MINAS E ENERGIA. **Balanco Energético Nacional 2008: Resultados preliminares**. Rio de Janeiro: Empresa de Pesquisa energética – EPE, p. 13, 2008.

MINNAN, L.; JINLI, H.; XIAOBIN, W.; HUIJUAN, X.; JINZAO, C.; CHUANNAN, L. Isolation and characterization of a high H₂-producing strain *Klebsialle oxytoca* HP1 from a hot spring. **Research in Microbiology**, v. 156, p. 76-81, 2005.

MIZUNO, O.; DINSDALE, R.; HAWKES, F.R.; HAWKES, D.L.; NOIKE, T. Enhancement of hydrogen production from glucose by nitrogen gas sparging. **Bioresource Technology**, v.73, p. 59-65, 2000.

MOMIRLAN, M.; VEZIROGLU, T. Current status of hydrogen energy. **Renewable Sustainable Energy Reviews**, v.6, p.141-179, 2002.

MORETTO, E.; FETT, R. **Tecnologias de óleos e gorduras vegetais na indústria de alimentos**. São Paulo: Livraria Varela, 1998. 151p.

MORIMOTO, M.; ATSUKO, M.; ATIF, A.Y.; NGAN, M. A.; FAKHRUL-RAZI, A.; IYUKE, S. E.; BAKIR, A. M. Biological production of hydrogen from glucose by natural anaerobic microflora. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 29, p. 709-713, 2004.

MORRIS, D. The next economy: from dead carbon to living carbon. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.86, p.1743-1746, 2006.

MUCCILLO, D. **Estudos *In Silico* para a Produção Bacteriana de Hidrogênio**. Santa Catarina, 2007. 108p. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Química) - Universidade Federal de Santa Catarina.

NANDI, R.; SENGUPTA, S. Microbial production of hydrogen: an overview. **Critical Reviews in Microbiology**, v.24, p.61-84, 1998.

NOLLING, J.; BRETON, G.; OMELCHENKO, M.; MAKAROVA, K.; ZENG, Q.; GIBSON, R.; LEE, H. M.; DUBOIS, J.; QIU, D.; HITTI, J.; WOLF, Y. I.; TATUSOV, R. L.; SABATHE, F.; DOUCETTE-STAMM, L.; SOUCAILLE, P.; DALY, M. J.; BENNETT, G. N.; KOONIN, E. V.; SMITH, D. R. Genome sequence and comparative analysis of the solvent-producing bacterium *Clostridium acetobutylicum*. **Journal of Bacteriology**, v.183, p. 4823-4838, 2001.

NUYTS, S.; VAN MELLAERT, L.; THEYS, J.; LANDUYT, W.; LAMBIN, P.; ANNE, J. Clostridium spores for tumor-specific drug delivery. **Anticancer Drugs**, v. 13, p. 115-25, 2002.

OH, S. E.; IYER P.; BRUCE M. A.; LOGAN B. E. Biological hydrogen production using a membrane bioreactor. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 87, p. 119-27, 2004.

OH, Y. K.; SEOL, E. H.; KIM, J.R.; PARK, S. Fermentative biohydrogen production by a new chemoheterotrophic bacterium

Citrobacter sp. Y19. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 28, p.1353–1359, 2003.

OH, Y. K.; SEOL, E. H.; LEE, E.; PARK, S. Fermentative hydrogen production by a new chemolithotrophic bacterium *Rhodopseudomonas palustris* P4. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 27, p. 1373–1379, 2002.

OLIVEIRA, L.A.; AMORIM, T.S.; SANTOS, D.V.; SILVA, J. Composição físico-química de variedades de mandioca de mesa cultivadas no sistema orgânico. **Revista Raízes e Amidos Tropicais – UNESP**, v. 3, 2007.

PAQUET, V.; CROUX, C.; GOMA, G.; SOUCAILLE, P. Purification and Characterization of the Extracellular α -Amylase from *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824." **Applied and Environmental Microbiology**, v. 57, p. 212-218, 1990.

PINTO, F.; TROSHINA, O.; LINDBLAD, P. A brief look at three decades of research on cyanobacterial hydrogen evolution. **International Journal of Hydrogen Energy**, v.27, p.1209–1215, 2002.

PLEVIN, R.; DONNELLY, D. Converting waste to energy and profit: Tapioca starch power in Thailand. **Renewable Energy World**, v. set/out, p. 74-81, 2004.

PONTE, J. J. Histórico das pesquisas sobre a utilização da manipueira (extrato líquido das raízes de mandioca) como defensivos agrícola. **Fitopatol. Venez**, v. 2, p. 2-5, 1992.

QURESHI, N.; LI, X. L.; HUGHES, S.; SAHA, B.; COTTA, M. Butanol production from corn fiber xylan using *Clostridium acetobutylicum*. **Biotechnology. Progress**, v. 22, p. 673 – 680, 2006.

RAGAUSKAS, A.; WILLIAMS, C.; DAVISON, B.; BRITOVSEK, G.; CAIRNEY, J. The path forward for biofuels and biomaterials. **Science**, v.311, p.484–489, 2006.

REUNGSANG, A., SANGYOKA, S., IMAI, T.; CHAIPRASERT, P. Biohydrogen Production from Cassava Starch Manufacturing Wastewater. In: **The Joint International Conference on Sustainable Energy and Environment (SEE)**, 2004, Hua Hin, Thailand. 2004.

REUNGSANG, A.; SANGYOKA, S.; CHAIPRASET, P.; IMAI, T. Factors affecting hydrogen production from cassava wastewater by a co-culture of anaerobic sludge and *Rhodospirillum rubrum*. **Pakistan Journal of Biological Sciences**, v. 10, p. 3571-3577, 2007.

ROOS, T. Indices for performance evaluation of predictive models in food microbiology. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 81, p. 501-508, 1996.

SAMPAIO, M. C.; NEUBERT, E. O. História da Mandioca em Santa Catarina. In: **Exposição sobre a História da Mandioca em Santa Catarina** - EPAGRI (Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina), 2007, Florianópolis – SC. 2007.

SANGYOKA, S.; REUNGSANG, A.; MOONAMART, S. Repeated-Batch fermentative for bio-hydrogen production from cassava starch manufacturing wastewater. **Pakistan Journal of Biological Sciences**, v. 10, p. 1782-1789, 2007.

SANTOS, G. T.; ÍTAVO, L. C. V.; MODESTO, E. C.; JOBIM, C. C.; DAMASCENO, J. C. 2001. Silagens alternativas de resíduos agro-industriais. In: **Simpósio Sobre Produção e Utilização de Forragens Conservadas**, 2001, Maringá – PR. Anais do Simpósio. 2001.

SAWYER, C. N.; MCCARTY, P.L. **Basic concepts from biochemistry**. In: Chemistry for Environmental Engineering. McGraw-Hill, New York, NY, 1978.

SIEMERINK, M. **Revival of butanol production by Clostridia**. Wageningen University, Netherlands. Laboratoire de Microbiologie (Département D'agrotechnologie et Sciences Alimentaires). Disponível em: <<http://www.mib.wur.nl/NR/rdonlyres/D0CF982E-0E37-44D9-BB01-8057D72D8AF2/69639/2008MarcoSiemerinkMscthesisprojectproposal.pdf>>. Acesso em: 18 de Junho, 2008.

SMITH, G.D.; EWART, G.D.; TUCKER, W. Hydrogen production by cyanobacteria. **International Journal of Hydrogen Energy**, v.17, p.695–698, 1992.

SPARLING, R.; RISBEY, D.; POGGI-VARALDO, H.M. Hydrogen production from inhibited anaerobic composters. **International Journal of Hydrogen Energy**, v.22, p. 563–566, 1997.

SPEECE, R. E. **Anaerobic biotechnology for industrial wastewaters**. Vanderbilt University. Archae Press. United States of America, 1995.

TAGUCHI, F.; MIZUKAMI, N.; HASEGAWA, K.; SAITO-TAKI, T. Microbial conversion of arabinose and xylose to hydrogen by a newly isolated *Clostridium sp.* No.2. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 40, p. 228-233, 1994.

TANISHO S.; ISHIWATA, Y. Continuous hydrogen production from molasses by bacterium *Enterobacter aerogenes*. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 19, p. 807–812, 1994.

TERRACCIANO, J. S.; KASHKET, E. R. Intracellular conditions required for initiation of solvent production by *Clostridium acetobutylicum*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 52, p. 86-91, 1986.

UENO Y.; HARUTA S.; ISHII M.; IGARASHI Y. Microbial community in anaerobic hydrogen-producing microflora enriched from sludge compost. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 57, p. 555–562, 2001.

UENO Y.; SATO S.; MORIMOTO M. Hydrogen production from industrial wastewater by anaerobic microflora in chemostatculture. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 82, p. 194–197, 1996.

VALDEZ-VAZQUEZ, I.; RIOS-LEAL, E.; ESPARZA-GARCIA, F.; CECCHI, F.; POGGI-VARALDO, H.M. Semi-continuous solid substrate anaerobic reactors for H₂ production from organic waste: mesophilic versus thermophilic regime. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 30, p. 1383-1391, 2005.

VAN GINKEL, S.; SUNG, S.; LAY, J.J. Biohydrogen production as a function of pH and substrate concentration. **Environmental Science and Technology**, v. 35, p. 4726–4730, 2001.

VAN HAANDEL, A. C., LETTINGA, G. **Tratamento Anaeróbio de Esgotos: Um Manual para Regiões de Clima Quente**. Editora: Epgraf, Campina Grande, 1994.

VANDENBERG, L. P. S.; SOCCOL, C. R.; PANDEY, A.; LEBEAULT, J. M. Solid-state fermentation for the synthesis of citric acid by *Aspergillus niger*. **Bioresource Technology**, v. 34, p. 175-178, 2000.

VIGNAIS P. M.; BILLOUD. B.; MEYER, J. Classification and phylogeny of hydrogenases. **FEMS Microbiology Reviews**, v.25, p.455–501, 2001.

VRIJE, T.; CLAASSEN, P. A. Dark Hydrogen Fermentations. In: REITH, J. H.; WIJFFELS, R.H.; BARTEN, H.: **Bio-methane & Bio-hydrogen: Status and perspectives of biological methane and hydrogen production**. Holland: Dutch Biological Hydrogen Foundation: p. 103-123, 2003.

WANG, C. H.; CHANG, J.S. Continuous Biohydrogen Production from Starch with Granulated Mixed Bacterial Microflora. **Energy Fuels**, v. 22, p. 93-97, 2008.

WANG, C.; CHANG, C.; CHU, C.; LEE, D.; CHANG, B.; LIAO, C. Using filtrate of waste biosolids to effectively produce bio-hydrogen by anaerobic fermentation. **Water Research**, v. 37, p. 2789–2793, 2003.
WOSIACKI, G.; CEREDA, M. P. Valorização de resíduos do processamento da mandioca. **Exact and Soil Sciences, Agrarian S. and Engineering**, v.8, p.27-43, 2002.

WU, J. H.; LIN, C. Y. Biohydrogen production by mesophilic fermentation of food wastewater. **Water Science and Technology**, v. 49, p. 223–228, 2004.

YAMIN, J.; GUPTA, H.; BANSAL, B.; SRIVASTAVA, O. Effect of combustion duration on the performance and emission characteristics of a spark ignition engine using hydrogen as a fuel. **International Journal of Hydrogen Energy**, v.25, p.581–589, 2000.

YANG, P.; ZHANG, R.; MCGARVEY, J. A.; BENEMANN, J. R. Biohydrogen production from cheese processing wastewater by

anaerobic fermentation using mixed microbial communities. **International Journal of Hydrogen Energy**, v.32, p.4761-4771, 2007.

YOKOI, H.; MAEDA, Y.; HIROSE, J.; HAYASHI, S.; TAKASAKI, Y. H₂ production by immobilized cells of *Clostridium butyricum* on porous glass beads. **Biotechnology Techniques**, v. 11, p. 431-433, 1997.

YOKOI, H.; MAKI, R.; HIROSE, J.; HAYASHI, S. Microbial production of hydrogen from starch manufacturing wastes. **Biomass and Bioenergy**, v. 22, p. 389-395, 2002.

YOKOI, H.; SAITSU, A.; UCHIDA, H.; HIROSE, J.; HAYASHI, S.; TAKASAKI, Y. Microbial hydrogen production from sweet potato starch residue. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 91, p. 58-63, 2001.

ZHANG H.; BRUNS M. A.; LOGAN B. E.; KEIS, S.; SHAHEEN, R.; JONES, D.T. Emended descriptions of *Clostridium acetobutylicum* and *Clostridium beijerinckii*, and descriptions of *Clostridium saccharoperbutylacetonicum* sp. nov. and *Clostridium saccharobutylicum* sp. Nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 51, p. 2095-2103, 2001.

ZHANG H.; BRUNS M.A.; LOGAN B. E. Biological hydrogen production by *Clostridium acetobutylicum* in an unsaturated flow reactor. **Water Research**, v. 40, p. 728-34, 2006.

ZHANG, T.; LIU, H.; FANG, H.H.P. Biohydrogen production from starch in wastewater under thermophilic conditions. **Journal of Environmental Management**, v. 69, p. 149-156, 2003.

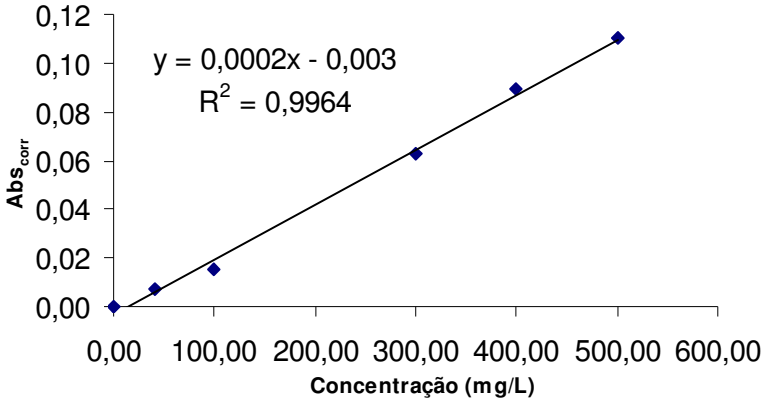
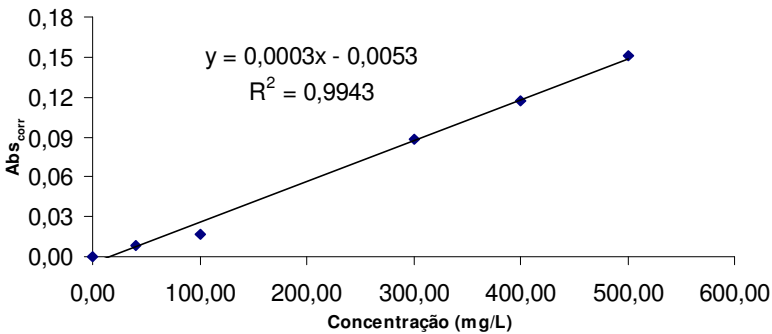
ZHU, H.; UEDA, S.; ASADA, Y.; MIYAKE, J. Hydrogen production as a novel process of wastewater treatment—Studies on tofu wastewater with entrapped *R. sphaeroides* and mutagenesis. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 27, p. 1349-1357, 2002.

ZOTOU, A.; LOUKOU,Z.; KARAVA, O. , Method Development for the Determination of Seven Organic Acids in Wines by Reversed-Phase High Performance Liquid Chromatography. **Chromatographia**. v. 60, p. 39-44, 2004.

ZURAWSKI, D.; MEYER, M.; STEGMANN, R. Fermentative Production of Biohydrogen from Biowaste using Digested Sewage

Sludge as Inoculum. **Tenth International Waste Management and Landfill Symposium**, 2005.

ANEXOS

Figura A.1 – Curva padrão para a determinação de DQO (14/3/08).**Figura A.2** – Curva padrão para a determinação de DQO (12/7/08).**Figura A.3** – Curva padrão para a determinação de DQO (21/10/08).

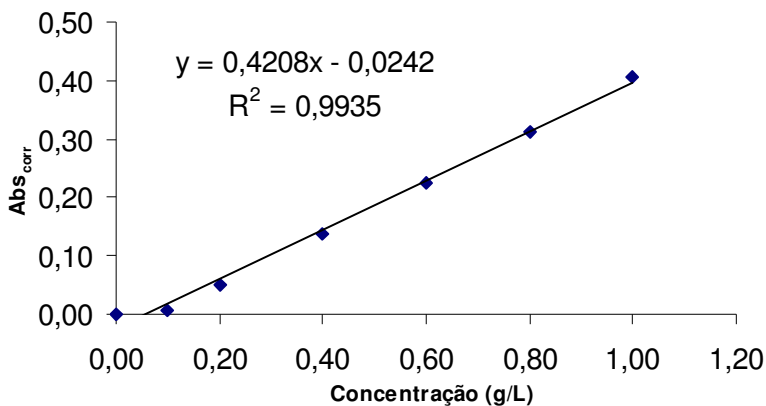


Figura A.4 - Curva de calibração para a determinação da concentração de açúcares redutores pelo método do ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) 05/07/08.

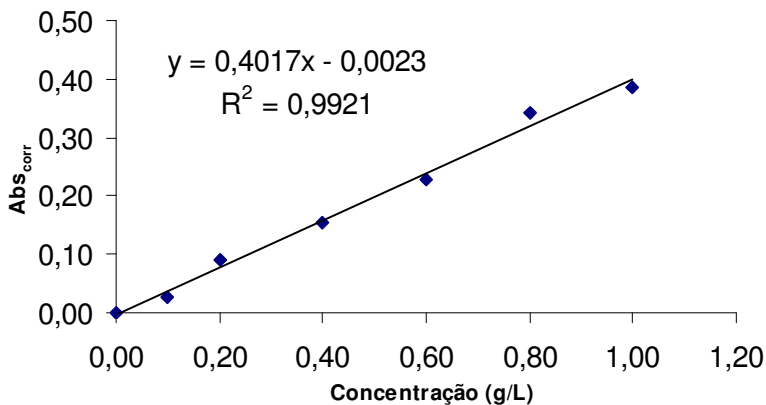


Figura A.5 - Curva de calibração para a determinação da concentração de açúcares redutores pelo método do ácido 3-5 dinitrosalicílico (DNS) 23/10/08.

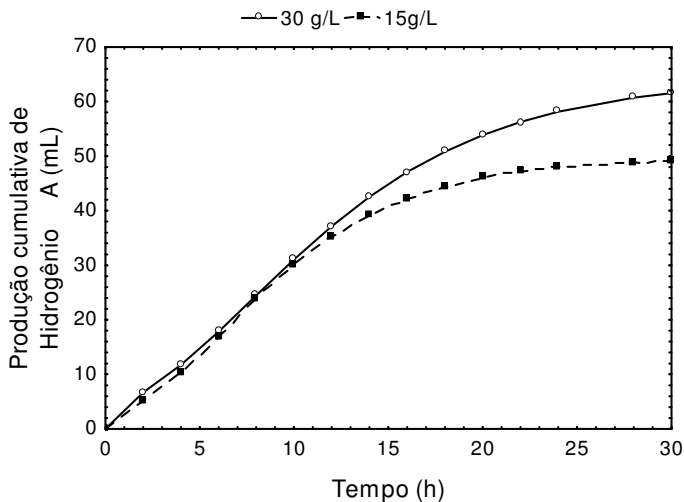


Figura A.6 - Curva de produção de hidrogênio ajustada pelo modelo modificado de Gompertz, nas concentrações iniciais de 30 e 15 gDQO/L.

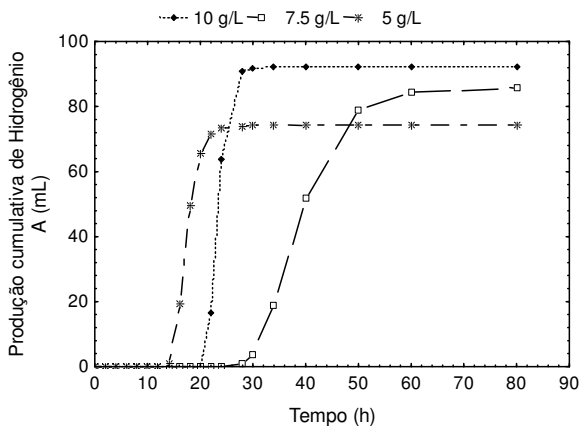


Figura A.7 - Curva de produção de hidrogênio ajustada pelo modelo modificado de Gompertz, nas concentrações iniciais de 10, 7,5 e 5 gDQO/L.

Tabela A.11 – Dados obtidos com o acompanhamento do Ensaio I: 30 gDQO/L de manipueira, pH inicial 7 e temperatura 36°C

Tempo (h)	Volume de Hidrogênio (mL)				pH	DQO (g/L)
	Biorreator 1	Biorreator 2	Média	Desvio Padrão		
0	0	0	0	0,00	7	30,12
1	6	6	6	0,00	7	-
2	8	6	7	1,41	6,5	-
3	10	16	13	4,24	6,5	-
4	37	40	38,5	2,12	6	28,98
5	42,5	48,5	45,5	4,24	6	-
6	49	61	55	8,49	6	-
7	46	66	56	14,14	5,5	-
8	49	65	57	11,31	5,5	26,78
9	57	61	59	2,83	5	-
11	52	68	60	11,31	5	-
12	43	47	45	2,83	4,5	26,29
15	33	39	36	4,24	4,5	-
18	18	22	20	2,83	4,5	25,30
21	15	13	7	1,41	4,5	25,44
23	0	0	0	0,00	4	25,30
24	0	0	0	0,00	4	25,12

Tabela A.12 – Dados obtidos com o acompanhamento do Ensaio II: 15 gDQO/L de manipueira, pH inicial 7 e temperatura 36°C

Tempo (h)	Volume de Hidrogênio (mL)					pH	DQO (g/L)
	*BR 1	BR 2	BR 3	Média	Desvio Padrão		
0	0	0	0	0	0,00	7	15,68
1	3,1	2,9	3,1	3,0	0,12	7	15,27
2	5	6	5,5	5,5	0,50	6,5	14,82
3	6,5	7,3	6,9	6,9	0,40	6,5	14,76
4	30	35	29	31,33	3,21	6	12,23
5	37	41	40	39,33	2,08	6	11,69
6	44	47	40	43,67	3,51	6	11,44
7	42	51	61	51,33	9,50	5,5	11,28
8	59	51	48	52,67	5,69	5,5	11,26
9	60	55	56	57	2,65	5	11,23
11	59	59	50	56	5,20	5	10,94
12	55	61	51	55,67	5,03	4,5	10,91
15	19	13	15	16,67	3,06	4,5	10,26
18	3	2,5	3,5	3	0,50	4,5	10,18
21	3	2,5	1,5	2,33	0,76	4,5	10,17
23	0	0	0	0	0,00	4,5	10,16
24	0	0	0	0	0,00	4	10,15

Tabela A.13 – Dados obtidos com o acompanhamento do Ensaio III: 10 gDQO/L de manipueira, pH inicial 7 e temperatura 36°C

Tempo (h)	Volume de Hidrogênio (mL)					pH	DQO (g/L)
	BR 1	BR 2	BR 3	Média	Desvio Padrão		
0	0	0	0	0	0	7	10,77
8	0	0	0	0	0	7	-
12	0	0	0	0	0	7	-
14	0	0	0	0	0	7	10,59
18	0	0	0	0	0	7	8,45
20	0	0	0	0	0	6,5	8,19
24	9	11	10	10	1	6,5	7,01
26	12	15	14	13,7	1,5	6	6,62
30	24	29	25	26	2,6	6	-
34	55	54	50	53	2,6	6	-
40	78	85	79	80,7	3,8	5	-
44	75	80	77	77,3	2,5	7	6,35
50	70	80	78	76	5,3	7	-
55	66	76	64	68,7	6,4	6	-
60	30	34	31	31,7	2,1	5,5	6,25
64	16	21	21	19,3	2,9	5	-
70	13	15	15	14,3	1,2	4,5	-
74	5	6	7	6	1,0	4,5	-
78	0	0	0	0	0	4,5	6,25

Tabela A.14 – Dados obtidos com o acompanhamento do Ensaio IV: 7.5 gDQO/L de manipueira, pH inicial 7 e temperatura 36°C

Tempo (h)	Volume de Hidrogênio (mL)				pH	DQO (g/L)
	Biorreator 1	Biorreator 2	Média	Desvio Padrão		
0	0	0	0	0	7	7,46
4	0	0	0	0	7	7,37
8	0	0	0	0	7	7,31
16	0	0	0	0	7	7,22
24	0	0	0	0	6,5	6,42
30	4	6	5	1,41	6,5	6,20
32	9	9	9	0	6,5	5,89
34	13,5	16,5	15	2,12	6	5,65
38	21	25	23	2,83	6	5,62
40	34	38	36	2,83	6	5,61
46	46	50	48	2,83	5	-
46	55	54	54,5	0,71	7	-
50	50	51	50,5	0,71	7	-
60	44	43	43,5	0,71	6	5,60
70	23	22	22,5	0,71	5	5,60
80	0	0	0	0	4,5	5,60

Tabela A.15 – Dados obtidos com o acompanhamento do Ensaio V: 5 gDQO/L de manipueira, pH inicial 7 e temperatura 36°

Tempo (h)	Volume de Hidrogênio (mL)					pH	DQO (g/L)
	BR 1	BR 2	BR 3	Média	Desvio Padrão		
0	0	0	0	0	0	7	5,23
8	0	0	0	0	0	7	5,01
12	0	0	0	0	0	7	-
14	6	5	5	5,3	0,58	7	-
18	8	7	9	8	1	6,5	-
20	14	14	16	14,7	1,15	6,5	-
24	25	22	22	23	1,73	6	4,21
30	42	41	43	42	1	6	4,09
34	60	50	50	53,3	5,77	5	-
40	58	58	65	60,3	4,04	7	3,78
50	55	59	66	60	5,57	7	-
55	43	50	54	49	5,57	6	-
60	40	47	44	43,7	3,51	5,5	3,55
64	38	33	30	33,7	4,04	5	-
70	22	26	26	25,3	3,06	4,5	-
80	0	0	0	0	0	4,5	-
90	0	0	0	0	0	4,5	3,5