

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CAMPUS SOROCABA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PLANEJAMENTO E USO DOS RECURSOS
RENOVÁVEIS

MARIANNE AKEMI NERONI CHOGI

**PRODUÇÃO DE BIOCOMBUSTÍVEIS A PARTIR DE GLICOSE E
MANIPUEIRA**

Sorocaba
2016

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CAMPUS SOROCABA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PLANEJAMENTO E USO DOS RECURSOS
RENOVÁVEIS

MARIANNE AKEMI NERONI CHOGI

**PRODUÇÃO DE BIOCOMBUSTÍVEIS A PARTIR DE GLICOSE E
MANIPUEIRA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Planejamento e Uso dos Recursos Renováveis, para obtenção do título de mestre em Planejamento e Uso dos Recursos Renováveis.

Orientação: Prof^ª. Dr^ª. Iolanda Cristina Silveira Duarte

Co-orientação: Prof^º Dr. Ariovaldo José da Silva

Sorocaba
2016

Neroni Chogi , Marianne Akemi

Produção de Biocombustíveis a partir de glicose e manipueira / Marianne Akemi Neroni Chogi . -- 2016.

94 f. : 30 cm.

Dissertação (mestrado)-Universidade Federal de São Carlos, campus Sorocaba, Sorocaba

Orientador: Profa.Dra. Iolanda Cristina Silveira Duarte

Banca examinadora: Dra. Paula Rúbia Ferreira Rosa; Dra. Sandra Imaculada Maintinguer

Bibliografia

1. Produção de biocombustíveis. 2. Água residual do processamento de mandioca - manipueira. 3. Gênero Clostridium. I. Orientador. II. Universidade Federal de São Carlos. III. Título.

MARIANNE AKEMI NERONI CHOGI

**PRODUÇÃO DE BIOCOMBUSTÍVEIS A PARTIR DE
GLICOSE E MANIPUEIRA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação para obtenção do título de
mestre em Planejamento e Uso de Recursos Renováveis.
Universidade Federal de São Carlos.
Sorocaba, 15 de julho de 2016.

Coorientador:




Dr. Ariovaldo José da Silva
Universidade de Campinas - UNICAMP

Examinadores:



Dra. Sandra Imaculada Maintinguer
Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" – UNESP Rio Claro



Dra. Paula Rúbia Ferreira Rosa
Universidade Federal de São Carlos – UFSCar Campus São Carlos

DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho aos meus pais, meus mentores e apoiadores.

AGRADECIMENTO

Para a realização desse projeto muitas pessoas devem ser agradecidas, graças ao apoio e ajuda tanto técnica quanto emocional pude chegar ao fim dessa jornada.

Agradeço a professora Iolanda Cristina Silveira Duarte que proporcionou a realização deste trabalho através da sua orientação, agradeço a dedicação e paciência.

Esse trabalho não poderia ter sido realizado sem a parceria e ajuda do professor Ariovaldo José da Silva e Giovani Brota responsável técnico pelo Laboratório de Saneamento - FEAGRI / Unicamp, os quais agradeço pela ajuda e dedicação.

Tenho um agradecimento muito especial pela Ana Carolina Vieira Araújo, que não gosta que eu a chame de professora, mas que realizou esse papel ao me ajudar e socorrer diversas vezes quando necessitei.

Graças à companhia, risadas, conversas e apoio do pessoal do Laboratório de Microbiologia Ambiental – UFSCar Sorocaba as horas intensas de trabalho se tornaram mais agradáveis, obrigada Luana, Maria, Fran, Tamara e Mônica.

“ Se nós começamos temos que terminar ” como dizia Mayara de Mello, grande companheira desses dois anos nos experimentos, no laboratório, em congressos, em conversas, nos conselhos e nas madrugadas no laboratório, em decorrência dessa amizade encontrei grande apoio para realizar esse trabalho.

Agradeço meus pais por toda a dedicação até agora e apoio nessa minha escolha.

RESUMO

CHOGI, Marianne Akemi Neroni. Produção de biocombustíveis a partir de glicose e manipueira. 2016. 94f. Dissertação (Mestrado em Planejamento e Uso dos Recursos Renováveis) – Universidade Federal de São Carlos, Sorocaba, 2016.

O presente trabalho teve por objetivo a produção de biocombustíveis a partir de manipueira (efluente oriundo do processamento da mandioca) na presença de duas cepas *Clostridium beijerinckii* (ATCC 10132) e *Clostridium acetobutylicum* (ATCC 824), e quatro diferentes inóculos pré-tratados termicamente, sendo estes: ES - efluente de biodigestor de suinocultura situado na Granja Água Branca no município de Itu; LR - lodo anaeróbio de estação de tratamento de esgoto sanitário do município de Porto Feliz; EB - esterco bovino; SL - solo de cultivo de cana-de-açúcar da região de Sorocaba. Foram utilizados como substratos a manipueira e glicose separadamente. Ambas as cepas produziram biocombustíveis, no entanto a mais eficiente foi *Clostridium beijerinckii* (ATCC 10132) que produziu $0,33 \pm 0,08$ g L⁻¹ de butanol e $1,65 \pm 0,23$ g L⁻¹ de etanol a partir de 30 g L⁻¹ de glicose. A partir desses resultados a produção de biocombustíveis foi avaliada nos dois diferentes substratos: manipueira e glicose, com a manipueira (10 g L⁻¹ de açúcar redutor) obteve-se produção de butanol de $0,64 \pm 0,1$ g L⁻¹ e etanol de $2,47 \pm 0,070$ g L⁻¹, enquanto nos ensaios com glicose a 10 g L⁻¹ a produção de butanol foi de $0,27 \pm 0,13$ g L⁻¹ e etanol foi de $1,72 \pm 0,18$ g L⁻¹. Os inóculos pré-tratados não produziram biocombustíveis com ambos os substratos, porém observou-se produção de ácido butírico de $0,31 \pm 0,04$ g L⁻¹ para o EB (esterco bovino) e $0,12 \pm 0,013$ g L⁻¹ para o ES (efluente de suinocultura). Como o inóculo EB apresentou uma maior produção de ácido butírico essa cultura foi escolhida para a fermentação com manipueira com demanda química de oxigênio (DQO) de 5 g L⁻¹ (correspondendo a 2 g L⁻¹ de açúcar redutor). Análises de biologia molecular foram realizadas para confirmar a presença do gênero *Clostridium* no inóculo EB, utilizando os primers Sj-F e Sj-R específico para o gênero *Clostridium*. Com a confirmação da presença desse, um novo ensaio com manipueira com DQO de 5 g L⁻¹ foi realizado com a *C. beijerinckii* e com o inóculo EB visando definir a necessidade de adição de nutrientes à manipueira para obtenção de biocombustíveis. A fermentação da manipueira foi realizada com a cepa *C. beijerinckii* (CB) sem enriquecimento do meio e com inóculo esterco bovino com enriquecimento (EBE) e sem enriquecimento (EBS). Com a cepa padrão a produção de biocombustíveis foi de 0,02 g L⁻¹ de butanol e 0,69 g L⁻¹ de etanol em 12 h de fermentação. Para o EBE após 106 h de fermentação ocorreu a produção de etanol igual a 0,168 g L⁻¹ e para o EBS após 12 h a produção para o mesmo álcool foi de 0,026 g L⁻¹. Esses resultados demonstraram a viabilidade da utilização da manipueira como substrato para a produção de butanol e etanol com cepas de *Clostridium* e a possibilidade de produção de butanol pelos inóculos, pois o ácido butírico é um produto intermediário da via que leva à síntese de butanol.

Palavras chaves: Biobutanol. Bioetanol. *Clostridium*. Manipueira.

ABSTRACT

CHOGI, Marianne Akemi Neroni. Biofuel production from glucose and cassava. 2016. 94 f. Dissertation (Master of Planning and Use of Renewable Resources) - Federal University of São Carlos, Sorocaba, 2016.

Biofuels are produced from clean alternative energy sources and one example is biobutanol, a fuel that can be produced by fermentation of different raw materials. The production of butanol is carried out by fermentative metabolism of solvent-producing microorganisms, with acetone and ethanol as major byproducts (ABE fermentation). This work aims to produce biobutanol using strains *Clostridium beijerinckii* (ATCC 10132) and *Clostridium acetobutylicum* (ATCC 824) and four different inoculum: ES - swine effluent digester located in the Água Branca Farm in the municipality of Itu; LR - UASB sludge of sewage treatment plant from the city of Porto Feliz; ES - cattle manure; SL - Soil from sugarcane cultivation in Sorocaba region. Glucose and cassava wastewater were used as substrate. The biobutanol production efficiency was evaluated for each strain and inoculum in fermentation batch reactors in which the sole substrate was glucose or cassava wastewater. Both strains produced biofuel, and *C. beijerinckii* (ATCC 10132) was more efficient yielding 0.33 ± 0.08 g L⁻¹ butanol and 1.65 ± 0.23 g L⁻¹ of ethanol from 30 g L⁻¹ of glucose. When cassava wastewater was used as substrate (10 g L⁻¹ of reducing sugar), the production of butanol was 0.64 ± 0.1 g L⁻¹ and ethanol was 2.47 ± 0.07 g L⁻¹ in comparison to 0.27 ± 0.13 g L⁻¹ butanol and 1.72 ± 0.18 g L⁻¹ of ethanol produced when *C. beijerinckii* were fed with glucose 10 g L⁻¹ as control. Fermentation inocula produced only butyric acid with concentrations of 0.31 ± 0.04 g L⁻¹ for cattle manure and 0.12 ± 0.013 g L⁻¹ for swine effluent. As the cattle manure showed higher production of butyric acid, this culture was chosen for fermentation with cassava wastewater at COD 5 g L⁻¹. First of all the inoculum's DNA was amplified with the pair of primers Sj-F and Sj-R specific for the genus *Clostridium*. With the confirmation of the clostridia presence, the fermentation with cassava wastewater at 5 g L⁻¹ of COD was performed. This fermentation was compared with the strain *C. beijerinckii* growing in medium without enrichment and cattle manure with and without medium enrichment. *C. beijerinckii* biofuel production was 0.02 g L⁻¹ of butanol and 0.69 g L⁻¹ of ethanol after 12 h of fermentation, while cattle manure fermentation yielded 0.168 g L⁻¹ of ethanol after 106 h in enriched medium and 0.026 g L⁻¹ of ethanol in medium without enrichment after 12 h. These results demonstrate the feasibility of using cassava as a substrate for the production of biobutanol, ethanol and the possibility of producing biobutanol by cattle manure and swine effluent since butyric acid is an intermediary product of the pathway leading to butanol synthesis.

Key words: Biobutanol. Bioethanol. *Clostridium*. Cassava wastewater.

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1 - Isômeros do butanol.....	15
Figura 2.2 - Síntese química do butanol: a) hidroformilação, b) Processo Reppe e c) hidrogenação de crotonaldeído.....	16
Figura 2.3 - Esquema da fermentação ABE por <i>C. acetobutylicum</i>	17
Figura 2.4 - Processo para obtenção de etanol	22
Figura 3.1 - Organograma experimental do ensaio com as cepas e glicose 30 g L ⁻¹	41
Figura 3.2 - Esquema da segunda parte experimental.....	43
Figura 3.3 - Produção de etanol e butanol no final da fermentação (144 h) utilizando 30 g L ⁻¹ de glicose.....	44
Figura 3.4 - Produção de ácido butírico, etanol e butanol por <i>Clostridium beijerinckii</i> nos diferentes substratos após 90 h em 10 g L ⁻¹ de glicose e manípueira 10 g L ⁻¹ de açúcar redutor.....	49
Figura 4.1 - Esquema para montagem dos reatores anaeróbios	69
Figura 4.2 - Gel de amplificação (1% de agarose) do inóculo com marcador molecular de 1Kb (a) controle negativo, (b) controle positivo, (c) e (d) amostra de DNA do inóculo EB (esterco bovino).....	70
Figura 4.3 - Consumo de açúcar durante a operação dos reatores anaeróbios com os inóculos: CB (<i>C. beijerinckii</i>), EBE (esterco bovino enriquecido), EBS (esterco bovino sem enriquecimento).....	71
Figura 4.4 - Produção de butanol pela cepa CB com manípueira DQO 5g L ⁻¹	72
Figura 4.5 - Crescimento de CB medido em densidade óptica 600 nm e consumo de glicose durante a operação do reator.....	72
Figura 4.6 - Leitura de pH durante a operação para os três inóculos: CB (<i>C. beijerinckii</i>), EBE (esterco bovino enriquecido), EBS (Esterco bovino sem enriquecimento).....	74
Figura 4.7 - Crescimento de EBE medido em densidade óptica 600 nm e consumo de glicose durante a operação do reator.....	75
Figura 4.8 - Crescimento de EBS medido em densidade óptica 600 nm e consumo de glicose durante a operação do reator.....	76
Figura 4.9 - Produção de ácido butírico e etanol por CB durante a operação do reator.....	77

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1 - Comparação dos combustíveis	15
Tabela 2.2 - Produção de butanol a partir de diferentes substratos com as cepas <i>C. acetobutylicum</i> e <i>C. beijerinckii</i>	20
Tabela 3.1 - Produção de butanol e etanol por <i>Clostridium acetobutylicum</i> e <i>Clostridium beijerinckii</i>	45
Tabela 3.2 - Produção de butanol encontrada na literatura por CB e CA utilizando concentrações de glicose inferiores e iguais a 30 g L ⁻¹	47
Tabela 3.3 - Consumo de açúcares no período de 0h-144h.....	48
Tabela 3.4 - Comparação de produção de biobutanol com glicose como único substrato e outros substratos.	50
Tabela 3.5 - Rendimento e taxa de produtividade de butanol por CB com diferentes substratos	51
Tabela 3.6 - A produção de ácido butírico, ácido láctico e etanol pelos diferentes inóculos a partir de glicose 10 g L ⁻¹ e manipueira 10 g L ⁻¹ de açúcar redutor.....	51
Tabela 3.7 - Valores de pH iniciais e finais.....	53
Tabela 4.1 - Produção, rendimento e taxa de produtividade dos inóculos	73
Tabela 4.2 - Medidas de DQO e biomassa inicial e final dos três inóculos	77
Tabela 5.1 - Produção e rendimento de ácido butírico, etanol e butanol dos ensaios realizados para os diferentes inóculos	83

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABE Acetona-butanol-etanol

ATCC American Type Culture Collection

CA *Clostridium acetobutylicum*

CB *Clostridium beijerinckii*

DQO Demanda Química de oxigênio

EB Esterco bovino

EBE Esterco bovino enriquecido

EBS Esterco bovino sem enriquecimento

ES Efluente de suinocultura

g gramas

h hora

L litro

LR Lodo anaeróbico de estação de tratamento de esgoto

mL mililitro

PCR Reação em cadeia da polimerase

pH Potencial hidrogeniônico

SL Solo

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1 –INTRODUÇÃO	13
1.1 INTRODUÇÃO.....	13
CAPÍTULO 2 –REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	14
2.1 BUTANOL	14
2.2 ETANOL	21
2.3 ÁGUA RESIDUÁRIA DO PROCESSAMENTO DA MANDIOCA – MANIPUEIRA	24
2.4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	26
CAPÍTULO 3 – PRODUÇÃO DE BIOCOMBUSTÍVEIS POR <i>CLOSTRIDIUM BEIJERINCKII</i>, <i>C. ACETOBULYLICUM</i> E DIFERENTES INÓCULOS A PARTIR DE GLICOSE E MANIPUEIRA.	36
3.1 INTRODUÇÃO.....	37
3.2 METODOLOGIA.....	39
3.2.1 Preparação das cepas – culturas puras	39
3.2.2 Operação dos reatores anaeróbios em batelada com glicose	40
3.2.3 Pré –tratamento dos inóculos	41
3.2.4 Manipueira	41
3.2.5 Operação dos reatores anaeróbios em batelada tendo como único substrato glicose ou manipueira	41
3.2.6 Procedimentos analíticos	43
3.2.6.1 Determinação dos açúcares redutores.....	43
3.2.6.2 Determinação dos ácidos orgânicos e álcoois	43
3.2.7 Cálculo de rendimento e taxa de produção	44
3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	44
3.3.1 Efeito da cepa sobre a produção de biocombustíveis a partir de glicose 30 g L⁻¹	44
3.3.2 Efeito do substrato sobre a produção de biocombustíveis para a cepa CB. ..	48
3.3.3 Efeito dos diferentes inóculos sobre a produção de biocombustíveis a partir de glicose 10 g L⁻¹ e manipueira 10 g L⁻¹ de açúcar redutor	51
3.4 CONCLUSÃO.....	54
3.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	54
CAPÍTULO 4– INFLUÊNCIA DO INÓCULO SOBRE A PRODUÇÃO DE BIOCOMBUSTÍVEIS A PARTIR DA MANIPUEIRA	64
4.1 INTRODUÇÃO.....	65

4.2 METODOLOGIA.....	66
4.2.1 Inóculo	66
4.2.1.1 Ativação do Inóculo CB e montagem do reator anaeróbio.....	66
4.2.1.2 Pré-tratamento inóculo EB	66
4.2.1.3 Biologia molecular para presença do gênero <i>Clostridium</i>	67
4.2.2 Manipueira	67
4.2.3 Operação dos reatores	68
4.2.4 Análises físico-químicas	68
4.2.5 Determinação de butanol, etanol e ácidos orgânicos	69
4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	70
4.3.1 Presença de <i>Clostridium</i> spp. no inóculo EB	70
4.3.2 Produção de biocombustíveis	70
4.4 CONCLUSÃO.....	78
4.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	78
CAPÍTULO 5 - CONSIDERAÇÕES FINAIS	82
CAPÍTULO 6 - CONCLUSÃO	84
APÊNDICE A – ANÁLISES DE CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DOS ENSAIOS COM AS CEPAS <i>CLOSTRIDIUM BEINJERINCKII</i> E <i>CLOSTRIDIUM ACETOBUTILYUM</i> TENDO COMO SUBSTRATO GLICOSE 30 G L⁻¹.	85
APÊNDICE B – ANÁLISES DE CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DOS ENSAIOS COM A CEPA <i>CLOSTRIDIUM BEINJERINCKII</i> E COM OS DIFERENTES INÓCULOS TENDO COMO SUBSTRATO GLICOSE 10 G L⁻¹.	86
APÊNDICE C – ANÁLISES DE CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DOS ENSAIOS COM A CEPA <i>CLOSTRIDIUM BEINJERINCKII</i> E COM OS DIFERENTES INÓCULOS TENDO COMO SUBSTRATO MANIPUEIRA 10 G L⁻¹ DE AÇÚCAR REDUTOR. ...	89
APÊNDICE D – ANÁLISES DE CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DOS ENSAIOS COM A CEPA <i>CLOSTRIDIUM BEINJERINCKII</i> E COM O INÓCULO ESTERCO BOVINO TENDO COMO SUBSTRATO MANIPUEIRA 5 G L⁻¹	92
APÊNDICE E – CURVA PADRÃO UTILIZADA PARA QUANTIFICAR AÇÚCARES REDUTORES PELO MÉTODO 3,5 ÁCIDO DINITROSALICÍLICO (DNS).	94

CAPÍTULO 1 –INTRODUÇÃO

Com o esgotamento gradual dos recursos energéticos globais, fontes de energia alternativas que sejam sustentáveis, rentáveis e visem à proteção do meio ambiente tem atraído grande atenção (CHEN et al., 2012). Essa necessidade de fontes de energia limpas, eficientes e acessíveis é vista frequentemente em questões ambientais e de saúde relacionadas ao uso de combustíveis fósseis (SARATHY et al., 2014). Neste cenário, a produção econômica dos biocombustíveis a partir de fontes renováveis tem o potencial para compensar as necessidades atuais de combustíveis derivados do petróleo (KUMAR; GAYEN, 2011).

Os biocombustíveis são fontes de energia limpa e alternativa, o qual pode ser utilizado para reduzir o consumo de combustíveis fósseis e as emissões de dióxido de carbono (HE et al., 2014). Sendo assim, a biomassa é utilizada como matéria-prima para produzir biocombustíveis e o CO₂ emitido durante o consumo deste biocombustível, é reciclado na síntese de biomassa (HE et al., 2014).

O etanol e butanol obtido a partir de recursos renováveis são excelentes representantes como biocombustíveis, (LI, et al., 2016), esses bioálcoois são uma potencial fonte de energia renovável no futuro pode ser produzido eficientemente pela fermentação acetona-butanol-etanol (ABE). Porém esses processos fermentativos não podem competir economicamente com a energia do petróleo devido ao elevado custo dos substratos. As recentes pesquisas têm focado na produção desses álcoois com matérias-primas que sejam renováveis, prontamente disponíveis, baratas, para produzir um rendimento razoável e não competir com a base alimentar (COMWIEN et al., 2015; KENNES et al., 2016).

Entre os combustíveis renováveis o etanol, devido à sua longa história, o uso e as características inerentes, tais como baixa toxicidade para micro-organismos e meio ambiente, baixo ponto de ebulição, elevado índice de octano, e considerável conteúdo de energia, é o principal candidato a combustível primário para aplicações de curto e longo prazo (LYND et al., 2008).

O butanol é um potencial substituinte da gasolina, pois devido as suas características químicas serem muito parecidas não há necessidade de qualquer ajuste nos motores de veículos (FERNÁNDEZ-NAVEIRA et al., 2016).

Uma matéria-prima alternativa para essa produção são os resíduos da indústria alimentícia, na qual existe uma grande demanda em pesquisas que utilizem esse subproduto para produção de produtos com maior interesse no mercado que agrega valor e esses resíduos gerados (TUMWESIGYE; OLIVEIRA; SOUSA-GALLAGHER, 2016). Um desses resíduos

gerados na indústria alimentícia é o efluente oriundo do processamento da mandioca denominado manipueira. A transformação da mandioca, especialmente em áreas onde a indústria é altamente concentrada, é considerada uma fonte poluente e um ônus para os recursos naturais, já que os resíduos são libertados diretamente no ambiente antes do tratamento adequado (FAO, 2001).

Uma alternativa para reduzir os impactos ambientais e recuperar a energia perdida no fluxo de resíduos (HASYIM, et al., 2011) é a utilização desse resíduo rico em amido como matéria-prima alternativa para a produção de butanol e etanol.

A produção desses álcoois é possível pela fermentação pelo gênero *Clostridium*, grupo de bactérias capazes de utilizar uma variedade de fonte de carboidratos e convertê-los em butanol e etanol (CHEN et al., 2013). Exemplares desse gênero já foram encontrados em diferentes fontes como solo, lodo de tratamento de diferentes efluentes e no esterco bovino.

Em função da manipueira ser rica em carboidrato e o gênero *Clostridium* ser identificado e encontrado em diferentes fontes, o presente trabalho teve por objetivo avaliar a produção de biocombustível utilizando como substrato manipueira.

A produção de bicomcombustíveis foi avaliada a partir manipueira e glicose por *C. acetobutylcum* e *C. beijerinckii*, espécies conhecidas como produtoras de biocombustíveis, e em quatro inóculos pré-tratados oriundos de amostras ambientais.

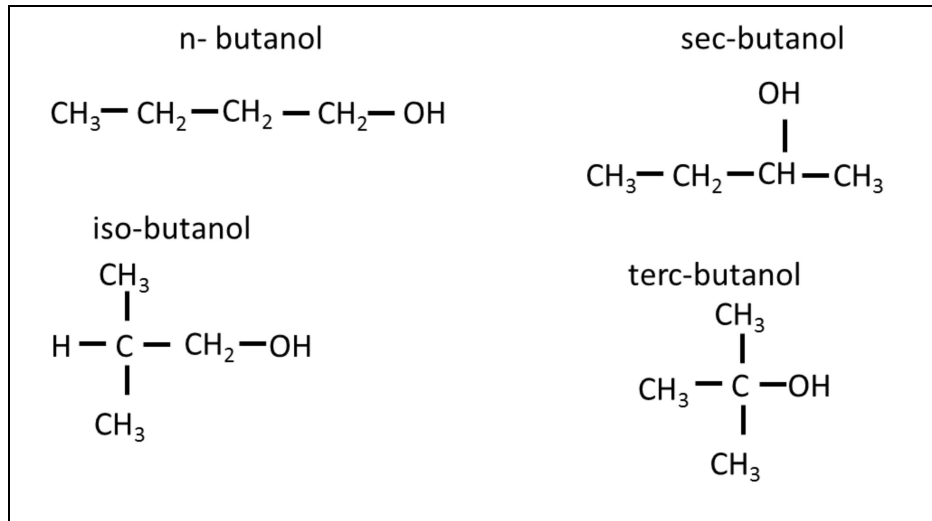
CAPÍTULO 2 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 BUTANOL

O butanol é um combustível renovável a base de biomassa e pode ser produzido por fermentação alcoólica a partir de diferentes matérias-primas. Possui uma estrutura de quatro carbonos (C_4H_9OH), os quais podem formar uma cadeia linear ou estrutura ramificada, que conferem diferentes propriedades para essa molécula (RAKOPOULOS et al., 2011), sendo um líquido incolor, de odor sufocante, inflamável e pouco solúvel em água (LEE et al., 2008).

Existem quatro isômeros diferentes dependendo da localização do grupo hidroxila (-OH) e do carbono na estrutura da cadeia (FIG. 2.1). Na produção de butanol a partir de biomassa a tendência é ter como principal produto a molécula linear, o 1-butanol ou *n*-butanol (butanol normal), que apresentando cadeia linear com o grupo hidroxila (-OH) no átomo de carbono terminal (RAKOPOULOS et al., 2011).

Figura 2.1 - Isômeros do butanol



O butanol como combustível tem algumas vantagens sobre o etanol (TAB. 2.1), tais como: maior energia, menor volatilidade, é menos higroscópico e apresenta menor teor corrosivo (VAN DER MERWE et al., 2013). O butanol é mais semelhante à gasolina do que o etanol, o que permite ser usado em porcentagem maior em relação ao etanol quando misturado a gasolina (HE et al., 2014) e conseqüentemente reduz as emissões de fuligem e monóxido de carbono na atmosfera (YAO, et al., 2010).

Tabela 2.1- Comparação dos combustíveis

	Butanol	Etanol	Gasolina
Densidade de energia (Mj L ⁻¹)	29,2	19,6	32
Relação ar-combustível	11,2	9	14,6
Calor de vaporização (Mj/kg)	0,43	0,92	0,36
Índice de octano	96	129	91-99
Número de octano	78	102	81-89

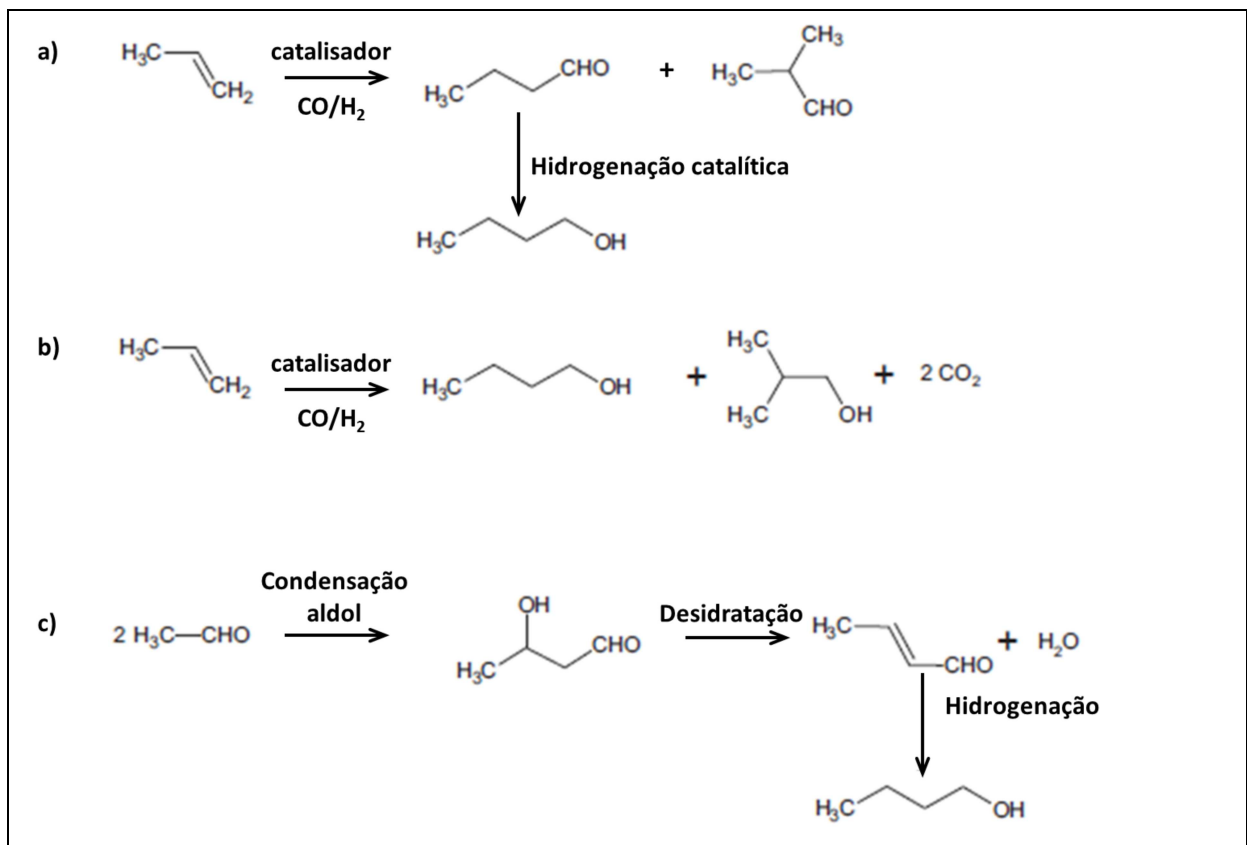
FONTE: LEE et al., 2008.

O butanol pode ser utilizado como: solvente na produção de borracha e de verniz; solvente para corantes; extrator na produção de fármacos e substratos naturais tais como antibióticos, hormônios, vitaminas, alcaloides e cânfora; aditivo em produtos de limpeza, por

exemplo, limpadores de chão e removedores; solubilizante na indústria têxtil; aditivo da gasolina (anti-gelo) e como fase móvel em cromatografia de papel (DURRE, 2007).

Em escala comercial, é produzido por meios químicos (BEREZINA et al., 2012), os três principais processos químicos utilizados nas indústrias são: 1) hidroformilação (oxo síntese), nela uma molécula de monóxido de carbono e de hidrogênio são adicionados a uma ligação dupla carbono-carbono e formam uma mistura de aldeídos, seguida por hidrogenação resultando na produção de butanol (FIG. 2.2 A), 2) Processo Reppe, com a utilização de um catalisador ocorre a carbonilação de propeno, produzindo o butanol, (FIG. 2. 2 B) (LEE et al., 2008), 3) hidrogenação de crotonaldeído, consiste em uma condensação de acetaldeído, seguido por uma desidratação e subsequente hidrogenação (FIG. 2.2 C) (UYTTEBROEK; VAN HECKE; VANBROEKHOVEN, 2015).

Figura 2.2: Síntese química do butanol: a) hidroformilação, b) Processo Reppe e c) hidrogenação de crotonaldeído.



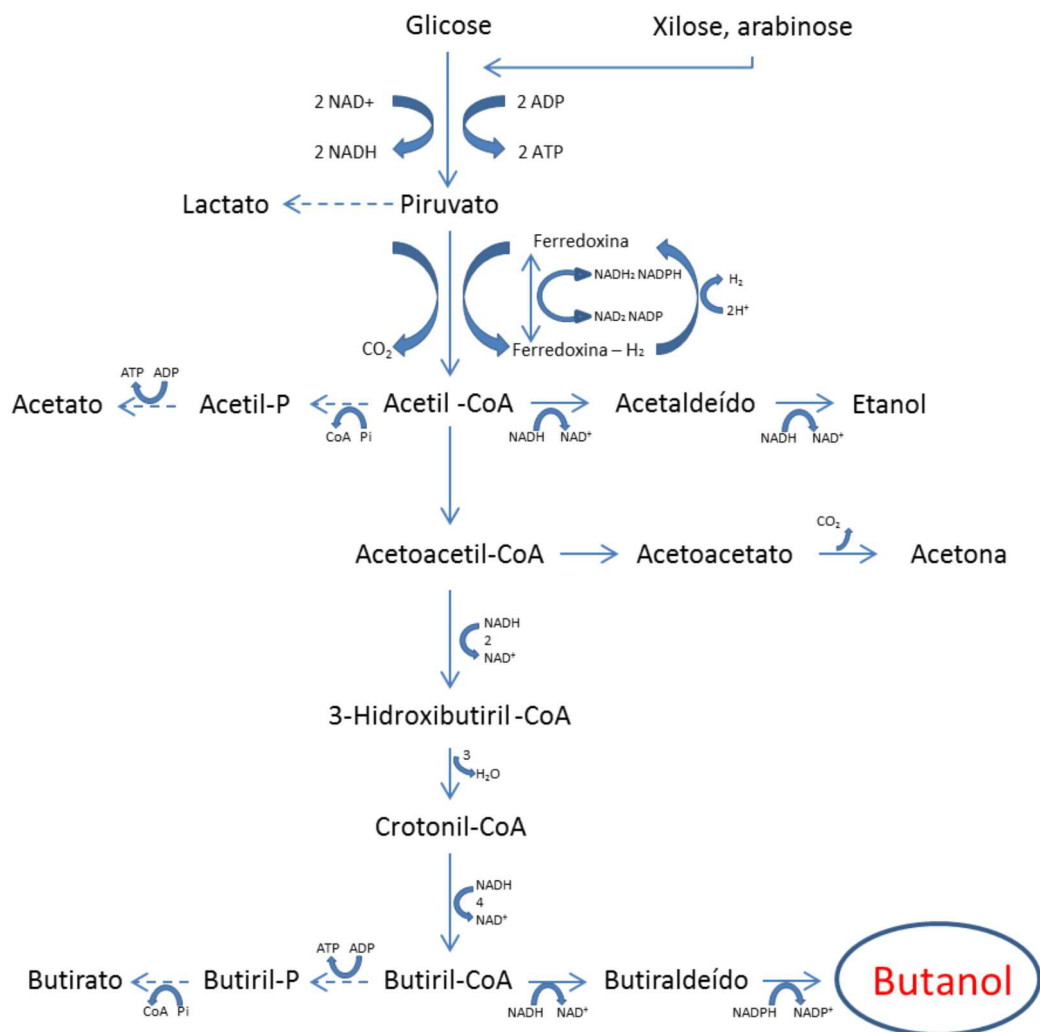
Fonte: Modificado de UYTTEBROEK; VAN HECKE; VANBROEKHOVEN, 2015.

A produção do butanol também pode ser realizada pelo metabolismo fermentativo por meio de micro-organismos produtores de solventes, tendo acetona e etanol como principais

subprodutos (fermentação ABE acetona-butanol-etanol, FIG. 2.3 – exemplifica a via metabólica em etapas para a obtenção de acetona-butanol-etanol), (DÜRRE et al., 2008), tendo tipicamente como proporção de produtos de 3: 6: 1, em que o butanol é o produto principal (BELLIDO, et al., 2015).

Esses micro-organismos realizam a fermentação ABE em duas etapas (FIG. 2.3), a primeira etapa é denominada acidogênica, ocorre na fase exponencial de crescimento e é caracterizada pela conversão do substrato nos ácidos acético e butírico pela produção dos gases hidrogênio e carbônico. A segunda etapa designada de solventogênica, é caracterizada pela conversão dos ácidos em solventes ABE, a qual acontece um pouco antes da fase estacionária (LÜTKE-EVERSLOH e BAHL, 2011; YADAV et al., 2014).

Figura 2.3 - Esquema da fermentação ABE por *C. acetobutylicum*.



Fonte: Modificado de HUANG et al., 2010.

Algumas espécies de bactéria tais como *Butyribacterium methylotrophicum*, *Pseudomonas putida*, *Bacillus subtilis* e a arqueia *Hyperthermus butylicus* (DÜRRE et al., 2008) são capazes de produzir o butanol. Contudo, as bactérias do gênero *Clostridium* spp. são as principais produtoras de butanol e as mais utilizadas. As espécies *C. acetobutylicum*, *C. beijerinckii*, *C. saccaroperbutylaceticum*, *C. saccharoacetobutylicum*, *C. aurantibutyricum*, *C. pasteurianum*, *C. sporogenes*, *C. cadaveris* e *C. tetanomorphum* já foram estudadas na produção de biobutanol (KUMAR e GAYEN, 2011).

Clostridium ssp. são bactérias obrigatoriamente anaeróbias, gram-positivas, e formadoras de endósporos (JONES; WOODS, 1986; ZHENG et al., 2015), são capazes de converter uma ampla variedade de fontes de carbono (glicose, galactose, celobiose, manose, xilose e arabinose) em combustíveis tais como butanol, acetona, e etanol (EZEJI; QURESHI.; BLASCHEK, 2007; CHEN et al., 2013).

Os clostrídios secretam diferentes enzimas que facilitam a quebra de carboidratos poliméricos em monômeros. Os vários monossacarídeos produzidos são transportados para dentro da célula por sistemas de transportes específicos ligados à membrana e, a partir de então os hidratos de carbono são subsequentemente metabolizadas através da glicólise da ou da via das pentoses fosfato (EZEJI; QURESHI.; BLASCHEK, 2007a).

O butanol é tóxico para esses micro-organismos, pois possui efeito fluidificante sobre a bicamada fosfolipídica, o que afeta a integridade estrutural e funcional das células. As concentrações limitrofes variam entre as espécies (VENKATARAMANAN et al., 2014). Essa característica torna a produção de biobutanol não economicamente competitiva em comparação com a via petroquímica (XUE et al., 2013). Desta forma o desenvolvimento de técnicas que atenuem significativamente a inibição por butanol é essencial para a produção industrial desse biocombustível (CHEN et al., 2012).

Mesmo que o próprio butanol seja uma barreira para o progresso fermentativo em escala industrial em função de sua toxicidade, as propriedades superiores em comparação com o bioetanol em termos de maior densidade energética e menor volatilidade, faz com que a utilização desse biocombustível ainda continue recebendo atenção (LEE et al., 2008).

Com essa finalidade, melhorias no desenvolvimento de bioprocessos, em microbiologia aplicada e engenharia genética podem resultar na otimização do processo fermentativo aumentando a competitividade econômica, como desenvolvimento de mutantes capazes de tolerar maiores concentrações de butanol e de processos de retirada do butanol do meio (GARCÍA et al., 2011), assim pesquisas adicionais e esforços no desenvolvimento são necessárias para apoiar a escala de produção industrial de biobutanol (NAPOLI, et al., 2012).

Outra alternativa é a busca de novas estirpes capazes de produzir mais butanol, já que exemplares do gênero foram encontrados no solo (ABD-ALLA et al., 2015), no lodo granular de tratamento da vinhaça (SANTOS et al., 2014), lodo ativado de estação de tratamento de esgotos (CHEN et al., 2012), lodo de tratamento de suinocultura (SHIDA et al., 2012; LARAZO et al., 2012), lodo de tratamento de fábrica de doces (DAVILA-VAZQUEZ, 2008) e esterco bovino (BAGGE, PERSSON; JOHANSSON, 2010).

Um estudo realizado por Cheng e seus colaboradores (2012) utilizaram como inóculo lodo ativado da estação de tratamento de águas residuais e obtiveram uma produção de 12,4 g L⁻¹ de butanol com 60 g L⁻¹ de glicose como substrato. Os micro-organismos identificados como responsáveis pela produção foram *C. saccharoperbutylacetonicum*, *C. butylicum*, *C. beijerinckii*, e *C. acetobutylicum*.

Abd-Alla e colaboradores (2015) coletaram 107 amostras de solo de cultivo de feijão, beterraba, cebola, cenoura, tomate, batata, trevo e trigo, conseguiram isolar oitenta cepas produtoras de butanol tendo como substrato glicose 6% e a produção alcançada foi de 16,77 g L⁻¹ com *Clostridium roseum* ASU58 e com a cepa padrão *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 apenas 6,46 g L⁻¹, ressaltando a importância da procura de novos micro-organismos isolados para a produção de butanol.

Além dos açúcares, outras fontes de carbono também foram utilizadas como substrato, o bagaço de mandioca (LU et al., 2012), fibra de milho (GUO et al., 2013; DU et al., 2013), palha de arroz (GOTTUMUKKALA et al., 2013), silagem de cevada (YANG et al., 2014), bagaço e palha de cana-de-açúcar (PEREIRA et al., 2015), na tabela 2.2 é possível observar a produção de butanol pelas cepas *C. acetobutylicum* e *C. beijerinckii*.

Tabela 2.2 - Produção de butanol a partir de diferentes substratos com as cepas *C. acetobutylicum* e *C. beijerinckii*

Inóculo	Substrato	Butanol g L ⁻¹	Referência bibliográfica
<i>C. acetobutylicum</i>	Bagaço de mandioca hidrolisado – 44,8 g L ⁻¹ (glicose)	9,71	LU et al. (2012).
	Forragem de cevada hidrolisada – 42,3 g L ⁻¹ (açúcares)	7,3	YANG et al (2014).
	Grãos e palha de cevada hidrolisada – 42,46 g L ⁻¹ (carboidratos)	7,8	YANG et al. (2015).
	Amido de mandioca hidrolisado – 58,4 g L ⁻¹ (glicose)	12,16	LI et al. (2014).
<i>C. beijerinckii</i>	Amido de milho – 60,1 g L ⁻¹ (açúcares redutores)	0,7	EZEJI QURESHI BLASCHEK (2007a).
	Lodo residual de fábrica de óleo de palma hidrolisado – 20 g L ⁻¹ (açúcares)	3,4	LOYARKAT; CHEIRSILP; UMSAKUL (2013).
	Fibra de milho hidrolisada (40,3 g L ⁻¹ de açúcar redutor)	7,5	GUO et al., (2013)
	Resíduo da fabricação de leite em pó – 49,08 g L ⁻¹ (glicose/lactose)	1,16	UJOR et al .(2014)
	Fibra de milho hidrolisada – 37 g L ⁻¹ (açúcares redutores)	9,5	DU et al. (2013)

Por se tratarem de materiais lignocelulósicos, esses precisam ser hidrolisados para que a microbiota tenha acesso aos carboidratos mais simples. Águas residuárias ricas em carboidratos, como o soro de queijo (RAGANATI et al., 2013) e a vinhaça resultante do

processo de fermentação do etanol a partir da cana-de-açúcar são outros exemplos de substratos.

Contudo, um ônus desse processo fermentativo, independente da fonte de substrato utilizada, é a extração dos biocombustíveis do meio aquoso que acaba encarecendo o processo de produção, algumas técnicas de extração dos biocombustíveis são:

- Extração por gás de arraste - essa técnica permite a remoção seletiva dos solventes a partir do caldo de fermentação e não utiliza membranas, geralmente são empregados como gás de arraste o H_2 e o CO_2 e quando borbulhados no caldo fermentativo capturam os solventes que pelo processo de condensação podem ser recuperados (CAI et al., 2016a; LU et al., 2016; EZEJI; QURESHI; BLASCHEK, 2007b)
- Pervaporação - é um processo de separação, onde uma mistura líquida binária ou de componentes múltiplos é separado por vaporização parcial através de uma membrana, é considerado como um processo promissor para a separação de solventes ABE (KONG et al., 2016; CAI et al, 2016b).
- Extração líquido-líquido – nesta técnica um solvente é adicionado com o intuito de solubilizar os solventes produzidos na fermentação, os quais são recuperados por destilação (HA; MAI; KOO, 2010; GAO; ORR; REHMANN, 2016).
- Processo de adsorção - adsorventes são adicionados diretamente às culturas e o produto adsorvido é retirado por processos de tratamento térmico, extração a vapor, extração gasosa, por aplicação do vácuo ou eluição do solvente (STAGGS; NIELSEN, 2015).

Todos esses processos são muito utilizados na extração dos solventes, porém muitas pesquisas estão sendo realizadas visando diminuir os custos referentes a esse processo tornando a fermentação ABE mais atrativa para a produção de biocombustíveis.

2.2 ETANOL

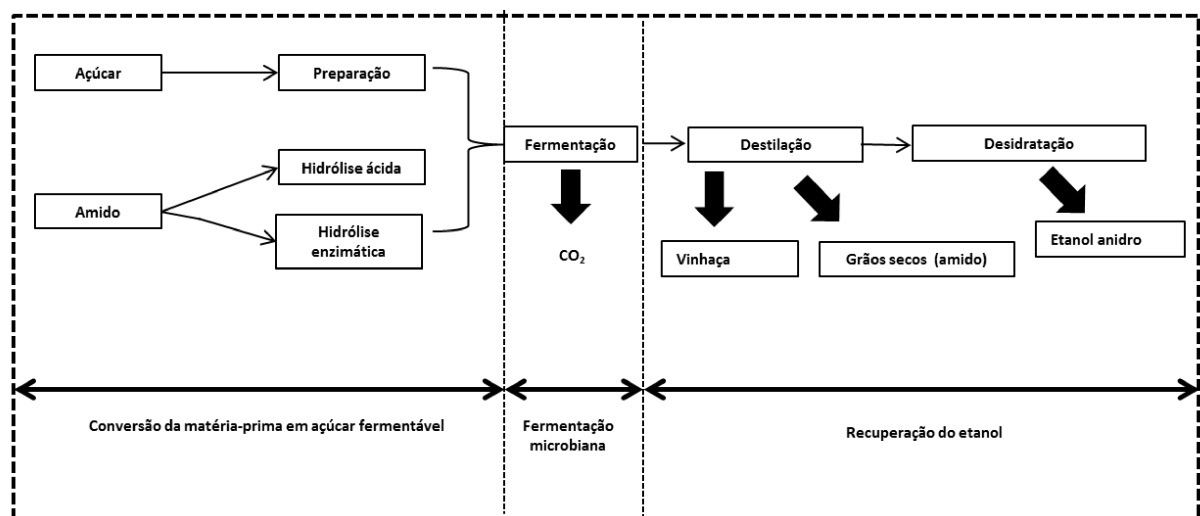
O etanol é um tipo de álcool obtido por fermentação de açúcar, que é convertido em álcool, o qual é purificado por destilação podendo ser usado como combustível (CHUTIMA; SKOLPAP, 2014), é um dos mais importantes combustíveis renováveis (ISLA; COMELL; SELUY, 2013) e o mais produzido (WEIMER; NERDAHL; BRANDL, 2015).

Contudo, como grande parte das matérias-primas utilizadas produção de etanol são alimentos, como milho, cana-de-açúcar, trigo, cenoura, beterraba, mandioca (NJOKU et al., 2012). A demanda por biocombustíveis é cada dia maior, existe uma preocupação em termos competitivos com a alimentação.

Outra problemática envolvida na fermentação é a produção de efluentes líquidos produzidos no processo de obtenção de etanol, (LIMAYEME; RICKE, 2012), que muitas vezes são tóxicos contendo elevadas quantidades de matéria orgânica e produzidas em larga escala.

Os processos de produção de etanol (FIG. 2.4) ocorrem a partir de dois tipos de substratos bastante semelhantes, as técnicas de transformação são ligeiramente diferentes em função das diversas matérias-primas utilizadas na fase inicial de preparação. Substratos contendo açúcar, por natureza, estão prontos para o processo fermentativo sem qualquer modificação adicional, enquanto os que contêm amido precisam de um passo adicional, a hidrólise, para convertê-los em açúcares fermentáveis (SORAPIPATANA; YOOSIN, 2011).

Figura 2.4 - Processo para obtenção de etanol



Fonte: Modificado de SORAPIPATANA; YOOSIN, 2011.

O etanol consolidou-se no mercado de biocombustíveis brasileiro, onde gasolina contém 20-25% de álcool anidro ou o álcool hidratado é consumido puro ou misturado com qualquer percentagem de gasolina nos veículos com motores movidos a bicombustíveis (VIRMOND et al., 2013)

No Brasil o etanol na sua maior parte é produzido pela fermentação do melaço de cana-de-açúcar a estimativa de produção 28,52 bilhões de litros para safra 2015/16, o país é o

segundo produtor de etanol no mundo perdendo apenas para os Estados Unidos (ARORA; BEHERA; KUMAR, 2015).

O maior impasse do processo de obtenção de etanol é a vinhaça, produzida em um volume de 12 a 15 litros de efluente por litro de etanol (FERRAZ JÚNIOR et al., 2016). Por possuir alta carga orgânica e alto teor de nutrientes (principalmente potássio, mas também de nitrogênio e fósforo), geralmente é aplicado diretamente ao solo da cultura de cana-de-açúcar, uma solução simples mais barata prevista na legislação, tornando-o um bom adubo orgânico (FERRAZ JÚNIOR et al., 2016). Contudo, com o despejo contínuo e sem controle, de, desencadeou uma série de impactos ambientais- como a lixiviação de metais para as águas subterrâneas, alterações na qualidade do solo, aumento de fitotoxicidade, odor desagradável, emissões de metano consideráveis durante o armazenamento temporário do soro, transporte e emissões de óxido nitrosos depois aplicação ao solo (CHRISTOFOLETTI, et al., 2013).

Ainda não existem muitas alternativas tecnológicas para destino vinhaça, além da combustão, da produção de leveduras, da produção de alimentos para o gado e da incineração, o que atesta o fato de que muitos esforços têm sido direcionados para alocar, corretamente, o grande volume de resíduos. Assim, novos estudos e métodos verdes precisam ser desenvolvidas visando à reciclagem e eliminação de vinhaça (CHRISTOFOLETTI, et al., 2013).

Um desses métodos é o processo fermentativo ABE, cujo *Clostridium* spp. é o principal grupo responsável. É um grupo diverso essencialmente composto por bactérias gram-positivas, anaeróbias, em forma de bastonete, capazes de formar endósporos (HEAP et al., 2009). Convertem uma ampla variedade de fontes de carbono (glicose, galactose, celobiose, manose, xilose e arabinose) em combustíveis tais como butanol, acetona, e etanol (EZEJI et al., 2007).

As pesquisas de etanol atualmente concentram-se na utilização de matérias-primas lignocelulósicas como substrato, devido à sua abundância e renovabilidade, especialmente em relação a reduzir o custo e aumentar a eficácia dos passos fundamentais no processo de pré-tratamento celulósico, hidrólise enzimática e fermentação (BEHERA et al., 2014).

Para a produção de etanol tendo como substrato materiais lignocelulósicos e açúcares existem uma série de micro-organismos capazes de realizar o processo fermentativo em diversas condições de temperatura e pH, é possível utilizar exemplares dos gêneros: *Clostridium* spp., *Thermoanaerobacterium* spp., *Thermoanaerobacter* spp., *Kluyveromyces* spp. *Pichia* spp., *Caloramator* spp., *Paenibacillus* spp., *Caldicellulosiruptor* spp. e *Bacillus* spp. (ARORA; BEHERA; KUMAR, 2015).

Alguns trabalhos evidenciam a produção de etanol em batelada com espécies do gênero *Clostridium*, *C. autoethanogenum* produziu 7,143 g L⁻¹ de etanol utilizando como fonte de carbono xilose e monóxido de carbono (ABUBACKAR et al., 2016) e *C. carboxidivoran* produziu 0.48 g L⁻¹ de etanol a com monóxido de carbono como fonte de carbono (FERNÁNDEZ-NAVEIRA et al., 2016), com *C. ljungdahlii* e como substrato um gás sintético 55% CO, 20% H₂, 15% Ar, 10% CO₂ (1,8 atm) foi possível produzir 0,012 g L⁻¹ de etanol (NAJAFPOUR; YOUNESI, 2006).

Com substratos ricos em carbono, *C. beijerinckii* produziu 0,4 g L⁻¹ tendo como fonte de carbono água residuária da fabricação de açúcar a partir da cana-de-açúcar (COMWIEN, et al., 2015), *C. phytofermentans* com 24,8 g L⁻¹ de glicose como substrato produziu 2,8 g L⁻¹ de etanol (FATHIMA et al., 2016) e *C. thermocellum* produziu 13,66 g L⁻¹ de etanol a partir de um substrato otimizado com uma concentração de filtro papel de 45 g L⁻¹, licor de milho 8 g L⁻¹, cloridrato de cisteína 0,025 g L⁻¹ e sulfato ferroso igual a 0,01g L⁻¹ (BALUSU et al., 2005).

2.3 ÁGUA RESIDUÁRIA DO PROCESSAMENTO DA MANDIOCA – MANIPUEIRA

A cultura de mandioca é considerada pela Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura a maior geradora de quantidade de resíduos sob a forma de casca, polpa, águas residuais durante o processamento pós-colheita (FOA, 2013), no Brasil a produção para 2016 deve chegar a 23,7 milhões de toneladas de mandioca processada (IBGE, 2016).

Em escala mundial a maior parte da produção dessa cultura, mais de 70%, é realizada por pequenos agricultores nas regiões subtropicais e tropicais na África, América Latina e Ásia (JANSSON et al., 2009). Trata-se de uma importante fonte de alimentação para mais de 700 milhões de pessoas em países tropicais e é cultivada em uma área total mundial de 18,6 milhões de hectares, com uma produção total de 238 milhões de toneladas (PATIL; FAUQUET, 2009).

Um resíduo gerado pela indústria do processamento da mandioca é a manipueira, trata-se de uma água residuária do processo nas indústrias farinheiras ou fecularias, esse líquido é rico em carboidratos (O-THONG et al, 2011), e cada quilo da raiz pode gerar de 5 a 7 L desse resíduo (SANGYOKA; REUNGSANG; MOONAMART, 2007).

A raiz de mandioca apresenta cianeto que pode variar entre 75 a 1000 mg kg⁻¹ e grandes quantidades são liberadas durante a produção. Trata-se de um elemento tóxico para os

seres humanos e animais uma vez que se liga ao ferro inibindo a atividade da enzima citocromo oxidase o que compromete a respiração (KAEWKANNETRA, 2009).

Resíduos e águas residuais gerados a partir de diversas indústrias devem ser evitados ou convertidos em energia, a fim de reduzir os problemas ambientais e proporcionar fontes adicionais de energia (PAPONG et al., 2014).

A manipueira foi utilizada na produção de energia, com uma célula combustível avaliaram os efeitos da concentração de cianeto, concentrações elevadas desse elemento não influenciaram a produção de energia, mostrando que o cianeto não afetou o crescimento dos micro-organismos (KAEWKANNETRA; CHIWES; CHIU, 2011).

Alguns estudos já elucidaram a utilização da manipueira para a produção de biocombustíveis (SANGYOKA; REUNGSANG; MOONAMART, 2007; SREETHAWONG et al, 2010; CAPPELLETTI et al., 2011; ROSA et al., 2014).

Sreethawong et al. (2011) utilizaram como inóculo lodo anaeróbio de lagoa de sedimentação de tratamento da manipueira e avaliaram a produção de hidrogênio em reatores em batelada alimentada com a água residuária do processamento de mandioca, avaliaram a suplementação de nitrogênio, obtiveram o maior rendimento igual a 438 ml de H₂ g⁻¹ DQO removida.

Cappelletti et al. (2011) utilizaram manipueira para estudar o efeito da DQO inicial do substrato na produção de hidrogênio com a cepa *Clostridium acetobutylicum*, com uma DQO inicial igual a 5 g L⁻¹ alcançaram o maior rendimento 2,41 mol H₂ mol⁻¹ glicose.

Em um trabalho realizado por ROSA et al. (2014) foi avaliado o potencial de co-fermentação da manipueira e mistura de glicose em reatores anaeróbios de leito fluidizado, utilizando como inóculo lodo proveniente de um matadouro de aves produziram metano em uma produção volumétrica igual a 9,68 L CH₄ d⁻¹ L⁻¹, hidrogênio com rendimento de 1,0 mmol H₂ g⁻¹ DQO removida, etanol igual a 3,0 mmol EtOH g⁻¹ DQO removida.

Ren et al. (2015) produziram 1183 mL L⁻¹ de hidrogênio fermentando o efluente do processamento da mandioca com uma mistura de lodo anaeróbio de tratamento de água residuais e uma microalga isolada do solo identificada como *Scenedesmus sp.* como inóculo.

Uma produção volumétrica de hidrogênio igual a 0,39 LH₂L⁻¹ d⁻¹ e de metano igual a 0,91 LCH₄ L⁻¹ d⁻¹ foi alcançada por Intanoo et al. (2016), neste estudo o inóculo foi lodo retirado do fundo do primeiro tanque anaeróbio do tratamento de efluente da fábrica de mandioca, foram utilizadas duas etapas em digestor anaeróbio de fluxo ascendente.

Como não existem muitas alternativas de uso desse efluente, geralmente ele é despejado em rios ou no solo, gerando assim um problema ambiental (RIBAS; BARANA,

2003) devido à alta demanda química e bioquímica de oxigênio do efluente (O-THONG et al, 2011). Mas devido ao seu alto conteúdo de matéria orgânica, a manipueira é qualificada como substrato em processos biotecnológicos (CAPPELLETTI et al., 2011; ROSA et al., 2014), como a produção de biocombustíveis.

2.4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABD-ALLA, M. H.; ZOHRI, A-N. A.; ELSADEK, A-W., E-E.; ALI S. M. Acetone – butanol - ethanol production from substandard and surplus dates by Egyptian native *Clostridium* strains. *Anaerobe*, v. 32, p. 77-86, 2015.

ABUBACKAR, H. N.; FERNÁNDEZ-NAVEIRA, A.; VEIGA, M. C.; KENNES, C. Impact of cyclic pH shifts on carbon monoxide fermentation to ethanol by *Clostridium autoethanogenum*. *Fuel*, v. 178, p. 56–62, 2016.

BAGGE, E.; PERSSON, M.; JOHANSSON, K.-E. Diversity of spore-forming bacteria in cattle manure, slaughterhouse waste and samples from biogas plants. *Journal of Applied Microbiology*, v. 109, n. 5, p. 1549–1565, 2010.

BALUSU R.; PADURU, R. R.; KURAVI. S. K.; SEENAYYA. G.; REDDY. G. Optimization of critical medium components using response surface methodology for ethanol production from cellulosic biomass by *Clostridium thermocellum* SS19. *Process Biochemistry*, v.40, p.3025–3030, 2005.

BELLIDO, C.; INFANTE, C.; COCA, M.; GONZÁLEZ-BENITO, G.; LUCAS, S.; GÁRCIA-CUBERO, M. T. Efficient acetone–butanol–ethanol production by *Clostridium beijerinckii* from sugar beet pulp. *Bioresource Technology*, v. 190, p. 332–338, 2015.

BEREZINA, O. V.; ZAKHAROVA, N. V. ; YAROTSKY, C. V.; ZVERLOV, V. V. Microbial Producers of Butanol. *Applied Biochemistry and Microbiology*, v. 48, n. 7, p. 625–638., 2012.

BEHERA, S.; ARORA, R.; NANDHAGOPAL, N.; KUMAR, S. Importance of chemical pretreatment for bioconversion of lignocellulosic biomass. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v. 36, p. 91–106, 2014.

CAI, D.; WANG, Y.; CHEN, C.; QIN, P.; MIAO, Q.; ZHANG, C.; LI, P.; TAN, T. Acetone–butanol–ethanol from sweet sorghum juice by an immobilized fermentation-gas stripping integration process. *Bioresource Technology*, v. 211, p. 704–710, 2016a.

CAI, D.; CHEN, H.; CHEN, C.; HU, S.; WANG, Y.; CHANG, Z.; MIAO Q.; QIN, P.; WANG, Z.; WANG, J.; TAN, T. Gas stripping–pervaporation hybrid process for energy-saving product recovery from acetone–butanol–ethanol (ABE) fermentation broth. *Chemical Engineering Journal*, v. 287, p. 1-10, 2016b.

CAPPELLETTI, B. M.; REGINATTO, V.; AMANTE, E. R.; ANTÔNIO, R. V. Fermentative production of hydrogen from cassava processing wastewater by *Clostridium acetobutylicum*. *Renewable Energy*, v. 36, p. 3367-3372, 2011.

CHEN, B-Y.; CHUANG, F-Y.; LINC, C-L.; CHANG, J-S. Deciphering butanol inhibition to Clostridial species in acclimatized sludge for improving biobutanol production. *Biochemical Engineering Journal*, v.69, p. 100– 105, 2012.

CHEN, Y.; ZHOU, T.; LIU, D.; LI, A.; XU, S.; LIU, Q.; LI, B.; YING, H. Production of Butanol from Glucose and Xylose with Immobilized Cells of *Clostridium acetobutylicum*. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, v. 18, p. 234-241, 2013.

CHENG, C-L.; CHE, P-Y.; CHEN, B-Y.; LEE, W-J.; CHIEN, L-J.; CHANG, J-S. High yield bio-butanol production by solvent-producing bacterial microflora. *Bioresource Technology*, v.113, p. 58–64, 2012.

COMWIEN, J.; BOONVITHAYA, N.; CHULALUKSANANUKUL, W.; GLINWONG, C. Direct Production of Butanol and Ethanol from Cane Sugar Factory Wastewater and Cellulosic Ethanol Pilot Plant Wastewater by *Clostridium beijerinckii* CG1. *Energy Procedia*, v. 79, p. 556 – 561, 2015.

CHRISTOFOLETTI, C.A.; ESCHER, J. P.; CORREIA, J. E.; MARINHO, J. F. U.; FONTANETTI. Sugarcane vinasse: Environmental implications of its use. *Waste Management*, v. 33, n. 12, p. 2752-2761, 2013.

DAVILA-VAZQUEZ, G.; ALATRISTE-MONDRAGÓN, F.; LEÓN-RODRÍGUEZ, A.; RAZO-FLORES E. Fermentative hydrogen production in batch experiments using lactose, cheese whey and glucose: Influence of initial substrate concentration and pH. *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 33, p. 4989-4997, 2008.

DU, T. F.; HE, A. Y.; WU, H.; CHEN J. N.; KONG, X. P.; LIU, J. L.; JIANG, M.; OUYANG, P. K. Butanol production from acid hydrolyzed corn fiber with *Clostridium beijerinckii* mutant. *Bioresource Technology*, v. 135, p. 254–261, 2013.

DURRE P. Biobutanol: an attractive biofuel. *Biotechnol J.* v. 2, p. 1525–34, 2007.

DÜRRE, P. Fermentative butanol production: bulk chemical and biofuel. *Annals of the New York Academy of Sciences*, v. 1125, p. 353–62, 2008.

EZEJI, T. C.; QURESHI, N.; BLASCHEK, H. P. Bioproduction of butanol from biomass: from genes to bioreactors. *Current Opinion in Biotechnology*, v. 18, p. 220-227, 2007 (a).

EZEJI, T. C.; QURESHI, N.; BLASCHEK, H. P. Production of acetone butanol (AB) from liqueWed corn starch, a commercial substrate, using *Clostridium beijerinckii* coupled with product recovery by gas stripping. *Journal Industrial Microbiology Biotechnology*, v. 34, p. 771–777. 2007 (b).

FAO. (2001). Strategic environmental assessment: An assessment of the impact of cassava production and processing on the environment and biodiversity. v. 5, p. 1-137. Disponível em: <http://www.fao.org/docrep/007/y2413e/y2413e00.htm>. Acesso em: 24 abr 2016.

FAO. (2013). Food wastage footprint—impacts on natural resources. Summary report. Disponível em: www.fao.org/nr/sustainability. Acesso em: 24 abr 2016.

FATHIMA, A. A.; SANITHA, M.; KUMAR, T.; IYAPPAN, S.; RAMYA, M. Direct utilization of wastewater algal biomass for ethanol production by cellulolytic *Clostridium phytofermentans* DSM1183. *Bioresource Technology*, v. 202, p. 253–256, 2016.

FERNÁNDEZ-NAVEIRA, A.; ABUBACKAR, H. N.; VEIGA1, M. C. KENNES, C. Efficient butanol-ethanol (B-E) production from carbon monoxide fermentation by *Clostridium carboxidivorans*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 100, p.3361–3370, 2016.

FERRAZ JÚNIOR, A. D. N.; KOYAMA, M.H.; ARAÚJO JÚNIOR, M. M.; ZAIAT, M. Thermophilic anaerobic digestion of raw sugarcane vinasse. *Renewable Energy*, v. 89, p. 245–252, 2016.

GARCÍA, V.; J PÄKKILÄA, J.; OJAMOB, H.; MUURINENA, E.; L. KEISKI, R.L. Challenges in biobutanol production: How to improve the efficiency? *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v. 15, p. 964–980, 2011.

GAO, K.; ORR, V.; REHMANN, L. Butanol fermentation from microalgae-derived carbohydrates after ionic liquid extraction. *Bioresource Technology*, v. 206, p. 77–85, 2016.

GOTTUMUKKALA, L. D.; PARAMESWARAN,B.; VALAPPIL, S. K.; MATHIYAZHAKAN, K.; PANDEY, A.; SUKUMARAN, R. K. Biobutanol production from rice straw by a non acetone producing *Clostridium sporogenes* BE01. *Bioresource Technology*, v.145, p. 182–187, 2013.

GUO, T.; HE. A.Y.; DU, T.F.; ZHU, D-F.; LIANG, D.F.; JIANG, M.; WEI, P.; OUYANG, P-K. Butanol production from hemicellulosic hydrolysate of corn fiber by a *Clostridium beijerinckii* mutant with high inhibitor-tolerance. *Bioresource Technology*, v.135, p. 379–385, 2013.

HA, S. H.; MAI, N. L.; KOO, Y. M. Butanol recovery from aqueous solution into ionic liquids by liquid–liquid extraction. *Process Biochemistry*, v. 45, p. 1899-1903, 2010.

HASYIM, R.; IMAI, T.; O-THONG, S.; SULISTYOWATI, L. Biohydrogen production from sago starch in wastewater using an enriched thermophilic mixed culture from hot spring. *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 36, n. 21, p. 14162-14171, 2011

HEAP, J. T.; PENNINGTON, O. J.; CARTMAN, S. T.; MINTON, N. P. A modular system for *Clostridium* shuttle plasmids. *Journal of Microbiological Methods*, v. 78, p. 79-85, 2009.

HE, B. Q.; YUAN, J. I. E.; LIU, M. B.; ZHAO, H. Combustion and emission characteristics of a n-butanol HCCI engine. *Fuel*, v. 115, p. 758–764, 2014.

HUANG, H.; LIU, H.; GAN, Y.R. Genetic modification of critical enzymes and involved genes in butanol biosynthesis from biomass. *Biotechnology Advances*, v. 28 p. 651–657, 2010.

INTANOO, P.; CHAIMONGKOL, P.; CHAVADEJ, S. Hydrogen and methane production from cassava wastewater using two-stage upflow anaerobic sludge blanket reactors (UASB) with an emphasis on maximum hydrogen production. *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 41, n. 14, p. 6107–6114, 2016.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA – IBGE. Levantamento Sistemático da Produção Agrícola. Rio de Janeiro: IBGE, v. 29, n. 2, p. 1-79, fevereiro de 2016.

JANSSON, C., WESTERBERGH, A., ZHANG, J., HU, X., SUN, C. Cassava, a potential biofuel crop in (the) People’s Republic of China. *Applied Energy*, v. 86, p. S95–S99, 2009.

JONES, D. T.; WOODS, D. R. Acetone-Butanol Fermentation Revisited. *Microbiological Reviews*, v. 50, n. 4, p. 484-524, 1986.

KAEWKANNETRA, P.; CHIWES, W.; CHIUD, T.Y. Treatment of cassava mill wastewater and production of electricity through microbial fuel cell technology, *Fuel*, v. 90, n.8, p. 2746-2750, 2011.

KAEWKANNETRA, P.; IMAI, T.; GARCIA-GARCIA, F. J.; CHIU, T. Y. Cyanide removal from cassava mill wastewater using *Azotobactor vinelandii* TISTR 1094 with mixed microorganisms in activated sludge treatment system. *Journal of Hazardous Materials*, v. 172, p.224–228, 2009.

KENNES, D.; ABUBACKAR, H. N.; DIAZ, M.; VEIGA, M C.; KENNES, C. Bioethanol production from biomass: carbohydrate vs syngas fermentation. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*. v. 91, n. 4, p. 304–317, 2016.

KONG, X.; HE, A.; ZHAO, J.; WU, H.; MA, J.; WEI, C.; JIN W.; JIANG, M. Efficient acetone–butanol–ethanol (ABE) production by a butanol-tolerant mutant of *Clostridium beijerinckii* in a fermentation–pervaporation coupled process. *Biochemical Engineering Journal*, v. 105, p. 90-96, 2016.

KUMAR, M.; GAYEN, K. Developments in biobutanol production: New insights. *Applied Energy*, v.88, p. 1999–2012, 2011.

LAZARO, C. Z.; VICH, D. V.; HIRASAWA, J. S.; VARESCHE, M. B. A. Hydrogen production and consumption of organic acids by a phototrophic microbial consortium. *International Journal of Hydrogen Energy*, v.37, p. 11691-11700, 2012.

LEE, S.Y.; PARK, J.H.; JANG, S.H.; NIELSEN, L.K.; J. KIM, J.; JUNG, K.S. Fermentative butanol production by Clostridia, *Biotechnology. Bioengineering*, v.101, p. 209–228, 2008.

LI, H-G.; ZHANG Q-H.; YU, X-B.; WEI, L.; WANG, Q. Enhancement of butanol production in *Clostridium acetobutylicum* SE25 through accelerating phase shift by different phases pH regulation from cassava flour. *Bioresource Technology*, v. 201, p. 148–155, 2016.

LIMAYEM, A., RICKE, S.C. Lignocellulosic biomass for bioethanol production: current perspectives, potential issues and future prospects. *Prog. Energy Combust. Sci.* 38, 449–467, 2012.

LU, C.; ZHAO, J.; YANG, S-T.; WEI, D. Fed-batch fermentation for n-butanol production from cassava bagasse hydrolysate in a fibrous bed bioreactor with continuous gas stripping. *Bioresource Technology*, v. 104, p. 380–387, 2012.

LU, K. M.; CHIANG, Y. C.; WANG, Y. R.; CHEIN, R. Y.; LI, S. Y. Performance of fed-batch acetone–butanol–ethanol (ABE) fermentation coupled with the integrated *in situ*

extraction-gas stripping process and the fractional condensation. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, v. 60, p. 119-123, 2016.

LÜTKE-EVERSLOH, T.; BAHL, H. Metabolic engineering of *Clostridium acetobutylicum*: recent advances to improve butanol production. *Biotechnology*, v. 22, n. 5, p. 634–647, 2011.

LYND, L.R.; LASER, M.S; BRANSBY, D.; DALE, B.E.; DAVISON, B.; HAMILTON, R.; HIMMEL, M.; KELLER, M.; MCMILLAN, J.D.; SHEEHAN, J.; WYMAN, C.E. How biotech can transform biofuels. *Nature Biotechnology*, v. 26, n. 2, 169-172, 2008.

NAJAFPOUR, G.; YOUNESI, H. Ethanol and acetate synthesis from waste gas using batch culture of *Clostridium ljungdahlii*. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 38, p. 223–228, 2006.

NAPOLI, F.; OLIVIERI, G.; RUSSO, M. E.; MARZOCHELLA, A.; SALATINO, P. Continuous lactose fermentation by *Clostridium acetobutylicum*-Assessment of energetics and product yields of the acidogenesis. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 50, p. 165–172, 2012.

NJOKU, S.A., XAHRING, B.K., UELLEND AHL, H., 2012. Pretreatment as the crucial step for a cellulosic ethanol biorefinery: testing the efficiency of wet explosion on different types of biomass. *Bioresour. Technol.* 124, 105–110.

O-THONG, S.; HNIMAN, A.; PRASERTSAN, P. IMAI, T. Biohydrogen production from cassava starch processing wastewater by thermophilic mixed cultures. *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 36, p. 3409-3411, 2011.

PATIL, B. L.; FAUQUET, C. M. Cassava mosaic geminiviruses: actual knowledge and perspectives. *Molecular Plant Pathology*, v. 10, p. 685–701, 2009.

PEREIRA, L. G.; CHAGAS, M. F.; DIAS, M. O. S.; CAVALETT O.; BONOMI, A. Life cycle assessment of butanol production in sugarcane biorefineries in Brazil. *Journal of Cleaner Production*, v. 96, p. 557-568, 2015.

RAGANATI, F.; OLIVIERI, G.; PROCENTESE, A.; RUSSO, M. E.; SALATINO, P.; MARZOCHELLA. Butanol production by bioconversion of cheese whey in a continuous packed bed reactor. *Bioresource Technology*, v. 138, p. 259–265, 2013.

RAKOPOULOS, D.C.; RAKOPOULOS, C.D.; PAPAGIANNAKIS, R.G.; KYRITSIS, D.C. Combustion heat release analysis of ethanol or n-butanol diesel fuel blends in heavy-duty DI diesel engine. *Fuel*, v. 90, p. 1855–1867, 2011.

REN, H. Y.; LIU, B. F.; KONG, F.; ZHAO, L.; REN, N. Hydrogen and lipid production from starch wastewater by co-culture of anaerobic sludge and oleaginous microalgae with simultaneous COD, nitrogen and phosphorus removal. *Water Research*, v. 85, p. 404-412, 2015.

RIBAS, M. M. F.; BARANA, A.C. Start-up adjustment of a plug-flow digester for cassava wastewater (*Manipueira*) treatment *Scientia Agricola*, v. 60 n.2, 2003.

ROSA, P. R. F.; SANTOS, S. C.; SAKAMOTO, I. K.; VARESCHE, M. B. A.; SILVA, E. L. The effects of seed sludge and hydraulic retention time on the production of hydrogen from a *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 39, p. 13118-13127, 2014.

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. 1782-178, 2007.

SANTOS, S. C.; ROSA, P. R. F.; SAKAMOTO, I. K.; VARESCHE, M. B. A.; SILVA, L. E. Continuous thermophilic hydrogen production and microbial community analysis from anaerobic digestion of diluted sugar cane stillage. *International Journal of Hydrogen Energy*, v.39, p. 9000-9011, 2014.

SARATHY, S. M.; OßWALD, P.; HANSEN, N.; KOHSE-HÖINGHAUS, K. Alcohol combustion chemistry. *Progress in Energy and Combustion Science*, v. 44, p. 40–102, 2014.

SHIDA, G. M.; MAINTINGUER, S. I.; SAAVEDRA, N. K.; VARESCHE, M. B. A.; SILVA, E. L. Performance and composition of bacterial communities in anaerobic fluidized

bed reactors for hydrogen production: Effects of organic loading rate and alkalinity. *International Journal of Hydrogen Energy*, v.37, p. 16925-16934, 2012.

SORAPIPATANA C.; YOOSIN S. Life cycle cost of ethanol production from cassava in Thailand. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v. 15, n. 2, p.1343–1349, 2011.

SREETHAWONG, T.; CHATSIRIWATANA, S.; RANGSUNVIGIT, P.; CHAVADEJ, S. Hydrogen production from cassava wastewater using an anaerobic sequencing batch reactor: Effects of operational parameters, COD:N ratio, and organic acid composition. *International Journal of Hydrogen Energy*, v.35, p. 4092-4102, 2010.

STAGGS, K. W.; NIELSEN, D. R. Improving n-butanol production in batch and semi-continuous processes through integrated product recovery. *Process Biochemistry*, v. 501, p. 487–1498, 2015.

TUMWESIGYEA, K.S.; OLIVEIRA, J.C.; SOUSA-GALLAGHERA, M.J. New sustainable approach to reduce cassava borne environmental waste and develop biodegradable materials for food packaging applications. *Food Packaging and Shelf Life*, v. 7, p. 8–19, 2016.

UYTTEBROEK, M.; VAN HECKE, W.; VANBROEKHOVEN, K. Sustainability metrics of 1-butanol. *Catalysis Today*, v. 239, p. 7-10, 2015.

VAN DER MERWE, A. B.; CHENG, H.; GÖRGENS, J.F.; KNOETZE, J.H. Comparison of energy efficiency and economics of process designs for biobutanol production from sugarcane molasses. *Fuel*, v.105, p. 451–458, 2013.

VENKATARAMANANA, K. P.; KURNIAWANB Y.; BOATMANC, J.J.; HAYNESE, C. H.; TACONIC, K.A.; MARTIND, L.; BOTHUNB, G. D.; SCHOLZE, C. Homeoviscous response of *Clostridium pasteurianum* to butanoltoxicity during glycerol fermentation *Journal of Biotechnology*, v. 179, p. 8–14, 2014.

VIRMOND, E.; ROCHA, J.D.; MOREIRA, R. F. P. M.; JOSÉ, H.J. Valorization of agroindustrial solid residues and residues from biofuel production chains by thermochemical

conversion: a review, citing Brazil as a case study. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, v. 30, p. 197-229, 2013.

XUE, C.; ZHAO, X. Q.; LIU, C. G.; CHEN, L. J.; BAI, F. W. Prospective and development of butanol as an advanced biofuel. *Biotechnology Advances*, v. 31, p. 1575–1584, 2013.

ZHENG, J.; TASHIRO, Y.; WANG, Q.; SONOMOTO; K. Recent advances to improve fermentative butanol production: Genetic engineering and fermentation technology. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, v.119, n.1, p. 1-9, 2015.

WEIMER, P.J.; NERDAHL, M.; BRANDL, D. J. Production of medium-chain volatile fatty acids by mixed ruminal microorganisms is enhanced by ethanol in co-culture with *Clostridium kluyveri*. *Bioresource Technology*, v. 175, p. 97–101, 2015.

WICHITCHAN, C.; SKOLPAP, W.; Optimum cost for ethanol production from cassava roots and cassava chips. *Energy Procedia*, v. 52, p. 190 – 203, 2014.

YADAV, S.; RAWAT, G.; TRIPATHI, P.; SAXENA, R.K. A novel approach for biobutanol production by *Clostridium acetobutylicum* using glycerol: A low cost substrate. *Renewable Energy*, v.71, p. 37-42, 2014.

YANG, M.; KUITTINEN, S.; KEINÄNEN, M.; VEPSÄLÄINEN, J.; ROMAR, H.; TYNJÄLÄ, P.; LASSI, U.; PAPPINEN, A. The use of (green field) biomass pretreatment liquor for fermentative butanol production and the catalytic oxidation of biobutanol. *Chemical Engineering Research and Design*, v.92, p. 1531–1538, 2014.

YAO, M.; WANG, H.; ZHENG, Z.; YUE, Y. Experimental study of n-butanol additive and multi-injection on HD diesel engine performance and emissions. *Fuel*, v. 89, p. 2191–2201, 2010.

CAPÍTULO 3 – PRODUÇÃO DE BIOCOMBUSTÍVEIS POR *CLOSTRIDIUM BEIJERINCKII*, *C. ACETOBULYLICUM* E DIFERENTES INÓCULOS A PARTIR DE GLICOSE E MANIPUEIRA.

RESUMO

O presente estudo teve por objetivo avaliar a produção de biocombustíveis a partir de dois substratos, glicose e água residuária do processamento da farinha de mandioca (manipueira). Cepas de *Clostridium beijerinckii* (ATCC 10132), *Clostridium acetobutylicum* (ATCC 824) foram avaliadas utilizando glicose 30 g L⁻¹ como substrato em reatores em batelada por 144h. Com a cepa que apresentou melhor produção de etanol e butanol foi realizado um segundo ensaio no qual foi avaliada a produção da cepa e quatro diferentes inóculos (pré tratados termicamente): ES - efluente de biodigestor de suinocultura situado na Granja Água Branca no município de Itu; LR - lodo de reator UASB da Estação de tratamento de Esgoto sanitário do município de Porto Feliz; ES - esterco bovino; SL - solo de cultivo de cana-de-açúcar do município de Sorocaba, todos foram submetidos à fermentação em batelada por 90h. A maior produção entre as cepas avaliadas com glicose 30 g L⁻¹ foi obtida por *Clostridium beijerinckii* com 0,33±0,08 g L⁻¹ de butanol e 1,65±0,23 g L⁻¹ de etanol frente a 0,06±0,03 g L⁻¹ de butanol e 1,24±0,04 g L⁻¹ de etanol produzido por *Clostridium acetobutylicum*. Na segunda etapa a manipueira (10 g L⁻¹ de açúcar redutor) foi avaliada para produção de butanol com *C. beijerinckii* alcançou-se produção de butanol de 0,64±0,01 g L⁻¹ nenhum dos inóculos apresentou produção desse biocombustível, porém com manipueira como substrato esterco bovino e o efluente de suinocultura produziram ácido butírico, 0,31±0,04 g L⁻¹ e 0,12±0,013 g L⁻¹, respectivamente e uma pequena produção de etanol 0,005±0,007 g L⁻¹ foi alcançada pelo efluente de suinocultura. Com glicose 10 g.L⁻¹ *C. beijerinckii* produziu 0,27±0,13 g L⁻¹ de butanol e 1,72±0,18 g L⁻¹ de etanol. Os inóculos não apresentaram produção de biocombustíveis com a partir de glicose. No entanto, como o ácido butírico é um produto da fermentação incompleta e esse pode ser metabolizado em butanol, esses inóculos apresentam potencial de produzir biobutanol. A maior produção de etanol (2,47±0,07 g L⁻¹) e butanol (0,64 ±0,01 g L⁻¹) foi obtida a partir de manipueira (10 g L⁻¹ de açúcar redutor) e com CB como inóculo. Esse resultado mostra a viabilidade da utilização da manipueira como substrato para a produção de biocombustíveis, proporcionando outro destino e agregando valor a esse resíduo.

Palavras-chaves: Biobutanol. *Clostridium beijerinckii*. *Clostridium acetobutylicum* Manipueira.

ABSTRACT

The world witness an energy crisis that can be observed in the rising price of fossil fuels, in the depletion of oil reserves and in environmental issues involving the use of these non-renewable fuels. Biofuels, such as biobutanol, have potential to offset the use of fossil fuels and are a clean and cheap energy source. Biobutanol has great potential as an alternative fuel because it is produced by fermentation of the genus *Clostridium* ssp. With the byproducts acetone and ethanol. This study aims to evaluate the production of biobutanol from two

substrates, glucose and wastewater from cassava flour processing (manipueira). Batch fermentations were carried with strains of *Clostridium beijerinckii* (ATCC 10132), *Clostridium acetobutylicum* (ATCC 824) and four different inocula: ES - digester effluent from pig farming located in the Fazenda Água Branca in the city of Itu; LR - UASB sludge of sewage treatment plant in the city of Porto Feliz; ES - cattle manure; SL soil sugarcane cultivation in the city of Sorocaba. There were two steps in the work, initially the production of strains with glucose (30 g L^{-1}) were evaluated and in these trials the highest production was obtained with the *Clostridium beijerinckii* strain (ATCC 10132) $0.33 \pm 0.08 \text{ g L}^{-1}$ in comparison to $0.06 \pm 0.03 \text{ g L}^{-1}$ butanol produced by *Clostridium acetobutylicum* (ATCC 824). In the following step, manipueira (10 g L^{-1} of reducing sugar) was evaluated for butanol production with *C. beijerinckii* and four environmental inocula, and only the strain produced butanol at $0.64 \pm 0.01 \text{ g L}^{-1}$. None of the inoculum showed production of biofuels, but with cassava as substrate, cattle and swine manure effluent produced butyric acid at concentrations of $0.31 \pm 0.04 \text{ g L}^{-1}$ and $0.12 \pm 0.013 \text{ g L}^{-1}$, respectively. Ethanol was produced in small amounts $0.005 \pm 0.007 \text{ g L}^{-1}$ by swine manure effluent. As the butyric acid is a product of incomplete fermentation and this can be metabolized to butanol, the two inocula show the potential to produce biobutanol after optimization of the fermentation process. This result shows the feasibility of using cassava wastewater as a substrate for the production, adding value to this waste.

Key-words: Biobutanol. Bioethanol *Clostridium*. Cassava wastewater.

3.1 INTRODUÇÃO

Com a crise energética confrontada pelo mundo, aumento dos preços dos combustíveis fósseis, esgotamento futuro dos recursos petrolíferos e problemas ambientais, tais como a chuva ácida e emissões de gases de efeito estufa (ABD-ALLA et al., 2015) provocados por essa fonte não-renovável de energia, a produção econômica dos biocombustíveis tornou-se um potencial para compensar as necessidades atuais de combustíveis fósseis (KUMAR & GAYEN, 2011), tendo como principais exemplos o butanol e o etanol.

Os dois álcoois podem ser produzidos a partir de biomassa vegetal e açúcares pelo processo fermentativo acetona-butanol-etanol (ABE) reforçado nas últimas décadas, através do desenvolvimento de melhores linhagens e otimização do processo.

A produção desses biocombustíveis é realizada em condições estritamente anaeróbias por bactérias do gênero *Clostridium* spp., capazes de metabolizar a biomassa em acetona, butanol e etanol utilizando uma variedade de hidratos de carbono (glicose, galactose, celobiose, manose, xilose e arabinose (EZEJI et al., 2007; QURESHI; EZEJI, 2008). Condição que pode reduzir o custo de produção através da utilização de substrato de baixo custo como os resíduos agroindustriais (QURESHI et al., 2010). Muitos trabalhos foram

realizados utilizando *Clostridium* spp. para produção de butanol e etanol a partir de biomassa rica em carboidratos, que incluem farelo de arroz, farelo de trigo, palha de milho, fibra de milho, trigo, cevada, semente de palma, resíduos de amido, palha de arroz e aparas de madeira (LU et al., 2012; DU et al., 2013; GUO et al., 2013; GOTTUMUKKALA et al., 2013; PEREIRA et al., 2015; SHUKOR et al., 2014; YANG et al., 2014).

O butanol tem grande potencial como biocombustível (NIGAM, SINGH, 2011; LI et al., 2014), apresenta vantagens sobre o etanol, pois é mais energético, possui menor volatilidade, é menos higroscópico, apresenta menor teor corrosivo (VAN DER MERWE et al., 2013) e é mais semelhante a gasolina do que o etanol, permitindo que seja usado em maior porcentagem quando misturado ao combustível (HE et al., 2014), além de ser compatível com o design atual dos motores tornando-se um candidato ideal para substituir a gasolina (KUJAWSKA et al., 2015), conforme apresentado anteriormente na tabela 2.1.

Com linhagens de *Clostridium acetobutylicum*, estudos mostraram a produção de biobutanol e bioetanol a partir de diferentes substratos. Um exemplo é o amido de mandioca hidrolisado, em um trabalho realizado por Li et al (2014) o butanol foi produzido em uma concentração igual a 12,16 g L⁻¹ e o etanol igual a 2,73 g L⁻¹.

Para as linhagens de *Clostridium beijerinckii* também são relatados os usos de diferentes substratos, a produção de 13,4 g L⁻¹ butanol foi obtida por Ezeji, Qureshi e Blaschek, (2007a) com o substrato amido de milho e a produção de etanol igual a 1,16 g L⁻¹ foi alcançada por Ujor et al., (2014) tendo como substratos resíduos provenientes da fabricação de leite em pó.

O Brasil, por ser um país agrícola, gera muitos resíduos agroindustriais, um deles é a água residuária do processamento da mandioca em farinha, denominada de manipueira. Segundo o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística em 2016 o país deve colher uma safra de 23,1 milhões de toneladas de mandioca (IBGE, 2016).

Para cada quilograma de raízes frescas é produzido 0,2 kg de amido, 0,4-0,9 kg de bagaço e cerca de 5-7 litros de água residuária rica em carboidratos (SANGYOKA; REUNGSANG; MOONAMART, 2007). O amido quando hidrolisado gera glicose e maltose, matérias-primas que podem ser utilizadas na conversão biológica dos hidratos de carbono em ácidos orgânicos (KAPDAN; KARGI, 2006) e, em seguida, em biocombustíveis.

A manipueira é rica em carboidratos (O-THOG, 2011), o que a torna atrativa no processo fermentativo. Contudo apresenta um alto teor de matéria orgânica e de cianeto, o que representa séria ameaça para o ambiente e à vida aquática em águas receptoras por se tratar de

um elemento tóxico capaz de comprometer o processo de respiração de animais aquáticos (KAEWKANNETRA, 2009).

Segundo Chua e colaboradores (2013), a procura por micro-organismos selvagens que possam reforçar a produção de biocombustíveis é necessária. No trabalho realizado por Abd-Alla e colaboradores (2015), usando como substrato glicose 6% a produção de biobutanol por uma nova estirpe foi de 16,77 g L⁻¹, produção superior à de uma estirpe já estudada que foi de 6,463 g L⁻¹.

O presente estudo teve por objetivo avaliar a produção de biocombustíveis a partir de manipueira como substrato, com o intuito de fornecer outra alternativa de destino para esse efluente agregando maior valor ao resíduo.

Logo foram avaliadas a viabilidade de produção das cepas *C. beijerinckii* e *C. acetobutylicum* e quatro diferentes inóculos. Os inóculos empregados neste trabalho foram previamente escolhidos com base em trabalhos que já haviam encontrado clostrídios no solo (ABD-ALLA et al., 2015), em lodo ativado de estação de tratamento de esgoto (CHEN et al., 2012), lodo de tratamento de suinocultura (SHIDA et al., 2012; LARAZO et al., 2012) e esterco bovino (BAGGE, PERSSON; JOHANSSON, 2010).

3.2 METODOLOGIA

Esse trabalho foi dividido em duas etapas, primeiramente duas cepas *Clostridium beijerinckii* (ATCC 10132) e *Clostridium acetobutylicum* (ATCC 824) foram testadas em relação à produção de biocombustíveis tendo como substrato glicose (30 g L⁻¹). Na segunda etapa do experimento a cepa que produziu mais os biocombustíveis com glicose (30 g L⁻¹) foi comparada em termos de produção com quatro diferentes inóculos: ES - efluente de biodigestor de suinocultura situado na Granja Água Branca no município de Itu; LR - lodo de reator UASB da Estação de tratamento de Esgoto sanitário do município de Porto Feliz; EB - esterco bovino; SL - solo de cultivo de cana-de-açúcar do município de Sorocaba. Nesta etapa foram avaliados dois substratos glicose (10 g L⁻¹) e manipueira com concentração de açúcares redutores igual a 10 g L⁻¹.

3.2.1 Preparação das cepas

As cepas foram obtidas da coleção da Fundação Tropical de Pesquisa e Tecnologia André Tosello, *Clostridium beijerinckii* (ATCC 10132) aqui denominada CB e *Clostridium*

acetobulylicum (ATCC 824) aqui denominada CA. Ambas foram reidratadas e incubadas por 24h em condições de anaerobiose em 37 °C no meio RCM (Reinforced Clostridial Media) (KHAMAISEH et al., 2012). Após o crescimento foram repicadas em 20 mL do mesmo meio e incubadas nas mesmas condições por 48h. Para a montagem dos reatores em batelada 5 mL dos 20 mL das cepas já incubadas foram transferidos com o auxílio de uma seringa para 300 mL do meio de produção de butanol (MONOT et al., 1982) com a seguinte composição: $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0,01 g L⁻¹, NaCl 0,01 g L⁻¹, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,01 g L⁻¹, acetato de amônio 1,5 g L⁻¹, Ácido *para*-aminobenzóico 0,001 g L⁻¹, Biotina 0,00001 g L⁻¹, KH_2PO_4 1 g L⁻¹, $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 0,75 g L⁻¹, extrato de levedura 2 g L⁻¹. Na preparação do meio foi fluxionado N_2 para deixa-lo anaeróbio, o pH foi ajustado para 6,5, com solução de NaOH 1 M e HCl 1 M com concentração de 30 g L⁻¹ de glicose, o qual foi incubado por 48 horas a 37 °C e utilizado como inóculo.

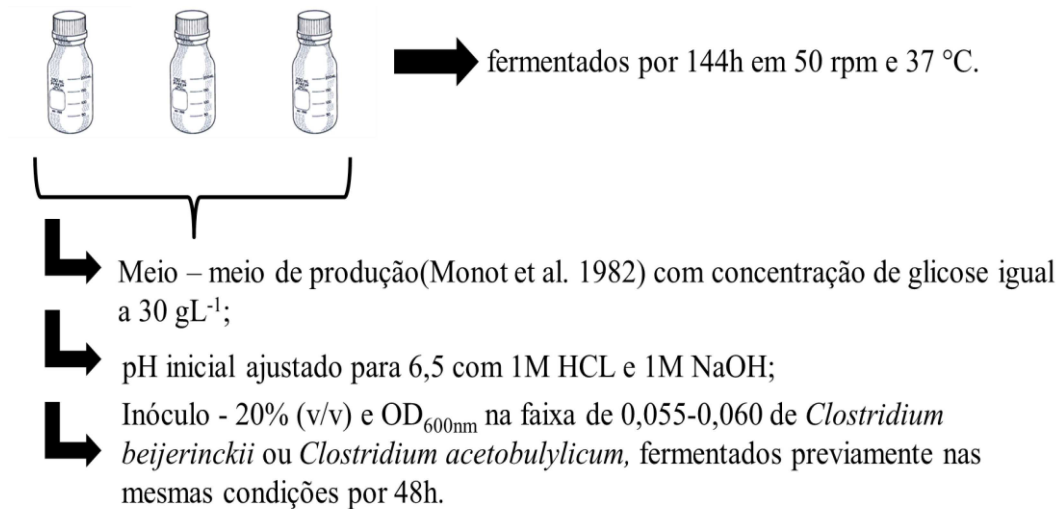
3.2.2 Operação dos reatores anaeróbios em batelada com glicose

Os reatores foram montados em triplicatas, em frascos reagentes de 500 mL com volume reacional de 300 mL, o volume restante foi preenchido com N_2 , para favorecer a anaerobiose.

Para a fermentação foi utilizado o meio sintético para crescimento de micro-organismos solvetogênicos (MONOT et al. 1982) e 30 g L⁻¹ de glicose. O meio foi distribuído nos frascos e fechados com tampa de butila e estes foram autoclavados em 121 °C, a 1 atm por 15 min.

Os reatores foram montados com 20%(v/v) de cada inóculo de CB e CA com densidade óptica (OD) medida em aparelho Hach Dr5000 em comprimento de onda 600 nm (EZEJI; QURESHI; BLASCHEK, 2005) entre 0,055-0,06 e mantidos constantemente em temperatura $37 \pm 1^\circ\text{C}$ e agitação 50 rpm por 144 h.

Figura 3.1 - Organograma experimental do ensaio com as cepas e glicose 30 g L⁻¹



3.2.3 Pré-tratamento dos inóculos

Os inóculos foram coletados em frascos de 5 L previamente limpos e esterilizados, todos foram armazenados em 4 °C após coleta.

Antes de iniciar os processos fermentativos de produção, os inóculos receberam um pré-tratamento térmico, como descrito por Xiao e Liu (2009). Foram autoclavados 5 g de cada inóculo a 121 °C em 1,5 atm por 30 minutos, o intuito desse tratamento foi selecionar as bactérias produtoras de endósporos e eliminar os organismos consumidores de H₂ e os demais micro-organismos (XIAO; LIU, 2009). Após esse tratamento nos frascos contendo o inóculo foram adicionados 20 mL do meio de produção de solventes (MONOT et al. 1982) com concentração de glicose igual a 30 g L⁻¹ e incubados por 48h em condições anaeróbias a 37±1 °C.

Posteriormente, foram retirados de cada frasco 5 mL de meio de cultura com inóculo e transferidos para frascos contendo 300 mL do meio de produção de butanol (MONOT et al. 1982) com concentração de 30 g L⁻¹ de glicose. Os frascos foram incubados por 48 h sob as mesmas condições e as culturas resultantes em cada frasco foram utilizadas nos processos fermentativos para produção de butanol.

3.2.4 Manipueira

A manipueira foi adquirida na Fábrica de Farinha de mandioca Caio Prado, situada no município de Araras, SP, e foram determinados os valores de pH inicial, 5,25 (APHA, 2005),

sólidos totais $64,75 \text{ g L}^{-1}$ (APHA, 2005), sólidos totais voláteis $49,67 \text{ g L}^{-1}$ (APHA, 2005), demanda química de oxigênio total $95,33 \text{ g L}^{-1}$ (DQO) (APHA, 2005) e total de açúcar redutor 20 g L^{-1} (MILLER et al., 1959). A manipueira foi armazenada sobre refrigeração ($-20 \text{ }^{\circ}\text{C}$).

Com o intuito de disponibilizar o amido em açúcares fermentáveis a manipueira foi hidrolisada em autoclave a 121°C por 30 min com uma solução $0,5\% \text{ H}_2\text{SO}_4$ 1:1 (v/v) (ROSA et al., 2014). Após esse procedimento o pH foi ajustado para 6,5 com solução NaOH 10 M e amostras de 40 mL foram centrifugadas por 5 min em rotação de 7500 rpm. Após centrifugação foram determinados os açúcares redutores presentes após hidrólise que foi de 16 g L^{-1} com o método 3,5 ácido dinitrosalicílico para açúcares redutores (DNS) (MILLER et al., 1959).

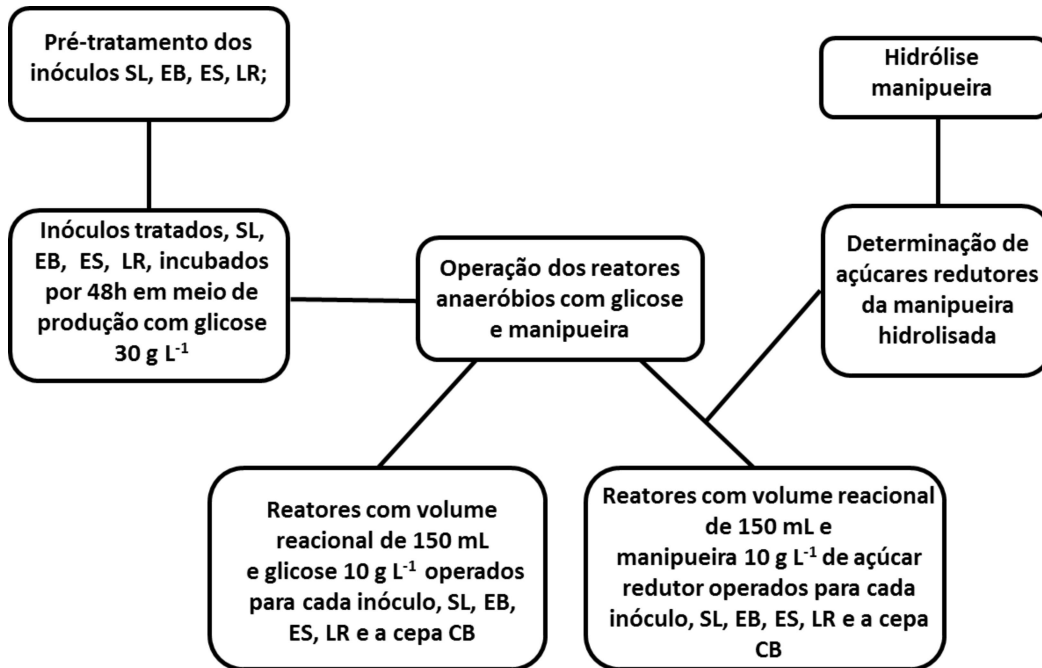
3.2.5 Operação dos reatores anaeróbios em batelada tendo como único substrato glicose ou manipueira

Esses reatores foram montados em triplicatas para cada substrato, glicose 10 g L^{-1} e manipueira 10 g L^{-1} de açúcar redutor, para cada inóculo CB (*C. beijerinckii*), SL (solo), ES (efluente de suinocultura), LR (lodo anaeróbio de estação de tratamento de esgoto), EB (esterco bovino) em frascos reagentes de 250 mL com volume reacional 150 mL, o volume restante foi preenchido com N_2 para favorecer a anaerobiose.

Os reatores foram montados no meio de produção (MONOT et al., 1982) com dois diferentes substratos separadamente. Reatores apenas com glicose na concentração de 10 g L^{-1} e apenas com manipueira, a qual foi diluída até a concentração de 10 g L^{-1} de açúcar redutor (DNS) (MILLER et al., 1959).

Os frascos foram tampados com tampa de butila e com auxílio de uma seringa 20% (v/v) de cada inóculo CB, SL, ES, LR e EB foram injetados com auxílio de uma seringa nos reatores, sendo que a $\text{OD}_{600\text{nm}}$ (EZEJI; QURESHI; BLASCHEK, 2005) utilizada foi na faixa de 0,1-0,11, que foi a menor OD lida entre os inóculos. Os reatores foram mantidos em agitação (50 rpm) e temperatura ($37 \pm 1 \text{ }^{\circ}\text{C}$) controlados por 90 h. Valores de pH foram medidos após a inoculação e ao final da fermentação.

Figura 3.2 - Esquema da segunda parte experimental



3.2.6 Procedimentos analíticos

Um volume de 5 ml de amostras iniciais e finais de cada reator foram centrifugadas a 7500 rpm por 5 min, a partir do sobrenadante foi determinado os açúcares, ácidos orgânicos e álcoois.

3.2.6.1 Determinação dos açúcares redutores

Os açúcares redutores foram determinados pelo método 3,5 ácido dinitrosalicílico (DNS) (MILLER et al., 1959) a partir de 1 mL de amostra retirada do sobrenadante.

3.2.6.2 Determinação dos ácidos orgânicos e álcoois

Para a determinação dos ácido orgânicos e álcoois utilizou-se o método Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLADE) (PENTEDO et al., 2012) sendo o detector ultravioleta e arranjo de diodos (UV-DAD) para a análise dos ácidos, e índice de refração (RID-10A) para álcoois. Para a separação dos ácidos e álcoois utilizou-se a coluna Aminex HPX-87H a 43 °C e ácido sulfúrico 0,01 N como eluente com fluxo de 0,5 mL min⁻¹. O tempo de corrida de cada amostra era de 65 minutos e a análise dos resultados era realizada pelo software 42 Class-VP (SHIMADZU modelo Prominence).

3.2.7 Cálculo de rendimento e taxa de produção

Os cálculos de rendimento e taxa de produção foram realizados conforme as fórmulas abaixo.

$$\text{Rendimento} = \text{g de butanol produzido} / \text{g de açúcar consumido}$$

$$\text{Taxa de produtividade} = \text{g de butanol produzido} / \text{L/tempo}$$

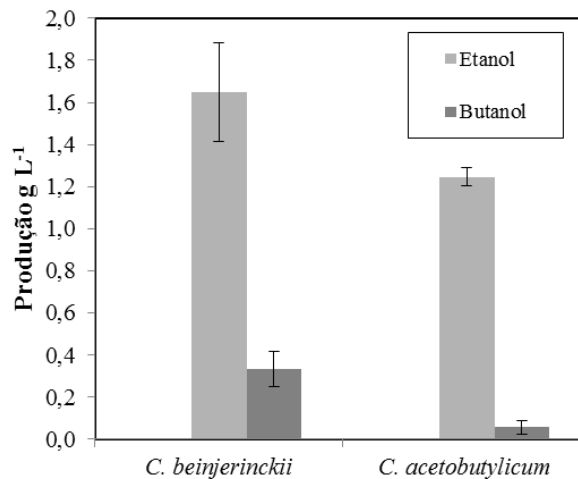
3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.3.1 Efeito da cepa sobre a produção de biocombustíveis a partir de glicose 30 g L⁻¹

Ambas as cepas produziram os dois biocombustíveis durante a fermentação com glicose, com a cepa CA a produção de etanol foi de 1,24±0,04 g L⁻¹ e butanol 0,06±0,03 g L⁻¹. Ouephanit et al. (2011), ao utilizar a mesma cepa CA com uma concentração de glicose igual 20 g L⁻¹ obtiveram etanol em uma concentração de 0,032 g L⁻¹ e butanol 0,149 g L⁻¹, uma baixa produção de solventes, contudo ao fermentarem com outros substratos como amido (2% m/v) a produção passou a ser de 0,091 g L⁻¹ de etanol e 0,089 g L⁻¹ de butanol ao utilizar água de lavagem de mandioca para produção de amido com pH igual a 5,5 a produção de etanol foi de 0,124 g L⁻¹ e de butanol igual a 0,070 g L⁻¹.

Já com a cepa CB foi possível obter maior produção, sendo de 1,65±0,23 g L⁻¹ de etanol e 0,33±0,08 g L⁻¹ de butanol (Fig. 3.3). Devido a esses resultados apenas CB foi utilizada na segunda etapa do experimento.

Figura 3.3 - Produção de etanol e butanol no final da fermentação (144 h) utilizando 30 g L⁻¹ de glicose



Como a proporção de produtos da fermentação ABE é igual a 3:6:1 (GARCÍA, et al., 2011; BELLIDO, et al., 2015) era esperado uma maior produção de butanol em relação ao etanol como na literatura. Alguns trabalhos, com glicose como substrato, mostram produções de etanol muito baixas em relação a de butanol (TAB. 3.1).

Para Ezeji, Qureshi e Blaschek, (2004) alcançaram uma produção de butanol igual a 11,9 g L⁻¹ e apenas 0,5 g L⁻¹ de etanol. Li et al., (2013b) obtiveram 0,5 g L⁻¹ de etanol e uma produção de butanol de 9,08 g L⁻¹ e no caso de Kheyrandish et al. (2015) a produção de butanol foi cem vezes maior do que a de etanol, 11,5 g L⁻¹ e 0,1 g L⁻¹.

Tabela 3.1 - Produção de butanol e etanol por *Clostridium acetobutylicum* e *Clostridium beijerinckii*

Glicose g L ⁻¹	Inóculo	Bioálcoois		Referências
		Butanol g L ⁻¹	Etanol g L ⁻¹	
80	<i>C. acetobutylicum</i>	11,5	0,1	KHEYRANDISH et al. (2015).
90	<i>C. acetobutylicum</i>	20,39	2,22	LU et al. (2012).
60	<i>C. acetobutylicum</i>	11,5	2	YEN; LI; MA (2011).
70	<i>C. acetobutylicum</i>	11,7	1,3	WU et al. (2013).
30	<i>C. acetobutylicum</i>	0,06	1,27	Presente estudo
60	<i>C. beijerinckii</i>	11,5	0,42	MARIANO; MACIEL FILHO; EZEJI (2012).
60	<i>C. beijerinckii</i>	9,08	0,5	LI et al. (2013b).
60	<i>C. beijerinckii</i>	11,9	0,5	EZEJI; QURESHI; BLASCHEK (2004).
30	<i>C. beijerinckii</i>	0,33	1,65	Presente estudo

Foi possível concluir que as condições utilizadas no experimento favoreceram mais a produção de etanol do que a de butanol. Destacando a baixa concentração inicial do substrato que favoreceu apenas a produção de ácido butírico e não a assimilação do ácido em butanol. Como para Comwien et al. (2015), que obteve uma concentração de ácido butírico mais elevada em relação ao solvente produzido, consequência da baixa quantidade de substrato utilizada, pois ao aumentarem a concentração de substrato oferecido aumentaram a produção de butanol. Em trabalhos que utilizam uma concentração de substratos mais elevada a produção de biocombustíveis foi mais significativa (TAB. 3.1) para ambas cepas utilizadas.

As análises de ácidos orgânicos por cromatografia líquida mostraram uma quantidade significativa de ácido butírico gerado, $2,60 \pm 0,41 \text{ g L}^{-1}$ para CB e $2 \pm 0,08 \text{ g L}^{-1}$ para CA. A maior produção de etanol pode ser explicada por uma alta concentração de ácido acético, ácido metabolizado em etanol, inicial $1,25 \pm 0,1 \text{ g L}^{-1}$ para CB e $1,03 \pm 0,08 \text{ g L}^{-1}$ para CA.

Segundo Geng e Parque (1993) culturas com pH inicial igual ou superior a 6,0, tendem a produzir ácidos orgânicos na sua maioria e uma pequena quantidade de solventes. Outro fator que pode ter corroborado com uma maior produção de ácidos, $2,8 \pm 0,38 \text{ g L}^{-1}$ para CB e $2,16 \pm 0,27 \text{ g L}^{-1}$ para CA, do que solventes, $1,31 \pm 0,07 \text{ g L}^{-1}$ para CA e $1,98 \pm 0,0,38 \text{ g L}^{-1}$ para CB, é referente a baixa concentração inicial de açúcar oferecido como substrato, segundo Linggang et al. (2013) com concentração inicial de glicose 30 g L^{-1} , obtiveram produção de $2,23 \text{ g L}^{-1}$ de butanol e $4,86 \text{ g L}^{-1}$ de ácido butírico. Ao aumentarem o substrato para 50 g L^{-1} foi possível aumentar a produção de butanol para $4,04 \text{ g L}^{-1}$ e diminuir a de ácido butírico para 1.78 g L^{-1} .

Wang et al. (2014) também obtiveram esse resultado, ao utilizar 20 g L^{-1} de glicose conseguiram produção de butanol igual a $1,85 \text{ g L}^{-1}$ e uma produção de ácido butírico maior que 3 g L^{-1} , alcançaram maior produção, $13,03 \text{ g L}^{-1}$, ao aumentar a concentração de substrato para 80 g L^{-1} , sugerindo que a fermentação de butanol deve ser realizada a uma concentração de fonte de carbono relativamente mais elevada para alcançar um desempenho maior.

Em termos de produção em g L^{-1} as cepas utilizadas produziram butanol $0,06 \pm 0,03 \text{ g L}^{-1}$ para CA e $0,33 \pm 0,08 \text{ g L}^{-1}$ para CB, resultados inferiores aos encontrados na literatura (TAB 3.2).

Ao utilizarem uma concentração de glicose (30 g L^{-1}) igual ao presente estudo as produções de butanol foram significativamente mais elevadas do que a produção alcançada por ambas as cepas, Chen et al. (2013), produziu $6,59 \text{ g L}^{-1}$ com CA, igual a e Yang et al. (2016) $6,24 \text{ g L}^{-1}$ com CB.

Tabela 3.2 - Produção de butanol encontrada na literatura por CB e CA utilizando concentrações de glicose inferiores e iguais a 30 g L⁻¹

Inóculo	Glicose inicial g L ⁻¹	pH	Quantidade de inóculo % (v/v)	Butanol g L ⁻¹	Referência
<i>C. acetobulylicum</i>	20	6,8	10	5,2	KHEYRANDISH et al. (2015)
<i>C. acetobulylicum</i>	30	mantido em 6,5	-----	6,59	CHEN et al. (2013)
<i>C. acetobulylicum</i>	20	mantido em 5	-----	2,66	DOLEJŠ et al. (2014)
<i>C. acetobulylicum</i>	25	6,5	5	3,1	ABD-ALLA; EL-ENANY, (2012)
<i>C. acetobulylicum</i>	30	7	3	2,2	BONER, et al. (2014)
<i>C. acetobulylicum</i>	30	6,5	20	0,06	Esse estudo
<i>C. beijerinckii</i>	20	6,5	10	5,7	LOYARKAT; CHEIRSILP; PRASERTSAN, (2015)
<i>C. beijerinckii</i>	20	6,5	-----	3,2	ISAR; RANGASWAMY, (2012)
<i>C. beijerinckii</i>	30	6,5	-----	6,24	YANG et al. (2016)
<i>C. beijerinckii</i>	31	6	-----	6,66	KWON et al. (2016)
<i>C. beijerinckii</i>	28,34	6,5	-----	6,45	MOON et al. (2015)
<i>C. beijerinckii</i>	30	6,5	20	0,33	Esse estudo

Grande parte dos trabalhos de produção de butanol evidenciam um consumo elevado de substrato chegando a 100%, diferentemente do que foi observado no presente trabalho (TAB. 3.3) em que o consumo de açúcar chega ao máximo de 28,73%.

A OD_{600 nm} do inóculo inserido nos reatores 0,055-0,06 pode ser um dos fatores para a baixa produção de butanol, já que a biomassa inserida em função da densidade ótica OD_{600nm} utilizada foi baixa, inóculos adicionados ao meio de produção de butanol com OD_{600 nm} mostraram melhores produção, com OD_{600nm} entre 0,8–1,0, 55 g L⁻¹ de glicose e 5% (v/v) alcançou uma produção maior que 12 g L⁻¹ de butanol com *C. beijerinckii* (EZEJI; QURESHI; BLASCHEK., 2007b) enquanto a mesma cepa inoculada com OD de 1,2-1,6 e 5% (v/v) produziu 14,3 g L⁻¹ butanol, com 40,8 g L⁻¹ de amido de milho solúvel (EZEJI; QURESHI; BLASCHEK, 2005).

Com uma concentração de glicose 60 g L^{-1} , utilizando *C. beijerinckii* como inóculo em proporção 5% (v/v), o consumo foi de 75,3% (EZEJI; QURESHI; BLASCHEK, 2003), com *C. saccharoperbutylacetonicum* como inóculo em proporção 10% (v/v), pH inicial 6,2 e concentração de glicose 66 g L^{-1} o consumo observado foi de 96,4% do substrato (THANG; KANDA; KOBAYASH, 2010), e com $19,3 \text{ g L}^{-1}$ de açúcares a partir de farelo de arroz hidrolisado houve 100% de consumo (AL-SHORGANI; KALIL; YUSOFF, 2012)

A partir de um inóculo isolado do solo de pradaria com 30 g L^{-1} de glicose, pH mantido em 6 e inóculo 10% (v/v) o consumo do substrato foi de 90,27% (CHUA, et al., 2013). Com *C. acetobutylicum* como inóculo em proporção 10% (v/v) dois substratos diferentes com concentrações iniciais de 23 g L^{-1} de glicose, o consumo do meio sintético de glicose foi de e 88,48% e do resíduo de sagu hidrolisado 93% (LINGGANG et al., 2013) com a mesma espécie e proporção igual a 5% (v/v), pH mantido em 5 e glicose 20 g L^{-1} , obteve-se 100% de substrato consumido (DOLEJŠ et al, 2014) e para o presente trabalho como o maior consumo de açúcar foi de 28,73% com *C. beijerinckii* (TAB. 3.3).

Tabela 3.3 - Consumo de açúcares no período de 0h-144h.

Cepa	Açúcares redutores g L^{-1}		% Consumo
	0h	144h	
<i>Clostridium beijerinckii</i>	33,43±0,88	23,83±1,4	28,73
<i>Clostridium acetobutylicum</i>	36,65±0,59	28,55±0,33	22,08

Como o pH final medido 4,71 esteve próximo de pH 5 a fase de acidogênese para solventogênese ocorreu, já que a produção de solvente está associada a redução no pH do meio para cerca de 5, devido à acumulação de produtos da fermentação, como ácido butírico e acético (JONES; WOODS, 1986).

3.3.2 Efeito do substrato sobre a produção de biocombustíveis para a cepa CB

Em função da cepa CB mostrar melhor produção de butanol na primeira fase do experimento foi utilizada para comparação com os inóculos ambientais SL, LS, LR e EB.

Assim como na primeira etapa do experimento a proporção ABE (3:6:1) de produção não ocorreu, pois a produção de etanol foi superior a de butanol para ambos substratos

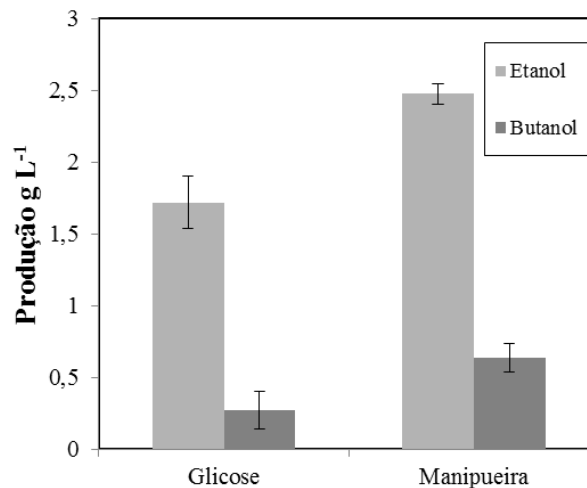
(FIG.3.4), mostrando que as condições de fermentação aplicadas favoreciam a produção de etanol do que butanol, $1,72 \pm 0,18 \text{ g L}^{-1}$ de etanol com glicose como substrato e $2,47 \pm 0,07 \text{ g L}^{-1}$ de etanol com manipueira como substrato, utilizando CB como cepa.

Contudo é importante evidenciar que para CB com manipueira houve 134% de aumento na produção de butanol empregando manipueira (10 g L^{-1} de açúcar redutor) em relação à produção com glicose (10 g L^{-1}) e para o etanol, houve um aumento de 44,4% ao empregar a manipueira (10 g L^{-1} de açúcar redutor) em relação a glicose (10 g L^{-1}).

Em concentração mais elevada de glicose 30 g L^{-1} a produtividade da manipueira (10 g L^{-1} de açúcar redutor) como substrato para CB foi maior para ambos álcoois, $0,09 \text{ g g}^{-1}$ de butanol e $0,35 \text{ g g}^{-1}$ de etanol para manipueira e $0,05 \text{ g g}^{-1}$ de butanol e $0,26 \text{ g g}^{-1}$ de etanol para glicose 30 g L^{-1} .

Esses resultados evidenciam que a manipueira, não é apenas uma fonte de poluição e problemas ambientais (SUN et al., 2012), já que foi possível produzir biocombustíveis em concentrações mais elevadas tendo a manipueira como substrato do que a glicose.

Figura 3.4 - Produção de ácido butírico, etanol e butanol por *Clostridium beijerinckii* nos diferentes substratos após 90 h em 10 g L^{-1} de glicose e manipueira 10 g L^{-1} de açúcar redutor.



Isso também foi observado em outros trabalhos que utilizam outras matérias primas para a fermentação (TAB. 3.4), como por exemplo ao utilizar amido de milho em concentração igual a $40,8 \text{ g L}^{-1}$ a produção foi de butanol foi de $14,3 \text{ g L}^{-1}$ ao aumentar a concentração de glicose a 60 g L^{-1} a produção de butanol foi reduzida para $11,9 \text{ g L}^{-1}$ (EZEJI; QURESHI; BLASCHEK, 2005). Outros componentes da manipueira, não perdidos na hidrólise, podem ter facilitado a assimilação dos ácidos orgânicos em solventes.

Tabela 3.4 - Comparação de produção de biobutanol com glicose como único substrato e outros substratos.

Glicose (g L ⁻¹)	Produção de butanol (g L ⁻¹)	Outo substrato (g L ⁻¹)	Produção de butanol (g L ⁻¹)	Referências
60	11,9	Amido de milho – 40,8	14,3	EZEJI; QURESHI; BLASCHEK, (2005)
23	4,86	Resíduo de produção de sago – 23	6,21	LINGGANG et al. (2013)
50	7,2	Farelo de trigo – 53,1	8,5	LIU et al. (2010)
60	5,52	Bagaço de cana de açúcar – 40,66	6,86	SU et al. (2015)
28,34	6,66	Resíduos de madeira hidrolisado – 31	6,91	KWON et al. (2016)
10	0,27	Manipueira - 10	0,64	Presente estudo

Ao utilizar a manipueira como substrato foi possível obter um rendimento de butanol igual 0,09 g g⁻¹ e uma taxa de produtividade 0,007 g L⁻¹ h⁻¹ após as 90 h de fermentação. Tais resultados foram inferiores aos encontrados na literatura utilizando a mesma cepa, mas com diferentes substratos (TAB. 3.5).

A baixa produtividade butanol pode ser o resultado da toxicidade de alguns derivados formados durante o processo de hidrólise ácida do substrato, como compostos fenólicos e o furfural (LOYARKATA; CHEIRSILPA; UMSAKUL, 2013).

Tabela 3.5 - Rendimento e taxa de produtividade de butanol por CB com diferentes substratos

Substrato	Rendimento*	Taxa de produtividade	Referências
	g g ⁻¹	g L ⁻¹ .h ⁻¹	
Resíduos de madeira hidrolisado	0,25	-----	KWON et al. (2016)
Água residuária da produção de amido hidrolisada	0,27	0,11	MAITI et al. (2016)
Tronco de palmeira hidrolisado	0,41	0,155	KOMONKIAT; CHEIRSILP, (2013)
Fibra de milho hidrolisada	0,34	0,13	GUO et al. (2012)
Farelo de trigo hidrolisado	0,32	0,16	LIU et al. (2010)
Manipueira hidrolisada	0,09	0,007	Presente estudo

Rendimento = g de butanol produzido/ g de açúcar consumido

3.3.3 Efeito dos diferentes inóculos sobre a produção de biocombustíveis a partir de glicose 10 g L⁻¹ e manipueira 10 g L⁻¹ de açúcar redutor

Em relação aos inóculos utilizados na fermentação ambos os substratos (glicose e manipueira) não foram convertidos a butanol (TAB. 3.6), porém apenas com a manipueira foi observada a produção de ácido butírico nos reatores para os quatro inóculos avaliados, sendo que concentrações mais significativas foram alcançadas com os inóculos EB 0,31±0,04 g L⁻¹ e ES 0,12±0,01 g L⁻¹, além de ácido butírico uma produção de ácido láctico para os inóculos ES (1,65±0,58 g L⁻¹) e EB (3,17±1,1 g L⁻¹), foi alcançada.

Tabela 3.6 - A produção de ácido butírico, ácido láctico e etanol pelos diferentes inóculos a partir de glicose 10 g L⁻¹ e manipueira 10 g L⁻¹ de açúcar redutor

Inóculo	Glicose 10 g L ⁻¹			Manipueira 10 g L ⁻¹ de açúcar redutor		
	Ác. Láctico g L ⁻¹	Ác. Butírico g L ⁻¹	Etanol g L ⁻¹	Ác. Láctico g L ⁻¹	Ác. Butírico g L ⁻¹	Etanol g L ⁻¹
SL	0	0	0	0,34±0,08	0,004±0,004	0
ES	0,71±0,072	0	0	1,65±0,58	0,12±0,012	0,005±0,007
LR	0	0	0,008±0,006	0,29±0,39	0,007±0,004	0,004±0,005
EB	2,05±0,085	0	0	3,17±1,1	0,31±0,04	0

Esse resultado pode ser consequência da falta de suplementação do meio, muitos trabalhos obtêm maiores produção com adição de ácido butírico, extrato de levedura ou uma

fonte de nitrogênio ao meio de produção de solventes. Al-Shorgani e colaboradores (2012) utilizaram como substratos glicose e ácido butírico e concluíram que a presença de $0,5 \text{ g L}^{-1}$ de ácido butírico aumentou a produção de butanol por *Clostridium saccharoperbutylacetonicum*, Quando adicionado ao meio, o butirato melhora o desempenho da fermentação pelos clostrídios. Para Li e colaboradores (2014), a eficácia do desempenho de produção foi de 23% em relação à proporção média butanol/acetona quando adicionou 3 g L^{-1} de ácido butírico, a proporção passou de 1,92 para 2,36, utilizando como substrato farinha de mandioca.

Adicionando $4,0 \text{ g L}^{-1}$ de ácido butírico Huang et al. (2004), melhoraram o rendimento e produtividade volumétrica de todos solventes em butanol pela fermentação por *Clostridium acetobutylicum* (HUANG et al., 2004). O ácido butírico pode aumentar significativamente o rendimento em butanol em baixos valores de pH se quantidades suficientes de fonte de carbono primário estejam presentes para *Clostridium pasteurianum* (REGESTEIN, 2015).

Linggang et al., (2013) suplementaram o meio de produção de solvente com diferentes concentrações de extrato de levedura, ao adicionar $0,5 \text{ g L}^{-1}$ de extrato de levedura aumentaram o rendimento de produção de $0,08 \text{ g g}^{-1}$ para $0,18 \text{ g g}^{-1}$ de butanol, é importante destacar que ao adicionar o extrato a concentração final de ácido butírico diminuiu de 3 g L^{-1} para $1,39 \text{ g L}^{-1}$.

É importante ressaltar que apesar da não produção de biocombustíveis pelos inóculos avaliados obteve-se a produção de alguns ácidos, como os ácidos láctico e butírico para os inóculos EB e EF, quando utilizado a manipueira como substrato.

Komonkiat e Cheirsilp (2013), ao adicionar uma fonte de nitrogênio ao meio de produção a produção de butanol passou de $5,24 \text{ g L}^{-1}$ para $10,03 \text{ g L}^{-1}$, em relação a concentração de ácido butírico final houve redução de $5,35 \text{ g L}^{-1}$ para $1,53 \text{ g L}^{-1}$.

Outro fator que pode ser responsável por essa baixa produção de butanol é a condição inicial do pH do meio (TAB 3.7), pois alguns trabalhos mostram que ao utilizarem valores de pH mais baixo a produção de butanol aumenta e a concentração de ácido butírico diminui.

A ausência de produção de butanol também pode ser explicada pela não transição da fase acidogênica para a solventogênica, devido aos altos valores de pH no final da fermentação dos inóculos SL, ES e LR (TAB. 3.7). Pois para que essa mudança de fase ocorra o pH do meio deve ser próximo de 5 (JONES; WOODS, 1986), desta forma não houve produção suficiente de ácido butírico. Contudo para os dejetos bovinos o pH final foi o mais baixo alcançando, possivelmente devido à alta produção de ácido láctico de $3,17 \text{ g L}^{-1}$ (TAB.3.6).

Diminuindo o pH inicial de 6,5 para 5, Linggang e colaboradores (2013) passaram de uma produção de butanol de 0,69 g L⁻¹ para 4,04 g L⁻¹ e concentrações finais de ácido butírico de 6,56 g L⁻¹ para 1,58 g L⁻¹. Ao testar o efeito do pH Al-Shorgani e colaboradores (2015) aumentaram a produção de butanol de 0,09 g L⁻¹ com pH inicial igual a 8 para 0,43 g L⁻¹ com pH igual a 5,8.

Tabela 3.7 - Valores de pH iniciais e finais.

Inóculo	Glicose		Manipueira	
	Inicial	Final	Inicial	Final
SL	6,22±0,00	6,27±0,00	6,10±0	6,06±0,00
ES	6,15±0,01	5,56±0,05	6,09±0,01	5,68±0,07
LR	6,29±0,03	6,26±0,01	6,11±0,01	5,99±0,10
EB	6,10±0,03	4,55±0,05	6,00±0,01	4,76±0,03

Chua et al. (2013), isolaram uma cepa, a partir de solo de pradaria, denominada G117, a qual após cinco dias de fermentação e com o processo de otimização das condições de produção com pH igual a 6, concentração de 30 g L⁻¹ de glicose, temperatura igual a 35 °C e um meio de sais minerais alcançaram produção 6,45 g L⁻¹ de butanol, ao aumentarem a concentração de substrato para 60 g L⁻¹ e suplementarem o meio com 0,4% de extrato de levedura obtiveram uma produção de butanol igual a 13,5 g L⁻¹.

Abd-Alla et al. (2015) isolaram 107 exemplares do gênero *Clostridium spp.* a partir de solos de culturas agrícolas, oitenta e seis dos isolados mostraram capacidade de produzir ABE e um exemplar isolado, denominado *C. roseum* apresentou produção de butanol maior do que a cepa *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824, com a linhagem nativa do solo (*C. roseum*) foi possível produzir 16,77 g L⁻¹ de butanol e 2,698 g L⁻¹ de etanol e 6,463 g L⁻¹ e 1,345 g L⁻¹ respectivamente, com a cepa.

Nesse mesmo trabalho, Abd-Alla et al, (2015) também isolaram três inóculos que produziram apenas etanol e acetona, e treze que produziram mais etanol do que butanol. Com os três isolados que produziram mais solventes foi oferecido outro substrato, o macerado de frutos de palma, e outro exemplar *C. beijerinckii* isolado mostrou maior produção de butanol 16,16 g L⁻¹, em relação à cepa *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824, que obteve produção de 9,71 g L⁻¹ do mesmo álcool.

No trabalho de Shin e colaboradores (2016) foi isolada uma nova espécie denominada de *C. kogasensis*, a partir do solo de gasoduto corroído, com condições ótimas de pH 6,5 e

temperatura 37 °C. Essa nova espécie não produziu o butanol e etanol apenas o ácido butírico e acético, tendo como substrato a glicose. Caso que pode ter ocorrido com os inóculos utilizados no trabalho quando oferecido manipueira como substrato, pois apresentaram produção de ácido acético e butírico apenas.

3.4 CONCLUSÃO

Clostridium beijerinckii apresentou maior eficiência para a produção de butanol a partir de glicose quando comparada a *C. acetobutylicum*, sendo a produção 5,5 vezes maior.

Manipueira com a concentração de açúcar redutor de 10 g L⁻¹ pode ser um substrato para *C. beijerinckii* na produção de butanol, etanol e ácidos orgânicos, já que manipueira como substrato a produção de metabólitos foi maior do que com as concentrações de glicose utilizadas, 30 e 10 g L⁻¹.

Os inóculos avaliados não foram capazes de produzir butanol a partir de glicose e manipueira. No entanto os inóculos: ES e ES apresentaram produção de ácido butírico apenas com a manipueira, sugerindo que são possíveis produtores de butanol.

A melhor condição de produção de biocombustíveis ocorreu ao utilizar manipueira 10 g L⁻¹ e obteve-se 2,47±0,07 g L⁻¹ de etanol e 0,64±0,1 g L⁻¹ de butanol, ao avaliar a produção da cepa *Clostridium beijerinckii* e os inóculos.

O presente trabalho mostrou que a manipueira tem potencial para ser utilizado como matéria-prima para processos biológicos e tem a vantagem de ser produtos residuais e não competindo por alimentos ou outras aplicações.

3.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABD-ALLA, M. H.; EL-ENANY, A. W. E. Production of acetone-butanol-ethanol from spoilage date palm (*Phoenix dactylifera* L.) fruits by mixed culture of *Clostridium acetobutylicum* and *Bacillus subtilis*. *Biomass and Bioenergy*, v. 42, p. 172-178, 2012.

ABD-ALLA, M. H.; ZOHRI, A-N. A.; ELSADEK, A-W., E-E.; ALI S. M. Acetone – butanol - ethanol production from substandard and surplus dates by Egyptian native *Clostridium* strains. *Anaerobe*, v. 32, p. 77-86, 2015.

Al-Shorgani, N. K. N.; Kalil, M. S.; Yusoff, W. M. W. Bioconversion of Butyric Acid to Butanol by *Clostridium saccharoperbutylacetonicum* N1-4 (ATCC 13564) in a Limited Nutrient Medium. *Bio Energy Research*, v. 5, n. 2, p. 1-7, 2012.

APHA; AWWA; WPCF. Standard Methods for the Examination of water and wastewater. 21. ed. Washington, DC: American Public Health Association, 2005.

BÖRNER, R.A.; ZAUSHITSYNA, O.; BERILLO, D.; SCACCIA, N.; MATTIASSON, B.; KIRSEBOM, H. Immobilization of *Clostridium acetobutylicum* DSM 792 as macroporous aggregates through cryogelation for butanol production. *Process Biochemistry*, v. 49, p. 10–18, 2014.

CHEN, B-Y.; CHUANG, F-Y.; LINC, C-L.; CHANG, J-S. Deciphering butanol inhibition to Clostridial species in acclimatized sludge for improving biobutanol production. *Biochemical Engineering Journal*, v.69, p. 100– 105, 2012.

CHUA, T. K.; LIANG, D.; QI, C.; YANG, K.; HE, J. Characterization of a butanol–acetone-producing *Clostridium* strain and identification of its solventogenic genes. *Bioresource Technology*, v. 135, p. 372–378, 2013.

KAPDAN, I.K.; KARGI, F. Biohydrogen production from waste materials. *Enzym Microb Technol*, v. 38, p. 569–582, 2008.

CHEN, Y.; ZHOU, T.; LIU, D.; LI, A.; XU, S.; LIU, Q.; LI, B.; YING, H. Production of Butanol from Glucose and Xylose with Immobilized Cells of *Clostridium acetobutylicum*. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, v. 18, p. 234-241, 2013.

COMWIEN, J.; BOONVITHAYA, N.; CHULALUKSANANUKUL, W.; GLINWONG, C. Direct Production of Butanol and Ethanol from Cane Sugar Factory Wastewater and Cellulosic Ethanol Pilot Plant Wastewater by *Clostridium Beijerinckii* CG1. *Energy Procedia*, v. 79, p. 556 – 561, 2015.

DOLEJŠ, I.; KRASNAN, V.; STLOUKAL, R.; ROSENBERG, M.; REBROŠ, M. Butanol production by immobilised *Clostridium acetobutylicum* in repeated batch, fed-batch, and continuous modes of fermentation. *Bioresource Technology*, v. 169, p. 723–730, 2014.

DU, T-F.; HE, A-Y.; WU, H.; CHEN J-N.; KONG, X-P.; LIU, J-L.; JIANG, M.; OUYANG, P-K. Butanol production from acid hydrolyzed corn fiber with *Clostridium beijerinckii* mutant. *Bioresource Technology*, v. 135, p. 254–261, 2013.

EZEJI, T. C.; QURESHI, N.; BLASCHEK, H. P. Production of acetone, butanol and ethanol by *Clostridium beijerinckii* BA101 and in situ recovery by gas stripping. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, v. 19, p. 595–603, 2003.

EZEJI, T. C.; QURESHI, N.; BLASCHEK, H. P. Acetone butanol ethanol (ABE) production from concentrated substrate: reduction in substrate inhibition by fed-batch technique and product inhibition by gas stripping. *Appl Microbiol Biotechnol* v. 63, p. 653–658, 2004.

EZEJI, T. C.; QURESHI, N.; BLASCHEK, H. P. Continuous butanol fermentation and feed starch retrogradation: butanol fermentation sustainability using *Clostridium beijerinckii* BA101. *Journal of Biotechnology*, v. 115, p. 179–187, 2005.

EZEJI, T. C.; QURESHI, N.; BLASCHEK, H. P. Production of acetone butanol (AB) from lique Wed corn starch, a commercial substrate, using *Clostridium beijerinckii* coupled with product recovery by gas stripping. *J Ind Microbiol Biotechnol*, v. 34, p. 771–777, 2007, (a), p.18.

EZEJI, T. C.; QURESHI, N.; BLASCHEK, H. P. Butanol Production From Agricultural Residues: Impact of Degradation Products on *Clostridium beijerinckii* Growth and Butanol Fermentation. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 97, n. 6, 2007 (b), p.23.

EZEJI, T. C.; QURESHI, N.; BLASCHEK, H. P. Bioproduction of butanol from biomass: from genes to bioreactors. *Current Opinion in Biotechnology*, v. 18, p. 220-227, 2007 (c).

FOND, O.; ENGASSER, J.M.; MATTA-EL-AMOURI, G.; PETITDEMANGE, H. The acetone butanol fermentation on glucose and xylose. II. Regulation and kinetics in batch cultures. *Biotechnol Bioeng*, v. 28, n. 2 p. 167–175, 1986.

GALLARDO, R.; ALVES, M.; RODRIGUES, L.R. Modulation of crude glycerol fermentation by *Clostridium pasteurianum* DSM 525 towards the production of butanol. *Biomass and Bioenergy*, v. 71, p.134-143, 2014.

GARCÍA, V.; PÄKKILÄ, J.; OJAMO, H.; MUURINENA, E.; KEISKIA, R. L. Challenges in biobutanol production: How to improve the efficiency? *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v. 15, p. 964–980, 2011.

GENG, Q.; PARK, C. Controlled-pH batch butanol–acetone fermentation by low acid producing *Clostridium acetobutylicum* B18. *Biotechnol Lett*, v.15, p.:421–426, 1993.

GOTTUMUKKALA, L. D.; PARAMESWARAN, B.; VALAPPIL, S. K.; MATHIYAZHAKAN, K.; PANDEY, A.; SUKUMARAN, R. K. Biobutanol production from rice straw by a non acetone producing *Clostridium sporogenes* BE01. *Bioresource Technology*, v.145, p. 182–187, 2013.

GUO, T.; HE, A-Y.; DU, T-F.; ZHU, D-F.; LIANG, D-F.; JIANG, M.; WEI, P.; OUYANG, P-K. Butanol production from hemicellulosic hydrolysate of corn fiber by a *Clostridium beijerinckii* mutant with high inhibitor-tolerance. *Bioresource Technology*, v.135, p. 379–385, 2013.

HE, B. Q.; YUAN, J.; LIU, M. B.; ZHAO, H. Combustion and emission characteristics of a n-butanol HCCI engine. *Fuel*, v. 115, p. 758–764, 2014.

HUANG, W.C.; RAMEY, D., YANG, S.T. 2004. Continuous production of butanol by *Clostridium acetobutylicum* immobilized in a fibrous bed bioreactor. *Appl. Biochem. Biotechnol*, v.115, n. 1, p. 887–898, 2004.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA – IBGE. Levantamento Sistemático da Produção Agrícola. Rio de Janeiro: *IBGE*, v. 29, n. 2, p. 1-79, fevereiro de 2016.

ISAR, J.; RANGASWAMY, V. Improved n-butanol production by solvent tolerant *Clostridium beijerinckii*. *Biomass and Bioenergy*, v. 37, p.9-15, 2012

JONES, D. T.; WOODS, D. R. Acetone-Butanol Fermentation Revisited. *Microbiological Reviews*, v. 50, n. 4, p. 484-524, 1986.

KAEWKANNETRA, P.; IMAI, T.; GARCIA-GARCIA, F. J.; CHIU, T. Y. Cyanide removal from cassava mill wastewater using *Azotobacter vinelandii* TISTR 1094 with mixed microorganisms in activated sludge treatment system. *Journal of Hazardous Materials*, v. 172, p.224–228, 2009.

KHAMASEH, E. I.; KALIL, M. S.; DADA, O.; YUSOFF, W. M. W. Date Fruit as Carbon Source in RCM-Modified Medium to Produce Biobutanol by *Clostridium acetobutylicum* NCIMB 13357. *Journal of Applied Sciences*, v. 12, n. 11, p. 1160-1165, 2012.

KHEYRANDISH, M.; ASADOLLAHI, M. A.; JEIHANIPOUR, A.; DOOSTMOHAMMADI, M.; RISMANI-YAZDI, H.; KARIMI, K. Direct production of acetone–butanol–ethanol from waste starch by free and immobilized *Clostridium acetobutylicum*. *Fuel*, v.142 (2015) 129–133, 2015.

KOMONKIAT, I.; CHEIRSILP B. Felled oil palm trunk as a renewable source for biobutanol production by *Clostridium* spp. *Bioresource Technology*, v. 146, p. 200–207, 2013.

KUJAWSKA, A.; KUJAWSKI, J.; BRYJAK, M.; KUJAWSKI, W. ABE fermentation products recovery methods - A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v. 48, p. 648–661, 2015.

KUMAR, M.; GAYEN, K. Developments in biobutanol production: New insights. *Applied Energy*, v.88, p. 1999–2012, 2011.

KWON, J. H.; KANG, H.; SANG, B. I.; KIM, Y.; MIN, J.; MITCHELL, R. J.; LEE, J. H. Feasibility of a facile butanol bioproduction using planetary mill Pretreatment. *Bioresource Technology*, v. 199, p. 283–287, 2016

LAZARO, C. Z.; VICH, D. V.; HIRASAWA, J. S.; VARESCHE, M. B. A. Hydrogen production and consumption of organic acids by a phototrophic microbial consortium. *International Journal of Hydrogen Energy*, v.37, p. 11691-11700, 2012.

LAZARO, C. Z.; PERNA, V.; ETCHEBEHERE, C.; VARESCHE, M. B. A. Sugarcane vinasse as substrate for fermentative hydrogen production: The effects of temperature and substrate concentration *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 39, p. 6407-6418, 2014.

LI, J.; CHEN, X.; QI, B.; LUO, J.; ZHANG, Y.; SU, Y.; WAN, Y. Efficient production of acetone–butanol–ethanol (ABE) from cassava by a fermentation–pervaporation coupled process. *Bioresource Technology*, v. 169, p. 251–257, 2013a.

LI, H.; OFOSU, F. K.; LI, K.; GU, Q.; WANG, Q.; YU, X. Acetone, butanol, and ethanol production from gelatinized cassava flour by a new isolates with high butanol tolerance. *Bioresource Technology*, v. 172, p. 276-282, 2014.

LI, L.; AI, H.; ZHANG, S.; LI, S.; LIANG, Z.; WU, Z.Q; YANG, S. T.; WANG, J. F. Enhanced butanol production by coculture of *Clostridium beijerinckii* and *Clostridium tyrobutyricum*. *Bioresource Technology*, v. 143, p. 397–404, 2013b.

LI, X.; SHI, Z.; LI, Z. Increasing butanol/acetone ratio and solvent productivity in ABE fermentation by consecutively feeding butyrate to weaken metabolic strength of butyrate loop. *Bioprocess Biosyst Eng*, v. 37, p. 1609–1616, 2014.

LINGGANG, S.; PHANG, L. Y.; WASOH, H.; ABD-AZIZ, S. Acetone–Butanol–Ethanol Production by *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 Using Sago Pith Residues Hydrolysate. *Bioenerg. Res.* v. 6, p.321–328, 2013.

LIU, Z.; YING, Y.; LI, F.; MA, C.; XU, P. Butanol production by *Clostridium beijerinckii* ATCC 55025 from wheat bran. *J Ind Microbiol Biotechnol*, v. 37, p. 495–501, 2010.

LOYARKAT, S.; CHEIRSILP, B.; UMSAKUL, K. Decanter cake waste as a renewable substrate for biobutanol production by *Clostridium beijerinckii*. *Process Biochemistry*, v. 48, p. 1933–1941, 2013.

LU, C.; ZHAO, J.; YANG, S-T.; WEI, D. Fed-batch fermentation for n-butanol production from cassava bagasse hydrolysate in a fibrous bed bioreactor with continuous gas stripping. *Bioresource Technology*, v. 104, p. 380–387, 2012.

LÜTKE-EVERSLOH, T.; BAHL, H. Metabolic engineering of *Clostridium acetobutylicum*: recent advances to improve butanol production. *Biotechnology*, v. 22, n. 5, p. 634–647, 2011.

MAITI, S.; SARMA, S. J.; BRAR, S. K.; BIHA, Y. L.; DROGUI, P.; BUELNA, G.; VERM, M. Agro-industrial wastes as feedstock for sustainable bio-production of butanol by *Clostridium beijerinckii*. *Food and Bioproducts processing*, v. 98, p. 217–226, 2016.

MAINTINGUER; S. I.; FERNANDES, B. S.; DUARTE, I. C.; SAAVEDRA, N. K.; ADORNO, M. T.; VARESCHE, M. B. Fermentative Hydrogen Production by Microbial Consortium. *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 33, p. 4309-4317, 2008.

MARIANO, A. P.; MACIEL FILHO, R.; EZEJI, T. C. Energy requirements during butanol production and in situ recovery by cyclic vacuum. *Renewable Energy*, v. 47, p. 183-187, 2012

MILLER, G.L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*, v.31, p. 426-429, 1959.

MONOT, F. MARTIN, J. R.; PETIDEMANGE, H.; GAY, R. Acetone and Butanol Production by *Clostridium acetobutylicum* in a Synthetic Medium. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 44, p. 1318-1324, 1982.

NIGAM, P. S.; SINGH, A. Production of liquid biofuels from renewable resources. *Progress in Energy and Combustion Science*, v. 37, n. 1, p. 52-68, 2011

O-THONG, S.; HNIMAN, A.; PRASERTSAN, P. IMAI, T. Biohydrogen production from cassava starch processing wastewater by thermophilic mixed cultures. *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 36, p. 3409-3411, 2011.

OUEPHANIT, C.; VIRUNANON, C.; BURAPATANA, V.; CHULALAKSANANUKULW. Butanol and ethanol production from tapioca starch wastewater by *Clostridium* spp. *Water Science & Technology*, v. 64, n.9, p.1774-1780, 2011.

PENTEADO, E. D.; ADORNO, M. A. T.; ZAIAT, M. Simple and accurated method for determination of fatty acids, alchools and carbohydrates by HPLC with UV/DAD and RID Detectors. *38th International Symposium on High. Performance Liquid Phase Separations and Related Techniques*. Anais...California, USA: 2012

PEREIRA, L. G.; CHAGAS, M. F.; DIAS, M. O. S.; CAVALETT O.; BONOMI, A. Life cycle assessment of butanol production in sugarcane biorefineries in Brazil. *Journal of Cleaner Production*, v. 96, p. 557-568, 2015.

QURESHI, N.; EZEJI, T. C. Butanol, 'a superior biofuel' production from agricultural residues (renewable biomass): recent progress in technology. *Biofuels Bioprod. Biorefin.*, v. 2, p. 319-330, 2008.

QURESHI, N.; SAHA, B. C.; HECTOR, R. E.; DIEN, B.; HUGHES, S.; LIU, S.; ITEN, L.; BOWMAN, M. J.; SARATH, G.; COTTA, M. A. Production of butanol (a biofuel) from agricultural residues: part II - use of corn stover and switchgrass hydrolysates. *Biomass Bioenergy*, v. 34, p. 566-571, 2010

REGESTEIN, L.; DOERR, E. W.; STAADEN, A.; REHMANN, L. Impact of butyric acid on butanol formation by *Clostridium pasteurianum*. *Bioresource Technology*, v. 196, p. 153-159, 2015.

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. 1782-178, 2007.

SHIDA, G. M.; MAINTINGUER, S. I.; SAAVEDRA, N. K.; VARESCHE, M. B. A.; SILVA, E. L. Performance and composition of bacterial communities in anaerobic fluidized bed reactors for hydrogen production: Effects of organic loading rate and alkalinity. *International Journal of Hydrogen Energy*, v.37, p. 16925-16934, 2012.

SHUKOR, H.; AL-SHORGANI, N. K. N.; ABDESHAHIAN, P.; HAMID, A. A.; ANUAR, N.; RAHMAN, N. A.; ISA, M. H. M.; KALIL, M. S. Biobutanol production from palm kernel cake (PKC) using *Clostridium saccharoperbutylacetonicum* N1-4 in batch culture fermentation. *Bioresources*, v. 9, n. 3, p. 5325–5338, 2014.

SHIN, Y.; KANG, S. S.; PAEK, J.; JIN, T. E.; SONG, H. S.; KIM, H.; PARK, H. M. CHANG, Y. H. *Clostridium kogasensis* sp. nov., a novel member of the genus *Clostridium*, isolated from soil under a corroded gas pipeline. *Anaerobe* v. 39, p. 14-18, 2016.

SU, H.; LIU, G.; HE, M.; TAN, F. A biorefining process: Sequential, combinational lignocellulose pretreatment procedure for improving biobutanol production from sugarcane bagasse. *Bioresource Technology*. v. 187, p.149–160, 2015.

SUN, L.; WAN, S.; YU, S.; WANG, Y.; WANG, S. Anaerobic biological treatment of high strength cassava starch wastewater in a new type up-flow multistage anaerobic reactor. *Bioresource Technology*, v. 104, p. 280–288, 2012.

THANG, V. H.; KANDA, K.; KOBAYASHI, G. Production of Acetone–Butanol–Ethanol (ABE) in Direct Fermentation of Cassava by *Clostridium saccharoperbutylacetonicum* N1-4. *Appl Biochem Biotechnol*, v. 161, p. 157–170, 2010.

UJOR, V.; BHARATHIDASAN, A. K.; CORNISH, K.; EZEJI, T. K. Evaluation of industrial dairy waste (milk dust powder) for acetone-butanol-ethanol production by solventogenic *Clostridium* species. *SpringerPlus*, v. 3, n. 387 p.1-12 , 2014.

VAN DER MERWE, A. B.; CHENG, H.; GÖRGENS, J.F.; KNOETZE, J.H. Comparison of energy efficiency and economics of process designs for biobutanol production from sugarcane molasses. *Fuel*, v.105, p. 451–458, 2013.

XIAO, B. Y.; LIU, J. X. Biological hydrogen production from sterilized sewage sludge by anaerobic self-fermentation. *Journal of Hazardous Materials*, v. 168, n. 1, p. 163–167, 2009.

WANG, Y.; GUO, W.; LO, Y.; CHANG, J.; REN, N. Characterization and kinetics of bio-butanol production with *Clostridium acetobutylicum* ATCC824 using mixed sugar medium simulating microalgae-based carbohydrates. *Biochemical Engineering Journal*, v. 91, p. 220–230, 2014.

WU, Y.D.; XUE, C.; CHEN, L. J.; BAI, F.W. Effect of zinc supplementation on acetone–butanol–ethanol fermentation by *Clostridium acetobutylicum*. *Journal of Biotechnology*, v. 165, p. 18–21, 2013.

YANG, M.; KUITTINEN, S.; KEINÄNEN, M.; VEPSÄLÄINEN, J.; ROMAR, H.; TYNJÄLÄ, P.; LASSI, U.; PAPPINEN, A. The use of (green field) biomass pretreatment liquor for fermentative butanol production and the catalytic oxidation of biobutanol. *Chemical Engineering Research and Design*, v.92, p. 1531–1538, 2014.

YANG, M.; KUITTINEN, S.; ZHANG, J.; VEPSALAINEN, J.; KEINANEN, M.; PAPPINEN, A. Co-fermentation of hemicellulose and starch from barley straw and grain for efficient pentoses utilization in acetone–butanol–ethanol production. *Bioresource Technology*, v. 179, p. 128–135, 2015

YANG, Y.; HOOGEWIND, A.; MOON, Y. H.; DAY, D. Production of butanol and isopropanol with an immobilized *Clostridium*. *Bioprocess Biosyst Eng*, v.39. p. 421–428, 2016.

YEN, H. W.; LI, R. J.; MA, T. W. The development process for a continuous acetone–butanol–ethanol (ABE) fermentation by immobilized *Clostridium acetobutylicum*. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, v. 42, p. 902–907, 2011.

ZHENG, J.; TASHIRO, Y.; WANG, Q.; SONOMOTO, K. Recent advances to improve fermentative butanol production: Genetic engineering and fermentation technology. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, v.119, n.1, p. 1-9, 2015.

CAPÍTULO 4 – INFLUÊNCIA DO INÓCULO SOBRE A PRODUÇÃO DE BIOCOMBUSTÍVEIS A PARTIR DA MANIPUEIRA

RESUMO

Os biocombustíveis, butanol e etanol, podem ser produzidos pela fermentação ABE realizada por micro-organismos do gênero *Clostridium* spp. O objetivo desse trabalho foi produzir esses bioálcoois a partir de água residuária proveniente do processamento da mandioca para produção de féculas e farinhas. Desta forma, reatores em batelada foram alimentados com manipueira (5 g L⁻¹DQO), e três diferentes inóculos foram utilizados: CB (*Clostridium beijerinckii*); EBE (esterco bovino enriquecido com meio para micro-organismos produtores de solventes; EBS (esterco bovino sem o meio para micro-organismos solvetogênicos). Antes de iniciar os ensaios o inóculo EB foi submetido ao pré tratamento térmico com o intuito de propiciar a presença apenas do gênero *Clostridium*. Para verificar a presença do gênero *Clostridium* no inóculo avaliado foi realizado um PCR com primer específicos para o gênero. Com a confirmação da presença de *Clostridium* no esterco bovino iniciaram-se os ensaios de fermentação. A cepa CB foi reativada e os reatores em batelada foram montados. Os ensaios duraram 106 h e durante esse período foram analisados o consumo de açúcares, o pH, OD_{600nm}, biomassa seca, álcoois e ácidos orgânicos. Com *Clostridium beijerinckii* foi possível produzir butanol com rendimento 0,014 g g⁻¹ e taxa de produtividade igual a 0,002 g L⁻¹. h⁻¹. Etanol foi produzido pelo esterco bovino enriquecido com rendimento 0,51 g g⁻¹ e taxa de produtividade igual a 0,002 g L⁻¹. h⁻¹. O trabalho mostrou o potencial de produção de biocombustíveis a partir do resíduo manipueira e do inóculo esterco bovino e agregou valor e esses dois resíduos. Talvez com a otimização do processo de fermentação maiores concentrações de solventes possam ser produzidas.

Palavras chaves: Biobutanol. Bioetanol *Clostridium beijerinckii*. Esterco bovino. Manipueira

ABSTRACT

Biofuels, butanol and ethanol can be produced by ABE fermentation by microorganisms of the genus *Clostridium* spp. The aim of this work was to produce these bioalcohols from wastewater from the processing of cassava production for starch and flour. There batch reactors were made using cassava (5 g L⁻¹ DQO), and three different inocula were used: CB (*Clostridium beijerinckii*); EBS (cattle manure with medium for producing solvent microorganisms) and EBS (cattle manure without medium for producing solvent microorganisms). Before starting the tests EB inoculum was subjected to the pre heat treatment in order to provide the presence of *Clostridium* genus to check the *Clostridium* genus presence the inoculum was carried out PCR with specific primer to the genus. With the confirmation of the presence of *Clostridium* in cattle manure we started the fermentation. CB strain was reactivated and the batch reactors were assembled. The tests lasted for 106 h and during this period were analyzed consumption of sugars, pH, OD_{600nm}, dry biomass, alcohols and organic acids. With *Clostridium beijerinckii* was possible to produce butanol at 0.014 g g⁻¹ and productivity rate equal to 0.0016 g L⁻¹ h⁻¹. Ethanol was produced by enriched manure yielded 0.51 g g⁻¹ and production rate equal to 0.0016 g L⁻¹. h⁻¹. The work showed the potential production of bioalcohols from cassava residue and inoculum from cattle manure,

adding value to these two residues. Perhaps with the optimization of the fermentation process higher solvent concentrations can be achieved.

Key words: Biobutanol. Bioethanol. *Clostridium*. Cattle manure. Cassava wastewater

4.1 INTRODUÇÃO

O butanol e etanol produzidos pela fermentação ABE são importantes alternativas de combustíveis em relação ao cenário atual de consumo e poluição dos combustíveis fósseis. Muitos trabalhos elucidam a utilização do processo fermentativo ABE (acetona, butanol, etanol) realizado por clostrídios, que são capazes de fermentar uma variedade de hidratos em acetona, butanol e etanol (SURVASE et al., 2013; VALDEZ-VAZQUEZ et al., 2015; ABD-ALLA et al., 2015; SIRISANTIMETHAKOM et al., 2016).

A problemática dessa fermentação está relacionada a seu custo de produção, já que grande parte dos substratos utilizados competem diretamente com a base alimentar humana (KENNES et al., 2016). Geralmente são utilizados na fermentação substratos ricos em carboidratos, farinha e amido de milho, arroz, mandioca ou trigo, esses produtos podem ser hidrolisados em açúcares fermentáveis. Outra fonte do processo fermentativo são os açúcares como glicose, sacarose, xilose, celobiose, entre outros (CHEN et al., 2013).

Recentes pesquisas têm utilizado como substrato diferentes fontes de ricas em carboidratos, mas que necessitam de um pré-tratamento (IBRAHIM et al., 2015; SU, et al., 2015, HARDE et al., 2016) com a finalidade de disponibilizar esses carboidratos em substratos fermentáveis por esses micro-organismos.

Fontes como palha de arroz, palha de milho, resíduos de madeira, resíduos da indústria de mandioca (explorar mais), resíduos da indústria de leite, resíduos da indústria sucroalcooleira, e diversas outras indústrias (IBRAHIM et al., 2015; KUMAR; GAYEN, 2011), têm sido utilizadas como substratos para a produção ABE.

É importante ressaltar que essas fontes alternativas se tratam de resíduos que na sua grande maioria não tem alternativa de uso e são descartados em solos ou em rios seguindo os padrões de descarte descritos na legislação, é uma matéria prima com alto valor agregado e, portanto, passível de reutilização.

Um resíduo muito produzido é a água residuária do processamento da mandioca em farinha e amido, esse resíduo apresenta um alto teor de carboidratos (O-THONG et al, 2011), e de cianeto, o qual é tóxico para os humanos e animais (KAEWKANNETRA, 2009). A

maioria do resíduo gerado geralmente é descartada no solo em forma de irrigação das plantações de mandioca ou é oferecido aos animais (RIBAS; BARANA, 2003).

O presente estudo teve por objetivo utilizar o resíduo do processamento de mandioca para a produção de butanol e etanol, pela cepa *Clostridium beijerinckii* e um inóculo ambiental derivado do esterco bovino com presença do gênero *Clostridium*, avaliando a produção de biocombustíveis, com substrato enriquecido com um meio para microorganismos produtores de solvente e com substrato apenas.

4.2 METODOLOGIA

4.2.1 Inóculo

O experimento foi realizado com dois inóculos *C. beijerinckii* (CB) e esterco bovino (EB), a produção de ambos foi avaliada quando alimentados com manipueira com DQO 5g L⁻¹. O inóculo EB foi submetido a dois diferentes ensaios um no qual foi oferecido como substrato apenas a manipueira e outro que o substrato foi enriquecido com o meio solvetogênico (MONOT, 1982).

4.2.1.1 Ativação do Inóculo CB e montagem do reator anaeróbio

O inóculo foi ativado em meio RCM (Reinforced Clostridial Media) (KHAMAISEH et al., 2012) a 37 °C. Após 48 h de crescimento foram repicadas em 800 mL do mesmo meio e incubadas nas mesmas condições, quando a leitura de OD_{600nm} da cultura alcançou 0,5-0,6 nm foi incubada nos reatores.

4.2.1.2 Pré-tratamento inóculo EB

Foram pesados 10 g do inóculo – reativou depois e pré tratado- e adicionados em 150 mL de meio PYG (Peptone-Yeast extract-Glucose) previamente esterilizado a 121 °C por 15 min, o frasco foi fechado e incubado a 37 °C por 24 h. Após esse período a cultura foi submetida a um choque-térmico em 90 °C em banho-maria por 10 min, depois de retirar a cultura e resfria-la em temperatura ambiente (MAINTINGUER, et al., 2008). 10 mL da mesma foram injetadas com auxílio de uma seringa em 150 mL de meio RCM previamente fluxionado com gás N₂ e esterilizado em 121 °C por 15 min. Essa cultura foi então incubada a 37 °C por 24 h e após esse período 10 mL dessa cultura foram injetados em meio RCM seguindo as mesmas condições de preparo e incubação.

4.2.1.3 Biologia molecular para presença do gênero *Clostridium*

Dez mL desta cultura foram retiradas para realização de PCR específico para clostrídios utilizando os *primers* SJ-F (679) CGGTGAAATGCGTAGAKATTA e SJ-R (952) CGAATTAACCACATGCTCCG, para a confirmação da presença desse grupo no inóculo (XIOA-LONG et al., 2014).

A extração química do DNA do inóculo foi realizada seguindo o protocolo de extração usou o kit e protocolo - para bactérias gram-positivas do Kit de purificação de DNA GeneJET GENOMIC DNA PURIFICATION KIT da Thermo Scientific.

A reação de PCR apresentou volume final de 25 μ L sendo, PCR buffer (1X), $MgCl_2$ (1,5 mM), dNTP (0,4 mM), *primer* (0,5 mM), 0,5 U de Taq polimerase e 1 μ L DNA genômico da amostra de EB. A amplificação foi realizada nas seguintes condições: desnaturação inicial, 94°C por 5min; seguida por 30 ciclos de 30 segundos(s) a 94 °C, 30 s a 56 °C, 72 °C por 60 s e a extensão final por 7 min a 72 °C. O controle negativo foi realizado com água ultra purificada e o controle positivo com uma amostra de *C. beijerinckii*. Os fragmentos de DNA foram separados por eletroforese em gel de agarose (1%) utilizando TAE 1X como solução tampão, nas condições de corrida 80 V por 1 h, o marcador utilizado foi o de 1 kb. O gel foi analisado em um fotodocumentador para gel de eletroforese – L-PIX TOUCH (Loccus, Brasil).

Após a realização do PCR e confirmação da presença de *Clostridium* spp., 50 mL dessa cultura, que foi armazenada em 4°C, foi inoculada com auxílio de uma seringa em 800 mL de meio RCM seguindo as mesmas condições de preparo e incubação. Ao atingir OD_{600nm} de 0,5-0,6 a cultura foi inoculada nos reatores.

4.2.2 Manipueira

A manipueira utilizada para os processos fermentativos foi adquirida em Araras, SP na Fábrica de Farinha de mandioca Caio Prado. Esse efluente apresentou as seguintes características: pH 5,25, sólidos totais 64,75 g L⁻¹, sólidos totais voláteis 49,67 g L⁻¹, total de açúcar redutor 20 g L⁻¹, demanda química de oxigênio total de (DQO) 95,33 g L⁻¹. A manipueira foi armazenada sobre refrigeração (-20 °C).

Para tornar o amido mais disponível realizou-se a hidrólise da manipueira em autoclave a 121 °C por 15 min com uma solução 0,5% H₂SO₄ 1:1 (V/V) (ROSA et al., 2014), o pH ajustado para 6,0 com solução NaOH 10 M e amostras de 40 mL foram centrifugadas por 5 min em rotação igual 7500 rpm. Uma alíquota dessa manipueira foi filtrada em filtro de acetato de celulose 0,2 μ m com a finalidade de medir a DQO do resíduo. A DQO foi determinada utilizando o kit de DQO HACH 3-150 mg L⁻¹.

4.2.3 Operação dos reatores

Com a cepa foram montados dois reatores com volume reacional de 1,5 L cada e um total de 3 L, para isso após a determinação de DQO a quantidade de água destilada necessária para a diluição da manípueira para 5g L⁻¹ DQO foi calculada. Para deixar o meio mais anaeróbio possível foram fervidos 3 L de água destilada e fluxionado N₂, o pH foi ajustado para 6 com solução NaOH 10 M. O volume de água necessário para diluição da manípueira foi dividido em dois frascos de 2L, sendo o volume reacional de 1,5 L cada. Os frascos foram tampados com tampa de butila e autoclavados a 121°C por 30 min.

Com o intuito de manter o meio estéril, a manípueira foi adicionada ao frasco com auxílio de uma seringa, um filtro de acetato de celulose 0,2 µm foi acoplado entre a seringa e a agulha a manípueira foi injetada nos frascos passando pelo filtro. Com os reatores montados, 20% (v/v) do inóculo CB com OD_{600nm} de 0,5-06 foi inoculado nos reatores.

Para o inóculo EB foi testado um meio de produção com a seguinte composição: MnSO₄. H₂O 0,01 g L⁻¹, NaCl 0,01 g L⁻¹, FeSO₄. 7H₂O, 0,01 g L⁻¹, acetato de amônio 1,5 g L⁻¹, ácido *para*-aminobenzóico 0,001 g L⁻¹, biotina 0,00001 g L⁻¹, KH₂PO₄ 1 g L⁻¹, K₂HPO₄. 3H₂O 0,75 g L⁻¹, extrato de levedura 2 g L⁻¹. Na preparação do meio foi fluxionado N₂ para deixa-lo anóxico, o pH foi ajustado para 6 com solução de NaOH 1 M e HCl 1 M, e autoclavado em reator 2 L com volume reacional de 1,5 L.

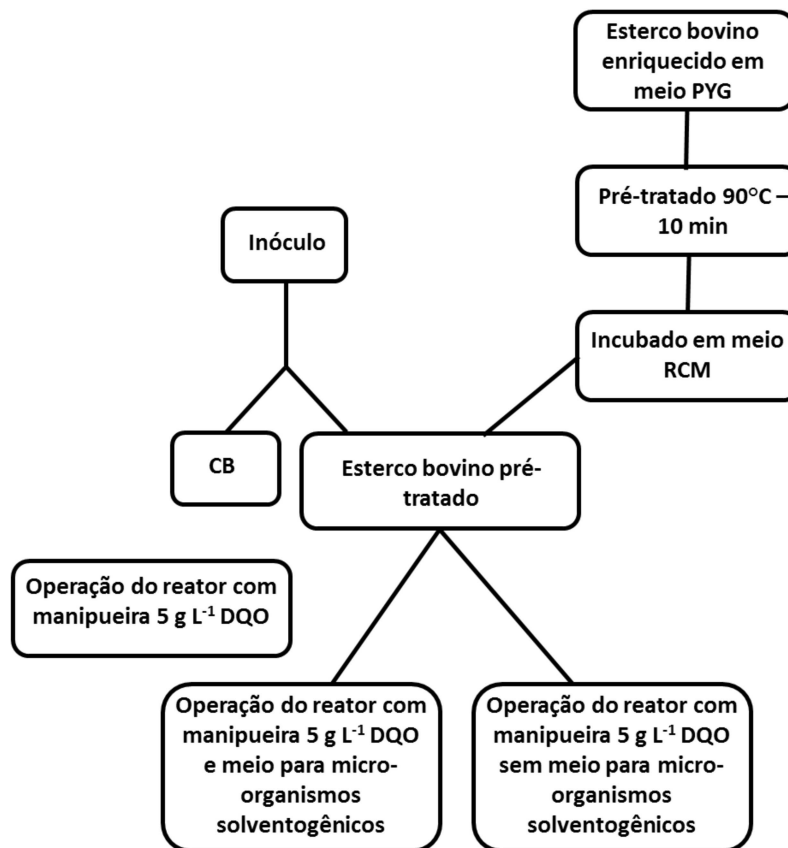
O reator sem suplementação foi preparado com água destilada como para o inóculo EB, e a manípueira adicionada com auxílio de uma seringa com filtro de acetato de celulose 0,2 µm inserido na agulha. Após a preparação dos dois reatores EBE e EBS, 20% (v/v) do inóculo EB com OD_{600nm} de 0,5-06.

4.2.4 Análises físico-químicas

Para os reatores com o inóculo CB nas primeiras 24 h foram retiradas com uma seringa amostras de 2 mL de cada reator, a cada 3 h para medir pH, OD_{600nm}, açúcares redutores com o método 3,5 ácido dinitrosalicílico (DNS) (MILLER et al., 1959). Depois desse período as amostragens foram realizadas em 36 h, 48 h, 65 h, 82 h e 106 h. A biomassa seca em mg L⁻¹ (APHA, 2005) foi determinada em 0 h, 12 h, 24 h, 48 h e 106 h. Nesses períodos eram retirados 60 mL de amostra de cada reator sendo 50 mL para determinação de biomassa e 10 mL para determinação dos outros parâmetros analisados. As medidas de DQO em g L⁻¹ foram realizadas nos tempos 0 h e 106 h.

Os reatores montados com os inóculos EBE e EBS, foram retiradas amostras a cada 3 h para medir pH, OD_{600nm}, açúcares redutores com o método 3,5 ácido dinitrosalicílico (DNS) (MILLER et al., 1959) durante 24 h. Após esse período a medição desses fatores foi realizada em 36 h, 48 h, 65 h e 106 h. A biomassa seca (mg L⁻¹) e DQO (g L⁻¹) foram determinadas em 0 h e 106 h.

Figura 4.1 – Esquema para montagem dos reatores anaeróbios



4.2.5 Determinação de butanol, etanol e ácidos orgânicos

Amostras de 2 mL de EBE e EBS foram centrifugadas a 7500 rpm por 5 min, 1 mL do sobrenadante foi retirado para a determinação dos ácido orgânicos e álcoois pelo método Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLADE) (PENTEDO, et al.,2012). A detecção dos ácidos foi realizada pelo detector ultravioleta e arranjo de diodos (UV-DAD) e a dos álcoois pelo detector de índice de refração (RID-10A). Para separação dos metabólitos utilizou-se a coluna Aminex HPX-87H a 43 °C e ácido sulfúrico 0,01 N como eluente com fluxo de 0,5 mL

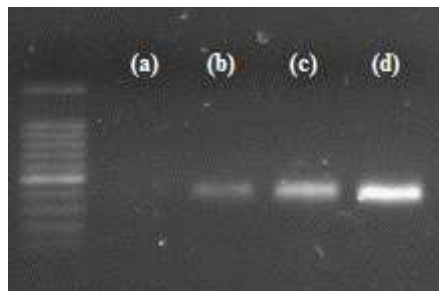
min⁻¹, cada corrida tinha duração de 65 minutos, para a análise dos dados o software 42 Class-VP (SHIMADZU modelo Prominence) foi utilizado.

4.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.3.1 Presença de *Clostridium* spp. no inóculo EB

Após a amplificação do inóculo EB a presença de clostrídios foi confirmada como mostra a figura 4.2, com a utilização do *primer* Sj específico para esse grupo (HU et al., 2014).

Figura 4.2 - Gel de amplificação (1% de agarose) do inóculo com marcador molecular de 1Kb (a) controle negativo, (b) controle positivo, (c) e (d) amostra de DNA do inóculo EB (esterco bovino).



4.3.2 Produção de biocombustíveis

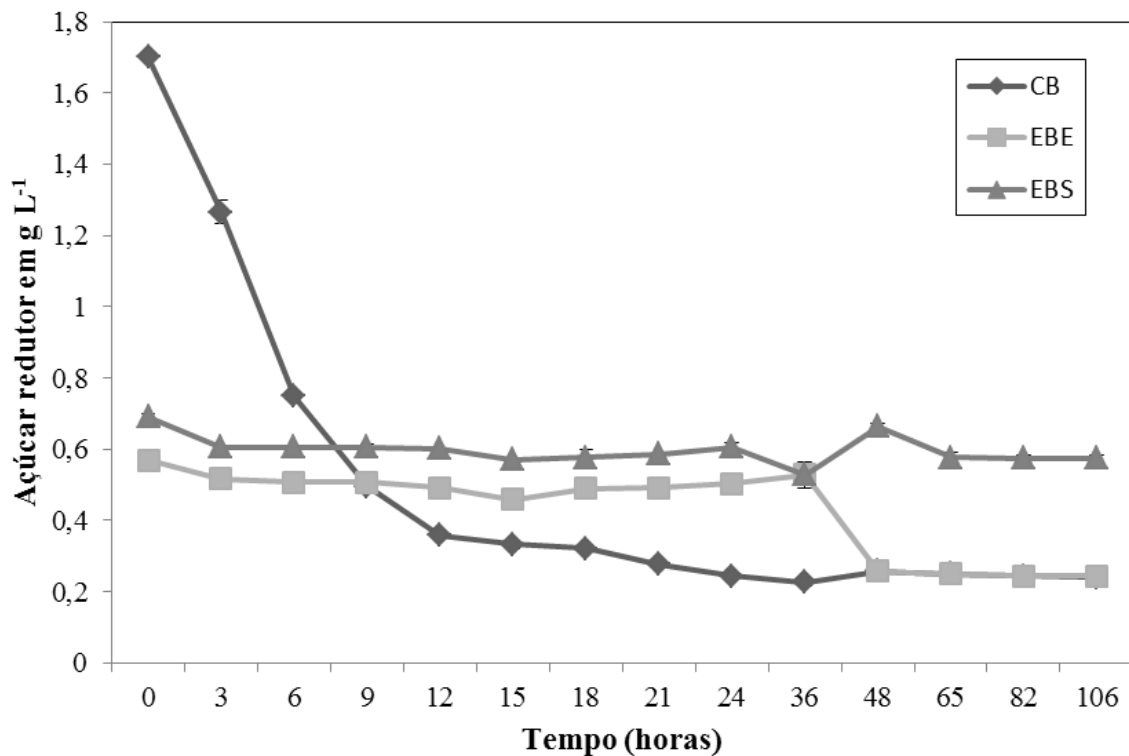
Nos ensaios realizados a cepa CB e o inóculo EBE e EBS, não foi obtido a produção de butanol com a manipueira DQO 5 g L⁻¹. Esse fato pode ser explicado pela DQO (5 g L⁻¹) oferecida que resultou em concentrações reduzidas de glicose no tempo 0 h, como pode ser observado na figura 4.3, sendo 1,70 g L⁻¹ no caso da cepa e de 0,69 g L⁻¹ para o ensaio com o inóculo EBS e 0,57 g L⁻¹ para o inóculo EBE.

Essa diferença em relação à concentração inicial de açúcar redutor para os inóculos é referente à hidrólise, pois manipueira hidrolisada não foi a mesma utilizada nos dois experimentos, para a cultura pura CB foi feita uma hidrólise que resultou em 1,70 g L⁻¹ de açúcar redutor no início do experimento. Para EB foi feita hidrólise que resultou em 0,69 g L⁻¹ de açúcar redutor inicial para EBS e 0,57 g L⁻¹ de açúcar redutor inicial para EBE.

Estudo semelhante realizado por Ouephanit et al. (2011), mostraram que duas cepas *C. butyricum* e *C. acetobutylicum* produziram a partir de água residuária hidrolisada proveniente

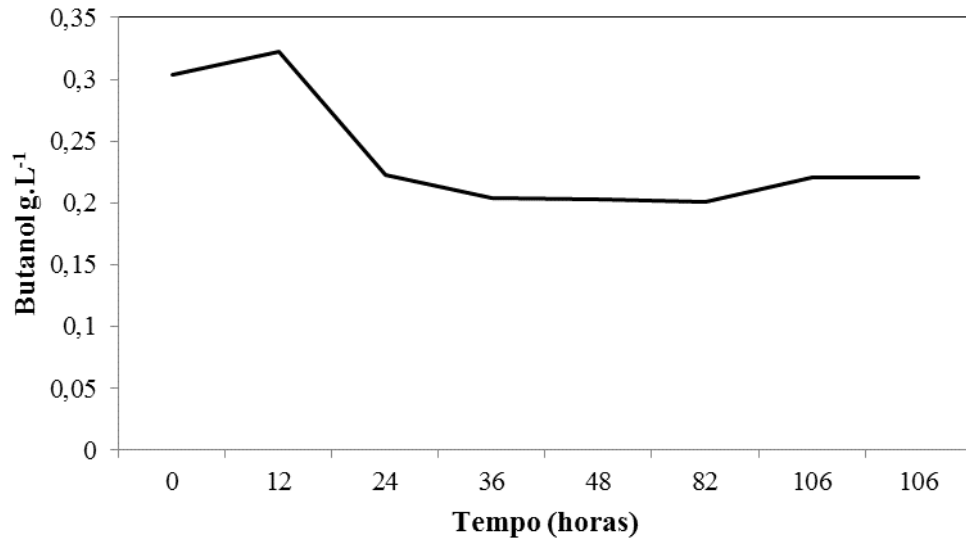
da lavagem da mandioca os dois álcoois. Ouephanit et al. (2011) ajustaram o pH inicial do para 6,5 a única variável neste experimento foi o pH do substrato adicionado ao meio, os valores de pH do substrato avaliados foram 4,5, 5,5 e 6,5, a melhor produção para ambas cepas foi com substrato em pH 5,5, tendo como resultado a produção de etanol igual a $0,144 \text{ g L}^{-1}$ para *C. butyricum* e *C. acetobutylicum* $0,124 \text{ g L}^{-1}$ e de butanol $1,81 \text{ g L}^{-1}$ *C. butyricum* e $0,07 \text{ g L}^{-1}$ *C. acetobutylicum*.

Figura 4.3 - Consumo de açúcar durante a operação dos reatores anaeróbicos com os inóculos: CB (*C. beijerinckii*), EBE (esterco bovino enriquecido), EBS (esterco bovino sem enriquecimento)



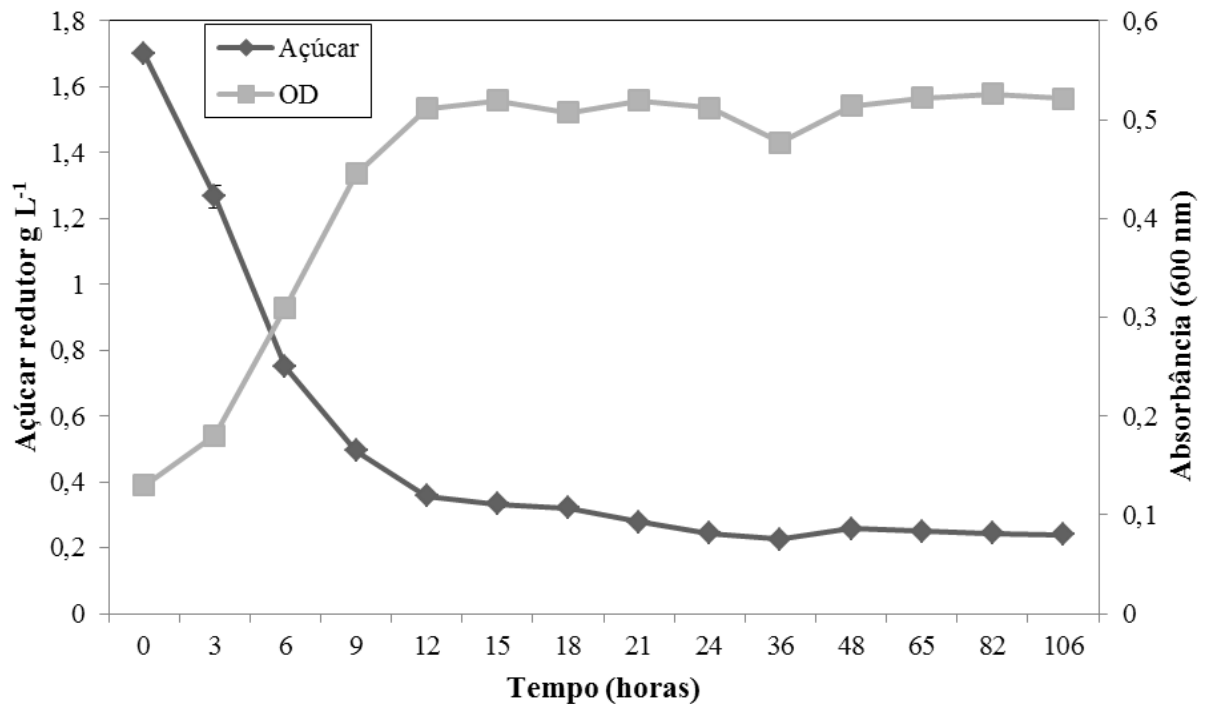
No caso da cepa o butanol obtido $0,3 \text{ g L}^{-1}$ no tempo 0h, como pode ser observado na figura 4.4 é resultado da pré incubação da mesma realizada com o meio RCM, o micro-organismo já havia produzido o biocombustível com o substrato do meio RCM. Ao ser inoculado no reator com manipueira DQO 5 g L^{-1} esse biocombustível foi transferido ao reator resultando em um butanol inicial de $0,3 \text{ g L}^{-1}$ no início do ensaio de fermentação. O declínio da concentração de butanol (FIG. 4.4) ocorreu em função da evaporação do álcool ao longo do ensaio.

Figura 4.4 - Produção de butanol pela cepa CB com manipueira DQO 5g L⁻¹



Para CB o tempo de fermentação que se obteve o maior consumo de glicose ocorreu entre 0h e 12h. Neste mesmo período é possível observar que o crescimento entrou em fase estacionária no tempo igual a 12h (FIG. 4.5).

Figura 4.5 - Crescimento de CB medido em densidade óptica 600 nm e consumo de glicose durante a operação do reator



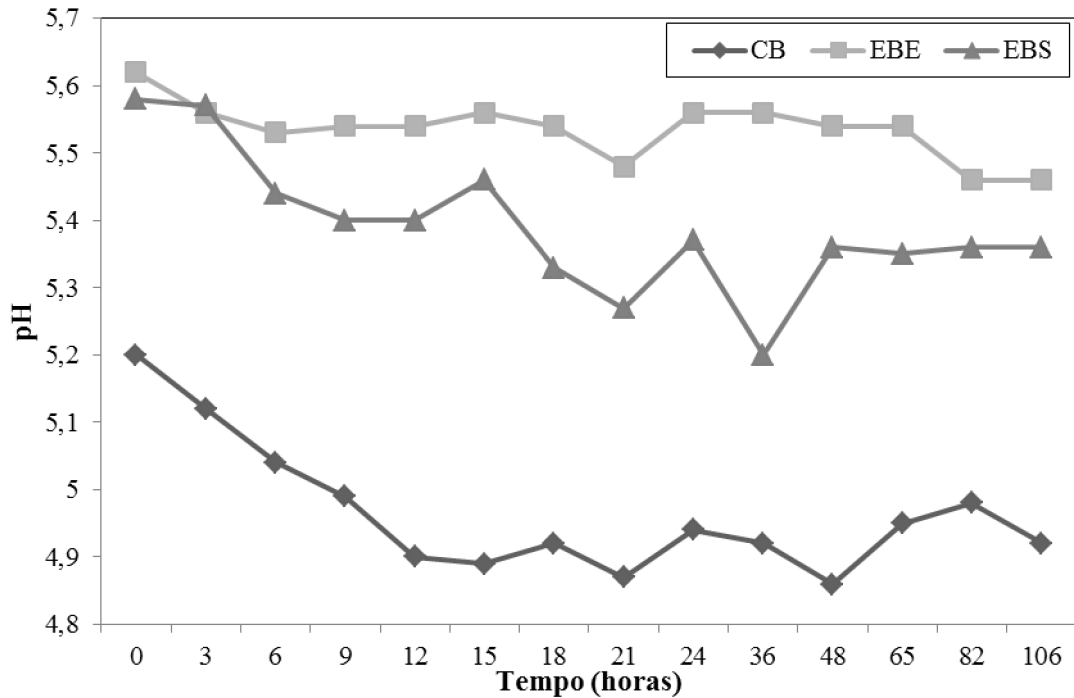
Neste ponto 12 h foi obtido butanol concentração igual a 0,02 g L⁻¹, com rendimento igual a 0,014 g g⁻¹ e produção de 0,002 g L⁻¹ h⁻¹ (TAB. 4.1), outro fator que corrobora a

produção de butanol nesse período é a diminuição do pH de 5,2 no início da operação para 4,9 após 12h (FIG. 4.6). Porém a partir das 12h de experimento a produção de butanol diminuiu (FIG. 4.4), desta forma para CB sobre as condições utilizadas no período de 12 h é possível obter produção de butanol.

Tabela 4.1 - Produção, rendimento e taxa de produtividade dos inóculos

	Inóculo		
	CB	EBE	EBS
Tempo de fermentação	12 h	106 h	12 h
Produto g L⁻¹			
Butanol	0,02	-----	-----
Etanol	0,69	0,17	0,026
Ácido butírico	0,91	-----	-----
Glicose g L⁻¹			
Inicial	1,70	0,57	0,69
Consumida	1,34	0,32	0,12
Rendimento g g⁻¹			
Butanol	0,015	-----	-----
Etanol	0,51	0,51	0,21
Produção g L⁻¹h⁻¹			
Butanol	0,002	-----	-----
Etanol	0,06	0,002	0,002

Figura 4.6 - Leitura de pH durante a operação para os três inóculos: CB (*C. beijerinckii*), EBE (esterco bovino enriquecido), EBS (Esterco bovino sem enriquecimento).



Para o inóculo EBE e EBS não ocorreu produção de butanol, o consumo de açúcar redutor e o crescimento do inóculo foram muito baixos como pode ser observado na figura 4.7 e na figura 4.8. A diferença no crescimento, OD medido ao longo do ensaio, entre EBE e EBS deve-se ao fato do enriquecimento realizado com o ensaio EBE, mas quando comparado ao inóculo CB o EBE não apresenta valores de OD significativos.

O consumo de glicose pode ser observado na figura 4.7 para EBE e na figura 4.8 para EBS. Os inóculos EBE e EBS produziram apenas etanol. EBE apresentou rendimento mais elevado igual a $0,51 \text{ g g}^{-1}$ de produção de etanol (TAB. 4.1), tanto em relação ao inóculo EBS do que alguns trabalhos analisados.

Um estudo realizado por Fathima et al. (2016) alcançou $4,6 \text{ g L}^{-1}$ de etanol com rendimento $0,26 \text{ g g}^{-1}$ utilizando *C. phytofermentans* na fermentação de biomassa de alga. Outro estudo (LEHMANN; EVERSLOH, 2011) utilizando um mutante de *C. acetobutylicum* alcançaram rendimento igual a $0,29 \text{ g g}^{-1}$ de etanol e uma produção de $16,2 \text{ g L}^{-1}$ de etanol, modificando a espécie de *Clostridium thermocellum*. Thompson e colaboradores (2015) conseguiram uma produção de etanol igual a $1,27 \text{ g L}^{-1}$ com de rendimento $0,32 \text{ g g}^{-1}$ com a melhor cepa modificada.

Desta forma se a concentração inicial do substrato fosse mais elevada do que a estudada a produção de solventes pelo inóculo EBE poderia alcançar valores mais significativos de rendimento do que os encontrados.

A diferença de produção entre os inóculos EBE e EBE é decorrência do meio suplementado que foi utilizado na fermentação de EBE. Na figura 4.6 é possível observar que o EBE e EBS não apresentou valores de pH menores que 5, e para produção de butanol é necessário que o pH alcance valores entre 5 e 4.

Figura 4.7 - Crescimento de EBE medido em densidade óptica 600 nm e consumo de glicose durante a operação do reator

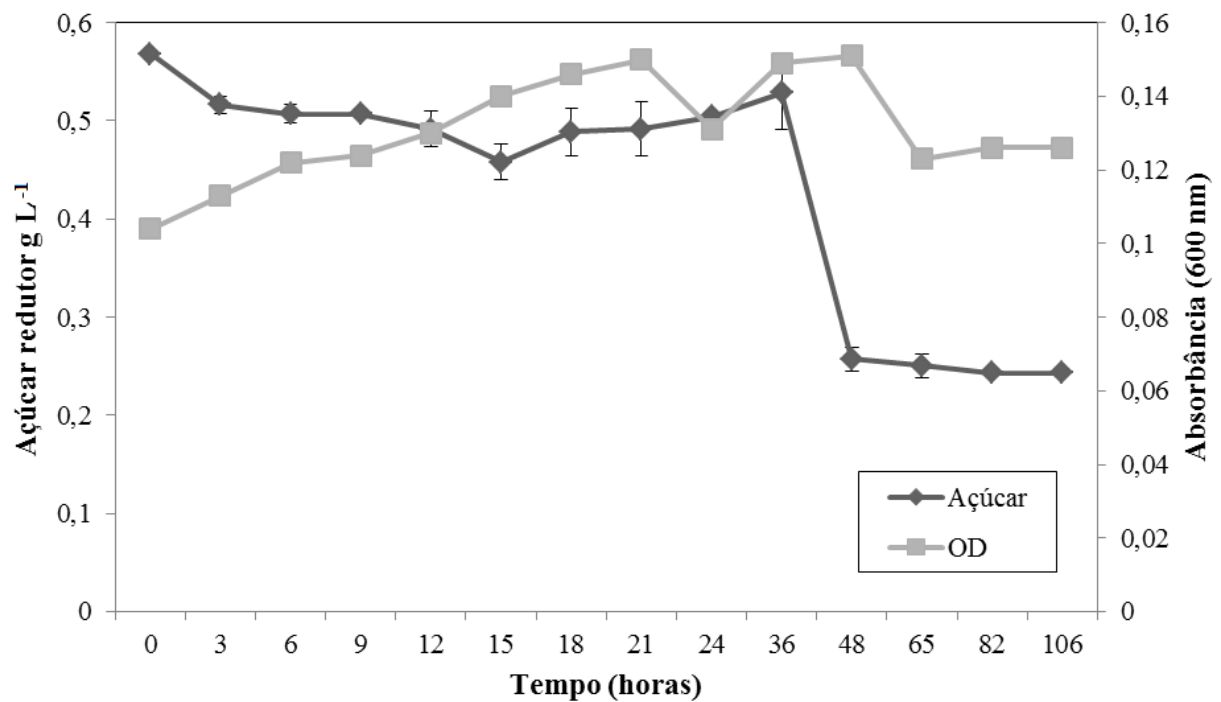
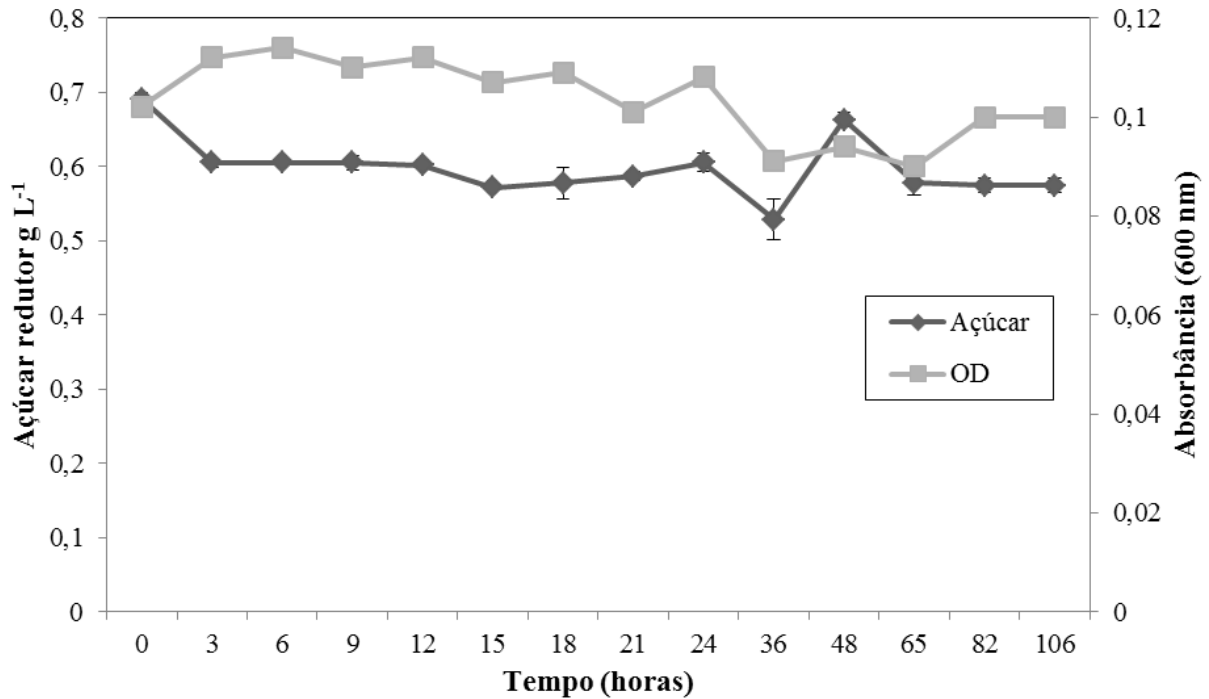


Figura 4.8 - Crescimento de EBS medido em densidade óptica 600 nm e consumo de glicose durante a operação do reator

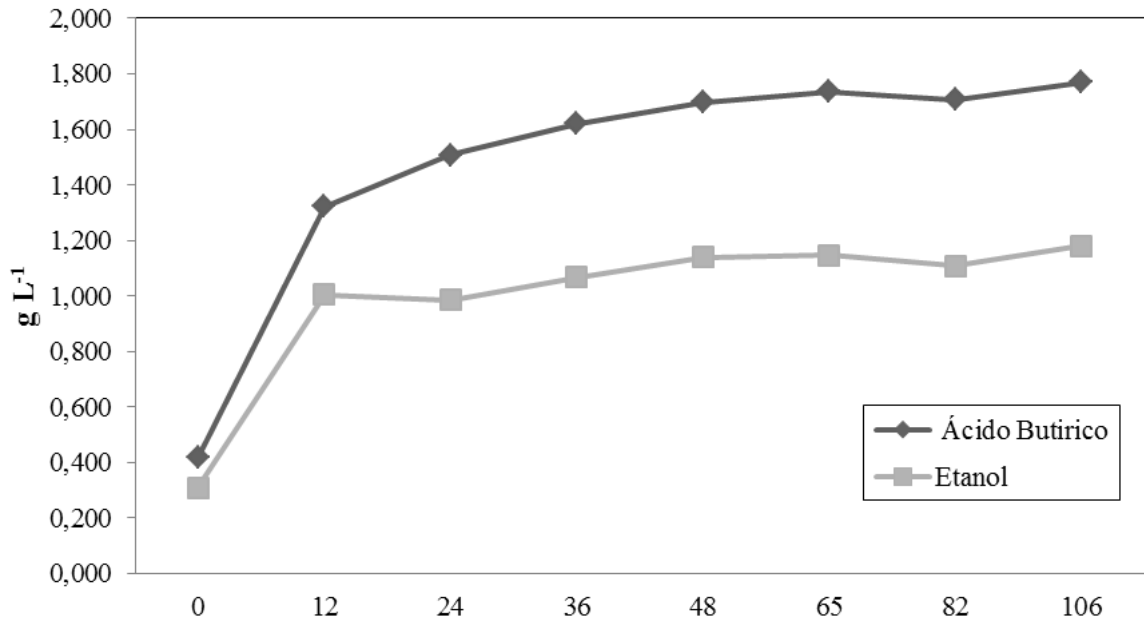


É importante ressaltar a produção de ácido butírico e etanol para CB, ao decorrer do experimento, tendo a maior produção no período entre 0h e 12h (FIG. 4.9).

Esse resultado mostra que existe a possibilidade de adequar as condições para que haja maior conversão de ácido butírico em butanol.

Segundo Fond et al. (1986), em taxas de alimentação baixas a concentração do meio se torna limitante, o que resulta em um crescimento mais lento, uma transição metabólica mais lenta, assim há maior acumulação de ácidos, já que para que ocorra a assimilação dos ácidos produzidos é necessário que ainda haja algum tipo de açúcar no meio. Linggang et al. (2013) relatam que ao utilizar uma concentração de açúcar igual a 30 g L⁻¹ obtiveram maior concentração de ácidos residuais do que com uma concentração 50 g L⁻¹, e devido a essa baixa concentração muitas vezes após a fermentação uma concentração de açúcar ainda pode ser encontrada no meio, porém não supre a quantidade necessária para a assimilação dos ácidos orgânicos.

Figura 4.9 – Produção de ácido butírico e etanol por CB durante a operação do reator



Para os valores de biomassa era esperado que aumentasse conforme o crescimento do inóculo o que não ocorreu para nenhum dos inóculos (TAB. 4.2).

Em relação a DQO não ocorreu redução para os inóculos CB e EBE apenas para EBS redução de 97,45%, essa condição pode ser explicada pelo fato da não extração dos metabólitos produzidos no meio o que afeta a DQO real, essa mesma condição pode ser observada em um estudo realizado por Ouephanit et al. (2011), usando água residuária da lavagem de mandioca de produção de fécula obtiveram uma redução de 93,5% de DQO com *C. butyricum* e 86,6% e *C. acetobutylicum*.

Tabela 4.2 – Medidas de DQO e biomassa inicial e final dos três inóculos

	Inóculo					
	CB		EBE		EBS	
	Inicial	Final	Inicial	Final	Inicial	Final
Biomassa mg L⁻¹	11,52	9,56	13,67	13,91	10,48	10,22
DQO g L⁻¹	13	13	15	15	17	15

A baixa produção de butanol pode estar relacionada a quantidade de substrato inicial pois, aumentando a concentração de substrato de 25 g L⁻¹ para 75 g L⁻¹ Abd-lla e co-autores

(2012) e obtiveram como resultado 3,10 g L⁻¹ e 12,3 g L⁻¹ de butanol. Ao isolarem uma cepa nativa Al-Shorgani e colaboradores ofereceram 20 g.L⁻¹ de substrato e a produção de butanol foi de 3,71 g L⁻¹ para 6,2 g L⁻¹ ao usarem uma concentração de 30 g L⁻¹ de substrato.

Meios suplementados apresentam maiores produção de solventes (TAB. 4.1) e melhor crescimento (FIG. 4.6 e FIG. 4.7), como pode ser observado nos reatores com inóculo EBE e EBS. Alguns estudos mostram que o enriquecimento com concentrações baixas de elementos, como zinco (WU, et al.,2013), extrato de levedura (ABD-ALLA et al.,2012; LINGGANG et al.,2013), nitrogênio (ABD-ALLA et al.,2012; KOMONKIAT; CHEIRSILP, 2013), ou ácido butírico melhoram a produção de solventes na fermentação ABE. É importante ressaltar que mesmo sem suplementação é possível produzir os solventes mesmo que em baixas concentrações.

4.4 CONCLUSÃO

A manipueira, a partir de CB, se mostrou como um substrato em potencial para a fermentação ABE, contudo é necessário a adequar as condições do processo fermentativo a fim de aumentar as concentrações finais de solventes.

O inóculo pré tratado de esterco bovino produziu apenas etanol, e quando suplementado com meio enriquecido para micro-organismos solvetogênicos apresentou rendimento 0,51 g g⁻¹.

Com a suplementação do meio de produção o rendimento de etanol foi melhor do que sem suplementação.

O trabalho mostra o potencial de dois resíduos, manipueira e esterco bovino, na obtenção de biocombustíveis, gerando novas alternativas de uso e agregando valor aos resíduos em função dos produtos produzidos.

4.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABD-ALLA, M. H.; EL-ENANY, A. W. E. Production of acetone-butanol-ethanol from spoilage date palm (*Phoenix dactylifera* L.) fruits by mixed culture of *Clostridium acetobutylicum* and *Bacillus subtilis*. *Biomass and Bioenergy*, v. 42, p. 172-178, 2012.

AL-SHORGANI, N. K. N.; ISA, M. H. M.; YUSOFF, W. M. W.; KALIL, M. K.; HAMID, A. A. Isolation of a *Clostridium acetobutylicum* strain and characterization of its fermentation performance on agricultural wastes. *Renewable Energy*, v. 86, p. 459-465, 2016.

CHEN, Y.; ZHOU, T.; LIU, D.; LI, A.; XU, S.; LIU, Q.; LI, B.; YING, H. Production of Butanol from Glucose and Xylose with Immobilized Cells of *Clostridium acetobutylicum*. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, v. 18, p. 234-241, 2013.

FATHIMA, A. A.; SANITHA, M.; KUMAR, T.; IYAPPAN, S.; RAMYA, M. Direct utilization of waste water algal biomass for ethanol production by cellulolytic *Clostridium phytofermentans* DSM1183. *Bioresource Technology*, v. 202, p. 253–256, 2016.

FOND, O.; ENGASSER, J.M.; MATTA-EL-AMOURI, G.; PETITDEMANGE, H. The acetone butanol fermentation on glucose and xylose. II. Regulation and kinetics in batch cultures. *Biotechnol Bioeng*, v. 28, n. 2 p. 167–175, 1986.

HARDE, S. M.; JADHAV, S. B.; BANKAR, S. B.; OJAMO, H.; GRANSTROM, T.; SINGHAL, R. S.; SURVASE, S. A. Acetone-butanol-ethanol (ABE) fermentation using the root hydrolysate after extraction of forskolin from *Coleus forskohlii* *Renewable Energy*, v. 86 p. 594-601, 2016.

HASSAN, E. A.; ABD-ALLA, M. H.; BAGY, M M. K.; MORSY, F. M. In situ hydrogen, acetone, butanol, ethanol and microdiesel production by *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 from oleaginous fungal biomass. *Anaerobe*, v. 34, p.125-131, 2015.

HU, X. L.; WANG, H. Y.; WU, Q.; XU, Y. Development, validation and application of specific primers for analyzing the clostridial diversity in dark fermentation pit mud by PCR-DGGE. *Bioresource Technology*, v. 163, p. 40–47, 2014.

IBRAHIM, M. F.; ABD-AZIZ, S.; EZREEZA, M.; YUSOFF, M.; PHANG, L. Y.; HASSAN, M. A. Simultaneous enzymatic saccharification and ABE fermentation using pretreated oil palm empty fruit bunch as substrate to produce butanol and hydrogen as biofuel. *Renewable Energy*, v. 77, p. 447-455, 2015.

KENNES, D.; ABUBACKAR, H. N.; DIAZ, M.; VEIGA, M C.; KENNES, C. Bioethanol production from biomass: carbohydrate vs syngas fermentation. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*. v. 91, n. 4, p. 304–317, 2016.

KOMONKIAT, I.; CHEIRSILP B. Felled oil palm trunk as a renewable source for biobutanol production by *Clostridium* spp. *Bioresource Technology*, v. 146, p. 200–207, 2013.

KUMAR, M.; GAYEN, K. Developments in biobutanol production: New insights. *Applied Energy*, v.88, p. 1999–2012, 2011.

LEHMANN, D.; EVERSLOH, T. Switching *Clostridium acetobutylicum* to an ethanol producer by disruption of the butyrate/butanol fermentative pathway. *Metabolic Engineering*, v. 13, p. 464–473, 2011.

LINGGANG, S.; PHANG, L. Y.; WASOH, H.; ABD-AZIZ, S. Acetone–Butanol–Ethanol Production by *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 Using Sago Pith Residues Hydrolysate. *Bioenerg. Res.* v. 6, p.321–328, 2013.

MILLER,G.L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*, v.31, p. 426-429, 1959.

MONOT, F. MARTIN, J. R.; PETIDEMANGE, H.; GAY, R. Acetone and Butanol Production by *Clostridium acetobutylicum* in a Synthetic Medium. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 44, p. 1318-1324, 1982.

OUEPHANIT, C.; VIRUNANON, C.; BURAPATANA, V.; CHULALAKSANANUKULW. Butanol and ethanol production from tapioca starch wastewater by *Clostridium* spp. *Water Science & Technology*, v. 64, n.9, p.1774-1780, 2011.

SIRISANTIMETHAKOM, S.; LAOPAIBOON, L.; SANCHANDA, P; CHATLEUDMONGKOL, J.; LAOPAIBOON, P. Improvement of butanol production from sweet sorghum juice by *Clostridium beijerinckii* using an orthogonal array design. *Industrial Crops and Products*, v.79, p. 287–294, 2016.

SURVASEA, S. A.; SKLAVOUNOSB, E.; HEININGENB,A.; GRANSTRÖMA, T. Market refused vegetables as a supplement for improved acetone–butanol–ethanol production by *Clostridium acetobutylicum* DSM 792. *Industrial Crops and Products*, v. 45, p. 349– 354, 2013.

SU, H.; LIU, G.; HE, M.; TAN, F. A biorefining process: Sequential, combinational lignocellulose pretreatment procedure for improving biobutanol production from sugarcane bagasse. *Bioresource Technology*, v. 187, p. 149–160, 2015.

THOMPSON, R. A.; LAYTON, D. S.; GUSS, M. A.; OLSON, D. G.; LYND, L. R.; TRINH, C. T. Elucidating central metabolic redox obstacles hindering ethanol production in *Clostridium thermocellum*. *Metabolic Engineering*, v.32, p. 207–219, 2015.

VALDEZ-VAZQUEZ, I.; PÉREZ-RANGEL, M.; TAPIA, A.; BUITRÓN, G.; MOLINA, C.; HERNÁNDEZ, G.; AMAYA-DELGADO, L. Hydrogen and butanol production from native wheat straw by synthetic microbial consortia integrated by species of *Enterococcus* and *Clostridium*. *Fuel*, v. 159, p.214–222, 2015.

WU, Y. D.; XUE, C. CHEN, L. J.; BAI, J. W. Effect of zinc supplementation on acetone–butanol–ethanol fermentation by *Clostridium acetobutylicum*. *Journal of Biotechnology*, v. 165, p. 18– 21, 2013.

CAPÍTULO 5 – CONSIDERAÇÕES FINAIS

A avaliação dos substratos e dos inóculos apresentou resultados significativos como pode ser observado na tabela 5.1, os melhores resultados de produção e rendimento para etanol, butanol e ácido butírico, foram alcançados com manipueira como substrato.

A manipueira como substrato quando avaliada em relação a glicose mostrou ter potencial mais elevado como mostra a tabela 5.1, nela é possível observar que a cepa *Clostridium beijerinckii* com manipueira 10 g L⁻¹ açúcar redutor como substrato alcançou uma produção de butanol, etanol e ácidos orgânicos, mais elevada do que com concentrações de glicose 30 e 10 g L⁻¹.

Em termos de rendimento a manipueira como substrato mostrou resultados mais elevados do que com glicose como substrato, para butanol o melhor resultado 0,09 g g⁻¹ foi alcançado com manipueira 10 g L⁻¹ açúcar redutor e CB como inóculo, para etanol o melhor rendimento 0,51 g g⁻¹ foi alcançado por CB e EBE ao utilizar manipueira 5 g L⁻¹ DQO e o melhor rendimento de ácido butírico 0,67 g g⁻¹ foi alcançado por CB ao utilizar manipueira 5 g L⁻¹ DQO, valores que podem ser observados na tabela 5.1.

A melhor condição de produção de biocombustíveis ocorreu ao utilizar manipueira 10 g L⁻¹ e obteve-se 2,47 ±0,07 g L⁻¹ de etanol e 0,637 ±0,01 g L⁻¹ de butanol, ao avaliar a produção da cepa *C. beijerinckii* e os inóculos.

Tabela 5.1 – Produção e rendimento de ácido butírico, etanol e butanol dos ensaios realizados

Inóculo	Substrato	Produção g L ⁻¹			Rendimento g g ⁻¹		
		Butanol	Etanol	Ác. butírico	Butanol	Etanol	Ác. butírico
CA	glicose 30 g L ⁻¹	0,06±0,03	1,24±0,04	2±0,08	0,01	0,23	0,37
	glicose 30 g L ⁻¹	0,33±0,08	1,65±0,23	2,6±0,41	0,05	0,26	0,34
	glicose 10 g L ⁻¹	0,27±0,13	1,72±0,18	2,70±0,29	0,04	0,24	0,38
CB	manipueira 10 g L ⁻¹ açúcar redutor	0,637±0,1	2,47±0,070	3,87±0,11	0,09	0,35	0,55
	manipueira 5 g L ⁻¹ DQO	0,02	0,9	0,91	0,014	0,51	0,68
	glicose 10 g L ⁻¹	0	0	0	0	0	0
SL	manipueira 10 g L ⁻¹ açúcar redutor	0	0	0,004±0,003	0	0	0
	glicose 10 g L ⁻¹	0	0,008±0,006	0	0	0	0
LR	manipueira 10 g L ⁻¹ açúcar redutor	0	0	0,007±0,004	0	0	0
	glicose 10 g L ⁻¹	0	0	0	0	0	0
ES	manipueira 10 g L ⁻¹ açúcar redutor	0	0,005±0,007	0,12±0,01	0	0	0,03
	glicose 10 g L ⁻¹	0	0	0	0	0	0
EB	manipueira 10 g L ⁻¹ açúcar redutor	0	0	0,31±0,04	0	0	0,06
EBE	manipueira 5 g L ⁻¹ DQO	0	0,17	0	0	0,51	0
EBS	manipueira 5 g L ⁻¹ DQO	0	0	0	0	0,21	0

Os inóculos EB e ES por apresentarem produção de ácido butírico, metabólito intermediário para produção de butanol, são potenciais produtores desse álcool.

O processo de obtenção de butanol pode ser aprimorado, mudando as condições iniciais dos ensaios uma vez que existe uma elevada concentração de ácido butírico acumulado nos reatores, o qual pode ser metabolizado no biocombustível.

Concentrações de substratos maiores devem ser utilizadas e uma maior OD 600nm dos inóculos adicionados nos reatores para alcançar uma maior produção de solventes.

A adição de ácido butírico nos reatores pode proporcionar uma maior produção de butanol, isso pode ser realizado com a adição do ácido nos reatores ou pela hidrólise da manipueira com uma solução de ácido butírico e não com uma solução de ácido sulfúrico.

CAPÍTULO 6 – CONCLUSÃO

A manipueira, água residual complexa, mostrou ser um potencial substrato para a obtenção de biocombustíveis.

Com a cepa *C. beijerinckii* foi possível alcançar maior produção de biocombustíveis ao utilizar manipueira 10 g L⁻¹, 2,47±0,070 g L⁻¹ de etanol e 0,64 ±0,01 g L⁻¹ de butanol, quando comparado com concentrações de glicose 10 g L⁻¹ e 30 g L⁻¹.

A cepa que mostrou melhor viabilidade de produção de biocombustíveis foi a *C. beijerinckii*. Os inóculos ES e EB mostraram potencial para a produção de ácidos orgânicos. Quando fermentado novamente com manipueira 5 g L⁻¹ de DQO o inóculo EB apresentou potencial para a produção de etanol.

Ambos os resíduos utilizados no trabalho, manipueira e esterco bovino, apresentam potencial para a obtenção de biocombustíveis, gerando novas alternativas de uso e agregando valor aos resíduos em função dos produtos produzidos.

**APÊNDICE A – Análises de cromatografia líquida dos ensaios com as cepas
Clostridium beijerinckii e *Clostridium acetobutylicum* tendo como substrato glicose
30 g L⁻¹**

<i>Clostridium beijerinckii</i>								
	Inicial (g L ⁻¹)				Final (g L ⁻¹)			
	R1	R2	R3	Média	R1	R2	R3	Média
Cítrico	0,005	0,004	0,006	0,005	0,004	0,000	0,005	0,003
Málico	0,051	0,048	0,046	0,048	0,134	0,137	0,150	0,140
Succínico	0,189	0,154	0,139	0,161	1,326	1,032	1,440	1,266
Lático	0,086	0,064	0,068	0,073	0,262	0,188	0,208	0,219
Fórmico	0,002	0,001	0,000	0,001	0,000	0,000	0,000	0,000
Acético	1,372	1,192	1,174	1,246	1,446	1,476	1,450	1,458
Propiônico	0,058	0,040	0,048	0,049	0,000	0,017	0,000	0,006
Isobutírico	0,337	0,291	0,280	0,303	0,400	0,407	0,478	0,428
Butírico	0,008	0,007	0,006	0,007	2,784	2,127	2,902	2,604
Isovalérico	0,014	0,000	0,000	0,005	0,000	0,000	0,000	0,000
Valérico	0,050	0,067	0,035	0,051	0,054	0,022	0,054	0,043
Capróico	0,030	0,041	0,029	0,033	0,037	0,018	0,042	0,033
Glicose	25,904	23,662	22,389	23,985	19,840	19,584	19,546	19,657
Frutose	0,072	0,086	0,064	0,074	0,000	0,000	0,000	0,000
Metanol	0,013	0,013	0,013	0,013	0,012	0,000	0,000	0,004
Etanol	0,008	0,007	0,008	0,008	1,756	1,390	1,826	1,657
N-Butanol	0,000	0,000	0,000	0,000	0,377	0,234	0,383	0,332

<i>Clostridium acetobutylicum</i>								
	Inicial (g L ⁻¹)				Final (g L ⁻¹)			
	R1	R2	R3	Média	R1	R2	R3	Média
Cítrico	0,004	0,004	0,005	0,004	0,003	0,000	0,000	0,001
Málico	0,062	0,049	0,057	0,056	0,050	0,053	0,056	0,053
Succínico	0,126	0,106	0,108	0,113	0,979	1,007	0,990	0,992
Lático	0,045	0,039	0,036	0,040	0,271	0,160	0,233	0,221
Fórmico	0,001	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
Acético	1,112	0,961	1,017	1,030	1,061	1,084	1,410	1,185
Propiônico	0,000	0,000	0,000	0,000	0,031	0,000	0,020	0,017
Isobutírico	0,312	0,264	0,281	0,286	0,235	0,191	0,211	0,212
Butírico	0,033	0,022	0,025	0,027	2,067	1,939	2,103	2,036
Isovalérico	0,000	0,011	0,000	0,004	0,014	0,010	0,012	0,012
Valérico	0,053	0,025	0,024	0,034	0,016	0,016	0,037	0,023
Capróico	0,018	0,017	0,028	0,021	0,013	0,016	0,030	0,020
Glicose	24,499	22,080	23,004	23,194	19,117	17,872	20,248	19,079
Frutose	0,150	0,135	0,136	0,140	0,000	0,000	0,000	0,000
Metanol	0,013	0,013	0,012	0,013	0,013	0,015	0,016	0,015
Etanol	0,025	0,019	0,021	0,022	1,275	1,219	1,312	1,269
N-Butanol	0,000	0,000	0,000	0,000	0,037	0,038	0,094	0,056

APÊNDICE B – Análises de cromatografia líquida dos ensaios com a cepa *Clostridium beijerinckii* e com os diferentes inóculos tendo como substrato glicose 10 g L⁻¹

	Inóculo – Solo do cultivo de cana-de-açúcar							
	Inicial (g L ⁻¹)				Final (g L ⁻¹)			
	R1	R2	R3	Média	R1	R2	R3	Média
Cítrico	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
Málico	0,076	0,127	0,120	0,108	0,089	0,086	0,088	0,088
Succínico	0,224	0,260	0,247	0,244	0,211	0,221	0,208	0,213
Lático	0,015	0,015	0,049	0,026	0,004	0,004	0,004	0,004
Fórmico	0,000	0,000	-0,001	0,000	0,007	0,008	0,008	0,007
Acético	1,242	1,310	1,339	1,297	1,243	1,306	1,227	1,259
Propiônico	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
Isobutírico	0,251	0,284	0,299	0,278	0,272	0,284	0,242	0,266
Butírico	0,005	0,004	0,005	0,005	0,002	0,003	0,002	0,002
Isovalérico	0,024	0,031	0,032	0,029	0,047	0,051	0,032	0,043
Valérico	0,058	0,057	0,063	0,059	0,055	0,058	0,048	0,053
Capróico	0,024	0,056	0,038	0,039	0,028	0,027	0,027	0,027
Glicose	16,337	16,337	16,445	16,373	15,106	15,534	14,882	15,174
Frutose	0,000	0,000	0,033	0,011	0,000	0,000	0,000	0,000
Metanol	0,014	0,014	0,000	0,010	0,000	0,021	0,025	0,015
Etanol	0,071	0,071	0,086	0,076	0,080	0,070	0,076	0,076
N-Butanol	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000

	Inóculo - Efluente de biodigestor de suinocultura							
	Inicial (g L ⁻¹)				Final (g L ⁻¹)			
	R1	R2	R3	Média	R1	R2	R3	Média
Cítrico	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
Málico	0,102	0,155	0,193	0,150	0,439	0,347	0,326	0,370
Succínico	0,144	0,260	0,275	0,226	0,668	0,585	0,756	0,670
Lático	0,039	0,071	0,095	0,068	0,778	0,836	0,724	0,779
Fórmico	-0,002	-0,001	-0,002	-0,002	0,000	0,000	0,000	0,000
Acético	0,687	1,331	1,280	1,099	1,265	1,265	1,238	1,256
Propiônico	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
Isobutírico	0,134	0,282	0,279	0,232	1,276	1,320	1,182	1,259
Butírico	0,003	0,006	0,005	0,004	0,000	0,000	0,000	0,000
Isovalérico	0,018	0,032	0,034	0,028	0,088	0,093	0,087	0,089
Valérico	0,029	0,055	0,055	0,047	0,046	0,042	0,047	0,045
Capróico	0,051	0,030	0,040	0,040	0,088	0,096	0,096	0,093
Glicose	6,724	14,159	12,756	13,458	12,525	12,342	12,001	12,289
Frutose	0,046	0,000	0,085	0,044	0,000	0,000	0,000	0,000
Metanol	0,000	0,000	0,000	0,000	0,030	0,046	0,022	0,033
Etanol	0,066	0,071	0,080	0,072	0,073	0,053	0,070	0,065
N-Butanol	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000

Inóculo - Lodo de reator UASB usado no tratamento de esgoto sanitário								
	Inicial (g L ⁻¹)				Final (g L ⁻¹)			
	R1	R2	R3	Média	R1	R2	R3	Média
Cítrico	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
Málico	0,041	0,051	0,054	0,049	0,093	0,079	0,079	0,083
Succínico	0,087	0,112	0,110	0,103	0,206	0,171	0,166	0,181
Lático	0,007	0,007	0,007	0,007	0,010	0,007	0,006	0,008
Fórmico	-0,001	-0,001	-0,001	-0,001	0,008	0,007	0,006	0,007
Acético	0,519	0,646	0,641	0,602	1,242	0,985	0,969	1,065
Propiônico	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
Isobutírico	0,100	0,127	0,126	0,118	0,245	0,197	0,193	0,212
Butírico	0,002	0,003	0,003	0,003	0,000	0,002	0,000	0,001
Isovalérico	0,015	0,017	0,017	0,016	0,033	0,028	0,027	0,029
Valérico	0,000	0,000	0,000	0,000	0,051	0,040	0,032	0,041
Capróico	0,005	0,005	0,074	0,028	0,025	0,031	0,024	0,027
Glicose	5,452	6,860	6,838	6,384	13,607	11,007	10,827	11,814
Frutose	0,000	0,019	0,016	0,012	0,000	0,000	0,000	0,000
Metanol	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
Etanol	0,081	0,076	0,069	0,075	0,084	0,081	0,084	0,083
N-Butanol	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000

Inóculo – Esterco bovino								
	Inicial (g L ⁻¹)				Final (g L ⁻¹)			
	R1	R2	R3	Média	R1	R2	R3	Média
Cítrico	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
Málico	0,138	0,061	0,058	0,086	0,207	0,210	0,210	0,209
Succínico	0,157	0,086	0,085	0,110	0,055	0,056	0,056	0,056
Lático	0,105	0,055	0,053	0,071	2,211	2,151	2,007	2,123
Fórmico	-0,002	-0,002	-0,002	-0,002	0,000	0,000	0,000	0,000
Acético	0,938	0,526	0,524	0,663	1,067	1,102	1,082	1,083
Propiônico	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
Isobutírico	0,163	0,090	0,090	0,114	0,049	0,073	0,065	0,062
Butírico	0,003	0,002	0,002	0,003	0,002	0,002	0,002	0,002
Isovalérico	0,030	0,017	0,000	0,016	0,076	0,076	0,071	0,074
Valérico	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,031	0,010
Capróico	0,025	0,005	0,000	0,010	0,024	0,000	0,021	0,015
Glicose	8,209	4,603	4,504	5,772	7,006	7,514	7,407	7,309
Frutose	0,026	0,013	0,013	0,017	0,057	0,058	0,056	0,057
Metanol	0,017	0,000	0,000	0,006	0,000	0,000	0,000	0,000
Etanol	0,081	0,087	0,086	0,085	0,073	0,081	0,024	0,059
N-Butanol	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000

Inóculo – <i>Clostridium beijerinckii</i>								
	Inicial (g L ⁻¹)				Final (g L ⁻¹)			
	R1	R2	R3	Média	R1	R2	R3	Média
Cítrico	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
Málico	0,060	0,061	0,072	0,064	0,125	0,141	0,085	0,117
Succínico	0,106	0,149	0,177	0,144	0,703	0,444	0,468	0,538
Lático	0,030	0,021	0,027	0,026	0,003	0,109	0,082	0,065
Fórmico	-0,002	-0,001	-0,001	-0,002	0,004	0,001	-0,001	0,001
Acético	0,574	0,862	0,999	0,812	1,506	1,330	1,413	1,416
Propiônico	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
Isobutírico	0,123	0,176	0,208	0,169	0,444	1,148	0,969	0,854
Butírico	0,035	0,051	0,062	0,049	2,413	2,980	2,875	2,756
Isovalérico	22,484	15,122	17,195	18,267	0,000	0,019	0,000	0,006
Valérico	0,000	0,000	0,000	0,000	0,033	0,046	0,051	0,043
Capróico	0,000	0,021	0,027	0,016	0,042	0,058	0,052	0,051
Glicose	3,755	5,563	6,586	5,301	1,992	0,909	0,935	1,279
Frutose	0,027	0,024	0,027	0,026	0,000	0,000	0,000	0,000
Metanol	0,000	0,016	0,000	0,005	0,017	0,000	0,000	0,006
Etanol	0,013	0,026	0,021	0,020	1,524	1,879	1,809	1,737
N-Butanol	0,000	0,000	0,000	0,000	0,120	0,354	0,344	0,273

APÊNDICE C – Análises de cromatografia líquida dos ensaios com a cepa *Clostridium beijerinckii* e com os diferentes inóculos tendo como substrato manipueira 10 g L⁻¹ de açúcar redutor

	Inóculo – Solo do cultivo de cana-de-açúcar							
	Inicial (g L ⁻¹)				Final (g L ⁻¹)			
	R1	R2	R3	Média	R1	R2	R3	Média
Cítrico	0,048	0,046	0,073	0,056	0,070	0,075	0,065	0,070
Málico	0,306	0,304	0,431	0,347	0,407	0,439	0,588	0,478
Succínico	0,396	0,382	0,538	0,439	0,561	0,587	0,538	0,562
Lático	1,141	1,105	1,569	1,272	1,592	1,676	1,540	1,603
Fórmico	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
Acético	1,018	0,993	1,384	1,132	1,518	1,605	1,479	1,534
Propiônico	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
Isobutírico	0,523	0,507	0,703	0,577	0,751	0,786	0,722	0,753
Butírico	0,007	0,006	0,008	0,007	0,015	0,010	0,009	0,011
Isovalérico	0,020	0,020	0,028	0,023	0,032	0,035	0,033	0,033
Valérico	0,052	0,059	0,083	0,065	0,091	0,100	0,088	0,093
Capróico	0,015	0,021	0,037	0,024	0,031	0,032	0,049	0,037
Glicose	5,309	5,335	8,277	6,307	8,769	9,217	8,503	8,829
Frutose	1,824	1,783	2,572	2,059	2,702	2,844	2,629	2,725
Metanol	0,023	0,019	0,000	0,014	0,020	0,017	0,000	0,012
Etanol	0,077	0,080	0,110	0,089	0,074	0,072	0,088	0,078
N-Butanol	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000

	Inóculo - Efluente de biodigestor de suinocultura							
	Inicial (g L ⁻¹)				Final (g L ⁻¹)			
	R1	R2	R3	Média	R1	R2	R3	Média
Cítrico	0,032	0,050	0,058	0,047	0,068	0,067	0,068	0,068
Málico	0,169	0,370	0,418	0,319	0,525	0,489	0,484	0,499
Succínico	198,390	0,430	0,492	66,437	1,921	1,923	1,941	1,928
Lático	0,561	1,229	1,388	1,060	2,879	2,582	2,672	2,711
Fórmico	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
Acético	0,530	1,125	1,269	0,975	1,534	1,468	1,496	1,499
Propiônico	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
Isobutírico	0,257	0,553	0,626	0,478	1,400	1,182	1,242	1,274
Butírico	0,003	0,005	0,006	0,005	0,133	0,109	0,125	0,122
Isovalérico	0,027	0,022	0,023	0,024	0,079	0,070	0,075	0,075
Valérico	0,015	0,052	0,071	0,046	0,098	0,100	0,092	0,097
Capróico	0,000	0,026	0,030	0,019	0,032	0,033	0,036	0,034
Glicose	1,920	4,259	4,839	3,673	6,566	6,292	6,336	6,398
Frutose	0,845	1,900	2,163	1,636	2,680	2,555	2,594	2,610
Metanol	0,000	0,000	0,013	0,004	0,018	0,016	0,015	0,016
Etanol	0,081	0,077	0,074	0,077	0,081	0,079	0,087	0,082
N-Butanol	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000

Inóculo - Lodo de reator UASB usado no tratamento de esgoto sanitário								
	Inicial (g L ⁻¹)				Final (g L ⁻¹)			
	R1	R2	R3	Média	R1	R2	R3	Média
Cítrico	0,040	0,047	0,058	0,048	0,047	0,049	0,054	0,050
Málico	0,142	0,170	0,362	0,225	0,188	0,322	0,337	0,282
Succínico	0,167	0,196	0,415	0,259	0,611	0,455	0,473	0,513
Lático	0,476	0,564	1,217	0,752	1,539	1,296	1,351	1,395
Fórmico	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
Acético	0,470	0,529	1,126	0,708	1,174	1,280	1,353	1,269
Propiônico	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
Isobutírico	0,224	0,262	0,558	0,348	1,021	0,631	0,641	0,764
Butírico	0,003	0,003	0,005	0,004	0,005	0,014	0,013	0,010
Isovalérico	0,011	0,018	0,035	0,022	0,082	0,045	0,046	0,058
Valérico	0,006	0,014	0,049	0,023	0,056	0,070	0,070	0,065
Capróico	0,000	0,000	0,028	0,009	0,033	0,026	0,039	0,033
Glicose	2,136	2,316	4,926	3,126	5,090	5,695	5,943	5,576
Frutose	0,762	0,907	1,959	1,209	1,583	2,202	2,314	2,033
Metanol	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,014	0,005
Etanol	0,087	0,088	0,103	0,093	0,097	0,090	0,063	0,083
N-Butanol	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000

Inóculo – Esterco bovino								
	Inicial (g L ⁻¹)				Final (g L ⁻¹)			
	R1	R2	R3	Média	R1	R2	R3	Média
Cítrico	0,052	0,044	0,075	0,057	0,056	0,058	0,050	0,055
Málico	0,298	0,452	0,813	0,521	0,382	0,418	0,315	0,372
Succínico	0,196	0,304	0,566	0,355	0,352	0,362	0,315	0,343
Lático	0,640	0,967	1,778	1,129	4,522	4,646	3,725	4,298
Fórmico	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
Acético	0,567	0,837	1,542	0,982	1,401	1,464	1,263	1,376
Propiônico	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
Isobutírico	0,262	0,401	0,732	0,465	0,468	0,538	0,447	0,484
Butírico	0,003	0,005	0,009	0,006	0,319	0,356	0,283	0,319
Isovalérico	0,035	0,037	0,065	0,046	0,114	0,118	0,105	0,113
Valérico	0,019	0,040	0,082	0,047	0,064	0,073	0,059	0,066
Capróico	0,000	0,014	0,033	0,016	0,034	0,032	0,027	0,031
Glicose	1,575	2,477	4,822	2,958	1,267	1,586	1,419	1,424
Frutose	0,926	1,408	2,706	1,680	2,363	2,426	2,093	2,294
Metanol	0,000	0,018	0,013	0,010	0,000	0,000	0,000	0,000
Etanol	0,018	0,021	0,026	0,022	0,008	0,000	0,007	0,005
N-Butanol	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000

Inóculo – <i>Clostridium beijerinckii</i>								
	Inicial (g L ⁻¹)				Final (g L ⁻¹)			
	R1	R2	R3	Média	R1	R2	R3	Média
Cítrico	0,105	-----	0,120	0,113	0,070	-----	0,091	0,080
Málico	0,977	-----	1,100	1,039	0,194	-----	0,205	0,200
Succínico	0,778	-----	0,885	0,831	0,885	-----	0,791	0,838
Lático	2,239	-----	2,529	2,384	0,000	-----	0,111	0,056
Fórmico	0,000	-----	0,000	0,000	0,000	-----	-0,001	-0,001
Acético	2,168	-----	2,501	2,335	1,550	-----	1,080	1,315
Propiônico	0,000	-----	0,000	0,000	0,000	-----	0,000	0,000
Isobutírico	1,026	-----	1,164	1,095	1,421	-----	1,723	1,572
Butírico	0,105	-----	0,124	0,115	3,895	-----	4,066	3,980
Isovalérico	0,061	-----	0,070	0,065	0,102	-----	0,052	0,077
Valérico	0,134	-----	0,000	0,067	0,000	-----	0,000	0,000
Capróico	0,046	-----	0,055	0,050	0,061	-----	0,067	0,064
Glicose	6,915	-----	8,083	7,499	0,000	-----	0,000	0,000
Frutose	3,541	-----	3,987	3,764	0,163	-----	0,155	0,159
Metanol	0,013	-----	0,015	0,014	0,014	-----	0,025	0,019
Etanol	0,047	-----	0,060	0,054	2,469	-----	2,581	2,525
N-Butanol	0,000	-----	0,000	0,000	0,566	-----	0,709	0,637

APÊNDICE E – Curva padrão utilizada para quantificar açúcares redutores pelo método 3,5 ácido dinitrosalicílico (DNS)

