

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ

LUANA ROBERTA RABELLO

SÍNTESE DE ABE PELA FERMENTAÇÃO DE *Clostridium acetobutylicum* ENCAPSULADA EM ALGINATO E LÍQUIDO IÔNICO

FRANCISCO BELTRÃO

2019

LUANA ROBERTA RABELLO

SÍNTESE DE ABE PELA FERMENTAÇÃO DE *Clostridium acetobutylicum* ENCAPSULADA EM ALGINATO E LÍQUIDO IÔNICO

Trabalho de Conclusão de Curso de graduação, apresentado à disciplina de Trabalho de Conclusão de Curso 2, do Curso de Engenharia Química do Departamento Acadêmico de Engenharias - DAENG - da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, como requisito parcial para obtenção do título de bacharel em Engenharia Química.

Orientadora: Dra. Tânia Maria Cassol
Coorientador: Dr. Éder da Costa dos Santos
Coorientadora: Dra. Michele Di Domenico

FRANCISCO BELTRÃO

2019

FOLHA DE APROVAÇÃO

LUANA ROBERTA RABELLO

SÍNTESE DE ABE PELA FERMENTAÇÃO DE *Clostridium acetobutylicum* ENCAPSULADA EM LÍQUIDOS IÔNICOS

Trabalho de Conclusão de Curso de
Graduação em Engenharia Química da
Universidade Tecnológica Federal do Paraná.

Data de aprovação: 27 de novembro de 2019.

Prof^a. Dr^a. Tania Maria Cassol

Universidade Tecnológica Federal do Paraná Câmpus Francisco Beltrão

Prof^a. Dr^a. Cláudia Eugenia Castro Bravo

Universidade Tecnológica Federal do Paraná Câmpus Francisco Beltrão

Prof^a. Dr^a. Irede Angela Lucini Dalmolin

Universidade Tecnológica Federal do Paraná Câmpus Francisco Beltrão

“A folha de aprovação assinada encontra-se na coordenação do curso.”

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a todos os Brasileiros que com sua garra construíram este país e proporcionam as presentes e futuras gerações condições de conhecimento e desenvolvimento próspero, em especial a todos os colaboradores da Universidade Tecnológica Federal do Paraná.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Andréa, Túlio Malburg e Paula Villasboas pelo forte apoio que realizaram em toda a minha vida, dando condições para aquisição de uma educação, e formação de qualidade.

A meu amigo de toda vida, Guilherme, que sempre pude contar e conversar, dando apoio sempre que precisei.

Aos meus amigos e colegas de graduação, em especial a Priscila Marchiori, pelo forte apoio e dias de estudos que renderam bons momentos e muito conhecimento.

Um agradecimento ao meu noivo, Vinícius Fröner Lacerda por sempre estar do meu lado, me auxiliando durante toda minha graduação.

A Catarina e Maria Joaquina, meus bichinhos de estimação, por ter sido uma importante companhia durante essa jornada, dando apoio emocional e momentos alegres.

A todos meus professores que passaram por minha graduação, pelo respeito e conhecimento, em especial ao professor Cláudio Novello que foi grande incentivador durante a graduação e a professora Tania Maria Cassol pelo grande auxílio e conhecimento fundamentais para a elaboração deste trabalho, além de todo apoio na elaboração e execução.

EPÍGRAFE

“No que diz respeito ao empenho, ao compromisso, ao esforço e à dedicação, não existe meio termo. Ou você faz uma coisa bem-feita ou não faz.”

Ayrton Senna

RESUMO

Os combustíveis alternativos aos derivados de petróleo, como os biocombustíveis, são de grande importância econômica, uma vez que há o esgotamento da matéria fóssil, base dos combustíveis convencionais. O processo ABE (acetona, butanol e etanol) é uma matriz energética possível de ser produzida por métodos fermentativos que não agride o ambiente; para isso, diversas pesquisas utilizam microrganismos como a *Clostridium acetobutylicum* para produção dessa matriz. Um dos grandes problemas da produção de ABE por esses microrganismos é devido ao fato do produto fermentado ser tóxico a eles quando em altas concentrações, evidenciando a necessidade de métodos que os tornem mais resistentes a esta toxicidade, ou que não haja contato do produto com o microrganismo. O encapsulamento é um método que evita o contato direto do microrganismo com o ABE produzido, uma vez que este ao produzir expelle o ABE para o meio externo (fora das cápsulas). O objetivo deste trabalho é a avaliação de produção de ABE através da *Clostridium acetobutylicum* encapsulada em *beads*. A utilização de métodos de encapsulamento é amplamente utilizado em diversas indústrias, sendo de fácil aplicação e reprodução. Usualmente são utilizados alginato e carbonato de cálcio para criação das cápsulas, outro método é a utilização de líquidos iônicos o qual pode ser mais promissor devido a este poder ser recuperado para reutilização. As capsulas são utilizadas para imobilizar o microrganismo em uma esfera, a qual tem como principal função a proteção deste. A produção de ABE através de metodologia de encapsulamento mostrou bons resultados em comparação com métodos fermentativos tradicionais (não imobilizados), sendo a produção de etanol maior que a esperada, entretanto a produção de butanol foi levemente menor que a encontrada em outros métodos. Tais diferenças trazem a possibilidade de estudos futuros de cinética de produção. Após a primeira etapa de fermentação foi possível a reutilização das cápsulas para próximos processos fermentativos, diferente de fermentação tradicional, onde é necessário a inoculação de novos microrganismos para a reinicialização do processo.

Palavras-chave: *Clostridium acetobutylicum*. *Beads*. Butanol. Etanol. Acetona. Manipueira. Fermentação. ABE.

ABSTRACT

Alternative fuels to petroleum derivatives, such as biofuels, are of great economic importance, since there is the depletion of fossil matter, the basis of conventional fuels. The ABE process (acetone, butanol and ethanol) is an energy matrix that can be produced by fermentative methods that do not harm the environment; For this, several researches use microorganisms such as *Clostridium acetobutylicum* to produce this matrix. One of the major problems of ABE production by these microorganisms is due to the fact that the fermented product is toxic to them when in high concentrations, highlighting the need for methods that make them more resistant to this toxicity, or that there is no contact of the product with the product. microorganism. Encapsulation is a method that avoids the direct contact of the microorganism with the produced ABE, since in producing it expels the ABE to the external environment (outside the capsules). The objective of this work is the evaluation of ABE production through *Clostridium acetobutylicum* encapsulated in *beads*. The use of encapsulation methods is widely used in various industries, being easy to apply and reproduce. Usually alginate and calcium carbonate are used to create the capsules, another method is the use of ionic liquids which may be more promising because it can be recovered for reuse. The capsules are used to immobilize the microorganism in a sphere, whose main function is to protect it. ABE production through encapsulation methodology showed good results compared to traditional (non-immobilized) fermentative methods, with ethanol production higher than expected, but butanol production was slightly lower than that found in other methods. Such differences bring the possibility of future studies of production kinetics. After the first fermentation step, it was possible to reuse the capsules for future fermentation processes, unlike traditional fermentation, where it is necessary to inoculate new microorganisms to restart the process.

Keywords: *Clostridium acetobutylicum*. *Beads*. Butanol. Ethanol. Acetone. Cassava. Fermentation. ABE.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Etapas do processo produtivo em uma fecularia	18
Figura 2 - Processo de obtenção da manipueira	19
Figura 3 - Exemplo de um líquido iônico a base do imidazol	21
Figura 4 - Via metabólica de fermentação ABE realizada pela <i>Clostridium acetobutylicum</i>	23
Figura 5 - Considerações da engenharia fermentativa ABE.	24
Figura 6 - Conversão do butirato em butanol através de dois mecanismos sugeridos: (a) via CoAT e (b) via da butirato-quinase; BADH; butilaldeo desidrogenase, BDH; butanol desidrogenase, BK; butiratoquinase, PTB; fosfotransbutirilase.	25
Figura 7 - Caixa e ampola protegida com cepa de <i>Clostridium acetobutylicum</i>	26
Figura 8 - Equipamento de geração de ambiente inerte.	27
Figura 9 - Tubo de ensaio vedado com microrganismo (esq.) e tubo de ensaio microrganismos na jarra de anaerobiose (dir.).	29
Figura 10 - Ativação do microrganismo passadas 24 horas (esq.) e passadas 72 horas (dir.).	29
Figura 11 - Ativação e manipulação da cepa liofilizada de <i>Clostridium acetobutylicum</i>	30
Figura 12 - Procedimentos de coleta, aquisição e análise do substrato.....	30
Figura 13 - Estrutura química do NOME DO LIQUIDO	34
Figura 14 - Etapas básicas do processo de obtenção e separação do ABE	35
Figura 15 - Funil de separação (esq.) e sistema de destilação (dir.).	36
Figura 16 - Frasco com frações recuperadas referentes a 1 L.....	37
Figura 17 - Gráfico da curva de crescimento da <i>Clostridium acetobutylicum</i>	38
Figura 18 - <i>Beads</i> formulados dentro de frasco Schott vedado sem oxigênio.	40
Figura 19 - Frasco com <i>beads</i> fermentado (esq.) e no início da fermentação (dir.). .	40
Figura 20 – <i>Beads formulados dentro de frasco Schott vedado sem oxigênio (i), beads líquido iônicos (ii), comparação entre os beads (iii)</i>	41
Figura 21 - Teste de Lucas no líquido orgânico (possível etanol) (dir.).	43
Figura 22 - Teste de Lucas no líquido orgânico (possível butanol) (dir.).	43

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABE - Acetona, butanol e etanol

ATCC - *American Type Culture Collection*

ATT - Acidez total titulável

DBO - Demanda bioquímica de oxigênio

DQO - Demanda química de oxigênio

MO - Microrganismo

OD - Oxigênio dissolvido

pH - Potencial hidrogeniônico

RCM - *Modified Reinforced Clostridial*

UV - Ultra violeta

LISTA DE SÍMBOLOS

n - Volume da solução de hidróxido de sódio gastos na titulação em mL.

N - Normalidade da solução de hidróxido de sódio.

E_q - Equivalente-grama do ácido.

V - Volume

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	14
2	OBJETIVOS.....	16
2.1	Objetivo Geral	16
2.2	Objetivos Específicos	16
3	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	17
3.1	Indústria de Alimentos	17
3.2	Indústria de biocombustíveis.....	19
3.2.1	Biocombustíveis no Brasil	19
3.2.2	Produção de biocombustíveis por <i>Clostridium acetobutylicum</i>	20
3.3	Líquidos Iônicos	21
3.4	Engenharia Fermentativa	22
4	PROCEDIMENTOS METODOLÓGICOS	26
4.1	Aquisição da <i>Clostridium acetobutylicum</i>	26
4.2	Câmara de anaerobiose.....	26
4.3	Caldo nutritivo	27
4.4	Ativação e manipulação de <i>Clostridium acetobutylicum</i>	27
4.5	Substrato para fermentação	30
4.5.1	Características físico-químicas.....	31
4.5.2	Características bioquímicas	32
4.6	Encapsulação (<i>beads</i>).....	33
4.6.1	<i>Beads</i> de alginato.....	33
4.6.2	<i>Beads</i> de Líquidos Iônicos	34
4.7	Fermentação	34
4.8	Quantificação, qualificação e separação de produtos	35

4.8.1	Separação	36
4.8.2	Qualificação.....	37
4.8.3	Quantificação	37
5	RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	38
5.1	Ativação e manutenção do microrganismo	38
5.2	Características da Manipueira.....	39
5.3	Fermentação com <i>Beads</i>	39
5.4	Recuperação, qualificação e quantificação de produtos	41
5.5	Qualificação de álcoois	43
6	CONCLUSÃO	44
	REFERÊNCIAS.....	45
	ANEXO.....	50

1 INTRODUÇÃO

O panorama mundial, caracteriza-se por uma crise energética devido à escassez de combustíveis fósseis, juntamente ao seu alto potencial de poluição ambiental. O problema pode ser evidenciado devido ao fato do alto consumo destes combustíveis para satisfação das necessidades humanas, e pela demanda da indústria e agroindústria. Esse alto consumo acresce a quantidade de poluentes no meio ambiente e esgota cada vez mais as fontes de combustíveis fósseis disponíveis.

Segundo o relatório do BEN (Balanço Energético Nacional) de 2018, são utilizados na matriz energética um total de 36,4% de petróleo e seus derivados, contra 17% de biomassa e processos fermentativos. Não obstante, no ano de 2006, 81% da energia utilizada no mundo se originaram de combustíveis fósseis (carvão, petróleo e gás) afirmam Lucon e Goldenber (2009).

Em 1997, foi assinado o tratado mundial do Protocolo de Kyoto, o qual visa a substituição dos combustíveis a base de fontes não renováveis por combustíveis de fontes renováveis. O Protocolo de Kyoto direciona o mundo para a sustentabilidade, fazendo com que a indústria das matrizes energéticas tenha como alvo o desenvolvimento de tecnologia, métodos e técnicas de baixo custo, grande eficiência (alto potencial energético), que apresentem um menor passivo ambiental na produção e consumo do combustível.

Em 2015 veio à tona o Acordo de Paris, o qual previa a liberação de países mais desenvolvidos para os países menos desenvolvidos pudessem desfrutar de energias renováveis e menos poluidoras.

É axiomático a ampliação de investimentos, e pesquisas para produção de matriz energética de fontes renováveis e de baixo impacto ambiental que satisfaçam seu consumo. Existem inúmeros métodos de obtenção de combustíveis de fontes renováveis, dentre eles o mais comum são aqueles obtidos por meio de biomassa, como etanol, biogás e biodiesel. Porém, estes dependem de diversos fatores, indo desde área disponível, substrato e questões econômicas, sendo assim necessário o desenvolvimento de métodos economicamente mais simples e eficazes para produção, que possam ser aplicados em pequena escala à grandes plantas industriais.

De acordo com Zverlov et al., (2012), a conversão de açúcares em álcool por processo fermentativo é uma das técnicas biotecnológicas mais antigas utilizada pela humanidade. A produção de combustíveis a partir de consórcios microbianos é amplamente utilizada através dos processos fermentativos que estes proporcionam. Resíduos de processamento primários da indústria e agroindústria são passíveis de serem utilizados como substratos para produção de biocombustível ao invés de serem levados para tratamento com agentes químicos.

Culturas microbianas como a da *Clostridium acetobutylicum* são capazes de degradar longas cadeias carbônicas em produtos mais simples, além de produzirem um biocombustível neste processo fermentativo. Os resíduos de indústrias podem ser facilmente degradados por fermentação bacteriana conforme descreve Nielsen et al., (2009).

A via fermentativa da *Clostridium acetobutylicum* tem como produto da fermentação o ABE (acetona, butanol e etanol). Entre esses, o butanol é o biocombustível que apresenta maior destaque, por apresentar menor corrosividade, menor pressão de vapor, alto potencial energético, ser facilmente transportado através de oleodutos e uma maior semelhança com a gasolina, podendo este ser utilizado nos motores existentes, sem a necessidade de modificações. Segundo Dürre (2008), o biobutanol tem vantagens significativas em relação ao etanol, pois pode ser utilizado em sua forma pura ou em mistura com qualquer concentração.

O Brasil devido sua extensão territorial e demandas regionais possui diversas indústrias de alimentos, como os laticínios que produzem leites, queijo e manteigas e as indústrias fecularias as quais produzem farinhas. Essas indústrias geram seus produtos e em consequência os resíduos. Estes resíduos geralmente são tratados e depositados nos cursos hídricos ou destinados a um outro processo produtivo. Os resíduos produzidos são ricos em proteínas, aminoácidos e açúcares, os quais podem ser utilizados como base nutritiva para microrganismos em geral.

A utilização de resíduos industriais como substrato para os microrganismos, é de grande valia, pois os microrganismos se nutrem dos açúcares, proteínas e aminoácidos presentes nos resíduos, utilizando da fermentação para obtenção de produtos bioenergéticos, e conjuntamente como pré-tratamento dos resíduos.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Produzir acetona, butanol e etanol (ABE) utilizando manipueira como fonte nutriente no processo fermentativo da bactéria *Clostridium acetobutylicum*.

2.2 Objetivos Específicos

- Produzir biocombustível utilizando a *Clostridium acetobutylicum* como agente fermentador.
- Utilizar a manipueira proveniente das atividades de fecularias da região oeste do Paraná como substrato.
- Identificar a presença do biocombustível após o processo fermentativo.
- Separar o biocombustível produzido no processo de fermentação.

3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1 Indústria de Alimentos

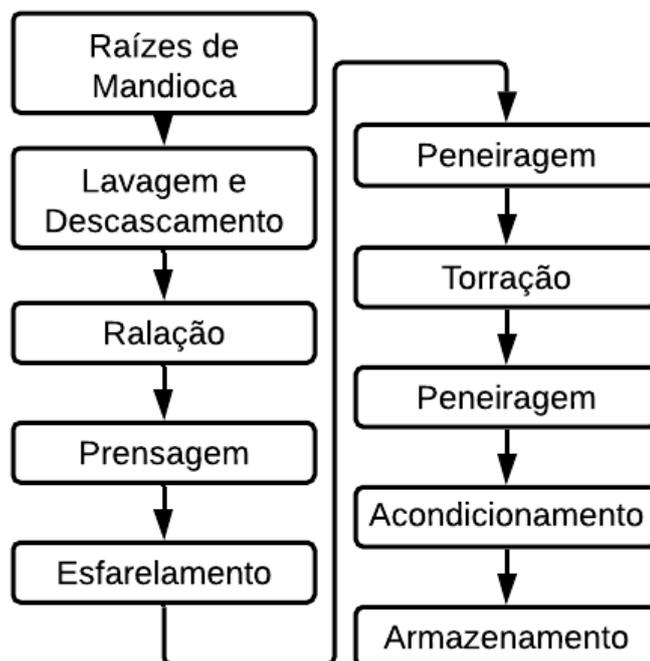
As forças globais segundo Altieri (2010) são questões de capacidade de países em desenvolvimento em se alimentarem. Dentre estes, vários tem sua economia organizada em torno do competitivo setor agrícola voltado para a exportação. No entanto, ainda segundo Altieri (2010), estes setores agrícolas trazem uma variedade de problemas de ordem econômica, ambiental e social, além dos impactos negativos a saúde pública, e à integridade do ecossistema.

A indústria de alimentos necessita de aplicação de adaptações e treinamentos para que os processos resultem em benefícios econômicos e ambientais. Recomenda-se que o setor alimentício associe o ideal de proteção ambiental à qualidade do produto, garantindo que suas atividades não prejudiquem o meio ambiente (TIMOFIECSYK e PAWLOWSKY, 2000).

A mandioca, segundo Aplevicz e Demiate (2007) é uma das mais tradicionais culturas agrícolas brasileiras, sendo cultivada em praticamente todo o território nacional. Segundo o relatório de Estudos de Mercado sobre a Mandioca (ESPM e SEBRAE, 2008) a farinha produzida pelas fecularias pode ser utilizada em diversos ramos industriais, indo desde a indústria alimentícia, indústria de papel e celulose, até as indústrias têxteis.

O Estado do Paraná, segundo a *Food and Agriculture Organization of the United Nations* (FAO, 2013) é o maior produtor da Região Sul de cultivos de mandioca, ficando atrás apenas do estado do Pará. Seu cultivo é feito em um nível tecnológico que permite a obtenção de produtividade superior à média nacional (Figura 1), assim como descrito por Wosiacki e Cereda (2002).

Figura 1 - Etapas do processo produtivo em uma fecularia



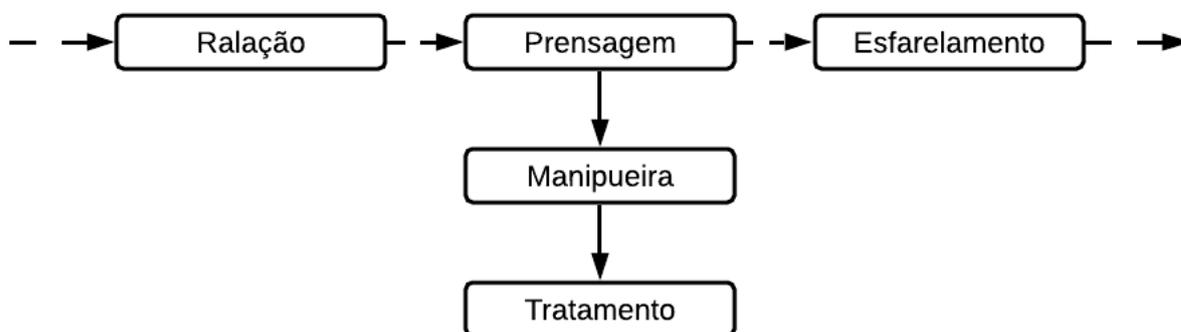
Fonte: Adaptado de Matsuura; Folegatti; Sarmiento (2003)

Segundo WOSIACKI e CEREDA (2002) a disposição do efluente industrial (manipueira) obtido no processamento da mandioca é energeticamente não esgotado e de elevada toxicidade, sendo que em águas fluviais acarreta prejuízos ambientais, diminuindo a disponibilidade aquática de oxigênio além do descarte de grande quantidade de amido (produto com alto valor agregado no processamento).

Segundo BARANA e CEREDA (2000) os moinhos de processamento de farinha de mandioca produzem resíduos sólidos e líquidos. Nos resíduos líquidos, consideram-se a água de lavagem da mandioca, a qual contém fibras e porções de compostos orgânicos e inorgânicos junto a raízes e casca, e a água de prensagem, que é aquela obtida através da compactação (prensa) da mandioca. Na prensagem é possível obter a linamarina (glicosídeo cianogênico), o qual pode ser enzimaticamente hidrolisado em cianeto, um poluente altamente tóxico.

O relatório de Estudos de Mercado sobre a Mandioca (ESPM e SEBRAE, 2008) traz ainda que a manipueira, resíduo líquido obtido no processo de prensagem (Figura 2) deve ser tratado cuidadosamente antes de seu efluente ser despejado em rios ou solos.

Figura 2 - Processo de obtenção da manipueira.



Fonte: Adaptado de MATSUURA; FOLEGATTI; SARMENTO (2003)

3.2 Indústria de biocombustíveis

A grande preocupação pela redução de poluentes e a crise energética têm estimulado o mercado mundial de biocombustíveis (RIVALDI et al., 2008). A economia global mantém-se em crescimento e a demanda por energia limpa e recursos renováveis se encontra em aumento contínuo. Existem, segundo Borges et al. (2016), programas que incentivam e aumentam a produção e tecnologia quanto as energias renováveis.

Os biocombustíveis podem se apresentar como uma solução viável para a demanda energética e economia global. Segundo nota da Embrapa (2012), ainda que, atualmente, os únicos biocombustíveis produzidos em grande escala sejam o etanol e o biodiesel, outras classes de moléculas possuem propriedades desejáveis e são passíveis de produção por via microbiana.

Louis Pasteur foi o responsável pelo primeiro relato sobre a fermentação de glicose a butanol em 1862, porem a produção de butanol a nível industrial só foi iniciada em 1912 com os estudos do Dr. Chaim Weizmann, conforme relata Bohlmann (2006).

3.2.1 Biocombustíveis no Brasil

Em 1975, foi lançado no Brasil o Programa Nacional do Álcool (Pro-álcool), com o objetivo da maior redução da dependência nacional do petróleo importado, o qual correspondia a cerca de 80% do petróleo consumido no Brasil (LEITE e CORTEZ, 2008)

Segundo Macedo e Nogueira (2010) a demanda brasileira no ano de 2002 foi de 39,2 milhões de metros cúbicos de biocombustível, destes, 76% consumidos diretamente no setor de transporte, 16% no setor agropecuário e 5% para a geração de energia elétrica isolada. A maior parte da demanda do setor de transportes (97%) ocorre diretamente no setor rodoviário.

Dentre as principais razões do interesse de produção de biocombustíveis no Brasil, trazidas por Leite e Leal (2007), estão a diminuição da dependência externa de petróleo, pela razão da segurança de suprimento ou impacto da balança comercial nacional, a minimização dos efeitos das emissões atmosféricas por veículos na poluição local, em especial em grandes centros urbanos, e o controle da concentração dos gases de efeito estufa na atmosfera.

O Brasil é líder no movimento de países a favor do uso em grande escala de biocombustíveis, sendo também o país que tem a experiência mais antiga e relevante na produção dessa matriz energética (PEZZO e AMARAL, 2007).

Segundo Kohlhepp (2010), nas últimas 3 décadas houve um crescimento acentuado na produção de biocombustíveis, a maior produção brasileira de biocombustíveis está relacionada ao álcool e ao biodiesel, sendo o primeiro produzido pelas indústrias álcool-açucareiras, e segundo por soja e mamona.

3.2.2 Produção de biocombustíveis por *Clostridium acetobutylicum*

A *Clostridium* sp. está em um dos maiores gêneros bacterianos, tendo descritas mais de 150 espécies (GOLDMAN E GREEN, 2005). Esse microrganismo possui características muito semelhantes entre os diversos indivíduos do gênero, sendo que, apesar de serem anaeróbicas, a sua tolerância em relação ao oxigênio varia, existindo espécies aero tolerantes e outras estritamente anaeróbicas assim descrito por Wiedmann e Zhang (2011).

A produção de biobutanol se dá através da fermentação de açúcares por bactérias do gênero *Clostridium*, um gênero de bactérias gram-positivas que tem por principal característica seu caráter anaeróbico (VISOLI et al., 2014).

O butanol é uma das moléculas as quais podem ser produzidas via fermentação. A *Clostridium acetobutylicum* é um dos microrganismos utilizados para a produção de diversos compostos, sendo a acetona, butanol e o etanol (ABE) os mais comuns. Lin e Blaschek (1983) classificam o butanol como um dos

biocombustíveis alternativos promissores para diminuição de impacto ambiental. Segundo Pereira e Neves (2016) ainda são necessários alguns avanços tecnológicos ligados à matéria prima, microrganismos, e biorreatores para a otimização do processo, uma vez superados estes desafios, o biobutanol será um combustível promissor para um futuro próximo.

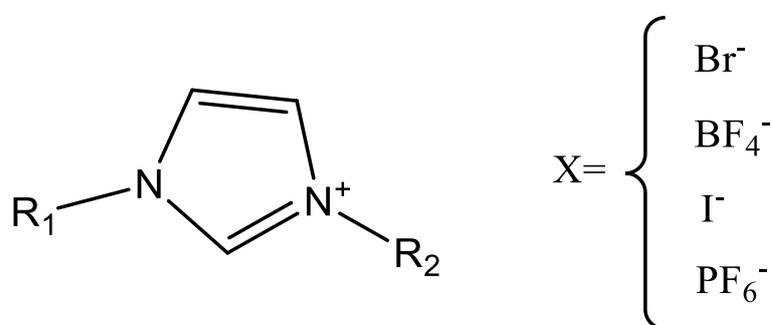
O interesse industrial e de pesquisa tem crescido com o biobutanol, com melhorias no tradicional processo de fermentação Acetona-Butanol-Etanol (ABE), no desenvolvimento de novas linhagens de bactérias para melhorar o rendimento e em técnicas de separação para isolar o solvente (NATALENSE e ZOUAIN, 2013).

O relatório de pesquisa com microrganismos do gênero *Clostridium* sp. da Embrapa (2018), indica que o n-butanol é principal componente do processo fermentativo da ABE. Entretanto, ainda segundo o relatório, o desempenho produtivo é limitado, devido a estes compostos serem tóxicos aos microrganismos nesse gênero, ou seja, são fatores que abaixam o crescimento microbiano.

3.3 Líquidos iônicos

Os líquidos iônicos, segundo Cândido (2012), diferem de líquidos moleculares, devido à sua constituição apenas de íons (Figura 3), possuindo características como estabilidade térmica, baixa inflamabilidade, boa condutividade iônica, dentre outras, os quais os tornam altamente atrativos em uma diversidade de aplicações.

Figura 3 - Exemplo de um líquido iônico a base do imidazol



Fonte: Autoria própria (2019)

Ainda segundo Cândido (2012), há uma gama de possibilidades de combinações de diferentes ânions e cátions orgânicos e inorgânicos, permitindo que as propriedades do líquido iônico sejam ajustadas dependendo da escolha dos íons.]

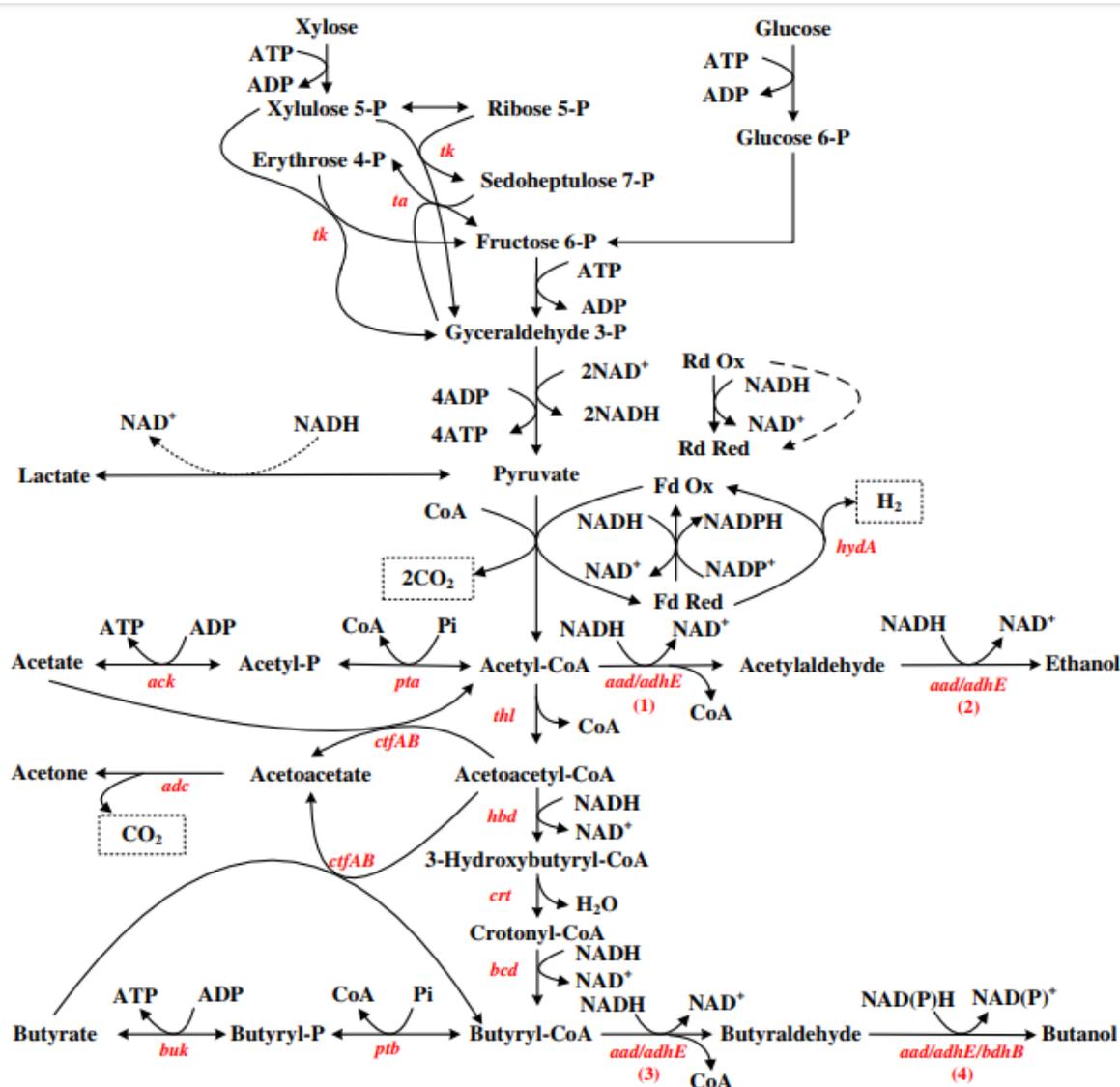
Santos et al. (2014) descreve que tem sido relatado diversos estudos envolvendo imobilização ou encapsulamento. Além dos líquidos iônicos poderem ser utilizados como base adicional para formação de cápsulas, segundo Vilas Boas (2018) podem ser recuperados e novamente purificados empregando algumas técnicas simples.

3.4 Engenharia Fermentativa

A produção de butanol é tradicionalmente realizada por vias anaeróbicas, sendo uma das fases mais importantes a de acidogênese e solvogênese. Nesta fase, segundo Liu (2019) as células crescem exponencialmente com o consumo dos açúcares, acúmulo de ácidos, produção de hidrogênio e diminuição do pH. Após esse processo, ocorre o deslocamento para a fase da solvogênese, na qual o crescimento do microrganismo se mantém em estado estacionário, e inicia-se o processo de produção de ABE sem a produção de hidrogênio. A Figura 4 representa a via metabólica da fermentação do ABE pela *Clostridium acetobutylicum*.

A *Clostridium acetobutylicum* é uma das principais bactérias produtoras de compostos de relevante interesse. Pode-se dizer que os produtos da via fermentativa podem ser classificados em três tipos, assim como descrito por Li (2019), o primeiro tipo são os solventes, acetona, butanol e etanol, o segundo tipo são os ácidos orgânicos como o acetato e o butirato, e por último os gases como CO₂ e o H₂. O primeiro tipo é o de maior interesse comercial, sendo o butanol o principal produto da via fermentativa.

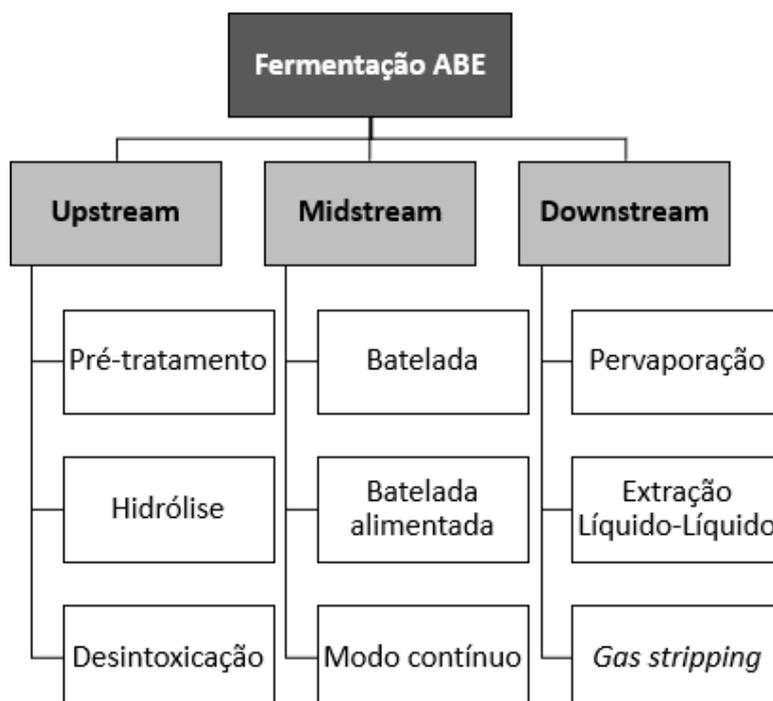
Figura 4 - Via metabólica de fermentação ABE realizada pela *Clostridium acetobutylicum*



Fonte: Zheng et al. (2014).

Todo processo deve levar em consideração a engenharia de fermentação do ABE (Figura 5), considerando as etapas de preparação, fermentação e recuperação, visando uma melhor qualidade do processo.

Figura 5 - Considerações da engenharia fermentativa ABE.

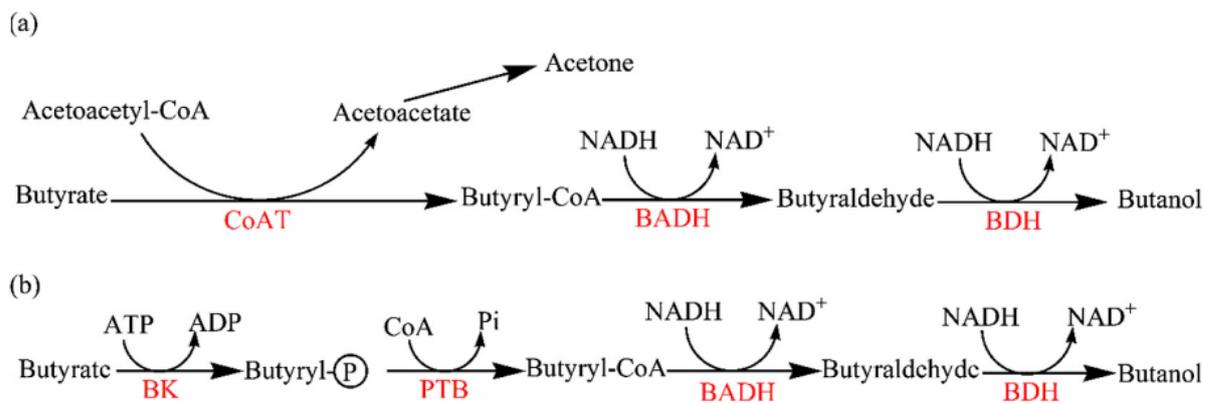


Fonte: Liu (2019).

A fermentação ABE pode ser operada com o modo batelada, batelada alimentada ou contínuo, que depende da capacidade de produção. Em geral, a fermentação em batelada ou batelada alimentada é mais adequada para a produção de butanol em pequenas escalas. Por outro lado, a fermentação contínua é uma boa seleção para a produção de butanol em larga escala como biocombustível ou produto químico a granel, devido à sua alta produtividade e menor custo de mão de obra e manutenção (XUE et al., 2013).

A engenharia fermentativa aplicada e detalhada, explana soluções para obtenção do produto desejado de forma simplificada. De acordo com Al-Shorgani et al. (2016), incrementar no substrato uma concentração de ácido butírico aumenta a produção de butanol, enquanto a concentração de acetona permanece quase constante. Ainda segundo Al-Shorgani et al. (2016), o butirato pode ser convertido em butanol através da via da CoA transferase ou através da via da butirato-quinase (Figura 6).

Figura 6 - Conversão do butirato em butanol através de dois mecanismos sugeridos: (a) via CoAT e (b) via da butirato-quinase; BADH; butilaldeo desidrogenase, BDH; butanol desidrogenase, BK; butiratoquinase, PTB; fosfotransbutirilase.



Fonte: Al-Shogani et al. (2016).

Segundo Taconi, Venkataramanan e Johnson (2009) as culturas de *Clostridium sp.* cultivadas em meios purificados são capazes de produzir uma gama de produtos durante a sua fase de fermentação. As frações de produtos são formados através do tipo de substrato.

4 PROCEDIMENTOS METODOLÓGICOS

4.1 Aquisição da *Clostridium acetobutylicum*

A cepa liofilizada de *Clostridium acetobutylicum* (Figura 7), utilizada para o desenvolvimento deste trabalho, o qual foi adquirido em 2014 através da coleção de culturas da Fundação André Tosello de Pesquisa e Tecnologia, juntamente com registros de aquisição e linhagem do microrganismo conforme consta no Anexo A.

Figura 7 - Caixa e ampola protegida com cepa de *Clostridium acetobutylicum*.



Fonte: Autoria própria (2019)

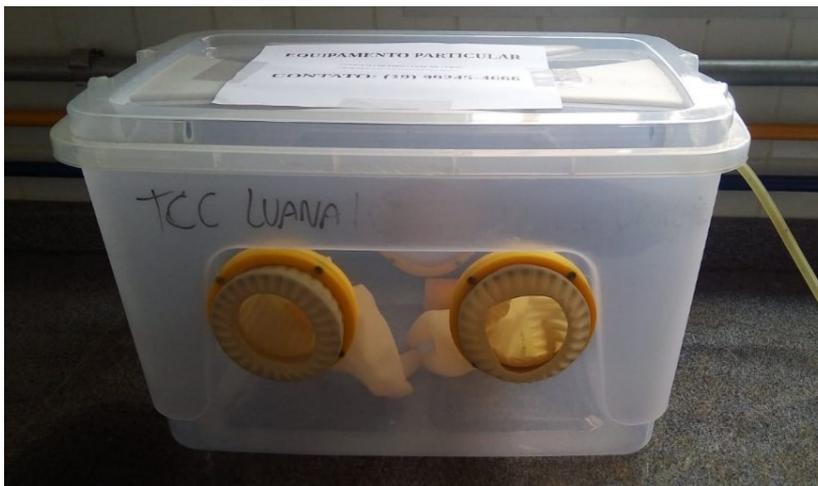
4.2 Câmara de anaerobiose

Foi construída uma câmara de anaerobiose (Figura 8), visando a obtenção de um ambiente inerte e de fácil manipulação, para evitar falência das células bacterianas. A câmara de anaerobiose foi projetada tendo em vista o custo de construção, sendo utilizado materiais de fácil aquisição e de baixo custo agregado.

O equipamento possui uma escotilha para adição e remoção de material, dois espigões (acoplagem de mangueira) para alimentação do gás inerte e purga do oxigênio, e duas escotilhas de acesso com luvas para manipulação.

O equipamento foi construído utilizando uma caixa plástica de 50 L, com material transparente para facilitar a visualização. As escotilhas de acesso de material e luvas, juntamente a tampa da caixa e os dutos de alimentação e descarga, foram vedados com silicone.

Figura 8 - Equipamento de geração de ambiente inerte.



Fonte: A autoria própria (2019)

4.3 Caldo nutritivo

Para o preparo do caldo nutritivo de ativação da *Clostridium acetobutylicum* (ATCC 824), foi utilizado o meio de cultura descrito pelo meio clostridial reforçado (RCM 2107), específico para as cepas liofilizadas da *Clostridium sp.*

Inicialmente, foi preparada uma solução de 200 mL de água deionizada (ultrapura) contendo 0,0002 mL de Resazurina. De forma separada, foram pesados em vidraria adequada 2 g de Triptose, 2 g de Extrato de Carne puro (sem conservantes), 0,6 g de Extrato de Levedura, 1 g de Dextrose, 1 g de Cloreto de Sódio, 0,2 g de Amido Solúvel, 0,1 g de L-Cisteína (acetificada) e 0,6 g de Acetato de Sódio. Estes foram então dissolvidos nos 200 mL de água deionizada na presença da Resazurina, com agitação manual para sua homogeneização.

O caldo foi fracionado em tubos de ensaio com rosca e levados para autoclavagem a 121 °C durante 15 min, e, em seguida, colocado sob resfriamento a 6°C para sua conservação.

4.4 Ativação e manipulação de *Clostridium acetobutylicum*

A ativação da cepa liofilizada da *Clostridium acetobutylicum* foi realizada em câmara de fluxo laminar, com ambiente previamente estéril com luz UV. O conteúdo da ampola (células bacterianas liofilizadas) foi introduzido em um tubo de ensaio

contendo entre 5 e 10 mL de caldo nutritivo, o qual foi imediatamente posto em uma jarra de cultivo anaeróbico vedável, com a presença de um sachê de geração de anaerobiose. A jarra foi levada a incubadora à 37°C até a ocorrência da turbidez do meio.

Para verificar a viabilidade celular (RIBEIRO, 2004) do crescimento microbiano foi utilizada a técnica de verificação de respiração por coloração através da alteração de coloração do meio pelo composto cromogênico (Rezasurina), o qual indicou o início da oxidação do meio (processos metabólicos) realizados pelo microrganismo, uma vez que não há oxigênio o único agente oxidante é a cultura obtida pela cepa de *Clostridium acetobutylicum*.

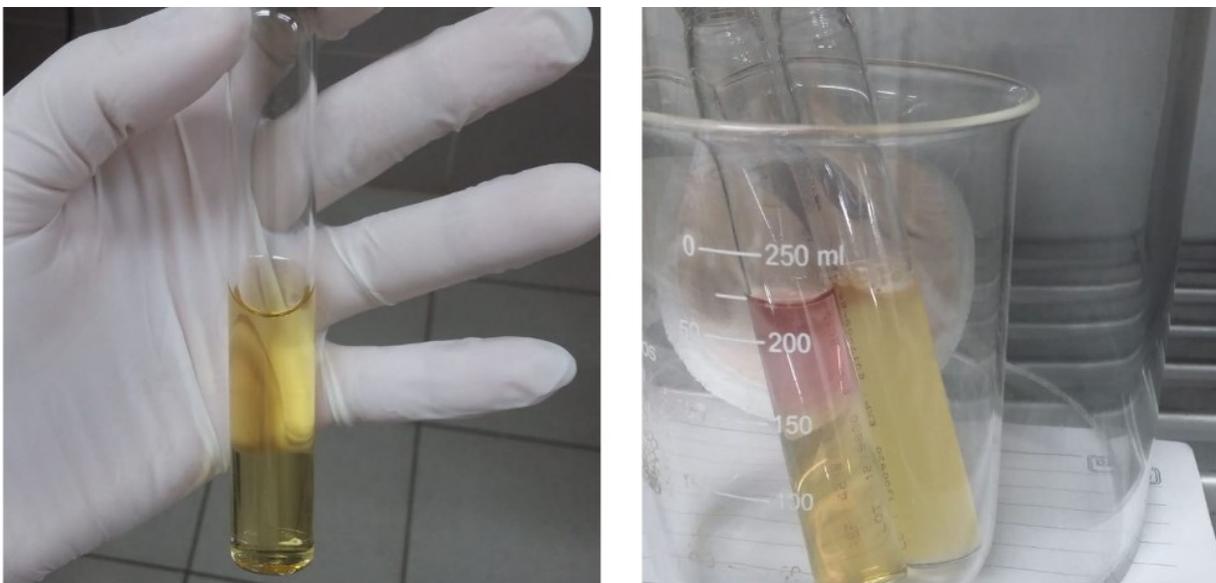
A contagem celular da cultura de *Clostridium acetobutylicum* foi realizada por metodologia de densidade óptica, no qual as amostras de caldo com microrganismo em fermentação foram recolhidos, sendo estes avaliados a cada 12 horas, os valores foram comparados com soluções de densidade celular padronizada.

Para a manutenção e estoque de células mãe da microbiota do *Clostridium acetobutylicum* foram preparados 200 mL de caldo nutritivo respeitando as proporções de reagentes descritos na RCM 2107, com exceção da adição de rezasurina. Adicionou-se no caldo 4% $m.v^{-1}$ de ágar bacteriológico, fracionando-as em tubos de ensaio com rosca e levando toda a solução para esterilização em autoclave a 121°C por 15 min.

Na câmara de anaerobiose foi inoculado o microrganismo nos tubos com meio de cultura estéril, vedando com tampa e para-filme, em seguida, os tubos foram levados a incubadora (37°C) por durante 4 dias (96 h) para início do crescimento bacteriano. Após o crescimento os tubos de ensaio foram abertos em ambiente anaeróbico para adição de Glicerol 40% (crioprotetor), vedados e levados para congelamento em câmara fria portátil com DataLogger e termostato digital. Os tubos foram levados congelados a um equipamento de liofilização. No final do processo a porção foi fracionada e guardada para futura utilização.

A Figura 9 e 10 apresentem respectivamente os tubos com os microrganismos e após o período de fermentação inicialmente proposto, já a Figura 11, representa as etapas prévias de ativação e manipulação da cepa liofilizada de *Clostridium acetobutylicum*.

Figura 9 - Tubo de ensaio vedado com microrganismo (esq.) e tubo de ensaio microrganismos na jarra de anaerobiose (dir.).



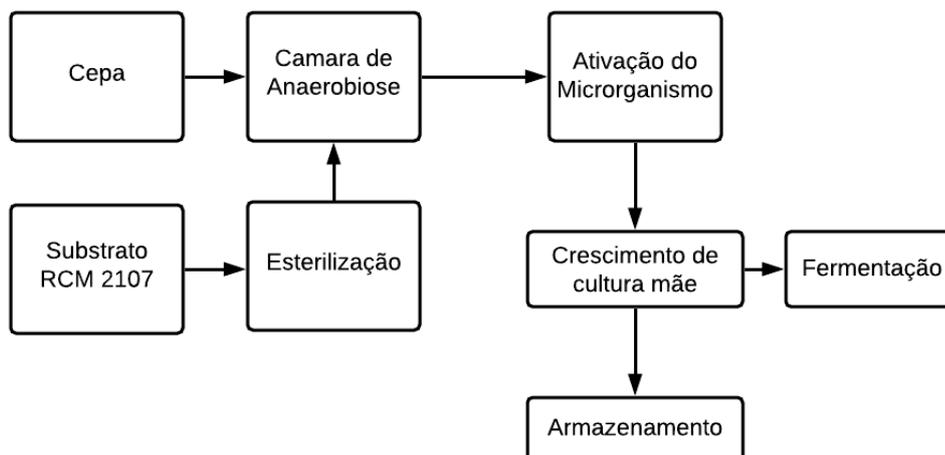
Fonte: Autoria própria (2019)

Figura 10 - Ativação do microrganismo passadas 24 horas (esq.) e passadas 72 horas (dir.).



Fonte: Autoria própria (2019)

Figura 11 - Ativação e manipulação da cepa liofilizada de *Clostridium acetobutylicum*



Fonte: Autoria própria (2019)

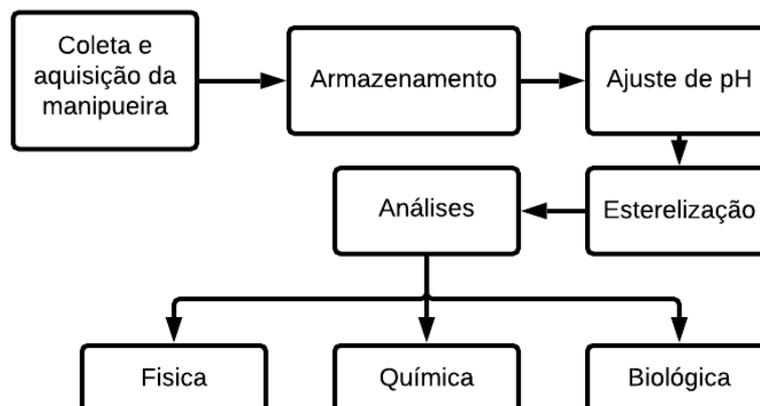
4.5 Substrato para fermentação

A manipueira foi cedida pela Fino Alimentos (Comercial Agrícola Toledo Ltda), indústria localizada no município de Toledo no oeste paranaense.

O substrato de manipueira foi obtida no processo de prensagem em prensa aberta do tipo cesta, onde é eliminado o líquido do interior do sólido, este líquido (manipueira) escorre até um tanque de descarga. A manipueira foi coletada em sua forma bruta neste tanque.

Foram coletados 10 L de manipueira líquida do tanque de descarte de efluentes do processamento de prensagem da mandioca, seguindo os procedimentos do fluxograma indicado na Figura 12.

Figura 12 - Procedimentos de coleta, aquisição e análise do substrato.



Fonte: Autoria própria (2019)

4.5.1 Características físico-químicas

Foram avaliadas as características físico-químicas da manipueira, logo após o seu recebimento para qualificação das propriedades como substrato. Foram mensurados o pH, a temperatura, a acidez, a umidade e o teor de sólidos.

4.5.1.1 Acidez

A acidez da manipueira foi determinada seguindo o procedimento da Portaria nº 76 do Ministério da Agricultura, onde foram coletados 10 mL da amostra de manipueira dispostas em um Erlenmeyer, completando até 100 mL com água destilada livre de dióxido de carbono. Foram adicionadas 3 gotas de fenolftaleína e, em seguida, titulou-se com uma solução de hidróxido de sódio 0,1 N até a alteração da coloração para rosácea. A acidez total foi avaliada através da equação da acidez total titulável (Equação 1)

$$ATT_{g/100mL} = \frac{n \cdot N \cdot Eq}{10 \cdot V} \quad (\text{Eq. 1})$$

4.5.1.2 pH e Temperatura

A avaliação de pH foi feita utilizando-se um leitor de pH, previamente calibrado com as soluções tampões 7 e 4, sequencialmente. A temperatura do resíduo foi aferida utilizando-se um termômetro de mercúrio.

4.5.1.3 Série de Sólidos

A série de sólidos totais para o material foi realizada secando uma cápsula em estufa por 110°C durante 1 h, esfriando em seguida em dessecador até esta atingir a temperatura ambiente. Foram transferidos 10 mL do material analisado para a cápsula previamente seca e com peso conhecido. A cápsula contendo o material passou por secagem em estufa a 110°C por 12 h, em seguida foi resfriada a temperatura ambiente em dessecador e seu peso foi quantificado.

A série de sólidos fixos (sedimentáveis) teve procedimento semelhante, entretanto esta necessitou de filtração do material através de um papel filtrante previamente seco e com peso conhecido.

A série de sólidos voláteis foi mensurada pela diferença dos sólidos totais e fixos, assim como descrito na metodologia da APHA (1992).

4.5.2 Características bioquímicas

Foram avaliadas as características bioquímicas da manipueira como demanda química de oxigênio (DQO), demanda bioquímica de oxigênio (DBO) bem como a quantificação de proteínas, carboidratos, aminoácidos e nitrogênios existentes no substrato.

4.5.2.1 DQO

A determinação de DQO foi feita através do método de oxidação da amostra pelo dicromato de potássio ($K_2Cr_2O_7$) com sulfato de prata como agente catalizador (Ag_2SO_4) em um digestor anaeróbico. Após a digestão, a amostra passou por titulação da solução de sulfato de ferro amoniacal ($Fe_2(SO_4)(NH_4)_2$), com o presença de indicador analítico de Ferroína, o qual determinou a quantidade de oxigênio consumida na reação.

4.5.2.2 DBO

A demanda bioquímica de oxigênio foi determinada usando o método da DBO₅, a qual verificou a quantidade de oxigênio disponível para ser utilizado na degradação da matéria orgânica por microrganismos anaeróbicos.

As amostras de análise foram diluídas em água destilada aerada previamente por 24 h juntamente com as “sementes” (microbiota proveniente de lodo ativado). A solução diluída foi armazenada em garrafas com rolha para sifonação.

Os frascos foram levados a incubação a temperatura de 20°C por durante 5 dias. Foram verificados a quantidade de oxigênio dissolvido antes e após a incubação

e calculada sua diferença. A DBO foi determinada utilizando a Equação 2 descrita abaixo.

$$DBO \left(\frac{mg}{L} O_2 \right) = (OD_{inicial} - OD_{final}) \cdot \left(\frac{V_{diluido}}{V_{amostra}} \right) \quad (\text{Eq. 2})$$

4.5.2.3 Proteínas

A quantidade de proteínas foi avaliada pelo método de Kjeldahl, utilizando o sulfato de cobre (CuSO₄) como catalizador. Nesta análise é determinada a quantidade de nitrogênio total, na qual, a amostra é digerida em H₂SO₄ (e o nitrogênio é convertido em NH₃), em seguida destilada e titulada para quantificação.

4.5.2.4 Carboidratos

Os carboidratos tiveram sua quantificação através espectrofotometria em 620 nm da reação de antrona com o material analisado assim como descrito no manual de métodos Oficiais para análise de alimentos do Ministério da Agricultura (MAPA, 2017).

4.6 Encapsulação (*beads*)

A encapsulação da *Clostridium acetobutylicum* foi realizada por dois diferentes métodos, um através da formulação dos *beads* por base de alginato e cloreto de cálcio, e outro através da utilização de alginato e líquido iônico.

4.6.1 *Beads* de alginato

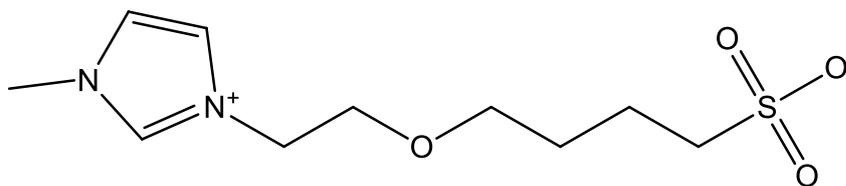
Conforme descrito por Haroldo et al., (2010), o caldo nutritivo foi preparado com adição de alginato em concentração 1,5% (*m.v*⁻¹) do caldo nutritivo, a solução preparada passou por autoclavagem e em seguida foi inserida no consórcio microbiano. Uma solução de água destilada foi preparada com adição de 15% (*m.v*⁻¹) de cloreto de cálcio homogeneizado, em seguida passou por assepsia por

autoclavagem. A solução de cloreto de cálcio passou por agitação em ambiente inerte, sendo feito o gotejamento da solução de alginato contendo os microrganismos para a formação dos *beads*.

4.6.2 *Beads* de Líquidos Iônicos

A formulação dos *beads* por líquidos iônicos foram realizadas seguindo procedimento semelhante ao de gotejamento (Rahman et al., 2013) do líquido iônico em solução imiscível. O líquido iônico feito partindo do metilimidazol e butano sulfona (Figura 13) substituiu o cloreto de cálcio em mesma proporção. A forma e tamanho dos *beads* dependem do fluxo e estrutura da gota formada, sendo neste caso o gotejamento realizado com uma seringa com agulha.

Figura 13 - Estrutura química do NOME DO LIQUIDO



4-(2-(1-methyl-1H-imidazol-3-ium-3-yl)ethoxy)butane-1-sulfonate

Fonte: Autoria própria (2019)

4.7 Fermentação

Para a fermentação anaeróbia foram utilizados frascos de 500 mL, sendo inoculado 100 mL do meio de cultura previamente autoclavado com o microrganismo e suplementado com a manipueira (substrato nutritivo) para fermentação.

Devido ao substrato da manipueira apresentar um pH muito baixo, houve a necessidade do ajuste do pH, o qual ocorreu com o ajuste inicial para $6,90 \pm 0,05$ com soluções NaOH e HCl. Os frascos contendo as amostras foram esterilizados em autoclave a 121°C e 1 atm por 15 min. As soluções de manipueira foram esterilizadas separadamente em autoclave e adicionadas após esterilização dos frascos em

autoclave. Em seguida, as amostras foram incubadas em uma BOD a 36°C, sendo o ensaio cessado no sétimo dia de incubação.

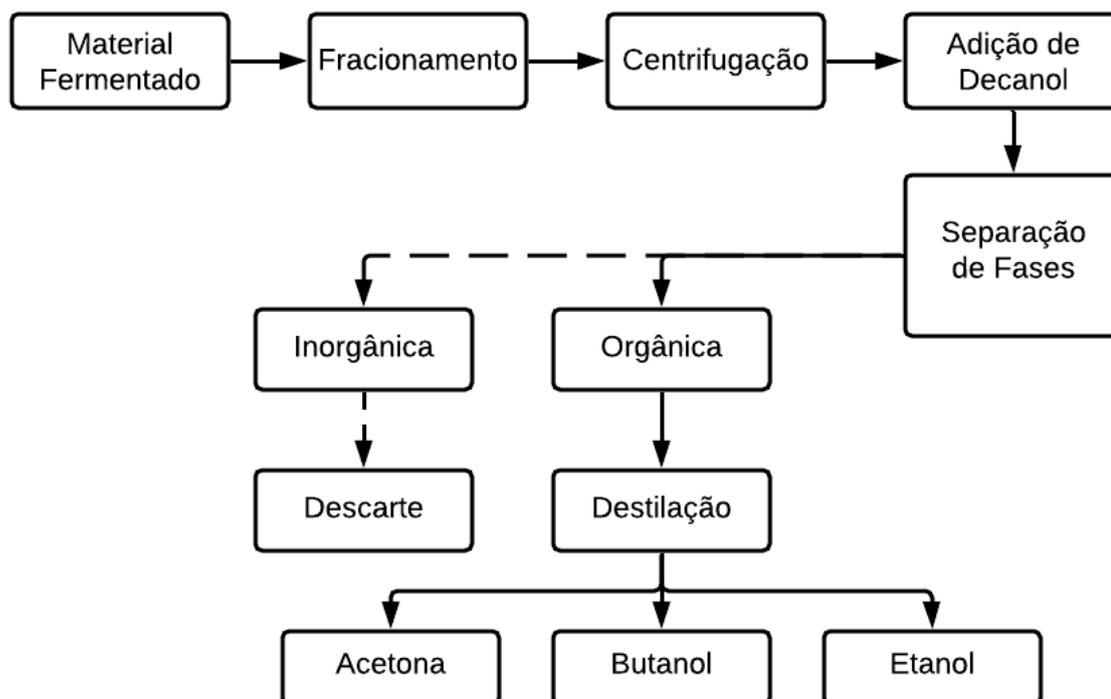
As cápsulas com microrganismos formuladas foram colocadas em frascos Schott em proporção de 10% do volume do frasco, sendo seu volume completado com o substrato de manipueira. Em seguida os frascos contendo a manipueira e os microrganismos encapsulados foram levados a uma BOD para início do processo de fermentação, permanecendo vedados por tempo suficiente para o esgotamento de nutrientes do meio.

4.8 Quantificação, qualificação e separação de produtos

Foi realizado a separação do produto desejado para em seguida realizar a qualificação e a quantificação dos produtos.

A Figura 14 indica as etapas básicas do processo de obtenção e separação do ABE do material fermentado.

Figura 14 - Etapas básicas do processo de obtenção e separação do ABE



Fonte: Autoria própria (2019)

4.8.1 Separação

O caldo fermentado foi removido dos frascos de fermentação, sendo levados a tubos cônicos tipo Falcon, os quais foram postos em centrifugação por 5 min a 5000 rpm para a separação das fases da solução. Os tubos foram então congelados para confirmação visual da presença do ABE, pela diferença dos pontos de fusão dos compostos presentes na solução.

Os tubos Falcon congelados, tiveram a porção superficial removida com auxílio de seringa com uma agulha e posterior raspagem. O conteúdo foi armazenado em um balão volumétrico devidamente vedado, e, em seguida, foi adicionado decanol (álcool de cadeia longa) na proporção de 1:3, para o auxílio na separação das fases.

A solução obtida foi homogeneizada em tubo de ensaio com auxílio de um Vórtex, durante 5 min em máxima agitação. Em seguida, a solução foi colocada em um funil (Figura 15) de separação e permaneceu em repouso durante 72 h para a realização da separação da fase orgânica da fase inorgânica.

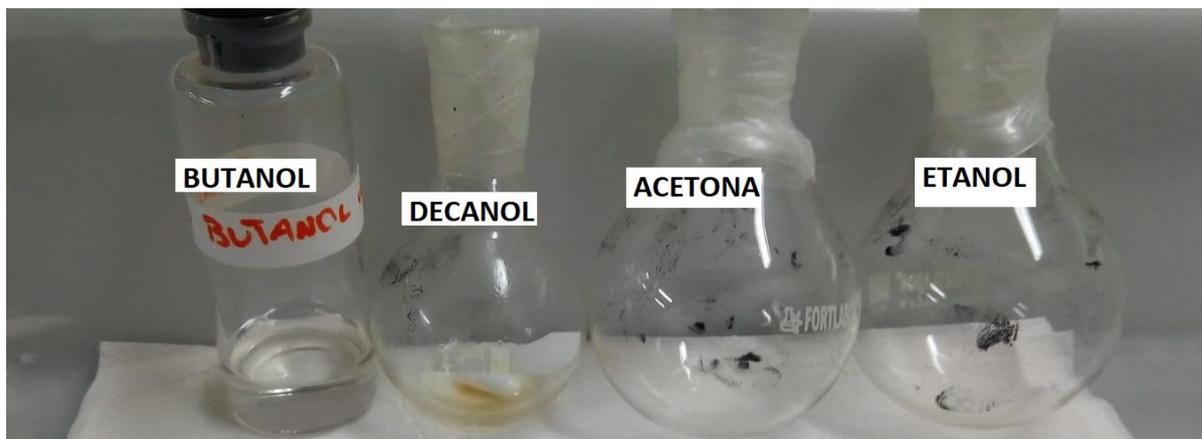
Uma coluna de destilação (Figura 15) foi montada, inserindo a fase orgânica para a destilação e obtenção do biocombustível. Foi realizada a consideração de quantidade produzida pelo volume obtido em cada balão de recuperação de destilado (Figura 16).

Figura 15 - Funil de separação (esq.) e sistema de destilação (dir.).



Fonte: A autoria própria (2019)

Figura 16 - Frasco com frações recuperadas referentes a 1 L



Fonte: Autoria própria (2019)

4.8.2 Qualificação

A confirmação de que a porção orgânica são álcoois foi realizada através do teste de Lucas, o qual verificou a diferença de reatividade por meio de reação de substituição nucleofílica.

Foram colocados 0,1 mL do álcool produzido previamente separado em um tubo de ensaio, foi adicionado 1 mL do reativo de Lucas e 1 mL de cloreto de zinco, foi aplicada agitação constante no tubo para homogeneização completa da solução.

O reativo de Lucas foi preparado misturando 136 g de cloreto de zinco anidro com 105 g de ácido clorídrico concentrado sob resfriamento.

Para o teste positivo à a formação do cloreto de alquila, o qual é observado por uma camada insolúvel ou uma emulsão, os álcoois terciários formam uma segunda camada em menos de 1 minuto, já os álcoois secundários necessitam de até 10 minutos para confirmação do teste. Os álcoois primários não são reativos, não sendo qualificados por este teste.

4.8.3 Quantificação

A quantificação foi realizada por método não analítico devido a falta de equipamento, está ocorreu pela consideração do volume após a destilação, após isso foi considerado a concentração mássica produzida.

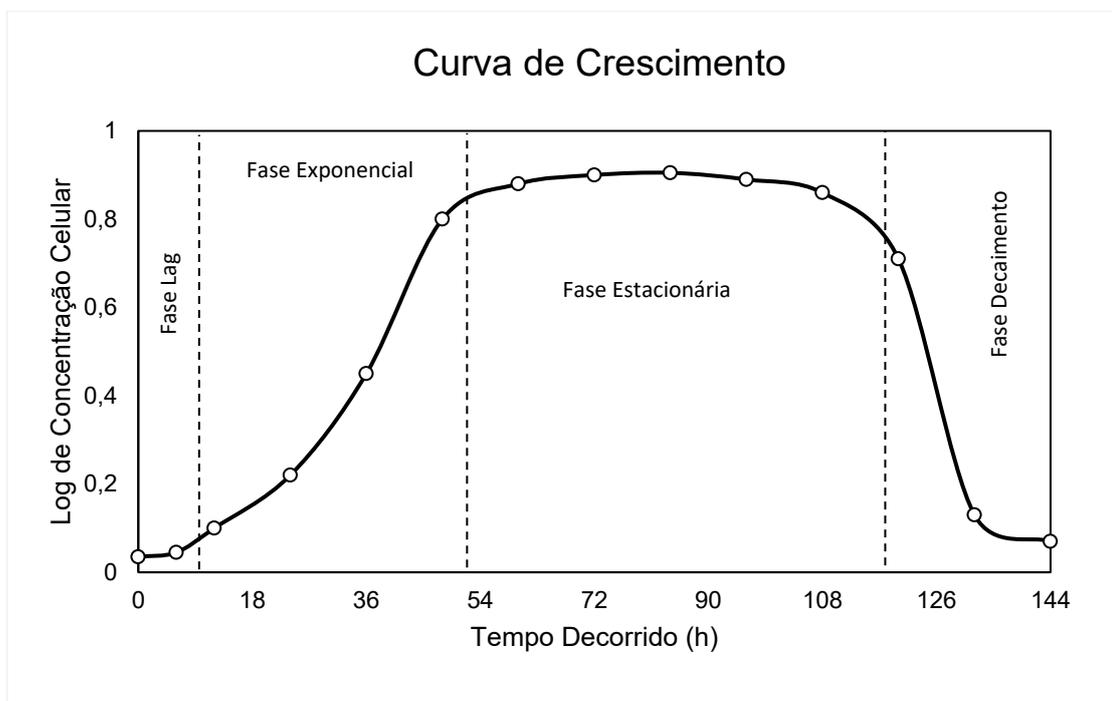
5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 Ativação e manutenção do microrganismo

Foi observada a alteração da coloração nos tubos de ativação da *Clostridium acetobutylicum* presente em ambiente sem a presença de oxigênio, essa ocorre devido a ação de oxidação promovida pelo microrganismo anaeróbico, uma vez que a oxidação química só ocorre com a presença do oxigênio. A diferença de tempo para alteração da coloração do meio deu-se pela concentração de cepa serem diferentes em cada um dos tubos, assim por essa alteração de coloração do meio foi identificado que o teste de viabilidade de atividade celular foi positivo.

As parcelas coletadas do caldo de ativação utilizados para verificação da curva de crescimento microbiana da *Clostridium acetobutylicu*, (Figura 17) indicou que foram necessárias 54 horas para atingir o ápice de crescimento do microrganismo, sendo em aproximadamente 115 horas o início da falência da *Clostridium acetobutylicum* neste caldo nutritivo.

Figura 17 - Gráfico da curva de crescimento da *Clostridium acetobutylicum*



Fonte: Autoria própria (2019)

5.2 Características da Manipueira

O resíduo da manipueira apresentou temperatura média de 22°C nas análises físico químicas, onde foi possível mensurar um pH ácido na ordem de 3,51 o qual é característico deste resíduo. O resíduo apresentou ainda uma acidez titulável de 9,3%. As demais características foram analisadas em laboratório particular, obtendo os resultados da Tabela 1.

Tabela 1 - Características físico-químicas da manipueira

Análises	Resultado	
Acidez Total	9,4	mg/L
Carboidratos (%)	12,44	mg/L
DBO ₅	114,25	mg/L
DQO	132,18	mg/L
HCN Total	54,35	mg/L
Nitrogênio Total	114	mg/100mL
pH	3,51	
Proteínas	1,17	mg/g
Sólidos Fixos	33,41	mg/L
Sólidos Totais	68,56	mg/L
Sólidos Voláteis	101,97	mg/L
Umidade	92	%

Fonte: Aatoria própria (2019)

Apesar do substrato de manipueira necessitar de correções de pH para ser utilizada como fonte nutriente do *Clostridium acetobutylicum*, autores como Duarte et al., (2011) descrevem este substrato como um ótimo nutriente, ressaltando a necessidade de dosagem e adequação da manipueira.

5.3 Fermentação com *Beads*

O microrganismo encapsulado na formulação dos *beads* de alginato e carbonato de cálcio (Figura 18), apresentou uma parede esפה e sem dissolução em

água, foi necessário o uso de uma pipeta de Pasteur de vidro devido ao composto causar o entupimento da agulha da seringa, possibilitando a utilização do material encapsulado no processo de fermentação da manipueira.

Figura 18 - *Beads* formulados dentro de frasco Schott vedado sem oxigênio.



Fonte: Autoria própria (2019)

As cápsulas de *Clostridium acetobutylicum* mergulhadas em solução com o substrato (Figura 19) apresentou turbidez no caldo no final do processo, o que indica a ocorrência de fermentação. Foi observado ainda o aparecimento de uma película na porção superficial.

A fermentação utilizando os *beads* de líquido iônico (Figura 20, ii) apresentaram um tamanho menor, o qual foi possível obter por este não entupir o orifício da agulha no gotejamento. Os tamanhos entre os *beads* são consideravelmente diferentes devido ao modo do qual foram formados (Figura 20, iii).

Figura 19 - Frasco com *beads* fermentado (esq.) e no início da fermentação (dir.).



Fonte: Autoria própria (2019)

Figura 20 – *Beads* formulados dentro de frasco Schott vedado sem oxigênio (i), *beads* líquido iônicos (ii), comparação entre os *beads* (iii)



Fonte: Autoria própria (2019)

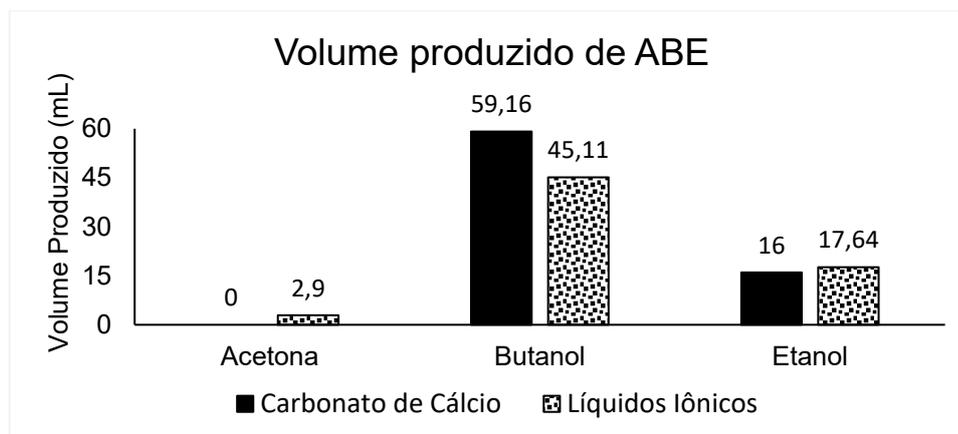
5.4 Recuperação, qualificação e quantificação de produtos

Foi observado que mesmo em um congelador a solução apresentou uma fase líquida, o qual é devido ao fato do ABE só congelar em temperaturas muito inferiores a 0°C (zero), a fase contendo a porção de ABE ficou líquida enquanto a fase contendo a porção inorgânica ficou sólida, essas propriedades possibilitaram uma maior facilidade da a remoção inicial da fase orgânica.

No sistema de destilação foi observado o gotejamento no balão de coleta nas temperaturas de 79°C e 118°C, o qual corresponde respectivamente aos pontos de ebulição do etanol e do butanol. Não foi possível observar o gotejamento em ponto de ebulição da acetona, isso pode ser devido a quantidade produzida de acetona ser ínfima.

A quantidade produzida na fermentação da manipueira utilizando os *beads* de alginato com carbonato de cálcio e os a base de líquidos iônicos mensurados (Gráfico 1) indicou uma produção de 16 mL de etanol, e 59,16 mL de butanol para os *beads* a base de carbonato de cálcio. Os *beads* a base de líquido iônico apresentou uma produção de 17,65 mL de etanol, 59,16 mL de butanol e 2,9 mL de acetona.

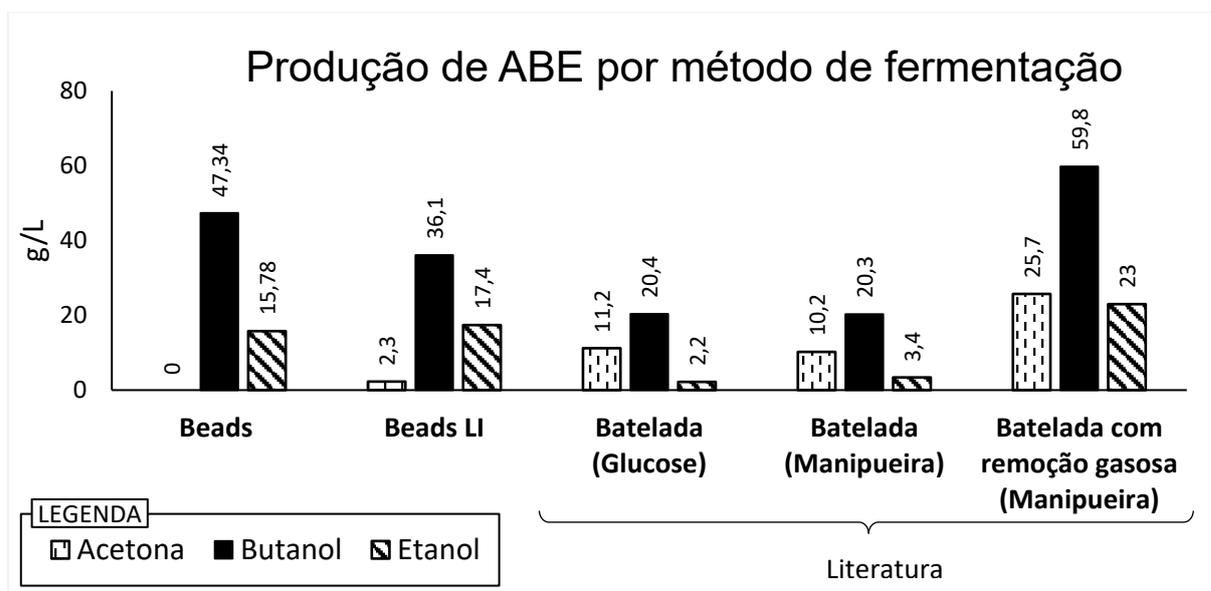
Gráfico 1 – Volume produzido ABE



Fonte: Autoria própria (2019)

Em comparação com os valores de produção encontrados na literatura descrita por Lu et.al. (2012) onde foram realizados processos de fermentação, sem o uso de *beads* para encapsular o microrganismo, observou-se que os valores de produção de butanol inferiores e valores de etanol superiores. A diferença pode ser evidenciada no Gráfico 2 com a comparação de produção pela literatura.

Gráfico 2 - Comparação de produção de ABE com a literatura



Fonte: Autoria própria (2019)

5.5 Qualificação de álcoois

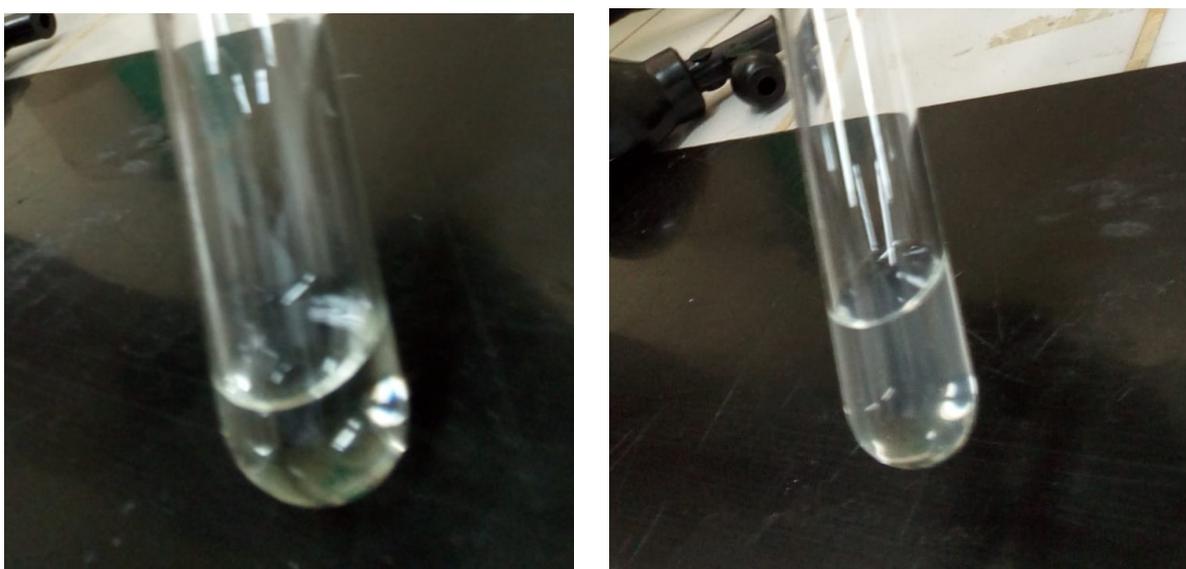
O teste visual de Lucas, o qual utiliza da reatividade dos álcoois para realizar sua classificação foi confirmado através da alteração da turbidez do meio, sendo confirmado assim que cada um dos destilados tratavam-se de um álcool (Figura 21 e Figura 22).

Figura 21 - Teste de Lucas no líquido orgânico (possível etanol) (dir.).



Fonte: Autoria própria (2019)

Figura 22 - Teste de Lucas no líquido orgânico (possível butanol) (dir.).



Fonte: Autoria própria (2019)

6 CONCLUSÃO

A produção de ABE através de método de encapsulamento do microrganismo por *beads* apresentou valores satisfatórios em relação a literatura. A menor produção de acetona e uma maior produção de etanol pode ser devido as características do substrato e ou da difusividade da parede dos *beads* cabendo assim estudos futuros para verificação do real motivo dessa alteração de característica de produção.

Ambos os métodos de encapsulamento apresentaram valores com pouca diferença de produção entre si, fica assim evidente a possibilidade de estudo posterior quanto ao custo associado no encapsulamento de ambos os métodos.

As cápsulas são passíveis de serem reutilizadas devido ao fato destas protegerem o microrganismo do contato com o oxigênio e da intolerância à presença do ABE. O uso de método de encapsulamento por *beads* evita a inoculação de microrganismos em cada novo processo de fermentação

O encapsulamento com líquidos iônicos inicialmente foi um problema, devido a estes necessitarem de uma estrutura a qual não seja facilmente dissolvida no meio e que não reaja com o ABE produzido.

Esse estudo teve caráter exploratório na produção de ABE por metodologia de encapsulamento, podendo ser tomado como base para verificação de qualidade de produção entre diversas formulações de *beads* e diversos substratos para fermentação por *Clostridium acetobutylicum*.

A falta de disponibilidade de equipamento de qualificação e quantificação final como espectrofotômetros fez com que fossem utilizadas técnicas mais robustas de qualificação e quantificação.

REFERÊNCIAS

AL-SHORGANI, K. N. et al. Enhanced butanol production by optimization of medium parameters using *Clostridium acetobutylicum* YM1. **Saudi Journal of Biological Sciences**, Selangor, v. 30, p. 1-14, Fevereiro 2016.

ALTIERI, A. Agroecologia, agricultura camponesa e soberania alimentar. **Revista NERA**, Presidente Prudente, 2010.

APHA, A. P. H. A. **Standard method for examination of water and wastewater**. Washington: [s.n.], v. 19, 1992.

APLEVICZ, K. S.; DEMIATE, I. M. Characterization of native and modified cassava starches and their use in baked products. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, Campinas, 2007.

BARANA, A. C.; CEREDA, M. P. Tratamento de águas residuais de mandioca (manipueira) utilizando um biodigestor anaeróbico de duas fases. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, Campinas, 2019.

BOHLMANN, G. M. Process economic considerations for production of ethanol from biomass feedstocks. **Industrial Biotechnology**, v. 2, n. 1, Março 2006.

BORGES, A. C. P. et al. ENERGIAS RENOVÁVEIS: UMA CONTEXTUALIZAÇÃO DA BIOMASSA COMO. **PRODEMA**, Fortaleza, v. 10, n. 2, 2016. ISSN: 1982-5528.

CÂNDIDO, L. G. **Líquidos iônicos : efeito da temperatura sobre a condutividade iônica : uma nova formulação da teoria de Arrhenius**. Universidade de Brasília. Brasília. 2012.

DÜRRE, P. Fermentative Butanol Production Bulk Chemical and Biofuel. **New York Academy of Sciences**, v. 1125, n. 1, p. 353–362, Março 2008.

DÜRRE, P. Fermentative Butanol Production: Bulk Chemical and Biofuel. **Ann N Y Acad Sci.**, New York, Março 2008.

EMBRAPA et al. Produção de n-Butanol Usando Linhagens do Gênero. **BOLETIM DE PESQUISA E DESENVOLVIMENTO**, Fortaleza, 2018.

EPE, EMPRESA DE PESQUISA ENERGÉTICA. **Balço Energético Nacional (BEN) 2016: Ano base 2017**. Empresa de Pesquisa Energética. [S.l.]. 2018.

ESPM; SEBRAE. ESTUDO DE MERCADO SOBRE A MANDIOCA (FARINHA E FÉCULA). **ESTUDOS DE MERCADO – ESPM/SEBRAE**, Brasil, 2019.

FAO. **Impacts on Natural Resources. Summary Report**. [S.l.]: [s.n.], 2013.

GOLDMANN, ; GREEN, H. **Practical Handbook of Microbiology**. 3. ed. [S.l.]: CRC Press , v. 9781466587397, 2015.

GUIMARÃES, C. E. et al. Avaliação do Desempenho Ambiental do Aproveitamento do Biogás em Fecularias de Mandioca no Estado do Paraná. **Desenvolvimento Em Questão**, 2017.

HAN, B.; GOPALAN, V.; EZEJI, T. C. Acetone production in solventogenic Clostridium species: new insights from non-enzymatic decarboxylation of acetoacetate. **Appl Microbiol Biotechnol**, Wooster, p. 565-576, Março 2011.

HARAGUCHI, F. K.; ABREU, W. C. D.; DE PAULA, H. Proteínas do soro do leite: composição, propriedades nutricionais, aplicações no esporte e benefícios para a saúde humana. **Revista de Nutrição**, Campinas, v. 19, n. 4, p. 479-488, Agosto 2006. ISSN 1415-5273.

JACOBSON, M. ; JOHNSON, E. A. Genomics of Clostridium. **Genomics of Foodborne Bacterial Pathogens**, New York, p. 95-118, Dezembro 2010. ISSN 978-1-4419-7686-4.

KOHLHEPP, G. Análise da situação da produção de etanol e biodiesel no Brasil. **Estudos Avançados**, 2010.

LEITE, R. C. D. C.; LEAL, M. R. L. V. O BIOCOMBUSTÍVEL NO BRASIL. **Novos Estudos**, 2007.

LEITE, R. C.; CORTEZ, L. A. B. O Etanol Combustível no Brasil. **Ministério das relações exteriores – MRE**, Brasília, 2007.

LI, Y. et al. Potential of acetone-butanol-ethanol (ABE) as a biofuel. **Fuel**, Hunan, v. 242, p. 673–686, 15 Abril 2019.

LIN, Y.-L.; BLASCHEK, H. P. Butanol Production by a Butanol-Tolerant Strain of *Clostridium acetobutylicum* in Extruded Corn Broth. **American Society for Microbiology**, v. 45, n. 3, p. 966-973, Março 1983.

LUCON, ; GOLDEMBERG,. Crise financeira, energia e sustentabilidade no Brasil. **Estudos Avançados**, v. 23, n. 65, Janeiro 2009.

MACEDO, I. D. C.; NOGUEIRA, L. A. H. AVALIAÇÃO DO BIODIESEL NO BRASIL. **Biocombustíveis**, Brasília, 2004.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, P. E. A. **MAPA**. Secretaria da Defesa Agropecuária. Brasília. 2017.

NATALENSE, J.; ZOUAIN, D. Technology Roadmapping for Renewable Fuels: Case of Biobutanol in Brazil. **Journal of Technology Management & Innovation**, Santiago, v. 8, n. 4, p. 143-152, 2013.

NIELSEN, D. R. et al. Engineering alternative butanol production platforms. **Metabolic Engineering**, Cambridge, v. 11, n. 5, p. 262–273, Setembro 2009.

PAULA, H. C. B. D. et al. Esferas (Beads) de Alginato como Agente Encapsulante de Óleo de Croton Zehntneri Pax et Hoffm. **Polímeros**, São Carlos, v. 20, n. 2, p. 112-120, Junho 2010.

PEZZO, C. R.; AMARAL, W. A. N. D. O papel do Brasil no estabelecimento do mercado internacional de biocombustíveis. **Revista USP**, Piracicaba, 2007.

QURESHI, N.; MADDOX, I. S. REDUCTION IN BUTANOL INHIBITION BY PERSTRATION: Utilization of Concentrated Lactose/Whey Permeate by *Clostridium acetobutylicum* to Enhance Butanol Fermentation Economics. **Food and Bioproducts Processing**, Palmerston North, v. 83, p. 43-52, Março 2005.

RAMOS, T. J. D. S. **Líquidos iônicos carboxilatos: síntese, caracterização e sinergismo com íons lantanídeos**. Universidade Federal de Pernambuco. [S.l.]. 2018.

RATHORE, S.; HENG, P. W. S.; CHAN,. Microencapsulation of Clostridium acetobutylicum ATCC 824 spores in gellan gum microspheres for the production of biobutanol. **Journal of Microencapsulation**, Singapore, p. 1-10, Março 2015. ISSN 0265-2048.

RIBEIRO, M. O.; AL., E. Avaliação de testes rápidos em microplacas usando indicadores de viabilidade celular para determinação da susceptibilidade de cepas de Mycobacterium tuberculosis à isoniazida e rifampicina. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 30, 2004.

RIVALDI, J. D. et al. Glicerol de biodiesel - Estratégias biotecnológicas para o aproveitamento do glicerol gerado da produção de biodiesel. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, Brasília, v. 37, n. 44, 2008. ISSN 1414-6347.

SANTOS, M. R. O.; AL., E. Remoção de compostos fenólicos utilizando sílica modificada com líquido iônico bis (trifluorometilsulfonil) imida de 1-propil-3-metilimidazólio ([MIM][NTf₂-]) como adsorvente. **Semana de Pesquisa da Universidade Tiradentes-SEMPESq**, n. 16, 2014.

TACONI, K. A.; VENKATARAMANAN, K. P.; JOHNSON, D. T. Growth and Solvent Production by Clostridium pasteurianum ATCCVR 6013TM Utilizing Biodiesel-Derived Crude Glycerol as the Sole Carbon Source. **Environmental Progress & Sustainable Energy**, Huntsville, v. 28, n. 1, p. 100-110, Março 2009.

TIMOFIECKSKY, F. D. R.; PAWLOWSKY, U. MINIMIZAÇÃO DE RESÍDUOS NA INDÚSTRIA DE ALIMENTOS: REVISÃO. **CEPPA**, Curitiba, 2000.

VISOLI, L. J. et al. **AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO BIOTECNOLÓGICA DE BUTANOL A PARTIR DE SORGO SACARÍNEO**. Cobeq Congresso Brasileiro de Engenharia Química. Florianópolis: [s.n.]. 2014.

WIEDMANN, M.; ZHANG, W. **Genomics of Foodborne Bacterial Pathogens**. 1. ed. [S.I.]: Springer, 2011. ISBN 144197685X.

WOSIACKI, G.; CEREDA, M. P. VALUATION OF CASSAVA PROCESSING RESIDUES THEPRODUCTION OF TRICHOSPORON SP BIOMASS. **Exact and Soil Sciences, Agrarian S. and Engineering**, Ponta Grossa, 2002.

XUE, C. et al. Prospective and development of butanol as an advanced biofuel. **Biotechnology Advances**, Dalian, v. 31, n. 8, p. 1575-1584, Dezembro 2013.

XUE, C. et al. Recent advances and state-of-the-art strategies in strain and process. **Biotechnology Advances**, Dalian, v. 35, n. 2, p. 310–322, Março 2017.

ZHENG, et al. Recent advances to improve fermentative butanol production: Genetic. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, Fukuoka, v. 20, p. 1-9, Maio 2014.

ZVERLOV, V. V. et al. Bacterial acetone and butanol production by industrial fermentation in the Soviet Union: use of hydrolyzed agricultural waste for biorefinery. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 71, n. 5, p. 587–597, Agosto 2006. ISSN 1432-0614.

ZVERLOV, V. V. et al. Microbial producers of butanol. **Applied Biochemistry and Microbiology**, v. 48, n. 7, p. 625-638, 2012.

ANEXO



Coleção de Culturas Tropical
www.cct.org.br

Fundação André Tosello
www.fat.org.br
 R. Latino Coelho, 1301 Pq. Taquaral
 CEP 13087-010 Campinas SP
 Fone/Fax: (19) 3242-7022
 Fax: (19) 3242-7827
 CNPJ 46.126.322/0001-82

CERTIFICADO – 2º Via

A Coleção de Culturas Tropical – CCT certifica, para os devidos fins, que o microrganismo abaixo é uma linhagem referência ATCC (*American Type Culture Collection*, Manassas, VA – USA), conforme consta nos dados relativos ao seu histórico registrados no Catálogo de Linhagens da CCT, 1996 (<http://fat.org.br/catalogo-de-culturas-online>).

CCT	Microrganismo	Referência	NB *	Lote
0485	<i>Clostridium acetobutylicum</i>	ATCC 824	2	44.06

* NB – Nível de Biossegurança exigido para manipulação da linhagem.
 Ref. Catálogo de Linhagens, Coleção de Culturas Tropical – CCT, Fundação Tropical de Pesquisas e Tecnologia André Tosello, 1ª. Ed., 1996.

Microrganismo de 1ª passagem

Referência CCT: OS 140474 (2º via do documento)

Todas as linhagens do acervo passam por testes de rotina de controle de qualidade.

O prazo de validade das linhagens reativadas (em seu *slant* original) é de um mês, a partir da data de incubação (presente na etiqueta), desde que estocado sob refrigeração (02 a 10°C) e utilizados os métodos técnicos específicos para sua manipulação.

O prazo de validade de linhagens liofilizadas é indeterminado, desde que a ampola seja armazenada sob refrigeração (02 a 10°C) e livre de injúrias (sem rompimento do vidro).

Observações: Caso haja ocorrência de defeito comprovado, a CCT se compromete a substituir linhagens reativadas no prazo de até 30 dias, e linhagens liofilizadas no período de até 90 dias, a partir da data de entrega do material.

Maria Josiane Conti
 Coleção de Culturas – CCT/FAT
 E-mail: cct@fat.org.br; josi@fat.org.br

Campinas, 08 de maio de 2019.

Este documento se refere apenas aos itens aqui descritos, e só deve ser reproduzido na íntegra e com a aprovação escrita da CCT – FAT.

A Coleção de Culturas Tropical – CCT é registrada no WFCC (*World Federation for Culture Collections*) sob n° 885 (http://www.wfcc.info/collections/ctv_id/885).



Coleção de Culturas Tropical
www.cct.org.br

Fundação André Tosello
www.fat.org.br
 R. Latino Coelho, 1301 Pq. Taquaral
 CEP 13087-010 Campinas SP
 Fone/Fax: (19) 3242-7022
 Fax: (19) 3242-7827
 CNPJ 46.126.322/0001-82

**CARTA DE ENVIO
 LINHAGENS LIOFILIZADAS**

AC-REL-F-002 / 00
 Revisão: Inicial
 Emissão: 02/07/2014

Campinas, 01/12/2014

Tania Maria Cassol

Professora

Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR

Campus Francisco Beltrão

Linha Santa Barbara s/n°. Caixa Postal 135

Francisco Beltrão – PR

85801-970

E-mail: tcassol@utfpr.edu.br

Ref: Distr_IP – OS 140474

Prezada Sra,

Estamos enviando uma ampola com linhagem liofilizada de cada um dos microrganismos abaixo:

CCT	Microrganismo	Referência	Lote	NB *	Meio	T (°C)
0485	<i>Clostridium acetobutylicum</i>	ATCC 824	44.06	2	RCM	37

* NB = Nível de Biossegurança exigido para manipulação da linhagem

Em anexo seguem a metodologia de abertura das ampolas e reativação das linhagens, bem como a formulação dos seus respectivos meios de crescimento/manutenção, temperaturas de incubação e as informações disponíveis em nosso banco de dados.

O valor desta remessa é de R\$ 370,00 (trezentos e setenta reais). Nota Fiscal de Serviços e boleto bancário, emitidos pelo setor de contabilidade da FAT, seguem junto ao material.

Agradecemos a solicitação de nossos serviços e colocamo-nos à disposição para maiores informações.

Atenciosamente,

Josiane Conti

Coleção de Culturas – CCT/FAT

E-mail: josi@fat.org.br