UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO

ESCOLA DE QUÍMICA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PROCESSOS QUÍMICOS E BIOQUÍMICOS

ROBERTA DOS REIS RIBEIRO

PRODUÇÃO DE ETANOL DE SEGUNDA GERAÇÃO A PARTIR DE GÁS DE SÍNTESE POR ROTA BIOTECNOLÓGICA

RIO DE JANEIRO
2017

ROBERTA DOS REIS RIBEIRO

PRODUÇÃO DE ETANOL DE SEGUNDA GERAÇÃO A PARTIR DE GÁS DE SÍNTESE POR ROTA BIOTECNOLÓGICA

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos, Escola de Química, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor em Ciências (*DSc.*).

Orientadores: Priscilla Filomena Fonseca Amaral
Tatiana Felix Ferreira

Rio de Janeiro
2017

FICHA CATALOGRÁFICA

CIP - Catalogação na Publicação

RR5409 p

Reis Ribeiro, Roberta
PRODUÇÃO DE ETANOL DE SEGUNDA GERAÇÃO A PARTIR DE GÁS DE SÍNTESE POR ROTA BIOTECNOLÓGICA / Roberta Reis Ribeiro. -- Rio de Janeiro, 2017.
156 f.

Orientadora: Priscilla Filomena Fonseca Amaral.
Coorientadora: Tatiana Felix Ferreira.
Tese (doutorado) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Escola de Química, Programa de Pós Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos, 2017.

1. acetogênica. 2. Clostridium. 3. Gás de síntese. 4. Substrato gasoso. 5. etanol. I. Filomena Fonseca Amaral, Priscilla , orient. II. Felix Ferreira, Tatiana , coorient. III. Título.

Elaborado pelo Sistema de Geração Automática da UFRJ com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

PRODUÇÃO DE ETANOL DE SEGUNDA GERAÇÃO A PARTIR DE GÁS DE SÍNTESE POR ROTA BIOTECNOLÓGICA

Roberta dos Reis Ribeiro

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos da Escola de Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro como parte dos requisitos necessários para obtenção do grau de Doutor em Ciências (*DSc.*).

Aprovada por

_____
Profa. Priscilla Filomena Fonseca Amaral.,*D.Sc*. EQ-UFRJ (Orientadora)

_____
Profa. Tatiana Felix Ferreira, *DSc*. EQ-UFRJ (Orientadora)

_____
Profa. Andréa Medeiros Salgado, *DSc*. EQ-UFRJ

_____
Prof. Elcio Ribeiro Borges, *DSc*. EQ-UFRJ

_____
Profa. Verônica Ferreira Melo, *DSc*. IFRJ

_____
Profa. Alane Beatriz Vermelho, *DSc*. EQ-UFRJ

_____
Profa. Gizele Cardoso Fontes, *DSc*. UERJ

Rio de Janeiro, R.J. - Brasil

2017

“Que nada nos limite, que nada nos defina, que nada nos sujeite. Que a liberdade seja nossa própria substânca, já que viver é ser livre”.

Simone de Beauvoir

AGRADECIMENTOS

Prezado leitor....sim, leitor...porque nessas páginas trago também uma grande historia...

Nessa historia, não poderia deixar de agradecer primeiramente a Deus, obrigada senhor pelo dom da vida, pelas pessoas queridas que deixaram cada uma um pouco de si e também por minha família, mais uma vez obrigada senhor por sua generosidade comigo.

Agradeço também as minhas orientadoras, as professoras Priscilla e Tatiana, por confiarem em meu trabalho, por apostarem em mim, pelo apoio sempre presente, por me orientarem no real sentido da palavra e por me oferecerem um desafio o qual aprendi muito, sobre a vida e também sobre a forma como encarar tudo o que viria pela frente nesse trabalho....as mestras com carinho e admiração dedico esse trabalho.

Agradeço aos professores do DEB da Escola de Química da UFRJ por me receberem de braços abertos e por terem me dado a oportunidade de aprender com vocês.

As minhas queridas alunas: Anna, Debora, Mariana, Nathalia, Alanna, Fabiana e a Luana minhas grandes parceiras, obrigada queridas sem cada uma de vocês não teria chegado a etapa final, afinal não existe exercito de uma pessoa só.

Em especial, agradeço a minha mãe, minha parceira, que me acolheu como sempre com todo o amor e paciência que eu precisava nesse fim de etapa...obrigada mãe por tudo! Te amo demais...Aos meus irmãos Bruna e Fagner que estão sempre na torcida, também amo vocês. Ao meu saudoso pai Luiz que me ensinou que o conhecimento é a única coisa que não podem roubar de você e assim aprender o valor da educação e das oportunidades. A minha saudosa avó Ninfa, que tenho certeza que sua estrela zela por mim aonde quer que ela esteja.

Não poderia deixar de agradecer a maravilhosa família da Tia Ermelinda, que me recebeu com tanto amor e de coração aberto, que Deus permita que existam mais pessoas como vocês, obrigada Amanda, Suzana, Tio Luiz e a toda a sua família maravilhosa que me adotou, sem a ajuda de vocês não teria chegado a esse ponto, minha eterna gratidão a vocês.

Dizem que os amigos são anjos de uma asa só, que somente voam abraçados...então não poderia deixar de agradecer aos amigos que sempre foram presentes na minha vida...

A minha querida amiga Priscilla, por todo carinho que me dedicou esses anos todos, por ter me proporcionado momentos que eu nem sonhava que existiam...obrigada por me apresentar um novo mundo e perceber que poderia fazer parte dele e também pelo melhor presente que você já me deu...meu amado afilhado, você é muito especial na minha vida.

A querida amiga Tatiana, por sua paciência com minhas dificuldades, por me apresentar a cerveja, a comida japonesa, a vontade de praticar esportes, pelas risadas e a tudo que você me fez crescer nesses anos de convivência, também pela agradável convivência com sua família sempre atenciosa e querida comigo, você é importante na minha vida.

A minha amiga Tamires, pela companhia no laboratório nas noites desertas do Fundão e principalmente pela companhia na reta final desse trabalho, obrigada por estar comigo nesse momento e por me fazer companhia nos dias mais difíceis e nas noites mais escuras...Obrigada por tudo amiga.

Ao querido Elcio, que teve tanta disponibilidade para me estender a mão na minha primeira experiência de docência, por suas palavras de incentivo, apoio, companhia, por tantas risadas nas aulas experimentais nas quartas a noite na EQ...enfim, por sempre estar me incentivando...obrigada destino por ter me apresentado esse maravilhoso amigo.

As minhas queridas amigas que a UFRJ uniu e que sempre estiveram disponíveis e me apoiando, Milena, Claudia, Juliana, Renata, Fernanda e Priscila...começamos uma historia em 2001 que graças a vocês foi mais alegre e mais leve, sem vocês a faculdade não seria a mesma...da EQ para a vida.

Obrigada Kelly, Pedro, Raisa, Thiana e Ana por seu carinho, apoio, amizade e torcida... é muito importante pra mim a presença de vocês na minha vida mesmo que estejamos distantes. A Dra. Fátima pelo fundamental apoio, acertivas palavras e direcionamento no final dessa importante etapa.

Agradeço aos meus amigos de laboratório que tornaram os momentos de trabalho mais interessantes e alegres, aos colegas do BIOSE(Prof. Maria Alice, Etel, Roseli, Ariane, Vanessa, Felipe, Larissa,....), não poderia deixar de agradecer a boa vontade da minha amiga Fernanda, pela disponibilidade em analisar os meus últimos experimentos em janeiro, ao Cae pela paciência nas eternas tentativas de utilizar o CGMS e em especial aos amigos do Laboratório 123 (Luana, Deja, Jully, Jonas, Ully, Joana, Aline, Fabiane, Carol's e a Nanci) que sempre foram boa companhia nos *happy hour* e também nas longas horas de experimento. Meu agradecimento a Dani do LADEBIO por sua boa vontade e disponibilidade e ao professor Nei por apoiar esse projeto.

Enfim Deus mestre de todas as coisas, obrigada por tudo e que esse trabalho traga uma luz aos próximos que virão depois de mim.

Por fim prezado leitor, quando chegar a sua vez, você perceberá que a luta será intensa, que você ficara confuso e as vezes até chateado...mas não se abata diante das dificuldades que sabemos que virão...TUDO VAI DAR CERTO NO FINAL...se não deu é porque não chegamos ao final ainda...boa leitura.

RESUMO

RIBEIRO, Roberta dos Reis. PRODUÇÃO DE ETANOL DE SEGUNDA GERAÇÃO A PARTIR DE GÁS DE SÍNTESE POR ROTA BIOTECNOLÓGICA. Rio de janeiro, 2017. Tese (Doutorado em Ciências). Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro.

Devido aos efeitos nocivos ao meio ambiente relacionados à utilização de combustíveis fósseis, o cenário mundial mostra que vem ocorrendo uma busca por fontes de energias renováveis, como o etanol. Contudo,no Brasil a produção desse combustível ainda não é suficiente para suprir a sua demanda. Nesse contexto, rotas alternativas para produção de etanol têm sido estudadas, dentre elas destaca-se a fermentação de gás de síntese por bactérias acetogênicas. O presente trabalho visou a biossíntese de etanol a partir de gás de síntese utilizando três diferentes espécies de bactérias acetogênicas: *Clostridium ljungdahlii, Clostridium carboxidivorans e Clostridium ragsdalei.* Após a ativação das três cepas adquiridas, experimentos preliminares foram realizados com *Clostridium carboxidivorans* e os resultados mostraram que o meio ATCC 2713 apresentou os maiores valores de produtividade de etanol utilizando gás de síntese ou nitrogênio em frascos de soro (7,0 mg/L.h) ou em frasco SCHOTT (9,0 mg/L.h). Portanto, esse meio foi escolhido para os experimentos seguintes. Avaliou-se o efeito do aumento da turbulência do sistema, comparando-se cultivos de *Clostridium ljungdahlii, Clostridium carboxidivorans e Clostridium ragsdalei* com meio ATCC 2713 e gás de síntese, com frascos de soro posicionados na vertical e na horizontal. Observou-se uma melhora significativa na transferência de massa do sistema com os frascos na posição horizontal, visto que ocorreu expressivaprodução de células de *C. carboxidivorans (*1,245 g.p.s cél./L), resultando em uma maior concentração em comparação com a estratégia anterior com frascos incubados na vertical (0,337 g.p.s cél./L). A nova estratégia também favoreceu a produção de etanol obtendo-se 19,0 mg/L.h de produtividade para este solvente. Visando, mais uma vez, o aumento da transferência de massa, foi testada a adição de 20% (v/v) de perfluorodecalina (PFC) no meio de cultivo. A presença de PFC elevou a produção de etanol, mostrando o efeito positivo da transferência de CO ao meio líquido, mas não teve efeito significativo na produtividade. Em seguida, avaliou-se o impacto do pH inicial no bioprocesso em questão e verificou-se que o pH 7,0 foi a melhor condição para produção de etanol (9,0 mg/L.h de produtividade).Outra

estratégia testada com o intuito de favorecer o aumento da biomassa e também o aumento da produção de etanol foi a batelada alimentada com adição de meio ATCC 2713 concentrado a cada 3 horas. Essa estratégia foi eficaz com relação ao aumento da concentração celular (1,93 g p.s. cél/L) e aumentou a produção de etanol em setevezes. Com o objetivo de minimizar o meio de cultivo para a fermentação de gás de sínteseavaliou-se o meio contendo apenas triptona e glicose e foi detectada a formação de 1,2 g/L de etanol. Além disso, foi testada a substituição da fonte de nitrogênio (triptona) por milhocina e apesar de ter ocorridoprodução de 0,188 g/L de etanol e produtividade de 2,4 mg/L.h, esses valores foram inferiores ao estudo realizado com triptona. Foi, então, realizada uma sequência de três planejamentos experimentais para minimização do meio. O delineamento *Plackett-Burman* e odelineamento fatorial fracionado (2^{4-1}) mostraram que peptona, triptona e L-arginina apresentam efeito significativo na produção de etanol. O delineamento de composto central rotacional (DCCR), entretanto, não foi conclusivo devido à produção concomitante de ácido lático, que prejudicou a formação de etanol. Ensaios em biorreator também foram realizados para avaliar a influência do tipo de peptona no cultivo de *C. carboxidivorans* e observou-se a produção de etanol somente em meio de cultivo com peptona bacteriológica, que foi escolhida para os experimentos seguintes. As três espécies de *Clostridium* apresentaram produção de etanol em biorreator, entretanto a maior produtividade de etanol, ocorreu nos ensaios com *Clostridium carboxidivorans* a 200 rpm e 37°C (70.0 mg/L.h). O aumento da agitação do sistema, de 200 a 400 rpm, não favoreceu o crescimento celular nem a produtividade em etanol.

Palavras-chave: Gás de síntese, fermentação, bactérias acetogênicas e etanol.

ABSTRACT

RIBEIRO, Roberta dos Reis. SECOND GENERATION ETHANOL PRODUCTION FROM SYNGAS BY BIOTECHNOLOGICAL ROUTE.Rio de janeiro, 2017. Thesis (Doctor of Science, D. Sc.). Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro.

Due to harmful environmental effects related to fossil fuels use, the world has been investing in renewable energy sources, such as ethanol. However, the production of this fuel is not enough to supply its demand in Brazil. In this context, alternative routes for ethanol production have been studied, as syngas fermentation by acetogenic bacteria. The present work aimed the ethanol biosynthesis from syngas using three different species of acetogenic bacteria: *Clostridium ljungdahlii*, *Clostridium carboxidivorans* and *Clostridium ragsdalei*. After the three strains activation, preliminary experiments were performed with *Clostridium carboxidivorans* and the results showed that the ATCC 2713 medium presented the highest values of ethanol productivity using syngas or nitrogen in serum bottles (7.0 mg /L.h) or in a SCHOTT bottles (9.0 mg /L.h). Therefore, this medium was chosen for next experiments. The effect of increased turbulence was evaluated by comparing cultures of *Clostridium ljungdahlii*, *Clostridium carboxidivorans* and *Clostridium ragsdalei*inATCC 2713 medium containingsyngas, with serum bottles positioned vertically or horizontally. There was a significant improvement in system mass transfer with flasks in horizontal position, since there was an increase production of *C. carboxidivorans* cells (1,245 g d.w cells/L), much higher in comparison withthe previous strategy with bottles incubated vertically (0.337 g d.w cells/L). The new strategy also promotethe increase of ethanol productivity (19.0 mg/L.h). The addition of 20% (v / v) perfluorodecalin (PFC) in the culture medium was performed in order to increase mass transfer. The PFC presence in culture medium increased ethanol production, showing itspositive effect on CO transfer between gas and liquid phases, but it did not have a significant effect on productivity. The initial bioprocess pH was then evaluated and pH 7.0 was the best condition for ethanol production (9.0 mg/L.h of productivity). Another strategy tested to increase biomass and also ethanol production was the fedbatch condition with addition of ATCC 2713 concentrated medium every 3 hours. This strategy was effective in increasing cell concentration (1.93 g d.w. cells/L) and ethanol production (seven times higher). The medium containing tryptone and glucosewas evaluated in order to

minimize culture medium for syngas fermentation and 1.2 g/L ethanol was detected. In addition, the replacementof nitrogen source (tryptone) bycorn steep licor was tested and although there was a production of 0.188 g/L ethanol and a productivity of 2.4 mg/L.h, these values were lower than the others obtained with tryptone. A sequence of three experimental designs for minimizing the medium was alsoperformed. The Plackett-Burman design and fractional factorial design (2^{4-1}) showed that peptone, tryptone and L-arginine have a significant effect on ethanol production. However, the central rotational composite design was not conclusive due to lactic acid concomitant production, which impaired the ethanol formation. Bioreactor assays were also performed to evaluate the influence of different peptones on *C. carboxidivorans* culture and ethanol production was only observed in culture medium with bacteriological peptone, which was chosen for next experiments. The three *Clostridium* species were able to produceethanol in bioreactor, however, the highest ethanol productivity occurred for *Clostridium carboxidivorans* culture at 200 rpm and 37 °C (70.0 mg/L.h). Increasing the stirring of the system, from 200 to 400 rpm, cell growth andethanol productivity were not improved.

Keywords:Syngas, fermentation, acetogenic bacteria and ethanol.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Matriz Energética Brasileira no ano de 1970. 31
Figura 2. Matriz Energética Brasileira no ano de 1980. 32
Figura 3. Matriz Energética Brasileira no ano de 2015. 33
Figura 4. Participação de renováveis na Matriz Energética Brasileira e no mundo... 34
Figura 5. Consumo de gasolina C, etanol anidro e etanol hidratado no Brasil. 35
Figura 6. Percentual de valores de preços médios de etanol comparado ao preço da gasolina praticados no período de (04/12/2016 a 10/12/2016) no Brasil. 37
Figura 7. Alternativas para produção de etanol a partir de diferentes fontes de matéria-prima. 42
Figura 8. Esquema estrutural de matéria-prima lignocelulósica. 44
Figura 9. Mecanismo e distribuição dos produtos no processo de pirólise rápida..... 51
Figura 10. Esquema simplificado da rota acetogênica deacetil- CoA ou Wood-Ljungdahl (THF - tetrahidrofolato). 56
Figura 11. Via metabólica Wood-Ljungdahl de conversão de CO e CO2 a etanol e butanol. As enzimas-chave são: álcool desidrogenase (ADH), desidrogenase de formato (FDH), monóxido de carbono desidrogenase / acetil-CoA-sintetase (CODH / ACS), e hidrogenase (H2ase). 57
Figura 12. Procedimento de ativação das cepas: (A) abertura do frasco contendo a cepa, (B) adição de gás e (C) inoculação nos meios de cultivo específicos em câmara anaeróbia. 69
Figura 13. Foto ilustrativa dos frascos de soro (A) e frascos SCHOTT (B) utilizados para realizar experimentos de fermentação de gás de síntese. 70
Figura 14. Tampas de borracha butílica utilizada nos ensaios em frascos de soro. 71
Figura 15. Frascos SCHOTT utilizados para os ensaios em batelada alimentada(A) e o esquema detalhado desses frascos(B). 73
Figura 16. Foto ilustrativa das tampas de borracha de clorobutil utilizadas nos ensaios para vedar e evitar entrada de ar. 74
Figura 17. Frascos de soro na posição vertical e horizontal em agitador rotatório a 150 rpm e 37°C. 74
Figura 18. Esquema ilustrativo do (A) Cilindro de gás na entrada no biorreator de células livres para alimentação de gás de síntese ou nitrogênio, (B) biorreator de células livres com capacidade de 1 litro, (C) medidor de CO e (D) rotâmetro na saída do biorreator. 80

Figura 19. Curva de peso seco para quantificação do crescimento celular de (A) *Clostridium carboxidivorans*, (B) *Clostridium ljungdahlii* e (C) *Clostridium ragsdalei* através de medidas em espectrofotômetro a 600 nm.....83
Figura 20. Cromatograma típico para mistura dos padrões de glicose, etanol, ácido acético, ácido butírico e ácido lático.....84
Figura 21. Cinética do cultivo de *Clostridium carboxidivorans* em meio ATCC 2713 com gás de síntese em experimento não destrutivo em frascos de soro na posição vertical. 87
Figura 22. Cinética do cultivo de *Clostridium carboxidivorans* em meio ATCC 2713 com gás de síntese em experimento destrutivo em frascos de soro na posição vertical. 90
Figura 23. Cinética do cultivo de *Clostridium carboxidivorans* em meio ATCC 2713 com nitrogênio gasoso em experimento destrutivo em frascos de soro na posição vertical. 91
Figura 24. Cinética do cultivo de *Clostridium carboxidivorans* em meio DSMZ 879 com gás de síntese em experimentos destrutivos em frascos de soro colocados na posição vertical. 93
Figura 25. Cinética do cultivo de *Clostridium carboxidivorans* em meio DSMZ com de nitrogênio gasoso em experimento destrutivo em frascos de soro colocados na posição vertical. 95
Figura 26. Cinética do cultivo de *Clostridium carboxidivorans* em meio simples com de gás de síntese em experimento destrutivo em frascos de soro colocados na posição vertical. 96
Figura 27. Cinética do cultivo de *Clostridium carboxidivorans* em meio ATCC 2713com adição intermitente de gás de síntese em experimento conduzidos em frasco SCHOTT colocados na posição vertical. 97
Figura 28. Cinética do cultivo de *Clostridium carboxidivorans* em meio DSMZ com adição intermitente de gás de síntese em experimento conduzido em frasco SCHOTT colocados na posição vertical. 98
Figura 29. Perfil de crescimento celular para C. carboxidivorans com frascos posicionados na vertical e C. carboxidivorans, C. ljungdahlii e C. ragsdalei com frascos posicionados na horizontal. (V) Vertical; (H) Horizontal com gás de síntese.....100

Figura 30. Perfil cinético de crescimento celular e formação de metabólitos do cultivo de Clostridium carboxidivorans em meio ATCC 2713, PFC e gás de síntese em frascos de soro agitados a 150 rpm e 37°C, colocados na horizontal. 104
Figura 31. Perfil de crescimento celular para Clostridium carboxidivorans com frascos posicionados na horizontal e batelada alimentada de meio ATCC 2713 e adição de gás de síntese em frascos de soro agitados a 150 rpm e 37°C, colocados na horizontal. 106
Figura 32. Cinética de crescimento celular e formação de metabólitos do cultivo de Clostridium carboxidivorans em meio de cultivo com glicose (1 g/L) e gás de síntese em frascos de soro agitados a 150 rpm e 37°C colocados na horizontal. Experimentos em batelada alimentada de gás de síntese e glicose. 108
Figura 33. Cinética de crescimento celular e formação de metabólitos do cultivo de Clostridium carboxidivorans em meio com extrato de lêvedo (2,5 g/L) e glicose (1 g/L) em frascos de soro agitados a 150 rpm e 37°C posicionados na horizontal. Experimentos em batelada alimentada de gás de síntese e meio dez vezes concentrado. 111
Figura 34. Cinética de formação de metabólitos de cultivo de Clostridium carboxidivorans em meio de cultivo com triptona e glicose (1 g/L) em experimentos em batelada alimentada de gás de síntese e meio dez vezes concentrado. 113
Figura 35. Diagrama de Pareto para do delineamento Plackett-Burman 117
Figura 36. Diagrama de Pareto para o efeito estimado de cada variável do planejamento fatorial fracionado 2^{4-1}. 119
Figura 37. Diagrama de Pareto para o efeito estimado de cada variável do planejamento fatorial fracionado 2^{4-1}. 120
Figura 38. Diagrama de Pareto para o efeito estimado de cada variável do planejamento DCCR. 123
Figura 39. Cinética do cultivo de *Clostridium carboxidivorans* em meio ATCC 2713 (com peptona de gelatina, digestão pancreática) com alimentação de gás de síntese utilizando biorreator mecanicamente agitado a 200 rpm e 37°C.. 127
Figura 40. Cinética do cultivo de Clostridium carboxidivorans em meio ATCC 2713 (com peptona de gelatina, digestão enzimática) com alimentação de gás de síntese utilizando biorreator mecanicamente agitado a 200 rpm e 37°C.. 127

Figura 41. Cinética do cultivo de Clostridium carboxidivorans em meio ATCC 2713 (com peptona bacteriológica) com alimentação de gás de síntese utilizando biorreator mecanicamente agitado a 200 rpm e 37°C.. 128
Figura 42. Cinética do cultivo de *Clostridium carboxidivorans* em meio ATCC 2713 (peptona bacteriológica) com adição de nitrogênio gasoso utilizando biorreator mecanicamente agitado a 200 rpm e 37°C.. 130
Figura 43. Cinética do cultivo de Clostridium ljungdahlii em meio ATCC 2713 (peptona bacteriológica) com adição de nitrogênio gasoso utilizando biorreator mecanicamente agitado a 200 rpm e 37 ºC. 130
Figura 44. Cinética do cultivo de Clostridium ragsdalei em meio ATCC 2713 (peptona bacteriológica) com adição de nitrogênio gasoso utilizando biorreator mecanicamente agitado a 200 rpm e 37 ºC. 131
Figura 45. Cinética do cultivo *Clostridium carboxidivorans* em meio ATCC 2713 (peptona bacteriológica) com adição de gás de síntese utilizando biorreator mecanicamente agitado a 200 rpm e 37°C. 133
Figura 46. Cinética do cultivo de *Clostridium ljungdahlii* em meio ATCC 2713 (peptona bacteriológica) com adição de gás de síntese utilizando biorreator mecanicamente agitado a 200 rpm e 37°C. 133
Figura 47. Cinética do cultivo de Clostridium rasgdalei em meio ATCC 2713 (peptona bacteriológica) com alimentação de gás de síntese utilizando biorreator mecanicamente agitado a 200 rpm e 37°C. 134
Figura 48. Cinética do cultivo de *Clostridium carboxidivorans* em meio ATCC 2713 (peptona bacteriológica) com adiçãode gás de síntese utilizando biorreator mecanicamente agitado a 300 rpm e 37°C. 138
Figura 49. Cinética do cultivo de *Clostridium carboxidivorans* em meio ATCC 2713 (peptona bacteriológica) com adição de gás de síntese utilizando biorreator mecanicamente agitado a 400 rpm e 37°C. 138

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Importação de etanol pelo Brasil por país de origem na safra 2016/2017 (mil litros)..... 36

Quadro 2.Preço (R$) do etanol hidratado e gasolina e relação gasolina/etanol (%)no estado de São Paulo..... 37

Quadro 3. Características físico-químicas do etanol..... 38

Quadro 4.Principais produtos obtidos a partir do etanol e suas aplicações..... 39

Quadro 5.Composição gravimétrica média dos resíduos sólidos gerados noBrasil..... 47

Quadro 6.Comparação de diferentes estudos de fermentação de gás de síntese utilizando bactérias acetogênicas para a produção de etanol em diferentes configurações de biorreatores..... 59

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Componentes da Milhocina obtida na empresa *CornProducts*. 65

Tabela 2.Composição do meio ATCC (*American Type Culture Collection*) 2713. 66

Tabela 3. Composição do meio BHI (*Brain Heart infusion broth*). 67

Tabela 4. Composição do meio DSMZ (*Leibniz Institute DSMZ-German Collection of Microorganisms and Cell Cultures*) 879. 67

Tabela 5. Composição da solução de elementos traços para o preparo do meio DSMZ (*Leibniz Institute DSMZ-German Collection of Microorganisms and Cell Cultures*) 879. 68

Tabela 6. Composição da solução de vitaminas para o preparo do meio DSMZ (*Leibniz Institute DSMZ-German Collection of Microorganisms and Cell Cultures*) 879. 68

Tabela 7. Fatores e níveis usados no delineamento do planejamento experimental *Plackett-Burman* para selecionar a melhor composição de meio de cultivo para produção de etanol por *C. carboxidivorans*. 78

Tabela 8. Fatores e níveis utilizados no planejamento experimental fatorial fracionado 2^{4-1}para selecionar a melhor composição de meio de cultivo para produção de etanol por *C. carboxidivorans*. 79

Tabela 9.Fatores e níveis utilizados no Delineamento Composto Central Rotacional para selecionar a melhor composição de meio de cultivo para produção de etanol por *C. carboxidivorans*. 80

Tabela 10. Composição de nitrogênio e preço das diferentes peptonas comerciais. 82

Tabela 11. Parâmetros cinéticos do cultivo de *Clostridium carboxidivorans* em frascos de soro ou Schott realizados em agitador rotatório a 150 rpm 30°C com injeção de gás e frascos colocados na posição vertical. 90

Tabela 12. Parâmetros cinéticos, concentração de etanol e ácido acético e produtividade a 37 °C, 150 rpm na estratégia de fermentação em frascos de soro nas posições vertical e horizontal. 102

Tabela 13. Parâmetros cinéticos, concentração de etanol e ácido acético e produtividade a 37 °C, 150 rpm com frascos de soro nas 105

posições horizontal, meio ATCC 2713 na presença e ausência de PFC.

Tabela 14. Parâmetros cinéticos do cultivo de *Clostridium carboxidivorans* em frascos de soro realizados em agitador rotatório a 150 rpm 37°C na horizontal com diferentes valores de pH inicial e injeção de gás de síntese. 106

Tabela 15. Parâmetros cinéticos do cultivo de *Clostridium carboxidivorans* em frascos de soro realizados em agitador rotatório a 150 rpm 37°C na horizontal com adição de meio 10 vezes concentrado e injeção de gás de síntese. 109

Tabela 16. Custo dos componentes utilizados para preparo de meio ATCC 2713. 112

Tabela 17. Parâmetros cinéticos do cultivo de *Clostridium carboxidivorans* em frascos de soro realizados em agitador rotatório a 150 rpm 37°C na horizontal, com meio contendo glicose (1 g/L)e milhocina, adição de meio dez vezes concentrado e injeção de gás de síntese. 116

Tabela 18. Matriz de ensaio do primeiro delineamento de *Plackett-Burman* para o cultivo de *Clostridium carboxidivorans* para a produção de etanol. 117

Tabela 19. Tabela ANOVA obtida considerando interações de segunda ordem obtendo R^2 = 0,4963 e Erro puro = 0,018233 118

Tabela 20. Matriz dos ensaios do delineamento fatorial fracionado (2^{4-1}) com os valores codificados (máximo, +1, mínimo, -1 e ponto central, 0) e valores reais entre parêntesis (em g/L)e os resultados para a variável dependente, produção máxima e produtividade de etanol. 120

Tabela 21. Tabela ANOVA obtida para o delineamento fatorial fracionado2^{4-1}considerando interações de segunda ordem obtendo-se R^2 = 0,54918 e Erro puro = 0,000162. Variável dependente é a produção de etanol (g/L). 121

Tabela 22. Tabela ANOVA obtida para o delineamento fatorial fracionado2^{4-1} considerando interações de segunda ordem obtendo- 122

se R^2 = 0,65709 e Erro puro = 0,0000005. Variável dependente é a produtividade de etanol (g/L.h)

Tabela 23. Composição dos meios de cultivo e resultados obtidos de produção de biomassa e etanol para minimização dos componentes para o planejamento DCCR. 123

Tabela 24. Matriz do delineamento composto central rotacional (DCCR) com os valores codificados (máximo, +1, mínimo, -1 e ponto central, 0), valores reais entre parêntesis e os resultados para a variável dependente (produção de etanol). 124

Tabela 25. Matriz do delineamento composto central rotacional (DCCR) com os valores codificados (máximo, +1, mínimo, -1 e ponto central, 0), valores reais entre parêntesis e os resultados para a variável dependente (produção de ácido lático). 126

Tabela 26. Parâmetros cinéticos do cultivo de *Clostridium carboxidivorans* em biorreator com meio ATCC 2713, agitação de 200 rpm, a 37°C e com alimentação de gás de síntese, utilizando diferentes peptonas. 130

Tabela 27. Parâmetros cinéticos dos cultivos de *Clostridium carboxidivorans*, *Clostridium ljungdahlii* e *Clostridium ragsdalei* em biorreator com meio ATCC 2713, agitação de 200 rpm, a 37°C e com alimentação de nitrogênio. 135

Tabela 28. Parâmetros cinéticos dos cultivos de *Clostridium carboxidivorans*, *Clostridium ljungdahlii* e *Clostridium ragsdalei* em biorreator com meio ATCC 2713, agitação de 200 rpm, a 37°C e com alimentação de gás de síntese. 137

Tabela 29. Parâmetros cinéticos dos cultivos de *Clostridium carboxidivorans* em biorreator com meio ATCC 2713, agitação de 200, 300 e 400 rpm, a 37°C e com alimentação de gás de síntese. 141

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ANOVA	Análise de variância
ATCC	*American Type Culture Colection*
CG	Cromatografia gasosa
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
ACS	Acetil-Coenzima A sintase
DCCR	Delineamento central composto rotacional
DSMZ	*Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen*
FDH	Formato desidrogenase
FT	Fischer-Tropsch
PC	Ponto central
WL	Wood-Ljungdahl
BHI	*Brain Heart infusion broth*
UNICA	União da Indústria de Cana-de-açucar
ANP	Agência Nacional de Petroleo
THF	Tetrahidrofolato
ADH	Álcool desidrogenase
FDH	Desidrogenase de formato
CODH	Monóxido de carbono desidrogenase
H2ase	Hidrogenase
BNDES	Banco nacional de desenvolvimento
EPE	Empresa de Pesquisa energética
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
GTL	*Gás-to-liquids*
ABRELPE	Associação Brasileira de Limpeza Pública e Resíduos Especiais
RSU	Resíduos sólidos urbanos
HFM-BR	*Hollow fiber membrane biofilm reactor* (Reator de biofilme aderido à membrana de fibra oca)
MBR	*Monolith biofilm reactor* (reator de biofilme aderido à monolito)
CSTR	*Continuous stirred tank reactor with continuous liquid and gas flow*(reator contínuo de mistura completa com fluxo contínuo de líquido e gás

STR	*Stirred tank reactor with liquid batch* (reator de mistura completa operando em batelada)
CSTR-BC	CSTR-*bubble column* (coluna de bolhas)
ICR	Immobilized cell reactor (reator com células imobilizadas)
PNRS	Política Nacional de Resíduos Sólidos
BD	*Becton Dickinson*

NOMECLATURA MATEMÁTICA

R^2	Coeficiente de determinação
P	Concentração máxima de produto ou sub-produto(g/L)
tg	Ttempo de duplicação ou tempo de geração (h)
QP	Produtividade volumétrica (g/L.h)
t_f	Tempo de fermentação (h)
g.p.s.cel.L-1	grama de peso seco de célula por litro
Po	Concentração inicial de produto ou sub-produto(g/L)
[X]	concentração celular (g/L)

LETRAS GREGAS

μ	taxa específica de crescimento (h^{-1})

SUMÁRIO

1 Introdução 26
2 Revisão Bibliográfica 30
2.1 Matriz energética brasileira 30
2.1.1 Mercado Brasileiro de Etanol 34
2.1.2 O preço do etanol combustível no Brasil 36
2.2 Etanol 38
2.2.1 Conceitos e propriedades 38
2.2.2 Aplicações do etanol 38
2.3 Produção de Etanol - via química e fermentativa 40
2.3.1 Tecnologias maduras para produção de etanol de primeira geração 40
2.3.2 Tecnologias emergentes de produção de etanol de segunda geração 43
2.4 Gás de síntese 46
2.4.1 Matérias-primas para a produção de gás de síntese 46
2.4.2 Processos para obtenção de gás de síntese 48
2.4.3 Aplicações de gás de síntese 51
2.5 Produção de etanol a partir de gás de síntese por rota biotecnológica 52
2.5.1 Bactérias acetogênicas fermentadoras de gás de síntese 53
2.5.2 Via Metabólica de fermentação de gás de síntese 55
2.5.3 Condições de cultivo para produção de etanol por bactérias acetogênicas 58
2.6 INNOVA Energias Renováveis 60
3 Justificativa e Objetivos 62
3.1 Objetivos 63
4 Metodologias Experimentais 64
4.1 Materiais 64
4.2 Equipamentos 64
4.3 Micro-Organismos, meios de cultivo, ativação e conservação 65
4.3.1 Meios de cultivos 66
4.3.2 Ativação dos micro-organismos 68
4.3.3 Conservação dos micro-organismos 69
4.4 Experimentos preliminares para avaliação da produção de etanol 70
4.4.1 Experimentos em frascos de soro 70

4.4.2 Experimentos em frascos SCHOTT 72
4.5 Avaliação de nova estratégia para AVALIAR a transferência de massa em frascos de soro 73
4.6 Avaliação do perfil cinético de *C. carboxidivorans* em diferentes meios de cultivo 75
4.7 Planejamento experimental e análise estatística para aumento da produção de etanol por *C. carboxidivorans* 76
4.7.1 Planejamento experimental do tipo *Plackett-Burman* 77
4.7.2 Planejamento experimental fatorial fracionado 2^{4-1} 78
4.7.3 Planejamento experimental Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) 79
4.8 Experimentos em biorreator 79
4.8.1 Avaliação da assimilação de gás de síntese 81
4.8.2 Influência da variação da peptona na produção de etanol 81
4.8.3 Influência da agitação na produção de etanol 82
4.9 Métodos Analíticos 82
4.9.1 Determinação da Concentração celular 82
4.9.2 Análises por Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) 84
4.10 Cálculos dos parâmetros de avaliação do processo 85
4.10.1 Determinação da taxa específica de crescimento μ (h^{-1}). 85
4.10.2 Tempo de duplicação 85
4.10.3 Produtividade volumétrica (g/L.h) 85
5 Resultados e discussões 86
5.1 Ativação das cepas 86
5.2 Experimentos preliminares 86
5.2.1 Experimentos não destrutivos em frascos de soro 86
5.2.2 Experimentos destrutivos em frascos de soro 90
5.2.3 Experimentos preliminares não destrutivos em frascos SCHOTT 97
5.2.4 Considerações gerais sobre os experimentos preliminares 99
5.3 Avaliação de nova estratégia operacional para melhoria da transferência de massa em frascos de soro 99
5.3.1 Cultivos de *C. carboxidivorans* com frascos de soro na posição horizontal 104

5.4 Planejamento experimental e análise estatística para aumento da produção de etanol por *Clostridium carboxidivorans* 115
5.4.1 Planejamento experimental do tipo *Plackett-Burman* 116
5.4.2 Planejamento experimental Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) 122
5.5 Experimentos em biorreator 126
5.5.1 Influência da peptona no cultivo de *Clostridium carboxidivorans* 126
5.5.2 Perfil cinético de *Clostridium carboxidivorans*, *Clostridium ljungdahlii* e *Clostridium ragsdalei* em meio ATCC 129
5.5.3 Influência da agitação no cultivo de *Clostridium carboxidivorans* em biorreator 137
6 Conclusões 141
7 Sugestões para Trabalhos Futuros 143
8 Referências 144

1 INTRODUÇÃO

Os esforços para desenvolver energias renováveis são impulsionados pelos impactos negativos causados por um consumo mundial cada vez maior de energia obtida a partir da queima de combustíveis fósseis. Os custos associados à transição dos combustíveis de transporte fósseis para renováveis serão minimizados se grandes alterações nas infra-estruturas existentes puderem ser evitadas (LIU *et al*., 2014).

O etanol é um combustível renovável, isto é, biocombustível, que pode ser diretamente misturado com gasolina ou utilizado em veículos do tipo *flex fuel*, que já se encontram no mercado desde 2003. O uso como combustível puro é praticamente exclusivo ao Brasil e aos Estados Unidos, enquanto o uso como aditivo, de 2% a 10%, ocorre nos EUA, Europa, Índia e China, entre outros países (BNDES, 2007). No Brasil, em 2013, o governo brasileiro determinou a elevação do percentual de etanol anidro na gasolina, subindo de 20% para 25% e a partir de março de 2015 o governo determinou o aumento dessa proporção para 27%. Sendo assim, a demanda de etanol no país tem crescido nos últimos anos, principalmente devido ao aumento do número de carros *flex fuel*, que no ano de 2013 representavam, aproximadamente, 60% da frota enquanto que os carros movidos à gasolina representavam cerca de 33% (UNICA, 2014; UNICA, 2016).Portanto, é notório que a busca por incremento na oferta de etanol na matriz energética brasileira se faz necessária e também promissora.

Atualmente, os processos de produção de etanol comercial fazem uso do milho (EUA) ou da cana-de-açúcar (Brasil), embora as matérias primas de composição lignocelulósica tenham obtido grande atenção devido à elevada variedade e abundância de recursos celulósicos de baixo custo (LYND, 1996). Também é possível obter etanol de segunda geração através de matérias-primas lignocelulósicas que são compostas principalmente por: celulose, hemicelulose e lignina, que possuem grandes quantidades de carboidratos, exceto a lignina (PEREIRA JR. *et al.*, 2008).

O etanol obtido de matéria-prima de composição lignocelulósica pode ser produzido por diversos processos, como: (i) a sacarificação acoplada à fermentação (FERREIRA *et al*., 2010); (ii) a gaseificação seguida por conversão com catalisador metálico (REWICK e WENTRCEK, 1974); ou (iii) gaseificação seguida por conversão

com catalisador microbiano (fermentação) (PHILLIPS *et al*., 1994). Embora o primeiro processo tenha sido extensivamente estudado nas últimas décadas, os processos de gaseificação vêm recebendo uma grande atenção devido à descoberta recente de catalisadores e também a capacidade de utilização da gaseificação para converter a maior parte da matéria-prima de composição celulósica em gás de síntese para processamento catalítico (HURST e LEWIS, 2010).

O gás de síntese (CO, H_2 e CO_2) pode ser obtido a partir de reforma a vapor, oxidação parcial ou pirólise de matéria orgânica, incluindo resíduos agroindustriais e resíduos sólidos urbanos. A fermentação do gás de síntese por bactérias acetogênicas pode gerar diversos produtos, incluindo o etanol. Esta via é considerada muito atrativa, pois além de ser possível a utilização de toda a composição da biomassa, incluindo a lignina, não há necessidade de um complexo processo de pré-tratamento da biomassa e a utilização de enzimas, que elevam o custo do processo. Além disso, tem-se a alta especificidade do biocatalisador; a independência da razão H_2:CO para a bioconversão; a esterilização da fermentação utilizando as altas temperaturas do processo de geração de gás de síntese; a operação em condições ambientais; e evita-se o envenenamento de catalisadores metálicos, uma vez que utiliza bactérias acetogênicas (MUNASINGHE, 2010).

Essas bactérias acetogênicas são estritamente anaeróbias e capazes de assimilar vários tipos de substratos como monóxido de carbono, dióxido de carbono e hidrogênio, metanol e também ácidos graxos. Algumas espécies têm sido relatadas na literatura como capazes de realizar a bioconversão de gás de síntese em produtos de interesse, entre elas *Clostridium ljungdahlii*, *Clostridium autoethanogenum*, *Eubacteriumlimosum*, *Clostridium* sp. Strain P11 (*Clostridium ragsdalei*), *Alkalibaculumbacchi* e *Clostridium carboxidivorans* (WILKINS, 2011; MOHAMMADI, 2011).

O presente trabalho visou à produção de etanol e o estudo das melhorias desse processo, a partir de gás de síntese por rota biotecnológica utilizando três diferentes espécies de *Clostridium*: *Clostridium ljungdahlii, Clostridium carboxidivorans e Clostridium ragsdalei.*

O desenvolvimento desta tese possibilitou a publicação dos seguintes trabalhos de produção científica e tecnológica:

Artigos completos publicados em periódicos

1. RIBEIRO, R. R.; FERREIRA, T. F. ; COELHO, F. M. ; AMARAL, P. F. F.A new strategy for acetogenic bacteria cell growth and metabolites production using syngas in lab scale. Journal of Biotechnology and Biochemistry, v. 3, p. 2730, 2016.
2. COELHO, F. M. ; NELE, M. ; RIBEIRO, R. R. ; FERREIRA, T. F. ; AMARAL, P. F. F. *Clostridium carboxidivorans* surface characterization using contact angle measurement (CAM). Chemical Engineering Transactions, v. 50, p. 277282, 2016.

Publicação em Anais de Congressos (Trabalho completo)

1. COELHO, F. M. ; RIBEIRO, R. R. ; FERREIRA, T. F. ; AMARAL, P. F. F. ANÁLISE DA ADESÃO DE BIOFILME BACTERIANO EM MEMBRANA DE FILTRAÇÃO HIDROFÓBICA PARA A FERMENTAÇÃO DE GÁS DE SÍNTESE. In: XXI Congresso Brasileiro de Engenharia Química, 2016, Fortaleza. XXI Congresso Brasileiro de Engenharia Química, v. 1, 2016.

2. COELHO, F. M. B. ; RIBEIRO, R. R. ; AMARAL, P. F. F. ; FERREIRA, T. F.ESTUDO DA ADESÃO DE BIOFILME BACTERIANO EM SISTEMAS DE FERMENTAÇÃO DE GÁS DE SÍNTESE. In: XI Congresso Brasileiro de Engenharia Química em Iniciação Científica, 2015, Campinas. Anais do Congresso Brasileiro de Engenharia Química em Iniciação Científica Cobeq IC 2015. São Paulo: Editora Edgard Blücher, v. 1, p. 1233, 2015.

3.COELHO, F. M. B. ; RIBEIRO, R. R. ; AMARAL, P. F. F. ; FERREIRA, T. F. . Caracterização da Superfície de *Clostridium carboxidivorans* através de Teste de Adesão Microbiana a Solventes. In: V SIMPÓSIO DE BIOQUÍMICA E BIOTECNOLOGIA, 2015, Londrina. V SIMPÓSIO DE BIOQUÍMICA E BIOTECNOLOGIA. São Paulo: Blucher, v. 1, 2015.

4. RIBEIRO, R. R.; COELHO, F. M. B. ; FERREIRA, T. F. ; AMARAL, P. F. F. . Avaliação do metabolismo de *Clostridium carboxidivorans* em meio ATCC e DSMZ na

presença de gás de síntese. In: V SIMPÓSIO DE BIOQUÍMICA E BIOTECNOLOGIA, 2015, Londrina. V SIMPÓSIO DE BIOQUÍMICA E BIOTECNOLOGIA. São Paulo: Blucher, v. 1, 2015.

5.RIBEIRO, R. R.; AMARAL, P. F. F. ; FERREIRA, T. F. . Modelagem Cibernética da Fermentação de Gás de Síntese por *Clostridium ljungdahlii*. In: 11 Congresso Interamericano de Computacion Aplicada a la industria de Processos, Lima. CAIP 2013, 2013.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

No presente capítulo são apresentados os diferentes aspectos teóricos referentes à temática abordada: histórico da matriz energética nacional (PROÁLCOOL), plataformas (petroquímica, bioquímica e integral), etanol, aplicações, fontes renováveis de interesse industrial; o etanol de primeira e segunda geração e suas aplicações no mercado; tecnologias de pré-tratamentos na separação das frações presentes na matéria-prima; obtenção por rota biotecnológica, concepções e tecnologias emergentes portadoras de futuro (SSF, SSCF, CBP); matéria-prima para a produção do etanol de segunda geração, gás de síntese (matérias-primas, processos de produção, aplicações), características relevantes ao processo de obtenção de etanol a partir de gás de síntese, micro-organismos produtores e aspectos de metabolismo e, considerações importantes.

2.1 MATRIZ ENERGÉTICA BRASILEIRA

A matriz energética é o conjunto de fontes energéticas possíveis de serem produzidas e distribuídas à sociedade e às principais regiões industriais, urbanas e rurais de um país. Dentre as matrizes, destacam-se o petróleo, o gás natural, o carvão, o etanol, recursos hídricos, lenha e as energias solar, térmica e eólica. Quando se trata de energia, não se atribui apenas à energia elétrica, transmitida através de sistemas de distribuição, mas também a energia utilizada nos veículos, como carros, caminhões e ônibus. É uma representação da quantidade de recursos energéticos oferecidos por um país ou por uma região, sendo eles renováveis ou não (BRASIL, 2012; OLIVEIRA, 2014).

Dentro da classificação de fontes renováveis ou não renováveis, pode-se considerar como fontes renováveis a biomassa de cana-de-açúcar, a hidráulica, a lenha, o carvão vegetal, a solar, a eólica a lixívia. Exemplificando as fontes não renováveis tem-se o petróleo e seus derivados, o gás natural, o carvão mineral e o urânio.

É possível observar na Figura 1 que no ano de 1970, a participação de energias renováveis no Brasil era superior a 60% devido à predominância do uso da lenha para obtenção de energia. Porém, com a introdução de recursos energéticos mais

eficientes, a participação de recursos renováveis caiu para 46% uma década depois. Essa diferença pode ser notada comparando as Figuras 1 e 2 em que é possível perceber nitidamente a substituição do uso de lenha por petróleo e seus derivados, sendo que estes tiveram sua participação aumentada de 34% em 1970 para 48% em 1980.

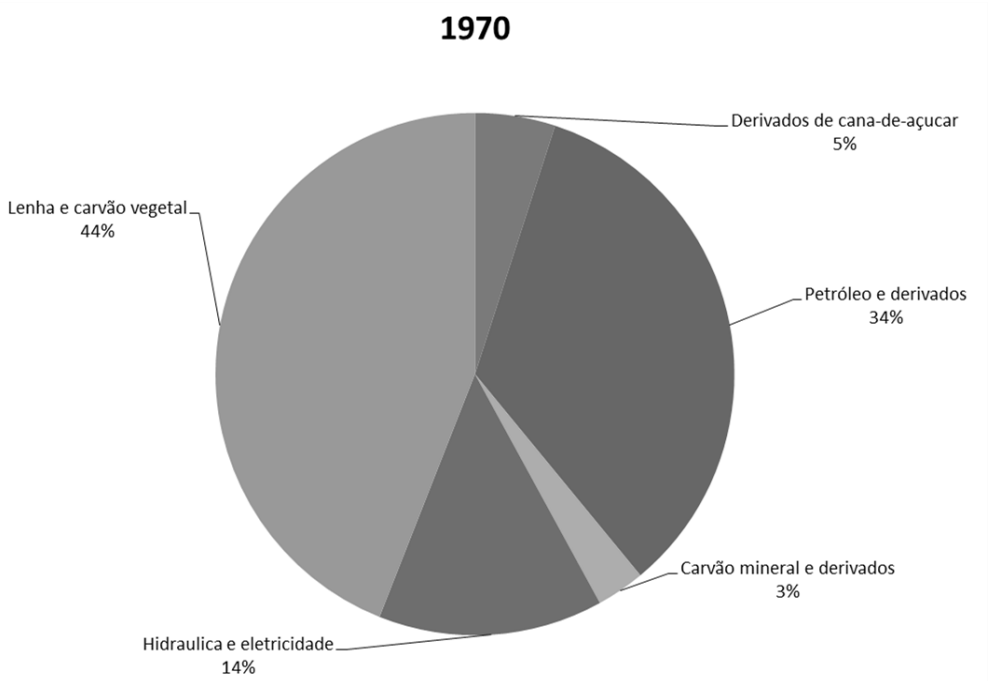

Figura 1. Matriz Energética Brasileira no ano de 1970.
Fonte: adaptado de Brasil, 2013.

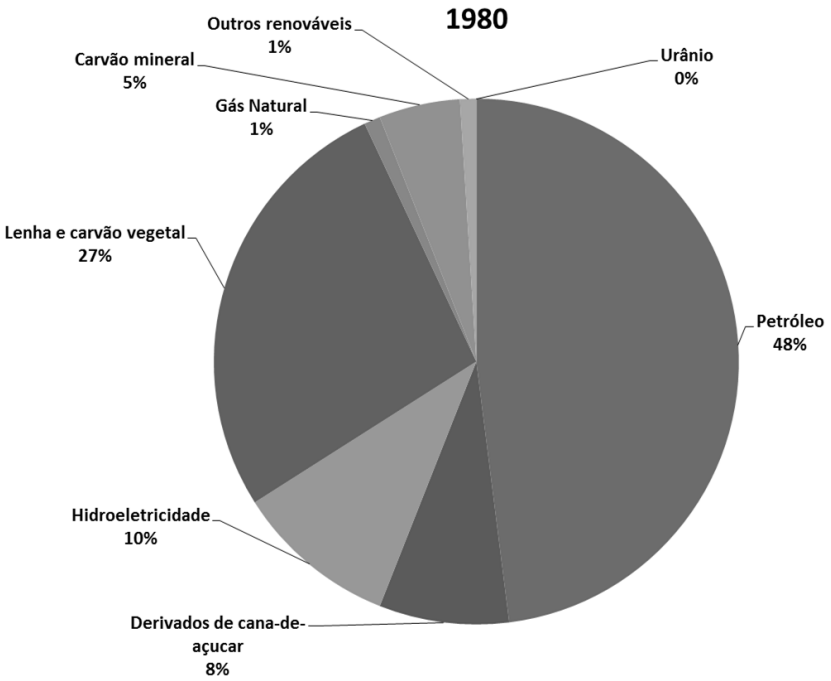

Figura 2. Matriz Energética Brasileira no ano de 1980.
Fonte: adaptado de Brasil, 2013.

De acordo com dados atuais (Figura 3), é possível perceber que no Brasil a maior parte da energia ainda é proveniente de fontes não renováveis. Entretanto, quando comparado às décadas de 70 e 80 (Figuras 1 e 2) pode-se perceber que a energia advinda da biomassa da cana-de-açúcar dobrou sua participação em relação aos anos 80 e triplicou quando comparada aos anos 70. Esse fato pode ser atribuído à criação do Proálcool que ocorreu em 1975. O Proálcool foi um programa de incentivo a substituição em larga escala dos combustíveis veiculares derivados do petróleo por etanol, criado devido à crise do petróleo em 1973 e a crise no Irã, maior exportador de petróleo mundial em 1979. Com o incentivo de governo visando à utilização de fontes de energia renováveis, observa-se assim a queda da participação do petróleo da matriz energética brasileira de 48% em 1980 para 37% em 2015.

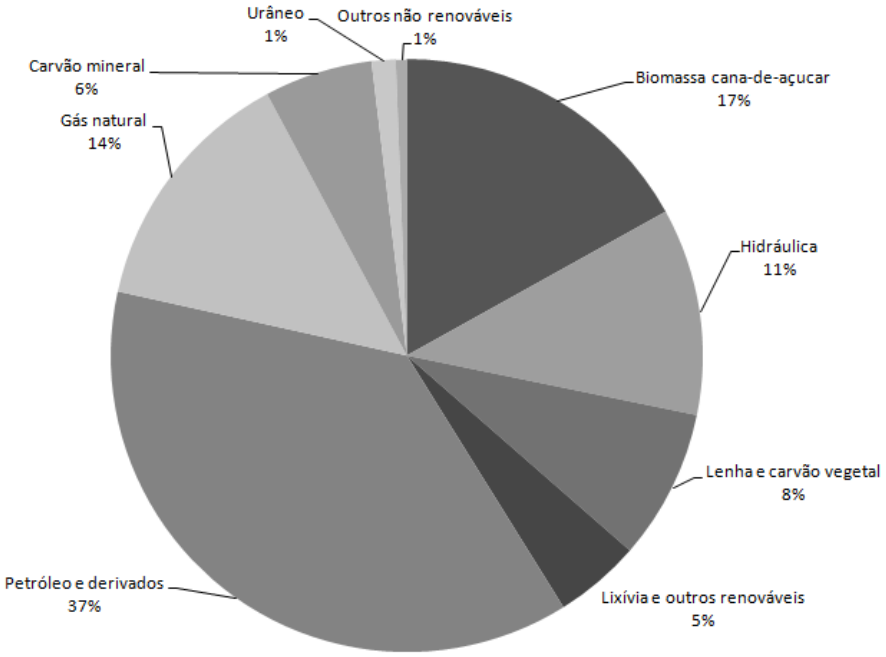

Figura 3. Matriz Energética Brasileira no ano de 2015.
Fonte: adaptado de Brasil, 2016.

No ano de 2015, a participação de recursos renováveis na matriz energética brasileira manteve-se entre as mais elevadas do mundo (Figura 4), com pequeno crescimento devido, particularmente, à queda da oferta interna de petróleo e derivados (7,2%). Entre os recursos renováveis, houve o aumento da participação do etanol (anidro + hidratado) no mercado de veículos leves que era de 34% em 2014 e passou a 40% em 2015, fato relacionado ao aumento da competitividade do preço do etanol. A partir de março de 2015 o governo determinou o aumento da proporção de álcool anidro na gasolina C, subindo de 25 para 27%, o que justifica um aumento do consumo deste na matriz energética brasileira. Devido ao aumento da demanda de etanol no mercado nacional, observa-se a necessidade de se incrementara produção deste combustível a partir de outras matérias-primas. No ano de 2015, foi observado um crescimento expressivo de 34% da demanda de etanol hidratado, alcançando 19 bilhões de litros (BRASIL, 2014; DRABER, 2013; BRASIL, 2016).

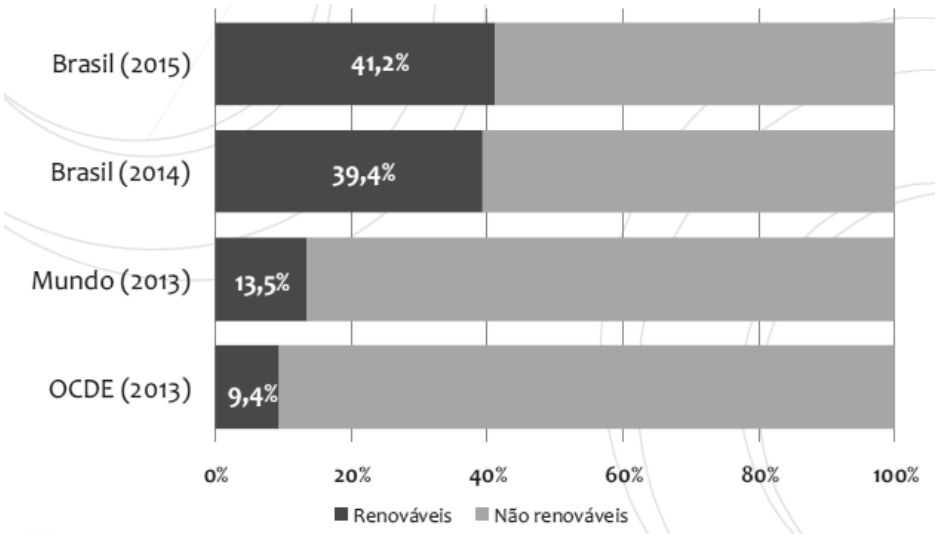

Figura 4. Participação de renováveis na Matriz Energética Brasileira e no mundo.Fonte: EPE; Agência Internacional de Energia, 2016.

2.1.1 Mercado Brasileiro de Etanol

Diante do cenário de busca por incremento de fontes renováveis na matriz energética brasileira, o mercado de etanol desponta como promissor. No Brasil, dois fatores foram fundamentais para o incremento do uso do etanol: a ampla cobertura geográfica e o elevado número de postos de abastecimento de combustível que comercializam o produto, fato que diferencia favoravelmente o Brasil de outros países (MARQUES, 2010).

No Brasil, a maior parte da produção de etanol tem como destino o uso carburante, que é dividido em etanol anidro e o hidratado. O etanol anidro é usado na produção da gasolina C, que é a única gasolina que pode ser comercializada no território nacional para abastecimento de veículos automotores. As distribuidoras de combustíveis adquirem o etanol anidro das destilarias e a gasolina A (“pura”) das refinarias, fazendo uma mistura desses dois na proporção que pode variar entre 25 e 27% de álcool anidro. O etanol hidratado é usado diretamente no abastecimento de veículos automotores e possui em sua composição entre 95,1% e 96% de etanol e o restante de água (UNICA, 2007; BRASIL, 2015).

Em 2015, foi registrado um recuo de 9,7% na produção de gasolina e redução de 9,5% no consumo.Essas reduções foram compensadas pela produção e consumo

de etanol, que cresceram, respectivamente, 5,8% e 18,6% em relação ao ano anterior. A Figura 5 apresenta o crescente aumento do consumo de etanol anidro e hidratado a partir de 2012 e a queda no consumo de gasolina C a partir de 2015. O aumento da oferta de etanol favoreceu, assim, a evolução do percentual renovável na matriz de consumo do setor de transporte, de 18% para 21% em 2015 (UNICA, 2014; BRASIL, 2016).

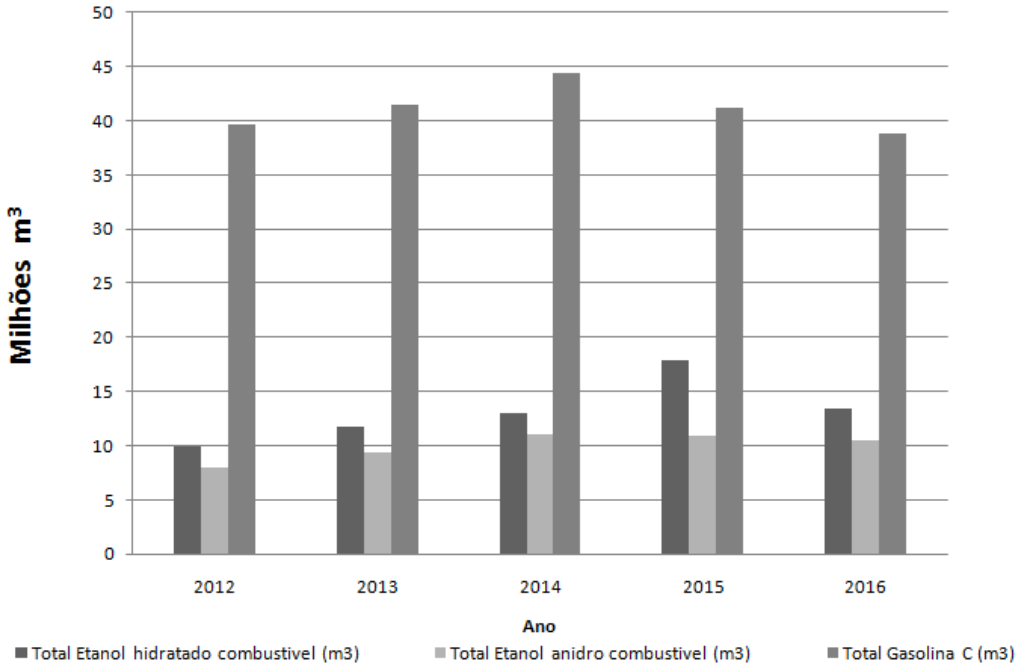

Figura 5. Consumo de gasolina C, etanol anidro e etanol hidratado no Brasil. Fonte:adaptado de UNICA, 2016.

O volume global da safra de 2014/2015de etanol comercializado alcançou 25,17 bilhões de litros, que corresponde a praticamente o mesmo valor contabilizado no mesmo período do ano da safra anterior (25,67 bilhões de litros). Deste volume,23,67 bilhões de litros direcionam-se ao abastecimento interno (2,45 % superior à safra anterior), sendo 9,62 bilhões de litros de etanol anidro e 14,05 bilhões de etanol hidratado (UNICA, 2015).

Em 2015, a produção brasileira de etanol bateu recorde ao atingir 30 bilhões de litros.Os principais fatores que levaram a esse recorde foram a boa safra de cana-de-açúcar e as medidas governamentais que aumentaram a atratividade do etanol, como a elevação do percentual de etanol anidro da gasolina C (que passou a ser

27%), o aumento do preço da gasolina A, o retorno da contribuição de intervenção de domínio econômico (Cide) e a elevação do PIS/Cofins para a gasolina A.Esses fatores contribuíram para o aumento do preço da gasolina C para o consumidor final, tornando assim mais atrativo o consumo de etanol, como mostra a Figura 5 (NOVACANA, 2017).

A importação brasileira de etanol na safra 2016/2017 foi de, aproximadamente, 680 mil m^3 (Quadro 1),principalmente dos Estados Unidos, que é o maior produtor mundial. Esse volume supera a quantidade importada em 2014 (450 mil m^3).Esse fato pode estar associado ao aumento do preço da gasolina no Brasil, que causou o aumento da demanda de etanol no mercado brasileiro e também da necessidade dos Estados Unidos de escoarem a sua produção excedente. Entretanto o quadro se mostra reversível à medida que ocorre aumento da produção de etanol e, por consequência, a diminuição de preço no mercado brasileiro e sua maior competitividade (MAPA, 2015; UNICA, 2016).

Quadro 1. Importação de etanol pelo Brasil por país de origem na safra 2016/2017 (mil litros).

País de origem	**Volume (m^3)**
Estados Unidos	678067
Paraguai	1979
Jamaica	118
Polônia	74
Alemanha	35
Outros	39

Fonte: UNICA, 2016.

2.1.2 O preço do etanol combustível no Brasil

Segundo dados da Agencia Nacional do Petróleo (ANP, 2017), é possível observar na Figura 6 que o preço do combustível etanol no Brasil quando comparado ao preço da gasolina está, em sua maioria, acima do percentual recomendado pela agência, que é de até 70% do valor da gasolina, uma vez que o seu poder calorífico é 70% do poder calorífico da gasolina.

De acordo com dados da ANP (Figura 6), é possível notar que no Estado de São Paulo, maior produtor de etanol no Brasil, o preço deste combustível está em torno de 76% do praticado para a gasolina.Entretanto, esse percentual é variável

fazendo com que seja competitivo em alguns meses do ano (Quadro 2).Esse fato pode estar relacionado ao aumento da demanda de etanol. Portanto, mesmo nos estados que apresentam um percentual um pouco acima do recomendado pela ANP (70%), como nos estados de Mato Grosso e Goiás (76% e72%, respectivamente), o abastecimento de veículos leves com esse combustível ainda pode ser competitivo quando comparado à gasolina.

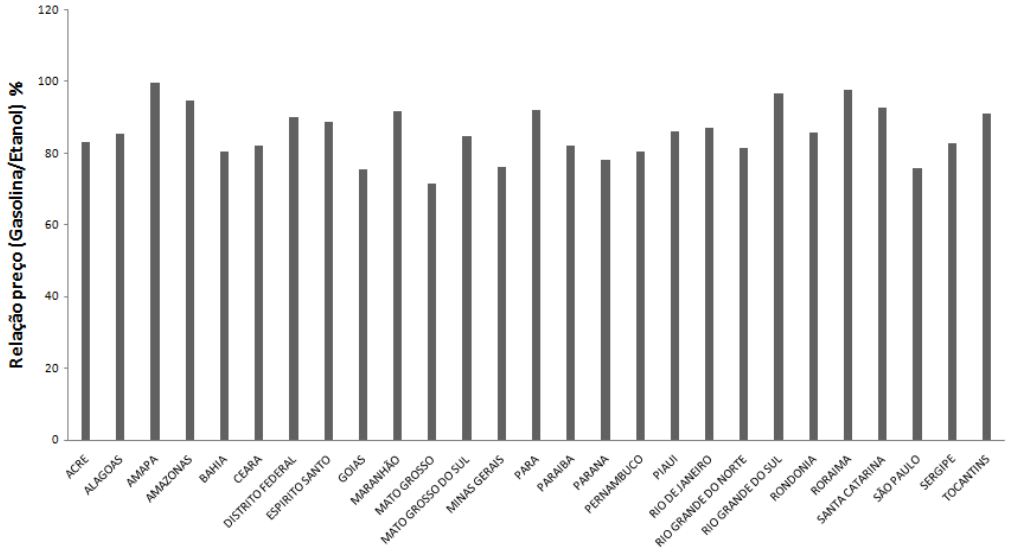

Figura 6. Percentual de valores de preços médios de etanol comparado ao preço da gasolina praticados no período de (04/12/2016 a 10/12/2016) no Brasil.
Fonte: modificado pelo autor a partir de dados da ANP, 2017.

Quadro 2. Preço do etanol hidratado e gasolina e relação gasolina/etanol no estado de São Paulo.

Mês	*Gasolina (R$)*	*Etanol hidratado (R$)*	*Relação gasolina/etanol %*
Janeiro	3,52	2,601	74
Fevereiro	3,544	2,682	76
Março	3,567	2,735	77
Abril	3,538	2,555	72
Maio	3,479	2,247	65
Junho	3,464	2,271	66
Julho	3,441	2,224	65
Agosto	3,446	2,284	66
Setembro	3,448	2,319	67
Outubro	3,468	2,525	73
Novembro	3,507	2,679	76
Dezembro	3,573	2,693	75

Fonte: Elaboração própria a partir de dados UNICA, 2016.

2.2 ETANOL

2.2.1 Conceitos e propriedades

O etanol ou álcool etílico é uma substância de fórmula molecular C_2H_5OH, sendo um líquido incolor e volátil, facilmente inflamável, de chama azulada que não gera fuligem e muito higroscópico. O Quadro3 apresenta as características físico-químicas do etanol (BETANCUR, 2010).

Quadro 3. Características físico-químicas do etanol.

Fórmula molecular	**C_2H_5OH**
Massa molecular	46 u.m.a.
Massa específica (20°C)	0,7894 g/mL
Massa específica (15°C)	0,7942 g/mL
Densidade API	47,1
Índice de refração (20°C)	1,3619
Temperatura de ebulição (1atm)	78,32°C
Temperatura de fusão (1atm)	- 117,22°C
Temperatura de inflamação	12°C
Limite de estabilidade	300°C
Tensão de vapores (0°C)	12,00 mmHg.
(20°C)	44,00 mmHg.
Calor latente	921 KJ/Kg
Poder calorífico etanol hidratado	5,380 Kcal/L
Octanagem aparente (ASTM)	99
Índice de cetano aparente	10
Razão ar: combustível	9,0:1

Fonte: Betancur, 2010.

2.2.2 Aplicações do etanol

O principal uso do etanol é como combustível líquido puro ou misturado à gasolina. É usado também como insumo na fabricação de aditivo à gasolina em substituição ao etil-terc-butil-éter (ETBE). O uso como combustível, na proporção de 20% a 100%, é praticamente exclusivo do Brasil e dos Estados Unidos, enquanto o uso como aditivo, de 2% a 10%, ocorre nos EUA, Europa, Índia e China, entre outros países (BASTOS, 2007).

Quando o etanol é comparado à gasolina, embora tenha poder calorífico inferior, o mesmo apresenta características que permitem excelente desempenho aos motores, entre as quais se destacam (ANDRADE, 2009):

(1) larga faixa de inflamabilidade;

(2) grande poder antidetonante;

(3) um elevado calor latente de vaporização;

(4) densidade superior à da gasolina;

(5) baixo ponto de fulgor.

O etanol pode também servir de matéria-prima para a produção de produtos de interesse industrial, como eteno, propeno, acetaldeído, etc. O Quadro4 apresenta os principais produtos obtidos a partir de diferentes processos com o etanol como matéria-prima. Esses produtos têm diversas aplicações de interesse comercial, o que mostra a importância dessa *commoditie*.

Quadro 4. Principais produtos obtidos a partir do etanol e suas aplicações.

Processos	**Produtos**	**Aplicação típica**
Desidratação	Eteno	Resinas plásticas
	Propeno	Solventes
	Etilenoglicol	Éter etílico
		Fibras têxteis
Desidrogenação	Acetaldeido	Ácido acético
Oxigenação		Acetatos
		Corantes
Esterificação	Acetato	Solventes
	Acrilatos	Fibras têxteis
		Adesivos
Halogenação	Cloreto de Etila	Fluidos refrigerantes
		Produtos medicinais
		Resinas plásticas
Amonólise	Dietilamina	Inseticidas
	Monoetilamina	Herbicidas
Desidrogenação	Butadieno	Borrachas sintéticas
Desidratação		
Biotransformação	Ácido acético	Produção de acetato de vinila, perfumaria
	Aminoácidos	Alimentação humana e ração animal
	Vitaminas	Fortificação industrial de alimentos

Fonte: Betancur, 2010; Marques, 2010.

2.3 PRODUÇÃO DE ETANOL - VIA QUÍMICA E FERMENTATIVA

O etanol pode ser obtido principalmente por duas rotas: via química e via fermentativa. Na rota química, obtém-se o etanol a partir de hidrocarbonetos insaturados, como eteno e etino, de gases de petróleo e da hulha. Nos países em que há grandes reservas de petróleo e uma indústria petroquímica consolidada, esta pode ser uma forma econômica de produzir etanol (MOREIRA *et al*., 2008).

Outra rota química conhecida é a de Fischer-Tropsch (FT) que possibilita a formação de cadeias de hidrocarbonetos partindo-se do gás de síntese (mistura gasosa de CO e H_2) e assim viabilizando a produção de gasolina e óleo diesel, dentre outros hidrocarbonetos de maior e menor peso molecular, incluindo etanol (SCHMIDELL, 2001). Segundo Worden (1991), embora a síntese de etanol por FT fosse promissora, essa via apresenta algumas limitações físico-químicas e desvantagens associadas ao processo de conversão catalítico do gás, o que fez com que essa tecnologia caísse em desuso. A via sintética nunca foi utilizada no Brasil, em escala industrial, mesmo antes da Crise do Petróleo (CASTRO, 2011).

Quando se trata de Brasil, a rota fermentativa é a mais importante e uma das mais antigas datando de 1532 com a vinda das primeiras mudas de cana-de-açúcar da Ilha da Madeira. Por isso, pode ser considerada uma tecnologia também madura. Essa tecnologia utiliza o caldo de cana-de-açúcar, convertendo os açúcares fermentescíveis em etanol e dióxido de carbono pela ação de leveduras, rota conhecida também como produção de etanol de primeira geração (MAGALHAES, 2009; PACHECO, 2011).

Atualmente outras rotas fermentativas vêm sendo estudadas: uma a partir de matérias-primas lignocelulósicas e outra que segue após um processo termoquímico, também chamado de tecnologia híbrida, onde é realizada a fermentação de gás de síntese.

2.3.1 Tecnologias maduras para produção de etanol de primeira geração

As matérias-primas para produção de etanol de primeira geração provenientes da agroindústria estão distribuídas segundo a sua composição química nas seguintes categorias: (1) substratos solúveis tais como sacarose, glicose, frutose e lactose que

podem ser facilmente extraídos e fermentados e são provenientes da cana-de-açúcar, beterraba, melaço, soro de leite, etc.; (2) polissacarídeos insolúveis, em geral, material amiláceo, os quais antes do processo de fermentação são submetidos à pré-tratamento para solubilização e hidrólise, sendo o amido advindo do milho, mandioca, trigo, cevada, batata e outros (PEREIRA Jr. *et al.,* 2008a).

A beterraba é bastante comum na Europa, enquanto que a cana-de-açúcar e o milho são as principais matérias primas no Brasil e nos Estados Unidos, respectivamente. Essas matérias-primas, sacarínea e amilácea, também são fontes importantes de alimento, o que pode resultar em um conflito alimento *versus* combustível (BETANCUR, 2010).

Na Figura 7 é apresentado um diagrama de blocos de obtenção de etanol a partir de diferentes matérias-primas, no qual se podem observar as etapas comuns aos diferentes processos. De forma geral, o processo de produção de etanol pode ser sintetizado da seguinte forma: a matéria-prima, seja qual for a sua origem, é submetida a um pré-tratamento e adequação para a liberação de glicídio que são subsequentemente, metabolizados por um agente biológico para a produção de etanol, que posteriormente é purificado (BETANCUR, 2010).

No Brasil, a matéria-prima (caldo de cana de açúcar) apresenta sacarose como substrato, que é diretamente fermentável pelo agente biológico, *Saccharomyces cerevisiae*, visto que esse micro-organismo produz invertase. Essa enzima intracelular catalisa a hidrólise da sacarose em glicose e frutose e, portanto, nenhum processo de hidrólise antes da fermentação é necessário, como mostra a Figura 7 (PEREIRA Jr *et al*., 2008a).

Já o processo de obtenção do etanol a partir de matérias-primas amiláceas, como é o caso dos Estados Unidos (milho), requer uma hidrólise prévia que pode ser química ou pelo uso de enzimas amilolíticas para sacarificação, gerando glicose para a fermentação. Essas enzimas são altamente específicas para cada tipo de ligação. As principais são as α-amilases e as glucoamilases (BARCELOS, 2012a), como mostra a Figura 7. Assim, o custo da produção de etanol no Brasil é mais barato em relação à produção do mesmo nos Estados Unidos.

O rendimento energético obtido através do processamento da cana-de-açúcar é um dos maiores, superior ao do milho. Além disso, a produção de etanol a partir do milho, que é um alimento, faz com que os norte-americanos precisem subsidiar sua produção para tornar o preço do etanol do milho equivalente ao preço do etanol da cana de açúcar (DRABER, 2013).

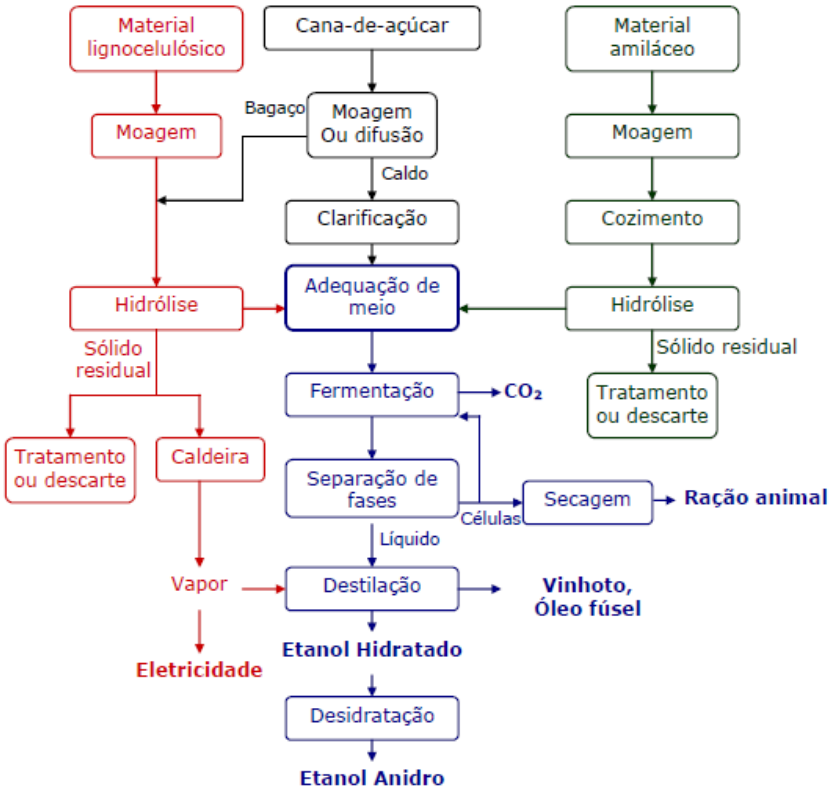

Figura 7. Alternativas para produção de etanol a partir de diferentes fontes de matéria-prima.Fonte : Betancur,(2010); adaptado de Pereira Jr., (1991).

Nesse processo, diversos fatores, físicos (temperatura, pressão osmótica), químicos (pH, oxigenação, nutrientes minerais e orgânicos, inibidores) e microbiológicos (espécies, linhagem e concentração da levedura, concentração bacteriana), afetam o rendimento da fermentação, ou seja, a eficiência da conversão de açúcares fermentescíveis em etanol (BORZANI, 2001).

Os micro-organismos comumente utilizados na fermentação são leveduras do gênero *Saccharomyces* geralmente a espécie *Saccharomyces cerevisiae*, da qual foram selecionadas várias linhagens. Normalmente, se utilizam leveduras comuns à

região da destilaria, freqüentemente denominadas de leveduras selvagens, que são isoladas e selecionadas com as características de dominância e persistência ao longo da safra e com habilidades fermentativas desejáveis como alta eficiência de produção de etanol, baixa produção de glicerol e alta tolerância a diversos fatores estressantes (BORZANI, 2001; ALCARDE, 2007).

2.3.2 Tecnologias emergentes de produção de etanol de segunda geração

O etanol de segunda geração surge como alternativa para o aumento da produção de etanol. Essa rota utiliza matérias-primas de composição lignocelulósica, tais como excedente de bagaço de cana-de-açúcar, resíduos agrícolas e resíduos sólidos urbanos que podem ser utilizados, através de tratamentos químicos, termoquímicos ou rotas bioquímicas, auxiliando assim a redução de impactos ambientais (MARTIN *et al.*, 2006; DIAS, 2010; NUNES *et al*. 2013).

Em geral, quando se utiliza matérias-primas de composição lignocelulósica para a produção de etanol de segunda geração, estas podem ser divididas em cinco grupos principais: resíduos de agricultura (bagaço de cana-de-açúcar, palha de milho, palha de trigo, palha e casca de arroz, palha de cevada, bagaço de sorgo, caroços de azeitona e celulose), coníferas e folhosas, resíduos de celulose (papel de jornal, papel de escritório), biomassa herbácea (feno, gramíneas) e resíduos sólidos municipais (BARCELOS, 2012).

Conforme pode ser observado na Figura 8, as matérias-primas de composição lignocelulósica são geralmente formadas por estruturas rígidas e fibrosas compostas por celulose, hemicelulose e lignina, cuja composição depende de alguns fatores, como a espécie da planta, idade, tempo de colheita, condição ou o estágio de crescimento. A fração de celulose se apresenta em maior proporção, variando entre 35 e 50%, seguido das frações de hemicelulose (20 – 35%) e lignina (10 – 25%). Adicionalmente, cinzas, compostos fenólicos, ácidos graxos e outros constituintes, denominados extrativos, compõem a fração remanescente destas biomassas vegetais (SAHA, 2003; OLIVEIRA, 2007; BARCELOS, 2012).

Portanto, nas tecnologias para a obtenção de etanol de segunda geração, a partir de matéria-prima de composição lignocelulósica, há necessidade de hidrólise dos polissacarídeos da biomassa em açúcares fermentáveis e sua posterior

fermentação. O processo de hidrólise utiliza tecnologias complexas e multifásicas, com base no uso de pré-tratamentos da biomassa para a separação dos açúcares e remoção da lignina que pode ser aproveitada para cogeração de energia (PEREIRA Jr. *et al.*, 2008).

De acordo com Silva (2013), os processos de pré-tratamento e hidrólise devem ser projetados para melhorar o processo de fermentação, disponibilizando açúcares com 5 ou 6 átomos de carbono, oriundos das etapas de pré-tratamentos das frações de hemicelulose (formada por monossacarídeos com 5 e 6 átomos de carbono) ou de celulose (formada por monossacarídeos com 6 átomos de carbono).

Agentes químicos eram utilizados como catalisadores da hidrólise total da biomassa que continha matéria-prima de composição lignocelulósica.Entretanto, durante o processo ocorre a formação de hidrolisados com alto número de compostos inibidores da fermentação, necessitando, dessa forma, de etapas como a destoxificação, impedindo a realização da fermentação simultaneamente ao processo hidrolítico. Dessa forma, devido ao baixo desempenho desse processo, novas concepções tecnológicas foram concebidas com o intuito de se alcançar maiores valores de eficiência (FAIRNBANKS, 2003; BETANCUR, 2010).

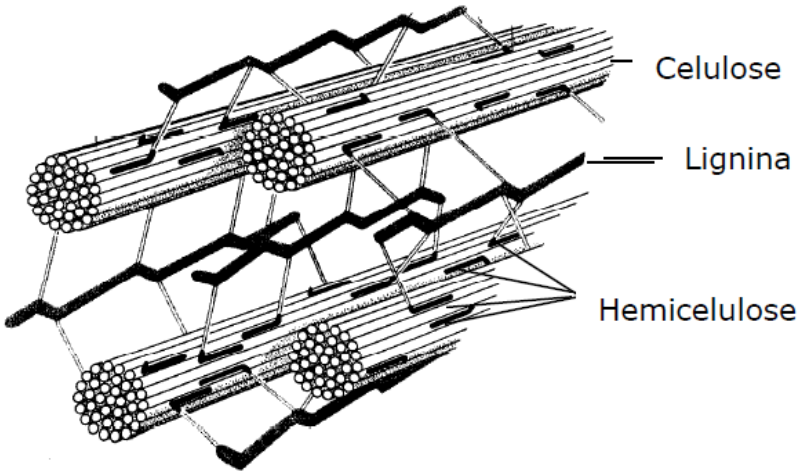

Figura 8. Esquema estrutural de matéria-prima lignocelulósica.
Fonte:Betancur, 2010; adaptado de Shleser, 1994.

Um pré-tratamento é considerado bom se a acessibilidade ao ataque biológico, isto é, das enzimas, é maximizada e a formação dos sub-produtos inibidores é

minimizada. Os diferentes tipos de pré-tratamento, aplicados a materiais lignocelulósicos para clivar as ligações das macroestruturas, podem ser classificados como físicos, físico-químicos, químicos e biológicos (BORGES, 2011).

Os pré-tratamentos físico-químicos são utilizados para aumentar a susceptibilidade do material lignocelulósico ao ataque enzimático. Caracterizam-se pelo tratamento do material em elevadas pressões e temperaturas, e o posterior resfriamento rápido (BORGES, 2011). São eles: explosão a vapor ou auto-hidrólise, explosão por amônia e explosão por CO_2. No caso dos pré-tratamentos químicos, utiliza-se agentes químicos para romper as frações da lignocelulose, tais como: hidrólise ácida, ozonólise, hidrólise alcalina, deslignificação oxidativa e processo *organosolv* (BORGES, 2011).

Nos pré-tratamentos biológicos são utilizados biocatalisadores (enzimas) para clivar seletivamente as ligações presentes no material lignocelulósico. Em outros casos são utilizados micro-organismos, principalmente, actinomicetos e fungos basidiomicetos, para a degradação total do material (SUN & CHENG, 2002).

O desenvolvimento de novas concepções tecnológicas para o pré-tratamento da biomassa é necessário para tornar a celulose mais acessível à atuação das enzimas, para posterior hidrólise da hemicelulose. Concernente com essa realidade, quatro concepções, em diferentes estágios de desenvolvimento, onde a hidrólise enzimática é integrada a diferentes rotas, são possíveis. São elas: hidrólise e fermentação em etapas separadas (método tradicional, menos eficiente), sacarificação e fermentação simultânea, sacarificação com co-fermentação simultânea e bioprocesso consolidado (BETANCUR, 2010; HAMELINCK, 2005; DRABER, 2013; BARCELOS, 2012). No bioprocesso consolidado ocorre o máximo de integração, uma vez que em um único biorreator ocorre tanto a hidrólise de polissacarídeos, a fermentação, como a produção de enzimas, realizados pelo mesmo micro-organismo. Recentemente, o fungo *Paecilomyces variotii*, apresentou taxas similares de fermentação de glicoses e xiloses (LYND *et al.*, 2005; KENNES *et al.*, 2016).

Outra tecnologia que tem se apresentado como emergente e portadora de futuro é a produção de combustíveis líquidos a partir da bioconversão de gás de síntese. Essa tecnologia utiliza uma grande variedade de matérias-primas, entre elas

bagaço de cana-de-açúcar, resíduos sólidos urbanos e qualquer outra matéria orgânica carbonácea. Essa rota, que é um processo híbrido, combinando uma tecnologia termoquímica e outra bioquímica, tem ainda como vantagem a utilização de toda a biomassa, incluindo também a lignina, que é um dos maiores gargalos do processo descrito anteriormente (DANIELL, 2012; KENNES *et al.*, 2016).

No processo híbrido, a matéria-prima carbonácea é, então, convertida a gás de síntese via gaseificação, que por sua vez é fermentado por bactérias acetogênicas, produzindo etanol, butanol, ácido acético, ácido butírico e butanol. Os produtos da fermentação dependerão do micro-organismo, bactérias acetogênicas (capazes de fermentar gás de síntese) e das condições que serão empregadas no processo (KENNES *et al.*, 2016). Como essa tecnologia é objeto de estudo e avaliação do presente trabalho, o aprofundamento desse tema é apresentado, de forma detalhada, no tópico a seguir.

2.4 GÁS DE SÍNTESE

Gás de síntese é o nome dado a uma mistura rica em monóxido de carbono (CO), hidrogênio (H_2) e, em alguns casos, dióxido de carbono (CO_2). O gás de síntese pode conter também outros gases como metano e nitrogênio, assim como outros compostos em menores proporções, como óxidos de nitrogênioeH_2S, além de cinzas, etc (KENNES *et al*., 2016). Esse gás serve de matéria-prima para a síntese de produtos químicos e representa uma fonte potencial crescente de combustíveis limpos, sendo um combustível importante para a produção de eletricidade isenta de poluentes atmosféricos, tais como óxidos de enxofre (SOx) (VENTURI, 2012; GEROSA, 2006). A disponibilidade e flexibilidade dos recursos para sua produção são as chaves para os usos atuais e futuros do gás de síntese e de seus componentes em separado (WITTCOFF, 1996).

2.4.1 Matérias-primas para a produção de gás de síntese

Além do metano, o gás de síntese pode ser produzido praticamente a partir de qualquer hidrocarboneto, ou seja, qualquer material carbonáceo incluindo carvão, turfa, madeira, biomassa e resíduos em geral (WITTCOFF, 1996). No entanto, para

produção de combustíveis líquidos (*GTL – gás-to-liquids*), as rotas de menor custo são baseadas em gás natural (WILHELM *et al*., 2001).

A composição do *Syngas* gerado depende do tipo de matéria-prima e do tipo de gaseificador. Alguns parâmetros importantes em termos de características de matéria-prima incluem a sua composição, umidade e teor de alcatrão ou tamanho de partícula (KENNES *et al*., 2016).

Com o crescimento das grandes cidades e o aumento crescente do consumo pela população, uma matéria-prima que vem crescendo em importância para esse fim, são os resíduos sólidos urbanos (RSU). A Associação Brasileira de Limpeza Pública e Resíduos Especiais (ABRELPE) observou que, entre 2007 e 2010, 42% dos RSU do país (23,7 milhões de toneladas) receberam destinação inadequada em lixões a céu aberto e de 2011 para 2012 a geração de RSU no Brasil cresceu 1,3%, índice superior à taxa de crescimento populacional urbano no país no mesmo período, que foi de 0,9% (ABRELPE, 2012).

O Quadro5apresenta a composição média dos RSU no Brasil (ALCANTARA, 2010), onde 64% é constituído de matéria orgânica que pode ser utilizada no processo de pirólise.

Quadro 5. Composição gravimétrica média dos resíduos sólidos gerados no Brasil.

Material/Amostra	%
Matéria orgânica	64
Papelão	5
Papel	8,5
Plástico rígido	2
Plástico maleável	2,7
Metais	1,5
Vidro	1,5
Outros	14,8
Total	100

Fonte: Alcântara, (2010).

Na China tem-se avaliado a incineração de resíduos sólidos urbanos (RSU), que tem como vantagens a recuperação de energia e a redução de volume do peso. Entretanto, como a proteção ambiental torna-se cada vez mais importante no controle

das emissões resultantes da incineração dos RSU se faz necessário fornecer uma solução ambientalmente amigável e mais eficiente (CALAMINUS e STAHLBERG, 1998).

Atualmente, encontra-se em desenvolvimento no Brasil um projeto que utiliza Tecnologia de Pirólise a Tambor Rotativo (UTR-PLTR), implantado como unidade piloto no município de Boa Esperança-MG. Esse projeto tem como principal objetivo a solução técnica para o tratamento de RSU, combinada com a capacidade de minigeração de energia, menor que 1 MW, atendendo o item de descentralização da geração de energia segundo as diretrizes das políticas públicas de desenvolvimento na área de infraestrutura (RODRIGUES *et al*., 2014).

2.4.2 Processos para obtenção de gás de síntese

O gás de síntese pode ser obtido pelo processo de gaseificação, que pode ser definido como o processo de conversão termoquímica de um material sólido ou líquido (que contém carbono na sua composição) em um combustível gasoso. (LORA *et al*., 2012).

O processo de gaseificação pode ser descrito por um conjunto de reações químicas, sendo que estas ocorrem em diferentes regiões do gaseificador (para o caso dos reatores de leito fixo) ou simultaneamente em todo o volume do mesmo (para o caso dos reatores de leito fluidizado). As principais reações químicas presentes em processos de gaseificação ocorrem nos processos de reforma a vapor, oxidação parcial e pirólise (LORA *et al*., 2012).

2.4.2.1 Reforma a vapor

A tecnologia comercial predominante para produção de gás de síntese tem sido e continua sendo a reforma a vapor. Nesse processo, metano e vapor são cataliticamente e endotermicamente convertidos em gás de síntese, com uma razão molar H_2/CO de 3:1, ocorrendo em altas temperaturas, sem a formação de produtos intermediários (WILHELM *et al*., 2001), segundo a Equação (1).

$CH_4 + H_2O \leftrightarrow CO + 3H_2 \quad \Delta H^{o}298 = 206$ (kJ/mol) Equação(1)

$CO + H_2O \leftrightarrow CO_2 + H_2 \quad \Delta H^{o}298 = -41$ (kJ/mol) Equação(2)

$CO + 3H_2 \leftrightarrow CH_4 + H_2O \ \Delta H^o298 = -206$ (kJ/mol) Equação(3)

As reações (2) e (3) estão presentes no processo industrial para a produção de hidrogênio. A reação (2) é a reação de deslocamento da água (reação de shift), favorecida a baixas temperaturas e pouco afetada por variações de pressão. A reação (3) é a reação de metanação, que é reversível nas temperaturas do processo de reforma e visa eliminar o CO residual (VASCONCELOS, 2006).

2.4.2.2 Oxidação parcial

Uma abordagem alternativa é a oxidação parcial, que é uma reação exotérmica não catalítica de metano e oxigênio para produzir uma mistura de gás de síntese.A oxidação parcial pode ser utilizada para diferentes tipos de hidrocarbonetos, incluindo combustíveis pesados e hidrocarbonetos sólidos. O problema desse tipo de reação é que na maioria das vezes precisa-se de oxigênio puro para as reações, assim como uma altíssima temperatura (1300-1400°C) de operação. A Equação (4) representa o processo de oxidação parcial (ABREU, 2012).

$C_nH_{2n+2} + 0{,}5\ n\ O_2 \leftrightarrow nCO + (n+1)\ H_2$ Equação(4)

A reforma a vapor e a oxidação parcial produzem, inerentemente, misturas de gás de síntese com composições sensivelmente diferentes. Em particular, a reforma a vapor produz um gás de síntese com uma razão H_2/CO muito mais elevada, o que é uma vantagem em aplicações de produção de hidrogênio (WILHELM *et al*., 2001).

2.4.2.3 Pirólise

A pirólise consiste na degradação térmica de hidrocarbonetos na ausência de oxigênio (CONTI, 2009). Este processo requer uma fonte externa de calor para aquecer a matéria e podendo fazer a temperatura variar de 300ºC a mais de 1000°C. Entretanto, tem se observado que qualquer processo térmico com temperaturas superiores a 300°C na ausência de oxigênio são considerados métodos de pirólise, o que torna o termo extremamente abrangente. Inicialmente, é possível fazer uma distinção quanto aos parâmetros de operação, como tempo de residência dos resíduos, a temperatura a qual ele é submetido e a composição do gás produzido depende do tipo de gaseificador e do resíduo utilizado, entre outros (CONTI, 2009):

(i) Pirólise Lenta - Processo a temperaturas superiores a 400°C e longos períodos de residência (40min – 1hora) em que a proporção dos produtos obtidos normalmente é 30% líquidos, 35% carbonáceos e 35% gases;

(ii)Pirólise Rápida - Processo a temperatura entre 400°C e 600°C e períodos de residência curtos (t < 2 seg) em que a proporção dos produtos obtidos normalmente é de 75% líquidos, 12% carbonáceos e 13% gases;

(iii) *Flash* Pirólise - Processo a temperaturas superiores a 800°C e períodos de residência curtos (t ~ 1 seg), a proporção dos produtos obtidos normalmente é de 5% líquidos, 10% carbonáceos e 85% gases.

A pirólise de matéria orgânica, incluindo matéria-prima lignocelulósica, permite a transformação da biomassa em três frações: sólida, gasosa e líquida (esta última considera os gases condensáveis da fração gasosa). A fração sólida consiste,principalmente, em cinzas e carbono (dependendo da temperatura empregada no processo), que podem ser utilizados como combustível ou na fabricação de carvão ativado por meio da sua posterior ativação com CO_2 e/ou vapor de água. A fração gasosa é também combustível, sendo composta por gás de síntese e outros hidrocarbonetos (LORA, *et al*., 2012).

Segundo Méier e Faix (1999), a fração líquida, também chamada de óleos pirolíticos, ou bio-óleo, é uma mistura complexa de componentes aromáticos e alifáticos oxigenados. Os óleos pirolíticos são alcatrões (hidrocarbonetos) que possuem igualmente um importante conteúdo energético, e podem ser aproveitáveis em câmaras de combustão, motores a diesel e turbinas entre outros (CHIARAMONTI *et al.*, 2007; LORA, *et al*., 2012).

A pirólise rápida é um processo relativamente novo, que ainda não atingiu o estágio comercial. Neste processo, partículas de biomassa relativamente pequenas (< 6 cm) são rapidamente aquecidas até temperaturas em torno de 650ºC e pressões ligeiramente superiores à atmosférica (BIOMASS, 2011). A Figura 9 mostra o mecanismo e a formação dos produtos durante a pirólise rápida e suas frações típicas (MÉIER, 2006).

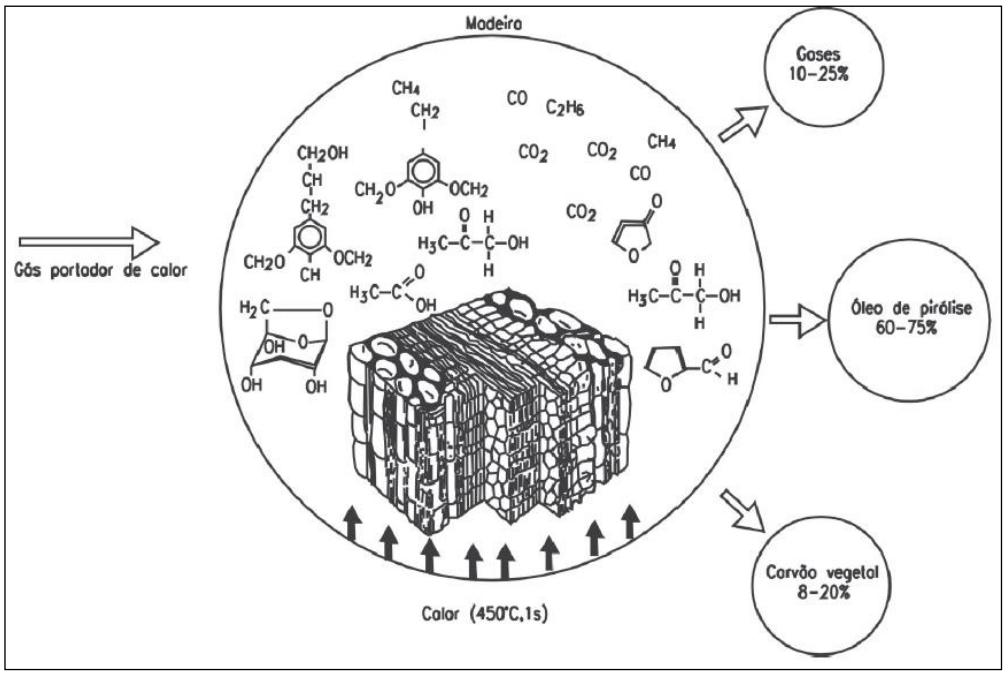

Figura 9. Mecanismo e distribuição dos produtos no processo de pirólise rápida.Fonte: Lora et al., (2012); adaptado de Méier (2006).

2.4.3 Aplicações de gás de síntese

O gás de síntese é utilizado para gerar eletricidade e também para a obtenção de produtos químicos. A amônia é, de longe, o produto químico mais importante obtido a partir de gás de síntese e consome cerca de 5% da produção mundial de gás natural. O metanol é o segundo produto químico importante feito a partir do gás de síntese e é a base para a produção de metil-terc-butil-éter (MTBE), formaldeído e ácido acético (ABREU, 2012).

A amônia é produzida utilizando o processo Haber-Bosch. Esse processo requer uma razão decomposição $N_2/3H_2$(1 mol de N_2 reage com 3 moles de H_2 para originar 2 moles de NH_3) e deve ser realizado a pressões elevadas e à temperatura mais baixa possível. Esse processo é realizado a uma pressão de cerca de 250 bar, a uma temperatura de 450 °C e a mistura passa sobre um catalisador de óxido de ferro. Contudo, as conversões são baixas (cerca de 10% por cada passo), o que exige uma grande reciclagem do gás de síntese que não reagiu. Aproximadamente 75% da produção de amônia é utilizada para produção de fertilizantes principalmente como sais de amônio ou sob a forma de uréia (RIBEIRO, 2013).

Já o metanol, é produzido num conversor na presença de catalisador a base de Cu-Zn-Cr, a 50-100 bar (49 – 99 atm) e temperatura na faixa de 250°-260°C, de acordo com a Equação 5 (AQUINO, 2008):

$CO + 2H_2 \leftrightarrow CH_3OH \ \Delta G^o = -25$ kJ/mol. Equação(5)

A razão estequiométrica de H_2/CO no gás de síntese é ajustada para 2:1. O rendimento de metanol obtido é de 61%.

Outra aplicação que vem surgindo nos últimos anos é a tecnologia de fermentação de gás de síntese utilizando micro-organismos acetogênicos para produção de etanol e outros bioprodutos. O presente trabalho visa utilizar essa rota emergente para a síntese de etanol.

2.5 PRODUÇÃO DE ETANOL A PARTIR DE GÁS DE SÍNTESE POR ROTA BIOTECNOLÓGICA

Segundo Kopke (2011), a rota bioquímica de fermentação de gás de síntese oferece uma via para a produção de grandes volumes de combustíveis e produtos químicos a partir de gases obtidos da pirólise de biomassa e resíduos sólidos urbanos. Esse processo híbrido integra as rotas termoquímica e bioquímica combinando a gaseificação da biomassa e a fermentação anaeróbica (WILKINS, 2011).

A bioconversão de gás de síntese em etanol e outros bioprodutos é considerada muito atrativa devido à utilização de toda a composição da biomassa, incluindo a lignina; a eliminação do complexo processo de pré-tratamento da biomassa e os custos de enzimas; a alta especificidade do biocatalizador (micro-organismo); a independência da razão H_2:CO para a bioconversão; a esterilização da fermentação utilizando as altas temperaturas do processo de geração de gás de síntese; a operação em condições ambientais; e o contorno do problema de envenenamento de catalisadores pelos metais, uma vez que utiliza micro-organismos (MUNASINGHE, 2010).

Como exemplos de utilização de tecnologias de produção de etanol através da gaseificação de biomassa seguida por fermentação por bactérias acetogênicas tem-se as empresas INEOS Bio, Coskata e Lanza Tech (RENEWABLE FUELS ASSOCIATION, 2014).

Diferentes bactérias têm sido relatadas por produzirem etanol a partir de CO e CO_2 como a sua única fonte de carbono, incluindo *Clostridium ljungdahlii*, *Clostridium autoethanogenum*, *Eubacteriumlimosum*, *Clostridium* sp. Strain P11 (*Clostridium ragsdalei*), *Alkalibaculumbacchi* e *Clostridium carboxidivorans* (WIKINS, 2011). A seguir, as características de algumas espécies serão destacadas, assim como, o metabolismo de produção de etanol.

2.5.1 Bactérias acetogênicas fermentadoras de gás de síntese

Foram descobertas várias bactérias acetogênicas anaeróbicas que crescem autotroficamente sintetizando materiais celulares a partir de substratos inorgânicos simples como CO, H_2, CO_2, água, e minerais. Estes organismos produzem energia para o crescimento a partir da conversão das espécies reduzidas, CO ou H_2, a ácido acético pela via acetogênica proposto por Ljungdahl e Wood (PHILIPS *et al*., 1994).

As bactérias acetogênicas são anaeróbias obrigatórias e capazes de assimilar vários substratos como monóxido de carbono, dióxido de carbono e hidrogênio, metanol e também ácidos graxos (MOHAMMADI, 2011).

No presente trabalho serão utilizadas cepas de três diferentes espécies,*Clostridium ljungdahlii, Clostridium carboxidivorans e Clostridium ragsdalei*, que serão destacadas a seguir.

2.5.1.1 Clostridium ljungdahlii

Em 1987, *Clostridium ljungdahlii*, uma bactéria anaeróbia gram-positiva, foi descoberta e verificou-se sua capacidade de converter o monóxido de carbono e hidrogênio em etanol e acido acético. Desde então, tem sido desenvolvido um grande número de pesquisas em fermentação de gases e também desenvolvimento de processos com diferentes configurações de biorreatores a fim de melhorar a transferência de massa (MUNASINGHE, 2010).

A cepa *Clostridium ljungdahlii* DSM 13528 (TANNER *et al*., 1993) está depositada na coleção de cultura da empresa alemã DSMZ (Leibniz Institute DSMZ-German Collection of Microorganisms and Cell Cultures). Cepa isolada de resíduo de galinheiro, *C. ljungdahlii* DSM 13528 é um anaeróbio em forma de bastonete gram-positivo que é capaz de fermentar os açúcares como a xilose e a frutose e também

gás de síntese. Sendo um micro-organismo acetogênico, favorece a produção de ácido acético durante o seu crescimento e o etanol é um produto não associado ao crescimento (KLASSON *et al*., 1992). O pH possui efeito sobre o crescimento e formação do produto. A produção de ácido acético é favorecida em pH mais elevado (5,0 a 7,0) enquanto que a produção de etanol é favorecida em pH mais baixos (4 a 4,5) e sua temperatura ótima é de 37°C.

2.5.1.2 Clostridium carboxidivorans

A mais recente espécie de *Clostridium,Clostridium carboxidivorans* foi isolada de uma lagoa de decantação agrícola.É móvel, gram-positiva, forma esporos e é acetogênica, produzindo etanol, ácido acético, butirato e butanol como produtos finais, sendo essa bactéria capaz de fermentar CO e CO_2(BRUANT, 2010).

Segundo Liou *et al.*(2005), a espécie *Clostridium carboxidivorans* possui diferentes taxas específicas de crescimento em diferentes substratos como frutose, CO/CO_2, H_2/CO_2 (0,32 h^{-1}; 0,16 h^{-1}; 0,12 h^{-1}, respectivamente). A faixa ótima de pH situa-se entre 5,0 e 7,0 e a de temperatura entre 37ºC e 40ºC.

A cepa *Clostridium carboxidivorans* DSM 15243 (LIOU *et al.*, 2005) está depositada na empresa alemã DSMZ.

2.5.1.3 Clostridium ragsdalei

A cepa *Clostridium ragsdalei* DSM 15248 (LIOU *et al*., 2005) está depositada no banco de cepas da empresa alemã DSMZ. A cepa foi isolada por Dr. Ralph Tanner, da Universidade de Oklahoma. É uma bactéria anaeróbia, isolada de fezes de pato. É móvel, gram-positiva, é acetogênica e sua temperatura ótima é de 35°C.

Segundo Saxena e Tanner (2006),*Clostridium ragsdalei,* espécie também conhecida como *Clostridium* P11,foi capaz de fermentar CO e apresentou produção de 200 mM etanol em fermentação em batelada. Em outro estudo esta cepa após fermentar gás de síntese em biorreator de mistura (CSTR) com volume de 100 L após 59 dias de fermentação e temperatura de operação de 37°C, foi capaz de produzir 25,26 g/L etanol e 1,89 g/L de etanol em biorreator de batelada após 15 dias de fermentação e temperatura de 32°C. Em biorreator de fibra oca houve a produção de 15 g/L (KUNDIYANA *et al*., 2011; TSAI *et al*., 2009).

2.5.2 Via Metabólica de fermentação de gás de síntese

A produção de etanol através da fermentação acetogênica dos substratos gasosos (CO, CO_2 e H_2) segue a rota metabólica proposta por “Wood Ljungdahl” apresentada na Figura 10. Essa rota metabólica apresenta dois caminhos convergentes (uma utilizando como substrato CO_2 e uma outra utilizando CO ou CO_2) para formar acetil-CoA, que por sua vez é transformado em álcool ou ácido orgânico. Nessa rota são necessários equivalentes redutores, que são obtidos pela oxidação de H_2 através da ação da enzima hidrogenase ou oxidação do CO pela enzima monóxido desidrogenase (CODH) (SKIDMORE *et al*., 2013).

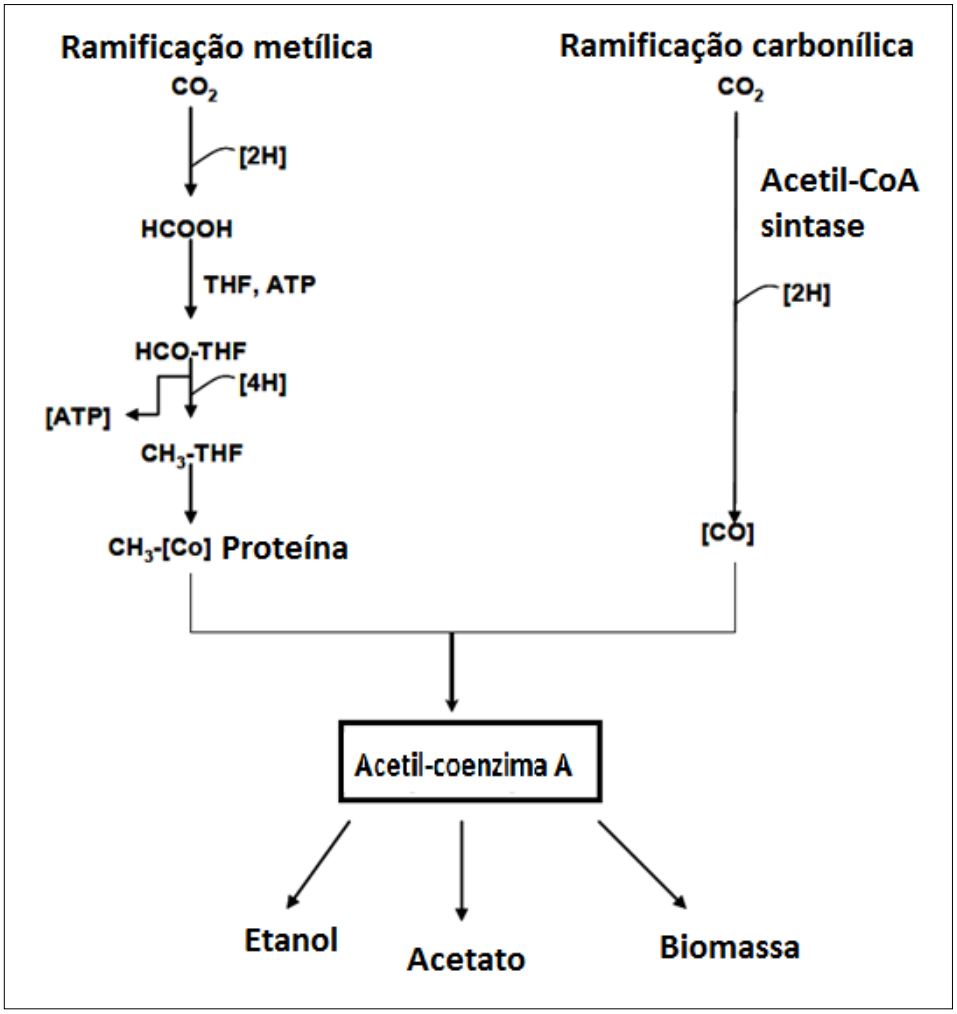

Figura 10. Esquema simplificado da rota acetogênica deacetil- CoA ou Wood-Ljungdahl (THF - tetrahidrofolato). Fonte: Drake (1994).

Análises metabólicas e genôminas indicam que a cepa *Clostridium carboxidivorans* utiliza uma variação da via “Wood-Ljungdahl” (acetil-CoA) (Figura 11), que utiliza gás de síntese como a única fonte de carbono e energia para produzir etanol, butanol, ácido acético e ácido butírico (BRUANT *et al.*, 2010; HEMME *et al*., 2010;LIOU *et al*., 2005). As reações globais de produção de etanol e ácido acético a partir de CO e H_2 e a variação na energia livre de Gibbs a 298 K e100 kPa estão apresentadas nas Equações (6) a (9)(VEJA *et al*., 1989).

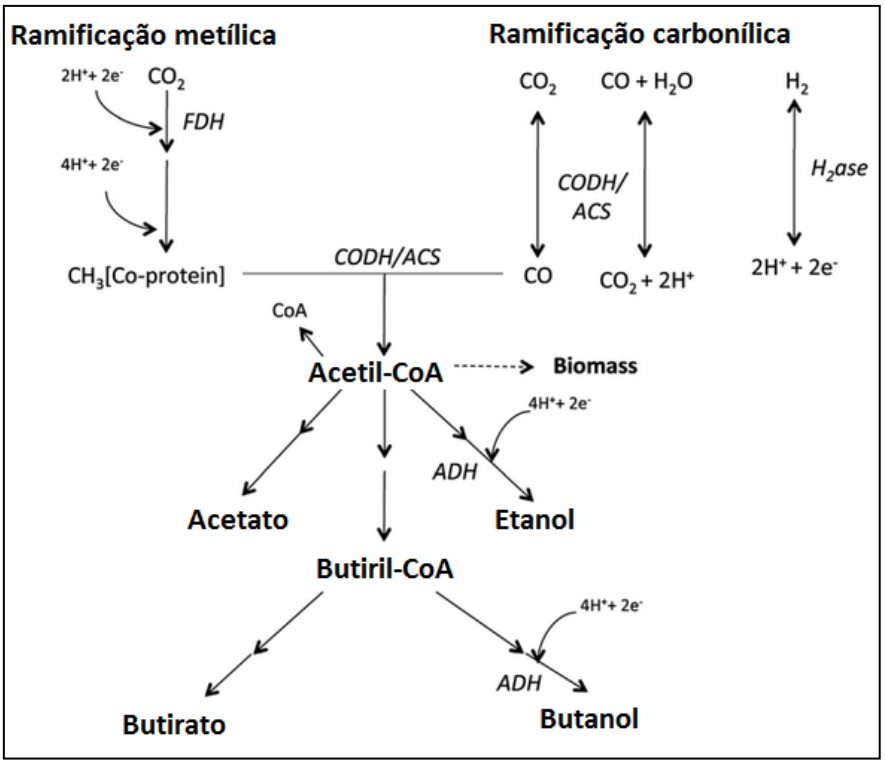

Figura 11. Via metabólica Wood-Ljungdahl de conversão de CO e CO2 a etanol e butanol. As enzimas-chave são: álcool desidrogenase (ADH), desidrogenase de formato (FDH), monóxido de carbono desidrogenase / acetil-CoA-sintetase (CODH / ACS), e hidrogenase (H2ase). Fonte: Ukpong et al.(2012).

$6CO + 3H_2O \rightarrow C_2H_5OH + 4CO_2$ $\Delta G° = -217,4$ KJ/mol Equação(6)

$6H_2 + 2CO_2 \rightarrow C_2H_5OH + 3H_2O$ $\Delta G° = -97,0$ KJ/mol Equação(7)

$4CO + 2H_2O \rightarrow CH_3COOH + 2CO_2$ $\Delta G° = -154,6$ KJ/mol Equação(8)

$4H_2 + 2CO_2 \rightarrow CH_3COOH + 2H_2O$ $\Delta G° = -74,3$ KJ/mol Equação(9)

As equações para produção de butanol e ácido butírico a partir de H_2 e CO estão representadas pelas Equações (10) a (13) (UKPONG *et al*., 2012).

$12CO + 5H_2O \rightarrow C_4H_9OH + 8CO_2$ $\Delta G° = -486,4$ KJ/mol Equação(10)

$12H_2 + 4CO_2 \rightarrow C_4H_9OH + 7H_2O$ $\Delta G° = -245,6$ KJ/mol Equação(11)

$10CO + 4H_2O \rightarrow CH_3(CH_2)_2COOH + 6CO_2$ $\Delta G° = -420,8$ KJ/mol Equação(12)

$10H_2 + 4CO_2 \rightarrow CH_3(CH_2)_2COOH + 6H_2O \quad \Delta G° = -220,2$ KJ/mol Equação(13)

2.5.3 Condições de cultivo para produção de etanol por bactérias acetogênicas

Atualmente micro-organismos conhecidos capazes de fermentar o gás de síntese em etanol e outros produtos biológicos são predominantemente mesófilos. A temperatura mais favorável para mesófilos é entre 37 e 40 °C (HENSTRA *et al*., 2007). Micro-organismos mesófilos, por exemplo, *Clostridium aceticum*, *Acetobacterium woodii*, *C. carboxidivorans* e *C. ljungdahlii* têm sido amplamente estudado em fermentação gás de síntese (YOUNESI *et al*., 2005).

A gama de pH mais favorável para a atividade microbiana eficaz varia entre 5,8 e 7,0, dependendo da espécie (KLASSON *et al*., 1993). Younesi *et al*. (2005) examinaram a produção de etanol e de ácido acético na fermentação de gás de síntese usando *C. ljungdahlii* selvagem, descobrindo que este micro-organismo produz, principalmente, o ácido acético com uma razão de etanol/ácido acético de 0,05, e concentrações de etanol de 0,6 g/L.

Phillips *et al*. (1993) relataram uma melhora drástica na produção de etanol com *C. ljungdahlii* quando o pH baixou para 4,0-4,5 e um meio limitado em nutrientes foi usado. A concentração de etanol correspondente foi de 20 g/L com uma concentração de ácido acético de apenas 2-3 g/L num biorreator de mistura completa utilizando gás de síntese derivado do carvão. Os autores relataram uma concentração máxima de etanol de 48 g/l utilizando o recíclo de células em um biorreator de mistura completa após 560 h de funcionamento. A concentração de ácido acético correspondente foi de cerca de 3 g/l.

Várias enzimas estão envolvidas na conversão de CO em acetil CoA e na subsequente produção de metabólitos tais como ácido acético, etanol ou butanodiol. Algumas dessas enzimas têm metais em seus sítios ativos. Portanto, a presença ou ausência de metais traços específicos nos meios de cultura pode afetar a bioconversão do gás de síntese (KENNES *et al*., 2016).Em uma publicação recente, foi relatado que o aumento das concentrações de níquel, zinco, selênio e tungstênio melhorou a produção de etanol em *C. Ragsdalei* (SAXENA e TANNER, 2011).

Abubackar *et al*. (2015) mostraram que a utilização de um meio nutritivo sem selênio e sem qualquer solução vitamínica, mas com a adição de tungstênio, resultou na produção significativa de etanol por *C. autoethanogenum* em um biorreator contínuo alimentado a gás, sem acúmulo de ácido acético.

Em quase todos os estudos de bioconversão CO/gás de síntese, as vitaminas são adicionadas e consideradas uma parte essencial do meio de cultivo. No entanto, observou-se recentemente que, em experimentos em frascos de penicilina em batelada, a adição de vitaminas não teve qualquer influência significativa no crescimento e na formação de produtos tais como o etanol (ABUBACKAR *et al*., 2015).

Quadro 6. Comparação de diferentes estudos de fermentação de gás de síntese utilizando bactérias acetogênicas para a produção de etanol em diferentes configurações de reatores.

Tipo de reator	Composição do gás de sintese (%)	Micro-organismo	Etanol (g/L)	Etanol/Ác. Acético	Referência
HFM-BR	CO (20), H2 (5), CO2 (15), N2 (60)	*C. carboxidivorans* P7	23,93	4,79	(SHEN *et al*.,, 2014a)
MBR	CO (20), H2 (5), CO2 (15), N2 (60)	*C. carboxidivorans* P7	4,89	2,1	(SHEN *et al*., 2014b)
STR	CO (55), H2 (20), CO2 (10), Ar (15)	*C. ljungdahlii*	6,5	1,53	(MOHAMMADI *et al*., 2012)
STR	CO (100)	*C. autoethanogenum*	0,867	NA	(ABUBAKAR *et al*., 2015)
STR	CO (20), H2 (5), CO2 (15), N2 (60)	*C.rasgdalei* P11	25,26	6,8	(KUNDIYANA *et al*., 2010)
CSTR-BC	CO (60), H2 (35), CO2 (5)	*C.ljungdahlii* ERI-2	19,73	3	(RICHTER *et al*., 2013)
CSTR (com reciclo de células)	CO (55), H2 (20), CO2 (10), Ar (15)	*C. ljungdahlii*	48	21	(PHILLIPS *et al*., 1993)
ICR	CO (13), H2 (14), CO2 (5), N2 (68)	*C.ljungdahlii* ERI-2	2,74	0,64	(GADDY*et al*., 2000)

Abreviações: HFM-BR, *Hollow fiber membrane biofilm reactor* (Reator de biofilme aderido à membrana de fibra oca); MBR, *Monolith biofilm reactor* (reator de biofilme aderido à monolito); CSTR; *Continuous stirred tank reactor with continuous liquid and gas flow* (reator contínuo de mistura completa com fluxo contínuo de líquido e gás; STR, *Stirred tank reactor with liquid batch* (reator de mistura completa operando em batelada); CSTR-BC, CSTR-*bubble column* (coluna de bolhas); ICR, Immobilized cell reactor (reator com células imobilizadas). Razão Etanol/ácido acético é representada em concentração molar. Fonte: Kennes*et al*.(2016).

Com o objetivo de reduzir o custo dos meios de cultivo utilizados na produção de bioetanol, alguns pesquisadores verificaram a possibilidade de trabalhar com meios de cultivo de baixo custo que poderiam substituir os caros meios de cultivos padrão. Meios nutritivos como a milhocina e o extrato de sementes de algodão foram testados em estudos de bioconversão, substituindo o extrato de lêvedo (KUNDIYANA

et al., 2010). Em um estudo realizado em frascos de 250 mL para comparar o efeito da substituição de extrato de lêvedo por milhocina, obteve-se cerca de 84% mais massa celular com 10 g/L de milhocina do que com 1 g/L de extrato de lêvedo (MADDIPATI *et al*., 2011).

Além do custo relacionado aos constituintes utilizados no preparo do meio de cultivo, outro importante desafio relacionado a essa tecnologia está relacionado a transferência de massa, visto que o gás de síntese apresenta baixa solubilidade no meio reacional. Sendo assim, diferentes configurações de biorreatores têm sido estudadas buscando um aumento de produtividade na bioconversão de gás de síntese em etanol (KENNES *et al*., 2016), como mostra o Quadro 6.

2.6 INNOVA ENERGIAS RENOVÁVEIS

A idéia para a pesquisa relacionada ao presente trabalho nasceu de uma parceria com a empresa INNOVA Energias Renováveis, que buscava uma alternativa para o aproveitamento do gás de síntese gerado a partir de biomassa.

A INNOVA Energias Renováveis é uma empresa Brasileira, que atua no Setor Energético, com larga experiência em desenvolvimento de projetos, implantação, estruturação econômico-financeira e operação de usinas de geração de energia.

Após um profundo estudo de alternativas tecnológicas, a INNOVA estabeleceu parceria tecnológica com a empresa italiana MAIM Engineering Srl, devidamente registrada no INPI, que garante à INNOVA licença exclusiva para a fabricação e comercialização de unidades de Pirólise Lenta a Tambor Rotativo nas Américas do Sul e Central.

A tecnologia MAIM/INNOVA possui aplicação demonstrada na Itália para uma ampla gama de resíduos sólidos, obtendo gás de síntese limpo com alto poder calorífico. Esta tecnologia é comercializada no Brasil e nas Américas do Sul e Central com exclusividade pela INNOVA Energias Renováveis.

O processo consiste em uma evolução da tecnologia de pirólise a tambor rotativo, através da qual os hidrocarbonetos sofrem degradação térmica na ausência de oxigênio. A tecnologia MAIM/INNOVA permite a conversão de aproximadamente 90% do conteúdo orgânico da biomassa ou resíduos orgânicos em gás de síntese.

A partir da biomassa seca inserida no processo, a tecnologia MAIM/INNOVA permite uma obtenção de 67% da massa inicial na forma de gás de síntese (já considerado o consumo interno para alimentação do processo), ou seja, caso forem inseridas 10 toneladas de biomassa seca, a produção líquida de gás de síntese será de 6,7 toneladas, aproximadamente, disponível para a conversão em etanol.

Embora a tecnologia MAIM/INNOVA esteja pré-disposta para a utilização do gás de síntese limpo em grupos geradores a gás para produção de energia elétrica, o baixo valor de mercado deste insumo no país e a baixa eficiência elétrica dos ciclos termodinâmicos tradicionais tornam a economicidade dos empreendimentos pouco atrativa, incentivando formas alternativas de aproveitamento do gás de síntese.

Devido à simplicidade dos processos biológicos frente a processos catalíticos como Fischer-Tropsch e também devido à fácil colocação do produto etanol no mercado brasileiro, decidiu-se pelo desenvolvimento experimental de tecnologia de fermentação de gás de síntese para a síntese de biocombustível, similar a tecnologias em fase pré-comercial existentes no mundo (COSKATA).

3 JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS

A Política Nacional de Resíduos Sólidos (PNRS), fundamentada na Lei nº12.305 de 2010, tem como princípio a responsabilidade compartilhada entre governo, empresas e população e propõe mudanças com relação ao manejo e destinação, ambientalmente adequadas, dos resíduos sólidos.

No Brasil, 50% dos municípios destinam seu resíduo sólido a lixões e no Estado do Rio de Janeiro esse número é elevado a 60%. Associados ao problema ambiental desse tipo de descarte estão aproximadamente 40.000 catadores trabalhando no estado do Rio de Janeiro, de forma insalubre, o que gera um enorme problema social. Destaca-se assim a necessidade de uma discussão a respeito do correto direcionamento dos resíduos sólidos.

Neste contexto, uma alternativa para o destino dos resíduos sólidos urbanos visando o seu aproveitamento energético seria o processo térmico, de pirólise e sucessiva valorização do gás de síntese gerado através da sua transformação em um insumo de maior valor agregado.

O Brasil é pioneiro na tecnologia de produção de etanol de primeira geração e vem se destacando nos estudos de obtenção de etanol de segunda geração utilizando o processo de sacarificação acoplada à fermentação. No entanto, a falta de experiência na produção de etanol de segunda geração pela via térmica no país se justifica pela falta de alternativas tecnológicas comprovadas e competitivas na produção de gás de síntese.

Portanto, essa tese se insere em um projeto que propõe a utilização de uma ***tecnologia híbrida*** *que combina o uso de uma* ***tecnologia termoquímica*** *que está sendo implementada pela empresa brasileira "INNOVA Energias Renováveis" para a produção de gás de síntese de baixo custo, e de uma* ***rota bioquímica*** *que consiste na transformação desse gás em biocombustível. A tecnologia de fermentação de gás de síntese por bactérias do gênero Clostridium e sua conversão em etanol é bastante promissora, mas ainda inédita no Brasil, carecendo de incentivos para seu desenvolvimento.*

3.1 OBJETIVOS

O objetivo geral da presente tese reside em produzir etanol a partir da fermentação de gás de síntese utilizando bactérias acetogênicas.

Os objetivos específicos são:

- Selecionar a cepa com maior viabilidade técnica dentre as espécies adquiridas do gênero *Clostridium* em termos de produtividade em etanol;
- Analisar os perfis cinéticos de crescimento e produção de etanol a partir de gás de síntese utilizando a cepa selecionada em diferentes meios de cultivo e diferentes modos de operação;
- Aumentar a produção de células e de etanol a partir de gás de síntese em escala de laboratório (frascos de soro) através da mudança na posição dos frascos;
- Aumentar a produção de etanol e reduzir o custo de operação, através de planejamentos experimentais variando-se a composição do meio de cultivo;
- Monitorar e validar a produção de etanol a partir de gás de síntese em biorreator de bancada com células livres.

4 METODOLOGIAS EXPERIMENTAIS

4.1 MATERIAIS

Os reagentes utilizados para formulação dos meios de cultivo foram: triptona (Fluka), peptona de gelatina (Sigma), extrato de lêvedo (Fluka), glicose P.A. (Vetec), cloreto de sódio (Vetec), L- arginina (Sigma), piruvato de sódio (Sigma), menadiona (Sigma), hemina (Sigma), frutose (Sigma), cisteína (Sigma), biotina(Sigma), ácido fólico (Sigma), piridoxina-HCl (Sigma), tiamina (Sigma), riboflavina(Sigma), ácido nicótico (Sigma), ácido pantotênico (Sigma), vitamina B12 (Sigma), ácido aminobenzóico (Sigma) e ácido lipóico (Sigma).

O gás de síntese sintético foi adquirido na empresa de Gases Especiais White Martins. A composição do gás de síntese selecionada segue de acordo com as especificações do gás de síntese proveniente da pirólise de resíduos urbanos fornecida pela empresa INNOVA Energias Renováveis (40% H_2, 25% CO, 10% CO_2, 10% N_2 e 11% CH_4).

A milhocina utilizada nos ensaios foi obtida na empresa Corn Products, tendo pH 4,0 e os elementos determinados na Tabela 1. A análise foi realizada pelo Laboratório Agronômico S/A.

4.2 EQUIPAMENTOS

Os equipamentos utilizados nos experimentos e nas análises foram:

1) Centrífuga Eppendorf 5804R;

2) Espectrofotômetro Bell SP 2000 UV;

3) Capela de fluxo laminar BioFlux II 90A;

4) Incubador com agitação (*shaker*) Tecnal TE-420;

5) pHmetro Marte MB10;

6) Autoclave vertical Prismatec modelo CS;

7) Biorreator Tecnal TEC-Bio-1,5;

8) HPLC Waters 1525;

9) Detector IR Waters 2414.

Tabela 1. Componentes da Milhocina obtida na empresa *CornProducts*.

Componente	Unidade	Quantidade
Nitrogênio	%	3,41
Fósforo Total	%	1,12
Potássio	%	2,9
Cálcio	%	2
Magnésio	%	0,95
Enxofre	%	0,25
Ferro	mg/Kg	647,5
Manganês	mg/Kg	57,5
Cobre	mg/Kg	22,5
Zinco	mg/Kg	152,5
Boro	%	0,08
Sódio	%	0,08
Carbono Orgânico Total	%	16,72
Capacidade de troca catiônica (CTC)	mmolc/Kg	200
Relação CTC/C	*	11,96
Relação C/N	*	4,9
pH		4
Condutividade Elétrica	mS/cm	1,52
Índice salino	%	14,16
Densidade		1,15
Soma NPK	%	7,43
Biotina	mg/kg	0,3
Colina	mg/kg	3500
Inositol	mg/kg	6000
Niacina	mg/kg	80
Ác. Pantotênico	mg/kg	15
Piridoxina	mg/kg	9
Riboflavina	mg/kg	6
Tiamina	mg/kg	3

4.3 MICRO-ORGANISMOS, MEIOS DE CULTIVO, ATIVAÇÃO E CONSERVAÇÃO

As cepas de *Clostridium* que foram utilizadas no presente trabalho são: *Clostridium ljungdahlii* DSM 13528, *Clostridium carboxidivorans* DSM 15243 e

Clostridium ragsdalei DSM 15248. Essas cepas estão depositadas na coleção de cultura da empresa alemã DSMZ e foram obtidas da mesma.

4.3.1 Meios de cultivos

Para ativação da cepa *Clostridium carboxidivorans* DSM 15243 utilizou-se o meio ATCC 2713, cuja composição encontra-se na Tabela 2. Esse meio foi indicado pela empresa americana ATCC para as etapas de crescimento e manutenção dessa espécie.

Tabela 2. Composição do meio ATCC 2713**.**

Componente	**Concentração (g/L)**
Triptona	10,0
Peptona de gelatina	10,0
Extrato de lêvedo	5,0
Glicose	1,0
NaCl	5,0
L-Arginina	1,0
Piruvato de sódio	1,0
Menadiona	0,0005
Heamina	0,005
pH ajustado para 7,1; autoclavado a 121 ºC	

Para ativação das cepas *Clostridium ljundahlii* DSM 13528 e *Clostridium ragsdalei* DSM 15248 foi utilizado o meio BHI (*Brain Heart Infusion Broth*) da Acumedia (7116), cuja composição encontra-se na Tabela 3.Esse meio foi utilizado para propagação das células que estavam apresentando grande fase lag e dificuldade de propagação dos repiques. Segundo a empresa americana *Becton Dickinson* (BD) que comercializa esse meio de cultivo, ele é conhecido como meio universal para uma grande variedade de micro-organismos por ser um meio de cultivo rico que além de conter nutrientes de cérebro e coração de gado também possui peptona e glicose.

Tabela 3. Composição do meio BHI (*Brain Heart infusion broth*).

Componente	**Concentração (g/L)**

Infusão de cérebro e coração	17,5
Peptona de gelatina	10,0
Dextrose	2,0
Cloreto de sódio	5,0
Fosfato de sódio	2,5
pH ajustado para 7,4; autoclavado a 121 ºC	

Tabela 4. Composição do meio DSMZ (*Leibniz Institute DSMZ-German Collection of Microorganisms and Cell Cultures*) 879**.**

Componente	**Concentração (g/L)**
NH_4Cl	1,0
KCl	0,1
$MgSO_4.7\ H_2O$	0,2
NaCl	0,8
KH_2PO_4	0,1
$CaCl_2.2H_2O$	0,02
Extrato de lêvedo	1,0
$Na_2WO_4.2H_2O$	0,0002
$NaHCO_3$	1,0
Frutose	5,0
HCl de cisteína	0,3
$Na_2S.9H_2O$	0,3
Solução de elementos traços (Tabela 5)	10 mL/L
Solução de vitaminas (Tabela 6)	10 mL/L
pH ajustado para 5,9; autoclavado a 121 ºC	

Para a realização dos experimentos preliminares em frascos de soro, o meio DSMZ 879 (Tabelas 4, 5 e 6) foi testado, pois havia recomendação da empresa alemã DSMZ (*Leibniz Institute DSMZ-German Collection of Microorganisms and Cell Cultures*) para o crescimento das espécies *C. ljungdahlii*; *C. carboxidivorans* e *C. ragsdalei*. Para esses experimentos o meio ATCC 2713 (Tabela 2) também foi utilizado.

Tabela 5. Composição da solução de elementos traços para o preparo do meio DSMZ 879**.**

Componente	**Concentração (g/L)**

Ácido nitriloacético	1,5
$MgSO_4.7H_2O$	3,0
NaCl	1,0
$Fe(SO_4)_2.7H_2O$	0,1
$CoSO_4.7H_2O$	0,18
$CaCl_2.2H_2O$	0,1
$ZnSO_4.7H_2O$	0,18
$CuSO_4.5H_2O$	0,01
$KAl(SO_4)_2.12H_2O$	0,02
H_3BO_3	0,01
$Na_2Mo_4.2H_2O$	0,01
$NiCl_2.6\ H_2O$	0,03
$Na_2SeO_3.5H_2O$	0,0003

Tabela 6. Composição da solução de vitaminas para o preparo do meio DSMZ 879**.**

Componente	**Concentração (mg/L)**
Biotina	2,0
Ácido fólico	2,0
Piridoxina-HCl	10,0
Tiamina-$HCl.2H_2O$	5,0
Riboflavina	5,0
Ácido nicotínico	5,0
D-(+)-pantotenato de cálcio	5,0
Vitamina B12	0,1
Ácido p-aminobenzóico	5,0
Ácido lipóico	5,0

4.3.2 Ativação dos micro-organismos

As cepas liofilizadas foram retiradas da ampola em ambiente estéril e em seguida seu meio de cultivo foi reduzido com N_2, como mostram as Figuras12 (A) e (B). A suspensão de células foi, então, inoculada em frascos de soro com meio de cultivo específico para cada espécie. Para *C. carboxidivorans* DSM 15248 foi utilizado o meio DSMZ 879 e para *C. ljungdahlii* DSM 13528 e *C. ragsdalei* DSM 15248 utilizou-

se o meio BHI. O procedimento foi realizado em câmara anaeróbia e posteriormente, os frascos foram incubados a 150 rpm e 37°C, exceto no caso de*C. ragsdalei* cuja temperatura ótima é em torno de 30 °C. O procedimento descrito esta representado na Figura 12 (C).

Figura 12. Procedimento de ativação das cepas: (A) abertura do frasco contendo a cepa, (B) adição de gás e (C) inoculação nos meios de cultivo específicos em câmara anaeróbia.

4.3.3 Conservação dos micro-organismos

Após procedimento de ativação em câmara anaeróbia, foram realizados repiques em frascos de soro para conservação em geladeira. As culturas microbianas foram, então, mantidas em geladeira (4ºC) em frascos de soro contendo 50 ml do meio líquido ATCC 2713 (*Clostridium carboxidivorans)* e BHI (*Clostridium ljungdahlii* e

Clostridium ragsdalei), fechados com septo de borracha e lacrados com lacre de alumínio.

Com o objetivo de armazenamento por longos períodos, foi utilizado o congelamento em criotubos no qual células foram suspensas em meio contendo 20% de glicerol e armazenadas em ultrafreezer a - 50°C.

4.4 EXPERIMENTOS PRELIMINARES PARA AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ETANOL

A fim de verificar a capacidade da cepa *C. carboxidivorans* DSM 15243em converter gás de síntese em etanol foram realizados experimentos em frascos de soro (Figura 13 A) e em frascos SCHOTT (Figura 13 B).

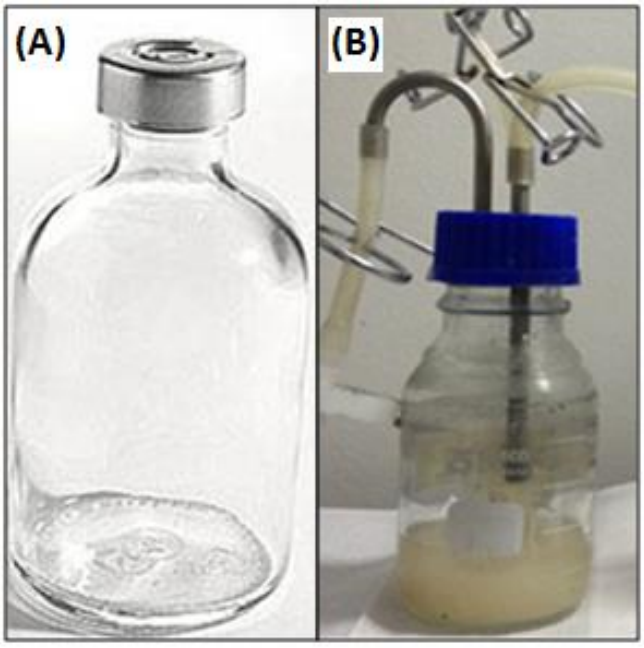

Figura 13. Foto ilustrativa dos frascos de soro (A) e frascos SCHOTT (B) utilizados para realizar experimentos de fermentação de gás de síntese.

4.4.1 Experimentos em frascos de soro

Nos experimentos preliminares o pré-inóculo e os ensaios foram realizados em frascos de soro com capacidade de 65 mL contendo 50 mL de meio de cultivo. Tampas de borracha impermeável à gases e vedação de alumínio foram utilizadas para selar os frascos. Essas tampas eram de borracha butílica, como mostra a Figura

14. Antes de autoclavar o meio de cultivo, um gás isento de oxigênio (nitrogênio ou gás de síntese), cuja composição dependia da estratégia utilizada era borbulhado no líquido, por 1 minuto.

Figura 14. Tampas de borracha butílica utilizada nos ensaios em frascos de soro.Fonte:www.sigmaaldrich.com

Os pré-inóculos eram preparados em meio de cultivo ATCC 2713 sem oxigênio através da adição de gás de síntese. Os frascos eram, então, inoculados com 5 mL de células conservadas na geladeira (4ºC) em meio ATCC 2713 em frascos de soro. Para o aumento da biomassa, na primeira fase de estudo os pré-inóculos eram incubados em agitador rotatório a 150 rpm, 37ºC, em posição vertical, por 24 h.

Após 24 horas, 5 mL de pré-inóculo era transferido, com o auxílio de seringa e agulha estéreis, para os frascos de soro de 65 mL contendo 50 mL do meio de cultivo a ser utilizado no experimento. Para que este meio de cultivo fosse isento de oxigênio, borbulhava-se gás de síntese por 1 min no meio líquido e também se adicionava este gás por 30 segundos no *headspace*(espaço do frasco isento de líquido) do frasco antes da sua esterilização. Esse processo antecedia a adição do inoculo. Após a inoculação era adicionado gás de síntese no *headspace* dos frascos por 30 segundos e estes eram incubados na posição vertical em agitador rotatório a 150 rpm e 37ºC por 120 horas. Os experimentos preliminares foram realizados com amostragem da fase líquida de 12 em 12 horas para análise de concentração celular, etanol, sub-produtos e pH.

Os meios de cultivo testados nos experimentos preliminares com a cepa *C. carboxidivorans* DSM 15243, foram o meio ATCC 2713, o meio DSMZ 879 e meio

contendo apenas peptona a 10 g/L. Os gases testados foram o gás de síntese e o nitrogênio (controle).

4.4.1.1 Experimentos não destrutivos

Para os experimentos chamados de não destrutivos, as amostras eram retiradas de um mesmo frasco e após cada amostragem gás de síntese era adicionado no *headspace* por 30 segundos,para recompor a atmosfera gasosa. A amostragem foi realizada com agulhas e seringas estéreis.

4.4.1.2 Experimentos destrutivos

Durante a realização dos experimentos preliminares pode-se verificar a perda de grande parte do gás de síntese injetado no frasco quanto se espetava a tampa de borracha butílica(Figura 14) com a agulha para retirar amostra. Sendo assim, optou-se por realizar ensaios destrutivos, ou seja, realizou-se o mesmo procedimento citado anteriormente, porém inoculou-se 10 frascos na mesma condição em duplicata e a cada 12 horas dois frascos eram abertos e retirava-se amostra para análise da fase líquida. Esse frasco era “destruído”, ou seja, não era mais utilizado para retirada de pontos experimentais e a amostragem seguinte era realizada em um outro frasco que havia sido inoculado ao mesmo tempo em que este e cultivado nas mesmas condições.

4.4.2 Experimentos em frascos SCHOTT

Visto que a cepa *C. carboxidivorans* DSM 15243 se mostrou capaz de converter gás de síntese em etanol, novos testes foram realizados, porém utilizando frascos SCHOTT, adaptados,com capacidade de 500 mL, como mostra a Figura 15(A).

Os pré-inóculos foram preparados como descrito em 4.4.1. Após 24 horas, todo o conteúdo dos frascos do pré-inóculo foi centrifugado e a biomassa celular foi transferida para o frasco SCHOTT, contendo 200 mL de meio de cultivo, com pH ajustado para 5,0, procedimento foi realizado em câmara anaeróbia. Antes da inoculação. Após a inoculação o frasco SCHOTT era incubado em agitador rotatório a 150 rpm e 37ºC por 48 horas. Após cada amostragem era adicionado de gás de síntese ao frasco por 30 s.

As amostras líquidas foram retiradas com uma seringa estéril de 12 em 12 horas utilizando a saída S2 (Figura 15 B). Em seguida, realizava-se adição de gás de síntese pela entrada (Figura 15 B). Na entrada para gás de síntese acoplou-se uma pedra sinterizada para melhorar a difusão do gás de síntese no meio líquido.

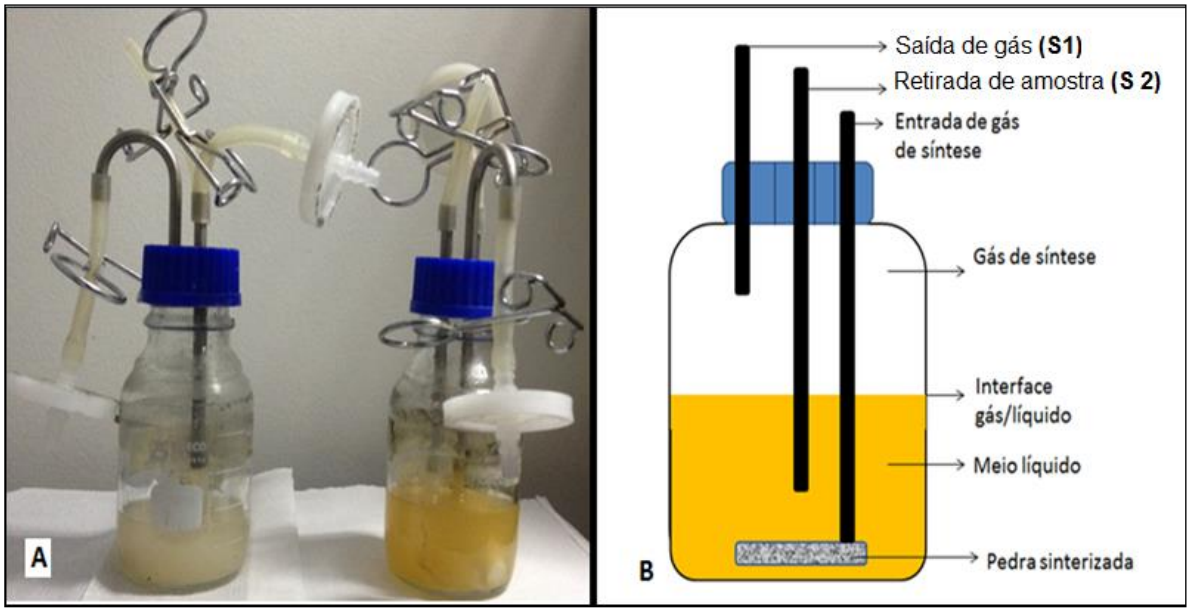

Figura 15. Frascos SCHOTT utilizados para os ensaios em batelada alimentada(A) e o esquema detalhado desses frascos(B).

4.5 AVALIAÇÃO DE NOVA ESTRATÉGIA PARA AVALIAR A TRANSFERÊNCIA DE MASSA EM FRASCOS DE SORO

A partir dos resultados obtidos nos experimentos preliminares, foi selecionado o meio ATCC 2713 para dar continuidade aos estudos de aumento da concentração de biomassa e produção de etanol.

Como as tampas de borracha butílica (Figura 14) mostraram-se ineficientes para manter o ambiente anóxico nos frascos, tampas de clorobutil (Figura 16), que são mais resistentes e com maior espessura (para evitar a saída dos gases), foram adquiridas. Na descrição dos resultados será indicado qual tampa foi utilizada para melhor elucidação dos dados experimentais.

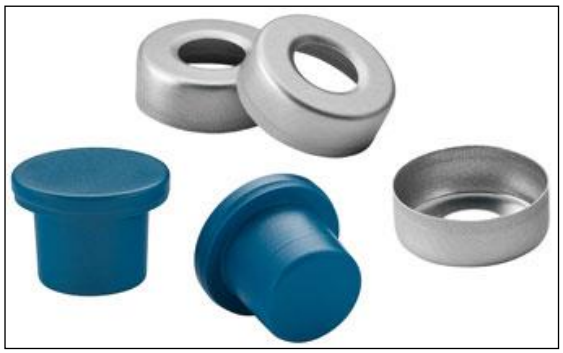

Figura 16. Foto ilustrativa das tampas de borracha de clorobutil utilizadas nos ensaios para vedar e evitar entrada de ar. Fonte:www.belco.com

Assim duas estratégias foram adotadas para estudar o perfil cinético de crescimento celular de *C. carboxidivorans, C. ljungdahlii* e *C. rasgdalei* e selecionar a espécie com maior produtividade de etanol, como também o incremento do crescimento celular. Para tanto, utilizou-se uma estratégia de mudança na posição na incubação dos frascos de soro (vertical e horizontal) no agitador rotatório, objetivando avaliar o aumento da transferência de massa no sistema. Os ensaios foram conduzidos em agitador rotatório a 150 rpm e 37°C, o esquema está apresentado na Figura 17.

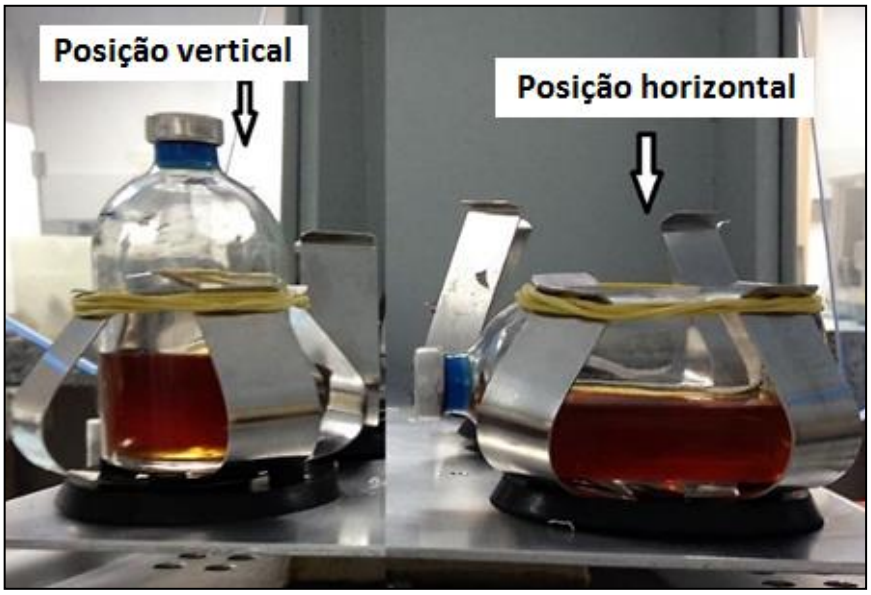

Figura 17. Frascos de soro na posição vertical e horizontal em agitador rotatório a 150 rpm e 37°C.

Os pré-inóculos foram preparados de acordo com o item 4.4.1 e após 24 horas, cerca de 5 mL de pré-inóculo era transferido para os frascos contendo o meio de cultivo a ser utilizado no experimento com o auxílio de seringa e agulha estéreis. Esse processo antecedia a adição do inóculo. Após a inoculação era adicionado gás de síntese no *headspace* dos frascos por 30 segundos e, em seguida, os frascos de soro de 100 mL com 50 mL de meio de cultivo eram incubados em agitador rotatório a 150 rpm e 37ºC por 120 horas e eram posicionados em duas condições diferentes, vertical e horizontal. A amostragem era realizada de hora em hora, sempre seguida por adição de gás de síntese (por 30 segundos) para recompor a atmosfera gasosa e evitar entrada de ar. Nessas amostras eram quantificadas as concentrações de células, etanol, glicose e pH.

Para comparação, uma outra estratégia foi utillizada para aumentar a transferência de massa do sistema: a adição de um carreador de gases, a perfluorodecalina, que é um perfluorocarboneto (PFC). Os experimentos foram realizados com frascos na horizontal. Foram adicionados 20% (v/v) de PFC ao meio ATCC 2713, ou seja, 10 mL de PFC e 40 mL de meio ATCC 2713, havendo a adição de gás de síntese antes do inóculo e após a retirada de alíquotas, após 24 horas e 28 h, 46 h, 50 h e 94 h.

4.6 AVALIAÇÃO DO PERFIL CINÉTICO DE *C. CARBOXIDIVORANS* EM DIFERENTES MEIOS DE CULTIVO

Para avaliação da melhor condição de pH para produção de etanol por *C. Carboxidivorans* DSM 15243diferentes valores de pH inicial nos meios de cultivo foram testados(4,0; 5,0; 6,0; 7,0 e 8,0) utilizando frascos de soro de 100 mL com 50 mL de meio de cultivo ATCC 2713 e o pH foi ajustado utilizando solução concentrada de hidróxido de sódio e ácido clorídrico concentrado, os ensaios foram realizados em duplicata com frascos incubados na posição horizontal. No frasco de soro de 100 mL de volume útil contendo 50 mL de meio ATCC 2713 foram adicionados 5 mL de inóculo e incubados a 37°C e 150 rpm em agitador rotatório por 24 h onde era então retirada uma alíquota para medida de crescimento celular e produção de etanol.

Para avaliação do perfil cinético de *C. carboxidivorans* DSM 15243 em diferentes meios de cultivo foram utilizados frascos de soro de 100 mL com 50 mL de meio de cultivo. Foram estudadas diferentes composições de meio de cultivo em processo de batelada alimentada (alimentação de meio de cultivo concentrado).No frasco de soro de 100 mL de volume útil contendo 50 mL de meio ATCC 2713 foram adicionados 5 mL de inóculo e após 24 h de cultivo retirava-se 5 mL de amostra e alimentava-se 5 mL de meio ATCC 2713 dez vezes mais concentrado. Em seguida, repetiu-se esse procedimento a cada 3 horas (27 h, 30 h, 33 h) e também após 72 h e 146 h, supondo consumo parcial dos constituintes presentes no meio de cultivo durante esses períodos. Como cada frasco continha 50 mL de meio de cultivo, com a retirada de 5 mL de amostra e adição de 5 mL de meio dez vezes concentrado, pretendia-se atingir a concentração inicial de meio ATCC 2713. Após cada amostragem, também era adicionado gás de síntese por 30 segundos nos frascos.

O inóculo foi realizado como descrito no item 4.4.1 com frascos na horizontal e em agitador rotatório a 37°C e 150 rpm. Após 24 horas de cultivo no meio de cultivo estudado e a cada amostragem, eram retirados 5 mL de amostra e adicionados 5 mL de meio de cultivo concentrado em 10 vezes, para aumento da concentração celular. Foram retiradas amostras a cada duas horas, para análise da concentração celular e quantificação do consumo de glicose, produção de ácidos orgânicos e produção de etanol. Os experimentos foram realizados por 144 h.

Os meios de cultivo testados nessa etapa foram: meio ATCC 2713,meio contendo apenas glicose (1 g/L); meio contendo glicose (1 g/L) e extrato de lêvedo (2,5 g/L) e meio contendo glicose (1 g/L) e triptona (10 g/L).

Foi testada também a substituição das fontes de nitrogênio e sais por milhocina. Para avaliar o potencial de substituição das fontes de nitrogênio presentes no meio ATCC 2713 por milhocina foram testadas as concentrações de 10, 20, 30, 40 e 50 g/ L de milhocina com 1,0 g/L de glicose.

4.7 PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL E ANÁLISE ESTATÍSTICA PARA AUMENTO DA PRODUÇÃO DE ETANOL POR *C. CARBOXIDIVORANS*

Objetivando obter a melhor composição de meio de cultivo para a produção de etanol, foi realizada uma sequência de três planejamentos experimentais, sendo um

delineamento *Plackett-Burman,* um planejamento fatorial fracionado (2^{4-1}) e um delineamento de composto central rotacional (DCCR). O tratamento estatístico dos resultados foi realizado empregando-se o *software* STATISTICA, versão 7.0 (StatSoft, Inc.) incluindo análise de variância (ANOVA), para obter o impacto e a significância de cada termo além de determinar as interações entre as variáveis dependentes e independentes.

A qualidade do modelo polinomial foi constatada por meio da determinação do coeficiente R^2, e a sua significância estatística verificada pelo teste-F considerando intervalo de confiança de 90% ou p-valor menor que 0,1.

Todos os ensaios dos planejamentos experimentais foram realizados com *C. carboxidivorans* DSM 15243em frascos de soro (100 mL) na posição horizontal, contendo 50 mL de meio de cultivo, que era previamente borbulhado com gás de síntese (1 min) e também era adicionado gás no seu *headspace* (30 segundos) antes da inoculação.A adição de meio de cultivo concentrado dez vezes (5 mL) e gás de síntese no *headspace* (30 segundos) era realizada após cada amostragem (retirada de 5 mL). Os frascos (com tampas de clorobutil) eram incubados na horizontal a 37 °C e 150 rpm.

4.7.1 Planejamento experimental do tipo *Plackett-Burman*

O delineamento *Plackett-Burman* é essencialmente para *screening* e é uma ferramenta muito útil para avaliação prévia das variáveis de um processo, como uma estratégia seqüencial para se chegar a otimização do mesmo (Rodrigues, 2005). Dessa forma, o planejamento *Plackett-Burman* foi escolhido para identificar quais as variáveis são significativas para a produção de etanol.

A influência de oito componentes do meio de cultivo foi analisada, sendo esses: triptona, peptona de gelatina, extrato de levedura, cloreto de sódio, L-arginina, piruvato de sódio, menadiona e hemina, mantendo-se fixa a concentração de glicose (1,0 g/L). Cada uma das 8 variáveis foi analisada em dois níveis, máximo e mínimo, codificados respectivamente como “−1” e “+1”, e três replicatas no ponto central, codificado como “0”, totalizando 15 ensaios. Os valores para cada nível estão apresentados na Tabela 7, que foram definidos com base na composição do meio ATCC 2713.

Tabela 7. Fatores e níveis usados no delineamento do planejamento experimental *Plackett-Burman* para selecionar a melhor composição de meio de cultivo para produção de etanol por *C. carboxidivorans*.

Variáveis Independentes	**Nível**		
	-1	**0**	**1**
Triptona (g/L)	0	5	10
Peptona (g/L)	0	5	10
Ext. Levedo (g/L)	0	2,5	5
Cloreto de sódio(g/L)	0	2,5	5
L-Arginina (g/L)	0	0,5	1
Piruvato (g/L)	0	0,5	1
Menadiona (g/L)	0	0,25	0,0005
Hemina (g/L)	0	2,5	0,005

4.7.2 Planejamento experimental fatorial fracionado 2^{4-1}

Selecionados os constituintes do meio de cultivo, pelo delineamento *Plackett-Burman*, a segunda etapa da sequência de planejamentos é um delineamento fatorial fracionado (2^{k-1}) para encontrar os fatores de significativa influencia na produção de etanol. São eles triptona, peptona de gelatina, extrato de lêvedo e L-arginina que foram as variáveis independentes. Cada variável foi analisada em 2 níveis, mínimo e máximo, codificados respectivamente como “−1” e “+1”, e duas replicatas do ponto central codificadas como “0”, totalizando 10 ensaios (Tabela 8).

Os valores de máximo, mínimo e ponto central foram escolhidos a partir dos resultados obtidos no planejamento *Plackett-Burman*.

Tabela 8. Fatores e níveis utilizados no planejamento experimental fatorial fracionado 2^{4-1}para selecionar a melhor composição de meio de cultivo para produção de etanol por *C. carboxidivorans*.

Variáveis Independentes	**Nível**		
	-1	**0**	**1**

Triptona (g/L)	2	7	12
Peptona (g/L)	2	7	12
Ext. Levedo (g/L)	1	4	7
L-Arginina (g/L)	0,2	0,7	1,2

4.7.3 Planejamento experimental Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR)

Com os resultados obtidos no planejamento fatorial fracionado propôs-se um delineamento composto central rotacional (DCCR) para se definir as melhores condições para a produção de etanol. No presente trabalho, o planejamento foi realizado com 3 variáveis independentes em dois níveis, máximo “+1” e mínimo “-1”, (2^3) mais 6 ensaios axiais com 3 repetições no ponto central, totalizando 17 ensaios. As variáveis independentes selecionadas foram: Peptona, extrato de lêvedo e L-arginina e os níveis adotados são apresentados na Tabela 9.

Tabela 9. Fatores e níveis utilizados no Delineamento Composto Central Rotacional para selecionar a melhor composição de meio de cultivo para produção de etanol por *C. carboxidivorans*.

Variáveis Independentes	**Nível**				
	-1,68	**-1**	**0**	**1**	**1,68**
Peptona (g/L)	6,96	9	12	15	17,07
Ext Levedo (g/L)	6,96	9	12	15	17,07
L-Arginina (g/L)	0,53	0,8	1,2	1,6	1,87

4.8 EXPERIMENTOS EM BIORREATOR

Para os ensaios em biorreator operando em batelada foi utilizado um equipamento da marca Tecnal, TEC-BIO-C, com capacidade de 1 litro (Figura 18(B)). O equipamento contém agitação e controle de temperatura. O monitoramento da temperatura e da velocidade de rotação foi feito com auxílio do Software TEC-BIO-C.

Para a injeção de gás de síntese (Figura 18(A)) de composição descrita no item 4.1 era adicionado um filtro (HEPA-VENT,Whatman) estéril com porosidade de 0,22 µm para evitar a contaminação do meio de cultivo. A injeção de gás era realizada abaixo da haste de agitação através de um anel multiorifício. Na saída de gás do

biorreator também foi adicionado um filtro (HEPA-VENT,Whatman)estéril com porosidade de 0,22 µm para evitar a contaminação do ambiente.

O sistema era totalmente vedado e antes do inicio dos experimentos o meio de cultivo de fermentação estéril era adicionado com bomba peristáltica. Gás de síntese ou nitrogênio eram borbulhados no meio de cultivo para garantir o ambiente experimental anaeróbio e para o controle de vazamento do sistema era utilizado um detector de CO (Instrutemp 7701) Figura 18(C).

Para evitar a entrada de ar no biorreator pela saída do condensador, foi colocado na purga do sistema um frasco com solução de etanol 70% em ambiente aberto. Além disso, na saída da purga foi instalado um rotâmetro fixando-o em 0,67 vvm. sendo possível assim controlar a vazão de gás na entrada do sistema(Figura 18 D).

A suspensão celular do inóculo foi cultivada como descrito no item 4.4.1 com frascos de soro na horizontal e correspondeu a 10% (v/v) do volume do meio de cultivo adicionado ao biorreator, que foi de 75,0 mL.

O bioprocesso foi acompanhado através de amostragens da fase líquida ao longo do experimento para as análises de etanol, glicose, ácido acético, ácido lático, biomassa e pH.

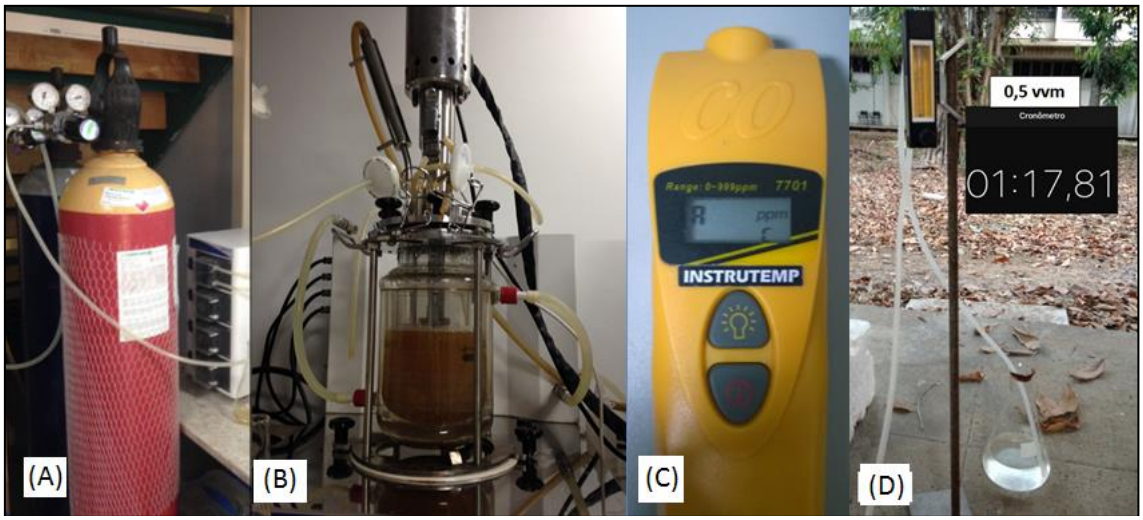

Figura 18. Esquema ilustrativo do (A) Cilindro de gás na entrada no biorreator de células livres para alimentação de gás de síntese ou nitrogênio, (B) biorreator de células livres com capacidade de 1 litro, (C) medidor de CO e (D) rotâmetro na saída do biorreator.

4.8.1 Avaliação da assimilação de gás de síntese

Para a avaliação da cinética de crescimento celular e produção de etanol das três espécies de *Clostridium*(*C. ljungdahlii*; *C. Carboxidivorans* e *C. ragsdalei*) foram realizados experimentos com gás de síntese ou com nitrogênio gasoso (ausência de gás de síntese). A alimentação de nitrogênio ou gás de síntese foi realizada por pulsos a 0,67 vvm em dois ciclos de aproximadamente um minuto cada, após a retirada de cada alíquota do meio de cultivo. Foi utilizado 750 ml de meio ATCC 2713, temperatura 37°C e agitação de 200 rpm.

4.8.2 Influência da variação da peptona na produção de etanol

Após a escolha da cepa com maior produtividade volumétrica em etanol, avaliou-se a substituição da peptona de gelatina de digestão pancreática (Sigma-aldrich),uma vez que a peptona é uma fonte de nitrogênio importante para o crescimento microbiano e também apresenta um custo elevado no processo, representando cerca de 30% do custo total do meio ATCC 2713.

A peptona de gelatina, apresenta alto conteúdo de prolina e poucos aminoácidos sulfurados. O mesmo fabricante (Sigma-aldrich) fornece uma outra peptona obtida de gelatina, de digestão enzimática, mas não especifica a enzima e nem fornece maiores informações sobre o produto. Além dessas, foi testada uma peptona bacteriológica da marca KASVI, com preço inferior a peptona de gelatina, digestão pancreática. A Tabela 10 apresenta as características de cada peptona testada, segundo os fabricantes.

Tabela 10. Composição de nitrogênio e preço das diferentes peptonas comerciais.

Tipo de Peptona	Nitrogênio amino	Nitrogênio total	Preço(R$)/kg
Peptona de gelatina, digestão pancreática (cod. 70176)	≥ 2,2	≥ 15	1.462,00
Peptona de gelatina, digestão enzimática (cod. 70951)	≥ 2,4	≥ 15	424,00
Peptona bacteriológica KASVI	3-4,5%	> 12,5%	680,00

Os experimentos foram realizados com a cepa *C. carboxidivorans* DSM 15243, com gás de síntese.Foi utilizado 750 ml de meio ATCC 2713 (variando somente a peptona presente no meio de cultivo), temperatura 37°C e agitação de 200 rpm.A

alimentação de gás de síntese foi realizada por pulsos a 0,67 vvm em dois ciclos de aproximadamente um minuto cada, após a retirada de cada alíquota do meio de cultivo.

4.8.3 Influência da agitação na produção de etanol

Avaliou-se a influência da agitação do sistema na produção de etanol em experimentos em biorreator com a espécie *C. Carboxidivorans* DSM 15243. Variou-se a agitação em 200, 300 e 400 rpm, utilizando a temperatura de 37ºC e meio ATCC 2713 com petona KASVI. A alimentação de gás de síntese foi realizada por pulsos a 0,67 vvm em dois ciclos de aproximadamente um minuto cada, após a retirada de cada alíquota do meio de cultivo.

4.9 MÉTODOS ANALÍTICOS

4.9.1 Determinação da Concentração celular

A concentração de células foi determinada por medição da densidade óptica utilizando espectrofotômetro a 600 nm para as cepas *C.ljungdahlii* DSM 13528*, C. Carboxidivorans* DSM 15243 e *C. ragsdalei* DSM 15248 e esses valores foram convertidos para mg peso seco de células por mL (mg p.s. cél/mL) usando fator de conversão obtido pelas curvas padrão de peso seco.

As curvas padrão de peso seco para as cepas *C. Carboxidivorans* DSM 15243*, C.ljungdahlii* DSM 13528 *e C. Ragsdalei* DSM 15248 estão apresentadas nas Figuras19 (A), (B) e (C), respectivamente.

A curva de peso seco é obtida através de uma suspensão de células em solução salina (água destilada com 0,9% (p/v) de NaCl). Desta suspensão, retira-se uma alíquota de 15 mL, que é filtrada em papel Millipore 0,22 µm, seca em luz de infravermelho por 30 min e em seguida pesada. Da mesma suspensão são feitas diferentes diluições de modo a se obter concentrações celulares diferentes e então mede-se a absorvância em espectrofotômetro a 600 nm. Com os valores de concentração versus absorvância é possível obter a curva padrão.

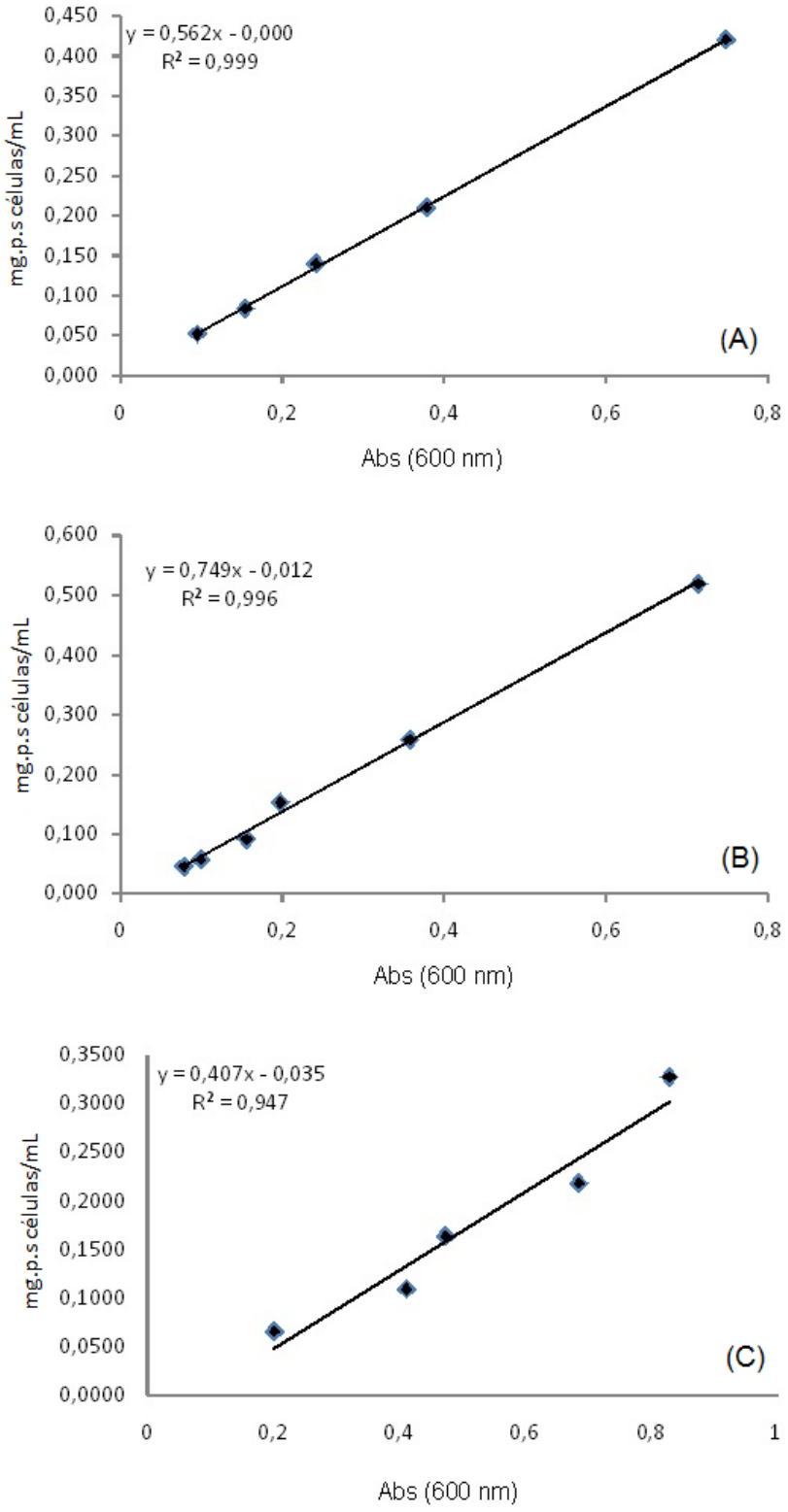

Figura 19. Curva de peso seco para quantificação do crescimento celular de (A) *Clostridium carboxidivorans*, (B) *Clostridium ljungdahlii* e (C) *Clostridium ragsdalei* através de medidas em espectrofotômetro a 600 nm.

4.9.2 Análises por Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

As análises para quantificar as concentrações de glicose, etanol e possíveis co-produtos como ácido acético, ácido butírico e ácido lático presentes na fase líquida foram realizadas por Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) (Waters®). Para realização das análises foi utilizada uma coluna Aminex® HPX-87H, 300x7,8 mm (Bio-RadLaboratoriesLtd) acoplada a uma pré-coluna trocadora de cátions (Bio-RadLaboratoriesLtd), detector de Índice de Refração (Waters 2414), bomba binária (Waters 1525), forno e módulo controlador de temperatura (Waters) e software Breeze.

A fase móvel utilizada foi H_2SO_4 0,005M, com vazão de 0,8 mL/min, volume de injeção de 20 µL e a temperatura de 60°C. Os padrões analíticos de todos os produtos de fermentação (Sigma ChemicalCo., St. Louis, Missouri) foram diluídos em água Milli-Q e injetados em triplicata para a preparação da curva padrão que relaciona a área relacionada ao pico do composto com sua concentração.

A Figura 20 mostra o cromatograma típico para mistura dos padrões de glicose, ácidos orgânicos e álcoois presentes em fermentações de gás de síntese.

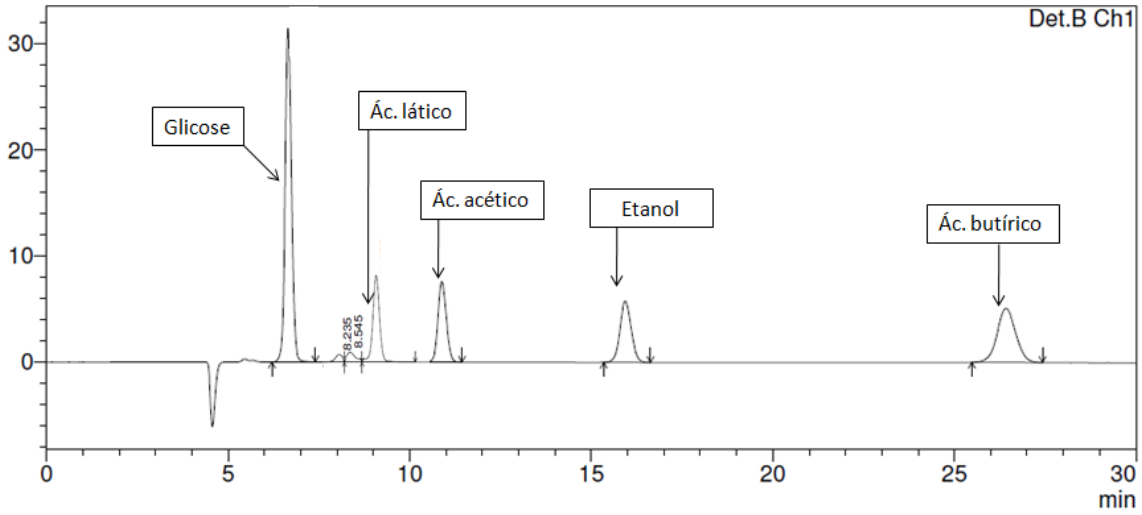

Figura 20. Cromatograma típico para mistura dos padrões de glicose, etanol, ácido acético, ácido butírico e ácido lático.

4.10 CÁLCULOS DOS PARÂMETROS DE AVALIAÇÃO DO PROCESSO

4.10.1 Determinação da taxa específica de crescimento μ (h^{-1}).

A determinação das taxas específicas de crescimento foi realizada pela quantificação da concentração celular (X) dos cultivos de *Clostridium carboxidivorans, Clostridium ljungdahlii e Clostridium ragsdalei* ao longo do tempo.

A taxa específica de crescimento celular (μ, h^{-1}) foi determinada pelo coeficiente angular da reta obtida no gráfico de ln(X) versus tempo na fase exponencial do crescimento.

4.10.2 Tempo de duplicação t_d (h)

O tempo de duplicação ou tempo de geração (tg),que é o tempo de duplicação da massa celular foi determinado pela Equação 7:

$$\text{Ln } 2X_0/X_0 = \mu_x \, tg \rightarrow tg = \text{Ln } 2 / \mu \rightarrow td = 0{,}693/ \mu \quad (7)$$

4.10.3 Produtividade volumétrica (g/L.h)

A Equação 8 foi usada para quantificar a produtividade volumétrica.

$$Q_P = (P-P_0)/t_f \quad (8)$$

onde:

P: Concentração máxima de produto ou co-produto (g/L)

Po: Concentração inicial de produto ou co-produto (g/L)

t_f*:* Tempo de fermentação (h)

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 ATIVAÇÃO DAS CEPAS

Segundo Morgan *et al*. (2006) embora a liofilização seja uma técnica amplamente empregada para a manutenção de diferentes micro-organismos, sendo considerada uma técnica de preservação a longo prazo, as etapas que compõem o processo podem causar danos celulares. Por exemplo, podem ocorrer alterações na permeabilidade da membrana celular, o que leva ao aumento da sensibilidade a alguns agentes seletivos, aumento da fase lag de multiplicação celular e a necessidade de incremento nutricional. Portanto, o procedimento de ativação das cepas é uma etapa essencial para o processo.

A cepa *Clostridium carboxidivorans* DSM 15243 apresentou crescimento celular (aumento da turbidez) no meio ATCC 2713 após 72 h de cultivo a 37ºC com agitação de 150 rpm. No entanto, as demais cepas não apresentaram aumento de turbidez nesse meio de cultivo. Para ativar então as cepas *Clostridium ljungdahlii* DSM 13528 *e Clostridium ragsdalei* DSM 15248 foi testado o meio BHI, no qual ambas apresentaram aumento de turbidez após 72 h de cultivo nesse meio de cultivo, confirmando assim a ativação das mesmas.

Após a ativação das cepas, procedeu-se os ensaios para a avaliação da produção de etanol.

5.2 EXPERIMENTOS PRELIMINARES

5.2.1 Experimentos não destrutivos em frascos de soro

Para avaliar a capacidade de *C. carboxidivorans* em assimilar gás de síntese para produção de etanol inoculou-se a cepa DSM 15243 em meio ATCC 2713 contendo gás de síntese previamente injetado em frascos de soro. O cultivo foi monitorado quanto ao pH, concentração celular e produção de metabólitos e os resultados estão apresentados na Figura 21. A amostragem foi feita utilizando sempre o mesmo frasco, que era retirado do incubador rotatório e recolocado a cada amostragem (experimento não destrutivo).

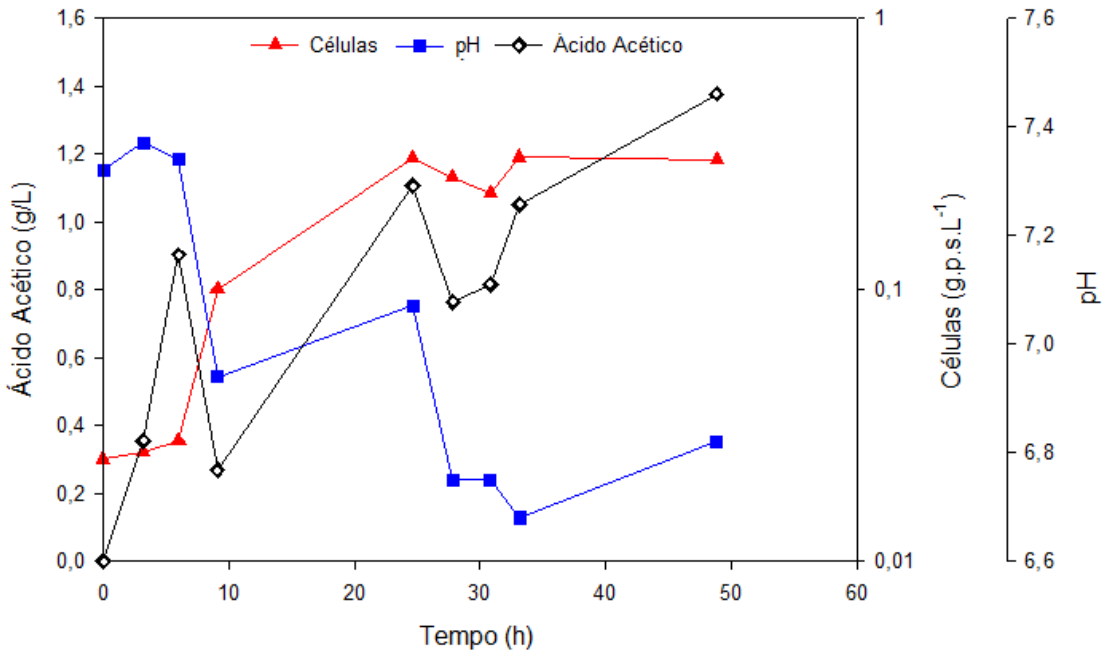

Figura 21. Cinética do cultivo de *Clostridium carboxidivorans* em meio ATCC 2713 com gás de síntese em experimento não destrutivo em frascos de soro na posição vertical. As linhas entre os pontos não representam valores.

É possível observar na Figura 21 que há uma fase lag de crescimento celular de, aproximadamente, 6 horas e que a fase exponencial é acompanhada por uma ligeira redução do pH do meio de cultivo. Apesar do crescimento celular não ter sido expressivo (ΔX = 0,28 mg p.s. cél/mL) a taxa específica de crescimento foi significativa (μ = 0,11 h^{-1}), como mostra a Tabela 11. Pela Figura 21, pode-se destacar também que a partir de 24 h de cultivo o crescimento celular se estabiliza (fase estacionária). É possível que nesse momento a fonte de carbono tenha se esgotado ou tenha ocorrido a produção de algum metabólito tóxico para a célula. Segundo Ragsdale (2004), *C. carboxidivorans* apresenta fase estacionária de crescimento celular devido à diminuição do pH do meio de cultivo e a produção de solventes.

A Figura 21 também apresenta os resultados de formação do produto de interesse, o etanol, e outros metabólitos, como ácido acético e ácido butírico ao longo do cultivo.

De acordo com a Figura 21 o acúmulo de ácido acético durante o cultivo coincide com uma pequena queda do pH do meio de cultivo. Nesse cultivo não

se detectou produção de etanol, o que indica que esse meio de cultivo pode favorecer a formação de ácido acético.

Foi possível observar que, durante a amostragem dos primeiros pontos, ocorreu perda do gás de síntese no frasco de soro, provavelmente devido aos furos gerados pela agulha na retirada de amostras. Fato que direcionou a realização de experimentos destrutivos, ou seja, a cada amostragem um frasco inteiro é utilizado para as análises.

Tabela 11 Parâmetros cinéticos do cultivo de *Clostridium carboxidivorans* em frascos de soro ou Schott realizados em agitador rotatório a 150 rpm 30°C com injeção de gás e frascos colocados na posição vertical.

Condições				ΔX (g p.s.		P_{ETANOL}	Q_{ETANOL}		Q_{AC}		Q_{AB}
Gás	Meio	pH inicial	pH final	cél/L)	μ (h^{-1})	(g/L)	(g/L.h)	P_{AC} (g/L)	(g/L.h)	P_{AB} (g/L)	(g/L.h)
Batelada Simples											
Ensaio não destrutivo – frasco de soro											
GS	ATCC	7,3	6,8	0,28	0,11	0,000	0,000	1,380	0,040	0,000	0,000
Ensaio Destrutivo											
GS	ATCC	7,2	6,2	0,55	N.D.	0,196	0,007	1,020	0,037	0,000	0,000
N_2	ATCC	7,3	6,2	0,24	0,03	0,347	0,007	1,363	0,074	0,000	0,000
GS	DSMZ	6,6	4,0	0,30	Nd	0,120	0,003	0,090	0,009	0,000	0,000
N_2	DSMZ	6,8	4,4	0,42	Nd	0,098	0,005	0,727	0,011	0,000	0,000
GS	Simples	6,5	5,7	0,15	0,07	0,000	0,000	0,374	0,007	0,000	0,000
Batelada Alimentada (adição de gás) – frasco Schott											
Ensaio não destrutivo											
GS	ATCC	5,4	6,8	0,55	Nd	0,164	0,009	1,900	0,042	0,283	0,002
GS	DSMZ	6,1	3,8	0,93	0,01	0,054	0,002	1,657	0,008	0,000	0,000

GS: Gás de síntese
Meios: ATCC: Meio ATCC 2713; DSMZ: meio DSMZ 879; Simples: peptona 10 g/L;
ΔX: variação máxima da concentração de células (X_{max} – $X_{inicial}$);
μ: taxa específica de crescimento celular obtido na fase exponencial do crescimento pelo coeficiente angular da curva ln(x) *versus* tempo;
P_{ETANOL}; P_{AC}; P_{AB}: concentração máxima de produto ou subproduto (Etanol, AC: ácido acético; AB: ácido butírico);
$Q_{ETANOL}Q_{AC}Q_{AB}$: produtividade volumétrica máxima para o produto ou subproduto (Etanol, AC: ácido acético; AB: ácido butírico);
N.D.: não determinado

5.2.2 Experimentos destrutivos em frascos de soro

5.2.2.1 Ensaio utilizando meio ATCC 2713 com gás de síntese

Foram inoculados células de *C. carboxidivorans*, ao mesmo tempo, com mesmo volume de inóculo, em dez frascos de soro com meio ATCC 2713 e gás de síntese, previamente injetado, e o cultivo foi monitorado utilizando todo o conteúdo de um frasco a cada amostragem. A Figura 22 apresenta a cinética de crescimento celular, pH e a cinética de formação de metabólitos.

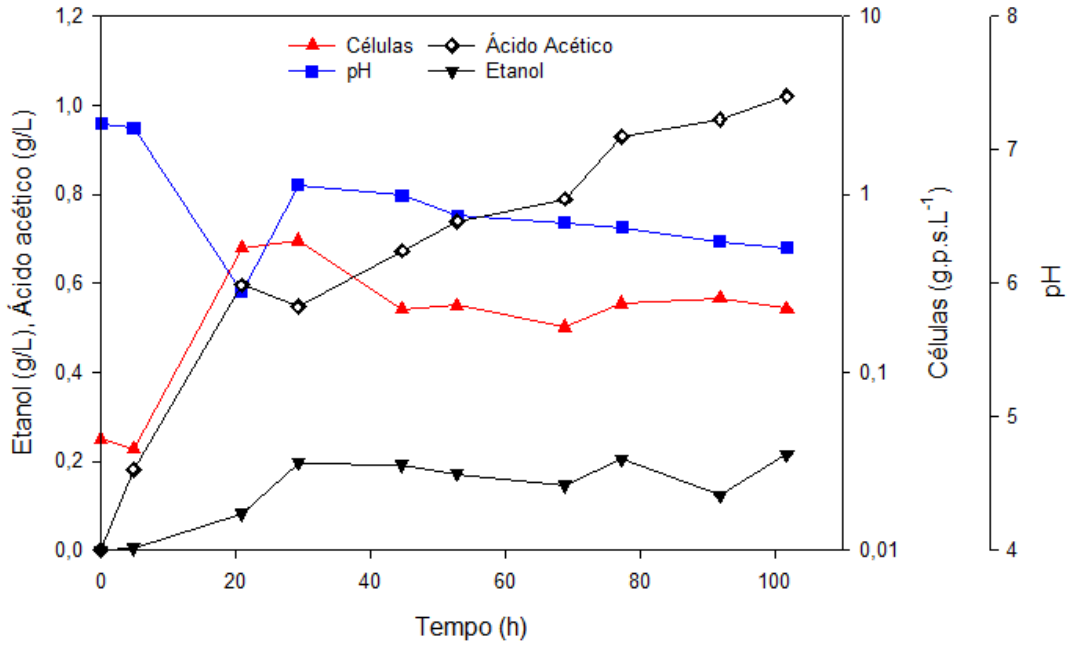

Figura 22. Cinética do cultivo de *Clostridium carboxidivorans* em meio ATCC 2713 com gás de síntese em experimento destrutivo em frascos de soro na posição vertical. As linhas entre os pontos não representam valores experimentais.

É possível perceber pela Figura 22 que há uma redução do pH do meio de cultivo durante a fase exponencial do crescimento celular, assim como ocorreu nos experimentos não destrutivos (Figura 21). No entanto, a fase estacionária parece ter o início mais tardio que nos ensaios destrutivos, o que indica que o gás de síntese permaneceu por mais tempo nesse sistema. Assim, foi possível uma maior produção de biomassa (ΔX=0,55 g p.s. cél./L; Tabela 11) em comparação com os ensaios não destrutivos.

A Figura 22 mostra uma produção de ácido acético até inferior ao encontrado para os experimentos não destrutivos (Figura 21), apesar do pH final ter sido inferior (Tabela 11). No entanto, nesse caso foi possível detectar a produção de etanol. Considerando que nos experimentos destrutivos tenha mais gás de síntese por mais tempo, é possível que a maior quantidade de CO e CO_2 no sistema tenha permitido o desvio da rota de produção de acido acético parcialmente para a produção de etanol.

5.2.2.2 Ensaio utilizando meio ATCC 2713 com nitrogênio gasoso

De forma a identificar se o gás de síntese estava influenciando o cultivo de *C. carboxidivorans* em meio ATCC 2713 foi feito um experimento na ausência de gás de síntese. Para manter a anaerobiose do meio de cultivo, os 10 frascos de soro com meio ATCC foram saturados com nitrogênio gasoso por ser um gás inerte. Estes foram inoculados da mesma forma e ao mesmo tempo e amostragens foram feitas com todo o conteúdo de um frasco a cada tempo. Os resultados são apresentados nas Figuras 23.

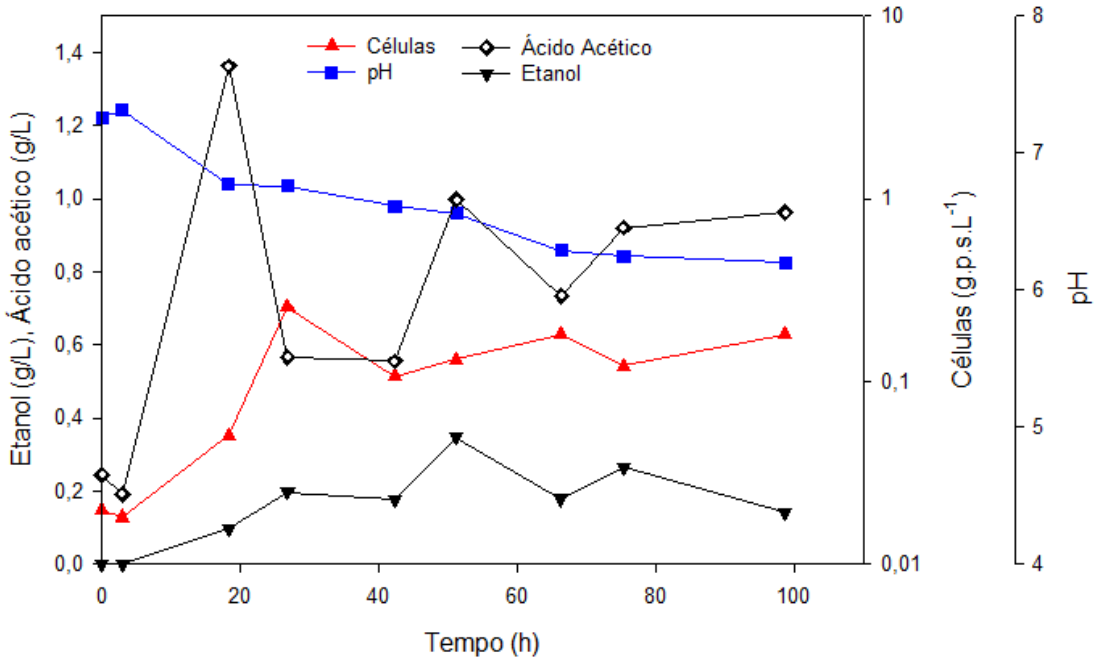

Figura 23. Cinética do cultivo de *Clostridium carboxidivorans* em meio ATCC 2713 com nitrogênio gasoso em experimento destrutivo em frascos de soro na posição vertical. As linhas entre os pontos não representam valores experimentais.

É possível observar na Figura 23 que o crescimento foi mais lento e que a produção de biomassa foi menor (ΔX= 0,24 g p.s. cél/L; Tabela 11) do que no

experimento com gás de síntese. A redução do pH acompanhou esse crescimento celular mais lento, mantendo o declínio até o final do cultivo. Isso, provavelmente, ocorreu devido a menor oferta de fonte de carbono já que não adicionou-se gás de síntese, tendo somente 1 g/L de glicose no meio ATCC.

Em contrapartida, observa-se na Figura 23 e na Tabela 11 que tanto a produção de etanol como de ácido acético foram maiores do que no experimento com gás de síntese. Isso indica que essa cepa é capaz de produzir etanol e ácido acético em ambiente anaeróbio sem gás de síntese e que provavelmente algum componente do gás de síntese pode estar inibindo a produção desses metabólitos.

Segundo Higman *et al*. (2003), há uma grande diferença na composição do gás de síntese *clean* utilizado em pesquisas e o gás de síntese produzido industrialmente. O chamado gás de síntese *clean* é composto basicamente por monóxido de carbono (CO), dióxido de carbono (CO_2) e hidrogênio (H_2) e o gás de síntese industrial conterá sólidos (principalmente de cinzas), voláteis condensáveis e uma mistura gasosa de CO, CO_2, H_2, H_2O, CH_4. A composição dessas impurezas poderá causar impactos que podem incluir, toxicidade para as células, a inibição enzimática, alteração no potencial redox, na osmolaridade e também no pH (XU *et al.*, 2011). Esses fatores podem estar relacionados à diminuição da formação dos produtos do experimento do gás de síntese quando comparado a aos experimentos com nitrogênio.

5.2.2.3 Ensaio utilizando meio DSMZ com gás de síntese

O meio DSMZ 879, indicado para o cultivo de *C. ljungdahlii*, é um meio de cultivo que contém muito mais componentes que o meio ATCC 2713, sendo um meio de cultivo mais completo pela presença de muitas vitaminas e elementos traço. Além disso, tem frutose como fonte de carbono direta, diferente do meio ATCC que apresenta glicose. Os dois meios de cultivo têm extrato de lêvedo, mas o meio DSMZ tem fonte inorgânica de nitrogênio, enquanto o meio ATCC tem triptona e peptona de gelatina. Portanto, de forma a verificar se o meio DSMZ seria melhor para a produção de etanol por *C. carboxidivorans* esse meio de cultivo foi testado. Os resultados são apresentados na Figura 24.

A Figura 24 mostra que em meio DSMZ com gás de síntese o crescimento de *C. carboxidivorans* teve uma fase lag bem curta, assim como início da fase

exponencial. O crescimento celular atingiu a fase estacionária em aproximadamente 20 h. A redução do pH ocorreu durante o crescimento celular, mas continuou reduzindo durante o início da fase estacionária, chegando a valores inferiores aos obtidos em meio ATCC, o que pode ser visto também na Tabela 11.

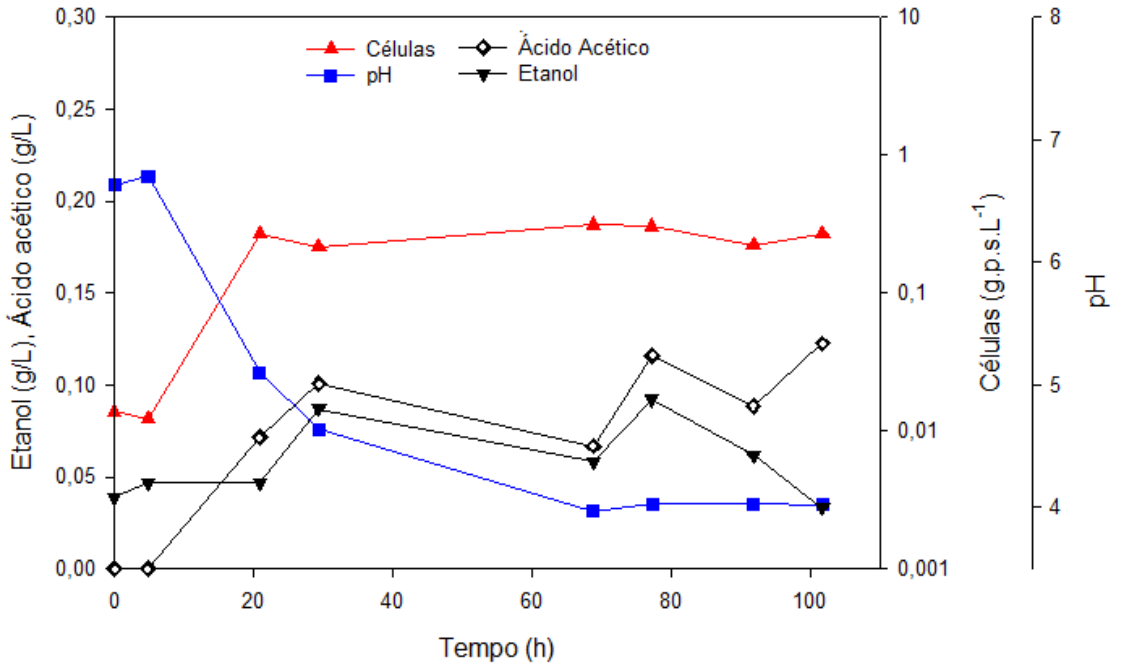

Figura 24. Cinética do cultivo de *Clostridium carboxidivorans* em meio DSMZ 879 com gás de síntese em experimentos destrutivos em frascos de soro colocados na posição vertical. As linhas entre os pontos não representam valores experimentais.

Segundo UKPONG *et al*. (2012) a bactéria *C. carboxidivorans* apresenta uma fase acidogênica que culmina com uma redução do pH, seguida por uma fase solventogênica, quando é possível se observar o aumento do pH. As Figuras 23 e 24 mostram que no caso do meio ATCC, ocorreu ligeira redução do pH, seguido de estabilização do mesmo. No caso do meio DSMZ o pH continuou diminuindo ao longo do cultivo.

A peptona quando degradada pode gerar amônia, o que eleva o pH. Portanto, a presença da peptona no meio ATCC pode ter evitado que o pH caísse tanto. Como o meio DSMZ não tem peptona, a produção de ácidos orgânicos permitiu uma redução maior do pH. Esse menor valor de pH pode ter influenciado o crescimento celular que foi bem menor que em meio ATCC com gás de síntese (Tabela 11).

Nesse meio (DSMZ) foi possível produzir etanol e ácido acético, só que nesse caso, a produção de etanol foi ligeiramente maior de que a produção do ácido, como

é possível verificar na Figura 24. Entretanto a produção e produtividade desses metabólitos foram inferiores do que em meio ATCC (Tabela 11).

Najafpour e Younesi (2006) utilizaram o meio DSMZ e gás de síntese para o cultivo de *C. lijundghalii* e produziram etanol em uma faixa de 2 a 4 mg/L em 36 h de cultivo em um sistema com pressão de 0,8 a 1,4 atm. Quando aumentaram a pressão do sistema para 1,8 atm conseguiram elevar para próximo de 12 mg/L a produção de etanol. No presente trabalho, foi obtida uma produção de etanol dez vezes maior (120 mg/L) com *C. carboxidivorans* em meio não pressurizado, como pode ser visto na Tabela 11.

5.2.2.4 Ensaio utilizando meio DSMZ com nitrogênio gasoso

Utilizou-se o meio DSMZ com nitrogênio gasoso de forma a comparar com o cultivo com gás de síntese, verificando o comportamento de *C. carboxidivorans* apenas com os componentes do meio DSMZ.

Verifica-se na Figura 25 que o micro-organismo cresceu na ausência de gás de síntese, o que mostra que provavelmente a fonte de carbono do meio DSMZ (frutose) foi utilizada pela cepa DSM 15243. Inclusive, a produção de biomassa (ΔX) foi maior em meio de cultivo com adição de nitrogênio do que em meio de cultivo com adição de gás de síntese (Tabela 11). Comparando-se os meios DSMZ e ATCC na ausência de gás de síntese (Tabela 11), verifica-se que o meio DSMZ foi melhor para o crescimento celular da cepa utilizada no presente trabalho. Isso provavelmente se deve à maior quantidade de vitaminas do meio DSMZ.

O pH reduziu em um perfil cinético muito similar ao do cultivo em meio DSMZ com gás de síntese (comparando as Figuras 24 e 25).

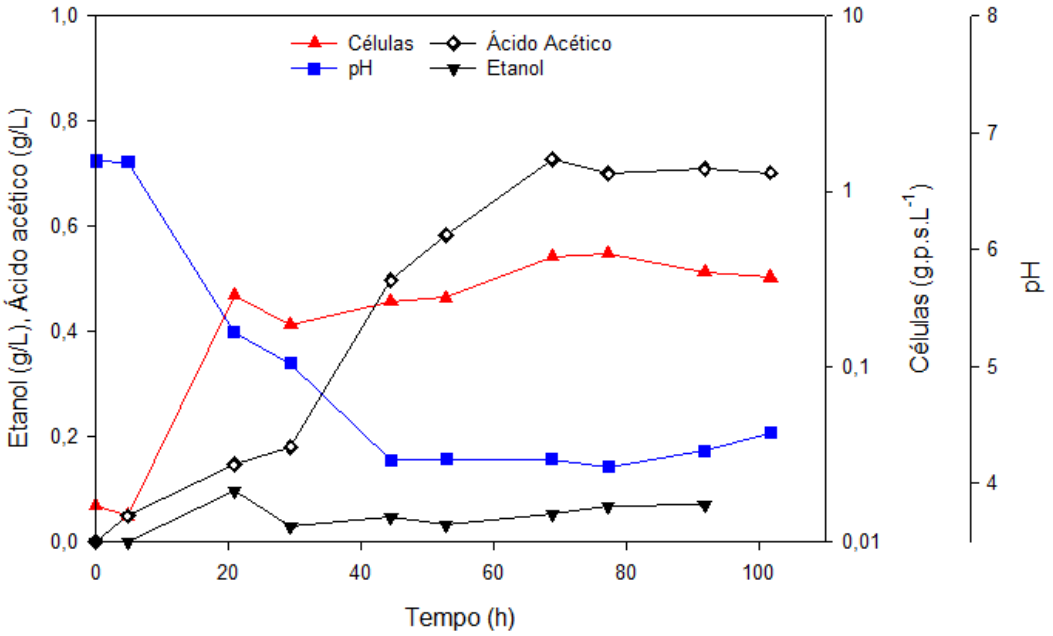

Figura 25. Cinética do cultivo de *Clostridium carboxidivorans* em meio DSMZ com de nitrogênio gasoso em experimento destrutivo em frascos de soro colocados na posição vertical. As linhas entre os pontos não representam valores experimentais.

A Figura 25 apresenta a cinética de produção de metabólitos em meio DSMZ e nitrogênio. Percebe-se que houve uma produção de ácido acético muito maior que etanol. A produção de ácido acético foi muito maior do que em meio DSMZ com gás de síntese, como pode-se observar na Tabela 11. Em relação ao etanol, verifica-se uma produção ligeiramente inferior na ausência de gás de síntese.

5.2.2.5 Ensaio utilizando meio simples com gás de síntese

O meio ATCC 2713 e o meio DSMZ são meios de cultivo ricos por conterem vitaminas, minerais, entre outros componentes. No intuito de verificar se a presença dessas vitaminas é essencial para a conversão de gás de síntese em etanol, testou-se um meio de cultivo mais simples contendo somente 10 g/L de peptona além do gás de síntese. Os experimentos foram do tipo destrutivos e também foram conduzidos a 150 rpm e 37ºC. Os resultados são apresentados na Figura 26.

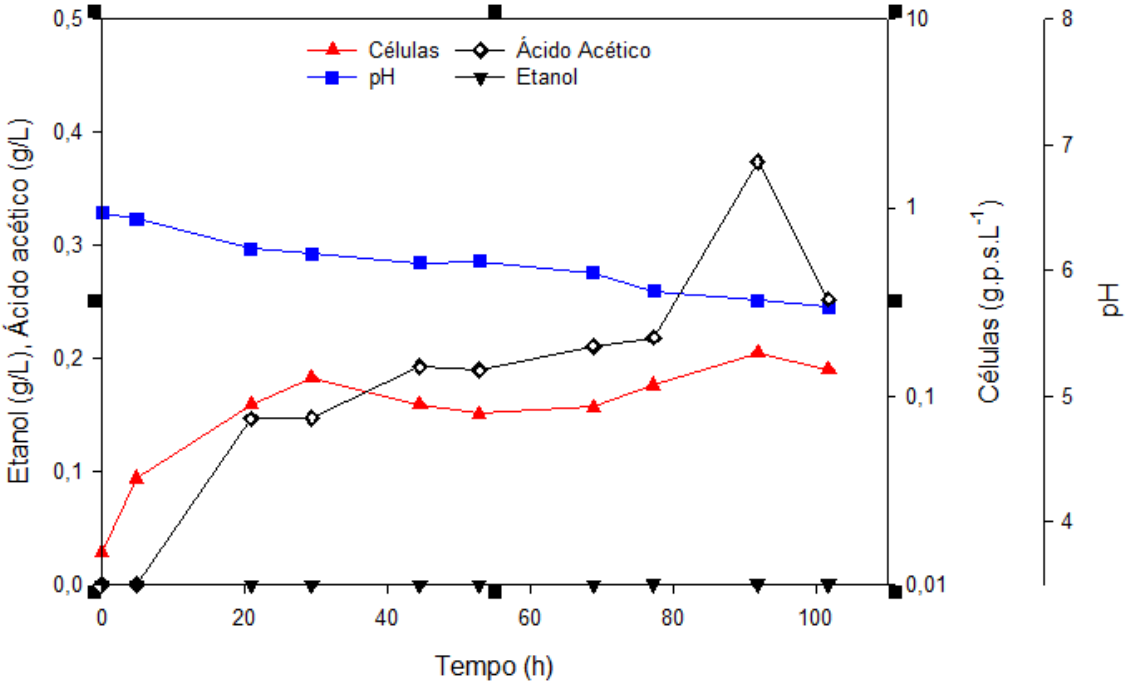

Figura 26. Cinética do cultivo de *Clostridium carboxidivorans* em meio simples com de gás de síntese em experimento destrutivo em frascos de soro colocados na posição vertical. As linhas entre os pontos não representam valores experimentais.

A redução do pH foi similar à encontrada no meio ATCC e bem menor do que em meio DSMZ, o que reforça a hipótese que a degradação da peptona eleva o pH, fazendo com que em meios de cultivo com produção de ácidos orgânicos a redução do pH não seja tão evidente.

O crescimento celular (Figura 26) foi mais lento e a produção de células (ΔX, Tabela 11) inferior quando comparados com os cultivos em meio ATCC ou DSMZ. Isso provavelmente se deve a falta de algumas vitaminas e substâncias redutoras, como a cisteína por exemplo, dos meios mais complexos.

A Figura 26 também apresenta a produção de metabólitos em meio simples com gás de síntese. A produção de etanol não foi detectada nesse sistema, enquanto que a produção de ácido acético foi crescente. No entanto, segundo a Tabela 11 a produtividade de ácido acético foi inferior a todas as outras condições testadas.

O teste mostra que o metabolismo de *C. carboxidivorans* está ativo em um meio simples, mas que outros componentes são necessários para que a produção de etanol seja possível.

5.2.3 Experimentos preliminares não destrutivos em frascos SCHOTT

5.2.3.1 Adição de gás de síntese intermitente em meio ATCC 2713

A alimentação de gás de síntese a cada 12 horas foi testada em frascos SCHOTT adaptados, com entrada para a injeção do gás e uma saída para amostragem. O meio ATCC foi utilizado e as condições de agitação (150 rpm) e temperatura (37ºC) foram mantidas. Os resultados são apresentados na Figura 27.

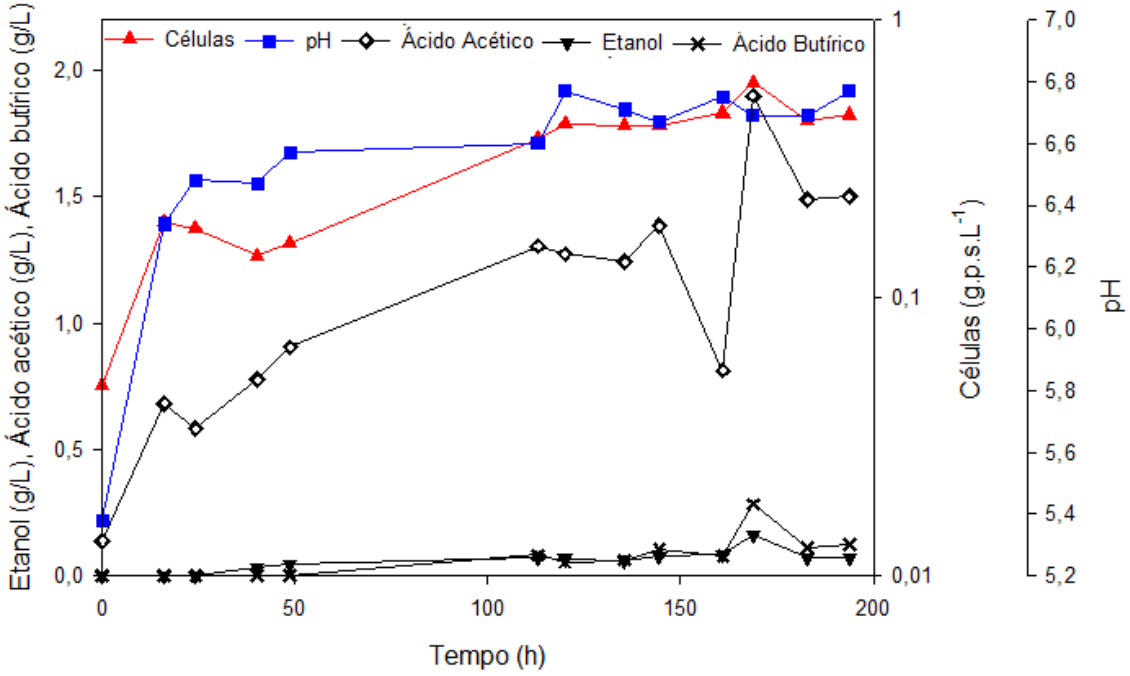

Figura 27. Cinética do cultivo de *Clostridium carboxidivorans* em meio ATCC 2713com adição intermitente de gás de síntese em experimento conduzidos em frasco SCHOTT colocados na posição vertical. As linhas entre os pontos não representam valores experimentais.

Observa-se na Figura 27 que houve um aumento do pH do sistema no início do cultivo e, em seguida, há uma estabilização do valor, próximo a sete. O crescimento celular foi crescente ao longo das 200 h de cultivo, atingindo uma produção de células de 0,55 g/L, similar ao obtido no cultivo realizado em frasco de soro em meio ATCC em experimento destrutivo.

Em relação à produção de metabólitos (Figura 27), a alimentação de gás de síntese viabilizou a produção de ácido butírico, uma via que estava inibida nas outras condições testadas. Além disso, a produção de ácido acético foi a maior encontrada,

como mostra a Tabela 11. Foi possível detectar a produção de etanol, mas em comparação com os outros sistemas com meio ATCC, essa produção foi inferior (Tabela 11).

Ukpong *et al*. (2012) avaliaram o cultivo de *C. carboxidivorans* em biorreator com alimentação contínua de gás de síntese e obtiveram no máximo: 2,80 g/L de etanol, 0,12 g/L de ácido butírico, 2,46 g/L de ácido acético e 0,53 g/L de butanol.

5.2.3.2 Adição intermitente de gás de síntese em Meio DSMZ 879

A adição de gás se síntese em frasco SCHOTT também foi avaliada em meio DSMZ com *C. carboxidivorans*. Os resultados são apresentados na Figuras 28.

O crescimento celular foi acompanhado pela redução do pH, chegando a valores próximos aos encontrados nos demais experimentos realizados com meio DSMZ. No entanto, diferentemente dos demais sistemas com meio DSMZ, o crescimento celular apresentou uma fase lag de quase 50 horas, que foi seguido de um aumento da concentração celular bastante expressivo, atingindo valores maiores do que qualquer outra condição estudada (Tabela 11).

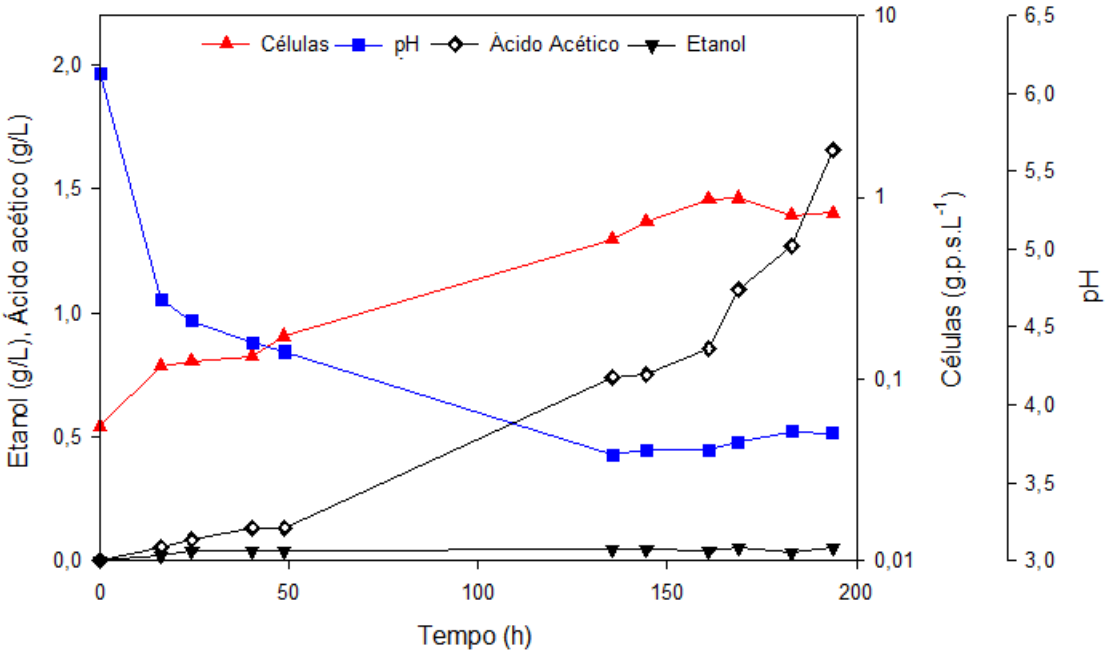

Figura 28. Cinética do cultivo de *Clostridium carboxidivorans* em meio DSMZ com adição intermitente de gás de síntese em experimento conduzido em frasco SCHOTT colocados na posição vertical. As linhas entre os pontos não representam valores experimentais.

A produção de etanol (0,054 g/L) apresentada na Figura 28 não foi muito elevada em comparação aos outros sistemas com meio DSMZ. Entretanto, a produção de ácido acético (1,657 g/L) foi mais elevada, como é possível também verificar na Tabela 11. A produção de ácido butírico não foi observada nesse caso, como ocorreu em meio ATCC 2713 no sistema com adição de gás de síntese.

5.2.4 Considerações gerais sobre os experimentos preliminares

Os resultados dos experimentos preliminares mostraram (Tabela 11) que o meio ATCC 2713 mostrou-se mais favorável a produção e produtividade em etanol. Portanto, esse meio foi escolhido para os experimentos seguintes. Foi também observado que os frascos de soro com as tampas de borracha butílica (Figura 14) foram ineficientes para a produção de etanol dado que o gás de síntese escapava durante a amostragem, sendo mais eficiente os experimentos conduzidos de forma destrutiva. Os experimentos conduzidos de forma destrutiva, por sua vez, apresentam a desvantagem de serem necessários muitos frascos a cada condição experimental, inviabilizando o teste simultâneo de diferentes condições. Sendo assim, optou-se por utilizar tampas de clorobutil mais espessas (Figura 16) para os experimentos posteriores para evitar o escape do gás e realizar experimentos não-destrutivos.

5.3 AVALIAÇÃO DE NOVA ESTRATÉGIA OPERACIONAL PARA MELHORIA DA TRANSFERÊNCIA DE MASSA EM FRASCOS DE SORO

Como o substrato de interesse, o CO (e o CO_2 e H_2), fica em uma fase diferente do micro-organismo, a transferência de massa em cultivos com *Clostridium* em meio de cultivo líquido com gás de síntese é prejudicada. Para cultivos em escala de laboratório é usual a utilização de frascos de soro para os cultivos de bactérias anaeróbias e esses frascos são posicionados na vertical no incubador rotatório. Uma forma de aumentar a superfície de contato entre a fase gasosa e líquida no interior desses frascos e, assim, elevar a transferência de massa dos componentes do gás de síntese para o meio líquido, seria posicionar os frascos na horizontal no incubador rotatório.

Portanto, a concentração de células, produção de etanol e ácido acético foram monitorados para as três especies de *Clostridium* (*C. ljungdahlii, C. carboxidivorans e*

C. ragsdalei) em meio ATCC 2713 e gás de síntese, nas duas estratégias operacionais, frascos na vertical e na horizontal, com adição de gás de síntese após a amostragem, de forma a verificar se essa nova estratégia aumentaria a produção de células e de metabólitos.Tampas de clorobutil (Figura 16) foram utilizadas para evitar o escape do gás de síntese.

Os resultados obtidos para ambas as estratégias estão apresentados na Figura 29 e Tabela 12. O perfil de crescimento celular para *C. rasgdalei* e *C. ljungdahlii* com frascos agitados na posição vertical não foram significativos e não estão apresentados na Figura 29.

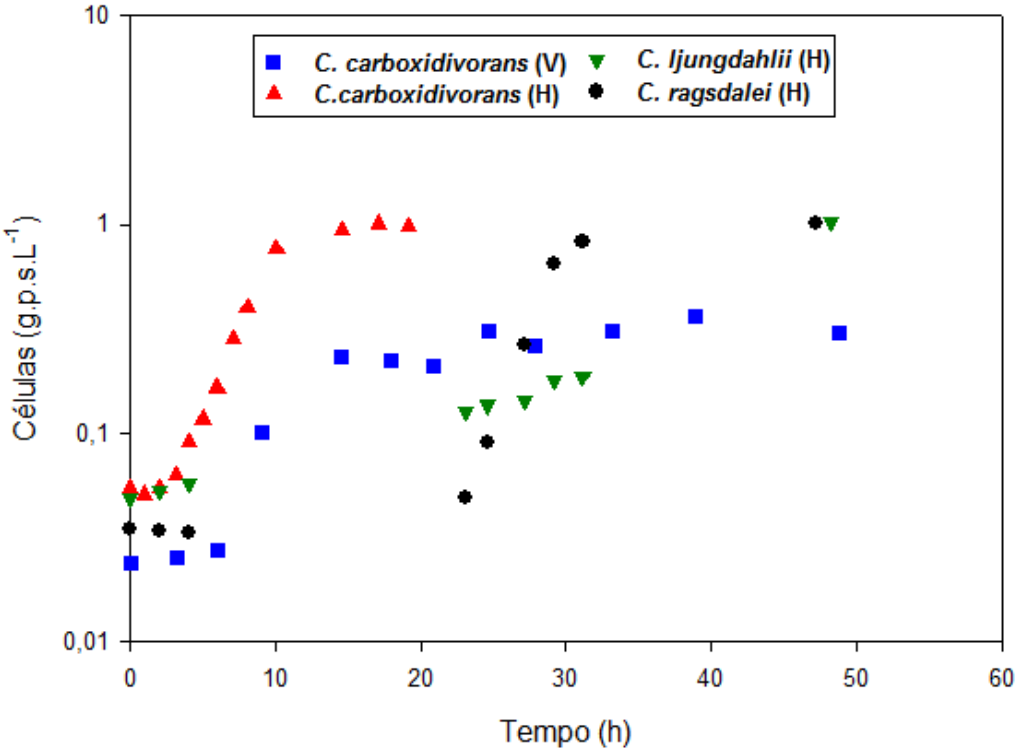

Figura 29. Perfil de crescimento celular para C. carboxidivorans com frascos posicionados na vertical e C. carboxidivorans, C. ljungdahlii e C. ragsdalei com frascos posicionados na horizontal. (V) Vertical; (H) Horizontal com gás de síntese.

Tabela 12. Parâmetros cinéticos, concentração de etanol e ácido acético e produtividade a 37 °C, 150 rpm na estratégia de fermentação em frascos de soro nas posições vertical e horizontal.

Micro-organismo	Posição do frasco de soro	t_{lag} (h)[a]	ΔX (g p.s/L)[b]	μ (h^{-1})[c]	P_{EtOH} (g/L)[d]	Q_{EtOH} (g/L.h)[e]	P_{AC} (g/L)[f]	Q_{AC} (g/L.h)[g]
Clostridium carboxidivorans	Vertical	6	0,337	0,24	ND	ND	1,021	0,091
C. carboxidivorans	Horizontal	3	1,245	0,37	0,290	0,019	0,526	0,050
C. ljungdahlii		27	0,987	N.D.	0,021	0,001	0,443	0,024
C. ragsdalei		23	0,968	0,38	0,065	0,005	0,456	0,018

a: tempo da fase lag; b: Variação do crescimento celular, é calculado a partir da diferença entre a concentração final e a inicial (g.p.s./L); c: taxa expecífica de crescimento, calculado na fase exponencial; d: Produção de etanol (concentração máxima observada); e: Produtividade volumétrica de etanol; f: Concentração de ácido acético; g: produtividade volumétrica de ácido acético.

De acordo com a Figura 29 é possível notar que o aumento da turbulência devido ao posicionamento dos frascos na horizontal favoreceu o crescimento celular para *C. rasgdalei* e *C. ljungdahlii*, visto que não se detectou crescimento celular com frascos na posição vertical e o crescimento celular significativo foi observado para os frascos na horizontal. Para *C. carboxidivorans* foi possível observar um aumento concentração celular indicando que ocorreu melhora na transferência de massa ao posicionar os frascos na horizontal, que pode ser confirmado pelo aumento da taxa específica de crescimento (μ), menor fase lag, e redução do tempo de duplicação em relação ao cultivo com frascos na vertical (Tabela 12). Ramió-Pujol *et al.* (2014) mencionam o posicionamento dos frascos de inóculo e experimentos na horizontal para fermentação de gás de síntese por *C. carboxidivorans*, com o intuito de aumentar a transferência de massa da fase gasosa para a fase líquida, obtendo-se uma taxa específica de crescimento (μ) de 0,082 h^{-1}.

Comparando o perfil cinético de crescimento celular das três espécies (Figura 29) com frascos posicionados na horizontal é possível observar que todas as espécies na fase estacionária apresentam a mesma concentração celular (1,0 $g.p.s.L^{-1}$). Entretanto, *C. carboxidivorans* apresentou a menor fase lag, indicando uma melhora na produtividade em termos de biomassa.

Hurst e Lewis (2010) realizaram um estudo para avaliar a influência da pressão no crescimento celular durante a fermentação utilizando *C. carboxidivorans e* obtiveram uma fase lag de 17 horas e início da fase exponencial em 22 horas na

pressão de 1,35 atm. No mesmo trabalho, uma concentração final de células de 1,0 g.p.s.L^{-1} na pressão de 2,0 atm foi obtida após 70 horas de fermentação. No presente estudo, foi possível alcançar uma concentração celular semelhante (1,0 g.p.s.L^{-1}) após 15 horas de experimento, com uma fase lag muito inferior (3 horas) e a uma pressão menor (aproximadamente 1,2 atm). Já Dadak *et al*., (2016) reportaram que *C. ljungdahlii* durante a fermentação de gás de síntese apresentou uma fase lag de cerca de27 horas e concentração de células ao final de 50 horas de 1,0 g.p.s.L^{-1} a uma pressão de aproximadamente 1,2 atm.

Ambos os estudos (HUST e LEWIS, 2010; DADAK, et al., 2016) foram conduzidos com frascos na posição vertical, que pode ter ocasionado a baixa transferência de massa. A utlização dos frascos na posição horizontal durante a fermentação possibilitou o incremento da transferência de massa dos gases CO e CO_2 para a fase líquida, reduzindo, assim, a fase lag.

A melhora da transferência de massa promovida pela turbulência causada nos frascos de soro incubados na posição horizontal favoreceu a produção de etanol como apresentado na Tabela 12.

Não foi observada a produção de etanol e ácido acético nas fermentações de *C. ljungdahlii* e *C. rasgdalei* com frascos na vertical e *C. carboxidivorans* apresentou apenas produção de ácido acético (1,021 g/L). Em relação a comparação entre as cinéticas com frascos na horizontal, *C. carboxidivorans* apresentou a maior produtividade de etanol (0,019 g/L.h).

Após a avaliação do perfil cinético, a cepa *C. carboxidivorans* DSM 15243 foi escolhida para os estudos de minimização do meio de produção de etanol, uma vez que a cepa apresentou menor fase lag e também maior produção de etanol comparada as demais espécies.

Visando melhorar ainda mais a transferência de massa do gás de síntese para o meio líquido, foi testada a adição de perfluorodecalina, um perfluorocarboneto (PFC) que é utilizado como carreador de oxigênio em sistemas aeróbios (Amaral et al., 2007). Buscou-se com isso, o aumento do crescimento celular e também da produção de etanol por *Clostridium carboxidivorans*.

Os perfluorocarbonetos (PFC's) são moléculas que tiveram todos os seus átomos de hidrogênio substituídos por flúor. Essa substituição progressiva do hidrogênio pelo flúor leva a um aumento da sua massa molecular, fazendo com que os PFC's líquidos sejam mais pesados que os óleos minerais, por exemplo, e tenham, aproximadamente, o dobro da densidade da água, um exemplo de composto bastante usado, é a perfluorodecalina ($C_{10}F_{18}$). Uma das principais propriedades dos PFC's líquidos é que eles podem dissolver grandes volumes de gás, como por exemplo o CO_2. Esta solubilidade encontra-se relacionada com o volume molecular do gás a ser dissolvido e aumenta linearmente com a pressão parcial, aproximando-se da lei de Henry. Acredita-se que as moléculas gasosas ocupem "cavidades moleculares" presentes nos PFC's líquidos sem ocorrência de reações químicas (LOWE *et al.*, 1998).

Para avaliar o efeito desse carreador de gases na fermentação de gás de síntese, foram adicionados 20% (v/v) de PFC ao meio ATCC 2713. O perfil cinético de *C. carboxidivorans* nessas condições pode ser observado na Figura 30. A glicose presente no meio ATCC 2713 (1,0 g/L) foi totalmente consumida em 24 horas de experimento. No entanto, se observa uma queda no crescimento celular após esse período se mantendo em valores próximos a 0,25 g.p.s cél.L^{-1} até 94 horas. Amaral et al (2007) relataram a presença de células de *Yarrowia lipolytica* na fase do PFC, reduzindo sua concentração na fase líquida. Esse fenômeno pode ter ocorrido para *C. carboxidivorans*, o que explica essa queda da concentração celular na fase líquida.

De acordo com a Tabela 13 é possível verificar que a utilização de PFC no meio de cultivo não apresentou um incremento no crescimento celular, uma vez que no ensaio com meio ATCC 2713 sem a adição de PFC detectou-se, aproximadamente, o dobro de ΔX. A produção de etanol foi superior com a presença do PFC, mostrando um efeito positivo no aumento da transferência de CO e CO_2 para o meio de cultivo. No entanto, não se observa melhora na produtividade de etanol. De acordo com os resultados obtidos, os ensaios posteriores não tiveram a adição desse composto uma vez que o PFC é um composto caro e não demosntrou uma melhora tão grande no processo que justificasse sua adição.

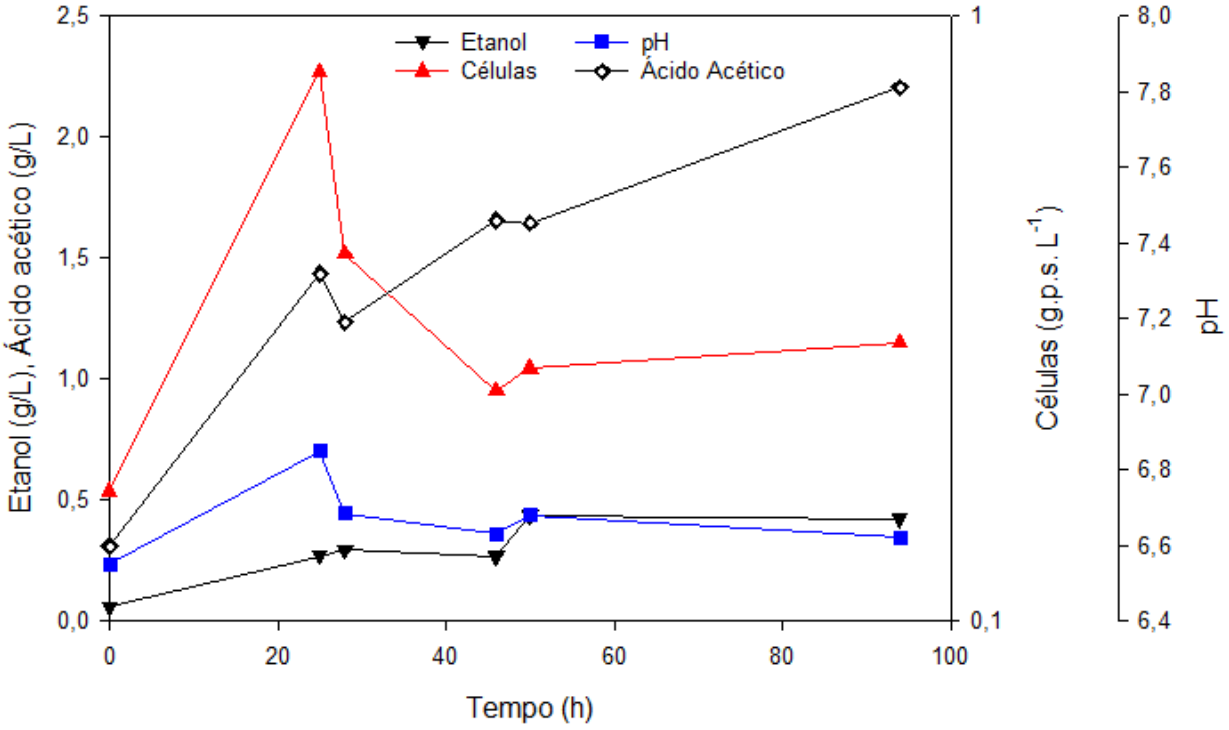

Figura 30. Perfil cinético de crescimento celular e formação de metabólitos do cultivo de Clostridium carboxidivorans em meio ATCC 2713, PFC e gás de síntese em frascos de soro agitados a 150 rpm e 37°C, colocados na horizontal. Experimentos em batelada alimentada de gás de síntese e glicose.

Tabela 13. Parâmetros cinéticos, concentração de etanol e ácido acético e produtividade a 37 °C, 150 rpm com frascos de soro nas posições horizontal, meio ATCC 2713 na presença e ausência de PFC.

PFC (%)	ΔX (g p.s/L)[a]	μ (h^{-1})[b]	P_{EtOH} (g/L)[c]	Q_{EtOH} (g/L.h)[d]	P_{AC} (g/L)[e]	Q_{AC} (g/L.h)[f]
0	1,245	0,37	0,290	0,019	0,526	0,050
20	0,646	N.D.	0,437	0,010	2,204	0,057

a: Variação do crescimento celular, é calculado a partir da diferença entre a concentração final e a inicial (g.p.s./L); b: taxa expecífica de crescimento, calculado na fase exponencial; c: Produção de etanol (concentração maxima observada); d: Produtividade volumétrica de etanol; e: Concentração de ácido acético; f: produtividade volumétrica de ácido acético.

5.3.1 Cultivos de *C. carboxidivorans* com frascos de soro na posição horizontal

Com o aumento da produção de etanol e biomassa devido à nova estratégia operacional (frascos na horizontal), novos cultivos foram realizados com *C. carboxidivorans* para avaliar diferentes composições de meio de cultivo.

Ramió-Pujol et al. (2014) avaliaram o impacto relacionado ao pH inicial na produção de solventes utilizando *C. ljungdahlii PETC e C. carboxidivorans P7*. As maiores concentrações de solventes obtidas ocorreram em pH 5,0, decaindo a medida que se aumentava o valor de pH, obtendo assim um aumento de 88% da produção de solventes em pH 5,0 quando comparada ao pH 6,0.Sendo assim, para avaliar o efeito do pH no meio de cultivo e assim favorecer o aumento da produtividade de etanol nos experimentos seguintes, foram realizados ensaios utilizando meio de cultivo ATCC 2713 e com pH inicial fixado em cinco valores diferentes (4,0; 5,0; 6,0; 7,0 e 8,0). Esses ensaios foram realizados em frascos de soro de 100 mL de volume útil contendo 50 mL de meio de cultivo. Foi borbulhado gás de síntese ao meio de cultivo e este também foi adicionado ao *headspace*. Esses ensaios foram realizados por 24 h e os resultados são apresentados na Tabela 14.

Tabela 14. Parâmetros cinéticos do cultivo de *Clostridium carboxidivorans* em frascos de soro realizados em agitador rotatório a 150 rpm 37°C na horizontal com diferentes valores de pH inicial e injeção de gás de síntese.

pH	ΔX (g p.s. cél/L)	P_{ETANOL} (g/L)	Q_{ETANOL} (g/L.h)	P_{AC} (g/L)	Q_{AC} (g/L.h)
4	0,024	0,033	0,001	0,380	0,016
5	0,128	0,030	0,001	0,600	0,025
6	0,231	0,151	0,006	1,064	0,044
7	0,206	0,226	0,009	1,357	0,057
8	0,172	0,166	0,007	1,564	0,065

a: Variação do crescimento celular, é calculado a partir da diferença entre a concentração final e a inicial (g.p.s./L); b: Produção de etanol (concentração máxima observada); c: Produtividade volumétrica de etanol; d: Concentração de ácido acético; e: produtividade volumétrica de ácido acético.

De acordo com a Tabela 14 é possível observar que em pH 7,0 maiores produção e produtividade em etanol foram encontradas. A produtividade em etanol com pH inicial de 7,0 foi nove vezes superior ao obtido em pH 5,0.

Quando fixado o pH inicial em 4,0, nota-se que o crescimento celular não foi favorecido, sendo observado a menor produção de células (ΔX = 0,024 g p.s. cél/L) e menor produtividade em etanol (0,001 g/L.h) e ácido acético (0,016 g/L.h) (Tabela 14). Segundo Abubackar et al. (2012), o pH é considerado um fator importante para a

regulação do metabolismo e fisiologia de bactérias, como a estabilização do potencial transmembrana na força próton motora em bactérias carboxidotróficas incluindo a transição entre as fases acidogênicas e solventogênicas. Dessa forma, de acordo com os resultados obtidos, os ensaios seguintes tiveram assim seu pH inicial fixado em 7,0.

Outra estratégia foi testada, com o intuito de favorecer o aumento da biomassa e também o aumento da produção de etanol durante a fermentação: a batelada alimentada. Para tanto, ao meio de cultivo era adicionado 5 mL de meio ATCC 2713 dez vezes concentrado após 24 h de cultivo. Repetiu-se esse procedimento a cada 3 horas (27 h, 30 h, 33 h) e também após 72 h, supondo consumo parcial dos constituintes presentes no meio de cultivo durante esses períodos. Como cada frasco continha 50 mL de meio de cultivo, com a retirada de 5 mL de amostra e adição de 5 mL de meio dez vezes concentrado, pretendia-se atingir a concentração inicial de meio ATCC 2713. Após cada amostragem, também era adicionado gás de síntese por 30 segundos nos frascos. Estes, então, eram incubados a 37°C e 150 rpm em agitador rotatório. Os resultados são apresentados na Figura 31.

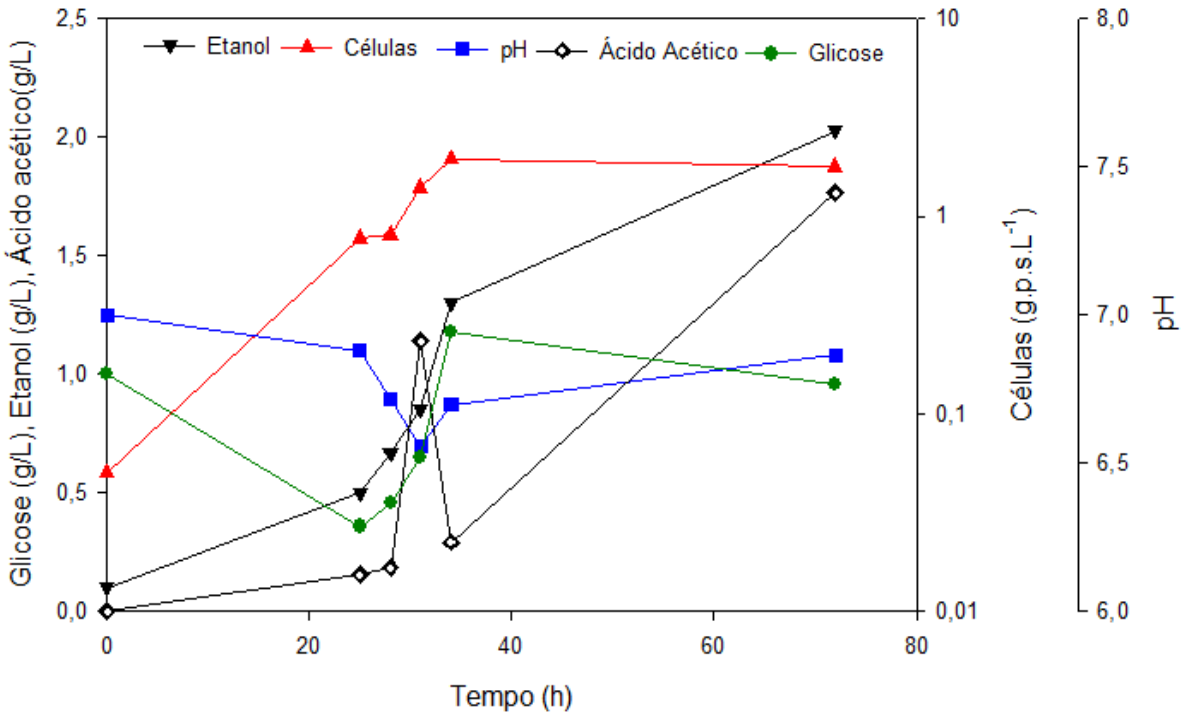

Figura 31. Perfil de crescimento celular para Clostridium carboxidivorans com frascos posicionados na horizontal e batelada alimentada de meio ATCC 2713 e

adição de gás de síntese em frascos de soro agitados a 150 rpm e 37°C, colocados na horizontal.As linhas entre os pontos não representam valores experimentais.

A concentração celular atingiu 1,93 g.p.s.cél.L^{-1} (Figura 31) em 33 horas de cultivo, mantendo-se praticamente constante a partir de então até 72 horas de experimento. A concentração de ácido acético se manteve crescente durante todo o experimento alcançando ao final do experimento 1,765g/L em 72 horas.

Observa-se que nas primeiras 24 horas de experimento a maior parte da glicose presente no meio de cultivo foi consumida chegando a 0,3 g/L e a glicose acrescentada pela adição do meio dez vezes concentrato a cada 3 horas foi consumida durante todo o experimento. Percebe-se que em 34 horas de cultivo o valor de glicose atingido foi de 1,18 g/L e ao final de 72 horas a concentração de glicose era de 0,96 g/L, o que representa uma diminuição da taxa de consumo desse substrato.

Comparando-se o ensaio sem alimentação (Tabela 12) e o ensaio com alimentação de meio concentrado (Tabela 15), nota-se que com essa última estratégia ocorreu um aumento na produção de etanol de, aproximadamente, sete vezes, saltando de 0,290 para 2,03 g/L. Ainda comparando as duas estratégias, nota-se que com a adição de meio concentrado houve diminuição da produtividade de ácido acético (de 0,05 para 0,024g.L.h^{-1}).

Portanto, observa-se que a nova estratégia foi benéfica para maximização da produção de etanol por *C. carboxidivorans*. Por este motivo os ensaios posteriores foram realizados com a adição de meio concentrado.

Tabela 15. Parâmetros cinéticos do cultivo de *Clostridium carboxidivorans* em frascos de soro realizados em agitador rotatório a 150 rpm 37°C na horizontal com adição de meio 10 vezes concentrado e injeção de gás de síntese.

Meio	pH inicial –final	∆X (g p.s. cél/L)	μ (h^{-1})	P_{ETANOL} (g/L)	Q_{ETANOL} (g/L.h)	P_{AC} (g/L)	Q_{AC} (g/L.h)
ATCC 2713	7,0-6,8	1,888	0,106	2,026	0,04	1,765	0,024
Glicose	6,03- 3,78	1,135	0,156	N.D.	N.D.	0,190	0,008
Glicose + EL	5,78-4,21	1,26	N.D.	N.D.	N.D.	0,140	0,004
Glicose + triptona	6,8-5,9	0,83	0,045	1,203	0,016	1,109	0,053

EL: Extrato de lêvedo; ∆X: variação máxima da concentração de células (X_{max} – $X_{inicial}$); μ: taxa específica de crescimento celular obtido na fase exponencial do crescimento pelo coeficiente angular da curva ln(x) *versus*

tempo; P_{ETANOL}; P_{AC}: concentração máxima de produto ou subproduto (Etanol, AC: ácido acético); $Q_{ETANOL}Q_{AC}$: produtividade volumétrica máxima para o produto ou subproduto (Etanol, AC: ácido acético); N.D.: não detectado.

Objetivando minimizar o meio de cultivo para a fermentação de gás de síntese testou-se substituir os componentes do meio ATCC 2713 por apenas glicose (1 g/L), alimentando o cultivo com 5 mL de solução de glicose dez vezes concentrada (i.e., 10 g/L) após 24 horas e, em seguida, a cada 3 horas, (27 h, 30 h, 33 h), 72 h e 146 h, supondo consumo total da glicose nesses períodos. Gás de síntese também era adicionado a cada amostragem. O perfil cinético de *C. carboxidivorans* nessas condições pode ser observado na Figura 32, que mostra o consumo total, da glicose nas primeiras 24 horas de experimento. No entanto, a alimentação de glicose a cada 3 horas mostrou-se ineficiente visto que a concentração desse substrato foi aumentando no meio de cultivo, atingindo 3,3 g/L ao final de 146 horas.

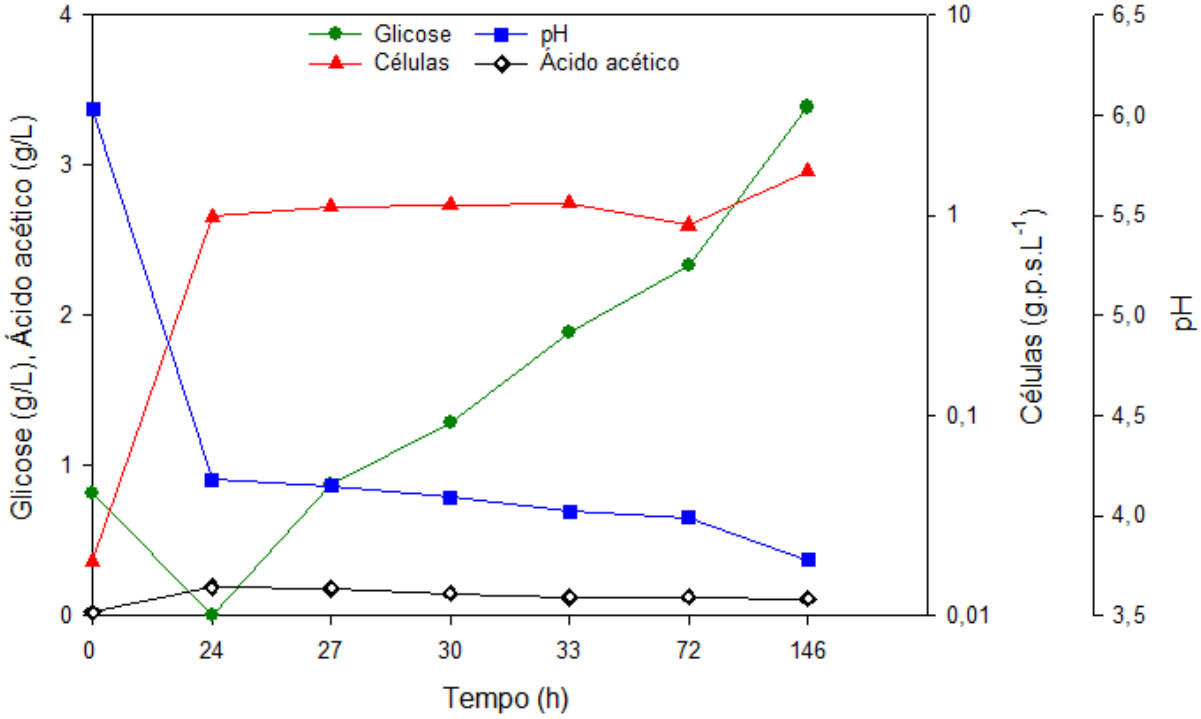

Figura 32. Cinética de crescimento celular e formação de metabólitos do cultivo de Clostridium carboxidivorans em meio de cultivo com glicose (1 g/L) e gás de síntese em frascos de soro agitados a 150 rpm e 37°C colocados na horizontal. Experimentos em batelada alimentada de gás de síntese e glicose.

A concentração celular atingiu 1,0 g.p.s. cél.L^{-1} (Figura 32) em 24 horas de cultivo, mantendo-se constante a partir de então até 72 horas de experimento. Em seguida, observa-se um ligeiro aumento para 1,5 g.p.s. cél. L^{-1} em 146 horas, perfazendo um crescimento celular de ΔX = 1,135 g.p.s. cél.L^{-1} (Tabela 15). A

concentração de ácido acético acompanha o perfil de crescimento celular até 24 horas (0,190 g/L) e, em seguida, ocorre um decaimento até 146 horas (0,112 g/L).

A limitação de nutrientes no meio de cultivo pode causar também limitações no metabolismo celular, como na sua manutenção, na produção de enzimas intracelulares e formação de cofator (COTTER et al., 2009; MOHAMMADI et al., 2011).

O perfil cinético observado para *C. carboxidivorans* mostra que nas primeiras 24 h de cultivo ocorreu crescimento celular provavelmente devido a resíduos do meio ATCC vindo do pré-inóculo. Com a exaustão desses nutrientes (fonte de nitrogênio e vitaminas), o adicional de glicose não foi metabolizado pelas células, acumulando-se no meio de cultivo e limitando o crescimento celular. Assim, após 24 h de cultivo nenhum produto foi formado e, provavelmente, o ácido acético produzido começou a ser consumido, junto com resíduos celulares (células que sofreram apoptose) para um ligeiro crescimento final.

Portanto, observa-se que é necessário adicionar nutrientes ao meio de cultivo, além de fonte de carbono, para produção de metabólitos por *C. carboxidivorans*.

Considerando, então, que nitrogênio é um nutriente importante para *Clostridium*, esse componente foi adicionado ao meio de cultivo nos experimentos seguintes. O nitrogênio pode estar presente no meio de cultivo na forma de amônia, proteína hidrolisada, extrato de lêvedo, triptona e outros e sua presença é necessária para a manutenção de uma cultura e está diretamente relacionada a produção de etanol (Ramió-Pujol, 2015).

O meio ATCC 2713 possui como fontes de nitrogênio: peptona, triptona e extrato de lêvedo. Uma vez que a triptona é o componente mais oneroso, sendo responsável por 40,5% do custo total do meio de cultivo, seguido pela peptona de gelatina (28% do custo) de acordo com cotação da empresa Sigma Aldrich (Tabela 16), avaliou-se a possibilidade de *C. carboxidivorans* apresentar crescimento celular e produzir etanol utilizando uma fonte de nitrogênio menos onerosa, o extrato de lêvedo. Além de fonte de nitrogênio, o extrato de lêvedo também serve como fonte de vitaminas e outros elementos essenciais ao crescimento celular.

Assim, no meio de cultivo utilizado havia 1 g/L de glicose e 2,5 g/L de extrato de lêvedo e após 24 de cultivo (para crescimento do inóculo), 5 mL desse meio dez

vezes concentrado era adicionado a 50 mL de meio de cultivo após a retirada de 5 mL de amostra. Essa adição de meio concentrado era realizada após 24 horas e, em seguida, a cada 3 horas (27 h, 30 h, 33 h), 72 h e 146 h em conjunto com a adição de gás de síntese.

Tabela 16. Custo dos componentes utilizados para preparo de meio ATCC 2713.

	R$/kg	R$/L de meio ATCC	Percentual do custo total do meio ATCC 2713 (%)
Triptona	1.872,00	18,7	40,5
Peptona gelatina	1.294,00	12,9	28,0
Extrato de lêvedo	960,00	4,8	10,4
Glicose	836,00	0,8	1,8
Cloreto de sódio	32,20	0,2	0,3
L-arginina	1.900,00	1,9	4,1
Piruvato de sódio	5.520,00	5,5	11,9
Menadiona	13.280,00	0,0	0,01
Haemim	277.000,00	1,4	3,0

O perfil cinético de crescimento está apresentado na Figura 33, em que é possível notar que com a adição de extrato de lêvedo não ocorreu produção de etanol, havendo apenas pequena produção de ácido acético (0,14 g/L) e uma produção de biomassa de ΔX =1,26 g p.s. cél./L (Tabela 15). Também foi observada uma diminuição do pH.

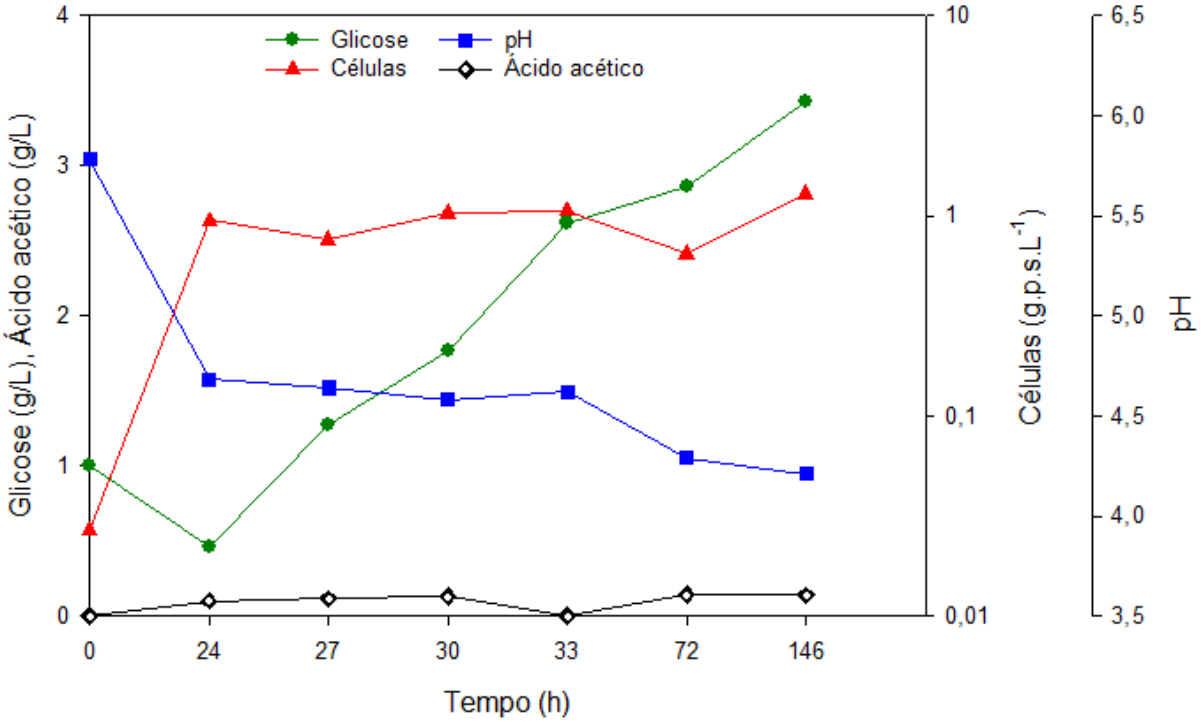

Figura 33. Cinética de crescimento celular e formação de metabólitos do cultivo de Clostridium carboxidivorans em meio com extrato de lêvedo (2,5 g/L) e glicose (1 g/L) em frascos de soro agitados a 150 rpm e 37°C posicionados na horizontal. Experimentos em batelada alimentada de gás de síntese e meio dez vezes concentrado.As linhas entre os pontos não representam valores experimentais.

No experimento com a adição de extrato de lêvedo (2,5 g/L) e glicose (1 g/L) apresentado na Figura 33, é possível observar um perfil de crescimento celular muito semelhante ao obtido no ensaio com apenas glicose (1 g/L) (Figura 32), ambos ensaios alcançando aproximadamente 1 g.p.s células/L. No entanto, novamente a glicose se acumulou no meio de cultivo e o crescimento celular se estabilizou após 24 h de cultivo. Esse resultado mostra que o extrato de lêvedo não é suficiente como única fonte de nutrientes para promover o consumo da glicose adicionada e a produção de metabólitos.

Diferentes concentrações de extrato de lêvedo foram avaliadas em experimentos de fermentação por *Clostridium lijungdahlii* e foi observada que as maiores concentrações de etanol estavam relacionadas a baixas concentrações de extrato de lêvedo na faixa de 0 a 0,1 g/L de extrato de lêvedo (BARIK, et al.,1988; GADDY e CLAUSEN,1992). Em outro estudo foi avaliado o impacto de concentrações na faixa de 1 a 20 g/L de extrato de lêvedo em cultivos de *Clostridium thermocellum* e

houve a diminuição de crescimento celular e produção de etanol em ambas as concentrações de extrato de lêvedo (GADDY e CLAUSSEN ,1992; SATO *et.al*., 1992).

Kopke *et al.* (2010) em seu estudo relatam a necessidade de alguns íons inorgânicos, como o sódio, para algumas bactérias acetogênicas visto que estes auxiliam a ATPase a realizar a geração de energia, tendo efeitos na concentração celular final, regulando a energia de conservação celular e causando efeito na produção de solventes como o etanol.

Como a estratégia com extrato de lêvedo não funcionou, decidiu-se testar a fonte de nitrogênio mais onerosa, a triptona, em cultivo realizado da mesma forma que foi realizado com extrato de lêvedo. Pode-se observar na Figura 34 o perfil de crescimento celular de *C. carboxidivorans*, em que se detectou a formação do produto etanol e subproduto ácido acético. A formação de ácidos orgânicos favorece uma ligeira redução do pH do meio de cultivo indicando assim que ocorreu a fase acidogênica.

A variação máxima de crescimento celular ($\Delta X \sim 0{,}863$ g.p.s.células/L) (Tabela 15), foi inferior aos demais cultivos com frascos na horizontal (somente com glicose ou com glicose + extrato de lêvedo). Mesmo assim, nesse cultivo observa-se produção de etanol, o que não havia sido observado nos demais cultivos. Além disso, observa-se que não há acúmulo acentuado de glicose (Figura 34) no meio de cultivo, durante a fermentação indicando a necessidade da triptona para o consumo dessa fonte de carbono.

Nesse cultivo, a produção de etanol (1,203 g/L) foi a metade da produção desse solvente em meio ATCC (2,026 g/L) (Tabela 15), entretanto entre os ensaios testados apresentados na Tabela 15 somente neste ensaio houve a produção desse metabólito.

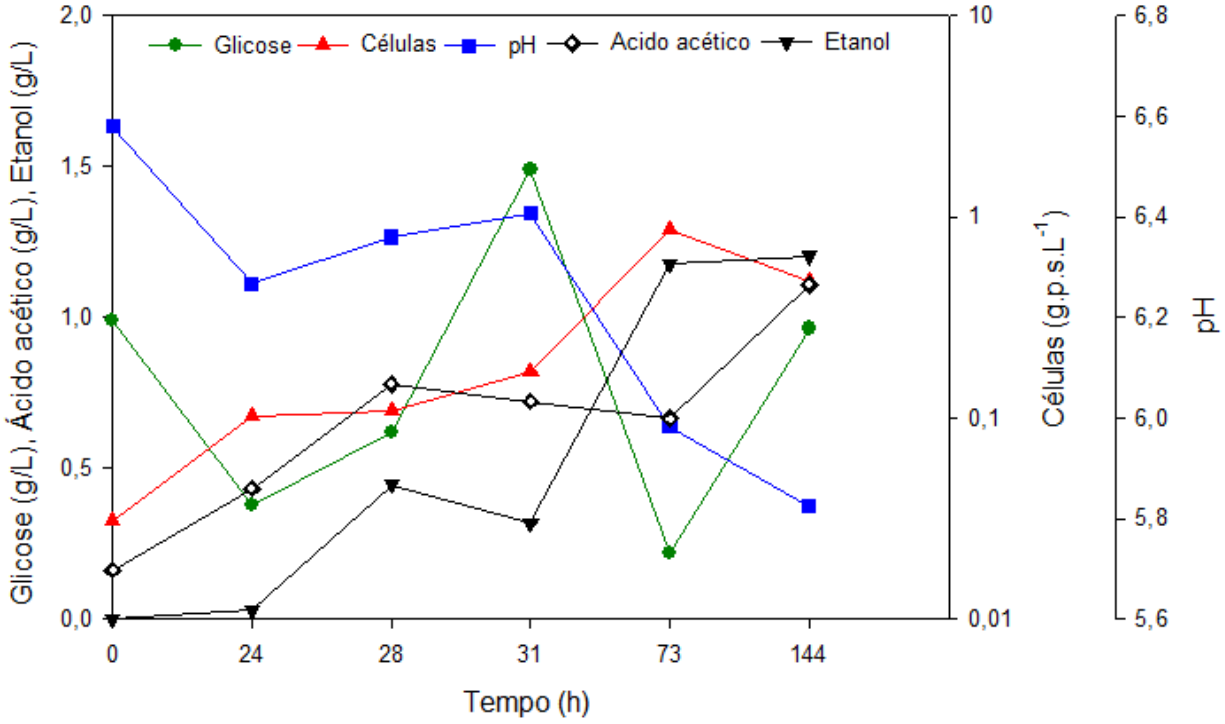

Figura 34. Cinética de formação de metabólitos de cultivo de Clostridium carboxidivorans em meio de cultivo com triptona e glicose (1 g/L) em experimentos em batelada alimentada de gás de síntese e meio dez vezes concentrado. As linhas entre os pontos não representam valores experimentais.

A adição de suplementos no meio de cultivo para fermentação de gás de síntese como extrato de lêvedo ou milhocina é uma prática comum (MADDIPATTI et al., 2011); KUNDIYANA et al., 2010); RAMACHANDRIYA et al., 2013)). Esses compostos apresentam micronutrientes que podem ser utilizados pelas bactérias acetogênicas como fonte de vitaminas. Maddipatti et al. (2011) observaram em fermentações de *C.ragsdalei* um aumento de 31 % na produção de etanol e butanol em meio de cultivo preparado com 2% de milhocina quando comparado ao meio de cultivo preparado com extrato de lêvedo.

Kundiyana et al. (2010) obtiveram um aumento de 28% na produção de etanol utilizando 0,5 g/L de milhocina quando comparado ao meio de cultivo preparado com extrato de lêvedo em cultivos de *C.ragsdalei*. Ramachandriya et al. (2013) observaram um aumento da produção de etanol e ácidos orgânicos em meio de cultivo preparado com milhocina em fermentações por *C. carboxidivorans*.

Para avaliar a substituição da fonte de nitrogênio (triptona) por milhocina foram realizados ensaios com diferentes concentrações de milhocina (10, 20, 30, 40 e 50 g/

L de milhocina) em frascos 100 mL de volume útil contendo 50 mL de meio e 1,0 g/ L de glicose. Foi adicionado gás de síntese ao meio de cultivo e ao *headspace*. Foram retiradas amostras de 5 mL em 0, 24, 27, 30, 33, 72 e 146 horas para análise da crescimento celular e quantificação do consumo de glicose e produção ácidos orgânicos. A cada amostragem foi adicionado gás de síntese e meio (glicose + milhocina) dez vezes concentrado de cada concentração estudada. Devido a formação de precipitados após a autoclavação do meio de cultivo, esse era filtrado e autoclavado antes de iniciar o experimento, não houve ajuste de pH.

É possível observar na Tabela 17 que o aumento da concentração de milhocina não favoreceu o aumento da taxa específica de crescimento. Nota-se, entretanto, um aumento significativo na produção de biomassa com o aumento da concentração de milhocina no meio de cultivo. A produção de etanol e de ácido acético aumentaram com o aumento da concentração de milhocina, assim como, suas respectivas produtividades.

Apesar de ter havido a produção de 0,188 g/L de etanol e produtividade de 0,0024 g/L.h com 50 g/L de milhocina, esse valor de produtividade é ainda 6,7 vezes inferior ao estudo realizado com triptona e glicose (Tabela 15), sinalizando que para produção de etanol a substituição de triptona por milhocina não melhorou a produção e a produtividade com relação a etanol. Em todos os ensaios foi observado acúmulo de glicose no meio de cultivo,mostrando que a milhocina não contribuiu para o consumo dessa fonte de carbono como a triptona fez.

Tabela 17. Parâmetros cinéticos do cultivo de *Clostridium carboxidivorans* em frascos de soro realizados em agitador rotatório a 150 rpm 37°C na horizontal, com meio contendo glicose (1 g/L)e milhocina, adição de meio dez vezes concentrado e injeção de gás de síntese.

Milhocina (g/L)	pH inicial - final	ΔX (g p.s. cél/L)	μ (h^{-1})	P_{ETANOL} (g/L)	Q_{ETANOL} (g/L.h)	P_{AC} (g/L)	Q_{AC} (g/L.h)
0	6,03- 3,78	1,14	0,156	N.D.	N.D.	0,190	0,008
10	4,41-3,72	1,54	0,086	0,041	0,0005	0,340	0,0066
20	4,215-3,73	1,81	0,080	0,080	0,0011	0,624	0,0138
30	4,14-3,79	2,74	0,072	0,114	0,0015	0,938	0,022
40	4,1-3,83	3,37	0,064	0,114	0,0018	1,177	0,025
50	4,08-3,83	4,37	0,069	0,188	0,0024	1,530	0,034

Extrato de lêvedo; ΔX: variação máxima da concentração de células (X_{max} – $X_{inicial}$); μ: taxa específica de crescimento celular obtido na fase exponencial do crescimento pelo coeficiente angular da curva ln(x) *versus* tempo; $\mathbf{P_{ETANOL}}$**;** $\mathbf{P_{AC}}$: concentração máxima de produto ou subproduto (Etanol, AC: ácido acético); $\mathbf{Q_{ETANOL}Q_{AC}}$**:** produtividade volumétrica máxima para o produto ou subproduto (Etanol, AC: ácido acético); N.D.: não detectado.

Esses ensaios utilizando milhocina indicam que é possível formular um meio de cultivo com menos componentes que o meio ATCC 2713 e assim gerar quantidades similares de etanol, entretanto alguns componentes são essenciais para o consumo da fonte de carbono e obtenção de produtos. Portanto, faz-se necessário um estudo da influência dos componentes do meio de cultivo na produção de etanol de forma a minimizar esses componentes no meio de cultivo e elevar a produção de etanol.

5.4 PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL E ANÁLISE ESTATÍSTICA PARA AUMENTO DA PRODUÇÃO DE ETANOL POR *CLOSTRIDIUM CARBOXIDIVORANS*

Para a obtenção de um meio de cultivo minimizado e aumento de produção de etanol, foi realizada uma sequência de três planejamentos experimentais, sendo um delineamento *Plackett-Burman,* um delineamento fatorial fracionado (2^{4-1}) e um delineamento de composto central rotacional (DCCR). O tratamento estatístico dos resultados foi realizado empregando-se o *software* STATISTICA, versão 7.0 (StatSoft, Inc.) incluindo análise de variância (ANOVA), para obter o impacto e a significância de cada termo além de determinar as interações entre as variáveis dependentes e independentes.

A qualidade do modelo polinomial foi constatada por meio da determinação do coeficiente R^2, e a sua significância estatística verificada pelo teste-F considerando intervalo de confiança de 90% ou p-valor menor que 0,1.Todos os experimentos dos planejamentos experimentais foram realizados em frascos de soro colocados na horizontal no incubador rotatório com agitação de 150 rpm a 37 ºC. Cinco mililitros do meio de cada experimento (dez vezes concentrado) era adicionado a 50 mL do cultivo após retirada de 5 mL de amostra. O gás de síntese também era adicionado ao meio de cultivo a cada amostragem que ocorria após 24 h, 27 h, 30 h, 32 h, 72 h e 144 h.

5.4.1 Planejamento experimental do tipo *Plackett-Burman*

O primeiro planejamento experimental do tipo *Plackett-Burman* foi realizado para selecionar os componentes do meio ATCC 2713 que seriam realmente significativos para a produção de etanol. Dessa forma, a maior quantidade de etanol produzida durante 144 h de cultivo foi considerada uma variável dependente. Esse estudo teve como variáveis independentes triptona, peptona de gelatina, extrato de lêvedo, cloreto de sódio, L-arginina, piruvato de sódio, menadiona e hemina (g/L).

A matriz do planejamento experimental bem como os resultados obtidos estão apresentadas na Tabela 18.

Tabela 18. Matriz de ensaio do primeiro delineamento de *Plackett-Burman* para o cultivo de *Clostridium carboxidivorans* para a produção de etanol.São apresentados os valores das variáveis (x_1, x_2, x_3, x_4, x_5, x_6:, x_7e x_8) codificados (1, -1, 0) e os valores reais estão entre parêntesis (em g/L).

Ensaio	x_1	x_2	x_3	x_4	x_5	x_6	x_7	x_8	P_{EtOH} (g/L)
1	1 (10)	-1 (0)	1 (5)	-1 (0)	-1 (0)	-1 (0)	1 (0,0005)	1 (0,005)	0,79
2	1 (10)	1 (10)	-1 (0)	1 (5)	-1 (0)	-1 (0)	-1 (0)	1 (0,005)	0,90
3	-1 (0)	1 (10)	1 (5)	-1 (0)	1 (1)	-1 (0)	-1 (0)	-1 (0)	0,69
4	1 (10)	-1 (0)	1 (5)	1 (5)	-1 (0)	1 (1)	-1 (0)	-1 (0)	0,78
5	1 (10)	1 (10)	-1 (0)	1 (5)	1 (1)	-1 (0)	1 (0,0005)	-1 (0)	1,21
6	1 (10)	1 (10)	1 (5)	-1 (0)	1 (1)	1 (1)	-1 (0)	1 (0,005)	1,87
7	-1 (0)	1 (10)	1 (5)	1 (5)	-1 (0)	1 (1)	1 (0,0005)	-1 (0)	0,51
8	-1 (0)	-1 (0)	1 (5)	1 (5)	1 (1)	-1 (0)	1 (0,0005)	1 (0,005)	0,25
9	-1 (0)	-1 (0)	-1 (0)	1 (5)	1 (1)	1 (1)	-1 (0)	1 (0,005)	0,03
10	1 (10)	-1 (0)	-1 (0)	-1 (0)	1 (1)	1 (1)	1 (0,0005)	-1 (0)	0,99
11	-1 (0)	1 (10)	-1 (0)	-1 (0)	-1 (0)	1 (1)	1 (0,0005)	1 (0,005)	0,51
12	-1 (0)	-1 (0)	-1 (0)	-1 (0)	-1 (0)	-1 (0)	-1 (0)	-1 (0)	0,04
13	0 (5)	0 (5)	0 (2,5)	0 (2,5)	0 (0,5)	0 (0,5)	0 (0,00025)	0 (0,0025)	1,65
14	0 (5)	0 (5)	0 (2,5)	0 (2,5)	0 (0,5)	0 (0,5)	0 (0,00025)	0 (0,0025)	1,92
15	0 (5)	0 (5)	0 (2,5)	0 (2,5)	0 (0,5)	0 (0,5)	0 (0,00025)	0 (0,0025)	1,79

x_1: triptona; x_2: peptona; x_3: extrato de lêvedo; x_4: NaCl; x_5: L-Arginina; x_6: piruvato; x_7: menadiona; x_8: Hemina; P_{EtOH}: Maior concentração de etanol detectada durante 144 h de cultivo.

As maiores concentrações de etanol durante 144 h de cultivo variaram de 0,032 a 1,92 $g.L^{-1}$com as diferentes composições de meio de cultivo. Os resultados desse primeiro planejamento *Plackett-Burman* forneceram um coeficiente de determinação (R^2) de 0,496 (Tabela 19), que embora não se ajuste adequadamente aos dados experimentais, pode assim ser gerado o Gráfico de Pareto (Figura 35) para estimação dos parâmetros mais influentes.

Tabela 19. Tabela ANOVA obtida considerando interações de segunda ordem obtendo R^2 = 0,4963 e Erro puro = 0,018233

	SS	Df	MS	F	p >F
(1) Triptona	**1,694257**	**1**	**1,694257**	**92,92085**	**0,010591**
(2) Peptona	**0,662230**	**1**	**0,662230**	**36,31975**	**0,026446**
(3) Extrato de lêvedo	0,118207	1	0,118207	6,48300	0,125795
(4) NaCl	0,121807	1	0,121807	6,68044	0,122733
(5) L-Arginina	**0,186751**	**1**	**0,186751**	**10,24227**	**0,085324**
(6) Piruvato	0,054271	1	0,054271	2,97646	0,226626
(7) Menadiona	0,000217	1	0,000217	0,01189	0,923132
(8) Hemina	0,001752	1	0,001752	0,09609	0,785889
Falta de ajuste	**2,844727**	**4**	**0,711182**	**39,00448**	**0,025153**
Erro puro	0,036467	2	0,018233		
SS total	5,720684	14			

SS: soma dos quadrádita; Df: grau de libertdade; MS: média quadrática; F:Fisher calculado; *p* >F= Probabilidade de Fisher.

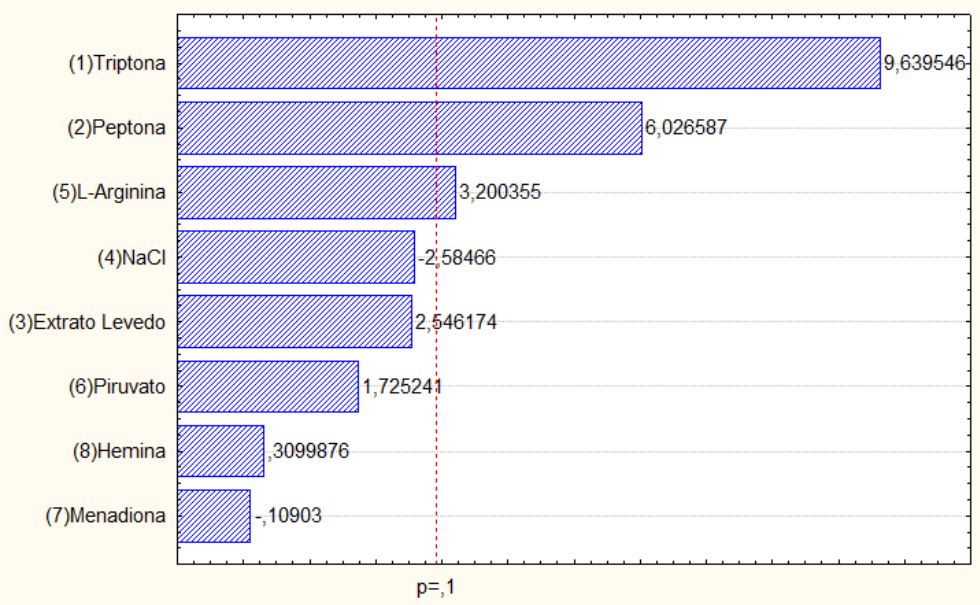

Figura 35. Diagrama de Pareto para do delineamento Plackett-Burman mostrando após tracejado vermelho (p < 0,1) variáveis significativas para produção de etanol ($g.L^{-1}$).

Analisando o Gráfico de Pareto (Figura 35) os valores dispostos ao lado de cada retângulo representam a estatística do teste *t* de *Student*, sendo considerados em módulo no modelo matemático da hipótese nula que determina a significância do fator. A magnitude dos efeitos é representada pelas colunas enquanto que a linha transversal às colunas representa p = 0,1, ou seja, um nível de significância de 10% (α = 0,1). Assim, os fatores a direita da linha transversal rejeitam a hipótese nula e são

estatisticamente significativos ao nível de 90% de confiança. São consideradas significativas as variáveis que ultrapassam a direita da linha tracejada.

É possível observar na Figura 35 que os componentes do meio ATCC que influenciam significativamente a produção de etanol são: triptona, peptona de gelatina e L-arginina. Entretanto, devido a influência positiva do extrato de lêvedo no crescimento celular, observado nos ensaios preliminares e também ao ajuste ruim do modelo (R^2 = 0,49636), esse composto foi adicionado ao planejamento seguinte.

Com esse resultado foi possível selecionar os constituintes do meio de cultivo que seriam utilizados na segunda etapa da sequência de planejamentos, o delineamento fatorial fracionado.

5.2.7.2 Planejamento experimental do tipo delineamento fatorial fracionado (2^{4-1})

Considerando as variáveis com influência significativa na produção de etanol indicadas pelo planejamento do tipo *Plackett-Burman*: triptona, peptona de gelatina e L-arginina e considerando o extrato de lêvedo, uma fonte de vitaminas essencial para o crescimento dos micro-organismos, realizou-se um planejamento fatorial fracionado 2^{k-1}, com k = 4, e dois pontos centrais. Como variável dependente considerou-se a máxima produção de etanol detectada durante 144 h de cultivo e a máxima produtividade desse solvente. A matriz dos ensaios bem como os resultados são apresentados na Tabela 20.

Tabela 20. Matriz dos ensaios do delineamento fatorial fracionado (2^{4-1}) com os valores codificados (máximo, +1, mínimo, -1 e ponto central, 0) e valores reais entre parêntesis (em g/L)e os resultados para a variável dependente, produção máxima e produtividade de etanol.

Ensaio	x_1	x_2	x_3	x_4	P_{EtOH} (g/L)	Q_{EtOH} (g/(L.h)
1	-1 (2)	-1 (2)	-1 (1)	-1 (0,2)	0,287	0,004
2	1 (12)	1 (12)	-1 (1)	1 (1,2)	0,350	0,004
3	-1 (2)	-1 (2)	-1 (1)	1 (1,2)	0,340	0,005
4	1 (12)	1 (12)	-1 (1)	-1 (0,2)	0,257	0,008
5	-1 (2)	-1 (2)	1 (7)	1 (1,2)	0,216	0,007
6	1 (12)	1 (12)	1 (7)	-1 (0,2)	0,671	0,009
7	-1 (2)	-1 (2)	1 (7)	-1 (0,2)	0,677	0,009

8	1 (12)	1 (12)	1 (7)	1 (1,2)	1,614	0,022
9	0 (7)	0 (7)	0 (4)	0 (0,7)	0,985	0,014
10	0 (7)	0 (7)	0 (4)	0 (0,7)	0,967	0,013

x_1: triptona; x_2: peptona de gelatina (pancreática); x_3: extrato de lêvedo; x_4: L-arginina; P_{EtOH}: Maior concentração de etanol detectada durante 144 h de cultivo.

A magnitude dos efeitos estimados de cada variável independente é apresentada no diagrama de Pareto, fornecendo o efeito quantitativo estimado que cada uma das variáveis sobre a produção de etanol (Figura 36) e a produtividade de etanol (Figura 37), estabelecendo quais destes efeitos encontram-se dentro do grau de confiança estabelecido para a análise (90%). As Tabelas 21 e 22 apresentam a tabela ANOVA para a produção de etanol e produtividade em etanol, respectivamente.

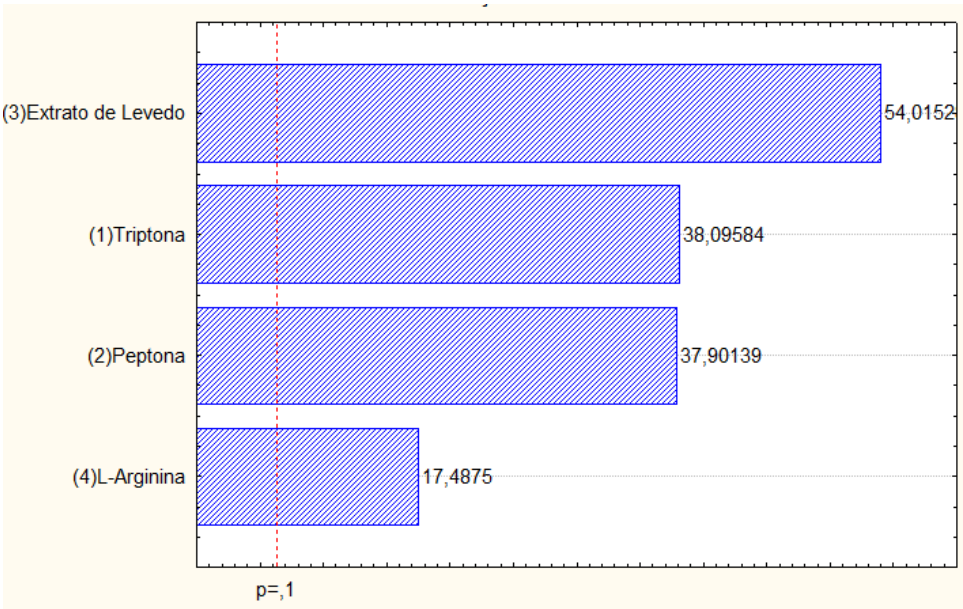

Figura 36. Diagrama de Pareto para o efeito estimado de cada variável do planejamento fatorial fracionado 2^{4-1}. Variável dependente é a produção de etanol (g/L).

Tabela 21. Tabela ANOVA obtida para o delineamento fatorial fracionado2^{4-1}considerando interações de segunda ordem obtendo-se R^2 = 0,54918 e Erro puro = 0,000162. Variável dependente é a produção de etanol (g/L).

	SS	df	MS	F	p >F
(1) Triptona	**0,235109**	**1**	**0,235109**	**1451,293**	**0,016707**
(2) Peptona	**0,232715**	**1**	**0,232715**	**1436,515**	**0,016793**
(3) Extrato de lêvedo	**0,472659**	**1**	**0,472659**	**2917,650**	**0,011785**
(4) L-Arginina	**0,049542**	**1**	**0,049542**	**305,813**	**0,036365**
Falta de ajuste	**0,812563**	**4**	**0,203141**	**1253,955**	**0,021176**
Erro puro	0,000162	1	0,000162		

SS total	1,802750	9

SS: soma dos quadrádita; Df: grau de libertdade; MS: média quadrática; F:Fisher calculado; *p* >F= Probabilidade de Fisher.

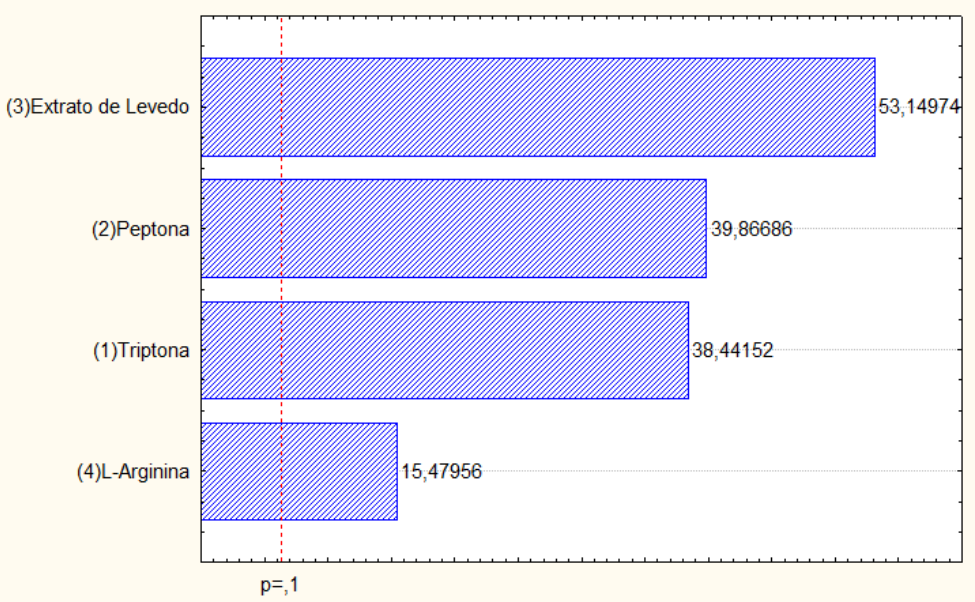

Figura 37. Diagrama de Pareto para o efeito estimado de cada variável do planejamento fatorial fracionado 2^{4-1}. Variável dependente é a produtividade de etanol (g/L.h).

Tabela 22. Tabela ANOVA obtida para o delineamento fatorial fracionado2^{4-1} considerando interações de segunda ordem obtendo-se R^2 = 0,65709 e Erro puro = 0,0000005. Variável dependente é a produtividade de etanol (g/L.h)

	SS	df	MS	F	p >F
(1) Triptona	**0,000041**	**1**	**0,000041**	**81,0000**	**0,070447**
(2) Peptona	**0,000050**	**1**	**0,000050**	**100,0000**	**0,063451**
(3) Extrato de lêvedo	**0,000085**	**1**	**0,000085**	**169,0000**	**0,048875**
(4) L-Arginina	**0,000008**	**1**	**0,000008**	**16,0000**	**0,155958**
Falta de ajuste	**0,000095**	**4**	**0,000024**	**47,5000**	**0,108347**
Erro puro	0,000000	1	0,000000		
SS total	0,000279	9			

SS: soma dos quadrádita; Df: grau de libertdade; MS: média quadrática; F:Fisher calculado; *p* >F= Probabilidade de Fisher.

Analisando os diagramas de pareto (Figura 36 e 37), observa-se que as variáveis independentes estudadas são todas estatisticamente significativas tanto para a produção como para a produtividade em etanol. Além disso, todos os efeitos foram positivos, o que significa que o aumento dessas variáveis aumentaria a

produção e produtividade em etanol, não possibilitando a exclusão de componentes no meio de cultivo. Como os valores de R^2 para ambas as variáveis dependentes, a produção de etanol (0,5492) (Tabela 21) e a produtividade de etanol (0,6571) (Tabela 22), não apresentaram um bom ajuste aos dados experimentais não foi possível gerar uma equação de modelo.

Uma vez que para realizar um planejamento do tipo DCCR com 4 variáveis independentes seriam necessários muitos experimentos e visto que triptona e peptona de gelatina são os componentes mais caros do meio de cultivo (Tabela 16), optou-se por realizar alguns ensaios antes do DCCR, para verificar a necessidade dos dois componentes. Foram, então, realizados 3 ensaios, em duplicata, com composição descrita na Tabela 23. Considerou-se, para a formulação destes meios de cultivo, a composição do ensaio 8 do planejamento fatorial fracionado (2^{4-1}), que apresentou maior produção e produtividade em etanol.

Tabela 23. Composição dos meios de cultivo e resultados obtidos de produção de biomassa e etanol para minimização dos componentes para o planejamento DCCR.

Componente	**Meio 1**	**Meio 2**	**Meio 3**
Triptona (g/L)	12,0	12,0	0,0
Peptona (g/L)	12,0	0,0	12,0
Extrato de lêvedo (g/L)	7,0	7,0	7,0
L-arginina (g/L)	1,2	1,2	1,2
Glicose (g/L)	1,0	1,0	1,0
Parâmetros			
ΔX (g p.s. cel/L)	0,724	0,710	0,884
P_{EtOH} (%)	100.0	60.6	161.7

ΔX: variação máxima da concentração de células ($X_{max} - X_{inicial}$); **P_{ETANOL}**: percentual da produção de etanol em relação ao experimento 8 do planejamento fatorial fracionado;

É possível observar na Tabela 23, que a maior produção de etanol foi detectada no meio de cultivo sem triptona, mesmo em relação ao meio de cultivo com triptona e peptona de gelatina (Meio 1). Portanto, o DCCR foi realizado com 3 variáveis independentes: peptona de gelatina, extrato de lêvedo e L-arginina. Como todas essas variáveis tiveram efeito positivo no planejamento fatorial fracionado, as concentrações de cada nível para o DCCR foram escolhidas tendo-se como ponto central os valores do nível máximo (+1) do planejamento fatorial para essas variáveis.

5.4.2 Planejamento experimental Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR)

O Delineamento de Composto Central Rotacional (DCCR) foi realizado com três variáveis independentes em dois níveis (máximo, +1 e mínimo, -1), perfazendo 8 experimentos (2^3) e mais 6 pontos axiais e 3 réplicas no ponto central, totalizando 17 ensaios. A concentração de glicose foi mantida em 1 g/L assim como nos ensaios anteriores. Como variável dependente, utilizou-se a produção máxima de etanol em 70 horas de cultivo, já que havia sido verificado no planejamento fatorial que a máxima produção de etanol ocorria em torno de 70 h de fermentação.

A matriz com os valores reais, os níveis utilizados e os resultados obtidos no DCCR está apresentada na Tabela 24 e o diagrama de pareto obtido com esses valores é apresentado na Figura 38.

Tabela 24. Matriz do delineamento composto central rotacional (DCCR) com os valores codificados (máximo, +1, mínimo, -1 e ponto central, 0), valores reais entre parêntesis e os resultados para a variável dependente (produção de etanol).

Ensaios	x_1 (g/L)	x_2 (g/L)	x_3 (g/L)	P_{EtOH} (g/L)
1	-1 (6,96)	-1 (6,96)	-1 (0,8)	0,264
2	1 (15)	-1 (6,96)	-1 (0,8)	0,237
3	-1 (6,96)	1 (15)	-1 (0,8)	0,225
4	1 (15)	1 (15)	-1 (0,8)	0,281
5	-1 (6,96)	-1 (6,96)	1 (1,6)	0,229
6	1 (15)	-1 (6,96)	1 (1,6)	0,313
7	-1 (6,96)	1 (15)	1 (1,6)	0,295
8	1 (15)	1 (15)	1 (1,6)	0,311
9	-1,68 (6,96)	0 (12)	0 (1,2)	0,229
10	1,68 (17,07)	0 (12)	0 (1,2)	0,237
11	0 (12)	-1,68 (6,96)	0 (1,2)	0,242
12	0 (12)	1,68 (17,07)	0 (1,2)	0,259
13	0 (12)	0 (12)	-1,68 (0,53)	0,219
14	0 (12)	0 (12)	1,68 (1,87)	0,298
15	0 (12)	0 (12)	0 (1,2)	0,254
16	0 (12)	0 (12)	0 (1,2)	0,294
17	0 (12)	0 (12)	0 (1,2)	0,193

x_1: peptona de gelatina (pancreática); x_2: extrato de lêvedo; x_3: L-arginina; P_{EtOH}: Maior concentração de etanol detectada durante 70 h de cultivo.

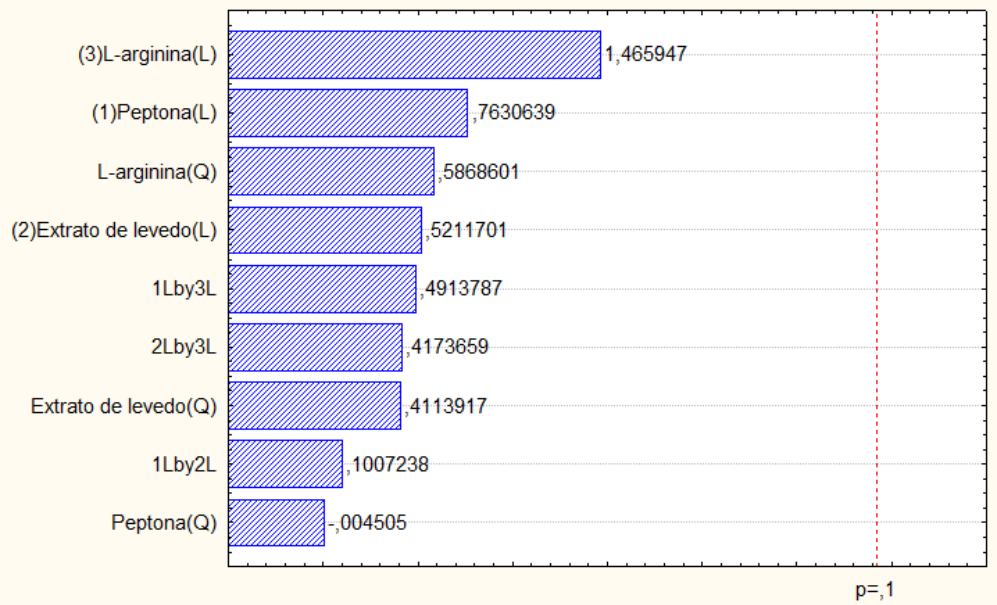

Figura 38. Diagrama de Pareto para o efeito estimado de cada variável do planejamento DCCR. A variável dependente é a concentração de etanol em 70 h.

De acordo com o diagrama de pareto apresentado na Figura 38 não foi possível gerar um modelo matemático para previsão da concentração etanol a ser obtida com as diferentes concentrações dos fatores estudados pois nenhuma variável foi significativa para a produção de etanol. Além disso, observou-se que os valores de produção de etanol, que variaram de 0,193 a 0,313 g/L, foram muito inferiores aos valores obtidos para o planejamento experimental anterior, que chegou a cerca de 1,6 g/L de etanol.

Portanto, decidiu-se investigar as possíveis explicações para esse fato e verificou-se que ocorreu uma significativa produção de ácido lático durante a fermentação, como mostra a Tabela 25. Deve-se destacar que essa produção ocorreu em 30 horas de fermentação.

Tabela 25. Matriz do delineamento composto central rotacional (DCCR) com os valores codificados (máximo, +1, mínimo, -1 e ponto central, 0), valores reais entre parêntesis e os resultados para a variável dependente (produção de ácido lático).

Ensaios	x_1 (g/L)	x_2 (g/L)	x_3 (g/L)	Ácido lático (g/L)
1	-1 (6,96)	-1 (6,96)	-1 (0,8)	1,33
2	1 (15)	-1 (6,96)	-1 (0,8)	2,85
3	-1 (6,96)	1 (15)	-1 (0,8)	3,09
4	1 (15)	1 (15)	-1 (0,8)	3,05
5	-1 (6,96)	-1 (6,96)	1 (1,6)	3,15
6	1 (15)	-1 (6,96)	1 (1,6)	2,09
7	-1 (6,96)	1 (15)	1 (1,6)	2,65
8	1 (15)	1 (15)	1 (1,6)	3,17
9	-1,68 (6,96)	0 (12)	0 (1,2)	2,40
10	1,68 (17,07)	0 (12)	0 (1,2)	3,69
11	0 (12)	-1,68 (6,96)	0 (1,2)	1,75
12	0 (12)	1,68 (17,07)	0 (1,2)	3,41
13	0 (12)	0 (12)	-1,68 (0,53)	2,11
14	0 (12)	0 (12)	1,68 (1,87)	2,99
15	0 (12)	0 (12)	0 (1,2)	3,24
16	0 (12)	0 (12)	0 (1,2)	3,27
17	0 (12)	0 (12)	0 (1,2)	2,78

x_1: peptona de gelatina (pancreática); x_2: extrato de lêvedo; x_3: L-arginina;

A produção de ácido lático já foi relatada para outras espécies acetogênicas como *C. ljungdahlii*, *C. rasgdalei* e *C. autoethanogenum* (KÖPKE et al., 2011). A via metabólica de fermentação de gás de síntese por bactérias do gênero Clostridia envolve a conversão de piruvato em produtos como ácido lático e 2,3-butanodiol. Pequenas quantidades de ácido lático podem ser produzidas a partir de piruvato por bactérias acetogênicas através da reação catalisada pela lactato desidrogenase, sendo essa etapa dependente de elétrons (LIEW *et al*., 2013).

Misoph e Drake (1996) estudaram o efeito do CO_2 na fermentação da bactéria acetogênica Peptostreptococcus productus e verificou a produção de significativas quantidades de lactato durante a fermentação de frutose em meio enriquecido com CO_2. A formação de lactato também foi detectada durante a fermentação de frutose e xilose em meios com limitação de CO_2.

Há também a possibilidade de a produção de ácido lático ser uma estratégia metabólica à contaminação por O_2, como destacou Botelho (2016), que trabalhou com

o aumento de biomassa celular de *C. carboxidivorans*, e também detectou ácido lático durante as fermentações com gás de síntese. Os acetogênicos têm sido classicamente referidos como anaeróbios obrigatórios, senão rigorosos. De fato, muitas enzimas centrais para a acetogenese são extremamente sensíveis ao oxigênio (isto é, oxidação). No entanto, Drake et al. (2008) lembraram que muitos acetogênicos têm sido isolados de ambientes aerados.De fato, tem sido relatado que os acetogênicos contêm numerosas enzimas que podem remover de forma redutora o oxigênio e os seus subprodutos tóxicos (por exemplo, superóxido e peróxido). Estas enzimas incluem peroxidase, NADH-oxidase, rubredoxina oxidoredutase (uma superóxido redutase), rubreritrina (uma peroxidase), superóxido dismutase, catalase e citocromo oxidase (KARNHOLZ *et al.*, 2002; SILAGHI-DUMITRESCU *et al.*, 2003; DAS *et al.*, 2005). Estas enzimas são eficazes na proteção de acetogênicos do estresse oxidativo quando a concentração de oxigênio é relativamente baixa. Segundo Datar *et al.* (2004) *C. carboxidivorans* possui tolerância a pequenas concentrações de oxigênio (até 1300 ppm).

Os acetogênicos podem utilizar uma variedade de aceptores finais de elétrons. Assim, algumas bactérias acetogênicas podem deslocar o fluxo redutor da via acetil-CoA para processos alternativos de aceitação de elétrons que são menos sensíveis ao oxigênio e operam em potenciais redox mais elevados do que a via acetil-CoA (DRAKE et al., 2008). Por exemplo, *C. glicolicum* RD-1 é um acetogênico aerotolerante que muda de acetogênese para fermentação clássica em resposta ao oxigênio. Este acetogênico tolera até 4% de oxigênio no *headspace* de culturas agitadas, durante as quais os açúcares são metabolizados através da fermentação clássica a lactato e etanol (KUSEL et al., 2001).

Portanto, a alta produção de ácido lático nos experimentos do DCCR pode estar relacionada à entrada de oxigênio nos frascos de soro durante a amostragem e também no processo de adição de meio concentrado ao sistema. Isso pode ter ocorrido pois as tampas de clorobutil são reutilizadas com frequência nos experimento, sendo autoclavadas repetidamente, o que pode levar ao desgaste das mesmas e assim, à entrada de oxigênio no sistema.

Hunger et al. (2011) investigaram a influência do O_2 na fermentação de glicose utilizando as bactérias acetogênicas *Clostridium glucolicum* e *Bacteroides*

xylanolyticus. Para a bactéria *Clostridium glucolicum* variou-se a concentração inicial de O_2 no meio de cultivo de 0 a 4,0% e verificou-se a ausência de lactato em ambiente anaeróbio (0% de O_2) e um aumento na formação de lactato com o aumento da concentração inicial de O_2 do meio de cultivo. O mesmo foi observado para a cepa de *Bacteroides xylanolyticus*, porém neste caso a concentração inicial de O_2 foi investigada até 10%. Nesta última condição, ocorreu inibição total do metabolismo celular, não houve crescimento celular e também não ocorreu produção de metabólitos. Esses dados corroboram que a presença de O_2 no meio de cultivo favorece a formação de lactato, contudo as bactérias acetogênicas só suportam até determinada concentração de O_2.

Para contornar esses problemas pode-se realizar os ensaios em câmara anaeróbia para evitar a entrada de oxigênio ou o uso e descarte das tampas de clorobutil após o uso, minimizando, dessa forma,a entrada de oxigênio.

5.5 EXPERIMENTOS EM BIORREATOR

5.5.1 Influência da peptona no cultivo de *Clostridium carboxidivorans*

Considerando o meio ATCC 2713 um meio muito caro para a produção de etanol e tendo observado que o fornecedor utilizado para a compra da peptona de gelatina (Sigma-Aldrich) fornecia dois tipos de peptona de gelatina, com diferenças muito grandes nos preços, decidiu-se investigar a influência do tipo de peptona no cultivo de *C. carboxidivorans*. A peptona utilizada até então, era a peptona de gelatina de digestão pancreática (cod. 70176, Sigma-Aldrich), que custa R$ 1.462,00/kg. O mesmo fornecedor, Sigma-Aldrich, fornecia também uma outra peptona de gelatina, mas de digestão enzimática, sem identificar a enzima utilizada (cod. 70951, Sigma-Aldrich), mas com custo mais de três vezes menor (R$ 424,00/kg) e mesmas características. Testou-se também a influência da origem da peptona, utilizando uma peptona bacteriológica de outro fornecedor (KASVI), com preço intermediário (R$ 644,00/kg) e com diferentes características.

Os resultados para o cultivo de *C. carboxidivorans* em biorreator utilizando peptona de gelatina de digestão pancreática, peptona de gelatina de digestão

enzimática e peptona bacteriológica estão apresentados nas Figuras 39, 40 e 41 respectivamente.

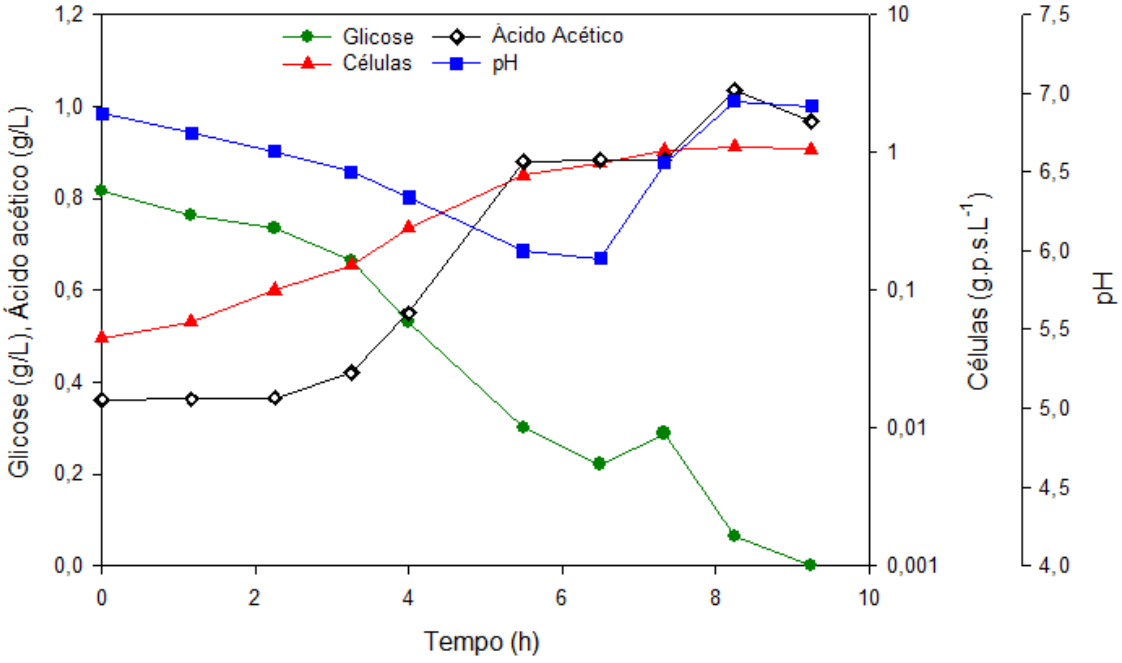

Figura 39. Cinética do cultivo de *Clostridium carboxidivorans* em meio ATCC 2713 (com peptona de gelatina, digestão pancreática) com alimentação de gás de síntese utilizando biorreator mecanicamente agitado a 200 rpm e 37°C.As linhas entre os pontos não representam valores experimentais.

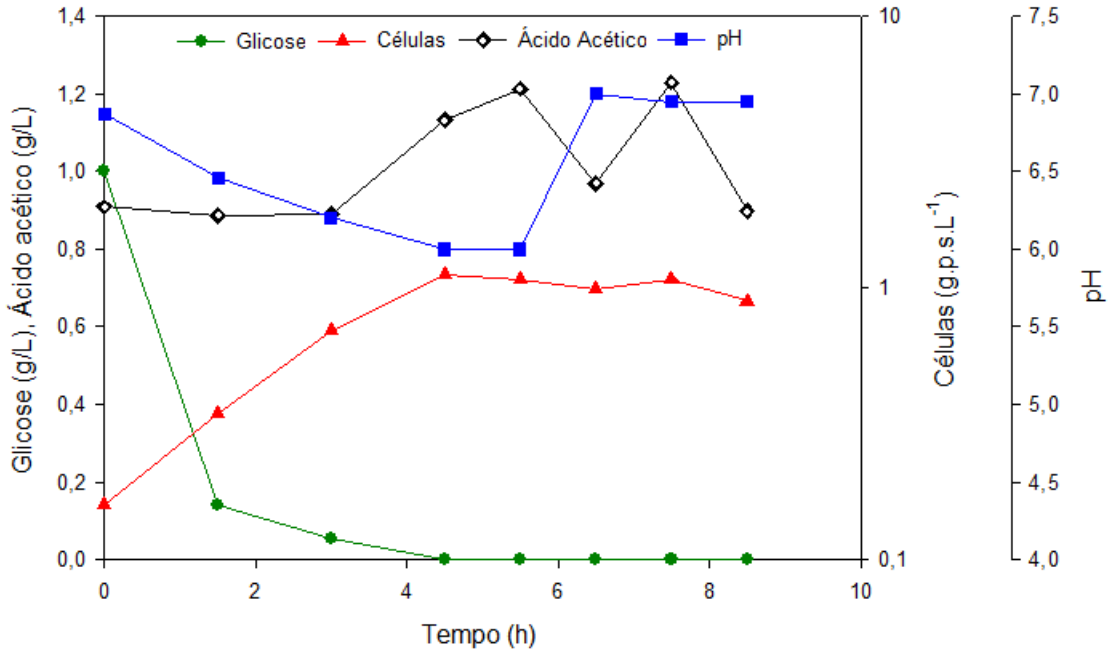

Figura 40. Cinética do cultivo de Clostridium carboxidivorans em meio ATCC 2713 (com peptona de gelatina, digestão enzimática) com alimentação de gás de síntese utilizando biorreator mecanicamente agitado a 200 rpm e 37°C.As linhas entre os pontos não representam valores experimentais.

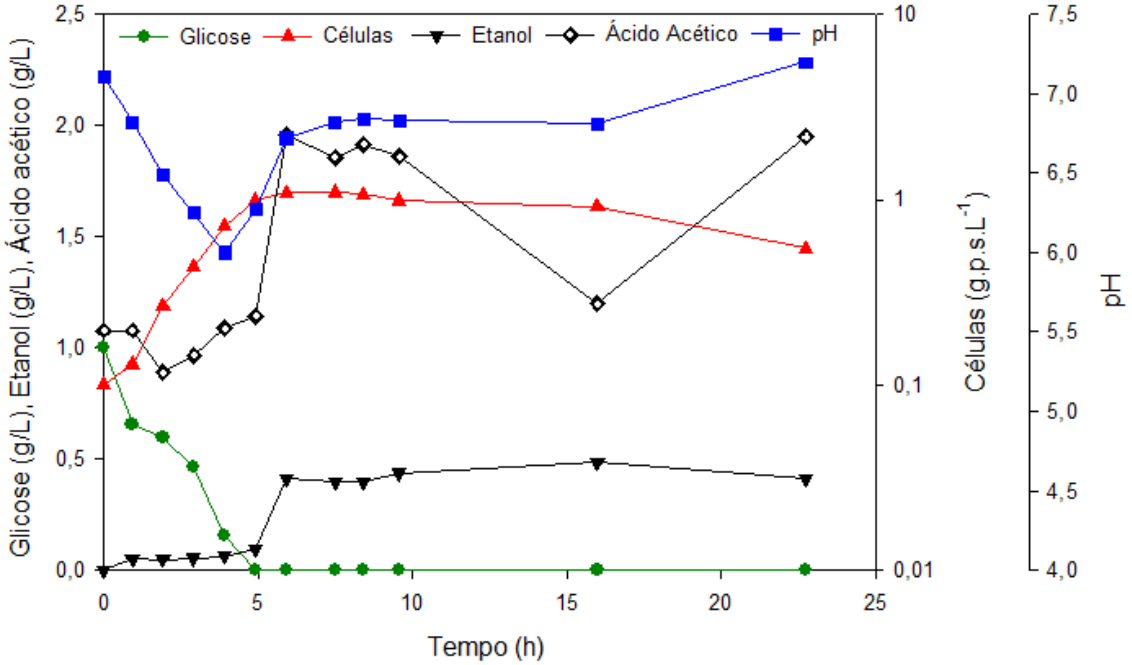

Figura 41. Cinética do cultivo de Clostridium carboxidivorans em meio ATCC 2713 (com peptona bacteriológica) com alimentação de gás de síntese utilizando biorreator mecanicamente agitado a 200 rpm e 37°C.As linhas entre os pontos não representam valores experimentais.

É possível observar um consumo total da glicose durante a fase exponencial de crescimento e redução do pH com concomitante produção de ácido acético. Apesar do cultivo com peptona de gelatina de digestão pancreática (Figura 39) ter apresentado uma fase lag maior, os parâmetros de produção de biomassa (ΔX, μ e tg) foram similares para os três cultivos (Tabela 26). Entretanto, a produção de etanol só é observada na presença de peptona bacteriológica, assim como a maior produção de ácido acético (Tabela 26).

Tabela 26. Parâmetros cinéticos do cultivo de *Clostridium carboxidivorans* em biorreator com meio ATCC 2713, agitação de 200 rpm, a 37°C e com alimentação de gás de síntese, utilizando diferentes peptonas.

Peptona	ΔX (g p.s. cél/L)	μ (h^{-1})	tg (h)	P_{EtOH} (g/L)	Q_{EtOH} (g/L.h)	P_{AC} (g/L)	Q_{AC} (g/L.h)
Gelatina, digestão pancreática	1,059	0,508	1,364	N.D.	N.D.	0,675	0,09
Gelatina, digestão enzimática	0,922	0,437	1,586	N.D.	N.D.	0,320	0,05
Bacteriológica	0,994	0,443	1,564	0,487	0,07	0,881	0,14

ΔX: variação máxima da concentração de células (X_{max} – $X_{inicial}$); μ: taxa específica de crescimento celular obtido na fase exponencial do crescimento pelo coeficiente angular da curva ln(x) *versus* tempo; tg: tempo de duplicação;

P_{EtOH}; P_{AC}: concentração máxima de produto ou subproduto (Etanol, AC: ácido acético); **Q_{EtOH}; Q_{AC}:** produtividade volumétrica máxima para o produto ou subproduto(Etanol, AC: ácido acético); N.D.: não detectado.

É possível observar que a produção de etanol não tenha sido verificada no experimento com peptona de gelatina pancreática devido ao tempo de cultivo ter sido curto, já que em frascos agitados a produção desse solvente havia sido detectada (12, por exemplo). No entanto, como em menos de 10 horas de cultivo, produziu-se etanol com peptona bacteriológica, essa foi escolhida para os experimentos seguintes em biorreator. Com isso, reduziu-se o custo do meio de cultivo em mais da metade.

5.5.2 Perfil cinético de *Clostridium carboxidivorans*, *Clostridium ljungdahlii* e *Clostridium ragsdalei* em meio ATCC

Os experimentos em biorreator foram realizados com as três espécies de *Clostridium* disponíveis, visto que as condições de cultivo em biorreator poderiam favorecer a produção de etanol por outra espécie.

Inicialmente, como controle, testou-se o cultivo com o meio “padrão” ATCC 2713 (com peptona bacteriológica) e com adição de gás nitrogênio ao invés do gás de síntese. As Figuras 42, 43 e 44 apresentam o perfil cinético das espécies *Clostridium carboxidivorans, Clostridium ljungdahlii e Clostridium ragsdalei*,respectivamente.

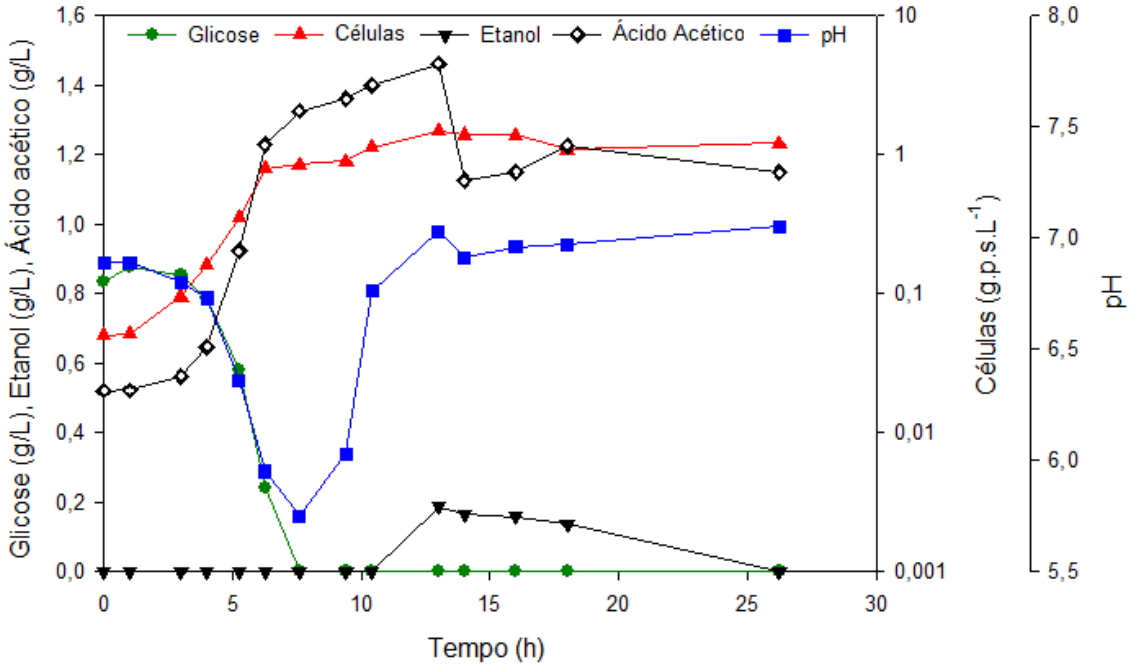

Figura 42. Cinética do cultivo de *Clostridium carboxidivorans* em meio ATCC 2713 (peptona bacteriológica) com adição de nitrogênio gasoso utilizando biorreator mecanicamente agitado a 200 rpm e 37°C.As linhas entre os pontos não representam valores experimentais.

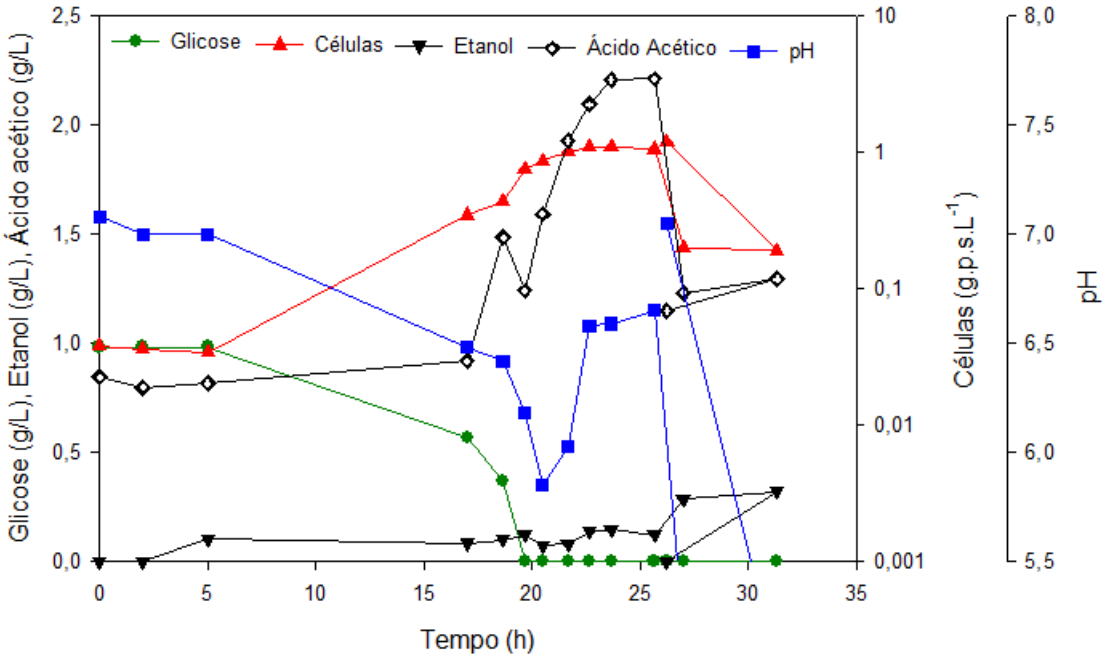

Figura 43. Cinética do cultivo de Clostridium ljungdahlii em meio ATCC 2713 (peptona bacteriológica) com adição de nitrogênio gasoso utilizando biorreator mecanicamente agitado a 200 rpm e 37 ºC. As linhas entre os pontos não representam valores experimentais.

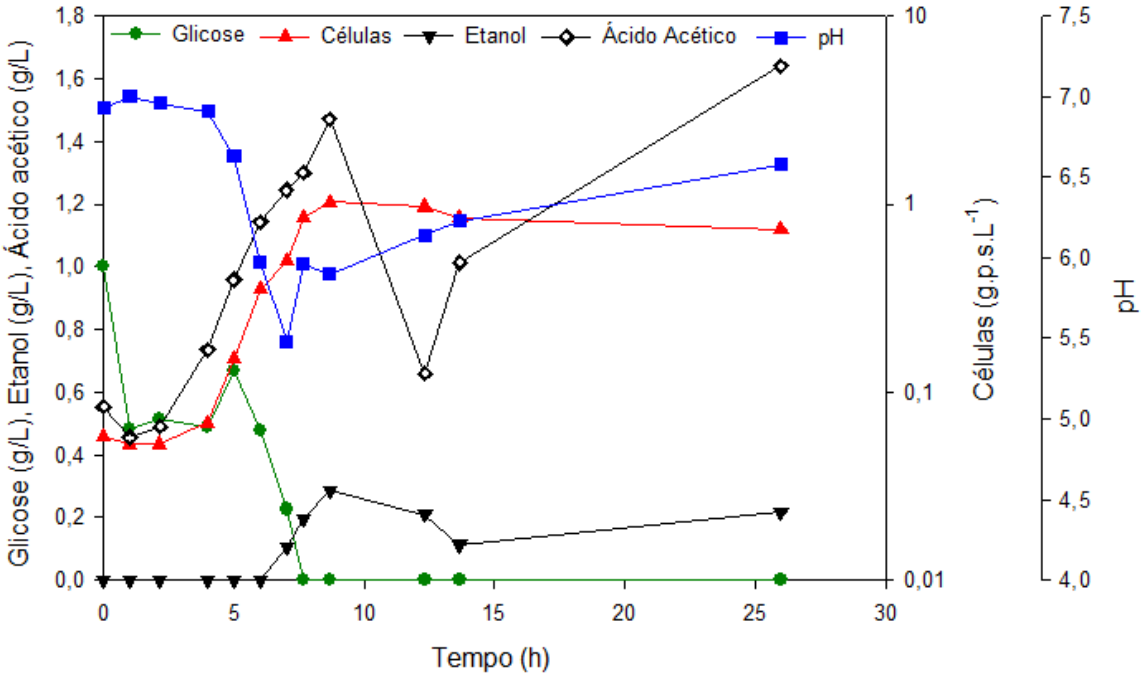

Figura 44. Cinética do cultivo de Clostridium ragsdalei em meio ATCC 2713 (peptona bacteriológica) com adição de nitrogênio gasoso utilizando biorreator mecanicamente agitado a 200 rpm e 37 ºC. As linhas entre os pontos não representam valores experimentais.

É possível observar na Figura 42 que após 8 horas de cultivo toda a glicose é consumida e a fase exponencial ocorre durante o consumo dessa fonte de carbono. A fase acidogênica fica evidente com a queda do pH, concomitante a produção de ácido acético. Quando o crescimento celular se estabiliza a fase solventogênica tem início caracterizada nesse ensaio pela produção de etanol (0,19 g/L). Pode-se também notar que a limitação de fonte de carbono, relacionada ao esgotamento da glicose no meio de cultivo pode ter causado o consumo de ácido acético e etanol. Observa-se que a partir de 14 horas, esses dois compostos apresentam um decaimento.

No caso de *C. lijungdahlii* em meio ATCC 2713 e gás nitrogênio (Figura 43) pode-se notar que a glicose foi completamente consumida após 20 horas de cultivo. Apesar da ausência de dados para determinar com precisão a fase lag, observa-se uma ausência de crescimento por várias horas e início de fase exponencial tardia em relação a *C. carboxidivorans* (Figura 41). A fase exponencial foi concomitante ao consumo de glicose, apresentando nesse momento redução do pH e produção de ácido acético (fase acidogênica), similar ao cultivo de *C. carboxidivorans.* Apesar das similaridades, nota-se na Tabela 27 uma taxa específica de crescimento e uma

produção de biomassa maiores para *C. carboxidivorans.* No entanto, a produção de etanol e ácido acético foram maiores para *C. ljungdahlii*, apesar da menor produtividade dos mesmos.

O cultivo de *C. rasgdalei* (Figura 52) apresentou fase lag ligeiramente superior ao cultivo de *C. carboxidivorans* (aproximadamente 4 horas). Um perfil cinético similar às demais espécies foi observado, com fase exponencial concomitante ao consumo total de glicose e produção de ácido acético com redução do pH no mesmo período. No entanto, a fase solventogênica foi paralela à fase acidogênica, com produção de etanol junto com a produção de ácido acético. Com isso, apesar da produção de etanol ter sido menor do que no cultivo de *C. ljungdahlii,* a produtividade foi superior à produtividade em etanol das demais espécies (Tabela 27). O mesmo aconteceu para a produtividade do ácido acético. *C. rasgdalei* apresentou maior taxa específica de crescimento celular, apesar de não ter apresentado maior produção de biomassa (Tabela 27), assim como ocorreu nos cultivos em frascos de soro na horizontal.

Tabela 27. Parâmetros cinéticos dos cultivos de *Clostridium carboxidivorans*, *Clostridium ljungdahlii* e *Clostridium ragsdalei* em biorreator com meio ATCC 2713, agitação de 200 rpm, a 37°C e com alimentação de nitrogênio.

Micro-organismo	ΔX (g p.s. cél/L)	μ (h^{-1})	tg (h)	P_{EtOH} (g/L)	Q_{EtOH} (g/L.h)	P_{AC} (g/L)	Q_{AC} (g/L.h)
Clostridium carboxidivorans	1,440	0,518	1,340	0,190	0,014	1,460	0,112
Clostridium ljungdahlii	1,065	0,203	3,410	0,320	0,011	2,212	0,093
Clostridium ragsdalei	0,970	0,598	1,160	0,287	0,033	1,470	0,170

ΔX: variação máxima da concentração de células ($X_{max} - X_{inicial}$); μ: taxa específica de crescimento celular obtido na fase exponencial do crescimento pelo coeficiente angular da curva ln(x) *versus* tempo; tg: tempo de duplicação; **P_{EtOH}; P_{AC}**: concentração máxima de produto ou subproduto (Etanol, AC: ácido acético); **Q_{EtOH}; Q_{AC}:** produtividade volumétrica máxima para o produto ou subproduto(Etanol, AC: ácido acético); N.D.: não detectado.

As três espécies foram também cultivadas em meio ATCC 2713 em biorreator e com gás de síntese purgado a cada amostragem. As Figuras 45, 46 e 47 apresentam o perfil cinético das espécies *C. carboxidivorans, C. ljungdahlii e C. ragsdalei*,respectivamente.

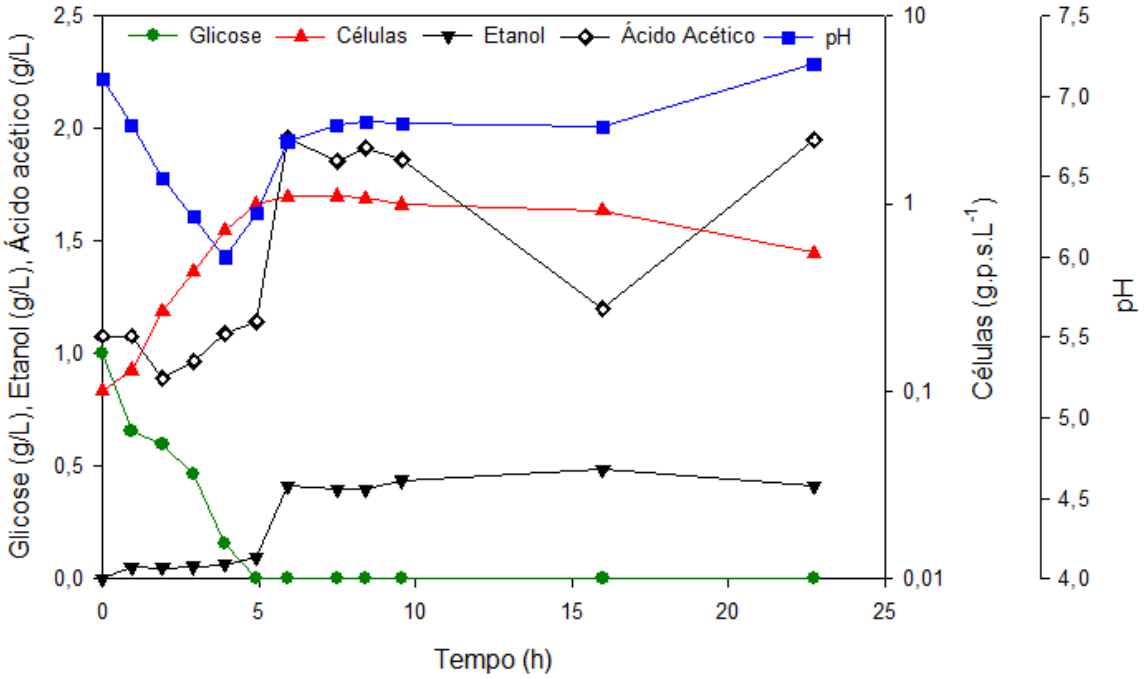

Figura 45. Cinética do cultivo *Clostridium carboxidivorans* em meio ATCC 2713 (peptona bacteriológica) com adição de gás de síntese utilizando biorreator mecanicamente agitado a 200 rpm e 37°C. As linhas entre os pontos não representam valores experimentais.

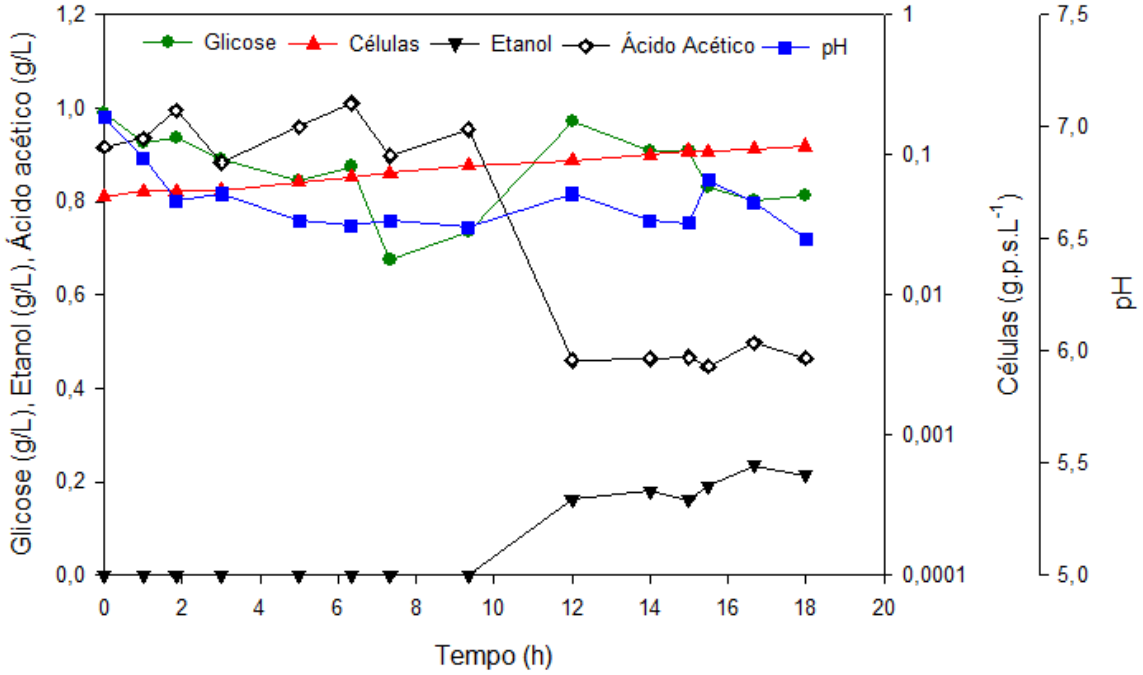

Figura 46. Cinética do cultivo de *Clostridium ljungdahlii* em meio ATCC 2713 (peptona bacteriológica) com adição de gás de síntese utilizando biorreator mecanicamente agitado a 200 rpm e 37°C. As linhas entre os pontos não representam valores experimentais.

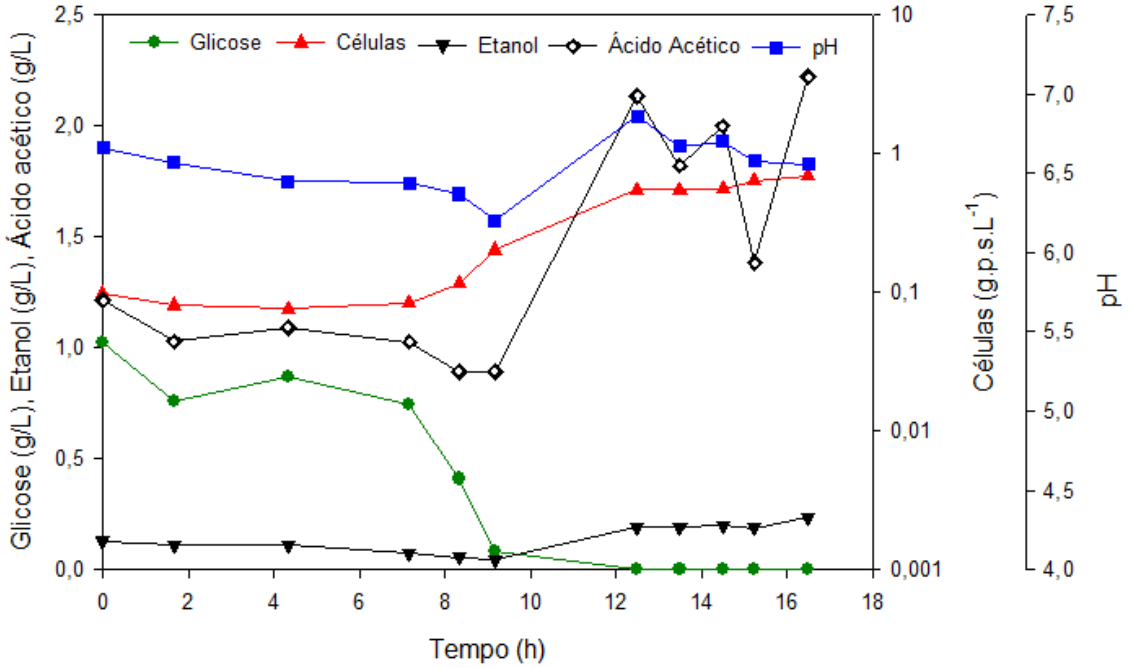

Figura 47. Cinética do cultivo de Clostridium rasgdalei em meio ATCC 2713 (peptona bacteriológica) com alimentação de gás de síntese utilizando biorreator mecanicamente agitado a 200 rpm e 37°C. As linhas entre os pontos não representam valores experimentais.

Com gás de síntese, observa-se que para a cepa *C. carboxidivorans* (Figura 45) a fase lag é quase inexistente, inferior a fase lag do cultivo em nitrogênio (Figura 42). Observa-se também uma fase exponencial do crescimento simultânea ao consumo total de glicose e à fase acidogênica (produção de ácido acético e redução do pH), assim como no cultivo com nitrogênio. A presença do gás de síntese desfavoreceu a produção de biomassa e a taxa específica de crescimento (Tabela 28), mas possibilitou uma produção de etanol 2,6 vezes maior, com elevada produtividade em comparação ao cultivo com nitrogênio (Tabela 27).

Ahmed et al. (2006) estudaram o efeito de impurezas presentes no gás de síntese para fermentação por *C. carboxidivorans*, entre os contaminantes foi observada a presença de NO na concentração de 150 ppm. Esse estudo relaciona a presença desse contaminante a inibição da enzima hidrogenase que esta relacionada ao consumo de H_2. Nesse estudo, ao final de 10 dias de fermentação foi obtida 0,2 g/L de células, taxa específica de crescimento (μ) de 0,0074 h^{-1}, concentração máxima de 0,2 g/L de etanol e 2,5 g/L de ácido acético. O presente estudo obteve valores muito superiores para os parâmetros taxa específica de crescimento,

produção de etanol e ácido acético em 16 horas de fermentação, indicando que a composição do gás de síntese e as condições de cultivo não causaram a inibição do metabolismo de *C. carboxidivorans*.

Tabela 28. Parâmetros cinéticos dos cultivos de *Clostridium carboxidivorans*, *Clostridium ljungdahlii* e *Clostridium ragsdalei* em biorreator com meio ATCC 2713, agitação de 200 rpm, a 37°C e com alimentação de gás de síntese.

Micro-organismo	ΔX (g p.s. cél/L)	μ (h^{-1})	tg (h)	P_{EtOH} (g/L)	Q_{EtOH} (g/L.h)	P_{AC} (g/L)	Q_{AC} (g/L.h)
Clostridium carboxidivorans	0,994	0,443	1,560	0,487	0,030	1,958	0,331
Clostridium ljungdahlii	0,056	N.D.	12,60	0,235	0,014	N.D.	N.D.
Clostridium ragsdalei	0,595	0,354	1,950	0,191	0,015	2,134	0,171

Meio ATCC 2713; ΔX: variação máxima da concentração de células ($X_{max} – X_{inicial}$); μ: taxa específica de crescimento celular obtido na fase exponencial do crescimento pelo coeficiente angular da curva ln(x) *versus* tempo; **P_{ETANOL}; P_{AC}**: concentração máxima de produto ou subproduto (Etanol, AC: ácido acético); **$Q_{ETANOL}Q_{AC}$:** produtividade volumétrica máxima para o produto ou subproduto(Etanol, AC: ácido acético); N.D.: não detectado.

Para *C. ljungdahlii* (Figura 46), não houve crescimento celular nem consumo de glicose significativo em gás de síntese. É possível que o tempo de cultivo (18 h) tenha sido insuficiente, visto que em frascos agitados essa espécie apresentou uma fase lag de 27 h (Tabela 12). Como na presença de nitrogênio gasoso (Figura 43), *C. ljungdahlii* apresentou crescimento celular antes de 18 h, provavelmente o gás de síntese inibe o metabolismo dessa espécie, obtendo-se uma fase exponencial tardia. Assim, não houve produção de ácido acético, mas detectou-se produção de etanol significativa (Tabela 28). Essa produção foi, inclusive, superior a produção de etanol na presença de nitrogênio (Tabela 27) e nos frascos agitados (Tabela 12).

Mohammadi, et al. (2012) estudaram o processo de fermentação para produção de etanol a partir de gás de síntese cuja composição é 55% de CO, 20% de H_2 e 10% de CO_2 por *Clostridium ljungdahlii* em biorreator CSTR. Durante a fermentação, a concentração de células e a taxa de consumo de CO diminuíram quando o pH da cultura diminuiu. Quando se utilizou uma velocidade de agitação de 500 rpm, a concentração máxima de células foi de 2,34 g/L, a produção máxima de etanol e de ácido acético foram de 6,50 e 5,43 g/L, respectivamente, após 30 dias de fermentação, período muito superior ao utilizado no presente estudo. Comparando

esses dados com os resultados apresentados na Tabela 28, nota-se que a agitação de 200 rpm foi suficiente para a produção de etanol (0,487 g/L) e ácido acético (1,958 g/L), entretanto, seria necessário um teste aumentando o tempo de fermentação.

Richter, et al (2013) estudaram a combinação de biorreatores para a produção de etanol por fermentação de gás de síntese utilizando *Clostridium ljungdahlii*. O sistema consistia em um sistema de 2 estágios, onde o primeiro estágio ocorria em biorreator tipo CSTR de 1 litro (83 dias) para crescimento celular e o segundo estágio acontecia em um biorreator de 4 litros tipo coluna de bolhas com reciclo de células (83 dias) para a produção de etanol, ambos fermentando a mistura gasosa de gás de síntese (60% CO, 35% H_2 e 5% CO_2). O reciclo do gás de síntese permitiu a melhora da transferência de massa e assim o incremento das taxas metabólicas onde a concentração celular foi mantida em 10 g.p.s/L de células e a produtividade de etanol foi de 0.37 g/L.h, muito superior a obtida para essa espécie no presente trabalho (Tabela 28). Esses resultados confirmam a hipótese da necessidade de artifícios para incremento da transferência de massa no sistema e também aumento no tempo de fermentação, uma vez que o tempo de duplicação obtido nos ensaios foi de 12,6 horas. Danielll *et al.* (2012) aponta que o reciclo de células ou a sua imobilização em suporte podem favorecer o aumento da concentração celular, e assim, favorecer a fermentação de gás de síntese.

C. rasgdalei apresentou perfil similar em gás de síntese (Figura 47) em comparação com nitrogênio (Figura 44), com consumo de glicose concomitante a fase exponencial do crescimento e produção de etanol associada ao crescimento celular. No entanto, a fase lag foi um pouco maior em gás de síntese e a produção de biomassa e taxa específica de crescimento inferiores, o que pode ser observado comparando as Tabelas 27 e 28. Esses resultados indicam o efeito inibitório desse gás no crescimento dessa espécie. A produção de etanol também foi inferior em comparação com o cultivo na presença de nitrogênio, mas o gás de síntese favoreceu a produção de ácido acético, aumentando em 45% sua concentração no meio de cultivo, porém mantendo a mesma produtividade.

Kundiyana, et al. (2009) avaliaram o perfil de fermentação de *C. ragsdalei* em CSTR a agitação de150 rpm e 37 °C, sendo observada a divisão em duas fases do perfil de fermentação, onde a primeira ocorre até 24 dias (fase acidogênica) e a

segunda de 24 a 59 dias (fase solventogênica). Na primeira fase, a concentração de etanol alcançou 4,46 g/L e a produtividade em etanol foi de 0,0075 g/L.h, enquanto a produtividade em ácido acético foi de 0,00625 g/L.h. Já na segunda fase, a produtividade de etanol foi de 0,036 g/L.h ao final de 59 dias. Comparando com os resultados obtidos no presente trabalho (Tabela 28) com os valores obtidos no trabalho de Kundiyana, et al. (2009) para a mesma espécie, nota-se que embora o tempo de fermentação do experimento (17 horas) seja muito inferior aos 24 dias ou 576 horas da primeira fase chamada acidogênica, tanto a produtividade de etanol como também a de ácido acético foram superiores, indicando que um aumento no tempo de fermentação poderia favorecer a fase solventogênica da fermentação.

Mais uma vez, com os resultados obtidos, escolheu-se *C. carboxidivorans* para dar continuidade aos ensaios em biorreator na presença de gás de síntese.

5.5.3 Influência da agitação no cultivo de *Clostridium carboxidivorans* em biorreator

Como a produção de biomassa e de etanol de *C. carboxidivorans* apresentou melhores resultados com o aumento da supefície de contato gás-líquido nos ensaios realizados em frascos de soro, ou seja, com melhora da transferência de massa (Tabela 12), verificou-se a possibilidade do aumento da agitação do sistema ter o mesmo efeito em biorreator. Portanto, variou-se a agitação do sistema de 200 a 400 rpm.

O perfil de cinético do cultivo com agitação de 200 rpm está apresentado na Figura 45 e os perfis cinéticos com agitação de 300 e 400 rpm estão apresentados nas Figuras 48 e 49, respectivamente.

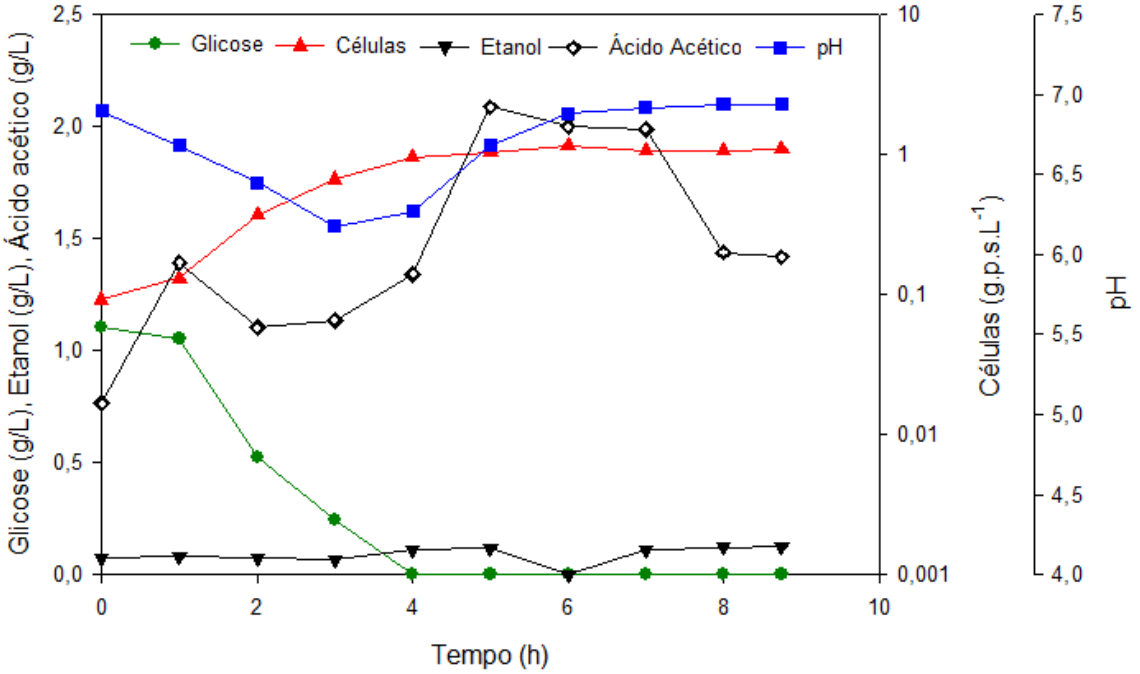

Figura 48. Cinética do cultivo de *Clostridium carboxidivorans* em meio ATCC 2713 (peptona bacteriológica) com adição de gás de síntese utilizando biorreator mecanicamente agitado a 300 rpm e 37°C. As linhas entre os pontos não representam valores experimentais.

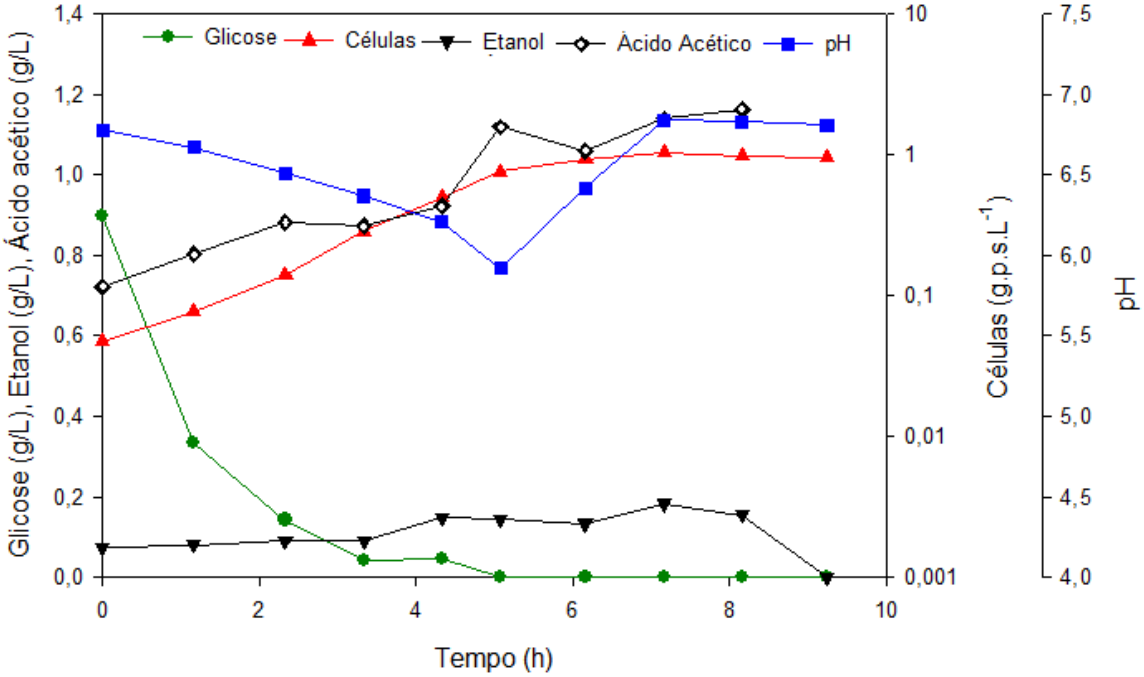

Figura 49. Cinética do cultivo de *Clostridium carboxidivorans* em meio ATCC 2713 (peptona bacteriológica) com adição de gás de síntese utilizando biorreator mecanicamente agitado a 400 rpm e 37°C. As linhas entre os pontos não representam valores experimentais.

Tabela 29. Parâmetros cinéticos dos cultivos de *Clostridium carboxidivorans* em biorreator com meio ATCC 2713, agitação de 200, 300 e 400 rpm, a 37°C e com alimentação de gás de síntese.

Agitação (rpm)	ΔX (g p.s. cél/L)	μ (h^{-1})	tg (h)	P_{EtOH} (g/L)	Q_{EtOH} (g/L.h)	P_{AC} (g/L)	Q_{AC} (g/L.h)
200	0,994	0,443	1,560	0,487	0,07	0,881	0,14
300	1,067	0,657	1,055	0,124	0,08	1,323	0,63
400	0,986	0,556	1,25	0,183	0,07	1,163	0,08

ΔX: variação máxima da concentração de células ($X_{max} - X_{inicial}$); μ: taxa específica de crescimento celular obtido na fase exponencial do crescimento pelo coeficiente angular da curva ln(x) *versus* tempo; **P_{ETANOL}; P_{AC}**: concentração máxima de produto ou subproduto (Etanol, AC: ácido acético); **$Q_{ETANOL}Q_{AC}$:** produtividade volumétrica máxima para o produto ou subproduto (Etanol, AC: ácido acético); N.D.: não detectado.

De acordo com a Tabela 29, é possível notar que o aumento da agitação do sistema não favoreceu o crescimento celular, onde a variação máxima de crescimento celular (ΔX ~ 1,0 g.p.s. células/L) foi muito semelhante para todas as agitações estudadas. Apesar da agitação de 300 rpm ter o maior valor de taxa específica de crescimento (μ=0,657 h^{-1}) a produção de etanol não foi favorecida, sendo a agitação de 200 rpm a que obteve a maior produção de etanol (0,487 g/L) e menor produção de ácido acético produziu (0,881g/L). Quando se fala de produtividade de etanol, não se nota ganhos significativos e todos se mantiveram em valores próximos (~0,07 g/L.h), não justificando assim o aumento da agitação para ensaios em biorreator, uma vez que o aumento da agitação também implica em maior gasto com energia, principalmente quando se pretende ampliar a escala para sistemas industriais.

Comparando as Figuras 45, 48 e 49 nota-se um perfil semelhante para consumo de glicose que foi esgotada no biorreator em aproximadamente 5 horas, o perfil de produção de ácido acético se manteve parecido para as agitações de 200 e 300 rpm alcançando aproximadamente 2,0 g/L de ácido acético ao final da batelada. Tal fato não ocorre na agitação de 400 rpm, onde se observa produção de 1,2 g/L desse ácido ao final da fermentação. Quanto ao perfil de produção de etanol, nota-se que na agitação de 200 rpm ocorreu um aumento da produção após 5 horas de fermentação, já na agitação de 300 rpm a concentração de etanol se manteve constante e na agitação de 400 rpm ocorreu um leve aumento da concentração de etanol após 3 horas de fermentação seguido do consumo do etanol produzido. Dessa

forma a velocidade de agitação, a pressão atmosférica, que se mostrou mais eficiente foi a de 200 rpm.

Ukpong (2014) avaliou a fermentação de gás de síntese em biorreator de 7.5 L de volume uma agitação de 150 rpm, temperatura de 37°C e observou que, para crescimento celular de *C. carboxidivorans*, houve um acúmulo de ácido acético que coincidiu com a queda do pH durante as primeiras 72 horas, e a formação de solventes (32,1-61,2 mM etanol e 4,4-7,1 mM butanol) se iniciou após 50 horas de fermentação, atingindo seu valor máximo em 192 horas. Esse estudo corrobora para o entendimento que uma mudança na estratégia de condução da fermentação como o aumento do tempo de fermentação se faz necessária.

Hurst e Lewis (2010) avaliaram a influência da pressão do sistema na fermentação de gás de síntese por *C.carboxidivorans*. Em seu estudo, a pressão parcial de CO variou de 0,35 a 2 atm. Na pressão de 1,05 atm a concentração celular foi de 0,5 g.p.s./L após 60 horas de operação, enquanto o presente estudo (Tabela 29) foi possível alcançar 1,0 g.p.s/L em 5 horas de fermentação nas três condições de agitação estudadas e a pressão ambiente. Com relação a produção de ácido acético, no estudo de Hurst e Lewis (2010) a pressão de 1,05 atm a concentração de ácido acético foi de 2,0 g/L quando se obteve 0,4 g.p.s./L de células, essa concentração do ácido é aproximadamente duas vezes superior a mesma condição de pressão no presente estudo (Tabela 29) e enquanto no trabalho de Hurst e Lewis (2010) a concentração de etanol foi de 0,5 g/L em aproximadamente 70 horas, obtendo o seu maior valor (2,0 g/L) quando foi aplicada uma pressão no sistema de 2 atm no mesmo tempo de cultivo o presente estudo obteve a concentração máxima de etanol de 0,487g/L a 200 rpm,pressão atmosférica e após 6 horas de fermentação (Tabela 29).

Dessa forma, outro ponto importante a ser estudado no que tange a fermentação de gás de síntese é o aumento da pressão do sistema a influência deste parâmetro na transferência de massa.

6 CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos nesse trabalho pode-se concluir que:

- A cepa *Clostridium carboxidivorans* DSMZ 15243 apresentou crescimento celular nos dois meios de cultivos testados (ATCC 2713 e DSMZ 979) tanto na presença quanto na ausência de gás de síntese. Portanto, essa cepa é capaz de assimilar as fontes de carbono presentes nesses meios, sendo glicose para o meio ATCC e frutose para o meio DSMZ;
- Como ocorreu maior produção de células em meio ATCC 2713 com gás de síntese quando comparado ao meio contendo nitrogênio, pode-se afirmar que há consumo dos componentes do gás de síntese por *C. carboxidivorans*.
- As produções de etanol e de ácido acético foram maiores em meio ATCC 2713 com nitrogênio, mas quando utilizou-se a estratégia de adição intermitente de gás de síntese nesse mesmo meio também se produziu quantidades significativas de etanol.
- As tampas de borracha butílica dos frascos de soro permitiram a saída de gás de síntese durante a amostragem e, portanto,não ocorreu produção expressiva de etanol nos experimentos realizados com essas tampas. As tampas de clorobutil,que são mais espessas e dificultam o escape de gás de sintese, são mais eficientes para cultivos com substratos gasosos;
- O aumento da superfícide de contato líquido-gasoso no sistema causado pelo posicionamento dos frascos de soro na horizontal no incubador rotatório, em comparação com a posição vertical, favoreceu o crescimento de *Clostridium ljungdahlii, Clostridium carboxidivorans e Clostridium ragsdalei* e promoveu a produção de etanol;
- A adição de 20% (v/v) de perfluorodecalina (PFC) no meio de cultivo favoreceu a produção de etanol, mas não influenciou significativamente sua produtividade, além de ter reduzido a produção de células;
- Os ensaios com pH inicial 7,0 apresentaram as maiores produção e produtividade em etanol;

- A estratégia de alimentação com meio ATCC 2713 dez vezes concentrado aumentou a produção de etanol em 7 vezes;
- É possível produzir etanol utilizando *C. carboxidivorans* a partir de gás de síntese em meio de cultivo contendo apenas glicose e triptona;
- A substituição da fonte de nitrogênio (triptona) por milhocina reduziu a produtividade em etanol;
- Triptona, peptona e L-Arginina apresentam efeito significativo na produção de etanol. Os demais componentes do meio de cultivo ATCC 2713 não apresentaram relevância no bioprocesso estudado para obtenção desse solvente;
- Ocorreu alta produção de ácido lático concomitantemente à produção de etanol em cultivos de *C. carboxidivorans* na presença de gás de síntese;
- No cultivo de *C. carboxidivorans* em meio ATCC 2713 em biorreator a peptona bacteriológica (menos onerosa) favoreceu a produção de etanol em comparação com a peptona pancreática;
- Não houve produção de ácido lático nos ensaios realizados em biorreator com nitrogênio ou gás de sintese;
- Em biorreator,*C.carboxidivorans* mostrou-se melhor produtora de etanol quando comparada a *C.ljungdahlii e* a *C. ragsdalei*. Além disso, o cultivo realizado com gás de síntese apresentou maior produtividade em etanol em comparação ao cultivo com nitrogênio;
- O aumento da agitação em biorreator, a pressão atmosférica, não favoreceu o aumento da a produtividade de etanol.

7 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Estudar o efeito do aumento da pressão de gás de síntese no sistema visando maximizar a produção de etanol;
- Avaliar o perfil de consumo de gás de síntese em biorreator de células livres, pela técnica de Cromatografia Gasosa;
- Investigar a influência da adição de agentes redutores, como L-cisteína na produção de ácidos e/ou solventes;
- Estudar novas estratégias operacionais, como a alimentação contínua de gás de síntese em biorreator de células livres;
- Investigar a utilização de biorreatores de fibra oca (*hollow fiber*), para aumento da transferência de massa e produção de metabólitos.

8. REFERÊNCIAS

ABREU, A.J. Desenvolvimento e caracterização de catalisadores de níquel suportados em matrizes ceo2-zro2-Al2O3, ceo2-La2O3-Al2O3 e zro2-La2O3-Al2O3 avaliados para as reações de reforma de metano. Tese de doutorado, São Carlos., Universidade de São Paulo. 2012.

ABUBACKAR, H.N.; VEIGA, M.C.; KENNES, C. Carbon monoxide fermentation to ethanol by Clostridium autoethanogenum in a bioreactor with no accumulation of acetic acid. Bioresource Technol. v. 186, p. 122–127, 2015.

ABUBACKAR,H.N.; VEIGA, M.C. E KENNES C. Biological conversion of carbon monoxide to ethanol effect of pH, gas pressure, reducing agent and yest extract. Bioresour Technol, v. 114, p. 518-522, 2012.

AHMED, A. et al. Effects of biomass-generated producer gas constituents on cell growth, product distribution and hydrogenase activity of *Clostridium carboxidivorans* P7T. Biomass and Bioenergy, v. 30, n. 7, p. 665–672, 2006.

ALCANTARA, A.J.O.Composição gravimétrica dos resíduos sólidos urbanos e caracterização química do solo da área de disposição final do município de cáceres-MT. Dissertação apresentada à Universidade do Estado de Mato Grosso, 2010.

ALCARDE, A.R. Processamento da cana-de-açúcar. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Embrapa. Brasília, DF. Anais, 2007.

AMARAL, P. F. F.; ALMEIDA, A. P. R.; PEIXOTO, T.; ROCHA-LEAO, M. H. M.; COUTINHO, J. A.; COELHO, M. A. Z. Beneficial effects of enhanced aeration using perfluorodecalin in Yarrowia lipolytica cultures for lipase production. World Journal of Microbiology and Biotechnology, v. 23(3), p. 339-344, 2007.

AMARAL, P. F.F. Produção de lipase de *Yarrowialipolytica*em Biorreator Multifásico – Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Rio de Janeiro UFRJ, Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos – EQ , Rio de Janeiro, 221 p., 2007.

ANDRADE, E.T.; CARVALHO, S. R. G.; SOUZA, L.F. Programa do Proálcool e o etanol no Brasil. ENGEVISTA, V. 11, n. 2. P. 127-136, 2009.

ANP. Síntese dos Preços Praticados São Paulo, 2017.
www.anp.gov.br/preco, acessado em 20 de fevereiro 2017.

AQUINO, A. S. Análise de Rotas Alternativas para Seqüestro Químico de CO2: Produção de Metanol, Gás de Síntese e Acido Acético. Rio de Janeiro: UFRJ/EQ, 2008.

BARCELOS, C. A. Aproveitamento das frações sacarínea, amilácea e lignocelulósica do sorgo sacarino [Sorghum bicolor (L.) Moench] para a produção de bioetanol. Tese (Doutorado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos) – Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2012.

BARIK, S.; PRIETO, S.; HARRISON, S.B.; CLAUSEN, E.C.; GADDY, J.L. Biological production of alcohols from coal through indirect liquefaction. Appl. Biochem. Biotechnol, v.18, p. 363-378, 1988.

BASTOS, V. D., BNDES Setorial. Etanol, alcoolquímica e biorrefinarias. Rio de Janeiro, n. 25, p. 5-38, mar. 2007.

BETANCUR, G. J. V. Otimização do pré-tratamento ácido de bagaço de cana-de-açucar e avaliação da fermentabilidade do hidrolisado hemicelulósico para a produção de etanol de segunda geração. Tese de doutorado em ciências. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Escola de Quimica, Rio de Janeiro, 2010.

BIOMASS. Conversion of Biomass to Bio-Oil, acessado em 25 de julho de 2011, Downloaded em: http://blogs.princeton.edu/chm333/f2006/biomass/bio_oil/02_chemistryprocessing_the_the_basics/02_processing.

BORGES, E.R. Produção de ácido succínico por *actinobacillus succinogenes*.Tese (doutorado em ciências) – Universidade federal do rio de janeiro - ufrj, Escola de Química, programa de pós-graduação em tecnologia de processos químicos e bioquímicos, 2011.

BORZANI, W. *et. al.* Biotecnologia Industrial. São Paulo. Blucher, 2001.

BOTELHO, A. M. Aumento da produção de biomassa de *Clostridium carboxidivorans* utilizando gás de síntese para fins biotecnológicos. Dissertação de mestrado,

Universidade Federal do Rio de Janeiro, Escola de Química, Programa de Pós Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos, 2016.

BRASIL, MME/EPE-Ministério de Minas e Energia, Empresa de PesquisaEnergética. Resenha Energética Brasileira, 2016.

BRASIL, EPE - Empresa de Pesquisa Energética. Balanço Energético Nacional, Relatório Síntese/ano base. Rio de Janeiro, RJ, 2013.

BRASIL, MME/EPE, Ministério de Minas e Energia, Empresa de PesquisaEnergética. Resenha Energética. Exercício de 2012. Brasília, DF, 2013.

Brasil. Empresa de Pesquisa Energética. Balanço Energético Nacional- EPE- 2012 – Ano base 2011: Síntese do Relatório Final. Rio de Janeiro: EPE, 2012.

BRUANT, *et al*. Genomic Analysis of carbon monoxide utilization and butanol production by Clostridium carboxidivorans Strain P7^{T}.plos ONE 5(9): e 13033. 2010.

CALAMINUS, B., Stahlberg, R., Continuous in-line gasification/vitrification process for termal waste treatment: process technology and current status of projects. Waste Management, 18(6-8): 547-556, 1998.

CHIARAMONTI, D.; OASMAA, A.; SOLANTAUSTA, Y. Power generation using fast pyrolisis liquids from biomass. Renewable and Sustainable Energy Reviews, v. 11, p. 1056-1086, 2007.

CONTI, L. La pirolisi: Il processo, I punti do forza, Le opportunita. Universita degli Studi di Sassari, Italia, 2009.

COTTER, J.L.; CHINN, M.S.; GRUNDEN, A.M. Influence of process parameters on growth of Clostridium ljungdahlii and Clostridium autoethanogenum on synthesis gas. Enzyme Microb. Technol., v. 44, p. 281-288, 2009.

DADAK, A.; AGHBASHLO, M.; TABATABAEI, M.; YOUNESI, H.; NAJAFPOUR, G. Using exergy to analyse the sustainability of fermentative ethanol anda acetate production from syngas via anaerobic bacteria (Clostridium ljungdahlii). Sustainable Energy Technologies and Assesments, v. 15, p. 11-19, 2016.

DANIELL, J.; KOPKE, M. E SIMPSON, D. Commercial biomass syngas fermentation. Energies, v. 5, p. 5372-5417, 2012.

DAS, A.; SILAGHI-DUMITRESCU, R.; LJUNGDAHL,L.G.; KURTZ, D.M. Cytochrome bd oxidase, oxidativestress, and dioxygen tolerance of the strictly anaerobicbacterium Moorella thermoacetica. J. Bacteriol. v. 187, p. 2020–2029, 2005.

DATAR, R.P., SHENKMAN, R.M., CATENI, B.G. Fermentation of biomass-generated producer gas to ethanol. *Biotechnol Bioeng* 86: 587–594, 2004.

DRABER, K. M. M.Etanol de segunda geração já é realidade. Monografia apresentada como requisito parcial para a conclusão de Graduação do Curso de Engenharia Bioquímica - Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo, Lorena, 2013.

DRAKE, H. L., GÖßNER, A. S., DANIEL, S. L. Old acetogens, new light. Annals of the New York Academy of Sciences,v. 1125(1), p. 100-128, 2008.

FERREIRA, V., FABER, M. D. O., MESQUITA, S. D. S., & PEREIRA JR, N. Simultaneous saccharification and fermentation process of different cellulosic substrates using a recombinant Saccharomyces cerevisiae harbouring the β-glucosidase gene. Electronic Journal of Biotechnology, 13(2), 5-6, 2010.

GADDY, J.L; CLAUSEN, W.C. Clostridium ljungdahlii, an Anaerobic Ethanol and Acetate Producing Microorganism. U.S. Patent 5173429, 22, 1992.

GEROSA, T. M. O estudo da utilização do gás natural como insumo para a indústria química e petroquímica: modelagem de uma planta gás-química. Dissertação de mestrado. Programa Interunidades de pós-graduação em energia. EP/FEA/IEE/IF. Universidade de São Paulo.155 p. São Paulo. 2006.

GHESHLAGHI,R.; SCHARER, J.M.; MOO-YOUNG, M.; CHOU, C.P. Metabolic pathways of clostridia for producing butanol. Biotechnology advances. v. 27(6), p. 764-81, 2009.

HAMELINCK, C. N.; HOOIJDONK, G. V.; FAAIJ, A. P. C. Ethanol from lignocellulosic biomass: Techno-economic performance in short-, middle- and long-term. *Biomass and Bioenergy*, 28:384-410, 2005.

HUNGER, S.; GO¨ßNER, A. S.; DRAKE, H. L. Trophic Links between the Acetogen *Clostridium glycolicum* KHa and the Fermentative Anaerobe *Bacteroides xylanolyticus*

KHb, Isolated from Hawaiian Forest Soil. Applied and environmental microbiology, v. 77, p. 6281–6285, 2011.

HURST, K. M. & LEWIS, R. S. Carbon monoxide partial pressure effects on the metabolic process of syngas fermentation. *Biochemical Engineering Journal*, *48*(2), 159-165, 2010.

KARNHOLZ, A., KUSEL,K., GOßNER, A. et al. Toleranceand metabolic response of acetogenic bacteriatoward oxygen. Appl. Environ. Microbiol. V. 68: 1005–1009, 2002.

KENNES, D.; ABUBACKAR, H.N; DIAZ, M.; VEIGA, M.C.; KENNES, C. Bioethanol production from biomass: carbohydrate vs syngas fermentation. J. Chem. Technol. Biotechnol, v. 91, p. 304-317, 2016.

KLASSON, K.T., ACKERSON, C.M.D., CLAUSEN, E.C., GADDY, J.L. Biological conversion of coal and coal-derived synthesis gas. Fuel 72, 1673–1678, 1993.

KLASSON, K.T.; ACKERSON, M.D.; CLAUSEN, E.C.; GADDY, J.L. Bioconversion of synthesis gas into liquid or gaseous fuels. EnzimeMicrobTechnol, v.14, 602-608, 1992.

KÖPKE, M.; MIHALCEA, C.; LIEW,F.M.; TIZARD, J.H.; ALI MS, CONOLLY, J.J., et al. 2,3-butanediol industrial waste gas. Applied and Environmental Microbiology. v.77(15), 2011

KOPKE, M.; HELD, C.; HUJER, S.; LIESEGANG, H.; WIEZER, A.; WOLLHER, A. Clostridium lijungdahlii represents a microbial production plataform based on syngas. Prod Natl Acad Sci, USA, v. 107, p. 13087-92, 2010.

KUNDIYANA, D.K.; HUHNKE, R.L; MADDIPATI, P.; ATIYEH, H.K. AND WILKINS, M.R. Feasibility of incorporating cotton seed extract in Clostridium stran P11 fermentation medium during synthesis gas fermentation. Bioresource Technol. V 101; 9673-9680, 2010b.

KUNDIYANA,D. K.; RAYMOND, L.; HUHNKE, and MARK, R. WILKINS. Syngas fermentation in a 100-L pilot scale fermentor:Design and process considerations. Journal of Bioscience and Bioengineering VOL. 109 No. 5, 492–498, 2010a.

KÜSEL, K.; KARNHOLZ, A.; TRINKWALTER, T.; DEVEREUX, R.; ACKER, G.; DRAKE, H. L. Physiological ecology of Clostridium glycolicum RD-1, an aerotolerant

acetogen isolated from sea grass roots. Applied and environmental microbiology, v. 67(10), p. 4734-4741, 2001.

LIOU *et al*. Clostridium carboxidivorans sp. Nov., a solvent-producing clostridium isolated from an agricultural settling lagoon, and reclassification of the acetogen Clostridium scatologenes strain SL1 as Clostridium drakei sp. Nov. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology , v. 55, p. 2085–2091, 2005.

LIU, K.; ATIYEH, H.K.; STEVENSON, B.S.; TANNER, R.S.; WILKINS, M.R. AND HUHNKE, R.L. Continuous syngas fermentation for the production of ethanol, n-propanol and n-butanol. Bioresource Technol, v. 151, p. 69-77, 2014.

LIEW, F.M.; KÖPKE, M.; SIMPSON,S. D. Gas Fermentation for Commercial Biofuels Production, Gaseous and Solid Biofuels - Conversion Techniques, 2013.

LORA *et al.* Biocombustiveis. 2012.

LOWE, K. C., DAVEY, M. R. e POWER, J. B. “Perfluorochemicals: their applications and benefits to cell culture”, Tibtech, v. 16, pp.272-277, 1998.

LYND, L.R. Overview and evaluation of fuel ethanol from cellulosic biomass: technology, economics, the environment, and policy, Annu. Rev. Energy Environ. v. 21, p. 403–465, 1996.

LYND, L.R.; ZYL, W.H.V.; McBRIDE, J.E.; LASER, M. Consolidated bioprocessing of cellulosic biomass: an update. Current Opinion in Biotechnology, v. 16. n. 5, p. 577-583, 2005.

MADDIPATI, P.; ATIYEH, H.K.; BELLMER,D.D.; HUHNKE, R.L. Ethanol production from syngas by Clostridium strain P11 using corn steep liquor as a nutrient replacement to yeast extract. Bioresource Technol, v. 102, p. 6494–6501, 2011.

MAPA – Ministério de Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Produção e Agroenergia. Departamento da cana-de-açúcar e Agroenergia. Produção brasileira de etanol. Disponível em www.agicultura.gov.br. Acesso em fevereiro de 2017.

MÉIER, D. Aktuelle Enwicklungen auf dem Gebiet der Flash Pyrolise zur Verflussigung von Biomasse, Fachtung, “Thermochemishe Umwandlung von Biomasse”, Flensburg, 2006.

MÉIER, D.; FAIX, O. O State of the art of applied fast pyrolysis of lignocellulosic materials a review. Bioresource Technology, v. 68, p. 71-77, 1999.

MISOPH, M.; DRAKE, H.L. Effect of CO2 on the Fermentation Capacities of the Acetogen *Peptostreptococcus productus.* Journal of bacteriology, p. 3140–3145,1996.

MOHAMMADI, M.; NAJAFPOUR, G.; YOUNESI, H.; LAHIJANI, P. Bioconversion of synthesis gas to second generation biofuels: A review. Renewable and Sustainable Energy Reviews, v. 15, p. 4255-4273, 2011.

MOHAMMADI, M.; YOUNESI, H.; NAJAFPOUR, A.G. e MOHAMED, A. R. Sustainable ethanol fermentation from synthesis gas by *Clostridium ljungdahlii* in a continuous stirred tank bioreactor. *J Chem Technol Biotechnol* ,2012.

MOLITOR, B. et al. Carbon recovery by fermentation of CO-rich off gases - Turning steel mills into biorefineries. Bioresource Technology, v. 215, p. 386–396, 2016.

MUNASINGHE, P.C., KHANAL, S.K. Syngas fermentation to biofuel: evaluation of carbon monoxide mass transfer coefficient (kla) in different reactor configurations. Biotechnol.Prog.26 (6), 1616–1621, 2010.

NAJAFPOUR, G.; YOUNESI, H. Ethanol and acetate synthesis from waste gases using batch culture of Clostridium ljungdhahlii. Enzime and Microbial Technology, v. 38, p. 223-228, 2006.

NOVACANA. Brasil torna-se o 2° maior comprador de etanol dos EUA, para surpresa das usinas nos EUA. 2016. https://www.novacana.com/n/etanol/mercdo/importacao/brasil-maior-comprador-etanol-eua-surpresa-usinas-eua-050416/. Acessado em 07/02/2017.

NOVACANA. Com PIS/Cofins, queda de preço do etanol nas usinas não chega aos postos, diz ANP. 2017. https://www.novacana.com/n/etanol/impostos/piscofinsquedaprecoetanolusinasspnaopostosanp080217/. Acessado em 18/02/2017.

OLIVEIRA J. G. Perspectivas para a cogeração com bagaço de cana-de-açucar: potencial do mercado de carbono para o setor sucroalcooleiro paulista. 2007. 160 f.

Dissertação (Mestrado em Engenharia de produção) - Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2007.

PACHECO, T. F.Produção de Etanol: Primeira ou Segunda Geração? Circular Tecnica. Embrapa, 2011.

PEREIRA Jr., N.; COUTO, M.A.P.G.; SANTA ANNA, L.M.M. Biomass of lignocellulosic composition for fuel ethanol production and the context of biorefinery. In Series on Biotechnology, Ed. Amiga Digital UFRJ, Rio de Janeiro, v.2, 45 p., 2008.

PHILLIPS, J.; KLASSON, K.; CLAUSEN, E. and GADDY, J. Biological production of ethanol from coal synthesis gas. Appl Biochem Biotechnol, v. 39, p. 559-571, 1993.

RAMACHANDRIYA, K.D.; KUNDIYANA, D.K.; WILKINS, M.R.; TERRIL, J.B. ATIYEH, H.K.; HUHNKE, R.L. Carbon dioxide conversion to fuels and chemicals using a hybrid green process. Appl Energy, v. 112, p. 289-99, 2013.

RAMIÓ-PUJOL, S.; GANIGUÉ, R.; BAÑERAS, L.; COLPRIM, J. How can alcohol production be improved in carboxydotrophic clostridia? Process Biochemistry, v. 50, p. 1047-1055, 2015.

RAMIÓ-PUJOL, S.; GANIGUÉ, R.; BANERAS, L; COLPRIM, J. Impact of formate on growth and productivity of Clostridium lijungdahlii PETC and Clostridium carboxidivorans P7grown on syngas. Int Microbiol, 2014.

RENEWABLE FUELS ASSOCIATION.Falling Walls &Rising Tides.Ethanol Industry Outlook.2014. review. Applied Biochemistry and Biotechnology, v. 39/40, p. 587-600, 2014.

REWICK, R.T.; WENTRCEK, P.R.; WISE,H. Carbon gasification in the presence of metal catalysts, Fuel , v. 53 (4), p. 274–279, 1974.

RIBEIRO, D. Processo de Haber-Bosch. Revista de Ciência Elementar, v. 1, 2013

Richter, H.; Martin, M.E. and Angenent, L. T. Two-Stage Continuous Fermentation System for Conversion of Syngas into Ethanol. *Energies, v. 6*, 3987-4000, 2013.

RODRIGUES, V.; COSENZA, C. A. N.; BARROS, C. F.; KRYKHTINE, F. E SÁ FORTES, L. E. N. Tratamento de Resíduos Sólidos Urbanos e Produção de Energia:

Análise de Legislação para Viabilidade Econômica de Soluçoes Conjuntas. XI Simposio de Excelencia em Gestão e Tecnologia. Resende, RJ, 2014.

SAHA, B.C. Hemicellulose bioconversion. J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 30, 279–291, 2003.

SANTOS, D. S. Produção de etanol de segunda geração por *Zymomonas mobilis* naturalmente ocorrente e recombinante, empregando biomassa lignocelulósica. 218p. Tese (Doutorado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos) – Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2012.

SHLESER, R. Ethanol production in Hawaii: Processes, feedstock, and current economic feasibility of fuel grade ethanol production in Hawaii. Final Report. Department of Business,Economic Development and Tourism, State of Hawaii, USA., pp. 1-87, 1994.

SILAGHI-DUMITRESCU, R., COULTER, E.D., DAS, A. et al. A flavodiiron protein and high molecular weightrubredoxin from Moorella thermoacetica with nitric oxidereductase activity. Biochemistry, v. 42, p. 2806–2815, 2003.

SILVA, A.J. G. Avaliação da Rota Termoquímica de Produção de Etanol e Alcoóis Superiores/ Arthur José Gerbasi da Silva. – Rio de Janeiro: UFRJ/COPPE, 2013. Tese (doutorado) – UFRJ/ COPPE/ Programa de Planejamento Energético, 2013.

SKIDMORE, B. E.; BAKER , R. A.; BANJADE, D. R., JASON, M. B.; DOUGLAS R.. T.; RANDY, S. L. Syngas fermentation to biofuels: Effects of hydrogen partial pressure on hydrogenase Efficiency. B i o m a s s and b i o e n e r gy, v. 5 5, p. 1 5 6 e 1 6 2, 2 0 1 3.

SUN, Y. & CHENG, J. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. Applied Biochemistry and Biotechnology, v. 39/40, p. 587-600, 2002.

TANNER, R.S.; MILLER, L.M; YANG, D. Clostridium ljungdahlii sp. nov. An acetogenic species in clostridial Rrna Homology Group I. Int. J. Syst Bacteriol, v. 43, p. 232-236, 1993.

TSAI, S.P.; DATTA, R.; BASU, R.; YOON, S.H. Syngas conversion system using asymmetric membrane and anaerobic microorganism, US Oatent N° 2.009.021.516.3A1, 2009.

UKPONG, M.N.; ATIYEDH, H.K.; DE LORME, J.M.; LIU, K.; ZHU, X.; TANNER, R.S.; WILKINS, M.K.; STEVENSON, B.S. Physiological response of Clostridium carboxidivorans during conversion of synthesis gas to solvents in a gas-fed bioreactor. Biotechnology and Bioengineering, V. 109, N°11, 2012.

UNICA. Histórico de exportação mensal de etanol pelo Brasil, por região, 2016. Http://www.novacana.com/estudos/historico-das-exportacoes-brasileiras-de-etanol. Acessado em 03/02/2017

VASCONCELOS, N. Reforma a vapor do metano em catalisadores à base de níquel promovidos com nióbia. Dissertação de Mestrado. Niteroi. Universidade Federal Fluminense, 2006.

VEGA, J.L.; PRIETO, S.; ELMORE, B.B.; CLAUSEN, E.C.; GADDY, J.L. The biological production of ethanol from synthesis gas. Applied Biochemistry and Biotecnology 20/21, 781- 797, 1989.

WILKINS, M.R.; ATIYEH, H. K., Microbial production of ethanol from carbon monoxide.Current Opinion in Biotechnology, v.22, 326-330, 2011.

WITTCOFF, H.A.; REUBEN, B. G. Industrial organic chemicals. New York: John Wiley & Sons, 531, 1996.

WORDEN, R.M.; GRETHLEIN, A.J.; JAIN, M.K.; DATTA, R. Production of butanol and ethanol from synthesis gas via fermentation. Fuel, v.70, p. 615-619, 1991.

YOUNESI, H.; NAJAFPOUR, G.; MOHAMED, A. R. Ethanol and acetate production from synthesis gás via fermentation processes using anaerobic bacterium, Vlostridium ljungdahlii. Biochemical Engineering Journal, v. 27, p. 110-119, 2005.