UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO

ESCOLA DE QUÍMICA

LÍVIAN RIBEIRO VASCONCELOS DE SÁ

PRODUÇÃO BIOLÓGICA DE HIDROGÊNIO POR BACTÉRIAS FERMENTATIVAS UTILIZANDO DIFERENTES CARBOIDRATOS OU GLICERINA COMO SUBSTRATO

RIO DE JANEIRO

Maio - 2011

LÍVIAN RIBEIRO VASCONCELOS DE SÁ

PRODUÇÃO BIOLÓGICA DE HIDROGÊNIO POR BACTÉRIAS FERMENTATIVAS UTILIZANDO DIFERENTES CARBOIDRATOS OU GLICERINA COMO SUBSTRATO

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos, Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências.

Orientadora: Dra. Magali Christe Cammarota

Co-orientadora: Dra. Viridiana Ferreira-Leitão

RIO DE JANEIRO

Maio - 2011

S111p Sá, Lívian Ribeiro Vasconcelos.

Produção biológica de hidrogênio por bactérias fermentativas utilizando diferentes carboidratos ou glicerina como substrato/ Lívian Ribeiro Vasconcelos de Sá. – 2011.
xxxi, 405 f.: il.

Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Escola de Química, Rio de Janeiro, 2011.

Orientadoras: Magali Christe Cammarota e Viridiana Santana Ferreira-Leitão.

1. Biohidrogênio. 2. Fermentação anaeróbia. 3. Carboidratos. 4. Ácidos orgânicos voláteis. 5. *Clostridium*. 6. Hidrogenases. – Dissertações. I. Cammarota, Magali Christe (Orient.). II. Ferreira-Leitão, Viridiana Santana (Orient.). III. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Programa em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos, Escola de Química. IV. Título.

CDD: 661.08

LÍVIAN RIBEIRO VASCONCELOS DE SÁ

PRODUÇÃO BIOLÓGICA DE HIDROGÊNIO POR BACTÉRIAS FERMENTATIVAS UTILIZANDO DIFERENTES CARBOIDRATOS OU GLICERINA COMO SUBSTRATO

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos, Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências.

Aprovada em 13 de Maio de 2011

_____
Magali Christe Cammarota, D.Sc., UFRJ

_____
Viridiana Santana Ferreira-Leitão, D.Sc., INT

_____
Eliana Flavia Camporese Sérvulo, D.Sc., UFRJ

_____
Isaac Volschan Jr., D.Sc., UFRJ

_____
Marcelo Zaiat, D.Sc., USP

Dedico este trabalho

Aos meus pais Wilian e Beatriz, pelo amor incondicional, pelos valiosos ensinamentos de vida e por me ensinarem a acreditar e batalhar pelo meu sonho;

Aos meus irmãos Suzan, Tamaran e Renan pelo amor sincero, incentivo e por entenderem a minha ausência durante momentos importantes em suas vidas;

Ao meu noivo Douglas, pela cumplicidade, compreensão e apoio para que se tornasse possível a realização deste sonho.

AGRADECIMENTOS

À Deus, por iluminar o meu caminho;

À Dra. Viridiana Santana Ferreira-Leitão, mais que orientadora, amiga, pela confiança, incentivo e constante exemplo de profissionalismo e pelos valiosos ensinamentos. O meu muito obrigado Vivi;

À minha orientadora Prof. Dra. Magali Christe Cammarota, pela oportunidade, confiança, incentivo e dedicada orientação;

À pesquisadora Dra. Edna Maria Morais Oliveira da Embrapa Agroindústria de Alimentos, pelo carinho, constante incentivo e valiosos ensinamentos de Biologia Molecular;

À pesquisadora Andrea Matos da Embrapa Solos, pela amizade, carinho, imenso apoio e por todo o auxílio na parte de Cromatografia Gasosa;

Ao Prof. Dr. Marcone Oliveira da Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF), pela ajuda e sábios ensinamentos na parte de validação de metodologias analíticas;

Ao Prof. Dr. Luiz Fernando Cappa de Oliveira, à Profa. Dra. Renata Diniz e à Profa. Dra. Elita Scio, professores da Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF), por todo o incentivo e valiosa orientação durante a minha iniciação científica;

Aos pesquisadores Dr. Fabio Bellot e Dr. Marco Fraga do Instituto Nacional de Tecnologia (INT), pelo convite para participarmos da Rede de Hidrogênio, pela excelente convivência e pelas valiosas trocas de conhecimento;

À Profa. Dra. Elba Bon, da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), por acreditar no meu trabalho e estimular a minha participação no curso de “Sistemas de utilização de biomassa” realizado em 2010 no Japão;

A todos os meus familiares, em especial, aos meus avôs Orlando e Eni, pelo carinhoso apoio e zelo;

À amiga Manoela Balesteros, pela amizade, incentivo, força e solidariedade, mesmo estando longe;

Aos queridos colegas do Laboratório de Biocatálise (LABIC - INT), Javier, Maria Cristina, Ana Luiza, Lorraine, Anete e Patrick, pelo incentivo, compreensão e colaboração; e em especial, à Patrícia, pelo carinho e cumplicidade durante a realização deste trabalho;

À querida pesquisadora Dra. Fabiana Mendes do Instituto Nacional de Tecnologia (INT), pelo carinho, amizade e sábios conselhos;

À pesquisadora Dra. Márcia Lutterbach e às queridas colegas Mariana, Luciana e Ana Lúcia do Laboratório de Biocorrosão e Biodegradação (LABIO - INT) pelo carinho e ajuda incondicional durante as análises microbiológicas;

Às pesquisadoras Elba dos Santos de Oliveira e Mona Andrade Abdel-Rehim do Laboratório de Gases Combustíveis (LAGÁS - INT) pelo carinho e presteza nos ensaios de Cromatografia Gasosa;

Aos colegas do Laboratório de Diagnóstico Molecular da Embrapa Agroindústria de Alimentos, em especial, a Tatiane Correa e ao Thiago Ferreira, pelo carinho e imensa contribuição nas análises de biologia molecular;

Aos colegas do Laboratório de Tecnologia Ambiental da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), em especial, a Suzana pela ajuda sempre que solicitada;

Aos colegas da Divisão de Catálise e Processos Químicos (DCAP-INT) pelo estimulante ambiente de pesquisa;

À Companhia Estadual de Águas e Esgotos (CEDAE), pela gentileza em ceder o lodo anaeróbio utilizado como inóculo neste trabalho, e em especial, ao Luciano Basto, pela ajuda e presteza;

À SETEC/MCT pelo apoio financeiro e em especial ao Dr. Adriano Duarte pelo estímulo;

Ao CNPq pela bolsa concedida;

A todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

"A mente que se abre a uma nova ideia
jamais volta ao seu tamanho original"
Albert Einstein

RESUMO

de Sá, Lívian Ribeiro Vasconcelos. Produção biológica de hidrogênio por bactérias fermentativas utilizando diferentes carboidratos ou glicerina como substrato. Dissertação (Mestrado) - Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2011

A produção de biohidrogênio a partir do processo de fermentação anaeróbia tem despertado grande interesse devido ao grande potencial como combustível alternativo para o futuro. O monitoramento das etapas do processo fermentativo fornece informações relevantes sobre o caminho metabólico seguido pelos micro-organismos. Uma metodologia analítica desenvolvida para determinação simultânea de sacarose, glicose, frutose e ácidos acético, propiônico, isobutírico e butírico por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) foi aplicada com êxito nas amostras do processo fermentativo. Os efeitos dos pré-tratamentos ácido, alcalino e térmico do inóculo sobre o desempenho das comunidades bacterianas responsáveis pela produção de H_2 foram avaliados através dos níveis de expressão das hidrogenases de *Clostridium* associados aos rendimentos máximos de H_2 obtidos. O pré-tratamento térmico apresentou o maior rendimento de H_2 (4,62 mol de H_2/mol de sacarose) e o maior nível de expressão das hidrogenases, 64 vezes superior ao obtido com o inóculo *in natura,* em 72 h de fermentação. Elevados rendimentos de H_2 também foram obtidos pelos inóculos com pré-tratamento alcalino (3,93 mol de H_2/mol de sacarose) e ácido (3,85 mol de H_2/mol de sacarose) em diferentes tempos, 48 e 120 h, respectivamente. A razão dos ácidos acético e butírico (HAc/HBu) auxiliou na avaliação do desempenho das comunidades bacterianas produtoras de H_2. Diferentes substratos foram testados para produção de H_2 a 35^0C e pH inicial 5,5, apresentando elevados rendimentos de H_2: sacarose (4,24 mol de H_2/mol de sacarose), glicose (2,19 mol de H_2/mol de glicose), frutose (2,09 mol de H_2/mol de frutose), xilose (1,88 mol de H_2/mol de xilose) e glicerina (0,80 mol de H_2/mol de glicerina).

Palavras-chave: biohidrogênio, fermentação anaeróbia, carboidratos, ácidos orgânicos voláteis, *Clostridium*, hidrogenases.

ABSTRACT

de Sá, Lívian Ribeiro Vasconcelos. Biological hydrogen production by fermentative bacteria by using different carbohydrates or glycerin as substrate. Dissertation (Master Degree) – School of Chemistry, Federal University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2011

The production of biohydrogen through anaerobic fermentation has received increasing attention and has great potential as an alternative process for clean fuel production in the future. The monitoring of the stages of the fermentation process provides relevant information about the metabolic pathway followed by microorganisms. An analytical methodology developed for simultaneous determination of sucrose, glucose, fructose and acetic, propionic, isobutyric and butyric acids by high performance liquid chromatography (HPLC) was successfully applied in the samples of the fermentation process. The effects of acid, alkaline and heat pretreatments of the inoculum on the performance of bacterial communities responsible for H_2 production were evaluated through the level of hydrogenase gene expression of *Clostridium* associated with maximum yields of H_2 obtained. The heat pretreatment provided the highest yield of H_2 (4.62 mol H_2/mol sucrose) and the highest level of hydrogenase gene expression, 64 times that of inoculum *in natura* within 72 h of fermentation. High yields of H_2 were also obtained with alkaline pretreatment (3.93 mol H_2/mol sucrose) and acid pretreatment (3.85 mol H_2/mol sucrose) at different times, 48 and 120 h, respectively. The ratio of acetic and butyric acids (HAc/HBu) was useful in the assessment of the performance of bacterial communities that produce H_2. Different substrates were tested for H_2 production at 35^0C and an initial pH of 5.5, which resulted in high yields of H_2: sucrose (4.24 mol H_2/mol sucrose), glucose (2.19 mol H_2/mol glucose), fructose (2.09 mol H_2/mol fructose), xylose (1.88 mol H_2/mol xylose) and glycerin (0.80 mol H_2/mol glycerin).

Keywords: biohydrogen, anaerobic fermentation, carbohydrates, volatile fatty acids, *Clostridium*, hydrogenases.

LISTA DE FIGURAS

Figura 3.1	Percentual de produção de H_2 a partir de algumas fontes energéticas.	8
Figura 3.2	Representação esquemática das principais etapas do processo fermentativo anaeróbio.	12
Figura 3.3	Representação esquemática das principais etapas do processo de fermentação anaeróbia e os grupos de micro-organismos que devem ser inibidos e/ou eliminados para se obter maiores rendimentos de H_2.	17
Figura 3.4	Possíveis materiais residuais dos processos de produção de etanol 1G e etanol 2G para produção de biohidrogênio	20
Figura 3.5	Produção de biodiesel e obtenção da glicerina como subproduto, a partir da transesterificação de óleos vegetais ou gorduras animais com alcoóis (metanol ou etanol), utilizando catálise básica.	21
Figura 3.6	O efeito da pressão parcial de hidrogênio na produção biológica de H_2. (a) Oxidação do NADH para produção de H_2 em P_{H_2}< 60 Pa; (b) Oxidação do NADH para formação de ácido butírico em P_{H_2} > 60 Pa. Reações: (1) Metabolismo da glicose por via glicolítica; (2) Descarboxilação oxidativa do piruvato por meio da enzima piruvato:ferredoxina oxiredutase; (3) Formação de hidrogênio através das hidrogenases; (4) Fermentação butírica.	27
Figura 3.7	Rota metabólica do *Clostridium acetobutylicum* durante a produção de H_2 por fermentação anaeróbia.	29
Figura 4.1	Sistema utilizado nos ensaios preliminares para produção de H_2.	35
Figura 4.2	Condição de ciclagem térmica para obtenção dos produtos de PCR.	42
Figura 4.3	Condição de ciclagem térmica para obtenção dos produtos de PCR em tempo real.	44

Figura 4.4 Cromatógrafo Líquido da Shimadzu utilizado durante as análises cromatográficas. 45

Figura 4.5 Cromatógrafo Gasoso da Agilent utilizado durante as análises cromatográficas. 46

Figura 4.6 Ampola de amostragem conectada ao sistema cromatográfico gasoso. 47

Figura 5.1 Cromatogramas da mistura de padrões adicionados a amostra de lodo anaeróbio. (**A**) Detector UV-VIS a 210nm e (**B**) Detector IR. Picos: sacarose (1), glicose (2), frutose (3), ácido acético (4), ácido propiônico (5), ácido isobutírico (6) e ácido butírico (7). A concentração dos analitos adicionados foi de 100 $mmol.L^{-1}$. Condições cromatográficas: coluna Aminex HPX-87H com pré-coluna, fase móvel H_2SO_4 0,005 $mol.L^{-1}$, fluxo de 1.0 $mL.min^{-1}$ e temperatura de 55 ^0C. 51

Figura 5.2 Cromatogramas da mistura de padrões adicionados a amostra de lodo de abatedouro de aves. (**A**) Detector UV-VIS a 210nm e (**B**) Detector IR. Picos: sacarose (1), glicose (2), frutose (3), ácido acético (4), ácido propiônico (5), ácido isobutírico (6) e ácido butírico (7). A concentração dos analitos adicionados era de 100 $mmol.L^{-1}$. Condições cromatográficas: coluna Aminex HPX-87H com pré-coluna, fase móvel H_2SO_4 0,005 $mol.L^{-1}$, fluxo de 1.0 $mL.min^{-1}$ e temperatura de 55 ^0C. 53

Figura 5.3 Produtos de PCR para as amplificações dos genes: (A) *Clostridium sp*. 16S rRNA e (B) hidrogenase. M = marcador *Low DNA Mass Ladder*; A1 = inóculo *in natura* antes da fermentação; A2 = inóculo pré-tratado termicamente antes da fermentação; A3 = inóculo *in natura* após 24 h de fermentação; A4 = inóculo pré-tratado termicamente após 24 h de fermentação. 68

Figura 5.4 Nível de expressão do gene hidrogenase. A1 = inóculo *in natura* antes da fermentação; A2 = inóculo pré-tratado termicamente antes da fermentação; A3 = inóculo *in natura* após 24 h de fermentação; A4 = inóculo pré-tratado termicamente após 24 h de fermentação. 69

Figura 5.5 Cinética de consumo da sacarose no meio fermentativo, ao longo de 72 h de fermentação, a partir de diferentes inóculos. 70

Figura 5.6 Rendimentos máximos de H_2 obtidos ao longo de 120 h de fermentação utilizando inóculos *in natura* e com pré-tratamento (térmico, alcalino e ácido). 72

Figura 5.7 Produtos de PCR para as amplificações dos genes: (A) e (B) *Clostridium sp*. 16S rRNA e (C) e (D) hidrogenase. M = marcador *Low DNA Mass Ladder*; A1 = inóculo *in natura*; A2 = inóculo após pré-tratamento ácido; A3 = inóculo após pré-tratamento alcalino; A4 = inóculo após pré-tratamento térmico; A5 = inóculo *in natura* após 72 h de fermentação; A6 = inóculo com pré-tratamento ácido após 72 h de fermentação; A7 = inóculo com pré-tratamento alcalino após 72 h de fermentação e A8 = inóculo com pré-tratamento térmico após 72 h de fermentação. 77

Figura 5.8 Nível de expressão do gene hidrogenase. A1 = inóculo *in natura*; A2 = inóculo após pré-tratamento ácido; A3 = inóculo após pré-tratamento alcalino; A4 = inóculo após pré-tratamento térmico; A5 = inóculo *in natura* após 72 h de fermentação; A6 = inóculo com pré-tratamento ácido após 72 h de fermentação; A7 = inóculo com pré-tratamento alcalino após 72 h de fermentação e A8 = inóculo com pré-tratamento térmico após 72 h de fermentação. 78

Figura 5.9 Porcentagem de degradação dos diferentes substratos utilizados para produção de H_2 em 72 h de fermentação utilizando inoculo pré-tratado termicamente. Sacarose 1 = concentração de 11,8 mmol.L^{-1} utilizando inóculo não adaptado anteriormente; Sacarose 2 = concentração de 11,8 mmol.L^{-1} utilizando inóculo adaptado anteriormente (reciclo do inóculo); Glicose = concentração de 25,0 mmol.L^{-1}; Frutose = concentração de 22,6 mmol.L^{-1}; Xilose 1 = concentração de 28,6 mmol.L^{-1}; Xilose 2 = concentração de 57,1 mmol.L^{-1} e Glicerina = concentração de 46,6 mmol.L^{-1}. 80

Figura 5.10 Proporções entre os ácidos acético e butírico obtidas para os meios fermentativos contendo diferentes substratos para produção de H_2 em 72 h utilizando inóculo pré-tratado termicamente. Sacarose 1 = concentração de 11,8 mmol.L^{-1} utilizando inóculo não adaptado anteriormente; Sacarose 2 = concentração de 11,8 mmol.L^{-1} utilizando inóculo adaptado anteriormente (reciclo do inóculo); Glicose = concentração de 25,0 mmol.L^{-1}; Frutose = concentração de 22,6 mmol.L^{-1}; Xilose 1 = concentração de 28,6 mmol.L^{-1}; Xilose 2 = concentração de 57,1 mmol.L^{-1} e Glicerina = concentração de 46,6 mmol.L^{-1}. 81

Figura 5.11 Cromatogramas obtidos para análise do meio contendo glicerina como substrato. A = Cromatograma do meio contendo glicerina como substrato após 72 h de fermentação; B = Cromatograma do padrão 1,2-propanodiol 5 mmol.L^{-1}; 1 = Metabólito formado; 2 = Padrão 1,2-propanodiol 5 mmol.L^{-1}. 82

Figura 5.12 Rota metabólica do *Clostridium butyricum* a partir do glicerol. 1 = hidrogenase; 2 = Ferredoxina-NAD(P)$^{+}$-redutase; 3 = NAD(P)H-ferredoxina redutase; 4 = glicerol desidrogenase; 5 = DHA quinase; 6 = 1,3-propanodiol desidrogenase; 7 = glicerol desidratase; 8 = fosfotransacetilase; 9 = acetato linase; 10 = fosfotransbutilase; 11 = butirato quinase; 12 = piruvato-ferredoxina oxirredutase; 13 = gliceraldeido-3-fosfato desidrogenase. 84

Figura 5.13 Rendimentos máximos de H_2 para os diferentes substratos utilizados em 72 h de fermentação e utilizando inoculo pré-tratado termicamente. Sacarose 1 = concentração de 11,8 mmol.L^{-1} utilizando inóculo não adaptado anteriormente; Sacarose 2 = concentração de 11,8 mmol.L^{-1} utilizando inóculo adaptado anteriormente (reciclo do inóculo); Glicose = concentração de 25,0 mmol.L^{-1}; Frutose = concentração de 22,6 mmol.L^{-1}; Xilose 1 = concentração de 28,6 mmol.L^{-1}; Xilose 2 = concentração de 57,1 mmol.L^{-1} e Glicerina = concentração de 46,6 mmol.L^{-1}. 85

Figura 5.14 Rota metabólica utilizada pelos micro-organismos do gênero *Clostridium*. 86

LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1	Métodos de produção de hidrogênio.	8
Tabela 3.2	Vantagens e desvantagens dos processos biológicos e principais micro-organismos estudados para produção de biohidrogênio.	11
Tabela 3.3	Diferentes tipos de pré-tratamento de inóculos para maximização da produção de H_2.	15
Tabela 3.4	Efeito da temperatura na produção de H_2 fermentativo.	23
Tabela 3.5	Efeito do pH na produção de H_2 fermentativo.	24
Tabela 3.6	Rendimento teórico máximo para produção de H_2 a partir de diferentes carboidratos.	28
Tabela 4.1	Composição da solução de nutrientes para os ensaios preliminares de produção de H_2.	35
Tabela 4.2	Composição da solução de nutrientes para os ensaios de avaliação de diferentes métodos de pré-tratamento do inóculo.	37
Tabela 4.3	Composição do meio reacional.	37
Tabela 4.4	Composição do meio reacional para os ensaios de avaliação de diferentes substratos para produção de H_2.	38
Tabela 4.5	*Primers* utilizados na reação em cadeia de polimerase (PCR).	41
Tabela 4.6	Componentes da PCR.	42
Tabela 5.1	Analitos determinados através da metodologia proposta.	52
Tabela 5.2	Resultados estatísticos obtidos no cálculo do parâmetro seletividade.	55
Tabela 5.3	Valores de RSD (%) obtidos no estudo do parâmetro de repetibilidade.	56
Tabela 5.4	Valores de RSD (%) obtidos no estudo do parâmetro de precisão intermediária.	57
Tabela 5.5	Porcentagem de recuperação para os carboidratos e ácidos orgânicos voláteis estudados.	59

Tabela 5.6 Resultados do estudo para determinação do LOD e LOQ. 61

Tabela 5.7 Resultados de robustez de amostras anaeróbias fermentativas em relação à porcentagem de recuperação. 63

Tabela 5.8 Resultados da análise de variância (ANOVA) para o planejamento fatorial completo 3^3. 64

Tabela 5.9 Concentração dos metabólitos formados após 24 h de fermentação utilizando inóculo *in natura* e inóculo pré-tratado termicamente. 66

Tabela 5.10 Comparativo entre estudos de métodos de pré-tratamento de inóculo para produção de H_2 fermentativo. 74

Tabela 5.11 Concentração dos metabólitos formados durante 120 h de fermentação utilizando inóculo *in natura* e inóculos com pré-tratamento (térmico alcalino e ácido). 76

Tabela 5.12 Diferentes substratos utilizados para produção de H_2 fermentativo a partir de culturas mistas. 88

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

ABREVIATURAS

HAc	Ácido acético
HBu	Ácido butírico
DNA	Ácido desoxirribonucléico
HIb	Ácido isobutírico
HPr	Ácido propiônico
RNA	Ácido ribonucléico
AOV	Ácidos orgânicos voláteis
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ANOVA	Análise de Variância
BNR	Bactérias nitrato-redutoras
BSR	Bactérias sulfato-redutoras
$BioH_2$	Biohidrogênio
CG	Cromatografia gasosa
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
CEDAE	Companhia Estadual de Águas e Esgotos
DQO	Demanda química de oxigênio
cDNA	DNA complementar
TCD	Detector de condutividade térmica
IR	Detector de índice de refração
FID	Detector de ionização em chama
UV	Detector UV visível
DGGE	Eletroforese em gel de gradiente desnaturante
ETE	Estação de tratamento de esgoto
Etanol 1G	Etanol de Primeira Geração
Etanol 2G	Etanol de Segunda Geração
Hyd	Gene hidrogenase
H_2	Hidrogênio
LOD	Limite de detecção
LOQ	Limite de quantificação
NADH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo

pb	Pares de base
PFV	Polifluoreto de vinila
HAc/HBu	Razão ácido acético e ácido butírico
PCR	Reação em cadeia de polimerase
CSTR	Reator de tanque agitado contínuo
SSV	Sólidos suspensos voláteis
TRH	Tempo de retenção hidráulico
ATP	Trifosfato de adenosina

SÍMBOLOS

A_{a+s}	Área do analito mais a do padrão adicionado
A_s	Área do padrão
r	Coeficiente de correlação
s	Desvio padrão
RSD	Desvio padrão relativo
ΔG^0	Energia livre de Gibbs
$\bar{x}$	Média
R%	Porcentagem de recuperação
P_{H2}	Pressão parcial de hidrogênio
t_R	Tempo de retenção

SUMÁRIO

RESUMO i
ABSTRACT ii
LISTA DE FIGURAS iii
LISTA DE TABELAS viii
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS x

1. INTRODUÇÃO 1
2. OBJETIVOS 4
2.1. Objetivo geral 5
2.2. Objetivos específicos 5
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA 6
3.1. Hidrogênio como fonte alternativa de energia 7
3.2. Produção biológica de H_2 9
3.3. Aspectos gerais da fermentação anaeróbia 12
3.3.1. Fatores que influenciam no processo fermentativo 13
3.3.1.1. Inóculo 14
3.3.1.1.1. Culturas puras 14
3.3.1.1.2. Culturas mistas 14
3.3.1.2. Substrato 17
3.3.1.2.1. Materiais lignocelulósicos 18
3.3.1.2.2. Glicerina 21
3.3.1.3. Temperatura 23
3.3.1.4. pH 23
3.3.1.5. Modo operacional do reator 25
3.3.1.6. Pressão parcial de hidrogênio 26
3.3.2. Enzimas hidrogenases no processo de produção de H_2 fermentativo 30
3.3.2.1. Ferramentas moleculares no estudo da expressão do gene hidrogenase de *Clostridium* 30
4. MATERIAIS E MÉTODOS 33

4.1. Inóculo 34
4.2. Ensaios para produção biológica de H_2 34
4.2.1. Ensaios preliminares 34
4.2.2. Ensaios para avaliação do pré-tratamento do inóculo 36
4.2.2.1. Pré-tratamento do inóculo 36
4.2.2.2. Meio reacional 36
4.2.3. Ensaios para avaliação de diferentes substratos 38
4.3. Análises microbiológicas 39
4.3.1. Extração do DNA do pool bacteriano 39
4.3.2. Extração do RNA do pool bacteriano 40
4.3.3. Reação em cadeia da polimerase (PCR) 41
4.3.4. RT-PCR em tempo real 43
4.3.4.1. Síntese do cDNA 43
4.3.4.2. PCR em tempo real 43
4.3.5. Contagem de bactérias anaeróbias 44
4.4. Análises cromatográficas 44
4.4.1. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) 44
4.4.2. Cromatografia Gasosa (CG) 46
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO 48
5.1. Desenvolvimento e validação de metodologia para análise de carboidratos e ácidos orgânicos voláteis por CLAE, para monitoramento da produção de H_2 por via fermentativa 49
5.1.1. Estudo preliminar das condições cromatográficas 50
5.1.2. Procedimentos de validação 54
5.1.2.1. Seletividade e linearidade 54
5.1.2.2. Precisão 55
5.1.2.3. Exatidão 57
5.1.2.4. Limite de detecção (LOD) e limite de quantificação (LOQ) 60
5.1.2.5. Robustez 62

5.2. Avaliação de alguns parâmetros como ferramentas úteis no estudo das comunidades bacterianas produtoras de H_2 65
5.3. Avaliação de diferentes pré-tratamentos do inóculo para produção de H_2 70
5.4. Avaliação de diferentes substratos para produção de H_2 79
6. CONCLUSÕES 89
7. TRABALHOS FUTUROS 91
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 93
9. ANEXOS 106

Capítulo 1: Introdução

1. INTRODUÇÃO

O aumento das necessidades energéticas mundiais, a diminuição das reservas de combustíveis fósseis e os problemas ambientais relacionados ao uso contínuo destes combustíveis, definem o novo panorama para o século XXI e determinam que novas políticas referentes a fontes de energia sejam adotadas [HALLENBECK e GHOSH, 2009]. O alarmante crescimento pela procura de energia, associado à incerteza quanto à disponibilidade e preço do petróleo, conduzem à adoção de práticas para o desenvolvimento e exploração de novos recursos energéticos.

Assegurar a geração de energia, com as devidas precauções em relação ao meio ambiente, tem sido um dos desafios atuais mais relevantes. O debate sobre o aquecimento global vem crescendo de forma acentuada nas últimas décadas, conduzindo assim, ao desenvolvimento de novas fontes alternativas de energia que sejam menos poluentes que as atuais. É neste contexto que a produção de hidrogênio surge como uma alternativa de grande interesse. O hidrogênio pode ser produzido a partir de combustíveis fósseis, água e biomassa [SOUZA*,* 2009].

O desenvolvimento de tecnologias para produção biológica de hidrogênio a partir de biomassa consiste em uma área bastante promissora. O hidrogênio biológico pode ser produzido através dos seguintes processos: biofotólise direta da água, biofotólise indireta da água, foto-fermentação, fermentação anaeróbia e através de sistemas híbridos [KIRTAY, 2011; DAS e VEZIROGLU, 2008]. Dentre estes sistemas, a produção de hidrogênio por fermentação anaeróbia tem se destacado, devido principalmente à maior produção de H_2 quando comparada aos outros processos biológicos e a possibilidade de utilização de diferentes materiais residuais como substrato [MATHEWS e WANG, 2009; LEVIN, PITT e LOVE*,* 2004].

Durante a fermentação anaeróbia, substratos ricos em matéria orgânica são convertidos em compostos mais simples, tais como ácidos orgânicos voláteis (ácidos acético, propiônico, butírico e isobutírico), alcoóis, H_2 e CO_2. A identificação dos ácidos orgânicos voláteis e dos alcoóis formados durante o processo de fermentação anaeróbia revela informações importantes sobre o caminho metabólico seguido pelos micro-organismos. Além disso, a razão entre o ácido acético (HAc) e o ácido butírico (HBu) pode ser relacionada à produção de H_2 [DE SÁ *et al.,* 2011].

Estudos na literatura mostram que micro-organismos do gênero *Clostridium* são os principais responsáveis pela produção de H_2 no processo de fermentação anaeróbia [SKONIECZNY e YARGEU, 2009; TOLVANEN *et al.,* 2008; HUNG *et al.,* 2008]. Estes micro-organismos dispõem de enzimas hidrogenases que catalisam a reação reversível de oxidação do hidrogênio ($2H^+ + 2e^- \leftrightarrow H_2$) [VIGNAIS, BILLOUD e MEYER, 2001].

Recentemente o nível de expressão das hidrogenases tem sido utilizado como indicador da produção de H_2 em diferentes sistemas [CHANG *et al.,* 2008; WANG, OLSON e CHANG, 2008a; CHANG *et al.,* 2006]. As [FeFe]-hidrogenases normalmente ocorrem em micro-organismos produtores de H_2, enquanto as [NiFe] e [NiFeSe]-hidrogenases são frequentemente encontradas em micro-organismos consumidores de H_2 [DAS *et al.,* 2006].

No processo de fermentação anaeróbia, os micro-organismos responsáveis pelo possível consumo do H_2 são representados pelas arqueias metanogênicas, as bactérias homoacetogênicas e as bactérias redutoras de sulfato e nitrato [NTAIKOU, ANTONOPOULOU e LYBERATOS, 2010]. O pré-tratamento do inóculo tem sido comumente empregado no processo de produção de H_2, visto que ele possui a finalidade de inibir e/ou eliminar os micro-organismos consumidores de H_2, bem como selecionar os micro-organismos produtores de H_2. Vários tipos de pré-tratamentos são utilizados, tais como os químicos (ácido, alcalino, adição de compostos químicos) e os físicos (térmico, congelamento/descongelamento, aeração). Dentre eles, o pré-tratamento térmico do inóculo tem sido o mais comumente utilizado para enriquecimento das bactérias produtoras de H_2 [DE SÁ *et al.,* 2011].

Uma grande variedade de materiais ricos em matéria orgânica pode ser utilizada como substratos na produção de H_2. Carboidratos, como sacarose e glicose, são facilmente biodegradáveis pelas bactérias fermentativas. No entanto, fontes puras de carboidratos representam matérias-primas caras para produção de H_2 em grande escala. Neste contexto se destaca a utilização de materiais residuais como potenciais substratos para produção de H_2. A biotransformação de resíduos em hidrogênio pode ser considerada bastante atraente do ponto de vista ambiental e econômico [NTAIKOU, ANTONOPOULOU e LYBERATOS, 2010; DAS e VEZIROGLU, 2008].

Capítulo 2: Objetivos

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

O objetivo principal deste trabalho foi à avaliação da produção de hidrogênio através do processo de fermentação anaeróbia em reatores de batelada.

2.2. Objetivos específicos

Os objetivos específicos deste trabalho foram:

- Desenvolver metodologia analítica por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) para monitoramento de carboidratos, ácidos orgânicos e alcoóis durante o processo de fermentação anaeróbia;
- Avaliar a eficiência de diferentes tipos de pré-tratamentos do inóculo para produção de H_2;
- Verificar a relação entre o nível de expressão das hidrogenases e a produção de H_2;
- Estudar a produção de H_2 utilizando sacarose, glicose, frutose, xilose e glicerina como substrato.

Capítulo 3: Revisão Bibliográfica

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. Hidrogênio como fonte alternativa de energia

Atualmente, as intensas mudanças climáticas globais e o fornecimento futuro de energia têm estimulado o desenvolvimento de pesquisas baseadas em combustíveis alternativos. Dentro deste contexto, o hidrogênio (H_2) tem despertado grande interesse, visto que a sua combustão direta produz uma quantidade significativa de energia e libera apenas H_2O ($H_2 + 1/2 O_2 \rightarrow H_2O$) [MATHEWS e WANG, 2009; KOTAY e DAS, 2008]. Além disso, o hidrogênio apresenta uma elevada densidade energética (da ordem de 143 $KJ.g^{-1}$), sendo aproximadamente três vezes superior quando comparada aos combustíveis à base de hidrocarbonetos pesados [BALAT e KIRTAY, 2010]. O H_2 pode ser utilizado diretamente como combustível em motores de combustão ou em células a combustível [DAS e VEZIROGLU, 2008; KOTAY e DAS, 2008]. Além do mais, os processos de produção de H_2 a partir de matérias-primas renováveis ou não-renováveis permitem certa flexibilidade em relação à tecnologia, tornando-o uma promissora alternativa energética [PAGE e KRUMDIECK, 2009].

A maior utilização do hidrogênio hoje é como reagente das indústrias químicas e petroquímicas para a produção de fertilizantes (com uma quota de 50%) seguida pelo tratamento do petróleo bruto (aproximadamente 37%) [DAS e VEZIROGLU, 2008; KOTAY e DAS, 2008]. Além destes processos, o H_2 é também utilizado como reagente nos processos de hidrogenação, como combustível para motores de foguete e como fluido de refrigeração em geradores elétricos [DAS e VEZIROGLU, 2001].

Atualmente, os métodos de produção de hidrogênio podem ser divididos em função das três principais matérias-primas utilizadas: combustíveis fósseis, água e biomassa. Alguns dos processos mais significativos estão citados na Tabela 3.1 [SOUZA, 2009].

Tabela 3.1: Métodos de produção de hidrogênio [SOUZA, 2009].

Matérias-primas	Métodos
Combustíveis fósseis	Reforma a vapor do gás natural Oxidação parcial de hidrocarbonetos pesados Gaseificação do carvão
Água	Eletrólise da água Processos foto-eletroquímicos Processos termoquímicos
Biomassa	Processos biológicos (biofotólise da água, foto-fermentação e fermentação anaeróbia) Gaseificação da biomassa Reforma a vapor do etanol Reforma em fase líquida

Entre os métodos citados, estima-se que a reforma do gás natural contribui com 40% do hidrogênio produzido, seguido pela oxidação de hidrocarbonetos pesados (30%), gaseificação do carvão (18%) e eletrólise da água (5%) [DAS e VEZIROGLU, 2008]. Atualmente a produção biológica do hidrogênio contribui com apenas 1% no percentual de produção de H_2 (Figura 3.1). No entanto, espera-se que esta porcentagem cresça exponencialmente com o desenvolvimento de novas técnicas e processos [NEVES, 2009].

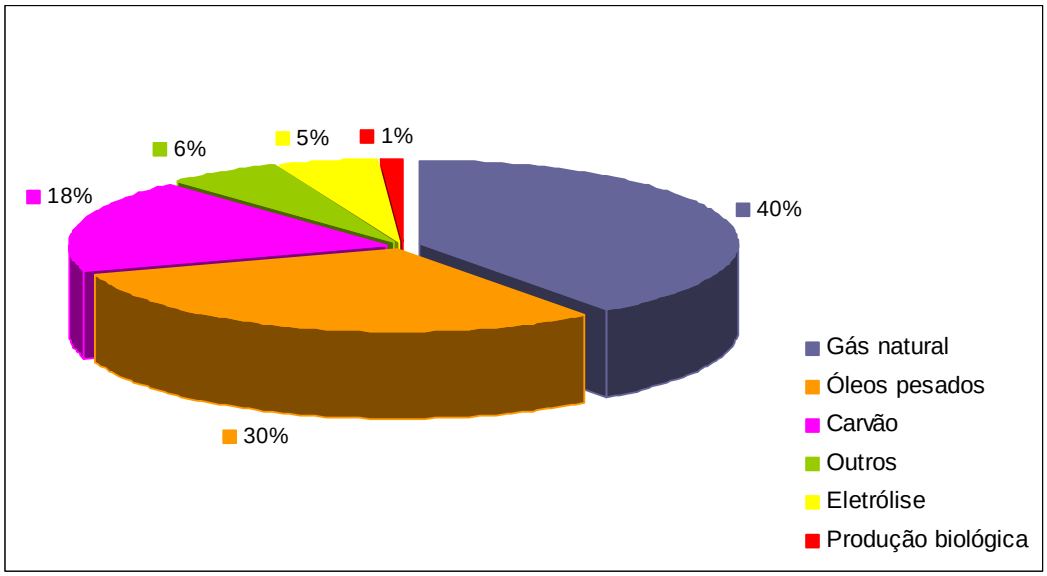

Figura 3.1: Percentual de produção de H_2 a partir de algumas fontes energéticas [NEVES, 2009].

O desenvolvimento de tecnologias para produção biológica de hidrogênio é uma área bastante promissora. Os processos de obtenção de hidrogênio por via microbiana vêm ganhando grande destaque devido à possibilidade de utilização de fontes renováveis de energia, bem como o reaproveitamento de materiais residuais, diminuindo assim a quantidade de subprodutos gerados nas indústrias. Além disso, estes processos são adequados para produção descentralizada de energia em instalações de pequena escala, em locais onde a biomassa ou os resíduos estão disponíveis, evitando assim custos adicionais com o transporte [KOTAY e DAS, 2008]. Os processos biológicos são geralmente operados à temperatura e pressão ambientes, levando assim a um menor consumo de energia e a balanços energéticos favoráveis [BALAT e KIRTAY, 2010; DAS e VEZIROGLU, 2001].

3.2. Produção biológica de H_2

O hidrogênio biológico, também conhecido como biohidrogênio, pode ser produzido através dos seguintes processos: biofotólise direta da água utilizando algas verdes, biofotólise indireta da água através das cianobactérias, foto-fermentação de compostos orgânicos por meio de bactérias fotossintéticas, fermentação anaeróbia de compostos orgânicos através de bactérias fermentativas e sistemas híbridos utilizando bactérias fotossintéticas e fermentativas [KIRTAY, 2011; DAS e VEZIROGLU, 2008].

A biofotólise direta da água está associada à ação da energia luminosa sobre um sistema biológico, resultando na decomposição da água e produção de hidrogênio, geralmente realizada por algas verdes sob condições anaeróbias. A biofotólise indireta envolve tipicamente cianobactérias que utilizam a energia armazenada nos carboidratos oriundos da fotossíntese para gerar hidrogênio a partir da água. A foto-fermentação é realizada por bactérias púrpuras não sulfurosas que utilizam a energia luminosa para transformar ácidos orgânicos em H_2 e CO_2. Finalmente, o processo de fermentação anaeróbia, envolve bactérias anaeróbias que convertem os carboidratos em hidrogênio. Todos os processos citados acima podem ser combinados de forma a expandir as possibilidades tecnológicas de produção do biohidrogênio [LIU *et al.,* 2010; ARGUN e KARGI, 2010; OZGUR *et al.,* 2010; ARGUN, KARGI e KAPDAN*,* 2009]. A Tabela 3.2 apresenta as principais vantagens e desvantagens dos processos biológicos de produção de H_2, bem como

os micro-organismos mais estudados até o presente trabalho [KIRTAY, 2011; BRENTNER, PECCIA e ZIMMERMAN, 2010; DAS e VEZIROGLU, 2001].

Dentre os sistemas apresentados na Tabela 3.2, a produção de hidrogênio por fermentação anaeróbia tem despertado grande interesse, devido principalmente a uma maior produção de H_2 quando comparado aos outros processos biológicos [MATHEWS e WANG, 2009; LEVIN, PITT e LOVE, 2004; HALLENBECK e BENEMANN, 2002]. A produção de H_2 por meio de bactérias fermentativas permite a geração de hidrogênio de modo contínuo e em ritmo sustentado, uma vez que não há inibição pela ausência de iluminação. Além disso, os micro-organismos fermentativos são mais eficazes na produção de H_2 em um curto intervalo de tempo, quando comparados aos micro-organismos responsáveis pelos processos foto-biológicos [DAS e VEZIROGLU, 2008]. Metabólitos intermediários de grande valor agregado são gerados durante o metabolismo das bactérias fermentativas [DAS e VEZIROGLU, 2001]. O processo fermentativo permite ainda a utilização de diferentes tipos de resíduos como substrato, tais como, materiais lignocelulósicos, glicerina, resíduos alimentícios e lácteos, entre outros [CHONG *et al.,* 2009]. Nesta perspectiva, a produção de H_2 via fermentação anaeróbia apresenta-se como uma alternativa economicamente interessante e ambientalmente correta [DAS e VEZIROGLU, 2001].

Tabela 3.2: Vantagens e desvantagens dos processos biológicos e principais micro-organismos estudados para produção de biohidrogênio.

Processos biológicos	Vantagens	Desvantagens	Micro-organismos	Referências
Biofotólise direta	Produção de H_2 a partir da água; Não necessita de ATP.	Necessita de iluminação constante; Inibição das hidrogenases pelo O_2; Biorreatores modificados para maximizar a utilização da energia solar.	*Chlamydomonas reinhardii* *Platymonas subcordiformis*	KIM *et al.,* 2010 RAN *et al.,* 2009
Biofotólise indireta	Produção de H_2 a partir da água; Habilidade de fixação de N_2 e produção de H_2 pelas nitrogenases; Separação espacial do O_2 e H_2 nas células diferenciadas (heterocistos); Separação temporal (dia/noite) em células não-heterocísticas.	Necessita de iluminação constante; Biorreatores modificados para maximizar a utilização da energia solar; Necessidade de ATP pelas nitrogenases; Síntese e manutenção dos heterocistos; CO_2 presente no gás.	*Plectonema boryanum* *Anabaena siamensis* *Anabaena variabilis* *Synechocystis sp.* *Cyanothece sp.* *Nostoc sp.*	HUESEMANN *et al.,* 2010; KHETKORN *et al.,* 2010 BERBEROGLU *et al.,* 2008 NAVARRO *et al.,* 2009 MIN e SHERMAN, 2010 YOSHINO *et al.,* 2007
Foto-fermentação	Utilização de diferentes resíduos e efluentes como substrato; Utilização de amplo espectro de luz pelas bactérias fotossintéticas.	Necessita de iluminação; Biorreatores modificados para maximizar a utilização da energia solar; CO_2 presente no gás.	*Rhodopseudomonas palustris* *Rhodobacter sp.* *Rhodobacter sphaeroides* *Rhodobacter capsulatus*	SUWANSAARD *et al.,* 2010 KAWAGOSHI *et al.,* 2010 ZHU *et al.,* 2010 OBEID *et al.,* 2010
Fermentação anaeróbia	Ampla variedade de fontes de carbono como substrato; Não necessita de iluminação; Produção de metabólitos intermediários de grande valor agregado; Não há limitações com relação ao O_2.	Tratamento do efluente após fermentação; CO_2 presente no gás.	*Clostridium sp.* *Clostridium butyricum* *Clostridium beijerinckii* *Citrobacter freundii* *Enterobacter cloacae* *Enterobacter aerogenes* *Escherichia coli* *Klebsiella pneumoniae*	KAMALASKAR *et al.,* 2010 TAI *et al.,* 2010 SKONIECZNY e YARGEAU, 2009 BECKERS *et al.,* 2010 MANDAL *et al.,* 2006 JAYASINGHEARACHCHI *et al.,* 2009 GHOSH e HALLENBECK, 2009 NIU *et al.,* 2010

3.3. Aspectos gerais da fermentação anaeróbia

A fermentação anaeróbia consiste em um processo biológico no qual um consórcio de diferentes tipos de micro-organismos, na ausência de oxigênio molecular, promove a transformação de compostos orgânicos complexos (carboidratos, proteínas e lipídios) em produtos mais simples, tais como ácidos orgânicos voláteis (ácidos acético, propiônico, isobutírico e butírico), alcoóis (etanol, butanol), hidrogênio, dióxido de carbono e metano [CAMPOS, 1999].

O processo fermentativo é desenvolvido em quatro principais etapas: hidrólise, acidogênese, acetogênese e metanogênese. Uma representação esquemática das principais etapas do processo fermentativo anaeróbio está demonstrada na Figura 3.2.

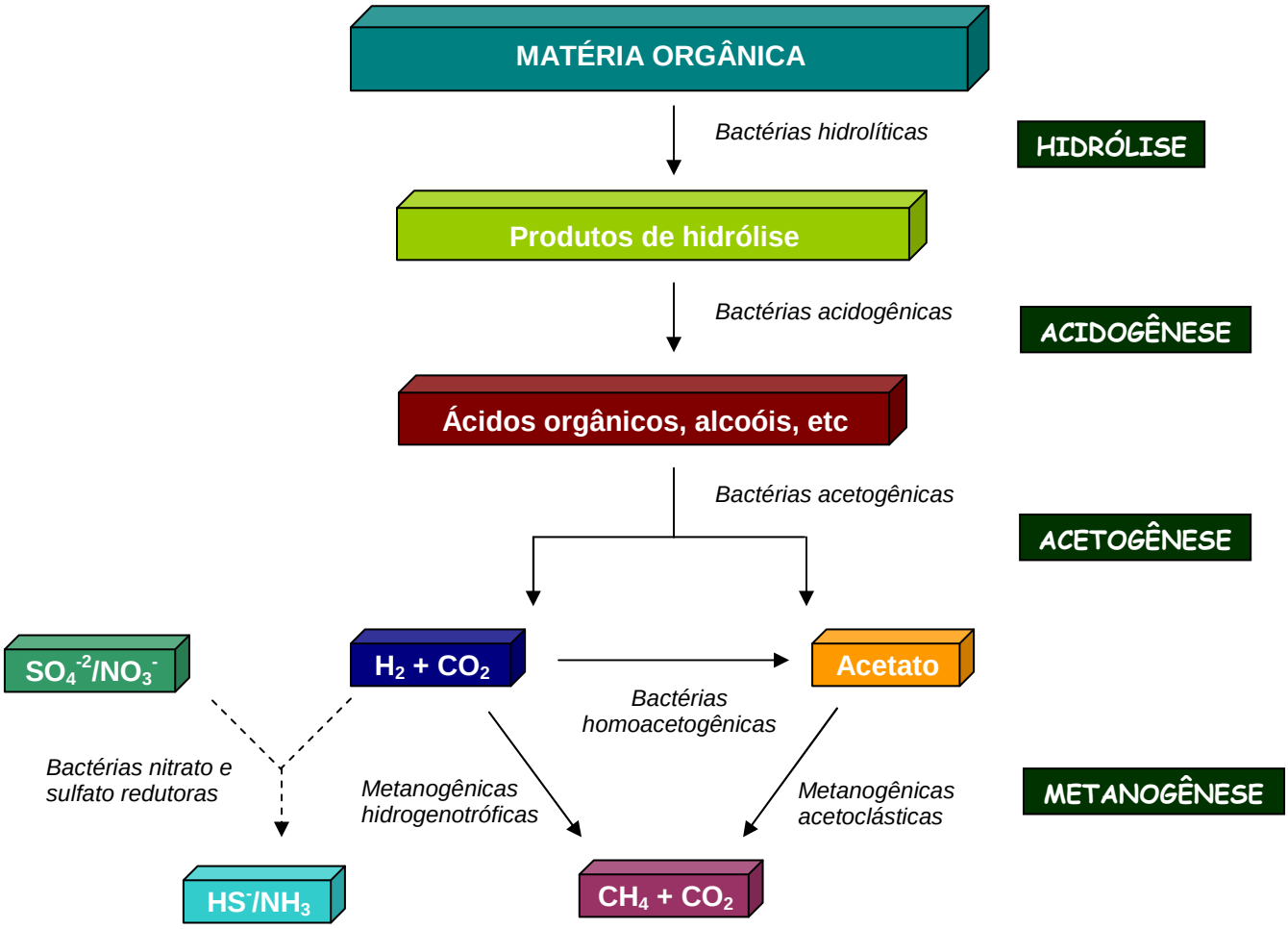

Figura 3.2: Representação esquemática das principais etapas do processo fermentativo anaeróbio [Adaptado de GUO *et al.*, 2010].

A degradação da matéria orgânica em ambientes anaeróbios envolve a cooperação de uma população de diferentes micro-organismos responsáveis por uma fermentação estável e de auto-regulação [VALDEZ-VASQUEZ e POGGI-VARALDO, 2009; STERLING *et al.,* 2001].

Na primeira fase do processo fermentativo, as bactérias hidrolíticas produzem enzimas extracelulares que promovem a degradação dos materiais particulados complexos em materiais dissolvidos mais simples, os quais são permeáveis às membranas celulares das bactérias fermentativas. Na fase acidogênica, os produtos solúveis oriundos da etapa anterior são metabolizados no interior das células das bactérias, sendo convertidos em compostos mais simples. Os compostos produzidos incluem ácidos orgânicos voláteis, alcoóis, CO_2, H_2, além de novas células bacterianas. As bactérias acetogênicas são responsáveis pela oxidação dos produtos gerados na fase acidogênica em substrato apropriado (H_2 e ácido acético) para as arqueias metanogênicas. Nesta etapa do processo, o H_2 pode também ser convertido em ácido acético pelas bactérias homoacetogênicas. Na última etapa do processo, as arqueias metanogênicas convertem o H_2 e o ácido acético em metano e dióxido de carbono. Em função de sua afinidade pelo substrato, as arqueias metanogênicas podem ser divididas em metanogênicas acetoclásticas (arqueias que utilizam o ácido acético como substrato) e metanogênicas hidrogenotróficas (arqueias que utilizam o hidrogênio como substrato). Na presença de sulfato e nitrato no meio fermentativo, as bactérias nitrato-redutoras (BNR) e as bactérias sulfato-redutoras (BSR) são capazes de utilizar o H_2 com formação de sulfeto e amônia [CHERNICARO, 2007; STERLING *et al.,* 2001; SPEECE, 1996].

3.3.1. Fatores que influenciam o processo fermentativo

A produção de hidrogênio por fermentação anaeróbia depende de uma série de condições e parâmetros operacionais e físico-químicos que influenciam o processo, destacando-se o tipo de inóculo e substrato, temperatura, pH, modo operacional do reator e pressão parcial de hidrogênio [NTAIKOU, ANTONOPOULOU e LYBERATOS*,* 2010; WANG e WAN, 2009].

3.3.1.1. Inóculo

A produção de hidrogênio biológico pode ser realizada através de culturas microbianas mistas derivadas de ambientes naturais ou através de culturas puras selecionadas a partir de bactérias produtoras de H_2.

3.3.1.1.1. Culturas puras

Diferentes linhagens bacterianas têm sido utilizadas para produzir H_2 a partir de diferentes substratos. As vantagens na utilização de culturas puras estão relacionadas à seletividade do substrato, a fácil manipulação do metabolismo através da alteração das condições de crescimento, aos elevados rendimentos de H_2 e a redução de subprodutos. Por outro lado, culturas puras são sensíveis a contaminações, o que demanda, na maioria dos casos, o emprego de condições assépticas, o que implica no aumento do custo global do processo [NTAIKOU, ANTONOPOULOU e LYBERATOS*,* 2010].

Diversos tipos de micro-organismos têm sido utilizados para produção de H_2 via processo fermentativo. Dentre eles, se destacam as espécies pertencentes ao gênero *Clostridium,* devido ao seu rápido metabolismo e sua capacidade de formar esporos frente a condições adversas. *Bacillus*, *Enterobacter* e *Thermoanaerobacterium* sp. também têm sido relatados como potenciais produtores de H_2 [KRAEMER e BAGLEY, 2007].

3.3.1.1.2. Culturas mistas

A utilização de culturas mistas para processos em grande escala é considerada favorável devido ao controle e à operação do processo ser facilitada pela utilização de meios não estéreis, reduzindo deste modo o custo global [NTAIKOU, ANTONOPOULOU e LYBERATOS*,* 2010]. A redução do custo pode ser ainda enfatizada quando empregadas culturas mistas a partir de fontes naturais, tais como solo [LOGAN *et al.,* 2002], lodo de esgoto [CHEN, LIN e LIN*,* 2002], excreta de animais [LAY *et al.,* 2003] e compostos [MORIMOTO *et al.,* 2004] ou através de certos resíduos [ANTONOPOULOU *et al.,* 2008].

A desvantagem na utilização de culturas mistas em termos da viabilidade econômica do processo de produção de H_2 está relacionada à presença, sempre provável, de micro-organismos consumidores de H_2, tais como as arqueias metanogênicas, as bactérias homoacetogênicas e as bactérias sulfato e nitrato redutoras [NTAIKOU, ANTONOPOULOU e LYBERATOS, 2010]. A estratégia para minimizar este efeito consiste no pré-tratamento do inóculo, que possui a finalidade de inibir e/ou eliminar os micro-organismos consumidores de H_2, bem como selecionar os micro-organismos produtores de H_2.

Vários tipos de pré-tratamentos de inóculos têm sido utilizados, tais como os químicos (ácido, alcalino, adição de compostos químicos) e os físicos (térmico, congelamento/descongelamento, aeração). A Tabela 3.3 apresenta alguns pré-tratamentos de inóculos utilizados para maximizar a produção de hidrogênio.

Tabela 3.3: Diferentes tipos de pré-tratamentos de inóculos para maximização da produção de H_2.

Inóculo	Pré-tratamentos do inóculo estudados	Substrato	Pré-tratamento ótimo	Referências
Lodo de esgoto	Térmico, aeração, ácido, alcalino, adição de ácido 2-bromoetanolsulfônico e iodopropano	Sacarose	Alcalino	ZHU e BÉLAND, 2006
Lodo anaeróbio digerido	Alcalino, ácido, adição de ácido 2-bromoetanolsulfônico, choque de carga e térmico	Efluente de óleo de palma	Choque de carga	O-THONG, PRASERTAN e BIRKELAND, 2009
Esterco bovino	Congelamento/descongelamento, ácido, térmico e adição de 2-bromoetanosulfonato de sódio	Glicose	Ácido	CHEONG e HANSEN, 2006
Lodo digerido	Ácido, alcalino, térmico, aeração e adição de clorofórmio	Glicose	Térmico	WANG e WAN, 2008

Como pode ser observado na Tabela 3.3, existem muitas diferenças em relação ao pré-tratamento ótimo para enriquecimento das bactérias produtoras de H_2 a partir de culturas mistas. Esta discordância está relacionada aos diferentes estudos realizados, em termos do tipo e origem do inóculo utilizado, condições do pré-tratamento e tipo de substrato [WANG e WAN, 2009].

O pré-tratamento térmico do inóculo tem sido o mais comumente utilizado para enriquecimento das bactérias produtoras de H_2. Sob elevadas temperaturas, somente os micro-organismos acidogênicos formadores de esporo sobrevivem ao choque térmico, enquanto os micro-organismos não formadores de esporo são eliminados ou inibidos. Diferentes temperaturas têm sido utilizadas durante o pré-tratamento térmico, em uma faixa de 75 a 100^0C. A variação do tempo durante o pré-tratamento térmico também tem variado de 15 minutos a 2 horas [VALDEZ-VAZQUEZ e POGGI-VARALDO, 2009; ZHU e BÉLAND, 2006].

As arqueias metanogênicas, que constituem os principais micro-organismos consumidores de H_2 na maioria dos ambientes anaeróbios, não possuem a capacidade de esporular, portanto, elas não sobrevivem sob condições térmicas extremas [VIJAYARAGHAVAN e AHMAD, 2006; STERLING *et al.,* 2001]. O pH também constitui um fator que influencia na atividade das metanogênicas no meio fermentativo, visto que a maioria destes micro-organismos crescem somente na faixa de pH de 6 a 8 [GUO *et al.,* 2010].

Oh e colaboradores (2003) observaram que o pré-tratamento térmico é capaz de prevenir a metanogênese, no entanto, não inibe o consumo do H_2 pelas bactérias homoacetogênicas. Os autores justificaram a presença de homoacetogênicas no meio fermentativo pré-tratado, em virtude de algumas destas bactérias pertencerem ao gênero *Clostridium*, tais como, *C. aceticum* e *C. thermoautotrophicum*. Kim *et al.* (2006) observaram a presença de bactérias homoacetogênicas *Clostridium scatologenes*, em inóculo pré-tratado termicamente para produção de H_2. Outros estudos mostraram que a eliminação deste tipo de bactéria, pode ser realizada através da remoção de CO_2 do *headspace* [PARK *et al.,* 2005].

As bactérias que utilizam o nitrato ou o sulfato como aceptor de elétrons são mais eficientes em baixas concentrações de H_2 no meio (0,02 ppm). Além disso, estas bactérias só competem com as homoacetogênicas e com as metanogênicas na presença de nitrato e sulfato em excesso [WEJIMA *et al.,* 2002]. Valores de pH menores que 6 inibem consideravelmente a atividade das bactérias sulfato-redutoras [LIN e CHEN, 2006]. A Figura 3.3 apresenta um esquema das etapas do processo de fermentação anaeróbia e os grupos de micro-organismos que devem ser inibidos e/ou eliminados a fim de se obter maiores rendimentos de H_2.

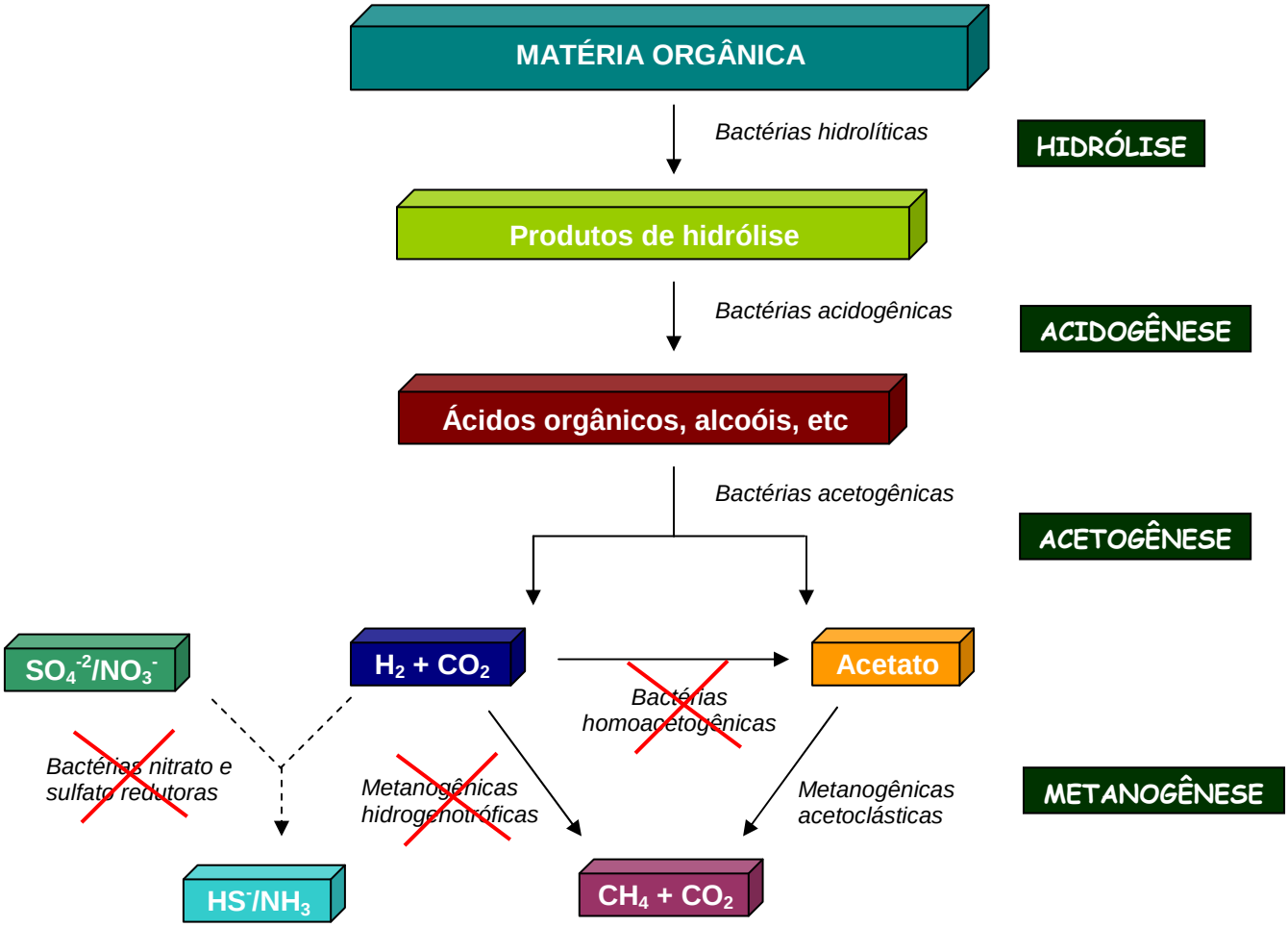

Figura 3.3: Representação esquemática das principais etapas do processo de fermentação anaeróbia e os grupos de micro-organismos que devem ser inibidos e/ou eliminados para se obter maiores rendimentos de H_2 [Adaptado de GUO *et al.*, 2010].

3.3.1.2. Substrato

Uma grande variedade de materiais ricos em carboidratos, lipídios e/ou proteínas podem ser utilizados como substratos na produção de H_2 por via biológica. No entanto, conforme descrito por inúmeros estudos, os carboidratos constituem a fonte preferida de carbono orgânico no processo fermentativo [GUO *et al.*, 2010; WANG e WAN, 2009]. Este fato fica evidenciado em um estudo realizado por Lay e colaboradores (2003), no qual foram utilizados substratos de diferentes composições químicas com a mesma cultura mista de micro-organismos. Os autores observaram que resíduos ricos em carboidratos possuem um potencial de produção de

hidrogênio 20 vezes maior quando comparado aos resíduos ricos em lipídios e proteínas.

Disponibilidade, custo e biodegradabilidade constituem os principais critérios para seleção de substratos adequados para a produção de hidrogênio fermentativo [HAWKES *et al.,* 2002]. Carboidratos simples, como sacarose e glicose são facilmente biodegradáveis, por esse motivo, são utilizados como substratos modelo para produção do biohidrogênio. No entanto, fontes puras de carboidratos representam matérias-primas caras para produção de H_2 em grande escala, sendo viáveis apenas quando baseadas em fontes renováveis e de baixo custo [NTAIKOU, ANTONOPOULOU e LYBERATOS*,* 2010; DAS e VEZIROGLU, 2008]. É neste contexto que se destaca a utilização de materiais residuais como potenciais substratos para produção de H_2. A biotransformação de resíduos em hidrogênio pode ser considerada bastante atraente do ponto de vista ambiental (energia renovável) e econômico (recuperação de recursos e gestão de resíduos com baixo custo total) [NTAIKOU, ANTONOPOULOU e LYBERATOS*,* 2010].

Inúmeros materiais residuais têm sido utilizados como substrato para as bactérias fermentativas na produção de H_2, tais como resíduos alimentícios industriais ou domésticos [SHIN, YOUN e KIM*,* 2004; YU *et al.,* 2002]; resíduos da indústria de papel [VALDEZ-VAZQUEZ *et al.,* 2005], resíduos lácteos [DAVILA-VAZQUEZ *et al.,* 2008] e resíduos de óleo de palma [VIJAYARAGHAVAN e AHMAD, 2006].

Dois outros materiais residuais tipicamente brasileiros merecem destaque com relação ao grande potencial de produção de H_2. São eles, os resíduos lignocelulósicos obtidos do processo de obtenção de etanol e a glicerina obtida do processo de produção do biodiesel.

3.3.1.2.1. Materiais lignocelulósicos

A biomassa lignocelulósica consiste em um material complexo e quimicamente rico, cuja estrutura é representada principalmente pela interação físico-química entre a celulose (polímero linear de glicose), a hemicelulose (heteropolímero de açúcar altamente ramificado) e a lignina (macromolécula aromática e de alta massa molecular) [FERREIRA-LEITÃO *et al.,* 2010a].

No processo convencional de produção de açúcar e etanol a partir da cana-de-açúcar (Etanol de Primeira Geração – Etanol 1G) são gerados resíduos de biomassa lignocelulósica, tais como o bagaço e a palha da cana-de-açúcar. Em 2008, o Brasil produziu 415 milhões de toneladas de resíduos de cana-de-açúcar, sendo 194 milhões de toneladas de bagaço e 220 milhões de toneladas de palha. Estima-se que 88% do bagaço tem sido utilizado para co-geração de energia no setor sucro-alcooleiro. Da produção anual de palha, cerca de 50% é deixada no campo, para evitar a erosão, para manutenção das propriedades agronômicas do solo e para preservação da microbiota do solo [FERREIRA-LEITÃO *et al.,* 2010a].

A utilização deste material lignocelulósico para produção de etanol de segunda geração (Etanol 2G) tem sido intensamente estudada. Se os 12% restantes do bagaço e 50% restantes da palha fossem disponibilizados para fabricação do etanol 2G, a quantidade de combustível produzido, considerando o teor de celulose da biomassa de 30%, seria significativo. De fato, como uma tonelada de cana-de-açúcar contém 340 kg de folhas (10% de umidade) e 300 Kg de bagaço (50% de umidade), seria possível produzir um superávit de 36,5 L de etanol além dos 80 L já produzidos a partir do caldo de cana (sacarose) [FERREIRA-LEITÃO *et al.,* 2010a].

O processo de produção do bioetanol a partir da biomassa lignocelulósica envolve as etapas de pré-tratamento do material lignocelulósico, hidrólise da celulose, fermentação de hexoses e destilação [SOCCOL *et al.,* 2010]. Considerando a associação do processo de produção 1G e 2G, a fração celulósica (maior conteúdo de hexoses) seria a opção mais imediata e outras utilizações para a fração hemicelulósica (pentoses) seriam necessárias. Neste contexto, abre-se espaço também para a produção de biohidrogênio. A Figura 3.4 mostra uma representação esquemática dos possíveis materiais residuais dos processos de produção de etanol 1G e etanol 2G para produção de biohidrogênio.

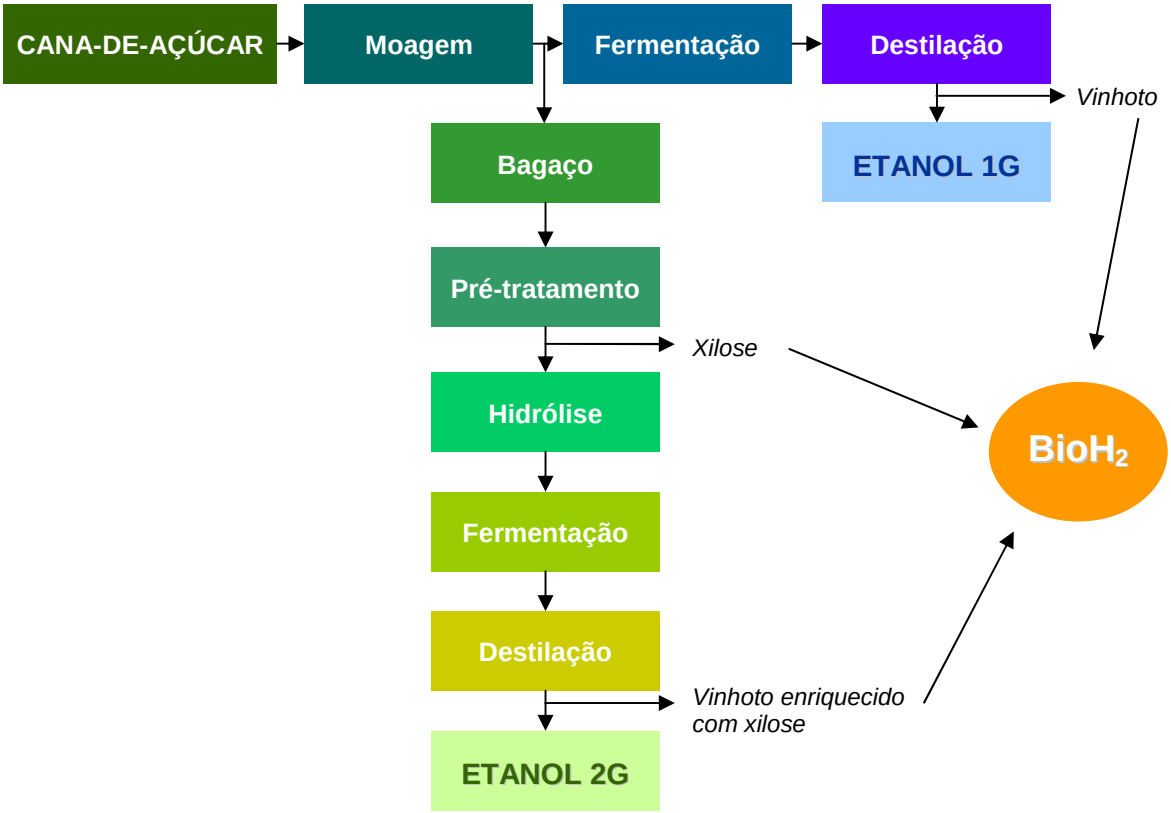

Figura 3.4: Possíveis materiais residuais dos processos de produção de etanol 1G e etanol 2G para produção de biohidrogênio.

Dependendo do tipo e das condições empregadas durante o pré-tratamento do material lignocelulósico, parte da fração hemicelulósica pode ser solubilizada e hidrolisada, liberando como principal componente a xilose [SILVA, 2009]. Ferreira-Leitão e colaboradores (2010b) obtiveram elevados rendimentos de xilose após pré-tratamento a vapor de bagaço de cana-de-açúcar utilizando CO_2 como agente impregnante.

A xilose produzida durante as etapas de processamento do material lignocelulósico, não é diretamente fermentável pelos micro-organismos da espécie *Saccharomyces cerevisiae*, levedura convencionalmente utilizada no processo fermentativo para produção de etanol. Deste modo, a grande proporção de xilose obtida da fração hemicelulósica tem despertado grande interesse nas mais diversas áreas da bioconversão. Entre os processos de bioconversão, a produção de H_2 a partir de xilose tem se destacado como amplamente viável devido à possibilidade de degradação deste carboidrato pelas bactérias fermentativas produtoras de H_2.

Eficientes rendimentos de H_2 têm sido obtidos com a utilização da xilose como substrato para as bactérias fermentativas. Lin e Cheng (2006) obtiveram rendimentos de H_2 de 1,92 a 2,25 mol de H_2/mol de xilose utilizando cultura mista e xilose como substrato na concentração de 20 $g.L^{-1}$.

3.3.1.2.2. Glicerina

A glicerina tem atraído grande atenção nos últimos anos, devido ao fato de ser um subproduto gerado no processo de produção de biodiesel. A Figura 3.5 mostra uma representação esquemática do processo de produção de biodiesel a partir da transesterificação de óleos vegetais ou gorduras animais com alcoóis (metanol ou etanol), utilizando catálise básica, com conseqüente obtenção da glicerina [RIVALDI *et al.,* 2009].

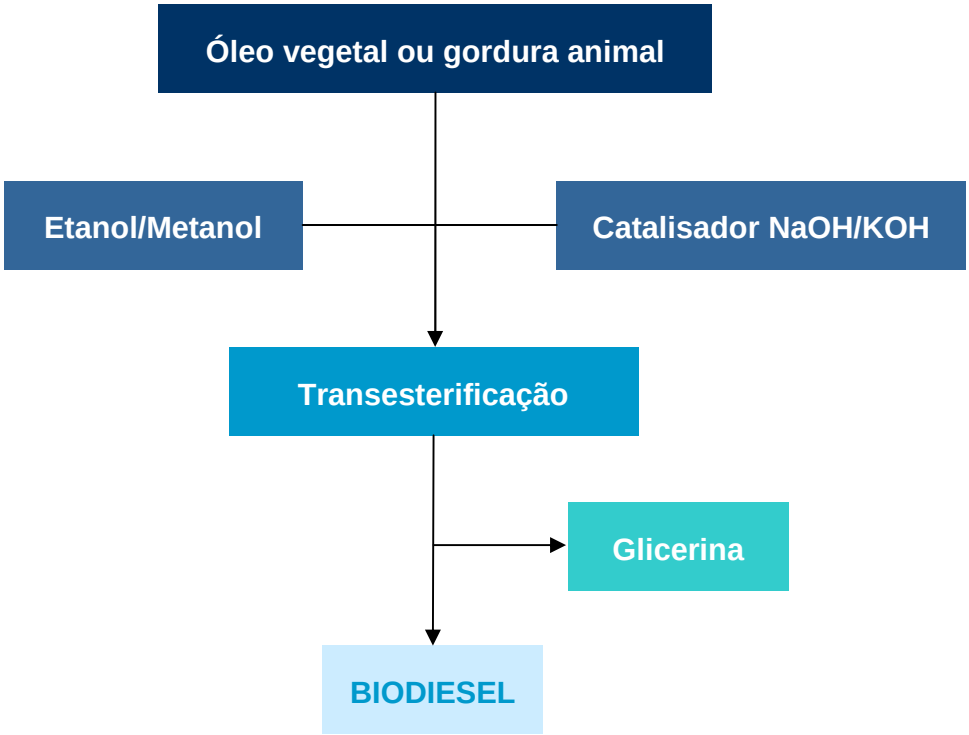

Figura 3.5: Produção de biodiesel e obtenção da glicerina como subproduto, a partir da transesterificação de óleos vegetais ou gorduras animais com alcoóis (metanol ou etanol), utilizando catálise básica [Adaptado RIVALDI *et al.,* 2009].

Em 2004, o Governo Federal instituiu o Programa Nacional de Produção e Uso do Biodiesel, o qual previa a adição deste biocombustível ao diesel fóssil. Em 2008, o diesel comercializado em todo território nacional passou a conter, obrigatoriamente, 3% de biodiesel (B3). Em 2010 houve o aumento deste percentual para 5% (B5). Se, por um lado, estas ações colocam o país na vanguarda do uso de combustíveis alternativos no planeta, elas também reforçam a necessidade de se encontrar utilizações para o subproduto gerado no processo, como a glicerina. Para cada 90 m^3 de biodiesel produzidos por transesterificação, são gerados, aproximadamente, 10 m^3 de glicerina [MOTA *et al.,* 2009].

Com o intuito de evitar futuros problemas derivados do acúmulo de glicerina e tornar a produção de biodiesel mais competitiva, torna-se necessário a busca de alternativas para o uso da glicerina gerada nesta produção. A utilização da glicerina como substrato para geração de biohidrogênio tem despertado grande interesse, visto que ela pode ser biodegradada por bactérias anaeróbias fermentativas.

Elevados rendimentos de H_2 têm sido obtidos em estudos que utilizam a glicerina como substrato para as bactérias fermentativas. Akutsu e colaboradores (2009) investigaram o efeito do pré-tratamento térmico do inóculo na produção de H_2 a partir de diferentes substratos (glicerina, amido, óleo e peptona). Os autores utilizaram uma cultura mista, na qual micro-organismos do gênero *Clostridium* eram predominantes. Os maiores rendimentos de H_2 foram obtidos para o amido e glicerina, 20,5-174,4 mL de H_2/ g DQO de amido e 11,5-38,1 mL de H_2/g DQO de glicerina, respectivamente.

Diferentemente das espécies do gênero *Clostridium*, outras espécies microbianas, tais como *Enterobacter aerogenes*, podem produzir maiores rendimentos de H_2 utilizando o glicerol como substrato em vez de carboidratos. Nakashimada *et al.* (2002) utilizaram *E. aerogenes* para produzir H_2 a partir de diferentes substratos: glicose, frutose, galactose, sorbitol, manitol, gluconato e glicerol. Os autores observaram que o maior rendimento de H_2 foi obtido quando o glicerol foi utilizado como substrato, e sugeriram que o elevado estado redox intracelular (elevada razão NADH/NAD) acelera a produção do H_2.

3.3.1.3. Temperatura

A temperatura é considerada como um dos principais fatores que interfere na produção do hidrogênio via fermentação anaeróbia.

As reações de fermentação podem ser conduzidas em temperaturas mesofílicas (25-40^{0}C), termofílicas (40-65^{0}C), termofílicas extremas (65-80^{0}C) e hipertermofílicas (> 80^{0}C) [LEVIN, PITT e LOVE, 2004]. A maioria dos estudos de produção de H_2 fermentativo tem utilizado a faixa de temperatura mesofílica. Li e colaboradores (2007a) reportam que 73 dos 121 estudos de caso foram realizados em temperaturas mesofílicas. A Tabela 3.4 apresenta alguns estudos que investigaram o efeito da temperatura no processo de produção do H_2 fermentativo.

Tabela 3.4: Efeito da temperatura na produção de H_2 fermentativo.

Inóculo	Substrato	Temperatura (^{0}C)		Referências
		Faixa estudada	Temperatura ótima	
Lodo de esgoto municipal	Xilose	30-55	50	LIN, WU e HUNG, 2008a
Lodo anaeróbio	Glicose	33-41	41	MU *et al.*, 2006a
Lodo anaeróbio	Sacarose	25-45	35	WANG, MU e YU, 2005
Ethanoligenens harbiense	Glicose	20-44	37	XING *et al.*, 2008
Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum	Sacarose	40-80	60	O-THONG *et al.*, 2008

A temperatura ótima para cada processo vai depender do tipo e origem do inóculo, da quantidade de compostos realmente biodegradáveis e das condições operacionais do sistema [GUO *et al.,* 2010].

3.3.1.4. pH

O pH constitui outro fator relevante que influencia fortemente no processo de produção de H_2 fermentativo.

Dois diferentes tipos de experimentos têm sido conduzidos para determinação do pH ótimo para produção de H_2. O primeiro envolve o ajuste de diferentes valores iniciais de pH, enquanto o outro envolve o controle e manutenção do mesmo pH durante todo o processo fermentativo. Rendimentos de H_2 utilizando o ajuste do pH inicial bem como a manutenção do pH controlado podem ser analisados na Tabela 3.5.

Tabela 3.5: Efeito do pH na produção de H_2 fermentativo.

Inóculo	Substrato	pH inicial		pH controlado		Referências
		Faixa estudada	pH ótimo	Faixa estudada	pH ótimo	
Lodo anaeróbio	Amido	5,0 - 7,0	5,0	-	-	LIN, CHANG e HUNG, 2008b
Clostridium butyricum	Sacarose	5,0 - 6,5	5,5	-	-	CHEN *et al.,* 2005
Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum	Sacarose	4,0 - 8,5	6,2	-	-	O-THONG *et al.,* 2008
Lodo de esgoto municipal	Xilose	5,0 - 8,0	6,5	-	-	LIN *et al.,* 2006
Cultura mista	Sacarose	-	-	3,4 - 6,3	4,2	MU *et al.,* 2006b
Lodo anaeróbio	Sacarose	-	-	4,7 - 6,3	5,5	WANG, MU E YU, 2005
Lodo anaeróbio	Glicose	-	-	4,0 - 7,0	5,5	FANG e LIU, 2002

Estudos mostram que o pH ótimo em termos de produção de H_2 se encontra na faixa de 5 a 7, sendo que o pH em torno de 5,5 tem sido relacionado aos melhores rendimentos de produção de H_2 [KHANAL *et al.,* 2004; GINKEL e SUNG, 2001]. O pH dentro da faixa supracitada favorece a atividade das enzimas envolvidas no processo de produção do H_2, bem como permite a inibição dos micro-organismos consumidores de H_2 presentes no meio fermentativo [VALDEZ-VAZQUEZ e POGGI-VARALDO, 2009; LI e FANG, 2007].

O pH afeta não somente o rendimento da produção de H_2 em culturas mistas, mas também modifica o espectro de subprodutos formados, bem como promove alterações nas comunidades bacterianas presentes no meio fermentativo [YE *et al.,* 2007; TEMUDO, KLEEREBEZEM e LOOSDRECHT*,* 2007]. Temudo e colaboradores (2008) estudaram o impacto do pH na atividade metabólica e na diversidade microbiana no processo fermentativo com glicose, xilose e glicerol a 30^0C. Os autores observaram que em pH baixo (< 6), os principais metabólitos formados consistiam dos ácidos butírico e acético; enquanto em elevados pH, o espectro de produtos formados mudava para ácido acético e etanol. Além disso, os autores observaram que em ambas as condições, pH baixo ou elevado, havia a predominância de espécies do gênero *Clostridium*, enquanto que valores intermediários de pH, havia uma maior diversidade microbiana no meio fermentativo.

3.3.1.5. Modo operacional do reator

A maioria dos estudos relacionados à produção de H_2 por via fermentativa anaeróbia tem sido conduzida em batelada. Reatores em batelada possuem a vantagem de serem simples, flexíveis e facilmente operados. No entanto, operações em grande escala requerem processos de produção contínuos por razões práticas de armazenamento de resíduos e por considerações econômicas [GUO *et al.,* 2010; WANG e WAN, 2009].

No processo contínuo em escala laboratorial, o reator de tanque agitado contínuo (em inglês, *continuously stirred tank reactor – CSTR*) tem sido comumente utilizado [AROOJ *et al.,* 2008]. Outros tipos de reatores também têm sido utilizados, tais como o reator anaeróbio de fluxo ascendente com manta de lodo [CHANG e LIN, 2004], biorreator de leito empacotado [LEITE *et al.,* 2008]; reator de leito fixo [LI, ZHANG e FANG*,* 2006], biorreator de leito fixo e ascendente [PEIXOTO, 2008]; reator batelada anaeróbio em série [CHEONG, HANSEN e STEVENS*,* 2007] e reator de leito fluidizado anaeróbio [ZHANG *et al.,* 2007], entre outros.

Em alguns estudos de produção de H_2, verificou-se que o processo em batelada apresenta maiores rendimentos de H_2 quando comparado ao modo contínuo. Isto pode ser atribuído ao microambiente substancialmente diferente no reator em batelada quando comparado aos reatores contínuos [NTAIKOU, ANTONOPOULOU e LYBERATOS*,* 2010]. Lin e Cheng (2006) avaliaram a produção

de H_2 a partir de uma cultura mista utilizando xilose como substrato. Os autores observaram maior rendimento de H_2, 2 mol de H_2/mol de xilose, para os testes em batelada do que em modo de operação contínuo, 0,7 mol de H_2/mol de xilose. Lin e Lay (2004) produziram H_2 utilizando sacarose como substrato e obtiveram maiores rendimentos de H_2 para os testes em batelada, 2,66 mol de H_2/mol de sacarose, do que em um reator do tipo CSTR, 1,73 mol de H_2/mol de sacarose.

3.3.1.6. Pressão parcial de hidrogênio

A pressão parcial do hidrogênio no reator é um dos fatores que afeta a produção de H_2 por via fermentativa.

Na maioria dos sistemas de produção biológica de H_2, as hexoses podem ser metabolizadas a piruvato por via glicolítica, com a respectiva formação de 2 mol de piruvato e 2 mol de NADH para cada mol de hexose transformada. O piruvato formado, sob a ação da enzima piruvato:ferredoxina oxidoredutase, sofre a reação de descarboxilação oxidativa cedendo elétrons para as enzimas hidrogenases produzirem H_2. Portanto, as hexoses metabolizadas por bactérias que contenham a enzima piruvato:ferredoxina oxidoredutase, são capazes de produzir 2 mol de H_2 por mol de hexose. Se a pressão parcial de hidrogênio for suficientemente baixa (P_{H_2}< 60 Pa)[1], o NADH produzido por via glicolítica pode ser oxidado liberando elétrons para as hidrogenases produzirem H_2 (Figura 3.6 a). Deste modo, é possível obter um adicional de 2 mol de H_2 por mol de hexose degradada. A produção de H_2 por meio da oxidação do NADH é termodinamicamente desfavorável em pressões parciais elevadas (P_{H_2} > 60 Pa). Sob pressões elevadas, o NADH é oxidado para formação de compostos orgânicos, tais como o ácido butírico (Figura 3.6 b), reduzindo deste modo, a quantidade de H_2 produzido [HALLENBECK, 2009; ANGENENT *et al.,* 2004; HAWKES *et al.,* 2002].

[1] A produção de H_2 é termodinamicamente favorável em: $P_{H2} \leq \exp\left[2F(E_{H2}^{0'} - E_x^{0'})/RT\right]$, onde $E_x^{0'}$ é o potencial redox do doador de elétron, $E_{H2}^{0'}$ é o potencial redox do H_2, R é a constante dos gases idéias e T é a temperatura absoluta. Para ferredoxina, a produção de H2 pode ser contínua quando a P_{H_2} é menor que ~ 0,3 atm (3 x 10^4 Pa), enquanto para o NADH, a P_{H_2} deve ser menor que ~ 6 x 10^{-4} atm (60 Pa) [ANGENENT *et al.,* 2004].

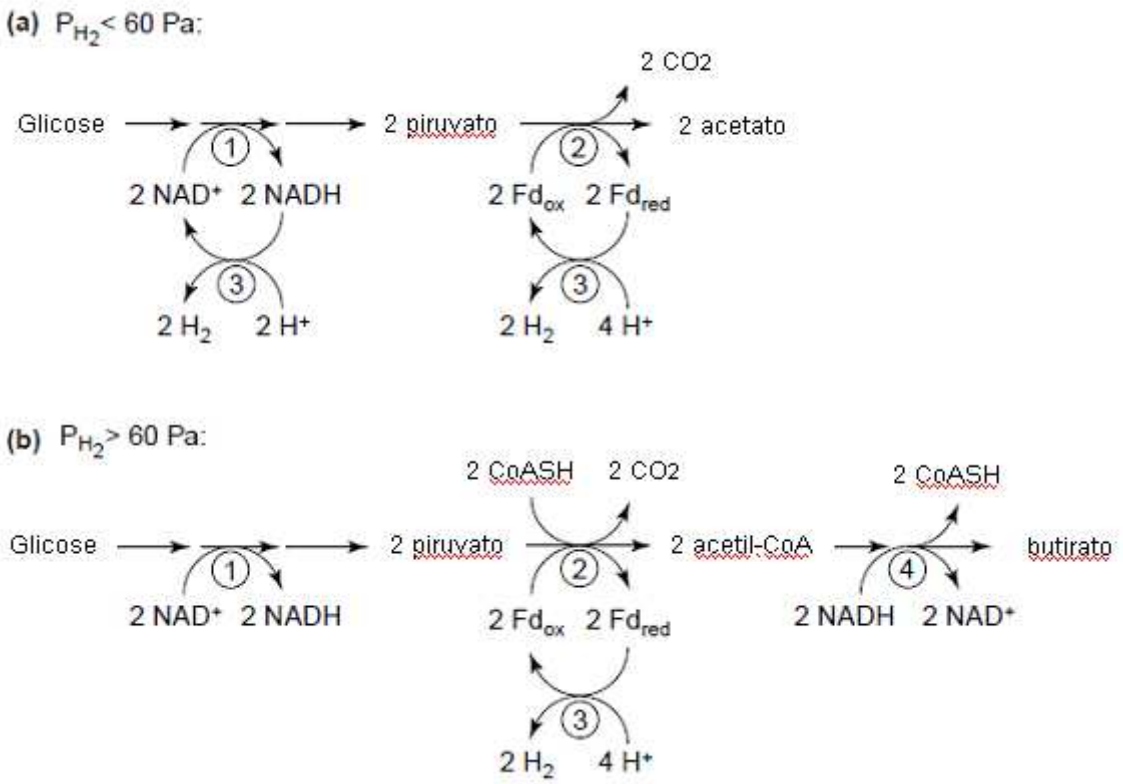

Figura 3.6: O efeito da pressão parcial de hidrogênio na produção biológica de H_2. (a) Oxidação do NADH para produção de H_2 em P_{H_2}< 60 Pa; (b) Oxidação do NADH para formação de ácido butírico em P_{H_2} > 60 Pa. Reações: (1) Metabolismo da glicose por via glicolítica; (2) Descarboxilação oxidativa do piruvato por meio da enzima piruvato:ferredoxina oxiredutase; (3) Formação de hidrogênio através das hidrogenases; (4) Fermentação butírica [ARGENENT *et al.,* 2004].

A maior produção teórica de hidrogênio pode ser associada com a formação de ácido acético como produto da fermentação, visto que neste caso, é possível obter até 4 mol de H_2 por mol de glicose consumida (reação 3.1). O mesmo não acontece quando o ácido butírico é obtido como produto, já que o rendimento teórico máximo diminui para até 2 mol de H_2 por mol de glicose consumida (reação 3.2). No entanto, na prática, elevados rendimentos de H_2 são obtidos quando se observa a produção da mistura dos ácidos acético e butírico, como produtos da fermentação anaeróbia [LEVIN, PITT e LOVE, 2004].

$$C_6H_{12}O_6 + 2H_2O \rightarrow 2CH_3COOH + 2CO_2 + 4H_2 \quad (3.1)$$

$$C_6H_{12}O_6 + 2H_2O \rightarrow CH_3CH_2CH_2COOH + 2CO_2 + 2H_2 \quad (3.2)$$

Diferentes rendimentos de H_2 podem ser obtidos dependendo da rota metabólica adotada pelos micro-organismos no processo de fermentação anaeróbia. A Tabela 3.6 descreve as possíveis rotas para produção de H_2 a partir de alguns carboidratos e da glicerina: (1) com a formação de ácido acético e (2) com a formação de ácido butírico [MAINTINGUER, 2009].

Tabela 3.6: Rendimento teórico máximo para produção de H_2 a partir de diferentes substratos [MAINTINGUER, 2009].

Carboidratos	Rota metabólica
Sacarose	(1) $C_{12}H_{22}O_{11} + 5H_2O \rightarrow 4CH_3COOH + 4CO_2 + 8H_2$
	(2) $C_{12}H_{22}O_{11} + H_2O \rightarrow 2CH_3CH_2CH_2COOH + 4CO_2 + 4H_2$
Glicose e Frutose	(1) $C_6H_{12}O_6 + 2H_2O \rightarrow 2CH_3COOH + 2CO_2 + 4H_2$
	(2) $C_6H_{12}O_6 + 2H_2O \rightarrow CH_3CH_2CH_2COOH + 2CO_2 + 2H_2$
Xilose	(1) $C_5H_{10}O_5 + 3H_2O \rightarrow CH_3COOH + 3CO_2 + 6H_2$
	(2) $C_5H_{10}O_5 + 2H_2O \rightarrow 1/2\, CH_3CH_2CH_2COOH + 3CO_2 + 5H_2$
Glicerina	(1) $C_3H_8O_3 + 2H_2O \rightarrow CH_3COO^- + HCO_3^- + 2H^+ + 3H_2$

A obtenção dos ácidos acético (HAc) e butírico (HBu) como produtos do processo fermentativo fornecem informações relevantes sobre a rota metabólica seguida. Estudos prévios mostraram que a razão entre o ácido acético e o ácido butírico (HAc/HBu) pode estar relacionada à obtenção de H_2, visto que, o aumento desta razão é acompanhada do aumento da produção de H_2 [DE SÁ *et al.,* 2011; HAFEZ *et al.,* 2010; BAGHCHEHSARAE *et al.,* 2008; KHANAL *et al.,* 2004].

A elevada pressão parcial de H_2 no meio fermentativo pode ainda favorecer a solventogênese, fase na qual é observada a formação de ácido láctico e alguns solventes (etanol, butanol e acetona). Segundo Levin, Pitt e Love (2004), as vias metabólicas para síntese de H_2 são sensíveis a elevadas concentrações de H_2 e estão sujeitas à inibição pelo produto. Deste modo, um aumento da pressão parcial de H_2 diminui a síntese de H_2 e as vias metabólicas são direcionadas para produção de metabólitos mais reduzidos, tais como ácido láctico, etanol, butanol e acetona.

Alguns estudos relacionam a ocorrência da solventogênese com as fases de crescimento dos micro-organismos e com as alterações do pH no meio fermentativo

[SKONIECZNY e YARGEAU, 2009; HAWKES *et al.,* 2002]. A Figura 3.7 apresenta a rota metabólica do *Clostridium acetobutylicum* para degradação da glicose e formação de diversos metabólitos. A fermentação com este micro-organismo ocorre em duas fases distintas: a primeira fase é caracterizada pelo rápido crescimento microbiano, elevada produção de H_2 e formação dos ácidos acético e butírico, e a segunda fase é caracterizada pelo baixo crescimento microbiano, baixa produção de H_2 e produção de solventes [MATHEWS e WANG, 2009].

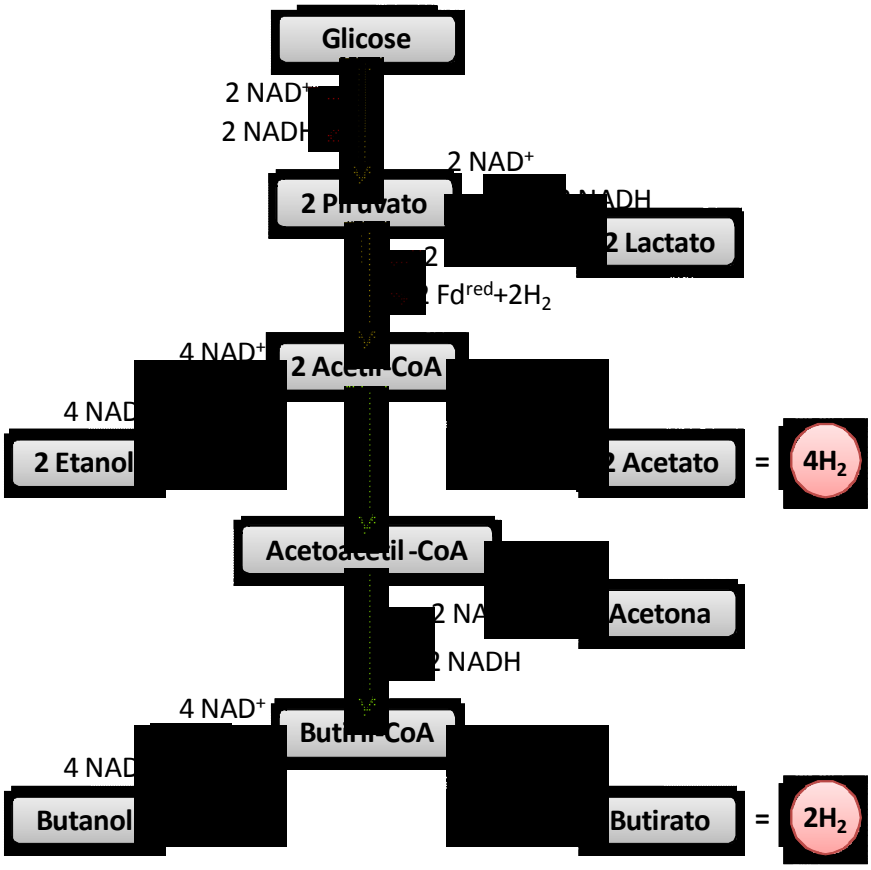

Figura 3.7: Rota metabólica do *Clostridium acetobutylicum* durante a produção de H_2 por fermentação anaeróbia [Adaptado de MATHEWS e WANG, 2009].

Diversos estudos têm sido conduzidos de modo a diminuir a pressão parcial de H_2 na fase líquida, favorecendo deste modo, a síntese de H_2. Ngo, Kim e Sim (2011) aumentaram a produção de H_2 de 1,23 para 2,73 mol de H_2/mol de glicerina através de purgas de N_2 no meio fermentativo. Mizuno e colaboradores (2000) reduziram a concentração do H_2 dissolvido no meio fermentativo através de purgas com N_2, obtendo um aumento de 68% no rendimento de H_2. Lay (2000) aumentou a velocidade de agitação de um reator contínuo através de um agitador magnético, de

100 para 700 rpm e observou que a taxa diária de produção de H_2 utilizando amido como substrato aumentou significativamente. Apesar dos inúmeros estudos sobre este assunto, uma investigação mais detalhada sobre este tema se torna necessária de modo a viabilizar a produção de H_2 em grande escala [VALDEZ-VAZQUEZ e POGGI-VARALDO, 2009].

3.3.2. Enzimas hidrogenases no processo de produção de H_2 fermentativo

O processo de produção biológica de H_2 por via fermentativa é fundamentalmente dependente de enzimas hidrogenases. Estas enzimas são responsáveis pela catálise da reação reversível de oxidação do hidrogênio ($2H^+ + 2e^- \leftrightarrow H_2$) [DAS *et al.,* 2006; HALLENBECK e BENEMANN, 2002; VIGNAIS, BILLOUD e MEYER*,* 2001; VOORDOUW, 1992].

As hidrogenases podem ser agrupadas, de maneira geral, em duas classes distintas, baseadas no tipo de metal encontrado em seus respectivos centros catalíticos: aquelas que contem somente ferro são chamadas de [FeFe]-hidrogenases e aquelas que contém níquel e ferro são denominadas [NiFe]-hidrogenases. Algumas enzimas também podem apresentar o selênio além do níquel e do ferro no centro catalítico, sendo denominadas [NiFeSe]-hidrogenases [MEYER, 2007; VIGNAIS e COLBEAU, 2004; HALLENBECK e BENEMANN, 2002].

As [FeFe]-hidrogenases são geralmente encontradas em micro-organismos produtores de H_2, tais como os do gênero *Clostridium*. As [NiFe]-hidrogenases e as [NiFeSe]-hidrogenases são frequentemente encontradas em micro-organismos consumidores de H_2, tais como as arqueias metanogênicas e as bactérias redutoras de sulfato [MEYER, 2007; DAS *et al.,* 2006; VIGNAIS e COLBEAU, 2004; PETERS, 1999].

3.3.2.1. Ferramentas moleculares no estudo da expressão do gene hidrogenase de *Clostridium*

Técnicas de biologia molecular têm sido utilizadas para a caracterização da comunidade microbiana responsável pela produção de H_2. Estas técnicas têm funcionado como ferramentas úteis no monitoramento dos processos biológicos,

uma vez que a estabilidade e a eficiência destes processos são fortemente dependentes das interações entre as comunidades microbianas envolvidas.

A reação em cadeia da polimerase (em inglês, *Polymerase Chain Reaction* - PCR) tem sido uma das técnicas de biologia molecular mais utilizada para investigação qualitativa de comunidades microbianas. Esta técnica consiste, de uma maneira geral, na amplificação exponencial de uma determinada quantidade de DNA. O DNA molde sofre uma amplificação controlada por enzimas, obtendo-se deste modo, milhões de cópias do fragmento do DNA de interesse [LEHNINGER, 2002].

Algumas variações da técnica de PCR têm sido amplamente utilizadas no controle do processo de produção do H_2, tais como a RT-PCR em tempo real. Neste caso, o RNA funciona como molde e não o DNA. A partir do RNA extraído da amostra, a enzima transcriptase reversa sintetiza uma cadeia de DNA complementar (cDNA), a qual é posteriormente utilizada na PCR em tempo real. Dados quantitativos precisos são obtidos na utilização da PCR em tempo real.

Estudos recentes mostram que a técnica de RT-PCR em tempo real tem funcionado como uma ferramenta útil no estudo da expressão do gene hidrogenase (*hyd*) em produtores de H_2. A expressão do *hyd* para espécies do gênero *Clostridium*, tem sido apontada como um indicador da produção de H_2 em diferentes sistemas anaeróbios [WANG *et al.,* 2009; CHANG *et al.,* 2008; WANG *et al.,* 2008b; CHANG *et al.,* 2006].

Wang e colaboradores (2009) investigaram a relação entre o nível de expressão do gene hidrogenase e a produção de H_2 fermentativo a partir da cepa de *Clostridium butyricum* W5. A partir da quantificação da expressão do *hyd*, através da técnica de RT-PCR em tempo real, os autores concluíram que o nível de hidrogenases nas células pode ser considerado como um avançado indicador para produção de H_2. Os autores justificaram o uso da RT-PCR em tempo real para análise do gene funcional, visto que a técnica permite obter dados quantitativos com elevada precisão em culturas bacterianas puras ou mistas.

Em estudos realizados por Chang *et al.* (2006), a existência de *Clostridium sp.* no meio fermentativo foi confirmada a partir de análises de PCR-DGGE. Através de análises de RT-PCR com sequenciamento foi possível verificar que as hidrogenases presentes no meio fermentativo apresentavam 82% de similaridade do gene hidrogenase do *Clostridium pasteurianum* e 84% de similaridade do gene

hidrogenase do *Clostridium saccharobutylicum*. Além disso, os autores quantificaram o nível de expressão do gene hidrogenase clostridial em diferentes tempos, e observaram que a expressão do *hyd* no sistema era positivamente relacionada com a produção de H_2.

Wang *et al.* (2008b) investigaram a correlação entre a expressão do gene hidrogenase e a produção de H_2 durante experimentos em batelada com *Clostridium butyricum* CGS5 usando sacarose como fonte de carbono. Os autores concluíram que a taxa de produção de H_2 pela cepa era linearmente proporcional ao nível de expressão da hidrogenases.

Diante do que foi apresentado, é evidente a importância de estudos voltados para a produção de biohidrogênio, visto a possibilidade de utilização de um biocombustível baseado em fontes renováveis de energia. No presente estudo, diferentes fontes de carbono e métodos de pré-tratamentos do inóculo foram avaliados na produção do biohidrogênio em experimentos de pequena escala. Metodologia analítica para monitoramento do bioprocesso foi desenvolvida e validada. Toda a parte experimental empregada neste trabalho é apresentada no próximo capítulo.

Capítulo 7: Trabalhos Futuros

7. TRABALHOS FUTUROS

As sugestões para trabalhos futuros são:

- Desenvolver e validar uma metodologia analítica para determinação de H_2 e CO_2 por Cromatografia Gasosa (CG) utilizando um Micro-CG;
- Otimizar as condições experimentais de modo a maximizar a produção de H_2 através do processo de fermentação anaeróbia;
- Investigar o efeito da inibição da concentração do substrato para os diferentes substratos avaliados, de modo, a viabilizar a maior produção de H_2;
- Avaliar a composição do meio nutricional e a possibilidade de utilização de maiores teores de Fe no meio nutritivo para favorecimento da atividade das hidrogenases;
- Verificar a influência da pressão parcial do H_2 no sistema, através de purgas com N_2 no meio fermentativo, favorecendo a síntese de maiores teores de H_2;
- Caracterizar a população microbiana responsável pela produção de H_2 através de técnicas como PCR-DGGE e sequenciamento;
- Estudar a possibilidade de reuso do inóculo, visto que rendimentos similares de H_2 foram obtidos para ambos os casos, inóculo reciclado e não reciclado, utilizando a sacarose como substrato;
- Avaliar a produção de H_2 a partir de substratos reais, tais como, resíduos lignocelulósicos da produção de etanol 2G, glicerina obtida de processo de produção de biodiesel e resíduos agro-industriais, de modo a viabilizar a utilização destes materiais residuais, minimizando o acúmulo destes nos processos industriais;
- Avaliar a produção de H_2 em biorreatores de bancada em regime contínuo.

Capítulo 6: Conclusões

6. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos durante este trabalho permitiram as seguintes conclusões:

A simultânea determinação de carboidratos (sacarose, glicose e frutose) e ácidos orgânicos voláteis (ácidos acético, propiônico, isobutírico e butírico) por CLAE foi aplicada com êxito em amostras do processo fermentativo para a produção de H_2. Todos os parâmetros de validação do método estudados obedeceram à faixa dos limites estabelecidos por protocolos oficiais. Deste modo, a metodologia proposta neste trabalho, pode ser aplicada no monitoramento da produção de H_2 via fermentação anaeróbia.

Durante os estudos preliminares de produção de H_2, o pré-tratamento térmico favoreceu a produção deste gás, visto que uma maior expressão do gene hidrogenase (cerca de 3 vezes) e uma maior razão HAc/HBu (aproximadamente 7) foi obtida para o inóculo pré-tratado termicamente quando comparado ao inóculo *in natura*. A combinação destes dois parâmetros, HAc/HBu e o nível de expressão das hidrogenases, pode funcionar como uma ferramenta útil na avaliação do desempenho das comunidades bacterianas produtoras de H_2.

O pré-tratamento térmico foi o mais promissor para produção de H_2 durante os ensaios de avaliação de diferentes pré-tratamentos do inóculo, em virtude de seu maior rendimento no tempo de 72 h, 4,62 mol de H_2/mol de sacarose, frente aos outros pré-tratamentos testados (alcalino e ácido). O elevado nível de expressão do gene hidrogenase no inóculo pré-tratado termicamente, 64 vezes maior que o do inóculo *in natura* corrobora a relação direta entre a expressão do gene hidrogenase e a produção de H_2.

Diferentes substratos podem ser utilizados na produção de H_2, tais como sacarose, glicose, frutose, xilose e glicerina, obtendo-se rendimentos de H_2 a 35^0C e pH inicial 5,5 de 4,24 mol de H_2/mol de sacarose, 2,19 mol de H_2/mol de glicose, 2,09 mol de H_2/mol de frutose, 1,88 mol de H_2/mol de xilose e 0,80 mol de H_2/mol de glicerina.

Capítulo 5: Resultados e Discussão

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Desenvolvimento e validação de metodologia para análise de carboidratos e ácidos orgânicos voláteis por CLAE, para monitoramento da produção de H_2 por via fermentativa

Em geral, a análise de carboidratos e ácidos orgânicos voláteis (AOV) em meio fermentativo anaeróbio tem sido basicamente realizada através de métodos colorimétricos [WANG e WAN*,* 2008; XIAO e LIU, 2009] e cromatografia gasosa [UM, WANG e YU*,* 2006c; FANG e LIU, 2002], respectivamente. Os métodos colorimétricos fornecem apenas a quantidade total de carboidratos [DUBOIS *et al.,* 1956]. A maior desvantagem deste tipo de análise consiste na dificuldade de se avaliar simultaneamente diferentes carboidratos [CHÁVEZ-SERVÍN, CASTELLOTE e LÓPEZ-SABATER*,* 2004]. Além de serem métodos não específicos, são também demorados. A cromatografia gasosa (CG) tem sido tradicionalmente utilizada para determinar os ácidos orgânicos voláteis em amostras envolvendo lodo anaeróbio. No entanto, devido às características peculiares destes ácidos (por exemplo, alta polaridade, volatilidade e solubilidade em água), pode ser que uma etapa de derivatização seja necessária para obtenção de derivados não-polares, os quais podem ser facilmente analisados por CG, permitindo uma análise mais precisa [ÁBALOS, BAYONA e PAWLISZYN*,* 2000].

Deste modo, metodologias analíticas simples, rápidas e precisas são desejáveis para o monitoramento e controle do processo fermentativo anaeróbio. Neste contexto, a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) com modo de detecção dual, detector UV-VIS (UV) e detector de índice de refração (IR), tem recebido grande atenção devido à capacidade de analisar carboidratos e ácidos orgânicos voláteis em amostras de matrizes complexas [GIANNOCCARO, WANG e CHEN*,* 2008; STEIN *et al.,* 1992]. Esta parte do trabalho teve como objetivo desenvolver e validar uma metodologia para analisar simultaneamente sacarose, glicose, frutose e os ácidos acético, propiônico, butírico e isobutírico em lodo anaeróbio usando CLAE, para monitoramento da produção de biohidrogênio.

5.1.1. Estudo preliminar das condições cromatográficas

Testes preliminares foram realizados para selecionar as condições cromatográficas iniciais para determinação simultânea de sacarose, glicose, frutose, ácido acético (HAc), ácido propiônico (HPr), ácido isobutírico (HIb) e ácido butírico (HBu) em amostras do processo fermentativo para a produção de H_2. Os parâmetros avaliados foram: coluna cromatográfica, utilização de pré-coluna, composição da fase móvel, fluxo da fase móvel e temperatura da coluna. A condição ótima encontrada foi: coluna Aminex HPX-87H com pré-coluna, fase móvel consistindo de H_2SO_4 0,005 mol.L^{-1}, fluxo de 1.0 mL.min^{-1} e temperatura de 55 ^{0}C. A Figura 5.1 apresenta o cromatograma obtido sob as condições ótimas, de uma mistura de padrões adicionados a amostra de meio de cultura do processo fermentativo. Sacarose, glicose e frutose foram determinadas através do detector de índice de refração (IR), enquanto os ácidos orgânicos voláteis foram determinados através do detector UV-VIS a 210 nm.

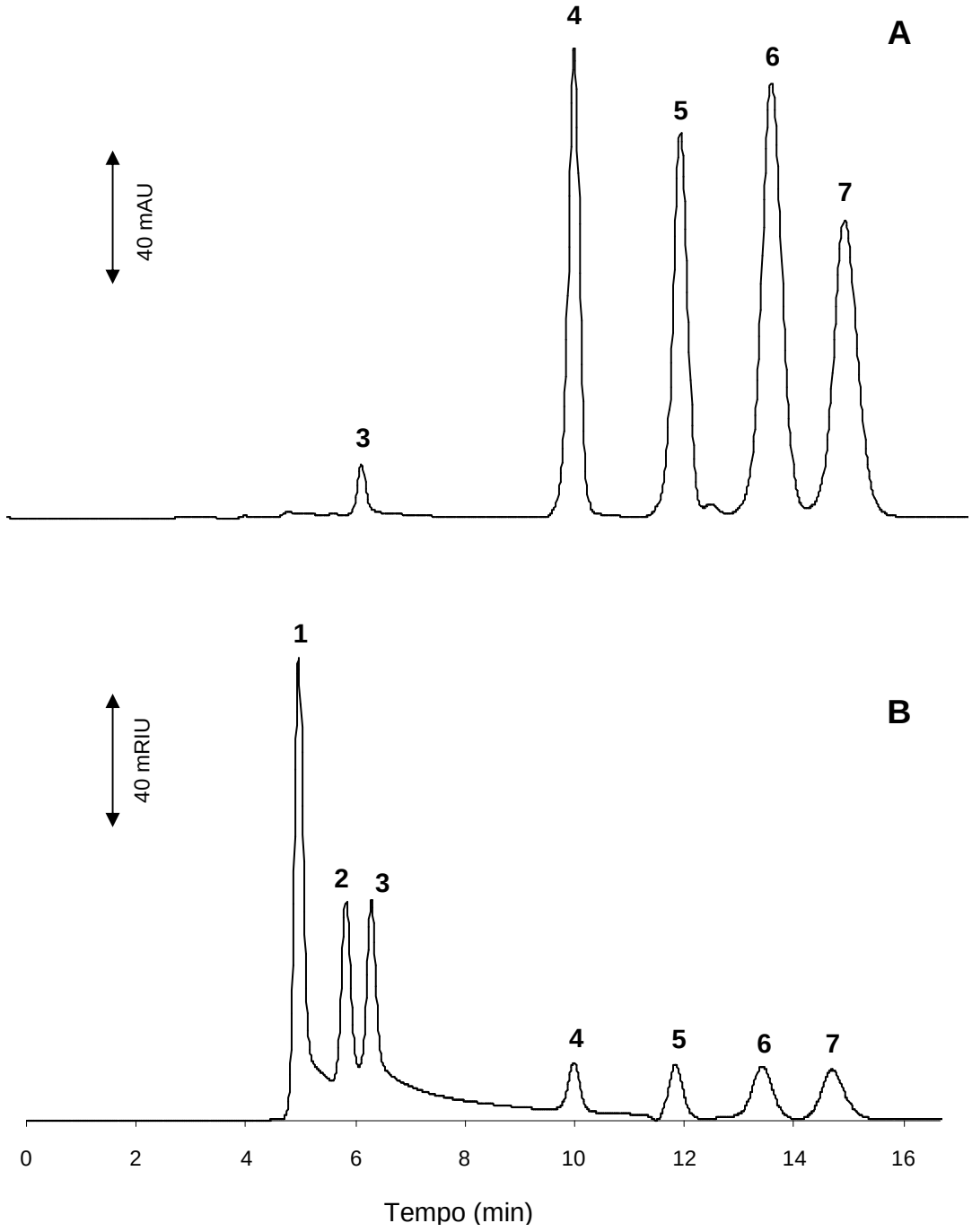

Figura 5.1: Cromatogramas da mistura de padrões adicionados à amostra de meio de cultura do processo de produção de H_2. A = Detector UV-VIS a 210nm e B = Detector IR. Picos: sacarose (1), glicose (2), frutose (3), ácido acético (4), ácido propiônico (5), ácido isobutírico (6) e ácido butírico (7). A concentração dos analitos adicionados foi de 100 mmol.L^{-1}. Condições cromatográficas: coluna Aminex HPX-87H com pré-coluna, fase móvel H_2SO_4 0,005 mol.L^{-1}, fluxo de 1.0 mL.min^{-1} e temperatura de 55^0C.

A metodologia proposta permite a análise de outros compostos importantes para o processo fermentativo, tais como os ácidos pirúvico, fórmico, láctico, caprílico, capróico e valérico; alguns alcoóis (etanol e butanol) e outros carboidratos (raminose, galactose, xilose, arabinose, manose e maltose). Além disso, esta metodologia admite a análise de glicerina e seus derivados (por exemplo: ácido glicérico e ácido tartrônico). A Tabela 5.1 apresenta a versatilidade da metodologia proposta. Utilizando a mesma condição cromatográfica é possível analisar até 24 compostos. Deste modo, a mudança de substrato nos experimentos não se torna um grande problema, visto que a metodologia proposta permite a determinação de grande número de compostos e seus derivados.

Tabela 5.1: Analitos determinados através da metodologia proposta.

Analitos	Detector IR	Detector UV (210 nm)
Carboidratos	**Sacarose, glicose, frutose,** xilose, raminose, galactose, arabinose, manose e maltose	----
Alcoóis	Etanol, butanol e glicerol	----
AOV*	**Ácidos acético, propiônico**, **isobutírico**, **butírico,** glicérico, tartrônico, láctico, fórrmico, pirúvico, caprílico, capróico e valérico	**Ácidos acético, propiônico, isobutírico, butírico**, láctico, fórmico, pirúvico, caprílico, capróico e valérico

*AOV = ácidos orgânicos voláteis

Vale ressaltar, que o método proposto por CLAE permite ainda a análise dos carboidratos (sacarose, glicose e frutose) e ácidos orgânicos voláteis (acético, propiônico, isobutírico e butírico) em outras matrizes de lodo anaeróbio. A Figura 5.2 apresenta o cromatograma obtido para a análise de carboidratos e ácidos orgânicos voláteis (AOV) em amostra de lodo anaeróbio de abatedouro de aves fortificada com os analitos de interesse.

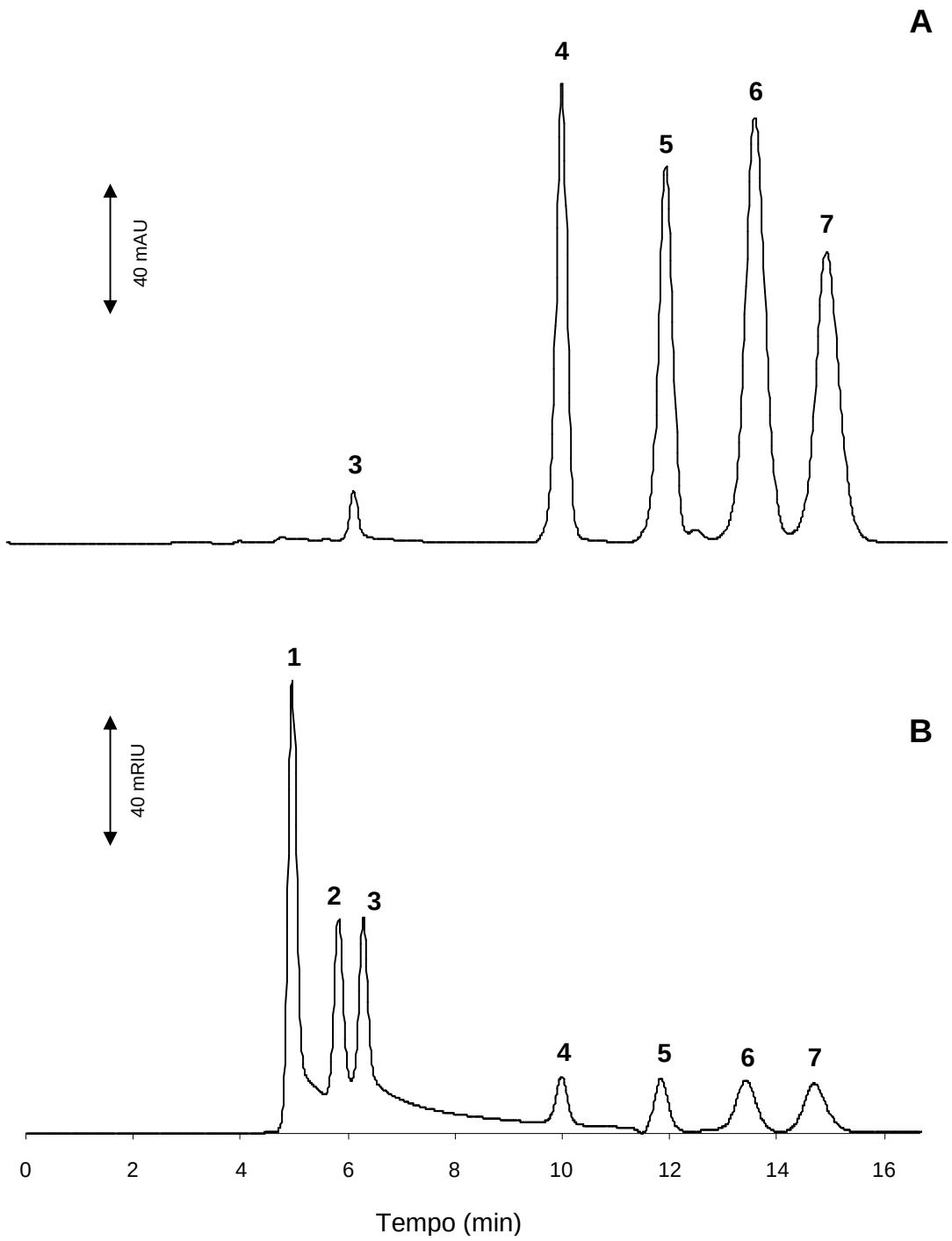

Figura 5.2: Cromatogramas da mistura de padrões adicionados à amostra de lodo de abatedouro de aves. A = Detector UV-VIS a 210nm e B = Detector IR. Picos: sacarose (1), glicose (2), frutose (3), ácido acético (4), ácido propiônico (5), ácido isobutírico (6) e ácido butírico (7). A concentração dos analitos adicionados foi de 100 mmol.L^{-1}. Condições cromatográficas: coluna Aminex HPX-87H com pré-coluna, fase móvel H_2SO_4 0,005 mol.L^{-1}, fluxo de 1.0 mL.min^{-1} e temperatura de 55^{0}C.

5.1.2. Procedimentos de validação

Após a determinação das condições cromatográficas, alguns parâmetros de validação, tais como seletividade, linearidade, precisão, limite de detecção (LOD), limite de quantificação (LOQ), exatidão e robustez, foram avaliados.

5.1.2.1. Seletividade e linearidade

A seletividade do método é um fator muito importante a ser avaliado devido à complexidade da matriz estudada. A seletividade de um método corresponde a capacidade de avaliar, de forma inequívoca, as substâncias em exame na presença de componentes que podem interferir com a sua determinação em uma amostra complexa [RIBANI *et al.,* 2004].

A dificuldade de obtenção de uma matriz de lodo anaeróbio isenta de carboidratos e AOV, permite o uso do método de adição padrão para avaliar o parâmetro de seletividade. Deste modo, curvas analíticas obtidas pelo método de adição padrão e curvas analíticas obtidas pelo método de padronização externa foram comparadas [RIBANI *et al.,* 2004]. A similaridade dos coeficientes angulares das curvas analíticas (Tabela 5.2) indica que o método apresenta apropriada seletividade para determinação simultânea de carboidratos e ácidos orgânicos, presentes em amostras de lodo anaeróbio para produção de biohidrogênio.

A linearidade corresponde à capacidade do método em fornecer resultados diretamente proporcionais à concentração da substância em exame, dentro de uma determinada faixa de aplicação [RIBANI *et al.,* 2004].

Para avaliação da linearidade do método, foi realizada a análise de variância dos modelos propostos (Tabela 5.2). O teste de falta de ajuste para as curvas analíticas apresentaram em todos os casos o $F_{calculado}$ menor que o $F_{crítico}$ (2,84), o que indica, com 95% de confiança, que não ocorre falta de ajuste para os modelos propostos [MONTGOMERY, 2004]. Deste modo, o método analítico proposto apresenta seletividade e linearidade aceitáveis na faixa de concentração estudada (10-100 $mmol.L^{-1}$).

Tabela 5.2: Resultados estatísticos obtidos no cálculo do parâmetro seletividade.

Analitos	Coeficiente angular	Coeficiente linear	r	$F_{calculado}$
Sacarose[a]	31502,6 ± 1092,3	119516,7 ± 66263,5	0,9751	1,61
Sacarose[b]	28960,5 ± 1849,5	178558,5 ± 112197,4	0,9224	1,36
Glicose[a]	14665,5 ± 674,9	181307,1 ± 40941,0	0,9574	2,37
Glicose[b]	12812,5 ± 941,0	184596,2 ± 57082,9	0,9009	1,30
Frutose[a]	19490,8 ± 561,4	58796,8 ± 34056,6	0,9826	0,60
Frutose[b]	17827,8 ± 1124,3	83161,9 ± 68201,4	0,9241	1,05
Ácido acético[a]	32191,1 ± 935,9	20633,7 ± 56776,4	0,9823	2,15
Àcido acético[b]	31518,5 ± 2142,0	329271,7 ± 129938,9	0,9343	1,64
Àcido propiônico[a]	37402,0 ± 1106,5	41834,3 ± 67125,9	0,9816	2,30
Àcido propiônico[b]	34871,7 ± 2293,4	208623,1 ± 139123,9	0,9183	1,90
Ácido isobutírico[a]	58843,0 ± 1717,4	69246,2 ± 104181,0	0,9822	1,87
Ácido isobutírico[b]	56979,8 ± 3452,3	14234,3 ± 209426,0	0,9293	1,67
Ácido butírico[a]	45094,8 ± 1318,9	10512,2 ± 80011,4	0,9820	1,96
Ácido butírico[b]	43234,9 ± 2765,3	250443,8 ± 167748,7	0,9222	1,59

[a]curva analítica de padronização externa (n=3); [b]curva analítica de adição padrão (n=3)

5.1.2.2. Precisão

Representa a dispersão de resultados entre ensaios independentes, repetidos de uma mesma amostra, amostras semelhantes ou padrões, sob condições definidas [RIBANI *et al.,* 2004].

A precisão pode ser determinada através da estimativa do desvio padrão relativo (RSD), conforme demonstrado na equação 5.1, onde s corresponde ao desvio padrão e $\bar{x}$ corresponde à média dos valores [ANVISA, 2003].

$$RSD\ (\%) = \frac{s}{\bar{x}} x 100 \qquad (5.1)$$

A precisão deste método foi avaliada em dois níveis: repetitividade e precisão intermediária. A repetitividade representa a concordância entre os resultados de medições sucessivas de um mesmo método, efetuadas sob as mesmas condições de medição, chamadas condições de repetitividade: mesmo procedimento; mesmo analista; mesmo instrumento usado sob as mesmas condições; mesmo local; repetições em um curto intervalo de tempo. Indica o efeito

das variações dentro do laboratório devido a eventos como diferentes dias ou diferentes analistas ou diferentes equipamentos ou uma combinação destes fatores. A precisão intermediária é reconhecida como a mais representativa da variabilidade dos resultados em um único laboratório e, como tal, mais aconselhável de ser adotada. O objetivo da validação da precisão intermediária é verificar que no mesmo laboratório o método fornecerá os mesmos resultados [RIBANI *et al.,* 2004].

A repetitividade foi determinada através da avaliação do RSD (%) calculado a partir das áreas dos picos obtidos para os padrões e para as amostras fortificadas nos seguintes níveis de concentração: 10, 50 e 100 mmol.L^{-1}.

A Tabela 5.3 mostra que os valores de RSD (%) obtidos são menores que 3% para ambos, padrões e amostras fortificadas.

Tabela 5.3: Valores de RSD (%) obtidos no estudo do parâmetro de repetitividade.

Concentração (mmol.L^{-1})	RSD (%) para padrões[a]						
	Sacarose	Glicose	Frutose	HAc	HPr	HIb	HBu
10	2,30	2,65	2,99	2,08	1,86	1,17	0,83
50	1,69	1,50	2,70	1,83	1,78	1,61	1,10
100	2,49	2,60	0,97	0,54	0,77	1,14	0,97
Concentração adicionada (mmol.L^{-1})	RSD (%) para amostras fortificadas[a]						
	Sacarose	Glicose	Frutose	HAc	HPr	HIb	HBu
10	0,88	2,32	2,17	0,90	2,84	0,89	1,94
50	0,63	1,05	2,28	1,80	0,76	0,88	0,76
100	1,37	1,36	2,31	0,98	1,03	1,24	2,09

[a]n=3

A precisão intermediária do método foi determinada de maneira idêntica ao parâmetro de repetibilidade. Esta análise foi realizada 30 dias após o estudo inicial. Os padrões e as amostras fortificadas usadas no teste de precisão intermediária foram previamente utilizados no teste de repetitividade. Estas soluções foram armazenadas em freezer após o primeiro teste, para conservação das propriedades iniciais. A Tabela 5.4 mostra que os valores de RSD (%) obtidos são menores que 2,53% para ambos, padrões e amostras fortificadas.

Tabela 5.4: Valores de RSD (%) obtidos no estudo do parâmetro de precisão intermediária.

Concentração (mmol.L^{-1})	RSD (%) para padrões[a]						
	Sacarose	Glicose	Frutose	HAc	HPr	HIb	HBu
10	0,55	1,47	1,20	0,86	1,02	1,96	0,40
50	1,17	1,51	1,76	0,31	0,58	1,17	0,44
100	0,92	0,82	1,62	0,46	0,96	1,88	0,75
Concentração adicionada (mmol.L^{-1})	RSD (%) para amostras fortificadas[a]						
	Sacarose	Glicose	Frutose	HAc	HPr	HIb	HBu
10	1,30	0,54	0,26	1,99	1,43	0,53	0,72
50	1,93	1,53	2,36	1,02	2,12	1,55	1,87
100	0,97	2,45	2,19	2,53	0,20	0,85	0,59

[a]n=3

Os valores de RSD (%) obtidos para ambos os estudos de repetitividade e precisão intermediária são considerados aceitáveis (menores que 5%) [ANVISA, 2003]. Este tipo de procedimento avalia simultaneamente a precisão do método e a dispersão analítica dos compostos interferentes presentes na matriz do processo fermentativo.

5.1.2.3. Exatidão

Representa o grau de concordância entre os resultados individuais encontrados em um determinado ensaio e um valor de referência aceito como verdadeiro. É importante observar que um valor exato ou verdadeiro é o valor obtido por uma medição perfeita e este valor é indeterminado por natureza. A exatidão é sempre considerada dentro de certos limites, a um dado nível de confiança (ou seja, aparece sempre associada a valores de precisão). Estes limites podem ser estreitos em níveis de concentração elevados e mais amplos em níveis de traços [RIBANI *et al.,* 2004].

Neste trabalho, a exatidão foi determinada através da porcentagem de recuperação de quantidades conhecidas de analitos adicionados às amostras. A porcentagem de recuperação (R%) foi calculada usando a equação 5.2, onde A_a corresponde à área do analito, A_s corresponde à área do padrão e A_{a+s} é a área do analito mais o padrão adicionado.

$$R\% = \frac{A_{a+s} - A_a}{A_s} x100 \qquad (5.2)$$

Os testes de recuperação foram realizados através da adição de quantidades conhecidas de padrões (10, 50 e 100 mmol.L^{-1}) nas amostras de lodo anaeróbio antes do processo de centrifugação. Somente após a adição dos padrões, procedeu-se à centrifugação das amostras. O sobrenadante obtido foi filtrado em membrana 0,22 µm e analisado por CLAE.

A Tabela 5.5 mostra que as porcentagens de recuperação obtidas estão dentro da faixa de 70-114%. Este resultado demonstra que o método apresenta aceitável exatidão [RIBANI *et al.,* 2004].

Tabela 5.5: Porcentagem de recuperação para os carboidratos e ácidos orgânicos voláteis estudados.

Concentração de padrão adicionada (mmol.L^{-1})	Concentração encontrada (mmol.L^{-1})[a]	R %
Sacarose		
10	11,55 ± 0,28	115,50
50	44,45 ± 2,02	88,91
100	92,88 ± 3,84	92,88
		99,10[b]
Glicose		
10	11,22 ± 0,58	112,22
50	52,31 ± 2,13	104,62
100	122,41 ± 0,57	122,41
		113,08[b]
Frutose		
10	11,95 ± 0,44	119,46
50	53,22 ± 0,98	106,43
100	108,17 ± 2,18	108,17
		111,35[b]
Ácido acético		
10	6,74 ± 0,93	80,50
50	40,42 ± 2,22	80,84
100	86,70 ± 1,69	86,70
		82,68[b]
Ácido propiônico		
10	6,99 ± 0,22	69,92
50	35,85 ± 2,09	71,70
100	45,27 ± 2,09	71,38
		71,00[b]
Ácido isobutírico		
10	9,35 ± 0,85	93,46
50	45,92 ± 2,38	91,84
100	89,97 ± 3,16	89,97
		91,76[b]
Ácido butírico		
10	10,50 ± 1,11	104,95
50	48,02 ± 1,51	96,04
100	97,66 ± 3,16	97,66
		99,55[b]

[a]média ± desvio padrão (n=3); [b]média da faixa de recuperação

5.1.2.4. Limite de detecção (LOD) e limite de quantificação (LOQ)

O limite de detecção (LOD) corresponde à menor concentração do analito presente em uma amostra que pode ser detectada, porém não necessariamente quantificada. Já o limite de quantificação (LOQ) é expresso como a menor concentração do analito em uma amostra que pode ser determinada com um nível aceitável de precisão e exatidão [ANVISA, 2003].

LOD e LOQ podem ser calculados através de três diferentes formas: método visual, método da relação sinal-ruído e através da avaliação de parâmetros da curva analítica [RIBANI *et al.,* 2004].

Neste estudo, o LOD e o LOQ foram determinados através dos parâmetros das curvas analíticas, de acordo com as equações 5.3 e 5.4, respectivamente, onde *s* corresponde ao desvio padrão dos coeficientes lineares e *S* corresponde à média dos coeficientes angulares das curvas multiplicado por 3 ou 10.

$$LOD = \frac{s}{S} x 3 \tag{5.3}$$

$$LOQ = \frac{s}{S} x 10 \tag{5.4}$$

Para este teste, três curvas analíticas foram construídas usando o método de adição padrão nos seguintes níveis de concentração: 1, 3, 5, 7 e 10 mmol.L^{-1}. O procedimento para preparação das curvas é idêntico ao descrito no item 4.4.1 A Tabela 5.6 apresenta os parâmetros das curvas analíticas, os resultados estatísticos obtidos para o cálculo da linearidade e os valores de LOD e LOQ obtidos.

Tabela 5.6: Resultados do estudo para determinação do LOD e LOQ.

Analitos	Coeficiente angular	Coeficiente linear	r	$F_{calculado}$	LOD ($mmol.L^{-1}$)	LOQ ($mmol.L^{-1}$)
Sacarose[a]	39594,9 ± 1697,2	29474,2 ± 10295,7	0,9882	2,05		
Sacarose[b]	41588,3 ± 1566,9	14667,2 ± 9505,2	0,9908	3,02	0,54	1,80
Sacarose[c]	42538,6 ± 1253,6	22349,4 ± 7604,7	0,9944	1,73		
Glicose[a]	25386,8 ± 1217,9	22432,2 ± 7388,4	0,9853	0,67		
Glicose[b]	25400,3 ± 1097,1	20457,8 ± 6655,2	0,9881	0,48	0,13	0,43
Glicose[c]	25195,7 ± 895,6	20600,1 ± 5433,2	0,9918	0,85		
Frutose[a]	24252,8 ± 955,2	14045,6 ± 5794,7	0,9900	0,01		
Frutose[b]	25045,3 ± 851,4	7413,4 ± 5164,7	0,9923	0,01	0,48	1,59
Frutose[c]	24056,2 ± 817,9	14239,1 ± 4961,5	0,9925	0,07		
Ácido acético[a]	36469,2 ± 2130,0	333072,8 ± 12921,4	0,9785	0,19		
Ácido acético[b]	38747,9 ± 1670,2	326576,3 ± 10131,8	0,9881	0,21	0,28	0,94
Ácido acético[c]	39712,5 ± 1143,5	327058,0 ± 6936,8	0,9947	0,01		
Ácido propiônico[a]	41081,2 ± 1365,0	131957,2 ± 8280,2	0,9929	0,24		
Ácido propiônico[b]	45325,8 ± 1318,0	116656,0 ± 7995,6	0,9946	0,26	0,68	2,27
Ácido propiônico[c]	46485,5 ± 899,5	113056,9 ± 5456,5	0,9976	0,27		
Ácido isobutírico[a]	65165,7 ± 1463,3	12251,1 ± 8876,5	0,9967	0,28		
Ácido isobutírico[b]	71418,4 ± 1616,9	-4206,9 ± 9808,7	0,9967	1,75	0,39	1,32
Ácido isobutírico[c]	72513,2 ± 1282,1	-2995,2 ± 7777,4	0,9980	1,14		
Ácido butírico[a]	49057,5 ± 1755,0	166107,1 ± 10646,1	0,9918	0,35		
Ácido butírico[b]	53971,3 ± 1605,0	154992,9 ± 9736,7	0,9943	0,47	0,36	1,19
Ácido butírico[c]	53773,0 ± 1275,0	155738,1 ± 57773,0	0,9963	0,40		

[a]curva analítica 1 (n=3), [b]curva analítica 2 (n=3), [c]curva analítica 3 (n=3)

5.1.2.5. Robustez

O parâmetro robustez permite avaliar pequenas alterações nas condições cromatográficas da metodologia proposta [ANVISA, 2003]. Neste trabalho, a robustez foi avaliada utilizando um planejamento fatorial completo de dois níveis e três fatores (2^3) com triplicata no ponto central: temperatura da coluna (54 e 56ºC), fluxo da fase móvel (0,9 e 1,1 $mL.min^{-1}$) e concentração de H_2SO_4 na fase móvel (4,8 e 5,2 $mmol.L^{-1}$).

Para o teste de robustez, as amostras foram fortificadas com padrões de carboidratos e ácidos orgânicos na concentração de 50 $mmol.L^{-1}$ cada.

A Tabela 5.7 apresenta os experimentos realizados para avaliação da robustez e os resultados obtidos em relação à porcentagem de recuperação. Como pode ser observado, as porcentagens de recuperação se encontram dentro da faixa de 70-121%. Deste modo, pequenas variações nos parâmetros cromatográficos tais como, temperatura da coluna, fluxo da fase móvel e concentração da fase móvel não apresentam significativas mudanças nos valores de recuperação, pois estes se encontram dentro do intervalo de referência [RIBANI *et al.,* 2004]. Os experimentos foram realizados em triplicata.

Ferramentas de análise estatística (análise de variância – ANOVA) foram utilizadas para identificar os efeitos significativos (Tabela 5.8). Um fator independente possui efeito significativo sobre uma resposta quando ele possui um p-valor < 0,05. Os resultados indicaram que todos os fatores (temperatura da coluna, fluxo da fase móvel e concentração da fase móvel) tiveram efeito não significativo sobre as respostas de glicose e ácido propiônico. Os fatores temperatura da coluna (X_1) e fluxo da fase móvel (X_2) são significativos para a frutose e ácido isobutírico, respectivamente. A interação entre o fluxo e a concentração da fase móvel (X_2X_3) apresentou efeito significativo para a sacarose, ácido acético e ácido butírico. Embora alguns efeitos tenham sido significativos no intervalo de confiança de 95% (p-valor < 0,05), o método pode ser considerado robusto, visto que a dispersão das respostas (porcentagem de recuperação – R%) foi relativamente baixa (Tabela 5.7).

Tabela 5.7: Resultados de robustez de amostras anaeróbias fermentativas em relação à porcentagem de recuperação.

Experimentos	X_1	X_2	X_3	Sacarose	Glicose	Frutose	HAc	HPr	HIb	HBu
1	-1	-1	-1	106	116	119	100	85	79	92
2	+1	-1	-1	103	119	118	98	83	76	88
3	-1	+1	-1	95	116	115	91	77	68	81
4	+1	+1	-1	91	121	119	93	74	68	72
5	-1	-1	+1	91	119	109	92	79	76	82
6	+1	-1	+1	92	117	119	90	78	76	82
7	-1	+1	+1	102	110	116	98	87	79	81
8	+1	+1	+1	99	119	118	94	80	71	85
9	0	0	0	100	109	116	95	80	76	87
10	0	0	0	102	106	117	97	83	76	89
11	0	0	0	102	108	115	98	85	78	91
				98 ± 5,34[a]	115 ± 5,24[a]	116 ± 3,0 [a]	95 ± 3,44[a]	81 ± 4,08[a]	75 ± 3,25[a]	85 ± 5,73[a]

X_1- Temperatura da coluna (ºC): (-) 54; (0) 55; (+) 56;

X_2- Fluxo da fase móvel ($mL.min^{-1}$): (-) 0,9; (0) 1,0; (+) 1,1;

X_3- Concentração da fase móvel ($mmol.L^{-1}$): (-) 4,8; (0) 5,0; (+) 5,2;

[a]média ± desvio padrão (n=3)

Tabela 5.8: Resultados da análise de variância (ANOVA) para o planejamento fatorial completo 3^3.

Fatores	Sacarose		Glicose		Frutose		Ácido acético		Ácido propiônico		Ácido isobutírico		Ácido butírico	
	Efeito	*p-valor*	Efeito	*p-valor*	Efeito	*p-valor*	Efeito	*p-valor*	Efeito	*p-valor*	Efeito	*p-valor*	Efeito	*p-valor*
X_1	-2,17	0,09	3,50	0,10	3,85	< 0,05	-1,63	0,24	-3,34	0,19	-2,48	0,09	-2,18	0,26
X_2	-1,26	0,23	-1,45	0,34	0,51	0,61	-1,16	0,36	-1,71	0,42	-4,00	< 0,05	-6,13	0,05
X_3	-3,07	0,05	-1,76	0,27	-2,46	0,10	-1,78	0,22	0,97	0,62	1,99	0,13	-1,10	0,51
X_1X_2	-1,04	0,30	3,22	0,11	-0,69	0,51	0,47	0,68	-1,65	0,43	-1,07	0,31	-0,23	0,88
X_1X_3	1,19	0,25	-0,16	0,90	2,35	0,11	-1,47	0,28	-0,91	0,64	-1,52	0,20	4,36	0,09
X_2X_3	10,26	< 0,05	-2,17	0,20	2,12	0,13	6,31	< 0,05	7,02	0,05	3,23	0,06	7,42	< 0,05
$X_1X_2X_3$	-0,85	0,37	2,37	0,18	-3,54	0,05	-1,72	0,23	-1,71	0,42	-2,82	0,07	2,06	0,28

X_1- Temperatura da coluna (ºC);

X_2- Fluxo da fase móvel ($mL.min^{-1}$);

X_3- Concentração da fase móvel ($mmol.L^{-1}$).

5.2. Avaliação de alguns parâmetros como ferramentas úteis no estudo das comunidades bacterianas produtoras de H_2

Os ensaios preliminares de produção de H_2, utilizando inóculo *in natura* e inóculo pré-tratado termicamente e sacarose como substrato, não permitiram a determinação do teor de H_2 devido à quantidade insuficiente de biogás produzido. Deste modo, a fim de se obter uma quantidade de gás suficiente para injeção no cromatógrafo, tornou-se necessário o arraste e consequente diluição do gás produzido com N_2. Foi possível observar a presença de H_2 no biogás produzido por ambos os inóculos utilizados. No entanto, não foi possível estabelecer uma comparação entre eles, devido às diferentes taxas de diluição com o N_2.

Apesar da falta de dados quantitativos de H_2, este estudo preliminar investigou a possibilidade, da razão entre o ácido acético e o ácido butírico (HAc/HBu) e do nível de expressão do gene hidrogenase, funcionarem como ferramentas úteis na avaliação do desempenho das comunidades bacterianas na produção de H_2 fermentativo [DE SÁ *et al.,* 2011]. Os resultados obtidos são discutidos a seguir.

A produção de H_2 via fermentação anaeróbia é usualmente acompanhada pela formação de ácidos orgânicos voláteis (AOV) e solventes. A formação destes metabólitos intermediários indica a rota metabólica seguida pelos micro-organismos envolvidos no bioprocesso, permitindo assim um maior entendimento das condições favoráveis para produção de H_2 [KHANAL *et al.,* 2004].

A Tabela 5.9 apresenta as concentrações individuais dos AOV formados após 24 h de fermentação, utilizando o inóculo *in natura* e o inóculo pré-tratado termicamente. O conteúdo e a distribuição dos AOV sugerem que a fermentação é do tipo acética, visto a predominância de ácido acético em ambos os meios contendo inóculo *in natura* (5,31 $mmol.L^{-1}$) e inóculo pré-tratado (6,45 $mmol.L^{-1}$), quando comparados aos outros metabólitos formados. O meio fermentativo contendo inóculo *in natura* também promoveu a formação de ácido butírico (1,34 $mmol.L^{-1}$) e ácido propiônico (0,57 $mmol.L^{-1}$). Etanol (1,36 $mmol.L^{-1}$), ácido butírico (0,99 $mmol.L^{-1}$) e ácido propiônico (1,28 $mmol.L^{-1}$) foram obtidos no meio contendo inóculo pré-tratado termicamente.

Tabela 5.9: Concentração dos metabólitos formados após 24 h de fermentação utilizando inóculo *in natura* e inóculo pré-tratado termicamente.

Inóculo	Metabólitos formados ($mmol.L^{-1}$)*			
	Ácido acético	Ácido propiônico	Ácido butírico	Etanol
In natura	5,31 ± 0,01	0,57 ± 0	1,34 ± 0,03	0
Pré-tratado termicamente	6,45 ± 0,01	1,28 ± 0,01	0,99 ± 0,03	1,36 ± 0,02

*Concentração ($mmol.L^{-1}$) ± desvio padrão, n=3

Os diferentes metabólitos produzidos podem estar associados com os diferentes grupos de micro-organismos selecionados durante o pré-tratamento térmico. Este tipo de pré-tratamento do inóculo elimina micro-organismos não formadores de esporo, enquanto micro-organismos formadores de esporo sobrevivem ao choque térmico [VALDEZ-VAZQUEZ e POGGI-VARALDO, 2009]. Espécies do gênero *Clostridium*, tais como *C. butyricum*, *C. acetobutylicum*, *C. beijerinckii* e *C. thermolactium* são exemplos de micro-organismos produtores de H_2 formadores de esporo [NTAIKOU, ANTONOPOULOU e LYBERATOS, 2010]. Dependendo do tipo de espécie presente no biorreator e das condições de operação após o pré-tratamento, diferentes metabólitos podem ser formados [HAWKES *et al.,* 2002]. Chen e colaboradores (2005) ao utilizarem uma cepa de *Clostridium butyricum* isolada de lodo de esgoto para produção de H_2 observaram a predominância de ácido butírico no meio fermentativo. Khanal *et al.* (2004) relacionaram a elevada concentração de ácido propiônico no meio fermentativo à presença de micro-organismos produtores de propionato, tais como *Clostridium propionicum*, *C. arcticum* e *C. novyi.*

A produção de etanol e a elevada formação de ácido propiônico no meio contendo inóculo pré-tratado (Tabela 5.9), podem estar associadas ao aumento da pressão parcial de H_2 no biorreator [LI *et al.,* 2007]. A produção de etanol (reação 5.1) e de ácido propiônico (reação 5.2) a partir de ácido acético e H_2 são termodinamicamente favoráveis [OH, GINKEL e LOGAN, 2003; HAWKES *et al.,* 2002]. As reações 5.3 e 5.4 apresentam a formação dos metabólitos acetato e butirato e de H_2, respectivamente, a partir de um açúcar C6 (obtido na etapa de hidrólise da sacarose), [NTAIKOU, ANTONOPOULOU e LYBERATOS, 2010; WESTERMANN *et al.,* 2007]. A formação de H_2 no meio líquido, a partir do açúcar

C6 (reações 4.3 e 4.4) favorece a ocorrência das reações 5.1 e 5.2. Deste modo, apesar da pressão parcial de H_2 não ter sido determinada neste estudo, as reações 5.1, 5.2, 5.3 e 5.4 e suas respectivas energias livres de Gibbs (ΔG^0) justificam a formação do etanol e dos ácidos acético, butírico e propiônico, formados durante o processo fermentativo.

$$CH_3COOH + 2H_2 \rightarrow C_2H_5OH + H_2O$$

$$\Delta G^0 = -49{,}51 \ KJ/mol \tag{5.1}$$

$$CH_3COO^- + 3H_2 + HCO_3^- + H^+ \rightarrow CH_3CH_2COO^- + 3H_2O$$

$$\Delta G^0 = -76{,}2 \ KJ/mol \tag{5.2}$$

$$C_6H_{12}O_6 + 4H_2O \rightarrow 4H_2 + 2CH_3COO^- + 2HCO_3^- + 4H^+$$

$$\Delta G^0 = -206{,}3 \ KJ/mol \tag{5.3}$$

$$C_6H_{12}O_6 + 2H_2O \rightarrow 2H_2 + CH_3CH_2CH_2COO^- + 2HCO_3^- + 3H^+$$

$$\Delta G^0 = -254{,}8 \ KJ/mol \tag{5.4}$$

Além disso, a produção de etanol observada neste estudo pode estar relacionada ao tipo de micro-organismo presente no meio fermentativo após o pré-tratamento térmico, visto que algumas espécies de *Clostridium* podem produzir simultaneamente elevados rendimentos de H_2 e etanol [AKUTSU *et al.,* 2009].

A sacarose não foi detectada em ambos os meios, *in natura* ou pré-tratado, após 24 h de fermentação. A produção de biohidrogênio utilizando sacarose como substrato pode ser estimada através da razão entre o ácido acético e o ácido butírico (HAc/HBu) obtida durante o processo fermentativo [DE SÁ *et al.,* 2011]. Neste estudo, o meio contendo inóculo pré-tratado termicamente apresentou uma maior razão HAc/HBu (aproximadamente 7) quando comparado ao meio contendo inóculo *in natura* (aproximadamente 4). Com base nas razões HAc/HBu obtidas, pode-se atribuir a maior produção de H_2 ao meio fermentativo contendo inóculo pré-tratado termicamente. Esta atribuição está baseada em estudos da literatura que mostram

que a razão HAc/HBu pode ser correlacionada com a produção de H_2, uma vez que o aumento desta razão é acompanhado pelo aumento da produção de H_2 [HAFEZ *et al.,* 2010; WANG *et al.,* 2009; BAGHCHEHSARAEE *et al.,* 2008; KHANAL *et al.,* 2004].

Estudos prévios relatam que micro-organismos do gênero *Clostridium* são os principais responsáveis pela produção de H_2 durante a fermentação anaeróbia [AKUTSU *et al.,* 2009; SKONIECZNY e YARGEU, 2009; TOLVANEN *et al.,* 2008; HUNG *et al.,* 2008]. O desempenho de *Clostridium sp.* na produção de H_2 está relacionado a expressão das hidrogenases [HAFEZ *et al.,* 2010; WANG *et al.,* 2009; BAGHCHEHSARAEEET *et al.,* 2008; CHANG *et al.,* 2008; CHAN *et al.,* 2006]. Dentro deste contexto, um estudo de biologia molecular preliminar foi realizado, utilizando PCR com *primers* para detecção do gene 16S rRNA e do gene hidrogenase, ambos de *Clostridium sp*. A Figura 5.3 apresenta os produtos de PCR para o gene 16S rRNA com *amplicons* de 182 pares de base (A) e os produtos de PCR para o gene hidrogenase com *amplicons* de 259 pares de base (B). Como pode ser observado, a amplificação dos produtos para o gene 16S rRNA (Figura 5.3 A) e para o gene hidrogenase (Figura 5.3 B), mostram qualitativamente a presença de micro-organismos do gênero *Clostridium* e a atividade das hidrogenases, respectivamente, para todas as condições estudadas.

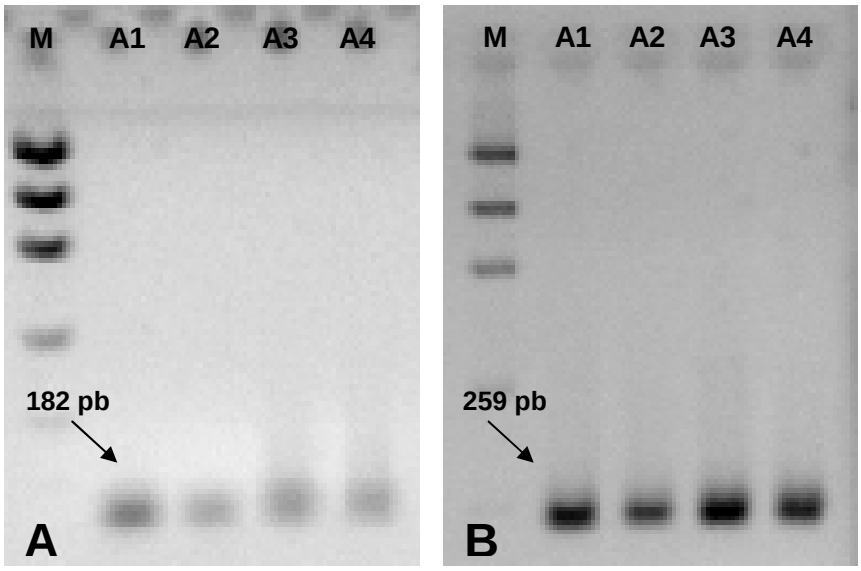

Figura 5.3: Produtos de PCR para as amplificações dos genes: (A) *Clostridium sp*. 16S rRNA e (B) hidrogenase. M = marcador *Low DNA Mass Ladder*; A1 = inóculo *in natura* antes da fermentação; A2 = inóculo pré-tratado termicamente antes da fermentação; A3 = inóculo *in natura* após 24 h de fermentação; A4 = inóculo pré-tratado termicamente após 24 h de fermentação.

Baseado nos resultados obtidos foi realizado um estudo subseqüente utilizando RT-PCR em tempo real, para se determinar o nível de expressão do gene hidrogenase (*hyd*) nas condições estudadas. Os dados quantitativos obtidos por RT-PCR em tempo real são representados na Figura 5.4.

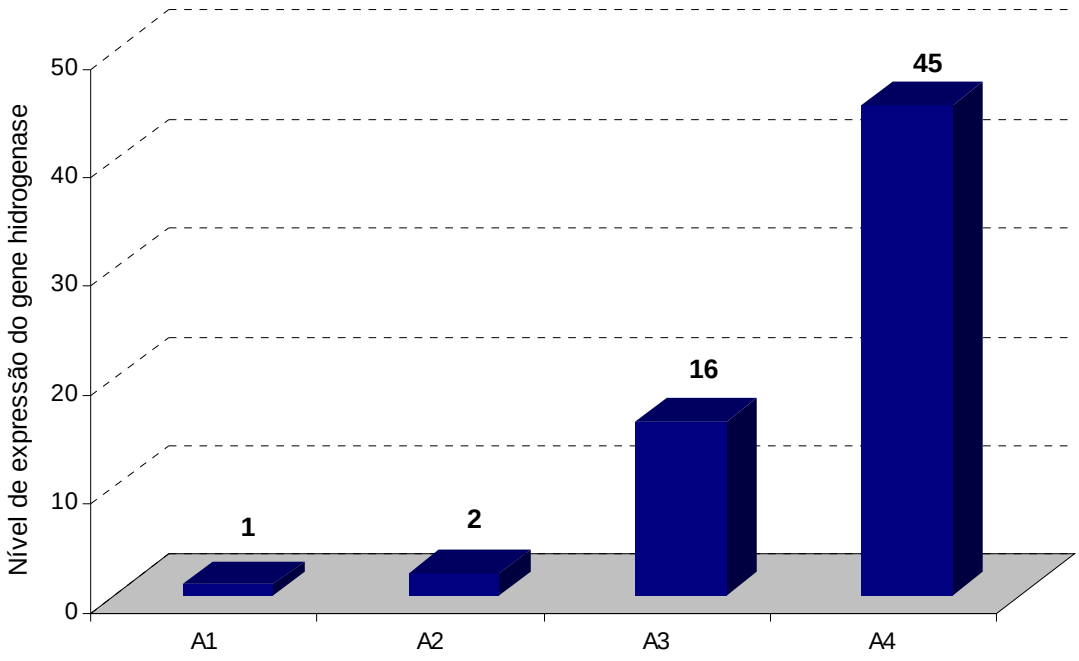

Figura 5.4: Nível de expressão do gene hidrogenase. A1 = inóculo *in natura* antes da fermentação; A2 = inóculo pré-tratado termicamente antes da fermentação; A3 = inóculo *in natura* após 24 h de fermentação; A4 = inóculo pré-tratado termicamente após 24 h de fermentação.

É possível observar que, após 24 h de fermentação, a expressão do gene hidrogenase no inóculo pré-tratado termicamente é triplicada quando comparada ao inóculo *in natura.* Este resultado, combinado com a razão HAc/HBu obtida (aproximadamente 7) para o inóculo pré-tratado termicamente, corrobora a relação direta entre a expressão do gene hidrogenase e a produção de H_2, previamente demonstradas em estudos recentes. Wang e colaboradores (2009) investigaram a relação entre o nível de expressão do gene hidrogenase e a produção de H_2 fermentativo a partir de uma nova cepa de *Clostridium butyricum* W5 e concluíram que o nível de hidrogenases nas células pode ser considerado como um avançado indicador para produção de H_2. Wang *et al.* (2008b) investigaram a correlação entre a expressão do gene hidrogenase e a produção de H_2 durante experimentos em

batelada com *Clostridium butyricum* CGS5, e concluíram que a taxa de produção de H_2 era linearmente proporcional ao nível de expressão do gene hidrogenase.

5.3. Avaliação de diferentes pré-tratamentos do inóculo para produção de H_2

Neste estudo de produção de H_2 por fermentação anaeróbia, foram avaliados três diferentes tipos de pré-tratamento do inóculo: térmico, alcalino e ácido. Além disso, utilizou-se o inóculo *in natura* para efeito comparativo e avaliação da eficiência dos diferentes pré-tratamentos testados no processo de produção de H_2. Os pré-tratamentos propostos neste estudo possuem a finalidade de inibir e/ou eliminar os micro-organismos consumidores de H_2, bem como, selecionar os micro-organismos produtores de H_2 no meio fermentativo.

A sacarose, utilizada como substrato pelas bactérias fermentativas, foi consumida, ao longo de 120 h de fermentação, pelos micro-organismos presentes nos inóculos estudados. A Figura 5.5 apresenta a cinética de consumo da sacarose no meio fermentativo.

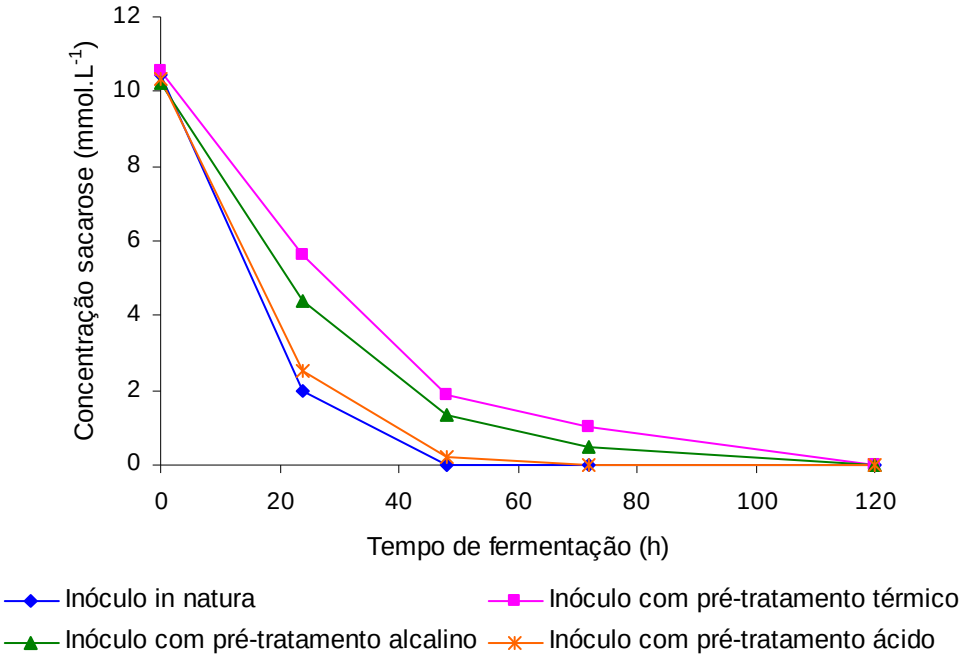

Figura 5.5: Cinética de consumo da sacarose no meio fermentativo, ao longo de 120 h de fermentação, a partir de diferentes inóculos.

Como pode ser observado na Figura 5.5, o inóculo *in natura* apresentou uma maior cinética de consumo de sacarose quando comparado aos inóculos pré-tratados. Este resultado pode estar associado ao fato do inóculo *in natura* não passar por nenhum tipo de pré-tratamento para seleção de micro-organismos, o que lhe confere uma maior população microbiana. A curva de consumo da sacarose do inóculo com pré-tratamento ácido apresenta um perfil cinético similar ao do inóculo *in natura*, inclusive no tempo necessário para total consumo da sacarose (48 h). Possivelmente, há um menor impacto deste tipo de pré-tratamento frente às bactérias fermentativas, pois estas já são habituadas à ambientes ácidos no processo natural de fermentação anaeróbia, devido à etapa da acidogênese. O inóculo pré-tratado termicamente apresenta uma menor velocidade de consumo da sacarose quando comparado aos outros dois inóculos pré-tratados; o que pode estar relacionado ao maior impacto do choque térmico frente a alterações no pH do meio fermentativo. Estes resultados podem ser confirmados pela contagem de bactérias anaeróbias no meio fermentativo: inóculo *in natura* (> 2,4 x 10^{10} NMP.mL^{-1}), inóculo com pré-tratamento térmico (2,3 x 10^{4} NMP.mL^{-1}), inóculo com pré-tratamento alcalino (4,3 x 10^{7} NMP.mL^{-1}) e inóculo com pré-tratamento ácido (> 2,4 x 10^{10} NMP.mL^{-1}).

A Figura 5.6 apresenta o rendimento máximo de H_2 obtido ao longo de 120 h de fermentação anaeróbia, utilizando inóculo *in natura* e inóculos que sofreram diferentes pré-tratamentos (térmico, alcalino e ácido). No tempo de 24 h de fermentação, não é possível observar diferenças significativas com relação à produção de H_2 pelos inóculos *in natura* e pré-tratados. Todos eles apresentaram perfis similares de aumento de produção de H_2 de 24 a 48 h de fermentação. A partir de 48 h, diferentes comportamentos são observados. O inóculo *in natura* e o inóculo com pré-tratamento alcalino apresentam seus maiores rendimentos em 48 h, 3,65 e 3,93 mol de H_2/mol de sacarose, respectivamente. A partir de 48 h, observa-se o decréscimo da produção de H_2 para ambos os inóculos, sendo o decaimento mais acentuado para o inóculo *in natura*. O inóculo com pré-tratamento ácido apresenta uma queda de 20% na produção de H_2 em 72 h, e um aumento de aproximadamente 30% em 120 h. Este tipo de pré-tratamento talvez seja interessante para processos contínuos, abrindo possibilidades para estudos posteriores. O inóculo pré-tratado termicamente apresenta os maiores rendimentos de produção de H_2 ao longo de 95 h de fermentação, sendo o rendimento máximo (4,62 mol de H_2/mol de sacarose)

obtido no tempo de 72 h. Neste tempo, o inóculo pré-tratado termicamente apresenta rendimento de H_2 46% superior ao observado no inóculo *in natura*. Levando-se em consideração o rendimento teórico máximo de até 8 mol de H_2/mol de sacarose com a respectiva formação de ácido acético (tabela 3.6), é possível observar os seguintes rendimentos máximos para os inóculos testados: *in natura* (46% em 48h), térmico (58% em 72h), alcalino (49% em 48h) e ácido (48% em 120h). Deste modo, dentro das condições estudadas, o pré-tratamento térmico do inóculo, apresentou-se como o mais promissor na produção de H_2.

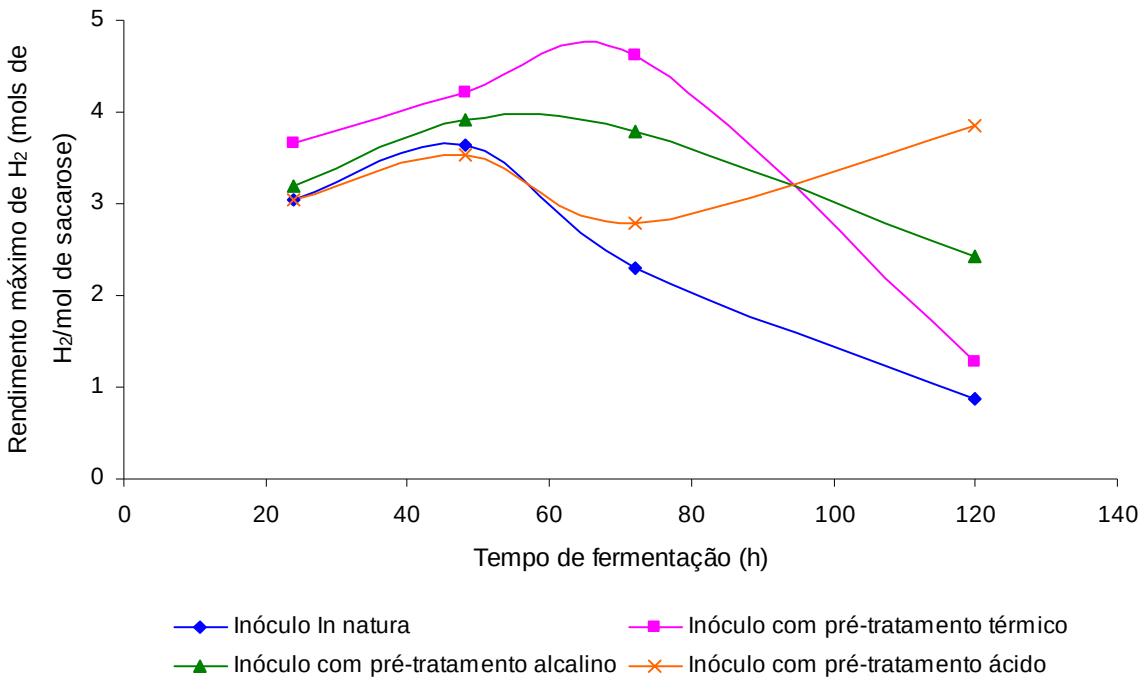

Figura 5.6: Rendimentos máximos de H_2 obtidos ao longo de 120 h de fermentação utilizando inóculos *in natura* e com pré-tratamento (térmico, alcalino e ácido).

Diferentes métodos de pré-tratamento do inóculo têm sido investigados de modo a maximizar a produção de H_2. Ren e colaboradores (2008) testaram os pré-tratamentos térmico, ácido, alcalino e de aeração para enriquecimento das bactérias produtoras de H_2 a partir de cultura mista utilizando glicose como substrato. Os autores observaram que os pré-tratamentos térmico, ácido e de aeração inibiram a atividade metanogênica, fato este não observado para o pré-tratamento alcalino. O rendimento máximo de H_2 (1,96 mol de H_2/mol de glicose) foi obtido para o pré-tratamento de aeração. Wang e Wan (2008) verificaram a eficiência de produção de

H_2 a partir de cinco diferentes tipos de pré-tratamento do inóculo: ácido, alcalino, térmico, aeração e através da adição de clorofórmio. Os resultados experimentais mostraram que a 35^0C, pH inicial 7 e utilizando glicose como substrato, o maior rendimento de H_2 foi obtido com o inóculo pré-tratado termicamente (1,78 mol de H_2/mol de glicose). O-Thong *et al.* (2009) avaliaram cinco diferentes pré-tratamentos do inóculo para produção de H_2: alcalino, ácido, adição de ácido 2-bromoetanosulfônico (BESA), choque de carga e térmico. Os resultados mostraram que o pré-tratamento de choque de carga foi o mais eficiente para o enriquecimento das bactérias termofílicas produtoras de H_2, obtendo-se um rendimento máximo de 1,96 mol de H_2/mol de hexose. Mu e colaboradores (2007) testaram os pré-tratamentos térmico, ácido e alcalino para inibição da atividade metanogênica em cultura mista. Os autores observaram que o maior rendimento de H_2 foi obtido para inóculo pré-tratado termicamente, enquanto o menor rendimento foi obtido para o inóculo com pré-tratamento alcalino, 2 mol de H_2/mol de glicose e 0,48 mol de H_2/mol de glicose, respectivamente. Zhu e Béland (2006) avaliaram diferentes pré-tratamentos do inóculo através de dois estágios sucessivos de cultivo em meio contendo sacarose. Os pré-tratamentos avaliados foram: térmico, aeração, ácido, alcalino, adição de BESA e adição de iodopropano. O maior rendimento de H_2 foi obtido no segundo estágio de cultivo para o inóculo com pré-tratamento alcalino, 6,12 mol e H_2/mol de sacarose.

Como pode ser observado através dos estudos relatados acima, o pré-tratamento ótimo difere para cada estudo. Isto pode estar associado a inúmeros fatores, dentre eles, o tipo de inóculo utilizado e as condições experimentais durante o pré-tratamento e a fermentação [REN *et al.,* 2008].

A Tabela 5.10 apresenta um comparativo entre os estudos mencionados acima e o presente trabalho sobre avaliação de diferentes métodos de pré-tratamento do inóculo para produção de H_2 utilizando cultura mista.

Tabela 5.10: Comparativo entre estudos de métodos de pré-tratamento de inóculo para produção de H_2 fermentativo.

Inóculo	Substrato	Modo reator	pH	Temperatura (^{0}C)	Tempo de fermentação (h)	Pré-tratamentos testados	Pré-tratamento ótimo	Rendimento máximo de H_2	Referências
Lodo de planta de tratamento de águas residuais municipais	Glicose	Batelada	-	35	50	Térmico, ácido, alcalino e aeração	Aeração	1,96 mol de H_2/mol de glicose	REN *et al.,* 2008
Lodo de digestor anaeróbio de tratamento de esgoto	Glicose	Batelada	pH inicial 7	35	36	Térmico, ácido, alcalino, químico, adição de clorofórmio e aeração	Térmico	1,78 mol de H_2/mol de glicose	WANG e WAN, 2008
Lodo anaeróbio de reator de produção de biogás de fábrica de óleo de palma	Sacarose	Batelada	pH inicial 5,5	60	-	Alcalino, ácido, adição de BESA*, choque de carga e térmico	Choque de carga	1,96 mol de H_2/mol de hexose	O-THONG, PRASERTAN e BIRKELAND, 2009
Lodo anaeróbio de reator de tratamento de efluente de processamento de soja	Sacarose	Batelada	pH controlado em 5,5	35	60	Térmico, alcalino e ácido	Térmico	4 mol de H_2/mol de sacarose	MU, YU e WANG, 2007
Lodo de digestor anaeróbio de tratamento de esgoto	Sacarose	Batelada	-	35	1ª batelada: 120 2ª batelada: 120	Térmico, aeração, ácido, alcalino, adição de iodopropano e adição de BESA*	Alcalino	6,12 mol de H_2/mol de sacarose	ZHU e BÉLAND, 2006
Lodo anaeróbio de estação de tratamento de esgoto	**Sacarose**	**Batelada**	**pH inicial 5,5**	**35**	**120**	**Térmico, alcalino e ácido**	**Térmico**	**4,62 mol de H_2/mol de sacarose**	**NESTE TRABALHO**

*BESA = ácido 2-bromoetanolsulfônico

Na avaliação dos metabólitos produzidos durante o processo fermentativo foi possível observar apenas a formação dos ácidos acético e butírico, sugerindo deste modo a fermentação do tipo butírica para todos os inóculos utilizados nesta etapa (*in natura* e pré-tratados). A diferença entre a fermentação do tipo butírica obtida neste estudo e a fermentação do tipo acética obtida no estudo preliminar de produção de H_2 (item 5.2), está associada aos diferentes inóculos utilizados (inóculos de diferentes estações de tratamento de esgoto), bem como às diferentes condições experimentais adotadas (concentração do substrato, meio nutricional e volume reacional).

A Tabela 5.11 apresenta as concentrações dos ácidos acético (HAc) e butírico (HBu) e as razões HAc/HBu obtidas no processo fermentativo utilizando os inóculos *in natura* e com pré-tratamento (térmico, alcalino e ácido). É possível observar uma correlação entre as razões HAc/HBu do inóculo *in natura* e as razões HAc/HBu dos inóculos pré-tratados. Os inóculos com pré-tratamento térmico e alcalino apresentam valores de HAc/HBu sempre maiores que os valores de HAc/HBu do inóculo *in natura*, ao longo das 120 h de fermentação. Este mesmo comportamento é observado na análise dos rendimentos máximos de H_2, onde os inóculos com pré-tratamento térmico e alcalino apresentam valores de rendimento máximo de H_2 sempre superiores aos valores do inóculo *in natura*, no decorrer das 120 h de fermentação. Os valores de HAc/HBu para o inóculo com pré-tratamento ácido em 24 e 48 h são similares aos valores de HAc/HBu do inóculo *in natura*, e nos tempos de 72 e 120 h os valores são superiores. Este mesmo comportamento é observado na análise dos rendimentos máximos de H_2 obtidos para estes dois tipos de inóculos nos tempos estabelecidos.

Tabela 5.11: Concentração dos metabólitos formados durante 120 h de fermentação utilizando inóculo *in natura* e inóculos com pré-tratamento (térmico alcalino e ácido).

Tempo de fermentação (h)	Inóculo *In natura*				Inóculo com pré-tratamento térmico			
	HAc*	HBu*	HAc/HBu*	H_2**	HAc*	HBu*	HAc/HBu*	H_2**
24	10,29	9,91	1,04	3,04	16,82	10,31	1,63	3,65
48	10,95	13,40	0,82	3,65	17,48	13,66	1,28	4,22
72	7,14	10,05	0,71	2,30	16,05	14,08	1,14	4,62
120	9,86	10,98	0,90	0,87	13,06	13,96	0,94	1,27
Tempo de fermentação (h)	Inóculo com pré-tratamento alcalino				Inóculo com pré-tratamento ácido			
	HAc*	HBu*	HAc/HBu*	H_2**	HAc*	HBu*	HAc/HBu*	H_2**
24	16,28	9,38	1,74	3,19	8,02	7,36	1,09	3,05
48	19,03	9,67	1,97	3,93	10,97	13,74	0,80	3,54
72	20,51	11,26	1,82	3,78	13,65	15,81	0,86	2,79
120	16,76	15,08	1,11	2,42	8,99	8,44	1,06	3,85

*Concentração = $mmol.L^{-1}$; **Rendimento máximo de H_2 = mol de H_2/mol de sacarose

Durante a avaliação dos diferentes métodos de pré-tratamento do inóculo, observou-se que o rendimento máximo de H_2 foi obtido a partir do inóculo pré-tratado termicamente no tempo de 72 h de fermentação (4,62 mol de H_2/mol de sacarose). Baseado neste resultado, um estudo de biologia molecular foi realizado, utilizando PCR com *primers* para detecção do gene 16S rRNA e do gene hidrogenase, ambos de *Clostridium sp*. A Figura 5.7 apresenta os produtos de PCR para o gene 16S rRNA com *amplicons* de 182 pares de base, para o inóculo *in natura* e os inóculos após os pré-tratamentos (A) e para as amostras no tempo de fermentação de 72 h (B); e os produtos de PCR para o gene hidrogenase com *amplicons* de 259 pares de base, para o inóculo *in natura* e os inóculos após os pré-tratamentos (C) e para as amostras no tempo de fermentação de 72 h (D).

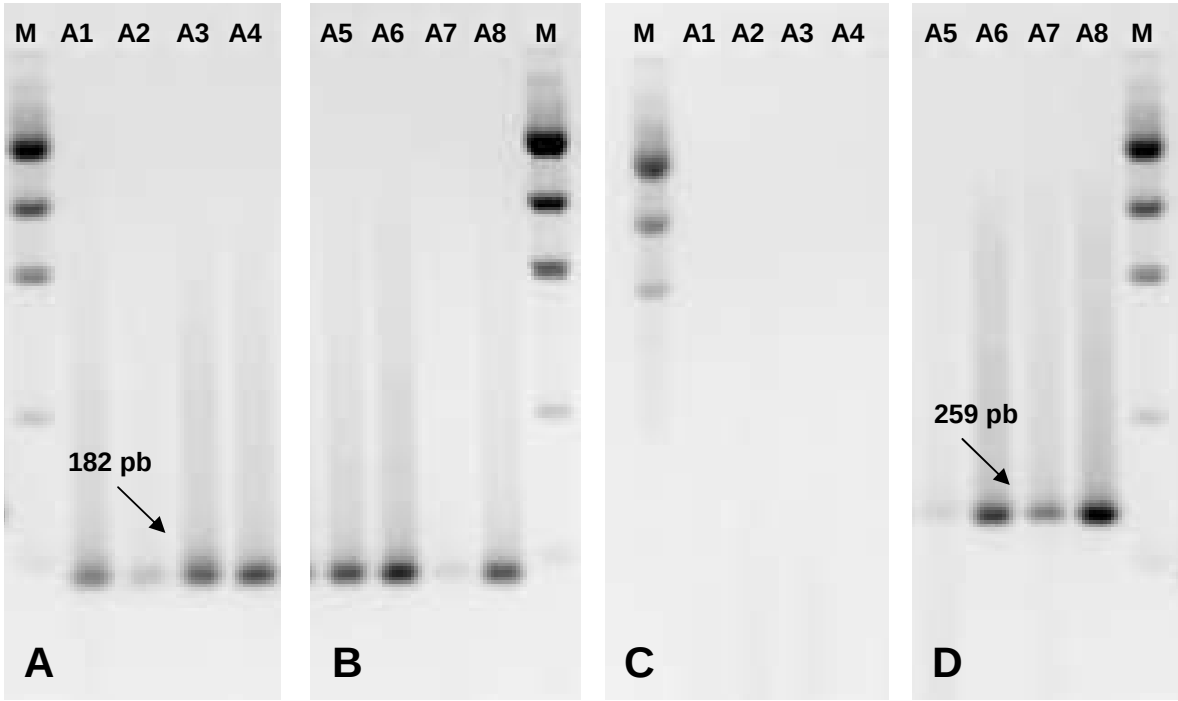

Figura 5.7: Produtos de PCR para as amplificações dos genes: (A) e (B) *Clostridium sp*. 16S rRNA e (C) e (D) hidrogenase. M = marcador *Low DNA Mass Ladder*; A1 = inóculo *in natura*; A2 = inóculo após pré-tratamento ácido; A3 = inóculo após pré-tratamento alcalino; A4 = inóculo após pré-tratamento térmico; A5 = inóculo *in natura* após 72 h de fermentação; A6 = inóculo com pré-tratamento ácido após 72 h de fermentação; A7 = inóculo com pré-tratamento alcalino após 72 h de fermentação e A8 = inóculo com pré-tratamento térmico após 72 h de fermentação.

Como pode ser observado, a amplificação dos produtos para o gene 16S rRNA (Figura 5.7 A e B) mostram qualitativamente a presença de micro-organismos do gênero *Clostridium* para todas as condições estudadas (inóculo *in natura*, inóculos após os pré-tratamentos e amostras após 72 h de fermentação). A Figura 5.7 D apresenta qualitativamente a atividade das hidrogenases para as amostras após 72 h de fermentação. Diferente comportamento é observado para o inóculo *in natura* e para os inóculos após pré-tratamento, onde praticamente não se observa a atividade das hidrogenases (Figura 5.7 C). A não detecção da atividade das hidrogenases nos inóculos após os respectivos pré-tratamentos (ácido, alcalino e térmico) pode estar associada à presença dos micro-organismos na forma de endósporos. Já o inóculo *in natura* não apresenta a atividade hidrogenásica relevante, possivelmente devido a presença de outros micro-organismos competindo com a rota de produção de H_2.

Baseado nos resultados obtidos um estudo subseqüente utilizando RT-PCR em tempo real foi realizado, para se determinar o nível de expressão do gene hidrogenase (*hyd*) nas amostras após 72 h de fermentação. Os dados quantitativos obtidos por RT-PCR em tempo real são representados na Figura 5.8.

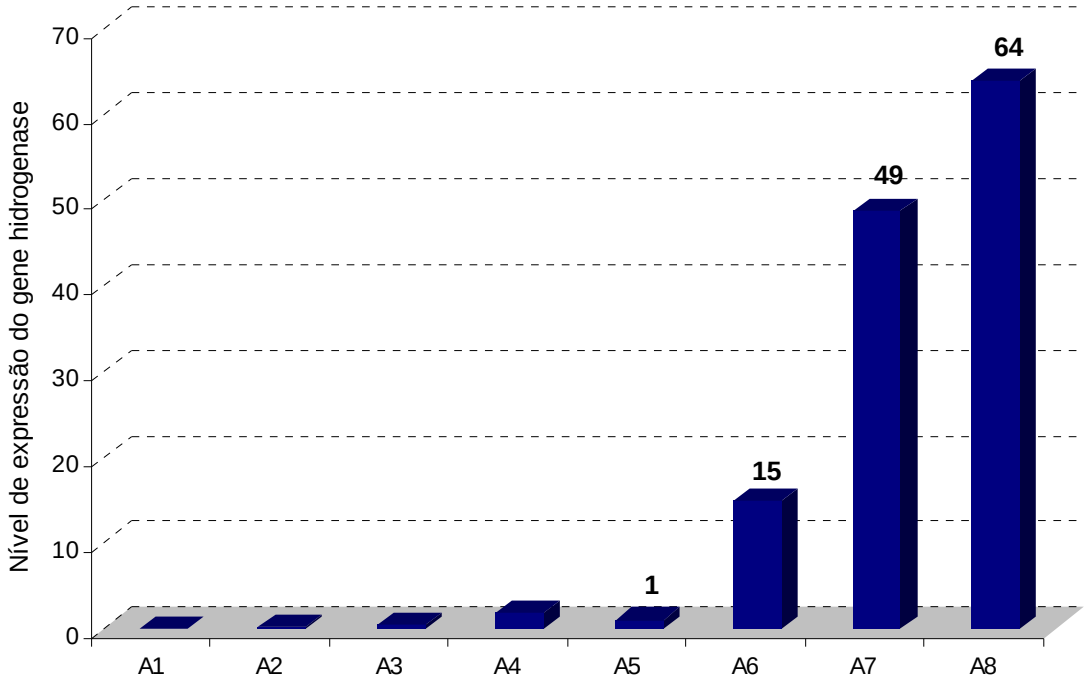

Figura 5.8: Nível de expressão do gene hidrogenase. A1 = inóculo *in natura*; A2 = inóculo após pré-tratamento ácido; A3 = inóculo após pré-tratamento alcalino; A4 = inóculo após pré-tratamento térmico; A5 = inóculo *in natura* após 72 h de fermentação; A6 = inóculo com pré-tratamento ácido após 72 h de fermentação; A7 = inóculo com pré-tratamento alcalino após 72 h de fermentação e A8 = inóculo com pré-tratamento térmico após 72 h de fermentação.

Os dados quantitativos obtidos por RT-PCR em tempo real confirmam os resultados já observados na Figura 5.7 C, onde o nível de expressão do gene hidrogenase é relativamente pequeno para o inóculo *in natura* (A1) e para os inóculos após pré-tratamento ácido (A2), alcalino (A3) e térmico (A4).

Todas as amostras dos inóculos pré-tratados após 72 h de fermentação (A6, A7 e A8) apresentaram acentuados níveis de expressão do gene hidrogenase. O inóculo pré-tratado termicamente (A8) apresentou o maior nível de expressão, aproximadamente 64 vezes maior que o inóculo *in natura* (A5). Menores níveis de expressão foram observados para o inóculo com pré-tratamento ácido e para o inóculo com pré-tratamento alcalino, 15 e 49 vezes maior que o inóculo *in natura*,

respectivamente. Comportamentos semelhantes foram verificados com relação aos rendimentos máximos de H_2 obtidos pelos inóculos *in natura* e pré-tratados no tempo de 72 h: térmico (4,62 mol de H_2/mol de sacarose) > alcalino (3,78 mol de H_2/mol de sacarose) > ácido (2,79 mol de H_2/mol de sacarose) > *in natura* (2,30 mol de H_2/mol de sacarose). Estes resultados demonstram a eficiência dos pré-tratamentos efetuados para a seleção de micro-organismos produtores de H_2 e corroboram a relação direta entre a expressão do gene hidrogenase e a produção de H_2, previamente demonstradas em estudos recentes. Chang *et al.* (2006) quantificaram o nível de expressão do gene hidrogenase clostridial ao longo do processo fermentativo, e observaram que a expressão do *hyd* no sistema era positivamente relacionada com a produção de H_2.

5.4. Avaliação de diferentes substratos para produção de H_2

Diferentes substratos foram avaliados para a produção de H_2 a partir do processo de fermentação anaeróbia: sacarose, glicose, frutose, xilose e glicerina. A escolha inicial em se utilizar a sacarose como substrato foi devido a preferência dos micro-organismos fermentativos por carboidratos, permitindo deste modo, um maior entendimento sobre o processo envolvido na geração de H_2. Glicose e frutose constituem produtos de hidrólise da sacarose, os quais também são utilizados para produção de H_2. O interesse na avaliação da produção de H_2 utilizando a xilose e a glicerina como substrato está baseado no fato destes produtos serem materiais residuais dos processos de produção do etanol de segunda geração (etanol 2G) e biodiesel, respectivamente. A utilização de materiais residuais de outros processos energéticos para produção de biohidrogênio constitui uma idéia bastante atraente do ponto de vista da minimização de resíduos para produção de um combustível baseado em fontes renováveis.

Neste estudo, utilizou-se o inóculo pré-tratado termicamente (100^0C por 60 min) e o tempo de fermentação de 72 h, por terem sido as condições experimentais onde se obteve o maior rendimento de H_2 no estudo realizado anteriormente de avaliação dos diferentes métodos de pré-tratamento do inóculo (item 5.3). Neste ensaio, utilizou-se a xilose nas concentrações de 28,6 mmol.L^{-1} (xilose 1) e 57,1 mmol.L^{-1} (xilose 2). Diferentes concentrações de xilose foram testadas tendo como objetivo um maior rendimento de H_2. Além disso, a sacarose foi testada com dois

tipos de inóculos: o inóculo pré-tratado termicamente (sacarose 1) e o inóculo pré-tratado termicamente já utilizado em outro processo fermentativo (sacarose 2). O objetivo de se utilizar um inóculo já adaptado se baseou na tentativa de se trabalhar com culturas produtoras de H_2 pré-selecionadas, visto que o inóculo já havia sido pré-tratado termicamente em experimento anterior.

A Figura 5.9 apresenta as porcentagens de degradação dos respectivos substratos utilizados para produção de H_2 em 72 h de fermentação.

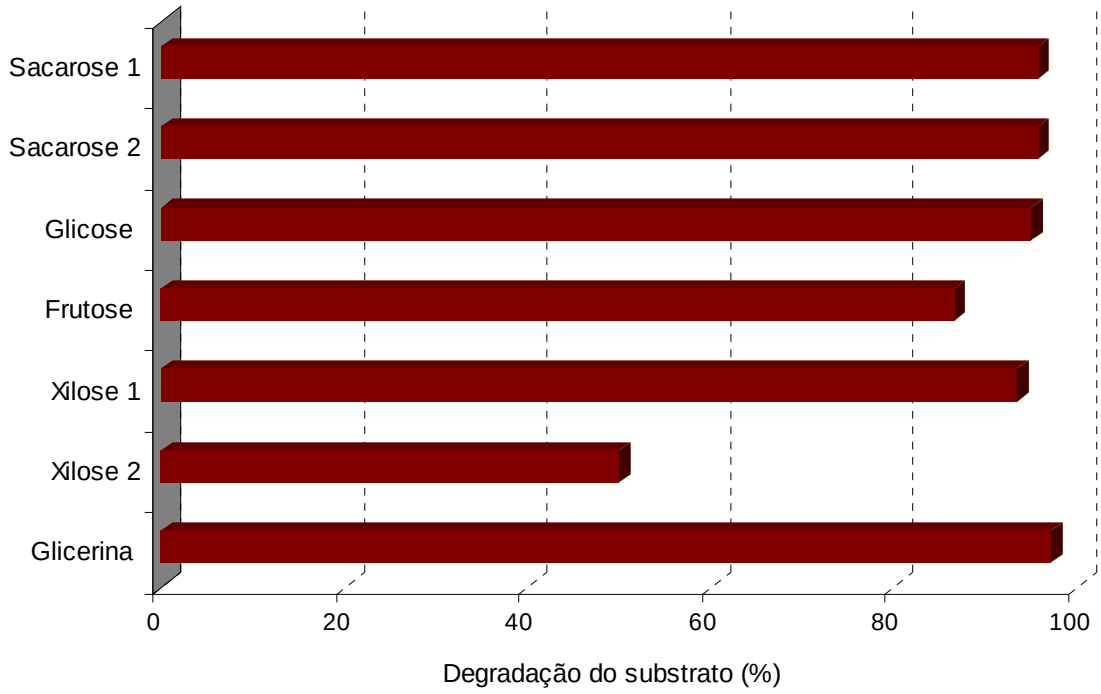

Figura 5.9: Porcentagem de degradação dos diferentes substratos utilizados para produção de H_2 em 72 h de fermentação utilizando inoculo pré-tratado termicamente. Sacarose 1 = concentração de 11,8 $mmol.L^{-1}$ utilizando inóculo não adaptado anteriormente; Sacarose 2 = concentração de 11,8 $mmol.L^{-1}$ utilizando inóculo adaptado anteriormente (reciclo do inóculo); Glicose = concentração de 25,0 $mmol.L^{-1}$; Frutose = concentração de 22,6 $mmol.L^{-1}$; Xilose 1 = concentração de 28,6 $mmol.L^{-1}$; Xilose 2 = concentração de 57,1 $mmol.L^{-1}$ e Glicerina = concentração de 46,6 $mmol.L^{-1}$.

Através da Figura 5.9, é possível observar que tanto o meio contendo sacarose 1 (inóculo não adaptado anteriormente) como o meio contendo sacarose 2 (inóculo adaptado anteriormente) apresentaram aproximadamente 96% de consumo do substrato. O meio contendo glicose obteve porcentagem de consumo similar (95%) aos meios contendo sacarose como substrato. Aproximadamente 87% da frutose foi consumida em 72 h de fermentação. Os meios contendo xilose 1

(concentração xilose = 28,6 mmol.L^{-1}) e xilose 2 (concentração xilose = 57,1 mmol.L^{-1}) apresentaram porcentagens de degradação bem distintas, 93% e 50%, respectivamente. A glicerina foi praticamente consumida (97%) durante o processo fermentativo.

Com relação aos metabólitos produzidos ao longo de 72 h de fermentação, observou-se apenas a formação dos ácidos acético e butírico em todos os casos, sugerindo deste modo a fermentação do tipo butírica para todos os meios contendo os diferentes substratos. A Figura 5.10 apresenta as proporções dos ácidos acético e butírico obtidas para os meios fermentativos contendo diferentes substratos. A maior concentração dos ácidos acético e butírico observada na sacarose 2 é devido a utilização de um inóculo oriundo de outro processo fermentativo que envolveu a produção deste dois ácidos (reciclo de inóculo).

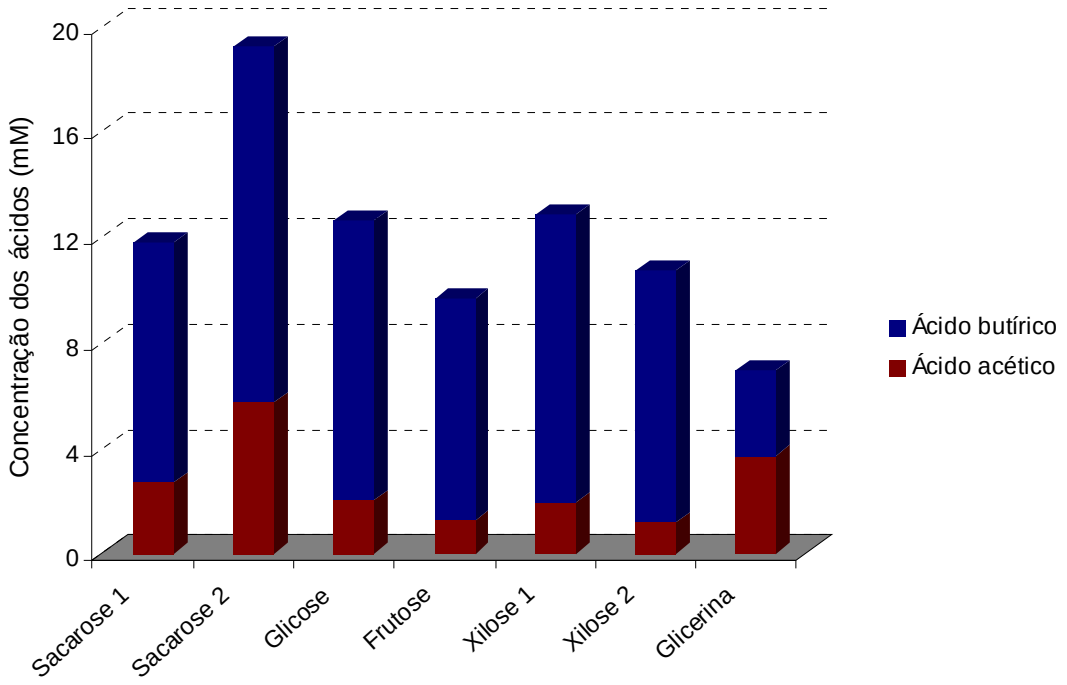

Figura 5.10: Proporções entre os ácidos acético e butírico obtidas para os meios fermentativos contendo diferentes substratos para produção de H_2 em 72 h utilizando inóculo pré-tratado termicamente. Sacarose 1 = concentração de 11,8 mmol.L^{-1} utilizando inóculo não adaptado anteriormente; Sacarose 2 = concentração de 11,8 mmol.L^{-1} utilizando inóculo adaptado anteriormente (reciclo do inóculo); Glicose = concentração de 25,0 mmol.L^{-1}; Frutose = concentração de 22,6 mmol.L^{-1}; Xilose 1 = concentração de 28,6 mmol.L^{-1}; Xilose 2 = concentração de 57,1 mmol.L^{-1} e Glicerina = concentração de 46,6 mmol.L^{-1}.

No meio fermentativo contendo glicerina como substrato, foi observada a formação de outro metabólito além dos ácidos acético e butírico. O metabólito formado apresenta um tempo de retenção (t_R = 10,4 minutos) muito próximo ao tempo de retenção do composto 1,2-propanodiol (t_R = 10,1 minutos). Há indícios de que o composto formado seja o 1,3-propanodiol, no entanto, a confirmação não pôde ser realizada devido a ausência deste padrão no laboratório. A Figura 5.11 apresenta os cromatogramas obtidos para o meio contendo glicerina como substrato no tempo de 72 h (A) e para o padrão de 1,2-propanodiol (B).

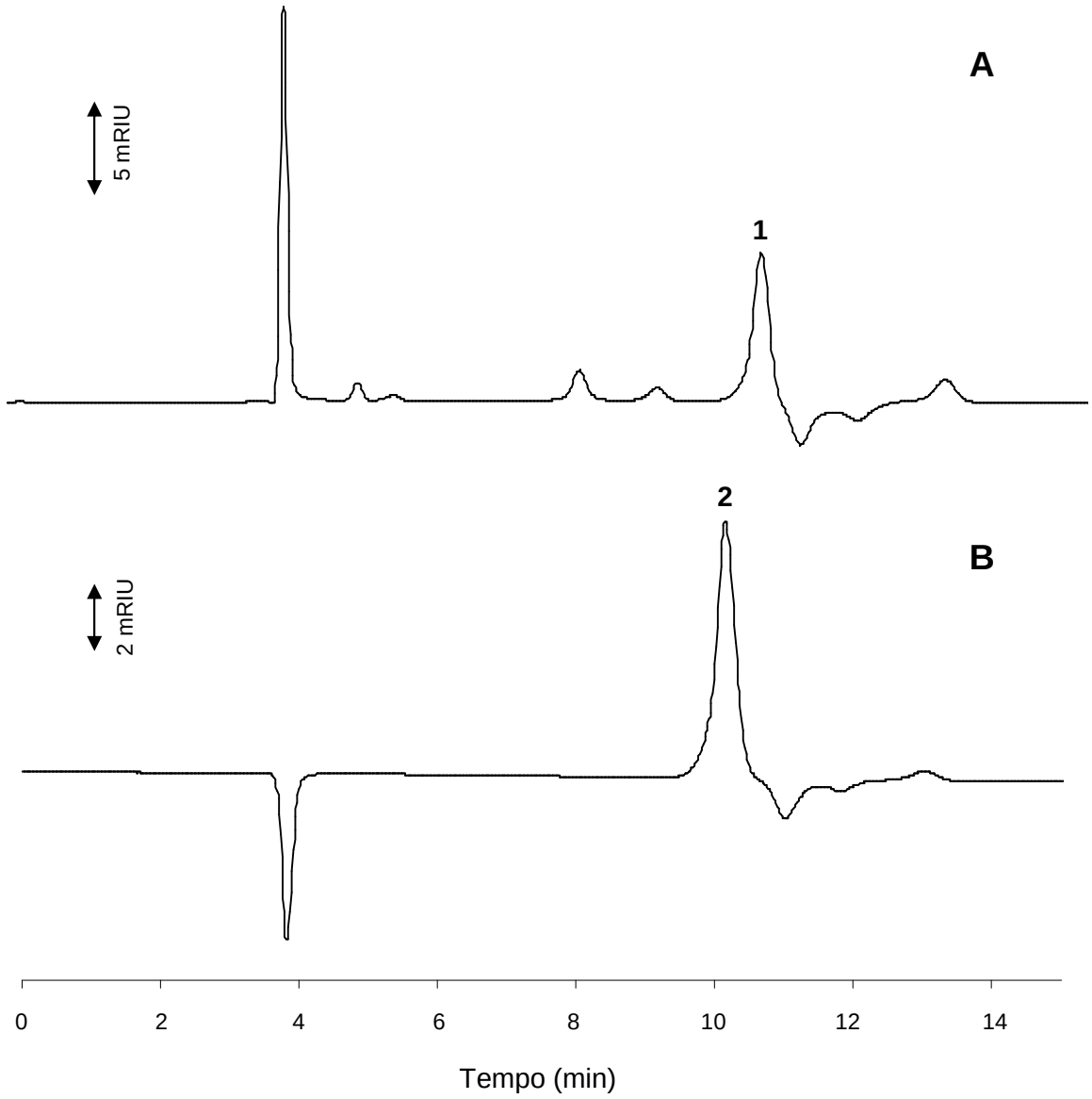

Figura 5.11: Cromatogramas obtidos para análise do meio contendo glicerina como substrato. A = Cromatograma do meio contendo glicerina como substrato após 72 h de fermentação; B = Cromatograma do padrão 1,2-propanodiol 5 mmol.L^{-1}; 1 = Metabólito formado; 2 = Padrão 1,2-propanodiol 5 mmol.L^{-1}.

A sugestão do 1,3-propanodiol baseou-se no estudo realizado por Akutsu *et al.* (2009). Neste estudo, os autores investigaram o efeito do pré-tratamento térmico do inóculo na produção de H_2 utilizando glicerina como substrato. Foi utilizada uma cultura mista, na qual espécies do gênero *Clostridium* eram dominantes no meio fermentativo. Os autores observaram um rendimento máximo de 38,1 mL de H_2/g DQO de glicerina e o 1,3-propanodiol como principal subproduto da fermentação. Esta atribuição foi baseada na rota metabólica do *Clostridium butyricum*, na qual ele degrada a glicerina em 1,3-propanodiol ou em uma variedade de subprodutos via piruvato (Figura 5.12). Os autores sugeriram que o inóculo pré-tratado termicamente favorece a produção simultânea de H_2 e 1,3-propanodiol, em virtude de espécies do gênero *Clostridium*, selecionadas durante o pré-tratamento, serem capazes de produzir ambas substâncias [AKUTSU *et al.,* 2009].

A produção biológica de 1,3-propanodiol recentemente tem despertado grande interesse, devido a funcionalidade deste composto como fonte de materiais poliméricos para as indústrias químicas devido as suas características especiais, tais como alta biodegradabilidade [TEMUDO *et al.,* 2008]. Atualmente, ele é utilizado em resinas, argamassas e tintas [SELEMBO *et al*., 2009]. Até o presente momento, vários tipos de micro-organismos, incluindo os do gênero *Clostridium*, tem sido investigados para produção do 1,3-propanodiol. Por exemplo, *Clostridium acetobutylicum* e o *Clostridium butyricum* são relatados como produtores de 0,54-0,62 e 0,63-0,68 mol de 1,3-propanodiol/mol de glicerol, respectivamente [AKUTSU *et al.,* 2009].

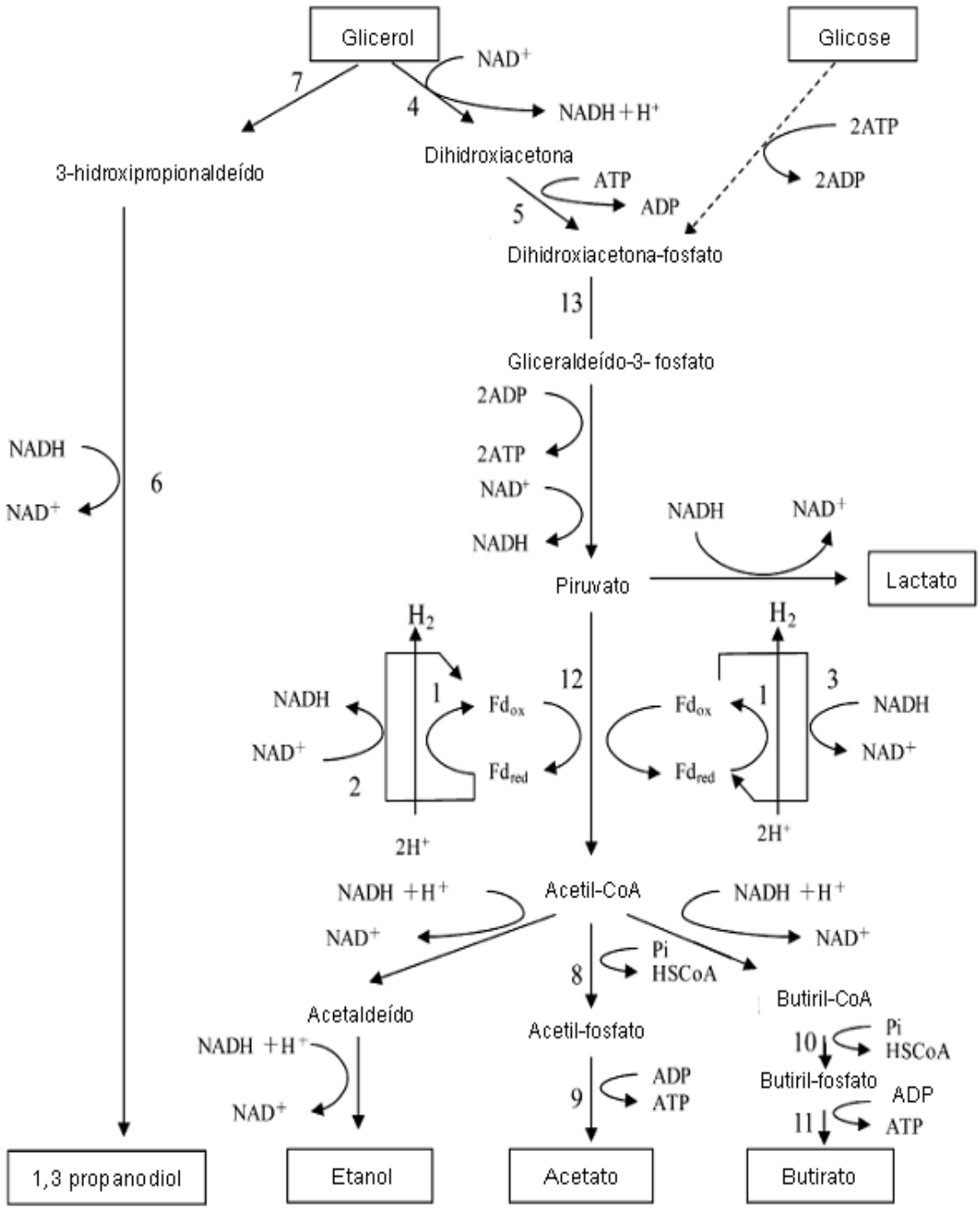

Figura 5.12: Rota metabólica do *Clostridium butyricum* a partir do glicerol [AKUTSU *et al.,* 2009]. 1 = hidrogenase; 2 = Ferredoxina-NAD(P)$^+$-redutase; 3 = NAD(P)H-ferredoxina redutase; 4 = glicerol desidrogenase; 5 = DHA quinase; 6 = 1,3-propanodiol desidrogenase; 7 = glicerol desidratase; 8 = fosfotransacetilase; 9 = acetato linase; 10 = fosfotransbutilase; 11 = butirato quinase;12 = piruvato-ferredoxina oxirredutase; 13 = gliceraldeido-3-fosfato desidrogenase.

A Figura 5.13 apresenta os rendimentos máximos de H_2 obtidos para os diferentes substratos testados.

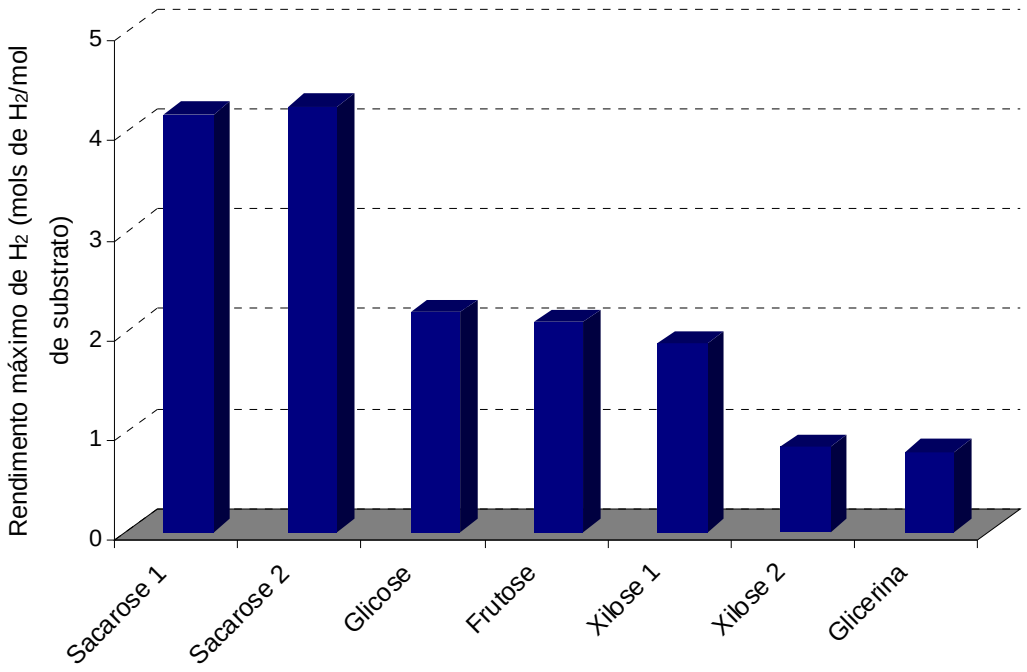

Figura 5.13: Rendimentos máximos de H_2 para os diferentes substratos utilizados em 72 h de fermentação e utilizando inoculo pré-tratado termicamente. Sacarose 1 = concentração de 10 $g.L^{-1}$ utilizando inóculo não adaptado anteriormente; Sacarose 1 = concentração de 11,8 $mmol.L^{-1}$ utilizando inóculo não adaptado anteriormente; Sacarose 2 = concentração de 11,8 $mmol.L^{-1}$ utilizando inóculo adaptado anteriormente (reciclo do inóculo); Glicose = concentração de 25,0 $mmol.L^{-1}$; Frutose = concentração de 22,6 $mmol.L^{-1}$; Xilose 1 = concentração de 28,6 $mmol.L^{-1}$; Xilose 2 = concentração de 57,1 $mmol.L^{-1}$ e Glicerina = concentração de 46,6 $mmol.L^{-1}$.

Os meios fermentativos contendo sacarose como substrato apresentaram os maiores rendimentos de H_2, aproximadamente 4,17 e 4,24 mol de H_2/mol de sacarose, para sacarose 1 e sacarose 2, respectivamente. Estes resultados, associados aos resultados similares obtidos para o consumo da sacarose (aproximadamente 96% de consumo para ambos os meios, sacarose 1 e sacarose 2) sugerem a possibilidade de utilização de reuso da biomassa durante o processo fermentativo para produção de H_2.

Os meios que utilizaram glicose e frutose como substrato apresentaram rendimentos de H_2 similares, 2,19 e 2,09 mol de H_2/mol de substrato, respectivamente. Aproximadamente metade do valor obtido quando se utiliza sacarose, mostrando coerência entre os resultados obtidos.

A utilização da xilose como substrato para produção de H_2 mostra-se tecnicamente interessante, visto que o rendimento obtido para xilose 1 (concentração igual a 28,6 mmol.L^{-1}), 1,88 mol de H_2/mol de xilose, é próximo ao rendimento obtido pela glicose (2,19 mol de H_2/mol de glicose). Este resultado pode ser explicado através da Figura 5.14, que mostra a rota metabólica utilizada pelos micro-organismos do gênero *Clostridium* na conversão de hexoses e pentoses em H_2, ácidos orgânicos e solventes. Estes micro-organismos são capazes de fermentar pentoses (por exemplo, xilose) em pentose-5-fosfato e em seguida, em frutose-6-fosfato e gliceraldeído-3-fosfato, os quais são produtos intermediários da via glicolítica [VALDEZ-VAZQUEZ e POGGI-VARALDO, 2009].

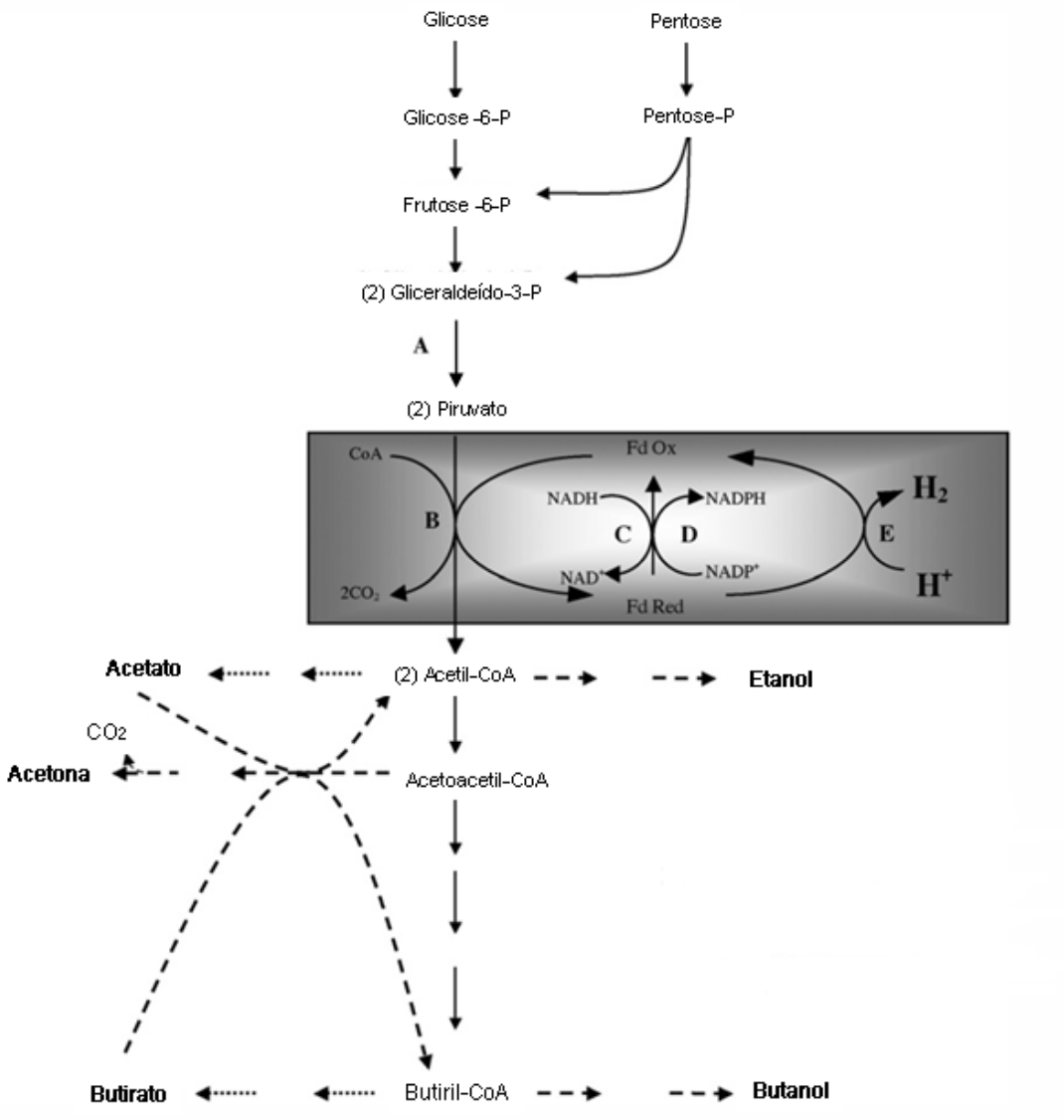

Figura 5.14: Rota metabólica utilizada pelos micro-organismos do gênero *Clostridium* [Adaptado VALDEZ-VAZQUEZ e POGGI-VARALDO, 2009].

Na tentativa de se obter maiores rendimentos de H_2 a partir da xilose, utilizou-se uma solução de xilose com uma concentração duplicada (xilose 2 – concentração de 57,1 mmol.L^{-1}). No entanto, é possível observar que quando se utilizou uma maior concentração da xilose, o rendimento de H_2 praticamente caiu pela metade, de 1,88 para 0,85 mol de H_2/mol de xilose. Resultados similares foram obtidos por Lin e Cheng (2006) ao analisarem o efeito da concentração da xilose na produção de H_2 a partir de uma cultura mista. Diferentes concentrações de xilose (10 a 100 g de DQO.L^{-1}) foram utilizadas e a maior produção de H_2 ocorreu com o substrato na concentração de 20 g de DQO.L^{-1}. Os autores sugeriram que a fermentação para produção de H_2 utilizando xilose pode ser inibida pela concentração do substrato.

O menor rendimento de H_2 obtido, 0,80 mol de H_2/mol de substrato, foi observado ao se utilizar a glicerina como substrato. Resultados comparáveis têm sido obtidos na literatura. Ngo e colaboradores (2011) estudaram o processo de produção de H_2 a partir de uma bactéria termofílica, *Thermotoga neapolitana* DMS 4359 utilizando glicerina pura e glicerina residual (oriunda do processo de produção do biodiesel) como substratos. Os maiores rendimentos de H_2 foram obtidos no tempo de 49 h de fermentação para ambos os inóculos, 1,02 e 1,28 mol de H_2/mol de glicerina, para a glicerina pura e para a glicerina residual, respectivamente. Selembo *et al.* (2009) investigaram a produção de H_2 a partir de uma cultura mista pré-tratada termicamente utilizando glicerina como substrato. Rendimentos similares foram obtidos para a glicerina pura e para a glicerina residual, 0,28 e 0,31 mol de H_2/mol de glicerina consumida, respectivamente.

Baseado nos rendimentos teóricos máximos de até 8 mol de H_2/mol de sacarose, 4 mol de H_2/mol de açúcar C6, 6 mol de H_2/mol de açúcar C5 e 3 mol de H_2/mol de glicerina, com a respectiva formação de ácido acético em todos os casos, é possível observar bons rendimentos da produção de H_2 para os diferentes substratos testados: 52% para sacarose 1, 53% para sacarose 2, 55% para glicose, 52% para frutose, 31% para xilose 1, 15% para xilose 2 e 27% para glicerina.

A Tabela 5.12 apresenta diferentes substratos utilizados para produção de H_2 fermentativo a partir de culturas mistas. É possível observar através desta tabela, que os rendimentos de H_2 obtidos neste trabalho são comparáveis aos valores descritos na literatura.

Tabela 5.12: Diferentes substratos utilizados para produção de H_2 fermentativo a partir de culturas mistas.

Inóculo	Substrato	Modo reator	Rendimento máximo de H_2	Referências
Lodo utilizado no tratamento de dejetos de suinocultura	Sacarose	Batelada	1,6 mol de H_2/mol de sacarose	MAINTINGUER, 2009
Lodo de tratamento de águas residuais	Sacarose	Batelada	6,12 mol de H_2/mol de sacarose	ZHU e BÉLAND, 2006
Lodo de tratamento de águas residuais de produção de citrato	Sacarose	Contínuo	1,61 mol de H_2/mol de sacarose	ZHAO e YU, 2008
Lodo de tratamento de esgoto municipal	Sacarose	Contínuo	3,88 mol de H_2/mol de sacarose	LEE, LIN e CHANG, 2006
Lodo de tratamento de esgoto	**Sacarose**	**Batelada**	**4,24 mol de H_2/mol de sacarose**	**NESTE ESTUDO**
Lodo anaeróbio granular	Glicose	Batelada	1,46 mol de H_2/mol de glicose	DAVILA-VAZQUEZ *et al.,* 2008
Lodo anaeróbio de tratamento de esgoto	Glicose	Contínuo	1,63 mol de H_2/mol de glicose	WU *et al*., 2008a
Lodo digerido de tratamento de esgoto	Glicose	Batelada	1,8 mol de H_2/mol de glicose	WANG e WAN, 2008
Lodo de tratamento de esgoto	**Glicose**	**Batelada**	**2,19 mol de H_2/mol de glicose**	**NESTE ESTUDO**
Lodo de tratamento de esgoto	Frutose	Contínuo	1,68 mol de H_2/mol de frutose	LEE *et al.,* 2007
Lodo de tratamento de esgoto	**Frutose**	**Batelada**	**2,09 mol de H_2/mol de frutose**	**NESTE ESTUDO**
Lodo de tratamento de esgoto municipal	Xilose	Batelada	2 mol de H_2/mol de xilose	LIN e CHENG, 2006
Lodo de tratamento de dejetos de suinocultura	Xilose	Batelada	0,8 mol de H_2/mol de xilose	MAINTINGUER, 2009
Lodo de tratamento de esgoto	Xilose	Contínuo	1,60 mol de H_2/mol de xilose	WU *et al*., 2008b
Lodo de tratamento de esgoto	**Xilose**	**Batelada**	**1,88 mol de H_2/mol de xilose**	**NESTE ESTUDO**
Solo do cultivo de trigo	Glicerina	Batelada	0,28 mol de H_2/mol de glicerina	SELEMBO *et al.,* 2009
Lodo de tratamento de esgoto	**Glicerina**	**Batelada**	**0,80 mol de H_2/mol de glicerina**	**NESTE ESTUDO**

Capítulo 4: Materiais e Métodos

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Inóculo

Neste trabalho, utilizou-se como inóculo lodo anaeróbio oriundo de Estação de Tratamento de Esgoto (ETE) da CEDAE (Companhia Estadual de Águas e Esgotos) de diferentes procedências. O inóculo utilizado nos ensaios preliminares de produção de H_2 foi coletado na ETE-Penha (Rio de Janeiro). Já o inóculo utilizado nos experimentos posteriores, foi coletado na ETE-Alegria (Rio de Janeiro). Ambos os inóculos foram coletados de um digestor de tratamento de lodo de excesso do sistema de lodo ativado em operação na planta.

Utilizou-se também lodo anaeróbio coletado em um reator UASB de tratamento de efluente de uma indústria de abatedouro de aves localizada na cidade do Rio de Janeiro (RJ).

O teor de sólidos suspensos voláteis (SSV) dos inóculos foi obtido de acordo com normas recomendadas por métodos oficiais [APHA, 1998].

4.2. Ensaios para produção biológica de H_2

4.2.1. Ensaios preliminares

Inicialmente os experimentos foram conduzidos em frascos de vidro de 500 mL acoplados a *bags* de PFV (polifluoreto de vinila) para a coleta do biogás produzido. Um *bag* contendo N_2 também foi acoplado à saída lateral dos frascos, de modo a permitir o borbulhamento de N_2 no sistema, evitando assim a retenção dos gases no meio fermentativo.

A Figura 4.1 apresenta o sistema utilizado nos ensaios preliminares para produção de H_2 via fermentação anaeróbia.

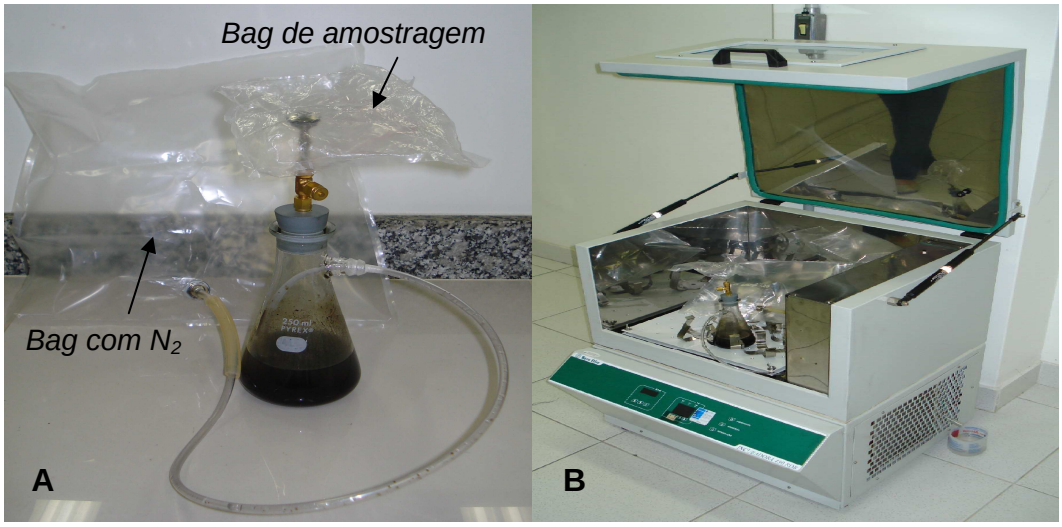

Figura 4.1: Sistema utilizado nos ensaios preliminares para produção de H_2.

Neste ensaio, foram utilizados dois tipos de inóculo: o inóculo *in natura* e o inóculo pré-tratado termicamente. No pré-tratamento térmico, o inóculo foi aquecido a 100^0C por 60 minutos e depois mantido a temperatura ambiente para posterior utilização. O meio reacional foi composto de 75 mL do inóculo, 75 mL de água destilada e 500 µL de uma solução contendo nutrientes e sacarose. A Tabela 4.1 apresenta a composição da solução de nutrientes e sacarose.

Tabela 4.1: Composição da solução de nutrientes para os ensaios preliminares de produção de H_2.

Reagentes	Concentração ($mg.L^{-1}$)	Finalidade
Sacarose	25000	Substrato
$K_2HPO_4.3H_2O$	800	Tampão
NH_4HCO_3	2025	Macronutriente
$FeSO_4.7H_2O$	25	Micronutriente
$ZnCl_2$	5	
$CuCl_2.2H_2O$	5	
$MnCl_2.\ 4H_2O$	5	
$(NH_4)_6Mo_7O_{24}.4H_2O$	15	
$CaCl_2$	50	
$CoCl_2.6H_2O$	5	
$MgCl_2.6H_2O$	100	
NaCl	10	
$NiCl_2.6H_2O$	5	
H_3BO_3	5	

Fonte: Adaptado de MU, YU e WANG, 2007.

O pH do meio reacional foi ajustado para 5,5 ± 0,1 com HCl 1 $mol.L^{-1}$ e o sistema purgado com N_2 por 10 minutos, para manutenção das condições de anaerobiose. Os frascos reacionais foram incubados em shaker a 35ºC e 100 rpm por 24 horas (Figura 4.1 B).

4.2.2. Ensaios para avaliação do pré-tratamento do inóculo

4.2.2.1. Pré-tratamento do inóculo

Nesta etapa, foram avaliados três métodos de pré-tratamento do inóculo: o pré-tratamento térmico (o inóculo foi aquecido a 100ºC durante 60 minutos), o pré-tratamento alcalino (o pH do inóculo foi ajustado para 12 com NaOH 5 $mol.L^{-1}$, sendo mantido durante 60 minutos, após este tempo o pH foi ajustado a 7 com HCl 10 $mol.L^{-1}$) e o pré-tratamento ácido (o pH do inóculo foi ajustado para 2 com HCl 10 $mol.L^{-1}$, sendo mantido durante 60 minutos, após este tempo o pH foi ajustado a 7 com NaOH 5 $mol.L^{-1}$).

4.2.2.2. Meio reacional

Os experimentos foram conduzidos em frascos tipo penicilina cujo volume era de 100 mL. O meio reacional foi composto do inóculo *in natura* ou pré-tratado (térmico, ácido ou alcalino), do substrato sintético representado por uma solução de sacarose 10 $g.L^{-1}$ e de uma solução de nutrientes. A Tabela 4.2 apresenta a composição da solução de nutrientes. No momento da utilização da solução nutricional, 10 mL da solução 2 foi adicionada à 1000 mL da solução 1, perfazendo uma solução única que foi adicionada ao frasco reacional.

Tabela 4.2: Composição da solução de nutrientes para os ensaios de avaliação de diferentes métodos de pré-tratamento do inóculo.

Solução	Reagentes	Concentração ($mg.L^{-1}$)	Finalidade
1	KH_2PO_4	2500	Tampão
	K_2HPO_4	2500	
	NH_4Cl	20000	Macronutriente
2	$FeCl_3$	2000	Micronutriente
	$ZnCl_2$	50	
	$CuCl_2.2H_2O$	30	
	$MnCl_2.\ 4H_2O$	500	
	$(NH_4)_6Mo_7O_{24}.4H_2O$	50	
	$AlCl_3$	50	
	$CoCl_2.6H_2O$	2000	
	HCl (concentrado)	1 mL	

Fonte: Adaptado de CHERNICARO, 2007.

A quantidade de cada um dos componentes do meio reacional foi determinada baseando-se nas relações de DQO:SSV 1:1 m/m e DQO:N:P 350:5:1 m/m. A Tabela 4.3 apresenta a quantidade adicionada de cada componente aos reatores anaeróbios. Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

Tabela 4.3: Composição do meio reacional.

Componentes	Volume (mL)
Inóculo	52
Substrato sintético (solução de sacarose 10 $g.L^{-1}$)	36,5
Solução de nutrientes	1,5
Volume líquido reacional total	90

O pH do meio reacional foi ajustado para 5,5 ± 0,1 com HCl 10 $mol.L^{-1}$. Para manutenção das condições de anaerobiose, os reatores anaeróbios foram purgados com nitrogênio por 60 segundos cada e então vedados com tampa de borracha e lacre de alumínio. Em seguida, os reatores foram incubados em shaker a 35°C e à 100 rpm de agitação.

Os ensaios tiveram uma duração de 120 horas, sendo que nas primeiras 72 h, a cada 24 horas, triplicatas de cada condição reacional foram monitoradas quanto

ao teor de H_2 no biogás. A última amostragem ocorreu 48 h após as 72 h iniciais de fermentação. Os meios reacionais foram descartados após as amostragens. Este ensaio permitiu a avaliação do melhor tempo de reação para produção de hidrogênio. Além disso, foi possível monitorar a etapa de hidrólise da sacarose e a geração dos metabólitos intermediários formados durante o processo fermentativo.

4.2.3. Ensaios para avaliação de diferentes substratos

Nestes ensaios, foram testados diferentes substratos sintéticos para produção de H_2: sacarose, glicose, frutose, xilose e glicerina.

Os experimentos foram conduzidos em frascos tipo penicilina (100 mL) contendo o meio reacional composto do inóculo pré-tratado, do substrato sintético e da solução de nutrientes (mencionada no item 4.2.2.2). A quantidade de cada um dos componentes do meio reacional foi determinada baseando-se nas relações de DQO:SSV 1:1 m:m e DQO:N:P 350:5:1 m:m. A Tabela 4.4 apresenta a quantidade adicionada de cada componente aos reatores anaeróbios. Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

Tabela 4.4: Composição do meio reacional para os ensaios de avaliação de diferentes substratos para produção de H_2.

Tipo de Substrato	Concentração do substrato no meio reacional (mmol.L^{-1})	Volume adicionado (mL)		
		Inóculo	Solução nutricional	Substrato
Sacarose 10 g.L^{-1}	11,8	52	1,5	36,5
Glicose 10 g.L^{-1}	25,0	48	1,4	40,6
Frutose 10 g.L^{-1}	22,6	52	1,4	36,6
Xilose 10 g.L^{-1}	28,6	50	1,4	38,6
Xilose 20 g.L^{-1}	57,1	50	1,4	38,6
Glicerina 10 g.L^{-1}	46,6	50	1,4	38,6

O pH do meio reacional foi ajustado para 5,5 ± 0,1 com HCl 10 mol.L^{-1}. Para manutenção das condições de anaerobiose, os reatores anaeróbios foram purgados com nitrogênio por 60 segundos cada e então vedados com tampa de borracha e

lacre de alumínio. Em seguida, os reatores foram levados para o shaker, onde foram mantidos a 35°C e 100 rpm de agitação, durante 72 horas.

4.3. Análises microbiológicas

As análises microbiológicas deste trabalho foram realizadas em colaboração com o Laboratório de Diagnóstico Molecular da Embrapa Agroindústria de Alimentos (RJ) e com o Laboratório de Biologia Molecular da Divisão de Corrosão e Degradação do Instituto Nacional de Tecnologia (RJ).

4.3.1. Extração do DNA do pool bacteriano

O DNA genômico do pool bacteriano foi extraído e purificado usando o *Kit DNeasy Blood & Tissue* (Qiagen Sciences, USA).

O procedimento de extração foi realizado de acordo com as instruções do kit:

1) Centrifugar a amostra por 10 minutos a 7500 rpm;
2) Descartar o sobrenadante;
3) Pesar 200 mg da amostra;
4) Ressuspender a amostra em 350 µL de tampão ATL (antes de utilizá-lo colocar no banho a 56^{0}C);
5) Adicionar 40 µL de proteinase K e incubar a 56^{0}C por 2 horas;
6) Agitar em vortex por 15 segundos. Adicionar 200 µL do tampão AL e agitar vigorosamente em vortex. Adicionar 200 µL de etanol 100% (gelado) e agitar novamente em vortex;
7) Centrifugar por 5 minutos a 13000 rpm;
8) Transferir 300 µL do sobrenadante para a coluna branca e centrifugar a 8000 rpm durante 1 minuto. Descartar o filtrado e o tubo de coleta;
9) Transferir a coluna para um novo tubo de coleta, adicionar 500 µL do tampão AW1 e centrifugar a 8000 rpm por 1 minuto. Descartar o filtrado e o tubo de coleta;
10) Transferir a coluna para outro novo tubo de coleta, adicionar 500 µL do tampão AW2 e centrifugar a 14000 rpm durante 3 minutos para secar a membrana da coluna. Descartar o filtrado e o tubo de coleta;

11) Transferir a coluna para um tubo eppendorf novo, pipetar 200 µL de tampão AE e aplicar diretamente na membrana da coluna. Incubar à temperatura ambiente por 1 minuto e centrifugar à 8000 rpm por 1 minuto;
12) Pipetar novamente 200 µL de tampão AE e aplicar diretamente na membrana da coluna. Incubar à temperatura ambiente por 1 minuto e centrifugar à 8000 rpm por 1 minuto;
13) Descartar a coluna e reservar o filtrado.

A quantificação do DNA foi realizada através de um espectrofotômetro Nanodrop modelo ND-1000.

4.3.2. Extração do RNA do pool bacteriano

O RNA total do pool bacteriano foi extraído usando o *Kit RNeasy Plant Mini* (Qiagen Sciences, USA).

O procedimento de extração foi realizado de acordo com as instruções do kit:

1) Centrifugar a amostra por 10 minutos a 7500 rpm;
2) Descartar o sobrenadante;
3) Pesar 100 mg da amostra homogênea em eppendorf esterilizado;
4) Adicionar 650 µL de tampão RLC com β-mercaptoetanol e agitar em vórtex;
5) Incubar a 56ºC por 3 minutos. Se o lisado ficar em suspensão, centrifugar por 14500 rpm durante 1 minuto;
6) Transferir o lisado para a coluna lilás e centrifugar a 14500 rpm por 2 minutos;
7) Transferir o sobrenadante do tubo coletor para o eppendorf. Verificar o volume;
8) Adicionar meio volume de etanol (96-100%) e homogeneizar;
9) Transferir a solução (~ 650 µL), incluindo o possível precipitado para a coluna rosa;
10) Centrifugar a 10000 rpm por 2 minutos;
11) Descartar o eluato, adicionar 700 µL de tampão RW1 e centrifugar a 12000 rpm durante 1 minuto;
12) Verificar se não restou líquido dentro da coluna. Em caso positivo, centrifugar novamente;

13) Remover a coluna do tubo com cuidado para que a resina não entre em contato com o eluato;
14) Descartar o eluato da lavagem, adicionar 500 µL de tampão RPE na coluna e centrifugar a 10000 rpm por 15 segundos;
15) Descartar o eluato, adicionar 500 µL de tampão RPE na coluna e centrifugar a 10000 rpm por 2 minutos (secar a membrana);
16) Remover a coluna do tubo com cuidado para não haver contaminação com o etanol;
17) Descartar o tubo coletor e conectar um novo;
18) Centrifugar a 14500 rpm durante 1 minuto;
19) Conectar a coluna em eppendorf de 1,5 mL, adicionar 50 µL de H_2O milli-Q estéril e centrifugar a 10000 rpm durante 2 minutos;
20) Repetir a eluição com o eluato da etapa anterior.

A quantificação do RNA foi realizada através de um espectrofotômetro Nanodrop modelo ND-1000.

4.3.3. Reação em cadeia da polimerase (PCR)

A análise qualitativa do DNA extraído do pool bacteriano foi realizada através da técnica de PCR. Para esta análise foram utilizados pares de *primers* específicos para o gene 16S rRNA de *Clostridium sp.* e para o gene hidrogenase de *Clostridium sp.* Os *primers* foram sintetizados pela empresa *Invitrogen Life Technologies,* contendo a série de bases nucleotídicas descritas na Tabela 4.5.

Tabela 4.5: *Primers* utilizados na reação em cadeia de polimerase (PCR).

Primers	Sequência (5´-3´)	Especificidade	Referências
16S-f	AGCGTTGTCCGGATTTACTG	Gene 16S rRNA de *Clostridium sp.*	Wang *et al.,* 2008b
16S-r	TTCGCCACTGGTATTCTTCC	Gene 16S rRNA de *Clostridium sp.*	Wang *et al.,* 2008b
HG-f	AAGAAGCTTTAGAAGATCCTAA	Gene hidrogenase de *Clostridium sp.*	Wang *et al.,* 2008b
HG-r	GGACAACATGAGGTAAACATTG	Gene hidrogenase de *Clostridium sp.*	Wang *et al.,* 2008b

Os componentes da PCR e suas respectivas concentrações podem ser visualizados na Tabela 4.6.

Tabela 4.6: Componentes da PCR.

Componentes	Solução estoque	Concentração final	Volume (µL)
Tampão*	10x	1x	5,0
dNTPs	10 mM	0,4 mM	2,0
$MgCl_2$	50 mM	3,5 mM	3,5
Primer-f	10 µM	0,5 µM	2,5
Primer-r	10 µM	0,5 µM	2,5
Taq DNA polimerase	5 $U.\mu L^{-1}$	0,5 $U.\mu L^{-1}$	5,0
DNA	-	-	5,0
H_2O	-	-	24,5
Volume final	-	-	50,0

*20 mM Tris-HCl, pH 8,4

A PCR foi realizada em termociclador *GeneAmp® PCR System 9700 (*Applied Biosystems, USA*)*. A condição de ciclagem térmica utilizada está representada na Figura 4.2. Os produtos da PCR foram separados em gel de agarose 2,0 % com brometo de etídio em tampão TBE (1,0 M tris; 0,9 M ácido bórico e 0,01 M EDTA). Utilizou-se o marcador *Low DNA Mass Ladder*, para estimar os fragmentos do DNA da amostra em pares de bases (pb). Os produtos da PCR foram visualizados e fotodocumentados com o auxílio de um transiluminador *E-Box 008 System (Vilbert Lourmat-Biosystems*) sob luz UV a 302 nm.

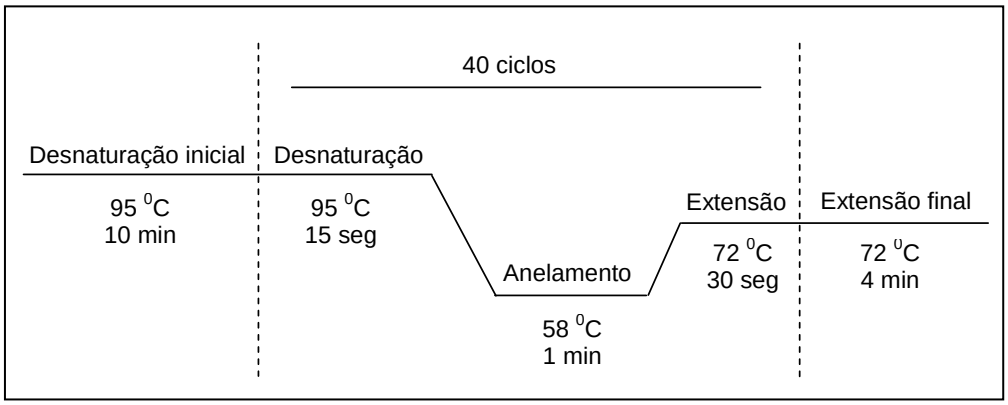

Figura 4.2: Condição de ciclagem térmica para obtenção dos produtos de PCR.

4.3.4. RT-PCR em tempo real

A análise do nível de expressão do gene hidrogenase foi realizada utilizando a técnica de RT-PCR em tempo real em dois estágios: a síntese do cDNA seguida da PCR em tempo real.

4.3.4.1. Síntese do cDNA

A síntese do cDNA foi realizada utilizando *TaqMan Reverse Transcription Reagents* (Applied Biosystems, USA), nas seguintes concentrações (volume final de 50 µL): tampão Taq Man RT (1x); 5,5 µmol.L^{-1} de $MgCl_2$; 500 µmol.L^{-1} de dNTPs; 2,5 µmol.L^{-1} de *primer random hexamer*; 1,25 U. µL^{-1} da enzima transcriptase reversa e 0,4 U.µL^{-1} de inibidor de RNase. O RNA foi adicionado na faixa de 60 ng a 2 µg.

A ciclagem térmica utilizada para a síntese do cDNA consistiu de três fases: incubação inicial a 25^0C por 10 minutos, ativação da enzima transcriptase reversa a 48^0C por 30 minutos e inativação a 95^0C por 5 minutos.

O cDNA sintetizado foi posteriormente utilizado na PCR em tempo real.

4.3.4.2. PCR em tempo real

Para a análise de PCR em tempo real foram utilizados os mesmos pares de *primers* descritos na Tabela 4.5. Neste caso, o gene 16S rRNA de *Clostridium sp.* corresponde ao gene constitutivo e o gene hidrogenase de *Clostridium sp*. corresponde ao gene alvo.

As reações (volume final de 25 µL) foram realizadas com SYBR Green PCR Master Mix (1x); 0,5 µmol.L^{-1} de cada *primer* (*forward e reverse*) para os dois genes (constitutivo e alvo) e 10 ng de cDNA.

A PCR em tempo real foi realizada utilizando o equipamento ABIPRISM-SDS7000 *(Applied Biosystems, USA)*. A condição de ciclagem térmica utilizada está representada na Figura 4.3. Os níveis de expressão foram determinados usando o método *delta delta* C_t, calculado com valores de C_t do gene 16S (gene constitutivo) e do gene hidrogenase (gene alvo) para cada amostra. Como calibrador foi utilizado à amostra de lodo *in natura*. As curvas de dissociação foram plotadas para verificação da especificidade dos *primers* utilizados.

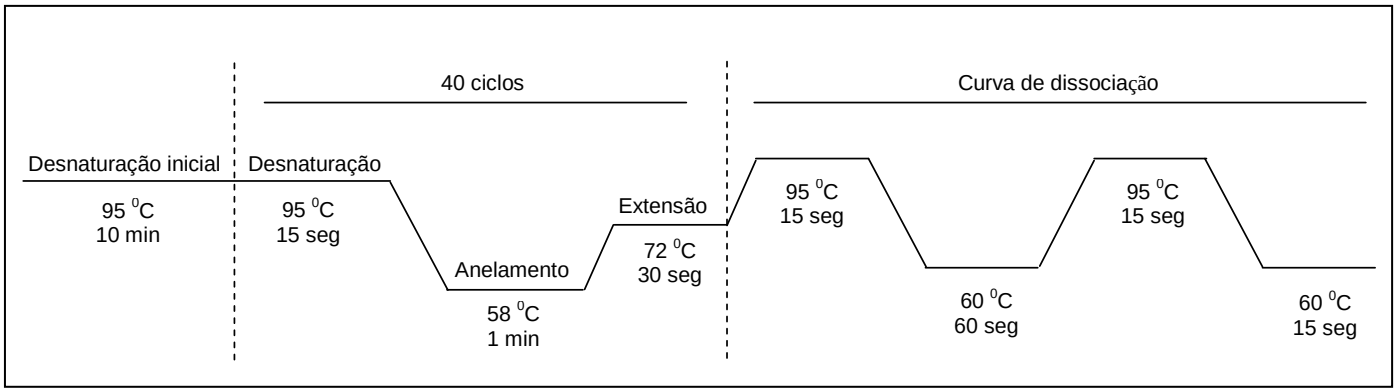

Figura 4.3: Condição de ciclagem térmica para obtenção dos produtos de PCR em tempo real.

4.3.5. Contagem de bactérias anaeróbias

A metodologia utilizada no Laboratório de Biocorrosão e Biodegradação do Instituto Nacional de Tecnologia para contagem das bactérias anaeróbias do meio fermentativo foi baseada na técnica dos tubos múltiplos para determinação do número mais provável (NMP). As condições utilizadas para este ensaio foram: meio de cultura de tioglicolato, temperatura de 30ºC e tempo de 28 dias. Esta metodologia permite estimar a densidade de bactérias em uma amostra, calculada a partir da combinação de resultados positivos e negativos [APHA, 1998].

4.4. Análises cromatográficas

4.4.1. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

A análise dos carboidratos (sacarose, glicose, frutose e xilose), ácidos orgânicos voláteis (ácidos acético, propiônico, isobutírico e butírico) e glicerina, presentes no meio fermentativo, foi realizada por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE). Utilizou-se um cromatógrafo líquido da Shimadzu (Shimadzu Corporation, Japão) composto dos seguintes módulos: degaseificador (modelo DGU-14A), bomba (modelo LC-10AT), auto-injetor (modelo SIL-20A), forno para coluna (modelo CTO-10AS) e detector UV-VIS (modelo SPD-10AV) conectado em série com detector de índice de refração (modelo RID-10A). A Figura 4.4 apresenta o equipamento utilizado durante as análises cromatográficas. A aquisição e o

tratamento dos dados foram controlados pelo *software* Class VP 6.1 (Shimadzu Corporation, Japão).

Figura 4.4: Cromatógrafo Líquido da Shimadzu utilizado durante as análises cromatográficas.

As amostras do meio fermentativo anaeróbio foram centrifugadas durante 5 minutos a 3000 rpm, e então filtradas em membrana de porosidade 0,22 μm Millipore antes de serem injetadas no sistema cromatográfico (n=3). As soluções estoque dos padrões (1000 $mmol.L^{-1}$) de sacarose, glicose, frutose, xilose, ácido acético, ácido propiônico, ácido isobutírico, ácido butírico e glicerina foram preparadas separadamente com água ultra pura e armazenadas em freezer.

As curvas analíticas foram preparadas usando o método de adição padrão e o método de padronização externa nos seguintes níveis de concentração: 10, 30, 50, 70 e 100 $mmol.L^{-1}$. Na preparação da curva de adição padrão foram utilizados 2 mL de sobrenadante do lodo anaeróbio (matriz). As soluções de ambas as curvas foram preparadas em triplicata e filtradas em membrana de porosidade 0,22 μm Millipore antes de serem injetadas no sistema cromatográfico (n=3). As curvas foram obtidas por regressão linear através do método dos mínimos quadrados. Os solventes utilizados como fase móvel foram filtrados em membranas com porosidade de 0,45 μm Millipore utilizando um kit para filtração também Millipore.

4.4.2. Cromatografia Gasosa (CG)

A análise cromatográfica do biogás foi realizada no Laboratório de Gases Combustíveis (LAGÁS) da Divisão de Energia (DIEN) do Instituto Nacional de Tecnologia (INT).

A análise dos componentes do biogás, tais como: H_2, CH_4 e CO_2 foi realizada por Cromatografia Gasosa (CG). Utilizou-se um cromatógrafo gasoso CG6890 Agilent equipado com detector de condutividade térmica (TCD) e ionização de chama (FID). A Figura 4.5 apresenta o equipamento utilizado durante as análises cromatográficas do biogás.

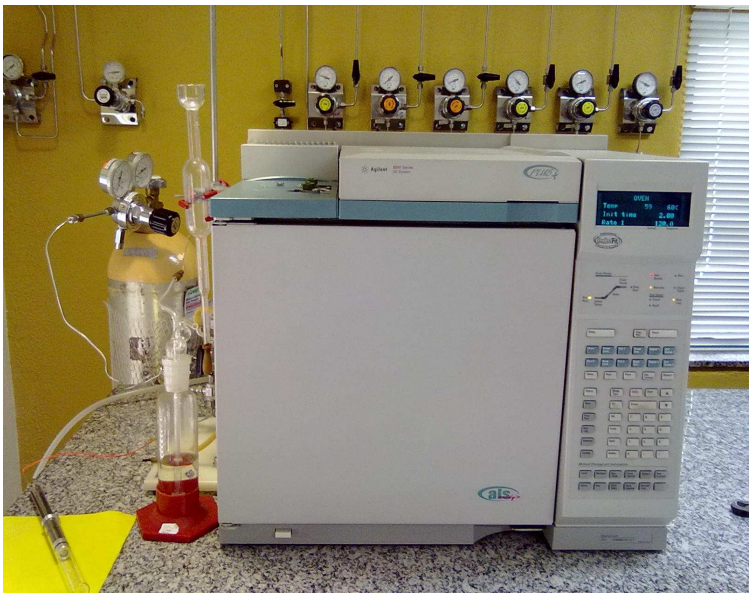

Figura 4.5: Cromatógrafo Gasoso da Agilent utilizado durante as análises cromatográficas.

As condições cromatográficas utilizadas para a análise do biogás foram: colunas HP-PLOT Al2O3 “S” (50 m x 0,53 mm x 15 µm), HP-PLOTQ (30 m x 0,53 mm x 40 µm) e HP-PLOT-Molecular Stieve 5A (15 m x 0,53 mm x 25 µm), nitrogênio como gás de arraste, temperatura do injetor de 150^0C e temperatura dos detectores de 250^0C. H_2 e CO_2 foram analisados através do detector de condutividade térmica (TCD) e CH_4 através do detector de ionização de chama (FID).

O programa de temperatura da corrida cromatográfica foi: temperatura inicial (60^0C por 2 minutos), taxa de aquecimento (80^0C/min) e temperatura final (100^0C por 13 minutos).

A quantificação do H_2 produzido nos reatores anaeróbios foi realizada através de uma curva analítica com soluções volumétricas *in-house*. Utilizou-se a equação dos gases ideais (equação 4.1) para se determinar o número de mols de H_2 para cada amostra, onde *p* corresponde a pressão do gás, *v* o volume de gás, *R* a constante universal dos gases ideais e *T* a temperatura absoluta. Neste trabalho, utilizou-se R igual a 62,4 mmHg.L.mol^{-1}.K^{-1}, 760 mmHg de pressão e 298,15 K de temperatura.

$$n = \frac{p.V}{R.T} \tag{4.1}$$

Nos ensaios preliminares de produção de H_2, a amostragem do biogás foi realizada utilizando os *bags* conectados aos frascos reacionais. Nos ensaios posteriores, em que se utilizaram frascos tipo penicilina, a amostragem foi realizada com o auxílio de ampolas que armazenavam o gás até o momento de injeção no cromatógrafo gasoso (Figura 4.6). O *loop* do cromatógrafo foi limpo com uma corrente de N_2 por 60 segundos a cada troca de amostra. A ampola foi purgada com cinco injeções de N_2 a cada troca de amostra.

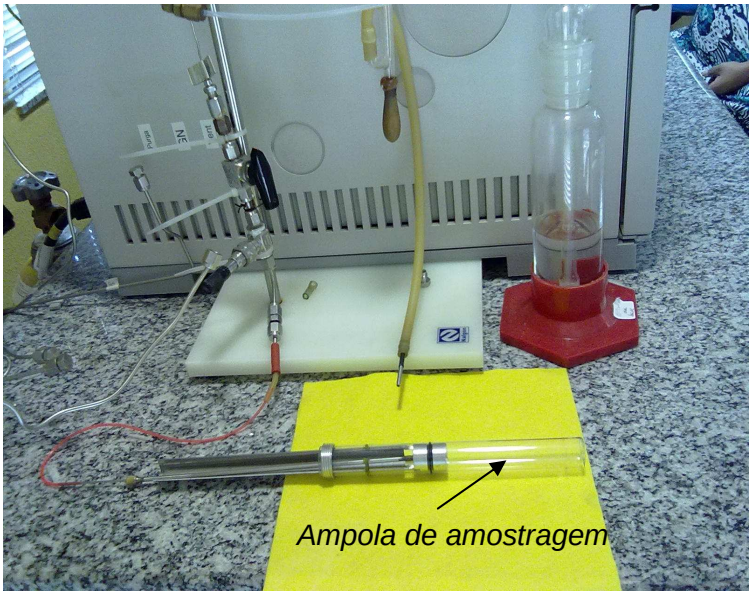

Figura 4.6: Ampola de amostragem conectada ao sistema cromatográfico gasoso.

Capítulo 8: Referências Bibliográficas

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ÁBALOS, M.; BAYONA, J.M.; PAWLISZYN, J. Development of a headspace solid-phase microextration procedure for the determination of free volatile fatty acids in waste waters. Journal of Chromatography A, v. 873, p. 107-115, 2000;

AKUTSU, Y.; LEE, D-Y.; LI, Y-Y.; NOIKE, T. Hydrogen production potentials and fermentative characteristics of various substrates with different heat-pretreated natural microflora. International Journal of Hydrogen Energy, v. 34, p. 5365-5372, 2009;

ANGENENT, L.T.; KARIM, K.; AL-DAHHAN, M.H.; WRENN, B.A.; DOMÍGUEZ-ESPINOSA, R. Production of bioenergy and biochemicals from industrial and agricultural wastewater. Trends in Biotechnology, v. 22, p. 477-485, 2004;

ANTONOPOULOU, G.; STAMATELATOU, K.; VENETSANEAS, N.; KORNAROS, M.; LYBERATOS, G. Biohydrogen and methane production from cheese whey in a two-stage anaerobic process. Industrial and Engineering Chemistry Research, v. 47, p. 5227-5233, 2008;

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária; Resolução RE nº 899, Maio/2003;

APHA, Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 20th edition; 1998;

ARGUN, H.; KARGI, F. Effects of light source, intensity and lighting regime on bio-hydrogen production from ground wheat starch by combined dark and photo-fermentations. International Journal of Hydrogen Energy, v. 35, p. 1604-1612, 2010;

ARGUN, H.; KARGI, F.; KAPDAN, I.K. Hydrogen production by combined dark and light fermentation of ground wheat solution. International Journal of Hydrogen Energy, v. 34, p. 4305-4311, 2009;

AROOJ, M.F.; HAN, S.K.; KIM, S.H.; SHIN, H.S. Continuous biohydrogen production in a CSTR using starch as a substrate. International Journal of Hydrogen Energy, v. 33, p. 3289-3294, 2008;

BAGHCHEHSARAEE, B.; NAKHLA, G.; KARAMANEV, D.; MARGARITIS, A.; REID, G. The effect of heat pretreatment temperature on fermentative hydrogen production using mixed cultures. International Journal of Hydrogen Energy, v. 33, p. 4064-4073, 2008;

BALAT, H.; KIRTAY, E. Hydrogen from biomass – Present scenario and future prospects. International Journal of Hydrogen Energy, v. 35, p. 7416-7426, 2010;

BECKERS, L.; HILIGSMANN, S.; HAMILTON, C.; MASSET, J.; THONART, P. Fermentative hydrogen production by *Clostridium butyricum* CWBI1009 and *Citrobacter freundii* CWBI952 in pure and mixed cultures. Biotechnology Agronomie Societe et Environmental, v. 14, p. 541-548, 2010;

BERBEROGLU, H.; JAY, J.; PILON, L. Effect of nutrient media on photobiological hydrogen production by *Anabaena variabilis* ATCC 29413. International Journal of Hydrogen Energy, v. 33, p. 1172-1184, 2008;

BRENTNER, L.B.; PECCIA, J.; ZIMMERMAN, J.B. Challenges in developing biohydrogen as a sustainable energy source: implications for a research agenda. Environmental Science Technology, v. 44, p. 2243-2254, 2010;

CAMPOS, J.R. Tratamento de esgotos sanitários por processo anaeróbio e disposição controlada no solo. PROSAB/ABES, Rio de Janeiro, 1999;

CHANG, F.Y.; LIN, C.Y. Biohydrogen production using an up-flow anaerobic sludge blanket reactor. International Journal of Hydrogen Energy, v. 29, p. 33-39, 2004;

CHANG, J-J.; CHEN, W-E.; SHIH, S-Y.; YU, S-J.; LAY, J-J.; WEN, F-S.; HUANG, C-C. Molecular detection of the clostridia in an anaerobic biohydrogen fermentation system by hydrogenase mRNA-targeted reverse transcription-PCR. Applied Microbiology Biotechnology, v. 70, p. 598-604, 2006;

CHANG, J-J.; WU, J-H.; WEN, F-S.; HUNG, K-Y.; CHEN, Y-T.; HSIAO, C-L.; LIN, C-Y.; HUANG, C-C. Molecular monitoring of microbes in a continuous hydrogen-producing system with different hydraulic retention time. International Journal of Hydrogen Energy, v. 33, p. 1579-1585, 2008;

CHÁVEZ-SERVÍN, J.L.; CASTELLOTE, A.I.; LÓPEZ-SABATER, M.C. Analysis of mono- and disaccharides in milk-based formulae by high-performance liquid chromatography with refractive index detection. Journal of Chromatography, v. 1043, p. 211-215, 2004;

CHEN, C-C.; LIN, C-Y.; LIN, M-C. Acid-base enrichment enhances anaerobic hydrogen production process. Applied Microbiology Biotechnology, v. 58, p. 224-228, 2002;

CHEN, W.M.; TSENG, Z.J.; LEE, K.S.; CHANG, J.S. Fermentative hydrogen production with *Clostridium butyricum* CGS5 isolated from anaerobic sewage sludge. International Journal of Hydrogen Energy, v. 30, p. 1063-1070, 2005;

CHEONG, D.Y.; HANSEN, C.L. Bacterial stress enrichment enhances anaerobic hydrogen production in cattle manure sludge. Applied Microbiology Biotechnology, v. 72, p. 635-643, 2006;

CHEONG, D-Y.; HANSEN, C.L.; STEVENS, D.K. Production of biohydrogen by mesophilic anaerobic fermentation in an acid-phase sequencing batch reactor. Biotechnology Bioenergy, v. 96, p. 421-432, 2007;

CHERNICARO, C.A.L. Princípios do tratamento biológico de águas residuárias – Reatores anaeróbios. Belo Horizonte: UFMG, 2007;

CHONG, M-L.; SABARATNAM, V.; SHIRAI, Y.; HASSAN, A. Biohydrogen production from biomass and industrial wastes by dark fermentation. International Journal of Hydrogen Energy, v. 34, p. 3277-3287, 2009;

DAS, D.; DUTTA, T.; NATH, K.; KOTAY, S.M.; DAS, A.K.; VEZIROGLU, T.N. Role of Fe hydrogenase in biological hydrogen production. Current Science, v. 90, p. 1627-1637, 2006;

DAS, D.; VEZIROGLU, T.N. Advances in biological hydrogen production processes. International Journal of Hydrogen Energy, v. 33, p. 6046-6057, 2008;

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

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

DE SÁ, L.R.V.; OLIVEIRA, T.C.; SANTOS, T.F.; MATOS, A.; CAMMAROTA, M.C.; OLIVEIRA, E.M.M.; FERREIRA-LEITÃO, V.S. Hydrogenase activity monitoring in the fermentative hydrogen production using heat pretreated sludge: a useful approach to evaluate bacterial communities performance. International Journal of Hydrogen Energy, *in press*, 2011;

DUBOIS, M.; GILLES, K.A.; HAMILTON, J.K.; REBERS, P.A.; SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. Analytical Chemistry, v. 28, p. 350-356, 1956;

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

FERREIRA-LEITÃO, V.; GOTTSCHALK, L.M.F.; FERRARA, M.A.; NEPOMUCENO, A.L.; MOLINARI, H.B.C.; BON, E.P.S. Biomass residues in Brazil: availability and potential uses. Waste Biomass Valor, v. 1, p. 65–76, 2010a;

FERREIRA-LEITÃO, V.; PERRONE, C.C.; RODRIGUES, J.; FRANKE, A.M.; MARCELLI, S.; ZACCHI, G. An approach to the utilization of CO_2 as impregnating agent in steam pretreatment of sugar cane bagasse and leaves for ethanol production. Biotechnology for Biofuels, v. 3, p. 1-8, 2010b;

GHOSH, D.; HALLENBECK, P.C. Fermentative hydrogen yields from different sugars by batch cultures of metabolically engineered *Escherichia coli* DJT135. International Journal of Hydrogen Energy, v. 34, p. 7979-7982, 2009;

GIANNOCCARO, E.; WANG, Y-J.; CHEN, P. Comparison of two HPLC systems and an enzymatic method for quantification of soybean sugars. Food Chemistry, v. 106, p. 324-330, 2008;

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

GUO, X.M.; TRABLY, E.; LATRILLE, E.; CARRÈRE, H.; STEYER, J-P. Hydrogen production from agricultural waste by dark fermentation: A review. International Journal of Hydrogen Energy, v. 35, p. 10660-10673, 2010;

HAFEZ, H.; NAKLA, G.; NAGGAR, M.H.E.; ELBESHBISHY, E. Effect of organic loading on a novel hydrogen bioreactor. International Journal of Hydrogen Energy, v. 35, p. 81-92, 2010;

HALLENBECK, P.C. Fermentative hydrogen production: principles, progress and prognosis. International Journal of Hydrogen Energy, v. 34, p. 7379-7389, 2009;

HALLENBECK, P.C.; BENEMANN, J.R. Biological hydrogen production; fundamentals and limiting processes. International Journal of Hydrogen Energy, v. 27, p. 1185-1193, 2002;

HALLENBECK, P.C.; GHOSH, D. Advances in fermentative biohydrogen production: the way forward? Trends Biotechnology, v. 27, p.287-297, 2009;

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

HUESEMANN, M.H.; HAUSMANN, T.S.; CARTER, B.M.; GERSCHLER, J.J.; BENEMANN, J.R. Hydrogen generation through indirect biophotolysis in batch cultures of the nonheterocystous nitrogen-fixing *Cyanobacterium Plectonema boryanum*. Applied Biochemistry and Biotechnology, v. 162; p. 208-220, 2010;

HUNG, C-H.; CHENG, C-H.; CHENG, L-H.; LIANG, C-M.; LIN, C-Y. Application of *Clostridium*-specif PCR primers on the analysis of dark fermentation hydrogen producing bacterial community. International Journal of Hydrogen Energy, v. 33, p. 1586-1592, 2008;

JAYASINGHEARACHCHI, H.S.; SARMA, P.M.; SINGH, S.; AGINIHOTRI, A.; MANDAL, A.K.; LAL, B. Fermentative hydrogen production by two novel strains of *Enterobacter aerogenes* HGN-2 and HT 34 isolated from sea buried crude oil pipelines. International Journal of Hydrogen Energy, v. 34, p. 7197-7207, 2009;

KAMALASKAR, L.B.; DHAKEPHALKAR, P.K.; MEHER, K.K.; RANADE, D.R. High biohydrogen yielding *Clostridium sp.* DMHC-10 isolated from sludge of distillery waste treatment plant. International Journal of Hydrogen Energy, v. 35, p. 10639-10644, 2010;

KAWAGOSHI, Y.; OKI, Y.; NAKANO, I.; FUJIMOTO, A.; TAKAHASHI, H. Biohydrogen production by isolated halotolerant photosynthetic bacteria using long-wavelength light-emitting diode (LW-LED). International Journal of Hydrogen Energy, v. 35, p. 13365-13369, 2010;

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

KHETKORN, W.; LINDBLAD, P.; INCHAROENSAKDI, A. Enhanced biohydrogen production by the N-2-fixing cyanobacterium *Anabaena siamensis* strain TISTR 8012. International Journal of Hydrogen Energy, v. 35, p. 12767-12776, 2010;

KIM, E.J.; KIM, J.S.; KIM, M.S.; LEE, J.K. Effect of changes in the level of light harvesting complexes of *Rhodobacter sphaeroides* on the photoheterotrophic production of hydrogen. International Journal of Hydrogen Energy, v. 31, p. 531-538, 2006;

KIM, J.P; KIM, K.R.; CHOI, S.P.; HAN, S.J.; KIM, M.S.; SIM, S.J. Repeated production of hydrogen by sulfate re-addition in sulfur deprived culture of *Chlamydomonas reinhardtii*. International Journal of Hydrogen Energy, v. 35, p. 13387-13391, 2010;

KIRTAY, E. Recent advances in production of hydrogen from biomass. Energy Conversion and Management, v. 52, p. 1778-1789, 2011;

KOTAY, M.K,; DAS, D. Biohydrogen as a renewable energy resource – prospects and potentials. International Journal of Hydrogen Energy, v.33, p. 258-263, 2008;

KRAMER, J.T.; BAGLEY, D.M. Improving the yield from fermentative hydrogen production. Biotechnology Letters, v. 29, p. 685-695, 2007;

LAY, J-J. Biohydrogen generation by mesophilic anaerobic fermentation of microcrystalline cellulose. Biotechnology Bioenergy, v. 74, p. 280-287, 2000;

LAY, J-J; FAN, K-S.; CHANG, I.J.; KU, C-H. Influence of chemical nature of organic wastes on their conversion to hydrogen by heat-shock digested sludge. International Journal of Hydrogen, v. 28, p. 1361-1367, 2003;

LEE, K.S.; LIN, P.J.; CHANG, J.S. Temperature effects on biohydrogen production in a granular sludge bed induced by activated carbon carriers. International Journal of Hydrogen Energy, v. 31, p. 465-472, 2006;

LEE, K.S.; LIN, P.J.; FANGCHIANG, K.; CHANG, J.S. Continuous hydrogen production by anaerobic mixed microflora using a hollow-fiber microfiltration membrane bioreactor. International Journal of Hydrogen Energy, v. 32 p. 950-957, 2007;

LEHNINGER, A.L. Princípios de bioquímica. David Nelson e Michael Cox, 3ª edição, Sarvier, São Paulo, p.880-905, 2002;

LEITE, J.A.C.; FERNANDES, B.S.; POZZI, E.; BARBOZA, M.; ZAIAT, M. Application of an anaerobic packed-bed bioreactor for the production of hydrogen and organic acids. International Journal of Hydrogen Energy, v. 33, p. 579-586, 2008;

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

LI, C.; FANG, H.H.P. Fermentative hydrogen production from wastewater and solid wastes by mixed cultures. Critical Reviews in Environmental Science and Technology, v. 37, p. 1-39, 2007;

LI, C.; ZHANG, T.; FANG, H.H.P. Fermentative hydrogen production in packed-bed and packaging-free upflow reactors. Water Science Technology, v. 54, p. 95-103, 2006;

LI, Y.F.; REN, N.Q.; CHEN, Y.; ZHENG, G.X. Ecological mechanism of fermentative hydrogen production by bacteria. International Journal of Hydrogen Energy, v. 32, p. 755-760, 2007;

LIN, C.Y.; CHANG, C.C.; HUNG, C.H. Fermentative hydrogen production from starch using natural mixed cultures. . International Journal of Hydrogen Energy, v. 33, p. 2445-2453, 2008b;

LIN, C.Y.; CHENG, C.H. Fermentative hydrogen production from xylose using anaerobic mixed microflora. . International Journal of Hydrogen Energy, v. 31 p. 832-840, 2006;

LIN, C.Y.; HUNG, C.H.; CHEN, C.H.; CHUNG, W.T.; CHENG, L.H. Effects of initial cultivation pH on fermentative hydrogen production from xylose using natural mixed cultures. Process Biochemistry, v.41, p. 1383-1390, 2006;

LIN, C.Y.; LAY, C.H. Effects of carbonate and phosphate concentrations on hydrogen production using anaerobic sewage sludge microflora. International Journal of Hydrogen Energy, v. 29, p. 275-281, 2004;

LIN, C.Y.; WU, C.C.; HUNG, C.H. Temperature effects on fermentative hydrogen from xylose using mixed anaerobic cultures. International Journal of Hydrogen Energy, v. 33, p. 43-50, 2008a;

LIU, B.F; REN, N.Q; XIE, G.J.; DING, J.; GUO, W.Q.; XING, D.F. Enhanced bio-hydrogen production by the combination of dark- and photo-fermentation in batch culture. Bioresource Technology, v. 101, p. 5325-5329, 2010;

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

MAINTINGUER, S.I. Obtenção e caracterização filogenética de consórcio bacteriano utilizado em reator anaeróbio em batelada aplicado à produção de hidrogênio. Dissertação (doutorado), Departamento de Hidráulica e Saneamento da Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, 2009;

MANDAL, B.; NATH, K.; DAS, D. Improvement of biohydrogen production under decreased partial pressure of H-2 by *Enterobacter cloacae*. Biotechnology Letters, v. 28, p. 831-835, 2006;

MATHEWS, J.; WANG, G. Metabolic pathway engineering for enhanced biohydrogen production. International Journal of Hydrogen Energy, v. 34, p. 7404-7416, 2009;

MEYER, J. [FeFe] hydrogenases and their evolution: a genomic perspective. Cellular and Molecular Life Sciences, v. 64, p. 1063-1084, 2007;

MIN, H.T.; SHERMAN, L.A. Hydrogen production by the unicellular, diazotrophic *Cyanobacterium Cyanothece sp* strain ATCC 51142 under conditions of continuous light. Applied and Environmental Microbiology, v. 76, p. 4293-4301, 2010;

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

MONTGOMERY, DC. Design and Analysis of Experiments, 6th ed; Wiley: New York, 2004;

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

MOTA, C.J.A.; SILVA, C.X.A.; GONÇALVES, V.L.C. Gliceroquímica: novos produtos e processos a partir da glicerina de produção de biodiesel. Química Nova, v. 32, p. 639-648, 2009;

MU, Y.; WANG. G.; YU, H-Q. Response surface methodological analysis on biohydrogen production by enriched anaerobic cultures. Enzyme Microbiology Technology, v. 38, p. 905-913, 2006c;

MU, Y.; YU, H.Q.; WANG, Y. The role of pH in the fermentative H_2 production from an acidogenic granule-based reactor. Chemosphere, v. 64, p. 350-358, 2006b;

MU, Y.; YU, H-Q.; WANG, G. Evaluation of three methods for enriching H2-producing cultures from anaerobic sludge. Enzyme and Microbial Technology, v. 40, p. 947-953, 2007;

MU, Y.; ZHENG, X.J.; YU, H.Q.; ZHU, R.F. Biological hydrogen production by anaerobic sludge at various temperatures. International Journal of Hydrogen Energy, v. 31, p. 780-785, 2006a;

NAKASHIMADA, Y.; RACHMAN, M.A.; KAKIZONO, T.; NISHIO, N. Hydrogen production of *Enterobacter aerogenes* altered by extracellular and intracellular redox states. International Journal of Hydrogen Energy, v. 27, p. 1399-1405, 2002;

NAVARRO, E.; MONTAGUD, A.; DE CORDOBA, P.F.; URCHUEGUIA, J.F. Metabolic flux analysis of the hydrogen production potential in *Synechocystis sp* PCC6803. International Journal of Hydrogen Energy, v. 34, p. 8828-8838, 2009;

NEVES, L.M.V. Produção de biohidrogênio por bactérias a partir de resíduos fermentescíveis. Dissertação (mestrado), Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa, 2009;

NGO, T.A.; KIM, M-S.; SIM, S.J. High-yield biohydrogen production from biodiesel manufacturing waste by *Thermotoga neapolitana*. International Journal of Hydrogen Energy, v. 36, p. 5836-5842, 2011;

NIU, K.; ZHANG, X.; TAN, W.S.; ZHU, M.L. Characteristics of fermentative hydrogen production with *Klebsiella pneumoniae* ECU-15 isolated from anaerobic sewage sludge. International Journal of Hydrogen Energy, v. 35, p. 71-80, 2010;

NTAIKOU, I.; ANTONOPOULOU, G.; LYBERATOS, G. Biohydrogen production from biomass and wastes via dark fermentation: A review. Waste Biomass Valor, v. 1, p. 21-316, 2010;

OBEID, J.; FLAUS, J.M.; ADROT, O.; MAGNIN, J.P.; WILLISON, J.C. State estimation of a batch hydrogen production process using the photosynthetic bacteria *Rhodobacter capsulatus*. International Journal of Hydrogen Energy, v. 35, p. 10719-10724, 2010;

OH, S-E.; GINKEL, S.V.; LOGAN, B.E. The relative effectiveness of pH control and heat treatment for enhancing biohydrogen gas production. Environmental Science Technology, v. 37, p. 5186-5190, 2003;

O-THONG, S.; PRASERTAN, P.; BIRKELAND, N-K. Evaluation methods for preparing hydrogen-producing seed inocula under thermophilic condition by process performance and microbial community analysis. Bioresource Technology, v. 100, p. 909-918, 2009;

O-THONG, S.; PRASERTAN, P.; KARAKASHEV, D.; ANGELIDAKI, I. Thermophilic fermentative hydrogen production by the newly isolated *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* PSU-2. International Journal of Hydrogen Energy, v. 33, p. 1204-1214, 2008;

OZGUR, E.; MARS, A.E.; PEKSEL, B.; LOUWERESE, A.; YUCEL, M.; GUNDUZ, U.; CLAASSEN, P.A.M.; EROGLU, I. Biohydrogen production from beet molasses by sequential dark and photofermentation. International Journal of Hydrogen Energy, v. 35, p. 511-517, 2010;

PAGE,S.; KRUMDIECK,S.; System-level energy efficiency is the greatest barrier to development of the hydrogen economy. Energy Policy. *Article in press*, 2009;

PARK, W.; HYUN, S.H.; OH, S-E.; LOGAN, B.E.; KIM, I.S. Removal of headspace CO2 increases biological hydrogen production. Environmental Science Technology, v. 39, p. 4416-4420, 2005;

PEIXOTO, G. Produção de hidrogênio em reator anaeróbio de leito fixo e fluxo ascendente a partir de água residuária de indústria de refrigerantes. Dissertação (mestrado), Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, 2008;

PETERS, J.W. Structure and mechanism of iron-only hydrogenases. Catalysis and regulation, v. 9, p. 670-676, 1999;

RAN, C.Q.; ZHANG, F.J.; SUN, H.J.; ZHAO, B.D. Effect of culture medium on hydrogen production by sulfur-deprived marine green algae *Platymonas subcordiformis*. Biotechnology and Bioprocess Engineering, v. 14, p. 835-841, 2009;

REN, N-Q.; GUO, W-Q.; WANG, X-J.; XIANG, W-S.; LIU, B-F.; WANG, X-Z.; DING, J.; CHEN, Z-B. Effects of different pretreatments methods on fermentation types and dominant bacteria for hydrogen production. International Journal of Hydrogen Energy, v. 33, p. 4318-4324, 2008;

RIBANI, M.; BOTTOLI, C.B.G.; COLLINS, C.H.; JARDIM, I.C.S.F.; MELO, L.F.C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. Química Nova, v. 27, p. 771-780, 2004;

RIVALDI, J.D.; SARROUB, B.F.; FIORILO, R.; SILVA, S.S. Glicerol de biodiesel. Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento, v. 37, 44-51, 2009;

SELEMBO, P.A.; PEREZ, J.M.; LLOYD, W.A.; LOGAN, B.E. Enhanced hydrogen and 1,3-propanediol production from glycerol by fermentation using mixed cultures. Biotechnology and Bioengineering, v. 104, p. 1098-1106, 2009;

SHIN, H-S.; YOUN, J-H.; KIM, S-H. Hydrogen production from food waste in anaerobic mesophilic and thermophilic acidogenesis. International Journal of Hydrogen Energy, v. 29, p. 1355-1363, 2004;

SILVA, V.F.N. Estudos de pré-tratamento e sacarificação enzimática de resíduos agroindustriais como etapas no processo de obtenção de etanol celulósico. Dissertação (mestrado), Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, 2009;

SKONIECZNY, M.T.; YARGEU, V. Biohydrogen production from wastewater by *Clostridium beijerinckii:* effect of pH and substrate concentration. International Journal of Hydrogen, v. 34, p. 3288-3294, 2009;

SOCCOL, C.R.; VANDENBERGHE, L.P.S.; MEDEIROS, A.B.P.; KARP, S.G.; BUCKERIDGE, M.; RAMOS, L.P.; PITARELO, A.; FERREIRA-LEITÃO, V.; GOTTSCHALK, L.M.F.; FERRARA, M.A.; BON, E.P.S.; MORAES, L.M.P.; ARAÚJO, J.A.; TORRES, F.A.G. Bioethanol from lignocelluloses: status and perspectives in Brazil. Bioresource Technology, v. 101, p. 4820-4825, 2010;

SOUZA, M.M.V.M. Tecnologia do hidrogênio. Rio de Janeiro: Synergia Editora, 2009;

SPEECE, R.E. Anaerobic biotechnology for industrial wastewaters. Archaea Press: Tennessee, 1996;

STEIN, J.; KULEMEIER, J.; LEMBEKE, B.; CASPARY, W.F. Simple and rapid method for determination of short-chain fatty acids in biological materials by high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection. Journal of Chromatography, v. 576, p. 53-61, 1992;

STERLING, M.C.; LACEY, R.E.; ENGLER, C.R.; RICKE, S.C. Effects of ammonia nitrogen on H_2 and CH_4 production during anaerobic digestion of dairy cattle manure. Bioresource Technology, v. 77, p. 9-18, 2001;

SUWANSAARD, M.; CHOORIT, W.; ZEILSTRA-RYALLS, J.H.; PRASERTAN, P. Phototropic H-2 production by a newly isolated strain of *Rhodopseudomonas palustris*. Biotechnology Letters, v. 32, p. 1667-1671, 2010;

TAI, J.; ADAV, S.S.; SU, A.; LEE, D.J. Biological hydrogen production from phenol-containing wastewater using *Clostridium butyricum*. International Journal of Hydrogen Energy, v. 35, p. 13345-13349, 2010;

TEMUDO, M.; MUYZER, G.; KLEEREBEZEM, R.; VAN LOODRECHT, M. Diversity of microbial communities in open mixed culture fermentations: impact of the pH and carbon source. Applied Microbiology Biotechnology, v. 80, p. 1121-1130, 2008;

TEMUDO, M.F.; KLEEREBEZEM, R.; LOOSDRECHT, M.V. Influence of the pH on (open) mixed culture fermentation of glucose: a chemostat study, v. 98, p. 69-79, 2007;

TOLVANEN, K.E.S.; KOSKINEN, P.E.P.; YLIKOSKI, A.I.; OLLIKKA, P.K.; HEMMILA, I.A.; PUHAKKA, J.A.; KARP, M.T. Quantitative monitoring of a hydrogen-producing *Clostridium butyricum* strain from a continuous-flow, mixed culture bioreactor employing real-time PCR. International Journal of Hydrogen Energy, v. 33, p. 542-549, 2008;

VALDEZ-VAZQUEZ, I.; POGGI-VARALDO, H.M. Hydrogen production by fermentative consortia. Renewable and Sustainable Reviews, v. 13, p. 1000-1013, 2009;

VALDEZ-VAZQUEZ, I.; SPARLING, R.; RISBEY, D.; RINDERKNECHT-SEIJAS, N.; POGGI-VARALDO, H.M. Hydrogen generation via anaerobic fermentation of paper mill wastes. Bioresource Technology, v. 96, p. 1907-1913, 2005;

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

VIGNAIS, P.M.; COLBEAU, A. Molecular Biology of Microbial Hydrogenases. Current Issues in Molecular Biology, v. 6, p. 159-188, 2004;

VIJAYARAGHAVAN, K.; AHMAD, D. Biohydrogen generation from palm oil mill effluent using anaerobic contact filter. International Journal of Hydrogen Energy, v. 31, p. 1284-1291, 2006;

VOORDOUW, G. Evolution of hydrogenase genes. Advances Inorganic Chemistry, v. 38, p. 397-422, 1992;

WANG, G.; MU, Y.; YU, H.Q. Response surface analysis to evaluate the influence of pH, temperature and substrate concentration on the acidogenesis of sucrose-rich wastewater. Biochemical Engineering Journal, v. 23, p. 175-184, 2005;

WANG, J.; WAN, W. Factors influencing fermentative hydrogen production: A review. International Journal of Hydrogen Energy, v. 34, p. 799-811, 2009;

WANG, J.L.; WAN, W. Comparison of different pretreatment methods for enriching hydrogen-producing cultures from digested sludge. International Journal of Hydrogen Energy, v. 33, p. 2934-2941, 2008;

WANG, M-Y.; OLSON, B.H.; CHANG, J-S. Relationship among growth parameters for *Clostridium butyricum*, hydA gene expression, and biohydrogen production in a sucrose-supplemented batch reactor. Applied Microbiology Biotechnology, v. 78, p. 525-532, 2008a;

WANG, M-Y.; TSAI, Y-L.; OLSON, B.H.; CHANG, J-S. Monitoring dark hydrogen fermentation performance of indigenous *Clostridium butyricum* by hydrogenase gene expression using RT-PCR and qPCR. International Journal of Hydrogen, v. 33, p. 4730-4738, 2008b;

WANG, X.; MONIS, P.T.; SAINT, C.P.; JIN, B. Biochemical kinetics of fermentative hydrogen production by *Clostridium butyricum* W5. International Journal of Hydrogen Energy, v. 34, p. 791-798, 2009;

WEJIMA, J.; GUBBELS, F.; HULSHOFF, P.L.W.; STAMS, A.J.M.; LENS, P.; LETTINGA, G. Competition for H_2 between sulfate reducers, methanogens and homoacetogens in a gas-lift reactor. Water Science Technology, v. 45, p. 75-80, 2002;

WESTERMANN, P.; JORGENSEN, B.; LANGE, L.; AHRING, B.K.; CHRISTENSEN, C.L. Maximizing renewable hydrogen production from biomass in a bio/catalytic refinery. International Journal of Hydrogen, v. 32, p. 4135-4141, 2007;

WU, S.Y.; HUNG, C.H.; LIN, C.Y.; LIN, P.J.; LEE, K.S.; KIN, C.N. HRT-dependent hydrogen production and bacterial community structure of mixed anaerobic microflora in suspended, granular and immobilized sludge systems using glucose as the carbon substrate. International Journal of Hydrogen, v. 33, p. 1542-1549, 2008a;

WU, S.Y.; LIN, C.Y.; LEE, K.S.; HUNG, C.H.; CHANG, J.S.; LIN, P.J. Dark fermentative hydrogen production from xylose in different bioreactors using sewage sludge microflora. Energy Fuels, v. 22, p. 113-119, 2008b;

XIAO, B.Y.; LIU, J.X. Effects of various pretreatments on biohydrogen production from sewage sludge. Chinese Science Bulletin, v. 54, p. 2038-2044, 2009;

XING, D.F.; REN, N.Q.; WANG, A.J.; LI, Q.B.; FENG, Y.J.; MA, F. Continuous hydrogen production of auto-aggregative *Ethanoligenens harbiense* YUAN-3 under non-sterile condition. International Journal of Hydrogen Energy, v. 33, p. 1489-1495, 2008;

YE, N.F.; LU, F.; SHAO, L.M.; GODON, J.J.; HE, P.J. Bacterial community dynamics and product distribution during pH-adjusted fermentation of vegetable wastes. Journal of Applied Microbiology, v. 103, p. 1055-1065, 2007;

YOSHINO, F.; IKEDA, H.; MASUKAWA, H.; SAKURAI, H. High photobiological hydrogen production activity of a *Nostoc sp* PCC 7422 uptake hydrogenase-deficient mutant with high nitrogenase activity. Marine Biotechnology, v. 9, p. 101-112, 2007;

YU, H.; ZHU, Z.; HU, W.; ZHANG, H. Hydrogen production from rice winery wastewater in an upflow anaerobic reactor by using mixed anaerobic cultures. International Journal of Hydrogen Energy, v. 27, p. 1359-1365, 2002;

ZHANG, Z-P.; TAY, J-H.; SHOW, K-Y.; YAN, R.; LIANG, D.T.; LEE, D-J.; JIANG, W-J. Biohydrogen production in a granular activated carbon anaerobic fluidized bed reactor. International Journal of Hydrogen Energy, v. 32, p. 185-191, 2007;

ZHAO, Q.B.; YU, H.Q. Fermentative H_2 production in an upflow anaerobic sludge blanket reactor at various pH values. Bioresource Technology, v. 99, p. 1353-1358, 2008;

ZHU, H.G.; BÉLAND, M.; Evaluation of alternative methods of preparing hydrogen producing seeds from digested wastewater sludge. International Journal of Hydrogen Energy, v. 31, p. 1980-1988, 2006;

ZHU, Z.N.; SHI, J.P.; ZHOU, Z.H.; HU, F.X.; BAO, J. Photo-fermentation of *Rhodobacter sphaeroides* for hydrogen production using lignocellulose-derived organic acids. Process Biochemistry, v. 45, p. 1894-1898, 2010.

Anexos

ANEXO 1

Artigo aceito na International Journal of Hydrogen Energy, 2011

Hydrogenase activity monitoring in the fermentative hydrogen production using heat pretreated sludge: A useful approach to evaluate bacterial communities performance

ANEXO 2

Artigo submetido a International Journal of Hydrogen Energy, 2011

Simultaneous analysis of carbohydrates and volatile fatty acids by HPLC for monitoring fermentative biohydrogen production