

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ - UNIOESTE
CENTRO DE ENGENHARIAS E CIÊNCIAS EXATAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO “STRICTO SENSU” EM
ENGENHARIA QUÍMICA – NÍVEL DE MESTRADO

PRODUÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS VOLÁTEIS POR BIODIGESTÃO
ANAERÓBIA DA MANIPUEIRA

CITIELI GIONGO

TOLEDO – PR - BRASIL

Abril de 2011

CITIELI GIONGO

**PRODUÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS VOLÁTEIS POR BIODIGESTÃO
ANAERÓBIA DA MANIPUEIRA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química em cumprimento parcial aos requisitos para obtenção do título de Mestre em Engenharia Química, área de concentração em Processos Químicos e Bioquímicos.

Orientador: Prof. Dr. Salah D. M. Hasan

Co-orientadora: Prof. Dr^a. Mônica L. Fiorese

TOLEDO – PR - BRASIL

Abril de 2011

Catálogo na Publicação elaborada pela Biblioteca Universitária
UNIOESTE/Campus de Toledo.
Bibliotecária: Marilene de Fátima Donadel - CRB – 9/924

G496p Giongo, Citeli
 Produção de ácidos graxos voláteis por biodigestão
anaeróbia da manipueira / Citeli Giongo. -- Toledo, PR : [s.
n.], 2011.
 ix; 66 f. : il., tabs, graf.

 Orientador: Dr^o. Salah Din Mahmud Hasan
 Co-orientadora: Dra. Mônica Lady Fiorese
 Dissertação (Mestre em Engenharia Química) -
Universidade Estadual do Oeste do Paraná. Campus de Toledo.
Centro de Engenharias e Ciências Exatas.

 1. Ácidos graxos voláteis – Produção 2. Fermentação 3.
Reatores anaeróbios 4. Manipueira – Resíduo industrial 5.
Planejamento experimental I. Hasan, Salah Din Mahmud, Or.
II. Fiorese, Mônica Lady, Or. III. T

CDD 20. ed. 660.28449
 660.283
 660.63

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela vida e renovação da fé em cada dificuldade.

À minha família, pelo apoio e compreensão nos períodos de ausência.

Ao professor orientador Dr. Salah Din Mahmud Hasan, pelos ensinamentos, apoio e paciência durante a realização deste trabalho.

À minha co-orientadora, professora Dr^a. Mônica Lady Fiorese, pelo seu conhecimento, ajuda e disponibilidade durante o desenvolvimento deste projeto.

Aos acadêmicos de Bacharelado em Engenharia Química, Denise Aparecida Zempulski, Tatiane Caroline Ferrari e Tércio Enrico Savoldi, pela ajuda e dedicação na realização dos experimentos.

À equipe de apoio técnico do curso de Engenharia Química pela ajuda concedida.

À minha gerência, líderes e colegas da equipe de P&D da empresa Prati-Donaduzzi de Toledo – PR, pelas folgas concedidas, pelo apoio e compreensão nos momentos de ausência no trabalho.

Aos professores do mestrado em Engenharia Química, por todo conhecimento passado.

Aos colegas de turma do mestrado, pela amizade, carinho e ajuda durante os estudos.

Ao “Xirú” do colégio agrícola de Toledo – PR, pela sua presteza na coleta do inóculo suíno do biodigestor.

Ao Sr. André, da Zadimel, pelo fornecimento da manipueira.

SUMÁRIO

| | |
|--|------------|
| LISTA DE FIGURAS | v |
| LISTA DE TABELAS | vii |
| RESUMO | x |
| ABSTRACT | xi |
| 1. INTRODUÇÃO | 1 |
| 1.1. Objetivos | 2 |
| 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA | 3 |
| 2.1 O cultivo da mandioca no Brasil | 3 |
| 2.2 A manipueira..... | 4 |
| 2.3 Agregação de valor com a utilização da manipueira..... | 6 |
| 2.4 Inóculos bovino e suíno na biodigestão anaeróbia | 8 |
| 2.5 Condições da biodigestão para produção de AGVs e biogás..... | 10 |
| 2.6 Utilização dos AGVs | 11 |
| 3. MATERIAL E MÉTODOS. | 13 |
| 3.1. Inóculo | 13 |
| 3.2. Substrato | 13 |
| 3.3. Preparo dos meios de cultura | 14 |
| 3.4. Reator de biodigestão anaeróbia..... | 14 |
| 3.5 Preparo do substrato sintético | 15 |
| 3.6 Experimentos com a manipueira | 15 |
| 3.6.1 Planejamento estatístico de experimentos | 16 |
| 3.7 Validação do Processo de produção dos AGVs | 17 |
| 3.8 Produção de biogás..... | 17 |
| 3.9 Métodos analíticos..... | 19 |
| 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO. | 20 |
| 4.1 Biodigestão com meio sintético | 20 |
| 4.1.1 Biodigestão com diferentes concentrações de fonte de carbono com inóculo suíno..... | 24 |
| 4.2 Biodigestão com manipueira | 25 |
| 4.2.1 Influência da concentração de glicose na produção de AGVs..... | 26 |
| 4.2.2 Influência da concentração de bicarbonato de sódio na produção de AGVs | 30 |

| | |
|--|-----------|
| 4.2.3 Planejamento experimental | 33 |
| 4.2.4 Planejamento experimental DCCR | 39 |
| 4.2.5 Validação dos experimentos | 47 |
| 4.2.6 Produção do biogás | 48 |
| 5. CONCLUSÕES | 50 |
| 6. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS. | 51 |
| 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 52 |
| ANEXO 1..... | 61 |

LISTA DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 2.1 Processo de fermentação anaeróbia via cultura mista..... | 9 |
| Figura 3.1 Ilustração do reator utilizado na biodigestão anaeróbia | 15 |
| Figura 3.2 Sistema de reator anaeróbio montado para a produção de biogás..... | 18 |
| Figura 4.1 Perfil cinético da produção de AGV e comportamento do pH e acidez, utilizando inóculo suíno em meio sintético com 2 g/L de glicose..... | 20 |
| Figura 4.2 Perfil cinético da produção de AGV e comportamento do pH e acidez, utilizando inóculo bovino em meio sintético com 2 g/L de glicose..... | 21 |
| Figura 4.3 Perfil cinético da produção de AGV utilizando inóculo suíno em meio sintético com 20 g/L de glicose | 22 |
| Figura 4.4 Perfil cinético da produção de AGV utilizando inóculo bovino em meio sintético com 20 g/L de glicose | 22 |
| Figura 4.5 Perfil cinético da produção de AGV utilizando inóculo bovino em meio sintético com 40 g/L de glicose | 23 |
| Figura 4.6 Comportamento do pH utilizando inóculo suíno em meio sintético com diferentes concentrações de glicose | 24 |
| Figura 4.7 Perfil cinético da produção de AGV utilizando inóculo suíno em meio sintético com diferentes concentrações de glicose | 25 |
| Figura 4.8 Perfil cinético da produção de AGV em meios com manipueira em diferentes concentrações totais de glicose..... | 27 |
| Figura 4.9 Perfil cinético do comportamento do pH em meios com manipueira em diferentes concentrações totais de glicose..... | 28 |
| Figura 4.10 Perfil cinético do comportamento da acidez em meios com manipueira em diferentes concentrações totais de glicose..... | 29 |
| Figura 4.11 Perfil cinético do comportamento da alcalinidade em meios com manipueira em diferentes concentrações totais de glicose..... | 29 |
| Figura 4.12 Perfil cinético da produção de AGV em meios com manipueira e 2g/L de glicose em diferentes concentrações de bicarbonato de sódio | 31 |
| Figura 4.13 Perfil cinético do comportamento do pH em meios com manipueira e 2g/L de glicose em diferentes concentrações de bicarbonato de sódio | 31 |
| Figura 4.14 Comportamento da acidez em meios com manipueira e 2g/L de glicose em diferentes concentrações de bicarbonato de sódio | 32 |

| | |
|--|-----------|
| Figura 4.15 Comportamento da alcalinidade em meios com manipueira e 2g/L de glicose em diferentes concentrações de bicarbonato de sódio | 32 |
| Figura 4.16. Perfil cinético da produção de AGV para os ensaios do planejamento fatorial 2^2 | 33 |
| Figura 4.17 Comportamento do pH para os ensaios do planejamento fatorial 2^2 | 35 |
| Figura 4.18 Comportamento da acidez para os ensaios do planejamento fatorial 2^2 | 35 |
| Figura 4.19 Comportamento da alcalinidade para os ensaios do planejamento fatorial 2^2 | 36 |
| Figura 4.20 Gráfico de Pareto para o modelo obtido no planejamento experimental 2^2 | 38 |
| Figura 4.21 Superfície de resposta: AGV (g/L) em função da temperatura ($^{\circ}\text{C}$) e concentração de bicarbonato de sódio (g/L) | 39 |
| Figura 4.22 Perfil cinético da produção de AGV do planejamento DCCR. | 40 |
| Figura 4.23 Perfil cinético do comportamento do pH do planejamento DCCR. | 41 |
| Figura 4.24 Perfil cinético da acidez do planejamento DCCR | 41 |
| Figura 4.25 Perfil cinético da alcalinidade do planejamento DCCR..... | 42 |
| Figura 4.26 Gráfico de Pareto para o modelo obtido no planejamento DCCR | 45 |
| Figura 4.27 Resíduos do modelo obtido pelo planejamento DCCR | 46 |
| Figura 4.28 Superfície de resposta e gráfico de contorno para o planejamento DCCR..... | 47 |
| Figura 4.29 Gráfico do volume de biogás produzido por fermentação anaeróbia ($T = 30^{\circ}\text{C}$ e $[\text{NaHCO}_3] = 3 \text{ g/L}$) | 49 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|---|-----------|
| Tabela 2.1 Composição química da manipueira..... | 5 |
| Tabela 3.1 Matriz do planejamento fatorial 2^2 com triplicata no ponto central. | 16 |
| Tabela 3.2 Matriz do planejamento fatorial DCCR 2^2 com quadruplicata no ponto central e 4 pontos axiais..... | 17 |
| Tabela 4.1 Caracterização físico-química da manipueira utilizada nos experimentos..... | 27 |
| Tabela 4.2 Diferentes concentrações de glicose ajustadas para a manipueira. | 27 |
| Tabela 4.3 Resultados da produção de AGV do planejamento fatorial 2^2 com triplicata no ponto central. | 36 |
| Tabela 4.4 Estimativa dos efeitos ($\alpha = 0,10$) para a produção de AGV para o planejamento fatorial 2^2 | 37 |
| Tabela 4.5 Análise de variância obtida para o planejamento fatorial 2^2 na produção de AGV..... | 38 |
| Tabela 4.6 Resultados da produção de AGV (t = 45 h) do planejamento fatorial DCCR com quadruplicata no ponto central e 4 pontos axiais. | 43 |
| Tabela 4.7 Estimativa dos efeitos para a produção de AGV para o planejamento DCCR..... | 44 |
| Tabela 4.8 Análise de variância obtida para o planejamento DCCR na produção de AGV..... | 46 |
| Tabela 4.9 Valores médios de AGV, pH, acidez e alcalinidade e seus respectivos DPR, na triplicata realizada no melhor ensaio do DCCR. | 47 |

GIONGO, Citeli. Produção de ácidos graxos voláteis por biodigestão anaeróbia da manipueira. 66p. 2011. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química). Universidade Estadual do Oeste do Paraná.

RESUMO

O cultivo da mandioca se estende por todo o Brasil, dada à fácil adaptação aos diferentes tipos de solos e condições climáticas. Nosso país ocupa o segundo lugar no cultivo dessa planta (15% da produção mundial). O processamento industrial da mandioca gera a manipueira como resíduo líquido, considerado poluente devido à alta carga orgânica e por conter um glicosídeo cianogênico que é hidrolisável a cianeto. Uma das maneiras de minimizar os impactos ambientais e agregar valor ao efluente é a sua utilização na produção de ácidos graxos voláteis (AGVs) via fermentação anaeróbia, objetivo principal deste trabalho, o qual foi realizado utilizando a manipueira como substrato e inóculo de dejetos suíno. O processo fermentativo na produção dos AGVs caracteriza-se, como resultado da atividade das bactérias acidogênicas, pela diminuição do pH e aumento da hidrólise e acidificação da matéria orgânica. Foram testados em meio sintético, à temperatura de 30 °C e pH inicial de 7,0, inóculos de dejetos de suínos e bovinos para definir o melhor inóculo na produção dos ácidos graxos voláteis, sendo o dejetos de suíno o que apresentou os melhores resultados e por isso foi utilizado nas fermentações posteriores. Além do parâmetro de produção de AGVs também foram monitorados o comportamento do pH, acidez e alcalinidade em todos os experimentos. Em fermentações realizadas com a manipueira como substrato, testaram-se diferentes concentrações de glicose como principal fonte de carbono (1, 2, 5 e 9 g/L) e observou-se que a concentração de 2 g/L de glicose produziu cerca de 2,5 g/L de AGVs, expressos como ácido acético, em 36h e com pH 5,0, sendo esta a concentração de glicose utilizada nos experimentos posteriores. Diferentes níveis de alcalinidade e temperatura foram testados através de planejamentos experimentais em que a melhor condição observada foi em 30°C com 3 g/L de bicarbonato de sódio, obtendo-se 3,4 g/L de AGVs em 45h. A partir dessas condições validou-se o modelo para produção de AGVs realizando fermentações em triplicata e avaliando quanto à repetibilidade do processo. Verificaram-se variações mínimas entre as réplicas, avaliadas pelo baixo desvio padrão relativo (DPR) obtido pela média dos resultados. A maior produção de ácidos graxos voláteis neste experimento foi obtida em 45h com média de 3,4 g/L de AGVs, DPR de 1,4% e pH em 5,6. A demanda química de oxigênio (DQO) e a quantidade de cianeto analisadas na manipueira eram de 8865 mg/L de O₂ e 1,9 mg/L, respectivamente, entre outras características físico-químicas determinadas. Após o processo de fermentação anaeróbia obteve-se redução de 21,6% da quantidade de DQO e 12,9% da quantidade de cianeto, indicando que a produção de AGVs, além de agregar valor a manipueira, contribui na redução de contaminantes importantes.

Palavras-chave: Fermentação anaeróbia, ácidos graxos voláteis, manipueira, planejamento experimental.

GIONGO, Citieli. Production of volatile fatty acids by anaerobic biodigestion of *manipueira*. 66p. 2011. Dissertation (Master Degree in Chemical Engineering). State University of West Paraná.

ABSTRACT

The cultivation of cassava extends throughout Brazil because of its excellent adaptation to different soils and climatic conditions. Our country occupies the second position at the worldwide ranking in cultivating this plant (15% of the world production). The industrial processing of cassava generates a liquid waste, the so called *manipueira*, considered as a pollutant due to the high organic load and it contains a cyanogenic glycoside, which can be hydrolyzed to cyanide. One way to minimize environmental impacts and to aggregate value to the effluent is its use in the production of volatile fatty acids (VFA) via anaerobic fermentation, which was the main goal of this study, performed using *manipueira* as a substrate and inoculum of swine dejection. The fermentation process during the production of VFA is characterized as a result of the activity of acidogenic bacteria, by the pH decrease and increased hydrolysis and acidification of the organic matter. Inoculum of swine and of bovine dejections were tested in synthetic medium at 30°C and initial pH of 7.0, to define the most appropriate inoculum for the production of volatile fatty acids, swine dejection presented the best results and was used in posterior fermentations. Besides the parameter of VFA production, the behavior of pH, alkalinity and acidity were as well monitored in all experiments. In the fermentation performed with *manipueira* as a substrate, glucose was used as the main carbon source and different concentrations were tested (1, 2, 5 and 9 g/L) and it was observed that the concentration of 2 g/L of glucose produced about 2.5 g/L of VFA, expressed as acetic acid, after 36h and at pH 5.0, this concentration of glucose was used in further experiments. The alkalinity and temperature levels were tested by experimental design, in which at 30°C with 3 g/L of sodium bicarbonate better conditions were observed, resulting in the production of 3.4 g/L of VFA in 45h. On the basis of these conditions, the model for the production of VFAs was validated by performing fermentations in triplicate and evaluating the reproducibility of the process. There were minor variations between replicates, as assessed by the low relative standard deviation (RSD) from the mean value of the results. The highest production of volatile fatty acids in this experiment was obtained at 45h with an average of VFAs production of 3.4 g/L, with RSD of 1.4% and pH 5.6. The chemical oxygen demand (COD) and the amount of cyanide in *manipueira* were analyzed being 8865 mg/L of O₂ and 1.9 mg/L, respectively, among other physical and chemical characteristics that were determined. After the anaerobic fermentation process, a reduction of 21.6% of COD amount and 12.9% of cyanide amount were obtained, indicating that the production of VFAs not only aggregates value to the *manipueira* but also contributes to the reduction of important contaminants.

Keywords: anaerobic fermentation, volatile fatty acids, *manipueira*, experimental design.

1. INTRODUÇÃO

O cultivo da mandioca se estende por todo o Brasil, seja como lavouras de subsistência ou como plantios para fins comerciais. Nosso país contribui com cerca de 15% da produção mundial ocupando o segundo lugar no cultivo dessa planta. Estima-se que a produção alcança 25 milhões de toneladas de raízes ao ano e que 60% seja destinada à industrialização (CORREIA & DEL BIANCHI, 2008).

Um grande problema enfrentado pelas indústrias de processamento da mandioca é o destino do resíduo líquido gerado, denominado de manipueira, líquido leitoso proveniente das raízes da planta gerado no processo de moagem e prensagem da mandioca. Sem um destino adequado ao resíduo, as empresas deste setor costumam descartar os efluentes em rios e terrenos próximos. Durante a produção da farinha de mandioca, a manipueira é gerada na proporção de 300L/ton de raiz processada, e na obtenção da fécula, produz-se 600 L/ton de raiz (BARANA & CEREDA, 2000; PAGANINI *et al.*, 2002).

A manipueira é considerada como um poluente devido à alta carga orgânica e por conter a linamarina, um glicosídeo cianogênico que é potencialmente hidrolisável a cianeto (MARÓSTICA JR & PASTORE, 2007).

De forma a minimizar os impactos ambientais e agregar valor, estudos mostram diferentes aplicações para o resíduo da manipueira. O CERAT, Centro de Raízes e Amidos Tropicais, tem realizado pesquisas sobre tratamento anaeróbio de manipueira, objetivando, além da redução da carga orgânica, a produção do gás metano. A manipueira possui ações herbicida, inseticida e nematicida, por isso alguns agricultores a utilizam como controle de ervas daninhas, parasitas, bactérias e vírus e na produção de biosurfactantes (SANTOS, 2009). Por outro lado, pelo elevado conteúdo de carbono e nutrientes, como fósforo, nitrogênio e enxofre, outra forma de utilização do resíduo é a sua aplicação como substrato para o crescimento de micro-organismos visando a produção de ácido cítrico, biopolímeros, biogás (metano), ácidos graxos voláteis (AGVs), como os ácidos acético, butírico e propiônico, entre outros produtos (LAMAISON, 2009).

Conforme observado por Alkaya *et al.*, (2009), a diminuição do pH é característica do processo fermentativo na produção dos AGVs, como resultado da atividade acidogênica, sendo que as concentrações de ácidos graxos voláteis aumentam por conta de hidrólise e acidificação simultânea da matéria orgânica. Segundo Leite (2003), a biodigestão anaeróbia de materiais com carga orgânica elevada e desprovido de controle das fases acidogênica, acetogênica e metanogênica pode contribuir para o acúmulo dos ácidos graxos voláteis em detrimento da produção de biogás.

1.1 OBJETIVOS

O objetivo principal deste trabalho consistiu em estudar a produção de ácidos graxos voláteis a partir da manipueira, utilizando-a como substrato. Como objetivos específicos, focou-se:

- no uso de diferentes inóculos na produção de ácidos graxos voláteis, dentre os quais os dejetos de suínos e bovinos;
- na avaliação em meio sintético da influência da concentração da fonte de carbono na produção (acúmulo) de AGVs;
- na utilização da manipueira como meio de cultivo, testando-se diferentes níveis de alcalinidade e de temperatura;
- determinação de um modelo empírico válido para produção de AGVs, através de planejamento experimental;
- na avaliação do grau de redução dos níveis de cianeto e de demanda química de oxigênio (DQO) na manipueira;
- na verificação da produção de biogás no processo.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 O cultivo da mandioca no Brasil

A mandioca (*Manihot esculenta* Crantz), também chamada de macaxeira e aipim é de fácil adaptação aos diferentes tipos de solos e condições climáticas e de baixo custo produtivo. Por isso o cultivo desta planta se estende por todos os estados brasileiros, seja como lavouras de subsistência ou como plantios para fins comerciais, contribuindo para um dos principais alimentos de milhões de pessoas de países tropicais (LAMAISON, 2009; PAGANINI *et al.*, 2002).

Uma das plantas mais eficientes em fotossíntese que se conhece é a mandioca, a qual é rica em carboidratos, apresentando nas suas raízes teores, variando de 20 a 45% de amido e 5% de açúcares redutores. Na matéria seca, o teor de amido varia entre 76,20 a 91,39% (CALDAS NETO *et al.*, 2000).

O Brasil ocupa o segundo lugar na produção mundial de mandioca, contribuindo com cerca de 15% da cultura dessa espécie. Dentre os estados de maior produção destacam-se: Pará, Bahia, Paraná, Maranhão, Rio Grande do Sul, São Paulo, Minas Gerais, Ceará, Pernambuco e Santa Catarina. Estima-se que a produção alcança 25 milhões de toneladas de raízes ao ano e que 60% seja destinada à industrialização (CORREIA & DEL BIANCHI, 2008; INOUE, 2008).

No Brasil existem mais de oitenta espécies de mandioca, que são classificadas de acordo com o teor de cianeto presente em suas raízes: *muito tóxica* com valores acima de 100 mg de HCN/kg de polpa crua, *moderadamente tóxica* entre 50 a 100 mg de HCN/kg e a *atóxica ou inócua* com teor cianogênico inferior a 50 mg/kg de polpa crua, esta última utilizada para fins alimentícios devido à baixa toxidez (VALLE *et al.*, 2004).

Devido ao rápido aumento da população, industrialização e do consumismo moderno, que tornam agravante a geração de resíduos, a busca por fontes renováveis de energia é um assunto que vem sendo discutido mundialmente. Essa questão é importante para atingir tanto um desenvolvimento sustentável quanto uma maior eficiência do processo industrial (CAPPELLETTI, 2009).

Uma vez que as plantas industriais passaram a gerar resíduos com altas concentrações de matéria orgânica, sólidos suspensos totais e nitrogênio, sem um tratamento prévio destes resíduos, isso causou sérios problemas ambientais (SENTÜRK *et al.*, 2010).

Segundo Barana (2000), com a promulgação da Lei Federal nº 9433, sancionada em 8 de janeiro de 1997, que instituiu sobre a Política Nacional de Recursos Hídricos, deve ser dada maior atenção aos resíduos industriais sendo que, por essa lei as empresas passam a pagar não só pela água consumida, mas pela quantidade e qualidade do efluente descartado em corpos d'água. Com a criação da série de normas ISO 14000, que objetiva um sistema de gestão ambiental e também à promoção do desenvolvimento sustentável em todo o mundo, as alternativas de aproveitamento de resíduos tem sido muito incentivadas (CARDOSO, 2003; SOLEDADE *et al.*, 2007).

2.2 A manipueira

O destino dado à manipueira é um grande problema enfrentado pelas indústrias de processamento da mandioca, já que é o principal efluente líquido das fecularias e farinheiras, de aspecto leitoso proveniente das raízes da planta, no processo de moagem e prensagem. Durante a produção da farinha de mandioca, a manipueira é gerada na proporção de 300L/ton de raiz processada, e na obtenção da fécula, produz-se 600L/ton de raiz (BARANA & CEREDA, 2000; PAGANINI *et al.*, 2002).

Ainda são poucas as empresas que realizam o tratamento dos resíduos do processamento da mandioca. A reutilização da manipueira, assim como de qualquer resíduo, visa não apenas reduzir o impacto ambiental, mas também proporcionar maior rentabilidade na atividade agregando valor ao mesmo (CARDOSO, 2003; SOLEDADE *et al.*, 2007).

Sem um destino ao resíduo e a baixo custo, as empresas, que têm destaque como agroindústrias poluidoras, costumam descartar os efluentes em rios e terrenos próximos, o que possibilita o desenvolvimento de micro-organismos anaeróbios facultativos que consomem o oxigênio livre da água e

potencializam a destruição da vida aeróbia do rio, incluindo peixes e vegetais (BARANA, 2000; FERNANDES JÚNIOR, 2001).

A manipueira é um resíduo poluente devido à alta carga orgânica e tóxico pela presença do glicosídeo cianogênico, a linamarina, potencialmente hidrolisável a cianeto. Essa substância danifica células nervosas, se liga com a hemoglobina do sangue dificultando a cadeia respiratória e tornando-se assim prejudicial para os seres vivos (MARÓSTICA JR & PASTORE, 2007; LIMA *et al.*, 2009).

De acordo com Cappelletti (2009), a concentração das substâncias presentes na manipueira é variável, dependendo da espécie cultivada, época do ano, tipo de solo, temperatura, altitude, umidade, entre outros. Quimicamente a manipueira é constituída por um alto teor de matéria orgânica, podendo atingir até 100g DQO/L e 140 mg de cianeto/L. Além de glicose e frutose, que correspondem respectivamente a 29% e 42% da matéria orgânica, o resíduo também possui amido, proteínas e sais minerais. A Tabela 2.1 mostra a composição da manipueira.

Tabela 2.1: Composição química da manipueira

| Parâmetro | Unidade | Valores |
|------------------------|---------|---------|
| Nitrogênio total | mg/L | 32,4 |
| Fósforo | mg/L | 17,8 |
| Potássio | mg/L | 333,6 |
| Cálcio | mg/L | 31,37 |
| Magnésio | mg/L | 36,87 |
| Condutividade Elétrica | dS/m | 1,46 |
| Sódio | mg/L | 51,7 |
| Alumínio | mg/L | 6,6 |
| Carbono Orgânico | g/L | 7,73 |
| pH | – | 4,8 |
| Cianeto | mg/L | 12,0 |
| DBO | mg/L | 6210 |
| DQO | mg/L | 14700 |
| Oxigênio Dissolvido | mg/L | 0,0 |
| Ferro | mg/kg | 6,09 |
| Zinco | mg/kg | 0,59 |
| Cobre | mg/kg | 0,05 |
| Manganês | mg/kg | 0,62 |

Fonte: Silva *et al.*, (2005).

Devido ao extenso cultivo da mandioca em diferentes tipos de solos, encontra-se na literatura uma variabilidade nas faixas de especificações dos constituintes químicos da manipueira, como por exemplo, na tabela 2.1, Silva *et al.*, (2005), apresentam a concentração de matéria orgânica indicada pela concentração da demanda química de oxigênio (DQO) em cerca de 14700 mg/L. Já para Cardoso (2005), citado por Lamaison (2009), a DQO da manipueira provinda de fecularias, é na faixa de 6000 a 8000 mg/L.

2.3 Agregação de valor com a utilização da manipueira

Devido à complexidade de sua composição química, a manipueira foi testada por Aragão & Ponte (1995), como fertilizante obtendo resultados igualmente eficazes aos adubos foliares comerciais, pois o resíduo natural contém em altos níveis, os macro e micronutrientes requeridos pelas plantas, além de ser economicamente vantajoso.

Como forma de recuperação de solos com carência de nutrientes, os trabalhos de Pinho (2007), e Santos *et al.*, (2009), avaliaram a produção de CO₂ e o consumo de O₂ durante a degradação de matéria orgânica por micro-organismos presentes em terrenos arenosos tratados com manipueira. Os resultados obtidos através do monitoramento da respiração basal do solo, a qual informa as condições dos ecossistemas terrestres, foram satisfatórios com aumento da atividade microbiana na degradação de carbono proporcional à quantidade de manipueira aplicada.

Devido ao conteúdo de cianeto na manipueira, ela possui ações herbicida, inseticida e nematicida, alguns agricultores a utilizam como controle de ervas daninhas, parasitas, bactérias e vírus (SANTOS, 2009; SARAIVA, 2007).

A EMATER (Empresa de Assistência Técnica e Extensão Rural), utiliza a manipueira no nordeste do Brasil, em substituição da água na produção de tijolos que, misturada ao barro, a matéria orgânica presente produz uma espécie de liga. Os elementos químicos do resíduo líquido têm a mesma função do fogo no processo de endurecimento do tijolo, ocorrendo após a evaporação do líquido do resíduo, do mesmo modo que a queima faria. Esse processo reduz o uso de

água, substitui a lenha, evitando assim o desmatamento e também a emissão de gases com a queima (CAPPELLETTI, 2009).

As farinheiras usam grande quantidade de lenha para secagem da farinha em fornos de baixa eficiência. Na tentativa de solucionar os problemas de poluição ambiental e energético, o CERAT, Centro de Raízes e Amidos Tropicais, tem realizado pesquisas sobre tratamento anaeróbio de manipueira, objetivando, além da redução da carga orgânica, a produção do gás metano, que pode ser utilizado como fonte de energia, substituindo até 77% da lenha na secagem da farinha (BARANA, 2000; INOUE, 2008).

As características físico-químicas da manipueira foram favoráveis ao crescimento do fungo *Aspergillus niger* na produção de ácido cítrico (LEONEL & CEREDA, 1995). Pastore (2010), obteve a produção deste ácido, através de fermentação submersa com o uso da manipueira recém-coletada, enriquecida com sacarose, como substrato.

A utilização das águas de prensagem da mandioca como substrato para uma cultura de *Rhodospirillum rubrum* juntamente com um lodo anaeróbio mostrou-se favorável para a produção de gás hidrogênio (REUNGSANG *et al.*, 2004). Devido a isso países como Estados Unidos, Alemanha e Japão têm incentivado as pesquisas para geração do biohidrogênio como fonte de energia ecologicamente correta em substituição aos combustíveis fósseis (CAPPELLETTI, 2009).

Como alternativa aos materiais petroquímicos na produção de polímeros plásticos, a manipueira se mostrou um substrato em potencial para a produção de polihidroxicanoatos (PHAs). Além da vantagem da utilização do resíduo, os biopolímeros são rapidamente biodegradáveis (COSTA, 2010).

Pelo elevado conteúdo de carbono e nutrientes, como fósforo, nitrogênio e enxofre, outra forma de agregar valor econômico ao resíduo é a sua aplicação como substrato para o crescimento de micro-organismos na geração de ácidos graxos voláteis, como os ácidos acético, butírico e propiônico (LAMAISON, 2009). O processo biológico aplicado à produção de AGVs a partir de águas residuárias pode ainda ser otimizado por meio da combinação da fermentação com a produção de subprodutos como biogás e biopolímeros (HAWKES *et al.*, 2002).

2.4 Inóculos bovino e suíno na biodigestão anaeróbia

Segundo Santos (2004), os digestores anaeróbios têm sido amplamente utilizados no tratamento de resíduos sólidos, incluindo tratamento de efluentes de agroindústrias, dejetos de animais, lodos de estações de tratamento de esgoto e lixo urbano. Milhões de digestores anaeróbios foram construídos em todo o mundo com essa finalidade.

De acordo com Aquino & Chernicharo (2005); o tratamento de um efluente líquido pode ser realizado, entre outras formas, através de processo biológico que pode ser aeróbio ou anaeróbio. Por causa da baixa produção de sólidos, baixo consumo de energia, tolerância à elevadas cargas orgânicas e possibilidade de operação com elevados tempos de retenção de sólidos, os reatores anaeróbios possuem grande aplicabilidade no tratamento de águas residuárias, concentradas e diluídas. O processo de biodigestão anaeróbia, quando comparado com fermentações aeróbias, possui as vantagens de produzir ácidos graxos voláteis e hidrogênio com baixo consumo de energia (FERNÁNDEZ-MORALES *et al.*, 2010).

No Brasil, essa tecnologia de tratamento de efluentes industriais e domésticos por sistemas anaeróbios, são de baixo custo e com potencial energético, sendo interessante tanto do ponto de vista empresarial, como dos órgãos de fiscalização do meio ambiente e de entidades que promovem a pesquisa (CORREIA & DEL BIANCHI, 2008).

A conversão microbiana do substrato por fermentação anaeróbia é uma série complexa de reações bioquímicas realizada por diversos grupos de bactérias seletivas, ou seja, é um processo fermentativo de flora mista. O efluente que contém compostos orgânicos complexos, tais como polissacarídeos, proteínas e lipídios, na hidrólise formam açúcares, aminoácidos e ácidos graxos, sendo que fato limitante para a próxima etapa, que é processo acidogênico, é que o material a ser degradado deve ser facilmente hidrolisado (PAGANINI *et al.*, 2002).

Na acidogênese/acetogênese, os produtos intermediários formados na hidrólise sofrem ação das bactérias acidogênicas que na ausência de oxigênio livre, convertem a matéria orgânica em ácidos orgânicos (principalmente acético,

propiónico e butírico), e também em hidrogênio, dióxido de carbono, etanol e acetona. Por fim, a metanogênese converte os compostos formados na acidogênese, em metano pela ação das bactérias metanogênicas (VENKATA MOHAN *et al.*, 2007). A Figura 2.1 ilustra as etapas do processo fermentativo e seus produtos formados.

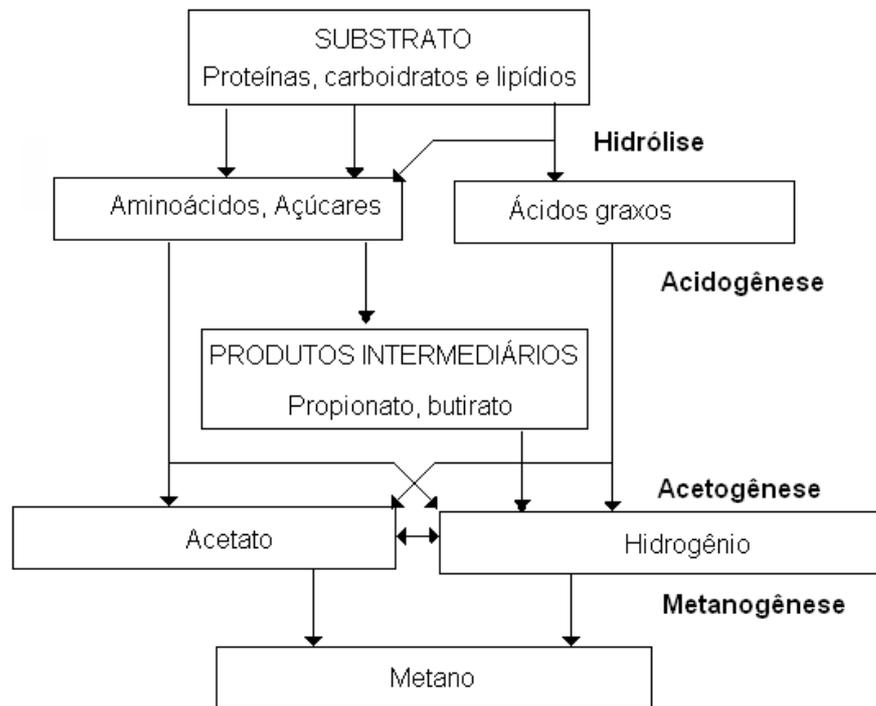


Figura 2.1: Processo de fermentação anaeróbica via cultura mista.

Em condições anaeróbicas de hidrólise da matéria orgânica os micro-organismos não dispõem de um aceptor final de elétrons, função do oxigênio em processos aeróbios. Então o substrato orgânico desempenha ao mesmo tempo a tarefa de aceptor e doador de elétrons, isto é, parte do composto orgânico poluente é reduzida enquanto outra parte é oxidada. Na fermentação da glicose ocorre a formação de ácido pirúvico envolvendo a formação de NADH (forma reduzida da enzima transportadora de elétrons NAD^+). No caso de micro-organismos aeróbios, eles fazem essa reciclagem transferindo elétrons do NADH para o oxigênio, levando à formação de água. Enquanto que micro-organismos anaeróbios fermentativos transferem os elétrons do NADH para a molécula de piruvato, levando à formação de vários compostos reduzidos (principalmente propionato, butirato, hidrogênio, etanol, propanol, formiato) o que depende do tipo

de micro-organismo e das condições ambientais envolvidas (AQUINO & CHERNICHARO, 2005).

Torres Castilho *et al.*, (1995), observaram um bom desempenho de biodigestores com a utilização de lodos ativados de bovinos e suínos como inóculos na produção de biogás.

Comparando-se o inóculo suíno com o de frango em digestão anaeróbia, Steil *et al.*, (2002), concluíram que o meio contendo dejetos suínos tem melhor desempenho na produção de biogás, com a utilização de inóculo na proporção de 15% do volume total do substrato.

Em fermentações de co-digestão de manipueira com diferentes concentrações de inóculo suíno realizadas por Panichnumsin *et al.*, (2010), a 37 °C, concluíram que o dejetos suínos contribui para aumentar a capacidade tamponante do meio, além de fornecer nitrogênio para a síntese microbiana resultando num processo de digestão anaeróbia estável para geração de ácidos graxos voláteis utilizados como intermediários na produção de metano.

Lacerda (1991), citado por Barana (2000), utilizou como inóculo de um reator metanogênico, mantido a 32°C, esterco bovino, sendo utilizada a manipueira como substrato. O biodigestor apresentou redução de DQO de até 8,8% e produção de metano de até 0,49L/g DQO destruída na manipueira.

2.5 Condições da biodigestão para produção de AGVs e biogás

O primeiro estágio característico do tratamento anaeróbio de efluentes é o processo de acidificação, onde os ácidos graxos voláteis são produzidos. Esta produção é dependente das características do substrato, e das condições ambientais e operacionais do bioreator como pH, alcalinidade e temperatura. Para tal, é necessário que os inóculos utilizados sejam ativados, ou seja, possuem as substâncias orgânicas, como proteínas, carboidratos e lipídios, facilmente biodegradáveis, para que ocorra a hidrólise e menor tempo de fermentação, o que difere de lodo primário. A sincronia destes fatores, associada com reduções econômicas definirá a eficiência do sistema (SANTOS, 2004).

Os valores de pKa dos ácidos butírico, acético, propiônico e valérico estão no intervalo de aproximadamente 3,5 e 5,0, sendo que o pH baixo favorece a dissociação desses ácidos, e altas concentrações da AGVs dissociados produzidos contribui para o aumento da alcalinidade (YUAN *et al.*, 2009).

Leite *et al.*, (2003), com o objetivo de produzir ácidos graxos voláteis, por biodigestão anaeróbia, utilizou a manipueira como substrato e argila expandida como suporte para imobilização da biomassa, e verificou que as concentrações efluentes dos ácidos butírico e capróico diminuíram com o aumento da alcalinidade no afluente, enquanto as concentrações do ácido propiônico aumentaram. Obteve também uma diminuição do tempo de retenção hidráulica de 2 para 0,5 hora que resultou na diminuição da concentração de ácido butírico, pouco influenciando a produção dos ácidos acético e propiônico. Concluiu ser satisfatória a viabilidade de produção dos ácidos graxos voláteis.

Larsen (2009), realizou a co-digestão anaeróbia de glicerina e manipueira e obteve produção de AGVs proporcional ao acréscimo de glicerina no meio. Durante essa etapa de produção houve inibição da fase metanogênica, o que não contribuiu para a produção de biogás.

Para Santos (2004), a produção de biogás é função da temperatura operacional do digestor, afetando diretamente a dinâmica do processo. Todos os micro-organismos produtores de metano são muito sensíveis à alterações de temperatura, e qualquer mudança brusca que exceda a 3° C desestabiliza a produção. É preciso assegurar uma relativa estabilidade de temperatura evitando variações bruscas, pois, do contrário, os micro-organismos não sobrevivem e, portanto, a produção do biogás é interrompida.

2.6 Utilização dos AGVs

Além da utilização laboratorial como reagentes de pureza conhecida, os ácidos graxos voláteis possuem importância como substrato intermediário na formação de novos produtos. A produção de polihidroxialcanoatos, um biopolímero utilizado para fabricação de materiais plásticos que são completamente biodegradáveis, foi obtida por Yu (2001), em duas etapas, sendo

a primeira delas a produção dos ácidos acético, butírico e propiônico, via fermentação anaeróbia e por último a polimerização desses ácidos. Semelhantemente em estudos realizados por Venkata Mohan *et al.*, (2010), produziram polihidroxibutirato com efluente enriquecido por ácidos graxos voláteis.

De acordo com Yan *et al.*, (2010), os AGVs são a fonte de carbono preferencial para a remoção de nutrientes como por exemplo o fósforo. Elefsiniotis *et al.*, (2004), investigaram a capacidade dos ácidos graxos voláteis, produzidos naturalmente à temperatura ambiente, de removerem o nitrogênio e conseguiram a remoção deste elemento na faixa de 20 a 200 mg/L.

Tuna *et al.*, (2009), através de fermentações de efluentes de trigo com obtenção de ácidos graxos voláteis, submeteram este processo à eletro-hidrólise para a produção de hidrogênio, o qual é considerado como fonte de energia limpa. Com concentrações de AGVs variando de 1 a 5 g/L alcançou 110 mL de hidrogênio. Por outro lado Argun *et al.*, (2008), obtiveram 693 mL de hidrogênio em fermentações com culturas de *Rhodobacter sphaeroides* com concentrações ótimas de AGVs em cerca de 2,35 g/L e 50 mg de amônia.

Panichnumsin *et al.*, (2010), realizaram co-digestão de manipueira com diferentes concentrações de dejetos suínos, à temperatura de 37 °C para a obtenção de gás metano através da produção intermediária de ácidos graxos voláteis. Os autores obtiveram cerca de 306 mL de metano/g de sólidos voláteis do inóculo suíno adicionado e a concentração de AGVs na faixa de 0,98 g/L.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Inóculo

Foram testados como inóculo os lodos ativados constituídos de dejetos de suínos e de bovinos obtidos de biodigestores anaeróbios já em operação em escala industrial. O lodo ativado de bovino foi obtido do biodigestor de uma indústria de leite e derivados e o lodo ativado suíno foi obtido junto ao biodigestor de um Colégio Estadual Agrícola, ambos situados na região Oeste do estado do Paraná. Os inóculos foram mantidos em galões plásticos de 3 litros, fechados e estocados em temperatura ambiente no laboratório. Os inóculos foram padronizados mediante análise de sólidos totais e sólidos totais voláteis, conforme descrito no item 3.7.2, referente a métodos analíticos.

3.2 Substrato

Foi utilizada a manipueira, efluente proveniente do processamento industrial da fécula de mandioca coletada em uma indústria localizada na região oeste do estado do Paraná. O resíduo foi filtrado por gravidade e mantido em garrafas de politereftalato de etileno (PET), e armazenado em freezer durante o tempo em que transcorreram os experimentos. Na véspera da utilização do efluente, transferiu-se para refrigerador para descongelar, mantendo assim as características originais da manipueira.

A manipueira foi caracterizada em termos de DQO, sólidos totais e sólidos totais voláteis, alcalinidade, pH, açúcares redutores e cianeto de acordo com as metodologias descritas no item 3.7.

Antes dos trabalhos com manipueira, o processo de biodigestão anaeróbia foi realizado com substrato sintético, usando ambos os inóculos para se avaliar a funcionalidade do processo e estabelecer alguns parâmetros operacionais a serem testados posteriormente com a manipueira tais como: determinação do melhor inóculo (suíno ou bovino) e concentração de glicose como fonte de carbono.

3.3 Preparo dos meios de cultura

Os meios de cultura foram preparados de acordo com Del Nery (1987), com algumas modificações, contendo os seguintes nutrientes por litro de meio preparado: uréia 0,125 g, fosfato de potássio monobásico 0,085 g, fosfato de potássio dibásico 0,0217 g, fosfato de sódio dibásico 0,0217 g. Essas substâncias foram dissolvidas na manipueira e, no caso do meio sintético, em água destilada.

A inoculação do lodo foi feita após o ajuste do pH na quantidade de 25 mL de inóculo por litro de meio.

Após inoculação os experimentos foram mantidos em estufa bacteriológica (Quimis®) a 30 °C. Amostras foram retiradas no tempo zero e de forma periódica para a determinação dos parâmetros pH, acidez, alcalinidade e AGVs, sendo que o volume total retirado não ultrapassava 10% do volume total do meio para que não houvesse desestabilização do processo fermentativo devido á quantidade de células retiradas.

3.4 Reator de biodigestão anaeróbia

Foram usados como reatores para a biodigestão anaeróbia recipientes de vidros com capacidade de 3,0 L com tampa metálica. As tampas continham duas perfurações onde foram adaptadas mangueiras de silicone, sendo uma utilizada para retirada periódica de amostra através de uma seringa plástica de 5mL colocada na extremidade externa da mangueira, e outra utilizada para a exaustão de possíveis gases (hidrogênio e metano) provenientes do processo fermentativo. Essa última mangueira ficava com a extremidade interna dentro do frasco, porém sem entrar em contato com o meio, e a extremidade externa imersa em um erlenmeyer contendo uma solução de hipoclorito de sódio 1,25%, vedado com tampão de gaze, algodão e para-filme. A Figura 3.1 demonstra como foram montados os reatores do tipo batelada para a biodigestão anaeróbia.

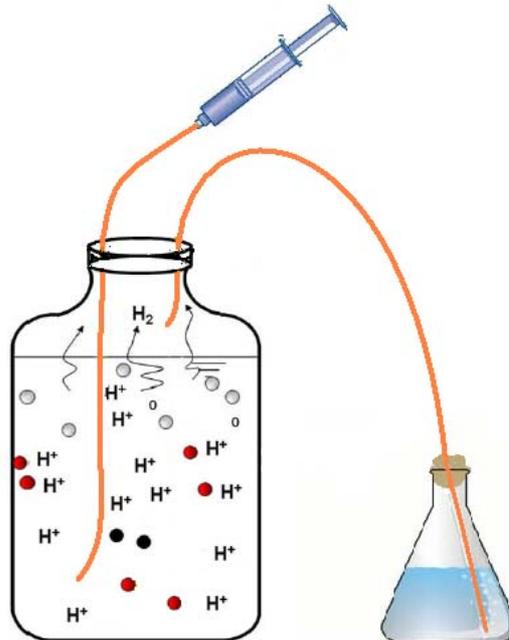


Figura 3.1: Ilustração do reator utilizado na biodigestão anaeróbia.

3.5 Preparo do substrato sintético

O substrato sintético foi preparado conforme item 3.3, porém substituindo a manipueira por água destilada. Foi utilizada a glicose como principal fonte de carbono para este meio e testada em diferentes concentrações: 2, 8, 14, 20 e 40 g/L. Nessas concentrações de glicose foram realizados experimentos com dejetos de suíno e bovino para avaliar o inóculo com melhor eficiência na produção de ácidos graxos voláteis.

3.6 Experimentos com a manipueira

Após obter-se a concentração de açúcares redutores do efluente testou-se também a adição de 1, 4 e 8 g/L de glicose à manipueira para se verificar o aumento da produção dos ácidos graxos voláteis.

Definida a concentração de glicose os experimentos foram avaliados sobre a influência da alcalinidade do meio, preparados conforme descrito acima e acrescidos de bicarbonato de sódio nas concentrações de 0, 1 e 2 g/L.

3.6.1 Planejamento estatístico de experimentos

A fim de se estabelecer um modelo empírico válido de produção de ácidos graxos voláteis na biodigestão, foram realizados dois planejamentos experimentais em função de variáveis importantes do processo como a alcalinidade e temperatura.

O primeiro estudo estatístico foi o planejamento fatorial 2^2 com triplicata no ponto central resultando em sete ensaios, onde a temperatura variou de 25 a 40 °C e a concentração de bicarbonato de sódio de 1 a 3 g/L, conforme mostrado na Tabela 3.1.

Tabela 3.1: Matriz do planejamento fatorial 2^2 com triplicata no ponto central. Os valores entre parênteses referem-se aos valores reais praticados.

| Ensaio | T (°C) | NaHCO ₃ (g/L) |
|--------|----------|--------------------------|
| 1 | -1 (25) | -1 (1,0) |
| 2 | 1 (40) | -1 (1,0) |
| 3 | -1 (25) | 1 (3,0) |
| 4 | 1 (40) | 1 (3,0) |
| 5 | 0 (32,5) | 0 (2,0) |
| 6 | 0 (32,5) | 0 (2,0) |
| 7 | 0 (32,5) | 0 (2,0) |

O segundo ensaio estatístico foi o planejamento experimental tipo DCCR (delineamento composto central rotacional) 2^2 com quadruplicata no ponto central e mais quatro pontos axiais, totalizando 12 ensaios, variaram-se a temperatura de 30 a 50 °C e a concentração de bicarbonato de sódio de 2,0 a 4 g/L, conforme a Tabela 3.2. Utilizou-se a metodologia de superfície de resposta para otimizar as condições da fermentação na produção dos ácidos graxos voláteis e fornecer um modelo matemático adequado. Foi usado o programa computacional STATISTICA™ (versão 8.0, da StatSoft, Inc.) para calcular os efeitos principais das variáveis e suas interações, bem como os dados relativos à Análise de Variância (ANOVA).

Tabela 3.2: Matriz do planejamento fatorial DCCR 2² com quadruplicata no ponto central e 4 pontos axiais. Os valores entre parênteses referem-se aos valores reais praticados.

| Ensaio | T (°C) | NaHCO₃ (g/L) |
|---------------|---------------|--------------------------------|
| 1 | -1 (33) | -1 (2,3) |
| 2 | 1 (47) | -1 (2,3) |
| 3 | -1 (33) | 1 (3,7) |
| 4 | 1 (47) | 1 (3,7) |
| 5 | 0 (40) | 0 (3,0) |
| 6 | 0 (40) | 0 (3,0) |
| 7 | 0 (40) | 0 (3,0) |
| 8 | 0 (40) | 0 (3,0) |
| 9 | -1,41 (30) | 0 (3,0) |
| 10 | 0 (40) | -1,41 (2,0) |
| 11 | 1,41(50) | 0 (3,0) |
| 12 | 0 (40) | 1,41 (4,0) |

3.7 Validação do Processo de produção dos AGVs

Foram realizados experimentos em triplicata com o melhor ensaio obtido no planejamento experimental tipo DCCR e, além dos parâmetros de pH, AGVs, acidez e alcalinidade, avaliou-se também a redução de cianeto e DQO do efluente após a fermentação. O objetivo da validação foi avaliar o grau de repetibilidade do melhor ponto obtido no DCCR, através dos valores médios e do desvio padrão relativo (DPR), dado pelo quociente entre o desvio padrão e a média, em porcentagem.

3.8 Produção de biogás

A produção do biogás foi realizada nas mesmas condições do melhor ensaio obtido no planejamento experimental DCCR. A Figura 3.2 mostra o ensaio montado para a produção de biogás.

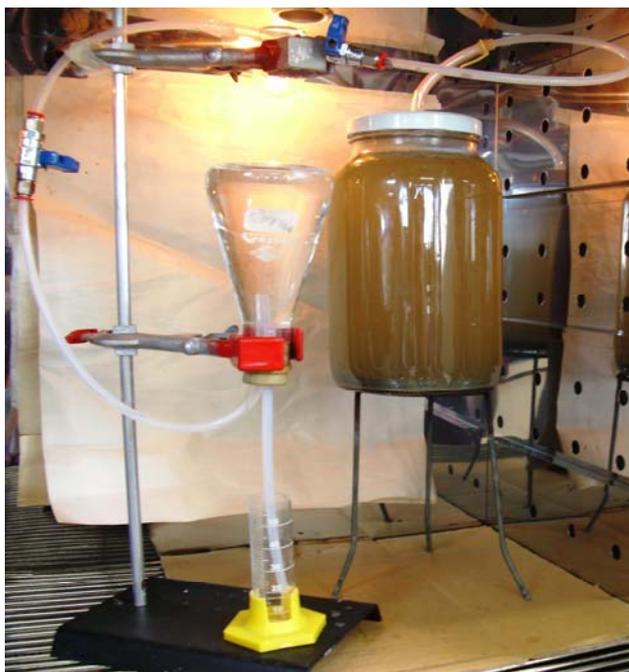


Figura 3.2: Sistema de reator anaeróbio montado para a produção de biogás.

Utilizou-se o mesmo reator para a produção dos ácidos graxos voláteis, porém na tampa havia apenas um orifício onde saía uma mangueira de silicone. Ao longo dessa mangueira haviam duas válvulas: a primeira é uma válvula de segurança para proteção do reator de possíveis refluxos de hidróxido de sódio 5% contido no frasco de saída do biogás, e a segunda para a liberação do biogás produzido no reator para o frasco coletor. A mangueira finalizava em um frasco erlenmeyer contendo solução de hidróxido de sódio 5%, onde o biogás borbulhava. Havendo possível produção do gás dióxido de carbono, este reage com a solução de hidróxido de sódio 5% formando carbonato de sódio e água, enquanto que os demais gases, como o metano e o hidrogênio, deslocam o volume de solução para uma proveta de vidro onde o volume é medido. O volume de biogás produzido foi calculado mediante a fórmula 3.1.

$$V = \frac{[P_{atm} - (\rho \times H \times g)] \times V_{exp} \times T}{P_{atm} \times T_{exp.}} \quad (3.1)$$

Onde:

V = volume de biogás seco na CNTP;

P_{atm} = pressão atmosférica (Kgf./cm²);

ρ = densidade da solução de hidróxido de sódio 5% (Kgf/m³);

H = é a diferença entre os níveis do frasco Erlenmeyer até o frasco coletor (m);

g = aceleração da gravidade (m/s²);

V_{exp} = volume de NaOH 5 % deslocado (diferença diária entre o volume inicial e final do frasco coletor) (mL);

T = temperatura padrão CNTP (273 K);

T_{exp} = temperatura experimental (303 K).

3.9 Métodos analíticos

Seguem descritos os métodos utilizados para a caracterização da manipueira, do inóculo e das amostras retiradas do meio durante o processo de biodigestão. Foram retiradas do reator alíquotas de 50 mL, realizada a verificação do pH através do método potenciométrico de leitura direta em pHmetro devidamente calibrado, e então as amostras foram fracionadas volumetricamente para as análises de acidez, alcalinidade e ácido graxos voláteis.

As análises como demanda química de oxigênio (DQO), sólidos totais e sólidos totais voláteis foram realizadas de acordo com Standard Methods for Examination of Water and Wastewater - *APHA* (1998). A determinação da concentração de açúcares redutores foi adaptado do método espectrofotométrico ultravioleta/visível proposto por Miller (1959) sendo o resultado de açúcar redutor expresso como glicose. A análise de cianeto foi determinada segundo procedimento do Manual da Hach (2000) do equipamento espectrofotômetro (Hitachi U-1800), utilizando o programa do cianeto número 160. Para a análise de acidez seguiu-se conforme método titulométrico descrito nas Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz (1985). As determinações de alcalinidade e ácidos graxos voláteis utilizaram metodologia proposta por Buchauer (1998), em que o volume de titulação até pH 4,3 é utilizado para fins de cálculo da alcalinidade e a diferença entre o volume de titulação de pH 5,0 a pH 4,0 é utilizado para calcular a produção de ácidos graxos voláteis. A discussão detalhada dos métodos analíticos encontra-se no Anexo 1.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Biodigestão com meio sintético

Com o intuito de avaliar a eficiência dos inóculos na produção dos ácidos graxos voláteis, foram realizados os processos de biodigestão em meio sintético com inóculos provenientes de lodo ativado de dejetos suíno e bovino. Leite *et al.*, (2003) realizou fermentações anaeróbias para produção de ácidos graxos voláteis utilizando substrato sintético com 2 e 4 g/L de glicose como principal fonte de carbono e obteve resultados satisfatórios na produção de AGVs. Utilizou-se glicose como fonte de carbono na concentração de 2 g/L no meio sintético. Foram monitoradas as condições de pH e acidez e determinaram-se as concentrações de ácidos graxos voláteis produzidos pelo processo.

O pH de todos os ensaios realizados foi ajustado para 7,0 com hidróxido de sódio 40 % ou ácido clorídrico 30% conforme necessário. Esse procedimento se fez necessário, pois segundo estudos já realizados por Correia e Del Bianchi (2008), a correção do pH de 6,5 a 7,5 melhora a estabilização do processo fermentativo e evita quedas bruscas de pH na etapa metanogênica. Conforme mostram as Figuras 4.1 e 4.2 pode-se verificar o comportamento de cada ensaio.

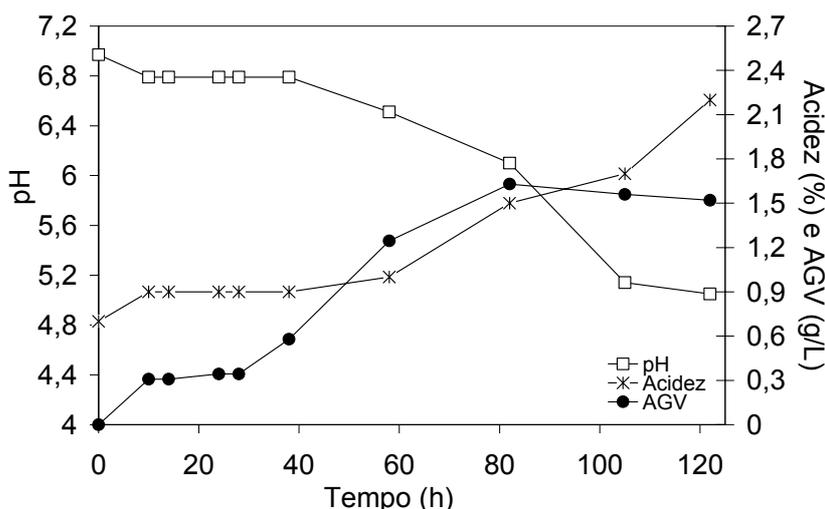


Figura 4.1: Perfil cinético da produção de AGV e comportamento do pH e acidez, utilizando inóculo suíno em meio sintético com 2 g/L de glicose ($pH_i = 7,0$; $T = 30\text{ }^\circ\text{C}$).

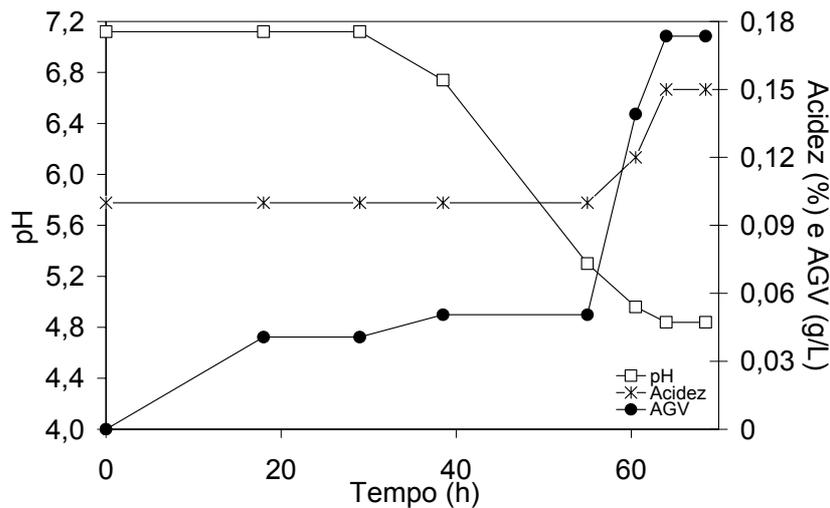


Figura 4.2: Perfil cinético da produção de AGV e comportamento do pH e acidez, utilizando inóculo bovino em meio sintético com 2 g/L de glicose ($pH_i = 7,0$; $T = 30\text{ }^\circ\text{C}$).

Pode-se verificar que no inóculo suíno (Figura 4.1) ocorreu produção de AGVs o que pode ser visualizado pela redução do pH e aumento da acidez. Neste ensaio a concentração máxima de AGV (1,63 g/L) foi verificada em 82 h, perfazendo uma produção de 0,02 g/L.h. Na Figura 4.2 observa-se comportamento semelhante para o inóculo bovino, porém com produção inferior de AGV (0,17 g/L) e tempo menor de experimento.

As alíquotas de amostras eram retiradas na medida em que o pH decaía. Comportamento semelhante ao experimento realizado, em relação às condições de pH, temperatura e produção de ácidos graxos voláteis, foi verificado em estudos realizados por Wang *et al.*, (2005), os quais utilizaram substrato sintético constituído por sacarose na concentração de 20 g/L, pH 5,0, temperatura de 30,0 °C e lodo anaeróbico de resíduo de produção de citrato como inóculo. Os autores verificaram que a degradação de sacarose começou lentamente no período inicial, com um tempo de latência de cerca de 10 h. Após a fase lag a sacarose passou a ser degradada rapidamente e convertida em ácidos graxos voláteis totalizando em 45 h com a produção de aproximadamente 1,18 g/L de acetato.

Com o objetivo de verificar o aumento na produção dos ácidos graxos voláteis foi realizado um experimento com uma concentração dez vezes maior de glicose. Os resultados obtidos para a evolução do pH, acidez e AGVs para os

inóculos suíno e bovino estão apresentados nas Figuras 4.3 e 4.4, respectivamente.

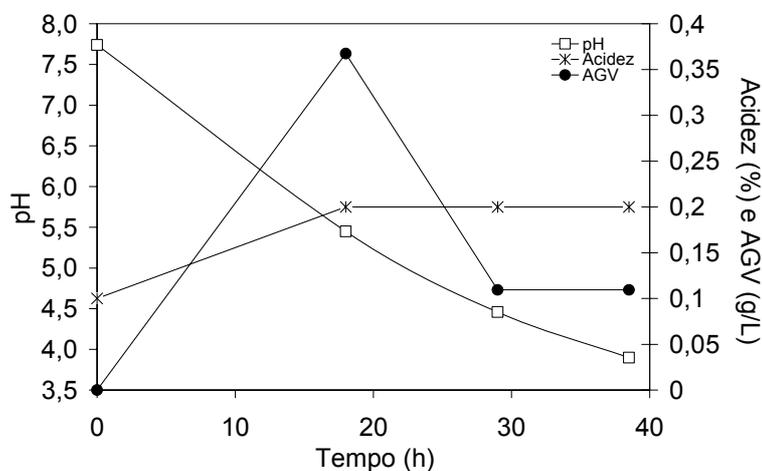


Figura 4.3: Perfil cinético da produção de AGV utilizando inóculo suíno em meio sintético com 20 g/L de glicose ($pH_i = 7,0$; $T = 30\text{ }^\circ\text{C}$).

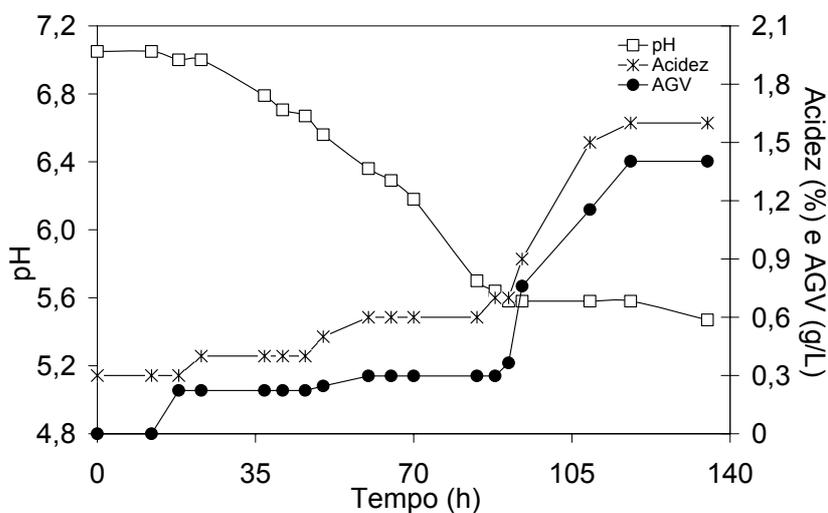


Figura 4.4: Perfil cinético da produção de AGV utilizando inóculo bovino em meio sintético com 20 g/L de glicose ($pH_i = 7,0$; $T = 30\text{ }^\circ\text{C}$).

Em todos os experimentos realizados até então, verificou-se comportamento característico de produção de AGVs para ambos os inóculos testados, isto é, decaimento do pH e aumento da acidez, pois de acordo com Aquino & Chernicharo (2005), o acúmulo de acetato ocorre quando há limitações

cinéticas dos micro-organismos metanogênicos que é acentuada pela redução do pH.

O inóculo suíno atingiu a concentração máxima de AGV (0,37 g/L) em 18 h de cultivo, com produção de 0,02 g/L.h, com um pH no valor de 5,5. O inóculo bovino atingiu em 118 h uma concentração de 1,4 g/L de AGV (produção de 0,01 g/L.h) com pH de 5,6. Para o inóculo suíno a concentração menor de AGV deve-se à alta concentração de açúcar o que induziu o crescimento da biomassa em detrimento do AGV, indicando que para a produção dos ácidos graxos voláteis deve-se trabalhar com a fonte de carbono em concentração limitante. No caso do inóculo bovino (Figura 4.4) verificou-se um aumento na produção de AGV (máximo de 1,40 g/L), porém esse aumento não foi superior ao experimento realizado com inóculo suíno e glicose na concentração de 2 g/L (Figura 4.1).

Devido a estes resultados decidiu-se aumentar a concentração de substrato (glicose) utilizando o inóculo bovino para verificar se o aumento da produção era influenciado pelo aumento da fonte de carbono. O novo experimento foi realizado utilizando-se 40 g/L de glicose no meio sintético. Os resultados obtidos estão apresentados na Figura 4.5. Não foi realizado experimento com o inóculo suíno devido ao elevado crescimento de massa celular observado no experimento anterior (Figura 4.3).

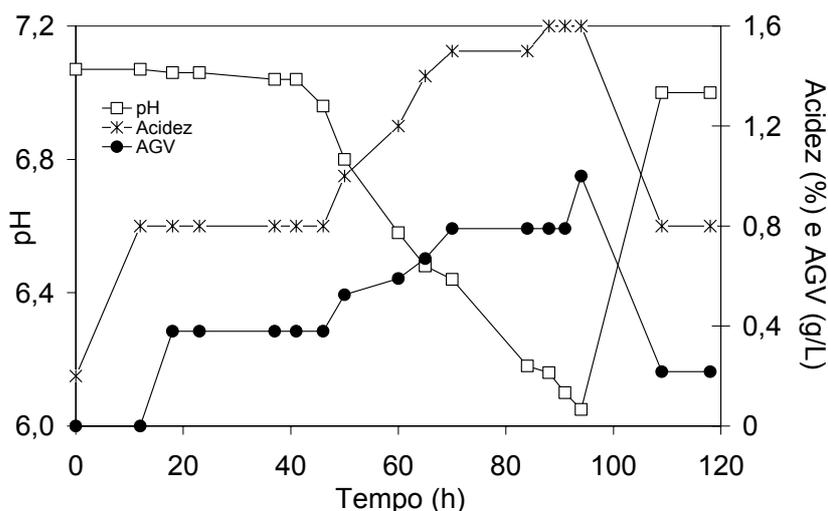


Figura 4.5: Perfil cinético da produção de AGV utilizando inóculo bovino em meio sintético com 40 g/L de glicose ($pH_i = 7,0$; $T = 30\text{ }^\circ\text{C}$).

A adição de substrato no meio não apresentou aumento na produção de AGV, conforme observado na Figura 4.5. Nesta biodigestão a concentração máxima de AGV foi alcançada em 94 horas (1 g/L) com produção de 0,01 g/L.h, quando o pH alcançou 6,0; os valores de acidez aumentaram em decorrência da produção de AGV.

Observando os resultados obtidos verificou-se que o experimento com inóculo suíno na concentração de 2 g/L de glicose, produziu mais AGVs quando comparado com os dados do inóculo bovino. Assim, optou-se pelo uso do inóculo suíno para os próximos experimentos.

4.1.1 Biodigestão com diferentes concentrações de fonte de carbono com inóculo suíno

Visando encontrar a concentração da fonte de carbono que ofereça as melhores condições para a produção dos ácidos graxos voláteis, foram realizados ensaios nas concentrações de 2 g/L, 8 g/L, 14 g/L e 20 g/L de glicose como meio sintético uma vez que os experimentos anteriores haviam utilizado apenas concentrações extremas de glicose. As Figuras 4.6 e 4.7 mostram a evolução do pH e produção de AGV ($pH_i = 7,0$; $T = 30\text{ }^\circ\text{C}$).

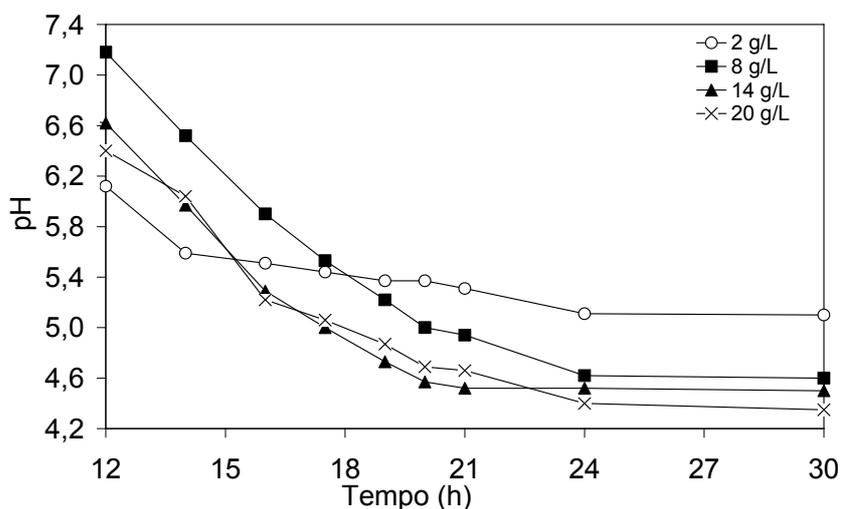


Figura 4.6: Comportamento do pH utilizando inóculo suíno em meio sintético com diferentes concentrações de glicose ($pH_i = 7,0$; $T = 30\text{ }^\circ\text{C}$).

Na Figura 4.6 o comportamento do pH apresentou-se similar na maioria das concentrações testadas, ocorrendo mudanças no pH inicial a partir de 12 horas de experimento e decaindo ao longo do tempo. Verificou-se também

comportamento semelhante na produção de AGV, conforme Figura 4.7, sendo a concentração de 8g/L de glicose a que apresentou maior produção de AGV (1,20 g/L) em 20h, correspondente a uma produção de 0,06 g/L.h em pH 5,0.

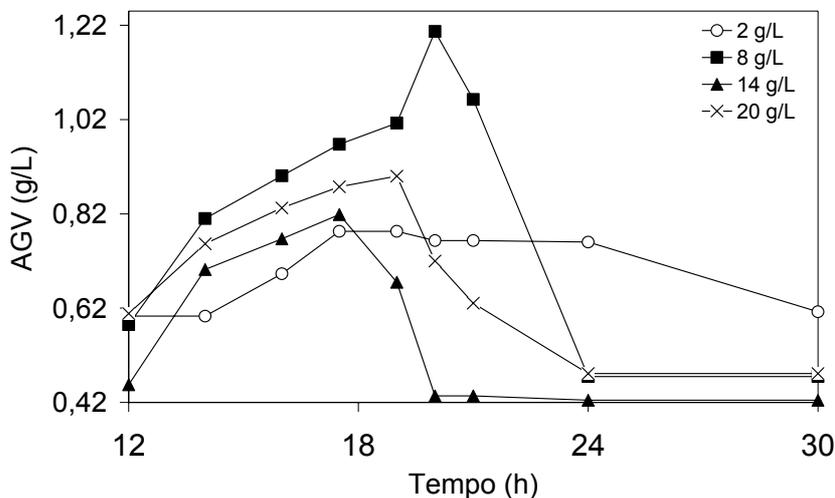


Figura 4.7: Perfil cinético da produção de AGV utilizando inóculo suíno em meio sintético com diferentes concentrações de glicose (pH_i = 7,0; T = 30 °C).

Leite *et al.*, (2003), obtiveram em seus estudos com substrato sintético nas concentrações de glicose de 2 e 4 g/L, em reator anaeróbico de leito fixo, operando à temperatura de 30 °C, cerca de 1,25g/L de ácido acético para ambas as concentrações de glicose. Entretanto, há de se ressaltar que os autores não utilizaram inóculo no meio, isto é, o substrato sintético foi se auto-fermentando, sendo monitorados os níveis de AGVs. Os mesmos concluíram ser satisfatória a produção de AGVs após 12 meses de operação.

Fernández-Morales *et al.*, (2010), produziram 3,18 g/L (0,16 g/L.h) de ácido acético em fermentações em meio sintético contendo 9 g/L de glicose em um reator sequencial em batelada na temperatura de 35 °C e pH mantido em 5,0 durante o processo fermentativo utilizando esgoto doméstico municipal como inóculo.

4.2 Biodigestão com manipueira

O inóculo suíno utilizado nos experimentos foi caracterizado e padronizado em termos de sólidos totais obtendo-se 0,66% e sólidos totais voláteis com 0,45%.

A manipueira foi coletada e caracterizada quanto ao pH, acidez, alcalinidade, açúcares redutores, açúcares redutores totais, DQO, cianeto, sólidos totais e sólidos totais voláteis, sendo os resultados expressos na Tabela 4.1.

Tabela 4.1: Caracterização físico-química da manipueira utilizada nos experimentos

| Parâmetros | unidade | valores |
|------------------|------------------------|---------|
| pH | – | 4,0 |
| Acidez | % | 0,40 |
| Alcalinidade | mmol/L | 2,5 |
| AR | g/L de glicose | 1,0 |
| ART | g/L de glicose | 4,0 |
| DQO | mg/L de O ₂ | 8865,0 |
| DBO | mg/L | 11,32 |
| ST | % | 0,742 |
| STV | % | 0,671 |
| Nitrogênio total | mg/L | 116,48 |
| Fosfato total | mg/L | 26,86 |
| Cianeto | mg/L | 1,91 |

Comparando-se os resultados obtidos quanto à caracterização da manipueira com os valores encontrados por Silva *et al.*, (2005), apresentados na Tabela 2.1, verifica-se que o efluente utilizado neste estudo contém quantidades inferiores de cianeto e DQO e o pH também está levemente mais baixo.

Valores semelhantes ao obtido na Tabela 4.1 foram verificados por Cardoso (2005), o qual empregou a manipueira como biofertilizante e utilizou o efluente com as seguintes características físico-químicas: pH em 3,6; 0,05 mg/L de Cianeto; 7747,00 mg/L de DQO e 0,602 % de sólidos totais.

Lamaison (2009), utilizou manipueira como substrato com concentrações de cianeto que variaram de 1,09 mg/L a 3,64 mg/L em fermentações em batelada, com cultura mista anaeróbia de tratamento de efluentes como inóculo, a 35 °C, para produção de biohidrogênio.

4.2.1 Influência da concentração de glicose na produção de AGVs

Como a manipueira utilizada no experimento encontrava-se inicialmente com concentração de açúcares redutores de 1,0 g/L de glicose (Tabela 4.1), avaliaram-se quatro concentrações diferentes de glicose a serem usadas na fermentação. Dessa forma, foram adicionadas diferentes quantidades de glicose na manipueira, conforme mostra a Tabela 4.2.

Tabela 4.2: Diferentes concentrações de glicose ajustadas para a manipueira

| Concentração de glicose na manipueira (g/L) | Quantidade de glicose adicionada em 1L de manipueira | Concentração final de glicose no meio (g/L) |
|---|--|---|
| 1 | zero | 1,0 |
| 1 | 1,0 | 2,0 |
| 1 | 4,0 | 5,0 |
| 1 | 8,0 | 9,0 |

Os resultados da produção de ácidos graxos voláteis em função do tempo e o pH durante este experimento são apresentados nas Figuras 4.8 e 4.9. A partir dos experimentos anteriores utilizando o meio sintético com inóculo suíno, verificou-se que nas doze primeiras horas da fermentação o pH mantinha-se estável e não ocorria produção quantitativa de ácidos graxos voláteis (Figuras 4.6 e 4.7). Por isso as análises de AGV, acidez e alcalinidade, para este experimento e os subsequentes, foram realizadas a partir de 12 h.

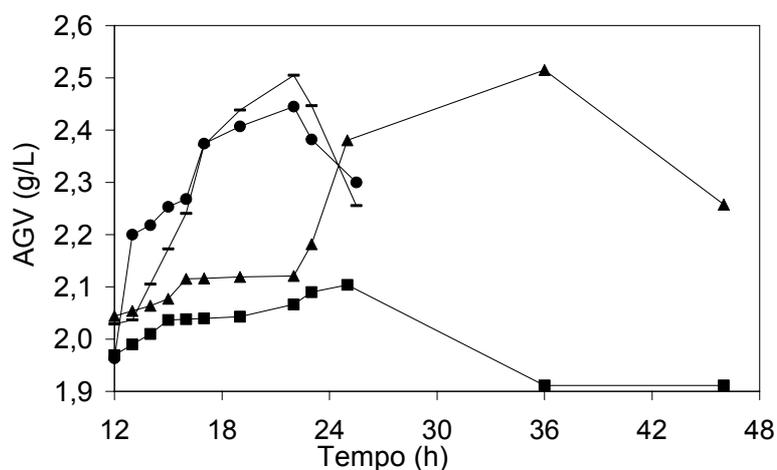


Figura 4.8: Perfil cinético da produção de AGV em meios com manipueira em diferentes concentrações totais de glicose ($pH_i = 7,0$; $T = 30\text{ }^\circ\text{C}$): ■ (1 g/L glicose); ▲ (2 g/L glicose); ● (5 g/L glicose); ▼ (9 g/L glicose).

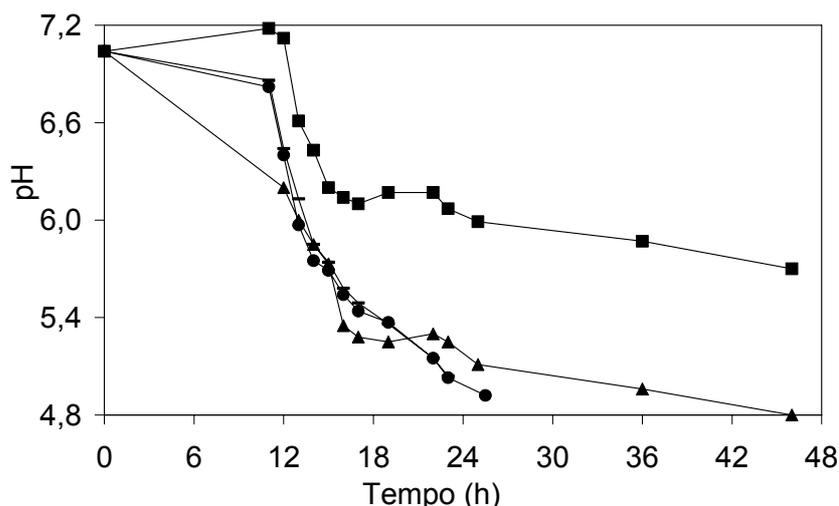


Figura 4.9: Perfil cinético do comportamento do pH em meios com manipueira em diferentes concentrações totais de glicose ($pH_i = 7,0$; $T = 30\text{ }^\circ\text{C}$): \blacksquare (1 g/L glicose); \blacktriangle (2 g/L glicose); \bullet (5g/L glicose); \bullet (9 g/L glicose).

Como se pode observar nos perfis cinéticos das Figuras 4.8 e 4.9, as concentrações de 5,0 e 9,0 g/L de glicose tiveram um comportamento similar e foram analisados até 25 horas já que após esse tempo o pH encontrava-se abaixo de 5,0 e a produção de ácidos graxos voláteis já havia decaído. O meio contendo 2g/L de glicose foi o que resultou em maior concentração de AGV (2,50 g/L) até pH 5,0, porém em um tempo maior (36 h), perfazendo uma produção de 0,07 g/L.h. Assim, foi possível verificar que a concentração de glicose influencia na velocidade de produção de AGVs sendo que em concentrações mais elevadas a produção é atingida em menor tempo. Logo, o melhor resultado obtido foi com 5 g/L de glicose no tempo de fermentação de 22 h, obtendo concentração de 2,50 g/L de AGV no pH 5,2, com produção correspondente de 0,11 g/L.h de AGVs. Entretanto, definiu-se a concentração de 2 g/L de glicose a ser usada nos próximos experimentos visando obter uma condição mais econômica.

Comparando-se com o melhor resultado obtido no estudo em meio sintético (0,06 g/L.h de AGV) que usou 8 g/L de glicose, verificou-se que o meio com manipueira de 2g/L de glicose apresentou resultado de produção de AGVs maior (0,07 g/L.h) e com concentração da principal fonte de carbono 4 vezes menor. Essa diferença pode ser explicada pelo fato da manipueira ser um meio mais complexo em termos de nutrientes, apresentando amido, nitrogênio, fósforo, magnésio, entre outras substâncias (Tabela 2.1).

Yu (2001), visando a produção de polihidroxicanoatos (PHA) a partir da obtenção inicial de AGVs com resíduo líquido de amido como substrato, obteve cerca de 4 g/L de ácidos graxos voláteis totais sendo que o ácido acético representou de 60 a 80 % do total de AGVs, ou seja, de 2,40 a 3,20 g/L.

As Figuras 4.10 e 4.11 mostram o comportamento da acidez e da alcalinidade para as diferentes concentrações de glicose utilizando manipueira.

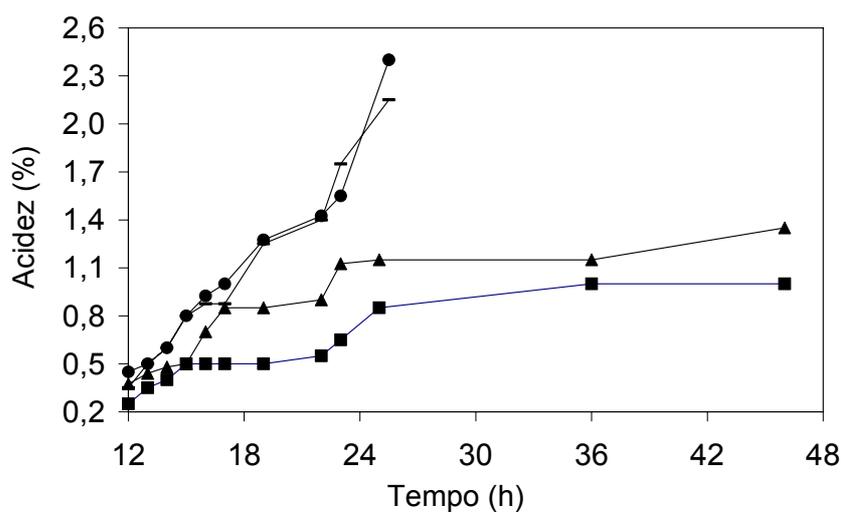


Figura 4.10: Perfil cinético do comportamento da acidez em meios com manipueira em diferentes concentrações totais de glicose ($pH_i = 7,0$; $T = 30\text{ }^\circ\text{C}$): ■ (1 g/L glicose); ▲ (2 g/L glicose); — (5g/L glicose); ● (9 g/L glicose).

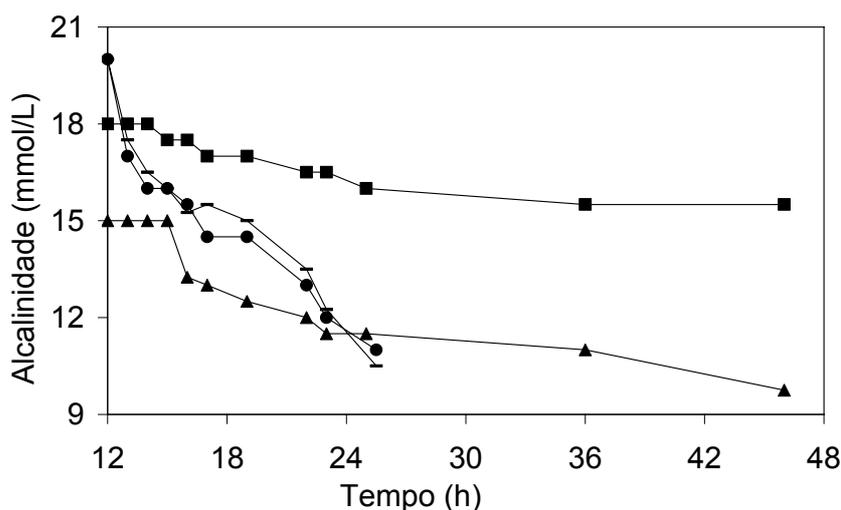


Figura 4.11: Perfil cinético do comportamento da alcalinidade em meios com manipueira em diferentes concentrações totais de glicose ($pH_i = 7,0$; $T = 30\text{ }^\circ\text{C}$): ■ (1 g/L glicose); ▲ (2 g/L glicose); — (5g/L glicose); ● (9 g/L glicose).

A produção de ácidos orgânicos voláteis reduz a capacidade tamponante do meio fermentativo havendo declínio do pH. Foi observado por Mohan *et al.*, (2007), que a melhor atividade das bactérias acidogênicas, com inibição da atividade metanogênica, ocorreu no decréscimo de pH 6 para 4,5, que utilizaram como substrato águas residuais de indústria de laticínios com microflora anaeróbia mista à temperatura de 28°C ±2. Nessas condições obtiveram a produção máxima de 3 g/L de produção de AGVs.

As concentrações de 5,0 e 9,0 g/L de glicose possuem comportamento similar nas análises realizadas, as quais foram avaliadas até 25 horas, já que após esse tempo o pH encontrava-se abaixo de 5,0, decaindo também a produção de AGV. O comportamento da acidez observado na Figura 4.10 é semelhante aos obtidos com os ensaios do meio sintético, com inóculo suíno, aumentando ao longo do tempo. Por outro lado, a alcalinidade vai diminuindo ao longo do tempo com a produção dos ácidos graxos voláteis, verificado na Figura 4.11.

4.2.2 Influência da concentração de bicarbonato de sódio na produção de AGVs

Após definida a concentração de glicose do meio (2 g/L) realizou-se experimentos visando observar a influência da alcalinidade na produção de AGV. Duas diferentes concentrações de bicarbonato de sódio foram testadas: 0, 1 e 2,0g/L. As Figuras 4.12 e 4.13 mostram os resultados obtidos de produção dos ácidos graxos voláteis e pH em função do tempo.

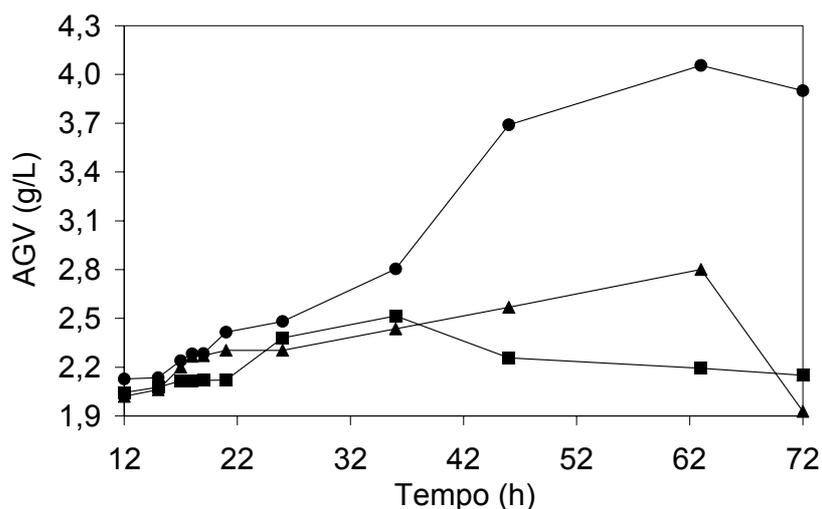


Figura 4.12: Perfil cinético da produção de AGV em meios com manipueira e 2g/L de glicose em diferentes concentrações de bicarbonato de sódio ($pH_i = 7,0$; $T = 30\text{ }^\circ\text{C}$): \blacksquare (0 g/L NaHCO_3); \blacktriangle (1 g/L NaHCO_3); \bullet (2 g/L NaHCO_3).

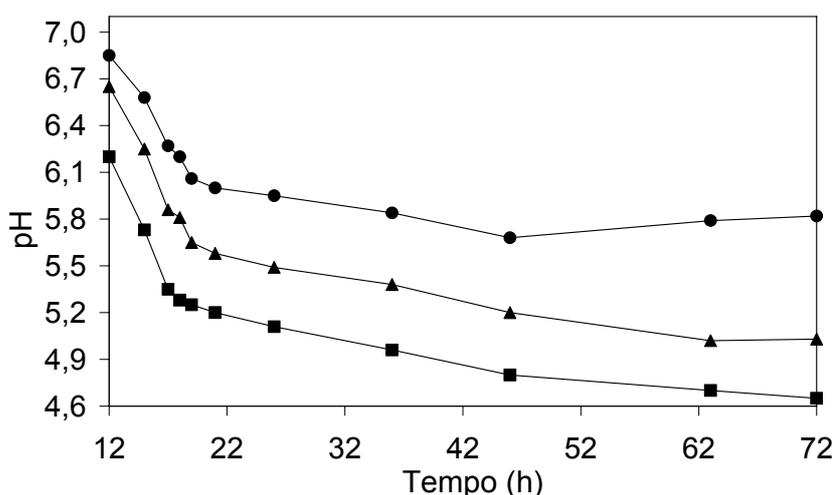


Figura 4.13: Perfil cinético do comportamento do pH em meios com manipueira e 2g/L de glicose em diferentes concentrações de bicarbonato de sódio ($pH_i = 7,0$; $T = 30\text{ }^\circ\text{C}$): \blacksquare (0 g/L NaHCO_3); \blacktriangle (1g/L NaHCO_3); \bullet (2g/L NaHCO_3).

Verifica-se na Figura 4.12 que ocorre um aumento na produção de AGVs no meio contendo 2 g/L de bicarbonato de sódio no qual obteve-se um pico de concentração de 4 g/L de AGV após 63 h, com produção de 0,06 g/L.h. Este experimento, comparado com as demais, realizados anteriormente, foi o que atingiu maior concentração de ácidos graxos voláteis. As análises de acidez (Figura 4.14) e alcalinidade (Figura 4.15) também foram monitoradas para as diferentes concentrações de bicarbonato de sódio.

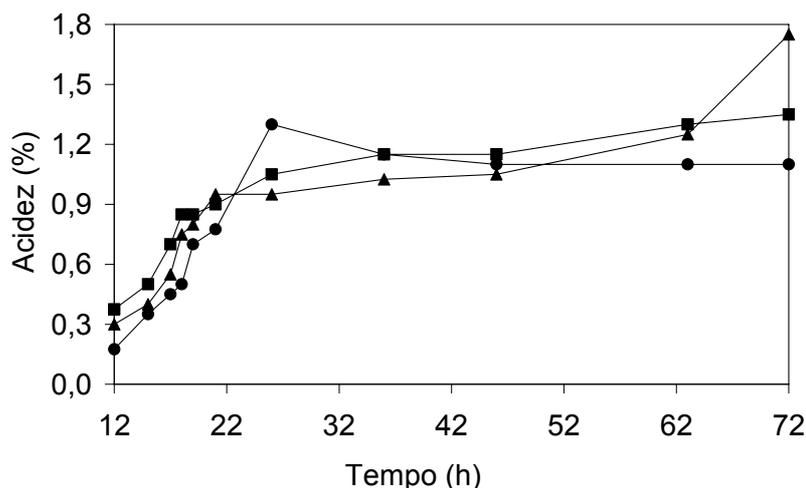


Figura 4.14: Comportamento da acidez em meios com manipueira e 2g/L de glicose em diferentes concentrações de bicarbonato de sódio ($pH_i = 7,0$; $T = 30\text{ }^\circ\text{C}$): ■ (0 g/L NaHCO_3); ▲ (1 g/L NaHCO_3); ● (2 g/L NaHCO_3).

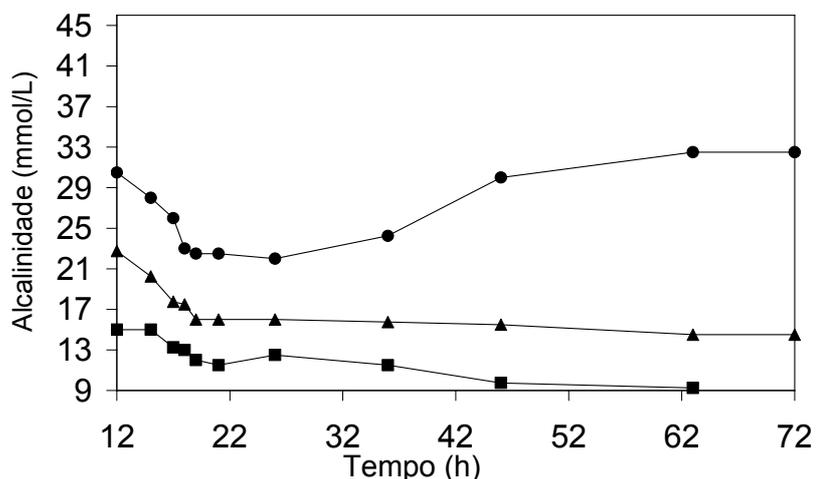


Figura 4.15: Comportamento da alcalinidade em meios com manipueira e 2g/L de glicose em diferentes concentrações de bicarbonato de sódio ($pH_i = 7,0$; $T = 30\text{ }^\circ\text{C}$): ■ (0 g/L NaHCO_3); ▲ (1 g/L NaHCO_3); ● (2 g/L NaHCO_3).

A adição de bicarbonato de sódio influencia o processo fermentativo conforme se verifica nas análises realizadas na concentração de 2g/L. Verifica-se que além do aumento na produção dos AGVs (Figura 4.12), o pH mínimo para esta concentração foi de 5,7, o qual posteriormente sofre um pequeno aumento (Figura 4.13). Para a análise de acidez (Figura 4.14) há um máximo de 1,3% no tempo de 26 h e em seguida decai suavemente para 1,10%. A alcalinidade (Figura 4.15) diminui até um mínimo de 22 mmol/L e depois começa a aumentar, no mesmo tempo que a acidez decresce. Segundo Dias de Luna *et al.*, (2002), isso ocorre na medida em que o resíduo vai sendo tamponado, a alcalinidade

aumenta com conseqüente elevação do pH do meio e a concentração de ácidos graxos voláteis diminui.

Conforme é verificado nas Figuras 4.13, 4.14 e 4.15, para a concentração de 1 g/L de NaHCO_3 e nos ensaios que não possuem bicarbonato de sódio, o pH e alcalinidade do meio decrescem continuamente em função do tempo enquanto que a acidez aumenta.

4.2.3 Planejamento experimental

Com base nos melhores resultados obtidos de concentração de glicose e do favorecimento da alcalinidade do meio para a produção dos ácidos graxos voláteis, realizou-se um planejamento fatorial 2^2 para avaliar os efeitos das variáveis temperatura e alcalinidade do meio. A concentração de glicose do meio de 2g/L foi o parâmetro fixo deste planejamento. A matriz de planejamento utilizada consta na Tabela 3.1, sendo que para cada um dos sete ensaios realizados foram monitorados ao longo do tempo os valores de AGV, pH, acidez e alcalinidade. A seguir serão apresentados os perfis cinéticos desses parâmetros e os resultados estatísticos. A Figura 4.16 mostra a produção de ácidos graxos voláteis obtidos durante o processo de fermentação para os sete ensaios, bem como as Figuras 4.17, 4.18 e 4.19 expressam o comportamento do pH, acidez e alcalinidade, respectivamente.

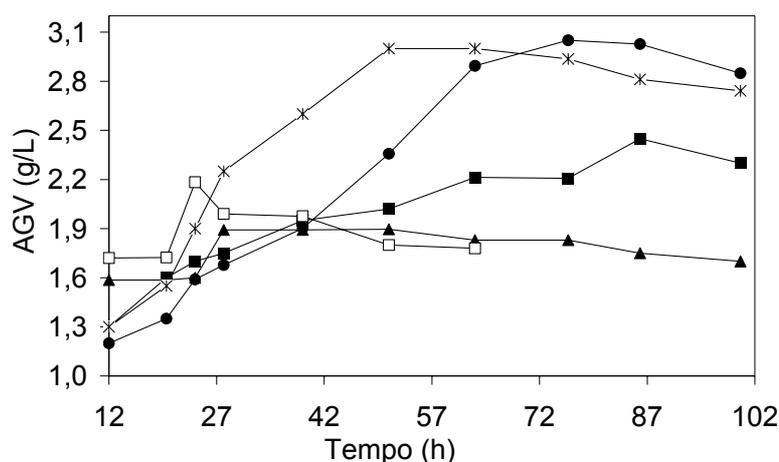


Figura 4.16. Perfil cinético da produção de AGV para os ensaios do planejamento fatorial 2^2 . ▲ Ensaio 1 (25°C; 1g/L NaHCO_3); □ Ensaio 2 (40°C; 1g/L NaHCO_3); ■ Ensaio 3 (25°C; 3g/L NaHCO_3); * Ensaio 4 (40°C; 3g/L NaHCO_3); ● Média Ensaios 5, 6 e 7 (32,5°C; 2g/L NaHCO_3).

Na Figura 4.16 observa-se que o ensaio 2, de 40 °C e 1 g/L NaHCO₃, teve seu máximo de produção de AGVs em 24 h com 2,18 g/L, sendo dado continuidade ao experimento até o tempo de 63 h, visto que os demais parâmetros avaliados (Figuras 4.17, 4.18 e 4.19) também indicam o final da biodigestão para este ensaio.

Para fins de análise estatística do planejamento fatorial foi escolhido o tempo de 51h de fermentação para todos os ensaios uma vez que nesse tempo visualiza-se uma maior concentração de AGVs no ensaio 4 e concentração crescente de ácidos graxos voláteis nos demais ensaios. Assim, mantém-se um tempo de produção próximo aos testes realizados anteriormente (item 4.2.2), nos quais observou-se maiores índices de produção, sendo que a concentração de 2 g/L de bicarbonato de sódio, do item 4.2.2, teve uma produção de AGVs maior que a encontrada neste experimento, isso pode ser devido à variação nos constituintes do inóculo e até do substrato, visto que a durabilidade do inóculo utilizado para os experimentos era de no máximo 8 dias, sendo necessário nova coleta. A manipueira também pode ter havido variação de seus constituintes, devido às diferentes espécies e épocas de cultivo, já que apenas o teor de glicose era monitorado a cada coleta e para os experimentos foram usados substratos e inóculos de dias diferentes.

O experimento da Figura 4.12 foi realizado como ensaio único, ou seja, sem réplicas, haja vista que o intuito deste era apenas verificar a influência da alcalinidade na produção dos ácidos graxos voláteis. Sendo os ensaios 5, 6 e 7 da Figura 4.16 triplicatas do ponto central do planejamento experimental, obtendo-se entre eles um desvio padrão relativo dos resultados de produção de AGVs de 2,04%, considera-se o resultado do planejamento mais confiável. Há uma semelhança entre os dois perfis de produção de AGVs, tendo um aumento notável da produção em 40 horas e estagnando em cerca de 70 horas.

Elefsiniotis *et al.*, (2004), obtiveram produção de AGVs de 0,80 g/L com efluentes industriais ricos em amido em reator anaeróbio operando à temperatura ambiente na faixa de 20 a 24 °C com tempo de detenção hidráulica de 30 h.

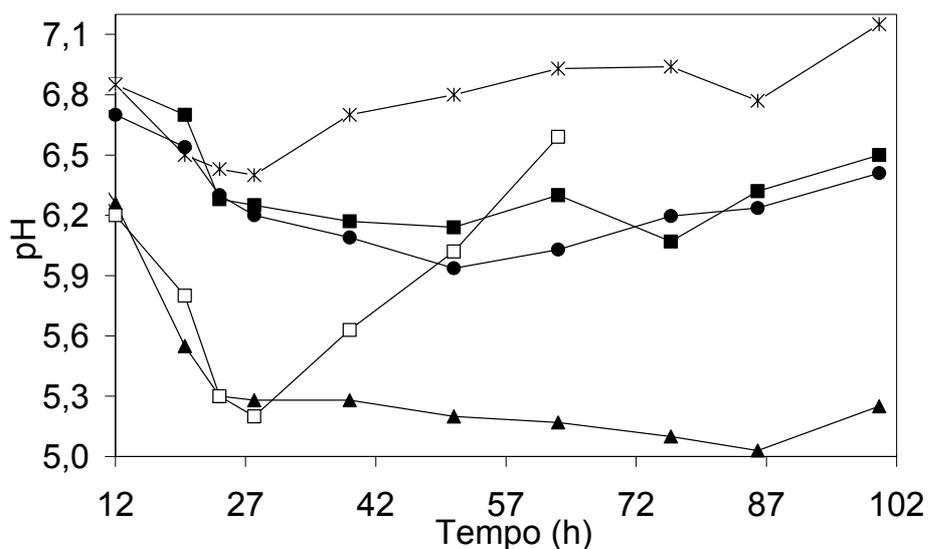


Figura 4.17. Comportamento do pH para os ensaios do planejamento fatorial 2^2 . ▲ Ensaio 1 (25°C; 1g/L NaHCO₃); □ Ensaio 2 (40°C; 1g/L NaHCO₃); ■ Ensaio 3 (25°C; 3g/L NaHCO₃); * Ensaio 4 (40°C; 3g/L NaHCO₃); ● Média Ensaios 5, 6 e 7 (32,5°C; 2g/L NaHCO₃).

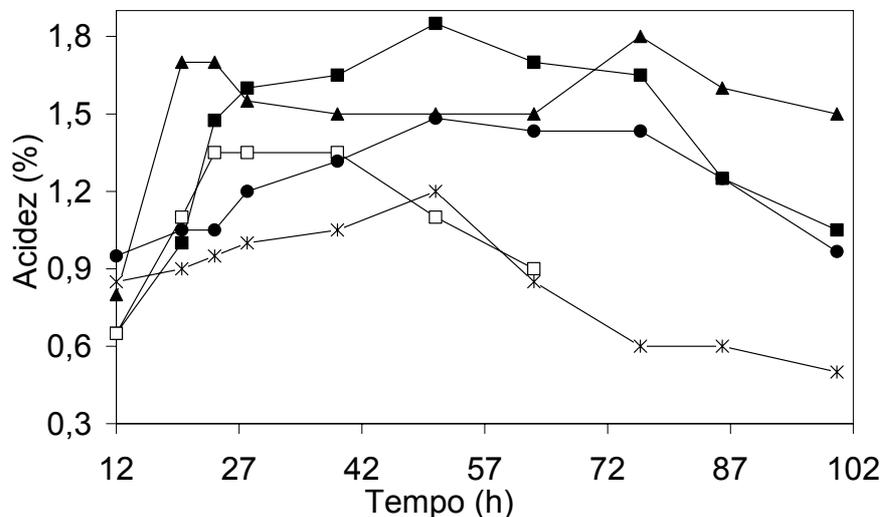


Figura 4.18. Comportamento da acidez para os ensaios do planejamento fatorial 2^2 . ▲ Ensaio 1 (25°C; 1g/L NaHCO₃); □ Ensaio 2 (40°C; 1g/L NaHCO₃); ■ Ensaio 3 (25°C; 3g/L NaHCO₃); * Ensaio 4 (40°C; 3g/L NaHCO₃); ● Média Ensaios 5, 6 e 7 (32,5°C; 2g/L NaHCO₃).

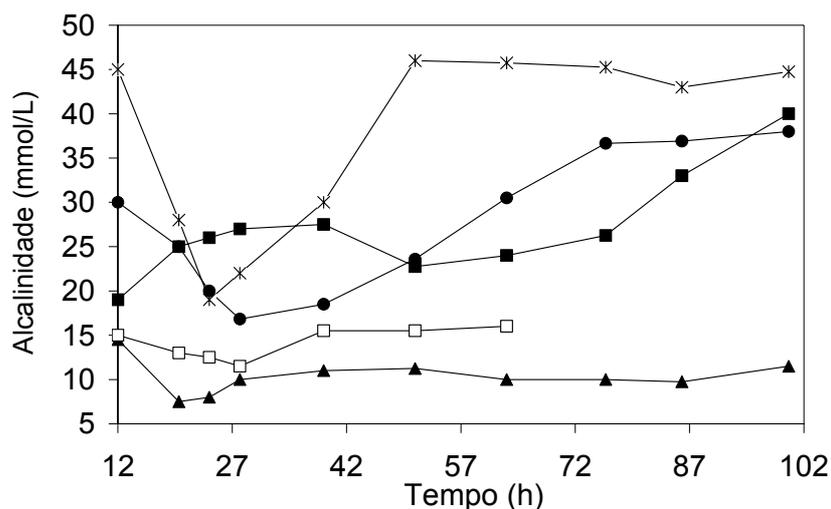


Figura 4.19. Comportamento da alcalinidade para os ensaios do planejamento fatorial 2^2 . \blacktriangle Ensaio 1 (25°C; 1g/L NaHCO_3); \square Ensaio 2 (40°C; 1g/L NaHCO_3); \blacksquare Ensaio 3 (25°C; 3g/L NaHCO_3); \ast Ensaio 4 (40°C; 3g/L NaHCO_3); \bullet Média Ensaios 5, 6 e 7 (32,5°C; 2g/L NaHCO_3).

As Figuras 4.17, 4.18 e 4.19 apresentaram comportamentos de pH, acidez e alcalinidade, respectivamente, semelhante ao experimento do item 4.2.2.

A Tabela 4.3 apresenta a matriz do planejamento, com as variáveis nas suas formas codificadas e reais, e os resultados obtidos de produção de ácidos graxos voláteis no processo fermentativo em 51 h de produção.

Tabela 4.3. Resultados da produção de AGV do planejamento fatorial 2^2 com triplicata no ponto central. Os valores entre parênteses referem-se aos valores reais praticados.

| Ensaio | T (°C) | NaHCO_3 (g/L) | AGV (g/L) |
|--------|----------|------------------------|-----------|
| 1 | -1 (25) | -1 (1,0) | 1,925 |
| 2 | 1 (40) | -1 (1,0) | 1,800 |
| 3 | -1 (25) | 1 (3,0) | 2,020 |
| 4 | 1 (40) | 1 (3,0) | 3,000 |
| 5 | 0 (32,5) | 0 (2,0) | 2,343 |
| 6 | 0 (32,5) | 0 (2,0) | 2,317 |
| 7 | 0 (32,5) | 0 (2,0) | 2,410 |

A Tabela 4.3 indica que o ensaio número 4, com as condições operacionais de temperatura de 40 °C, e 3 g/L de bicarbonato de sódio, foi o que mais produziu ácidos graxos voláteis.

Realizou-se análise estatística do experimento usando a matriz do planejamento da Tabela 4.3. Os ensaios 5, 6 e 7 são replicatas realizadas no ponto central do experimento, com intuito de verificar a reprodutibilidade e o erro experimental.

A estimativa dos efeitos principais e de interação das variáveis para o planejamento é apresentada na Tabela 4.4, onde se observou também os valores obtidos para o erro padrão, p-valor, os valores dos coeficientes das variáveis no modelo, o coeficiente de correlação R^2 e o nível de significância. Estes resultados foram obtidos empregando o software STATISTICA™ (versão 8.0, da StatSoft, Inc).

Todos os efeitos são significativos para o intervalo de confiança de 90% (p-valor < 0,10) e influenciam positivamente a concentração de AGV, ou seja, aumentando a temperatura e a concentração de bicarbonato de sódio aumenta-se a produção dos ácidos graxos voláteis.

Tabela 4.4 Estimativa dos efeitos ($\alpha = 0,10$) para a produção de AGV para o planejamento fatorial 2^2 .

| Variável | Efeito | Erro padrão do efeito | p-valor | Coeficiente | Erro padrão coeficiente |
|-------------------------------|----------|-----------------------|----------|-------------|-------------------------|
| Intercepto | 2,256616 | 0,052432 | 0,000028 | 2,256616 | 0,052432 |
| (1)T(°C) | 0,417340 | 0,138723 | 0,057283 | 0,208670 | 0,069362 |
| (2)[NaHCO ₃](g/L) | 0,657690 | 0,138723 | 0,017796 | 0,328845 | 0,069362 |
| Interação 1 com 2 | 0,561770 | 0,138723 | 0,027119 | 0,280885 | 0,069362 |

$R^2 = 0,941$

Isto também pode ser verificado no Gráfico de Pareto, Figura 4.20, que representa a razão entre o valor estimado do efeito e seu erro padrão, e constitui o valor do efeito padronizado.

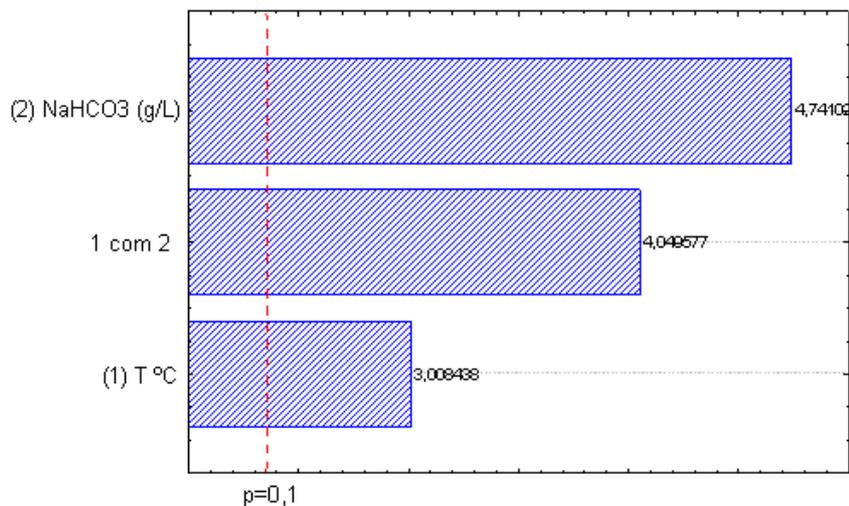


Figura 4.20: Gráfico de Pareto para o modelo obtido no planejamento experimental 2².

A análise de variância para este planejamento é apresentada na Tabela 4.5. Com um intervalo de confiança de 90%, o valor tabelado de F, com seus respectivos graus de liberdade é: $F_{\text{tab}}(3; 3; 0,1) = 5,39$

Tabela 4.5. Análise de variância obtida para o planejamento fatorial 2² na produção de AGV

| Fonte de variação | SQ | GL | MQ | Fcalc |
|-------------------|----------|----|----------|--------|
| Regressão | 0,922315 | 3 | 0,307438 | 15,975 |
| Resíduo | 0,057732 | 3 | 0,019244 | |
| Total | 0,980047 | 6 | | |

SQ = soma quadrática; GL = graus de liberdade; MQ = média quadrática

Como neste experimento a relação entre F_{calc} e F_{tab} é menor do 4,0 este modelo não é válido para fins de utilização com a finalidade de prever o comportamento do processo (Rodrigues & Lemma, 2005). A superfície de resposta obtida para o modelo linear é apresentada no gráfico da Figura 4.21.

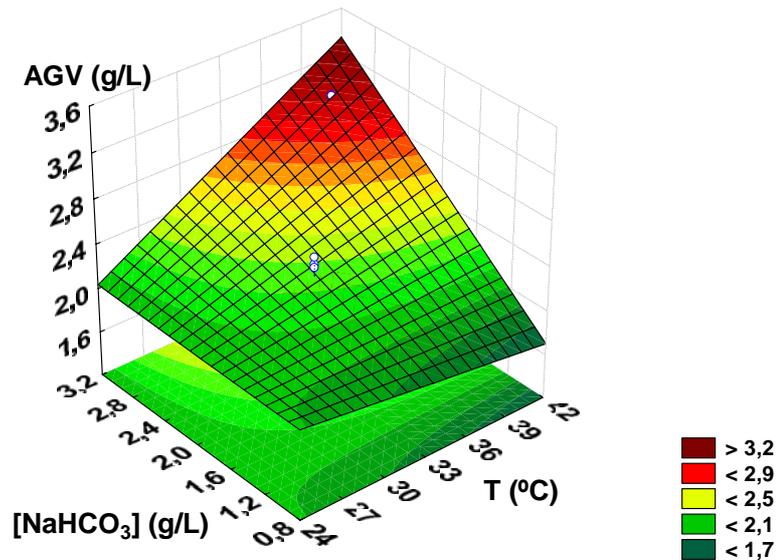


Figura 4.21: Superfície de resposta: AGV (g/L) em função da temperatura (°C) e concentração de bicarbonato de sódio (g/L).

Pelos resultados de produção de AGVs obtidos nos ensaios do planejamento experimental e através da análise estatística realizada, observou-se que o aumento da temperatura e da concentração de bicarbonato de sódio influem significativamente no aumento da resposta, sendo que o melhor resultado obtido foi de 3,0 g/L de ácidos graxos voláteis produzidos no ensaio 4, realizado com 3 g/L de bicarbonato de sódio e temperatura de 40 °C.

4.2.4 Planejamento experimental DCCR

Devido ao planejamento experimental 2^2 não ter gerado um modelo válido para o processo de biofermentação na produção de ácidos graxos voláteis, realizou-se um planejamento experimental do tipo delineamento composto central rotacional (DCCR). Sabe-se que os planejamentos fatoriais 2^2 geram modelos lineares e o tipo DCCR gera modelos não lineares (quadráticos). Para a realização deste estudo, valeu-se da informação de que os parâmetros temperatura e concentração de bicarbonato de sódio, utilizados no planejamento fatorial 2^2 , influenciaram positivamente o processo. Por isso repetiram-se as variáveis para avaliar a produção dos ácidos graxos voláteis por processo fermentativo usando a manípueira. A matriz do planejamento DCCR encontra-se

na Tabela 3.2, onde se verifica faixas de estudo mais altas para a temperatura (30 a 50 °C) e para a concentração de bicarbonato de sódio (2 a 4 g/L).

A Figura 4.22 mostra a produção de ácidos graxos voláteis obtidos durante o processo fermentativo para o planeamento DCCR. As Figuras 4.23, 4.24 e 4.25 expressam o comportamento do pH, acidez e alcalinidade, respectivamente, durante a biodigestão.

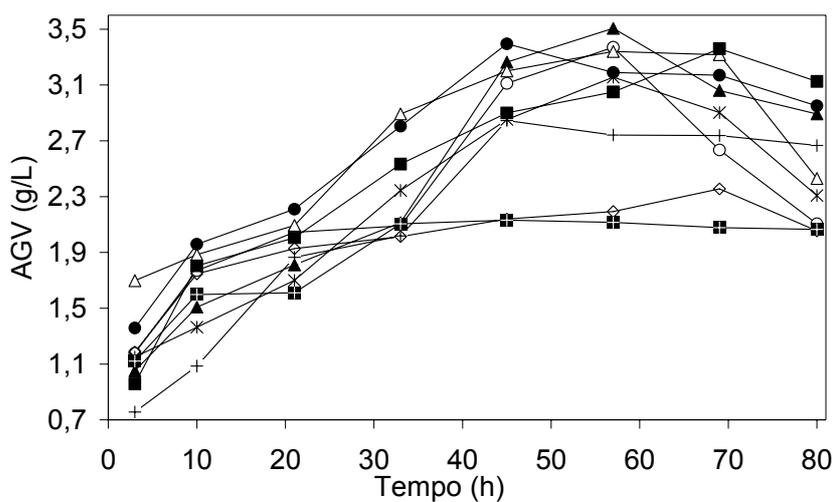


Figura 4.22: Perfil cinético da produção de AGV do planeamento DCCR. ○ 33°C 2,3g/L NaHCO₃; + 47°C 2,3g/L NaHCO₃; ▲ 33°C 3,7g/L NaHCO₃; ◇ 47°C 3,7g/L NaHCO₃; * 40°C 3g/L NaHCO₃; ● 30°C 3g/L NaHCO₃; △ 40°C 2g/L NaHCO₃; ■ 50°C 3g/L NaHCO₃; ■ 40°C 4g/L NaHCO₃.

Observa-se na Figura 4.22 que todos os ensaios tiveram um perfil cinético semelhante na produção dos ácidos graxos voláteis, obtendo uma boa produção a partir de 45 h. Assim, optou-se pelos resultados de produção de AGV neste tempo para realizar a análise estatística.

As Figuras 4.23, 4.24 e 4.25 apresentam comportamentos de pH, acidez e alcalinidade, respectivamente.

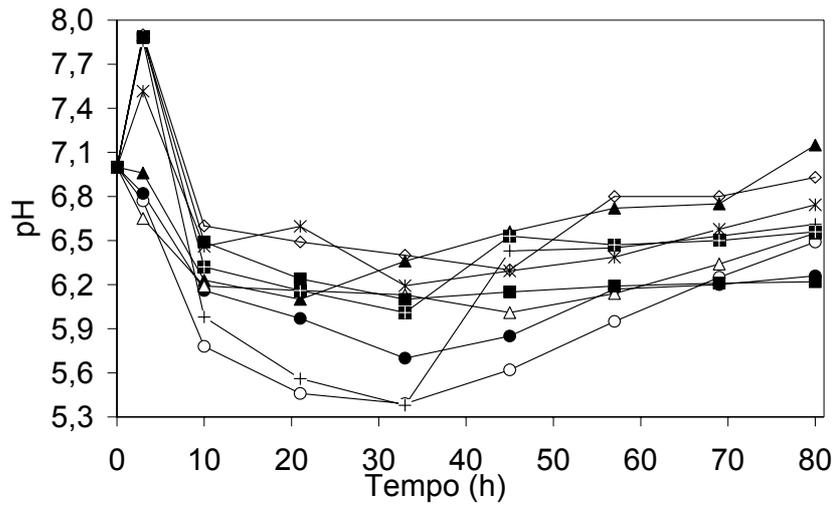


Figura 4.23: Perfil cinético do comportamento do pH do planejamento DCCR. ○ 33°C 2,3g/L NaHCO₃; + 47°C 2,3g/L NaHCO₃; ▲ 33°C 3,7g/L NaHCO₃; ◇ 47°C 3,7g/L NaHCO₃; * 40°C 3g/L NaHCO₃; ● 30°C 3g/L NaHCO₃; △ 40°C 2g/L NaHCO₃; ■ 50°C 3g/L NaHCO₃; ■ 40°C 4g/L NaHCO₃.

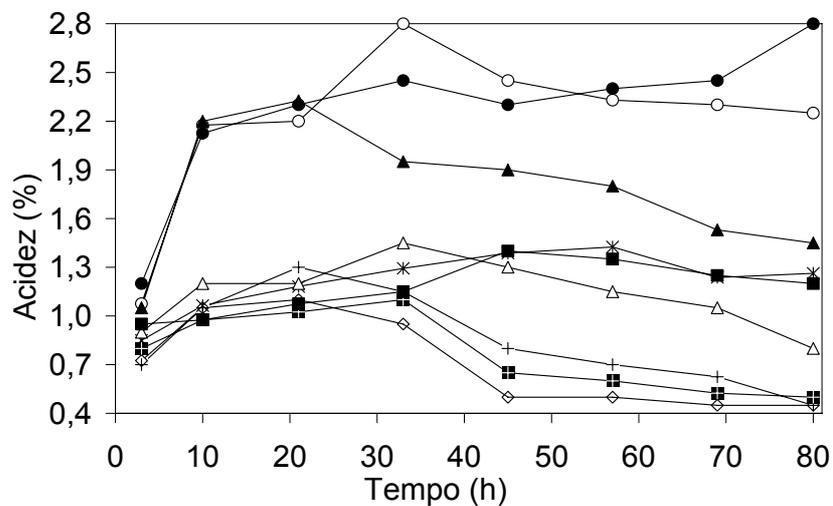


Figura 4.24: Perfil cinético da acidez do planejamento DCCR. ○ 33°C 2,3g/L NaHCO₃; + 47°C 2,3g/L NaHCO₃; ▲ 33°C 3,7g/L NaHCO₃; ◇ 47°C 3,7g/L NaHCO₃; * 40°C 3g/L NaHCO₃; ● 30°C 3g/L NaHCO₃; △ 40°C 2g/L NaHCO₃; ■ 50°C 3g/L NaHCO₃; ■ 40°C 4g/L NaHCO₃.

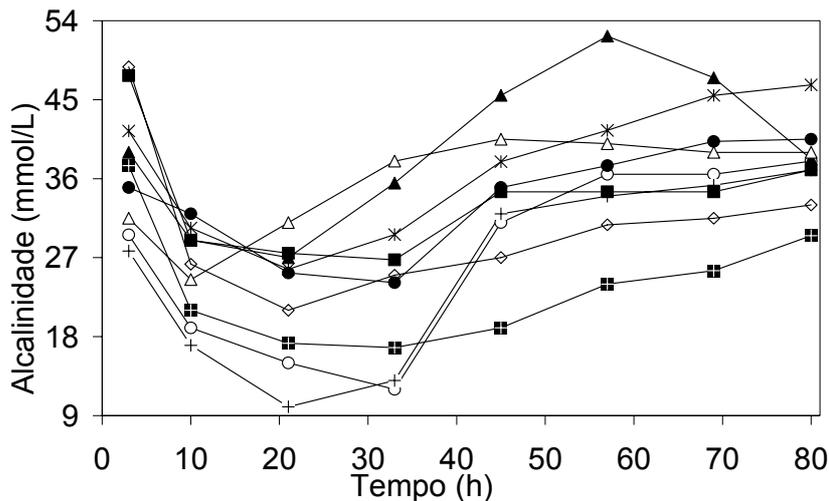


Figura 4.25: Perfil cinético da alcalinidade do planejamento DCCR. ○ 33°C 2,3g/L NaHCO₃; + 47°C 2,3g/L NaHCO₃; ▲ 33°C 3,7g/L NaHCO₃; ◇ 47°C 3,7g/L NaHCO₃; * 40°C 3g/L NaHCO₃; ● 30°C 3g/L NaHCO₃; △ 40°C 2g/L NaHCO₃; ■ 50°C 3g/L NaHCO₃; ■ 40°C 4g/L NaHCO₃.

O comportamento de pH observado na Figura 4.23 mostra que para os ensaios contendo menor concentração de bicarbonato de sódio chega-se a níveis mais baixos de pH, sendo o mínimo observado em 5,3 nos ensaios na temperatura de 33°C e 47°C ambos com 2,3 g/L de bicarbonato de sódio.

Os resultados práticos obtidos de produção de AGVs, pH e alcalinidade, conforme Figuras 4.22, 4.23 e 4.25 respectivamente, se assemelham os estudos realizados por Yuan *et al.*, (2009), que utilizaram meio sintético constituído por extrato de carne como substrato, a 20-22 °C, para produção de AGVs, onde o pH inicial das fermentações foi de 6,1 e 6,8. No primeiro dia do processo o pH do meio aumentou para 7,3, decaindo para 6,8 e, então, gradualmente, caiu para 6,4 ao longo de 5 dias e manteve-se entre 6,1 e 6,5. Os autores concluíram que a diminuição do pH foi devido à produção de AGVs, enquanto que a alcalinidade do meio aumentou.

Mu *et al.*, (2006), através de um planejamento do tipo DCCR para a produção de biohidrogênio com fermentação anaeróbia obtiveram que os parâmetros de pH e temperatura foram interdependentes e que a interação entre a concentração de substrato e pH não foi significativa. As condições ótimas encontradas pelos autores foram pH 5,5, temperatura de 34,8 °C e concentração de sacarose de 24,8 g/L.

As análises de acidez e alcalinidade das Figuras 4.24 e 4.25, respectivamente, possuem um comportamento semelhante aos observados nos experimentos anteriores realizados com bicarbonato de sódio.

Através da análise de regressão dos pontos experimentais, este tipo de planejamento gera modelos quadráticos que resultam em superfícies de resposta curvas (Rodrigues & Lemma, 2005). A matriz do planejamento DCCR com as variáveis nas suas formas codificadas e reais, e os resultados obtidos de produção de ácidos graxos voláteis no processo fermentativo, para o tempo de 45 h, são apresentadas na Tabela 4.6.

Tabela 4.6. Resultados da produção de AGV (t = 45 h) do planejamento fatorial DCCR com quadruplicata no ponto central e 4 pontos axiais. Os valores entre parênteses referem-se aos valores reais praticados.

| Ensaio | T (°C) | NaHCO ₃ (g/L) | AGV (g/L) |
|--------|------------|--------------------------|-----------|
| 1 | -1 (33) | -1 (2,3) | 3,11 |
| 2 | 1 (47) | -1 (2,3) | 2,85 |
| 3 | -1 (33) | 1 (3,7) | 3,26 |
| 4 | 1 (47) | 1 (3,7) | 2,14 |
| 5 | 0 (40) | 0 (3,0) | 2,86 |
| 6 | 0 (40) | 0 (3,0) | 2,89 |
| 7 | 0 (40) | 0 (3,0) | 2,64 |
| 8 | 0 (40) | 0 (3,0) | 3,02 |
| 9 | -1,41 (30) | 0 (3,0) | 3,40 |
| 10 | 0 (40) | -1,41 (2,0) | 3,20 |
| 11 | 1,41 (50) | 0 (3,0) | 2,13 |
| 12 | 0 (40) | 1,41 (4,0) | 2,94 |

A matriz de dados indica que o melhor resultado (3,40 g/L de AGV) foi obtido com o ensaio 9: temperatura de 30°C e 3g/L de bicarbonato de sódio, utilizando a manipueira com concentração de cerca de 2 g/L de açúcares redutores medidos como glicose. Verificou-se um aumento comparativamente ao planejamento anterior, cujo melhor resultado foi de 3.0 g/L de AGV a 40 °C e 3.0 g/L de bicarbonato de sódio (ensaio 4).

Wang *et al.*, (2005), através de uma análise estatística de experimentos tipo DCCR delinearão as melhores condições de produção de AGVs, via cultura anaeróbia com águas residuais ricas em sacarose, e obtiveram que a interação entre temperatura e pH foram significativas com as seguintes condições ótimas: temperatura de 33,5 °C, pH em 5,6 e concentração de sacarose em 24,2 g/L.

A Tabela 4.7 apresenta a estimativa dos efeitos principais e das interações das variáveis para o planejamento, referentes à produção dos AGVs, em que (L) representa a parte linear e (Q) a parte quadrática do modelo. Os valores destacados em negrito e itálico indicam que o efeito é significativo para o intervalo de confiança de 90% ($p < 0,10$).

Tabela 4.7 Estimativa dos efeitos para a produção de AGV para o planejamento DCCR

| Variável | Efeito | Erro padrão Erro puro | t(3) | p-valor | Coefficiente | Erro padrão coeficiente |
|---|------------------|--------------------------|-----------------|-----------------|------------------|----------------------------|
| <i>Intercepto</i> | 2,852255 | 0,079123 | 36,04847 | 0,000047 | 2,852255 | 0,079123 |
| <i>(1)T °C (L)</i> | -0,795679 | 0,112064 | -7,10020 | 0,005748 | -0,397840 | 0,056032 |
| T (°C) (Q) | -0,128500 | 0,125628 | -1,02286 | 0,381658 | -0,064250 | 0,062814 |
| <i>(2)[NaHCO₃] (g/L) (L)</i> | -0,232585 | 0,112064 | -2,07546 | 0,129564 | -0,116292 | 0,056032 |
| [NaHCO ₃] (g/L) (Q) | 0,179496 | 0,125628 | 1,42879 | 0,248390 | 0,089748 | 0,062814 |
| 1L com 2L | -0,429660 | 0,158247 | -2,71512 | 0,072849 | -0,214830 | 0,079123 |

$R^2 = 0,937$; $R = 0,968$

Onde: $T\text{ }^\circ\text{C (L)}$ é a temperatura linear; $T\text{ }^\circ\text{C (Q)}$ é a temperatura quadrática; $[\text{NaHCO}_3]\text{ (g/L) (L)}$ é a concentração de bicarbonato de sódio linear; $[\text{NaHCO}_3]\text{ (g/L) (Q)}$ é a concentração de bicarbonato de sódio quadrática e **1L com 2L** é a interação linear entre a temperatura e a concentração de bicarbonato de sódio.

Apenas o termo linear da temperatura, a interação entre temperatura e concentração de bicarbonato de sódio lineares foram significativos para a produção de AGVs. O Gráfico de Pareto da Figura 4.26, mostra a influência das variáveis avaliadas no processo ($p < 0,10$).

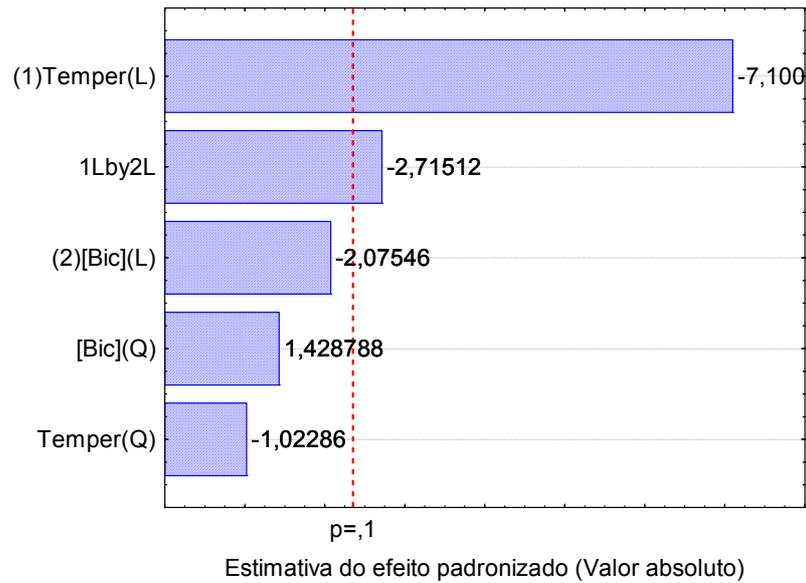


Figura 4.26: Gráfico de Pareto para o modelo obtido no planejamento DCCR

Onde: $T^{\circ}C (L)$ é a temperatura linear; $1L$ com $2L$ é a interação linear entre a temperatura e a concentração de bicarbonato de sódio; $[NaHCO_3] (L)$ é a concentração de bicarbonato de sódio linear; $[NaHCO_3] (Q)$ é a concentração de bicarbonato de sódio quadrática e $T^{\circ}C (Q)$ é a temperatura quadrática.

Considerando apenas os termos significativos o planejamento DCCR gerou o modelo conforme equação 4.1 para p-valor < 0,10:

$$AGV (g/L) = 2,85 - 0,398 \times T^{\circ}C - 0,215 \times T^{\circ}C \times [NaHCO_3] \quad (4.1)$$

A equação completa gerada no modelo DCCR está de apresentada na equação 4.2.

$$Y = B_0 + B_1 \cdot X_1 + B_2 \cdot X_2 + B_{11} \cdot X_1^2 + B_{22} \cdot X_2^2 + B_{12} \cdot X_1 \cdot X_2 \quad (4.2)$$

Onde: Y é a resposta (AGV g/L); B_0 é o intercepto; B_1 , B_2 , B_{11} , B_{22} e B_{12} são os coeficientes dos termos da equação; X_1 e X_2 são as variáveis ou fatores (Temperatura e concentração de bicarbonato de sódio) como termos lineares da equação; X_1^2 e X_2^2 são as variáveis ou fatores como termos quadráticos da equação e $X_1 \cdot X_2$ é a interação entre os fatores.

A análise de variância, considerando o erro puro, obtida para este planejamento, é apresentada na Tabela 4.8.

Tabela 4.8. Análise de variância obtida para o planejamento DCCR na produção de AGV

| Fonte de variação | SQ | GL | MQ | F _{calc} |
|---------------------|----------|----|----------|-------------------|
| Modelo (a) | 1,6504 | 5 | 0,33 | 17,9 |
| Falta de ajuste (b) | 0,035700 | 3 | 0,011900 | 0,47519 |
| Erro puro (c) | 0,075126 | 3 | 0,025042 | |
| Resíduo (b + c) | 0,1108 | 6 | 0,0185 | |
| Total (a + b + C) | 1,761207 | 11 | | |

Para um intervalo de confiança de 90%, o Teste F, com seus respectivos graus de liberdade para a falta de ajuste, resultou em $F_{\text{tab}}(3; 3; 0,10) = 5,39$, logo F_{calc} é menor que F_{tab} , considera-se o modelo válido para a falta de ajuste. A Figura 4.27 apresenta os gráficos dos resíduos.

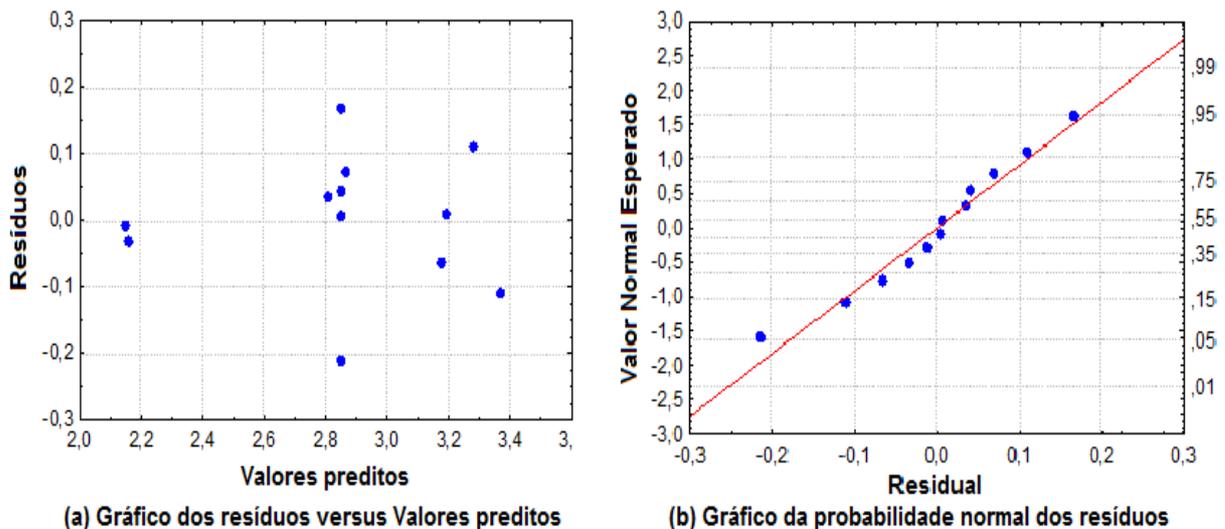


Figura 4.27. Resíduos do modelo obtido pelo planejamento DCCR

Pode-se visualizar na Figura 4.27 em (a) uma distribuição aleatória em torno do zero e em (b) que não há nenhum ponto fora da faixa - 2 a + 2. Calculou-se o valor tabelado de F para o modelo, com os respectivos graus de liberdade: $F_{\text{tab}}(5; 6; 0,10) = 3,11$. Com $F_{\text{calc}} > F_{\text{tab}}$ e a relação entre os dois = 5,76, considerou-se o modelo válido para ambos os testes. As superfícies de resposta e o gráfico de contorno para o acúmulo dos AGVs são ilustrados na Figura 4.28 (a) e (b) respectivamente.

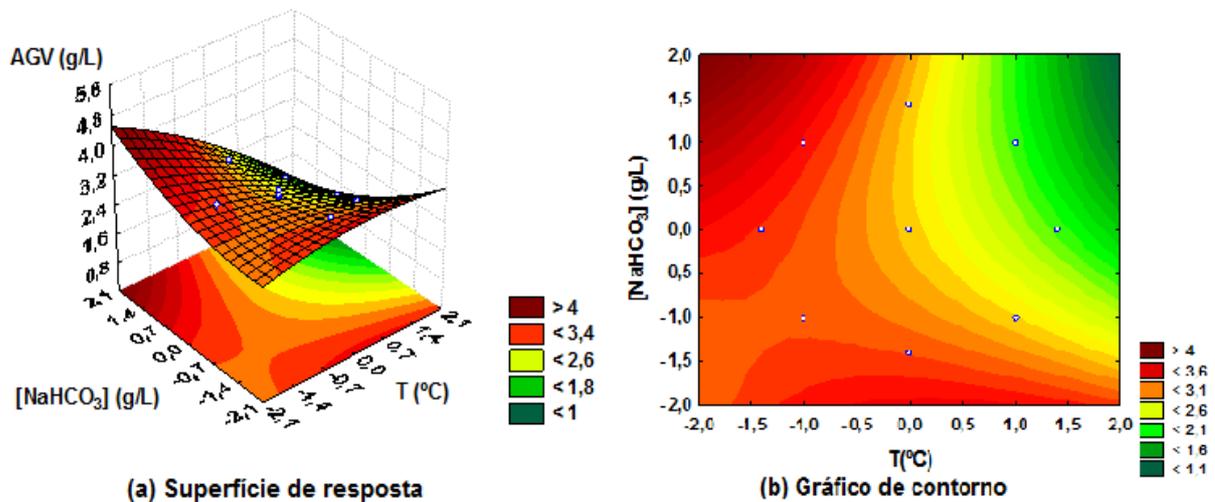


Figura 4.28. Superfície de resposta e gráfico de contorno para o planejamento DCCR.

4.2.5 Validação dos experimentos

Para fins de validação do processo de produção dos ácidos graxos voláteis, foram realizados experimentos em triplicata para o melhor ensaio obtido no planejamento experimental DCCR (temperatura de 30 °C e 3 g de bicarbonato de sódio por litro de manipueira). Os parâmetros monitorados nos três ensaios como a produção de AGVs, pH, acidez e alcalinidade foram avaliados em relação à média e o desvio padrão relativo (DPR) da triplicata. Os resultados estão apresentados na Tabela 4.9.

Tabela 4.9. Valores médios de AGV, pH, acidez e alcalinidade e seus respectivos DPR, na triplicata realizada no melhor ensaio do DCCR.

| Tempo (h) | AGV (g/L) | DPR (%) | pH | DPR (%) | Acidez (%) | DPR (%) | Alcalinidade (mmol/L) | DPR (%) |
|-----------|-----------|---------|------|---------|------------|---------|-----------------------|---------|
| 10 | 1,88 | 3,40 | 6,73 | 2,61 | 1,95 | 2,56 | 24,33 | 3,14 |
| 21 | 2,37 | 2,76 | 5,96 | 1,30 | 2,10 | 2,38 | 17,25 | 1,45 |
| 33 | 2,91 | 1,09 | 5,63 | 2,52 | 2,25 | 2,22 | 21,77 | 2,12 |
| 45 | 3,41 | 1,41 | 5,62 | 2,08 | 2,37 | 1,61 | 25,18 | 3,08 |
| 57 | 3,37 | 1,49 | 5,81 | 0,88 | 2,34 | 1,62 | 28,50 | 0,00 |
| 69 | 3,22 | 3,13 | 6,15 | 2,31 | 2,33 | 1,08 | 31,67 | 2,41 |
| 80 | 3,07 | 3,17 | 6,31 | 0,64 | 2,30 | 1,09 | 32,75 | 1,32 |
| 94 | 2,89 | 3,41 | 6,44 | 0,78 | 2,24 | 1,70 | 32,92 | 1,91 |

Pode-se verificar que a maior produção de ácidos graxos voláteis obtida foi em 45 horas com 3,41 g/L e uma concentração de 0,08 g/L.h de AGVs. Nesse tempo também se observou o menor valor de pH, de 5,62, e o maior valor de

acidez de 2,37%. Para este mesmo ponto medido, a alcalinidade foi de 25,18 mmol/L. O desvio padrão relativo dos resultados se mostrou baixo, sendo observadas maiores variações nas primeiras horas da fermentação para todos os parâmetros monitorados. Os valores de DPR estão abaixo de 10%, valor este considerado como intervalo de confiança na análise estatística para fins de pesquisa com material biológico. Desta forma observa-se o grau de repetibilidade dos ensaios realizados, validando os resultados obtidos no melhor ponto do DCCR.

Conforme demonstrado na Tabela 4.1, a quantidade de cianeto na manipueira utilizada nos experimentos era de 1,91 mg/L e DQO de 8865 mg/L de O₂. O resultado médio das alíquotas do melhor tempo de produção dos ácidos graxos voláteis (45 h) para análise de cianeto foi de 1,66 mg/L, com DPR de 1,9%, ocorrendo uma redução de 12,9% na quantidade de cianeto após a fermentação.

Para a análise de DQO, a quantidade média obtida nas amostras foi de 6948,3 mg/L de O₂, com DPR de 1,8%, havendo uma remoção de 21,6% da quantidade de DQO do efluente. Lamaison (2009), operando com reator em batelada alimentada, conseguiu a remoção de aproximadamente 22% da carga de DQO.

4.2.6 Produção do biogás

Foi realizado um experimento para a produção de biogás, sendo apenas medido o volume de gás produzido no reator. Neste experimento foram usadas as melhores condições de processo determinadas no planejamento DCCR, A Figura 4.29 mostra a produção por dia.

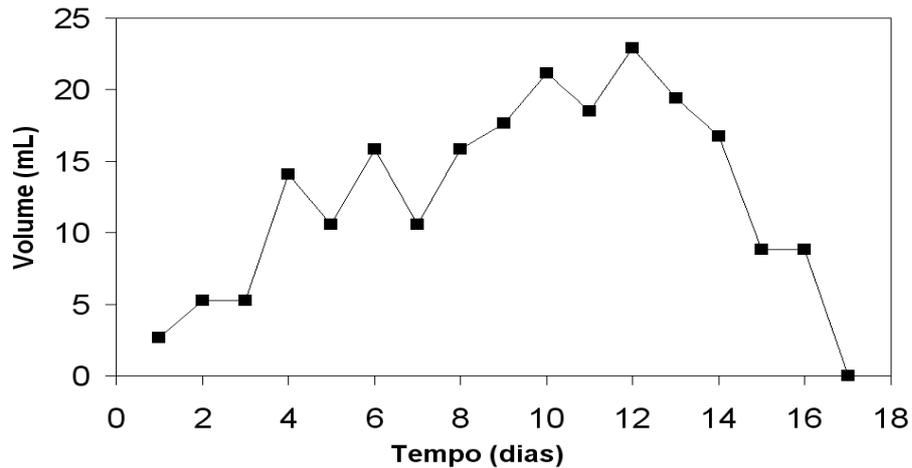


Figura 4.29: Gráfico do volume de biogás produzido por fermentação anaeróbia (T^a 30°C e $[NaHCO_3]$ 3 g/L).

A partir do terceiro dia de experimento se observa um aumento no volume do biogás produzido, que está de acordo com o processo fermentativo seguindo as etapas de acidogênese e posterior metanogênese, com aumento da alcalinidade e diminuição da acidez, conforme é observado no final dos ensaios das Figuras 4.18 e 4.19. A desestabilização do sistema observada no 5º e no 7º dia pode ser devido à fase de transição pela produção final de alguns ácidos (ácido fórmico) com consequente redução de pH, conforme comportamento semelhante observado por Chynoweth *et al.*, (1999), os quais utilizaram dejetos suínos e águas residuárias industriais na produção, por fermentação anaeróbia, de metano e hidrogênio como fonte de energia limpa.

O maior volume de produção de biogás observado ocorreu no 13º dia com 26 mL de biogás produzido e a produção total em 17 dias foi de 215 mL.

5. CONCLUSÕES

Os experimentos realizados com o meio sintético para a produção dos ácidos graxos voláteis foram essenciais para verificar o comportamento das fermentações quanto ao decaimento do pH e ao tempo de coleta das amostras. Além disso, determinou-se o tipo de inóculo que seria utilizado posteriormente nas fermentações utilizando a manipueira, já que os resultados com o inóculo suíno produziram mais AGVs que o inóculo bovino: maior produção de AGVs do inóculo suíno de 1,63 g/L e 1,4 g/L de AGVs para o inóculo bovino.

Verificou-se que a produção de ácidos graxos voláteis com concentração de glicose de 2 g/L, utilizando a manipueira como substrato, foi maior que a produção com o meio sintético contendo 8 g/L de glicose, que se pode concluir pelo fato da manipueira ser um meio mais complexo em termos de nutrientes.

A alcalinidade do meio contribuiu para aumentar a produção dos ácidos graxos voláteis, verificado nos experimentos realizados com bicarbonato de sódio. O planejamento experimental DCCR mostrou que a temperatura e a interação desta com a concentração de bicarbonato de sódio influenciam a produção de AGVs, sendo que as melhores condições para a produção, utilizando a manipueira como substrato e dejetos suíno como inóculo, ocorreu em 30°C com 3 g/L de bicarbonato de sódio.

O processo mostrou ser válido através de experimentos conduzidos em triplicata para a melhor condição observada no planejamento DCCR, com baixos valores de desvio padrão relativo entre as réplicas e obtendo-se um resultado médio de produção de ácidos graxos voláteis de 3,4 g/L (0,08 g/L.h de AGVs).

A caracterização da manipueira utilizada nos experimentos está de acordo com os dados da literatura, e no final do processo, além da produção dos ácidos orgânicos, podem-se obter diminuições nas quantidades de cianeto e na DQO, além da produção de biogás.

6. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Algumas sugestões para dar continuidade a este trabalho de forma a otimizar a produção de ácidos graxos por fermentação anaeróbia da manipueira são as seguintes:

- Testar outros parâmetros a partir do melhor resultado obtido com o planejamento DCCR, como por exemplo, agitação do meio, presença de suporte para a biomassa e diferentes tipos de suportes.

- Verificar o melhor ponto para a produção de biogás e quantificá-lo por cromatografia gasosa.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALKAYA, Emrah; KAPTAN, Serkan; OZKAN, Leyla; ULUDAG-DEMIRER, Sibel; DEMIRER, Göksel N. **Recovery of acids from anaerobic acidification broth by liquid–liquid extraction.** *Chemosphere.* v. 77, p. 1137–1142, 2009.
- ALMEIDA, Crislene Barbosa de; BUENO, Gisele Ferreira; DEL BIANCHI, Vanildo Luiz. **Avaliação da influência da agitação no tratamento anaeróbio por leite fixo de manipueira.** *Revista Raízes e Amidos Tropicais*, vol. 6, p.11-18, 2010.
- APHA, AWWA and WEF. **Standard Methods for Examination of Water and Wastewater.**, American Publications Health Association. 19th ed., Washington D. C.,1998.
- AQUINO, Sérgio F. de; CHERNICHARO, Carlos A. L. **Acúmulo de Ácidos Graxos Voláteis (AGVs) em Reatores Anaeróbios Sob Estresse: Causas e Estratégias de Controle.** *Engenharia Sanitária Ambiental.* v.10, Nº 2, pg 152-161, abr-jun, 2005.
- ARAGÃO, Maria do L; PONTE, J. Júlio. **O uso da manipueira – extrato líquido das raízes de mandioca como adubo foliar.** *Ciências Agrônômicas*, v. 26, p. 45- 48, 1995.
- ARGUN, Hidayet; KARGI, Fikret; KAPDAN, Ilgi K. **Light fermentation of dark fermentation effluent for bio-hydrogen production by different *Rhodobacter species* at different initial volatile fatty acid (VFA) concentrations.** *International Journal of Hydrogen Energy.* v. 33, p. 7405 – 7412, 2008.
- BARANA, A. C.; CEREDA, M. P. **Cassava wastewater (manipueira) treatment using a two phase anaerobic biodigestor.** *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 20, n. 2, 2000.

- BARANA, A. C. **Avaliação de tratamento de manipueira em biodigestores fase acidogênica e metanogênica.** São Paulo, 2000. – Universidade Estadual Paulista, Botucatu, Tese (Doutorado).
- BUCHAUER, K. **Comparison of two simple titration procedures to determine volatile fatty acids in influents to waste-water and sludge treatment processes.** *Water SA.* v. 24, n. 1, 1998.
- CALDAS NETO, S.F.; ZEOULA, L.M.; BRANCO, A.F. *et al.*,. **Mandioca e resíduos das farinheiras na alimentação de ruminantes: pH, concentração de amônia e eficiência microbiana.** In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 37, 2000. Viçosa, MG. *Anais da Sociedade Brasileira de Zootecnia*, 2000. p.457.
- CAPPELLETTI, Bianca Martins. **Efeito da concentração inicial da água residual do processamento da mandioca na produção de biohidrogênio por Clostridium acetobutylicum ATCC 824.** Santa Catarina, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2009. Dissertação (Mestrado).
- CARDOSO, Carlos Estevão Leite. *Competitividade e inovação tecnológica na cadeia agroindustrial de fécula de mandioca no Brasil.* São Paulo, 2003. Tese (Doutorado). Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba. Disponível em: <http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/11/11132/tde-04122003-151241>. Acesso em 30 agosto 2010.
- CARDOSO, Éria. **Uso de manipueira como biofertilizante no cultivo do milho: avaliação no efeito do solo, nas águas subterrâneas e na produtividade do milho.** Santa Catarina, Universidade do Extremo Sul Catarinense, Criciúma, 2005, Dissertação (Mestrado).
- CHYNOWETH, C. P.; WILKIE, A. C.; OWENS J. M. **Anaerobic treatment of piggery slurry.** *Journal of Animal Science*, v. 12, p. 604-606, 1999.

CORREIA, Gleyce T.; DEL BIANCHI, Vanildo L. **Tratamento biológico de água residuária da produção de farinha de mandioca utilizando reator anaeróbico compartimentado vertical (RACOV)**. *Semina: Ciências Exatas e da Terra*, v. 29, n. 2, p. 159-166, 2008.

COSTA, Siddhartha G. V. Almeida de Oliveira. *Estudo da produção de metabólitos por Pseudomonas aeruginosa: Ramnolipídios e polihidroxicanoatos*. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas). Rio de Janeiro, 2010. Universidade Estadual Paulista, Rio Claro. Disponível em: http://www.athena.biblioteca.unesp.br/exlibris/bd/brc/33004137041P2/2010/costa_sgvaio_dr_rcla.pdf. Acesso em 26 agosto 2010.

DEL NERY, V. **Utilização de Lodo Anaeróbio Imobilizado em Gel no Estudo de Partida de Reatores de Fluxo Ascendente com Manta de Lodo**. São Carlos, 1987. Escola de Engenharia de São Carlos. São Paulo, Dissertação (Mestrado).

ELEFSINIOTIS, P.; WAREHAM, D.G.; SMITH, M.O. **Use of volatile fatty acids from an acid-phase digester for denitrification**. *Journal of Biotechnology*, v. 114, p. 289–297, 2004.

FERNANDES JÚNIOR, Ary. **Tratamentos Físicos e Biológicos da Manipueira**. In: Marney Pascoli Cereda. (Org.). **Manejo, Uso e Tratamento de subprodutos da industrialização da mandioca**. São Paulo: Fundação Cargil, 2001, v. 4, p. 138-150.

Fernández-Morales, F.J.; Villasenõr J.; Infantes, D. **Modeling and monitoring of the acclimatization of conventional activated sludge to a biohydrogen producing culture by biokinetic control**. *International journal of hydrogen energy*. In Press (2010).

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.

INOUE, Keles. R. A.; **Produção de biogás, caracterização e aproveitamento agrícola do biofertilizante obtido na digestão da manipueira.** Minas Gerais. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa. 2008, Dissertação (Mestrado).

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz.** v. 1: **Métodos químicos e físicos para análise de alimentos,** 3. ed. São Paulo: IMESP, 1985. p. 25-26.

LAMAISON, Franciele do Carmo. **Aplicação da água residuária do processamento da mandioca como substrato para a produção de hidrogênio por processo fermentativo.** Santa Catarina. Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2009, Dissertação (Mestrado).

LARSEN, Andrea Christina. **Co-digestão anaeróbia de glicerina bruta e efluente de fecularia.** Paraná. Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Cascavel, 2009, Dissertação (Mestrado).

LEITE, J. A. C.; FORESTI, E.; BARBOZA, M.; ZAIAT, M. **Produção de ácidos graxos voláteis por fermentação acidogênica em reator anaeróbio horizontal de leito fixo com argila expandida como suporte da biomassa.** In: SIMPÓSIO NACIONAL DE FERMENTAÇÕES, 14, 2003, Santa Catarina. *Anais* Disponível em: www.enq.ufsc.br/eventos/sinaferm/trabalhos_completos/t121.doc, Acesso em 29/04/2010

LEONEL, M.; CEREDA, M. P. **Manipueira como substrato na biossíntese de ácido cítrico por *Aspergillus niger*.** *Scientia Agricola*, Piracicaba, vol. 52, nº 2, 1995.

LIMA, Roberto Albuquerque; SANTOS, Walleska Rossane dos; PAIVA, Sergio Carvalho de; ALBUQUERQUE, Clarissa Daisy da Costa; SALGUEIRO, Alexandra Amorim. **Tratamento físico-químico da manipueira.** In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MANDIOCA, 8, 2009, São Paulo. *Anais*

Disponível em: <http://www.cerat.unesp.br/xiiicbm/artigos.php>. Acesso em: 22 maio 2010.

MANUAL DA HACH. **Method 8027 For water, wastewater, and sea water**, p 277-285, 2000.

MARÓSTICA JR, Mário Roberto; PASTORE, Gláucia Maria. **Production of R-(+)-a-terpineol by the biotransformation of limonene from orange essential oil, using cassava waste water as médium**. *Food Chemistry*. v.101, p. 345 - 350, 2007.

MILLER, G.L. **Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugars**. *Anal. Chem.*, v. 31, p. 426-428, 1959.

MOHAN, S.V.; BABU, V.L.; SARMA, P.N. **Anaerobic biohydrogen production from dairy wastewater treatment in sequencing batch reactor: effect of organic loading rate**. *Enzime and Microbial Technology*. v. 24, p. 506-515, 2007.

MU Yang; WANG, Gang; YU, Han-Qing. **Response surface methodological analysis on biohydrogen production by enriched anaerobic cultures**. *Enzyme and Microbial Technology*. v. 38, p.905–913, 2006.

ORTEGA F. S.; ROCHA, K. M.; ZAIAT, M.; PANDOLFELLI, V. C. **Aplicação de espumas cerâmicas produzidas via .gelcasting. em biorreator para tratamento anaeróbio de águas residuárias**. *CERÂMICA*, vol. 47, nº. 304, 2001.

PAGANINI Cícero; GUERRA, Kerly Sandra Marques; STAHL, Marcela Andrade; BRAZ, Marcos Vinícius; BARANA, Ana Cláudia. **Avaliação de um reator anaeróbio tipo filtro biológico de fluxo ascendente para tratamento de manipueira – Parte II**. In: SIMPÓSIO ÍTALO BRASILEIRO DE ENGENHARIA

SANITÁRIA E AMBIENTAL, 6. 2002, Vitória. *Anais*. Disponível em: <http://www.bvsde.paho.org/bvsacd/sibesa6/sesen.pdf>. Acesso em: 24 maio 2010.

PANICHNUMSIN, Pornpan; NOPHARATANA, Annop; AHRING, Birgitte; CHAIPRASERT, Pawinee. **Production of methane by co-digestion of cassava pulp with various concentrations of pig manure.** *Biomass and Bioenergy*. v. 34, p. 1117 – 1124, 2010.

PASTORE, Neivair Sponchiado. **Avaliação de diferentes fontes de nitrogênio e sacarose na produção de ácido cítrico por *Aspergillus niger* usando manipueira como substrato.** Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Toledo, 2010, Dissertação (Mestrado)

PINHO, Marise Machado Caribé de Araújo. **Reaproveitamento de resíduo do processamento da mandioca (manipueira): avaliação de impactos químicos e microbiológicos no solo e utilização como fertilizante.** 2007, Pernambuco. Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife. Dissertação (Mestrado).

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

RODRIGUES, M.I.; IEMMA, A.F. **Planejamento de experimentos e otimização de processos.** 1ª ed., Campinas, SP: Casa do Pão Editora, 2005, 326p.

SANTOS, Armínio. **Usos e impactos ambientais causados pela manipueira na microrregião sudoeste da Bahia-Brasil.** In José Luis Lusón e Márcia Cardim: *PROBLEMAS SOCIALES Y REGIONALES EN AMÉRICA LATINA: ESTUDIO DE CASOS*. Editora Universitat de Barcelona, 2009. Disponível em: <http://books.google.com.br/books>. Acesso em: 22 agosto 2010.

SANTOS, José Humberto Teixeira. *Avaliação de um sistema de aquecimento do substrato na biodigestão anaeróbia de dejetos de suínos*. 2004, Minas Gerais, Dissertação (Mestrado em Engenharia Agrícola). Universidade Federal de Viçosa, Viçosa. Disponível em: <http://www.ufv.br/dea/ambiagro/arquivos/Tese%20de%20Jos%C3%A9%20Humberto2004.doc>. Acesso em: 26 agosto 2010.

SANTOS, M. de J.; ACCIOLY, A. M. de A.; TRINDADE, A. V.; SANTOS, N. M. dos. Estimativa da degradação de manipueira aplicada no solo. In: JORNADA CIENTÍFICA EMBRAPA MANDIOCA E FRUTICULTURA TROPICAL, 3., 2009, Cruz das Almas. **Anais...** Disponível em: http://www.cnpmf.embrapa.br/publicacoes/jornada/resumos/Resumo_Marilucia_JS_AdrianaMAA_rev_JR_ED_.pdf. Acesso em: 21 agosto 2010.

SARAIVA, Fernanda Z. SAMPAIO, Silvio C.; SILVESTRE, Marciane G.; QUEIROZ, Manoel M. F. de; NÓBREGA, Lúcia H. P.; GOMES, Benedito M. **Uso de manipueira no desenvolvimento vegetativo do milho em ambiente protegido**. Rev. bras. eng. agríc. ambient., Fev, vol.11, no.1, p.30-36, 2007.

Sentürk, E. Ince, M. Onkal Engin, G. **Treatment efficiency and VFA composition of a thermophilic anaerobic contact reactor treating food industry wastewater**. Biochemical Engineering Journal, v. 40, p. 492–499, 2010.

SILVA, Frederico Fonseca da; BERTONHA, Altair; FREITAS, Paulo Sérgio Lourenço; MUNIZ, Antônio Saraiva; REZENDE, Roberto; GONÇALVES, Antonio Carlos Andrade; LABEGALINI, Leonides; NETO, Valdemar Sanches Crosariollo. **Desdobramento do amido em glicose para identificar água residuária de indústria de mandioca no perfil do solo**. Acta Sci. Agron. Maringá, v. 27, nº. 3, p. 507-511, Jul/Set., 2005.

SOLEDADE, Maria das Graças Moreno; NÁPRAVNÍK FILHO, Luciano A. F. K.; SANTOS, Jair Nascimento; SILVA, Mônica A. Mac-Allister da. **ISO 14000 e a gestão ambiental: uma reflexão das práticas ambientais corporativas**. In:

ENCONTRO NACIONAL SOBRE GESTÃO EMPRESARIAL E MEIO AMBIENTE, 9., 2007, Curitiba. **Artigos.** Disponível em: <<http://engema.up.edu.br/arquivos/engema/pdf/PAP0435.pdf>> Acesso em 18 agosto. 2010.

STEIL L.; LUCAS JUNIOR J.; OLIVEIRA R. A. **Avaliação do uso de inóculos na digestão anaeróbia de resíduos de aves de postura, frangos de corte e suínos.** *Engenharia Agrícola*, Jaboticabal, v. 22, n. 2, p. 146-159, maio 2002.

TORRES CASTILHO R.; LA BRESLUENGO P.; MATA ALVAREZ J. **Temperature effect on anaerobic digestion of bedding straw in a one-phase system at different inoculum concentration.** *Agriculture Ecosystems and Environment*, v. 54, n. 1 p. 55-66, 1995.

TUNA, Eda; KARGI, Fikret; ARGUN, Hidayet. **Hydrogen gas production by electrohydrolysis of volatile fatty acid (VFA) containing dark fermentation effluent.** *International journal of hydrogen energy*. v. 34, p. 262 – 269, 2009.

VALLE, Teresa Losada; CARVALHO, Cássia Regina Limonta; RAMOS, Maria Teresa Baraldi; MÜHLEN, Gilda Santos; VILLELA, Omar Vieira. **Conteúdo cianogênico em progênies de mandioca originadas do cruzamento de variedades mansas e bravas.** *Bragantia*, Campinas, v.63, nº.2, p.221-226, 2004.

VARESCHE, M. B. A.; HIRASAWA, J. S.; SILVA, A. J.; FORESTI, E.; ZAIAT, M. **Avaliação da comunidade microbiana anaeróbia usando a hibridação *in situ* fluorescente em reator sulfetogênico operado com diferentes materiais suportes.** In: Simpósio Nacional de Fermentações, 14, 2003, Florianópolis - SC. SINA Ferm, 2003. Disponível em: http://www.enq.ufsc.br/eventos/sinaferm/trabalhos_completos/t023.doc. Acesso em 20 junho 2010.

VENKATA MOHAN, S.; LALIT BABU, V.; SARMA P.N. **Anaerobic biohydrogen production from dairy wastewater treatment in sequencing batch reactor (AnSBR): Effect of organic loading rate.** *Enzyme and Microbial Technology*. V. 41, p. 506–515, 2007.

VENKATA MOHAN, S.; VENKATESWAR REDDY, M.; VENKATA SUBHASH, G.; SARMA, P.N. **Fermentative effluents from hydrogen producing bioreactor as substrate for poly(b-OH) butyrate production with simultaneous treatment: An integrated approach.** *Bioresource Technology*. v. 101, p. 9382–9386, 2010.

WANG, Gang; MU, Yang; YU, Han-Qing. **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.

YU, Jian. **Production of PHA from starchy wastewater via organic acids.** *Journal of Biotechnology*, v. 86, p. 105–112, (2001).

YAN, Yuanyuan; FENG, Leiyu; ZHANG, Chaojie; WISNIEWSKI, Christelle; ZHOU, Qi. **Ultrasonic enhancement of waste activated sludge hydrolysis and volatile fatty acids accumulation at pH 10.0.** *Water research*. V. 44, p. 3329 e 3336, 2010.

YUAN, Q.; SPARLING, R.; OLESZKIEWICZ, J.A. **Waste activated sludge fermentation: Effect of solids retention time and biomass concentration.** *Water research*. V. 43, p. 5180 – 5186, 2009.

ANEXO 1
METODOLOGIAS ANALÍTICAS

Demanda Química de Oxigênio (DQO)

Esta análise foi realizada na manipueira e seguiu-se metodologia de acordo com o *Standard Methods - APHA* (1998). Foram preparadas as seguintes soluções:

Solução digestora: Foram pesados 10,216g de dicromato de potássio ($K_2Cr_2O_7$), previamente seco à 105°C por duas horas, e dissolvidos em 500 mL de água destilada, 167 mL de ácido sulfúrico (H_2SO_4) concentrado e 33,3g de sulfato de mercúrio ($HgSO_4$), e completou-se o volume para 1000 mL com água destilada. Todos os reagentes utilizados eram de grau padrão primário.

Solução catalítica: Pesou-se 5,06g de sulfato de prata (Ag_2SO_4) e solubilizou-se em 500 mL de ácido sulfúrico (H_2SO_4) concentrado, uma razão de 5,5g de $AgSO_4/kg$ de H_2SO_4 (densidade = $1,84KgL^{-1}$). Esta solução permaneceu em repouso por 1 dia para a dissolução completa.

Solução padrão de 1000 mgO₂/L: dissolveu-se 0,85g de biftalato de potássio previamente seco à 105°C por duas horas em 500 mL de água destilada. Transferiu-se para um balão volumétrico de 1000mL e completado o volume com o mesmo solvente.

Solução padrão de 500 mgO₂/L: mediu-se 250mL da solução padrão de 1000 mgO₂/L e transferiu-se para um balão de 500mL, completando-o com água destilada.

Preparo da curva padrão: Preparou-se a curva padrão com a solução padrão de 500 mgO₂/L de acordo com a Tabela 1.1, cada ponto da curva foi diluído para 100 mL.

Tabela 1.1 Curva padrão de O₂

| [mgO₂/L] | Volume Solução padrão de 500 mgO₂/L (mL) |
|----------------------------|--|
| 50 | 10 |
| 100 | 20 |
| 150 | 30 |
| 200 | 40 |
| 250 | 50 |
| 275 | 55 |

Pipetou-se 2,5 mL de cada ponto da curva para tubos de digestão. A manípueira foi filtrada e diluída (1:20) em água destilada, desta diluição foram pipetados 2,5 mL e para o branco foram utilizados 2,5 mL de água destilada. A curva padrão e a amostra foram preparados em triplicata. Para cada tubo adicionou-se 1,5 mL de solução digestora e 3,5 mL de solução catalítica e levados a um bloco digestor por duas horas a 150°C. Em seguida, os tubos foram retirados do bloco e resfriados em temperatura ambiente. As absorbâncias foram lidas em espectrofotômetro (Hitachi U-1800), no comprimento de onda de 600nm. Foi calculado a DQO da manípueira de acordo com a equação gerada pela reta da curva padrão.

Sólidos Totais (ST) e Sólidos Totais Voláteis (STV)

A metodologia utilizada para a determinação dos Sólidos Totais e Sólidos Totais Voláteis foi conforme procedimento do *Standard Methods for Examination of Water and Wastewater* (1998). A análise foi feita em triplicata. Antes de adicionar a amostra, os cadinhos foram calcinados na mufla a 550 °C por 15 minutos e colocados no dessecador para resfriar e em seguida pesados (P1). Pesou-se cerca de 10 g da amostra (ma) (inóculo suíno e/ou manípueira) para os cadinhos e colocados em estufa de secagem à temperatura de 105°C por 24h. Após este período foram transferidos para o dessecador e pesados novamente (P2). Em seguida, estes cadinhos foram colocados na mufla à temperatura de 600°C por 45 minutos, sendo retirados e colocados em dessecador para resfriar. Os cadinhos foram pesados novamente após a calcinação (P3). A diferença entre os pesos P1 e P2, resultou nos sólidos totais (ST). A concentração de sólidos totais voláteis (STV) foi obtida pela diferença entre P2 e P3, conforme mostram as equações 1.1 e 1.2.

$$ST (\%) = \frac{(P2 - P1) \times 100}{ma} \quad (1.1)$$

$$STV (\%) = \frac{(P2 - P1) - (P3 - P1) \times 100}{ma} \quad (1.2)$$

Quantificação de açúcares redutores (AR)

O método de determinação da concentração de açúcares redutores utilizado neste trabalho foi adaptado do método proposto por Miller (1959), que utiliza o reagente DNS (ácido 3,5-dinitrosalicílico), possuindo sensibilidade em espectrofotômetro ultravioleta/visível (UV/VIS) na faixa de 0,1 a 1,0 g/L de açúcar redutor expresso como glicose.

O reagente DNS foi preparado da seguinte maneira: pesaram-se 10,6 g de ácido 3,5-dinitrosalicílico e 19,8 g de hidróxido de sódio que foram solubilizados em 1416 mL de água destilada e reservou-se esta solução. Dissolveu-se com aquecimento brando 7,6 mL de fenol (fundido a 50°C) e 8,3 g de metabissulfito de sódio e adicionados à solução reservada de DNS.

A análise foi realizada misturando-se 400 µL da manipueira, devidamente diluída, com 400 µL do reagente DNS e aquecido em banho a 100 °C por 5 minutos. Em seguida resfriou-se em banho de gelo e adicionou-se 3,2 mL de solução de tartarato duplo de sódio e potássio anidro 12,3 g/L. O branco foi preparado pela adição de 400 µL de água destilada substituindo a amostra. Procedeu-se à leitura da absorbância em espectrofotômetro (UV-Vis) no comprimento de onda de 540 nm. A curva padrão de glicose foi construída nas mesmas condições da amostra na faixa de 0,1 a 1,0 g/L, gerando um modelo de regressão linear, bem como o coeficiente de determinação da glicose em função da absorbância medida.

Para a quantificação dos açúcares redutores totais (ART), foi realizada uma hidrólise ácida da amostra, onde uma alíquota de 2,0 mL da manipueira foi misturada a 2,0 mL de ácido clorídrico 2N, sendo a hidrólise ácida dos carboidratos realizada em banho aquecido a 100°C por 5 minutos. Após resfriamento em banho de gelo, a mistura foi neutralizada pela adição de 2,0 mL de hidróxido de sódio 2 N e os açúcares redutores totais quantificados pelo método do reagente DNS, conforme descrito no método para AR. O branco foi preparado pela reação de 2,0 mL de água deionizada substituindo a amostra. A curva padrão para a análise de ART foi construída com solução de sacarose com

concentrações na faixa de 0,1 a 3,0 g/L nas mesmas condições de hidrólise e neutralização da amostra.

Cianeto

A análise de cianeto foi determinada segundo procedimento do Manual da Hach (2000). Para 10 mL da amostra adicionou-se o reagente cyaniver 3, agitou-se por 30 segundos e repouso por mais 30 segundos. Em seguida adicionou-se o reagente cyaniver 4 e agitou-se por 10 segundos e adicionou-se o reagente cyaniver 5. Após foi deixado em repouso por 30 minutos e procedeu-se à leitura do resultado em mg/L de cianeto espectrofotômetro (Hitachi U-1800) a 612nm, utilizando o programa do cianeto número 160.

Acidez

A metodologia utilizada para análise de acidez foi seguida conforme descrito nas Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz (1985). Diluiu-se 20 mL da alíquota retida do reator em 50 mL de água destilada, e acrescentou-se 4 gotas da solução indicadora de fenolftaleína. Em seguida, titulou-se com solução volumétrica de hidróxido de sódio 0,1 M até o ponto de viragem, fez um ensaio em branco para as correções necessárias.

A solução indicadora de fenolftaleína foi preparada na concentração de 1% em etanol 96%.

Alcalinidade e Ácidos Graxos Voláteis

Para as análises de alcalinidade e ácidos graxos voláteis foi utilizada a metodologia proposta por Buchauer (1998), sendo o resultado da alcalinidade obtido no mesmo método da quantificação dos ácidos graxos voláteis, porém calculados com fórmulas diferentes. A amostra retirada da fermentação foi filtrada através de um filtro de membrana de 0,45 µm e transferidos 20 mL para um

béquer de 50 mL. O eletrodo de pH foi adaptado dentro da solução de forma que ficava sempre imerso abaixo da superfície do líquido. O pH inicial era registrado e a amostra titulada lentamente com solução volumétrica de ácido sulfúrico 0,1 M até que fosse atingido pH 5,0 e anotado o volume do titulante. Continuou-se a titulação lentamente até pH 4,3 e novamente o volume do titulante foi registrado. A titulação seguiu até pH 4,0 e o volume total de titulante adicionado foi anotado. A titulação foi realizada sob agitação constante com auxílio de barra e agitador magnéticos.

Calculou-se a alcalinidade e a produção de ácidos graxos voláteis através das fórmulas 1.3 e 1.4, respectivamente, obtidas por métodos iterativos:

$$Alc(mmól/L) = \frac{V_{Ac_{4,3}} \times N \times 1000}{V_{Am}} \quad (1.3)$$

$$AGV(\acute{a}c.ac\acute{e}t. g/L) = \frac{131340 V_{Ac_{5-4}} \times N \times 1000}{V_{Am} - 3,08 Alc - 10,9} \quad (1.4)$$

Onde: *Alc* é a medida da alcalinidade à bicarbonato em mmol /L; $V_{Ac_{4,3}}$ é o volume de solução titulante gasto até atingir pH 4,3; *N* é a normalidade exata da solução titulante; V_{Am} é o volume da amostra titulada; *AGV* é a quantificação de ácidos graxos voláteis expressos como ácido acético em g/L; $V_{Ac_{5-4}}$ é a diferença do volume da solução titulante gasto entre o pH 5,0 e o pH 4,0.