

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

PRODUÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS VOLÁTEIS POR FERMENTAÇÃO
ANAERÓBIA DE MANIPUEIRA E DE PERMEADO DE SORO DE QUEIJO

DENISE APARECIDA ZEMPULSKI

TOLEDO – PR
Fevereiro de 2013

DENISE APARECIDA ZEMPULSKI

**PRODUÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS VOLÁTEIS POR FERMENTAÇÃO
ANAERÓBIA DE MANIPUEIRA E DE PERMEADO DE SORO DE QUEIJO**

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^a. Dr^a. Mônica L. Fiorese

**TOLEDO – PR
Fevereiro de 2013**

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a todos aqueles que sempre acreditaram em mim, até quando nem eu mesma acreditei.

AGRADECIMENTOS

A pesquisa nunca é um esforço solitário e, há muitas pessoas a quem devo agradecer a energia e habilidade dispensadas na conclusão desta dissertação.

As minhas famílias, no plural. À família Zempulski, que me trouxe até aqui, por toda a dedicação, carinho, princípios e apoio nas horas que deveras necessitei. À família Diel, que conquistei e fui conquistada, pelo sincero apoio e carinho.

Ao meu noivo, amigo, braço direito e esquerdo, Cristiano Diel, por me ajudar a ser uma pessoa melhor a cada dia. Obrigada pelo carinho, amor, compreensão, auxílio e companheirismo essenciais para meu desenvolvimento pessoal e profissional.

Aos meus amigos, Adriana Diel, Camila Machineski, Jamal Awadallak, Elenice Reis, Deizi Klein, Jacqueline Honorio, Pricila Marin, Priscila Dias, Andréia Colombo, Vanessa Alflen e Juliana Dotto por terem sido muito mais que amigos, por todo o companheirismo e apoio pessoal.

Ao meu orientador, Salah Din Mahmud Hasan e co-orientadora Mônica Lady Fiorese pelos ensinamentos, paciência e dedicação no decorrer destes 2 anos.

Às alunas de Iniciação Científica Josiane Peternela, Camila Cardoso, Larissa Lampa e Karen Viar pela ajuda dispensada com os experimentos.

Ao Colégio Agrícola de Toledo, por ceder o inoculo suíno, e as empresas Zadimel e Sooro por fornecer os efluentes utilizados neste trabalho.

Ao corpo docente do programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, ao apoio técnico e a coordenação pelo suporte e prestatividade.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal e de Nível Superior (CAPES), pelo apoio financeiro

A todos que contribuíram direta ou indiretamente para o desenvolvimento deste estudo.

EPÍGRAFE

“Mas é preciso ter manha,
É preciso ter graça
É preciso ter sonho sempre
Quem traz na pele essa marca
Possui a estranha mania
De ter fé na vida.”

Maria, Maria – Milton Nascimento e Fernando Brant

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
2.1. O Cultivo da Mandioca.....	4
2.2. Resíduos do Processamento da Mandioca.....	5
2.3. Agregação de Valor Utilizando Resíduos do Processamento da Mandioca	9
2.4. Agregação de Valor do Bagaço da Mandioca.....	11
2.5. Aspectos do Setor Lácteo	12
2.6. Soro de Leite.....	13
2.7. Permeado do Soro de Queijo	13
2.7.1. Utilização do Permeado do Soro do Queijo	15
2.8. Digestão Anaeróbia.....	16
2.9. Fatores de Interferência na Biodigestão Anaeróbia.....	19
2.9.1. Temperatura	20
2.9.2. pH.....	20
2.9.3. Composição e Concentração dos Resíduos.....	21
2.9.4. Agitação.....	21
2.9.5. Alcalinidade	22
2.10. Inóculo Suíno na Digestão Anaeróbia.....	22
2.11. Utilização de Ácidos Graxos Voláteis	24
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	26
3.1. Inoculo	26
3.2. Meios de Cultivo.....	26
3.2.1. Manipueira	26
3.2.2. Hidrolisado Amiláceo	26
3.2.3. Permeado de Soro de Queijo	27
3.2.4. Adição de Nutrientes	27
3.2.5. Meio Sintético	28
3.3. Reator de Biodigestão Anaeróbia	28
3.4. Fermentação Anaeróbia	29

3.5. Fermentação Escura	30
3.6. Avaliação das Condições Operacionais do Processo.....	30
3.6.1. Planejamento Experimental	30
3.6.2. Tratamento Térmico do Inoculo.....	31
3.6.3. Tratamento Térmico do Meio de Cultivo.....	32
3.6.4. Permeado de Soro de Queijo	32
3.7. Métodos Analíticos	32
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	34
4.1. Caracterização dos Resíduos	34
4.1.1 Manipueira	34
4.1.2 Hidrolisado Amiláceo	35
4.1.3 Permeado de Soro de Queijo	36
4.1.4 Inoculo	37
4.2. Avaliação de Diferentes Substratos na Produção de AGVs.....	37
4.3. Fermentação Escura	39
4.4. Avaliação de Diferentes Condições de Processo	41
4.4.1. Manipueira.....	41
4.4.1.1 Influência da Glicose e da Alcalinidade.....	41
4.4.1.2 Tratamento Térmico do Inoculo.....	47
4.4.1.3 Tratamento Térmico do Meio de Cultivo.....	48
4.4.1.4 Comportamento Cinético do Processo.....	49
4.4.2. Permeado de Soro de Queijo	52
5. CONCLUSÕES	58
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	60

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1: Composição da mandioca crua.....	5
Tabela 2.2: Composição química média da manipueira	7
Tabela 2.3: Composição geral do Leite, Soro do Leite e Permeado do Soro de Queijo.....	15
Tabela 3.1: Constituintes e quantidades dos meios de cultivo.....	28
Tabela 3.2: Matriz do planejamento fatorial 2^2 com quadruplicata no ponto central.	31
Tabela 4.1: Caracterização da Manipueira	34
Tabela 4.2: Caracterização do permeado do soro do queijo.....	36
Tabela 4.3: Resultados da produção de AGV do planejamento fatorial 2^2 com quadruplicata no ponto central, usando manipueira como substrato	44
Tabela 4.4: Estimativa dos efeitos para a produção de AGV para o planejamento 2^2 com manipueira ($\alpha=0,05$)	44
Tabela 4.5: ANOVA para o planejamento 2^2 com manipueira ($\alpha=0,05$).....	46

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1: Composição do Leite, Soro e Permeado do Soro de Queijo. Fonte: SMITH (2008).....	14
Figura 2.2: Etapas metabólicas da digestão anaeróbia (adaptado de Rapport, 2008)	19
Figura 3.1: Esquema fermentação e reatores	29
Figura 4.1: Comportamento do pH (a) e do perfil cinético de AGVs (b) ao longo da fermentação para os diferentes meios testados	37
Figura 4.2: Comparação do perfil cinético de produção de AGV para a manipueira com e sem ausência de luz.	40
Figura 4.3: Comparação do perfil cinético de produção de AGV para o permeado com e sem ausência de luz.	40
Figura 4.5: Perfis cinéticos de produção de AGVs referente a quadruplicata no ponto central do planejamento 2 ² , utilizando a manipueira como substrato.....	42
Figura 4.6: Perfis cinéticos de produção de AGV referente ao planejamento 2 ² , utilizando a manipueira como substrato.	42
Figura 4.7: Perfis cinéticos de produção de AGV referente à quadruplicata do ensaio 4 do planejamento 2 ² , utilizando a manipueira como substrato.	43
Figura 4.8: Gráfico de pareto do planejamento experimental 2 ² com manipueira.	45
Figura 4.9: Superfície de resposta: AGV (mg.L ⁻¹) em função da concentração de glicose e do bicarbonato (g.L ⁻¹), para o planejamento 2 ² com manipueira.....	45
Figura 4.10: Perfis cinéticos de produção de AGV, com e sem tratamento térmico do inoculo.....	47
Figura 4.11: Perfis cinéticos de produção de AGV, com e sem tratamento térmico da manipueira.....	48
Figura 4.12: Perfil cinético de produção de AGVs.	49
Figura 4.13: Perfis Cinéticos de alcalinidade e acidez ao longo da fermentação com manipueira.....	50
Figura 4.14: Cinética de Açúcar Redutor e Biomassa.	51
Figura 4.15: Perfis cinéticos de AGVs utilizando o permeado de soro de queijo como substrato, e concentrações de glicose de 45 g.L ⁻¹ (diluído) e 75 g.L ⁻¹ (puro) e 10,26 g.L ⁻¹ de alcalinidade	52
Figura 4.16: Perfis cinéticos de AGVs utilizando o permeado de soro de queijo como substrato, concentrações adicionadas de bicarbonato de sódio de 0,44 g.L ⁻¹ e 2,56 g.L ⁻¹ e 45 g.L ⁻¹ de glicose.....	53
Figura 4.17: Perfis cinéticos de AGVs utilizando o permeado de soro de queijo como substrato, diferentes concentrações de bicarbonato de sódio e 75 g.L ⁻¹ de glicose.	54
Figura 4.18: Perfis cinéticos de AGVs utilizando o permeado de soro de queijo como substrato, concentrações de glicose de 25 e 75 g.L ⁻¹ e 9,2 g.L ⁻¹ de alcalinidade.	55

Figura 4.19: Triplicata de perfis cinéticos de AGVs utilizando o permeado de soro de queijo como substrato, 75 g.L^{-1} de glicose e $9,2 \text{ g.L}^{-1}$ de alcalinidade. 56

ZEMPULSKI, A. D. Produção de Ácidos Graxos Voláteis por Fermentação Anaeróbia de Manipueira e de Permeado de Soro de Queijo. 82p 2013. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química). Universidade Estadual do Oeste do Paraná.

RESUMO

A mandioca é uma cultura amplamente difundida por todo o território nacional. Em 2011, a produção nacional de mandioca foi estimada em 27,1 milhões de toneladas, obtendo uma variação positiva de 9,2% em relação à safra de 2010. Entre os resíduos líquidos do processamento da mandioca, cita-se a manipueira, que caracteriza a água de constituição da raiz, extraída na prensagem da massa ralada, na confecção da farinha. A manipueira é o resíduo mais problemático, por possuir elevada carga poluente e potencial tóxico devido à presença de glicosídeos cianogênicos, podendo causar sérios problemas ao meio ambiente e à vida aquática quando descartada inadequadamente. Outros resíduos de grande impacto ambiental quando descartados incorretamente, são os resíduos de indústrias de laticínio. O fracionamento dos constituintes do leite por ultrafiltração resulta em derivados de grande valor nutricional e comercial, como o retentado (fração concentrada composta por proteínas e gordura) e o permeado (fração diluída composta por lactose, sais minerais, eletrólitos, compostos nitrogenados e água). Recentemente há uma maior busca pelo uso de resíduos agroindustriais visando recuperar substâncias e/ou materiais e deste modo aumentar a eficiência econômica dos processos de produção. A aplicação de resíduos agroindustriais em bioprocessos é uma alternativa observada na forma de substratos, e uma ajuda para solucionar o problema da poluição nos processos de agroindustrialização, onde a digestão anaeróbia destaca-se devido as suas diversas características favoráveis. 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, sendo este o objetivo principal deste trabalho. Todas as fermentações foram realizadas a 30°C e 80 rpm com inóculo suíno. Inicialmente fez-se 4 fermentações, variando o substrato utilizado (manipueira, hidrolisado amiláceo, permeado de soro de queijo e meio sintético) onde obteve-se maiores resultados de concentração de AGVs com a manipueira e o permeado. Seguiram-se os estudos com estes dois substratos, fazendo-se o teste de ausência de luminosidade (fermentação escura), sendo esta estratégia responsável pelo aumento de 38% na produção de AGVs para a manipueira e 20% para o permeado. A seguir foi realizado um planejamento experimental 2^2 com quadruplicata no ponto central para a manipueira, onde foram testados 3 níveis de concentração de glicose (9, 19 e 29 g.L⁻¹) e bicarbonato de sódio (0,21, 1,51 e 3,21 g.L⁻¹), sendo as concentrações de glicose de 29 g.L⁻¹ e bicarbonato de 3,21 g.L⁻¹ as que resultaram em maior produção de AGV (1941,4 mg.L⁻¹ em 23 h) representando um acréscimo de 77,3% na produção. Para o permeado de soro de queijo também foram realizados testes variando níveis de glicose (75, 45 e 25 g.L⁻¹) e alcalinidade do meio (7,7, 8,14, 9,2, 10,26 e 10,7 g.L⁻¹). Os níveis que apresentaram melhor resultado foram 45 g.L⁻¹ de glicose e 10,26 g.L⁻¹ de alcalinidade, resultando em 4115,16 mg.L⁻¹ de AGVs em 41h.

Palavras-chave: Manipueira, permeado de soro de queijo, biodigestão anaeróbica, planejamento experimental, inóculo suíno, fermentação escura.

ZEMPULSKI, A. D. Production of Volatile Fatty Acids by Anaerobic Fermentation of Manipueira and Cheese Whey Permeate. 82p 2013. Dissertation (Master Degree in Chemical Engineering). State University of west Paraná

ABSTRACT

Cassava is a crop widely throughout the national territory. In 2011, the national production of cassava was estimated at 27.1 million tons, achieving an increase of 9.2% compared to the 2010 harvest. Among the liquid waste processing cassava, cites the Manipueira, it is the water content of the root mass extracted in pressing grated, in making flour. Manipueira residue is more problematic, because it has high pollution load and toxic potential due to the presence of cyanogenic glycosides, may cause serious problems to the environment and aquatic life if released into waterways. Other big environmental waste when discarded improperly, are waste dairy industries. The fractionation of milk constituents by ultrafiltration results in derivatives with great nutritional value and commercial, such as the retentate (concentrate fraction composed of protein and fat) and permeates (fraction diluted comprising lactose, minerals, electrolytes, nitrogen and water). Recently there is a higher quest for use of agro-industrial waste in order to recover substances and/or materials and thus increase economic efficiency of production processes. The application of agro-industrial residues in bioprocesses is used like alternative substrate, and a help to solve the problem of pollution in the processes of industrialization, where anaerobic digestion stands out due to its many favorable characteristics. One way to minimize environmental impacts and add value to the effluent is its use in the production of volatile fatty acids (VFA) production via anaerobic fermentation, which is the main objective of this work. All fermentations were performed at 30 ° C and 80 rpm with pig inoculum. Initially made up four fermentations, changing the substrate used (cassava, starchy hydrolyzate, whey permeate and synthetic medium) where obtained better results of VFA concentrations with cheese whey permeated and Manipueira. So, with these two substrates, was done the test without light (dark fermentation), and this new detail was responsible to increase the production of VFA in 38% for the manipueira and 20% for the permeate. Following an experimental design 2² was carried out with in quadruplicate central point for Manipueira, where they were tested three levels of glucose concentration (9, 19 e 29 g.L⁻¹) and sodium bicarbonate (0.21, 1.71 and 3.21 g.L⁻¹), and glucose concentrations of 29 g.L⁻¹ and bicarbonate 3.21 g.L⁻¹ that resulted in the increased production of VFA (1941,4 mg L⁻¹ in 23 h) representing an increase of 77,3% in production. For the cheese whey permeate also was done test changing the glucose (75, 45 e 25 g.L⁻¹) and alkalinity (7,7, 8,14, 9,2, 10,26 e 10,7 g.L⁻¹). The best levels founded in this work for the permeate are 45 g.L⁻¹ of glucose and 10,26 g.L⁻¹ of alkalinity, resulting in 4115,16 mg.L⁻¹ of VFA in 41 h.

Keywords: Manipueira, cheese whey permeate, anaerobic digestion, experimental design, pig inoculum, dark fermentation.

1. INTRODUÇÃO

A mandioca é uma cultura amplamente difundida por todo o território nacional, sendo a dimensão da cultura variada, indo das plantações de fundo de quintal até as extensivas, sendo mais comum no sul-sudeste do país (CEREDA, 2001). É uma cultura importante pela sua rusticidade e desempenho satisfatório em condições de solos de baixa fertilidade e em diferentes climas de várias regiões do Brasil (SCHONS *et al.*, 2009). Em 2011, a produção nacional de mandioca foi estimada em 27,1 milhões de toneladas, obtendo uma variação positiva de 9,2% em relação à safra de 2010 (IBGE, 2010).

Um resíduo importante no processo de extração de fécula de mandioca é o farelo, massa ou bagaço, caracterizado como material fibroso da raiz, contendo parte da fécula que não foi possível extrair no processamento. A elevada quantidade de farelo gerado e a sua umidade fazem com que este material se apresente como um problema durante a safra, devido às dificuldades de transporte e armazenamento. Diante disso, o interesse e também necessidade de utilização desse resíduo, devido aos prejuízos causados no meio ambiente com a sua disposição, são bastante significativos por parte das indústrias desta área (LEONEL, 2001).

Entre os resíduos líquidos do processamento da mandioca, cita-se a manipueira, que em tupi-guarani quer dizer “o que brota da mandioca”. A manipueira caracteriza a água de constituição da raiz, extraída na prensagem da massa ralada, na confecção da farinha (CEREDA *et al.*, 1994). A manipueira é gerada na proporção de 300 L.ton⁻¹ de raiz processada, e na obtenção da fécula, produz-se 600 L.ton⁻¹ de raiz (BARANA & CEREDA, 2000).

A manipueira é o resíduo mais problemático, por possuir elevada carga poluente e potencial tóxico devido à presença de glicosídeos cianogênicos, podendo causar sérios problemas ao meio ambiente e à vida aquática, se lançado em cursos d'água, causando alto impacto quando lançado diretamente em corpos receptores (rios e/ou lagos). A manipueira difere em volume e composição conforme originária de farinheiras ou fecularias (CEREDA, 2001; FERNANDEZ JUNIOR, 2001; GODOY & SANTOS, 2004).

A manipueira vem sendo objeto de estudos nos últimos anos devido ao grande interesse no controle da poluição ambiental e nos problemas acarretados pela mesma. Deste modo, a minimização de resíduos e a contribuição para as tecnologias limpas ganham importância (CAPPELLETTI, 2009).

Outros resíduos de grande impacto ambiental quando descartados incorretamente, são os resíduos de indústrias de laticínio. O fracionamento dos constituintes do leite por ultrafiltração resulta em derivados de grande valor nutricional e comercial, como o retentado (fração concentrada composta por proteínas e gordura) e o permeado (fração diluída composta por lactose, sais minerais, eletrólitos, compostos nitrogenados e água) (OLIVEIRA *et al.*, 2006).

A produtividade de leite no Brasil (em litros por vaca ao ano) cresceu 12% no período de 2005 a 2010. Ganhos efetivos na produtividade ocorreram em todas as regiões, merecendo destaques o crescimento observado na região Sul (19,1%) e no Norte (12,5%) do País (IBGE, 2010).

O permeado de queijo ultrafiltrado é uma fonte de macrominerais e eletrólitos como cálcio (Ca^{++}), magnésio (Mg^{++}), cloro (Cl), sódio (Na^+) e potássio (K), necessários ao equilíbrio osmótico das células animais. Além de apresentar teores consideráveis de lactose e vitaminas do complexo B (ex.: riboflavina), contém proteínas de alto valor biológico (MAHAN, 1998).

Recentemente há uma maior busca pelo uso de resíduos agroindustriais visando recuperar substâncias e/ou materiais e deste modo aumentar a eficiência econômica dos processos de produção. Diversos processos são desenvolvidos para utilização desses materiais convergindo em compostos químicos e produtos finos. A aplicação de resíduos agroindustriais em bioprocessos é uma alternativa observada na forma de substratos, e uma ajuda para solucionar o problema da poluição nos processos de agroindustrialização (SAITO, 2005).

Hoje em dia, o interesse pela aplicação da digestão anaeróbia é confirmado pelos inúmeros trabalhos publicados na literatura pertinente. Este interesse se deve em grande parte à crise energética devido ao aumento do preço dos combustíveis fósseis, conjunto com o aumento da demanda por energia, e também ao desenvolvimento de uma consciência ambiental além do desenvolvimento de modelos de biodigestores mais avançados e mais eficientes.

Esses aspectos permitiram o uso mais amplo desse tipo de tratamento, englobando agora não somente resíduos urbanos e rurais, mas também agroindustriais (FERNANDEZ JUNIOR, 2001; BRAUN *et al.*, 2010), onde a digestão anaeróbia destaca-se devido as suas diversas características favoráveis, como baixa produção de sólidos; baixo consumo de energia; baixos custos de implementação, manutenção e operação, tolerância a elevadas cargas orgânicas, degradação de certos compostos tóxicos e possibilidade de operação com elevados tempos de detenção hidráulica (AQUINO & CHERNICARO 2005; OLIVEIRA, 2007).

Desta forma, o objetivo principal deste trabalho consistiu em estudar a produção de ácidos graxos voláteis a partir do uso de substratos provenientes de resíduos agroindustriais, utilizando como inoculo cultura mista proveniente de dejetos suínos. Como objetivos específicos, focou-se em:

- Caracterização dos resíduos utilizados no estudo;
- Avaliação do uso de diferentes substratos na produção de ácidos graxos voláteis, como o permeado do soro de queijo, manipueira, e o hidrolisado amiláceo, na produção de ácidos graxos voláteis, em comparação com um meio de cultura padrão (sintético).
- Avaliação da ausência de luz na eficiência da biodigestão anaeróbia;
- Avaliação de diferentes níveis de concentração de glicose e bicarbonato de sódio na eficiência da biogiestão anaeróbia através de um planejamento experimental, utilizando como substrato a manipueira;
- Avaliação do tratamento térmico do inoculo e da manipueira na eficiência da biodigestão anaeróbia;
- Avaliação do comportamento cinético do processo em termos de biomassa, AGVs, alcalinidade, açúcares redutores, e acidez utilizando como substrato a manipueira;
- Avaliação de diferentes concentrações de glicose e bicarbonato de sódio na biodigestão anaeróbia utilizando como substrato o permeado de soro de queijo.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. O Cultivo da Mandioca

A mandioca (*Manihot esculenta Crantz*) é uma cultura importante pela sua rusticidade e desempenho satisfatório em condições de solos de baixa fertilidade e em diferentes climas de várias regiões do Brasil, estando presente na maioria das pequenas propriedades familiares, sendo importante fonte de carboidratos na alimentação humana e animal (SCHONS *et al.*, 2009).

Segundo Cereda (2001), a mandioca é cultura amplamente difundida por todo o território nacional. Sua utilização é feita de duas maneiras, o consumo culinário, doméstico, e o uso industrial pelo qual se processa a mandioca para a produção de farinha ou fécula, que pode ser doce ou azeda. A dimensão da cultura é também variada, indo das plantações de fundo de quintal até as extensivas, mais comum no sul-sudeste do país.

A mandioca possui uma série de vantagens em relação a outros cultivos, tais como a fácil propagação, elevada tolerância a estiagens, rendimentos satisfatórios mesmo em solos de baixa fertilidade, pouco exigente em insumos modernos, potencial resistência ou tolerância a pragas e doenças, elevado teor de amido nas raízes, boas perspectivas de mecanização do plantio à colheita, possibilidade de consórcio com inúmeras plantas alimentícias e industriais (VENTURINI FILHO & MENDES, 2003).

Verifica-se na Tabela 2.1, a composição química média de 100g da parte comestível da mandioca crua (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística – IBGE, 2009). Com estes valores, pode-se constatar a importância desta fonte alimentícia no cardápio dos brasileiros.

Apesar de seu cultivo se estender em todo o país, a mandioca concentra-se mesmo em três estados, onde estão 50% da produção brasileira: Pará (5,1 milhões de toneladas, ou 19,1% da produção nacional), Bahia (4,4 milhões de toneladas, ou 16,5%) e Paraná (3,8 milhões de toneladas, ou 14,4%) (IBGE, 2007).

Tabela 2.1: Composição da mandioca crua

Constituintes da mandioca crua	Quantidade
Energia	125,00 (Kcal)
Proteína	0,60 (g)
Lipídeos totais	0,30 (g)
Fibra alimentar total	30,10 (g)
Carboidrato	1,60 (g)
Cálcio	19 (mg)
Magnésio	27 (mg)
Manganês	0,06 (mg)
Fósforo	22 (mg)
Ferro	0,1 (mg)
Sódio	1 (mg)
Potássio	100 (mg)
Cobre	0,01 (mg)
Zinco	0,2 (mg)
Vitamina C	11,10 (mg)
Água	62,0 (g)

Fonte: Tabela de composição de alimentos (IBGE, 2009).

Já em 2011, a produção nacional de mandioca foi estimada em 27,1 milhões de toneladas, variação positiva de 9,2% em relação à safra de 2010, não havendo diferenciação entre o destino da produção de raízes, na coleta de dados, sendo ela para a indústria ou para o consumo doméstico (mandioca de mesa) (IBGE, 2010).

2.2. Resíduos do Processamento da Mandioca

Considerando-se os principais tipos de processamento de raízes de mandioca no Brasil como a fabricação de farinha de mandioca e a extração de fécula, os resíduos gerados podem ser sólidos ou líquidos. Dentre os resíduos

sólidos, cita-se a casca marrom, entrecasca, descarte, crueira, fibra, bagaço e varredura (PRADO & PAWLOWSKY, 2003)

Um resíduo importante no processo de extração de fécula de mandioca é o farelo, massa ou bagaço, caracterizado como material fibroso da raiz, contendo parte da fécula que não foi possível extrair no processamento. A elevada quantidade de farelo gerado e a sua umidade fazem com que este material se apresente como um problema durante a safra, devido às dificuldades de transporte e armazenamento. Diante disso, o interesse e também necessidade de utilização desse resíduo, devido aos prejuízos causados no meio ambiente com a sua disposição, são bastante significativos por parte das indústrias da área (LEONEL, 2001)

No processamento da mandioca, a fim de se obter o amido ou fécula, grande quantidade de resíduo sólido (bagaço) e líquido (manipueira) são eliminados nas etapas de prensagem, peneiramento e centrifugação. Segundo Leonel (2001) e Abrahão (2005), uma fecularia que processa, em média, 200 ton de mandioca por dia, gera aproximadamente 183 toneladas por dia de bagaço, ou seja, a cada quilograma de mandioca processada, é gerado 0,915 quilogramas de bagaço. Segundo Cereda (1996) a composição média dos farelos é: 85% de umidade inicial e 75% de amido, 15% de fibras, 1,6% de cinzas, 2% de proteína, 1% de açúcares e 0,8% de matéria graxa expressos na base seca. Os teores de pH e acidez são bastantes variáveis devido a fermentações naturais do resíduo úmido.

Entre os resíduos líquidos do processamento da mandioca, cita-se a manipueira, que em tupi-guarani quer dizer “o que brota da mandioca”. A manipueira caracteriza a água de constituição da raiz, extraída na prensagem da massa ralada, na confecção da farinha (CEREDA *et al.*, 1994).

Após serem descascadas, as raízes são trituradas até formarem uma massa homogênea que é prensada, cujo líquido resultante dessa prensagem é denominado manipueira, a qual é gerada na proporção de 300 L.ton⁻¹ de raiz processada, e na obtenção da fécula, produz-se 600 L.ton⁻¹ de raiz (BARANA & CEREDA, 2000).

Segundo Kuczman (2007), uma tonelada de raiz de mandioca pode conter em média 60% de umidade ou 600L de água como constituinte do suco celular. No caso das farinheiras, as águas das prensas, ou manipueira são de aspecto leitoso, contendo de 5 a 7% de fécula (parte sedimentável, parte em suspensão coloidal), proteínas, glicose, restos de célula, ácido cianídrico, bem como outras substâncias orgânicas e nutrientes minerais essenciais.

Os componentes, e respectivas quantidades presentes no resíduo variam muito devido a fatores como a idade da planta, tempo após a colheita, tipo e ajuste de equipamentos industriais (CEREDA & MATTOS, 1996). A Tabela 2.2 ilustra a composição química média da manipueira.

Tabela 2.2: Composição química média da manipueira

Parâmetros	Unidade	Efluente Bruto
Nitrogênio total	mg.dm ⁻³	32,4
Fósforo	mg.dm ⁻³	17,8
Potássio	mg.dm ⁻³	333,6
Cálcio	mg.dm ⁻³	31,37
Magnésio	mg.dm ⁻³	36,87
Condutividade elétrica	dS.µ ⁻¹	1,46
Sódio	mg.dm ⁻³	51,7
Alumínio	mg.dm ⁻³	6,6
Carbono orgânico	g.dm ⁻³	7,73
pH		4,8
Cianeto	mg.dm ⁻³	12,0
DBO	mg dm ⁻³	6.210
DQO	mg.dm ⁻³	14.700
Oxigênio dissolvido	mg.dm ⁻³	0,0
Ferro	mg.dm ⁻³	6,09
Zinco	mg.dm ⁻³	0,59
Cobre	mg.dm ⁻³	0,05
Manganês	mg.dm ⁻³	0,62

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

É o resíduo mais problemático, por possuir elevada carga poluente e potencial tóxico devido à presença de glicosídeos cianogênicos, podendo causar sérios problemas ao meio ambiente e à vida aquática, se lançado em cursos d'água, causando alto impacto quando lançado diretamente em corpos receptores (rios e/ou lagos). A manipueira difere em volume e composição conforme originária de farinheiras ou fecularias (CEREDA, 2001; FERNANDEZ JUNIOR, 2001; GODOY & SANTOS, 2004).

A característica que difere a planta da mandioca de outras tuberosas amiláceas é a presença de glicosídeos, potencialmente hidrolisáveis a cianeto. O glicosídeo mais representativo é a linamarina, e o menos frequente, a lotaustralina, no entanto, ambos são capazes de gerar ácido cianídrico. O teor de cianeto total começa alto. A partir do momento que se inicia o rompimento das paredes celulares, as enzimas reagem com os glicosídeos, liberando o ácido cianídrico. Parte do cianeto livre fica na solução líquida, parte volátil se desprende para a atmosfera, decrescendo a concentração de cianeto total. Nas fecularias as fases subsequentes do processo como a etapa de ralação das raízes, com adição de água para separação do amido, os valores de cianeto diminuem bruscamente, grande parte desse cianeto passa para a forma livre (CEREDA, 2001).

Na água, o cianeto está disperso na sua forma molecular como ácido cianídrico (HCN), mas pode ser encontrado na sua forma livre, como íon cianeto (CN⁻). Na forma de ácido cianídrico apresenta-se muito tóxico, pois é instável e volátil. Nos animais superiores, essa toxicidade explica-se pela afinidade com o ferro, combinando-se com a hemoglobina. Nas plantas superiores e nos micro-organismos, o cianeto interfere na fosforilação oxidativa, combinando-se com o citocromo oxidase e inibindo o transporte eletrônico e, conseqüentemente, a formação de ATP (OLIVEIRA, 2003).

De acordo com Cooke (1979) citado por CEREDA & MATTOS (1996) linamarina e lotaustralina, são os dois diferentes glicosídeos cianogênicos presentes na planta de mandioca, onde raízes e folhas contêm a maior quantidade de linamarina.

2.3. Agregação de Valor Utilizando Resíduos do Processamento da Mandioca

A palavra resíduo leva uma imagem depreciativa, onde o produto, analisado no contexto global do processamento, não tem serventia e deve ser descartado. Este conceito tem sido gradualmente abandonado, substituído por outros como subproduto e mesmo co-produto. O conceito altera o contexto do processo e coloca em foco a possibilidade de melhor utilização da matéria prima. Muitas mudanças no conceito de agroindústria ajudaram a acelerar essa nova imagem. A consciência de proteção ao meio ambiente, com a exigência de que o processamento seja feito sem prejuízo da natureza, sem dúvida foi um desses fatores. A imagem de uma indústria limpa é hoje uma peça mercadológica, além disso fica cada vez mais caro tratar efluentes e resíduos, tornando-se importante aproveitar integralmente a matéria prima para que não haja desperdícios no processo. Desta forma, sempre que possível, o resíduo final deverá se constituir em matéria prima para um novo processo, constituindo uma segunda transformação (CEREDA, 2001).

A manipueira vem sendo objeto de estudos nos últimos anos devido ao grande interesse no controle da poluição ambiental e nos problemas acarretados pela mesma. Deste modo, a minimização de resíduos e a contribuição para as tecnologias limpas ganham importância (CAPPELLETTI, 2009).

No Brasil, a manipueira já é utilizada por vários pesquisadores que vêm colhendo seus benefícios. No nordeste do país, a EMATER (Empresa de Assistência Técnica e Extensão Rural), já usa a manipueira em substituição da água na produção de tijolos, que misturado ao barro e a matéria orgânica presente, faz uma espécie de liga. Os elementos químicos presentes no líquido fazem o papel do fogo, pois sua evaporação endurece o tijolo do mesmo modo que o fogo faria. Este processo reduz o uso da água, poupa a matriz calorífica que é a lenha, evitando o desmatamento e evita a emissão de gases com a queima (CAPPELLETTI, 2009).

De acordo com a pesquisa feita por Santos *et al.* (2010), devido ao fato de a manipueira ser rica em macro e micro nutrientes, esta pode ser utilizada como fonte de potássio na cultura de alface, dependendo da dose utilizada.

Considerando-se que a manipueira é rica em carboidratos e em minerais, Costa (2010) a explorou como substrato alternativo para a produção de polihidroxicarboxilatos (PHAs). Além da vantagem da utilização do resíduo, os biopolímeros são rapidamente biodegradáveis.

Os resultados obtidos por Lamaison (2009) revelaram que foi possível produzir biohidrogênio por fermentação, utilizando a água residuária do processamento da mandioca como substrato.

As farinhas também utilizam grande quantidade de lenha para secagem da farinha em fornos de baixa eficiência. Para tentar solucionar os dois problemas, poluição ambiental e energético, pesquisas têm sido feitas no CERAT, Centro de raízes e Amidos Tropicais, sobre tratamento anaeróbio de manipueira. Nesse processo, além de redução da carga orgânica, ocorre produção de gás metano, que pode ser queimado, substituindo parte da lenha na secagem da farinha (BARANA, 2000), permitindo a substituição de 77% da lenha consumida (INOUE,2008).

Gonzaga *et al.* (2008) estudaram a utilização da manipueira em diferentes concentrações como inseticida, de forma alternativa a utilização de inseticidas sintéticos no controle do pulgão-preto dos citros. De acordo com seus estudos, as concentrações utilizadas (10 mg.mL⁻¹, 20 mg.mL⁻¹,30 mg.mL⁻¹,40 mg.mL⁻¹ e 50 mg.mL⁻¹) causaram mortalidade dos pulgões superior a 50%, sendo que a maior concentração causou a mortalidade de todos os insetos.

Devido à complexidade qualitativa da manipueira, Aragão & Ponte (1995) testaram sua eficácia como adubo foliar, pois o resíduo contém em altos níveis, todos os macro e micro nutrientes requeridos pelas plantas, com exceção do molibdênio, além de tratar-se de um resíduo industrial abundante e gratuito em regiões onde se cultiva a mandioca.

Segundo Leonel & Cereda (1995), a manipueira recém coletada na indústria apresentou-se como substrato viável para o crescimento da linhagem CCT 0917 de *A. niger*, não apresentando diferença significativa quanto a produção de ácido cítrico em relação ao meio sintético. Já Pastore (2010), obteve a produção deste ácido, através de fermentação submersa com o uso da manipueira recém-coletada, enriquecida com sacarose, como substrato.

Outra forma de agregação de valor é a utilização da manipueira para produção de ácidos graxos voláteis (AGVs), através da utilização do resíduo como meio fermentativo para bactérias fermentativas. Estas absorvem produtos solúveis provenientes da hidrólise (primeira etapa do processo de digestão anaeróbia) e metabolizam para compostos mais simples, para depois excretá-los. Os produtos formados são os ácidos graxos voláteis, álcoois, ácido láctico, gás carbônico, hidrogênio, amônia, sulfeto de hidrogênio, além de novas células (TAVARES, 2008).

2.4. Agregação de Valor do Bagaço da Mandioca

O processamento industrial da mandioca para obtenção da fécula gera uma grande quantidade e variedade de resíduos, sendo o bagaço o principal resíduo sólido produzido nas fecularias. Este material, quando descartado, além de poluir o meio ambiente, representa desperdício de uma matéria prima que poderia ser melhor aproveitada (MATSUI *et al.*, 2003).

Ramos *et al.* (2000) estudaram o uso do bagaço de mandioca em substituição ao milho no concentrado das rações para bovinos em crescimento, devido ao resíduo ser rico em amido, e ser potencialmente vantajoso devido ao baixo custo deste.

Matsui *et al.* (2003) estudaram o uso do bagaço da mandioca, misturando a fibras vegetais para a preparação de compósitos, que foram utilizados como matéria prima para a confecção de bandejas descartáveis. As bandejas obtidas na pesquisa foram resistentes o suficiente para permitir a sua utilização no acondicionamento de frutas e hortaliças.

Krueger (2009) obteve resultados satisfatórios ao utilizar o resíduo sólido do processamento da mandioca (bagaço) no crescimento de micro-organismos, capazes de excreção de enzimas amilolíticas, bem como na constituição de um substrato orgânico adequado à produção de compostos de maior valor agregado, como PHAs (polihidroxialcanoatos).

2.5. Aspectos do Setor Lácteo

O leite é uma secreção fluida das fêmeas de todas as espécies de mamíferos. Mais de 4.000 (quatro mil) espécies de mamíferos o produzem, com a função primordial de suprir as necessidades nutricionais dos recém-nascidos. Além de fornecer os nutrientes essenciais para os neonatos, o leite também exerce uma série de funções fisiológicas por meio de suas proteínas e peptídeos, por exemplo, fornecendo imunoglobulinas, enzimas, inibidores enzimáticos, ligando-se ou transportando proteínas, fatores de crescimento e agentes antibacterianos. Diversas são as espécies de mamíferos domesticados que fornecem leite para o consumo humano. Entretanto, a única espécie produtora de leite que tem significado para a indústria de laticínio é a bovina, ou seja, as vacas de diversas raças bovinas (ANTUNES, 2003).

Segundo o mesmo autor, a composição aproximada varia em razão da estação do ano e reflete diferenças entre raças, estágio de lactação e o sistema de alimentação. Como valores médios são aceitos 4,0% de gordura, 3,5% de proteína, 4,8% de lactose, e 0,7% de sais, sendo água o restante.

Os principais sais do leite são fosfatos, citratos, cloretos, sulfatos, carbonatos, bicarbonatos de sódio, potássio, cálcio e magnésio. São encontrados aproximadamente 20 outros elementos no leite em quantias menores, inclusive cobre, ferro, silício, zinco e iodo (BALDASSO, 2008).

Segundo dados do IBGE, no ano de 2010, a produção de leite no Brasil chegou a 30.715.460 m³, alcançando um rendimento produtivo médio de 1,340 L de leite por vaca ao ano. Dentre os estados brasileiros, o Paraná apresenta-se como terceiro maior produtor de leite, com uma produção anual de 3.595.775m³ de leite, obtendo uma participação de 11,7% na produção total. A produtividade de leite no Brasil (em litros por vaca ao ano) cresceu 12% no período de 2005 a 2010. Ganhos efetivos na produtividade ocorreram em todas as regiões, merecendo destaques o crescimento observado na região Sul (19,1%) e no Norte (12,5%) do País (IBGE, 2010).

O soro do leite é produzido indiretamente na utilização do leite para a produção de queijo. É encarado como efluente por muitas indústrias brasileiras, e se não for tratado gera um sério problema ambiental.

2.6. Soro de Leite

Na cadeia agroindustrial do leite, um dos derivados que merece destaque é a fabricação de queijos, que em 2008 atingiu a marca de 640 mil toneladas (LEITE, 2008).

Na produção de cada quilograma de queijo, partindo de 10 litros de leite, são gerados em média 9 litros de soro. Com um aspecto amarelo-esverdeado, contém cerca de 52% dos sólidos totais, 94% da lactose, 96% das proteínas solúveis e 38% dos minerais do leite. Quando encarado como efluente gera um alto custo para o seu tratamento, pois possui uma elevada demanda biológica de oxigênio (DBO), superior a $60.000 \text{ mg.O}_2\text{.L}^{-1}$ (ALVES, 2005; BALDASSO *et al.*, 2011). E, se não for tratado, representa o principal efluente poluidor das indústrias de laticínios. A concentração e a qualidade dos componentes do soro justificam a utilização do mesmo como fonte de matéria prima, e por isso vem despertando o interesse das indústrias (BALDASSO *et al.*, 2011).

Segundo a Associação Brasileira das Indústrias de Queijo (ABIQ), a produção anual de queijo é de 488 mil toneladas, se considerarmos um volume de 9 litros de soro para cada kg de queijo produzido, pode-se estimar um volume de aproximadamente 4,392 milhões de litros de soro de queijo. Este produto, é resultante da precipitação de gorduras e caseína do leite durante a fabricação de queijos, representa 85 a 90% do volume de leite e retém 55% de seus nutrientes, dentre eles a lactose (4 a 5%) e proteínas (0,6 a 0,7%) (SERPA *et al.*, 2009). Segundo Bronstein & Alegre (1998), o soro de leite é um dos resíduos mais poluentes da indústria alimentícia. Em média, cada tonelada de soro não tratado despejado por dia no sistema de tratamento de esgoto equivale a poluição diária de cerca de 470 pessoas.

2.7. Permeado do Soro de Queijo

As aplicações do soro são inúmeras, englobando as indústrias de lácteos, carnes, misturas secas (para condimentar), panificação, chocolate, aperitivos e bebidas, entre outras. Ainda assim, apenas cerca de 50% do soro produzido nos Estados Unidos e na Europa é utilizado na formulação de produtos, o restante é tratado como despejo (ALVES, 2005).

O fracionamento dos constituintes do leite por ultrafiltração resulta em derivados de grande valor nutricional e comercial, como o retentado (fração concentrada composta por proteínas e gordura) e o permeado (fração diluída composta por lactose, sais minerais, eletrólitos, compostos nitrogenados e água) (OLIVEIRA *et al.*, 2006)

O permeado de Queijo ultrafiltrado é uma fonte de macro-minerais e eletrólitos como cálcio (Ca^{++}), magnésio (Mg^{++}), cloro (Cl), sódio (Na^+) e potássio (K), necessários ao equilíbrio osmótico das células animais. Além de apresentar teores consideráveis de lactose e vitaminas do complexo B (ex.: riboflavina), contém proteínas de alto valor biológico (MAHAN, 1998).

Na Figura 2.2, tem-se a comparação entre a composição do leite, o soro do leite e o permeado do soro de queijo.

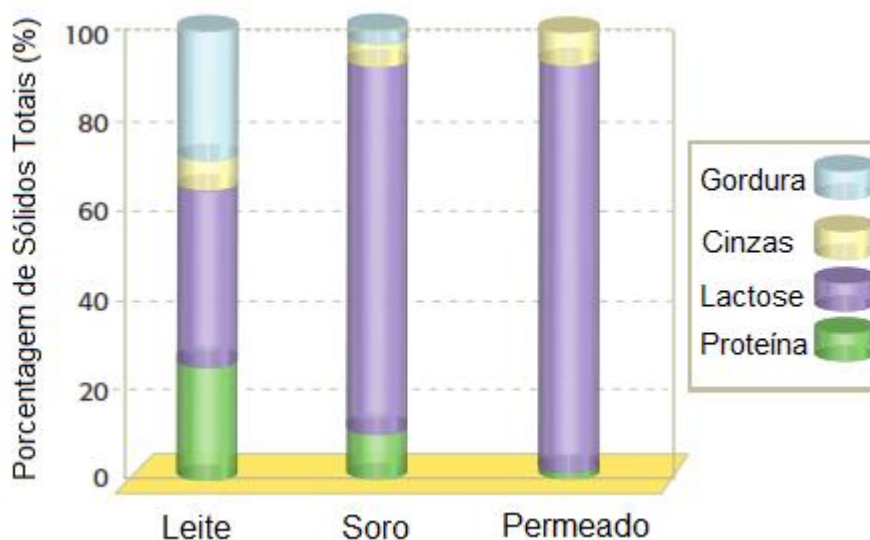


Figura 2.1: Composição do Leite, Soro e Permeado do Soro de Queijo. Fonte: SMITH (2008).

A Tabela 2.3 contém os valores das composições do Leite, o soro do leite e o permeado do soro do queijo em porcentagem.

Tabela 2.3: Composição geral do Leite, Soro do Leite e Permeado do Soro de Queijo.

Componente	Leite (%)	Soro de Leite (%)	Permeado do Soro (%)
Sólidos Totais	12,5	6,5	5,5
Proteína	3,5	0,8	< 0,1
Lactose	4,8	4,9	4,9
Cinzas	0,7	0,5	0,5
Gordura	3,5	0,3	0,0

Fonte: SMITH (2008).

Apesar de haver um mercado em expansão para os concentrados protéicos de soro, o soro desproteinado, que contém cerca de 90% dos sólidos totais e da DBO do soro original, continua sendo um subproduto poluente que não pode ser tratado ou descartado simplesmente como esgoto sem gastos, devido à sua elevada demanda química de oxigênio (DQO) em torno de 50.000 mg de $O_2 \cdot L^{-1}$ de permeado (ALVES, 2005).

2.7.1. Utilização do Permeado do Soro do Queijo

Hwang *et al.* (1992) estudaram a biocinética de um reator anaeróbio de fluxo ascendente para o tratamento do permeado do soro de queijo, justificando tal tratamento pela produção de metano, sendo útil a utilização do mesmo como fonte de energia na própria indústria de fabricação do queijo.

Oliveira *et al.* (2006) utilizaram o permeado do soro de queijo para elaborar uma bebida fermentada com características sensoriais aceitáveis e composição química semelhante a um repositor hidroeletrólítico, tendo a finalidade de repor água e sais minerais eliminados pela transpiração durante atividades físicas ou desidratação devido a distúrbios gastrointestinais.

Um estudo feito por Bronstein & Monte Alegre (1998) que mostrou a viabilidade da utilização do permeado de soro de queijo como substrato para o

crescimento de fermento, em particular, o cultivo de *Lactococcus Lactis* Subsp *Lactis*, suplementado com extrato de levedura e peptona.

O uso do permeado de soro de queijo como um substrato para a fermentação de *Propionibacterium Freudenreichi* PS1 para produção de ácidos graxos de cadeia curta (constituintes do bioaroma do queijo suíço), foi estudado por Souza *et al.* (2011), assim como parâmetros de secagem destes ácidos a fim de se obter estabilidade do bioaroma.

Norton *et al.* (1994) estudaram a cinética da produção contínua de ácido láctico, utilizando o permeado do soro de queijo como substrato e como inoculo *Lactobacillus helveticus* imobilizado. A produção de ácido láctico foi considerada satisfatória pelos autores do estudo.

2.8. Digestão Anaeróbia

Os processos bacteriológicos de fermentação da matéria orgânica são interiores a existência do homem na Terra, sendo que a quantidade de bactérias e a intensidade de sua ação no ambiente primitivo colaboraram na determinação da composição da atmosfera, propiciando as condições de desenvolvimento da vida. A literatura registrou a descoberta do gás metano pelo químico italiano Alessandro Volta (1745-1827), em 1776; entretanto é de se supor que este gás combustível já fosse reconhecido e até mesmo utilizado de alguma maneira desde antes desta data. Volta identificou o metano como o gás dos pântanos, resultante da decomposição de restos vegetais em ambientes confinados, verificando que o mesmo conferia ao gás suas características combustíveis (FERNANDEZ JUNIOR, 2001).

Hoje em dia, o interesse pela aplicação da digestão anaeróbia é confirmado pelos inúmeros trabalhos publicados na literatura pertinente. Este interesse se deve em grande parte à crise energética, devido ao aumento do preço dos combustíveis fósseis, conjunto com o aumento da demanda por energia, e também ao desenvolvimento de uma consciência ambiental além do desenvolvimento de modelos de biodigestores mais avançados e mais eficientes. Esses aspectos permitiram o uso mais amplo desse tipo de tratamento,

englobando agora não somente resíduos urbanos e rurais, mas também agroindustriais, (FERNANDEZ JUNIOR, 2001; BRAUN *et al.*, 2010), onde a digestão anaeróbia destaca-se devido as suas diversas características favoráveis, como baixa produção de sólidos; baixo consumo de energia; baixos custos de implementação, manutenção e operação, tolerância a elevadas cargas orgânicas, degradação de certos compostos tóxicos e possibilidade de operação com elevados tempos de detenção hidráulica (AQUINO & CHERNICARO 2005; OLIVEIRA, 2007).

O processo de tratamento anaeróbio de resíduos orgânicos, conhecido como digestão anaeróbica, pode ser considerado como um ecossistema onde diversos grupos de micro-organismos trabalham interativamente na conversão da matéria orgânica complexa em compostos mais simples. Ocorre devido a interações simbióticas de populações microbianas distintas tanto quanto às exigências nutricionais como na fisiologia, onde o produto de um grupo é substrato de outro (FERNANDEZ JUNIOR, 2001; OLIVEIRA, 2007).

Os grupos bacterianos envolvidos no processo estão misturados e esta diversidade depende basicamente do tipo de matéria orgânica adicionada ao digestor. As bactérias formadoras de ácidos são bastante resistentes e capazes de suportar súbitas mudanças das condições externas e de alimentação, ao contrário das bactérias metanogênicas, bastantes susceptíveis a alterações nas condições. As bactérias formadoras de ácido asseguram que o meio está livre de oxigênio e produzem alimento básico para as bactérias metanogênicas, além de suas enzimas agirem sobre proteínas e aminoácidos, liberando sais de amônia, as únicas fontes de nitrogênio que as bactérias metanogênicas aceitam. Estas, por sua vez, embora não possam viver sem as formadoras de ácidos, removem os produtos finais do metabolismo das primeiras e os convertem em gases, que escapam do sistema. Caso esta conversão não se processasse, as condições do biodigestor se tornariam tão ácidas que matariam as bactérias formadoras de ácidos (PINTO, 1999).

O processo da digestão anaeróbia é composto por diversas etapas sequenciais promovidas por bactérias específicas, e pode-se distinguir basicamente quatro etapas diferentes no processo global de conversão, que estão descritas a seguir, baseadas nos estudos de Lettinga (2007) e Oliveira (2007).

A hidrólise é a primeira etapa do processo de digestão anaeróbia, e consiste na ação de bactérias fermentativas, denominadas hidrolíticas, que, por não serem capazes de assimilar os materiais complexos, como proteínas, polissacarídeos e gorduras, excretam enzimas extracelulares (exoenzimas), que irão atuar na degradação destes compostos até se tornarem compostos mais simples, solúveis em água, podendo atravessar a parede celular das bactérias. A hidrólise de polímeros geralmente ocorre de forma lenta, sendo afetadas por vários fatores, como temperatura, tempo de retenção hidráulica, composição do substrato, pH, entre outros. Na digestão de substratos complexos, a hidrólise é considerada a etapa limitante, em função da disponibilidade e estrutura do substrato em questão.

Já na acidogênese, os produtos solúveis provenientes da hidrólise são absorvidos pelas células de bactérias fermentativas e metabolizados para compostos mais simples, e são excretados. Os produtos formados são ácidos graxos voláteis (AGVs), álcoois, aldeídos, ácido lático, gás carbônico, biohidrogênio, amônia, sulfeto de hidrogênio, além de novas células. Este processo é realizado por um grupo diversificado de bactérias, das quais a maioria é anaeróbia estrita, ou seja, a presença de oxidantes como o oxigênio ou o nitrato é tóxica. Há sempre a presença de bactérias que usam o oxigênio disponível, sendo de suma importância para a remoção de todo o oxigênio presente no sistema. Os ácidos graxos de baixo peso molecular são denominados ácidos voláteis porque podem ser destilados à pressão atmosférica. É a partir deles que a maior parte do metano é produzida, e é por causa deles que esta etapa é chamada acidogênese.

A etapa seguinte é a da acetogênese, onde as bactérias acetogênicas convertem os produtos da acidogênese em acetato, biohidrogênio e gás carbônico, que consistem em substrato para os micro-organismos metanogênicos. Elas fazem parte de um grupo metabólico intermediário.

Na etapa final da digestão anaeróbia, os compostos orgânicos são transformados em metano e gás carbônico, realizado pelas arqueas metanogênicas, as quais são estritamente anaeróbias e dependem do substrato fornecido pelas acidogênicas, configurando, portanto uma interação comensal. Estes micro-organismos utilizam apenas um limitado número de substratos, que

compreendem ácido acético, hidrogênio/dióxido de carbono, ácido fórmico, metanol, metilaminas e monóxido de carbono. As arqueas metanogênicas são divididas em dois grupos principais, em função da sua afinidade por substrato e magnitude de produção de metano, um grupo que forma metano a partir de ácido acético ou metanol, outro grupo que produz metano a partir de biohidrogênio e dióxido de carbono.

A Figura 2.3 resume o processo de digestão anaeróbia através de um fluxograma.

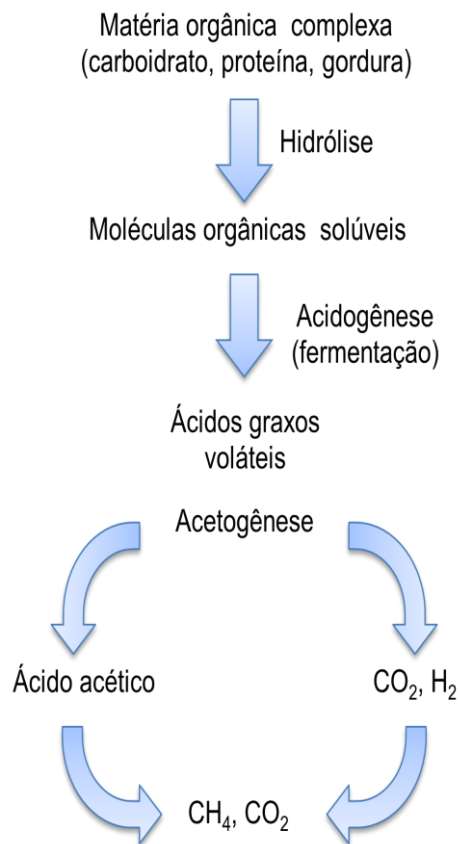


Figura 2.2: Etapas metabólicas da digestão anaeróbia (adaptado de Rapport, 2008)

2.9. Fatores de Interferência na Biodigestão Anaeróbia

O ritmo a que os micro-organismos crescem é de importância primordial no processo de digestão anaeróbia. Os parâmetros de funcionamento do digester devem ser controlados de modo a aumentar a atividade microbiana e, assim, aumentar a eficiência de degradação anaeróbia do sistema (THEMELIS, 2002). Alguns destes parâmetros são discutidos nos tópicos a seguir.

2.9.1. Temperatura

A temperatura é um fator extremamente importante na digestão anaeróbia, uma vez que influi na velocidade do metabolismo bacteriano, no equilíbrio iônico e na solubilidade dos substratos (Foresti *et al.*, 1999) citado por STEIL (2001).

Há principalmente duas faixas de temperaturas que fornecem condições ideais de biodigestão. A maior parte dos digestores trabalham na faixa mesofílica (20 a 45°C), por estes serem mais confiáveis, não necessitando de controle de temperatura. Já a digestão termofílica (acima de 45°C) é descrita como mais crítica e mais sensível devido à vulnerabilidade as bactérias, principalmente as metanogênicas, às variações de temperatura (PINTO, 1999; THEMELIS, 2002).

2.9.2. pH

Os micro-organismos são seres vivos que necessitam de um meio propício ao seu desenvolvimento; por isso, a acidez e alcalinidade são fatores importantes no processo de digestão anaeróbia. As bactérias metanogênicas são sensíveis a concentração de ácidos dentro do digestor, e seu crescimento pode ser inibido em condições ácidas, de modo que o pH do processo deve ser mantido entre 6 e 8, podendo ser considerado ótimo de 7 a 7,2; seu controle é função do acúmulo de bicarbonato, da fração de CO da parte gasosa, da concentração em ácidos voláteis ionizados e da concentração de nitrogênio sob a forma de amônia (PINTO, 1999; THEMELIS, 2002).

Inicialmente, as bactérias formadoras de ácidos fracionam a matéria orgânica e produzem ácidos voláteis, resultando num aumento da acidez do meio e uma redução do pH. Quando as bactérias metanogênicas começam a agir, transformam os ácidos em metano, neutralizando o meio e elevando o pH. Outro fator que tende a elevar o pH é o teor de amônia, que aumenta quando as proteínas começam a ser digeridas. Um terceiro fator atuante sobre o pH do meio, agindo de modo a estabilizá-lo, é o bicarbonato. A concentração do íon bicarbonato é diretamente proporcional ao teor de dióxido de carbono e ao pH do meio. Assim, se as bactérias do primeiro grupo são muito rápidas e produzem

mais alimentos do que as metanogênicas conseguem digerir, o dióxido de carbono liberado tornará maior a concentração de bicarbonato, o que impede a queda acentuada no pH. Com o correr da degradação do material orgânico e num sistema fechado, o pH tende a se elevar e a produção de metano tem o seu pico (PINTO, 1999).

2.9.3. Composição e Concentração dos Resíduos

Uma das vantagens da digestão anaeróbia reside justamente na diversidade de substratos passíveis de sofrer fermentação. As bactérias metanogênicas não exigem substâncias ou matérias específicas para sua operação (THEMELIS, 2002).

A composição do resíduo a ser tratado afeta diretamente a produção de biogás na proporção direta de quanto maior for o conteúdo de sólidos voláteis, os quais representam a quantidade de sólidos orgânicos presentes na amostra, e a disponibilidade de nitratos, fosfatos e sulfatos. Nota-se, também, que a produção de metano é diretamente proporcional à demanda química de oxigênio (DQO) (PINTO, 1999).

Elementos nutrientes essenciais, como o ferro, e os micronutrientes, como o níquel e o cobalto, demonstram efeitos positivos na produtividade de metano. Certos íons orgânicos, como o K^+ , o Na^+ , o Ca^{++} , a amônia iônica NH_4^+ , o Mg^{++} e o S^- apresentam, na fermentação, uma propriedade singular: quando em quantidade diminutas são excitantes do metabolismo celular, manifestando, porém, propriedades inibidoras do mesmo metabolismo quando em concentrações mais elevadas. Ainda não é completamente conhecido o fenômeno da inibição; acredita-se que, em maiores concentrações, os íons atravessem a delicada membrana celular, interferindo no mecanismo biológico da célula (PINTO, 1999).

2.9.4. Agitação

A importância da agitação no digestor é prover a mistura do meio de cultura e os micro-organismos. Além disso, a agitação previne a formação de gradientes

de temperatura dentro do digestor. Porém a agitação em rotações elevadas pode causar a ruptura das células, sendo preferível uma rotação mais baixa.

2.9.5. Alcalinidade

Alcalinidade é a capacidade que um sistema tem de neutralizar ácidos. Alcalinidade elevada não é sinônimo de pH elevado, mas significa que o sistema tem elevada concentração de radicais alcalinos e, em função disso, tem elevado poder de tamponamento. Pode-se dizer que a basicidade é um fator de intensidade (afeta o pH) e alcalinidade é um fator de capacidade.

De acordo com Chernicharo (1997) a interação da alcalinidade com os AGVs durante a digestão anaeróbia fundamenta-se na capacidade da alcalinidade do sistema em neutralizar os ácidos formados no processo e também em tamponar o pH na eventualidade de acumulação dos mesmos.

Corbelini (1994) citado por OLIVEIRA (2007) afirma que a alcalinidade é um dos parâmetros mais importantes para o controle da digestão anaeróbia, pois uma vez ocorrida qualquer alteração neste parâmetro, permite-se antever o acúmulo de ácidos no reator, antes que o pH seja afetado de maneira significativa.

2.10. Inóculo Suíno na Digestão Anaeróbia

Em países em desenvolvimento, a produção animal está sendo submetida a uma grande pressão para satisfazer a demanda de proteína animal necessária à população e também para ter um excesso de produção para comercialização com a maioria dos países desenvolvidos (BELLAVÉR, 2000).

Segundo a Associação Brasileira dos Criadores de Suínos, ABCS (2011), no ano de 2011, foi registrado 225.193 suínos em todo o país, 1,22% a mais que em 2010. Quanto ao desempenho dos estados, Santa Catarina permanece em primeiro lugar, com 36,89% dos registros emitidos, seguido por Minas Gerais com 26,69% e Paraná com 22,35%.

A atual expansão da suinocultura tem como principal característica a concentração de animais por área, visando atender o consumo interno e externo de carne, produtos e derivados. Os resíduos provenientes de animais são frequentemente responsáveis pela poluição de águas superficiais e subterrâneas, pela ação das chuvas, esses resíduos ricos em matéria orgânica e agentes patogênicos chegam às águas devido principalmente ao carregamento de material de áreas onde existem animais. Observa-se, como consequência, generalizada poluição hídrica (alta carga orgânica e presença de coliformes fecais) proveniente dos dejetos, que somada aos problemas de resíduos domésticos e industriais, tem causado sérios problemas ambientais, como a destruição dos recursos naturais renováveis, especialmente água (OLIVEIRA & NUNES, 2002; SANTOS, 2004).

A quantidade de excrementos produzidos diariamente por suíno e o teor de umidade dos seus dejetos variam de acordo com o desenvolvimento corporal, o tipo de alimentação, a quantidade de água ingerida, a estação do ano e a quantidade de água adicionada na higienização das baias. Estima-se a produção de efluentes nas unidades de ciclo completo, em condições normais, em $100 \text{ L.matriz}^{-1}.\text{dia}^{-1}$. Nesse sentido, os diversos setores da produção animal começam a se organizar para atender a dois requisitos com o objetivo de que seus produtos possam competir e para que tenham boa aceitação no mercado: questões legais e exigência de mercado interno e externo (SANTOS, 2004).

Os digestores anaeróbios têm sido largamente utilizados no tratamento de resíduos sólidos, pois reduz o potencial poluidor. Dentre os resíduos sólidos de culturas agrícolas, cita-se dejetos de animais, lodos de estações de tratamento de esgoto e lixo urbano, estimando-se que milhões de digestores anaeróbios tenham sido construídos em todo o mundo com esse propósito (SANTOS, 2004).

Dentre os estudos realizados a respeito de dejetos suínos, cita-se Steil (2001) que investigou a influência da utilização de inoculos sobre a digestão anaeróbia de resíduos de aves de postura, frangos de corte e suínos em biodigestores modelo batelada com volume útil de 60 litros operados à temperatura ambiente. A pesquisadora obteve resultados satisfatórios, e considerou os substratos como bons para o processo de digestão anaeróbia,

sendo que o potencial energético para o inoculo suíno variou de 0,1949 a 0,4466 m³ de biogás por kg de sólidos totais.

Em seus estudos, Orrico Junior *et al.* (2009), avaliaram o processo de biodigestão anaeróbia utilizando dejetos suínos, com e sem separação da fração sólida, considerando diferentes tempos de retenção hidráulica. A conclusão dos pesquisadores foi que a separação da fração sólida da água residuária é importante para maximizar a eficiência dos biodigestores, para melhorias na produção de biogás, podendo obter um efluente com maior concentração de elementos fertilizantes.

Souza *et al.* (2005) avaliaram a biodigestão anaeróbia de dejetos suínos sob efeito de três temperaturas (25, 35 e 40°C) e dois níveis de agitação (com e sem) do substrato. Os experimentos foram realizados por um período de 71 dias, e os resultados obtidos pelos pesquisadores demonstraram que a agitação não interferiu e que o melhor desempenho foi na temperatura de 35°C.

Em seus experimentos, Giongo (2011), testou em meio de cultura sintético para fermentação anaeróbia, inoculos suínos e bovinos, almejando maior produção de ácidos graxos voláteis, sendo a utilização de dejetos suínos que proveu melhores resultados.

2.11. Utilização de Ácidos Graxos Voláteis

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 polihidroxialcanoato, (PHA), que é um biopolímero termoplástico que pode substituir polímeros sintéticos tais como polipropileno, polietileno e poliestireno devido as sua semelhante propriedade mecânica. O PHA foi obtido por Yu (2000) a partir de águas residuais de amido num processo de duas etapas, primeiramente a acidogênese microbiana, onde obteve a produção de ácidos propiônico, butírico e acético (AGVs), e posteriormente, a polimerização dos ácidos.

Os recentes estudos de obtenção do biohidrogênio de fontes renováveis oferecem as informações mais relevantes para a produção de AGVs. A produção do biohidrogênio está intimamente relacionada à concentração de ácidos graxos voláteis, e segundo Leite (2005), a maior produção de biohidrogênio coincide com maiores teores de ácido butírico no efluente.

Tuna *et al.* (2009), através de fermentações de efluentes de trigo com obtenção de ácidos graxos voláteis, submetem este processo à eletro-hidrólise para a produção de biohidrogênio. Com concentrações de AGVs variando de 1 a 5 g.L⁻¹ alcançou 110 mL de biohidrogênio. Por outro lado Argun *et al.* (2008), obtiveram 693 mL de biohidrogênio em fermentações com culturas de *Rhodobacter Sphaeroides* com concentrações ótimas de AGVs em cerca de 2,35 g.L⁻¹ e 50 mg de amônia.

Panichnumsin *et al.* (2010), realizaram co-digestão de manipueira com diferentes concentrações de dejetos suíno, 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⁻¹ de sólidos voláteis do inoculo suíno adicionado e a concentração de AGVs na faixa de 0,98 g.L⁻¹.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Inoculo

O inoculo utilizado para as fermentações foi proveniente de dejetos suíno, obtido junto ao biodigestor do Colégio Estadual Agrícola de Toledo/Pr. Para cada fermentação realizada foi utilizado inoculo fresco, o qual após coletado foi acondicionado em galão de plástico no volume total de 3 L, fechado e armazenado a temperatura ambiente. O inoculo foi padronizado mediante análise de sólidos totais e sólidos totais voláteis.

3.2. Meios de Cultivo

Foram testados inicialmente quatro diferentes meios de cultivo visando a produção de AGVs, a manipueira, o hidrolisado amiláceo, o permeado de soro de queijo e o meio sintético.

3.2.1. Manipueira

A manipueira utilizada neste trabalho foi coletada em uma indústria (fecularia) localizada em Toledo/Pr e armazenada em garrafas de politereftalato de etileno (PET) de 2 L, as quais foram mantidas em freezer a -18°C até seu uso para a realização dos experimentos.

A manipueira foi caracterizada em termos de demanda química de oxigênio (DQO), demanda bioquímica de oxigênio (DBO), nitrogênio total, fosfato total, alcalinidade, oxigênio dissolvido, sólidos totais, sólidos totais voláteis, açúcar redutor, pH e acidez.

3.2.2. Hidrolisado Amiláceo

O hidrolisado amiláceo foi obtido mediante hidrólise ácida do amido presente na mandioca.

O bagaço da mandioca foi coletado na mesma indústria fornecedora da manipueira, e acondicionado em sacolas plásticas com massa média de 150 g de bagaço por sacola, as quais foram armazenadas em freezer na temperatura de -18°C até seu uso nos experimentos.

Para a realização da hidrólise do bagaço da mandioca, baseou-se nos estudos de Krueger (2009), onde a autora testou parâmetros para a obtenção de maior quantidade de glicose liberada na hidrólise ácida do bagaço da mandioca.

Desta forma, realizou-se o experimento em triplicata onde adicionou-se em um erlenmeyer 10 g de bagaço de mandioca, 100 mL de manipueira e 10 mL de solução de ácido clorídrico 10% (v/v), os quais foram mantidos em autoclave, numa temperatura de 121°C por 30 min, obtendo-se assim o hidrolisado amiláceo usado nos experimentos.

O hidrolisado amiláceo foi caracterizado em termos de açúcar redutor.

3.2.3. Permeado de Soro de Queijo

O permeado do soro de queijo foi cedido pela empresa Sooro, localizada na cidade de Marechal Cândido Rondon/Pr. O Permeado foi armazenado em garrafas de politereftalato de etileno (PET) de 2 L, e mantido em freezer a temperatura -18°C até seu posterior uso na realização dos experimentos.

O permeado do soro de queijo foi caracterizado em termos de demanda bioquímica de oxigênio (DBO), demanda bioquímica de oxigênio (DQO), fosfato total, cálcio, pH, acidez, sólidos totais, cinzas, lactose e proteína.

3.2.4. Adição de Nutrientes

Para todos os meios de cultivo testados foram adicionados os constituintes baseados nos estudos de Fernández-Moralez *et al.* (2010), onde em sua pesquisa os autores também objetivavam a produção de AGVs, e biohidrogênio. Os componentes utilizados e suas respectivas quantidades estão apresentados na Tabela 3.1.

Tabela 3.1: Constituintes e quantidades dos meios de cultivo

Componente	Concentração (g.L⁻¹)
Glicose	14,59
(NH ₄)Cl	4,89
KH ₂ PO ₄	2,85
NaCl	1,07
Na ₂ SO ₄	0,21
MgCl ₂ .6H ₂ O	0,44
EDTA	0,18
ZnSO ₄ .7H ₂ O	11,7.10 ⁻³
FeSO ₄ .7H ₂ O	11,3.10 ⁻³
MnCl ₂ .4H ₂ O	9,1.10 ⁻³
CuCl ₂ .2H ₂ O	8,0.10 ⁻³
CoCl ₂ .6H ₂ O	3,5.10 ⁻³
CaCl ₂	2,2.10 ⁻³
NiCl ₂ .6H ₂ O	1,8.10 ⁻³

Fonte: Fernández-Moralez *et al.*(2010)

Nos ensaios com o hidrolisado amiláceo não foi adicionado glicose, uma vez que este constituinte foi obtido da hidrólise ácida do bagaço da mandioca.

3.2.5. Meio Sintético

O meio sintético foi preparado com água destilada e adicionando os constituintes da Tabela 3.1.

3.3. Reator de Biodigestão Anaeróbia

Foram usados como reatores para os experimentos de biodigestão anaeróbia recipientes de vidro com capacidade de 3 L e tampa metálica. Nas tampas foram feitos dois orifícios onde foram adaptadas mangueiras de silicone, sendo a uma delas acoplada em sua extremidade uma seringa de plástico no volume de 5 mL para a retirada periódica de amostras. A extremidade da outra mangueira foi imersa em um erlenmeyer contendo solução de hidróxido de sódio, vedado com tampão de gaze, algodão e parafilme. Esta última mangueira tinha

como finalidade a exaustão de gases formados ao longo da biodigestão anaeróbia. A Figura 3.1 mostra a montagem dos reatores tipo batelada para a biodigestão anaeróbia.

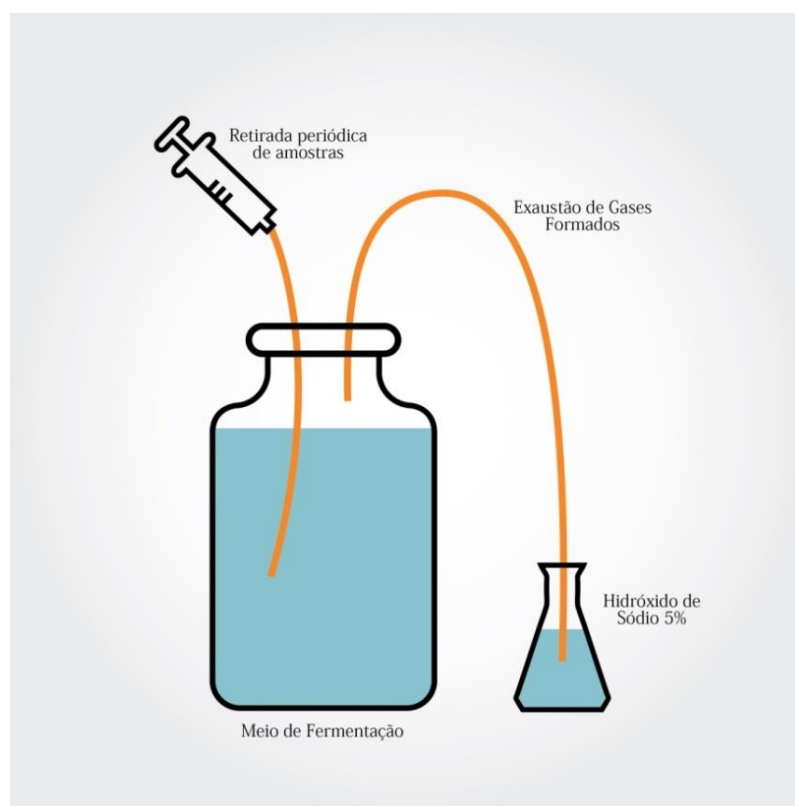


Figura 3.1: Esquema fermentação e reatores

3.4. Fermentação Anaeróbia

Em todos os experimentos, após dissolver os componentes da Tabela 3.1 com 2 L do meio de cultivo, foi adicionado o volume necessário de inóculo de forma a obter-se uma concentração de sólidos totais de 0,85%, posteriormente o pH foi ajustado para 7,0 com solução de hidróxido de sódio 2N, sendo este procedimento necessário, pois segundo Correia & Del Bianchi (2008), isto melhora na estabilização do processo fermentativo devido a manutenção do tamponamento no meio, pois valores iniciais muito baixos de pH acabam inibindo a fase metanogênica.

A quantidade estabelecida de sólidos totais utilizados baseou-se nos estudos de Giongo (2011) e Lamaison (2009) os quais também realizaram

fermentações utilizando a manipueira como substrato e inóculo proveniente de dejetos suínos.

Os reatores foram tampados, e a mangueira de exaustão de gases foi acoplada a uma bomba de vácuo por 15 min com o intuito de retirada do ar presente no reator. Em seguida, essa mesma mangueira foi submersa no Erlenmeyer contendo hidróxido de sódio.

Todas as fermentações ocorreram em incubadora shaker refrigerada (SOLAB) mantida sob temperatura de 30°C e agitação constante de 80 rpm.

Foram retirados 20 mL de amostra para análise de ácidos graxos voláteis no tempo zero e a cada 8h durante as primeiras 24 h de experimento após a amostragem passou a ser realizada a cada 12h. Inicialmente os ensaios tiveram como intuito verificar quais meios de cultivo proporcionariam melhores resultados de produção (acúmulo) de AGVs. Ao final dos estudos foi realizada uma análise cinética completa onde foram obtidas as curvas de açúcares redutores, alcalinidade, acidez, biomassa, pH e AGVs.

O volume total retirado de cada reator não excedeu 10% do volume total de meio de cultura contido em cada reator para não desestabilizar o meio de fermentação devido a quantidade de células retiradas, dessa forma, o volume total retirado de cada reator não excedeu 200 mL.

3.5. Fermentação Escura

Visando melhorar o processo de produção de AGVs, foi testada a fermentação anaeróbia na ausência de luminosidade, onde as demais condições operacionais foram mantidas.

3.6. Avaliação das Condições Operacionais do Processo

3.6.1. Planejamento Experimental

Foi realizado um planejamento experimental visando avaliar a influência dos parâmetros alcalinidade e concentração de glicose sobre a produção de

ácidos graxos voláteis para o meio fermentado com manipueira. Utilizou-se um planejamento fatorial completo 2^2 com quadruplicata no ponto central, totalizando 8 ensaios, onde foram testadas as concentrações de glicose de 9, 19 e 29 g.L⁻¹, e as concentrações de bicarbonato de sódio de 0,213; 1,71 e 3,21 g.L⁻¹ (Tabela 3.2). Tais concentrações de glicose foram baseadas no trabalho de Fernandes-Morales *et al.* (2010) e também considerando a concentração de glicose já contida na manipueira. Os valores entre parenteses na Tabela 3.2 referem-se aos valores reais aplicados de glicose e bicarbonato e os valores -1, 0 e +1 correspondem aos valores codificados do planejamento fatorial.

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 2^2 com quadruplicata no ponto central.

Ensaio	NaHCO₃(g.L⁻¹)	Glicose (g.L⁻¹)
1	-1 (0,213)	-1 (9)
2	1 (3,21)	-1 (9)
3	-1 (0,213)	1 (29)
4	1 (3,21)	1 (29)
5	0 (1,71)	0 (19)
6	0 (1,71)	0 (19)
7	0 (1,71)	0 (19)
8	0 (1,71)	0 (19)

3.6.2. Tratamento Térmico do Inoculo

Foi testada a efetividade do tratamento térmico do inoculo usado nos experimentos com manipueira, repetindo-se as condições de melhor produção de AGVs obtido no planejamento experimental.

O tratamento térmico foi baseado nas propostas sugeridas por Hawkes *et al.*, (2002), e Braga & Zaiat (2011), onde os autores estudaram parâmetros importantes almejando a otimização da produção de biohidrogênio, em ambas as

pesquisas os autores utilizaram o tratamento térmico que consistiu em ferver o inóculo a 100°C por 15 min.

3.6.3. Tratamento Térmico do Meio de Cultivo

Foi testada também a efetividade do tratamento térmico da manipueira, repetindo-se as condições de melhor produção de AGVs obtido no planejamento experimental. A intenção do tratamento térmico foi o possível aumento da solubilidade dos constituintes da manipueira, assim como a geleificação do amido presente neste substrato, proporcionando assim maior disponibilidade destes nutrientes aos micro-organismos.

O tratamento térmico consistiu em manter a manipueira em autoclave, a 121°C, por 30 min.

3.6.4. Permeado de Soro de Queijo

Foram testadas diferentes condições de operação da biodigestão anaeróbia, utilizando o permeado de soro de queijo como substrato, afim de se obter maior produção dos ácidos graxos voláteis. Como a quantidade de açúcar presente no permeado é elevada, 150 g.L⁻¹ de glicose, decidiu-se fazer a biodigestão com o permeado *in natura*, e também diluindo-o para obter concentrações menores de açúcar (90 g.L⁻¹ e 50 g.L⁻¹), fixando a concentração de bicarbonato de sódio. Foram testadas também diferentes concentrações de bicarbonato para uma quantidade fixa de glicose.

3.7. Métodos Analíticos

Seguem descritos os métodos utilizados para a caracterização da manipueira, do bagaço da mandioca, do permeado, do inoculo e das amostras retiradas durante o processo de biodigestão. A descrição detalhada dos métodos analíticos encontram-se no Anexo 1. Foram retiradas do reator alíquotas de 20 mL, realizada a verificação do pH pelo método potenciométrico de leitura direta do

pHmetro previamente calibrado, seguiu-se então para análise de ácidos graxos voláteis.

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). O método utilizado para a determinação da biomassa celular foi baseado e adaptado de Rodrigues (2005). A determinação da concentração de açúcares redutores foi adaptado do método proposto por Miller (1959) sendo o resultado de açúcar redutor expresso como glicose. Para a análise de acidez, umidade e glicosídeos redutores seguiu-se conforme descrito nas Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz (1985). A determinação de ácidos graxos voláteis utilizou a 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. As análises de proteína foram realizadas empregando-se a metodologia descrita pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – MAPA, Brasil (2006).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Caracterização dos Resíduos

4.1.1 Manipueira

Para fins de comparação, na Tabela 4.1 constam os valores obtidos da caracterização da manipueira no presente trabalho, e de mais dois estudos, estes realizados por Giongo (2011) e Pastore (2010). Ambas autoras utilizaram a manipueira, a primeira objetivava a produção de AGVs e a segunda objetivava a produção de ácido cítrico.

Tabela 4.1: Caracterização da Manipueira

Parâmetros	Referências		
	Caracterização	Giongo (2011)	Pastore (2010)
DQO	10300,00 mg.L ⁻¹	8865,0 mg.L ⁻¹	2250 mg.L ⁻¹
DBO	175,15 mg.L ⁻¹	11,32 mg.L ⁻¹	-
Nitrogênio total	67,2 mg.L ⁻¹	116,48 mg.L ⁻¹	105 mg.L ⁻¹
Fosfato total	21,84 mg.L ⁻¹	26,86 mg.L ⁻¹	0,83 mg.L ⁻¹
Alcalinidade	213,43 mg.L ⁻¹	-	330 mg.L ⁻¹
Oxigênio dissolvido	2,35 mg.L ⁻¹	-	-
Sólidos totais	1,12%	0,742%	2,30 mg.L ⁻¹
Sólidos totais voláteis	1,03%	0,671%	1,33 mg.L ⁻¹
Açúcar redutor	2,44 g.L ⁻¹	1 g.L ⁻¹	-
pH	5,73	4,0	7,24
Acidez	0,23%	0,40%	-

Nota-se que o valor obtido de DQO foi superior quando comparado aos estudos das autoras. Ao comparar o valor da carga orgânica presente neste estudo com a carga orgânica de um esgoto sanitário típico com DQO de aproximadamente 400 mg.L⁻¹ (CAMPOS, 1994), pode-se observar o potencial poluidor da manipueira, fato agravado devido o grande volume deste resíduo gerado pela indústria.

Quanto aos valores obtidos de nitrogênio total, este foi inferior ao encontrado pelas autoras, e quanto ao fosfato obteve-se um valor próximo porém inferior ao encontrado por Giongo (2011) e muito superior ao encontrado por Pastore (2010). A presença de nitrogênio e fósforo na manipueira a torna atrativa para seu uso como meio de cultivo de bactérias, devido a importância desses elementos no metabolismo desses micro-organismos, sendo favorável a maior proporção desses elementos no resíduo. Para a alcalinidade o valor obtido foi superior ao encontrado por Pastore (2010) e para açúcar redutor, sólidos totais e sólidos totais voláteis, os valores obtidos foram superiores aos valores obtidos por Giongo (2011), já a acidez foi inferior. Os componentes, e respectivas quantidades presentes no resíduo podem variar devido a fatores como a idade da planta, tempo após a colheita, tipo e ajuste de equipamentos industriais (CEREDA & MATTOS, 1996).

Na caracterização da manipueira (Tabela 4.1) os valores obtidos de nitrogênio total, oxigênio dissolvido e pH se apresentaram superiores quando comparados aos estudos feitos por Silva *et al.* (2005) (Tabela 2.2), onde os autores caracterizaram a manipueira bruta, e a mesma depois de percolada em colunas de solo. Para os valores obtidos de DQO e DBO foram inferiores quando comparados ao mesmo autor.

4.1.2 Hidrolisado Amiláceo

O hidrolisado amiláceo foi caracterizado em termos de açúcar redutor resultando em $80,4 \text{ g.L}^{-1}$. Krueger (2009) quantificou em seus estudos cerca de 10 g.L^{-1} de açúcar redutor, após feita a hidrólise ácida do bagaço da mandioca com água, valor inferior ao encontrado neste estudo. A hidrólise ácida do presente estudo foi realizada diretamente na manipueira. Todavia, na caracterização de açúcar redutor para a manipueira, obteve-se o valor médio de $2,44 \text{ g.L}^{-1}$, sendo o bagaço da mandioca a principal fonte da alta concentração de açúcar redutor, evidenciando positivamente a utilização do bagaço da mandioca como fonte alternativa para o fornecimento de glicose no meio de cultivo de micro-organismos. É fundamental ressaltar que a composição da mandioca varia de um

lugar para outro, e conseqüentemente, tal variação se estende também para seus resíduos.

4.1.3 Permeado de Soro de Queijo

Os valores obtidos na caracterização do permeado do soro de queijo encontram-se na Tabela 4.2. Como era de se esperar, pôde se verificar o elevado teor de DQO no permeado, bem como o de cálcio e de lactose devido ao fato do efluente ser oriundo do leite. Os valores de DQO e fosfato total são superiores aos encontrados na manipueira, como por exemplo o fosfato, cerca de 57 vezes maior, e DQO, cerca de 14 vezes.

Tabela 4.2: Caracterização do permeado do soro do queijo

Parâmetros	Quantidades
DBO	351,82 mg.L ⁻¹
DQO	149000 mg.L ⁻¹
Fosfato total	1246,9 mg.L ⁻¹
Cálcio	2024,04 mg.L ⁻¹
pH	6,6
Acidez	26 °D
Sólidos totais	15%
Cinzas	0,82%
Glicose	7,5%
Proteína	< 0,18%
Alcalinidade	7700 mgL ⁻¹

Smith (2008) em seu trabalho caracterizou o leite e seus derivados obtendo resultados para o permeado de soro de queijo. O valor obtido para sólidos totais foi superior quando comparado ao obtido por Smith (2008), o qual obteve 5,5%, assim como a quantificação de cinzas, que obteve-se 0,82% e o mesmo autor obteve 0,5%. Já para proteína, os resultados foram convergentes, obtendo-se níveis inferiores a 0,18% e o mesmo autor, níveis inferiores a 0,1.

4.1.4 Inoculo

O inoculo (dejeito suíno) foi padronizado mediante análise de sólidos totais e sólidos totais voláteis, obtendo-se os valores de médios de 0,18% para sólidos totais e 0,09% para sólidos totais voláteis. Todos os experimentos foram conduzidos na mesma concentração de inoculo, em termos de sólidos totais, no valor de 0,85% v/v para 2 L de meio de cultivo.

4.2. Avaliação de Diferentes Substratos na Produção de AGVs

Com o intuito de testar dentre quatro meios de cultivo propostos (sintético, manipueira, hidrolisado amiláceo, e permeado do soro de queijo) quais proporcionariam maior acúmulo de ácidos graxos voláteis, foi realizada a biodigestão anaeróbia com os quatro meios de cultivo, e monitorado pH e concentração de AGVs.

Os comportamentos de cada fermentação quanto ao pH e concentração de AGV acumulado podem ser observados nas Figuras 4.1 e 4.2, respectivamente.

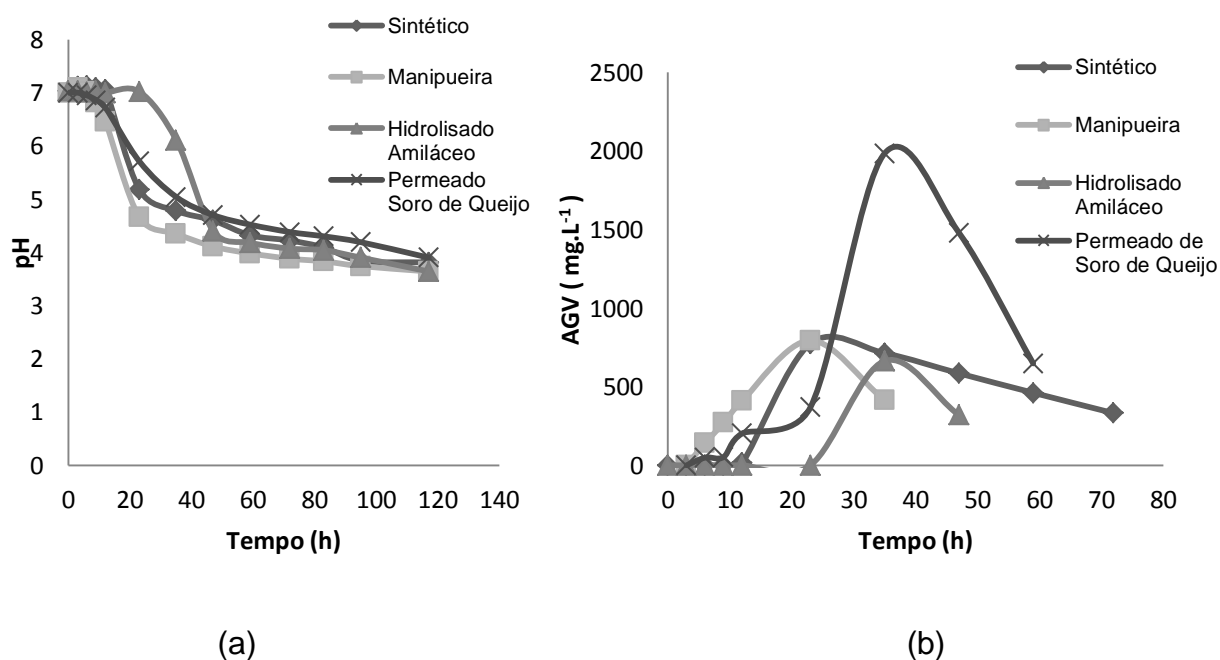


Figura 4.1: Comportamento do pH (a) e do perfil cinético de AGVs (b) ao longo da fermentação para os diferentes meios testados

O comportamento do pH dos ensaios foi semelhante, havendo um decaimento acentuado até 20 h, e posterior estabilização em torno do pH 4. De acordo com Aquino & Chernicaró (2005), que apresentaram em seus estudos uma visão integrada das principais causas de acúmulo de ácidos graxos voláteis em reatores anaeróbios, ocorre o acúmulo de acetato quando há limitações cinéticas dos micro-organismos metanogênicos que é acentuada pela redução do pH.

O decaimento do pH ao longo da fermentação também foi descrito por Correia & Del Bianchi (2008), onde os autores monitoraram o pH e o mantiveram próximo de 7,0 com a adição de bicarbonato de sódio durante a fermentação da manipueira em um reator anaeróbio compartimentado vertical inoculado com lodo granulado. O mesmo comportamento de decaimento do pH simultâneo a produção de AGVs é descrito por Giongo (2011), indicando a produção de AGVs.

Quanto ao acúmulo de AGVs no meio de cultivo (Figura 4.1 (b)), nota-se um pico de produção para todos os meios testados. O experimento realizado com o permeado do soro de queijo como meio de cultivo apresentou maior acúmulo, obtendo um pico de 1986,05 mg.L⁻¹ em 35 h de fermentação. Comparando a biodigestão com a manipueira com a biodigestão com meio sintético os picos foram próximos, sendo de 774,73 mg.L⁻¹ de AGV em 23 h para o meio sintético, e 794,75 mg.L⁻¹ de AGV em 23 h para o meio utilizando a manipueira. Já a biodigestão realizada com o hidrolisado amiláceo obteve menor acúmulo de AGV, obtendo-se o pico de 285,8 mg.L⁻¹ de AGVs em 35 h.

O permeado do soro de queijo é fonte de sais minerais, compostos nitrogenados, eletrólitos, água e principalmente lactose (15%). Assim, acredita-se que esses constituintes contribuíram para a alta produção de AGVs. A utilização do permeado foi considerada viável em pesquisas realizadas por Bronstein & Monte Alegre (1998) onde o efluente foi utilizado como substrato para o crescimento de fermento, em especial *Lactococcus Lactis* Subsp. *Lactis*, suplementado com extrato de levedura e peptona.

Os resultados de quantificação dos ácidos graxos voláteis foram realizados baseando-se no método proposto por Buchauer (1998). Porém o método apresenta limitação de quantificação para pHs inferiores a 4,3. Dessa forma, algumas das curvas de AGVs apresentadas possuem um número menor de pontos devido a esta limitação analítica. Todavia, acredita-se que o pico de

produção de AGVs ocorreu dentro da faixa de pH limitada pelo método, pois a produção de AGVs 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 a inibição da atividade metanogênica, ocorreu no decréscimo de pH 6 para 4,5, onde os autores utilizaram como substrato águas residuais de indústria de laticínios com microflora anaeróbia mista à temperatura de 28°C. Nessas condições obtiveram a máxima produção de 3000 mg.L⁻¹ de AGVs.

4.3. Fermentação Escura

A ausência de luz nas fermentações é citada por Loss (2011), que em seu trabalho objetivava a produção de biohidrogênio, que por sua vez é acompanhada pela produção de ácidos orgânicos. A autora menciona que a fermentação não depende de luz e não exige a presença dela, já Levin *et al.* (2004) fizeram um estudo de viabilidade na produção de biorreatores que pudessem suprir biohidrogênio suficiente para uso em células de combustível de membrana trocadora de prótons. O resultado das análises mostrou que sistemas baseados em fotossíntese não possuem taxas de produção de biohidrogênio suficientes para carregar células de combustível. No entanto, alguns sistemas de fermentação escura e reação de deslocamento CO-água de *R.gelatinosus* apresentaram resultados promissores.

Assim, após analisar os resultados obtidos no item 4.2, decidiu-se avaliar o desempenho da fermentação escura para os dois melhores meios de cultivo, repetindo-se os ensaios para a manipueira e para o permeado do soro do queijo, mantendo-se as mesmas condições, e promovendo a ausência de luz durante a biodigestão anaeróbia. As Figuras 4.2 e 4.3 apresentam a comparação entre as fermentações, na Figura 4.2 para a manipueira e na Figura 4.3 para o permeado.

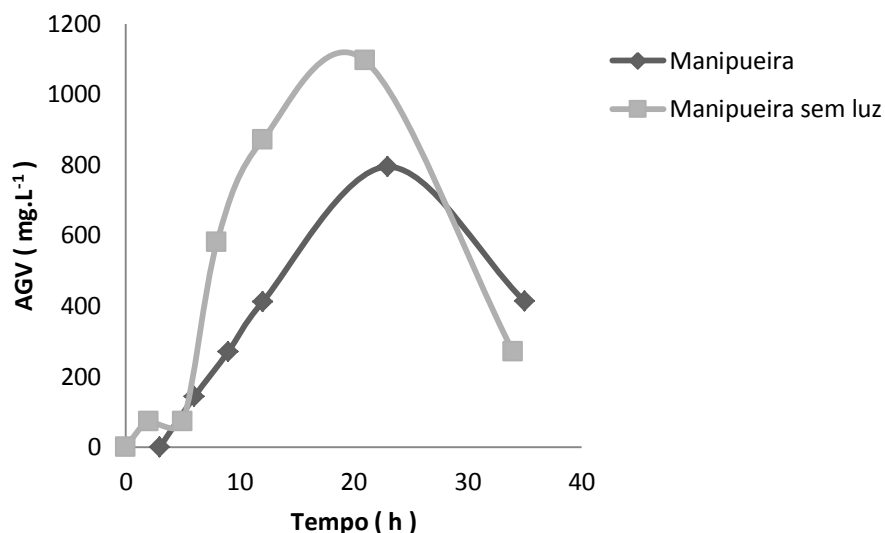


Figura 4.2: Comparação do perfil cinético de produção de AGV para a manipueira com e sem ausência de luz.

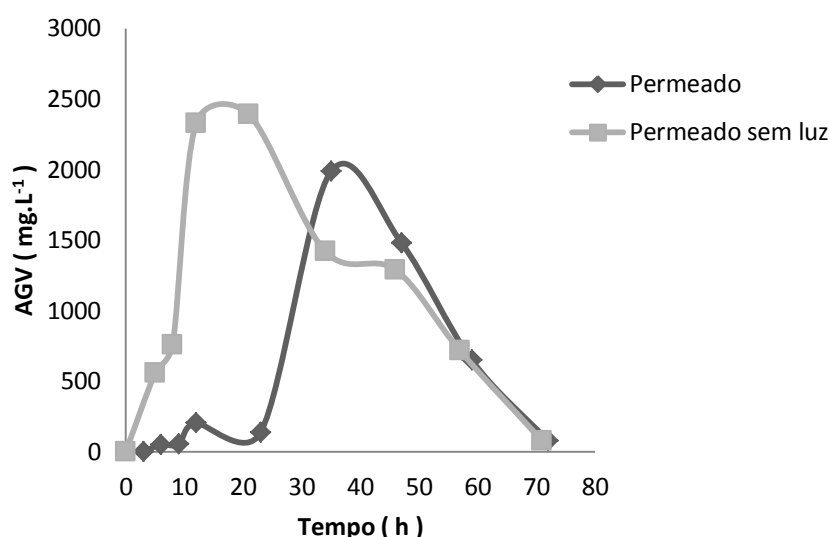


Figura 4.3: Comparação do perfil cinético de produção de AGV para o permeado de soro de queijo com e sem ausência de luz.

Conforme a Figura 4.2 verifica-se que na fermentação com ausência de luz ocorreu uma maior produção de AGVs (pico de 1095 mg.L^{-1} , em 21 h) em comparação com a fermentação com a manipueira sem ausência de luz (pico de 795 mg.L^{-1} , em 23 h), onde a fermentação escura apresentou um acréscimo de 38% em termos de acúmulo dos ácidos. Para o permeado do soro do queijo, a fermentação escura apresentou um máximo de acúmulo de AGV de 2391 mg.L^{-1} em 21 h, e para a mesma fermentação sem ser em ausência de luz, obteve-se um

acúmulo de 1986 mg.L^{-1} em 35 h, onde a fermentação escura apresentou um acréscimo de 20% de produção de AGV, num tempo inferior, evidenciando assim a melhor eficiência das fermentações quando ocorridas na ausência de luz.

Tuna *et al.* (2009) afirmam em seus estudos que a produção do biohidrogênio através da fermentação de resíduos de trigo moído foi mais alta quando operada na ausência de luz, porém para a produção do biohidrogênio a partir da fermentação contendo ácidos graxos voláteis resultou em rendimentos relativamente baixos.

4.4. Avaliação de Diferentes Condições de Processo

4.4.1. Manipueira

4.4.1.1 Influência da Glicose e da Alcalinidade

Com o intuito de avaliar a influência da concentração de glicose, e a alcalinidade (concentração de bicarbonato de sódio) na produção de ácidos graxos voláteis, assim como a interação destes dois fatores, foi realizado um planejamento experimental 2^2 com quadruplicata no ponto central, resultando em 8 ensaios, onde a concentração de glicose variou de 9, 19 e 29 g.L^{-1} , e a concentração de bicarbonato de sódio variou de 0,21; 1,71 e $3,21 \text{ g.L}^{-1}$, conforme Tabela 3.2. Inicialmente serão apresentados os perfis cinéticos de produção de AGVs para os 8 ensaios e posteriormente os resultados estatísticos.

Os pontos centrais do planejamento (ensaios 5 a 8) que representam as fermentações das repetições apresentaram cinética de acúmulo de AGVs conforme as curvas da Figura 4.5.

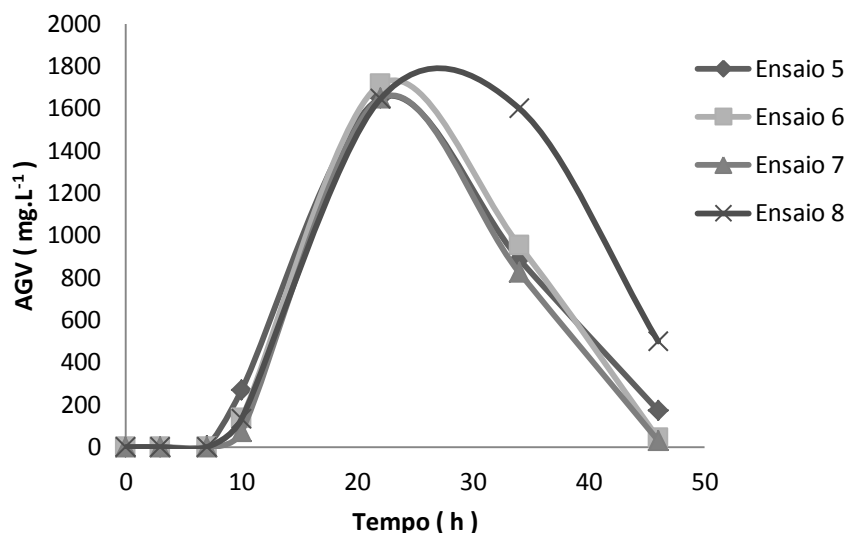


Figura 4.4: Perfis cinéticos de produção de AGVs referente a quadruplicata no ponto central do planejamento 2^2 , utilizando a manipueira como substrato.

Observa-se que os experimentos foram semelhantes em seu comportamento de produção de AGV, com exceção da replica de nº 8, de forma que é possível se verificar o grau de reprodutibilidade do processo.

As quatro primeiras fermentações do planejamento experimental (ensaios 1 a 4) e também a média da quadruplicata (média) no ponto central apresentaram a cinética de acúmulo de AGVs conforme Figura 4.6.

A média da quadruplicata no ponto central foi inserida no gráfico apenas para fins comparativos.

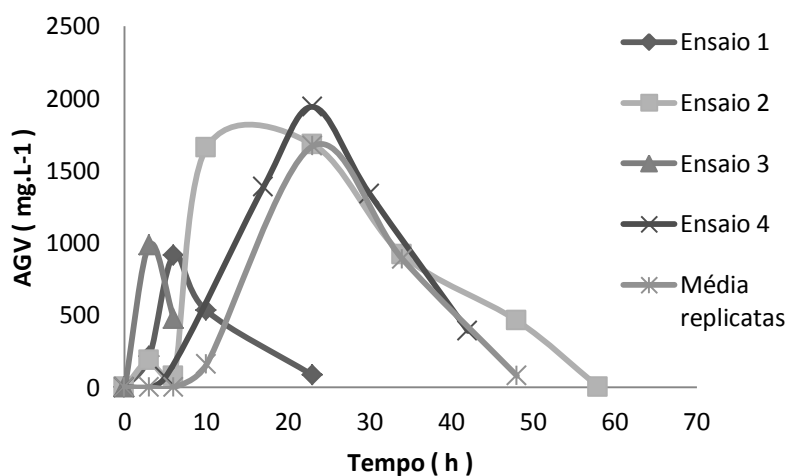


Figura 4.5: Perfis cinéticos de produção de AGV referente ao planejamento 2^2 , utilizando a manipueira como substrato.

Dessa forma, pode-se notar que a fermentação que apresenta maior produção de ácidos graxos voláteis é aquela correspondente ao ensaio 4, que possui os níveis mais elevados de concentração de glicose e bicarbonato de sódio (29 g.L^{-1} e 3 g.L^{-1} respectivamente). O pico de acúmulo da produção foi de $1941,4 \text{ mg.L}^{-1}$ de AGV em 23 h, representando um acréscimo de 77,3% em relação ao melhor resultado obtido até então (1095 mg.L^{-1}).

Optou-se então realizar uma quadruplicata da fermentação na melhor condição obtida, referente ao ensaio 4. Assim, na Figura 4.7 constam as 4 fermentação nas condições de maior produção de AGVs, afim de se analisar a reprodutibilidade dos experimentos.

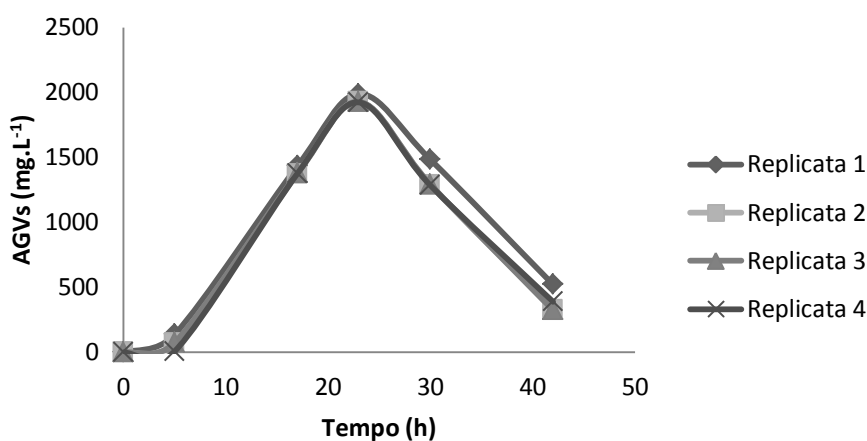


Figura 4.6: Perfis cinéticos de produção de AGV referente à quadruplicata do ensaio 4 do planejamento 2^2 , utilizando a manipueira como substrato.

Observa-se que as linhas dos experimentos foram muito próximas, significando que o experimento teve reprodutibilidade.

A Tabela 4.3 apresenta a matriz do planejamento experimental, com as variáveis trabalhadas e os resultados obtidos de produção de ácidos graxos voláteis no processo fermentativo.

Tabela 4.3: Resultados da produção de AGV do planejamento fatorial 2^2 com quadruplicata no ponto central, usando manipueira como substrato

Ensaio	NaHCO ₃ (g.L ⁻¹)	Glicose (g.L ⁻¹)	AGV (mg.L ⁻¹)
1	0,21	9	912,2
2	3,21	9	1657,7
3	0,21	29	985,6
4	3,21	29	1941,4
5	1,71	19	1648,5
6	1,71	19	1648,5
7	1,71	19	1645,4
8	1,71	19	1714,1

Conforme já relatado, a Tabela 4.3 indica, assim como a Figura 4.6, que o ensaio número 4, com as condições operacionais de 29 g.L⁻¹ de glicose e 3,21 g.L⁻¹ de bicarbonato de sódio, foi o que apresentou maior eficiência na produção de ácidos graxos voláteis. Realizou-se uma análise estatística dos resultados da tabela, onde os ensaios 5 a 8 são as réplicas realizadas no ponto central do experimento, com o intuito de verificar a reprodutibilidade e o erro experimental, onde o desvio padrão da réplica foi de 33,45.

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 determinação do modelo (R^2).

Tabela 4.4: Estimativa dos efeitos para a produção de AGV para o planejamento 2^2 com manipueira ($\alpha=0,05$)

Variável	Efeito	Erro padrão do efeito	p - valor	Coefficiente
Média/ Intercepto	1519,175	73,1908	0,000032	1519,175
NaHCO ₃	850,650	207,0148	0,014743	425,325
Glicose	178,550	207,0148	0,437055	89,275
NaHCO ₃ x Glicose	105,150	207,0148	0.638228	52,575

$$R^2 = 81,7\%$$

Verifica-se que apenas foi significativa a concentração de bicarbonato, ou seja, influenciou positivamente a produção de ácidos graxos voláteis durante a fermentação (p -valor=0,0147). Tal afirmação é evidenciada no gráfico de pareto (Figura 4.8) e na superfície de resposta (Figura 4.9). A análise de variância para este planejamento é apresentada na Tabela 4.5.

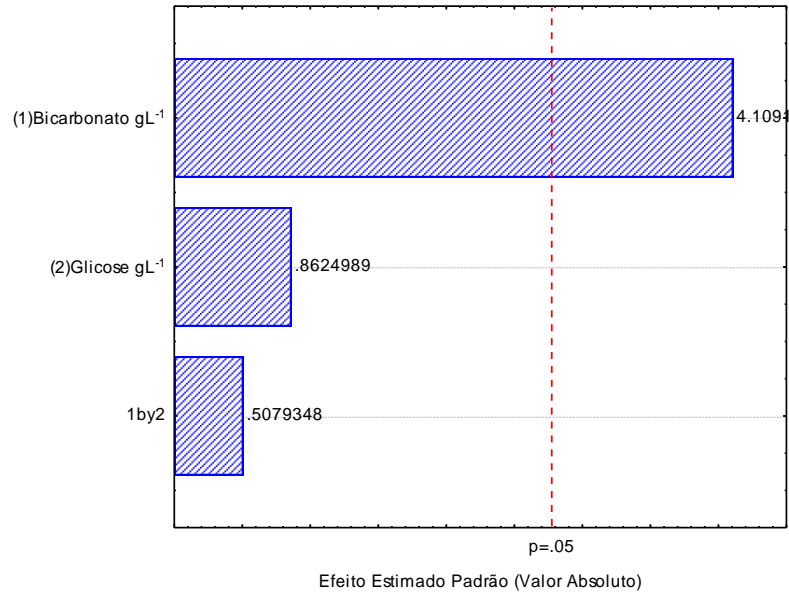


Figura 4.7: Gráfico de pareto do planejamento experimental 2^2 com manipueira.

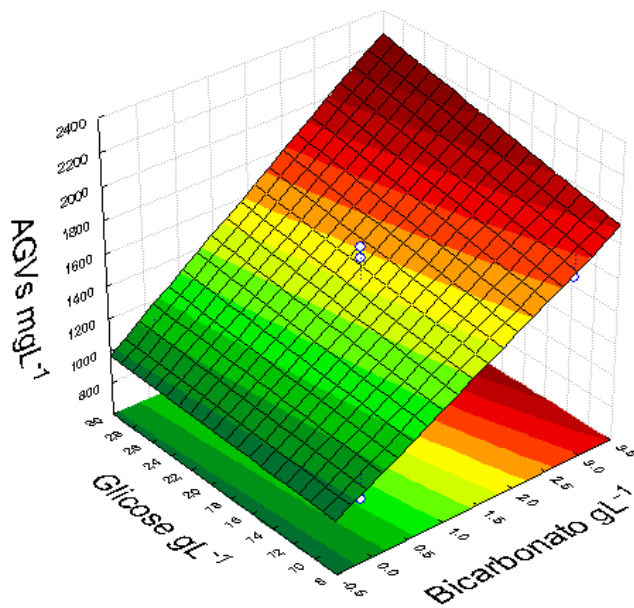


Figura 4.8: Superfície de resposta: AGV (mg.L^{-1}) em função da concentração de glicose e do bicarbonato (g.L^{-1}), para o planejamento 2^2 com manipueira.

Tabela 4.5: ANOVA para o planejamento 2^2 com manipueira ($\alpha=0,05$)

Causas de variação	SQ	GL	MQ	F	p-valor
NaHCO ₃	723605,4	1	723605,4	16,88493	0,014743
Glicose	31880,1	1	31880,1	0,74390	0,437055
NaHCO ₃ x Glicose	11056,5	1	11056,5	0,25800	0,638228
Resíduo	171420,4	4	42855,1		
Total	937962,5	7			

SQ: Soma quadrática;GL: Graus de liberdade;MQ: Média quadrática;F: Estatística F

Acredita-se que na digestão anaeróbia o pH é afetado principalmente pela concentração de bicarbonato, CO e AGV. Na medida em que as bactérias acidogênicas vão produzindo AGV, o pH do sistema vai decrescendo, tornando-o tóxico para as bactérias produtoras de AGVs, de forma que a adição de bicarbonato contribui para o tamponamento do meio e conseqüentemente permite maior produção dos ácidos de interesse.

Leite *et al.* (2003), com o objetivo de produzir ácidos graxos voláteis, por biodigestão anaeróbia, utilizaram a manipueira como substrato e argila expandida como suporte para imobilização da biomassa, e verificaram que as concentrações obtidas dos ácidos butírico e capróico diminuíram com o aumento da alcalinidade no afluente, enquanto as concentrações do ácido propiônico aumentaram. Obtiveram também uma diminuição do tempo de retenção hidráulica de 2 para 0,5h que resultou na diminuição da concentração de ácido butírico, pouco influenciando a produção dos ácidos acético e propiônico. Concluíram ser satisfatória a viabilidade de produção dos ácidos graxos voláteis. Os autores afirmam que atingiram concentrações de ácidos butírico e acético acima de 500mg.L⁻¹, quantidade esta inferior quando comparado ao atingido no presente trabalho.

Giongo (2011) em seus experimentos também concluiu sobre a influencia positiva do bicarbonato de sódio para produção de ácidos graxos voláteis, sendo que as melhores condições foram utilizando a manipueira como meio de cultivo à 30°C com 3 g.L⁻¹ de bicarbonato de sódio, obtendo-se uma concentração de 3400 mg.L⁻¹ de AGV.

4.4.1.2 Tratamento Térmico do Inóculo

Devido a alguns pesquisadores (Braga e Zaiat, 2011 e Hawkes *et al.*, 2002) relatarem em seus estudos sobre a melhora na produção de biohidrogênio via fermentação anaeróbia quando feito o tratamento térmico do inóculo, o que proporciona a morte das bactérias metanogênicas, e sabido que a produção de AGVs é uma etapa que antecede à produção de biohidrogênio, decidiu-se testar a eficácia do tratamento sobre a produção de AGVs.

Realizou-se uma quadruplicata nas mesmas condições que obtve-se a máxima produção dos ácidos com a manipueira, ou seja, a fermentação 4 (Tabela 4.4), tendo como diferença o pré tratamento térmico do inóculo. A média das quadruplicatas pode ser observada na Figura 4.10 juntamente com a média da quadruplicata anterior (Figura 4.7), uma vez que a única diferença entre as duas é o tratamento térmico.

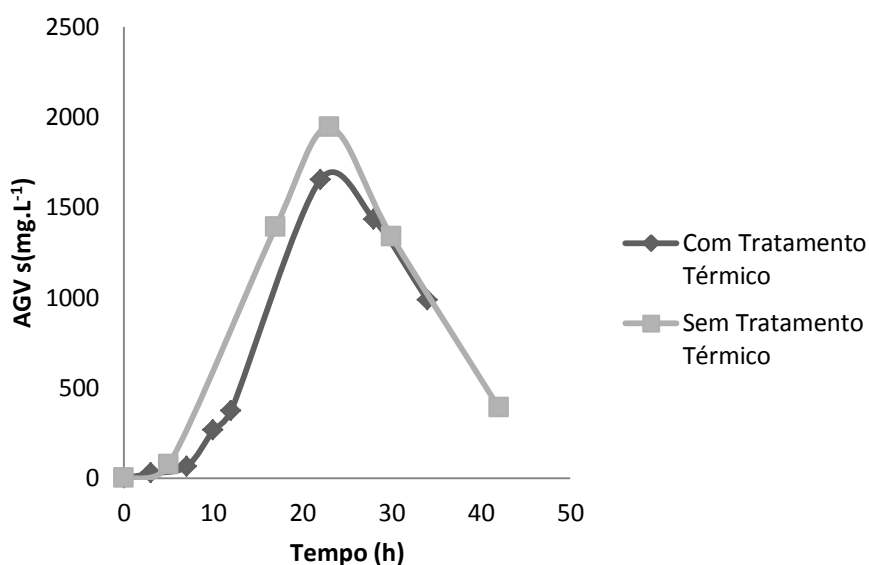


Figura 4.9: Perfis cinéticos de produção de AGV, com e sem tratamento térmico do inóculo.

A máxima produção sem o tratamento térmico do inóculo foi de 1941,42 mg.L⁻¹ de AGVs em 23 h, e a máxima produção com o tratamento térmico do inóculo foi de 1652,31 mg.L⁻¹ em 22 h, ou seja, o tratamento térmico não apresentou melhora na produção dos AGVs.

Braga & Zaiat (2011) avaliaram a produção de biohidrogênio em reatores anaeróbios e termofílicos, onde fizeram o pré tratamento do lodo utilizado como inóculo, e obtiveram picos de produção do gás superiores ao da fermentação mesofílica. Hawkes *et al.* (2002) publicaram seus estudos sobre otimização de produção de biohidrogênio, comparando diversas variáveis relevantes ao processo, dentre elas o inóculo. Os autores afirmam ter obtido um *start-up* mais rápido com o pré-tratamento térmico na produção de biohidrogênio. Aparentemente não há relação entre produção de AGVs e biohidrogênio no que diz respeito ao tratamento térmico do inoculo, ou seja, eliminando as bactérias metanogênicas melhora a produção de biohidrogênio, fato que não se verifica na produção de AGVs.

4.4.1.3 Tratamento Térmico do Meio de Cultivo

Foi realizado o tratamento térmico da manipueira, mantida em autoclave, à 121°C, por 30 min. O experimento foi realizado em triplicata, onde a média foi inserida no gráfico da Figura 4.11 como "Com Tratamento Térmico" juntamente com a média da cinética que apresentou melhores resultados até o presente momento (ensaio 4 do planejamento experimental sem tratamento térmico) para fins comparativos.

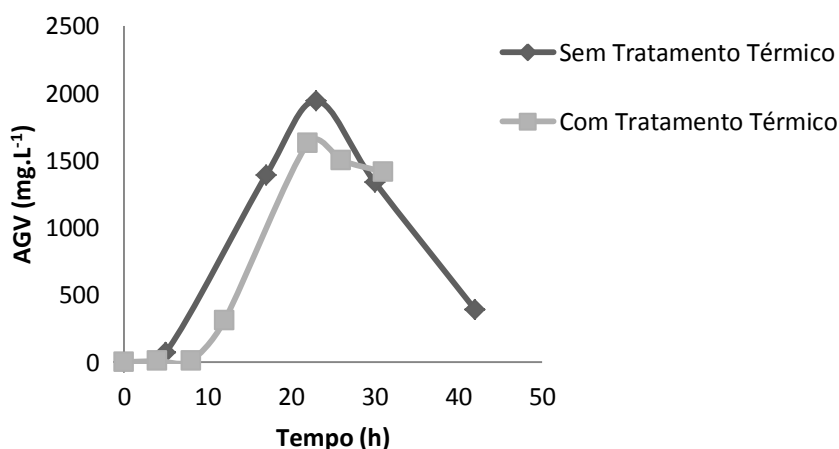


Figura 4.10: Perfis cinéticos de produção de AGV, com e sem tratamento térmico da manipueira.

A máxima produção sem o tratamento térmico da manipueira foi de 1941,42 mg.L⁻¹ de AGVs em 23 h, e a máxima produção com o tratamento térmico da manipueira foi de 1626,57 mg.L⁻¹ em 22 h, ou seja, o tratamento térmico não apresentou melhora na produção de AGVs.

4.4.1.4 Comportamento Cinético do Processo

Após avaliar os efeitos da concentração de glicose e alcalinidade, além dos tratamentos térmicos do inoculo e do meio de cultivo, resolveu-se fazer um estudo cinético do processo considerando os AGVs, biomassa, acidez e açúcar redutor, a fim de se verificar o comportamento destes parâmetros no decorrer da fermentação. O acompanhamento dos parâmetros foi realizado para a fermentação com a configuração que obteve-se os melhores resultados, ou seja, com dados operacionais correspondentes ao ensaio 4 do planejamento experimental (Tabela 3.2), realizada na ausência de luz. Os resultados obtidos encontram-se nas Figuras 4.12 à 4.14.

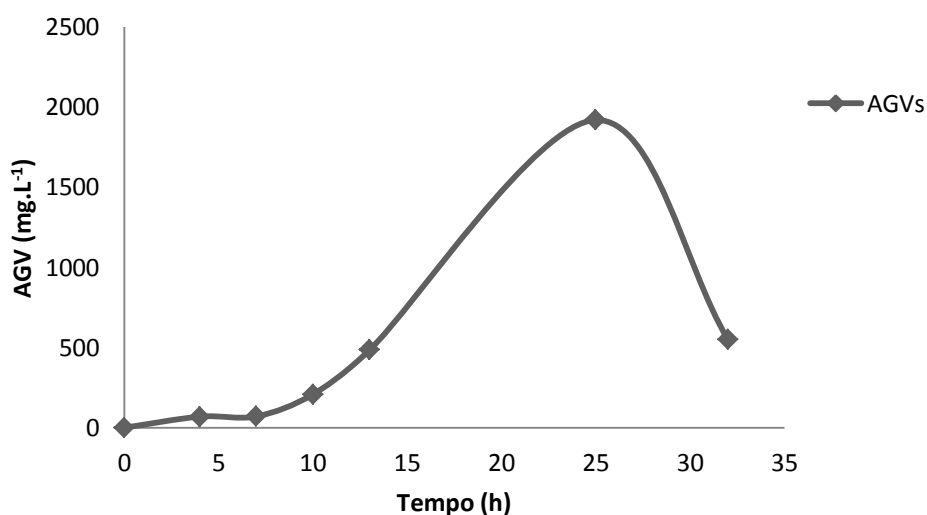


Figura 4.11: Perfil cinético de produção de AGVs.

Quanto aos AGVs, obteve-se o pico de produção de 1919 mg.L⁻¹ de AGVs em 25 h de fermentação, resultado próximo ao obtido na quadruplicata do método (Figura 4.7) onde obteve-se uma média de 1940 mg.L⁻¹. Elefsiniotis *et al.* (2004), obtiveram produção de AGVs de 800 mg.L⁻¹ 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. Por sua vez, Giongo (2011) obteve máxima produção de 3400 mg.L⁻¹ de AGVs, operando à 30°C utilizando como substrato a manipueira, com 3 g.L⁻¹ de bicarbonato de sódio e 2 g.L⁻¹ de glicose em 45 h de fermentação

Ao passo que a alcalinidade foi decrescendo ao longo da fermentação, a acidez foi aumentando, em decorrência da produção de AGVs. Como era de se esperar, Leite *et al.* (2003) em seus experimentos, objetivando a produção de AGVs utilizando a manipueira como substrato e imobilização da biomassa com argila expandida, também constatou a diminuição da alcalinidade, de acordo com a produção de AGVs

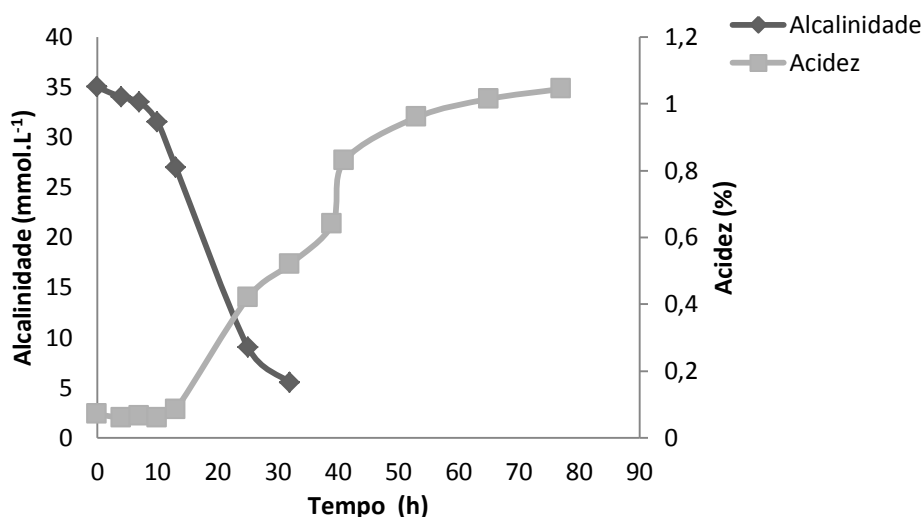


Figura 4.12: Perfis Cinéticos de alcalinidade e acidez ao longo da fermentação com manipueira.

Note-se na Figura 4.14 uma estabilização nos valores de açúcar redutor presente no meio em torno de 29 g.L⁻¹ nas primeiras 10 h, exatamente a quantidade de açúcar contida inicialmente no meio de cultivo, correspondendo a fase de adaptação ao meio dos micro-organismos ao meio de cultivo testado.

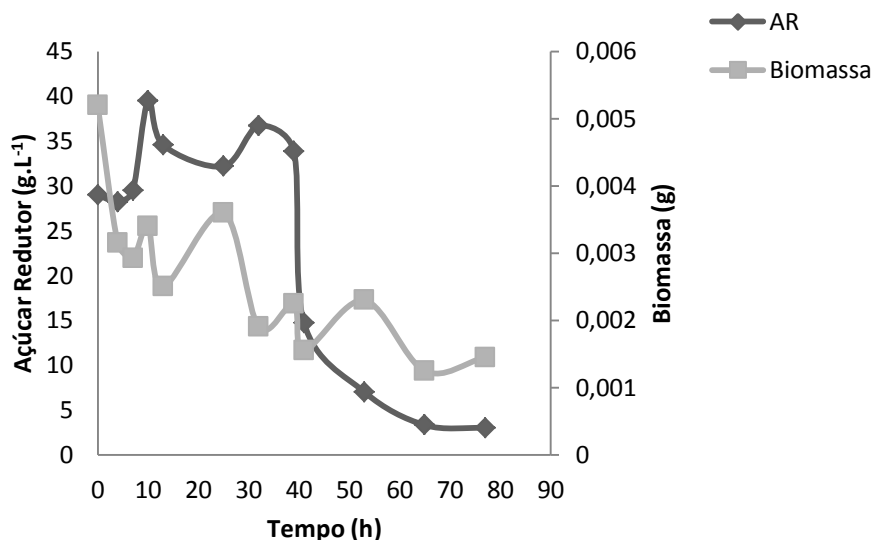


Figura 4.13: Cinética de Açúcar Redutor e Biomassa.

Posteriormente ocorre um acréscimo na quantidade de glicose presente, evidenciando a hidrólise que é a primeira etapa do processo de digestão anaeróbia. A hidrólise consiste na ação de bactérias fermentativas, denominadas hidrolíticas, que, por não serem capazes de assimilar os materiais complexos, como proteínas, polissacarídeos e gorduras, excretam enzimas extracelulares (exoenzimas), que irão atuar na degradação destes compostos até se tornarem compostos mais simples, solúveis em água, podendo atravessar a parede celular das bactérias (LETTINGA, 2007; OLIVEIRA, 2007).

Em seguida, há o consumo da glicose presente no meio, evidenciado pela diminuição dos açúcares redutores.

Wang *et al.* (2005), em trabalho semelhante, utilizaram substrato sintético constituído por sacarose na concentração de 20 g.L⁻¹, pH 5,0, temperatura de 30°C e lodo anaeróbio de resíduo de produção de citrato como inoculo e 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.

Quanto à biomassa, a presença desta no início da fermentação é elevada, e posteriormente, de forma oscilatória, ela decai. Este resultado pode ser devido a morte celular no decorrer da fermentação, como também erro operacional, pois

apesar de os reatores estarem em agitação constante de 80 rpm, notava-se decantação dos sólidos presentes no fundo do reator.

4.4.2. Permeado de Soro de Queijo

Conforme citado no item 3.6.2, foram testados diferentes níveis de concentração de glicose (25, 45 e 75 g.L⁻¹) através da diluição do permeado do soro de queijo que originalmente possui a concentração de 75 g.L⁻¹ de glicose. Foi testado também diferentes níveis de concentração de alcalinidade com a adição de bicarbonato (0, 0,44, 1,5, 2,56 e 3 g.L⁻¹) onde essas quantidades de bicarbonato foram adicionadas ao permeado, cujo já continha uma alcalinidade de 7,7 g.L⁻¹.

O permeado de soro de queijo possui 75 g.L⁻¹ de glicose, o que é uma concentração elevada, dessa forma optou-se diluir o permeado para a concentração de 45 g.L⁻¹ a fim de se verificar a produção de ácidos graxos voláteis (Figura 4.15). A alcalinidade foi fixada em 10,26 g.L⁻¹ em ambos os ensaios.

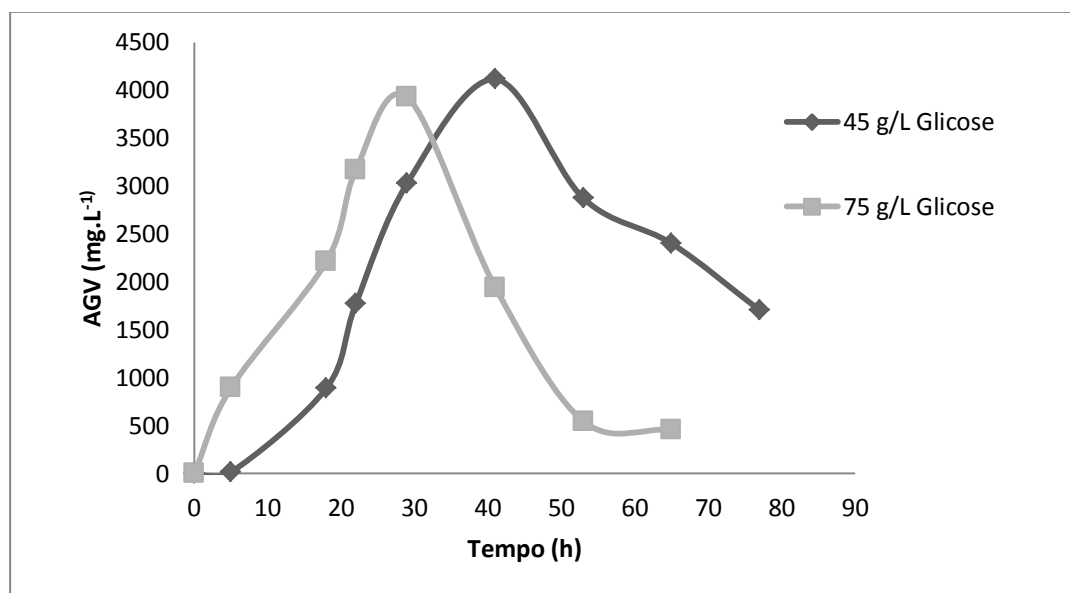


Figura 4.14: Perfis cinéticos de AGVs utilizando o permeado de soro de queijo como substrato, e concentrações de glicose de 45 g.L⁻¹ (diluído) e 75 g.L⁻¹ (puro) e 10,26 g.L⁻¹ de alcalinidade

Nota-se que os picos de AGVs foram próximos apesar da grande variação de glicose no meio. Para a fermentação com a concentração de 45 g.L^{-1} houve um pico de $4115,16 \text{ mg.L}^{-1}$ de AGVs em 41h, e para a fermentação com a concentração de 75 g.L^{-1} de glicose houve um pico de $3928,54 \text{ mg.L}^{-1}$ de AGVs em 29h. A fermentação com menor concentração de glicose apresentou um pico 4,8% maior de produção de AGV, podendo ter havido inibição por substrato devido à alta concentração de glicose presente no efluente bruto. Segundo Ince *et al.* (1995) citado por STEIL (2001), a concentração de substrato não deve limitar a atividade metanogênica seja por falta de alimento, ou seja por inibição quando em concentrações excessivas.

Posteriormente foram testadas para a concentração de 45 g.L^{-1} de glicose no permeado, duas concentrações de alcalinidade, $8,14$ e $10,26 \text{ g.L}^{-1}$, obtidas pela adição de $0,44$ e $2,56 \text{ g.L}^{-1}$ de bicarbonato respectivamente (Figura 4.16), notando-se maior produção de AGVs para a fermentação que possuía maior concentração de alcalinidade.

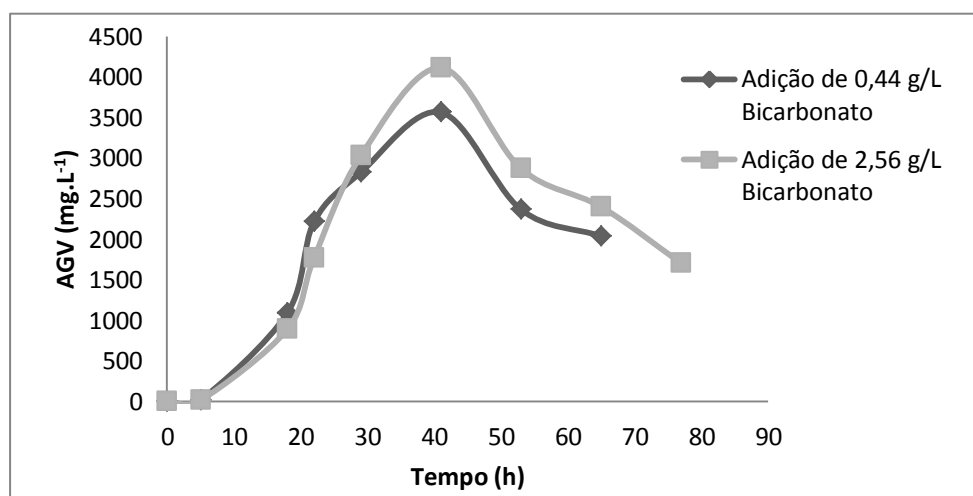


Figura 4.15: Perfis cinéticos de AGVs utilizando o permeado de soro de queijo como substrato, concentrações adicionadas de bicarbonato de sódio de $0,44 \text{ g.L}^{-1}$ e $2,56 \text{ g.L}^{-1}$ e 45 g.L^{-1} de glicose

O pico para a concentração de $8,14 \text{ g.L}^{-1}$ de alcalinidade foi de $3566,75 \text{ mg.L}^{-1}$ de AGV em 41h. O pico para a concentração de $10,26 \text{ g.L}^{-1}$ foi de $4115,16$ de AGVs em 41 h. Dessa forma, obteve-se um acréscimo de $15,4 \%$ na produção de AGVs.

O efeito positivo do bicarbonato de sódio (alcalinidade) na produção de AGVs foi evidenciado também para as fermentações utilizando manipueira como substrato, como já mencionado anteriormente. Norton *et al.* (1994) em seus estudos utilizaram uma base fraca, hidróxido de amônio, para tamponamento do meio e controle de pH, de forma a obter a produção de ácido láctico, utilizando o permeado de soro de queijo como substrato para a fermentação e *Lactobacillus helveticus* imobilizado, e obtiveram estabilidade do meio em relação ao pH, atingindo concentração de ácido láctico considerada satisfatória.

Para o teste das concentrações de glicose, os picos foram bem próximos (Figura 4.15). Assim, decidiu-se testar as concentrações de bicarbonato com o efluente bruto, como recebido da empresa, ou seja, 75 g.L^{-1} de glicose.

Na Figura 4.17, estão os resultados das fermentações utilizando o permeado na concentração de origem, 75 g.L^{-1} , variando a concentração adicionada de bicarbonato de sódio de 0 a 3 g.L^{-1}

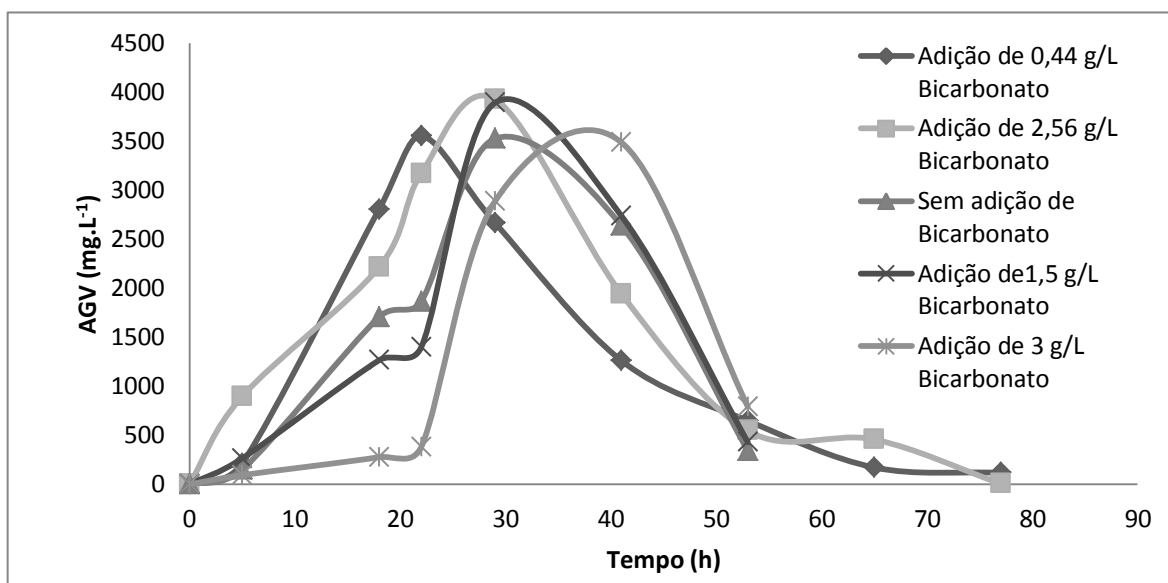


Figura 4.16: Perfis cinéticos de AGVs utilizando o permeado de soro de queijo como substrato, diferentes concentrações de bicarbonato de sódio e 75 g.L^{-1} de glicose.

Nota-se que sem a adição de bicarbonato de sódio (alcalinidade original do permeado de $7,7 \text{ g.L}^{-1}$) obteve-se a menor concentração de AGV, de $3526,27 \text{ mg.L}^{-1}$ em 29 h. Com as adições das concentrações de $0,44 \text{ g.L}^{-1}$ e 3 g.L^{-1} de bicarbonato, resultando em alcalinidades de $8,14$ e $10,7 \text{ g.L}^{-1}$ respectivamente,

atingiram níveis bem próximos entre si, e superiores em relação a concentração de $7,7 \text{ g.L}^{-1}$, sendo o pico de produção de 3554 mg.L^{-1} de AGVs em 22 h para a concentração de $8,14 \text{ g.L}^{-1}$ de alcalinidade e pico de $3588,32 \text{ mg.L}^{-1}$ de AGVs em 41h para $10,7 \text{ g.L}^{-1}$. Nota-se que o para concentrações maiores de bicarbonato de sódio, o pico de produção de AGVs é retardado, acredita-se que seja devido ao tamponamento.

Os maiores picos de produção de AGV ocorreram nas adições de concentrações de $1,5$ e $2,56 \text{ g.L}^{-1}$ de bicarbonato de sódio, resultando em uma alcalinidade de $9,2$ e $10,26 \text{ g.L}^{-1}$ de alcalinidade. O pico de produção para a concentração de $9,2 \text{ g.L}^{-1}$ de alcalinidade foi de $3891,52 \text{ mg.L}^{-1}$ de AGVs em 29h e o pico de produção para a concentração de $10,26 \text{ g.L}^{-1}$ de alcalinidade foi de $3928,54 \text{ mg.L}^{-1}$ de AGVs em 29h, sendo válido ressaltar que a concentração de glicose utilizada foi de 75 g.L^{-1} . Dessa forma, é preferível efetuar os experimentos com a adição de concentração de $1,5 \text{ g.L}^{-1}$ de bicarbonato, uma vez que os dois picos foram bem próximos tendo havido pouca diferença na produção de AGV com o acréscimo de bicarbonato de sódio.

Ao observar a Figura 4.15, a diminuição da concentração de glicose no permeado do soro de queijo de 75 g.L^{-1} para 45 g.L^{-1} resultou em um pequeno acréscimo na produção de AGVs. Assim, foi testada uma nova diluição do permeado do soro de queijo, atingindo-se a concentração de 25 g.L^{-1} de glicose, e fixando-se a concentração alcalinidade de $9,2 \text{ g.L}^{-1}$ (adição de $1,5 \text{ g.L}^{-1}$ de bicarbonato de sódio), os resultados obtidos estão na Figura 4.18.

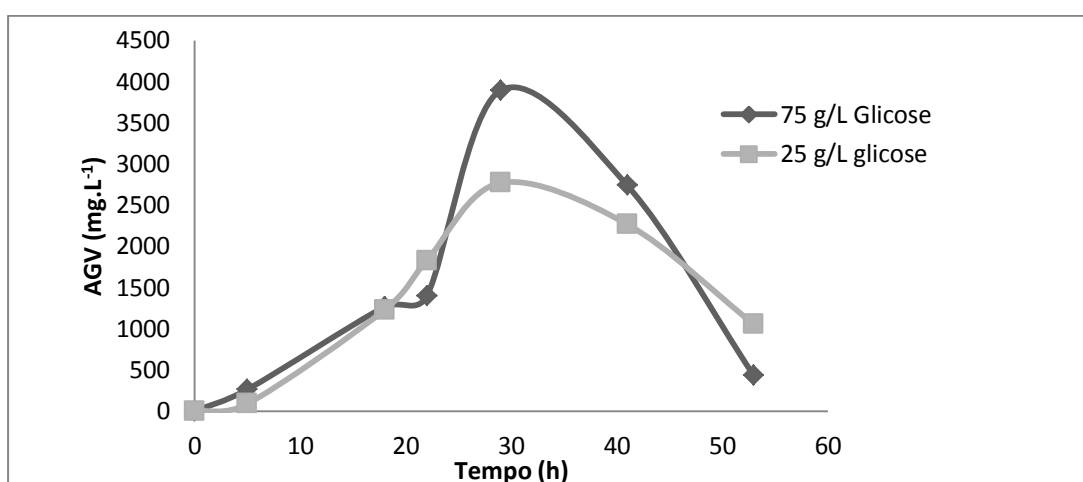


Figura 4.17: Perfis cinéticos de AGVs utilizando o permeado de soro de queijo como substrato, concentrações de glicose de 25 e 75 g.L^{-1} e $9,2 \text{ g.L}^{-1}$ de alcalinidade.

Nota-se que, embora a diminuição da concentração de 75 g.L^{-1} de glicose para 45 g.L^{-1} tenha sido positiva (Figura 4.15), a diminuição de 75 g.L^{-1} de glicose para 25 g.L^{-1} não foi. Para a maior concentração de açúcar, obteve-se um pico de $3891,58 \text{ mg.L}^{-1}$ em 29 h, e para a menor concentração, o pico de produção foi de $2769,47 \text{ mg.L}^{-1}$, também em 29 h, chegando a ser menor que o pico de concentração obtido pela fermentação feita com 75 g.L^{-1} de glicose e sem adição de bicarbonato ($3526,27 \text{ mg.L}^{-1}$ de AGVs em 29 h).

Por fim, decidiu-se testar a reprodutibilidade dos experimentos, fazendo uma triplicata da fermentação cujas condições de operação proporcionaram maior pico de produção de AGVs. Tais condições de operação foram 75 g.L^{-1} de glicose e $9,2 \text{ g.L}^{-1}$ de alcalinidade (adição de $1,5 \text{ g.L}^{-1}$ de bicarbonato de sódio).

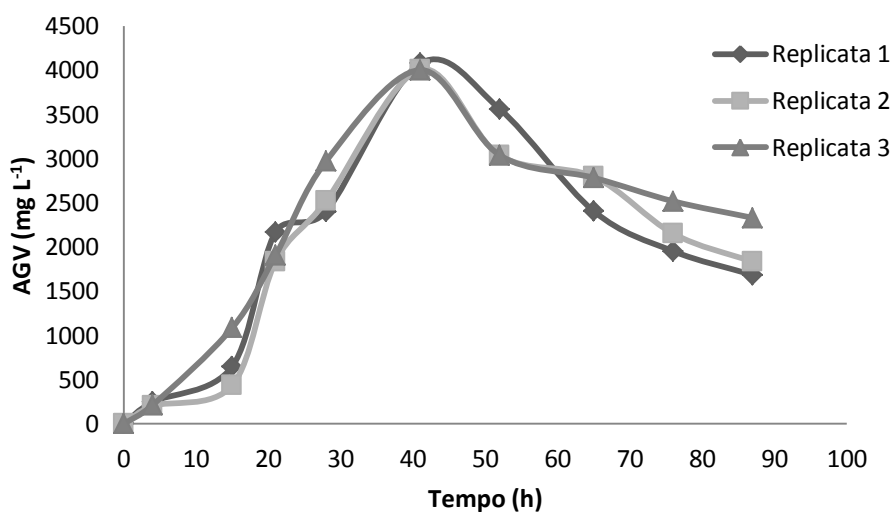


Figura 4.18: Triplicata de perfis cinéticos de AGVs utilizando o permeado de soro de queijo como substrato, 75 g.L^{-1} de glicose e $9,2 \text{ g.L}^{-1}$ de alcalinidade.

Nota-se que, os picos foram próximos. Para a replicata 1, o pico de produção foi de $4074,73 \text{ mg.L}^{-1}$ de AGVs, para a replicata 2, o pico de produção foi de 4006 mg.L^{-1} de AGVs, e para a replicata 3, o pico de produção foi de $4001,4 \text{ mg.L}^{-1}$ de AGVs, todos em 41h, sendo a média aritmética $4027,38 \text{ mg.L}^{-1}$ de AGVs e o desvio padrão foi de 33,5.

Assim, o maior pico atingido com a utilização do permeado foi de 4115,16 mg.L⁻¹ de AGVs, com 45 g.L⁻¹ de glicose e 10,26 g.L⁻¹ de alcalinidade (Figura 4.15) embora este valor seja muito próximo com o atingido usando o efluente bruto (75g.L⁻¹ de glicose) e com menor concentração de alcalinidade (9,2 g.L⁻¹).

O maior pico de AGVs utilizando o permeado de soro de queijo como meio de cultivo (4115,16 mg.L⁻¹) foi superior em 112% ao maior maior pico de AGVs utilizando a manipueira como meio de cultivo (1941,4 mg.L⁻¹) evidenciando o uso do permeado de soro de queijo na biodigestão anaeróbica como uma boa alternativa de realocação do resíduo e agregação de valor ao produzir AGVs.

5. CONCLUSÕES

Nos experimentos realizados com o intuito de avaliar o melhor resíduo como substrato para a produção de AGVs, destacam-se a manipueira e o permeado do soro de queijo. Ao se testar a possível substituição do bagaço da mandioca hidrolisado como fonte de açúcar ao invés da glicose, a eficiência da produção de AGV não foi notória, atrasando o pico de produção e tornando-se pouco atrativo a utilização do bagaço para estes fins. Os valores obtidos foram: 794,75 mg.L⁻¹ de acúmulo de AGV em 23 h utilizando a manipueira, 1986,05 mg.L⁻¹ de acúmulo de AGV em 35 h utilizando o permeado, 774,73 mg.L⁻¹ de acúmulo de AGV em 23 h utilizando o meio padrão e 288,8 mg.L⁻¹ de acúmulo de AGV em 35 h utilizando o hidrolisado amiláceo.

Obteve-se elevação no acúmulo de AGV quando os experimentos foram realizados na ausência de luz, sendo os demais parâmetros mantidos. O acréscimo no acúmulo foi de 38% para a fermentação utilizando a manipueira e 20% utilizando o permeado do soro do queijo.

Foi evidente o aumento na produção de AGV com a utilização da manipueira, após estudados os níveis de concentração de glicose e bicarbonato de sódio do planejamento experimental. O máximo acúmulo foi de 1941,4 mg.L⁻¹ de AGV em 23 h, para uma concentração de glicose e bicarbonato de sódio equivalente a 29 g.L⁻¹ e 3,21 g.L⁻¹ respectivamente, representando um acréscimo de 77,3% quando comparado a fermentação com a manipueira antes de se efetuar os experimentos do planejamento experimental. Ainda para a manipueira, os testes realizados de tratamento térmico para o inóculo, e tratamento térmico para a manipueira não foram satisfatórios, depois os mesmos não contribuíram para o aumento da produção dos AGVs.

Para os testes realizados utilizando o permeado de soro de queijo como substrato, concluiu-se que, dentre as concentrações de alcalinidade e glicose, as condições de operação que apresentaram melhor produção de AGVs foram 45 g.L⁻¹ de glicose e 10,26 g.L⁻¹ de alcalinidade (4115,16 mg.L⁻¹ de AGVs em 41 h), embora o pico de AGV nesta concentração de açúcar tenha ficado muito próximo ao pico de AGV para 75 g.L⁻¹ (3928,54 mg.L⁻¹). As concentrações adicionadas de

bicarbonato de sódio mais satisfatórias dentre as testadas foram as de 1,5 e 2,56g.L⁻¹ resultando em concentrações de 9,2 e 10,26 g.L⁻¹ de alcalinidade para a concentração fixa de 75 g.L⁻¹ de glicose. O pico de produção para a concentração de 9,2 g.L⁻¹ de alcalinidade foi de 3891,52 mg.L⁻¹ de AGVs em 29 h e o pico de produção para a concentração de 10,26 g.L⁻¹ de alcalinidade foi de 3928,54mg.L⁻¹ de AGVs em 29 h. Dessa forma, é preferível se operar na concentração de 9,2 g.L⁻¹, uma vez que os dois picos foram bem próximos tendo havido pouca diferença na produção de AGV com o acréscimo de bicarbonato de sódio.

Os picos de concentrações de AGVs atingidos foram satisfatórios, evidenciando o uso do permeado de soro de queijo e da manipueira na biodigestão anaeróbica como uma boa alternativa de realocação dos resíduos e agregação de valor ao produzir AGVs

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABRAHÃO, J. J dos S. **Bagaço da mandioca gerado em fecularias alimenta bovinos de corte**. Revista ABAM, ano III, nº 11, 2005. Disponível em: <<http://www.abam.com.br/revista/revista11/iapar.php>>. Acesso em: 12/01/12
- ALVES, R. L. **D Projeto da Rede de Captação Logística do Soro de Queijo Produzido no Estado de Minas Gerais**. Minas Gerais: Departamento de Engenharia Elétrica e Produção. Universidade Federal de Viçosa, 2005. 33 p. Dissertação (Conclusão de curso).
- ANTUNES, A. J. **Funcionalidade de Proteínas do Soro de Leite Bovino**. Barueri: Manole, 2003.
- APHA, AWAA and WEF. **Standard Methods for Examination of Water and Wastewater.**, American Publications Health Association. 19 th ed., Washington D. C.,1998.
- AQUINO, S. F., CHERNICHARO, C. A. L. **Acúmulo de ácidos graxos voláteis (AGVs) em reatores anaeróbios sob estresse: causas e estratégias de controle**. Engenharia Sanitária Ambiental. V.10. n. 2, p 152-161. 2005
- ARAGÃO, M. do L., & PONTE, J. J. **O uso da manipueira – extrato líquido das raízes de mandioca como adubo foliar**. CiênciaAgronômica, v. 26, n. 1/2 p.45- 48, 1995.
- ARGUN, H.; KARGI, F.; KAPDAN, I. 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.
- BALDASSO, C. **Concentração, Purificação e Fracionamento das Proteínas do Soro Lácteo através da Tecnologia de Separação por Membranas**. Porto Alegre: Escola de Engenharia. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2008. 179 p. Dissertação (Mestrado).

- BARANA, A. C. **Avaliação de tratamento de manipueira em biodigestores de fase acidogênica e metanogênica.** São Paulo, faculdade de ciências agrônomas, Universidade estadual paulista, 2000. 95p. Tese (Doutorado).
- 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.
- BELLAVER C. **Produção animal e qualidade de vida em sociedades em transição.** 1ª Conferência Internacional Virtual sobre Qualidade de Carne Suína, Santa Catarina, 2000. p 235-248.
- BRAGA, A. F. M.; ZAIAT, M. **Avaliação da produção de hidrogênio em reatores anaeróbios termofílicos.** Produção de bioenergia no tratamento de águas residuárias e adequação ambiental dos efluentes e resíduos gerados, Anais do I seminário do projeto temático, USP universidade de São Paulo, 2011.
- BRASIL. **Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística – IBGE.** Comunicação social – Brasil 2007. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/home/presidencia/noticias/noticia_visualiza.php?id_noticia=998>. Acesso em 11/01/12
- BRASIL. **Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística – IBGE.** Comunicação social – Brasil 2010. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/home/presidencia/noticias/noticia_visualiza.php?id_noticia=1798&id_pagina=1>. Acesso em 11/01/12
- BRASIL. **Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística – IBGE.** Tabela de produção de leite e participações relativas e acumuladas no total da produção. – Brasil 2010. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/economia/ppm/2010/tabelas_pdf/tab23.pdf>. Acesso em 3/07/12
- BRASIL. **Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística – IBGE.** Produção da Pecuária Municipal – Brasil 2007. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/economia/ppm/2010/ppm2010.pdf>>. Acesso em 4/07/12

- BRASIL. **Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística – IBGE**. Tabela de composição nutricional dos alimentos consumidos no Brasil. – Brasil 2009. Disponível em: http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/condicaoodevida/pof/2008_2009_composicao_nutricional/pofcomposicao.pdf. Acesso em 12/06/12
- BRASIL. **Associação Brasileira dos Criadores de Suínos - ABCS**. Relatório do Registro genealógico e provas zootécnicas de suínos, 2011.
- BRASIL. Instrução Normativa Nº 68 de 12 de dezembro de 2006. **Métodos analíticos oficiais físico-químicos para controle de leite e produtos lácteos**. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento, DF. Disponível em <http://www.agricultura.gov.br>. Acesso em 17/07/2012.
- BRAUN, R., DROSG, B., BOCHMANN, G., WEIF, S., KIRCHMAYR, R. **Microbes at work** Alemanha, Berlin:Springer-verlag, 2010. Capítulo 2: Recent developments in bio-energy recovery through fermentation. 1stEdition. V. 8 p 20-25.
- BRONSTEIN, V.; ALEGRE, R. M. **Estudos dos parâmetros da ultrafiltração de permeado de soro de queijo fermentado por *Lactococcus lactis* subsp. *lactis***. Ciência e Tecnologia de Alimentos.V.18, n. 1, 1998.
- 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.
- CAMPOS, J. R. **Alternativas para tratamentos de esgotos: pré-tratamento de águas de abastecimento**. Americana: Consórcio Intermunicipal das Bacias dos rios Piracicaba e Capivari, 112p. 1994
- CAPPELLETTI, B. M. **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, 2009. Dissertação (Mestrado).
- CEREDA, M.P. **Resíduos da Industrialização da Mandioca no Brasil – Utilização e Tratamento**. São Paulo: Paulicéia, 1994.

- CEREDA, M.P. **Caracterização, usos e tratamentos de resíduos da industrialização da mandioca**. Botucatu: centro de raízes tropicais – universidade estadual paulista, 1996, 56p
- CEREDA, M. P.; MATTOS, M.C.Y. **Linamarin: The Toxic Compound Of Cassava**. Journal of Venomous Animals and Toxins, Botucatu,v.2, n.1,1996. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0104-79301996000100002&lng=en&nrm=iso>. Acesso: 19/01/2012.
- CEREDA, M. P. **Manejo, uso e tratamento de subprodutos da industrialização da mandioca**. São Paulo: Fundação Cargill. 2001. Capítulo 1: Caracterização dos subprodutos da indústria da mandioca. 4V, p 13-37.
- CEREDA, M. P. **Manejo, uso e tratamento de subprodutos da industrialização da mandioca**. São Paulo:Fundação Cargill, 2001.Capitulo 24: Valorização de subprodutos como forma de reduzir custos de produção. 2000, 4V p 304-320.
- CHERNICHARO, C.A.L. **Princípios do tratamento biológico de águas residuárias**. Vol. 5. Reatores anaeróbios. Belo Horizonte, Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental - UFMG, 1997.
- COOKE ,R. D. **Enzymatic assay for determining the cyanide content of cassava and cassava products**. Cali: Cassava Information Center - CIAT, 1979: 1-14. In: CEREDA, M. P.; MATTOS, M.C.Y. Linamarin: The Toxic Compound Of Cassava. Journal of Venomous Animals and Toxins, Botucatu, v.2, n.1, 1996. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0104-79301996000100002&lng=en&nrm=iso>. Acesso: 19/01/2012.
- CORBELLINI, P.A. **Estudos preliminares sobre a digestão anaeróbia em duas fases com substrato sintético à base de glicose**. Revista de Bio-Engenharia Sanitária e Ambiental, III, n.1, p.11-21, 1994.
- CORREIA, G. T.; DEL BIANCHI, V. 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, S. G. V. A. de O. **Estudo da produção de metabólitos por *Pseudomonasa e ruginosa*: Ramnolipídios e polihidroxicanoatos.** Rio de Janeiro, 2010. Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Tese (Doutorado). Disponível em: <http://www.athena.biblioteca.unesp.br/exlibris/bd/brc/33004137041P2/2010/costa_sgvaio_dr_rcla.pdf> Acesso: 23/01/2012.
- FERNANDES JÚNIOR, A. **Manejo, uso e tratamento de subprodutos da industrialização da mandioca.** São Paulo: Fundação Cargill, 2001. Capítulo 10: Tratamentos físicos e Biológicos da manipueira. V. 4 p 138-150.
- FERNANDÉZ-MORALES, F. J.; VILLASEÑOR, 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. n.35 p 10927-10933, 2010.
- FORESTI, E.; FLORÊNCIO, L.; VAN HAANDEL, A.; ZAIAT, M.; CAVALCANTI, P. F. F. **Fundamentos do tratamento anaeróbio.** Rio de Janeiro: ABES, 1999. Capítulo. 2: Tratamento de esgotos sanitários por processo anaeróbio e disposição controlada no solo, p. 29-52.
- GIONGO, C. **Produção de ácidos graxos voláteis por biodigestão anaeróbia da manipueira.** Paraná, Centro de engenharia e ciências exatas, Universidade Estadual do Oeste do Paraná, 2011. 66p. Dissertação (mestrado).
- GODOY, A. M. G.; SANTOS, R. J. C. **Gestão dos efluentes líquidos das indústrias de farinha de mandioca de Araruna – PR.** Revista Produto & produção, v.7, n 3, p 37-49, 2004.
- GONZAGA, A. D.; GARCIA, M. V. B.; SOUZA, S. G. A.; PY-DANINEL, V.; CORREA, R, S.; RIBEIRO, J. D. **Toxicidade de manipueira de mandioca (*manihot esculenta crantz*) e erva de rato (*Palicourea marcgravii* St Hill) a adultos de *Toxoptera citricida* Kirkaldy (homóptera: *Aphididae*).** 2008 ACTA AMAZONICA vol 38 p 101-106

- HAWKES, F. R.; DINSDALE, R.; HAWKES, D. L.; HUSSY, I. **Sustainable fermentative hydrogen production: challenges for process optimization.** International Journal of Hydrogen Energy 27. 2002
- HWANG, S. H.; HANSEN, C. L.; STEVENS, D. K. **Biokinetics oh an Upflow Anaerobic Sludge Blanket Reactor Treating Whey Permeate.** Inglaterra: Elsevir Science Publishers Ltd. Bioresource Technology, n41 p 223-230. 1992.
- INCE, O.; ANDERSON, G. K.; KASAPGIL, B. **Control of organic loading rate using the specific methanogenic activity test during star-up of an anaerobic digestion system.** Water Research, v. 29, n. 1, p. 349-55, 1995.
- INOUE, K. R. A. **Produção de biogás, caracterização e aproveitamento agrícola do biofertilizante obtido na digestão da manipueira.** Minas Gerais. Universidade Federal de Viçosa, 2008. 65p. 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.
- KUCZMAN, O. **Tratamento Anaeróbio de efluente de fecularia em reator horizontal de uma fase.** Paraná: Universidade estadual do oeste do Paraná, 2007. Dissertação (mestrado).
- KRUEGER, C. L. **Seleção de linhagens de *bacillus* produtoras de polihidroxicanoatos a partir de resíduo.** Santa Catarina, Engenharia de alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, 2009. 98p Tese (mestrado).
- LAMAISON, F. do C. **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, 2009, Dissertação (Mestrado).
- LEITE, J. A. C. **Produção de ácidos graxos voláteis por fermentação acidogenica em reator anaeróbio de leito fixo e extração em resina de**

- troca inônica e com solvente orgânico.** São Paulo: Escola de engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo. 2005 103p. tese (doutorado).
- 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.eng.ufsc.br/eventos/sinaferm/trabalhos_completos/t121.doc, Acesso: 29/04/2012
- LEITE, J. L. B. **Comércio Internacional de Lácteos. Capítulo 6: O comércio internacional de soro de leite.** Editora Templo, 2ª Ed. Juiz de Fora: Embrapa Gado de Leite, 2008. 350p. p 119-129
- LEONEL, M. **Manejo, uso e tratamento de subprodutos da industrialização da mandioca.** São Paulo: Fundação Cargill, 2001. Capítulo 18: Uso dos subprodutos da industrialização da mandioca na alimentação animal., 4V p 229-239
- LEONEL, M.; CEREDA, M. P. **Manipueira como substrato na biossíntese de ácido cítrico por *Aspergillus niger*.** *Scientia Agricola*, Piracicaba, vol. 52, nº 2, 1995.
- LETTINGA, G. **Handbook biological waste water treatment.** Inglaterra, Londres: IWA Publishing, 2007. Capítulo 8: Sludge treatment. 1st Edition. 377-380.
- LEVIN, D. B.; PITT, L.; LOVE, M. **Biohydrogen production: prospects and limitations to practical application.** *International Journal of Hydrogen Energy*. v.29, p. 173-185, 2004.
- LOSS, R. A. **Avaliação da Produção de Hidrogênio por Consórcio Bacteriano Foto heterotrófico.** Santa Catarina: Engenharia de Alimentos. Universidade Federal de Santa Catarina, 2011. 101 p. Dissertação (Mestrado).
- MAHAN, K. L. **Alimentos, Nutrição & Dietoterapia**, 9ª edição, São Paulo: Roca, 1998

- MATSUI, N. K.; LAROTONDA, F. D. S.; LUIZ, D. B.; PIRES, A. T. N.; LAURINDO, J. B. **Utilização do Resíduo da mandioca na produção de bandejas descartáveis.** Revista Ceres, V: L, n 292, p 727-736. 2003
- 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.** *Enzyme and Microbial Technology.* v. 24, p. 506-515, 2007.
- NORTON, S.; LACROIX, C.; VUILLEMARD, J. C. **Kinetic Study oh Continuous Whey Permeate Fermentation by Immobilized *Lactobacillus helveticus* for Latic Acid Production.** Canadá: Butterworth-Heinermann. *Enzyme Microb. Technol.* Vol 16(1994)
- OLIVEIRA, K. R. F. **Processos ecotecnológicos no tratamento de efluentes líquidos de fecularia.** Mato Grosso do Sul, Tecnologias Ambientais, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, 2007. 97p Tese (mestrado).
- OLIVEIRA, M. C. L.; MOURA, J. P.; BENEDEL, H. D. **Caracterização química e Avaliação sensorial de Bebida Hidroeletrolítica Fermentada Obtida a Partir de Permeado de Leite Tipo C.** Revista Analítica, n. 23, p 78-83. 2006
- OLIVEIRA, P. A. V.; NUNES, M. L. **A Sustentabilidade Ambiental da Suinocultura.** In: Seminário Internacional Sobre Produção, Mercado e Qualidade da Carne de Suínos. Santa Catarina, 2002.
- OLIVEIRA, S.S. **Metabolismo da linamarina em reator de digestão anaeróbia com eparação de fases.** Botucatu, 2003. 88p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências agrônômicas, Universidade Estadual Paulista.
- ORRICO JUNIOR, M. A. P.; ORRICO, A. C. A.; LUCAS JUNIOR, J. **Biodigestão anaeróbia de dejetos de suínos com e sem separação da fração sólida em diferentes tempos de retenção hidráulica.** Eng. Agríc. [online]. 2009, vol.29, n.3, pp. 474-482. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S0100-69162009000300014>> acesso: 19/06/2012

- PANICHNUMSIN, P.; NOPHARATANA, A.; AHRING, B.; CHAIPRASERT, P. **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, N. S. **Avaliação de diferentes fontes de nitrogênio e sacarose na produção de ácido cítrico por *Aspergillus niger* usando manipueira como substrato.** Paraná, Universidade Estadual do Oeste do Paraná, 2010, 67p. Dissertação (Mestrado).
- PINTO, C. P. **Tecnologia da digestão anaeróbia da vinhaça e desenvolvimento sustentável.** São Paulo, Faculdade de engenharia mecânica, Universidade Estadual de Campinas, 1999. 147p. Tese (mestrado).
- PRADO, M. R.; PAWLOWSKY, U. **Alternativas para o tratamento de resíduos líquidos em feculárias.** Revista Brasil Alimentos, n 22, p 30-3, 2003.
- RAMOS, P. R., PRATES, E. R., FONTANELLI, R. S., BARCELLOS, J. O. J., BONELLI, I. B. **Uso do bagaço de mandioca em substituição ao milho no concentrado para bovinos em crescimento.** Revista Bras.Zootec.Vol 29, n 1. 2000.
- RAPPORT, J., ZHANG, R., JENKINS, B. M., WILLIAMS, R. B. **Current anaerobic digestion Technologies used for treatment of municipal organic solid waste.** Department of biological and agricultural engineering, university of California. 75p. 2008
- RODRIGUES, R. C. **Condições de cultura para a produção de poli (3-hidroxibutirato) por *Ralstonia eutropha* a partir de resíduos de indústrias de alimentos.** Florianópolis: Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, 2005. 90 p. Dissertação (Mestrado).
- SAITO, I. M. **Produção de hidrolisados e fibras a partir de resíduo da industrialização da mandioca submetido a pré-tratamento hidrotérmico.** São Paulo, Faculdade de ciências agrônomas, Universidade Estadual Paulista, 2005. 97p Tese (Doutorado)

- SANTOS, J. H. T. **Avaliação de um sistema de aquecimento do substrato na digestão anaeróbia de dejetos de suínos.** Minas gerais: Engenharia Agrícola, Universidade Federal de Viçosa, 2004. 66p. Tese (mestrado).
- SANTOS, M. H. V dos., ARAÚJO, A. C. de., SANTOS, D. M. R dos., LIMA, N. da S., LIMA, C. L. C., SANTIAGO, A. D. **Uso da manipueira como fonte de potássio na cultura da alface (*Lactuca sativa* L.) cultivada em casa-de-vegetação.** Acta Sci., Agron. v.32, n.4, 2010 Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1807-86212010000400023&lng=en&nrm=iso>. Acesso: 24/01/2012
- SCHONS, A.; STRECK, N. A.; STORCK, L.; BURIOL, G. A.; JUNIOR ZANON, A.; PINHEIRO, D. G.; KRAULICH, B. **Arranjos de plantas de mandiocas e milho em cultivo solteiro e consorciado: crescimento, desenvolvimento e produtividade.** Revista Bragantia, V.68, n1, p. 155-167, 2009
- SERPA, L.; PRIAMO, W. L.; REGINATTO, V. **Destino Ambientalmente Correto e Rejeitos de Queijaria e Análise de Viabilidade Econômica.** 2nd International workshop advances in cleaner production. São Paulo, 2009.
- SILVA, F. F., BERTONHA, A., FREITAS, P. S. L., MUNIZ, A. S., REZENDE, R., GONÇALVES, A. C. A., LABEGALINI, L., CROSARIOLLO NETO, V. S. **Desdobramento do amido em glicose para identificar a água residuária de indústria de mandioca no perfil do solo.** ActaScientiarum.Biological Sciences, V. 27, n.3, p 504-511. 2005.
- SMITH, K. Dried Dairy Ingredients. Wisconsin Center for Dairy research.2008.59p
- SOUZA, C. F.; LUCAS JUNIOR, J.; FERREIRA, W. P. M. **Biodigestão anaeróbia de dejetos de suínos sob efeito de três temperaturas e dois níveis de agitação do substrato: considerações sobre a partida.**Eng. Agríc.[online]. 2005, vol.25, n.2, pp. 530-539.<<http://dx.doi.org/10.1590/S0100-69162005000200027>>.acesso: 19/06/2012
- SOUZA, A. S.; ROCHA-LEÃO, M. H.; BORGES, S. V.; CIRILLO, M. A.; CORNEJO, F. E. P.; COURI, S. **Retention of chain fatty acids under**

drying and storage conditions. Ciência e tecnologia de alimentos, Campinas 2011. Vol 31, p 801-805.

STEIL, L. **Avaliação do uso de inóculos na digestão anaeróbia de resíduos de aves de postura, frangos de corte e suínos.** São Paulo: Instituto de química, Universidade Estadual Paulista, 2001. 109p Dissertação (Mestrado)

TAVARES, A. C. **Modelagem matemática da degradação da glicose com produção de hidrogênio, em um reator anaeróbio de leito fixo.** São Paulo, escola de engenharia de São Carlos, Universidade De São Paulo, 2008. 68p Tese (mestrado).

THEMELIS, N. J.; **Anaerobic digestion of biodegradable organics in municipal solid wastes.** Master of science degree in Earth resources Engineering, 2002. Fu Foundation School of Engineering & Applied Science Columbia University.

TUNA, E.; KARGI, F.; ARGUN, H. **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.

VENTURINI FILHO, W.G.; MENDES, B.P.**Tecnologia usos e potencialidades de tuberculosas e amiláceas latino americanas.** São Paulo: Fundação Cargill, 2003. Capítulo 19: Fermentação alcoólica de raízes tropicais.3V p 530-575

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, J. **Production of PHA from starchy wastewater via organic acids.** journal of Biotechnology, volume 86, issue 2, 30 march 2001, pages 105-112

ANEXO 1
METODOLOGIAS ANALÍTICAS

As análises de demanda química de oxigênio (DQO), demanda bioquímica de oxigênio (DBO), nitrogênio total, fosfato total, alcalinidade e oxigênio dissolvido para a manipueira foram obtidas junto ao laboratório de Limnologia aplicada.



LAUDO DE ANÁLISES LIMNOLÓGICAS (BIÓTICAS E ABIÓTICAS)

SOLICITANTE

Solicitante: **Denise – Prof. Salah**

Endereço: Toledo/PR

INFORMAÇÕES DA COLETA

Natureza da amostra: Efluente (Manipueira)

ENSAIOS REALIZADOS:

Demanda Química de Oxigênio (DQO)

	Valor	Unidade	Método
Análise 1	10550,00	mg/L	APHA (2005)
Análise 2	10050,00	mg/L	
Análise 3	10300,00	mg/L	

Demanda Bioquímica de Oxigênio (DBO)

	Valor	Unidade	Método
Análise 1	175,65	mg/L	APHA (2005)
Análise 2	174,65	mg/L	
Análise 3	175,15	mg/L	

Nitrogênio Total

	Valor	Unidade	Método
Análise 1	70,00	mg/L	Mackereth et al (1978)
Análise 2	64,40	mg/L	
Análise 3	67,20	mg/L	

Fosfato Total

	Valor	Unidade	Método
Análise 1	22,23	mg/L	Mackereth et al (1978)
Análise 2	21,40	mg/L	
Análise 3	21,90	mg/L	

LABORATÓRIO DE LIMNOLOGIA APLICADA

Rua da Faculdade, 645, Jardim Sta Maria, Cep 85903-000, Toledo/PR.
Fone (45)3379-7084/3379-7088

Alcalinidade			
	Valor	Unidade	Método
Análise 1	213,95	mg/L	Carmouze (1994)
Análise 2	212,56	mg/L	
Análise 3	213,78	mg/L	
Oxigênio Dissolvido			
	Valor	Unidade	Método
Análise 1	2,38	mg/L	Oxímetro
Análise 2	2,35	mg/L	
Análise 3	2,40	mg/L	

Dr. Nyamien Yahaut Sebastien

Responsável Técnico

CREA -PR-60044/D

As análises de demanda bioquímica de oxigênio (DBO), fosfato total e cálcio para o permeado do soro de leite foram obtidas junto ao laboratório de Limnologia aplicada.

LAUDO DE ANÁLISES LIMNOLÓGICAS (BIÓTICAS E ABIÓTICAS)

SOLICITANTE


Solicitante: Prof. Dra. Mônica L. Fiorese
Endereço: Toledo/PR

INFORMAÇÕES DA COLETA

Natureza da amostra: Permeado de Soro

ENSAIOS REALIZADOS:

Demanda Bioquímica de Oxigênio (DBO)			
	Valor	Unidade	Método
26/03/2012	352,42	mg/L	APHA (2005)
27/03/2012	351,23	mg/L	
Fosfato Total			
	Valor	Unidade	Método
26/03/2012	1264,00	mg/L	Mackereth et al (1978)
27/03/2012	1229,83	mg/L	
Cálcio			
	Valor	Unidade	Método
26/03/2012	2044,08	mg/L	Carmouze (1994)
27/03/2012	2004,00	mg/L	


Dr. Nyamien Yahaut Sebastien
Responsável Técnico
CREA -PR-60044/D

LABORATÓRIO DE LIMNOLOGIA APLICADA
Rua da Faculdade, 645, Jardim Sta Maria, Cep 85903-000, Toledo/PR.
Fone (45)3379-7084/3379-7088

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%.

A fórmula utilizada para o cálculo da acidez é:

$$\frac{V.f.100}{P.c}$$

Onde:

V: Volume de solução de NaOH gasto;

f: fator da solução de NaOH;

P: número de g da amostra usada na titulação

c: Correção para a solução de NaOH, 10 para solução de 0,1 M;

DETERMINAÇÃO DE BIOMASSA

A medida da biomassa celular do inoculo bovino, foi realizada apenas em umas das fermentações, a qual teve manipueira como substrato. Durante 77h de fermentação, foram coletadas por 12 vezes, amostras em quadruplicata de 1 mL de meio fermentado. O método utilizado para a determinação da concentração celular seca foi baseado e adaptado de Rodrigues (2005).

Eppendorfs previamente identificados foram mantidos em estufa à 90°C por 24h. Em seguida foram colocados em dessecador por 30 min para esfriarem, e anotou-se as massas dos eppendorfs, P₁. Volumes de 1 mL do meio fermentado foram adicionados ao eppendorf identificado e pesado e o material foi centrifugado a 15.000 rpm por 5 min em uma centrífuga de eppendorf (marca eppendorf, modelo Centrifuge 5804R). Após a centrifugação, o volume

sobrenadante contido em cada eppendorf foi descartado, e o sólido decantado no interior de cada eppendorf foi seco em estufa à 50°C por 24 h. Após este tempo, os eppendorfs esfriaram em dessecador por 30 min e foram pesados, P₂. A diferença, P₂-P₁ foi considerada como biomassa celular seca. Os valores obtidos da média aritmética foram plotados em gráfico.

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⁻¹ 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⁻¹. 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⁻¹, 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⁻¹ nas mesmas condições de hidrólise e neutralização da amostra.

UMIDADE

Pesou-se de 2 a 10 gramas da amostra em cápsula de porcelana, previamente tarada, e aqueceu-se por 3 h em estufa apropriada na temperatura de 105°C. Resfriou-se em dessecador até atingir temperatura ambiente e pesou-se novamente. A operação foi repetida até atingir peso constante.

A umidade foi obtida através do cálculo:

$$\frac{100.N}{P} = \text{Umidade (\%)}$$

Onde:

P: número de gramas da amostra;

N: número de gramas de umidade (perda de massa em g);

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 agitador magnético.

Calculou-se a alcalinidade e a produção de ácidos graxos voláteis através das fórmulas 2 e 3, respectivamente, obtidas por métodos iterativos:

$$Alc = \frac{Vac_{4,3} \cdot N \cdot 1000}{Vam} \quad (1)$$

$$AGV = \frac{131340 \cdot Vac_{5-4} \cdot N}{Vam} - 3,8 \cdot Alc - 10,9 \quad (2)$$

Onde:

Alc: É a medida da alcalinidade à bicarbonato em mmol /L;

Vac: É o volume de solução titulante gasto até atingir pH 4,3;

N: É a normalidade exata da solução titulante;

Vam: É o volume da amostra titulada;

AGV: É a quantificação de ácidos graxos voláteis expressos como ácido acético em mg/L;

VAc₅₋₄: É a diferença de volume da solução titulante gasto entre o pH 5,0 e o pH 4,0.

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

A análise foi feita em duplicata. 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) 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 4 e 5.

$$ST(\%) = \frac{(P2-P1) \cdot 100}{ma} \quad (3)$$

$$STV(\%) = \frac{[(P2-P1)-(P3-P1)] \cdot 100}{ma} \quad (4)$$

DETERMINAÇÃO DE GLÍCIDEOS REDUTORES

Transferiu-se, com o auxílio de uma pipeta volumétrica, 10 mL da amostra para um balão volumétrico de 100 mL, e completou-se o volume com água e agitou-se. A solução então foi transferida para uma bureta. Num balão de fundo chato, com auxílio de pipetas foi transferido 10mL da solução de Fehling A e B, e adicionou-se 40mL de água. Aqueceu-se até ebulição. Então, foi adicionado às gotas, solução da bureta sobre a solução do balão em ebulição, agitando-se sempre, até que a solução passou de azul para incolor (no fundo do balão ficou um resíduo vermelho de Cu_2O).

$$Glícideos Redutores em Lactose (\%) = \frac{100 \cdot A \cdot a}{P \cdot V}$$

Onde:

A: Número de mL da diluição da amostra

a: Número de glicose correspondente a 10mL das soluções de Fehling (0,066)


P: Volume da amostra (20mL)

V: Número de mL da solução da amostra gasto na titulação;

DEMANDA QUÍMICA DE OXIGÊNIO (DQO)

A demanda química de oxigênio do permeado do soro de queijo foi realizado na empresa que cedeu o mesmo, seguindo o Manual Fotômetro Nanocolor 500D. Macherey-Nagelde acordo com o procedimento:

Digestão da Amostra

1. Preparou-se a amostra para digestão, utilizando o kit adequado conforme a DQO esperada.
2. Adicionou ao tubo com o reagente a seguinte quantidade de amostra:
 - Faixa de 20-300 mg/ L DQO: 2 mL de amostra
 - Faixa de 100-1500 mg/L DQO: 2 mL de amostra
 - Faixa de 1000-15000 mg/L DQO: 0,2 mL de amostra
3. Adicionou a amostra lentamente com o tubo inclinado, de tal maneira que formasse duas fases (reagente + amostra).
4. Fechou-se o tubo, agitou com cuidado (reação exotérmica) e colocou-se no bloco de digestão, abaixando-se em seguida a tampa de proteção
5. O equipamento foi ligado e ajustada a temperatura de digestão para 148°C por meio da tecla °C.
6. Ajustou-se o tempo para 02 horas por meio da tecla 
7. Pressionou-se ^{o.k.}✓ para que iniciasse o processo de digestão.
8. Após o tempo programado o equipamento emitiu um sinal, e então os tubos foram retirados com cuidado para não haver agitação.
9. Transcorridos aproximadamente 10 minutos, agitou-se os tubos e os mesmos foram deixados para esfriar à temperatura ambiente.

Leitura da Amostra

1. Digitou-se o número do teste :
 - Faixa 50-300 mg/L DQO: método 033

- Faixa 100-1500 mg/L DQO: método 029
 - Faixa 1000-15000 mg/L DQO: método 028
2. Pressionou-se a tecla ^{o.k.}✓ para confirmação.
 3. Limpou-se o tubo de solução neutra com lenço de papel e inseriu-se a cubeta no fotômetro.
 4. O mesmo procedimento foi feito com as demais cubetas, tomando cuidado de selecionar sempre o método dependendo da faixa de DQO utilizada.

PROTEÍNA

DIGESTÃO OU MINERALIZAÇÃO

A quantificação de proteína, ou nitrogênio total do permeado do soro do queijo foi realizado na empresa que cedeu o mesmo, empregando-se a metodologia descrita pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – MAPA de seguindo o procedimento explicado a seguir.

Pesou-se em balança analítica a amostra e transferi-se para tubo de Kjeldahl. Foi Adicionado 2,5 g de mistura catalítica e 7 mL de ácido sulfúrico p.a. os tubos foram aquecidos em bloco digestor, a princípio, lentamente, mantendo a temperatura de 50°C por 1 (uma) hora ou dependendo das instruções do fabricante do bloco digestor. Em seguida, elevou-se gradativamente até atingir 400°C. Quando o líquido se tornou límpido e transparente, de tonalidade azul-esverdeada, retirou-se do aquecimento, deixou-se esfriar e então adicionou-se 10 mL de água.

DESTILAÇÃO

Acoplou-se ao destilador um erlenmeyer contendo 20 mL de solução de ácido bórico a 4 % com 4 ou 5 gotas de solução de indicador misto (erlenmeyer receptor do destilado). Adaptou-se o tubo de Kjeldahl ao destilador e adicionou-se a solução de hidróxido de sódio a 50% até que a mesma se torne negra (cerca de 20 mL). Procedeu-se a destilação coletando cerca de 100 mL do destilado. A solução receptora foi mantida fria durante a destilação.

TITULAÇÃO

Titulou-se com solução de ácido sulfúrico 0,1 N ou solução de ácido clorídrico 0,1 N até a viragem do indicador.

CÁLCULOS

$$Proteína (\%) = \frac{V \cdot N \cdot f \cdot 0,014 \cdot 100}{m} \cdot F$$

Onde:

V = volume de solução de ácido sulfúrico 0,1N, gasto na titulação após a correção do branco em mL

N = normalidade da solução de ácido sulfúrico 0,1N

f = fator de correção da solução de ácido sulfúrico 0,1N

m = massa da amostra em gramas

F = fator de conversão da relação nitrogênio/proteína para leite e derivados = 6,38