Universidade de São Paulo
Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto
Departamento de Química
Programa de Pós-Graduação em Química

“Efeito de derivados da hidrólise de biomassa de algas sobre a produção biológica de H₂ por diferentes espécies de *Clostridium* sp.”

Lucas Diniz Giraldeli

Dissertação apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Ciências, Área: **Química**.

RIBEIRÃO PRETO - SP

2017

Universidade de São Paulo
Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto
Departamento de Química
Programa de Pós-Graduação em Química

“Efeito de derivados da hidrólise de biomassa de algas sobre a produção biológica de H₂ por diferentes espécies de *Clostridium* sp.”

Lucas Diniz Giraldeli

Dissertação apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Ciências, Área: **Química**.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Valeria Reginatto Spiller

Versão Corrigida

RIBEIRÃO PRETO - SP

2017

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada à fonte.

FICHA CATALOGRÁFICA

Giraldeli, Lucas Diniz

“Efeito de derivados da hidrólise de biomassa de algas sobre a produção biológica de H₂ por diferentes espécies de *Clostridium* sp.”
– Ribeirão Preto, SP, 2017.

124 p.: 30 cm

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Química.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Valéria Reginatto Spiller

1. *Clostridium* sp.. 2. Produção de H₂. 3. Inibidores. 4. Fermentação.

FOLHA DE APROVAÇÃO**Giraldeli, Lucas Diniz****Título:** Efeito de derivados da hidrólise de biomassa de algas sobre a produção biológica de H₂ por diferentes espécies de *Clostridium* sp.

Dissertação apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Ciências, Área: **Química**.

Aprovado em:

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. _____ Instituição: _____
Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____
Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____
Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____
Julgamento: _____ Assinatura: _____

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a minha família por terem me apoiado e me incentivado sempre me dando forças para seguir em frente e não desistir de meus objetivos. Agradeço especialmente a minha mãe (Roseli), meu pai (Carlos) e meus irmãos (Diego e Priscila) por estarem sempre ao meu lado e me ajudando em todos os momentos.

Agradeço a Deus por estar sempre ao meu lado e presente em todos os momentos da minha vida, me ajudando a escolher o melhor caminho e me fazendo acreditar e nunca desistir do caminho que escolhi. Pela força que Ele me transmite, pela fé que me acompanha e pela proteção que é depositada sobre mim, fazendo com que eu supere meus medos e siga sempre em frente pelo caminho do bem.

Um agradecimento especial a minha orientadora, Valéria Reginatto Spiller, por ter me aceitado como aluno sem ao menos ter me conhecido anteriormente e me guiado com sabedoria, entusiasmo e muito bom humor. Sou grato por ter tido a oportunidade de aprender com uma pessoa que me causou inspiração e admiração, além de ter depositado total confiança em mim e saber lidar com meus defeitos de modo honesto, sereno e verdadeiro. Obrigado.

Gostaria de agradecer a todos os companheiros de laboratório, Mércia, André, Bruna, Thamires, Bianca, Thalita, Vinícius, Giovanni, Rafaela e Emelin, que sempre me ajudaram, me ensinaram e me apoiaram dentro e fora do laboratório. Em especial agradeço a Bruna que me ajudou demais quando cheguei ao laboratório e sempre esteve disposta a me ensinar tudo em qualquer momento.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	IX
LISTA DE TABELAS.....	XII
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS.....	XIV
RESUMO.....	XVI
ABSTRACT.....	XVIII
1-INTRODUÇÃO.....	1
2-OBJETIVOS	4
2.1-Objetivo Geral	4
2.2-Objetivos específicos:	4
3- REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	5
3.1-O H ₂ como um vetor energético	5
3.2-Processos de obtenção de H ₂	7
3.3-Processos biológicos de obtenção de H ₂	7
3.4-A produção de H ₂ por fermentação escura.....	9
3.5-Via bioquímica de produção de H ₂ por <i>Clostridium</i>	114
3.6-Substratos para produção fermentativa de H ₂	14
3.7- Sacarificação de biomassa de algas e formação dos compostos inibidores de fermentação.....	17
3.8- Efeito dos compostos inibidores sobre os microrganismos produtores de H ₂	21

4-MATERIAIS E MÉTODOS	24
4.1- Culturas de <i>Clostridium</i> sp.	24
4.2-Métodos de quantificação de microrganismos	25
4.3- Ensaio em batelada para a produção de H ₂ por fermentação.....	27
4.4- Cálculo dos parâmetros cinéticos dos ensaios de fermentação.	29
4.4.1- Fatores de conversão	29
4.4.2- Cálculo das velocidades específicas de crescimento celular, de consumo de substrato e de produção de H ₂	31
4.4.3- Estimativa da concentração inibitória– CI ₅₀	32
4.5-Determinações Analíticas.....	33
4.5.1-Determinação da concentração celular.....	33
4.5.2-Determinação de Açúcares Redutores Totais (ART).....	34
4.5.3-Análise da composição do gás os biorreatores	34
4.5.4- Análise dos metabólitos solúveis e dos inibidores.....	35
6- RESULTADOS E DISCUSSÃO	36
6.1- Ensaio cinéticos de produção de H ₂ com diferentes concentrações de inibidores	36
6.2- Estimativa da CI ₅₀ dos inibidores.....	52
6.3- Metabólitos solúveis produzidos durante a fermentação na presença de diferentes concentrações de inibidores	57
6.4- Comparação dos efeitos do HMF, AL e AF sobre a produção de H ₂ e produtos do metabolismo pelo <i>C. beijerinckii</i> Br21 e <i>C. acetobutylicum</i> ATCC 824.....	63
6.5- Efeitos da mistura de HMF, AL e AF sobre a produção de H ₂ e produtos do metabolismo do <i>C. beijerinckii</i> Br21 e <i>C. acetobutylicum</i> ATCC 824.....	73

7. CONCLUSÕES	88
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.	90
ANEXO I	104
ANEXO II.....	110
ANEXO III	116

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Vias bioquímicas do gênero <i>Clostridium</i>	14
Figura 2: Estrutura da carragenana.....	18
Figura 3: Esquema da sacarificação da agarose por hidrólise ácida com geração de subprodutos como o HMF.....	19
Figura 4: Esquema geral da degradação de polissacarídeos de algas em monossacarídeos e seus produtos de degradação durante o pré-tratamento ácido.....	20
Figura 5: Desidratação por catalise ácida de glicose.....	20
Figura 6: Efeitos dos ácidos orgânicos em uma célula bacteriana.....	22
Figura 7: Concentração celular (A), concentração de substrato (B) e concentração de produto- H ₂ (C) durante os ensaios de fermentação contendo diferentes concentrações de HMF e o controle (apenas com glicose).....	37
Figura 8: Concentração celular (A), concentração de substrato (B) e concentração de H ₂ (C) durante os ensaios de fermentação contendo diferentes concentrações de AL e o controle (apenas com glicose).....	43
Figura 9: Concentração celular (A), concentração de substrato (B) e concentração de H ₂ (C) durante os ensaios de fermentação contendo diferentes concentrações de AF e o controle (contendo apenas glicose).....	48
Figura 10: Velocidade relativa de produção de H ₂ em função da concentração do inibidor e as equações polinomiais que auxiliaram na estimativa de CI ₅₀	53
Figura 11: Velocidade relativa de crescimento celular em função da concentração do inibidor e as equações polinomiais que auxiliaram na estimativa de CI ₅₀	55
Figura 12: Velocidade relativa de consumo de substrato em função da concentração do inibidor e as equações polinomiais que auxiliaram na estimativa de CI ₅₀	56
Figura 13: Concentração de metabólitos solúveis e consumo de HMF ao final dos ensaios de fermentação para produção de H ₂ com diferentes concentrações de HMF e glicose (10 g/L).....	58
Figura 14: Concentração de metabólitos solúveis e consumo de ácido levulínico ao final dos ensaios de fermentação para produção de H ₂ com diferentes concentrações de ácido levulínico e glicose (10 g/L).	60
Figura 15: Concentração de metabólitos solúveis e consumo de ácido fórmico durante os ensaios de fermentação para produção de H ₂ com diferentes concentrações de ácido fórmico e glicose (10 g/L).....	62

- Figura 16:** Comparação entre a concentração celular (A e D), concentração de substrato (B e E) e de produto (C e F) durante os ensaios de fermentação com *C. beijerinckii* Br21 e *C. acetobutylicum* ATCC 824 contendo 0,90 g/L de HMF e seu respectivo ensaio controle.....65
- Figura 17:** Comparação entre a concentração celular (A e D), de substrato (B e E) e de produto (C e F) durante os ensaios de fermentação com *C. beijerinckii* Br21 e *C. acetobutylicum* ATCC 824 contendo a concentração da CI_{50} de AL (2,50 g/L) e seu respectivo ensaio controle.....67
- Figura 18:** Comparação entre a concentração celular (A e D), de substrato (B e E) e de produto (C e F) durante os ensaios de fermentação com *C. beijerinckii* Br21 e *C. acetobutylicum* ATCC 824 contendo a concentração da CI_{50} de AF (1,15 g/L) e seu respectivo ensaio controle.....69
- Figura 19:** Concentração dos metabólitos solúveis e consumo dos inibidores pelo *C.beijerinckii* Br21 durante os ensaios de fermentação para produção de H_2 na presença da CI_{50} de HMF (0,90 g/L), AL (2,50 g/L) e AF (1,15 g/L).....71
- Figura 20:** Concentração dos metabólitos solúveis e consumo dos inibidores pelo *C.acetobutylicum* ATCC 824 durante os ensaios de fermentação para produção de H_2 na presença da CI_{50} de HMF (0,90 g/L), AL (2,50 g/L) e AF (1,15 g/L).....72
- Figura 21:** Concentração celular (A), de substrato (B) e de produto (C) durante os ensaios de fermentação com *C. beijerinckii* Br21 e concentração celular (D), de substrato (E) e de produto (F) com *C. acetobutylicum* ATCC 824 contendo a mistura HMF+AL, comparado aos respectivos controles (sem inibidores).....75
- Figura 22:** Concentração celular (A), de substrato (B) e de produto (C) durante os ensaios de fermentação com *C. beijerinckii* Br21 e concentração celular (D), de substrato (E) e de produto (F) com *C. acetobutylicum* ATCC 824 contendo a mistura HMF+AF, comparado aos respectivos controles (sem inibidores).....77
- Figura 23:** Concentração celular (A), de substrato (B) e de produto (C) durante os ensaios de fermentação com *C. beijerinckii* Br21 e concentração celular (D), de substrato (E) e de produto (F) com *C. acetobutylicum* ATCC 824 contendo a mistura AL+AF, comparado aos respectivos controles (sem inibidores).....80
- Figura 24:** Concentração celular (A), de substrato (B) e de produto (C) durante os ensaios de fermentação com *C. beijerinckii* Br21 e concentração celular (D), de substrato (E) e de produto (F) com *C. acetobutylicum* ATCC 824 contendo a mistura HMF+AL+AF, comparado aos respectivos controles (sem inibidores).....82
- Figura 25:** Concentração dos metabólitos solúveis produzidos pelo *C.beijerinckii* Br21 durante os ensaios de fermentação para produção de H_2 na presença das misturas de inibidores HMF+AL, HMF+AF, AL+AF, HMF+AL+AF e do controle.....84

Figura 26: Concentração dos metabólitos solúveis produzidos pelo *C.acetobutylicum* ATCC 824 durante os ensaios de fermentação para produção de H₂ na presença das misturas de inibidores HMF+AL, HMF+AF, AL+AF, HMF+AL+AF e do controle.....86

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Produção de hidrogênio por culturas de <i>Clostridium</i> sp.....	15
Tabela 2: Meio de Cultura CH para o cultivo de <i>Clostridium</i> sp.....	24
Tabela 3: Tempo para o início da produção de H ₂ (λ), pH final, volume máximo de H ₂ , velocidade específica máxima de crescimento celular, consumo de substrato e produção de H ₂ , fator de conversão de substrato em célula e de substrato em produto e consumo de glicose (diferença em relação ao controle, entre parênteses) obtidos a partir dos ensaios cinéticos de produção de H ₂ por fermentação com adição de diferentes concentrações de HMF.....	40
Tabela 4: Tempo para o início da produção de H ₂ (λ), pH final, volume máximo de H ₂ , velocidade específica máxima de crescimento celular, consumo de substrato e produção de H ₂ , fator de conversão de substrato em célula e de substrato em produto e consumo de glicose (diferença em relação ao controle, entre parênteses) obtidos a partir dos ensaios cinéticos de produção de H ₂ por fermentação com adição de diferentes concentrações de AL.....	45
Tabela 5: Tempo para o início da produção de H ₂ (λ), pH final, volume máximo de H ₂ , velocidade específica máxima de crescimento celular, consumo de substrato e produção de H ₂ , fator de conversão de substrato em célula e de substrato em produto e consumo de glicose (diferença em relação ao controle) obtidos a partir dos ensaios cinéticos de produção de H ₂ por fermentação com adição de diferentes concentrações de AF.....	50
Tabela 6: Comparação entre as velocidades específica máximas de crescimento celular (X), consumo de substrato (S) e produção de H ₂ (H ₂) obtidas nos ensaios de fermentação com <i>C. beijerinckii</i> Br21 e <i>C. acetobutylicum</i> ATCC 824 e os respectivos controles contendo a concentração da CI ₅₀ de HMF (0,90 g/L).....	66
Tabela 7: Comparação entre as velocidades específica máximas de crescimento celular (X), consumo de substrato (S) e produção de H ₂ (H ₂) obtidas nos ensaios de fermentação com <i>C. beijerinckii</i> Br21 e <i>C. acetobutylicum</i> ATCC 824 e os respectivos controles contendo a concentração da CI ₅₀ de AL (2,50 g/L).....	68
Tabela 8: Comparação entre as velocidades específica máximas de crescimento celular (X), consumo de substrato (S) e produção de H ₂ (H ₂) obtidas nos ensaios de fermentação com <i>C. beijerinckii</i> Br21 e <i>C. acetobutylicum</i> ATCC 824 e os respectivos controles contendo a concentração da CI ₅₀ de AF (1,15 g/L).....	70
Tabela 9: Comparação entre as velocidades específica máximas de crescimento celular (X), consumo de substrato (S) e produção de H ₂ (H ₂) obtidas nos ensaios de fermentação com <i>C. beijerinckii</i> Br21 e <i>C. acetobutylicum</i> ATCC 824 e os respectivos controles contendo a mistura de inibidores HMF+AL.....	76

Tabela 10: Comparação entre as velocidades específica máximas de crescimento celular (X), consumo de substrato (S) e produção de H₂ (H₂) obtidas nos ensaios de fermentação com *C. beijerinckii* Br21 e *C. acetobutylicum* ATCC 824 e os respectivos controles contendo a mistura de inibidores HMF+AF.....78

Tabela 11: Comparação entre as velocidades específica máximas de crescimento celular (X), consumo de substrato (S) e produção de H₂ (H₂) obtidas nos ensaios de fermentação com *C. beijerinckii* Br21 e *C. acetobutylicum* ATCC 824 e os respectivos controles contendo a mistura de inibidores AL+AF.....81

Tabela 12: Comparação entre as velocidades específica máximas de crescimento celular (X), consumo de substrato (S) e produção de H₂ (H₂) obtidas nos ensaios de fermentação com *C. beijerinckii* Br21 e *C. acetobutylicum* ATCC 824 e os respectivos controles contendo a mistura de inibidores HMF+AL+AF.....83

Tabela 13: Consumo dos inibidores individualmente nas misturas utilizadas nos ensaios de fermentação com *C. beijerinckii* Br21.....85

Tabela 14: Consumo de cada inibidor individualmente nas misturas utilizadas durante os ensaios de fermentação com *C. acetobutylicum* ATCC 824.....87

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

HMF: 5-hidroximetilfurfural
AF: Ácido Fórmico
AL: Ácido Levulínico
ATP: Adenosina Trifosfato
ABE: Acetona, Butanol e Etanol
DNS: Ácido 3,5-dinitrosalicílico
DNA: Ácido desoxirribonucleico
RNA: Ácido ribonucleico
ART: Açúcares Redutores Totais
atm: atmosfera
DNS: Ácido dinitrossalicílico
X: crescimento celular
S: consumo de substrato
CI₅₀: Concentração Inibitória 50
CI₂₅: Concentração Inibitória 25
CoA: Coenzima A
CG: cromatografia a gás
R: Constante dos gases ideais
D.O.: Densidade óptica
Y_{p/s}: fator de conversão de produto em substrato
Y_{x/s}: fator de conversão de substrato em célula
NFOR: NADH-ferredoxina oxidoreductase
λ: fase de latência (lag fase)
g: grama
°C: Grau Celsius
h: horas
kJ: Kilojoule
K: Kelvin
L: Litros
mL: Mililitros
m/v: massa por volume
μm: Micrometros
mg: Miligrama
mmol: Milimol
mm: Milímetros
m: metros
nm: Nanômetros
NADH: nicotinamida adenina dinucleotídeo
P: produção de H₂

pH: Potencial hidrogeniônico

PFOR: piruvato-ferredoxina oxidoreductase

P.A.: Para Análise

rRNA: RNA ribossômico

T: Temperatura

UV/VIS: Ultravioleta Visível

v/v: volume por volume

V: volts

Máx H₂: volume máximo de H₂

rx: velocidade de crescimento celular

rs: velocidade de consumo de substrato

rp: velocidade de produção de H₂

W: watt

h: horas

μ_x: velocidade específica de crescimento celular

μ_s: velocidade específica de consumo de substrato

μ_{H₂}: velocidade específica de produção de H₂

RESUMO

Lucas Diniz GIRALDELI¹ e Valeria REGINATTO². **Efeitos de derivados de hidrólise de biomassa de algas sobre a produção biológica de H₂ por diferentes espécies de *Clostridium*.** 2017. 124 páginas. Departamento de Química, Universidade de São Paulo (USP), Ribeirão Preto, 2017.

¹ Graduado no Curso de Química Bacharel pela Universidade de São Paulo (USP), Ribeirão Preto, mestrando do Departamento de Química pela Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo (FFCLRP-USP), lucas.giraldeli@usp.br;

² Professora doutora da FFCLRP-USP, valeriars@ffclrp.usp.br.

O H₂ pode ser obtido por processos biológicos, como a fermentação, conduzidos à temperatura e pressão ambientes. Para tal são utilizadas matérias-primas renováveis, ricas em carboidratos, como as biomassas lignocelulósicas e de algas. Estas biomassas têm estrutura química complexa e requerem uma etapa de pré-tratamento e/ou hidrólise antes da sua utilização na fermentação. Processos de hidrólise podem liberar, tanto monossacarídeos, quanto substâncias potencialmente inibidoras de fermentação. Esse estudo avaliou o efeito de 3 potenciais inibidores de fermentação (5-hidroximetilfurfural -HMF, ácido levulínico –AL e ácido fórmico –AF), derivados da hidrólise de biomassas. Ensaio cinéticos de fermentação em batelada foram realizados com o microrganismo produtor de H₂, *Clostridium beijerinckii* Br21, utilizando glicose como fonte de carbono e diferentes concentrações de cada inibidor. O efeito do HMF, do AL e do AF foram avaliados nas faixas de concentração de 0,5 a 2,5 g/L, de 1,0 a 4,0 g/L, e de 0,5 a 2,0 g/L, respectivamente. Retiraram-se amostras do gás produzido e do líquido para estimar as velocidades específicas de produção de H₂, do crescimento celular e de consumo de glicose, nos ensaios com e sem a presença de inibidor (controle). Foi observada inibição de todos os parâmetros avaliados, comparados ao controle. Houve um aumento do tempo para início da produção e diminuição do rendimento de H₂ com o aumento da concentração de todos os inibidores. Os resultados das fermentações permitiram estimar a concentração dos compostos que inibem 50% a produção de H₂, o crescimento celular e o consumo do substrato (CI₅₀). Os valores de CI₅₀ obtidos para a produção de H₂ pelo HMF, AL e AF foram

0,89, 2,50 e 1,15 g/L, respectivamente. Para o crescimento celular a CI_{50} do HMF, AL e AF foram 1,42, 2,08 e 1,46 g/L, respectivamente. Para o consumo de substrato a CI_{50} foi 3,23, 3,79 e 0,43 g/L, para o HMF, AL e AF, respectivamente. As concentrações de CI_{50} para a produção de H_2 foram testados em 2 microrganismos distintos, o *C. beijerinckii* Br21 e o *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824, para fins comparativos. Assim pode-se verificar a inibição na produção de H_2 no *C. beijerinckii* Br21 de 49,3, 48,7 e 51,3%, enquanto que o *C. acetobutylicum* ATCC 824 apresentou inibição de 45,5, 61,3 e 59,6%, para o HMF, AL e AF, respectivamente. Foi estimada também a concentração de compostos que inibem 25% a produção de H_2 , a CI_{25} , a fim de realizar misturas com os inibidores e testá-las em ambos os microrganismos. Os valores obtidos de CI_{25} para HMF, AL e AF foram 0,66, 2,15 e 0,89 g/L, respectivamente. A partir desses valores foram feitas 4 misturas distintas: HMF+AL, HMF+AF, AL+AF e HMF+AL+AF. A inibição da produção de H_2 a partir dessas misturas em *C. beijerinckii* Br21 foram de 58,9, 58,4, 49 e 85,9%, enquanto que para o *C. acetobutylicum* ATCC 824 obteve-se os valores de 67,6, 66,6, 55,5 e 88,8%, para HMF+AL, HMF+AF, AL+AF e HMF+AL+AF, respectivamente. Portanto, pode-se notar que o *C. acetobutylicum* ATCC 824 mostrou ser mais sensível aos efeitos causados pelos inibidores, sendo que o HMF parece atuar mais sobre a produção de H_2 , enquanto que os ácidos têm efeito mais global no metabolismo da bactéria. Esses estudos mostraram os limites destes compostos, quando se deseja utilizar hidrolisados de biomassas como matéria-prima para a produção fermentativa do H_2 pelas espécies de *Clostridium* estudadas.

Palavras chave: hidrogênio, fermentação, inibição, *Clostridium beijerinckii* Br21, *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824.

ABSTRACT

H₂ can be obtained by biological processes, such as fermentation, conducted at ambient temperature and pressure. Renewable raw materials like lignocellulosic and algae biomass, which are rich in carbohydrates, can be used for this purpose. These types of biomass have complex chemical structures and require a pretreatment and/or hydrolysis step before they are used in fermentation. Hydrolysis may release not only monosaccharides but also potentially fermentation-inhibiting substances. This study evaluates how three potential fermentation inhibitors (5-hydroxymethylfurfural (HMF), levulinic acid-(LA), and formic acid (FA) derived from algal biomass hydrolysis affect H₂ production. Kinetic batch fermentation assays were performed by using the H₂-producing microorganism *Clostridium beijerinckii* Br21, glucose as carbon source, and different concentrations of each inhibitor. The effect of HMF, LA, and FA on H₂ production was evaluated for inhibitor concentrations ranging from 0.5 to 2.5 g/L, 1.0 to 4.0 g/L, and 0.5 to 2.0 g/L, respectively. Samples of the produced gas and liquid were taken to estimate the specific rates of H₂ production, cell growth, and glucose consumption in the assays conducted in the presence or in the absence (control) of an inhibitor. Increasing inhibitor concentration delayed the onset of H₂ production and diminished the H₂ yield. The fermentation results allowed us to estimate the inhibitor concentration that inhibited 50% of the H₂ production, cell growth, and substrate consumption rates, designated IC₅₀. Concerning the H₂ production rate, IC₅₀ was 0.89, 2.50, and 1.15 g/L for HMF, LA, and FA, respectively. As for the cell growth rate, IC₅₀ was 1.42, 2.08, and 1.46 g/L for HMF, LA, and FA, respectively. Regarding the substrate consumption rate, IC₅₀ was 3.23, 3.79, and 0.43 g/L for HMF, LA, and FA, respectively. IC₅₀ was also tested in the presence of *C. beijerinckii* Br21 or *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 and one of the inhibitors. The H₂ production rate decreased by 49.3, 48.7, and 51.3% in the presence of *C. beijerinckii* Br21 and of HMF, AL, or AF, respectively. In the presence of *C. acetobutylicum* ATCC 824 and of HMF, AL, or AF, the H₂ production rate reduced by 45.5, 61.3, and 59.6%, respectively. The inhibitor concentration that inhibited 25% of H₂ production, IC₂₅, was also determined so that mixtures of the inhibitors could be prepared and tested in the presence of the microorganisms. HMF, LA, and FA afforded IC₂₅ of 0.66, 2.15, and 0.89 g/L, respectively. On the basis of these values, four different mixtures were prepared: HMF+LA, HMF+FA, LA+FA, and HMF+LA+FA. In the presence of *C. beijerinckii* Br21, HMF+LA, HMF+FA, LA+FA, and HMF+LA+FA inhibited H₂ production by 58.9, 58.4, 49, and 85.9%,

respectively, whereas in the presence of *C. acetobutylicum* ATCC 824, inhibitions were 67.6, 66.6, 55.5, and 88.8% respectively. Therefore, *C. acetobutylicum* ATCC 824 was more sensitive to the effects caused by inhibitors. HMF seemed to affect the H₂ production rate more, whereas acids appeared to act more globally on bacterial metabolism. These results reveal the concentration limits of the tested inhibitors when biomass hydrolysates are employed as raw material for fermentative H₂ production.

Keywords: hydrogen, fermentation, inhibition, *Clostridium beijerinckii* Br21, *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824.

1- INTRODUÇÃO

A matriz energética mundial ainda é majoritariamente baseada em combustíveis fósseis, sobretudo no petróleo, no gás natural e no carvão mineral. Estas matérias-primas são esgotáveis e as suas combustões geram poluentes, tais como o monóxido e o dióxido de carbono, sendo este último, um dos principais responsáveis pelo aquecimento global (DAS e VEZIROGLU, 2008). Portanto, o desenvolvimento de processos para a obtenção de combustíveis menos poluentes, a partir de matérias-primas renováveis, tornou-se uma questão fundamental para o crescimento sustentável da sociedade (ANDERSON et al., 2014, MONLAU et al. 2014).

Neste contexto, o H_2 tem sido considerado a energia limpa do futuro, pois a sua combustão resulta somente em água. Os atuais processos de obtenção de H_2 incluem: reforma termocatalítica de compostos orgânicos, eletrólise da água e processos biológicos. Embora existam várias formas de obtenção do H_2 , cerca de 95% do H_2 produzido atualmente provêm de reações do gás natural ou do fracionamento do petróleo, utilizando elevadas temperaturas. Portanto, as tecnologias atualmente praticadas para a obtenção industrial de H_2 requerem direta ou indiretamente de combustíveis fósseis (CHAUBEY et al., 2013).

Dentre os novos processos para a obtenção de H_2 , os processos biotecnológicos, especialmente a fermentação, são promissores por demandarem menos energia, comparado aos processos tradicionais, pois são realizados a temperatura e pressão ambientes (DAS e VEZIROGLU et al., 2008).

A via fermentativa de produção de H_2 pode ser biocatalizada por culturas mistas ou culturas puras de microrganismos. No caso de culturas mistas são utilizados lodos anaeróbios de sistemas de tratamento de efluentes (MATHEWS e WANG, 2009). Como culturas puras, o principal gênero

produtor de H_2 é o *Clostridium* sp., especialmente o *Clostridium acetobutylicum* e o *Clostridium beijerinckii* (SKONIECZNY e YARGEU, 2009; HUNG *et al.*, 2008).

Além disso, a obtenção de H_2 por fermentação, denominado de biohidrogênio quando obtido pela via biológica, abre a oportunidade para a utilização de uma ampla gama de matérias-primas (substratos) renováveis ricas em carboidratos, incluindo águas residuárias e biomassas lignocelulósicas (VAZQUEZ e VARALDO, 2009; ELSHARNOUBY *et al.*, 2013) e de biomassas de algas (HO *et al.*, 2012, LIU *et al.*, 2012, COELHO *et al.*, 2014).

Apesar de nos últimos anos os materiais lignocelulósicos terem sido alvo de inúmeras pesquisas para a sua utilização como substrato na produção biotecnológica de combustíveis de segunda geração, mais recentemente, a biomassa de algas tem atraído o interesse de pesquisadores para a produção de biocombustíveis, denominados de terceira geração. Tal interesse está relacionado às muitas vantagens que a biomassa de algas apresenta quando comparada à lignocelulose como substrato, quais sejam: 1) as algas apresentam maior sequestro de dióxido de carbono; 2) são organismos aquáticos abundantes, portanto, a sua produção não necessita de terras agricultáveis e, como consequência, não competem por espaço com os outros gêneros alimentícios; 3) a produção de algas não é sazonal, podendo ser cultivadas o ano todo; 4) não há utilização de pesticidas e fertilizantes, resultando em menor geração de resíduos tóxicos; 5) podem-se extrair coprodutos de alto valor da biomassa de algas como aminoácidos e proteínas, o que pode elevar a viabilidade econômica da produção de biocombustíveis de terceira geração; e por fim, 6) as algas não possuem lignina em sua composição (ANDERSON *et al.*, 2014, ORTIGUEIRA *et al.*, 2015, XIA *et al.*, 2015).

O fato das algas não possuírem lignina na composição de sua parede celular representa uma grande vantagem na sua sacarificação, em relação aos materiais lignocelulósicos, pois os métodos de pré-tratamento e/ou hidrólise podem ser mais brandos ou até mesmo desnecessários (CHEN *et al.*,

2013; SAMBUSITI et al., 2015). Apesar disto, os pré-tratamentos aplicados à biomassa de alga, para liberar sacarídeos fermentáveis e/ou diminuir a recalcitrância do material para posterior hidrólise enzimática, são muito semelhantes aos aplicados em materiais lignocelulósicos, tais como o tratamento ácido (PARK et al., 2011), enzimático (MUENSEAN e KIM., 2015), além do hidrotérmico (PASSOS e FERRER., 2015).

Com exceção do tratamento enzimático, os métodos de hidrólise de biomassa de alga, principalmente os que utilizam elevadas temperaturas e pHs ácidos, podem gerar, não apenas os sacarídeos fermentáveis, mas também subprodutos resultantes da degradação de açúcares conhecidos como inibidores de fermentação. Tais subprodutos têm a sua origem na degradação de hexoses, como o 5-hidroximetilfurfural (HMF), o ácido fórmico (AF) e o ácido levulínico (AL), sendo os dois últimos produtos da degradação do HMF (BUNDHOO et al., 2016; SIVAGURUNATHAN et al., 2016). Tais subprodutos são conhecidos por serem potenciais inibidores de fermentação envolvendo microrganismos produtores de H_2 como o *Clostridium* sp. Porém, os efeitos causados por estes compostos sobre a produção de H_2 são pouco estudados, sendo que a maior parte dos estudos está relacionada às culturas mistas (QUÉMÉNEUR et al., 2012, ANBURAJAN et al., 2017, LIN et al., 2015). Desta forma, o efeito dos inibidores sobre os principais microrganismos produtores de H_2 , como espécies do gênero *Clostridium* sp., ainda são limitados. Cabe ressaltar que o principal microrganismo estudado neste trabalho é a cepa de *C. beijerinckii* Br21, recentemente isolada em nosso laboratório (FONSECA et al., 2016) e portanto não há nenhuma informação a respeito do efeito dos inibidores sobre esta cepa.

Neste sentido, o presente trabalho visa estudar o efeito dos principais subprodutos de hidrólise de biomassa de algas, o HMF, o AF e o AL sobre a produção de H_2 pelo *C. beijerinckii*

Br21 e por uma cepa padrão, o *C. acetobutylicum* ATCC 824. Essas investigações abrem caminho para a utilização de biomassa de algas na produção sustentável de H₂.

2-OBJETIVOS

2.1-Objetivo Geral

Avaliar o efeito de potenciais inibidores de fermentação, derivados da hidrólise ácida de biomassa de algas, sobre Clostridia produtores de H₂.

2.2-Objetivos específicos:

- Verificar o efeito de diferentes concentrações de potenciais inibidores da fermentação, o HMF, o ácido fórmico (AF) e o ácido levulínico (AL) sobre a produção biológica de H₂, sobre o crescimento celular e sobre o consumo de substrato pelo *C. beijerinckii* Br21;
- Estimar a Concentração Inibitória 50 (CI₅₀) de HMF, de AF e de AL sobre a produção biológica de H₂, sobre o crescimento celular e sobre o consumo de substrato do *C. beijerinckii* Br21.
- Comparar o efeito da CI₅₀ dos inibidores (HMF, AF e AL) sobre as cepas de *C. beijerinckii* Br21 e de *C. acetobutylicum* ATCC 824.
- Comparar o efeito isolado e da mistura dos inibidores (HMF, AF e AL) sobre a produção biológica de H₂ pelo *C. beijerinckii* Br21 e pelo *C. acetobutylicum* ATCC 824.

3- REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1-O H₂ como um vetor energético

O hidrogênio é o elemento menos denso da tabela periódica e apresenta-se em sua forma molecular, originando o gás diatômico H₂ em condições normais de temperatura e pressão (CNTP). Trata-se de um gás inodoro, incolor, altamente inflamável e insolúvel em água. Também é o elemento químico mais abundante no universo (cerca de 75% da massa elementar do universo). Na Terra encontra-se na forma de compostos químicos como hidrocarbonetos e água (STWERTKA, 2002).

O hidrogênio consiste em uma das diversas formas de obtenção direta de energia devido a sua elevada densidade energética, cerca de 120 MJ. kg⁻¹, que supera as densidades energéticas de combustíveis tradicionais como gasolina (44 MJ.kg⁻¹), metano (50 MJ.kg⁻¹) e etanol (26.8 MJ.kg⁻¹) (LIN et al., 2012; KUMAR e LIN., 2014).

Além disso, o hidrogênio é muito interessante do ponto de vista ambiental, pois sua combustão gera apenas água, ou seja, não produz poluentes atmosféricos. A equação 1 ilustra sua combustão (MATHEWS e WANG., 2009; DAS e VEZIROGLU., 2008).

Portanto, o hidrogênio é visto como uma fonte limpa de energia por não contribuir com o efeito estufa, devido à ausência de átomos de carbono em sua molécula.

3.2- Processos de obtenção do H₂

Pelo fato de o hidrogênio ser encontrado combinado a outros elementos, para a sua extração é necessária à utilização de grande quantidade de energia e um complexo processamento químico (CHAUBEY et al., 2013).

Entre os processos que envolvem a utilização de combustíveis fósseis para a obtenção de H₂, podemos citar a reforma do gás natural que contribui com cerca de 40% do hidrogênio produzido, a oxidação de hidrocarbonetos pesados que contribui com 30% da produção mundial de H₂, a gaseificação do carvão que representa 18% da produção mundial e por fim a eletrólise da água que contribui com 5% da produção mundial (WANG., 2012; STANCZYK., 2012; SÁ., 2013).

Exceto a eletrólise da água que demanda uma elevada quantidade de energia, todos os processos atuais de obtenção do H₂ anteriormente citados, requerem matérias-primas fósseis direta ou indiretamente.

Porém, atualmente há uma grande preocupação em que o H₂ seja obtido de forma sustentável. Neste sentido, a produção biológica de H₂ surge como uma alternativa aos métodos tradicionais, pois utiliza matérias primas renováveis e processos conduzidos à pressão e temperaturas ambientes. Atualmente, a via biológica ainda é pouco explorada, mas por se tratar de uma área bastante promissora, espera-se que haja um aumento na produção biológica de hidrogênio por meio do desenvolvimento de novas tecnologias e processos (MENON; RAO., 2012).

3.3-Processos biológicos de obtenção de H₂

Os processos atualmente conhecidos para obtenção biológica de H₂ são: a biofotólise direta da água realizado por algas verdes (*Chlamydomonas reinhardtii*, *Platymonas subcordiformis*), a biofotólise indireta da água por meio de cianobactérias (*Plectonema boryanum*, *Anabaena siamensis*), a fotodecomposição de compostos orgânicos por bactérias fotossintéticas por bactérias púrpuras não sulfurosas, e a fermentação de compostos orgânicos por bactérias fermentativas (fermentação escura). Além disso, pode ser utilizada uma combinação dos processos da fotodecomposição e da fermentação escura, conhecido como processo híbrido ou misto (DAS e VEZIROGLU, 2008; KOTAY, 2008).

A biofotólise direta da água realizada por algas verdes utiliza a luz solar para que ocorra a conversão da água em hidrogênio conforme a equação 2:

As algas verdes utilizam a energia da luz para gerar elétrons que serão doados para uma molécula de ferredoxina reduzindo-a. Na sequência, a enzima hidrogenase irá receber esses elétrons da ferredoxina reduzida a fim de combina-los com os prótons (H⁺) e assim gerar H₂ (KIM et al., 2010; RAN et al., 2009). Como a produção de H₂ pelas algas depende a enzima hidrogenase, este processo deve ocorrer em anaerobiose, pois a presença de O₂ causa a inibição desta enzima (KIM et al., 2010).

A biofotólise indireta é um processo realizado pelas cianobactérias e também necessita de luz solar para produção de H₂ como ilustrado nas equações 3 e 4:

Cianobactérias são microrganismos fotoautotróficos que contêm pigmentos fotossintéticos, carotenóides e fitobiliproteínas, permitindo que realizem fotossíntese. Elas podem ser fixadoras ou não de nitrogênio, além de produtoras de H₂, devido à presença de nitrogenases. A produção de H₂ ocorre por meio da utilização da energia armazenada nos carboidratos oriundos do processo de fotossíntese a partir da água. Como desvantagens desse processo podemos citar a necessidade constante de energia solar e a elevada utilização de ATP pelas nitrogenases, além da elevada concentração de CO₂ no gás produzido (HUESEMANN et al., 2010).

A fotodecomposição de compostos orgânicos é outro método de obtenção de H₂, porém realizados por bactérias púrpuras não sulfurosas, pela ação da enzima nitrogenase, sob condições de escassez de nitrogênio, presença de energia luminosa e compostos reduzidos (ácidos orgânicos) (Equação 5). As vantagens desse processo estão na utilização de compostos baratos e versáteis como, por exemplo, resíduos orgânicos, como substrato para produção de H₂. Como desvantagem pode citar a necessidade de luz constante para que ocorra o processo (DAS e VEZIROGLU., 2008; SUWANSAARD et al., 2010).

O processo híbrido é dividido em 2 etapas, onde na primeira etapa ocorre a fermentação de um carboidrato por bactérias fermentativas independentes de luz, e por isto é denominada de fermentação escura. Nesta etapa, o H₂ e intermediários de baixo peso molecular como ácidos orgânicos são formados. Os ácidos, por sua vez serão convertidos em mais H₂ por bactérias fotossintetizantes na segunda etapa do processo em um fotobiorreator. As reações desses processos podem ser descritas nas equações 6 e 7(DAS; VEZIROGLU., 2008):

(1) Etapa 1. Fermentação “escura” (anaeróbicos facultativos):

(2) Etapa 2. Fotofermentação (bactérias fotossintetizantes):

Portanto, a combinação da fermentação escura com a fotofermentação é bastante interessante, pois são formadas 4 moléculas de H_2 na etapa independente da luz (Equação 6) e mais 8 mols de H_2 a partir dos produtos (2 mols de ácido acético) gerados na fotofermentação (Equação 7), totalizando 12 mols de H_2 por molécula de glicose oxidada.

Entretanto, o sucesso do processo híbrido, que contempla a oxidação total da molécula de glicose com a geração de 12 mols de H_2 , depende do elevado rendimento da primeira etapa, ou seja, da fermentação escura.

3.4- A produção de H_2 por fermentação

A via fermentativa de produção de H_2 é um processo conhecido como fermentação “escura” por não necessitar da presença constante de luz. A fermentação é conduzida à pressão e temperaturas ambientes, permite a utilização de carboidratos como substratos e possui velocidade de conversão de substrato mais elevada, comparado aos demais processos biológicos. Estas características fazem da fermentação escura o método biológico mais estudado e promissor para a produção de H_2 (LEVIN et al, 2004).

A produção biológica de H_2 por fermentação pode ser realizada por culturas mistas ou puras de microrganismos. As culturas mistas são utilizadas em processos em escala industrial que buscam a obtenção de grandes quantidades de combustível, onde controle e operação dos processos são favorecidos pelo fato dos meios de cultura não necessitarem de esterilização, o que gera menos custos de produção (O-THONGA et al., 2011; SEM e SUTTAR., 2012; PHOWANA e DANVIRUTAI., 2014; SHANMUGAMA et al., 2014; CHEN et al., 2012; NASR et al., 2011; HAFEZ et al., 2010). As culturas mistas que também podem ser denominadas de consórcios microbianos são facilmente obtidas a partir de lodos oriundos de sistemas anaeróbios de tratamento de efluentes (DONGA et al., 2009, LAMAISON et al., 2015), chorume (RATTI et al., 2013; ZHU et al., 2015), solos (CHAGANTIA et al., 2012; SARAPHIROMA; REUNGSANG, 2011) e resíduos de alimentos (KIM et al., 2008). Dentre os principais microrganismos produtores de H_2 presentes em culturas mistas podemos citar os anaeróbios facultativos como *Enterobacter* sp. e os anaeróbios estritos como *Clostridium* sp (ELSHARNOUBY., 2013).

As culturas puras produtoras de H_2 , por sua vez, apresentam maior seletividade com relação ao substrato, maior facilidade na manipulação do metabolismo através de alterações de condições de crescimento, possuem elevados rendimentos de produção de H_2 , e formação de uma menor variedade de subprodutos, comparado às culturas mistas. Porém, este tipo de cultura é muito sensível à contaminação, fazendo com que haja a necessidade de condições assépticas para o seu manuseio, resultando num aumento nos custos do processo (NTAIKOU, I; ANTONOPOLOU, G; LYBERATOS, G., 2010).

Dentre os microrganismos mais estudados para produção de H_2 por fermentação destacam-se os do gênero *Clostridium* sp. Bactérias de outros gêneros como *Bacillus* sp., *Enterobacter* sp. e

Thermoanaerobacterium sp. também são citadas como potenciais produtoras de H₂ (KRAMER et al., 2007).

Atualmente, o avanço de técnicas de cultivo de microrganismos anaeróbios estritos como os clostridia que incluem jarras de anaerobiose, além de métodos de inoculação estéreis em um ambiente totalmente desprovido de O₂, facilitou a utilização desta cepa em pesquisas e processos (TORTORA et al., 2006).

As bactérias do gênero *Clostridium* sp. são capazes de formar endósporos, que é a forma mais resistente de proteção biológica e é capaz de proteger o genoma contra perigos ambientais como: calor, radiação, desidratação e compostos nocivos. Estes microrganismos apresentam a forma de bastonetes, são pleomórficas (apresentam 2 ou mais formas estruturais em seu ciclo de vida), são gram-positivas, se movimentam por flagelos, podem ser sacarolíticas, proteolíticas ou ambos. Os clostridia são anaeróbios estritos, mesofílicos e, produzem uma grande variedade de produtos e subprodutos, tais como: ácido acético, ácido butírico, ácido láctico, CO₂ e H₂. Além disso, durante a fase estacionária de crescimento, são capazes de produzir também Acetona, Butanol e Etanol, denominada de fermentação ABE (ZHAO et al., 2011).

Nesse trabalho as espécies estudadas serão o *C. acetobutylicum* ATCC 824 e uma cepa de *C. beijerinckii* Br21 (FONSECA., 2016). Estas espécies são as mais conhecidas e estudadas dentro do gênero *Clostridium* sp. e dentro dos microrganismos anaeróbios estritos produtores de H₂.

3.5-Via bioquímica de produção de H₂ por *Clostridium*.

O metabolismo de espécies do gênero *Clostridium*, especialmente, *C. acetobutylicum* e *C. beijerinckii* é caracterizado por apresentar 2 fases: a fase acidogênica e a fase solventogênica. Na fase

inicial chamada acidogênese, ocorre o crescimento celular exponencial com concomitante produção de CO₂, H₂, ácido acético (acetato) e ácido butírico (butirato). Devido à produção de ácidos orgânicos observa-se uma progressiva diminuição do pH no meio de cultura, sendo que ao final desta fase são geralmente atingidos pHs em torno de 4,5. Quando a concentração de ácidos é suficientemente alta, o crescimento celular se torna estacionário e se inicia a segunda fase do metabolismo, a solventogênese. Nesta fase, também conhecida por ser uma fase estacionária, os ácidos gerados passam a ser consumidos pela célula formando, Acetona, Butanol e Etanol, que nomeiam a fermentação de ABE. Devido a reassimilação dos ácidos, nesta etapa, normalmente, se observa um leve aumento no pH do meio de cultura (CHEN e BLASCHEK, 1999).

Portanto, a fase acidogênica, na qual a bactéria apresenta o crescimento logarítmico, é a fase de formação do H₂, objeto de estudo deste trabalho. A produção fermentativa de H₂ realizada por *Clostridium* ocorre pela oxidação de compostos orgânicos, normalmente um monossacarídeo, que fornecerá a este energia metabólica para seu crescimento e reprodução celular. Durante este processo são gerados elétrons em excesso que precisam ser dissipados para manter o equilíbrio eletroquímico intracelular. Desta maneira, os elétrons são eliminados através da redução de prótons do meio dando origem ao hidrogênio molecular, o H₂ (SINHA e PANDEY., 2011).

Em *Clostridium*, a glicose (fonte de carbono) é convertida em piruvato pela via glicolítica. O piruvato é então oxidado a acetil-CoA e CO₂, pela enzima piruvato-ferredoxina oxidoreductase (PFOR). Os elétrons obtidos nesta oxidação são transferidos da ferredoxina aos prótons (H⁺) do meio formando o H₂. A transferência dos elétrons da ferredoxina reduzida aos prótons é catalisada pela enzima hidrogenase segundo a equação: $2H^+ + 2e^- \leftrightarrow H_2$. Este processo resulta em um rendimento máximo de 2 mols de H₂ por mol de glicose (SINHA e PANDEY, 2011). Outros 2 mols de H₂ podem ser obtidos a partir da oxidação das coenzimas reduzidas (NADH) formadas durante a glicólise, por

intermédio da enzima NADH-ferredoxina oxidoreductase (NFOR). Portanto, em microrganismos estritamente anaeróbios, como o *Clostridium* sp., o rendimento máximo de H₂ é de 4 mols por mol de glicose oxidada. Entretanto, na prática, rendimentos menores são alcançados, pois a oxidação de NADH pela NFOR apenas ocorre sob baixas pressões parciais de H₂ (VALDEZ-VAZQUEZ e POGGI-VARALDO, 2009; SINHA e PANDEY, 2011).

Assim, o rendimento teórico máximo de 4 mols de hidrogênio por mol de glicose é obtido apenas quando a acetil-CoA é totalmente convertida em ácido acético ao final da reação (Equação 8). Quando o produto final da reação é o ácido butírico, o rendimento da reação passa a ser de apenas 2 mols de hidrogênio por mol de glicose (Equação 9).

A figura 1 ilustra a via bioquímica característica do *Clostridium* para produção de H₂, ressaltando a existência de vias alternativas que competem com a via principal de pelos elétrons, que é o caso das vias nas quais o lactato e etanol são gerados, sem a produção de H₂.

Figura 1. Via bioquímica do gênero *Clostridium* sp., de conversão de carboidratos em H₂, CO₂, ácidos orgânicos e solventes (SINHA; PANDEY, 2011).

3.6- Substratos para a produção fermentativa de H₂

Para que se atinja uma produção sustentável de hidrogênio por fermentação, o substrato empregado deve obedecer alguns critérios. Este deve conter principalmente carboidratos, ser obtido a partir de recursos renováveis, encontrar-se em concentração suficiente para que a fermentação e a recuperação da energia sejam energeticamente favoráveis e que, se algum tratamento prévio for necessário, este seja de baixo custo (DAS e VEZIROGLU, 2001; SIVAGURUNATHAN et al., 2017).

Fatores como custo, disponibilidade e biodegradabilidade consistem em alguns dos critérios que devem ser analisados na escolha do substrato ideal para produção de hidrogênio (HAWKES et al., 2002). Os carboidratos simples como sacarose e glicose são facilmente biodegradados e por isso acabam sendo modelos para a produção de hidrogênio, porém como são substratos puros encarecem a produção de H_2 em larga escala (NTAIKOU, ANTONOPOULOU e LYBERATOS., 2010; DAS e VEZIROGLU., 2008).

A Tabela 1 resume alguns rendimentos de produção de H_2 em função do consumo de substrato, descritos nos trabalhos de revisão realizados por WANG e WAN, (2009), ZHAO et al., 2011, AN et al, 2014 obtidos em estudos que utilizaram culturas puras para a produção de hidrogênio.

Tabela 1. Produção de hidrogênio por culturas de *Clostridium* sp.

Inóculo	Substrato	Tipo de reator	Rendimento (mol H_2/mol de Substrato)
<i>Clostridium acetobutylicum</i>	Glicose	Descontínuo	2 mol/mol glicose
<i>Clostridium acetobutylicum</i>	Glicose	Contínuo	1,08 mol/mol glicose
<i>Clostridium butyricum</i>	Xilose	Descontínuo	0,73 mol/mol xilose
<i>Clostridium butyricum</i>	Amido	Descontínuo	1,63 mol/mol amido
<i>Clostridium pasteurianum</i>	Sacarose	Descontínuo	2,07 mol/mol hexose
<i>Clostridium thermocellum</i>	Biomassa	Descontínuo	2,3 mol/mol glicose
<i>Clostridium thermolacticum</i>	Lactose	Contínuo	3 mol/mol lactose
<i>Clostridium</i> sp.	Celulose	Contínuo	0,3 mol/mol glicose
<i>Clostridium</i> sp.	Glicose	Descontínuo	0,2 mol/mol glicose
<i>Clostridium beijerinckii</i>	Glicose	Descontínuo	2,52 mol/mol glicose
<i>Clostridium beijerinckii</i>	Glicose	Descontínuo	1,97 mol/mol glicose
<i>Clostridium beijerinckii</i>	Xilose	Descontínuo	2,31 mol/mol xilose

Fonte: Adaptado de WANG e WAN, (2009), ZHAO et al., 2011, AN et al, 2014.

A utilização de materiais residuais como substratos para produção de H_2 tem sido uma alternativa muito estudada devido ao forte apelo ambiental pela busca de energias renováveis e de baixo custo (NTAIKOU, ANTONOPOULOU e LYBERATOS., 2010). Dentre os materiais residuais ricos em carboidratos empregados na produção fermentativa de H_2 destacam-se os resíduos alimentícios industriais e domésticos (SHIN, YOUN e KIM., 2004; YU et al., 2002), resíduos provenientes da indústria de papel (VALDEZ-VAZQUEZ et al., 2005), resíduos lácteos (DAVILA-VAZQUEZ et al., 2008), resíduos de óleo de palma (VIJAYARAGHAVAN e AHMAD., 2006), vinhaça (MORAES et al., 2004), além de vários materiais lignocelulósicos (REGINATTO e ANTÔNIO, 2015).

Nos últimos anos os materiais lignocelulósicos tem sido alvo de inúmeras pesquisas para a sua utilização como substrato na produção biotecnológica de combustíveis de segunda geração, incluindo o biohidrogênio (REGINATTO e ANTÔNIO, 2015; SIVAGURUNATHAN et al., 2017).

Entretanto, mais recentemente, a biomassa de algas tem atraído o interesse de pesquisadores para a produção de biocombustíveis de terceira geração (SAMBUSITI et al., 2015; ORTIGUEIRA et al., 2015). Tal interesse está relacionado às muitas vantagens que a biomassa de algas apresenta quando comparada à biomassa lignocelulósica, como já foi mencionado anteriormente (INTRODUÇÃO).

Em estudo a respeito do potencial de macroalgas na produção de biocombustíveis, Coelho et al. (2014) identificaram que biomassa de macroalgas tem sido estudada nos últimos anos, especialmente para a produção de bioetanol. Porém, muito poucos estudos da literatura verificaram o potencial das macroalgas para a produção de biohidrogênio. Um destes trabalhos foi conduzido por Lee et al. (2010) que utilizaram uma alga marinha marrom *Laminaria japonica* como substrato na produção de H_2 por *Clostridium* sp., obtendo 44 mL H_2 /g de alga seca. Em outro trabalho, a alga

vermelha *Gelidium amansii* foi hidrolisada com H₂SO₄ 2% (v/v) a 150 °C por 15 minutos e destoxificada com carvão ativado. A partir deste hidrolisado os autores obtiveram 53,5 mL de H₂ por g de alga seca utilizando uma cultura mista como inóculo (PARK et al., 2011).

As algas verdes, vermelhas e marrons apresentam um teor elevado de carboidratos, que pode variar de 25-60%, 30-60%, e 30-50% respectivamente, tornando-as um substrato bastante atrativo para processos biotecnológicos (ROSS et al., 2008).

Porém, assim como as biomassas lignocelulósicas, a utilização da biomassa de algas depende da disponibilização dos açúcares para serem fermentados. Ao contrário dos materiais lignocelulósicos, as algas não possuem lignina, o que representa uma grande vantagem na sua sacarificação, pois torna a etapa de pré-tratamento mais fácil ou até mesmo desnecessária, mas ainda assim, a etapa de hidrólise não pode ser dispensada (YUN et al., 2016).

3.7-Sacarificação de biomassa de algas e formação dos compostos inibidores de fermentação

As algas vermelhas tem sido as mais utilizadas em processos de fermentação devido ao elevado teor de carboidratos, tais como ágar, carragenana e em menor teor celulose, em sua composição (YUN et al., 2016). O ágar é composto principalmente de agarose, que consiste de um heteropolissacarídeo composto por D-galactose e 3,6-anidro-L-galactose (AHG). As carragenanas são poligalactanas sulfatadas compostas de β-D-galactose e 3,6-anidro-α-D-galactose, unidas nas posições 1→3 (A) e 1→4(B), dispostas em repetição (AB)_n, conforme figura 2. Por fim a celulose, que compreende a menor porção das macroalgas vermelhas, é composta por uma cadeia linear de unidades de β-1,4-D-glicose (PARK et al., 2012; ROESIJADI et al., 2010; WEI et al., 2013).

Figura 2. Estrutura da carragenana. Adaptado de Piculell 1995.

Alguns pré-tratamentos, anteriores à hidrólise, aplicados para a sacarificação da biomassa de algas liberam sacarídeos fermentáveis e/ou diminuem a recalcitrância do material para posterior hidrólise enzimática. Dentre os pré-tratamentos aplicados à biomassa de algas são descritos principalmente o tratamento ácido (PARK et al., 2011), o enzimático (MUENSEAN e KIM., 2015), e o hidrotérmico (PASSOS e FERRER., 2015).

Nos métodos, tanto de pré-tratamento, quanto de sacarificação em única etapa da biomassa, a utilização de ácidos é a mais comum (KIM et al., 2010; LEE et al., 2010; PARK et al., 2011). Para a obtenção de açúcares fermentáveis a partir de macroalgas vermelhas as condições mais aplicadas são elevadas temperaturas, longos períodos de hidrólise e ácidos. Por exemplo, Lee et al (2015) utilizou H_2SO_4 (0,5, 1,0, 1,5, 2,0% v/v) a 121°C por 30 minutos e depois neutralizou com carbonato de cálcio. O mesmo procedimento foi utilizado por Park et al (2011), porém com temperatura mais elevada (150°C).

Porém, especialmente o tratamento ácido em elevadas temperaturas podem gerar subprodutos resultantes da degradação de açúcares conhecidos como inibidores de fermentação, tais como o 5-hidroximetilfurfural (HMF), o ácido levulínico (AL) e o ácido fórmico (AF) (MONLAU et al., 2014;

YUN et al., 2016). Segundo Yun et al. (2016), a agarose, um dos principais polissacarídeos da biomassa de alga, por ser constituída de unidades anidras de açúcar, como o 3,6-anidro-L-galactose (AHG), estes são ainda mais vulneráveis à desidratação e formação dos seus subprodutos, devido a instabilidade deste composto na presença de condições ácidas extremas. A figura 3 ilustra a sacarificação ácida da biomassa de macroalga levando-se em consideração a agarose como polissacarídeo (YUN et al., 2016). Nesta figura pode-se observar a formação de açúcares monoméricos (D-galactose e AHG) a partir do tratamento ácido da agarose e a formação de subprodutos como o HMF.

Figura 3: Esquema da sacarificação da agarose por hidrólise ácida com geração de subprodutos como o HMF. Adaptado de YUN et al., 2016.

Portanto, os subprodutos inibidores de fermentação têm a sua origem na degradação de hexoses, sendo o ácido levulínico e o ácido fórmico, formados pela degradação do HMF, conforme o esquema apresentado na Figura 4.

Figura 4: Esquema geral da degradação de polissacarídeos de algas em monossacarídeos e seus produtos de degradação durante o pré-tratamento ácido. Adaptado de JONSSON et al. (2013).

A formação de HMF provém da desidratação de hexoses sob condições severas de temperatura e concentração de ácido, com a sua subsequente decomposição em ácido levulínico e fórmico (Figura 5), os quais, segundo Kumar et al. (2014) apresentam efeitos inibitórios semelhantes ou mais severos que o HMF aos microrganismos fermentativos.

Figura 5: Desidratação por catalise ácida de glicose (hexose) em ácido levulínico e ácido fórmico com HMF como intermediário. Adaptado de CHEN et al (2013).

3.8- Efeito dos compostos inibidores sobre os microrganismos produtores de H₂

Os efeitos e mecanismos de ação dos compostos inibidores de fermentação, anteriormente descritos, são mais bem conhecidos em eucariotos do que em procariotos, principalmente sobre a levedura *Saccharomyces cerevisiae*, devido a sua relevância industrial na produção do bioetanol (PALMQVIST E HAHN-HAGERDAL 2000, JONSSON et al. 2013).

O HMF, importante produto da degradação de hexoses, é conhecido como potencial inibidor celular por reduzir as atividades biológicas e enzimáticas, danificar o DNA, inibir a síntese de proteínas e RNA, além de ser considerado o mais potente inibidor (MODIG, T; LIDEN, G; TAHERZADEH, M.J., 2002). Acredita-se que a célula, como um mecanismo de defesa, reduza o HMF a compostos menos inibidores utilizando enzimas NADH-dependentes que também são atuantes na via glicolítica, limitando a formação de ATP pela célula (JONSSON et al., 2013).

Os ácidos orgânicos como o ácido fórmico e o levulínico, produtos de degradação do HMF, são ácidos fracos e apresentam dois mecanismos de inibição sobre microrganismos em geral. A toxicidade dos ácidos se deve ao desequilíbrio causado por estes no interior da célula, sendo este originado pela penetração na célula desses ácidos em sua forma não dissociada por difusão, levando a um decaimento do pH intracelular (SIVAGURUNATHAN et al., 2017). A penetração dos ácidos na célula ocorre na sua forma protonada devido ao pH extracelular ser inferior aos seus respectivos pKas. No meio intracelular, em pH em torno de 7, ocorre a dissociação desses ácidos e a geração de íons H⁺ fazendo com que a célula bombeie esses íons em excesso, o que pode causar um elevado gasto de ATP e levando a morte da célula (LOHMEIER-VOGEL et al., 1998). O efeito dos ácidos orgânicos na célula está esquematizado na figura 6.

Figura 6: Esquema dos efeitos dos ácidos orgânicos causados em uma célula bacteriana. Adaptado de ELBESHBISHY et al (2017).

Embora o efeito negativo destes subprodutos de hidrólise da biomassa sobre a produção de bioetanol já estejam relativamente bem estudados, o conhecimento a respeito do efeito destes compostos sobre os microrganismos produtores de hidrogênio, tais como os do gênero *Clostridium* sp., tem sido apenas recentemente investigado (MONLAU et al., 2014, SIQUEIRA e REGINATTO, 2015). Uma investigação mais detalhada é necessária para fornecer diretrizes para o uso de hidrolisados de biomassas como substratos na produção de biohidrogênio.

Em estudos com materiais lignocelulósicos é reportado que apenas um número limitado de microrganismos produtores de H_2 resiste à presença dos inibidores. Por exemplo, em estudos para a produção de H_2 utilizando hidrolisado de bagaço de cana foi verificada que a cultura mista utilizada como inóculo para a produção de H_2 foi enriquecida em *C. acetobutylicum* e uma bactéria formadora de ácido lático do gênero *Sporolactobacillus* sp., cuja presença contribuiu para o decréscimo do

rendimento de H_2 (FANGKUM e REUNGSANG, 2011). Quémeneur et al. (2012) observou importantes alterações no perfil de metabólitos quando uma cultura mista foi colocada em contato com furfural, HMF e compostos fenólicos, derivados de lignina. Independentemente do inibidor adicionado, o microrganismo predominante na cultura mista utilizada foi do gênero *Clostridium* sp., sendo o *C. beijerinckii* mais resistente aos inibidores e, por isto, considerado pelos autores, como um bom candidato à produção de H_2 com hidrolisados (QUÉMENEUR et al., 2012). Na presença de compostos inibidores, também foi observado por Quémeneur et al. (2012), a competição entre as bactérias produtoras e não produtoras de H_2 , tais como o *C. cellulosi* e *Sporolactobacillus* sp.

Finalmente, também é reportado que a presença dos inibidores durante a fermentação de H_2 pode conduzir a um desvio de vias metabólicas de produção de H_2 (isto é, acetato e butirato) para vias que competem pelos equivalentes redutores da produção de H_2 , com a predominância de ácido láctico, etanol e propionato (MONLAU et al., 2014, SIQUEIRA e REGINATTO, 2015). Entretanto, estudos mais avançados são necessários para entender esta inibição sobre a produção de H_2 (MONLAU et al., 2014).

4-MATERIAIS E MÉTODOS

4.1- Culturas de *Clostridium* sp.

Foram utilizadas duas cepas de diferentes espécies de *Clostridium* sp., o *C. acetobutylicum* ATCC 824 (gentilmente cedido da Coleção de Cultura da EMBRAPA frutas tropicais de Fortaleza - CE) e uma cepa de *C. beijerinckii*, denominada de Br21, recentemente isolada e identificada com base na análise do gene 16S rRNA (número de acesso GenBank – KT626859) (FONSECA et al., 2016). As culturas de *Clostridium* sp. foram cultivadas e mantidas em meio de cultura CH descrito por CHEN et al (2004), conforme a composição descrita na Tabela 2.

Tabela 2. Meio de Cultura CH para o cultivo de *Clostridium* sp. produtores de hidrogênio (adaptado de CHEN et al., 2004).

Meio de Cultura - CH	
Reagentes	Concentração
Glicose	10,00 g/L
Extrato de Levedura	1,00 g/L
Na ₂ HPO ₄	5,00 g/L
KH ₂ PO ₄	1,00 g/L
NaCl	1,00 g/L
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,10 g/L
FeSO ₄ .7H ₂ O	0,045 g/L
Solução de Oligoelementos	2 mL/L
H ₃ BO ₃ - 2,86g/L	
MnSO ₄ .4H ₂ O - 2,03g/L	
FeCl ₃ .6H ₂ O - 0,167g/L	
pH ajustado para 6,8	

As cepas de *C. beijerinckii* Br21 e *C. acetobutylicum* ATCC824 foram mantidas em placas Petri contendo meio de cultura CH sólido pela adição de ágar-ágar 2% (v/v) (Acumedia). Foi utilizada a técnica de *Pour Plate* de plaqueamento, na qual se adiciona uma alíquota ressuspensa do microrganismo e uma camada de meio de cultura para minimizar o contato com oxigênio. Após a solidificação do meio nas placas, estas foram transferidas para uma jarra de anaerobiose Anaerobar (Oxoid® AG025A), na qual foi colocado um sachê Anaerogen (Oxoid® AN025A), onde foram mantidas a 35°C até o surgimento das colônias. Após o surgimento, as colônias foram retiradas por meio de uma alça estéril e suspensas em 10 mL de solução estéril de NaCl (0,9% m/v). Todo o procedimento foi realizado dentro de uma capela de fluxo laminar (Pachane modelo PCR T2).

Foram preparados frascos tipo penicilina de 50 mL, contendo 14 mL de meio de cultura CH (sem glicose) borbulhando-se gás argônio para garantir a anaerobiose e lacrados com rolha de borracha e lacre de alumínio para posterior esterilização destes meios em autoclave (120°C por 20 min.), a solução de glicose foi adicionada separadamente para evitar contaminação (após filtração em membrana 0.22 µm) e os frascos foram inoculados com 1 mL da suspensão do inóculo e imediatamente armazenados em estufa microbiológica a 35°C por 72 horas para o crescimento do *Clostridium* sp. Após este período, os frascos foram armazenados em refrigerador. A partir desta cultura foram preparados o pré-inóculo e posteriormente o inóculo dos ensaios de fermentação.

4.2-Métodos de quantificação de microrganismos

Com a finalidade de determinar a concentração celular dos microrganismos estudados foram feitas correlações entre diferentes métodos de quantificação de microrganismos, tais como a massa

celular seca, a densidade ótica a 600 nm e a contagem de células em Câmara de Neubauer. Para isso foram utilizadas diferentes diluições de uma cultura líquida da bactéria em solução de NaCl (0,9% m/v) e realizada a leitura da densidade ótica (D.O.) em 600 nm em um espectrofotômetro UV/Vis (BEL Engineering-UV-M51), a contagem em Câmara de Neubauer em microscópio ótico (Coleman – N101 - B) e a determinação da massa celular seca de cada uma das diluições (APHA., 1995).

Para a determinação da massa celular seca foram filtradas amostras utilizando uma membrana (filtro) de acetato-celulose (UnifilTM) com porosidade de 0,22 μm , previamente secas em forno micro-ondas com potência de 180 W por 15 minutos, resfriadas e pesadas logo em seguida. Depois de filtrado um volume conhecido de amostras, os filtros foram secos por 24 horas a 105°C e novamente pesados em balança analítica (Sartorius BL210S). A diferença de massa dos filtros antes e após a secagem é definido como a massa seca da célula. Para converter essa massa em concentração foi dividido pelo volume filtrado em litros.

A contagem de células nas diferentes diluições da cultura foi feita por meio de uma Câmara de Neubauer em um microscópio óptico (Coleman–N101–B) com um aumento de 400x. Nesta Câmara é conhecido o volume que será utilizado no cálculo da concentração celular. A partir dos dados de quantificação da concentração celular pelos três métodos foram feitos gráficos correlacionando a D.O. x massa celular seca (mg/L) e a D.O. x Número de células (célula/mL). Por meio das equações lineares obtidas a partir dos gráficos foi possível estimar o número de células nas culturas ou a concentração de massa celular seca.

4.3-Ensaio em batelada para a produção de H₂ por fermentação

Preparo dos ensaios

Foram realizados ensaios de fermentação em batelada com a finalidade de avaliar os efeitos causados pelos subprodutos da hidrólise da biomassa de algas sobre o *C. beijerinckii* Br21 e o *C. acetobutylicum* ATCC 824. Todos os ensaios foram realizados utilizando glicose P.A. (Vetec; Brasil), em concentração de 10 g/L, como fonte de carbono.

Os testes foram realizados em frascos Durham® de 600 mL contendo 160 mL de meio de cultivo CH previamente esterilizados, sem a glicose. A glicose e os inibidores foram filtrados no momento de sua adição ao meio, utilizando membrana de acetato-celulose (Unifil™) com porosidade de 0,22 µm, a fim de evitar as suas degradações.

O pré-inóculo dos ensaios de fermentação foi preparado em um frasco de penicilina de 50 mL com 14 mL de meio de cultivo (CH), ao qual foi adicionado 1,0 mL da cultura do *C. beijerinckii* ou do *C. acetobutylicum* cultivado anteriormente e acondicionado em refrigerador. O cultivo do pré-inóculo foi realizado por um período de 24 horas a 35°C, sem agitação e mantido em uma estufa microbiológica. Ao final deste período foi feita a leitura da D.O. a 600 nm da cultura e realizada uma diluição com solução salina a fim de padronizar em 0,1, a qual corresponde a uma concentração celular de $2 \cdot 10^8$ célula/L. Após este procedimento, adicionou-se 10 mL de inóculo ao frasco Durham®, de 600 mL contendo 160 mL de meio de cultura, no qual foi realizado o ensaio de fermentação.

Ao final da adição de todos os componentes, os frascos de fermentação foram aspergidos com gás argônio (99,9% puro – White Martins) e em seguida fechados com uma tampa plástica. Esta tampa plástica contém um orifício central com uma vedação de borracha para permitir a retirada de

amostras de gás e de meio de cultivo através de uma seringa com agulha (estéreis). Todo esse procedimento foi realizado dentro de uma capela de fluxo laminar (Pachane modelo PCR T2) em condições de assepsia.

Adição dos inibidores aos ensaios de fermentação

Os compostos inibidores estudados foram introduzidos nos frascos Durham® em diferentes concentrações, todos da marca Sigma-Aldrich™ (EUA). Esses inibidores foram adicionados também após filtração em membrana 0,22 µm, a partir de um determinado volume de uma solução estoque de concentração conhecida e suficiente para obtenção das concentrações desejadas para cada ensaio. O HMF foi adicionado nas concentrações de 0,5, 1,0, 1,5, 2,0 e 2,5 g/L, o ácido levulínico 1,0, 2,0, 3,0, 3,5 e 4,0 g /L e o ácido fórmico 0,5, 1,0, 1,5 e 2,0 g/L. A escolha das concentrações foi feita com base em dados oriundos das referências bibliográficas utilizadas para este estudo.

A concentração de inibidores utilizada para realizar os ensaios com as misturas sobre as cepas de *Clostridium* sp. foi escolhida com base nas inibições que cada composto causou individualmente ao *C. beijerinckii* Br21. Utilizou-se a concentração do composto que inibiu em 25% a produção de H₂ pelo *C. beijerinckii* Br21, ou seja, a Concentração Inibitória 25, (CI₂₅). A partir das CI₂₅ foram feitas misturas dos inibidores, desta forma: HMF+AL, HMF+AF, AL+AF e HMF+AL+AF. Essas misturas foram testadas em ensaios de fermentação utilizando tanto o *C. beijerinckii* Br21, como o *C. acetobutylicum* ATCC824 com a finalidade de fazer uma comparação dos efeitos desses compostos sobre estes dois microrganismos produtores de H₂.

Acompanhamento dos ensaios de fermentação

No decorrer dos ensaios de fermentação foram retiradas periodicamente 5 mL de meio de cultura com seringa estéril para realização das seguintes análises: leitura da D.O a 600 nm (para a quantificação da concentração celular), a determinação da concentração de açúcares redutores totais (ART) e do pH. No início e final da fermentação foram quantificados os metabólitos solúveis, tais como o ácido acético, butírico, láctico e o etanol.

A composição do gás do *headspace* foi determinada por meio da retirada de uma alíquota de 100 µL de gás com uma seringa *gás-tight*. O ensaio de fermentação foi terminado quando o valor de pH era próximo de 4,5 e o volume de H₂ era constante. Todos os experimentos foram realizados em triplicata com um acompanhamento em duplicata do ensaio controle, ao qual não foram adicionados compostos inibidores. O controle continha somente meio de cultivo, fonte de carbono e inóculo.

4.4- Cálculo dos parâmetros cinéticos dos ensaios de fermentação.

4.4.1- Fatores de conversão

Para o cálculo do volume de H₂ produzido durante a fermentação no *headspace* dos frascos multiplicou-se o volume total (mL) do *headspace* pela porcentagem de H₂ analisado no gás presente nesse *headspace*. Esse volume de H₂ foi então convertido em mmol através da Equação dos Gases Ideais (Equação 10),

$$(P.V=n.R.T)$$

(Equação 10)

Onde: P é a pressão (1 atm), V é o volume de H₂ (L), n é o número de mol de H₂, R é a constante universal de um gás ideal (0,082 atm.L/K.mol) e T é a temperatura dos ensaios em Kelvin (308 K).

O fator de conversão ou o rendimento de H₂ em relação à glicose (substrato-s) (Y_{H₂/S}) consumida nos ensaios de fermentação foram calculados dividindo-se o volume de H₂ em mmol e o substrato consumido em mmol, conforme Equação 11:

$$Y_{H_2/S} = \frac{\Delta P}{\Delta S} \quad (\text{Equação 11})$$

Onde: Y_{H₂/S} é fator de conversão de substrato em produto no mesmo intervalo de tempo. ΔS em mmol é a diferença entre o número de mmols do substrato no início e no final do ensaio; ΔP é o número de mmols formado no período do ensaio.

O fator de célula em relação à glicose (substrato-s) (Y_{x/s}) consumida nos ensaios de fermentação foi calculado dividindo-se o crescimento celular em mmol e o substrato consumido em mmol, conforme a equação 12:

$$Y_{X/S} = \frac{\Delta X}{\Delta S} \quad (\text{Equação 12})$$

4.4.2- Cálculo das velocidades específicas de crescimento celular, de consumo de substrato e de produção de H₂.

As velocidades foram calculadas a partir do ajuste de curvas polinomiais aos valores de concentração celular (X), de concentração de substrato (S) e de concentração de H₂ (P) em função do tempo de fermentação que ocorreu entre 0 e 70 horas.

Sendo que a velocidade de crescimento (rx), de consumo de substrato (rs) e de produção de H₂ (rp) foi dada pela primeira derivada de X=f(t), S=f(t), e P=f(t), equações 13, 14 e 15, respectivamente.

$$rx = \frac{dx}{dt} ; \quad \text{(Equação 13)}$$

$$rs = \frac{ds}{dt} ; \quad \text{(Equação 14)}$$

$$rp = \frac{dp}{dt} ; \quad \text{(Equação 15)}$$

As velocidades específicas de crescimento celular (μ_x), de consumo de substrato (μ_s) e de produção de H₂ (μ_p) durante o período de duração dos ensaios cinéticos de fermentação foram obtidas dividindo-se as velocidade de crescimento (rx), de consumo de substrato (rs) e de produção de H₂ (rp) pela concentração de massa seca de células no tempo correspondente, de acordo com as Equações 16, 17, 18, respectivamente. A concentração celular em cada tempo foi obtida pela resolução da equação polinomial traçada aos pontos experimentais de X. Finalmente, através de um gráfico de μ versus tempo, foi obtido os $\mu_{\text{máx}}$, que nos indica as velocidades específicas máximas.

$$\mu_x = \frac{1}{X} \cdot \frac{dX}{dt} \quad (16)$$

Onde: r_x = velocidade de crescimento ($\text{g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$)

X = concentração celular (g.L^{-1})

μ_x = velocidade específica de crescimento (h^{-1})

$$\mu_s = \frac{1}{X} \cdot \frac{dS}{dt} \quad (17)$$

Onde: r_s = velocidade de consumo de substrato ($\text{mmol.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$)

S = concentração de substrato (mmol.L^{-1})

μ_s = velocidade específica de consumo ($\text{mmol/mgX.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$)

$$\mu_p = \frac{1}{X} \cdot \frac{dP}{dt} \quad (18)$$

Onde: r_p = velocidade de produção de H_2 ($\text{mmol.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$)

P = concentração de H_2 (mmol.L^{-1})

μ_p = velocidade de específica de produção ($\text{mmol H}_2/\text{mgX.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$)

4.4.3-Estimativa da concentração inibitória– CI_{50}

As velocidades específicas (μ_x , μ_s , μ_p), calculadas conforme descrito no item anterior, foram comparadas com as velocidades específicas máximas do controle, fazendo-se uma normatização destes valores, para a obtenção da velocidade relativa. As velocidades relativas consistem na razão entre as velocidades específicas máximas ($\mu_{\text{máx}}$) dos ensaios de fermentação com adição de cada

uma das concentrações dos inibidores e as velocidades específicas máximas dos ensaios sem a adição de inibidor (controle), conforme equação 19.

$$\text{Velocidade relativa} = \frac{\mu_{\text{máx inibidor}}}{\mu_{\text{máx controle}}} \quad (\text{Equação 19})$$

A partir destes resultados foi traçado um gráfico das velocidades relativas, em função das concentrações de cada um dos inibidores adicionados aos ensaios de fermentação. Estes resultados forneceram uma curva ao qual foi ajustado um modelo matemático, com o qual foi possível estimar a concentração de cada composto que inibiu 50% do crescimento celular, 50% do consumo do substrato e 50 % da produção de H₂, denominadas de Concentrações Inibitórias 50, ou CI₅₀, de acordo com Siqueira e Reginatto (2015).

Além desses parâmetros cinéticos, foi verificado o tempo (em horas) necessário para o início da produção de H₂ nos ensaios, denominada de lag fase e representada por λ . O volume máximo de H₂ produzido nos ensaios é representado por Máx H₂ em mililitro de H₂.

4.5-DETERMINAÇÕES ANALÍTICAS

4.5.1-Determinação da concentração celular

Para calcular a concentração celular foram realizadas leituras de densidade ótica (como mencionado anteriormente) para converter este valor em massa celular seca. Essa correlação somente

foi possível devido à obtenção de uma equação que relaciona D.O. a 600nm e a massa seca de diferentes suspensões de cultura, conforme descrito no item 4.2.

4.5.2-Determinação de Açúcares Redutores Totais (ART)

A análise quantitativa de açúcares redutores foi feita pelo método do ácido dinitrossalicílico - DNS (Miller, 1959). A curva padrão foi feita utilizando uma solução de glicose (Sigma-Aldrich) de 1,0 g/L e as concentrações utilizadas foram entre 0 e 1,0 g/L. A leitura da absorbância foi realizada em espectrofotômetro da Bellab modelo UV M-51 em comprimento de onda de 540 nm. Os testes foram feitos em triplicata.

4.5.3-Análise da composição do gás os biorreatores

A determinação da composição do gás durante os ensaios de fermentação foi realizada por cromatografia a gás (CG) de acordo com Han e Shin (2004), modificando-se a temperatura do detector para 100°C. A composição do gás do *headspace* foi avaliada por meio da retirada de 100µL de amostra do gás produzido no biorreator, utilizando-se uma seringa *gás-tight*. A análise foi realizada em um cromatógrafo a gás (Shimadzu –2014) equipado com detector de condutividade térmica (TCD). A coluna utilizada foi uma coluna empacotada, (Shin Carbon ST 100/120 mesh), peneira molecular 5A 2 m x 2 mm, sendo o gás de arraste, argônio ultra puro sob vazão de 30mL/min. As temperaturas do injetor, da coluna e do detector serão 80°C, 50°C e 100°C, respectivamente.

4.5.4-Análise dos metabólitos solúveis e dos inibidores

As concentrações dos subprodutos solúveis da fermentação, como os ácidos acético, butírico e láctico assim como o etanol e os inibidores HMF, ácido levulínico e ácido fórmico, foram determinadas por cromatografia líquida de alta eficiência – CLAE, utilizando um cromatógrafo Shimadzu (Japão). As condições utilizadas foram, coluna Aminex HPX-87H, fase móvel consistindo de H_2SO_4 (0,005 mol/L), fluxo de 0,6 mL/min (84 Kgf/cm²). Foi utilizado um sistema duplo de detecção (arranjo de diodo e índice de refração), onde somente o HMF e o AL utilizaram o sistema de arranjo de diodo nos comprimentos de onda de 280 e 190 nm, respectivamente. A aquisição e o tratamento dos dados foram realizados pelo software *Class* VP 6.1 (Shimadzu, Japão).

6- RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1- Ensaios cinéticos de produção de H₂ com diferentes concentrações de inibidores

Neste item serão apresentados os resultados relativos aos ensaios de fermentação para produção de H₂ com o *C. beijerinckii* Br21, utilizando a glicose como fonte de carbono (10 g/L) e diferentes concentrações de inibidores.

5-hidroximetilfurfural - HMF

As figuras 7A, 7B e 7C apresentam as concentrações de célula (X), de substrato (Glicose -S) e de produto (H₂) ao longo dos ensaios de fermentação contendo diferentes concentrações do inibidor HMF, bem como o ensaio controle (sem inibidor). Nestas figuras estão representados os ajustes polinomiais (linhas contínuas) feitos para as determinações das velocidades específicas de crescimento celular (μ_x), de consumo de substrato (μ_s) e de produção de H₂, (μ_{H_2}) que estão apresentadas na Tabela 3. As equações polinomiais completas e os seus coeficientes de correlações, bem como os gráficos das velocidades específicas em função do tempo estão apresentadas no anexo I.

Figura 7. Concentração celular (A), concentração de substrato (B) e concentração de produto- H_2 (C) durante os ensaios de fermentação contendo diferentes concentrações de HMF e o controle (apenas com glicose).

Nas figuras 7A e 7C pode ser observado que, de uma maneira geral, a adição de concentrações crescentes de HMF resultou em uma diminuição do crescimento do *C. beijerinckii* Br21, bem como na diminuição da concentração de H₂ produzido por este microrganismo, respectivamente. Já na Figura 7B, observa-se que o consumo de substrato não foi tão fortemente afetado quanto o crescimento e a produção de H₂. Enquanto que a adição de 1 g/L de HMF reduziu em 18,6 e 40,9% a concentração celular final e a concentração de H₂ finais, respectivamente, esta mesma concentração foi responsável por apenas 2,3% de diminuição do consumo do substrato com relação ao controle (tabela 3). Na maior concentração de HMF (2,5 g/L) houve uma redução de 63,2 e 91,7% da concentração celular e na concentração de H₂ finais, respectivamente. Porém, nesta mesma concentração de HMF (2,5 g/L) o consumo de substrato foi apenas 6,8% menor que o consumo de substrato no ensaio controle (tabela 3).

Na literatura diferentes efeitos do HMF têm sido relatados sobre o crescimento de microrganismos produtores de H₂. Enquanto Cao et al. (2009) observaram ausência de crescimento do microrganismo produtor de H₂ *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* W16 em concentrações acima de 2,0 g/L de HMF, Ezeji et al. (2007) observaram um estímulo no crescimento do *C. beijerinckii* BA 101 em concentrações de HMF superiores a 2,0 g/L. Da mesma forma, Clarkson et al. (2014) observaram um efeito positivo do HMF sobre o crescimento do *Thermoanaerobacter pseudethanolicus* 39E na presença de 1,26 g/L de HMF e utilizando glicose como fonte de carbono. Esse estímulo pode estar associado à capacidade de compostos derivados de furano, tais como o HMF, atuarem como aceptores alternativos para dissipação de elétrons no metabolismo desses microrganismos (IBRAHEEM et al., 2013).

Quanto à produção de H₂, o volume máximo de H₂ produzido (tabela 3) diminuiu de (366,7 ± 2,3 mL) nos ensaios controle (sem inibidor) para 30,2 mL em presença de 2,0 e 2,5 g/L de HMF, ou

seja, uma inibição de 92 % (figura 5C e tabela 3). Kumar et al. (2014) relataram a ausência de produção de H_2 na concentração de apenas 1,0 g/L de HMF utilizando uma cultura mista de microrganismos e glicose (15 g/L) como fonte de carbono. Porém, Quéméneur et al. (2011) utilizando cultura mista e xilose (5 g/L) e a mesma concentração de HMF (1,0 g/L) relatou uma inibição de apenas 35,7 % no volume de H_2 produzido. Anburajan et al. (2017) obtiveram uma inibição de 67,4% no volume de H_2 produzido pela adição de 2,7 g/L de HMF, em condições semelhantes às de Kumar et al. (2014), utilizando cultura mista e glicose (15 g/L) como fonte de carbono. Em um estudo realizado por Siqueira e Reginatto (2015), utilizando glicose como fonte de carbono, a adição de 1,0 g/L HMF em cultura mista resultou em uma redução de 79% na produção de H_2 . Lin et al. (2015) adicionando 1,9 g/L de HMF em uma cultura mista, na qual a espécie predominante era *Clostridium butyricum*, com glicose (10 g/L) como fonte de carbono, obteve cerca de apenas 4% de inibição na produção de H_2 .

Com relação à inibição de HMF sobre culturas puras produtoras de H_2 , Cao et al. (2009) verificaram uma queda de 50,2 % na produção de H_2 utilizando uma cultura pura de *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* W16 na presença de 1,0 g/L de HMF e ausência de produção acima de 1,5 g/L de HMF. Wang et al. (2015) utilizando *C. acetobutylicum* ATCC 824 e glicose (60 g/L) obtiveram total inibição da produção de H_2 com 5,19 g/L de HMF.

A tabela 3 sumariza os principais resultados obtidos a partir das figuras 7 A, B e C: o pH ao final dos ensaios, o tempo para o início da produção de H_2 (λ), o volume máximo de H_2 produzido, as velocidades específicas máximas de crescimento celular, de consumo de substrato e de produção de H_2 , o fator de conversão de substrato em produto ($Y_{p/s}$), o fator de conversão de substrato em célula ($Y_{x/s}$) e a porcentagem do consumo de glicose durante os ensaios.

Inibidor		Parâmetros							
HMF (g/L)	λ (h)	pH final	Máx H ₂ (mL)	$\mu_{x\text{máx}}$ (h ⁻¹)	$\mu_{sm\text{máx}}$ (mmol/ mgX.L.h)	$\mu_{H2\text{máx}}$ (mmolH ₂ /mgX.L.h)	$Y_{x/s}$ (mmolX/ mmol glicose)	$Y_{p/s}$ (mmolH ₂ /mmol glicose)	Consumo glicose (%)
0	12 ±	4,55 ±	366,7 ±	0,515 ±	0,0031 ±	0,0074 ±	166,1 ±	2,34 ±	66,95
	1,0	0,55	2,3	0,33	0,001	0,021	10,3	0,56	
0,5	12 ±	4,54 ±	329,3 ±	0,551 ±	0,0048 ±	0,0071 ±	114,7 ±	1,48 ±	69,48
	1,5	0,46	3,2	0,27	0,002	0,020	11,6	0,44	(+2,53)
1	21 ±	4,74 ±	216,7 ±	0,355 ±	0,0040 ±	0,0023 ±	88,7 ±	0,575 ±	64,57
	2,0	0,24	1,8	0,22	0,002	0,016	7,3	0,28	(-2,38)
1,5	44 ±	4,84 ±	125,6 ±	0,256 ±	0,0048 ±	0,001 ±	53,3 ±	0,21 ±	59,43
	1,5	0,22	2,3	0,30	0,001	0,0012	9,3	0,30	(-7,52)
2	52 ±	4,78 ±	30,2 ±	0,171 ±	0,0040 ±	0,0004 ±	42,7 ±	0,10 ±	58,45
	2,5	0,43	3,5	0,29	0,003	0,0003	6,7	0,17	(-8,5)
2,5	56 ±	4,77 ±	30,2 ±	0,130 ±	0,0027 ±	0,0001 ±	39,3 ±	0,03 ±	60,09
	2,0	0,47	3,5	0,18	0,005	0,0001	5,3	0,11	(-6,86)

Tabela 3. Tempo para o início da produção de H₂ (λ), pH final, volume máximo de H₂, velocidade específica máxima de crescimento celular, consumo de substrato e produção de H₂, fator de conversão de substrato em célula e de substrato em produto e consumo de glicose (diferença em relação ao controle, entre parênteses) obtidos a partir dos ensaios cinéticos de produção de H₂ por fermentação com adição de diferentes concentrações de HMF.

O tempo para o início da produção de H₂ (λ) (tabela 3) sofreu um aumento com a adição de concentrações crescentes de HMF, variando de 12 h, no controle, a 56 h no ensaio com a maior concentração de HMF (2,5 g/L). Este mesmo efeito pode ser observado por Quéméneur et al. (2011) e Kumar et al. (2014) pela adição de 0,3 a 1,0 g/L de HMF, utilizando cultura mista para produção de H₂, os quais observaram um aumento da fase lag de 6,2 h. Sharma et al. (2017) também observaram um aumento de 7 h do tempo para o início da produção de H₂ com aumento na concentração de HMF em uma co-cultura de *Enterobacter aerogenes* e *E. coli*. Porém, em um estudo com cultura mista realizado por Siqueira e Reginatto (2015), a adição de crescentes concentrações de HMF não causou aumento significativo do tempo para o início da produção de H₂.

O pH final dos ensaios fermentativos não apresentou variação significativa com o aumento das concentrações de HMF utilizada nos ensaios. Todos os ensaios apresentaram um pH final entre 4,5 – 4,8, o que condiz com o esperado para a fase acidogênica do metabolismo de *Clostridium* sp.

O $Y_{x/s}$ (fator de conversão de substrato em célula) decresceu com o aumento das concentrações de HMF utilizadas, chegando a atingir uma diminuição de 76,4% na maior concentração de HMF (2,5 g/L). Portanto nota-se que ocorre uma inibição da biomassa celular (média) produzida por unidade de massa de substrato consumido com o aumento das concentrações de HMF utilizadas nos ensaios de fermentação.

O rendimento ($Y_{p/s}$), que indica o quanto do substrato consumido foi utilizado na produção de H_2 sofreu um decréscimo significativo nas concentrações de 2,0 e 2,5 g/L de HMF, de 95,6 e 98,7% (tabela 3). Anbujeeran et al. (2017) constatou uma diminuição de 68,1% no $Y_{p/s}$ utilizando 2,7 g/L de HMF no rendimento de uma cultura mista.

Como pode ser observado na figura 7B e resumido na tabela 3, o consumo de glicose sofreu pouca variação em todos os ensaios, sendo que a menor porcentagem de consumo ocorreu na concentração de 2,0 g/L de HMF (58,45 %) apenas 8,5% menor que o controle. Além disso, pode-se notar um aumento na porcentagem do consumo de glicose com baixa concentração (0,5 g/L) de HMF, representando um estímulo de cerca de 2,53% ao consumo de glicose. Porém, este leve aumento no consumo de glicose não foi traduzido em crescimento celular e produção de H_2 , conforme relatado por outros autores. Sharma et al. (2017) verificaram que a utilização de HMF em baixa concentração (0,25 g/L) causava um estímulo na produção de H_2 de cerca de 13%. Entretanto, Kumar et al. (2014) observaram que uma pequena variação no consumo de glicose de 0,99% entre o controle e o ensaio com 1,0 g/L de HMF com cultura mista, não promoveu aumento na produção de H_2 .

Na tabela 3 também estão apresentadas as velocidades específicas de crescimento celular, (μ_x), de consumo de glicose (μ_s) e de produção de H_2 (μ_{H_2}), para o controle e nos ensaios com

diferentes concentrações de HMF, respectivamente. Estas velocidades foram às utilizadas para os cálculos das CI_{50} , apresentadas no próximo item deste trabalho (item 6.2).

Portanto, o HMF apresenta diferentes efeitos dependendo do microrganismo produtor de H_2 estudado. Alguns autores relatam efeito estimulatório em baixas concentrações de HMF, mas acima de 1 g/L parece ocorrer a inibição dos microrganismos produtores de H_2 . Neste trabalho foi verificado uma inibição do *C. beijerinckii* Br21 quase que total da produção de H_2 em concentração acima de 2 g/L.

Ácido Levulínico – AL

As figuras 8A, 8B e 8C apresentam as concentrações de célula (X), de substrato (Glicose -S) e de produto (H_2) ao longo dos ensaios de fermentação contendo diferentes concentrações do inibidor AL, bem como o ensaio controle (sem inibidor). Nestas figuras estão representados os ajustes polinomiais (linhas contínuas) feitos para as determinações das velocidades específicas de crescimento celular (μ_x), de consumo de substrato (μ_s) e de produção de H_2 , (μ_{H_2}) que estão apresentadas na Tabela 4. As equações polinomiais completas e os seus coeficientes de correlações e os gráficos das velocidades específicas em função do tempo estão apresentadas no anexo I.

Figura 8. Concentração celular (A), concentração de substrato (B) e concentração de H_2 (C) durante os ensaios de fermentação contendo diferentes concentrações de AL e o controle (apenas com glicose).

Nas figuras 8A e 8C pode ser observado que a adição de concentrações crescentes de AL resultou em uma diminuição do crescimento do *C. beijerinckii* Br21, bem como na diminuição do volume de H₂ produzido por este microrganismo. Porém, na Figura 8B, nota-se que o consumo de substrato sofreu pequena variação entre as diferentes concentrações de AL, mas variações expressivas com relação ao controle. A adição de 3 g/L de AL reduziu em 55,9 e 60,7% a concentração celular final e a concentração de H₂ produzido, respectivamente. Esta mesma concentração foi responsável por 38,9% de diminuição do consumo do substrato, valores superiores aos obtidos com o HMF. Na maior concentração de AL (4 g/L) não foi observado crescimento celular e nem produção de H₂ (tabela 4), já o consumo de substrato foi 60,7% menor que o consumo do ensaio controle, mostrando forte efeito inibitório nessa concentração.

Na literatura existem poucos estudos relatando o efeito inibitório do AL sobre o crescimento de microrganismos produtores de H₂. Conforme observado neste trabalho, o crescimento celular sofre inibição com o aumento da concentração de AL. Porém, em um estudo realizado por Lee et al. (2015), não foi observado inibição de crescimento celular em uma cultura de *Clostridium* sp. em concentrações que variaram de 0,5 a 2,0 g/L de AL. A inibição causada no crescimento de microrganismos por ácidos orgânicos fracos ocorre devido a uma redução do pH intracelular, pois os ácidos não dissociados penetram facilmente pela membrana e sofrem dissociação no interior da célula liberando prótons e ânions que afetam as atividades celulares (AXE et al., 1995).

O volume máximo de H₂ produzido apresentou uma diminuição de $355,3 \pm 3,5$ mL dos ensaios controle (sem inibidor) para 0 mL na presença de 4 g/L de AL, ou seja, inibição de 100% (Figura 8C e Tabela 4). Kumar et al. (2014) observaram diminuição de 97,4% na velocidade de produção de H₂ com 5,0 g/L de AL utilizando cultura mista e 15 g/L de glicose como fonte de carbono para a produção de H₂. Comparando-se os resultados de Kumar et al. (2014) com este

trabalho pode-se verificar que a cultura mista foi um pouco mais resistente ao AL do que o *C. beijerinckii* Br21.

A tabela 4 mostra os principais resultados obtidos a partir das figuras 8 A, B e C: o pH ao final dos ensaios, o tempo de para o início da produção de H_2 (λ), o volume máximo de H_2 produzido, as velocidades específicas máximas de crescimento celular, de consumo de substrato e de produção de H_2 , o fator de conversão de substrato em produto ($Y_{p/s}$), o fator de conversão de substrato em célula ($Y_{x/s}$) e a porcentagem do consumo de glicose durante os ensaios.

Inibidor		Parâmetros							
AL (g/L)	λ (h)	pH final	Máx H_2 (mL)	$\mu_{xmáx}$ (h^{-1})	$\mu_{smáx}$ (mmol/mgX .L.h)	$\mu_{H_2máx}$ (mmolH ₂ /mgX.L.h)	$Y_{x/s}$ (mmolX/ mmol glicose)	$Y_{p/s}$ (mmolH ₂ / mmol glicose)	Consumo glicose (%)
0	12 ±	4,55 ±	355,5 ±	0,516 ±	0,0032	0,0076	161,25 ±	2,36 ±	70,21
	1,0	0,35	3,5	0,43	± 0,05	± 0,03	9,2	0,43	
1,0	12 ±	4,60 ±	212,9 ±	0,449 ±	0,004 ±	0,0075	112,25 ±	1,87 ±	47,12
	2,0	0,32	2,1	0,21	0,023	± 0,02	10,1	0,37	(-23,09)
2,0	12 ±	4,59 ±	135,3 ±	0,280 ±	0,0042	0,0066	66,66 ± 8,3	1,57 ±	50,36
	1,0	0,18	1,2	0,35	± 0,024	± 0,02		0,27	(-19,85)
3,0	22 ±1,5	4,72 ±	133,1 ±	0,082 ±	0,0053	0,0003	15,47 ± 7,3	0,05 ±	38,95
		0,29	3,1	0,17	± 0,037	± 0,00		0,22	(-31,26)
3,5	46 ±	4,71 ±	30,1 ±	0,127 ±	0,0051	0,0001	24,90 ± 5,7	0,01 ±	40,92
	1,5	0,26	4,5	0,28	± 0,033	± 0,00		0,16	(-29,29)
4,0	0 ± 0	4,69 ±	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	9,45
		0,21							(-60,76)

Tabela 4. Tempo para o início da produção de H_2 (λ), pH final, volume máximo de H_2 , velocidade específica máxima de crescimento celular, consumo de substrato e produção de H_2 , fator de conversão de substrato em célula e de substrato em produto e consumo de glicose (diferença em relação ao controle, entre parênteses) obtidos a partir dos ensaios cinéticos de produção de H_2 por fermentação com adição de diferentes concentrações de AL.

O tempo para o início da produção de H_2 (λ) que foi de 12 h no controle permaneceu o mesmo nos ensaios até 2,0 g/L de AL, aumentando de 12 para 46 h em 3,5 g/L de AL. A partir de 4,0 g/L não houve produção de H_2 . O volume máximo de H_2 caiu em 89,5% com a adição de 3,5 g/L de AL. Kumar et al. (2014) observaram redução de 96,8% em 5,0 g/L de AL com cultura mista em glicose, em galactose observaram uma redução de 97,5% nesta mesma concentração de galactose. No

mesmo estudo de Kumar et al. (2014) o aumento do tempo para início da produção de H_2 também foi observado para adições crescentes de AL e a inibição no volume máximo de H_2 foi de 96,8% na concentração de 5,0 g/L.

O pH final dos ensaios fermentativos não apresentou variação significativa com o aumento das concentrações de AL utilizada. Todos os ensaios apresentaram um pH final entre 4,5 – 4,7, o que condiz com o esperado para a fase acidogênica do metabolismo de *Clostridium* sp.

O consumo de glicose observado na figura 8B e resumido na tabela 4 sofreu uma variação média entre 19,8 e 31,2% em relação ao ensaio controle na presença de até 3,5 g/L de AL. Porém, houve uma grande variação em relação ao ensaio com 4,0 g/L de AL, onde é observado uma diferença de 60,8% em relação ao ensaio controle, no qual foi observado um consumo de 70,2% do substrato. Estes resultados diferem bastante de Kumar et al. (2014) que relataram uma diminuição de apenas 2,53% no consumo de glicose para 5,0 g/L de AL em relação ao controle, utilizando cultura mista de microrganismos. Obviamente a utilização de cultura mista permite que outros microrganismos, não produtores de H_2 consumam o substrato, sem ser inibidos pelo AL.

O $Y_{x/s}$ (fator de conversão de substrato em célula) apresentou decréscimo com o aumento das concentrações de AL utilizadas, chegando a atingir uma inibição de 100% na maior concentração de AL utilizada (4,0 g/L). Este resultado mostra que não houve produção de biomassa celular (média) por unidade de massa de substrato consumido nesta concentração de AL utilizada no ensaio de fermentação.

O $Y_{p/s}$ também sofreu um decréscimo significativo nas concentrações de 3,5 e 4,0 g/L de AL, sendo de 99,1 e 100%, respectivamente. Kumar et al. (2014) registraram inibição de rendimento de 97,5% nas mesmas condições citadas anteriormente, mas utilizando cultura mista de microrganismos. Portanto, pode-se dizer mais uma vez que a cultura mista parece ser mais resistente aos inibidores do

que a cultura pura, devido à presença de uma maior diversidade de microrganismos que leva a um efeito distinto do inibidor sobre cada organismo.

Na tabela 4 também estão apresentadas as velocidades específicas de crescimento celular, (μ_x), de consumo de glicose (μ_s) e de produção de H_2 (μ_{H_2}), para o controle e nos ensaios com diferentes concentrações de AL, respectivamente. Estas velocidades foram às utilizadas para os cálculos das CI_{50} , apresentadas no próximo item deste trabalho (item 6.2).

A velocidade específica máxima de produção de H_2 e de crescimento celular apresentam um decréscimo elevado a partir da concentração de 3,0 g/L, onde foi registrada uma inibição de 96 e 84,1%, respectivamente e chegando em 100% com 4,0 g/L de AL.

Portanto, o AL se mostra um forte inibidor de crescimento celular, consumo de substrato e produção de H_2 , sendo que em concentrações mais elevadas (acima de 3,0 g/L) afetaram fortemente o *C. beijerinckii* Br21.

Ácido Fórmico – AF

As figuras 9A, 9B e 9C apresentam as concentrações de célula (X), de substrato (Glicose -S) e de produto (H_2) ao longo dos ensaios de fermentação contendo diferentes concentrações do inibidor AF, bem como o ensaio controle (sem inibidor). Nestas figuras estão representados os ajustes polinomiais (linhas contínuas) feitos para as determinações das velocidades específicas de crescimento celular (μ_x), de consumo de substrato (μ_s) e de produção de H_2 , (μ_{H_2}) que estão apresentadas na Tabela 5. As equações polinomiais completas e os seus coeficientes de correlações e os gráficos das velocidades específicas em função do tempo estão apresentadas no anexo I.

Figura 9. Concentração celular (A), concentração de substrato (B) e concentração de H_2 (C) durante os ensaios de fermentação contendo diferentes concentrações de AF e o controle (contendo apenas glicose).

Nas figuras 9A, 9B e 9C pode ser observado que a adição de concentrações crescentes de AF resultou em uma diminuição do crescimento do *C. beijerinckii* Br21, no consumo do substrato, bem como na diminuição da concentração de H₂ produzido por este microrganismo. Porém, na Figura 9, nota-se que estas variáveis foram mais afetadas nas concentrações mais elevadas de AF (1,5 e 2,0 g/L).

A adição de 1,5 g/L de AF reduziu em 81,3 e 90,4% a concentração celular e a concentração de H₂ produzido pelo *C. beijerinckii* Br21, respectivamente. Esta mesma concentração foi responsável por 34,3% de diminuição do consumo do substrato, em relação ao controle (figura 9B e tabela 5). Na maior concentração de AF (2,0 g/L) não foi observado crescimento celular, tampouco produção de H₂, enquanto que o consumo de glicose foi de apenas 12,7%. Em um estudo realizado por Wang et al. (2015) utilizando a cultura pura do *C. acetobutylicum* ATCC 824 e 60 g/L de glicose como fonte de carbono, não foram observados crescimento celular, consumo de substrato e produção de H₂ nas concentrações de 5,41, 4,36 e 2,05 g/L de AF. Estes resultados são semelhantes aos deste trabalho, uma vez que em 2,0 g/L de AF não foi observado crescimento celular.

Na literatura há poucos estudos a respeito da ação do AF sobre o crescimento de microrganismos produtores de H₂. Porém, a sua ação sobre os microrganismos é similar ao do AL, por também se tratar de um ácido fraco, causa um desequilíbrio iônico na célula.

Quanto à produção de H₂, o volume máximo de H₂ diminuiu de $325,3 \pm 3,5$ mL no ensaio controle (sem inibidor) para 0 mL na presença de 2,0 g/L de AF, ou seja, inibição de 100% (Figura 9C e Tabela 5). As maiores porcentagens de inibição foram observadas para as concentrações 1,5 e 2,0 g/L, 85,2 e 100%, , respectivamente. Esse aumento na inibição não foi observado por Kumar et al. (2014) trabalhando com cultura mista, que obteve uma inibição de apenas 69,4% sobre a produção de H₂ em concentrações muito mais elevadas de AF (20 g/L) do que a utilizada neste trabalho (2

g/L). Estes resultados evidenciam novamente a maior resistência de culturas mistas aos inibidores devido à variedade de microrganismos presentes, dentre os quais pode haver consumidores do AF.

A tabela 5 apresenta os principais resultados obtidos a partir das figuras 9 A, B e C: o pH final dos ensaios, o tempo para o início da produção de H_2 (λ), o volume máximo de H_2 produzido, as velocidades específicas máximas de crescimento celular, consumo de substrato e produção de H_2 , o fator de conversão de substrato em produto ($Y_{p/s}$), o fator de conversão de substrato em célula ($Y_{x/s}$) e a porcentagem do consumo de glicose em relação ao início do ensaio.

Inibidor		Parâmetros							
AF (g/L)	λ (h)	pH final	Máx H_2 (mL)	$\mu_{x\text{máx}}$ (h ⁻¹)	$\mu_{s\text{máx}}$ (mmol/ mgX.L.h)	$\mu_{H_2\text{máx}}$ (mmolH ₂ / mgX.L.h)	$Y_{x/s}$ (mmolX/ mmol glicose)	$Y_{p/s}$ (mmolH ₂ / mmol glicose)	Consumo glicose (%)
0	12 ±	4,53 ±	325,3 ±	0,48 ±	0,101 ±	0,0054	4,77 ±	0,05 ±	69,24
	1,0	0,30	2,7	0,40	0,23	± 0,03	1,4	0,20	
0,5	12 ±	4,59 ±	279,3 ±	0,53 ±	0,0001	0,0058	53 ± 12	36,25 ±	66,39
	1,0	0,18	2,9	0,27	± 0,00	± 0,03		20,4	(-2,85)
1,0	12 ±	4,75 ±	247,2 ±	0,41 ±	0,006 ±	0,0034	61,19 ±	0,50 ±	64,74
	1,0	0,27	1,8	0,32	0,03	± 0,02	10,2	0,18	(-4,5)
1,5	44 ±	4,61 ±	30,4 ±	0,23 ±	0,005 ±	0,0008	43,33 ±	0,14 ±	34,94
	2,0	0,22	3,2	0,19	0,02	± 0,00	9,3	0,33	(-34,3)
2,0	0 ± 0	4,58 ±	0 ± 0	0 ± 0	0,036 ±	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	12,71
		0,33			0,03				(-56,5)

Tabela 5. Tempo para o início da produção de H_2 (λ), pH final, volume máximo de H_2 , velocidade específica máxima de crescimento celular, consumo de substrato e produção de H_2 , fator de conversão de substrato em célula e de substrato em produto e consumo de glicose (diferença em relação ao controle) obtidos a partir dos ensaios cinéticos de produção de H_2 por fermentação com adição de diferentes concentrações de AF.

O tempo de para o início da produção de H_2 (λ) foi de 12 h para os ensaios contendo 0,5 e 1,0 g/L de AF, aumentando para 44 h em 1,5 g/L de AF. Kumar et al. (2014) registraram um aumento para o início da produção de H_2 de 5,1 h utilizando 20 g/L de AF em relação ao controle (sem AF) com cultura mista. O volume máximo de H_2 diminuiu 24, 90,6 e 100% pela adição de 1,0, 1,5 e 2,0 g/L de AF, respectivamente. Kumar et al. (2014) relataram uma diminuição 42 e 92% no volume

máximo de H_2 produzido por cultura mista, na presença de 20 g/L de AF, utilizando glicose e galactose como substratos, respectivamente.

O pH final dos ensaios fermentativos não apresentou variação significativa com o aumento das concentrações de AF utilizada nos ensaios. Todos os ensaios apresentaram um pH final entre 4,5 – 4,7, o que condiz com o esperado para a fase acidogênica do metabolismo de *Clostridium* sp.

O consumo de glicose observado na figura 9B e resumido na tabela 5, sofreu variação com o aumento da concentração de AF utilizada, ocorrendo maior diminuição na concentração de 2,0 g/L de AF, onde observou-se apenas 12,7% de consumo. Kumar et al. (2014) observaram uma diminuição de 1,84% no consumo de glicose para ensaios com 20 g/L de AF em relação ao controle, utilizando cultura mista. Por outro lado, os mesmos autores verificaram completa inibição no consumo de substrato em valores inferiores a 5,0 g/L de AF, quando galactose foi utilizada como substrato. Wang et al. (2015) observaram total consumo de glicose na presença de 4,36 g/L de AF utilizando uma cultura pura de *C. acetobutylicum* ATCC 824 e glicose (60 g/L).

Os fatores de conversão de substrato em produto ($Y_{p/s}$) e de substrato em célula ($Y_{x/s}$) apresentam inconstância no decorrer dos ensaios, porém mostram total inibição em 2,0 g/L. Em seu estudo Kumar et al. (2014) relata diminuição de apenas 41,9% no $Y_{p/s}$ em 20 g/L de AF.

As velocidades específicas máximas de crescimento celular ($\mu_{x\text{máx}}$) e produção de H_2 ($\mu_{H_2\text{máx}}$), representadas na tabela 5 apresentam diminuição com o aumento da concentração de AF, porém com exceção à menor concentração de AF (0,5 g/L), onde foi observado um leve estímulo das velocidades específicas máximas de crescimento celular e produção de H_2 .

Portanto, os 3 compostos inibidores avaliados promoveram diminuição, especialmente do crescimento celular e na produção de H_2 pelo *C. beijerinckii* Br21. O consumo de substrato foi afetado em menor grau e chegou a ser estimulado na presença de 0,5 g/L de HMF.

6.2- Estimativa da CI_{50} dos inibidores

Para estimar o grau de inibição dos compostos inibidores avaliados utilizou-se um conceito da toxicologia que fornece a quantidade de uma dada substância (inibidor) que inibe a metade da atividade metabólica de um organismo, denominada de concentração inibitória 50 ou CI_{50} . Neste caso, as atividades metabólicas consideradas foram às velocidades específicas máximas de crescimento celular, de consumo de substrato e de produção de H_2 , ou seja, o $\mu_{\text{máx}}$, μ_s e μ_{H_2} , respectivamente. A razão entre o $\mu_{\text{máx}}$ do ensaio com o inibidor e o $\mu_{\text{máx}}$ do ensaio controle forneceu o μ_{relativo} , apresentado nas figuras 10, 11 e 12. Os resultados forneceram um modelo matemático com o qual foi possível estimar a concentração dos compostos que inibiu 50% a produção de H_2 e estão representados na Figura 10. Portanto, a concentração do inibidor que promoveu 50% de inibição em relação ao controle ($\mu_{\text{relativo}}=0,5$) foi considerada a CI_{50} . As CI_{50} para a produção de H_2 para o HMF, AL e AF foram 0,90 g/L, 2,50 g/L e 1,15 g/L, respectivamente.

Figura 10. Velocidade relativa de produção de H₂ em função da concentração do inibidor e as equações polinomiais que auxiliaram na estimativa de CI₅₀.

O menor valor de CI₅₀ obtido foi do HMF (0,90 g/L), indicando que este composto apresenta maior inibição sobre a produção de H₂ pelo *C. beijerinckii* Br21, quando comparado aos demais compostos. Esse valor é superior ao encontrado por Kumar et al. (2014) que foi de 0,59 g/L, utilizando uma cultura mista e glicose como substrato, valor similar ao de 0,48 g/L obtido por Siqueira e Reginatto (2015) também com cultura mista. Porém, este valor é inferior aos valores de 3,0 g/L encontrado por Wang et al. (2015) utilizando *C. acetobutylicum* ATCC 824 e de 1,37 g/L obtido por Park et al. (2011) utilizando cultura mista. Em um estudo mais recente, Anburajan et al. (2017) usando cultura mista e glicose obteve uma inibição da produção de H₂ de 50% com 2,19 g/L de HMF.

Os valores de CI_{50} encontrados neste estudo para o AL e AF, 2,5 e 1,15 g/L foram distintos dos encontrados por Kumar et al. (2014) utilizando galactose como substrato e uma cultura mista. Os autores obtiveram um valor de CI_{50} inferior para o AL de 1,33 g/L e superior para o AF de 2,99 g/L. No estudo realizado por Wang et al. (2015) utilizando *C. acetobutylicum* ATCC 824 e glicose (60 g/L), a CI_{50} obtida para o AF foi de 0,179 g/L, valor muito inferior ao encontrado nesse estudo.

Os valores de CI_{50} obtido nesse estudo mostram que o HMF possui o maior poder de inibição sobre a produção de H_2 pelo *C. beijerinckii* Br21, comparado ao AL e AF. Compostos derivados de furano como HMF conseguem penetrar no citoplasma com facilidade e o seu principal efeito é a inibição de enzimas como a piruvato desidrogenase e a aldeído desidrogenase (MODIG et al., 2002). Além disso, podem causar danos nos polinucleotídeos, inibir a síntese de RNA, diminuir o pH intracelular e induzir ao estresse oxidativo (ALLEN et al., 2010; HEER et al., 2009; MILLS et al., 2009).

Dentre os ácidos orgânicos o AF apresentou um valor de CI_{50} menor do que o AL e, portanto maior inibição sobre a produção de H_2 pelo *C. beijerinckii* Br21. Mills et al. (2009) relataram que o AF possui um poder mais tóxico em relação a outros compostos pelo fato dele permear facilmente a membrana de microrganismos.

Utilizando o mesmo conceito que foi utilizado no cálculo da CI_{50} para a produção de H_2 , foram calculadas as CI_{50} para o crescimento celular e para o consumo de substrato. Os valores de CI_{50} obtidos para o crescimento celular do HMF, AL e AF foram de 1,42, 2,08 e 1,46 g/L, respectivamente (figura 11).

Figura 11. Velocidade relativa de crescimento celular em função da concentração do inibidor e as equações polinomiais que auxiliaram na estimativa de CI_{50} .

Wang et al. (2015) determinaram a CI_{50} do crescimento celular e consumo de glicose para HMF e AF utilizando uma cultura *C. acetobutylicum* ATCC 824, onde os valores para HMF foram de 2,31 e 3,19 g/L, respectivamente. Com relação ao AF os valores obtidos foram de 0,32 e 2,08 g/L, respectivamente. Os valores para o HMF são similares aos obtidos neste estudo, já para o AF os valores obtidos são diferentes aos deste estudo, indicando que o *C. beijerinckii* Br21 parece apresentar mais resistência ao AF, fato esse que foi relatado em um estudo feito por Haeng cho et al. (2012), onde foi observado a presença de uma enzima, a formiato desidrogenase (FDH) em *C. beijerinckii* e ausente em *C. acetobutylicum*, o que justifica a maior resistência do *C. beijerinckii* ao AF, uma vez que esta enzima seja responsável pela oxidação desse ácido a CO_2 . Clarkson et al.

(2014) obtiveram uma CI_{50} de crescimento celular para HMF de 2,0 g/L, utilizando *Thermoanaerobacter pseudethanolicus* 39E em glicose, ou seja, valor superior ao deste estudo.

A figura 12 apresenta a CI_{50} para o consumo de substrato para o HMF, AL e AF, os quais foram 3,23, 3,79 e 0,43 g/L, respectivamente (figura 12). Estes resultados indicam que o AF atuou mais sobre o consumo de substrato, enquanto que o HMF e o AL tem menor efeito sobre este parâmetro.

Figura 12. Velocidade relativa de consumo de substrato em função da concentração do inibidor e as equações polinomiais que auxiliaram na estimativa de CI_{50} .

Esses resultados demonstraram que ácidos fracos, como AF são capazes de atuar mais sobre o crescimento celular e o consumo de substrato (devido à baixa concentração obtida pela CI_{50}), enquanto HMF parece atuar mais diretamente sobre a via de produção de H_2 .

6.3- Metabólitos solúveis gerados durante a fermentação na presença de diferentes concentrações de inibidores

A diferença entre a concentração dos metabólitos solúveis no início e no fim dos ensaios de fermentação com o *C. beijerinckii* Br21 com a adição das diferentes concentrações de HMF, AL e AF, estão apresentados nas Figuras 13, 14 e 15, respectivamente. A análise dos metabólitos é de extrema importância, pois pode indicar o que está ocorrendo com as vias metabólicas do *Clostridium* sp. na presença dos inibidores. A quantificação destes metabólitos auxilia também a identificar o destino do substrato consumido, uma vez que o consumo do substrato foi o fator menos afetado pela adição dos inibidores.

5-hidroximetilfurfural - HMF

A figura 13 mostra as concentrações de metabólitos solúveis nos ensaios com adição de diferentes concentrações de HMF e o controle.

Figura 13. Concentração de metabólitos solúveis e consumo de HMF ao final dos ensaios de fermentação para produção de H_2 com diferentes concentrações de HMF e glicose (10 g/L).

Nos ensaios com adição de HMF puderam ser identificados os ácidos acético, butírico e láctico, assim como etanol. Os ácidos acético e butírico são os metabólitos diretamente relacionados com a produção de H_2 pelo *Clostridium* sp., conforme descrito no item 3.4 (VAZQUEZ e VARALDO, 2009; SINHA e PANDEY., 2011). Portanto, estes são os subprodutos mais desejados, quando o objetivo da fermentação pelo *Clostridium* sp. é a produção do H_2 . Quando o ácido acético é o subproduto da fermentação da glicose pelo *Clostridium* sp. 4 mols de H_2 por mol de glicose são gerados, mas quando o ácido butírico é o subproduto apenas 2 mols de H_2 por mol de glicose são obtidos (SINHA e PANDEY, 2011).

De uma maneira geral foi observado um aumento na concentração de etanol e ácido láctico, comparado ao controle, especialmente nas concentrações mais baixas de HMF (0,5 e 1,0 g/L). O aumento na concentração de etanol nos ensaios com adição do inibidor foi observado em todos os ensaios, exceto no ensaio com 2,5 g/L de HMF.

Tanto a concentração de ácido acético, quanto à de butírico diminuíram em relação ao controle com a adição de concentrações crescentes de HMF, por outro lado o ácido láctico e o etanol aumentaram com o aumento da concentração deste inibidor. Tanto a formação do ácido láctico, quanto à de etanol não estão relacionadas com a produção de H_2 , muito pelo contrário, estes compostos competem pelos equivalentes redutores para a formação de H_2 (VAZQUEZ e VARALDO, 2009; SINHA e PANDEY., 2011). Efeito parecido foi relatado por Kumar et al. (2014) utilizando cultura mista, por Sharma et al. (2017) utilizando uma co-cultura de *Enterobacter aerogenes* e *E. coli*, e por Anburajan et al. (2017) também utilizando cultura mista. Nestes trabalhos, os autores relataram a diminuição da concentração de ácido acético e butírico e o aumento da concentração de ácido láctico com aumento da concentração de HMF. Quéméneur et al. (2012) utilizando 1g/L de HMF em seus ensaios de fermentação não observaram mudança significativa em relação ao controle na concentração de ácido butírico e acético utilizando cultura mista e glicose. Porém Liu et al. (2015) verificaram que o HMF estimulou a via do ácido acético em detrimento da via do ácido butírico com aumento das concentrações de HMF, efeito que também foi observado neste trabalho com o *C. beijerinckii* Br21. Siqueira e Reginatto (2015) em trabalho com cultura mista relataram o aumento da concentração de etanol e ácido láctico com aumento da concentração de HMF nos ensaios de fermentação.

Na figura 13 pode ser verificado que o HMF foi consumido em todas as concentrações adicionadas, sendo que na concentração mais baixa este consumo chegou a quase 100%, indicando uma provável capacidade de metabolização deste inibidor pelo microrganismo estudado. O consumo de HMF variou entre 96,8 a 33,7%, nos ensaios com 0,5 e 2,5 g/L de HMF, respectivamente. Portanto, em concentrações baixas o HMF foi de alguma forma metabolizado pelo *C. beijerinckii* Br21. O consumo do HMF tem sido relacionado à capacidade do microrganismo em converter este

composto em álcool furfúrico, que não é tóxico para a célula, como forma de defesa (EZEJI et al., 2010; BARAL et al., 2014). Isto é possível pela existência da enzima álcool desidrogenase dependente de NADH em alguns organismos produtores de H_2 , como foi relatado por Palmqvist e Hahn-Hagerdal (2000). O que está de acordo com o esperado para o *C. beijerinckii* Br21, pois este microrganismo apresenta em seu genoma 5 genes de álcool desidrogenase (Alcohol dehydrogenase - EC 1.1.1.1), detectados através de sequenciamento genômico realizado no CTBE (Campinas-SP).

Ácido levulínico - AL

A figura 14 apresenta as concentrações de metabólitos solúveis e consumo do AL ao final dos ensaios de fermentação com diferentes concentrações de AL e o controle.

Figura 14. Concentração de metabólitos solúveis e consumo de ácido levulínico ao final dos ensaios de fermentação para produção de H_2 com diferentes concentrações de ácido levulínico e glicose (10 g/L).

Nos ensaios com a adição de AL pode ser identificada apenas a presença de ácido butírico, entretanto a sua concentração diminuiu com a adição de concentrações crescentes de AL. O *C. beijerinckii* Br21 foi capaz de metabolizar o AL, mas esta capacidade também diminuiu com o

aumento da concentração do inibidor. O maior consumo de AL foi atingido na menor concentração de 1,0 g/L, ou seja 89,8%. Em 3 g/L o consumo de AL diminuiu para 16%. Este consumo pode ser interpretado como um mecanismo de defesa do microrganismo para tentar se recuperar dos efeitos nocivos causados por estas substâncias inibidoras (MILLS et al., 2009). No caso dos ácidos orgânicos, no início do ensaio de fermentação, estes estão parcialmente protonados, mas no decorrer da fermentação, com o decaimento do pH, estes se tornam cada vez mais protonados e são capazes de penetrar na célula. No interior eles desprotonam aumentando a concentração de H^+ interna que para manter seu pH interno constante a célula deve bombear esse excesso de prótons utilizando ATP, o que gera grande gasto de energia e consequentemente a morte celular (LOHMEIER-VOGEL et al., 1998; ELBESHBISHY et al., 2017).

Kumar et al. (2014) estudaram o efeito do AL sobre uma cultura mista, utilizando galactose como fonte de carbono. Os autores detectaram tanto a presença de ácido acético, quanto de butírico em seus ensaios, porém em concentrações crescentes de AL foi observado o aumento na concentração de ácido acético e diminuição do ácido butírico. Entretanto, quando os autores substituíram a fonte de carbono por glicose foi observada a diminuição de ambos os ácidos, acético e butírico, com o aumento da concentração de inibidor. Em outro estudo realizado por Lee et al. (2015) com cultura mista e glicose foi verificado que em concentrações superiores a 2,0 g/L de AL não ocorria a produção de ácido butírico e uma produção muito baixa de acético. Entretanto, o AL favoreceu apenas a formação de ácido butírico pelo *C. beijerinckii* Br21.

Ácido fórmico - AF

Na figura 15 são apresentadas as concentrações de metabólitos solúveis e consumo de ácido fórmico nos ensaios de fermentação com diferentes concentrações de AF e o controle.

Figura 15. Concentração de metabólitos solúveis e consumo de ácido fórmico durante os ensaios de fermentação para produção de H_2 com diferentes concentrações de ácido fórmico e glicose (10 g/L).

Nos ensaios com AF também foi identificada apenas a presença de ácido butírico. Foi verificado um aumento na concentração de ácido butírico na presença de baixa concentração de AF (0,5 g/L), comparado ao controle. Mas em maiores concentrações observou-se a diminuição da concentração de ácido butírico, coincidindo com a baixa produção de H_2 sob estas condições (Figura 9). Assim como o AL, o AF também foi metabolizado e o seu consumo também diminuiu com o aumento das concentrações de AF. Na menor concentração de AF estudada (0,5 g/L) foi observado um consumo de 63,35% e na maior de AF (2,0 g/L) o consumo decresceu para 30 %.

No estudo de Kumar et al. (2014), adicionando AF e galactose como fonte de carbono, a fim de verificar o efeito deste inibidor sobre a produção de H_2 por uma cultura mista, os pesquisadores observaram a presença de ácido acético, apenas quando uma concentração de 10 g/L de AF foi adicionada aos ensaios. O aumento das concentrações de AF também promoveu a diminuição na concentração de ácido butírico, sendo quase totalmente ausente na maior concentração de 20 g/L de

AF. Nesse mesmo estudo, porém com glicose como fonte de carbono, a produção de ácido acético e butírico sofreram redução, sendo o ácido acético o mais afetado, pois em uma concentração de 3,0 g/L de AF utilizado, este sofreu uma diminuição de quase 100% em relação ao controle.

Portanto, pode-se supor que os ácidos utilizados neste estudo como inibidores de fermentação (AL e AF) atuam de forma distinta sobre o *C. beijerinckii* Br21, comparado ao derivado de furano (HMF). Enquanto nos ensaios de fermentação com HMF foi detectado uma produção mais diversificada de metabólitos, onde, além dos ácidos acético e butírico foi detectado ácido láctico e etanol, nos ensaios com os ácidos AL e AF, o metabolismo foi direcionado apenas para o ácido butírico, que é um subproduto da produção fermentativa de H₂.

6.4- Comparação dos efeitos do HMF, AL e AF sobre a produção de H₂ e produtos do metabolismo pelo *C. beijerinckii* Br21 e *C. acetobutylicum* ATCC 824

Neste item serão apresentados os resultados dos testes, nos quais foi adicionada a CI₅₀ dos inibidores, anteriormente determinadas para a produção de H₂ pelo *C. beijerinckii* Br21 e comparada com uma cepa padrão, o *C. acetobutylicum* ATCC 824. Os primeiros testes foram realizados com o *C. beijerinckii* Br21 a fim de validar a CI₅₀ sobre a produção de H₂ obtida a partir do modelo matemático. Posteriormente foram realizados os ensaios com estas mesmas concentrações de CI₅₀ no *C. acetobutylicum* ATCC 824 para comparar os efeitos dos inibidores sobre esses dois microrganismos.

5-hidroximetilfurfural - HMF

As figuras 16A, 16B e 16C apresentam as concentrações de célula (X), de substrato (S) e de produto (H₂) obtidas durante os ensaios de fermentação utilizando o *C. beijerinckii* Br21. As figuras 16D, 16E e 16F apresentam as concentrações de célula (X), de substrato (S) e de produto (H₂) obtidas durante os ensaios de fermentação utilizando o *C. acetobutylicum* ATCC 824, ambos contendo a CI₅₀ do HMF (0,90 g/L) e seus respectivos controles (sem inibidor). As linhas contínuas nestas figuras representam os ajustes polinomiais feitos para as determinações das velocidades específicas de crescimento celular, de consumo de substrato e de produção de H₂, apresentadas na Tabela 6. As equações polinomiais e os seus coeficientes de correlações obtidas pelos ajustes estão apresentados no anexo II.

Figura 16. Comparação entre a concentração celular (A e D), concentração de substrato (B e E) e de produto (C e F) durante os ensaios de fermentação com *C. beijerinckii* Br21 e *C. acetobutylicum* ATCC 824 contendo 0,90 g/L de HMF e seus respectivos ensaios controle.

CI ₅₀ - HMF (0,90 g/L)	<i>C. beijerinckii</i> Br21(controle)	<i>C. beijerinckii</i> Br21	<i>C. acetobutylicum</i> ATCC 824(controle)	<i>C. acetobutylicum</i> ATCC 824
μX (h ⁻¹)	0,54 ± 0,1	0,47 ± 0,2	0,57 ± 0,2	0,35 ± 0,1
μS (mmol/mgX.L.h)	0,006 ± 0,001	0,005 ± 0,001	0,0056 ± 0,001	0,0048 ± 0,002
μH_2 (mmol H ₂ /mgX.L.h)	0,0081 ± 0,002	0,0041 ± 0,003	0,0079 ± 0,003	0,0043 ± 0,002

Tabela 6. Comparação entre as velocidades específica máximas de crescimento celular (X), consumo de substrato (S) e produção de H₂ (H₂) obtidas nos ensaios de fermentação com *C. beijerinckii* Br21 e *C. acetobutylicum* ATCC 824 e os respectivos controles contendo a concentração da CI₅₀ de HMF (0,90 g/L).

Com base nos resultados das figuras 16A e 16D, o crescimento celular de ambos os microrganismos comparados aos seus controles mostrou que o *C. beijerinckii* Br 21 sofreu inibição menor quando comparado ao *C. acetobutylicum* ATCC 824 (Tabela 6), sendo de 13,8 e 38,2%, respectivamente. Com relação ao consumo de substrato, que pode ser observado pelas figuras 16B e 16E, houve uma inibição muito similar entre os microrganismos, sendo de 16,6% por parte de *C. beijerinckii* Br21 e de 14,2% por parte de *C. acetobutylicum* ATCC 824 (Tabela 6). Por fim as figuras 16C e 16F apresentam os efeitos sobre a produção de H₂, onde foram obtidos 49,3% de inibição pelo *C. beijerinckii* Br21 e 45,5% pelo *C. acetobutylicum* ATCC 824 (Tabela 6), ou seja, apesar de muito próximos os valores de inibição, o valor da CI₅₀ mostra-se condizente ao encontrado para *C. beijerinckii* Br21 e parece exercer efeito similar em *C. acetobutylicum* ATCC 824 quando se trata de produção de H₂. Portanto o HMF tende a exercer efeito similar em ambos os microrganismos, porém afetando um pouco mais o crescimento celular do *C. acetobutylicum* ATCC 824.

Ácido Levulínico – AL

Da mesma forma como foi mostrado para os ensaios com HMF, aqui são mostrados os resultados utilizando ácido levulínico (AL) na concentração de 2,50 g/L (CI₅₀) e seus respectivos controles (sem inibidor). As equações polinomiais e os seus coeficientes de correlações obtidas pelos ajustes estão apresentadas no anexo II.

Figura 17. Comparação entre a concentração celular (A e D), de substrato (B e E) e de produto (C e F) durante os ensaios de fermentação com *C. beijerinckii* Br21 e *C. acetobutylicum* ATCC 824 contendo a concentração da CI_{50} de AL (2,50 g/L) e seus respectivos ensaios controle.

CI ₅₀ - AL (2,50 g/L)	<i>C. beijerinckii</i> Br21(controle)	<i>C. beijerinckii</i> Br21	<i>C. acetobutylicum</i> ATCC 824(controle)	<i>C. acetobutylicum</i> ATCC 824
μX (h ⁻¹)	0,52 ± 0,1	0,23 ± 0,1	0,57 ± 0,3	0,30 ± 0,1
μS (mmol/mgX.L.h)	0,005 ± 0,003	0,003 ± 0,002	0,0037 ± 0,002	0,0031 ± 0,002
μH_2 (mmol H ₂ /mgX.L.h)	0,0066 ± 0,002	0,0033 ± 0,001	0,0093 ± 0,002	0,0036 ± 0,003

Tabela 7. Comparação entre as velocidades específica máximas de crescimento celular (X), consumo de substrato (S) e produção de H₂ (H₂) obtidas nos ensaios de fermentação com *C. beijerinckii* Br21 e *C. acetobutylicum* ATCC 824 e os respectivos controles contendo a concentração da CI₅₀ de AL (2,50 g/L).

As figuras 17A e 17D mostram que o crescimento celular de ambos os microrganismos comparados aos seus controles sofreram inibições similares de 55,4% para o *C. beijerinckii* Br21 e de 48,1% para o *C. acetobutylicum* ATCC 824 (Tabela 7). O efeito de inibição foi um pouco superior para o *C. beijerinckii* Br21, indicando um efeito levemente superior do AL sobre o crescimento celular deste microrganismo. Já o efeito inibitório do AL sobre o consumo de substrato (figuras 17B e 17E) foi maior sobre o *C. beijerinckii* Br21, sendo de 40%, enquanto que *C. acetobutylicum* ATCC 824 apresentou apenas 16,2% de inibição (Tabela 7), mostrando mais uma vez a sensibilidade de *C. beijerinckii* Br21 aos efeitos do AL. Com relação à produção de H₂ (figuras 17C e 17F), observou-se uma inibição de 48,7% pelo *C. beijerinckii* Br21, condizente ao obtido teoricamente pela CI₅₀, porém o *C. acetobutylicum* ATCC 824 apresentou inibição de 61,3% (Tabela 7), sendo superior ao apresentado pelo *C. beijerinckii* Br21, sugerindo que o *C. acetobutylicum* ATCC 824 seja mais sensível aos efeitos do AL com relação à produção de H₂.

Ácido fórmico - AF

Como mostrado anteriormente para HMF e AL, aqui são mostrados os resultados para o ácido fórmico (AF) utilizando uma concentração de 1,15 g/L (CI₅₀) e seus respectivos controles (sem inibidor).. As equações polinomiais e os seus coeficientes de correlações obtidas pelos ajustes estão apresentadas no anexo II.

Figura 18. Comparação entre a concentração celular (A e D), de substrato (B e E) e de produto (C e F) durante os ensaios de fermentação com *C. beijerinckii* Br21 e *C. acetobutylicum* ATCC 824 contendo a concentração da CI_{50} de AF (1,15 g/L) e seus respectivos ensaios controle.

CI ₅₀ - AF (1,15 g/L)	<i>C. beijerinckii</i> Br21(controle)	<i>C. beijerinckii</i> Br21	<i>C. acetobutylicum</i> ATCC 824(controle)	<i>C. acetobutylicum</i> ATCC 824
μX (h ⁻¹)	0,55 ± 0,1	0,44 ± 0,3	0,50 ± 0,2	0,345 ± 0,2
μS (mmol/mgX.L.h)	0,006 ± 0,002	0,005 ± 0,002	0,0038 ± 0,003	0,0033 ± 0,004
μH_2 (mmol H ₂ /mgX.L.h)	0,0074 ± 0,003	0,0036 ± 0,001	0,0062 ± 0,003	0,0025 ± 0,002

Tabela 8. Comparação entre as velocidades específica máximas de crescimento celular (X), consumo de substrato (S) e produção de H₂ (H₂) obtidas nos ensaios de fermentação com *C. beijerinckii* Br21 e *C. acetobutylicum* ATCC 824 e os respectivos controles contendo a concentração da CI₅₀ de AF (1,15 g/L).

As figuras 18A e 18D, mostram que o crescimento celular do *C. beijerinckii* Br21 foi menos afetado em relação ao *C. acetobutylicum* ATCC 824, conforme fica evidenciado pela tabela 8, onde *C. beijerinckii* Br21 sofreu inibição de 19,7% comparado ao seu respectivo controle enquanto que o *C. acetobutylicum* ATCC 824 sofreu uma inibição maior, de 31% também comparado ao seu controle. Em relação ao consumo de substrato, que pode ser observado pelas figuras 18B e 18E, ambos os microrganismos apresentaram inibição similar comparada ao respectivo controle, sendo de 16,6% para o *C. beijerinckii* Br21 e de 13,1% para o *C. acetobutylicum* ATCC 824 (Tabela 8). Com relação à produção de H₂ apresentada nas figuras 18C e 18F, nota-se diminuição de 51,3% pelo *C. beijerinckii* Br21, condizente ao obtido teoricamente pela CI₅₀, porém o *C. acetobutylicum* ATCC 824 apresentou inibição superior de 59,6%, indicando que este microrganismo seja mais sensível aos efeitos do AF com relação à produção de H₂.

Assim nota-se que os efeitos inibitórios da CI₅₀ do HMF sobre os dois microrganismos são similares. Porém, quando se utiliza a CI₅₀ dos ácidos nota-se um efeito inibitório superior sobre o *C. acetobutylicum* ATCC 824, especialmente na velocidade de produção de H₂. Portanto, o *C. acetobutylicum* ATCC 824 mostrou-se mais sensível aos efeitos tanto de AL quanto de AF, comparado ao *C. beijerinckii* Br 21.

A diferença da concentração dos metabólitos solúveis do início e no fim dos ensaios de fermentação com *C. beijerinckii* Br21 e o *C. acetobutylicum* ATCC 824 na presença dos inibidores, assim como o consumo dos mesmos estão apresentados nas Figuras 19 e 20, respectivamente.

Figura 19. Concentração dos metabólitos solúveis e consumo dos inibidores pelo *C.beijerinckii* Br21 durante os ensaios de fermentação para produção de H_2 na presença da CI_{50} de HMF (0,90 g/L), AL (2,50 g/L) e AF (1,15 g/L).

A avaliação dos metabólitos mostra que nos ensaios com HMF houve uma maior diversidade de produtos como ácido acético, butírico e láctico, além de etanol, onde todos estes compostos, exceto o ácido láctico, sofrem uma diminuição em relação ao controle. Nos ensaios com AL e AF, foi detectada apenas a presença de ácido acético e butírico em menor concentração comparado ao controle. Porém, nos ensaios com AF essa diminuição foi muito mais acentuada. O consumo dos inibidores também foi registrado, sendo o HMF o inibidor que sofreu maior consumo, de 76,5%, enquanto que o AL e AF tiveram consumo semelhante de 70,8 e 69,3%, respectivamente. O AL e o AF, por se tratarem de ácidos fracos, quando não dissociados são lipossolúveis e podem se difundir através da membrana celular causando queda no pH intracelular que resultará em um colapso do gradiente de prótons através da membrana e comprometendo o transporte de nutrientes (RUSSEL et al., 1992). Desta forma, os ácidos são capazes de afetar mais o crescimento desse microrganismo,

que se traduz numa diminuição da produção de H_2 . Por outro lado, o HMF, interfere mais nas vias metabólicas, uma vez que na presença deste composto há uma diversificação dos produtos metabólicos.

Na figura 20 são apresentadas as concentrações dos metabólitos nos ensaios de fermentação com o *C. acetobutylicum* ATCC 824 e os inibidores utilizados neste estudo (HMF, AL e AF) nas respectivas concentrações obtidas pela CI_{50} .

Figura 20. Concentração dos metabólitos solúveis e consumo dos inibidores pelo *C. acetobutylicum* ATCC 824 durante os ensaios de fermentação para produção de H_2 na presença da CI_{50} de HMF (0,90 g/L), AL (2,50 g/L) e AF (1,15 g/L).

Nos ensaios realizados com *C. acetobutylicum* ATCC 824 verificou-se uma maior diversidade de metabólitos em todos os ensaios, em relação ao *C. beijerinckii* Br21. Porém, somente no ensaio com HMF foi detectada a presença de etanol, além dos outros ácidos orgânicos (acético, butírico e láctico). No ensaio com HMF houve diminuição na concentração dos metabólitos em relação ao controle, exceto o etanol que aumentou. Nos ensaios com AL e AF também foi observada uma diminuição na concentração dos metabólitos produzidos, exceto no ensaio com AF que houve um ligeiro aumento no ácido láctico. O consumo dos inibidores mostrou mais uma vez que o HMF

foi o mais consumido com 88,7%, enquanto que o AL e o AF apresentaram consumo de 74,1 e 40,8%, respectivamente. Com base nesses resultados, pode-se dizer que assim como no *C. beijerinckii* Br21, o HMF foi o mais metabolizado e diversificou os produtos do metabolismo. Enquanto que os ácidos orgânicos AL e AF diminuíram o número de metabólitos solúveis, mas em comparação com o *C. beijerinckii* Br21, o *C. acetobutylicum* ATCC 824 produziu ácido láctico. O *C. beijerinckii* Br21 também foi capaz de metabolizar mais o ácido fórmico, um potente inibidor de fermentação, devido à presença da enzima formiato desidrogenase (FDH), cuja finalidade é a oxidação de ácido fórmico a CO₂ (HAENG CHO et al., 2012).

6.5 - Efeitos da mistura de HMF, AL e AF sobre a produção de H₂ e produtos do metabolismo do *C. beijerinckii* Br21 e *C. acetobutylicum* ATCC 824.

Neste item foi verificado o efeito da mistura dos inibidores sobre os microrganismos estudados. Para tal, foram feitas misturas com as concentrações que causam 25% de inibição da produção de H₂ no *C. beijerinckii* Br21, ou seja, a CI₂₅, calculadas a partir dos modelos matemáticos apresentados no item 6.2 (figura 8). Dentro deste raciocínio, as CI₂₅ da produção de H₂ pelo *C. beijerinckii* Br21 para o HMF, AL e AF foram 0,66 g/L, 2,15 g/L e 0,89 g/L, respectivamente.

A partir desses valores foram feitas 4 misturas distintas de inibidores e adicionadas aos ensaios de fermentação com o *C. beijerinckii* Br21 e o *C. acetobutylicum* ATCC 824: HMF+AL, HMF+AF, AL+AF e HMF+AL+AF.

HMF + AL

As figuras 21A, 21B e 21C apresentam uma comparação entre as concentrações de célula (X), de substrato (S) e de produto (H₂) obtidas durante os ensaios de fermentação utilizando o *C. beijerinckii* Br21. As figuras 21D, 21E e 21F apresentam as concentrações de célula (X), de substrato (S) e de produto (H₂) obtidas durante os ensaios de fermentação utilizando o *C. acetobutylicum* ATCC 824. Todos estes ensaios foram realizados contendo a mistura HMF+AL nas concentrações determinadas pela CI₂₅ para ambos os compostos. Também foi realizado um ensaio controle permitindo assim avaliar o seu efeito sobre o microrganismo específico. As linhas contínuas destas figuras representam os ajustes polinomiais feitos para as determinações das velocidades específicas de crescimento celular, de consumo de substrato e de produção de H₂, apresentadas na Tabela 9. As equações polinomiais e os seus coeficientes de correlações obtidas pelos ajustes estão apresentadas no anexo III.

Figura 21. Concentração celular (A), de substrato (B) e de produto (C) durante os ensaios de fermentação com *C. beijerinckii* Br21 e concentração celular (D), de substrato (E) e de produto (F) com *C. acetobutylicum* ATCC 824 contendo a mistura HMF+AL, comparado aos respectivos controles (sem inibidores).

HMF+AL	<i>C. beijerinckii</i> Br21(controle)	<i>C. beijerinckii</i> Br21	<i>C. acetobutylicum</i> ATCC 824(controle)	<i>C. acetobutylicum</i> ATCC 824
μX (h ⁻¹)	0,63 ± 0,2	0,52 ± 0,2	0,52 ± 0,2	0,25 ± 0,3
μS (mmol/mgX.L.h)	0,005 ± 001	0,004 ± 0,002	0,0034 ± 0,003	0,003 ± 0,001
μH_2 (mmol H ₂ /mgX.L.h)	0,012 ± 0,02	0,005 ± 0,002	0,007 ± 0,002	0,002 ± 0,004

Tabela 9. Comparação entre as velocidades específica máximas de crescimento celular (X), consumo de substrato (S) e produção de H₂ (H₂) obtidas nos ensaios de fermentação com *C. beijerinckii* Br21 e *C. acetobutylicum* ATCC 824 e os respectivos controles contendo a mistura de inibidores HMF+AL.

Com base nos resultados obtidos neste ensaio de fermentação pode-se verificar que o crescimento celular do *C. beijerinckii* Br21 comparado ao seu controle foi inibido em 18,2%, enquanto que o do *C. acetobutylicum* ATCC 824 apresentou inibição superior de 51,1% (Tabela 9), representado pelas figuras 21A e 21D. Com relação ao substrato, que é retratado pelas figuras 21B e 21E, observa-se uma inibição similar entre os dois microrganismos, 26,1 e de 25% (Tabela 9) em *C. beijerinckii* Br21 e *C. acetobutylicum* ATCC 824, respectivamente, em relação ao controle. O resultado referente à produção de H₂ é representado nas figuras 21C e 21F, onde existe uma diferença considerável na inibição causada pela mistura HMF+AL, sendo que o *C. beijerinckii* Br21 apresenta 58,9% de inibição e o *C. acetobutylicum* ATCC 824 apresenta 67,6% (Tabela 9), se mostrando mais susceptível aos efeitos causados pela mistura de inibidores.

HMF + AF

Aqui são apresentados os resultados utilizando a mistura de inibidores HMF+AF, nas concentrações de CI₂₅ determinadas previamente para estes compostos inibidores, do mesmo modo como foi apresentado para a mistura HMF+AL. As figuras 22A, 22B e 22C representam os ensaios com *C. beijerinckii* Br21 e as figuras 22D, 22E e 22F representam os ensaios com *C. acetobutylicum* ATCC 824. As linhas contínuas destas figuras representam os ajustes polinomiais feitos para as

determinações das velocidades específicas de crescimento celular, de consumo de substrato e de produção de H_2 , apresentadas na Tabela 10. As equações polinomiais e os seus coeficientes de correlações obtidas pelos ajustes estão apresentadas no anexo III.

Figura 22. Concentração celular (A), de substrato (B) e de produto (C) durante os ensaios de fermentação com *C. beijerinckii* Br21 e concentração celular (D), de substrato (E) e de produto (F) com *C. acetobutylicum* ATCC 824 contendo a mistura HMF+AF, comparado aos respectivos controles (sem inibidores).

HMF+AF	<i>C. beijerinckii</i> Br21(controle)	<i>C. beijerinckii</i> Br21	<i>C. acetobutylicum</i> ATCC 824(controle)	<i>C. acetobutylicum</i> ATCC 824
μX (h ⁻¹)	0,63 ± 0,4	0,50 ± 0,3	0,51 ± 0,2	0,28 ± 0,2
μS (mmol/mgX.L.h)	0,005 ± 0,002	0,003 ± 0,002	0,003 ± 0,001	0,003 ± 0,002
μH_2 (mmol H ₂ /mgX.L.h)	0,010 ± 0,02	0,004 ± 0,003	0,007 ± 0,003	0,002 ± 0,001

Tabela 10. Comparação entre as velocidades específica máximas de crescimento celular (X), consumo de substrato (S) e produção de H₂ (H₂) obtidas nos ensaios de fermentação com *C. beijerinckii* Br21 e *C. acetobutylicum* ATCC 824 e os respectivos controles contendo a mistura de inibidores HMF+AF.

As figuras 22A e 22D mostram a inibição do crescimento celular causada pela mistura em ambas as cepas de *Clostridium* sp. analisadas neste estudo, onde é possível verificar uma inibição superior de *C. acetobutylicum* ATCC 824 em relação a *C. beijerinckii* Br21 (comparadas aos respectivos controles), sendo de 46 e 20,8% (Tabela 10), respectivamente. Com relação ao consumo de substrato, apresentada nas figuras 22B e 22E, foi verificada uma maior inibição por parte do *C. beijerinckii* Br21, de 29,7%, enquanto que *C. acetobutylicum* ATCC 824 apresentou apenas 9,7% de inibição (Tabela 10). A produção de H₂, representado pelas figuras 22C e 22F, mostra uma diferença na inibição causada pela mistura HMF+AF, onde o *C. beijerinckii* Br21 apresenta 58,4% de inibição e o *C. acetobutylicum* ATCC 824 apresenta uma inibição superior de 66,6%. Este mesmo efeito sobre o *C. acetobutylicum* ATCC 824 foi observado anteriormente para a mistura de HMF+AL. Assim o *C. acetobutylicum* ATCC 824 mostra-se mais uma vez mais susceptível aos efeitos causados pela mistura de inibidores HMF+AF.

AF + AL

Aqui são apresentados os resultados utilizando a mistura dos ácidos AL+AF, nas concentrações de CI_{25} determinadas previamente para estes compostos inibidores, do mesmo modo como foi apresentado anteriormente para as outras misturas. As figuras 23A, 23B e 23C representam os ensaios com *C. beijerinckii* Br21 e as figuras 23D, 23E e 23F representam os ensaios com *C. acetobutylicum* ATCC 824. As linhas contínuas destas figuras representam os ajustes polinomiais feitos para as determinações das velocidades específicas de crescimento celular, de consumo de substrato e de produção de H_2 , apresentadas na Tabela 11. As equações polinomiais e os seus coeficientes de correlações obtidas pelos ajustes estão apresentadas no anexo III.

Figura 23. Concentração celular (A), de substrato (B) e de produto (C) durante os ensaios de fermentação com *C. beijerinckii* Br21 e concentração celular (D), de substrato (E) e de produto (F) com *C. acetobutylicum* ATCC 824 contendo a mistura AL+AF, comparado aos respectivos controles (sem inibidores).

AL+AF	<i>C. beijerinckii</i> Br21(controle)	<i>C. beijerinckii</i> Br21	<i>C. acetobutylicum</i> ATCC 824(controle)	<i>C. acetobutylicum</i> ATCC 824
μX (h ⁻¹)	0,59 ± 0,4	0,36 ± 0,2	0,53 ± 0,4	0,32 ± 0,1
μS (mmol/mgX.L.h)	0,004 ± 0,002	0,003 ± 0,002	0,004 ± 0,001	0,003 ± 0,003
μH_2 (mmol H ₂ /mgX.L.h)	0,010 ± 0,01	0,0051 ± 0,003	0,0063 ± 0,003	0,0028 ± 0,002

Tabela 11. Comparação entre as velocidades específica máximas de crescimento celular (X), consumo de substrato (S) e produção de H₂ (H₂) obtidas nos ensaios de fermentação com *C. beijerinckii* Br21 e *C. acetobutylicum* ATCC 824 e os respectivos controles contendo a mistura de inibidores AL+AF.

A mistura AL+AF, ou seja, somente ácidos, promoveu um efeito similar de inibição sobre o crescimento celular de ambos os microrganismos como pode ser visto nas figuras 23A e 23D, ou seja, 38,9 e 40,1% de inibição para *C. beijerinckii* Br21 e *C. acetobutylicum* ATCC 824, respectivamente (Tabela 11). No consumo de substrato apresentado pelas figuras 23B e 23E observa-se uma inibição superior em *C. acetobutylicum* ATCC 824 de 27%, enquanto que o *C. beijerinckii* Br21 sofreu 16,6% de inibição (Tabela 11). A produção de H₂ sofreu inibição inferior ao das misturas apresentadas anteriormente, sendo de 49% para o *C. beijerinckii* Br21 e de 55,5% para *C. acetobutylicum* ATCC 824.

HMF + AF + AL

Aqui são apresentados os resultados utilizando a mistura de todos os inibidores utilizados neste estudo, HMF+AL+AF, nas concentrações de CI₂₅ determinadas previamente para estes compostos inibidores, do mesmo modo como foi apresentado anteriormente para as outras misturas. As figuras 24A, 24B e 24C representam os ensaios com *C. beijerinckii* Br21 e as figuras 24D, 24E e 24F representam os ensaios com *C. acetobutylicum* ATCC 824. As linhas contínuas destas figuras representam os ajustes polinomiais feitos para as determinações das velocidades específicas de crescimento celular, de consumo de substrato e de produção de H₂, apresentadas na Tabela 12. As

equações polinomiais e os seus coeficientes de correlações obtidas pelos ajustes estão apresentadas no anexo III.

Figura 24. Concentração celular (A), de substrato (B) e de produto (C) durante os ensaios de fermentação com *C. beijerinckii* Br21 e concentração celular (D), de substrato (E) e de produto (F) com *C. acetobutylicum* ATCC 824 contendo a mistura HMF+AL+AF, comparado aos respectivos controles (sem inibidores).

HMF+AL+AF	<i>C. beijerinckii</i> Br21(controle)	<i>C. beijerinckii</i> Br21	<i>C. acetobutylicum</i> ATCC 824(controle)	<i>C. acetobutylicum</i> ATCC 824
μX (h ⁻¹)	0,63 ± 0,5	0,31 ± 0,2	0,54 ± 0,4	0,15 ± 0,2
μS (mmol/mgX.L.h)	0,003 ± 0,002	0,002 ± 0,002	0,0045 ± 0,002	0,0014 ± 0,003
μH_2 (mmol H ₂ /mgX.L.h)	0,012 ± 0,03	0,002 ± 0,001	0,009 ± 0,001	0,0010 ± 0,001

Tabela 12. Comparação entre as velocidades específica máximas de crescimento celular (X), consumo de substrato (S) e produção de H₂ (H₂) obtidas nos ensaios de fermentação com *C. beijerinckii* Br21 e *C. acetobutylicum* ATCC 824 e os respectivos controles contendo a mistura de inibidores HMF+AL+AF.

Neste ensaio foi realizada uma mistura com todos os inibidores utilizados neste estudo (HMF, AL e AF), no qual foi observada uma inibição superior ao já relatado anteriormente para as outras misturas em todos os parâmetros avaliados. As figuras 24A e 24D mostram que a inibição do crescimento celular foi superior para o *C. acetobutylicum* ATCC 824 do que para o *C. beijerinckii* Br21, 73,2 e 50,7%, respectivamente (Tabela 12). A inibição do consumo de substrato mostrado pelas figuras 24B e 24E também foi superior para *C. acetobutylicum* ATCC 824 do que para *C. beijerinckii* Br21, 68,8 e 32,3, respectivamente (Tabela 12). A inibição sobre a produção de H₂ representada nas figuras 24C e 24F foi muito similar nos dois microrganismos, porém apresentou valores elevados 85,9% para o *C. beijerinckii* Br21 e de 88,8% para o *C. acetobutylicum* ATCC 824, mostrando forte inibição sobre ambos.

Assim foi verificado que as misturas de inibidores apresentam um forte poder de inibição, sendo que os ácidos (AL e AF) quando combinados com o derivado de furano (HMF) tendem a terem seus efeitos inibitórios potencializados, fato este que não se observa quando somente os ácidos são misturados. A mistura de todos os compostos apresentou um efeito sinérgico, ou seja, a ação combinada dos inibidores sobre o microrganismo apresentou um efeito superior que a soma dos

efeitos de cada um dos inibidores aplicados isoladamente sobre a produção de H_2 tanto para o *C. beijerinckii* Br21, quanto para o *C. acetobutylicum* ATCC 824.

A diferença de concentração dos metabólitos solúveis entre o início e o fim dos ensaios de fermentação com *C. beijerinckii* Br21 e o *C. acetobutylicum* ATCC 824 na presença das misturas de inibidores estão apresentadas nas figuras 25 e 26. O consumo dos inibidores pelo *C. beijerinckii* Br21 e pelo *C. acetobutylicum* ATCC 824 está apresentados nas Tabelas 13 e 14, respectivamente.

Figura 25. Concentração dos metabólitos solúveis produzidos pelo *C.beijerinckii* Br21 durante os ensaios de fermentação para produção de H_2 na presença das misturas de inibidores HMF+AL, HMF+AF, AL+AF, HMF+AL+AF e do controle.

Os resultados obtidos mostram que o ensaio controle (sem adição de mistura de inibidores) apresentou os ácidos acético, láctico e butírico além de etanol. Todos os ensaios contendo as misturas de inibidores apresentaram apenas a produção de ácido acético e ácido butírico. Em todos os ensaios com as misturas a concentração de ácido acético foi inferior a do controle, porém no ensaio com HMF+AL+AF foi obtida a menor concentração de ácido acético. As concentrações de ácido butírico obtidas nos ensaios com as misturas de inibidores também foram inferiores ao controle, sendo a menor concentração com HMF+AL+AF e a maior com a mistura de ácidos AL+AF.

A tabela 13 apresenta o consumo dos inibidores presentes nas misturas durante o ensaio de fermentação com o *C. beijerinckii* Br21.

Consumo de inibidores <i>C. beijerinckii</i> Br21 (%)			
Misturas	HMF	AL	AF
HMF+AL	55,7	54,9	
HMF+AF	80,6		84,3
AL+AF		80,7	100
HMF+AL+AF	74,8	58,2	83,4

Tabela 13. Consumo dos inibidores individualmente nas misturas utilizadas nos ensaios de fermentação com *C. beijerinckii* Br21.

Nota-se que o consumo dos inibidores foi parecido em cada mistura, variando de 54,9 a 100 %. O inibidor que foi mais consumido em todos os ensaios foi o AF com consumo superior a 80% nos 3 ensaios em que esteve envolvido, sendo justificável pelo fato de alguns autores mencionarem que microrganismos como o *C. beijerinckii* apresentam uma enzima denominada formiato desidrogenase (FDH) capaz de catalisar a oxidação de formiato em CO₂, ou seja, dessa maneira o ácido fórmico presente pode ser consumido durante a fermentação (HAENG CHO et al., 2012).

Na figura 26 são apresentadas as concentrações dos metabólitos nos ensaios de fermentação com o *C. acetobutylicum* ATCC 824 e as misturas de inibidores utilizados neste estudo (HMF+AL, HMF+AF, AL+AF, HMF+AL+AF e o controle) nas respectivas concentrações obtidas pela CI₂₅ para cada inibidor individualmente.

Figura 26. Concentração dos metabólitos solúveis produzidos pelo *C. acetobutylicum* ATCC 824 durante os ensaios de fermentação para produção de H_2 na presença das misturas de inibidores HMF+AL, HMF+AF, AL+AF, HMF+AL+AF e do controle.

Como observado anteriormente para o *C. beijerinckii* Br21, o ensaio controle do *C. acetobutylicum* ATCC 824 também apresentou a produção dos ácidos acético, láctico e butírico além de etanol. Nos ensaios com as misturas de inibidores também foi observada apenas a produção dos ácidos acético e butírico, onde todos foram obtidos em concentrações inferiores as registradas no ensaio controle. Nota-se que no ensaio com AL+AF foi registrada a maior concentração de ácidos gerados dentre todos os ensaios com misturas de inibidores e o ensaio com HMF+AL+AF apresentou as menores concentrações de metabólitos solúveis gerados.

A tabela 14 apresenta o consumo dos inibidores presentes nas misturas durante o ensaio de fermentação com o *C. acetobutylicum* ATCC 824.

Consumo de inibidores <i>C. acetobutylicum</i> ATCC 824 (%)			
Misturas	HMF	AL	AF
HMF+AL	77,8	55,6	
HMF+AF	90		84,6
AL+AF		66	83,7
HMF+AL+AF	100	55,3	83,8

Tabela 14. Consumo de cada inibidor individualmente nas misturas utilizadas durante os ensaios de fermentação com *C. acetobutylicum* ATCC 824.

O consumo de inibidores apresentados mostram um aumento no consumo de HMF e uma diminuição no consumo de AL em comparação aos ensaios realizados com o *C.beijerinckii* Br21. O consumo de AF por sua vez continua sendo mais elevado, sendo superior a 80% como já relatado no ensaio com *C.beijerinckii* Br21. Esse maior consumo de AF pode confirmar o efeito causado por ácidos fracos em células bacterianas, onde esses ácidos tendem a afetar enzimas glicolíticas como a enolase, que é uma enzima fundamental para a geração de ATP por meio da glicólise. Já o consumo de HMF que parece ter sido estimulado na presença dos ácidos orgânicos pode ser justificado pela capacidade da célula em converter este composto em álcool furfurílico, que é menos tóxico para a célula, através da oxidoreductase (GUTIERREZ et al., 2006).

7 - CONCLUSÕES

Este estudo demonstrou e quantificou a inibição do *C. beijerinckii* Br21 frente a 3 compostos inibidores provenientes de hidrólise de biomassas, o HMF, o ácido levulínico e o ácido fórmico. Estes inibidores mostraram diferentes efeitos, porém em graus distintos. Estes compostos são capazes de afetar a produção de H_2 do microrganismo e também o crescimento celular e consumo de glicose.

A inibição causada pelo HMF teve maior relação com a produção de H_2 pelo microrganismo, enquanto que os ácidos orgânicos atuaram mais em nível de consumo de substrato e de crescimento celular.

Através da CI_{50} dos inibidores obtidas com o *C. beijerinckii* Br21 foi possível estabelecer uma comparação com o *C. acetobutylicum* ATCC 824, outro microrganismo produtor de H_2 mais conhecido e assim verificar que este microrganismo é mais sensível ao efeito dos compostos inibidores do que o *C. beijerinckii* Br21. Dentre os compostos utilizados o HMF foi que se mostrou maior efeito inibitório sobre a produção de H_2 , seguido de ácido fórmico e ácido levulínico. O *C. beijerinckii* Br21 apresentou uma elevada capacidade de metabolização dos ácidos, especialmente o ácido fórmico.

Esses compostos também foram estudados em associação (misturas), onde mais uma vez o *C. acetobutylicum* ATCC 824 se mostrou ser mais sensível aos efeitos inibitórios desses compostos. A associação de HMF com ácido levulínico ou fórmico apresentou uma potencialização dos efeitos inibitórios sobre a produção de H_2 e quando associados todos os inibidores apresentaram efeito similar, porém muito superior aos observados para a associação de 2 compostos distintos.

Este estudo revelou que ambas as cepas possuem capacidade de metabolizar em maior ou menor grau os inibidores provenientes da hidrólise de biomassas, mas o *C. beijerinckii* Br21 parece

ser mais robusto com relação aos ácidos orgânicos, fazendo dele um ótimo candidato para a produção de H_2 a partir de hidrolisados.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALMEIDA J.R., MODIG T., PETERSSON A., HÄHN-HÄGERDAL B., LIDÉN G., GORWA-GRAUSLUND M.F. Increased tolerance and conversion of inhibitors in lignocellulosic hydrolysates by *Saccharomyces cerevisiae*. **J Chem Technol Biotechnol**. v 82(4): 340–349, 2007.
- ALLEN, S.A., CLARK, W., MCCAFFERY, J.M., CAI, Z., LANCTOT, A., SLININGER, P.J., LIU, Z.L., GORSICH, S.W. Furfural induces reactive oxygen species accumulation and cellular damage in *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnol. Biofuels** 3, 2, 2010.
- ANBURAJAN P, ET AL. Inhibitory effect of 5-hydroxymethylfurfural on continuous hydrogen fermentation by mixed culture in a fixed bed reactor. **International Journal of Hydrogen Energy**. 2017.
- ANDERSON V., VIKLUND S. B., HACKL R., KARLSSON M., BERNTSSON T. Algae-based biofuel production as part of an industrial cluster. **Biomass and Bioenergy**. v 7: 1113-1124, 2014.
- AN D., LI Q., WANG X., YANG H., GUO L. Characterization on hydrogen production performance of a newly isolated *Clostridium beijerinckii* YA001 using xylose. **International Journal of Hydrogen Energy**. v 39: 19928-19936, 2014, 2014
- ASGHER M., AHMAD Z., IQBAL H.M.N. Alkali and enzymatic delignification of sugarcane bagasse to expose cellulose polymers for saccharification and bio-ethanol production. **Industrial Crops and Products**. v 44: 488-495, 2013.
- AXE D.; BAILEY, J.E. Transport of lactate and acetate through the energized cytoplasmic membrane of *Escherichia coli*. **Biotechnol Bioeng**.v 47:8-19, 1995.
- BALAT, H.; KIRTAY, E. Hydrogen from biomass – Present scenario and future prospects. **International Journal of Hydrogen Energy**. V.35, p 7416. 2010.

BARAL, N. R., & SHAH, A. Microbial inhibitors: formation and effects on acetone-butanol-ethanol fermentation of lignocellulosic biomass. **Applied microbiology and biotechnology**. 98(22), 9151-9172, 2014.

BEHERA S., ARARA R., NANDHAGOPAL N., KUMAR S. Importance of chemical pretreatment for bioconversion of lignocellulosic biomass. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**. v 36. p 91-106, 2014.

BORZANI, W., LIMA, V.A., AQUARONE, E. **Biotecnologia Industrial**. Ed. Volumes 1, 2, 3 e 4 . Ed. Edgar Blucher (col. Biotecnologia), 2001.

BUNDHOO, MA ZUMAR; MOHEE, ROMEELA. Inhibition of dark fermentative bio-hydrogen production: A review. **International Journal of Hydrogen Energy**. v. 41, n. 16, p. 6713-6733, 2016.

CAO, G. L., REN, N. Q., WANG, A. J., GUO, W. Q., XU, J. F., & LIU, B. F. Effect of lignocellulose-derived inhibitors on growth and hydrogen production by *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* W16. **International journal of hydrogen energy**. 35(24), 13475-13480, 2009.

CLARKSON S.M.; HAMILTON-BREHM S.D.; GIANNONE R.J. A comparative multidimensional LC-MS proteomic analysis reveals mechanisms for furan aldehyde detoxification in *Thermoanaerobacter pseudethanolicus* 39E. **Biotechnol Biofuels**. v 7:165–179, 2014.

CHAGANTIA, S.R.; LALMANB, J.Á.; HEATH, D.D. 16S rRNA gene based analysis of the microbial diversity and hydrogen production in three mixed anaerobic cultures. **International Journal of Hydrogen Energy**. v 37 (11): 9002-9017, 2012.

CHAUBEY R., SAHU S., JAMES O.O., MAITY S. A review on development of industrial processes and emerging techniques for production of hydrogen from renewable and sustainable sources. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**. v23:p 443-462, 2013.

CHEN W.M., TSENG Z.J., LEE K.S., CHANG J.S. Fermentative hydrogen production with *Clostridium butyricum* CGS5 isolated from anaerobic sewage sludge. **International Journal of Hydrogen Energy**. v 30:1063-1070, 2004.

CHEN, R., WANG, Y.Z., LIAO, Q., ZHU, X., XU, T.F. Hydrolysates of lignocellulosic materials for biohydrogen production. **BMB Reports**, v 46 (5): 244-251, 2013.

CHEN C.Y., ZHAO X.Q., YEN H.W., HO S.H., CHENG C.L., LEE D.J., BAI F.W., CHANG J.S. Microalgae-based carbohydrates for biofuel production. **Biochemical Engineering Journal**. v 78: p 1-10, 2013.

CHERNICARO, C.A.L. Biorreatores Anaeróbios – Princípios do tratamento biológico de águas residuárias. **Tese de Doutorado – UFMG, Belo Horizonte**, v 5(2), 1997.

COELHO M.S., BARBOSA F.G., SOUZA M.R.A.Z. The scientometric research on macroalgal biomass as a source of biofuel feedstock. **Algal Research**. v 6:p 132-138, 2014.

DAS D., VERIZOGLU T.N. Hydrogen production by biological processes: a survey of literature. **International Journal of Hydrogen Energy**. v26:p 13 -28, 2008.

DAVILA-VAZQUEZ G., ALATRISTE-MONDRAGON F., DE LEON-RODRIGUEZ A., RAZO-FLORES E. Fermentative Hydrogen Production in Batch Experiments Using Lactose, Cheese Whey and Glucose: Influence of Initial Substrate Concentration and pH, **International Journal of Hydrogen Energy**. v 33, 4989–4997, 2008.

DE VRIJE, T., BAKKER, R.R., BUDDE, M.A.W., LAI, M.H., MARS, A.E., CLAASSEN, P.A.M. Efficient hydrogen production from the lignocellulosic energy crop *Miscanthus* by the extreme thermophilic bacteria *Caldicellulosiruptor saccharolyticus* and *Thermotoga neapolitana*. **Biotechnol. Biofuels**. 2, 12 (2009).

DONGA, L.; ZHENHONGA, Y.; YONGMINGA, S.; XIAOYINGA, K.; YU, Z. Hydrogen production characteristics of the organic fraction of municipal solid wastes by anaerobic mixed culture fermentation. **International Journal of Hydrogen Energy**. v 32(2): 812-820, 2009.

ELSHARNOUBY, O.; HAFEZ, H.; NAKHLA, G.M.; EL NAGGER, H.E. A critical literature review on biohydrogen production by pure cultures. **International Journal of Hydrogen Energy**. v 38: 4945-4966, 2013.

ELBESHBISHY, ELSAYED et al. A critical review on inhibition of dark biohydrogen fermentation. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 79, p. 656-668, 2017.

ESTEVEZ J.M., CIANCIA M., CERESO A.S. The system of galactans of the red seaweed, *Kappaphycus alvarezii*, with emphasis on its minor constituents. **Carbohydrate Research**. v 339:2575-2592, 2004.

EZEJI T., QURESHI N., BLASCHEK H.P. Butanol production from agricultural residues: impact of degradation products on *Clostridium beijerinckii* growth and butanol fermentation. **Biotechnol Bioeng**. v 97: 1460-1469, 2007.

FANGKUM A., REUNGSANG A. Biohydrogen production from sugarcane bagasse hydrolysate by elephant dung: Effects of initial pH and substrate concentration. **International Journal of Hydrogen Energy**. v 36, 8687-8696, 2011.

FONSECA, BRUNA CONSTANTE. Produção de hidrogênio por fermentação por um novo isolado de *Clostridium beijerinckii*. Ribeirão Preto: Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, University of São Paulo, 2016.

GOUVEIA L., OLIVEIRA A.C. Microalgae as a raw material for biofuels production. **J Ind Microbiol Biotechnol**. 36:269–74, 2009.

GUTIERREZ T., INGRAM L.O., PRESTON J.F. Purification and characterization of a furfural reductase (FFR) from *Escherichia coli* strain LYO1 - an enzyme important in the detoxification of furfural during ethanol production. **J Biotechnol**. v 121:154-164, 2006.

CHO, D. H., SHIN, S. J., & KIM, Y. H. Effects of acetic and formic acid on ABE production by *Clostridium acetobutylicum* and *Clostridium beijerinckii*. **Biotechnology and Bioprocess Engineering: BBE**. 17(2), 270, 2012.

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

HAN, S. K., & SHIN, H. S. Biohydrogen production by anaerobic fermentation of food waste. **International Journal of Hydrogen Energy**. 29(6), 569-577, 2004.

HARGREAVES P.I., BARCELOS C.A., COSTA A.C.A., PEREIRA J.R.N. Production of ethanol 3G from *Kappaphycus alvarezii*: Evaluation of different process strategies. **Bioresource Technology**. v 134: 257–263, 2013.

HAWKES, F. R., DINSDALE, R., HAWKES, D. L., & HUSSY, I. Sustainable fermentative hydrogen production: challenges for process optimisation. **International Journal of Hydrogen Energy**. 27(11), 1339-1347, 2002.

HEER, D., HEINE, D., SAUER, U. Resistance of *Saccharomyces cerevisiae* to high concentrations of furfural is based on NADPH-dependent reduction by at least two oxireductases. **Appl. Environ. Microbiol.** v 75 (24), 7631–7638, 2009.

HO K.L., LEE D.J., SU A., CHANG J.S. Biohydrogen from lignocellulosic feedstock via one-step process. **International Journal of Hydrogen Energy**. v 37:15569-15574, 2012.

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

HUESEMANN, M.H.; HAUSMANN, T.S.; CARTER, B.M.; GERSCHLER, J.J.; BENEMANN, J.R. **Appl. Biochem. Biotechnol.** 162, 208, 2010.

IBRAHEEM O, NDIMBA BK. Molecular adaptation mechanisms employed by ethanogenic bacteria in response to lignocellulose-derived inhibitory compounds. **Int J Biol Sci.** 9:598e612, 2013.

JONSSON L.J., ALRIKSSON B., NILVEBRANT N.O. Bioconversion of lignocellulose: inhibitors and detoxification. **Biotechnology for Biofuels.** v 6:16-24, 2013.

JUNG K.W., KIM D.H., SHIN H.S. Fermentative hydrogen production from *Laminaria japonica* and optimization of thermal pretreatment conditions. **Bioresource Technology** 102: 2745-2750, 2011.

KIM, J.K.; NHAT, L.; CHUN, Y.N.; KIM, A.S.W. Hydrogen Production Conditions from Food Waste by Dark Fermentation With *Clostridium beijerinckii* KCTC 1785. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, v. 13: 499-504, 2008.

KIM, J.P.; KIM, K.R.; CHOI, S.P.; HAN, S.J.; KIM, M.S.; SIM, S.J. Repeated production of hydrogen by sulfate re-addition in sulfur deprived culture of *Chlamydomonas reinhardtii*. **International Journal of Hydrogen Energy**, v.37: 13387-13391, 2010.

KOTAY, M.K.; DAS, D. **Int. J. Hydrogen Energy.** 33, 258, 2008

KUMAR G., SEN B., LIN C.Y. Pretreatment and hydrolysis methods for recovery of fermentable sugars from de-oiled Jatropha waste. **Bioresource Technology.** v 145:275–279, 2013.

KUMAR G., CHEON H.C., KIM S.H. Effects of 5-hydromethylfurfural, levulinic acid and formic acid, pretreatment byproducts of biomass, on fermentative H₂ production from glucose and galactose. **International Journal of Hydrogen Energy.** v 39:16885-16890, 2014.

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

LAMAISSON, F., REGINATTO, V., & ANTÔNIO, R. Efeito de diferentes pré-tratamentos de cultura mista para o enriquecimento em bactérias produtoras de hidrogênio. **Blucher Chemical Engineering Proceedings**. 1(2), 717-724, 2015.

LEE J.H., LEE D.G., PARK J.I., KIM J.Y. Bio-hydrogen production from a marine brown algae and its bacterial diversity. Korean J. **Chem. Eng.** 27: 187–192, 2010.

LEE, K.M.; MIN, K.; CHOI, O.; KIM, K.Y.; WOO, H.M.; KIM, Y.; HAN, S.O.; UM, Y.; LEE, P.; GUO, Y.; KIM, S.; SUNG, S. Effect of ultrasonic treatment of digestion sludge on bio-hydrogen production from sucrose by anaerobic fermentation. **International Journal of Hydrogen Energy**. v 35: 3450-3455, 2010.

LEE, K. M., CHOI, O., KIM, K. Y., WOO, H. M., KIM, Y., HAN, S. O., ... & UM, Y. Butyric acid production from red algae by a newly isolated *Clostridium* sp. S1. **Biotechnology letters**. 37(9), 1837-1844, 2015.

LEVIN, D. B., PITT, L., & LOVE, M. Biohydrogen production: prospects and limitations to practical application. **International journal of hydrogen energy**. 29(2), 173-185, 2004.

LIN, R., CHENG, J., DING, L., SONG, W., ZHOU, J., & CEN, K. Inhibitory effects of furan derivatives and phenolic compounds on dark hydrogen fermentation. **Bioresource technology**, 196, 250-255, 2105.

LIU C.H., CHANG C.Y., CHENG C.L., LEE D.J., CHANG J.S. Fermentative hydrogen production by *Clostridium butyricum* CGS5 using carbohydrate-rich microalgal biomass as feedstock. **International Journal of Hydrogen Energy**. v 37: 15458-15464, 2012.

LIU, Z., ZHANG, C., WANG, L., HE, J., LI, B., ZHANG, Y., & XING, X. H. Effects of furan derivatives on biohydrogen fermentation from wet steam-exploded cornstalk and its microbial community. **Bioresource technology**. 175, 152-159, 2015.

LOHMEIER-VOGEL, E.M.; SOPHER, C.R.; LEE, H. Intracellular acidification as a mechanism for inhibition by acid hydrolysis-derived inhibitors of xylose fermentation by yeasts. **Journal of Industrial Microbiology of Hydrogen Energy**. v. 34, p 7404, 2009.

MATHEWS J., WANG G. Metabolic pathway engineering for enhanced biohydrogen production. **International Journal of Hydrogen Energy**, v.34:7404-7412, 2009.

MENON, V., & RAO, M. Trends in bioconversion of lignocellulose: biofuels, platform chemicals & biorefinery concept. **Progress in Energy and Combustion Science**. 38(4), 522-550, 2012.

MILLER, G.L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, p. 426-428, 1959.

MILLS, T.Y., SANDOVAL, N.R., GILL, R.T. Cellulosic hydrolysate toxicity and tolerance mechanisms in Escherichia coli. **Biotechnol. Biofuels** 2, 26, 2009.

MODIG T., LIDÉN G., TAHERZADEH M. Inhibition effects of furfural on alcohol dehydrogenase, aldehyde dehydrogenase and pyruvate dehydrogenase. **Biochem J**. v 363:769–776, 2002.

MONLAU F., SAMBUSITI C., BARAKAT A., QUÉMÉNEUR M., TRABLY E., STEYER J.P., CARRÈRE H. Do furanic and phenolic compounds of lignocellulosic and algae biomass hydrolyzate inhibit anaerobic mixed cultures? A comprehensive review. **Biotechnology Advances** 32: 934–951, 2014.

MORAES. B.S.; JUNQUEIRA, T.L.; PAVANELLO, J.; CAVALETTO, O.; MANTELATTO, P.; BONOMI, A.; ZAIAT, M. Anaerobic digestion of vinasse from sugarcane biorefineries in Brazil from energy, environmental, and economic perspectives: Profit or expense? **Applied Energy**. v 113: 825-835, 2014.

MUENSEAN, K., & KIM, S. M. Purification and characterization of [beta]-glucosidase produced by *Trichoderma citrinoviride* cultivated on microalga *Chlorella vulgaris*. **Applied biochemistry and microbiology**. 51(1), 102, 2015.

NASR, N.; ELBESHBISHY, E.; HAFEZ, H.; NAKHLA, G.; EL NAGGER M.H. Biohydrogen production from thin stillage using conventional and acclimatized anaerobic digester sludge. **International Journal of Hydrogen Energy**. v 36: 12761-1769, 2011.

NTAIKOU, I.; ANTONOPOULOU, G.; LYBERATOS, G. Biohydrogen Production from Biomass and Wastes via Dark Fermentation: a Review. **Waste Biomass Valorization**. v 1: 21-39, 2010.

ORTIGUEIRA, JOANA et al. Third generation biohydrogen production by *Clostridium butyricum* and adapted mixed cultures from *Scenedesmus obliquus* microalga biomass. **Fuel**, v. 153, p. 128-134, 2015.

O-THONGA, S., HNIMANB, A., PRASERTSANB, P., IMAI, T. Biohydrogen production from cassava starch processing wastewater by thermophilic mixed cultures. **International Journal of Hydrogen Energy**. v 36(1). P 382-389, 2011.

PALMQVIST E., HAHN-HAEGERDAL B. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. I: inhibition and detoxification. **Bioresource Technology**. v 74(1). P 17-24, 2000.

PARK J.H., CHEON H.C., YOON J.J., PARK H.D., KIM S.H. Optimization of batch dilute-acid hydrolysis for biohydrogen production from red algal biomass. **International Journal of Hydrogen Energy**. v 38:6130-6136, 2013.

PARK, A.B.J.H.; YOON, B.J.J.; PARK, A.H.D.; KIM, B.Y.J.; LIM, C.D.J.; KIM, D.S.H. Feasibility of hydrogen production from *Gelidium amansii*. **International Journal of Hydrogen Energy**, v.36: 13997-14003, 2011.

PASSOS, F., CARRETERO, J., & FERRER, I. Comparing pretreatment methods for improving microalgae anaerobic digestion: thermal, hydrothermal, microwave and ultrasound. **Chemical Engineering Journal**. 279, 667-672, 2015.

POLISSAC DB. A DATABASE OF POLYSACHHARIDE 3D STRUCTURE. Fonte: http://polysac3db.cermav.cnrs.fr/discover_carrageenans.html (acessado em 27/03/2015).

PHOWANA, P., DANVIRUTAI, P. Hydrogen production from cassava pulp hydrolysate by mixed seed cultures: Effects of initial pH, substrate and biomass concentrations. **Biomass and Bioenergy**. v 64. P 1-10, 2014.

QUEMENEUR M., HAMELIN J., BARAKAT A., STEYER J.P., CARRERE H., TRABLY E. Inhibition of fermentative hydrogen production by lignocellulose-derived compounds in mixed cultures. **International Journal of Hydrogen Energy**, v 37(4):3150-3159, 2012.

RATTI, R.P.; BOTTA, L.S.; SAKAMOTO, I.K.; VARESCHE, M.B.A. Microbial diversity of hydrogen-producing bacteria in batch reactors fed with cellulose using leachate as inoculum. **International Journal of Hydrogen Energy**. v 38: 9707-9717, 2013.

REGINATTO, V.; ANTÔNIO, R. Fermentative hydrogen production from agroindustrial lignocellulosic substrates. **Brazilian Journal of Microbiology**, v 46(2): 323-335, 2015.

ROSS A.B., JONES J.M., KUBACKI M.L., BRIDGEMAN T.. Classification of macroalgae as fuel and its thermochemical behaviour. **Bioresource Technology**. v 99: 6494–504, 2008.

ROE, A.J., MCLAGGAN, D., DAVIDSON, I., O'BYRNE, C., BOOTH, I.R. Perturbation of anion balance during inhibition of growth of *Escheria coli* by weak acids. **Journal of Bacteriology**. v. 180:767-772, 1998.

ROESIJADI, G., JONES, S. B., SNOWDEN-SWAN, L. J., & ZHU, Y. Macroalgae as a biomass feedstock: a preliminary analysis (No. PNNL-19944). Pacific Northwest National Laboratory (PNNL), Richland, WA (US), 2010.

RUSSELL, J. B. Another explanation for the toxicity of fermentation acids at low pH: anioin accumulation versus uncoupling. **J. Appl. Bacteriol.** v 73: 363-370, 1992.

SAMBUSITI, C., BELLUCCI, M., ZABANIOTOU, A., BENEDUCE, L., & MONLAU, F. Algae as promising feedstocks for fermentative biohydrogen production according to a biorefinery approach: a comprehensive review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews.** v 44, 20-36, 2015.

SARAPHIMORA, P.; REUNGSANG, A. Biological hydrogen production from sweet sorghum syrup by mixed cultues using na anaerobic sequencing batch reactor (ASBR). **International Journal of Hydrogen Energy.** v 36(14): 8765-8773, 2014.

SEM, B., SUTTAR, R.R. Mesophilic fermentative hydrogen production from sago starch-processing wastewater using enriched mixed cultures. **International Journal of Hydrogen Energy.** v 37(20). P 15588-15597, 2012.

SIVAGURUNATHAN, P., KUMAR, G., MUDHOO, A., RENE, E. R., SARATALE, G. D., KOBAYASHI, T., ... & KIM, D. H. Fermentative hydrogen production using lignocellulose biomass: an overview of pre-treatment methods, inhibitor effects and detoxification experiences. **Renewable and Sustainable Energy Reviews.** v 77, 28-42, 2017.

SINHA P., PANDEY A. An evaluative report and challenges for fermentative biohydrogen production. **International Journal of Hydrogen Energy.** v 36:7460–7478, 2011.

SIQUEIRA M.R., REGINATTO V. Inhibition of fermentative H₂ production by hydrolysis byproducts of lignocellulosic substrates. **Renewable Energy.** v 80:109-116, 2015.

SIVAGURUNATHAN, P., KUMAR, G., MUDHOO, A., RENE, E. R., SARATALE, G. D., KOBAYASHI, T., ... & KIM, D. H. Fermentative hydrogen production using lignocellulose biomass: an overview of pre-treatment methods, inhibitor effects and detoxification experiences. **Renewable and Sustainable Energy Reviews.** v 77, 28-42, 2017.

SHARMA, P., & MELKANIA, U. Impact of furan derivatives and phenolic compounds on hydrogen production from organic fraction of municipal solid waste using co-culture of *Enterobacter aerogenes* and *E. coli*. **Bioresource Technology**. 239, 49-56, 2017.

SHANMUGAMA, S., CHAGANTIB, S.R., LALMANA, J.A., heath, d. Using a statistical approach to model hydrogen production from a steam exploded corn stalk hydrolysate fed to mixed anaerobic cultures in an ASBR. **International Journal of Hydrogen Energy**. v 39. p 10003-10015, 2014.

SHIN, H.S., YOUN, J.H. E KIM, S.H. “Hydrogen Production from food waste in anaerobic and thermophilic acidogenesis.” **International Journal of Hydrogen Energy**. p 1355-63, 2004.

SÁ, L.R.V., CAMMAROTA, M.C., FERREIRA-LEITÃO, V.S. Produção de hidrogênio via fermentação anaerobia – aspectos gerais e possibilidade de utilização de resíduos agroindustriais brasileiros. **Química Nova**. v.37(5), 2014.

STANCZYK, K., KAPUSTA, K., WIATOWSKI, M., SWIADROWSKI, J., SMOLINSKI, A., ROGUT, J., KOTYRBA, A. Experimental simulation of hard coal underground gasification for hydrogen production. **Fuel**. v. 91(1). p 40-50, 2012.

STWERTKA, ALBERT. A Guide to the Elements. New York, NY: Oxford University Press. 2002

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

SUWANSAARD, M.; CHORIT, W.; ZEILSTRA-RYALLS, J.H.; PRASERTAN, P. **Biotechnol. Lett.** 32, 1667, 2010.

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

VAN WYCHEN, S.; LAURENS, L.M.L. *Determination of Total Carbohydrates in Algal Biomass*. NREL/TP-5100-60957. Golden, CO: **National Renewable Energy Laboratory**. 2013.

VIJAYARAGHAVAN, K.; AHMAD, D.; Biohydrogen generation from palm oil mill effluent using anaerobic contact filter. **International Journal of Hydrogen Energy**. v 31(10): 1284-1291, 2006.

WANG J.L, WAN W. Comparison of difference pretreatment methods for enriching hydrogen producing cultures from digested sludge. **International Journal of Hydrogen Energy**. p 1-7, 2009

WANG, Z., HUANG, H., LIU, H., ZHOU, X. Self-sustained electrochemical promotion catalysts for partial oxidation reforming of heavy hydrocarbons. **International Journal of Hydrogen Energy**. v 37(23). p 17928-17935, 2012.

WANG, Y., GUO, W., CHEN, B.Y., CHENG, C.L., LO, Y.C., HO, S.H., CHANG, J.S., REN, N. Exploring the inhibitory characteristics of acid hydrolysates upon butanol fermentation: a toxicological assessment. **Bioresour. Technol.** v 198, 571–576, 2015.

YU, H.Q., ZHU, Z.H., HU, W.R., ZHANG, H.S. Hydrogen production from rice winery waste water in an up flow anaerobic reactor by using mixed anaerobic cultures. **International Journal of Hydrogen Energy**. v27, 1359–1365, 2002.

YUN, E. J., KIM, H. T., CHO, K. M., YU, S., KIM, S., CHOI, I. G., & KIM, K. H. Pretreatment and saccharification of red macroalgae to produce fermentable sugars. **Bioresource technology**. 199, 311-318, 2016.

ZHANG, L., LI, X., YONG, Q., YANG, S.T., OUYANG, J., YU, S. Impacts of lignocellulose-derived inhibitors on L-lactic acid fermentation. **Bioresource Technology**. 203, 173-180, 2015.

ZHANG H., BRUNS M.A., LOGAN B.E. Biological hydrogen production by *Clostridium acetobutylicum* in an unsaturated flow reactor. **Water Res.** 40(4): 728-34, 2006.

ZHAO X, XING D, FU N, LIU B, REN N. Hydrogen production by the newly isolated *Clostridium beijerinckii* RZF-1108. **Bioresource Technology**. v.102. p 8432–8436, 2011.

ZHU, D.; WANG, G.; QIAO, H.; CAI, J. Fermentative hydrogen production by the new marine *Pantoea agglomerans* isolated from the mangrove sludge. **International Journal of Hydrogen Energy**. v 33: 6116-6123, 2008.

ZHU, L.; JIN, H.; GAO, K.; XU, X. Succession of microbial community and enhanced mechanism of a ZVI-based anaerobic granular sludge process treating chloronitrobenzenes wastewater. **Journal of Hazardous Materials**. v 285(21): 157-166, 2015.

ANEXO I

Equações polinomiais referentes ao crescimento celular (X), consumo de substrato (S) e produção de H₂ (P) nos ensaios de fermentação com *C. beijerinckii* Br21 e com a adição de diferentes concentrações de HMF.

Inibidor	Equações Polinomiais	
HMF (g/L)	X (mg/L)	R ²
controle	$y=0,009x^3-1,3068x^2+116,7x-11,917$	0,9972
0,5	$y=0,0048x^3-0,9549x^2+105,36x-22,426$	0,9955
1	$y=-0,0383x^3+3,6939x^2-21,402x-66,015$	0,993
1,5	$y=-0,0219x^3+2,7077x^2-39,281x+11,948$	0,9958
2	$y=-0,0018x^4+0,1913x^3-5,2178x^2+39,288x+3,8947$	0,9936
2,5	$y=-0,0079x^3+1,6x^2-36,814x+88,016$	0,9642

Inibidor	Equações Polinomiais	
HMF (g/L)	S (mmol/L)	R ²
controle	$y=0,0005x^3-0,0498x^2+0,4231x+59,859$	0,9939
0,5	$y=0,0006x^3-0,0582x^2+0,5119x+62,424$	0,9944
1	$y=0,0004x^3-0,0408x^2+0,2394x+62,839$	0,9943
1,5	$y=0,0005x^3-0,047x^2+0,5477x+61,983$	0,995
2	$y=-0,0209x^2+0,4835x+61,125$	0,9804
2,5	$y=0,0003x^3-0,0447x^2+0,8483x+60,576$	0,9654

Inibidor	Equações Polinomiais	
HMF (g/L)	P (mm H ₂ /L)	R ²
controle	$y=-0,0057x^2+0,7783x+0,0856$	0,9987
0,5	$y=-0,0032x^2+0,5921x-0,6199$	0,995
1	$y=-0,0022x^2+0,3918x-0,2663$	0,9942
1,5	$y=0,0003x^2+0,1651x-0,0427$	0,996
2	$y=-0,00005x^3+0,0031x^2-0,0603x+0,108$	0,968
2,5	$y=0,000003x^3+0,0009x^2-0,0231x+0,0522$	0,9818

Gráficos referentes às velocidades específicas máximas de crescimento celular (μ_X), consumo de substrato (μ_S) e produção de H_2 (μ_{H_2}) nos ensaios de fermentação com *C. beijerinckii* Br21 e com a adição de diferentes concentrações de HMF.

Equações polinomiais referentes ao crescimento celular (X), consumo de substrato (S) e produção de H₂ (P) nos ensaios de fermentação com *C. beijerinckii* Br21 e com a adição de diferentes concentrações de ácido levulínico (AL).

Inibidor	Equações Polinomiais	
AL (g/L)	X (mg/L)	R ²
controle	$y=0,0086x^3-1,2824x^2+116,42x-11,994$	0,997
1	$y=-0,0144x^3+1,1757x^2+46,982x+16,137$	0,9983
2	$y=-0,0169x^3+2,0213x^2-13,675x+0,2854$	0,9958
3	$y=-0,0005x^4+0,0547x^3-1,121x^2+21,406x-0,4277$	0,9605
3,5	$y=-0,0073x^3+0,853x^2-12,694x+14,824$	0,9946
4	$y=0$	0

Inibidor	Equações Polinomiais	
AL (g/L)	S (mmol/L)	R ²
controle	$y=0,0005x^3-0,0489x^2+0,4271x+59,719$	0,9951
1	$y=0,0001x^3-0,0103x^2-0,2363x+59,747$	0,995
2	$y=0,00008x^3-0,0086x^2-0,2401x+60,462$	0,9951
3	$y=-0,0004x^3+0,0387x^2-1,451x+59,907$	0,988
3,5	$y=0,0002x^3-0,0091x^2-0,4224x+61,412$	0,99
4	$y=0,00002x^4-0,0026x^3+0,1086x^2-1,9706x+59,73$	0,9942

Inibidor	Equações Polinomiais	
AL (g/L)	P (mm H ₂ /L)	R ²
controle	$y=-0,0061x^2+0,7974x-0,0517$	0,999
1	$y=-0,0038x^2+0,4901x-0,0631$	0,9989
2	$y=-0,0007x^2+0,2013x-0,2519$	0,9946
3	$y=-0,0004x^3+0,00303x^2-0,4283x-0,0118$	0,9979
3,5	$y=-0,000003x^4+0,0003x^3-0,01x^2+0,0835x-0,0263$	0,99
4	$y=0$	0

Gráficos referentes às velocidades específicas máximas de crescimento celular (μ_X), consumo de substrato (μ_S) e produção de H_2 (μ_{H_2}) nos ensaios de fermentação com *C. beijerinckii* Br21 e com a adição de diferentes concentrações de ácido levulínico (AL).

Equações polinomiais referentes ao crescimento celular (X), consumo de substrato (S) e produção de H₂ (P) nos ensaios de fermentação com *C. beijerinckii* Br21 e com a adição de diferentes concentrações de ácido fórmico (AF).

Inibidor	Equações Polinomiais	
AF(g/L)	X (mg/L)	R ²
controle	$y = -0,8675x^2 + 117,07x - 1,0282$	0,993
0,5	$y = 0,0216x^3 - 2,9327x^2 + 165,98x - 31,04$	0,9985
1	$y = -0,0526x^3 + 5,3663x^2 - 67,386x + 22,431$	0,9985
1,5	$y = -0,0004x^4 + 0,0381x^3 - 0,7149x^2 + 2,7964x + 2,783$	0,9926
2	$y = 0,00009x^3 - 0,0106x^2 + 0,4289x + 0,0191$	0,9982

Inibidor	Equações Polinomiais	
AF (g/L)	S (mmol/L)	R ²
controle	$y = 0,0075x^2 - 1,1883x + 63,017$	0,9957
0,5	$y = -0,0005x^3 - 0,0497x^2 + 0,1856x + 61,798$	0,9979
1	$y = 0,0005x^3 - 0,0443x^2 + 0,1496x + 62,942$	0,9936
1,5	$y = 0,0001x^3 - 0,018x^2 + 0,2732x + 61,714$	0,9929
2	$y = 0,00005x^3 + 0,0105x^2 - 0,6728x + 62,159$	0,9947

Inibidor	Equações Polinomiais	
AF (g/L)	P (mm H ₂ /L)	R ²
controle	$y = -0,0035x^2 + 0,6334x - 0,4889$	0,9955
0,5	$y = -0,0072x^2 + 0,7877x - 0,3244$	0,9962
1	$y = -0,0001x^3 + 0,0115x^2 + 0,0543x - 0,0666$	0,9953
1,5	$y = -0,000001x^4 + 0,0001x^3 - 0,0015x^2 - 0,002x + 0,0115$	0,9954
2	$y = 0$	0

Gráficos referentes às velocidades específicas máximas de crescimento celular (μ_X), consumo de substrato (μ_S) e produção de H_2 (μ_{H_2}) nos ensaios de fermentação com *C. beijerinckii* Br21 e com a adição de diferentes concentrações de ácido fórmico (AF).

ANEXO II

Equações polinomiais referentes ao crescimento celular (X), consumo de substrato (S) e produção de H₂ (P) nos ensaios de fermentação com *C. beijerinckii* Br21 e *C. acetobutylicum* ATCC 824 com a adição da CI₅₀ do HMF.

Inibidor	Equações Polinomiais CI ₅₀	
HMF - 0,90 g/L	X (mg/L)	R ²
<i>C. beijerinckii</i> Br21	$y=0,0014x^4-0,2168x^3+10,596x^2-102,39x+0,6964$	0,9987
<i>C. acetobutylicum</i> ATCC 824	$y=0,0012x^4-0,1866x^3+9,2752x^2-85,425x-1,0292$	0,9991

Inibidor	Equações Polinomiais CI ₅₀	
HMF - 0,90 g/L	S (mmol/L)	R ²
<i>C. beijerinckii</i> Br21	$y=0,0005x^3-0,0475x^2+0,4032x+63,078$	0,995
<i>C. acetobutylicum</i> ATCC 824	$y=0,0003x^3-0,031x^2-0,0557x+63,823$	0,9927

Inibidor	Equações Polinomiais CI ₅₀	
HMF - 0,90 g/L	P (mmol H ₂ /L)	R ²
<i>C. beijerinckii</i> Br21	$y=-0,0023x^2+0,4826x-0,4589$	0,99
<i>C. acetobutylicum</i> ATCC 824	$y=-0,0025x^2+0,4135x-0,1836$	0,9978

Gráficos referentes às velocidades específicas máximas de crescimento celular (μ_X), consumo de substrato (μ_S) e produção de H_2 (μ_{H_2}) nos ensaios de fermentação com *C. beijerinckii* Br21 e *C. acetobutylicum* ATCC 824 e seus respectivos controles com a adição da CI_{50} do HMF.

Equações polinomiais referentes ao crescimento celular (X), consumo de substrato (S) e produção de H₂ (P) nos ensaios de fermentação com *C. beijerinckii* Br21 e *C. acetobutylicum* ATCC 824 com a adição da CI₅₀ do ácido levulínico (AL).

Inibidor	Equações Polinomiais CI ₅₀	
AL - 2,50 g/L	X (mg/L)	R ²
<i>C. beijerinckii</i> Br21	$y = -0,0156x^3 + 1,9626x^2 - 12,941x + 2,2126$	0,9992
<i>C. acetobutylicum</i> ATCC 824	$y = -0,0169x^3 + 2,0978x^2 - 14,544x - 4,5983$	0,9979

Inibidor	Equações Polinomiais CI ₅₀	
AL - 2,50 g/L	S (mmol/L)	R ²
<i>C. beijerinckii</i> Br21	$y = 0,0001x^3 - 0,0151x^2 - 0,0783x + 63,017$	0,9962
<i>C. acetobutylicum</i> ATCC 824	$y = -0,0027x^2 - 0,4036x + 63,838$	0,9936

Inibidor	Equações Polinomiais CI ₅₀	
AL - 2,50 g/L	P (mmol H ₂ /L)	R ²
<i>C. beijerinckii</i> Br21	$y = 0,00003x^3 - 0,0003x^2 + 0,4628x - 0,0477$	0,9925
<i>C. acetobutylicum</i> ATCC 824	$y = -0,00002x^3 + 0,0001x^2 + 0,3409x - 0,1423$	0,9966

Gráficos referentes às velocidades específicas máximas de crescimento celular (μ_X), consume de substrato (μ_S) e produção de H_2 (μ_{H_2}) nos ensaios de fermentação com *C. beijerinckii* Br21 e *C. acetobutylicum* ATCC 824 e seus respectivos controles com a adição da CI_{50} do ácido levulínico (AL).

Equações polinomiais referentes ao crescimento celular (X), consumo de substrato (S) e produção de H₂ (P) nos ensaios de fermentação com *C. beijerinckii* Br21 e *C. acetobutylicum* ATCC 824 com a adição da CI₅₀ do ácido fórmico (AF).

Inibidor	Equações Polinomiais CI ₅₀	
AF - 1,15 g/L	X (mg/L)	R ²
<i>C. beijerinckii</i> Br21	$y=0,0011x^4-0,1771x^3+8,9813x^2-87,299x+5,1197$	0,9992
<i>C. acetobutylicum</i> ATCC 824	$y=0,001x^4-0,1626x^3+8,2518x^2-76,811x+9,013$	0,9981

Inibidor	Equações Polinomiais CI ₅₀	
AF - 1,15 g/L	S (mmol/L)	R ²
<i>C. beijerinckii</i> Br21	$y=0,0004x^3-0,0377x^2+0,2371x+63,376$	0,9962
<i>C. acetobutylicum</i> ATCC 824	$y=0,0004x^3-0,0368x^2+0,1323x+63,046$	0,9966

Inibidor	Equações Polinomiais CI ₅₀	
AF - 1,15 g/L	P (mmol H ₂ /L)	R ²
<i>C. beijerinckii</i> Br21	$y=0,0001x^3+0,008x^2+0,1886x-0,0635$	0,9982
<i>C. acetobutylicum</i> ATCC 824	$y=-0,0028x^2+0,4401x-0,7244$	0,9934

Gráficos referentes às velocidades específicas máximas de crescimento celular (μ_X), consume de substrato (μ_S) e produção de H_2 (μ_{H_2}) nos ensaios de fermentação com *C. beijerinckii* Br21 e *C. acetobutylicum* ATCC 824 e seus respectivos controles com a adição da CI_{50} do ácido fórmico (AF).

ANEXO III

Equações polinomiais referentes ao crescimento celular (X), consumo de substrato (S) e produção de H₂ (P) nos ensaios de fermentação com *C. beijerinckii* Br21 e *C. acetobutylicum* ATCC 824 com a adição da mistura de inibidores, HMF+AL.

Inibidor	Equações Polinomiais Misturas	
HMF + AL	X (mg/L)	R ²
<i>C. beijerinckii</i> Br21	$y = -0,0327x^3 + 3,3076x^2 - 24,264x - 49,359$	0,9943
<i>C. acetobutylicum</i> ATCC 824	$y = -0,0203x^3 + 2,3837x^2 - 19,523x - 0,1663$	0,9975

Inibidor	Equações Polinomiais Misturas	
HMF + AL	S (mmol/L)	R ²
<i>C. beijerinckii</i> Br21	$y = -0,0033x^2 - 0,3619x + 63,29$	0,9947
<i>C. acetobutylicum</i> ATCC 824	$y = -0,003x^2 - 0,3867x + 63,769$	0,9937

Inibidor	Equações Polinomiais Misturas	
HMF + AL	P (mmol H ₂ /L)	R ²
<i>C. beijerinckii</i> Br21	$y = -0,0024x^2 + 0,4407x - 0,2632$	0,9942
<i>C. acetobutylicum</i> ATCC 824	$y = -0,0021x^2 + 0,3829x - 0,246$	0,9984

Gráficos referentes às velocidades específicas máximas de crescimento celular (μ_X), consume de substrato (μ_S) e produção de H_2 (μ_{H_2}) nos ensaios de fermentação com *C. beijerinckii* Br21 e *C. acetobutylicum* ATCC 824 e seus respectivos controles com a adição da mistura de inibidores HMF+AL.

Equações polinomiais referentes ao crescimento celular (X), consumo de substrato (S) e produção de H₂ (P) nos ensaios de fermentação com *C. beijerinckii* Br21 e *C. acetobutylicum* ATCC 824 com a adição da mistura de inibidores, HMF+AF.

Inibidor	Equações Polinomiais Misturas	
HMF + AF	X (mg/L)	R ²
<i>C. beijerinckii</i> Br21	$y = -0,0367x^3 + 3,6626x^2 - 26,684x - 52,73$	0,9948
<i>C. acetobutylicum</i> ATCC 824	$y = -0,0306x^3 + 3,0611x^2 - 13,652x - 56,421$	0,9914

Inibidor	Equações Polinomiais Misturas	
HMF + AF	S (mmol/L)	R ²
<i>C. beijerinckii</i> Br21	$y = -0,0038x^2 - 0,3658x + 63,326$	0,9925
<i>C. acetobutylicum</i> ATCC 824	$y = 0,0004x^3 - 0,0358x^2 + 0,1048x + 63,187$	0,996

Inibidor	Equações Polinomiais Misturas	
HMF + AF	P (mmol H ₂ /L)	R ²
<i>C. beijerinckii</i> Br21	$y = -0,0022x^2 + 0,44x - 0,0156$	0,9941
<i>C. acetobutylicum</i> ATCC 824	$y = -0,0031x^2 + 0,4634x - 0,8147$	0,9937

Gráficos referentes às velocidades específicas máximas de crescimento celular (μ_X), consume de substrato (μ_S) e produção de H_2 (μ_{H_2}) nos ensaios de fermentação com *C. beijerinckii* Br21 e *C. acetobutylicum* ATCC 824 e seus respectivos controles com a adição da mistura de inibidores HMF+AF.

Equações polinomiais referentes ao crescimento celular (X), consumo de substrato (S) e produção de H₂ (P) nos ensaios de fermentação com *C. beijerinckii* Br21 e *C. acetobutylicum* ATCC 824 com a adição da mistura de inibidores, AL+AF.

Inibidor	Equações Polinomiais Misturas	
AL + AF	X (mg/L)	R ²
<i>C. beijerinckii</i> Br21	$y=0,0011x^4-0,1742x^3+8,9309x^2-90,049x+16,838$	0,9981
<i>C. acetobutylicum</i> ATCC 824	$y=-0,0296x^3+3,0959x^2-18,872x-34,328$	0,9972

Inibidor	Equações Polinomiais Misturas	
AL + AF	S (mmol/L)	R ²
<i>C. beijerinckii</i> Br21	$y=0,00006x^3-0,0092x^2-0,2027x+62,573$	0,9967
<i>C. acetobutylicum</i> ATCC 824	$y=0,0004x^3-0,0366x^2+0,1645x+62,944$	0,9972

Inibidor	Equações Polinomiais Misturas	
AL + AF	P (mmol H ₂ /L)	R ²
<i>C. beijerinckii</i> Br21	$y=-0,002x^2+0,4243x-0,212$	0,9954
<i>C. acetobutylicum</i> ATCC 824	$y=-0,0025x^2+0,4423x-0,2317$	0,9971

Gráficos referentes às velocidades específicas máximas de crescimento celular (μ_X), consume de substrato (μ_S) e produção de H_2 (μ_{H_2}) nos ensaios de fermentação com *C. beijerinckii* Br21 e *C. acetobutylicum* ATCC 824 e seus respectivos controles com a adição da mistura de inibidores AL+AF.

Equações polinomiais referentes ao crescimento celular (X), consumo de substrato (S) e produção de H₂ (P) nos ensaios de fermentação com *C. beijerinckii* Br21 e *C. acetobutylicum* ATCC 824 com a adição da mistura de inibidores, HMF+AL+AF.

Inibidor	Equações Polinomiais Misturas	
HMF + AL + AF	X (mg/L)	R ²
<i>C. beijerinckii</i> Br21	$y = -0,0005x^4 + 0,0511x^3 - 0,5049x^2 - 6,3821x + 18,976$	0,9983
<i>C. acetobutylicum</i> ATCC 824	$y = -0,0104x^3 + 1,8298x^2 - 34,059x + 54,008$	0,9948

Inibidor	Equações Polinomiais Misturas	
HMF + AL + AF	S (mmol/L)	R ²
<i>C. beijerinckii</i> Br21	$y = 0,0001x^3 - 0,0137x^2 + 0,0039x + 62,372$	0,9969
<i>C. acetobutylicum</i> ATCC 824	$y = 0,0001x^3 - 0,0125x^2 + 0,0164x - 62,245$	0,9947

Inibidor	Equações Polinomiais Misturas	
HMF + AL + AF	P (mmol H ₂ /L)	R ²
<i>C. beijerinckii</i> Br21	$y = 0,000009x^4 + 0,001x^3 - 0,0261x^2 + 0,2027x - 0,0047$	0,9986
<i>C. acetobutylicum</i> ATCC 824	$y = -0,000002x^4 + 0,0002x^3 + 0,0018x^2 - 0,0613x + 0,0458$	0,9984

Gráficos referentes às velocidades específicas máximas de crescimento celular (μ_X), consume de substrato (μ_S) e produção de H_2 (μ_{H_2}) nos ensaios de fermentação com *C. beijerinckii* Br21 e *C. acetobutylicum* ATCC 824 e seus respectivos controles com a adição da mistura de inibidores HMF+AL+AF.