



**INSTITUTO SUPERIOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
EGAS MONIZ**

**MESTRADO INTEGRADO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

**BACTÉRIAS ANAERÓBIAS COMO FÁBRICAS CELULARES:  
PRODUÇÃO DE HIDROGÉNIO E BUTIRATO POR  
CLOSTRIDIUM SP.**

Trabalho submetido por  
**Tânia Margarida Victor Martins**  
para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas

**Outubro de 2013**



**INSTITUTO SUPERIOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
EGAS MONIZ**

**MESTRADO INTEGRADO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

**BACTÉRIAS ANAERÓBIAS COMO FÁBRICAS CELULARES:  
PRODUÇÃO DE HIDROGÉNIO E BUTIRATO POR  
CLOSTRIDIUM SP.**

Trabalho submetido por  
**Tânia Margarida Victor Martins**  
para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas

Trabalho orientado por  
**Professora Doutora Patrícia da Silva Moura**

**Outubro de 2013**



*Aos pais,*

*Melhor do que todos os presentes por baixo da árvore de natal é a presença de uma  
família feliz.*

*“The most exciting phrase to hear in science, the one that heralds the most discoveries,  
is not "Eureka!" (I found it!) but "That's funny..."”*

Isaac Asimov



## **Agradecimentos**

*Agradeço principalmente à minha orientadora, Professora Doutora Patrícia da Silva Moura, pelo apoio, dedicação, compreensão, análise crítica e possibilidade de execução do presente trabalho.*

*Aos meus colegas e amigos, Alexandre Rego, Ana Luísa Barroco, Ana Pessoa, Ana Rita Rodrigues, Ana Sofia Figueiredo, Inês Figueiredo, Joana Lourenço, João Aguiar, Kelly Frade, Patrícia Candeias e Sílvia Martins agradeço o apoio incondicional, motivação, paciência e amizade durante estes cinco árduos anos.*

*Aos meus grandes amigos, Alfredo Antunes, Carmina Antunes, Joana Santos, João Paulos, Jorge Santos, Mónica Costa e Rosália Coelho agradeço a amizade, motivação e apoio absoluto que me têm dado ao longo dos anos.*

*E por último, agradeço incondicionalmente às pessoas mais importantes da minha vida, os meus pais, Artur e Laurinda Martins, por total confiança face ao meu trabalho e dedicação ao longo dos anos de curso e fora dele.*

*Muito Obrigado a todos!*

*Tânia Martins*

*Outubro de 2013*



## Resumo

Com a crescente procura de novas alternativas aos combustíveis fósseis, e assim tentar minimizar os seus efeitos ao nível ambiental e económico, tem-se recorrido à utilização de sub-produtos agrícolas e da indústria agro-alimentar e a processos biológicos de conversão. Por esta via é possível, por exemplo, obter compostos úteis como vetores energéticos, tais como hidrogénio e butirato a partir de resíduos da produção de goma de alfarroba.

Sabe-se que o hidrogénio e o butirato podem ser obtidos por processos biológicos, tal como a fermentação anaeróbica, sendo o género *Clostridium* o mais estudado para tal efeito.

*C. butyricum* e *C. tyrobutyricum* são microrganismos produtores de hidrogénio e ácidos orgânicos, nomeadamente butirato e acetato. *C. acetobutylicum* evidencia uma fermentação do tipo bifásico, que compreende as fases acidogénica e solventogénica. Consequentemente produz ácidos orgânicos, como o ácido butírico e o ácido acético, e ainda, com a reassimilação destes na fase solventogénica, produz etanol, butanol e acetona (ABE).

No presente trabalho pretende-se comparar os resultados obtidos na produção de hidrogénio e butirato por diferentes espécies de *Clostridium* sp., especificamente *Clostridium acetobutylicum* DSM 792, *Clostridium butyricum* DSM 10702 e *Clostridium tyrobutyricum* (estirpes 1T, 2T, 3T e 9P) utilizando o extrato aquoso de polpa de alfarroba como fonte de carbono e energia. Estas bactérias vão ser avaliadas entre si de acordo com o rendimento, produção específica e produtividade volumétrica de hidrogénio e butirato. Desta forma será possível a determinação de qual o melhor produtor destes compostos, como alternativa a combustíveis fósseis.

A comparação dos trabalhos efetuados permitiu verificar que o *C. butyricum* foi o microrganismo mais promissor para a produção simultânea de hidrogénio e butirato, utilizando como fonte de carbono o extrato aquoso de polpa de alfarroba.

*Palavras-chave:* *Clostridium* sp., polpa de alfarroba, hidrogénio, butirato.



## Abstract

With the growing demand for new alternatives to fossil fuels and trying to minimize their effects on environmental and economic, it has been resorted the use of agricultural by-products and agro-food industry and biological conversion processes. Through this way it is possible, for example, to obtain useful compounds as energy sources, such as hydrogen and butyrate residues from the production of locust bean gum.

It is known that butyrate and hydrogen can be obtained by biological processes, such as anaerobic fermentation, being the genus *Clostridium* the most studied for this purpose.

*C. butyricum* and *C. tyrobutyricum* can produce hydrogen and organic acids, particularly butyrate and acetate. *C. acetobutylicum* reveals a biphasic fermentation, which is the acidogenic and solventogenic ways. Consequently produces organic acids such as acetic acid and butyric acid, and also with the re-assimilation of these on solventogenic phase it can produce ethanol, butanol and acetone (ABE).

In this work it is intend to compare the results obtained in the production of hydrogen and butyrate by different species of *Clostridium* sp., specifically *Clostridium acetobutylicum* DSM 792, *Clostridium butyricum* DSM 10702 and *Clostridium tyrobutyricum* (strains 1T, 2T, 3T and 9P) using the extract aqueous carob pulp as a source of carbon and energy. These bacteria are being evaluated according to yield, volumetric productivity and specific production of hydrogen and butyrate. This will allow the determination of which microorganism is the best producer of these compounds as an alternative to fossil fuels.

According to the comparison of the different works, it has shown that *C. butyricum* was the microorganism most promising for the simultaneous production of hydrogen and butyrate as carbon source using the aqueous extract of carob pulp.

Keywords: *Clostridium* sp., carob pulp, hydrogen, butyrate.



# Índice Geral

Agradecimentos .....	5
Resumo .....	7
Abstract .....	9
Índice Geral .....	11
Lista de abreviaturas .....	17
Introdução.....	19
Enquadramento do trabalho.....	21
1. Bactérias anaeróbias.....	23
2. O Género <i>Clostridium</i> .....	25
2.1. O género <i>Clostridium</i> na indústria alimentar .....	25
2.2. O género <i>Clostridium</i> na indústria farmacêutica.....	26
2.3. O género <i>Clostridium</i> em processos biológicos .....	26
2.4. A patogenicidade do género <i>Clostridium</i> .....	27
3. Clostrídios como fábricas celulares .....	29
3.1. <i>Clostridium acetobutylicum</i> , <i>Clostridium butyricum</i> e <i>Clostridium tyrobutyricum</i> 29	
3.1.1. Vias Metabólicas .....	30
3.2. Aplicações de metabolitos por Clostrídios.....	34
4. Ácido butírico .....	37
4.1. Características.....	37
4.2. Aplicações do ácido butírico .....	37
4.2.1. Aplicação a nível intestinal .....	37
4.2.2. Aplicação anti-inflamatória e anticancerígena .....	38
4.2.3. Aplicações de ácido butírico na indústria .....	38
4.3. Perspetiva futura na utilização do ácido butírico.....	39
5. Biohidrogénio .....	41

5.1.	Características.....	41
5.2.	Produção de biohidrogénio.....	41
5.2.1.	Produção química .....	41
5.2.2.	Produção biológica .....	42
5.3.	Fatores preponderantes na produção de biohidrogénio .....	45
5.4.	Perspetivas futuras na produção de biohidrogénio .....	46
6.	Estudos realizados utilizando clostrídios como fábricas celulares para a produção de hidrogénio e butirato .....	47
6.1.	Ensaio de fermentação.....	47
6.2.	Trabalho Lima (2012), Martins (2012) e Martins (2013).....	47
7.	Conclusão .....	55
8.	Referências Bibliográficas .....	57

## Índice de figuras

<b>Figura 1</b> – Aplicação dos metabolitos provenientes da fermentação de glucose a partir de bactérias anaeróbias.....	24
<b>Figura 2</b> – Observação microscópica de uma coloração de Gram de células de <i>Clostridium sp.</i> ....	25
<b>Figura 3</b> – Vias metabólicas da fermentação de glucose por <i>C. butyricum</i> e <i>C. tyrobutyricum</i> .....	30
<b>Figura 4</b> – Via metabólica da fermentação de glucose por <i>Clostridium acetobutylicum</i> .....	32
<b>Figura 5</b> – Processamento de <i>kibbles</i> de alfarroba na obtenção de fontes de carbono para ensaio de fermentação .....	48
<b>Figura 6</b> – Ácidos orgânicos produzidos e quantificados ao fim de 72, 166 e 168 horas de fermentação por diferentes estirpes de <i>Clostridium sp.</i> .....	51
<b>Figura 7</b> – Açúcares consumidos na fermentação de extrato de polpa de alfarroba pelas .....	52



## Índice de tabelas

<b>Tabela 1</b> – Caraterização de açúcares do extrato aquoso de polpa de alfarroba.....	49
<b>Tabela 2</b> – Valores de biomassa produzida e pH final da fermentação de extrato aquoso de polpa de alfarroba por estirpes de <i>Clostridium</i> sp.....	50
<b>Tabela 3</b> – Comparação de resultados estequiométricos obtidos pela fermentação de extrato aquoso de polpa de alfarroba por diferentes estirpes de <i>Clostridium</i> sp. ....	53



## Lista de abreviaturas

<b><math>\beta</math>-hidroxibutiril-CoA deshidrogenase</b>	Beta – hidroxibutiril – Coenzima A deshidrogenase
<b>Acetil-CoA</b>	Acetil - Coenzima A
<b>ADC</b>	Acetoacetato Descarboxilase
<b>ACK</b>	Acetato Cinase
<b>adhE</b>	Butiril-Coenzima A deshidrogenase
<b>ADP</b>	Adenina Difosfato
<b>ATP</b>	Adenina Trifosfato
<b>bdhAB</b>	Butanol Deshidrogenase
<b>bdhAB, edh</b>	Etanol deshidrogenase
<b>BM1</b>	<i>Nutrient Basal Medium 1</i>
<b>BUK</b>	Butirato Cinase
<b>BUT</b>	Butiril-Coenzima A: acetato Coenzima A-transferase
<b>Butiril-CoA</b>	Butiril - Coenzima A
<b><i>C. acetobutylicum</i></b>	<i>Clostridium acetobutylicum</i>
<b><i>C. butyricum</i></b>	<i>Clostridium butyricum</i>
<b><i>C. tyrobutyricum</i></b>	<i>Clostridium tyrobutyricum</i>
<b><i>CRT</i></b>	<i>Crotonase</i>
<b>CO</b>	Monóxido de Carbono
<b>CoA</b>	Coenzima A
<b>CO<sub>2</sub></b>	Dióxido de Carbono

<b>EA</b>	Extrato Aquoso
<b>Fd</b>	Ferredoxina Oxidada
<b>FdH<sub>2</sub></b>	Ferredoxina Reduzida
<b>GAE</b>	Equivalentes de Ácido Gálgico
<b>H<sub>2</sub></b>	Hidrogénio
<b>HBD</b>	3-Hidroxilbutiril-Coenzima A Desidrogenase
<b>HPLC</b>	Cromatografia Líquida de Alta Pressão
<b>HYD</b>	Hidrogenase [FeFe] Monomérica
<b>LDH</b>	Lactato Desidrogenase
<b>NAD<sup>+</sup></b>	Ferredoxina Redutase
<b>NADH</b>	Ferredoxina Oxirredutase
<b>PFOR</b>	Piruvato: Ferredoxina Oxirredutase
<b>pH</b>	Potencial Hidrogenómico
<b>Pi</b>	Fósforo Inorgânico
<b>p.p.m</b>	Partes Por Milhão
<b>PTA</b>	Fosfotransacetilase
<b>PTB</b>	Fosfotransbutirilase
<b>RCM</b>	<i>Reinforced Clostridial Medium</i>
<b>THL</b>	Tiolase (Acetil-Coenzima A Acetiltransferase)

## Introdução

A necessidade mundial de novas capacidades energéticas para a substituição de reservas de combustíveis fósseis é cada vez maior, uma vez que se pretende diminuir os problemas ambientais e, ainda, diminuir os custos para tal obtenção, como foi perceptível em 2008, em que cada barril de petróleo custava 148 dólares (Sá, Oliveira, Matos & Oliveira, 2009). Assim sendo, o hidrogénio tem sido bastante estudado e empregue como via alternativa para combustíveis fósseis, pois apresenta capacidade energética significativa (Sá *et al.*, 2009). O hidrogénio, em comparação com os combustíveis fósseis, tem uma capacidade energética três vezes superior, sendo  $120 - 142 \text{ KJ.g}^{-1}$ , logo permite um aproveitamento direto como combustível para motores e/ou células a combustível (Sá *et al.*, 2009).

Nos últimos anos, a produção de hidrogénio e butirato por fermentação anaeróbia tem suscitado grande interesse, sendo o género *Clostridium* o grupo de microrganismos que mais se destaca neste processo (Sá *et al.*, 2009). Na fermentação anaeróbia, os substratos ricos em matéria orgânica são convertidos em diversos compostos, tais como hidrogénio, dióxido de carbono, butirato e acetato (Sá *et al.*, 2009; Tracy, Jones, Fast, Indurthi & Papoutsakis, 2012).

Neste trabalho, pretende-se salientar a utilidade de diversas espécies pertencentes ao género *Clostridium* para a produção de hidrogénio e butirato.

*Bactérias anaeróbias como fábricas celulares: produção de hidrogénio e butirato por Clostridium sp.*

## **Enquadramento do trabalho**

O presente trabalho permite comparar os resultados obtidos na produção de hidrogénio e butirato por diferentes estirpes de *Clostridium* sp. e verificar qual o melhor microrganismo em termos de rendimento em cada um dos metabolitos. Os trabalhos realizados por Martins (2012) e Martins (2013) utilizaram as estirpes *C. tyrobutyricum* 1T, 2T, 3T e 9P, e *C. acetbutylicum* DSM 792, em que conseguiram obter como metabolitos o hidrogénio e o butirato a partir da utilização de polpa de alfarroba como fonte de carbono. A polpa de alfarroba tem sido alvo de investigação porque evidencia elevado potencial de valorização, por ser rica em açúcares, tais como: glucose, sacarose e frutose. No trabalho efetuado por Lima (2013) estudou-se ainda a estirpe *C. butyricum* DSM 10702 utilizando como fonte de carbono polpa de alfarroba.

*Bactérias anaeróbias como fábricas celulares: produção de hidrogénio e butirato por Clostridium sp.*

## 1. Bactérias anaeróbias

As bactérias anaeróbias são bactérias que não requerem a presença de oxigénio para assimilar compostos orgânicos (Hong & Gu, 2009). As bactérias anaeróbias dividem-se em três grandes grupos, bactérias anaeróbias facultativas, bactérias anaeróbias aerotolerantes e bactérias anaeróbias obrigatórias ou estritas (Hub, 2012).

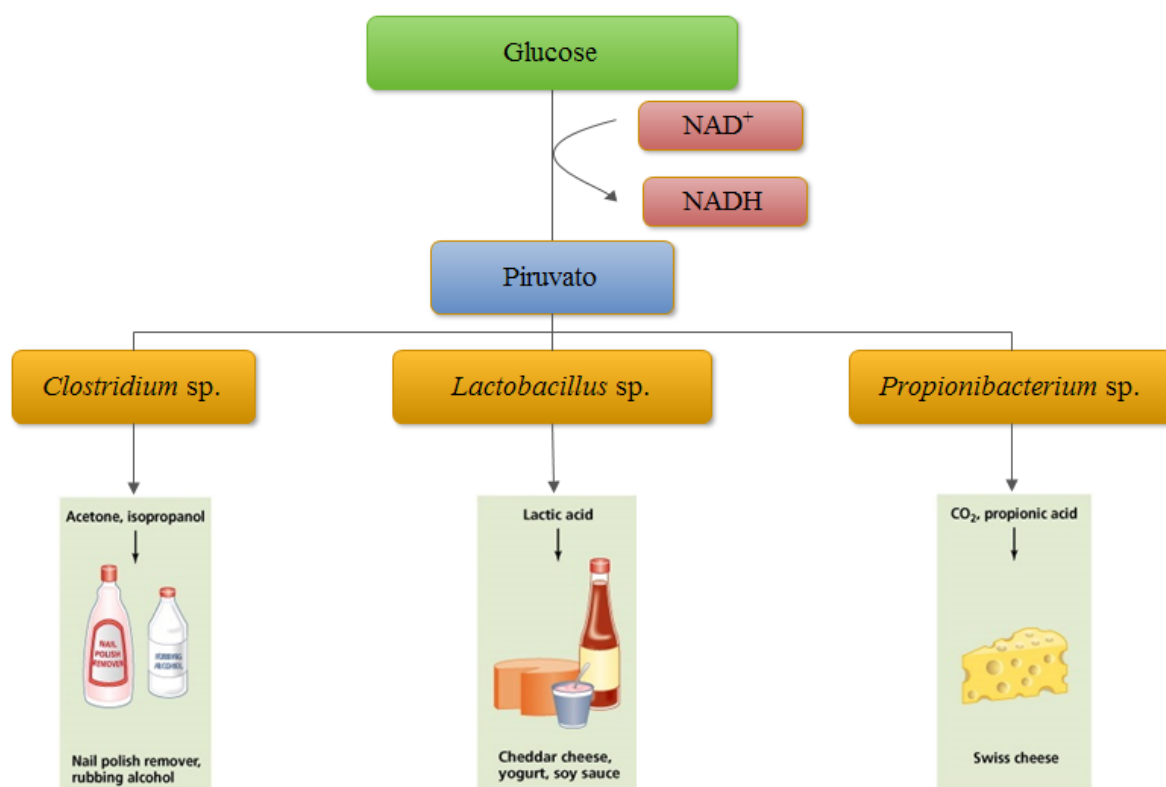
As bactérias anaeróbias facultativas crescem num ambiente com ou sem presença de oxigénio, sendo a *Escherichia coli*, *Staphylococcus genus* e todas as bactérias da família *Enterobacteriaceae* exemplos desse grupo de bactérias (Chen, Tseng, Lee & Chang, 2005; Hub, 2012). As bactérias anaeróbias aerotolerantes são bactérias que suportam a existência de oxigénio no meio envolvente, mas apenas crescem em meios sem oxigénio. *Lactobacillus acidophilus* é um exemplo de bactéria anaeróbia aerotolerante (Hub, 2012).

As bactérias anaeróbias obrigatórias não conseguem crescer nem manter a viabilidade na presença de oxigénio. São exemplo as bactérias do género *Clostridium* (Chen *et al.*, 2005; Hub, 2012). Este tipo de bactérias consegue adquirir energia por fermentação ou respiração anaeróbia. A energia é fundamental para o crescimento, motilidade e manutenção da função celular das bactérias, como tal, as bactérias recorrem a substratos como fonte de energia e crescimento (Eckenfelder, Patocza & Pulliam, 1988).

As bactérias anaeróbias obrigatórias ostentam distintas formas de obtenção de energia, tanto por hidrólise, fermentação ou, especificamente, acidogénese e metanogénese, entre outras (Ollivier, Caumette, Garcia & Mah, 1994). A hidrólise permite que haja decomposição de matéria orgânica complexa em moléculas orgânicas solúveis. Na fermentação ou acidogénese ocorre decomposição de carbo-hidratos a partir de enzimas, bactérias, leveduras ou bolores, com acidificação do meio (Cooke, 2013). Na acetogénese, os produtos da fermentação são convertidos em acetato, hidrogénio e dióxido de carbono; isto apenas ocorre em bactérias denominadas acetogénicas (Cooke, 2013). A metanogénese é realizada por bactérias metanogénicas, com formação de metano (Cooke, 2013). A fermentação realizada por bactérias anaeróbias permite obter diversos tipos de metabolitos, tais como ácidos orgânicos, dióxido de carbono, hidrogénio, metano e biomassa (Mittal, 2011). Os produtos obtidos dependem de

diversos fatores, tais como: temperatura, taxa de decomposição e produção de gases (Cooke, 2013).

De acordo com os diversos tipos de metabolitos obtidos na fermentação por distintas bactérias anaeróbicas, é possível verificar a partir da figura 1 que os metabolitos podem ser utilizados na produção de alimentos (e.g. queijo e iogurte), como condimento alimentar (e.g. molho de soja), e ainda, em produtos cosméticos (e.g. removedor de verniz) (Fulks, 2011).

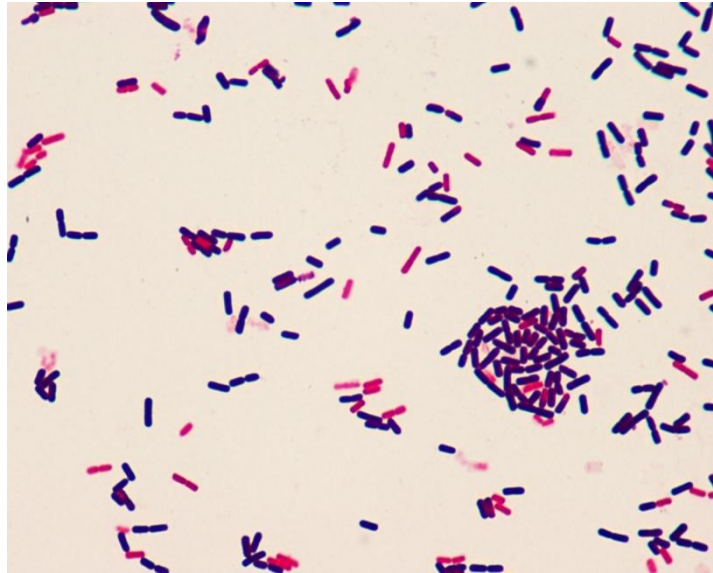


**Figura 1** – Aplicação dos metabolitos provenientes da fermentação de glucose a partir de bactérias anaeróbicas (Adaptado de Fulks, 2011)

Devido à forma como estas bactérias produzem distintos metabolitos, têm sido alvo de estudo como vias alternativas a combustíveis fósseis, uma vez que não necessitam de grandes quantidades de ATP para obter igual ou maior quantidade de energia (Eckenfelder *et al.*, 1988).

## 2. O Género *Clostridium*

O género *Clostridium* é constituído por bactérias anaeróbias, Gram-positivo, produtores de endosporos, e que se apresentam na forma de bastonete (Fig. 2) (Tracy *et al.*, 2012).



**Figura 2** – Observação microscópica de uma coloração de Gram de células de *Clostridium sp.* (Retirado de Naber, 2013)

Determinadas espécies de *Clostridium* são aerotolerantes, sendo que esta característica permite a sobrevivência de esporos na presença de oxigénio (Tracy *et al.*, 2012). Os clostrídios são organismos saprófitas, como tal, vivem e multiplicam-se em habitats anaeróbios contendo matéria orgânica (e.g. solos, sedimentos aquáticos e tecidos anaeróbios). Assim sendo, os clostrídios desenvolveram a capacidade de fermentar compostos orgânicos, nomeadamente hidratos de carbono simples e complexos (Tracy *et al.*, 2012). Estas bactérias apresentam características sacarolíticas e proteolíticas, pois conseguem decompor hidratos de carbono e proteínas, respetivamente. Conseguem igualmente produzir ácidos orgânicos, nomeadamente ácido butírico e ácido acético (Cruickshank, Duguid, Marmion & Swain, 1973; Liu, Zhu & Yang, 2006).

### 2.1. O género *Clostridium* na indústria alimentar

Com o constante crescimento populacional e a procura de novas alternativas capazes de substituírem petróleo, fez com que diversos países tivessem a capacidade de produção a larga escala de biomassa vegetal (Lo, Yung-Sheng, Chen & Chang, 2010; Ramachandran, Wrana, Cicek, Sparling & Levin, 2011; Smith, Maclean, Miller &

Carruthers,1997). Assim sendo, a obtenção industrial de biomassa vegetal é consequentemente utilizada como fonte de carbono para bactérias fermentativas (Smith *et al.*, 1997). A biomassa vegetal passa por diversos processos de transformação, designadamente gaseificação, pirólise, combustão, granulação e/ou compactação de resíduos (Antonopoulou, Gavala, Skiadas, Angelopoulos & Lyberatos, 2008; Aristarkhov, Zhuravskii, Polesskii & Permyakov, 2001). Tal é devido, para a produção de produtos com importância energética, tal como: hidrogénio e butirato (Smith *et al.*, 1997; Tracy *et al.*, 2012).

O género *Clostridium* é o grupo de bactérias que recorre a biomassa vegetal como fonte de carbono para a produção de metabolitos com capacidade energética (Rafieenia, 2013). Este género bacteriano utiliza monossacarídeos provenientes de sementes de girassol, grãos, milho, cana-de-açúcar, óleo de palma, polpa de alfarroba (Luque *et al.*, 2008). As bactérias vão utilizar os açúcares existentes na biomassa vegetal de forma a efetuar a fermentação, sendo que os açúcares comumente utilizados na fermentação são: glucose, frutose e xilose. Outros compostos existentes e passíveis de utilização são as hemiceluloses (Kalia & Purohit, 2008; Rafieenia, 2013; Tracy *et al.*, 2012)

## **2.2. O género *Clostridium* na indústria farmacêutica**

Na indústria farmacêutica muitos são os microrganismos que apresentam características que possam ser aplicadas neste campo. Certos microrganismos aproveitam a capacidade de fermentar determinados compostos orgânicos para produzir metabolitos com relevância industrial, tais metabolitos são: butirato, butanol, acetona, etanol, hidrogénio, 1,3-propanediol, entre outros (Papoutsakis, 2008; Tracy *et al.*, 2012). Muitos destes metabolitos podem produzir fragâncias em perfumes, bioplásticos, cosmética, fertilizantes, e, comprimidos (Dwidar, Park, Mitchell, & Sang, 2012; Goyal, Kumar & Gayen, 2013; Kalia & Purohit, 2008; Lee, Park, Jang, Nielsen, Kim & Jung, 2008).

## **2.3. O género *Clostridium* em processos biológicos**

Hoje em dia, os clostrídios têm sido bastante empregues em biotecnologia, uma vez que possuem a aptidão de utilizar uma ampla gama de fontes de carbono, apresentam diversas alternativas para a produção de metabolitos, e ainda, exibem tolerância a químicos tóxicos libertados durante a fermentação (Tracy *et al.*, 2012). Os metabolitos

provenientes da fermentação de fontes de carbono a partir do género *Clostridium* são o hidrogénio, o butirato, o butanol, o etanol e a acetona (Gheshlaghi, Scharer, Moo-Young & Chou, 2009). Todos estes metabolitos evidenciam capacidade energética de utilização num futuro próximo, para a substituição de combustíveis fósseis, mas para tal têm de satisfazer diversos critérios (Kalia & Purohit, 2008). Os critérios a ter em conta na caracterização de um metabolito como alternativa a combustíveis fósseis no futuro são: transporte (de fácil transporte), versatilidade (conversão fácil noutras formas energéticas), eficácia na utilização, compatibilidade ambiental (sem efeitos adversos), segurança, e por último, económico (Kalia & Purohit, 2008).

O hidrogénio é utilizado normalmente na produção de fertilizantes (50%) e na indústria petrolífera (37%). O hidrogénio consegue atingir um rendimento máximo de produção de 4,0 mol H<sub>2</sub> / mol de glucose ou 8,0 mol H<sub>2</sub> / mol de sacarose por fermentação de substratos de carbono a partir de bactérias anaeróbias (Lee, Salerno & Rittmann, 2008; Sá *et al.*, 2009). O etanol tem sido empregue como energia alternativa face a gasolina, custando 0,46 dólares por energia equivalente à obtida a partir de 1 litro de gasolina, representando 1,72% da energia utilizada em 2005 nos EUA (Hill, Nelson, Tilman, Polasky & Tiffany, 2006). A produção de etanol é subsidiada a agricultores pelo governo americano, porque é feita principalmente a partir do milho. Assim sendo, e de acordo com o departamento da agricultura dos Estados Unidos da América (USDA), em 2001 o governo americano pagava cerca de 580 dólares por hectare para a produção de 8590 kg de milho (Pimentel & Patzek, 2005; Pimentel, 2003).

#### **2.4. A patogenicidade do género *Clostridium***

As bactérias anaeróbias são capazes de provocar diversos tipos de doenças tanto no Homem como em animais. Podem provocar infeções endógenas e exógenas. As infeções endógenas são as mais comuns, pois ocorrem devido ao facto destas bactérias serem comensais da pele e mucosas (Brook, 2007).

Existem espécies de *Clostridium* patogénicas para o ser humano, tais como, *C. perfringens*, *C. tetani* e *C. botulinum* (Morello, Granato & Mizer, 2003). O *C. perfringens* é o agente responsável pela gangrena, enquanto *C. tetani* é o agente causador de tétano, e, *C. botulinum* é o agente do botulismo (Morello *et al.*, 2003).

*Bactérias anaeróbias como fábricas celulares: produção de hidrogénio e butirato por Clostridium sp.*

### 3. Clostrídios como fábricas celulares

#### 3.1. *Clostridium acetobutylicum*, *Clostridium butyricum* e *Clostridium tyrobutyricum*

No presente trabalho, os microrganismos a estudar são o *Clostridium acetobutylicum*, *Clostridium butyricum* e o *Clostridium tyrobutyricum*.

A espécie *C. acetobutylicum* é uma bactéria anaeróbia, Gram-positivo e formadora de esporos. Consegue produzir diversos tipos de metabolitos importantes a nível industrial, nomeadamente acetato, butanol, butirato, acetona e etanol (Hu *et al.*, 2011). Esta bactéria consegue efetuar uma fermentação acetona-butanol-etanol, conhecida como fermentação ABE (Ramey & Yang, 2004).

O *Clostridium butyricum* é uma bactéria Gram-positivo, anaeróbio e formador de esporos (Cai, Jin, Monis & Saint, 2013). Como bactéria produtora de endosporos, é capaz de sobreviver num pH baixo. Esta característica permite a utilização de *C. butyricum* como probiótico na alimentação animal e humana (Yang *et al.*, 2012). É possível verificar a presença desta bactéria tanto no solo como no trato gastrointestinal de animais e humanos saudáveis (He, Kong, Chen & Ruan, 2005).

O *Clostridium butyricum* tem a capacidade de utilizar como fontes de carbono hexoses, pentoses, glicerol, material lenhocelulósico, melações, amido e soro de leite (Tracy *et al.*, 2012). Esta espécie é um ótimo produtor de diversos metabolitos a partir de açúcar, sendo a fermentação por glucose, a fonte principal de produção de butirato, acetato, dióxido de carbono e hidrogénio (Valencia, Fajardo, Vargas & Fajardo, 2012).

O *Clostridium tyrobutyricum* caracteriza-se por ser uma bactéria anaeróbia obrigatória, Gram-positivo, apresenta-se em forma de bastonete, e ainda, formador de endósporos. A partir de diversos hidratos de carbono, este clostrídio é capaz de produzir os seguintes metabolitos: butirato, acetato, hidrogénio e dióxido de carbono (Dwidar *et al.*, 2012; Liu & Yang, 2006; Zhang, Yang, Yang & Ma, 2009).



Fd/FdH<sub>2</sub>, **ferredoxina oxidada/reduzida**; NAD<sup>+</sup>/NADH, **nicotinamida-adenina-dinucleótido oxidado/reduzido**; ATP/ADP, **adenina trifosfato/adenina difosfato**; Pi, **fósforo inorgânico**; CoA, **coenzima A**.

A glucose serve como fonte de carbono neste tipo de fermentação que no primeiro passo do processo origina piruvato, NADH e ATP. O piruvato será convertido em acetil-CoA e em dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) pela ação do piruvato ferredoxina oxidoreductase (*Pde*), e, conseqüentemente, a formação de ferredoxina reduzida (FdH<sub>2</sub>) (Cai *et al.*, 2011; Lee *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2009).

A ferredoxina reduzida (FdH<sub>2</sub>) será oxidada pelo hidrogenase [FeFe] monomérica, o que permite regenerar a ferredoxina oxidada (*Fd*), de forma a produzir hidrogénio e libertar o excesso de eletrões para a redução de NADH. Por esta via, originam-se 2 moles de hidrogénio por 1 mole de glucose consumida (Cai *et al.*, 2011; Lee *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2009). O piruvato também é capaz de originar lactato pela ação do lactato desidrogenase (*ldh*) com a oxidação do NADH a NAD<sup>+</sup> (Cai *et al.*, 2011; Lee *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2009).

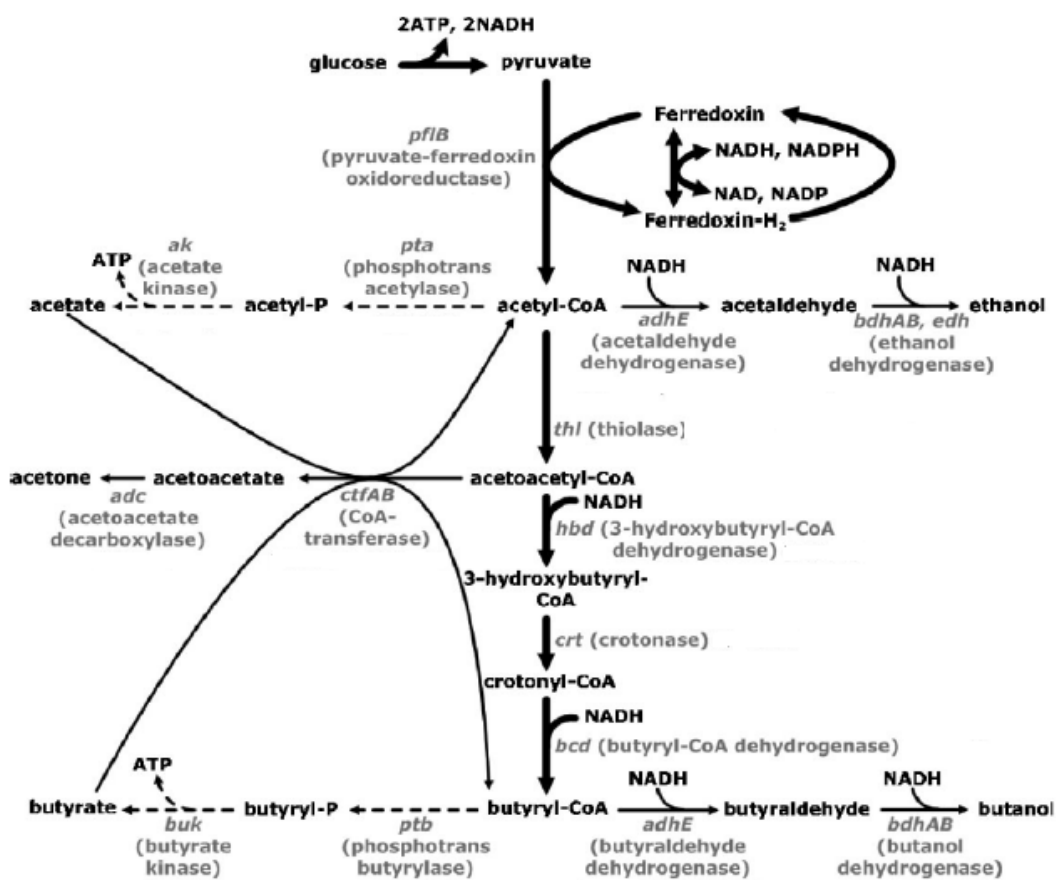
Sendo o Acetil-CoA um importante intermediário metabólico, este permite a formação por duas vias diferentes de acetato e butirato (Cai *et al.*, 2011; Lee *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2009). O acetato produzido pela ação da fosfotransacetilase (*pta*) e do acetato cinase (*ack*), havendo formação intermediária de acetil-fosfato e ATP (Cai *et al.*, 2011; Lee *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2009).

Para a formação de butirato, 2 moléculas de acetil-CoA são condensadas e, subseqüentemente reduzidas na formação de butiril coenzima A, numa reação simultânea de oxidação de NADH. Na última etapa para a biossíntese de butirato, a fosfotransbutirilase (*ptb*) e butirato cinase (*buk*) efetuam a conversão de butiril-CoA para butirato e ATP (Cai *et al.*, 2011; Lee *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2009). Outra via alternativa para a formação de butirato é a reciclagem de acetato em acetil-CoA (Cai *et al.*, 2011; Lee *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2009). A via para a formação de butirato permite que o rendimento de hidrogénio seja menor, uma vez que, esta via compete com a de hidrogénio, havendo um maior consumo de NADH (Cai *et al.*, 2011)

A bactéria *C. acetobutylicum* encontra-se estudada no âmbito da produção de biocombustíveis, pois consegue efetuar uma fermentação bifásica de açúcares (Haus *et*

al., 2011; Huang, Huang, Rudolph & Bennett, 2000). Este tipo de fermentação bifásica permite obter diversos tipos de metabolitos com relevante importância por duas fases, a fase acidogénica e a solventogénica. A bactéria é capaz de produzir na fase acidogénica, ácido butírico e acético, enquanto na fase solventogénica produz butanol, acetona e etanol (Huang *et al.*, 2000).

É possível visualizar pela figura 4, as vias metabólicas de uma fermentação bifásica por *Clostridium acetobutylicum*.



**Figura 4** – Via metabólica da fermentação de glucose por *Clostridium acetobutylicum* (Adaptado de Lee *et al.*, 2008)

*pflB*, piruvato-ferredoxina oxidorreductase; *pta*, acetiltransferase fosfato (fosfotransacetilase); *ak*, acetato cinase; *adhE*, butiraldeído desidrogenase ou acetaldeído desidrogenase; *bdhAB*, *edh*, etanol desidrogenase; *Thl*, tiolase (acetil-CoA acetiltransferase); *hbd*, 3-hidroxybutiril-CoA desidrogenase; *Crt*, crotonase; *Bcd*, butiril-CoA desidrogenase; *ptb*, butiltransferase fosfato (fosfobutililase); *CtfAB*, acetoacetyl-CoA; acetato/butirato:CoA transferase; *adc*, acetoacetato descarboxilase; *buk*, butirato cinase; *bdhAB*, butanol desidrogenase.

A fase acidogénica de *C. acetobutylicum* coincide com o crescimento exponencial da bactéria, assim sendo, ocorre produção de acetato e butirato com a libertação de hidrogénio e dióxido de carbono. A fase solventogénica equivale à fase de crescimento estacionário bacteriano, em que se vai formar acetona, butanol e etanol pela reassimilação dos ácidos produzidos na fase acidogénica (Haus *et al.*, 2011; Tashiro & Sonomoto, 2010)

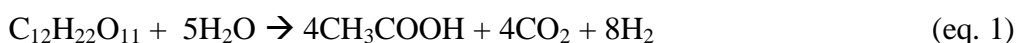
A fase acidogénica permite a metabolização do carbono por conversão de 1 mole de hexose, da via Embden-Meyerhof-Parnas, em 2 moles de piruvato com produção de 2 moles de ATP e 2 moles de NADH (Haus *et al.*, 2011; Tashiro & Sonomoto, 2010). A glicólise produz piruvato que por sua vez, é clivado na presença de coenzima A (CoA) para originar dióxido de carbono, acetil-CoA e ferredoxina reduzida. De seguida ocorre condensação, redução ou desidratação de acetil-CoA para produzir derivados CoA, tais como, acetoacetil-CoA e butiril-CoA (Haus *et al.*, 2011; Tashiro & Sonomoto, 2010). A partir de acetil-CoA e butiril-CoA, estes produzem respetivamente, acetato e butirato, sendo que a acumulação destes metabolitos reduza o pH do meio (Haus *et al.*, 2011; Tashiro & Sonomoto, 2010).

A fase solventogénica encontra-se dependente do valor de pH do meio de cultura, pois se o pH se encontrar num valor mínimo crítico, sucede reassimilação dos ácidos orgânicos produzidos pela fase acidogénica. A partir da via acetoacetil-CoA/acetato/butirato CoA-transferase, via da CoA transferase, o aceto e butirato são reutilizados (Haus *et al.*, 2011; Tashiro & Sonomoto, 2010). A via de CoA transferase encontra-se diretamente associada à produção de acetoacetato, que conseqüentemente é descarboxilado irreversivelmente a acetona. Assim sendo, acontece conversão de acetato e butirato a partir de acetil-CoA e butiril-CoA, respetivamente, em etanol e butanol por reações redutoras (Haus *et al.*, 2011; Tashiro & Sonomoto, 2010).

Durante a fase acidogénica é possível verificar acréscimo da produção de hidrogénio, uma vez que este assume o papel de aceitador de eletrões (Haus *et al.*, 2011; Tashiro & Sonomoto, 2010). Na fase solventogénica ocorre um decréscimo na produção de hidrogénio e dos equivalentes redutores em excesso de NADH ou NADPH, que são alternativamente oxidados para a produção de butanol ou etanol (Haus *et al.*, 2011; Tashiro & Sonomoto, 2010).

Na fermentação por *C. acetobutylicum* é possível produzir, a partir de 1 mole de glucose, 0,6 moles de acetato, 0,7 moles de butirato, 2 moles de dióxido de carbono e 2,7 moles de hidrogénio, ou 0,3 moles de acetona, 0,6 moles de butanol, 0,2 moles de etanol, 2,3 moles de dióxido de carbono e 1,2 moles de hidrogénio consoante a fase acidogénica ou solventogénica, respetivamente (Lütke-Eversloh & Bahl, 2011).

Foi demonstrado em diversos estudos que a razão entre o ácido acético e o ácido butírico encontra-se relacionada com a produção de hidrogénio, pois, permitem o aumento da produção de hidrogénio ou a sua diminuição. Tal ocorre devido ao consumo de sacarose na formação de ácido acético e ácido butírico (equação 1 e 2) (Sá *et al.*, 2009; Sá *et al.*, 2011).



### **3.2. Aplicações de metabolitos por Clostrídios**

O *Clostridium butyricum* tem tido um papel bastante fundamental em biotecnologia, pois os diferentes tipos de metabolitos provenientes da fermentação, nomeadamente hidrogénio e butirato, apresentam atividade energética (Liu *et al.*, 2006). O hidrogénio tem propriedades fundamentais como via alternativa a combustíveis fósseis, uma vez que é produzido a baixo custo, não afeta o meio ambiente, pois não ocorre libertação de dióxido de carbono durante a sua combustão, mas sim produção de água (Liu *et al.*, 2006).

Na indústria alimentar é possível a utilização de ácido butírico como aperfeiçoador de alimentos, por exemplo manteiga (Liu & Yang, 2006). Também pode ser útil como aditivo em fragrâncias e perfumes, e ainda, ação terapêutica no cancro do colo-rectal e hemoglobinopatias (Liu *et al.*, 2006; Zhu, 2003). Como o ácido butírico evidencia capacidade terapêutica para determinados tipos de cancro, este é utilizado na formulação de pré-fármacos (Dwidar *et al.*, 2012).

Devido ao facto de o *C. acetobutylicum* evidenciar uma fermentação bifásica, um dos produtos, o butanol, demonstra propriedades necessárias com aplicação em diversos campos a nível industrial (Huang *et al.*, 2000). O butanol, como foi descrito

anteriormente, pode ser empregue como: revestimento de superfícies, colas, elastómeros, produtos têxteis, flocculantes, fibras e plásticos (Millat, Janssen, Bahl, Fischer & Wolkenhauer, 2013). Pode vir a ser utilizado sem qualquer tipo de modificação em carros, embora a sua produção seja simultânea à de acetona e de etanol. Assim sendo, não é possível a sua obtenção em grande quantidade (Lütke-Eversloh & Bahl, 2011).

Estudos efetuados demonstraram que *C. butyricum* promove o crescimento de lactobacilos e bifidobactérias no trato gastrointestinal, e ainda inibe a diarreia fomentada por antibióticos (Mevissen-Verhage, Marcelis, Vos, Amerongen & Verhoef, 1987; Yang *et al.*, 2012).

*Bactérias anaeróbias como fábricas celulares: produção de hidrogénio e butirato por Clostridium sp.*

## 4. Ácido butírico

### 4.1. Características

O ácido butírico é considerado um ácido gordo saturado, como tal apresenta a seguinte fórmula química:  $C_4H_8O_2$ . Apresenta um pKa de 4,82, assim sendo, é um ácido fraco. À temperatura ambiente encontra-se no estado líquido, o seu odor é bastante notável, sendo até comparável ao ranço, o ponto de fusão é de  $-7,9^\circ C$  e o de ebulição  $163,5^\circ C$  (NCBI, 2009).

### 4.2. Aplicações do ácido butírico

#### 4.2.1. Aplicação a nível intestinal

No estômago, as fibras dietéticas não digeridas passam pelo processo de fermentação no intestino. Como tal, permitem a formação de pequenas cadeias de ácidos gordos, tais como acetato, propionato e butirato (Canani, Costanzo & Leone, 2012; Duncan *et al.*, 2004; Meijera, Vosb & Priebea, 2010). Com a produção destes ácidos gordos no meio intestinal, ocorre uma diminuição dos níveis de pH, logo existirá competição entre bactérias produtoras de butirato e bactérias Gram-negativo utilizadoras de carboidratos (e.g. *Bacteroides* sp.) (Canani *et al.*, 2011). Normalmente, as bactérias Gram-positivo e anaeróbias são as maiores produtoras de butirato. O grupo de bactérias comumente produtor de butirato é o género *Clostridium* (Harvey & Meylemans, 2011; Louis & Flint, 2009).

O butirato apresenta diversos efeitos a nível intestinal, tal como, capacidade reguladora na expressão de genes no cólon, que conseqüentemente vai promover a maturação celular, diferenciação celular, apoptose, proteção contra cancro do cólon e colite ulcerosa, e ainda, apresenta propriedades anti-inflamatórias (Böcker *et al.*, 2003; Canani *et al.*, 2011, Canani *et al.*, 2012; Louis, Young, Holtrop & Flint, 2010; Nepelska *et al.*, 2012). O butirato é a fonte de energia preferencial das células epiteliais intestinais, o que possibilita um correto e eficaz funcionamento intestinal (Louis *et al.*, 2010; Vinolo, Rodrigues, Nachbar & Curi, 2011).

O butirato pode ser obtido por duas vias, a de butiril-CoA: acetato - CoA transferase (*but*) ou butirato cinase (*buk*). Em diversos estudos, foi possível verificar que a nível intestinal, o butirato é produzido principalmente pela via butiril-CoA: acetato - CoA transferase (*but*) (Louis & Flint, 2009; Vital *et al.*, 2013).

#### **4.2.2. Aplicação anti-inflamatória e anticancerígena**

O butirato apresenta propriedades anti-inflamatórias, e, como tal, pode atuar sobre doenças inflamatórias intestinais, tais como, doença de Crohn e colite ulcerosa (Barcenilla *et al.*, 2000; Böcker *et al.*, 2003). Nas doenças inflamatórias ocorre libertação de péptidos, nomeadamente de citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento, potenciando a libertação de leucócitos (Böcker *et al.*, 2003).

O butirato atua nas células epiteliais intestinais, como tal vai ativar a proteína AP-1. Esta proteína permite a proliferação, a diferenciação, a transformação, a apoptose e a migração celular (Nepelska *et al.*, 2012). O butirato e outros ácidos gordos de cadeia curta vão ativar os mediadores da pré-inflamação, nomeadamente macrófagos, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, óxido nítrico (NO) e ácido araquidónico (Meijera *et al.*, 2010). O IL-8 é uma das principais citocinas a nível intestinal, pois é esta que permite a reação cascata da inflamação intestinal (Böcker *et al.*, 2003). O butirato procede à supressão de lipopolissacarídeos (LPS) e dos mediadores da pré-inflamação (Meijera *et al.*, 2010).

Outra das funções do butirato é a modulação da expressão de determinados genes, como tal, é possível a sua utilização ao nível do cancro do cólon. Ao apresentar atividade antiproliferativa, assim é possível atuar sobre as células cancerígenas (Böcker *et al.*, 2003; Duncan *et al.*, 2004). O butirato induz diferenciação celular provocando uma alteração bioquímica e morfológica, levando à supressão das células cancerígenas (Dwidar *et al.*, 2012). Para quem sofre de alopecia resultante de radioterapia e/ou quimioterapia, o ácido butírico permite a proteção dos folículos capilares (Dwidar *et al.*, 2012).

#### **4.2.3. Aplicações de ácido butírico na indústria**

O ácido butírico é um precursor de biocombustíveis e um bom solvente industrial, como tal, permite formar diversos tipos de compostos capazes de substituírem combustíveis químicos, tal como, butanol, butiril e etil butirato (Dwidar *et al.*, 2012). Assim sendo, é possível utilizar o ácido butírico para produção de bioplásticos, aditivo e em cosmética como fragância (He *et al.*, 2005; Liu *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2009; Zhu, 2003)

O ácido butírico pode ser produzido de forma biológica, natural, e quimicamente. Pela via química, o ácido butírico é proveniente da oxidação de aldeído butírico (Zidwick, Chen & Rogers, 2013). Esta via apresenta como vantagens o menor custo de produção e maior disponibilidade de materiais (Dwidar *et al.*, 2012).

O processo natural para a obtenção do ácido butírico recorre à extração deste metabolito mediante um produto biológico, designadamente a manteiga (Dwidar *et al.*, 2012). Esta via permite obter ácido butírico numa concentração a rondar os 2 a 4%, mas apresenta como desvantagens: maior custo face à via química e pouca quantidade de obtenção (Zigová & Sturdik, 2000).

Com a crescente preocupação para com o meio ambiente, a nível industrial tem existido interesse para a utilização de metabolitos provenientes da fermentação de compostos de carbono a partir de bactérias anaeróbias. Portanto, o processo fermentativo corresponde à via biológica para a obtenção de ácido butírico (Dwidar *et al.*, 2012). Têm sido conseguidos valores bastante aceitáveis na produção de ácido butírico pelo género *Clostridium*, nomeadamente *C. tyrobutyricum*, *C. butyricum* e *C. acetobutylicum* (Dwidar *et al.*, 2012). Atualmente, *C. tyrobutyricum* é o clostrídio mais promissor na obtenção de ácido butírico, porque consegue produzi-lo com elevada seletividade, e ainda, tolera altas concentrações deste composto (Dwidar *et al.*, 2012). Apesar de não ser capaz de utilizar variadas fontes de carbono em comparação com outras bactérias produtoras de ácido butírico, apenas utiliza glucose, frutose, xilose e lactato (Dwidar *et al.*, 2012)

#### **4.3. Perspetiva futura na utilização do ácido butírico**

A utilização de materiais biológicos tem sido considerado um caminho a seguir para a obtenção de compostos biodegradáveis. A utilização de metabolitos bacterianos acumulados no interior de grânulos intracelulares de bactérias permite a obtenção de bioplásticos (Aarthi & Ramana, 2011). O poli-hidroxibutirato (PHB) é um plástico biodegradável formado a partir do ácido butírico (Aarthi & Ramana, 2011; Brito, Agrawal, Araújo & Mélo, 2011; Chaijamrus & Udpuay, 2008; Kumar & Ashish, 2011; Singh & Parmar, 2011). Este plástico visa substituir plásticos petroquímicos, pois evidencia como vantagens o baixo custo, solubilidade em água e iguais funcionalidades de um plástico petroquímico (Aarthi & Ramana, 2011; Brito *et al.*, 2011; Chaijamrus &

Udpuay, 2008; Kumar & Ashish, 2011; Singh & Parmar, 2011). A sua solubilidade permite com que sejam dissolvidos em contacto com a água e não afetem o meio ambiente (Aarthi & Ramana, 2011; Brito *et al.*, 2011; Chaijamrus & Udpuay, 2008; Kumar & Ashish, 2011; Singh & Parmar, 2011).

## 5. Biohidrogénio

### 5.1. Características

No grego, hidrogénio é denominado por formador de água, este foi descoberto por Henry Cavendish (Emsley, 2013; Santos & Santos, 2005). A fórmula química do hidrogénio é representada por H<sub>2</sub>. Este apresenta-se à temperatura ambiente no estado gasoso, é incolor e inodoro. Apresenta um ponto de fusão de – 259,10°C e um ponto de ebulição de – 252,88°C, e, capacidade molar energética de 28,84 J.mol<sup>-1</sup>.K<sup>-1</sup> (Emsley, 2013).

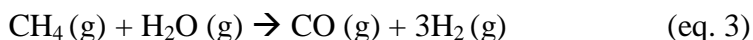
O hidrogénio encontra-se presente nas moléculas de DNA, daí que este composto seja considerado a base para a vida. Também podemos verificar a presença de hidrogénio no sol, nas estrelas, na água, sendo que na atmosfera em pequenas quantidades, inferior a 1 p.p.m de volume, logo é a molécula mais abundante no universo (Emsley, 2013).

### 5.2. Produção de biohidrogénio

A obtenção de hidrogénio é bastante importante, pois este apresenta bastante utilidade como via alternativa a combustíveis fósseis. O hidrogénio pode ser obtido por diversos processos, sobretudo química e biologicamente (Santos & Santos, 2005; Wang, 2008).

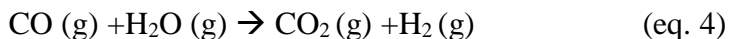
#### 5.2.1. Produção química

O processo químico é um processo em que produz hidrogénio a partir de SMR (*steam-methane reforming*) (Saxena, 2003; Wang, 2008). Este processo realiza-se num reator em que uma mistura de gases e hidrocarbonetos de cadeia leve são convertidos em hidrogénio, dióxido de carbono e monóxido de carbono (Santos & Santos, 2005; Saxena, 2003). A equação 3 evidencia a reação da conversão da mistura em hidrogénio, dióxido de carbono e monóxido de carbono (Santos & Santos, 2005).



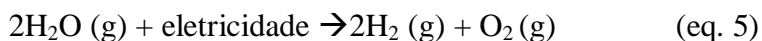
Depois de arrefecida, a mistura será colocada num catalisador para proceder à conversão adiabática. Esta conversão adiabática permite a conversão direta de energia interna sem qualquer troca de calor com o meio envolvente (Saxena, 2003). Desta conversão resulta um aumento de produção de hidrogénio (71-75%) e CO<sub>2</sub> (15-20%), porém, existe uma diminuição da presença de metano (4-7%) e CO (1-4%). O

hidrogénio presente vai ser purificado por adsorção de pressão (Saxena, 2003). Pela equação 4 é possível verificar a formação de mais hidrogénio e dióxido de carbono por este processo (Santos & Santos, 2005).



A grande vantagem deste tipo de processo é a obtenção de hidrogénio de pureza elevada que ronda os 98 a 99,999%, mas apresenta elevado custo de trabalho, nomeadamente, na temperatura a utilizar no reator (726,85 - 1026,85°C), nas operações de recuperação de calor, e, nas colunas de purificação (Santos & Santos, 2005; Saxena, 2003).

A eletrólise utiliza energia elétrica para separar a molécula de água em hidrogénio e oxigénio, com o recurso a um eletrolisador com membrana de troca de protões. A equação 5 mostra a produção de hidrogénio pelo método de eletrólise (Santos & Santos, 2005).



Este processo apresenta um rendimento global de 95%, servindo como alternativa a combustíveis fósseis. Assim, a produção de hidrogénio não afeta o meio ambiente, embora a eletrólise seja um processo não renovável e a quantidade de energia pretendida para a substituição dos combustíveis não seja suficiente (Santos & Santos, 2005).

### **5.2.2. Produção biológica**

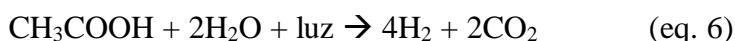
Desde a década de 70 que a produção biológica para a obtenção de hidrogénio tem sido bastante estudada, uma vez que está relacionada com a crise energética (Santos & Santos, 2005; Wang, 2008).

O método biológico para a obtenção de biohidrogénio, inclui diversos tipos de processos, tais como, fotólise, fotofermentação e ainda, fermentação escura (*dark fermentation*) (Das & Veziroglu, 2001; Hallenbeck, Ghosh, Skonieczny & Yargeau, 2009; Hallenbeck & Ghosh, 2009; Santos & Santos, 2005; Wang, 2008).

A biofotólise recorre às algas ou cianobactérias para a obtenção de hidrogénio pela separação das moléculas de água por raios ultravioletas. Assim sendo, a biofotólise da água é um processo semelhante à fotossíntese de plantas e algas, embora não seja

produzido carbono proveniente de biomassa, mas sim, produção de hidrogénio no estado gasoso (Das & Veziroglu, 2001; Hallenbeck *et al.*, 2009; Hallenbeck & Ghosh, 2009; Santos & Santos, 2005; Wang, 2008).

O processo de fotofermentação recorre a bactérias fotossintéticas para a conversão de hidrogénio proveniente de produtos de fermentação de microrganismos, nomeadamente, ácidos orgânicos (equação 6). Este processo aproveita grande quantidade de luz mas apresenta baixa eficácia de conversão (Das & Veziroglu, 2001; Hallenbeck *et al.*, 2009; Hallenbeck & Ghosh, 2009; Nath & Das, 2004; Wang, 2008).



A fermentação escura permite a obtenção de hidrogénio sem recurso a luz, mas sim, a partir de bactérias fermentadoras de compostos orgânicos, daí o produto da produção de hidrogénio seja denominada de biohidrogénio. Este processo utiliza uma grande quantidade e variedade de fontes de carbono, tal como, glucose, xilose e arabinose. É possível também obter por este processo diversos metabolitos, tais como, ácido butírico, acético e láctico, que são uma via alternativa com valor comercial (Antonopoulou, Gavala, Skiadas, & Lyberatos, 2010).

A otimização do processo é plena quando existe grande disponibilidade e concentração inicial de substratos, concentração elevada de metabolitos produzidos, e ainda, pela qualidade do microrganismo utilizado (Pan, Zhang, Fan & Hou, 2010; Panagiotopoulos *et al.*, 2011). Os substratos passam por pré-tratamentos para posterior utilização na fermentação, tais como hidrólise ácida (solução de ácido sulfúrico ou ácido clorídrico para a hidrólise do substrato celulósico), hidrólise alcalina (solução de hidróxido de sódio ou de cálcio para diminuir o grau de polimerização e aumentar o acesso enzimático subsequente aos polissacarídeos) e aquecimento (Chen, Stevens, Zhu, Holmes & Xu, 2013; Pan *et al.*, 2010; Panagiotopoulos *et al.*, 2011). O pré-tratamento pode ter um efeito inibitório no metabolismo dos microrganismos, uma vez que produz furanos, nomeadamente 5-hidroximetilfurfural (HMF) e furfural que resultam da degradação de hexoses e pentoses, respetivamente, podendo prolongar a fase de latência da bactéria (Panagiotopoulos *et al.*, 2011).

A fermentação escura é efetuada principalmente por *Clostridium* sp., porque evidencia rendimentos mais favoráveis para este tipo de fermentação em comparação com outros microrganismos, (Hallenbeck *et al.*, 2009; Hallenbeck & Ghosh, 2009; Nath & Das, 2004). Neste processo, o microrganismo possibilita a degradação de hidratos de carbono, especificamente de glucose em piruvato e NADH. Por ação da enzima ferredoxina oxireductase, o piruvato vai formar acetil-CoA e há libertação de dióxido de carbono (Hallenbeck *et al.*, 2009; Hallenbeck & Ghosh, 2009; Nath & Das, 2004). A síntese de hidrogénio é possibilitada pela regeneração da ferredoxina por ação de uma hidrogenase, a [FeFe] hidrogenase. Para além do aproveitamento desta via para a produção de biohidrogénio, durante a glicólise, é possível ocorrer a re-oxidação de NADH, que possibilita a síntese das moléculas de hidrogénio (Hallenbeck *et al.*, 2009; Hallenbeck & Ghosh, 2009; Nath & Das, 2004).

#### **5.2.2.1. Nitrogenases e Hidrogenases**

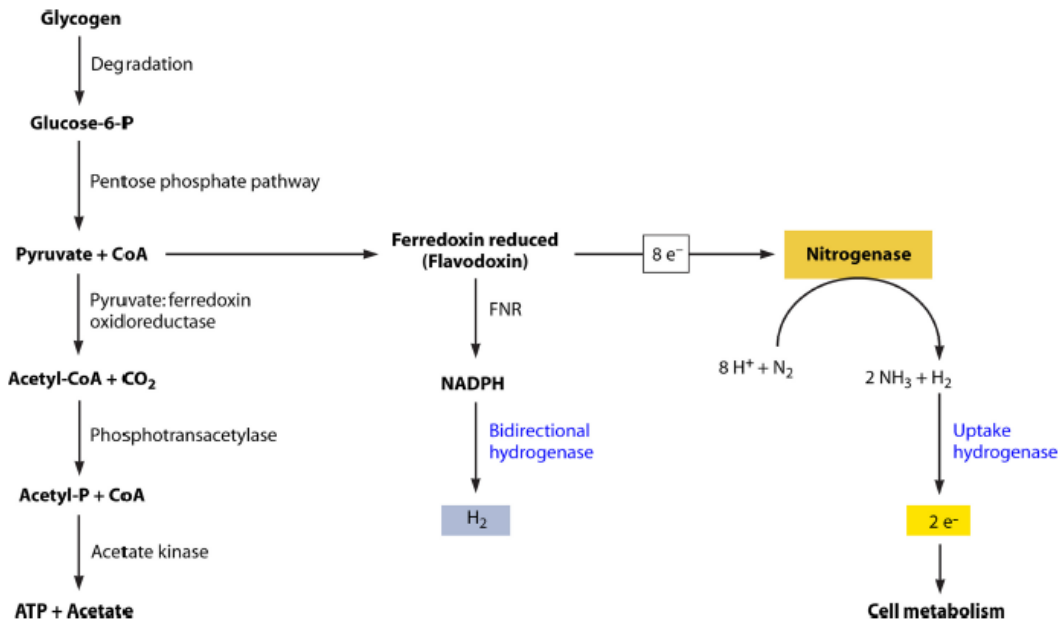
A biofotólise e a fotofermentação são processos que utilizam microrganismos para a produção biológica de hidrogénio, e, estes microrganismos encontram-se dependentes de enzimas capazes de catalisar a reação de protões a hidrogénio (como é visível pela equação 7) (Das & Veziroglu, 2001; Hallenbeck *et al.*, 2009; Hallenbeck & Ghosh, 2009).



Estas enzimas denominam-se por nitrogenases e hidrogenases ([NiFe] hidrogenases e [FeFe] hidrogenases) (Das & Veziroglu, 2001; Hallenbeck *et al.*, 2009; Hallenbeck & Ghosh, 2009; Wang, 2008). As nitrogenases permitem a fixação de azoto, possibilitando a redução de azoto em amoníaco com libertação de hidrogénio. A fixação de azoto por nitrogenases é apenas efetuada por procariontes. A utilização desta enzima permite a produção de pelo menos 1 mole de hidrogénio por cada mole de azoto reduzido (Peters *et al.*, 2013).

A nitrogenase é composta por duas metaloproteínas, Fe-proteína e MoFe-proteína, sendo a Fe-proteína dadora de eletrões para a MoFe-proteína. Com a degradação de ATPs pela Fe-proteína, é permissível obter energia química, mas é necessário a presença de ferredoxina reductase para transportar os eletrões (Bothe, Schmitz, Yates & Newton, 2010; Nunes, Cristina & Carlos, 2003).

As enzimas hidrogenases realizam a catálise de reações que alteram a molécula de hidrogénio. Esta divide-se em dois grandes grupos consoante a ligação de metais ao local de reação, são eles [NiFe] hidrogenases e [FeFe] hidrogenases (Hallenbeck *et al.*, 2009). É sempre necessário recorrer a ATP para ativação destas enzimas, (Das & Veziroglu, 2001). É possível verificar pela figura 4, a produção de hidrogénio a partir das enzimas nitrogenase e hidrogenase em cianobactérias.



**Figura 4** – Processo de obtenção de hidrogénio por nitrogenases e hidrogenases em cianobactérias (Retirado de Bothe, Schmitz, Yates & Newton, 2010)

### 5.3. Fatores preponderantes na produção de biohidrogénio

É necessário ter em conta que a produção de biohidrogénio na indústria encontra-se aproximada ao valor teórico de 4 moles de  $H_2$  por 1 mole de hexose (Hallenbeck, 2009). Outro fator preponderante na produção de biohidrogénio é a condução do processo de fermentação, pois é necessário vigiar todas as fases de obtenção de biohidrogénio, nomeadamente a inoculação, o substrato, o tipo de reator, nutrientes inorgânicos, a temperatura e o pH (Phowan, Reungsang & Danvirutai, 2010). O meio envolvente na produção de biohidrogénio tem de estar em perfeita harmonia com a bactéria a utilizar, uma vez que, se o meio apresentar um pH demasiado ácido os microrganismos utilizados podem perder viabilidade (Antonopoulou *et al.*, 2010; Skonieczny e Yargeau, 2009). O pH estipulado para a fermentação de carbo-hidratos por clostrídios foi

demonstrado como sendo de 4,5 a 7,0 (Antonopoulou *et al.*, 2010; Skonieczny & Yargeau, 2009).

#### **5.4. Perspetivas futuras na produção de biohidrogénio**

A produção de hidrogénio pode ter um papel bastante fundamental para a obtenção de energia sustentável, como tal não deve ter a sua origem em compostos fósseis, pois estes constituem uma fonte de energia limitada e com impacto ambiental (Logan, Oh, Kim & Ginkel, 2002). Assim sendo, a produção de biohidrogénio é uma boa alternativa para obtenção de energia limpa, sendo denominada energia renovável quando produzida a partir de fontes renováveis. Porém, uma incompleta conversão de substrato conduz a rendimentos baixos de hidrogénio (Hallenbeck *et al.*, 2009; Zhang, Bruns & Logan, 2006).

Sabe-se que os substratos utilizados para a obtenção de biohidrogénio são hidratos de carbono, que têm por base açúcares, nomeadamente glucose, sacarose, maltose e xilose (Beckers, Hiligsmann, Hamilton, Masset & Thonart, 2010). Outros substratos mais complexos também podem ser utilizados para produzir biohidrogénio, se se submeterem a diferentes processos (hidrólise química ou enzimática) para serem convertidos em açúcares simples (Chen *et al.*, 2008). Assim, é possível produzir biohidrogénio a partir de resíduos lenhocelulósicos, constituídos maioritariamente por hemiceluloses, lenhina e celulose, uma vez que não são substratos dispendiosos e encontram-se em abundância (Lo, Saratale, Chen, Bai & Chang, 2009).

A produção simultânea de hidrogénio e de metabolitos provenientes da fermentação escura ou *dark fermentation* tem sido bastante efetuado a nível industrial, pois estes compostos possuem características energéticas bastante importantes. Assim sendo, nalguns casos, torna-se necessário a introdução de alterações genéticas nos microrganismos para a produção quase exclusiva de ácido butírico e/ ou de hidrogénio (Zhu, 2003). Como tal, esta medida tem sido vista como perspetiva futura para a produção única de hidrogénio e / ou butirato. O *C. acetobutylicum* tem sido o microrganismo estudado para efetuar modificações genéticas, com recurso a plasmídeos (Mann & Lütke-Eversloh, 2013). É possível escolher apenas uma via de formação do metabolito pretendido, fase acidogénica ou solventogénica. (Tracy *et al.*, 2012).

## **6. Estudos realizados utilizando clostrídios como fábricas celulares para a produção de hidrogénio e butirato**

### **6.1. Ensaio de fermentação**

Os pré-inóculos das estirpes *C. acetobutylicum* DSM 792 (DSMZ, Alemanha), *C. tyrobutyricum* 1T, 2T, 3T e 9P, e *C. butyricum* DSM 10702 (DSMZ, Alemanha) estudadas por Martins (2012), Martins (2013) e Lima (2012), foram inoculados em meio RCM (*Reinforced Clostridial Medium*, Oxoid, Inglaterra) a 1% (v/v) durante 48, 30 e 16 horas, respetivamente.

As culturas de *C. acetobutylicum*, *C. tyrobutyricum* 1T, 2T, 3T e 9P, e *C. butyricum* em RCM foram utilizadas para inocular meio BM1 (*Nutrient Basal Medium 1*), a 1% (v/v), suplementado com extrato aquoso de polpa de alfarroba (EA). Os ensaios foram todos realizados em triplicado. A incubação foi realizada a 37°C durante um período de respetivamente, 168 horas, 72 horas e 166 horas.

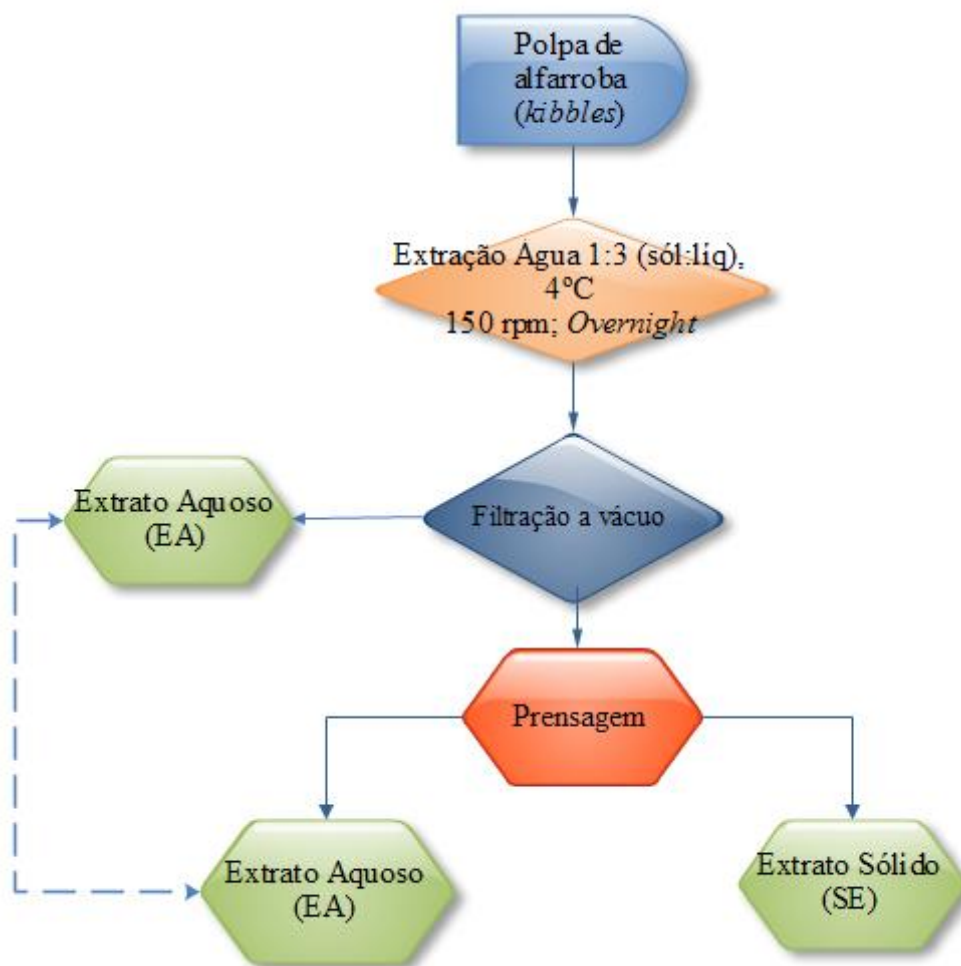
Foi possível caracterizar a quantidade de biogás produzido nos ensaios de fermentação a partir de um cromatógrafo gasoso GC (VARIAN – modelo 430) com detetor TCD e coluna sílica fundida com CP-Molecular Sieve de 5 Å com 30 metros de comprimento, 0,52 mm de diâmetro interno e 15 µm de espessura. As condições de análise foram: temperatura de injetor a 80°C, temperatura de detetor de 120°C e hélio como gás de arraste. A quantificação de biogás produzido foi efetuado segundo a expressão de Peng Robinson. Na quantificação de açúcares e ácidos orgânicos produzidos recorreu-se a HPLC (Merck L7100, Alemanha) de coluna Aminex - 87P (BioRad Laboratories, EUA) e coluna Aminex – 87H (BioRad Laboratories, EUA), respetivamente.

### **6.2. Trabalho Lima (2012), Martins (2012) e Martins (2013)**

#### **6.2.1. Caracterização da fonte de carbono**

Nestes estudos realizaram-se ensaios fermentativos para a produção de hidrogénio e ácido butírico utilizando extratos aquosos de polpa de alfarroba como fonte de carbono. A polpa de alfarroba moída em *kibbles* (vagens fragmentadas em pedaços, desprovidas de sementes), durante cerca de 16 horas a 4°C, foi extratada com água numa razão sólido:líquido de 1:3 (Lima, 2012; Martins, 2012; Martins, 2013). Após esta extração, procedeu-se a filtração com recurso a vácuo e funil de placa porosa, de seguida,

prensagem manual dos sólidos. Da filtração resultou uma fase líquida e sólida, denominadas por extrato aquoso (EA) e sólidos extratados (SE), respetivamente (Lima, 2012; Martins, 2012; Martins, 2013). Na figura 5 encontra-se descrito o método para a obtenção do extrato aquoso, que constituiu o substrato fermentativo.



**Figura 5** – Processamento de *kibbles* de alfarroba na obtenção de fontes de carbono para ensaio de fermentação (Adaptado de Lima, 2012; Martins, 2012)

No extrato aquoso foi possível caracterizar a concentração de açúcares presentes, nomeadamente de sacarose, glucose e frutose, e ainda, de pinitol e compostos fenólicos, como está representado na tabela 1. A quantificação dos açúcares sacarose, glucose e frutose foi efetuada com recurso a HPLC (cromatografia líquida de alta eficiência), sendo que a quantificação de compostos fenólicos foi efetuada pelo método de Folin-Ciocalteu (Lima, 2012; Martins, 2012; Martins, 2013).

**Tabela 1** – Caracterização de açúcares do extrato aquoso de polpa de alfarroba (Lima, 2012; Martins, 2012; Martins, 2013)

Concentração (g.L <sup>-1</sup> )					
Sacarose	Glucose	Frutose	Açúcares Totais	Pinitol	Fenóis totais (GAE)
91,8	25,2	21,4	138,4	14,1	0,28

É possível verificar pela tabela 1 que, no extrato aquoso, a sacarose é o açúcar que apresenta maior concentração, correspondendo a 91,8 g.L<sup>-1</sup>, sendo a frutose a de menor concentração, 21,4 g.L<sup>-1</sup>, logo é o açúcar menos presente no extrato aquoso. Assim sendo, os açúcares encontram-se no extrato aquoso na seguinte percentagem: sacarose 66%, glucose 18% e frutose a 16% (Lima, 2012; Martins, 2012; Martins 2013).

Foi possível quantificar a concentração de fenóis totais expressos em equivalentes de ácido gálgico (GAE). Segundo Papagiannopoulos, Wollseifen, Mellenthin, Haber e Galensa (2004), o teor de ácido gálgico para a polpa de alfarroba é de 174 mg.kg<sup>-1</sup>. A concentração de ácido gálgico obtida foi de 0,28 g.L<sup>-1</sup>. De acordo com alguns autores, o ácido gálgico e taninos presentes nos extratos de polpa de alfarroba pode inibir o crescimento de *Clostridium* sp. (Cetin-Karaca, 2011; Henis, Tagari & Volcani, 1964). Num estudo foi demonstrado a inibição do crescimento de um clostrídio celulolítico, *Clostridium cellulosolvens*, pelo extrato de polpa de alfarroba, estando o extrato de polpa de alfarroba presente numa concentração de 60 µg.mL<sup>-1</sup> (Henis *et al.*, 1964).

#### 6.2.1.1. Fermentação da fonte de carbono

Os ensaios de fermentação para as estirpes de *C. acetobutylicum* DSM 792, *C. tyrobutyricum* 1T, 2T, 3T e 9P, e ainda, de *C. butyricum* DSM 10702, foram executados a uma concentração de açúcares totais iniciais no extrato de polpa de alfarroba uniformizada de 10 g.L<sup>-1</sup>, designadamente de glucose, sacarose e frutose (Lima, 2012; Martins, 2012; Martins, 2013).

Na fermentação da fonte de carbono foi possível determinar as concentrações de hidrogénio e dióxido de carbono, valor final de pH, e ainda, a concentração de ácidos orgânicos e biomassa produzidos. Na tabela 2 são apresentados os resultados obtidos na

produção de biomassa e de pH final de *C. acetobutylicum*, *C. butyricum* e das quatro estirpes de *C. tyrobutyricum*, 1T, 2T, 3T e 9P (Lima, 2012; Martins, 2012; Martins, 2013).

Na fermentação de extrato aquoso, foi possível verificar, nas diferentes estirpes de *Clostridium*, que a biomassa microbiana produzida situou-se entre 0,83 e 1,83 g.L<sup>-1</sup> (Lima, 2012; Martins, 2012; Martins, 2013). As estirpes de *C. tyrobutyricum* apresentaram uma concentração de biomassa entre 0,83 e 0,94 g.L<sup>-1</sup>, sendo o *C. tyrobutyricum* 9P o microrganismo de maior produção de biomassa (0,94 g.L<sup>-1</sup>) (Martins, 2012). O microrganismo com maior produção de biomassa foi o *C. butyricum* correspondendo a 1,83 g.L<sup>-1</sup> (Lima, 2012). Os valores finais de pH variaram entre 4,4 e 6,2. A variação de pH corresponde ao aumento de concentração de ácidos orgânicos produzidos durante a fermentação, porque a produção desses metabolitos provoca a acidificação do meio de cultura (Lima, 2012; Martins, 2012; Martins, 2013). O pH inicial da fermentação foi de 6,8, como tal, é possível constatar que o *C. butyricum* foi o microrganismo com maior extensão de fermentação da fonte de carbono (Lima, 2012; Martins, 2012; Martins, 2013).

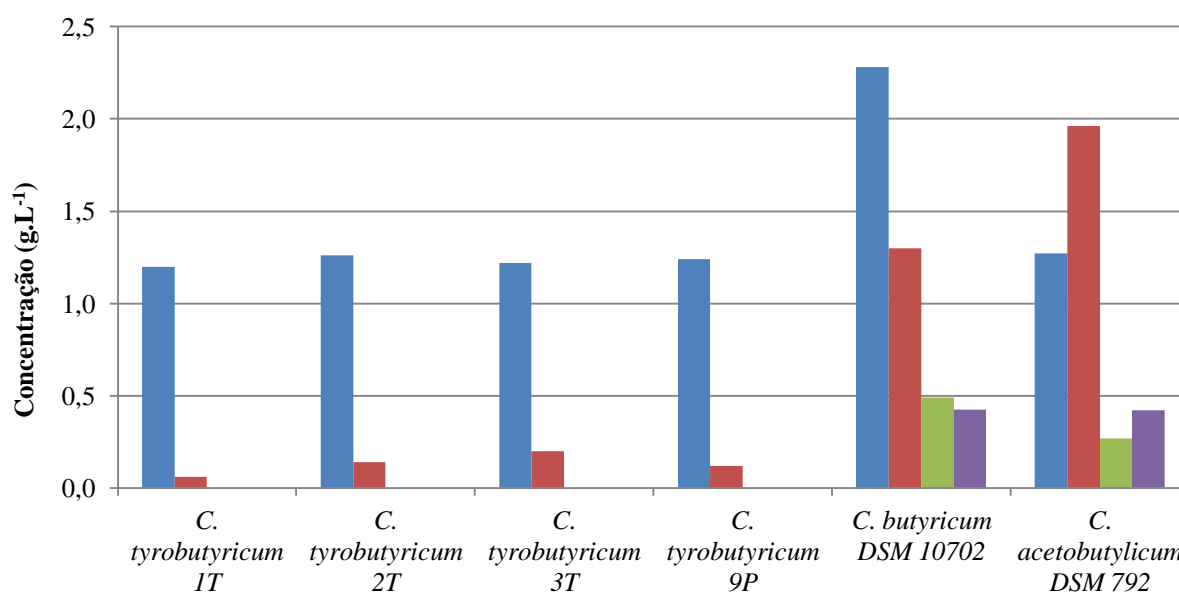
**Tabela 2** – Valores de biomassa produzida e pH final da fermentação de extrato aquoso de polpa de alfarroba por estirpes de *Clostridium* sp. (Retirado de Lima, 2012; Martins, 2012; Martins, 2013)

Estirpes	<i>C. acetobutylicum</i> DSM 792	<i>C. butyricum</i> DSM 10702	<i>C. tyrobutyricum</i> 1T	<i>C. tyrobutyricum</i> 2T	<i>C. tyrobutyricum</i> 3 T	<i>C. tyrobutyricum</i> 9P
Biomassa (g.L <sup>-1</sup> )	1,40	1,83	0,93	0,86	0,83	0,94
pH <sub>final</sub>	4,6	4,4	6,2	5,8	5,8	5,9

Durante a fermentação determinou-se a concentração de ácidos orgânicos. Para o efeito realizou-se a quantificação de ácidos orgânicos produzidos por utilização da coluna Aminex HPX- 87H (BioRad Laboratories, Alemanha (Lima, 2012; Martins, 2012; Martins, 2013). Como é possível verificar na figura 6, nos estudos efetuados por Lima (2012), Martins (2012) e Martins (2013), os ácidos orgânicos detetados para as

diferentes estirpes de *Clostridium* sp. foram: butirato, acetato, formato e lactato, sendo que o butirato e o acetato apresentam-se com maior concentração. Os ácidos orgânicos produzidos coincidem com a fase de crescimento exponencial e correspondem à fase acidogénica no caso de *C. acetobutylicum* (Cary, Petersen, Papoutsakis & Bennettl, 1988).

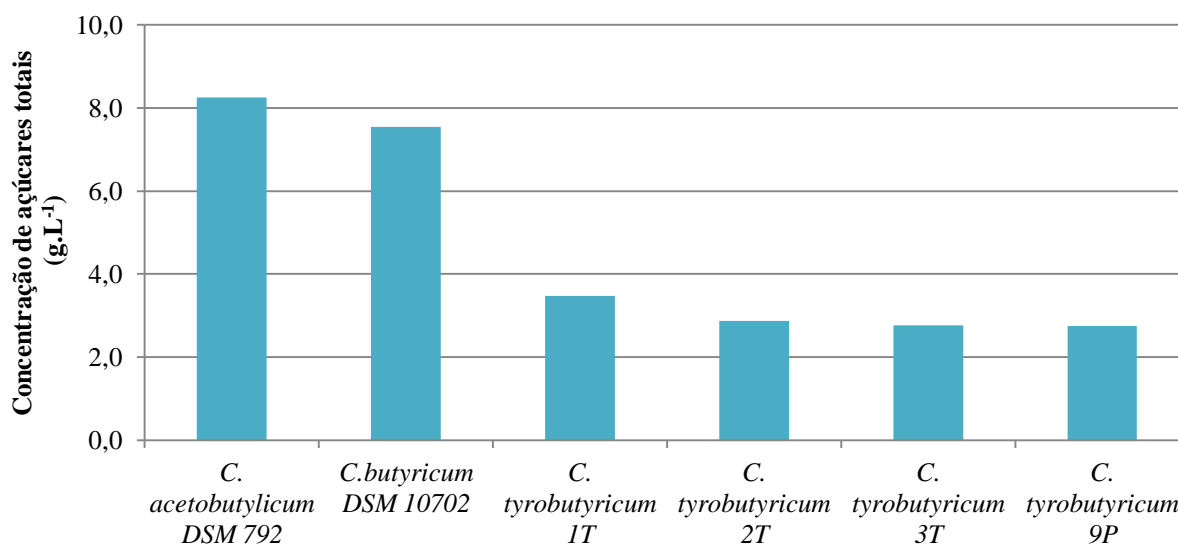
Na fermentação do extrato aquoso da polpa de alfarroba, das estirpes de *C. tyrobutyricum*, a estirpe 2T foi aquela que produziu maior quantidade de butirato, correspondendo a 1,3 g.L<sup>-1</sup>. Porém a estirpe 3T produziu maior quantidade de acetato, 0,2 g.L<sup>-1</sup> (Martins, 2012). No trabalho de Martins (2013), *C. acetobutylicum* produziu butirato e acetato em concentrações de 1,3 e 2,0 g.L<sup>-1</sup>, respetivamente. Na fermentação da fonte de carbono por *C. butyricum*, o butirato e o acetato foram obtidos numa concentração de, aproximadamente, 2,3 e 1,3 g.L<sup>-1</sup> (Lima, 2012).



**Figura 6** – Ácidos orgânicos produzidos e quantificados ao fim de 72, 166 e 168 horas de fermentação por diferentes estirpes de *Clostridium* sp. (Retirado de Lima, 2012; Martins, 2012; Martins, 2013) (■, Butirato; ■, Acetato; ■, Formato; ■, Lactato)

É possível correlacionar os açúcares totais e açúcares consumidos ao longo da fermentação por cada um dos microrganismos, com os principais ácidos orgânicos produzidos e gás libertado. Na figura 7 encontra-se representado o consumo de açúcares ao longo da fermentação pelas diferentes estirpes de *Clostridium* sp., sendo que o consumo de açúcares das diferentes estirpes variou entre 2,8 e 8,3 g.L<sup>-1</sup> (Lima, 2012;

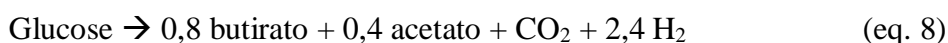
Martins, 2012; Martins, 2013). O maior consumo de açúcares foi registado pelo *C. acetobutylicum* DSM 792, sendo de 8,3 g.L<sup>-1</sup>.(Martins, 2013). A estirpe *C. tyrobutyricum* 9P apresenta o menor consumo de açúcares, apenas 2,8 g.L<sup>-1</sup> (Martins, 2012).



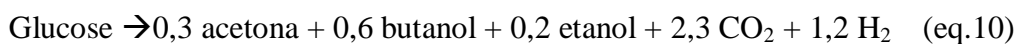
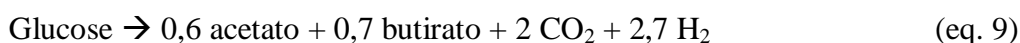
**Figura 7** – Açúcares consumidos na fermentação de extrato de polpa de alfarroba pelas diferentes estirpes de *Clostridium* sp. (Retirado de Lima, 2012; Martins, 2012; Martins, 2013)

Para as diferentes espécies de *Clostridium* sp. foram determinados os parâmetros estequiométricos da fermentação, comparativamente, de dois metabolitos de interesse, especificamente ácido butírico e hidrogénio (tabela 3) (Lima, 2012; Martins, 2012; Martins, 2013).

Segundo Zhang, Yang, Yang e Ma (2009), a equação da fermentação de glucose por *C. butyricum* e *C. tyrobutyricum* é a seguinte:



De acordo com Lütke-Eversloh e Bahl (2011), a equação que traduz a estequiometria da fermentação de glucose por *C. acetobutylicum* é representada da seguinte forma:



**Tabela 3** – Comparação de resultados estequiométricos obtidos pela fermentação de extrato aquoso de polpa de alfarroba por diferentes estirpes de *Clostridium* sp.

Estirpes	Rendimento em H <sub>2</sub> (mol.mol <sup>-1</sup> )	Produção específica de H <sub>2</sub> (mmol.g <sup>-1</sup> )	Produtividade vol. de H <sub>2</sub> (mL.L <sup>-1</sup> .h <sup>-1</sup> )	Rendimento em butirato (mol.mol <sup>-1</sup> )	Produção específica de butirato (mmol.g <sup>-1</sup> )	Razão H <sub>2</sub> /CO <sub>2</sub> (mol.mol <sup>-1</sup> )	Referências
<i>C. acetobutylicum</i> DSM 792	1,4	56,3	11,4	0,25	10,2	1,1	(Martins, 2013)
<i>C. tyrobutyricum</i> 1T	1,0	35,7	11,4	0,37	14,7	2,5	(Martins, 2012)
<i>C. tyrobutyricum</i> 2T	0,9	36,5	10,8	0,39	16,7	2,7	(Martins, 2012)
<i>C. tyrobutyricum</i> 3T	1,0	44,8	12,7	0,38	17,0	2,5	(Martins, 2012)
<i>C. tyrobutyricum</i> 9P	1,3	50,6	16,4	0,38	15,0	1,8	(Martins, 2012)
<i>C. butyricum</i> DSM 10702	3,9	78,2	20,7	0,71	14,7	1,6	(Lima, 2012)

n.d., não determinado

O rendimento em butirato na fermentação por diferentes espécies de *Clostridium* sp., encontrou-se entre 0,25 e 0,71 mol.mol<sup>-1</sup> de açúcares totais (Lima, 2012; Martins, 2012; Martins, 2013). Segundo Lin *et al.* (2007), o rendimento em butirato da fermentação por *C. tyrobutyricum* FYa102, *C. butyricum* ATCC 19398 e *C. acetobutylicum* M121 foi respetivamente, 0,37 mol.mol<sup>-1</sup> de glucose e 0,67 mol.mol<sup>-1</sup> de glucose, e, 0,67 mol.mol<sup>-1</sup> de glucose. Como é possível constatar pela tabela 3, os valores encontram-se próximos dos valores obtidos por Lin *et al.* (2007). O microrganismo que evidencia maior rendimento em butirato é o *C. butyricum* DSM 10702. Em relação à produção de hidrogénio, Lin *et al.* (2007) determinou valores de rendimento em hidrogénio para *C. acetobutylicum*, *C. butyricum* e *C. tyrobutyricum* de, respetivamente, 1,8 mol.mol<sup>-1</sup> de glucose, 2,1 - 2,5 mol.mol<sup>-1</sup> de glucose e 0,7 - 2,2 mol.mol<sup>-1</sup> de glucose. Os resultados

obtidos pelas diferentes estirpes de microrganismos para o rendimento de hidrogénio mostram valores próximos para as estirpes de *C. tyrobutyricum* variando entre 0,9 e 1,3 mol.mol<sup>-1</sup> de glucose (Martins, 2012). O microrganismo que apresentou maior valor de rendimento foi o *C. butyricum*, 3,9 mol.mol<sup>-1</sup> de glucose, o que equivale a 96% do rendimento máximo teórico de hidrogénio (Lima, 2012).

A produtividade volumétrica em hidrogénio foi bastante superior para *C. butyricum*, correspondendo a 20,7 mL.L<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup> (Lima, 2012). É de salientar que para este microrganismo e *C. acetobutylicum* o tempo de fermentação foi respetivamente de 166 e 168 horas, enquanto para as estirpes de *C. tyrobutyricum* esse tempo foi de 72 horas (Lima, 2012; Martins, 2012; Martins, 2013). De acordo com Zhang, Bruns e Logan (2006), em ensaios em biorreator, os valores de produtividade volumétrica em hidrogénio a partir de glucose variaram entre 89 e 220 mL.L<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup> num intervalo de tempo entre 60 e 72 horas, sendo a concentração inicial de glucose de 42 g.L<sup>-1</sup>, cerca de quatro vezes superior à concentração dos trabalhos de Lima (2012), Martins (2012) e Martins (2013) (10 g.L<sup>-1</sup>). A produção específica de butirato foi mais elevada com as estirpes de *C. tyrobutyricum* 2T e 3T, correspondendo respetivamente aos valores 16,7 e 17,0 mmol.g<sup>-1</sup> (Martins, 2012). Estes valores permitem demonstrar a capacidade destas estirpes para a produção específica deste metabolito. Na produção específica de hidrogénio, *C. butyricum* foi o microrganismo capaz de atingir maior produção deste gás, com um valor de 78,2 mmol.g<sup>-1</sup> (Lima, 2012).

A razão entre hidrogénio e dióxido de carbono permite informar sobre a pureza do biogás produzido. Como é possível verificar pela tabela 3, a razão H<sub>2</sub>/ CO<sub>2</sub> das estirpes estudadas variou entre 1,10 e 2,71 mol.mol<sup>-1</sup> (Lima, 2012; Martins, 2012; Martins 2013). *C. tyrobutyricum* 2T foi a estirpe que evidenciou maior razão de H<sub>2</sub> / CO<sub>2</sub>, 2,71 mol.mol<sup>-1</sup> (Martins, 2012).

De todos os microrganismos comparados no presente trabalho, *C. butyricum* evidenciou melhores resultados para a produção de hidrogénio e butirato com o recurso a extrato aquoso da polpa de alfarroba como fonte de carbono (Lima, 2012).

## 7. Conclusão

Este trabalho tinha como objetivo a comparação de diferentes estirpes de *Clostridium* sp., pela sua capacidade de produção de metabolitos por fermentação, especificamente hidrogénio e butirato. Os microrganismos estudados neste trabalho utilizaram extrato aquoso de polpa de alfarroba como fonte de carbono e energia para a fermentação.

Na fermentação do extrato aquoso de polpa de alfarroba por *C. acetobutylicum*, *C. butyricum* e as quatro estirpes de *C. tyrobutyricum* foi possível determinar parâmetros estequiométricos, constatando-se que o microrganismo com maior capacidade para a produção de hidrogénio foi o *C. butyricum* DSM 10702, com um rendimento de 3,9 mol.mol<sup>-1</sup>. Em relação à produtividade volumétrica em hidrogénio, este microrganismo permitiu a produção de 20,7 mL de H<sub>2</sub>.L<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>.

Na produção de butirato, *C. butyricum* foi o microrganismo que permitiu obter o maior rendimento em butirato, correspondendo a 0,71 mol.mol<sup>-1</sup>. No entanto, em termos de produção específica, *C. tyrobutyricum* 9P foi a estirpe que demonstrou maior capacidade para a produção desse metabolito.

Foi possível determinar diferentes rendimentos para as distintas estirpes de clostrídios, principalmente no consumo de açúcares, e ainda na produção de hidrogénio e butirato. Assim sendo, é possível selecionar a melhor estirpe de clostrídio para trabalhos futuros de produção de hidrogénio e/ou butirato a partir de polpa de alfarroba, correspondendo a *C. butyricum* DSM 10702.

*Bactérias anaeróbias como fábricas celulares: produção de hidrogénio e butirato por Clostridium sp.*

## 8. Referências Bibliográficas

- Aarthi, N. e Ramana, K. V. (2011). Identification and Characterization of Polyhydroxybutyrate producing *Bacillus cereus* and *Bacillus mycoides* strains. *International Journal of Environmental Sciences*, 1, 744–756.
- Antonopoulou, G., Gavala, H. N., Skiadas, I. V., Angelopoulos, K. e Lyberatos, G. (2008). Biofuels generation from sweet sorghum: fermentative hydrogen production and anaerobic digestion of the remaining biomass. *Bioresource technology*, 99, 110–9.
- Antonopoulou, G., Gavala, H. N., Skiadas, I. V. e Lyberatos, G. (2010). Influence of pH on fermentative hydrogen production from sweet sorghum extract. *International Journal of Hydrogen Energy*, 35, 1921–1928.
- Aristarkhov, D. V., Zhuravskii, G. I., Poleskii, É. P. e Permyakov, B. A. (2001). Technologies of vegetable biomass, technical rubber, and plastic waste processing. *Journal of Engineering Physics and Thermophysics*, 74, 1561–1565.
- Barcenilla, A., Pryde, S. E., Martin, J. C., Duncan, S. H., Stewart, C. S., Henderson, C., e Flint, H. J. (2000). Phylogenetic Relationships of Butyrate-Producing Bacteria from the Human Gut. *Applied and Environmental Microbiology*, 66, 1654–1661.
- Beckers, L., Hiligsmann, S., Hamilton, C., Masset, J. e Thonart, P. (2010). Fermentative hydrogen production by *Clostridium butyricum* CWBI1009 and *Citrobacter freundii* CWBI952 in pure and mixed cultures. *Biotechnology, Agronomy, Society and Environment*, 14, 541–548.
- Böcker, U., Nebe, T., Herweck, F., Holt, L., Panja, A., Jobin, C., ... Singer, M. V. (2003). Butyrate modulates intestinal epithelial cell-mediated neutrophil migration. *Clinical and experimental immunology*, 131, 53–60.
- Bothe, H., Schmitz, O., Yates, M. G. e Newton, W. E. (2010). Nitrogen fixation and hydrogen metabolism in cyanobacteria. *Microbiology and molecular biology reviews* : *MMBR*, 74, 529–551.

- Brito, G. F., Agrawal, P., Araújo, E. M. e Mélo, T. J. A. (2011). Biopolímeros , Polímeros Biodegradáveis e Polímeros Verdes. *Revista Eletrônica de Materiais e Processos*, 6, 127–139.
- Brook, I. (2007). Treatment of anaerobic infection. *Expert review of anti-infective therapy*, 5, 991–1006.
- Cai, G., Jin, B., Monis, P. e Saint, C. (2013). A genetic and metabolic approach to redirection of biochemical pathways of *Clostridium butyricum* for enhancing hydrogen production. *Biotechnology and bioengineering*, 110, 338–342.
- Cai, G., Jin, B., Saint, C. e Monis, P. (2011). Genetic manipulation of butyrate formation pathways in *Clostridium butyricum*. *Journal of biotechnology*, 155(3), 269–274.
- Canani, R. B., Costanzo, M. Di, e Leone, L. (2012). The epigenetic effects of butyrate potential therapeutic implications for clinical practice. *Clinical Epigenetics*, 4, 1–7.
- Canani, R. B., Costanzo, M. Di, Leone, L., Pedata, M., Meli, R., Calignano, A. e Roberto. (2011). Potential beneficial effects of butyrate in intestinal and extraintestinal diseases. *World Journal of Gastroenterology*, 17, 1519–1528.
- Cary, J. W., Petersen, D. J., Papoutsakis, E. T. e Bennettl, G. N. (1988). Cloning and Expression of *Clostridium acetobutylicum* Phosphotransbutyrylase and Butyrate Kinase Genes in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 170, 4613–4618.
- Cetin-Karaca, H. (2011). *Evaluation of natural antimicrobial phenolic compounds against foodborne pathogens*. Tese de Mestrado em Ciências. Escola Superior de Agricultura - Universidade do Kentucky, Kentucky. 214 pp.
- Chaijamrus, S. e Udpuay, N. (2008). Production and Characterization of Polyhydroxybutyrate from Molasses and Corn Steep Liquor produced by *Bacillus megaterium* ATCC 6748. *Agricultural Engineering International*, X, 1–12.

- Chen, S.-D., Lee, K.-S., Lo, Y.-C., Chen, W.-M., Wu, J.-F., Lin, C.-Y. e Chang, J.-S. (2008). Batch and continuous biohydrogen production from starch hydrolysate by *Clostridium* species. *International Journal of Hydrogen Energy*, 33, 1803–1812.
- Chen, W.-M., Tseng, Z.-J., Lee, K.-S. e Chang, J.-S. (2005). Fermentative hydrogen production with CGS5 isolated from anaerobic sewage sludge. *International Journal of Hydrogen Energy*, 30, 1063–1070.
- Chen, Y., Stevens, M. A., Zhu, Y., Holmes, J. e Xu, H. (2013). Understanding of alkaline pretreatment parameters for corn stover enzymatic saccharification. *Biotechnology for biofuels*, 6, 1-10.
- Cooke, R. L. (2013). Aerobic and Anaerobic Digestion and Types of Decomposition. *Water/Wastewater Distance Learning Website*. Acedido em 18 de Setembro de 2013, em <http://water.me.vccs.edu/courses/env149/lesson4.htm>
- Cruickshank, R., Duguid, J. P., Marmion, B. P. e Swain, C. H. A. (1973). *Clostridium* - I. *Cl. welchii* e outros Clostrídios. In *Microbiologia Médica volume I* (4ª edição, pp. 691–727). Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian.
- Das, D. e Veziroglu, T. N. (2001). Hydrogen production by biological processes : a survey of literature. *International Journal of Hydrogen Energy*, 26, 13–28.
- Duncan, S. H., Holtrop, G., Lobley, G. E., Calder, A. G., Stewart, C. S. e Flint, H. J. (2004). Contribution of acetate to butyrate formation by human faecal bacteria. *British Journal of Nutrition*, 91, 915–923.
- Dwidar, M., Park, J.-Y., Mitchell, R. J. e Sang, B.-I. (2012). The future of butyric acid in industry. *The Scientific World Journal*, 2012, 1–9.
- Eckenfelder, W. W., Patocza, J. B. e Pulliam, G. W. (1988). Anaerobic versus Aerobic Treatment in the U.S.A. In Boloña (Ed.), *Advances in Water Pollution Control. 5 International IAWPRC Conference on Anaerobic Digestion* (pp. 105–114). Londres: International Association of Water Pollution Research and Control.

- Emsley, J. (2013). Hydrogen. *Royal Society of Chemistry*. Acedido a 01 de Outubro de 2013, em <http://www.rsc.org/periodic-table/element/1/hydrogen>
- Fulks, J. (2011). Chapter 5 Bacterial Metabolism. *Biology*. Acedido a 02 de Outubro de 2013, em [http://www2.bc.cc.ca.us/bio16/5\\_metabolism.htm](http://www2.bc.cc.ca.us/bio16/5_metabolism.htm)
- Gheshlaghi, R., Scharer, J. M., Moo-Young, M. e Chou, C. P. (2009). Metabolic pathways of clostridia for producing butanol. *Biotechnology advances*, 27, 764–781.
- Goyal, Y., Kumar, M. e Gayen, K. (2013). Metabolic engineering for enhanced hydrogen production: a review. *Canadian journal of microbiology*, 59, 59–78.
- Hallenbeck, P. C. (2009). Fermentative hydrogen production: Principles, progress, and prognosis. *International Journal of Hydrogen Energy*, 34, 7379–7389.
- Hallenbeck, P. C. e Ghosh, D. (2009). Advances in fermentative biohydrogen production: the way forward? *Trends in biotechnology*, 27, 287–297.
- Hallenbeck, P. C., Ghosh, D., Skonieczny, M. T. e Yargeau, V. (2009). Microbiological and engineering aspects of biohydrogen production. *Indian journal of microbiology*, 49, 48–59.
- Harvey, B. G. e Meylemans, H. A. (2011). The role of butanol in the development of sustainable fuel technologies. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 86, 2–9.
- Haus, S., Jabbari, S., Millat, T., Janssen, H., Fischer, R.-J., Bahl, H., ... Wolkenhauer, O. (2011). A systems biology approach to investigate the effect of pH-induced gene regulation on solvent production by *Clostridium acetobutylicum* in continuous culture. *BMC systems biology*, 5, 1–13.
- He, G., Kong, Q., Chen, Q. e Ruan, H. (2005). Batch and fed-batch production of butyric acid by *Clostridium butyricum* ZJUCB. *Journal of Zhejiang University. Science. B*, 6, 1076–1080.

- Henis, Y., Tagari, H. e Volcani, R. (1964). Effect of Water Extracts of Carob Pods, Tannic Acid, and Their Derivatives on the Morphology and Growth of Microorganisms. *Applied microbiology*, 12, 204–209.
- Hill, J., Nelson, E., Tilman, D., Polasky, S. e Tiffany, D. (2006). Environmental, economic, and energetic costs and benefits of biodiesel and ethanol biofuels. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103, 11206–11210.
- Hong, Y. e Gu, J.-D. (2009). Bacterial anaerobic respiration and electron transfer relevant to the biotransformation of pollutants. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 63, 973–980.
- Hu, S., Zheng, H., Gu, Y., Zhao, J., Zhang, W., Yang, Y., ... Jiang, W. (2011). Comparative genomic and transcriptomic analysis revealed genetic characteristics related to solvent formation and xylose utilization in *Clostridium acetobutylicum* EA 2018. *BMC genomics*, 12, 1–18.
- Huang, K. X., Huang, S., Rudolph, F. B. e Bennett, G. N. (2000). Identification and characterization of a second butyrate kinase from *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824. *Journal of molecular microbiology and biotechnology*, 2, 33–38.
- Hub, B. (2012). Examples of Anaerobic Bacteria. *Bright Hub Inc.* Acedido a 30 de Setembro de 2013, em <http://www.brighthub.com/science/genetics/articles/57744.aspx>
- Kalia, V. C. e Purohit, H. J. (2008). Microbial diversity and genomics in aid of bioenergy. *Journal of industrial microbiology & biotechnology*, 35, 403–419.
- Kumar, S. V. e Ashish, S. (2011). Production of polyhydroxybutyrate from cafeteria waste: an environment friendly approach. *Pharmacia*, 1, 48–51.
- Lee, H.-S., Salerno, M. B. e Rittmann, B. E. (2008). Thermodynamic evaluation on H<sub>2</sub> production in glucose fermentation. *Environmental science & technology*, 42, 2401–2407.

- Lee, S. Y., Park, J. H., Jang, S. H., Nielsen, L. K., Kim, J. e Jung, K. S. (2008). Fermentative butanol production by Clostridia. *Biotechnology and bioengineering*, *101*, 209–228.
- Lima, M. (2012). *Valoração da polpa de alfarroba como substrato para a produção biológica de metabolitos de interesse industrial: fermentação de açúcares vs extração de compostos fenólicos*. Dissertação de Monografia para obtenção de grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas. Instituto Superior de Ciências da Saúde Egas Moniz, Monte de Caparica. 91 pp.
- Lin, P. Y., Whang, L. M., Wu, Y. R., Ren, W. J., Hsiao, C. J., Li, S. L. e Chang, J. S. (2007). Biological hydrogen production of the genus Clostridium: Metabolic study and mathematical model simulation. *International Journal of Hydrogen Energy*, *32*, 1728-1735.
- Liu, X. e Yang, S.-T. (2006). Kinetics of butyric acid fermentation of glucose and xylose by *Clostridium tyrobutyricum* wild type and mutant. *Process Biochemistry*, *41*, 801–808.
- Liu, X., Zhu, Y. e Yang, S.-T. (2006). Butyric acid and hydrogen production by *Clostridium tyrobutyricum* ATCC 25755 and mutants. *Enzyme and Microbial Technology*, *38*, 521–528.
- Lo, Y.-C., Saratale, G. D., Chen, W.-M., Bai, M.-D. e Chang, J.-S. (2009). Enzyme and microbial technology isolation of cellulose-hydrolytic bacteria and applications of the cellulolytic enzymes for cellulosic biohydrogen production. *Enzyme and Microbial Technology*, *44*, 417–425.
- Lo, Y.-C., Yung-Sheng, Chen, C.-Y. e Chang, J.-S. (2010). *Optimizing Fermentation Conditions for bioH<sub>2</sub> Production with Clostridium Butyricum CGS2 Using Statistical Experimental Design* (Vol. 78, pp. 169–173).
- Logan, B. E., Oh, S.-E., Kim, I. S. e Ginkel, S. Van. (2002). Biological hydrogen production measured in batch anaerobic respirometers. *Environmental science & technology*, *36*, 2530–2535.

- Louis, P. e Flint, H. J. (2009). Diversity, metabolism and microbial ecology of butyrate-producing bacteria from the human large intestine. *FEMS microbiology letters*, 294, 1–8.
- Louis, P., Young, P., Holtrop, G. e Flint, H. J. (2010). Diversity of human colonic butyrate-producing bacteria revealed by analysis of the butyryl-CoA:acetate CoA-transferase gene. *Environmental Microbiology*, 12, 304–314.
- Luque, R., Herrero-Davila, L., Campelo, J. M., Clark, J. H., Hidalgo, J. M., Luna, D., ... Romero, A. A. (2008). Biofuels: a technological perspective. *Energy & Environmental Science*, 1, 542–564.
- Lütke-Eversloh, T. e Bahl, H. (2011). Metabolic engineering of *Clostridium acetobutylicum*: recent advances to improve butanol production. *Current opinion in biotechnology*, 22, 634–647.
- Mann, M. S. e Lütke-Eversloh, T. (2013). Thiolase Engineering for Enhanced Butanol Production in *Clostridium acetobutylicum*. *Biotechnology and bioengineering*, 110, 887–897.
- Martins, T. (2012). *Clostrídios como fábricas celulares: estudos de fisiologia em fontes de carbono alternativas*. Monografia apresentada no âmbito da Unidade Curricular Introdução à Investigação Científica I, Instituto Superior de Ciências da Saúde Egas Moniz, Monte de Caparica. 36 pp.
- Martins, T. (2013). *Utilização de extratos aquosos de polpa de alfarroba como fonte de carbono para a fermentação por Clostridium acetobutylicum*. Monografia apresentada no âmbito da Unidade Curricular Introdução à Investigação Científica II, Instituto Superior de Ciências da Saúde Egas Moniz, Monte de Caparica. 40 pp.
- Meijera, K., Vosb, P. e Priebea, M. G. (2010). Butyrate and other short-chain fatty acids as modulators of immunity: what relevance for health?. *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care*, 13, 715–721.
- Mevissen-Verhage, E. A. E., Marcelis, J. H., Vos, M. N. de, Amerongen, W. C. M. H. e Verhoef, J. (1987). *Bifidobacterium*, *Bacteroides*, and *Clostridium* spp. in Fecal

- Samples from Breast-Fed and Bottle-Fed Infants with and without Iron Supplement. *Journal of Clinical Microbiology*, 25, 285–289.
- Millat, T., Janssen, H., Bahl, H., Fischer, R. e Wolkenhauer, O. (2013). The pH-induced Metabolic Shift from Acidogenesis to Solventogenesis in *Clostridium acetobutylicum* – From Experiments to Models. *Experimental Standard Conditions of Enzyme Characterization*, Rudesheim/Rhein, Alemanha 16-18 de Setembro de 2011. pp. 33–54.
- Mittal, A. (2011). Biological Wastewater Treatment. *Aquatech International Corporation*, pp. 32–44.
- Morello, J. A., Granato, P. A. e Mizer, H. E. (2003). *Laboratory Manual and Workbook in Microbiology*. 7ª edição, The McGraw-Hill Companies.
- Naber, D. (2013). *Clostridium*. *University of California, San Francisco*. Acedido a 12 de Setembro de 2013, em [http://labmedx.ucsfmedicalcenter.org/labmanual/clinlab/micro\\_images/bacteriology/anaerobes/clostridium-gs-1\\_s.jpg](http://labmedx.ucsfmedicalcenter.org/labmanual/clinlab/micro_images/bacteriology/anaerobes/clostridium-gs-1_s.jpg).
- Nath, K. e Das, D. (2004). Biohydrogen production as a potential energy resource – Present state-of-art. *Journal of Scientific & Industrial Research*, 63, 729–738.
- NCBI. (2009). Butyric Acid. *PubChem Compound*. Acedido a 22 de Setembro de 2013, em <http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/summary/summary.cgi?cid=264#x27>.
- Nepelska, M., Cultrone, A., Béguet-Crespel, F., Roux, K. Le, Doré, J., Arulampalam, V. e Blottière, H. M. (2012). Butyrate produced by commensal bacteria potentiates phorbol esters induced AP-1 response in human intestinal epithelial cells. *PLOS one*, 7, 1–10.
- Nunes, F. S., Cristina, A. e Carlos, A. (2003). Fixação de nitrogénio: estrutura, função e modelagem bioinorgânica das nitrogenases. *Química Nova*, 26, 872–879.
- Ollivier, B., Caumette, P., Garcia, J.-L. e Mah, R. A. (1994). Anaerobic bacteria from hypersaline environments. *Microbiological reviews*, 58, 27–38.

- Pan, C., Zhang, S., Fan, Y. e Hou, H. (2010). Bioconversion of corncob to hydrogen using anaerobic mixed microflora. *International Journal of Hydrogen Energy*, 35, 2663–2669.
- Panagiotopoulos, I., Bakker, R., Vrije, T. de, Niel, E. Van, Koukios, E. e Claassen, P. (2011). Exploring Critical Factors for Fermentative Hydrogen Production from Various Types of Lignocellulosic Biomass. *Journal of the Japan Institute of Energy*, 90, 363–368.
- Papagiannopoulos, M., Wollseifen, H.R., Mellenthin, A., Haber, B. e Galensa, R. (2004). Identification and quantification of polyphenols in carob fruits (*Ceratonia siliqua* L.) and derived products by HPLC-UV-ESI/MSn.. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 3784–3791.
- Papoutsakis, E. T. (2008). Engineering solventogenic clostridia. *Current opinion in biotechnology*, 19, 420–9.
- Peters, J. W., Boyd, E. S., D’Adamo, S., Mulder, D. W., Therien, J. e Posewitz, M. C. (2013). Hydrogenases, Nitrogenases, Anoxia, and H<sub>2</sub> Production in Water-Oxidizing Phototrophs. In B. Michael A. & M. Navid R. (Eds.), *The Chlamydomonas Sourcebook: Organellar and Metabolic Processes 2* (pp. 37–75). Dordrecht: Springer Netherlands.
- Phowan, P., Reungsang, A. e Danvirutai, P. (2010). Bio-hydrogen production from Cassava pulp hydrolysate using co-culture of *Clostridium butyricum* and *Enterobacter aerogenes*. *Biotechnology*, 9, 348–354.
- Pimentel, D. (2003). Ethanol Fuels: Energy Balance, Economics, and Environmental Impacts are Negative. *Natural Resources Research*, 12, 127–134.
- Pimentel, D. e Patzek, T. W. (2005). Ethanol Production Using Corn, Switchgrass, and Wood; Biodiesel Production Using Soybean and Sunflower. *Natural Resources Research*, 14, 65–76.

- Rafieenia, R. (2013). A Metabolic Model for Investigation of the Fermentative Hydrogen Production by *Clostridium Butyricum* W5 Grown on Xylose. *Asian Journal of Experimental Biological Sciences*, 4, 472–475.
- Ramachandran, U., Wrana, N., Cicek, N., Sparling, R. e Levin, D. B. (2011). Isolation and characterization of a hydrogen- and ethanol-producing *Clostridium* sp . strain URNW. *Canadian journal of microbiology*, 57, 236–243.
- Ramey, D. e Yang, S.-T. (2004). *Production of Butyric Acid and Butanol from Biomass* (pp. 1–103). Ohio.
- Sá, L. R. V. de, Oliveira, T. C. de, Matos, A. e Oliveira, E. M. M. (2009). Avaliação de diferentes pré-tratamentos do inóculo para produção de H<sub>2</sub> por bactérias anaeróbias. *Latin American Workshop And Symposium On Anaerobic Digestion*, 5, 1–8.
- Sá, L. R. V., Oliveira, T. C., Santos, T. F., Matos, A., Cammarota, M. C., Oliveira, E. M. M. e Leitão, V. S. F. (2011). Hydrogenase activity monitoring in the fermentative hydrogen production using heat pretreated sludge: A useful approach to evaluate bacterial communities performance. *International Journal of Hydrogen Energy*, 36, 7543–7549.
- Santos, F. M. S. M. e Santos, F. A. C. M. (2005). O combustível “hidrogênio.” *Millenium*, 252–270.
- Saxena, S. K. (2003). Hydrogen production by chemically reacting species. *International Journal of Hydrogen Energy*, 28, 49–53.
- Singh, P. e Parmar, N. (2011). Isolation and characterization of two novel polyhydroxybutyrate (PHB) - producing bacteria. *African Journal of Biotechnology*, 10, 4907–4919.
- Skonieczny, M. T. e Yargeau, V. (2009). Biohydrogen production from wastewater by *Clostridium beijerinckii*: Effect of pH and substrate concentration. *International Journal of Hydrogen Energy*, 34, 3288–3294.

- Smith, N. O., Maclean, I., Miller, F. A. e Carruthers, S. P. (1997). *Crops for industry and energy in Europe* (pp. 1–76). Bruxelas: European Commission.
- Tashiro, Y. e Sonomoto, K. (2010). Advances in butanol production by clostridia. *Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology*, 2, 1383–1394.
- Tracy, B. P., Jones, S. W., Fast, A. G., Indurthi, D. C. e Papoutsakis, E. T. (2012). Clostridia: the importance of their exceptional substrate and metabolite diversity for biofuel and biorefinery applications. *Current opinion in biotechnology*, 23, 364–381.
- Valencia, A. C. D., Fajardo, G. A. G., Vargas, F. E. S. e Fajardo, C. A. G. (2012). Modeling of Carbonated Metabolites Production by *Clostridium butyricum* W5 Under Anaerobic Conditions for Optimization of Hydrogen Metabolic Production. *Journal of Technology Innovations in Renewable Energy*, 1, 103–112.
- Vinolo, M. A. R., Rodrigues, H. G., Nachbar, R. T. e Curi, R. (2011). Regulation of Inflammation by Short Chain Fatty Acids. *Nutrients*, 3, 858–876.
- Vital, M., Penton, C. R., Wang, Q., Young, V. B., Antonopoulos, D. A., Sogin, M. L., ... Tiedje, J. M. (2013). A gene-targeted approach to investigate the intestinal butyrate-producing bacterial community. *Microbiome*, 1, 1–14.
- Wang, X. (2008). *Identification and Description of Clostridium sp . and Metabolic Activities in Fermentative Hydrogen Production*. Tese de Doutorado em filosofia. Universidade de Adelaide, Adelaide. 158 pp.
- Yang, C. M., Cao, G. T., Ferket, P. R., Liu, T. T., Zhou, L., Zhang, L., ... Chen, A. G. (2012). Effects of probiotic, *Clostridium butyricum*, on growth performance, immune function, and cecal microflora in broiler chickens. *Poultry Science Association Inc.*, 2121–2129.
- Zhang, C., Yang, H., Yang, F. e Ma, Y. (2009). Current progress on butyric acid production by fermentation. *Current microbiology*, 59, 656–663.

- Zhang, H., Bruns, M. A. e Logan, B. E. (2006). Biological hydrogen production by *Clostridium acetobutylicum* in an unsaturated flow reactor. *Water research*, 40, 728–734.
- Zhu, Y. (2003). *Enhanced butyric acid fermentation by Clostridium tyrobutyricum immobilized in a fibrous-bed bioreactor*. Dissertação de Doutorado em Filosofia. Universidade do Estado de Ohio, Ohio.
- Zidwick, M. J., Chen, J.-S. e Rogers, P. (2013). Organic acid and solvent production: propionic and butyric acids and ethanol. In E. Rosenberg, E. F. DeLong, S. Lory, E. Stackebrandt e F. Thompson (Eds.), *The prokaryotes - Applied Bacteriology and Biotechnology* (pp. 135–167). Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
- Zigová, J. e Sturdik, E. (2000). Advances in biotechnological production of butyric acid. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 24, 153–160.