UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS
CAMPUS DE BOTUCATU

“METABOLISMO DA LINAMARINA EM REATOR DE DIGESTÃO ANAERÓBIA COM SEPARAÇÃO DE FASES"

SUZY SARZI OLIVEIRA

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agronômicas da UNESP – Campus de Botucatu, para obtenção do título de Doutor em Agronomia – Área de Concentração Energia na Agricultura

BOTUCATU – SP
Dezembro - 2003

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS
CAMPUS DE BOTUCATU

"METABOLISMO DA LINAMARINA EM REATOR DE DIGESTÃO ANAERÓBIA COM SEPARAÇÃO DE FASES"

SUZY SARZI OLIVEIRA

Orientador: **Marney Pascoli Cereda**

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agronômicas da UNESP – Campus de Botucatu, para obtenção do título de Doutor em Agronomia – Área de Concentração Energia na Agricultura

BOTUCATU – SP
Dezembro - 2003

DEDICATÓRIA

Com carinho aos meus pais, Pedro e Noemia.

Aqueles que me deram a vida
e que me encaminharam para o
significado de vivê-la, dedico o
conhecimento de mais este trabalho.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelas oportunidades concedidas em minha vida.
Aos meus pais Noemia e Pedro, que sempre se esforçaram para a minha chegada até aqui.
Ao meu "namorado-esposo" Tony, meu companheiro, meu amigo, meu amor...pela dedicação constante.
Ao meu irmão Richard sempre incentivador e à minha cunhada-irmã Adriana com sua doce ternura.
À minha irmã Elaine e ao meu cunhado Sérgio que mesmo tão distantes estão sempre tão pertos.
À Profa. Dra. Marney Pascoli Cereda, dona de um dinamismo "invejável", uma pessoa que sempre me passou segurança mesmo em momentos em que essa já parecia ter sido perdida.
A Profa. Dra. Maria Bernadete Amâncio Varesche pela disponibilidade do uso do LPB (Laboratório de Processos Biológicos) – USP, São Carlos, pela grande ajuda com os microrganismos, pelo bom humor que torna sempre agradável o ambiente de trabalho.
A Profa. Elizabeth de Mattos Moraes pelo prazer da amizade e pela disponibilidade em me ensinar ***sempre.***
Ao Prof. Cláudio Cabello pela amizade e por sempre estar disponível às minhas dúvidas.
As queridas amigas Magdalena e Ana Elisa, sempre tão presentes em minha vida de Doutoranda, com muita dedicação e compreensão.
A amiga Luciane Gelesky Sarkis pela paz de espírito e pelos "pousos" sempre inesperados em São Carlos.
A todos os colegas do Centro de Raízes e Amidos Tropicais pelas "boas risadas", em especial aos queridos amigos Luís Henrique, Aura e Marianinha (Bauru), pelo carinho sempre dispensado..
A Profa. Teresa Losada Valle (IAC) pela doação das raízes de mandioca com alta concentração de linamarina.
Ao Prof.Ismael (Departamento de Tecnologia) pela grande disponibilidade no empréstimo do botijão de nitrogênio líquido.
Aos "meninos" da farinheira Plaza sempre tão solícitos. Agradeço de coração a todos eles pela amizade e grande ajuda dispensada em minhas visitas para a coleta da manipueira.

Aos professores, funcionários e colegas da FCA.

A FAPESP (Fundação de Amparo à pesquisa do Estado de São Paulo) pelo auxílio financeiro concedido.

LISTA DE QUADROS

QUADROS **Página**

1 Quantidade de cianeto total e carga orgânica na manipueira..... 6

2 Valores médios de caracterização de resíduo líquido da industrialização da mandioca..... 10

3 Teor de ácido cianídrico em partes da planta da mandioca..... 11

4 Toxicidade do HCN inalado em diferentes concentrações..... 18

5 - Metodologia de análise das formas de cianeto (total e livre)..... 37

6 Fator (F) de correção de umidade do biogás com relação à temperatura..... 38

7 Composição do meio mínimo..... 39

8 Metodologia de determinação da atividade da enzima linamarase..... 47

9 Condições das culturas enriquecidas em linamarina e acetonacianidrina a 30±2°C..... 46

10 Cargas orgânicas do afluente e efluente dos reatores acidogênico e metanogênico e respectivas taxas de redução..... 49

11 Remoção de cianeto total e livre e porcentagem de remoção durante o funcionamento dos reatores biológicos na degradação da manipueira..... 50

12 Atividade da enzima linamarase..... 52

13 Balanço de teores de cianeto total nos reatores e HCN captado nos gases..... 56

14 Valores de pH ao longo dos ensaios *in vitro* com a linamarina..... 57

15 Degradação da linamarina ao longo do tempo por inóculo manipueira 58

16 Degradação da linamarina ao longo do tempo por inóculo proveniente do efluente do reator acidogênico..... 59

17 Degradação da linamarina ao longo do tempo por inóculo proveniente do efluente do reator metanogênico..... 60

18 Taxa de deegradação da linamarina com inóculo manipueira em condições anaeróbias e aeróbias..... 63

19 Taxa de degradação da linamarina com inóculo proveniente do efluente acidogênico em condições aeróbias e anaeróbias..... 63

20 Taxa de degradação da linamarina com inóculo proveniente do efluente metanogênico, com e sem amostragem de gases..... 64
21 Teores de cineto total e livre medidos nos inóculos e ao final dos ensaios *in vitro* com a linamarina..... 65
22 Degradação da acetonacianidrina ao longo do tempo por inóculo proveniente da manipueira..... 67
23 Degradação da acetonacianidrina ao longo do tempo por inóculo proveniente do efluente do reator acidogênico..... 68
24 Degradação da acetonacianidrina ao longo do tempo por inóculo proveniente do efluente do reator metanogênico..... 69
25 Taxa de degradação da acetonacianidrina com inóculo manipueira em condições anaeróbias e aeróbias..... 71
26 Taxa de degradação da acetonacianidrina com inóculo proveniente do efluente acidogênico..... 72
27 Taxa de degradação da acetonacianidrina com inóculo proveniente do efluente metanogênico..... 72
28 Resultados de cineto total e livre nos ensaios *in vitro* com a acetonacianidrina..... 73

LISTA DE FIGURAS

FIGURAS **Página**

1 Lagoa de estabilização com armazenamento de manipueira..... 8

2 Distribuição da massa de mandioca sobre os quadros de prensa e posterior prensagem desta massa ralada..... 9

3 Distribuição do ácido cianídrico no processo de extração da fécula de mandioca..... 11

4 Fórmulas estruturais da linamarina e lotaustralina..... 12

5 Síntese da linamarina, produção de cianeto e localização da linamarina e linamarase na célula do mesófilo foliar da mandioca..... 13

6 Atividade da linamarase em função do pH por duas horas sob diferentes temperaturas..... 15

7 Estabilidade térmica na atividade da linamarase por duas horas sob diferentes temperaturas..... 15

8 Cianogênese da linamarina..... 19

9 Relações metabólicas no processo de decomposição anaeróbia. Atuação de grupos bacterianos anaeróbios na conversão da matéria orgânica complexa a metano e dióxido de carbono..... 24

10 Conversão do cianeto a CO_2 e NH_3..... 29

11- Teor de cianeto do extrato de mandioca após a inibição da linamarase endógena..... 30

12 Etapas que elucidam o destino do HCN degradado..... 40

13 Sistema de distribuição simultânea de gases..... 41

14 Degradação da linamarina por inóculo proveniente da manipueira..... 58

15 Degradação da linamarina por inóculo proveniente do efluente do reator acidogênico..... 59

16 Degradação da linamarina por inóculo proveniente do efluente do reator metanogênico, com e sem amostragem de gás……..... 61

17 Degradação da acetonacianidrina por inóculo manipueira..... 68

18 Degradação da acetonacianidrina por inóculo proveniente do efluente do reator acidogênico... 69

19 Degradação da linamarina por inóculo proveniente do efluente do reator metanogênico..... 70

RESUMO

A mandioca contém linamarina em todas as partes da planta. A linamarina se decompõe por enzimas endógenas ou exógenas e gera ácido cianídrico. A fabricação de farinha se faz com a ralação das raízes descascadas e prensagem da massa obtida, gerando água de constituição que arrasta a linamarina solúvel e outros compostos orgânicos. Essa água pode causar poluição e intoxicação em animais e plantas. Uma solução para seu tratamento é a digestão anaeróbia, mas não há informações sobre o destino dos produtos da decomposição da linamarina, que podem ter sido metabolizados por microrganismos ou arrastados com os gases. Para elucidar essa questão, os gases gerados em um conjunto de reatores acidogênico e metanogênico em série, alimentados com água residual de mandioca, foram captados em solução de carbonato de sódio e depois dosado o HCN. Nos gases gerados nos dois reatores ocorreu arraste de HCN que captado e dosado, correspondeu a um mínimo de 0,28 a 0,47 mg.24h. Os valores de HCN captados e dosados nos gases corresponderam a uma parcela muito pequena da linamarina degradada e do cianeto livre e total dosados nos efluentes dos reatores. A dosagem da linamarase no resíduo recém coletado (manipueira) permitiu constatar que a atividade da enzima tem início imediatamente após a ruptura dos tecidos da raiz. O acompanhamento da atividade da linamarase no afluente do reator acidogênico (manipueira armazenada à temperatura ambiente) e nos efluentes dos reatores acidogênicos e metanogênicos mostrou que a atividade se mantém por todo o sistema.

Como é difícil separar a ação da enzima da mandioca do metabolismo de microrganismos, foram realizados ensaios *in vitro* com meio de cultivo adicionado de inóculos do substrato (manipueira) e dos efluentes dos efluentes dos reatores acidogênicos e metanogênicos. Nestes frascos foram acrescentadas quantidades conhecidas de linamarina e acetona-cianidrina. Parte dos frascos foram submetidos a condições aeróbias e anaeróbias.

Os resultados mostraram que de uma forma geral toda a linamarina e acetona-cianidrina foram totalmente decompostos durante o tratamento. A linamarina foi decomposta em menor tempo que a acetona-cianidrina, em condições aeróbias e anaeróbias. Provavelmente essa degradação mais rápida foi devida à liberação de glicose durante a hidrólise, o que não ocorre na hidrólise da acetona-cianidrina que libera acetona e HCN, portanto menor energia é disponibilizada para os microrganismos. Entre os inóculos avaliados,

o mais eficiente nas duas condições (aeróbias e anaeróbias), foi o de manipueira, seguido pelo proveniente do efluente do reator acidogênico.

Palavras-chave: Energia, Linamarina, Acetona-cianidrina, Mandioca, Resíduo, Farinha, Tratamento anaeróbio.

THE LINAMARIN METABOLISM IN ANAEROBIC DIGESTION REACTOR WITH PHASES SEPARATION. Botucatu, 2003. 88f.
Thesis (Doctorate in Agronomy/Energy in the Agriculture) – Agronomy College - São Paulo State University.

Author: SUZY SARZI OLIVEIRA
Adviser: MARNEY PASCOLI CEREDA

SUMMARY

Cassava contains linamarin in all parts of the plant. Linamarin is hydrolyzed by endogenous or exogenous enzymes and generates hydrocyanic acid. The manufacture of Brazilian cassava flour is made by pressing the grated peeled cassava roots and the dryed mass is rosted in an open oven. The constituting water of the cassava roots pulls out with soluble linamarin and other organic compounds. Such water may cause pollution and intoxication of animals and plants. The recommended treatment of cassava wastewater is the anaerobic digestion, although there is no information about the destination of the products from the linamarin decomposing, which may have been metabolized by microorganisms or pulled out with gases. To clarify this matter, gases generated in a series of acidogenic and methanogenic reactors, fed with cassava wastewater (substrate), were attracted in a sodium carbonate solution. In this solution, HCN was then dosed. In the analyzing period, reactors produced gases and reduction of organic charge in quantities compatible with literature reports. The results showed that variable quantities of HCN (0.28 to 0.47 mg HCN) were attracted in gases in 24 hours and those values were much lower than the corresponding values to the removal of total and free cyanide in the reactors at the same period. The dosage of the linamarase in the recently collected cassava wastewater used as subtract allowed to verify that the activity of the enzyme has beginning immediately after the rupture of the root's tissue. The following of the linamarase activity of the substrate of acidogenic reactor and the effluents of the acidogenic and methanogenic reactors showed that the activity stays in different degree for the whole system.

As it is difficult to separate the action of the enzyme of the cassava from the one of microorganism's metabolism, *in vitro* testes were performed using a cultivation medium added of 3 inoculums: the substratum and the effluents of the acidogenic and methanogenic reactors. In these flasks well-known amounts of linamarin acetone-cyanidrin were added. The flasks were submitted to aerobic and anaerobic conditions.

The results showed that in a general way linamarin and acetone-cyanidrin were totally destroyed during the *in vitro* tests. The linamarin was decomposed in short time that the acetone-cyanidrin, in both aerobic and anaerobic conditions. These faster degradation was probably due to the glucose liberation during linamarin hydrolyze, what doesn't happen in the acetone-cyanidrin hydrolyze that liberates acetone and HCN, therefore smaller energy is available for the microorganisms. In the two conditions the most efficient inoculums among the evaluated was it from the substrate, followed by the one from the acidogenic reactor effluent.

Key words: Energy, Linamarin, Acetone-cyanidrin, Cassava, Wastewater, Flour, Anaerobic digestion.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO..... 1
2 OBJETIVO..... 3
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA..... 4
3.1 A indústria de transformação da mandioca..... 5
3.1.1 Manipueira – caracterização e composição..... 8
3.2 Glicosídeos cianogênicos em *Manihot esculenta* Crantz..... 11
3.2.1 Linamarase EC. 3.2.1.21..... 14
3.3 Os cianetos..... 16
3.3.1 Intoxicação pelo cianeto..... 17
3.4 Tratamento biológico de resíduos..... 20
3.4.1 Tratamento anaeróbio da manipueira..... 21
3.4.1.1 Associações sintróficas entre bactérias anaeróbias..... 22
3.5 A digestão anaeróbia em duas fases..... 25
3.6 Os microrganismos e o cianeto..... 26
4 MATERIAIS E MÉTODOS..... 32
4.1 Linamarina extraída..... 32
4.2 Acetonacianidrina..... 32
4.3 Cianeto de potássio..... 33
4.4 Ácido pícrico..... 33
4.5 Equipamentos..... 33
4.6 Substrato..... 33
4.6.1 – Coleta do substrato..... 33
4.7 Os biodigestores e inóculos..... 34
4.8 Análises de acompanhamento dos reatores..... 36
4.9 Procedimentos experimentais..... 38
4.9.1 Composição e preparação do Meio Mineral (MM) e soluções-estoque.. 39
4.9.2 – Avaliação quantitativa da volatilização do ácido cianídrico nos reatores..... 42
4.9.3 - Atividade da enzima linamarase..... 43

4.9.4 - Avaliação *in vitro* do metabolismo da linamarina e acetonacianidrina 45

4.9.4.1 - Incubação das culturas microbianas 46

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO..... 49

5.1 Funcionamento dos reatores..... 49

5.2 Estabilidade da enzima linamarase no substrato (manipueira) e efluente dos reatores..... 51

5.3 Avaliação quantitativa da volatilização dos cianetos nos reatores..... 53

5.4 Quantificação do metabolismo dos microrganismos sobre a linamarina..... 56

5.5 Quantificação do metabolismo dos microrganismos com a acetonacianidrina..... 66

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS..... 74

7 CONCLUSÕES..... 76

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... 79

1 INTRODUÇÃO

A facilidade de cultivo, baixos custos de produção, a tolerância a solos pobres, à seca e ataque de insetos tornam a mandioca alimento básico para milhões de pessoas, principalmente em países em desenvolvimento da América Latina e África, constituindo a maior fonte das calorias consumidas.

Em diversos países com a Índia, China e Tailândia, o cultivo da mandioca destina-se à obtenção de matéria prima para as indústrias de amido, álcool, glicose, acetona, cola, papéis e estabilizantes em alimentos industrializados.

A mandioca possui glicosídeos cianogênicos entre os quais a linamarina em maior concentração; esses glicosídeos estão presentes em todas as partes da planta em concentrações variadas. Quando a planta ou raiz sofre traumatismo, os glicosídeos liberam ácido cianídrico ou cianeto (HCN), principal responsável pela toxicidade da mandioca. Essa toxidez potencial tem sido fonte de preocupação de cientistas do mundo todo, principalmente da Europa e Estados Unidos da América, em razão da incidência de doenças em países africanos que tem sido relacionado com ingestão de mandioca.

Além da alimentação, outro problema é o resíduo gerado pelas indústrias de transformação da mandioca, onde o mais importante é o líquido denominado manipueira.

Os processos biológicos são uma alternativa para tratar os resíduos gerados pelas indústrias, de forma mais econômica e evita a poluição do meio ambiente. A digestão anaeróbia, apesar de ser utilizada a mais de uma centena de anos, apresenta ainda pontos a serem elucidados, principalmente quando se pretende o tratamento de resíduos específicos. A manipueira é um desses resíduos, gerados na forma líquida durante o processamento da mandioca na produção de farinha e fécula. Muitos esforços foram e estão sendo direcionados no sentido de tratar esse resíduo e resultados apontam o tratamento anaeróbio como o mais viável.

A preocupação com o resíduo manipueira com relação ao HCN é bastante significativa, já que a produção da farinha de mandioca gera entre 267 e 419 litros desse resíduo para cada tonelada de raiz processada. Uma indústria farinheira de médio porte, que

chega a processar cerca de 260 t. /mês de raiz, pode gerar em torno de 104 mil litros de manipueira/mês. Esse resíduo é, na maioria das vezes, lançado em córregos e rios causando prejuízo ao meio ambiente (CEREDA, 1994).

Quanto à redução do cianeto do efluente, a literatura mostra claramente a redução no teor de cianeto total. A redução ocorre principalmente na fase metanogênica do tratamento, embora não haja muitas explicações quanto à forma dessa remoção e, conseqüentemente, o destino da linamarina. Sabe-se, que a degradação dos compostos cianogênicos, pode ocorrer, através da atividade microbiana e também por enzimas autóctones da raiz da mandioca.

2 OBJETIVO

O presente trabalho teve por objetivo principal, através do monitoramento dos biodigestores de bancada destinados ao estudo do tratamento da manipueira, estabelecer possíveis vias metabólicas envolvidas na degradação do cianeto da manipueira, em condições de anaerobiose e a forma em que esse cianeto é liberada.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A crescente escassez de águas naturais de boa qualidade constitui um dos grandes problemas mundiais da atualidade. Tal quadro pode, em grande parte, ser atribuído à demanda crescente de água pelas populações, conjugada à deterioração dos mananciais superficiais e subterrâneos ocasionada pelo lançamento inadequado de esgotos sanitários, industriais e resíduos sólidos no solo e em corpos hídricos (REALI et al. 2001).

Nesse contexto, torna-se imprescindível que a educação ambiental esteja aliada ao desenvolvimento e implantação de tecnologias apropriadas de tratamento de águas de abastecimento e residuárias; além da coleta, tratamento e disposição final e adequada dos resíduos sólidos.

A qualidade da água a ser distribuída deve sempre satisfazer aos padrões de potabilidade, estabelecidos pelos órgãos competentes com base em critérios que visem a garantia da saúde do consumidor. As doenças transmitidas pela água podem ser agrupadas em doenças de transmissão hídrica e doenças de origem hídrica. As primeiras são aquelas em que a água atua como veículo propriamente dito do agente infeccioso como, por exemplo, no caso da febre tifóide, da disenteria bacilar e outras. As segundas são aquelas decorrentes de certas substâncias químicas contidas na água numa quantidade inadequada (BATALHA, 1994).

No Brasil, encontra-se em vigência o Padrão de Potabilidade fixado pelo Ministério da Saúde, através da portaria n° 1469 de 29 de Dezembro de 2000. Tal padrão adota critérios físicos, químicos, organolépticos, bacteriológicos e radiológicos, definindo os valores máximos permitidos (VMP) para água de consumo humano. Dentre as substâncias químicas inorgânicas que representam risco para a saúde, cita-se o cianeto, que tem o valor máximo de 0,07 mg/L, permitido para essa substância na água para consumo.

A portaria n° 1469 de 2000, citada, não esclarece qual o tipo de cianeto para o qual esse limite máximo é fixado, se para o resíduo de indústrias de galvanoplastia ou de indústrias alimentícias, ou para todas, e nem se este teor é de cianeto livre ou total. Por outro lado, a literatura também não esclarece em que forma o cianeto é liberado.

Dentro da problemática poluição, os subprodutos do processamento da mandioca,

têm sido relatados como responsáveis por graves problemas de contaminação do ambiente. As indústrias processadoras de mandioca geram um resíduo poluente, conhecido tecnicamente como manipueira, que contém cianeto em forma potencialmente livre. A manipueira equivale à água de constituição da raiz, liberada na prensagem da massa de mandioca ralada. Para a manipueira de farinheiras, o potencial poluente é devido ao alto teor de matéria orgânica, que pode chegar a 100g DQO/L. É também potencialmente tóxico devido à presença do glicosídeo cianogênico linamarina, degradável a cianeto, podendo atingir níveis de 140 mg/L de cianeto total (DEL BIANCHI, 1998). Na água, o cianeto é encontrado na sua forma molecular como ácido cianídrico (HCN) ou na sua forma livre, como íon cianeto (CN^-). O ácido cianídrico apresenta-se como o mais tóxico, pois é bastante instável e altamente volátil (LINARDI, 2000). A toxicidade causada pelo íon cianeto é bastante estudada, enquanto que o estudo da toxicidade causada pelos glicosídeos é restrita (CEREDA e MATTOS, 1996).

3.1 – A indústria de transformação da mandioca

No Brasil, a mandioca pode ser utilizada diretamente para o consumo ou para a indústria onde é processada em farinha e fécula de mandioca (DAMASCENO, 1999).

Vilpoux (1998), relatou que as indústrias de transformação da mandioca no Brasil podem ser divididas em quatro grupos: (1) empresas artesanais, que possuem equipamentos simples e são constituídas, em sua maioria, pelas casas-de-farinha e algumas pequenas fecularias localizadas principalmente na região norte e nordeste; (2) pequenas empresas, que trabalham principalmente no setor informal e transformam menos de mil toneladas de mandioca por ano, e que representam a maioria das farinheiras e das empresas de polvilho azedo da região sul do país; (3) médias empresas, que podem trabalhar tanto no setor informal como no formal, transformam menos de 15.000 toneladas de mandioca por ano, e que são constituídas sobretudo por indústrias de farinha, polvilho azedo e algumas fecularias; e (4) grandes empresas, que trabalham no setor formal e transformam mais de 15.000 toneladas de mandioca por ano, entrando nessa categoria a totalidade das fecularias dos estados do Paraná, São Paulo e Mato Grosso do Sul.

Na industrialização da mandioca são gerados diversos resíduos, tais como casca, farelo e manipueira, que é o resíduo líquido. Os efluentes líquidos de uma fábrica de farinha

de mandioca podem ser divididos em duas categorias básicas: as águas de lavagem das raízes e a água proveniente da prensagem da massa de mandioca ralada, denominada água da prensa ou manipueira. As águas de lavagem, com DQO de 2600 mg/L (PAWLOWSKI, 1991), embora em maior quantidade (1 a 3 m^3/t. de mandioca processada) possuem menor poder poluente. A manipueira é bem mais agressiva ao ambiente, tanto pelo alto teor de cianeto total quanto pela carga orgânica (Quadro 1).

Quadro 1 – Quantidade de cianeto total e carga orgânica na manipueira

	Fernandes Jr. (1989)	**Cereda (1994)**	**Cetesb (1994)**	**Barana (2000)**
Cianeto total (mg/kg)	284	444	------	83,86
DQO (g/L)	84	63	71 – 101	74

A carga orgânica da manipueira de indústria de farinha de mandioca, expressa na forma de DQO (demanda química de oxigênio), é em média de 60.000 mg/L. Comparando-se tal valor com a carga orgânica de esgoto sanitário típico, com DQO de, aproximadamente, 400 mg/L (CAMPOS, 1994), observa-se que o potencial poluidor da manipueira é consideravelmente maior, sendo agravado em função da grande quantidade gerada. No Quadro 1 observa-se diferentes valores de carga orgânica para cada autor, esses valores se devem a diferenças: nos lotes de manipueira coletados, variedades da mandioca e épocas de colheita.

A partir do levantamento realizado pela Cetesb (1994), das 68 indústrias cadastradas nesta entidade, verificava-se que, para o tratamento das águas de lavagem, os processos mais utilizados nesta época, foram: peneira e gradeamento (20), decantação (27), disposição em lagoas de estabilização (9), digestão anaeróbia em reator de fluxo ascendente e manta de lodo (1). O encaminhamento final foi: lançamento em corpos d' água (26), disposição na terra (lavoura ou áreas de sacrifício) (23). Para as águas de prensa, os processos mais utilizados foram: decantação (22), disposição em lagoas de acumulação (37), digestão

anaeróbia em reator de fluxo ascendente (1). O encaminhamento final foi: lançamento em corpos d'água (8), disposição na terra (lavoura ou áreas de sacrifício) (40).

Na maioria das indústrias, a manipueira gerada tem como destino final os rios e córregos, ocasionando sérios prejuízos, principalmente para os criadores de gado, com casos freqüentes de intoxicação (CEREDA, 1994). Quando esses resíduos são acondicionados em lagoas de estabilização, esses permanecem depositados sob ação de agentes naturais, tais como fotodecomposição, precipitação e atividade microbiana local, sem haver qualquer tratamento adicional no sentido da otimização do processo para o aproveitamento destes efluentes como sub-produtos. Estes resíduos tendem a percolação alcançando lençóis freáticos, contaminando aqüíferos e ainda produzindo odor desagradável e problemas com insetos e vetores.

A Figura 1 mostra uma lagoa de estabilização onde são armazenados resíduos de farinheira no Estado de São Paulo.

Figura 1 – Lagoa de estabilização com armazenamento de manipueira

3.1.1 – Manipueira – caracterização e composição

Manipueira, vocábulo indígena incorporado à língua portuguesa, é o líquido de aspecto leitoso e cor amarelo-clara que escorre das raízes carnosas da mandioca (*Manihot esculenta* Crantz), por ocasião da prensagem da massa ralada das mesmas. É subproduto ou resíduo da industrializaçao da mandioca, que, fisicamente, se apresenta na forma de suspensão aquosa e, quimicamente, como uma miscelânea de compostos, tais como: goma (5 a 7%), glicose e outros açúcares, proteínas, células descamadas, linamarina e derivados cianogênicos (ácido cianídrico, cianetos e aldeídos), substâncias diversas e diferentes sais minerais (MAGALHÃES, 1998).

A mandioca é cultura amplamente difundida por todo o território nacional. Sua utilização é feita em duas opções, o consumo culinário doméstico ou industrial (de "mesa") e o uso industrial, pelo qual processa-se farinha de mandioca e procedem a extração da fécula e sua transformação em polvilho azedo. A dimensão da cultura também é variada, indo das plantações de fundo de quintal até as extensivas, mais comuns no sudeste do país. As utilizações culinárias caseiras não geram resíduos significativos, pela pequena quantidade processada. Quando o processamento é maior, os subprodutos podem vir a apresentar problemas de disposição e soluções deverão ser encontradas. Já a utilização industrial causa sérios problemas ambientais, pois mesmo as pequenas unidades fabris, como as casas de farinha, podem gerar quantidades significativas de resíduo, pelo costume de reunirem-se em um dado local ou município (FIORETTO et al. 2001).

Como subproduto, a manipueira é produzida nas farinheiras na proporção de 3:1, ou seja, 1 litro de manipueira para cada 3Kg de massa ralada de raízes de mandioca prensadas. É abundante em todas as regiões de cultivo e industrialização da mandioca e esporadicamente aproveitada em molhos de pimenta e de tucupi no estado do Pará.

Sendo equivalente à água de constituição da raiz, a manipueira contém a maioria das substâncias solúveis, e algumas insolúveis em suspensão. Além do potencial poluente devido a grande quantidade de material de origem orgânica, existe o problema da existência de glicosídeos potencialmente hidrolisáveis a cianeto (CARVALHO e CARVALHO, 1979).

Praticamente a totalidade do glicosídeo cianogênico existente na massa de raiz desintegrada é carreada por esse resíduo.

A Figura 2, mostra a geração da manipueira na prensa de massa ralada de farinheira. As mandiocas já descascadas e raladas formam a massa que posteriormente será prensada para eliminação da água da constituição da raiz (manipueira).

Figura 2 – Distribuição da massa de mandioca sobre os quadros de prensa e posterior prensagem desta massa ralada

Como resíduo, a manipueira tem sido despejada, principalmente, nos pequenos cursos d' água, pelas indústrias que utilizam raízes de mandioca como matéria-prima (FIORETTO, 2001). Isto ocorre principalmente com as indústrias menores e mais antigas, constituídas junto aos rios e riachos. Por isso, a Companhia de Tecnologia e Saneamento Ambiental de São Paulo (CETESB) considera as indústrias de processamento de mandioca como altamente poluidoras.

Fecularias geram em torno de 600 litros de manipueira diluída com menos de 5% de matéria orgânica, 60ppm de CN (cianeto) e 5000 mg O_2/L de DBO (Demanda Bioquímica de Oxigênio) por tonelada de raízes de mandioca processadas (CEREDA e MATTOS, 1996).

No Quadro 2 consta a composição média de amostras de manipueira de fábricas de farinha (CEREDA, 2001), constatando-se que, as amostras apresentam elevado teor de cianeto total em relação a manipueira de fecularia.

Quadro 2 – Valores médios de caracterização de resíduo líquido da industrialização da mandioca

	Manipueira de farinheira	**Manipueira de fecularia**
Umidade (%)	92,77	91,53
Proteína (6,25)	1,22	0,97
Amido (%)	9,42	6,12
matéria graxa	0,50	0,11
Cinzas (500°C)	0,54	0,08
Fibras	0,30	0,10
pH	4,10	4,10
Acidez*	3,27	2,70
HCN (total)	463,76	80,00

* mL NaOH/100 mL
Fonte: Cereda (2001)

O cianeto presente nos resíduos líquidos do processamento da mandioca é proveniente de suas raízes. O Quadro 3 apresenta a distribuição de cianeto total das variedades de mandioca, de acordo com o potencial cianogênico. mandiocas "bravas" ou amargas possuem alto teor de ácido cianídrico e mandiocas "mansas", doces ou aipins, toxidez bastante reduzida quanto ao teor de ácido cianídrico (FERREIRA FILHO, 1942 citado por TELLES, 1987).

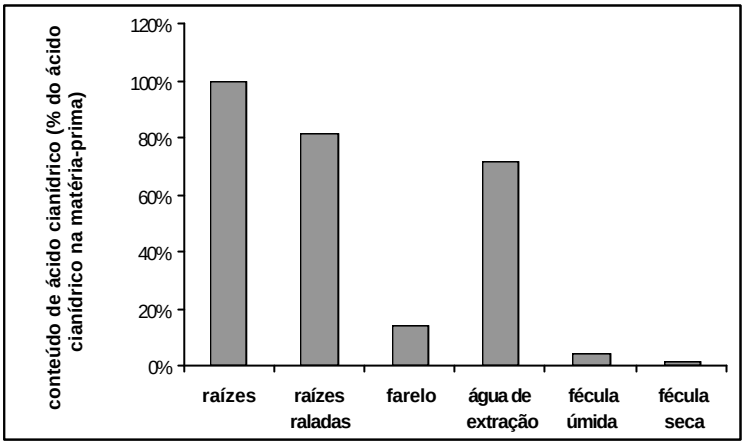
Quadro 3 – Teor de ácido cianídrico em partes da planta da mandioca

Parte da Planta	**Mandioca amarga**	**Mandioca doce**
	% HCN	
Folhas adultas	0,04	0,01
Caule verde	240,00	144,00
Caule lenhoso adulto	1130,00	430,00
Porção interna do lenho	27,00	72,00
Medula	760,00	190,00
Raiz fresca (casca)	55,00	147,00
Raiz fresca (parte interna)	530,00	48,00

Fonte: Ferreira Filho (1942) citado por Telles (1987).

Del Bianchi (1998) em estudo realizado na indústria de farinha de mandioca Plaza (SP), observou que entre os resíduos gerados, o cianeto total se encontrava em maior

concentração na manipueira, isto porque, sendo solúvel, se concentra na água. Esse fato é reforçado pelas informações de Arguedas e Cooke (1982) (Figura 3) que ilustram a distribuição do ácido cianídrico no processo de extração da fécula de mandioca realizada na Colômbia.

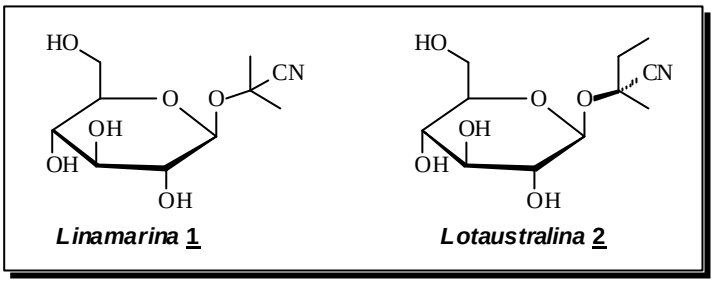


Fonte: Adaptado de Arguedas e Cooke (1982)
Figura 3 - Distribuição do ácido cianídrico no processo de extração da fécula de mandioca

3.2 - Glicosídeos cianogênicos em *Manihot esculenta* Crantz

Desde o início da domesticação dos Ameríndios, a ação tóxica da mandioca já era conhecida, assim como os processos de destoxificação para obtenção de alimento seguro.

A característica que difere a planta da mandioca de outras tuberosas amiláceas é a presença destes glicosídeos potencialmente hidrolisáveis a cianeto. Muitas plantas acumulam glicosídeos cianogênicos os quais após a hidrólise liberam HCN com função competitiva e defensiva para a planta (PETRUCCIOLI et al. 1999). Esse papel não foi plenamente confirmado cientificamente (CEREDA et al. 2003). A Figura 4 representa a linamarina, glicosídeo mais representativo (93%), e a lotaustralina (7%) (CARVALHO e CARVALHO, 1979). A linamarina pode se acumular em concentrações tão altas quanto 500 mg/kg de peso fresco nas raízes e em maior teor nas folhas jovens (McMAHON et al, 1995).

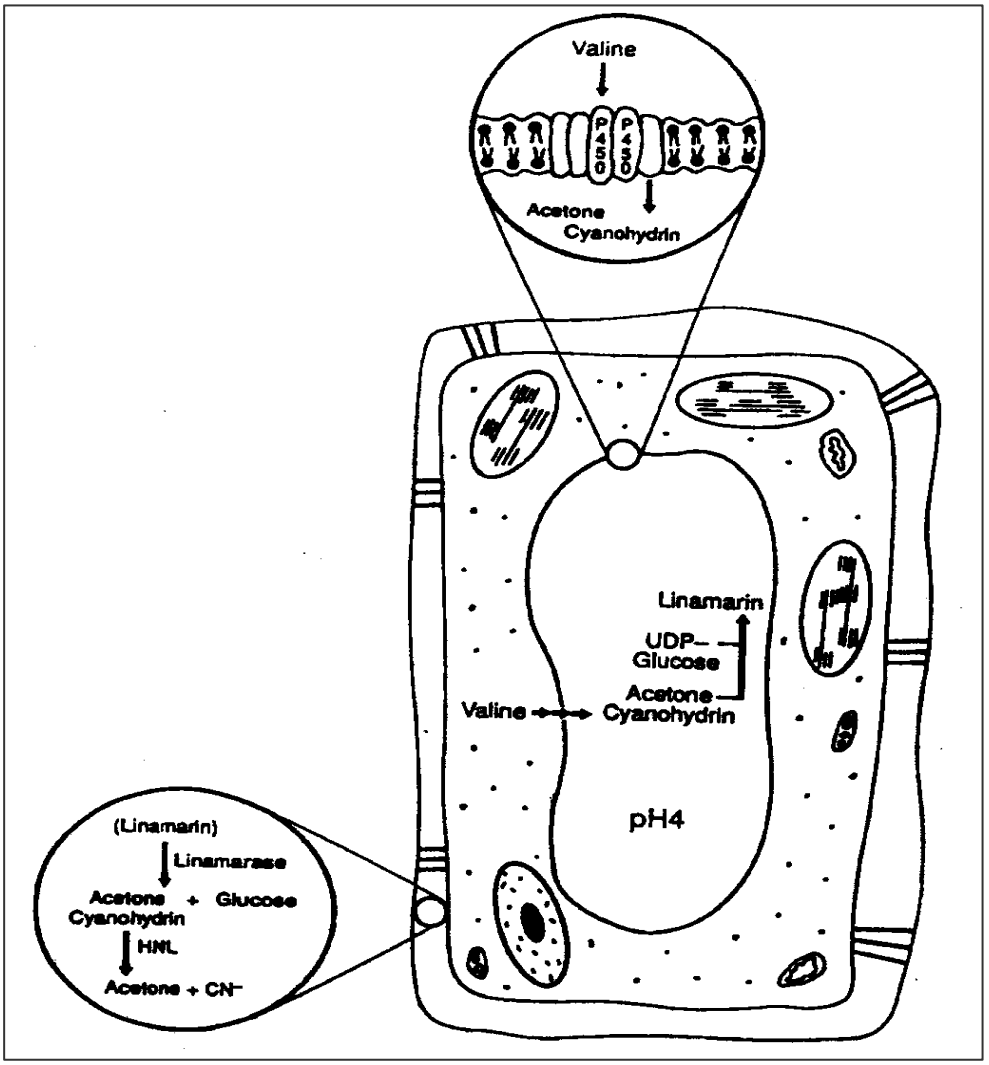


Fonte: Wood, 1966
Figura 4: Fórmulas estruturais da linamarina e lotaustralina

A linamarina foi isolada em 1906 a qual foi atribuída a responsabilidade pela toxicidade da mandioca. Somente em 1965 foi evidenciado que a maioria das plantas que continha linamarina apresentava também homólogo deste glicosídeo, a metil linamarina ou lotaustralina. Em 1968, constatou-se que a linamarina e lotaustralina constituíam o material cianogênico da mandioca (CARVALHO e CARVALHO, 1979).

Oke (1968), esclarece que a linamarina e a lotaustralina são β-glicosídeos de acetonacianidrina e etil-metil-cetona-cianidrina, respectivamente. Segundo o mesmo autor, os glicosídeos na forma ligada não são tóxicos.

Nas folhas e na entrecasca da raiz da planta da mandioca é que se encontram as maiores quantidades de glicosídeos cianogênicos (COCK, 1985), havendo diferenças nas concentrações dependendo dos diferentes cultivares (COCK, 1985; WHEATLEY et al. 1993). A Figura 5 representa o processo de cianogênese (síntese da linamarina) na célula da folha da mandioca. Sob condições normais de desenvolvimento, os tecidos da planta cianogênica não contêm HCN livre detectável, sugerindo compartimentação de cianoglicosídeos e enzimas hidrolíticas (HUGHES, 1991).



Fonte: McMahon et al. 1995.
Figura 5 – Síntese da linamarina, produção de cianeto e localização da linamarina e linamarase na célula do mesófilo foliar da mandioca

A linamarina é sintetizada a partir do aminoácido valina e acumulada no vacúolo (Figura 5). Testes de "marcação com ouro" mostraram que a linamarase está localizada na parede das células do tecido foliar. Na planta, a linamarina depois de sintetizada no vacúolo, deve atravessar a parede da célula e se desloca até as raízes. É provável que a linamarina deva atavessar a parede da célula numa forma não hidrolisável, possivelmente como diglicosídeo (MKPONG et al. 1990). Ocorrendo ruptura da parede celular, como quando os tecidos da planta são dilacerados, linamarina e enzima entram em contato e a linamarina é convertida a

cianeto pelas enzimas linamarase e hidroxinitriloliase (HNL) presente na parede da célula vegetal.

Aproximadamente, cerca de 70% da linamarina presentes na raiz da mandioca, é removida por hidrólise enzimática durante o processamento (HOSEL e BARZ, 1975). Em complementação, quase todo o cianeto que é gerado é removido por volatilização ou solubilização (IKEDIOBI et al. 1980). Ainda assim, a linamarina remanescente, não hidrolizada, que sobra do processamento das raízes, pode causar problemas de saúde quando esse residual for hidrolizado no corpo humano ou animal, liberando cianeto (TEWE, 1984; BALAGOPALAN et al. 1988).

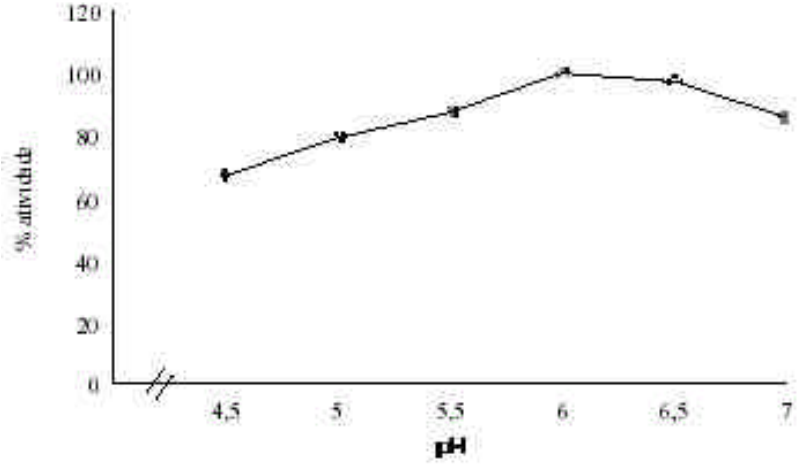
3.2.1 - Linamarase

Linamarase (EC. 3.2.1.21) é uma enzima encontrada na planta de mandioca juntamente com seus respectivos substratos linamarina e lotaustralina (NOK e IKEDIOBI, 1990). Uma vez que a planta é triturada ou macerada, linamarina e lotaustralina, que são glicosídeos cianogênicos, imediatamente liberam HCN como resultado da atividade da enzima linamarase. Kojuma et al. (1982), em estudos de laboratório, observaram que no ferimento dos tecidos do parênquima da mandioca ocorre aumento gradual na quantidade de cianeto total e decréscimo nos níveis de linamarase durante período de 3 dias de incubação.

A linamarase tem sido empregada na determinação laboratorial de cianoglicosídeos em mandioca, por ser potencialmente aceleradora do processo de destoxificação do cianeto (IKEDIOBI e ONYIKE, 1982).

A atividade da linamarase varia nos diferentes tecidos da planta. Folhas e cascas possuem grande atividade da enzima, mas no parênquima da raiz essa atividade é de 30 a 100 vezes menor (NAMBISAN e SUDARESAN, 1991 citados por NAMBISAN, 1994). A enzima apresenta atividade máxima em pH entre 5,5–6,0 e temperaturas superiores a 50°C, mas é inativa em temperaturas superiores a 70°C. Sua natureza e atividade em tecidos vegetais são significativas, pois influenciam o grau de hidrólise dos glicosídeos cianogênicos durante o processamento e influi nos níveis finais de glicosídeos em produtos de mandioca (NAMBISAN, 1994).

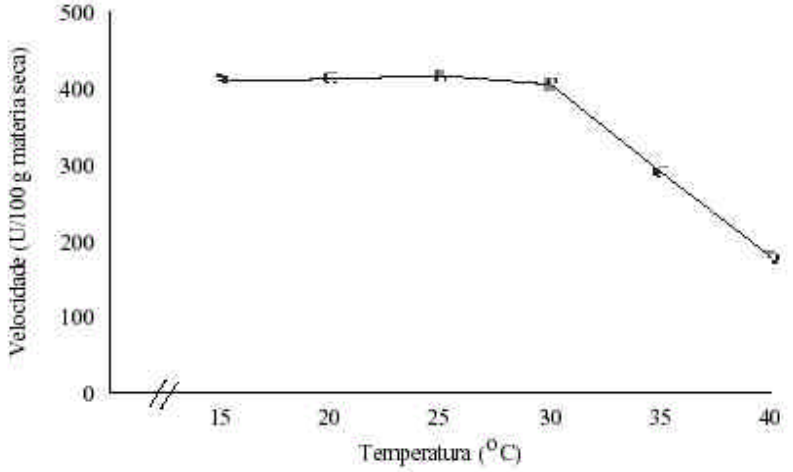
Correa et al. (2002), estudaram o efeito da temperatura de secagem de folhas de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz cv. Baiana) sobre a liberação do ácido cianídrico. Dois ensaios *in vitro* foram realizados para a determinação do pH ótimo e para medida da estabilidade térmica da linamarase, visando à escolha das temperaturas de secagem. O pH ótimo selecionado foi 6,0 (Figura 6).



Fonte – Correa et al. 2002

Figura 6 – Atividade da linamarase em função do pH por duas horas sob diferentes temperaturas

Os autores observaram que a linamarase manteve-se estável por até duas horas sob temperaturas entre 15 e 30°C (Figura 7). Sob temperaturas maiores que 30°C a enzima começou a perder a atividade



Fonte – Correa et al. 2002

Figura 7 – Estabilidade térmica na atividade da linamarase por duas horas sob diferentes temperaturas

O teor da enzima linamarase é mais importante que o teor de linamarina, pois dele depende o grau de destoxificação. Oliveira et al. (1998) estudaram o comportamento da enzima linamarase, assim como os teores de cianeto em folhas de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz), durante o desenvolvimento anual da planta, com objetivo de estabelecer a época do ano mais propícia à utilização das folhas com menor teor de cianeto. Os autores concluíram que existe correlação entre a atividade da linamarase e teor de cianeto em certas épocas do ano. Nos meses onde a atividade da enzima é mais alta, os teores de cianeto também são proporcionalmente mais altos. Diferentemente dos resultados obtidos por Oliveira et al. (1998) Mkpong et al. (1990) em estudo de caracterização, purificação e localização da linamarase na mandioca, não observaram diferenças substanciais no conteúdo de linamarina ou na atividade da linamarase em folhas de variedades de mandioca com raízes que apresentavam alto e baixo teor cianogênico. Esses resultados indicam que os níveis de linamarina e linamarase nas folhas de diferentes variedades, com alto ou baixo conteúdo cianogênico, não estão correlacionados com os níveis de linamarina nas raízes de diferentes variedades.

Segundo Nambisan (1994), o conteúdo de linamarina varia nas diferentes partes da planta. Diferentes espécies também apresentam variação no conteúdo de linamarina na raiz (25-450 mg de equivalentes de cianeto/kg de peso fresco). Essa diferença poderia ser explicada por diferentes graus de biossíntese, degradação ou transporte. Embora a translocação da linamarina se dê das folhas para a raiz, não há acúmulo progressivo na parte comestível. Isto indica que a linamarina não é estocada passivamente no tecido, mas metabolizada e utilizada (NAMBISAN, 1992).

3.3 – Os cianetos

Além dos compostos cianogênicos, o próprio cianeto pode ser uma ameaça para ambiente. Os cianetos podem estar presentes no ambiente em uma variedade de formas, incluindo HCN, sais (NaCN ou KCN) ou formas complexas, que podem ser decompostas, tais como ferrocianeto de potássio. Cianetos não são intensamente adsorvidos ou retidos nos solos, mas se acumulam na fase aquosa e freqüentemente formam complexos com outros contaminantes metálicos de efluentes industriais, tais como, Fe, Cu, Ni e Zn (TOWILL et al.

1978). Embora KCN e NaCN sejam prontamente dissociados nas formas de CN^- e HCN em pH neutro, os complexos de metalocianetos têm ampla faixa de estabilidade biológica e química (DUBEY E HOLMES, 1995).

A toxicidade do cianeto vem sendo estudada há bastante tempo. Em 1958, Winton e Winton, relataram método de análise que usa ácido pícrico em reação colorimétrica que detecta a presença de quantidades de cianeto tão pequenas como 0,003253 mg. Entretanto, esse método apresenta diversos interferentes como glicose e acetona que estão presentes na reação de degradação da linamarina. Com o passar dos anos continuou a preocupação com o cianeto presente em diferentes materiais e acrescentou-se a preocupação com sua volatilização para o ambiente. Estudos sobre a perda de HCN na forma gasosa têm mostrado que o pH tem efeito significativo na taxa de extração do HCN, sendo que quanto menor o pH do meio, maiores são as perdas de HCN como gás (DODGE e ZABBAN, 1952; MUIR et. al. 1988).

A toxicidade de vários tipos de cianeto depende de suas formas químicas, estabilidade e biodisponibilidade para a exposição aos microrganismos e animais. Nos animais superiores, essa toxicidade explica-se pela afinidade com o ferro, combinando-se com a hemoglobina. Reage também com o Fe(III) presente na citocromo oxidase mitocondrial, impedindo as reações redox. Este fator pode impedir os tecidos, especialmente aqueles do sistema nervoso central, de usarem oxigênio podendo rapidamente resultar em morte (DiPALMA, 1971). Nas plantas superiores e nos microrganismos (CEREDA, BRASIL e FIORETTO, 1981), o cianeto interfere na fosforilação oxidativa, combinando-se com a citocromo oxidase e inibindo o transporte de elétrons e, conseqüentemente, a formação de ATP.

3.3.1 - Intoxicação pelo cianeto

Com relação à ação tóxica do cianeto, são muitas as citações da literatura de sua toxicidade e efeitos sobre os organismos vivos, mas muito pouco é relatado à respeito do efeito de ingestão e da Dose Letal (DL_{50}) desses compostos para esses organismos, principalmente o homem. A Dose Letal da linamarina estabelecida por ingestão resultou em que a DL_{50} de linamarina para a intoxicação oral é maior que 200 mg/Kg de peso vivo (LOPES, 2001).

A intoxicação com o ácido cianídrico tem sido relatada há anos, relacionada com a ingestão de produtos de mandioca processados inadequadamente ou por inalação do gás (HCN). Em 1950, Henderson e Haggard, citados por Oke (1968), citaram as várias concentrações tóxicas de HCN inalado, como consta no Quadro 4.

Quadro 4 – Toxicidade do HCN inalado em diferentes concentrações

HCN (ppm)	Efeito tóxico
20	Seguro por período de máxima exposição
20-40	Pequeno depois de muitas horas
100-250 300	Perigoso depois de 1 ½ hora Letal em poucos minutos
3000	Rapidamente letal

Fonte: Henderson e Haggard (1950), citado por Oke (1968).

Nos animais superiores, o cálculo da quantidade suficiente para causar a morte , ou dose letal, é obtida experimentalmente e expressa em mg/kg de peso vivo. Oke (1968) cita que o limite adotado era de 1mg/kg de peso vivo. Esse limite deu origem a classificação das raízes de mandioca em bravas e mansas, de acordo com a quantidade de raiz, que por seu teor de cianeto, atingisse ou ultrapassasse esse limite. O limite fixado pela Organização Mundial da Saúde (OMS) para os produtos elaborados com mandioca é da ordem de 5mg/kg de peso vivo, baseados em compêndios médicos e testes realizados com HCN por via de inalação. Com relação a mandioca, a literatura cita valores de 15 a 400 ppm (mg CN/kg de peso fresco) de ácido cianídrico nas raízes, embora valores mais freqüentes encontram-se na faixa de 30 a 150 ppm (CARVALHO, 1979).

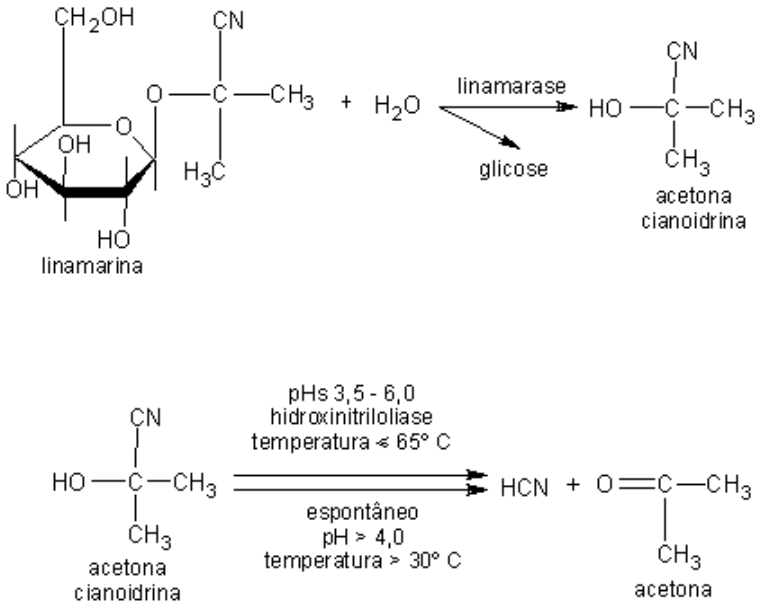
Atualmente, o IAC (Instituto Agronômico de Campinas), preocupado com a ingestão de raízes de variedades de mandioca cultivadas no Estado de São Paulo e baseando-se nos limites estabelecidos pela Organização Mundial de Saúde, estabeleceu para a mandioca de mesa, o limite máximo de 100 ppm de HCN na polpa crua das raízes. Outras instituições adotam o limite de 50 ppm. Assim, a classificação, segundo o IAC (LORENZI e DIAS, 1993) é a seguinte: mansas, com menos de 100 ppm de HCN na polpa crua das raízes; intermediária, de 100 a 200 ppm de HCN; brava, com mais e 200 ppm de HCN.

Os problemas de saúde associados a dieta altamente rica em compostos cianogênicos incluem: (a) hipertiroidismo, resultante do metabolismo do tiocianato no

metabolismo do iodo; (b) neuropatia atáxica topical, uma disordem neurológica; (c) konzo, uma paralisia rápida e permanente (OSUNTOKUN, 1981; TYLLESTAR et al. 1992; ROSLING et al. 1993). Essas doenças não foram claramente modelizadas e há controvérsias em relação à real influência da linamarina (CEREDA et al. 2003).

A ingestão de alimentos derivados da mandioca, insuficientemente processados, pelos animais superiores, faz com que os compostos cianogênicos (linamarina e lotaustralina e suas respectivas α-hidroxinitriloliases) sejam convertidos em cianeto pelas β-glicosidases, em temperaturas e valores elevados de pH. Segundo Brimer (1996), a linamarina que não for metabolizada no intestino humano ou animal, poderá ser absorvida e excretada na urina sem levar à exposição ao cianeto.

A geração do cianeto da linamarina é um processo de dois passos, envolvendo a deglicosilação da linamarina e a clivagem da acetonacianidrina em cianeto a acetona (Figura 8) (McMAHON et al. 1995).



Fonte: McMahon et al. 1995
Figura 8 – Cianogênese da linamarina

Esses dois passos são catalisados por duas enzimas, a β-glicosidase (linamarase) e a α-hidroxinitriloliase (HNL) e são descritos a seguir:

- Ação da linamarase: num primeiro passo da cianogênese da linamarina, a ação da linamarase promove a hidrólise da linamarina em acetonacianidrina e glicose (Figura 8). A acetonacianidrina pode então se decompor espontaneamente ou enzimaticamente a cianeto e acetona.

- Ação da hidroxinitriloliase: o passo final da cianogênese da linamarina é a quebra da acetonacianidrina em cianeto e acetona (Figura 8). Esta reação pode ocorrer espontaneamente em temperaturas maiores que 35°C ou em valores de pH maiores que 4,0. Acetonacianidrina pode também ser convertida a cianeto e acetona pela hidroxinitriloliase (HNL) (CARVALHO, 1981; WHITE e SAYRE, 1992; WHITE et al. 1994).

3.4 – Tratamento biológico de resíduos

Para que um resíduo possa ser decomposto por atividade biológica é necessário que sirva de substrato para organismos que possuam enzimas necessárias à sua decomposição (FERNANDES JR. e TAKAHASHI, 1994). Métodos biológicos para tratamento de efluentes datam do século passado e são aplicados, vias de regra, depois de tratamentos primários. Os processos biológicos fundamentam-se no contato feito entre os microrganismos e o efluente. Como resultado deste contato, o microrganismo consome a matéria orgânica presente no efluente para produção de energia e síntese de novas células. Além da remoção do carbono orgânico, que é o objetivo do tratamento biológico, alguns outros elementos no efluente, podem ser envolvidos na atividade microbiana (SAMPAIO, 1996).

As águas residuárias originárias do processamento de mandioca, não podem ser consideradas esgotadas, e, em função de sua composição média, podem ser reaproveitadas passando de resíduo a substrato no tratamento biológico, gerando energia e efluente tratado.

Devido ao consumo de energia para tratamentos aeróbios e a necessidade de grandes áreas para o tratamento em lagoas de estabilização, técnicos da CETESB (1994) recomendaram o uso de processos anaeróbios ou aplicação no solo para as águas residuárias da fabricação de farinha de mandioca.

3.4.1. – Tratamento anaeróbio da manipueira

O processamento de raízes de mandioca, quer nas farinheiras ou nas fecularias, gera quantidades significativas de resíduo líquido carreadores de carga cianogênica (SOBRINHO, 1975). Para que sejam evitados impactos ambientais, é recomendado que efluentes líquidos carreadores dessa carga cianogênica, sejam destoxificados, anteriormente, ao seu descarte (MACHADO et al. 1999).

A biodegradação de compostos cianogênicos tem sido, juntamente com os tratamentos tradicionais, alternativa à degradação de efluentes (MACHADO et al. 1999). É importante destacar que a degradação natural é diferente da biodegradação, pois o termo degradação natural se aplica à ocorrência da volatilização do composto no ambiente, enquanto que, a biodegradação engloba a atividade microbiana sobre o poluente ou substância a qual se deseja destoxificar.

No caso específico da mandioca, os estudos efetuados para o tratamento das águas residuárias são, predominantemente, de processos biológicos anaeróbios, pois, o processo anaeróbio é especialmente efetivo em razão das bactérias anaeróbias possuírem um metabolismo resistente ao cianeto (CEREDA et al. 1990).

Tratamentos isolados são efetuados utilizando outros processos. É o caso do estudo realizado por Faria (1978), que obteve reduções de DQO de 44% utilizando coagulação e floculação química, com hidróxido de cálcio e sulfato de alumínio. O mesmo autor, utilizando o processo aeróbio de lodos ativados, obteve reduções de DQO da ordem de 90%. Alguns trabalhos realizados utilizaram processos anaeróbios na fase inicial, seguidos de tratamento aeróbio. Gabardo et al. (1981) estudou o tratamento de despejos de fecularia por lagoa anaeróbia e aerada em série, obtendo remoções de DQO da ordem de 97,78%.

Motta (1985), estudou o tratamento da manipueira em reatores de mistura completa, com e sem adição de cascas de mandioca, em diferentes proporções. Takahashi et al.(1985), estudaram a cinética do processo de tratamento anaeróbio, com o uso de modelos matemáticos. Fernandes Jr. (1989), estudou as causas da instabilidade em reatores de mistura completa e indicou a utilização de sistemas com separação de fases, como alternativa para a biodigestão de resíduos da indústria da mandioca. Lacerda (1991), estudou a cinética da fase

metanogênica da digestão anaeróbia da manipueira, com estabilização do pH, selecionando TRH (tempo de residência hidráulico) de três dias como o mais eficiente para essa fase. Fernandes Jr. (1995), estudou a cinética da fase acidogênica da digestão anaeróbia da manipueira, com estabilização do pH, encontrando TRH de um dia como o mais eficiente para esta fase. Barana (1995), estudou a variação da carga orgânica na fase metanogênica em biodigestor com separação de fases e com estabilização do pH, obtendo a maior taxa de redução de DQO (88,75%), com carga de 2,25g de DQO por litro de reator por dia, e como carga orgânica máxima o limite de 8,48g de DQO por litro de reator por dia. Barana (2000), avaliou o processo de biodigestão com separação de fases de forma conjunta, com controle de temperatura. Testou o uso de afluente sem e com correção de pH, obtendo melhores resultados quando manteve a correção do pH do afluente. A maior taxa de redução de DQO foi de 75,24%, com carga orgânica de 9,45g de DQO por litro de reator dia. Estes trabalhos foram realizados em laboratório, definindo os principais coeficientes técnicos necessários para a implantação do sistema em escala piloto.

Embora os estudos de otimização do funcionamento de reatores anaeróbios piloto com separação de fases no tratamento da manipueira já tenham demonstrado que são tecnicamente viáveis, não esclareceram o que ocorre com a linamarina degradada e qual o papel intrínseco que os microrganismos realmente exercem em cada biodigestor com separação de fases, pois sempre visaram a redução da carga orgânica e do cianeto com a produção de biogás (CEREDA, 2003).

3.4.1.1 – Associações sintróficas

Nos processos anaeróbios, a degradação da matéria orgânica ocorre pela atuação de microrganismos procarióticos anaeróbios, facultativos e obrigatórios e as atividades metabólicas consistem basicamente da respiração anaeróbia e da fermentação (VAZOLLER, 1995).

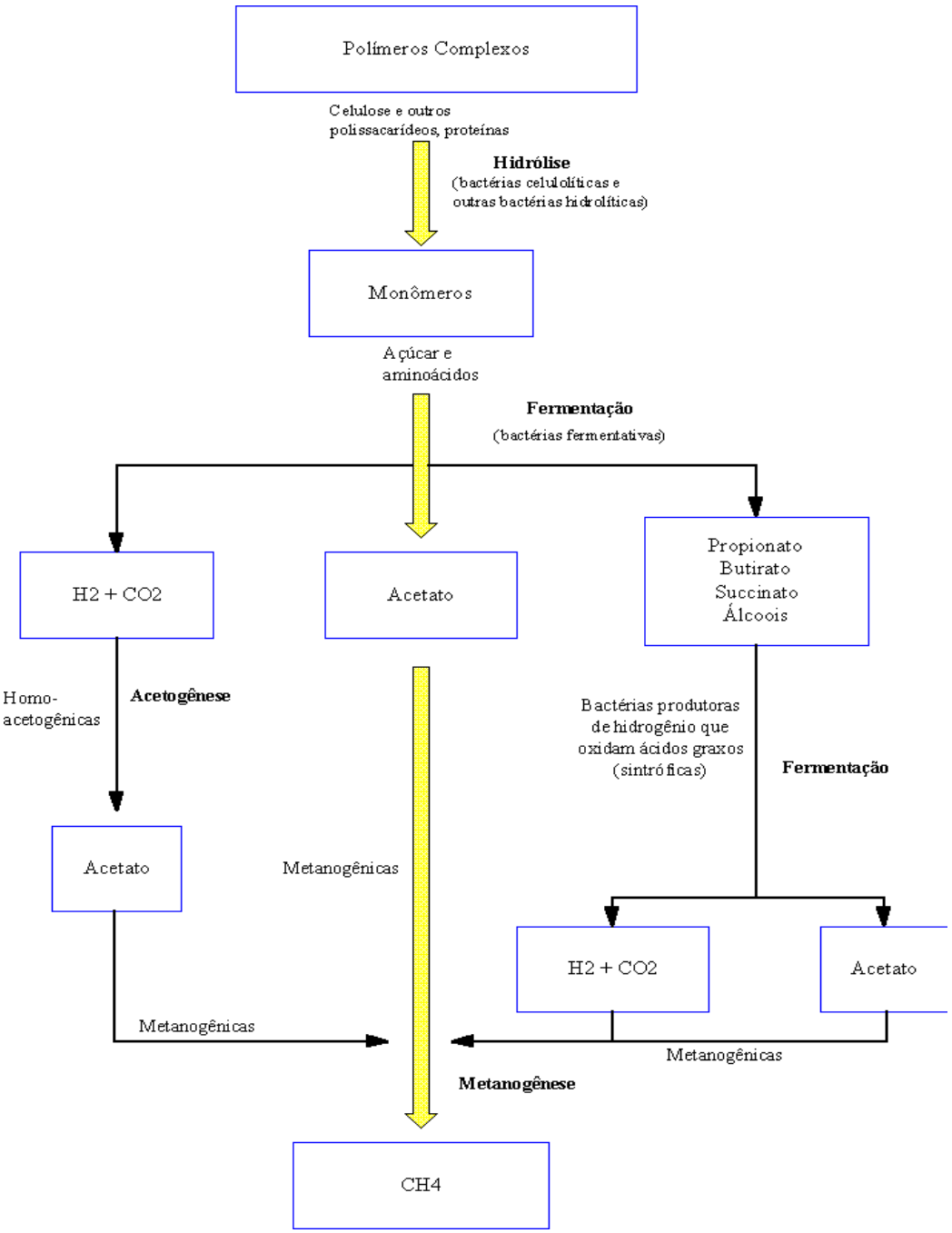
A degradação anaeróbia da matéria orgânica complexa depende da atividade metabólica simbiótica, entre populações microbianas metabolicamente distintas, o que assim assegura a estabilidade do processo. Para os organismos aeróbios, essas relações sintróficas são menos importantes do que para aqueles presentes nas cadeias alimentares anaeróbias.

Entretanto, quando as condições tornam-se anóxicas e os aceptores de elétrons escassos, o catabolismo fermentativo predomina, mas em muitos casos requer interações sintróficas (MADIGAN et al. 1997).

A Figura 9, segundo Madigan et al. (1997), ilustra um ambiente metanogênico, onde a matéria orgânica é degradada por associações de bactérias fermentativas, acetogênicas e metanogênicas.

Bactérias consumidoras de hidrogênio e formiato e algumas consumidoras de acetato através da metanogênese, têm influência sobre o metabolismo de outra bactéria. Produtos formados pelas bactérias fermentativas são alterados a produtos mais oxidados por outros grupos bacterianos, que fazem parte desse consórcio. As bactérias acetogênicas para metabolizar compostos dependem das metanogênicas consumirem hidrogênio e formiato eficientemente. Hidrogênio deve ser continuamente removido do meio para assegurar que a produção de ácido acético não seja interrompida ou diminua drasticamente. Essa condição é essencial para que a fermentação metanogênica prevaleça, pois a metanogênese só ocorre quando há produção de algum substrato específico. O H_2 e ácido acético são os mais importantes, responsáveis por cerca de 30% e 70%, respectivamente do gás metano gerado em biodigestores. Esses tipos de interações metabólicas entre bactérias anaeróbias devem existir em relação ao fato de que a oxidação do NADH e $FADH_2$, os quais vão reduzir o próton ou o bicarbonato, somente ocorrerá quando as concentrações de hidrogênio e formiato forem baixas. As metanogênicas catabolizam H_2, formiato e acetato eficientemente.

Relações sintróficas que dependem de transferência de hidrogênio e formiato interespécies foram descritas para a degradação de, por exemplo, ácidos orgânicos voláteis, aminoácidos e compostos aromáticos.



Fonte: Adaptado de Madigan et al. (1997)

Figura 9: Relações metabólicas no processo de decomposição anaeróbia. Atuação de grupos bacterianos anaeróbios na conversão da matéria orgânica complexa a metano e dióxido de carbono.

3.5 – A digestão anaeróbia em duas fases

Devido à complexidade bioquímica, a digestão anaeróbia é encarada como processo essencialmente bifásico (BRYANT, 1979; HENZE e HARREMOES, 1983). O processo em duas fases se aplica para a digestão anaeróbia da biomassa e resíduos, com a produção de metano.

A digestão anaeróbia em duas fases é um processo biológico onde substratos orgânicos são primeiramente metabolizados pelos organismos não-metanogênicos para a produção de, principalmente, ácidos voláteis e óxidos de carbono que são intermediários degradados pelos organismos metanogênicos para a produção de metano e dióxido de carbono. Pesquisas têm mostrado que os dois grupos de microrganismos da digestão anaeróbia diferem significativamente com respeito à fisiologia, requerimentos nutricionais, crescimento e características metabólicas, condições ambientais ótimas e sensibilidade a estresses ambientais (ANDREWS e PEARSON, 1965). A aplicação satisfatória deste conceito depende da possibilidade de se separar fisicamente e manter as culturas dominantes de organismos não-metanogênicos e metanogênicos em dois digestores separados.

Ghosh (1981), relata que a aplicação eficiente da separação de fases depende da possibilidade de separação física para manutenção de culturas dominantes nos respectivos reatores.

O modelo de reatores com separação de fases foi selecionado justamente com a intenção de tratar resíduos industriais específicos, como de indústrias processadoras de plantas amiláceas. Pesquisas realizadas visando a otimização do processo de biodigestão anaeróbia da manipueira, indicaram a necessidade de separação de fases acidogênica e metanogênica, promovendo processo mais estável (FERNANDES JR., 1989).

Estudo utilizando separação de fases no tratamento de manipueira de farinheira foi realizado por Lacerda (1991) com objetivo de caracterizar a cinética da fase metanogênica em reator de fluxo ascendente e leito fixo, com volume útil de 9,33 L. O substrato foi previamente fermentado naturalmente e estabilizado com NaOH, e então submetido à fermentação metanogênica em regime contínuo de alimentação. Cita a autora que o sistema

manteve-se estável nessas condições e que, para obter eficiência mínima de 80% na redução da carga orgânica foi possível operar a fase metanogênica com TRH limite de três dias.

Barana (2000) e Fernandes Jr. (1995), estudaram as fases da degradação acidogênica e metanogênica da manipueira em biodigestores com separação de fases em escala de bancada, obtendo resultados passíveis de serem aplicados no processo de biodegradação da manipueira com concomitante produção de biogás. Os resultados obtidos pelos autores citados mostraram redução de carga orgânica e no teor de cianeto, com concomitante produção de biogás.

3.6 – Os microrganismos e o cianeto

Na planta, a enzima capaz de hidrolisar a linamarina é a linamarase, mas essa hidrólise pode também ser realizada por enzimas microbianas (COLARD, 1978; IKEDIONE e ONYIKE, 1982) ou ainda por agentes físicos e químicos (OKE, 1968).

Embora o cianeto seja um inibidor metabólico, os métodos biológicos de tratamento desse resíduo são factíveis, pois o cianeto também é produzido naturalmente por ampla variedade de plantas, fungos e alguns grupos bacterianos e apropriadamente metabolizados. Tecnologias de biodegradação são particularmente interessantes para resíduos contendo cianeto com adição de compostos orgânicos que servem como substrato para o crescimento microbiano (RAYBUCK, 1992).

Amplo número de sistemas microbiano está envolvido na destoxificação ou degradação do cianeto. Muitos microrganismos são resistentes, ou podem induzir resistência ao cianeto, degradando-o a compostos não-tóxicos por possuírem sistemas enzimáticos específicos e caminhos para degradarem tal composto.

O íon cianeto é potente inibidor do crescimento e do metabolismo celular, incluindo respiração e o metabolismo do nitrogênio e do fosfato (KNOWLES 1976; SOLOMONSON, 1981; KNOWLES e BUNCH, 1986). O íon cianeto, também aumenta o tempo de geração e inibe a replicação do DNA em *Escherichia coli* (ASHCROFT e HADDOCK, 1975). Esse composto também inibe grande número de enzimas, particularmente a oxidase terminal, na cadeia respiratória.

Alguns microrganismos se desenvolvem em substratos contendo cianeto por

possuírem metabolismo anaeróbio, mecanismo alternativo a cadeia respiratória, ou ainda por metabolizarem o cianeto pela cisão do radical em carbono e nitrogênio (CEREDA, 1994). Os microrganismos podem induzir enzimas para a degradação e destoxificação do cianeto ou ainda formar enzimas cianeto-resistentes (KNOWLES, 1976).

A presença de uma via alternada à respiração, resistente ao cianeto, já foi descrita para alguns microrganismos (BAHR E BONNER, 1973). Através deste mecanismo, continuaria havendo consumo de O_2 e formação de água mesmo em presença de KCN (cianeto de potássio), que inibiria a cadeia respiratória normal. Esta via é inibida pelo ácido salicil hidroxâmico.

Após um composto entrar na célula, ele tem que ser reconhecido como uma fonte de alimento assimilável. Esta tarefa dentro da célula é normalmente desenvolvida por sensores especializados ou proteínas reguladoras que podem interagir com a molécula de alimento e então estimular a expressão dos genes em codificar enzimas necessárias para a conversão do composto. Entretanto, quando um composto não dá tal resposta através dos sensores, ele não é considerado fonte de alimento útil e não fica sujeito à transformação por enzimas metabólicas. Uma digestão incompleta de alguns compostos pode ocorrer se houverem enzimas metabólicas que não são convenientes para catalisar aquele tipo de reação. Dois diferentes caminhos para a adaptação dos microrganismos a compostos poluentes podem ocorrer. Se o composto é, em princípio, reconhecido como uma fonte de alimento e os genes necessários são "ligados", ocorre a "adaptação bioquímica". Se ocorrer a falta de um elo em uma das possibilidades descritas, mudanças ou adições são necessárias na informação genética existente, alterando enzimas ou proteínas que poderão ser sintetizadas para que se "acomode" à degradação a novos substratos. Neste caso fala-se em "adaptação genética" (van der MEER et. al., 1994).

Estudos do metabolismo de compostos tóxicos por microrganismos vêm sendo descritos por vários autores. Em numerosos casos, os microrganismos possuem potencial metabólico de versatilidade para a quebra de compostos orgânicos químicos sintéticos. Porção significativa da atividade de biodegradação de compostos antropogênicos pode envolver o cometabolismo, processo no qual os microrganismos, enquanto desenvolvem-se pelo consumo

de determinado substrato, apresentam a capacidade de transformar outros compostos sem que haja qualquer benefício direto ao metabolismo (SUFLITA e TOWNSEND, 1995).

A presença de cianeto, ou compostos cianogênicos na água tem efeito significativo sobre a atividade biológica dos ecossistemas. A legislação brasileira determina que a concentração máxima de cianeto para descarte é de 0,2 mg/L, mas não especifica em que forma, gás, dissolvido, líquido, livre ou complexado. (BARANA, 2000).

Magalhães (1998), em estudo sobre as bases bioquímicas da toxicidade da manipueira a insetos, nematóides e fungos, realizou ensaio de armazenamento da manipueira a temperatura ambiente e em tempos variados (t=0; t=6horas; t=12 horas; t=24 horas; t=48 horas; t=72 horas). As análises da concentração da linamarina e de seus metabólitos intermediários ao longo dos tempos de armazenamento demonstraram rápida degradação do composto linamarina, tal que no tempo 6 horas nenhuma linamarina foi detectada. A concentração de acetona cianidrina (intermediário na degradação da linamarina) no tempo 6 horas apresentou-se inferior a concentração obtida no tempo inicial, permanecendo estável até o tempo de 72 horas. As concentrações de cianeto livre apresentaram-se bastante variadas, porém passadas às 72 horas de incubação, a quantidade de cianeto livre diminuiu de forma significativa, possivelmente devido a sua alta volatilidade. Parte da redução desses compostos possivelmente poderiam ser explicadas pela atividade de leveduras presentes na manipueira (PUTTIKUNT et al. 1995) e parte pela ação das enzimas presentes na raiz da mandioca (MAGALHÃES, 1998).

Muitas espécies de fungos (*Fusarium sp., Hansenula anomala*) e de bactérias (*Escherichia coli, Pseudomonas fluorescens, Citrobacter freundii, Bacillus subtilis* e muitas outras linhagens de *Bacillus*) podem assimilar cianeto e usá-lo como fonte de nitrogênio e/ou de carbono, geralmente via NH_3 intermediário (HOLMES e DUBEY, 1995).

Fernandes Jr. (1995), empregando reatores com separação de fases e estudando cinética da fase acidogênica (35°C) na degradação da manipueira, obtendo redução de cianeto de 88%, caracterizou de maneira presuntiva a flora microbiana do reator com TRH de um dia e constatou a presença de cocos Gram positivos (*Leuconostoc* sp, *Ruminococcus* sp, *Streptococcus* sp), bacilos Gram positivos (*Clostridium* sp, *Propionibacterium* sp, *Bacillus* sp) e bacilos Gram negativos (bacilos entéricos). Ácido láctico foi detectado em grande

quantidade (600 mg/L) no reator em TRH de um dia, na ocasião do estudo microbiológico, destacando o *Streptococcus bovis* (remanescente do inóculo bovino usado) como uma das espécies presentes com a capacidade de produção de ácido láctico e acético. A quantidade elevada de ácido láctico pode explicar também a presença do bacilo Gram positivo (*Propionibacterium* sp), o qual é importante consumidor de lactato.

Bernal *et al* (1996), estudaram o efeito do cianeto (KCN) sobre os microrganismos que intervêm na fermentação anaeróbia de efluentes de indústrias de fécula de mandioca. Concluíram que não estando adaptada, a biomassa presente no biodigestor será muito sensível a pequenas concentrações de cianeto. Porém, se a concentração inicial de cianeto adicionada não for alta, a microflora é capaz de se recuperar rapidamente. Por outro lado, existe a possibilidade de se adaptar a biomassa gradualmente a altas concentrações de cianeto.

Outra forma de utilização do cianeto é através do crescimento de *Pseudomonas fluorescens* NCIMB 11764. Estudos mostraram que a bactéria foi capaz de crescer na presença de cianeto usando-o como única fonte de nitrogênio com uso simultâneo do oxigênio e consumo de NADH. Na Figura 10, são apresentadas duas reações que elucidam a via de conversão que leva o cianeto a CO_2 e NH_3, e que envolve o ataque das enzimas monooxigenases ou dioxigenases. *Pseudomonas fluorescens* NCIMB 11764 não catalisaram a conversão do cianeto em condições anaeróbias (KUNS et al. 1992).

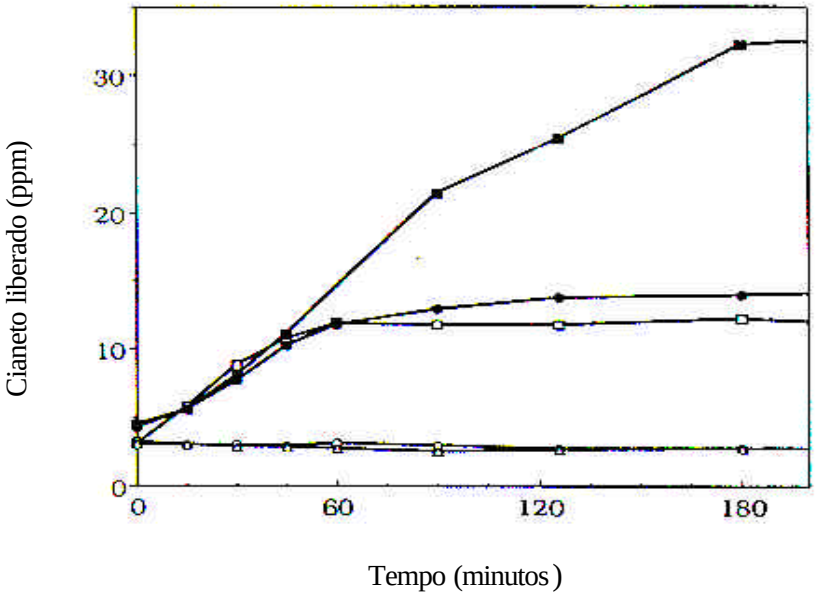
$$HCN + O_2 \rightarrow HOCN\ (\text{cianato}) + H_2O \rightarrow CO_2 + NH_3$$
$$HCN + O_2 \rightarrow CO_2 + NH_3$$

Fonte: Kuns et al. 1992
Figura 10: Conversão do cianeto a CO_2 e NH_3

Outros estudos mostram a participação da enzima rodanase na conversão do cianeto e tiossulfato em uma forma de cianeto menos tóxica, o tiocianato. Esta enzima tem sido encontrada em *B. stearothermophilus*, *Thiobacillus denitrificans* e também no fígado e no epitélio nasal de roedores, onde é produzida em grandes concentrações e funciona como mecanismo de desintoxicação, quando ácido cianídrico é inalado (BOWEN et al. 1965; ATKINSON, 1975).

Giraud et al. (1992), estudaram o potencial das bactérias produtoras de ácido

láctico na degradação da linamarina presente na mandioca. Dez linhagens de bactérias foram testadas e observou-se, através de análises em HPLC, que a linamarina foi totalmente degradada e que os produtos gerados foram ácido láctico e acetonacianidrina, depois do período de incubação de 30 minutos a 30°C e pH 5,5. A glicose produzida na hidrólise da linamarina foi convertida imediatamente em ácido láctico pelas bactérias que atuam na "limpeza final". Das bactérias produtoras de ácido láctico, a *L. plantarum* A6 apresentou maior taxa na degradação da linamarina em meio aeróbio. A linamarase endógena da mandioca foi primeiramente inativada para que somente a atividade da bactéria fosse avaliada. O trabalho compreendeu quatro ensaios. No primeiro ensaio foi usado extrato com enzimas inativadas acrescidas de linamarina. No segundo ensaio foi usado extrato com enzimas inativadas e linamarase. No terceiro ensaio foi usado extrato com enzimas inativadas e *L. plantarum* A6 e no último ensaio, extrato com enzimas inativadas mais linamarina e *L. plantarum* A6. Os resultados são apresentados na Figura 11.



Legenda: △ extrato controle; ○ extrato+linamarina (ensaio 1); □ extrato+linamarase (ensaio 2); ● extrato +*L.plantarum* A6 (ensaio 3); ■ extrato+L.plantarum A6+linamarina (ensaio 4)
Fonte: Giraud et al. (1992)
Figura 11 - Teor de cianeto do extrato de mandioca após a inibição da linamarase endógena

Pode ser observado na Figura 11, que no extrato de mandioca controle (extrato com

linamarase inativada) não foi detectado cianeto livre, nem mesmo depois da adição de linamarina (ensaio 1). Após a adição de linamarase, a quantidade de cianeto livre aumentou rapidamente e manteve-se em um patamar, após 60 minutos (ensaio 2). A adição de células da *L. plantarum* A6 ao extrato de mandioca (ensaio 3) resultou na geração de cianeto livre, comparado ao que havia sido previamente observado. A bactéria sozinha foi capaz de hidrolisar grande quantidade de linamarina (ensaio 4).

Como pode ser observado, várias são as rotas metabólicas utilizadas pelos microrganismos na degradação de cianeto, demonstrando a versatilidade da adaptação microbiana ao meio onde se encontram ou são inoculados.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

A água residual foi coletada sob a prensa de massa ralada em uma fábrica de farinha de mandioca (Plaza Indústria e Comércio Ltda.) situada em Santa Maria da Serra, Estado de São Paulo, Brasil. A fábrica fica a 175 Km de distância do Centro de Raízes e Amidos Tropicais (CERAT), Unesp – Botucatu e a 120 Km de distância do Laboratório de Processos Biológicos (USP – São Carlos).

4.1 - Linamarina extraída

A linamarina utilizada nesta pesquisa foi extraída e purificada em diversos lotes, isto é, várias quantidades de mandioca foram levadas em separato, por pesquisadores do CPQBA (Centro de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas) – UNICAMP, Campinas (SP), segundo metodologia proposta por Rodrigues et al.[1] (1999), a partir de raízes de mandioca Branca de Santa Catarina da variedade SRT 59, pertencente à coleção do Instituto Agronômico de Campinas (IAC);

Os extratos de linamarina utilizados foram obtidos de acordo com o rendimento do processo para sua extração em cada batelada, o que resultou na variação dos teores de pureza dos mesmos entre 77,4% e 87,2%, resultando numa mistura com 85% de pureza.

4.2 - Acetonacianidrina

A acetonacianidrina líquida foi o da marca Aldrich com 99% de pureza.

4.3 - Cianeto de potássio

O KCN (p.a) utilizado para a confecção das curvas padrão foi da marca Dinâmica.

4.4 - Ácido pícrico

A solução de ácido pícrico saturada foi obtida pela diluição de 2,56g de ácido pícrico da marca Reagent em 100mL de água destilada.

4.5 – Equipamentos

Além dos equipamentos normais de laboratório, foram usados o Espectrofotômetro Varian, Cary 50 Bio UV – visível, cromatógrafo "Hewlett Packard (HP), centrífuga da Jouan modelo GR 2022 refrigerada e Shacker rotacional à 30±2°C e 30 rpm.

4.6 - Substrato

Os lotes de manipueira foram usados como substrato, sem diluições, no tratamento anaeróbio com separação de fases. A coleta era realizada a cada 15 dias, iniciando-se no mês de Março de 2000 até o mês de Junho de 2003 (período de duração do trabalho). Assim sendo, foram obtidos lotes de manipueira de diversas variedades de mandioca processadas como matéria-prima ao longo destes três anos.

4.6.1 – Coleta do substrato

Vários galões plásticos (≅25), com capacidade para 9 litros foram usados na coleta do resíduo. Durante o trajeto de Santa Maria da Serra até o CERAT (Botucatu) já ocorria a decantação dos sólidos suspensos grosseiros, no próprio recipiente. O sobrenadante era armazenado e congelado a –10°C para posterior aplicação nos reatores. No laboratório, a cada novo lote coletado, amostras do sobrenadante de manipueira foram separadas para as análises de caracterização. O restante das amostras era acondicionada nos recipientes plástico de 9 litros para armazenamento em freezer horizontal, mantido à –10°C para o congelamento das amostras. Para o preparo do substrato que alimentou os reatores, o descongelamento da manipueira foi realizado em temperatura de geladeira (5°C), iniciando no dia anterior a sua utilização. Nesta forma foi denominado substrato.

Na realização dos testes de atividade da enzima linamarase, a manipueira coletada sob a prensa foi armazenada de duas maneiras, sob nitrogênio líquido e em temperatura ambiente. Nomeou-se de maneira geral a manipueira sob temperatura ambiente somente de manipueira em todo os testes do trabalho. Na realização dos testes da atividade da enzima linamarase a atividade da manipueira conservada em nitrogênio líquido foi chamada de atividade inicial.

Cada reator tinha o pH do seu afluente previamente ajustado com hidróxido de sódio 50% diretamente ao material em fermentação nos recipientes que abasteciam esses reatores. O ajuste do pH era feito por controladores automáticos e bombas peristálticas que introduziam o hidróxido de sódio ao resíduo quando da ocorrência de abaixamento do mesmo. O efluente do reator acidogênico foi usado como afluente do metanogênico. Os valores de pH estabelecidos como adequados para bom desempenho das bactérias acidogênicas (pH 5,5-6,0) e das arqueas metanogênicas (pH 6,5-7,0) foram os citados por Souza (1982).

4.7 – Os biodigestores e inóculos

Na realização dos testes microbiológicos *in vitro*, a fonte de microrganismos (inóculos) para os ensaios foi a manipueira, os efluentes dos reatores. A amostra de manipueira foi coletada sob as prensas na farinheira Plaza e as amostras dos inóculos acidogênicos e metanogênicos foram coletados sob as saídas dos efluentes dos reatores, durante o funcionamento das bombas peristálticas, que introduziam o resíduo nos reatores. A coleta obedeceu aos tempos de retenção de saída dos efluentes. Os inóculos foram levados ao Laboratório de Processos Biológicos (LPB), USP-São Carlos, sob conservação em gelo, em caixas de isopor devidamente fechadas. Este procedimento de transporte dos inóculos é um procedimento de rotina quando se trata de testes com inoculação de microrganismos.

O sistema de reatores usados no processo de tratamento do resíduo manipueira foi o de separação de fases, já empregados no estudo cinético da fase metanogênica para tratamento da manipueira por Lacerda (1991) e no estudo cinético da fase acidogênica para o mesmo substrato (FERNANDES JR., 1995). No primeiro reator (reator acidogênico), ocorre o processo de acidogênese do resíduo e no segundo (reator metanogênico) ocorre a metanogênese do resíduo já acidificado anteriormente.

Reator Acidogênico: modelo de fluxo ascendente, cilíndrico (tubo PVC - policloreto de vinila com capacidade útil para 6 litros). O substrato manipueira era bombeado através de bomba peristáltica ligada a um temporizador para o reator acidogênico. O TRH empregado foi de 1 dia (Fernandes Jr., 1995). Temperatura de operação de 35°C +/- 1°C. O valor de pH manteve-se entre 5,5 e 6,0.

Reator Metanogênico: modelo de fluxo ascendente e leito fixo, formado por dois tubos de PVC, um de 10 cm de diâmetro e outro de 15 cm de diâmetro, ambos com 71 cm de altura, dispostos verticalmente, com o tubo de menor diâmetro dentro do maior. O meio suporte eram anéis de PVC rígidos, que atuavam como leito fixo. O volume útil do reator metanogênico era de 9,33 L de coluna interna. A coluna era dotada de parede dupla, através da qual circulava água mantida à temperatura controlada. O TRH empregado foi de 3 dias (Lacerda, 1991). Temperatura de operação de 32°C +/- 1°C. O valor de pH foi mantido entre 6,5 e 7,0.

A temperatura dos dois reatores foi mantida constante com o auxílio de três aquecedores de aquário instalados em diferentes alturas, ligados a um termostato. O monitoramento da temperatura das colunas era feito através de um termômetro cujo bulbo ficava imerso na água que banhava as colunas.

Os reatores descritos já se encontravam inoculados no laboratório do CERAT, quando do início do trabalho, e a descrição da inoculação e partida encontram-se citadas na literatura (BARANA, 1995).

Em cada biodigestor estava acoplado um gasômetro do tipo telescópico, feito com tubo PVC. A estrutura e o funcionamento dos gasômetros foram às mesmas citadas por Barana (2000): tubo mais largo contendo solução salina acidificada (25% de cloreto de sódio e 3% de ácido sulfúrico) (FERNANDES JR., 1995). O tubo mais estreito, tampado na parte superior, flutuava e conforme o biogás era produzido esse tubo enchia-se de gás e subia. Medindo-se o volume de tubo deslocado, e fazendo-se as correções com relação à umidade e temperatura, obtia-se o volume de biogás produzido nas CNTP (Condições Normais de Temperatura e Pressão). Os gasômetros possuíam um orifício no topo que permanecia tampado com uma rolha provida de um termômetro. Assim, uma vez feita à leitura do volume de gasômetro deslocado e a medida da temperatura do gás, o gasômetro era esvaziado com a retirada da rolha.

A solução salina acidificada era utilizada para formar um selo d'água e para que não houvesse reação entre o CO_2 produzido e o líquido de enchimento do gasômetro, permitindo assim, quantificação e qualificação mais precisa do gás gerado no biodigestor (FERNANDES JR., 1995).

4.8 – Análises de acompanhamento dos reatores

Os biodigestores foram monitorados para a verificação do funcionamento do sistema nas condições preconizadas por Barana (2000). O acompanhamento do funcionamento se deu principalmente através de análises de remoção da DQO, cianeto total e livre e produção de metano. Considerou-se importante, a constatação do bom funcionamento dos biodigestores na redução da DQO e dos teores de cianeto, para que os resultados de captação de HCN nos gases fossem compatíveis com o tratamento. Entretanto, não foram realizados testes para otimização do processo de biodegradação da manipueira, o que já foi realizado por outros autores anteriormente citados e usados tais índices.

Com o mesmo objetivo, foram realizadas também determinações de pH, sólidos totais e voláteis. Foram estabelecidas a produção de biogás, quantificação e composição nos reatores acidogênico e metanogênico.

A seguir são citadas as metodologias de acompanhamento do funcionamento dos reatores.

- Demanda Química de Oxigênio (DQO)

Metodologia baseada na proposta da CETESB, como adaptação do método clássico, onde a matéria orgânica é oxidada pelo dicromato, transformando-se em ácido crômico através de aquecimento. Neste método a dosagem é feita por colorimetria.

- Cianeto total e livre

No substrato, afluente e efluente dos reatores foi feita a dosagem de cianeto total (linamarina+acetonacianidrina+HCN). O método usado foi o colorimétrico descrito por Cooke (1978) e modificado por Essers (1993). Nos gases gerados, a dosagem foi feita unicamente do produto da degradação final da linamarina, na forma de HCN, que sendo a única volátil, poderia sair com os gases. Neste caso, a determinação do HCN foi feita pelo método colorimétrico de Smith citado por Winton e Winton (1958) usando ácido pícrico como reagente de cor. A metodologia adotada (ESSERS, 1993) é resumida no Quadro 5.

Quadro 5 - Metodologia de análise das formas de cianeto (total e livre) no substrato manipueira, afluente dos e efluente dos reatores.

Cianeto	buffer pH 7,0	amostra (extrato)	linamarase (15 min. 30°C)	NaOH 0,2M (5 min. repouso)	buffer pH 6,0	cloramina T (agitar-gelo 5 min.)	reagente de cor (agitar-repouso 10 min.)
total	0,4mL	0,1mL	0,1mL	0,6mL	2,8mL	0,1mL	0,6mL
livre	0,0 mL	0,6mL	0,0 mL	0,0 mL	3,4mL	0,1mL	0,6mL

A leitura de absorbância foi feita em espectrofotômetro a 605 nm.

As porcentagens de redução do cianeto, foram calculadas de acordo com a fórmula, segundo (VIEIRA E SOUZA, 1981):

$$\%\text{Redução Cianeto} = \frac{\text{Cianeto alimentação} - \text{Cianeto efluente}}{\text{Cianeto alimentação}} \times 100$$

As formas de cianeto foram detectadas e quantificadas em todas as etapas do processo de digestão anaeróbia da manipueira. Essas análises serviram para estabelecer os pontos onde ocorrem as maiores taxas de redução das formas de cianeto.

- pH

Foi utilizado um medidor de pH PM608 da marca ANALION que é um aparelho digital de precisão, efetuando a leitura com duas casas decimais.

- Análise da composição do biogás

Essa medida foi importante para poder se avaliar a eficiência do processo. A análise foi realizada na UNESP, campus Jaboticabal no Departamento de Engenharia Rural, em um cromatógrafo a gás da marca FINNIGAN, modelo GC-9001, coluna Porapack-Q e peneira molecular à temperatura de 60°C. O gás de arraste utilizado foi o hidrogênio, e o detector de condutividade térmica, regulado à temperatura de 100°C.

- Determinação do volume de biogás produzido

A determinação do volume de biogás produzido fez-se medindo a altura de gasômetro deslocado, fazendo-se a correção deste volume com relação à umidade (Quadro 6) e aplicando-se na Equação 1, tem-se o volume do gás nas CNTP.

$P_0 \times V_0 / T_0 = P_1 \times V_1 / T_1 \times F$ **Equação 1**

Onde:

P_0 - pressão na CNTP (760 mmHg)

V_0 – volume na CNTP

T_0 – temperatura na CNTP

P_1 - pressão local de Botucatu – SP (691,86 mmHg)

V_1 – volume medido (litros)

T_1 – temperatura medida (K)

F - fator de correção de umidade

Quadro 6 – Fator (F) de correção de umidade do biogás com relação à temperatura

Temperatura (ºC)	**F**
30	0,9540
31	0,9512
32	0,9484
33	0,9454
34	0,9423
35	0,9390
36	0,9355
37	0,9319
38	0,9281
39	0,9242
40	0,9200

Fonte: IPT/USP, citado por Fernandes Jr. (1995).

4.9 - Procedimentos experimentais

Para elucidação do destino do HCN degradado, adotou-se as quatro etapas que seguem, como indicado na Figura 12.

Etapa A: testes de captação dos gases para estabelecer a degradação e volatilização do cianeto ao longo do sistema de tratamento dos reatores biológicos;

Etapa B: uma vez que a hidrólise da linamarina também pode ocorrer pela linamarase da mandioca e de microrganismos, foram realizados testes de atividade da enzima linamarase. Para isso, foram comparados os teores de cianeto total e livre em amostras de manipueira sob temperatura ambiente e em amostras em nitrogênio líquido. Foram também analisadas as atividades nos afluentes e efluentes dos reatores biológicos em funcionamento para a verificação do efeito residual;

Etapas C e D: testes *in vitro* para estabelecer o metabolismo dos microrganismos autóctones da manipueira e presentes nos efluentes dos reatores na decomposição dos compostos linamarina e acetonacianidrina (intermediário na decomposição da linamarina) em diferentes condições, usando meio mínimo (MM). Os microrganismos empregados nessas etapas foram provenientes de inóculos retirados dos efluentes dos reatores acidogênico e metanogênico e da manipueira.

4.9.1 - Composição e preparação do Meio Mineral (MM) e soluções-estoque

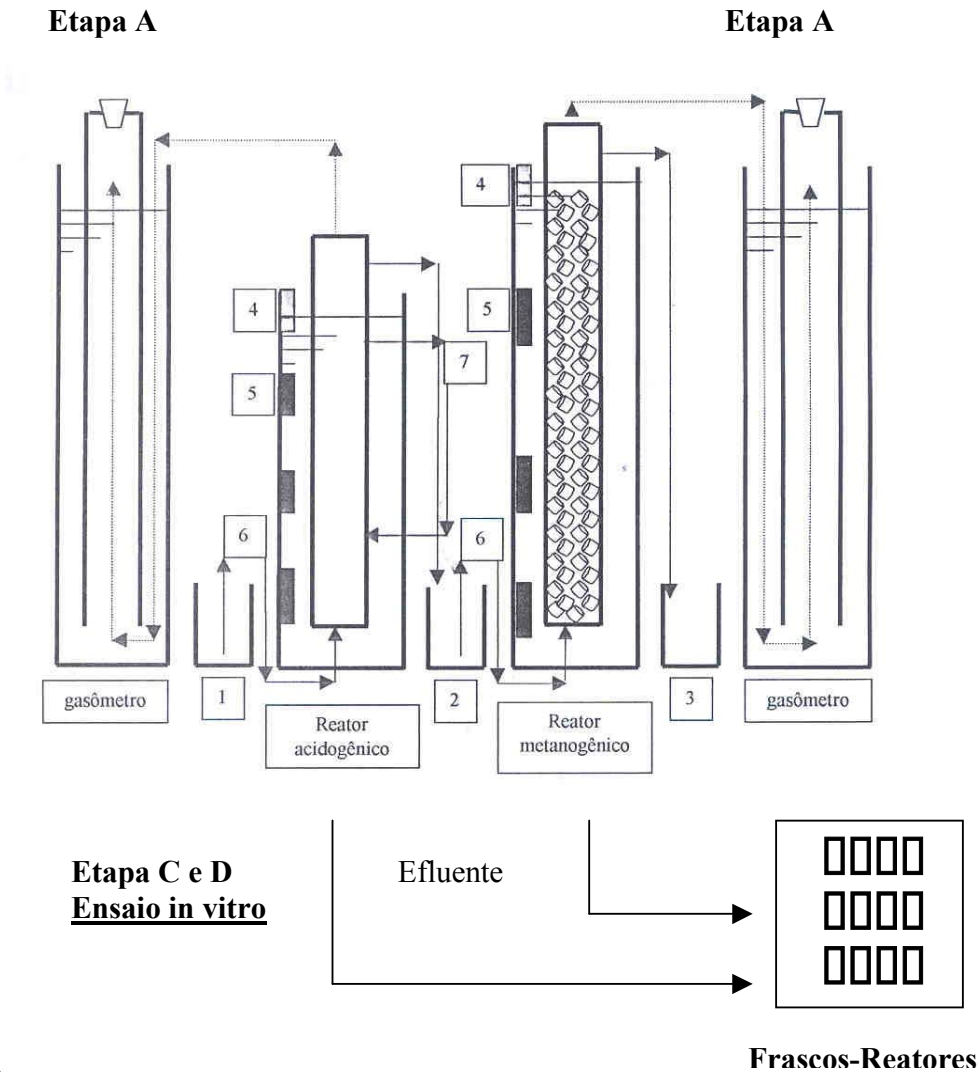
O meio mineral líquido (MM) usado como fonte nutricional mínima para os microrganismos foi descrito por Roberts et al (1995) e será denominado no âmbito deste trabalho como MM. O Quadro 7 descreve o meio mínimo.

Quadro 7 – Composição do meio mínimo

Componentes	Quantidades/1L de água destilada
$(NH4)_2SO_4$	3,0 g
KH_2PO_4	2,0 g
K_2HPO_4	2,0 g
$MgSO_4.7H_2O$	0,5 g

Fonte: Roberts et al (1995)

Após dissolver os componentes do MM em água deionizada, borbulhou-se por 15 minutos gás N_2 (100% pureza) e posteriormente filtrou-se esse meio em membrana, através do método de filtração por membrana de 0,22μm de diâmetro de poro. Neste método, todo material usado na filtração foi anteriormente autoclavado e a esterilização do meio MM foi realizada sob condições de assepsia. A filtração do MM pertencente aos ensaios com a linamariona foi feita sem a linamarina, a qual foi adicionada posteriormente com abertura dos frascos-reatores anaeróbios sob atmosfera constante de N_2. Este procedimento foi realizado desta maneira, pois não se sabia como seria o comportamento da linamarina ao ser filtrada. A filtração do MM pertencente aos ensaios com a acetonacianidrina foi feita juntamente com o composto. Não foi feita a filtração em separato, pois a acetonacianidrina sendo altamente volátil iria ser afetada com esse manuseio.



Legenda:

1 – Afluente do reator acidogênico (manipueira) **Etapa B, C e D**
2 – Efluente do reator acidogênico/afluente do reator metanogênico **Etapa B, C e D**
3 – Efluente do reator metanogênico **Etapa B, C e D**
4 – Termostato (branco)
5 – Termômetro
6 – Bomba Peristáltica
7 – Bomba de recirculação

Biogás
Manipueira

Fonte: adaptado de Barana (2000)
Figura 12 – Etapas que elucidam o destino do HCN degradado

Foram preparadas três tipos de meio de cultura que diferiram com relação ao pH e ao tipo de inóculo adicionado. Nos ensaios *in vitro*, as condições dos meios de cultura, simularam as condições da manipueira e dos efluentes dos reatores, pois deram origem aos inóculos. Após o preparo, cada meio de cultura foi distribuído nos frascos com auxílio de proveta esterelizada. Após o meio ter sido distribuído nos frascos, as condições foram ajustadas para aerobiose ou anaerobiose. Sistema de distribuição simultânea de gases (Figura 13), garantiu uma atmosfera de nitrogênio isenta de oxigênio dentro dos frascos Boecko (500mL), mantidos sob condições anaeróbias, após terem sido fechados. No LPB-USP, esse sistema é composto de quatro saídas de gases simultâneas. Em cada saída, foi instalada uma mangueira com cerca de 30cm apropriada para gases e, na extremidade oposta, estava instalada uma seringa de vidro (B&D) de 3mL. Nas seringas, eram afixadas agulhas de insulina. Através dessas mangueiras, fazia-se passar os gases nos frascos de cultivo.

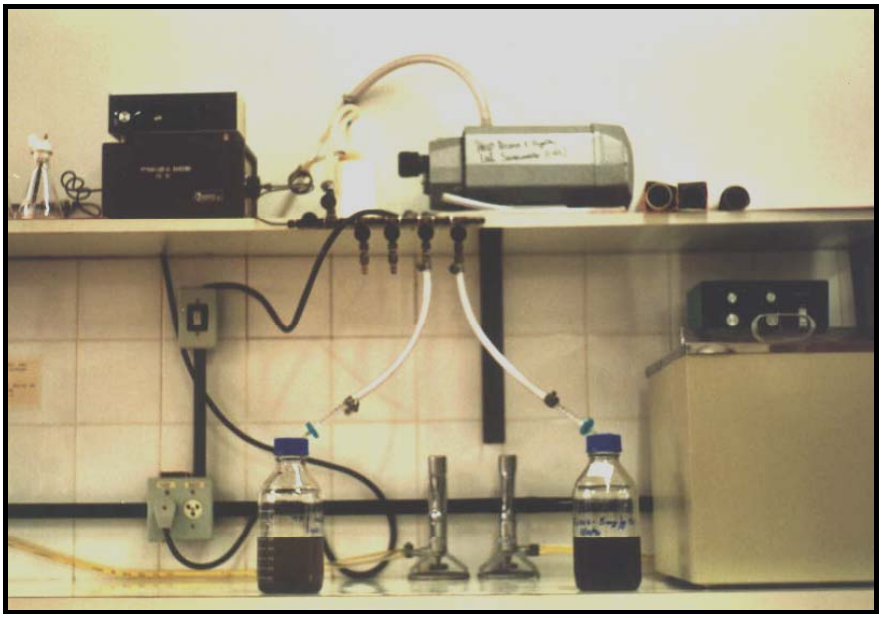


FIGURA 13 - Sistema de distribuição simultânea de gases

Para os testes *in vitro* com a linamarina, usou-se linamarina com 85% de pureza para o preparo de solução estoque de 1,63%, obtendo-se ao final, nos frascos reatores concentração de 0,0653% de linamarina.

Nos testes *in vitro* com a acetonacianidrina, este composto foi adicionado diretamente aos frascos-reatores, pois se apresentava na forma líquida. A concentração final nos frascos reatores foi de 1%.

4.9.2 – Avaliação quantitativa da volatilização do ácido cianídrico nos reatores

Os gases gerados e eliminados através dos gasômetros telescópicos dos reatores, foram monitorados para a presença de ácido cianídrico por um sistema de coleta. Os gases foram captados em separado e borbulhados numa solução de carbonato de sódio (Na_2CO_3 0,1M) seguindo metodologia baseada em Heath et al. (1998). A dosagem do HCN em espectrofotômetro a 540nm seguiu metodologia de Smith citada por Winton e Winton (1958), como segue:

- Reagentes: carbonato de sódio 5% e solução de ácido pícrico saturada. Para a curva padrão foi usado cianeto de potássio (KCN). A curva padrão foi usada para a quantificação de HCN volatilizado.

- Determinação de ácido cianídrico: O gás gerado durante 24 horas foi borbulhado em 250mL de solução de carbonato de sódio (0,1M) que serviu como captor. Após 24 horas, os frascos eram trocados. Para dosagem do HCN, foram colocados em um tubo de ensaio 1 mL da solução de carbonato de sódio do frasco de captura, 1mL de solução de carbonato de sódio a 5% e 3mL de solução saturada de ácido pícrico. Os tubos de ensaio foram tampados e colocados em banho de água fervente por 5 minutos e depois resfriados em água corrente. O volume foi completado a 10mL com água destilada. A leitura foi feita no espectrofotômetro a 540nm e os resultados de absorbância obtidos colocados na curva padrão para obtenção do HCN gerados em 24 horas.

Concomitantemente a volatilização do HCN, a degradação do cianeto foi acompanhada também no resíduo líquido manipueira, ao longo do tratamento nos reatores, através do método colorimétrico/enzimático descrito por Cooke (1978) e modificado por Essers (1993).

4.9.3 –Obtenção e atividade da enzima linamarase

A medida da atividade da linamarase foi feita na manipueira sob temperatura ambiente, em amostras de manipueira congeladas em nitrogênio líquido e também nos afluentes e efluentes dos reatores biológicos em funcionamento.

Na determinação da atividade da enzima linamarase, o método utilizado foi o método de Essers (1993). Foram dosados cianeto total e livre na manipueira e em amostras de manipueira em nitrogênio líquido e também em amostras dos afluentes e efluentes dos reatores em funcionamento.

Para a extração da enzima, foram colocados 200mL de manipueira ou do efluente em um liquidificador e este material foi homogeneizado durante três minutos, em velocidade alta com 400mL de solução tampão acetato 0,1M pH 5,5. A mistura foi mantida à temperatura de 2 à 4°C durante um período de 24 horas. Posteriormente foi centrifugada a 9000 rpm à 4°C durante 30 minutos. O sobrenadante foi saturado com 60% de sulfato de amônio (390g. de sulfato de amônio/L). Essa solução saturada foi mantida em temperatura de 4°C durante 16 horas. A solução foi depois centrifugada a 9000 rpm durante uma hora a 4°C. Desprezado o sobrenadante, o precipitado foi dissolvido em 50mL de tampão fosfato 0,1M pH 6,0. A solução formada com o precipitado e o tampão foi armazenada em um saco de diálise (tamanho 33x21mm – marca INLAB). Procedeu-se com a imersão em solução tampão (tampão fosfato 0,1M pH 6,0) sendo a solução dialisada durante 2 dias e a solução tampão que banha o saco foi trocada a cada 24 horas. Após esse período, a enzima já dialisada foi distribuída em ependorfes e armazenada a –10°C para posterior teste da atividade enzimática.

Obtida a enzima, foi estabelecida a atividade da mesma. A unidade enzimática internacional (UE), representa a quantidade de enzima que catalisa a formação de 1mmol de HCN por minuto nas condições definidas pela metodologia. Uma curva padrão para HCN foi preparada para quantificar o HCN da amostra (Essers, 1993). A curva padrão é a mesma usada na determinação do cianeto total e livre presente nas amostras de raiz de mandioca e seus derivados como a manipueira.

A enzima extraída foi convenientemente diluída com tampão fosfato 0,1M pH 6,0. Essa diluição depende da concentração e, portanto, de sua atividade. O Quadro 8 específica as quantidades de reagentes adicionados aos tubos contendo a enzima diluída.

Quadro 8 – Metodologia de determinação da atividade da enzima linamarase

Reagentes adicionados em tubos contendo 0,1mL de enzima diluída
- 0,5mL de solução linamarina 5mM
- banho de água à 30°C por 30 minutos
- 0,6mL de solução de NaOH 0,2M (repouso por 5 minutos)
- 2,8mL de buffer pH 6,0
- 0,1mL de cloramina T (agitar)
- banho de gelo por 5 minutos
- 0,6mL de reagente de cor (agitar; repouso por 10 minutos e leitura em espectrofotômetro a 605nm)

Para ser obtida a concentração de 5mM de linamarina, 31mg de linamarina liofilizada foi dissolvida em 25mL de tampão fosfato (0,1M pH 6,0). A linamarina usada nestes testes foi da marca Sigma (p.a).

Os valores de absorbância obtidos a 605nm, foram aplicados na equação da curva padrão para cianeto, obtendo-se valores de µg de HCN que posteriormente foram aplicados na Equação 2. Os resultados obtidos foram expressos em Unidade Enzimática (UE)/mL para cada amostra em particular. A quantidade de linamarase deve ser ajustada em função de sua atividade. Segundo Cooke (1978), a atividade de 0,3 UE/0,1mL de enzima diluída pode ser considerada como boa atividade, valores abaixo, inviabilizam o uso da enzima extraída, e, valores acima, caracterizam muita enzima que pode ser diluída.

Equação 2: UE/mL = µg HCN x fator de diluição/0,1mL x 810µg HCN

Onde;

- UE/mL = unidade enzimática/mL
- µg HCN (curva padrão)
- fator de diluição (500x/1000x/2000x, etc.)
- 0,1mL = quantidade de amostra
- 810µg HCN = 1 UE libera 27µg de HCN por minuto, assim 27µg x 30 minutos = 810µg HCN/30 minutos (tempo de reação no teste)

4.9.4 - Avaliação *in vitro* do metabolismo da linamarina e acetonacianidrina

Avaliou-se a ação dos microrganismos autóctones da manipueira e presentes nos efluentes dos reatores, em dois testes *in vitro*. Foi realizado um teste com a linamarina em complementação aos testes *in vitro* e foram realizados testes microbiológicos *in vitro* com a acetonacianidrina, que é um composto intermediário presente na degradação da linamarina. Desta maneira, testou-se a acetonacianidrina exógena numa concentração conhecida para a observação do crescimento dos microrganismos frente ao composto com concomitante degradação do mesmo.

Os testes de avaliação do metabolismo de microrganismos presentes nos inóculos citados, foram realizados no Departamento de Hidráulica e Saneamento, Laboratório de Processos Biológicos (LPB) - USP, onde foi possível a manipulação dos microrganismos em condições anaeróbias, pois é um laboratório especializado em microbiologia de anaeróbios.

Foram selecionados três inóculos para os testes: a) manipueira sob temperatura ambiente (presença da flora microbiana autóctone da mandioca), b) efluente do reator acidogênico, c) efluente do reator metanogênico.

Os gases formados através do metabolismo bacteriano foram analisados por cromatografia a gás, utilizando-se cromatógrafo Gow Mac. A coluna utilizada foi Porapack-Q (comprimento de 2 metros e diâmetro interno de ¼). O detector foi de condutividade térmica (série 150). O gás de arraste foi o hidrogênio super-seco (White Martins) e o integradores eram CG-instrumentos Científicos-300. As condições de operação do equipamento foram: - vazão do gás de arraste 30 mL/min.; temperaturas do detector, colunas e injetor igual a 75°C; a corrente foi de 150mA.

Amostras de gás eram retiradas a cada dois dias, utilizando-se uma seringa especial, com trava Hamilton Gastight que impede a saída ou mesmo a mistura dos gases contidos na seringa com a atmosfera externa. Eram retirados para a leitura no aparelho 0,5mL de amostra da atmosfera dos frascos, fazendo, antes dessa retirada, várias lavagens dentro da própria atmosfera dos frascos com a seringa, para que fosse certificada a pureza gasosa. A avaliação dos gases produzidos se fez necessária para a verificação de produção de metano nos frascos anaeróbios na presença dos compostos linamarina e acetonacianidrina. Como não se verificou a produção de gás metano ao longo do período de incubação, as amostragens passaram a ser realizadas uma vez por semana somente para a certificação da presença ou ausência de metano e produção de CO_2.

A quantificação da degradação da linamarina e acetonacianidrina ao final dos ensaios, foi realizada com emprego da técnica HPLC, segundo metodologia proposta por Korpraditskul et al (1993) para o preparo das amostras. Para os testes cromatográficos, foram coletadas alíquotas de 2 mL de amostras semanais dos frascos-reatores (frascos Boecko) e as amostras foram acondicionadas em caixa de isopor sob conservação em gelo e transportadas até a cidade de Bauru (Laboratório de química-UNESP), para posterior dosagem dos compostos-alvo no cromatógrafo. Cada amostra foi previamente preparada através de centrifugação durante 5 minutos e posterior filtração do sobrenadante com uma seringa plástica de 1mL (B&D) em filtro holder, contido de membrana "millipore" 0,22μm, sendo o filtrado acondicionado em "ependorfes" e posteriormente injetado uma alíquota de 50μL desse filtrado com o auxílio de uma seringa específica de vidro, para a leitura cromatográfica. As alíquotas foram injetadas e analisadas a um fluxo de 0,6mL/min., à 65°C por um período de retenção de 20 minutos para a acetonacianidrina e 13 minutos para a linamarina. Esse tempo foi baseado nos cromatogramas das amostras padrões que apresentaram tempos de retenção específicos menores nesse tipo de cromatógrafo.

4.9.4.1 – Incubação das culturas microbianas

A incubação foi conduzida sob condições anaeróbias e aeróbias. O Quadro 9 descreve os procedimentos empregados.

Quadro 9 – Condições das culturas enriquecidas em linamarina e acetonacianidrina a 30±2°C

Inóculos	Condições dos frascos em duplicata
Manipueira sob temperatura ambiente	Anaeróbia
	Aeróbia
Efluente do reator acidogênico	Anaeróbia
	Aeróbia
Efluente do reator metanogênico	Anaeróbia com amostragem de gás
	Anaeróbia sem amostragem de gás

Os ensaios de enriquecimento foram conduzidos sob condições anaeróbias e aeróbias para simular as condições encontradas nos reatores. No reator acidogênico predominam microrganismos facultativos que promovem a digestão da manipueira em meio levemente ácido com presença de pequenas quantidades de oxigênio. Nos testes *in vitro* usou-se para o acondicionamento

do meio de cultura e dos microrganismos frascos Boecko de 500mL. Para a manutenção de condições anaeróbias, os frascos foram vedados com tampa de borracha preta e tampa plástica rosqueável e furada na parte superior para retirada de amostras com agulha e seringa sem a necessidade de abertura dos frascos. Na manutenção de condições aeróbias foram usados os mesmos tipos de frascos tampados com rodilhão de algodão para permitir trocas gasosas.

Nas duas situações, aeróbias e anaeróbias, os testes foram realizados em duplicata, e os frascos continham 225mL de meio mineral líquido estéril (MM) (Roberts et al, 1995). O volume de inóculo em todas as condições dos ensaios foi de 25mL (10% v/v).

As duas condições, aeróbias e anaeróbias, foram aplicadas aos inóculos: manipueira sob temperatura ambiente e efluente do reator acidogênico. O inóculo proveniente do efluente do reator metanogênico foi mantido apenas em condições anaeróbias.

Os frascos Boecko, nas diferentes situações, também tiveram o pH de seu meio de cultura adaptado de acordo com o pH dos efluentes nos reatores e da manipueira. O inóculo manipueira sob temperatura ambiente tem um pH em torno de 5,4, o inóculo efluente do reator acidogênico tem pH em torno de 3,8 e o inóculo efluente do reator metanogênico tem o pH em torno de 7,8. Esses valores foram mantidos para cada situação nos frascos adicionando NaOH 1N ou H_2SO_4 1M, conforme desejava-se aumentar ou abaixar o pH, respectivamente.

Finalmente, após a inoculação, os frascos foram incubados em Shacker rotacional à 33°C/30 rpm. A temperatura de 33°C foi estipulada, em razão da degradação da acetonacianidrina (intermediário da linamarina) ser favorecida por temperaturas maiores que 30°C em condições acidogênicas (pH > 4,0).

A cada dois dias foram feitas leituras da composição gasosa da atmosfera dos frascos mantidos sob anaerobiose. Essas leituras foram realizadas para possível acompanhamento da produção de gás metano pelos microrganismos. Observado que durante a leitura da composição gasosa dos reatores não havia a produção de gás metano, essas leituras passaram a ser feitas semanalmente.

Os frascos sob condições metanogênicas foram separados em dois lotes: com e sem leitura de gás metano. Esse procedimento preservou o cianeto que possivelmente pudesse ter sido volatilizado com amostragens de gases. Como a acetonacianidrina se decompõe espontaneamente, o cianeto já estaria liberado para os microrganismos.

Durante todo o período de incubação, 2 mL de amostra foram retiradas de cada frasco Boecko para cada ensaio. Foram feitas as análises das amostras como segue:

- análise de quantificação de cianeto total através do método de Cooke (1958) e modificado por Essers (1993)

- análise em HPLC para a determinação da degradação da linamarina e da acetonacianidrina ao longo do tempo de incubação. O cromatógrafo fornece os resultados desta degradação através de cromatogramas que expressam as porcentagens remanescentes dos compostos.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para comprovar que a decomposição da linamarina ocorreu nas condições esperadas e que, portanto, a redução de cianeto correspondeu ao relato da literatura, foi feito o acompanhamento dos reatores.

5.1 - Funcionamento dos reatores

O Quadro 10 resume as condições de funcionamento dos reatores durante o período que compreendeu a pesquisa.

Quadro 10 – Cargas orgânicas do afluente e efluente dos reatores acidogênico e metanogênico e respectivas taxas de redução

	Cargas (gDQO/L reator.dia^{-1})		**Redução de carga (%)**
	Afluente	**Efluente**	
Reator acidogênico			
Etapa 1	17,60	11,20	36,36
Etapa 2	47,56	35,30	25,77
Etapa 3	34,18	29,30	14,27
Etapa 4	53,24	50,53	5,09
Reator metanogênico			
Etapa 1	3,12	2,32	25,64
Etapa 2	10,25	3,89	62,04
Etapa 3	15,51	4,37	71,82
Etapa 4	17,02	10,32	39,36

As reduções da carga orgânica no reator acidogênico foram pequenas, variando de 5,09 a 36,36% da carga do efluente. Em tratamento anaeróbio, não se espera grande remoção de DQO no reator acidogênico, pois, nesta fase, a matéria orgânica complexa do afluente é transformada em ácidos orgânicos voláteis, que ainda possuem elevada carga orgânica. A pouca redução de carga orgânica que ocorre neste reator é devido à produção e retirada dos gases CO_2 e H_2 do sistema.

Observa-se no Quadro 10, que a redução de carga orgânica variou conforme aumento da carga de entrada. Fernandes Jr. (1995) obteve em reator acidogênico com TRH de um dia, o mesmo utilizado nesta pesquisa, com carga orgânica de entrada de 3,97 gDQO/L reator.dia^{-1}, redução de 24,18% na DQO de manipueira.

Com relação à remoção de cianeto, os reatores se mostraram eficientes nas duas fases, e durante todo o período de funcionamento. O Quadro 11 apresenta os valores médios para os valores de remoção de cianeto.

Quadro 11 – Remoção de cianeto total e livre e porcentagem de remoção durante o funcionamento dos reatores biológicos na degradação da manipueira

Condições (mg/L)			**HCN total**		
1o Ensaio			**% remoção**		
	HCN total	**HCN livre**	**acidogênico**	**metanogênico**	**total**
Manipueira	85,52	15,62	**41,66**	**54,58**	**73,49**
Entrada acidogênico	79,59	9,06			
Saída acidogênico	46,43	9,85			
Saída metanogênico	21,09	15,00			
2º Ensaio					
Manipueira	106,12	10,60	**33,41**	**64,54**	**76,39**
Entrada acidogênico	83,31	9,11			
Saída acidogênico	55,47	5,92			
Saída metanogênico	19,67	19,81			

As maiores remoções de cianeto total também ocorreram no reator metanogênico, confirmando os resultados obtidos por Barana (2000), que encontrou na faixa de pH do reator metanogênico, entre 6,5-7,0, provavelmente em razão da faixa de atuação ótima das enzimas que agem sobre a linamarina.

A média da composição gasosa das amostras dos reatores foi: 91,5% de CO_2 no reator acidogênico e 60% de CH_4 no reator metanogênico. Os volumes de biogás produzidos pelos reatores foram analisados somente por duas vezes durante a duração da pesquisa, para

melhor comprovar o bom funcionamento dos reatores. Obteve-se em média a produção de 20,4 L/dia no reator acidogênico e 79 L/dia no reator metanogênico

5.2 – Estabilidade da enzima linamarase no substrato (manipueira) e efluentes dos reatores

Para estabelecer a importância da linamarase no processo de degradação da linamarina, a atividade da enzima linamarase foi acompanhada no substrato (manipueira) e nos efluentes durante o funcionamento dos reatores.

O Quadro 12 registra as atividades encontradas. No caso específico da atividade da enzima linamarase na manipueira, coletada sob a prensa, foram consideradas duas condições de armazenamento, sob nitrogênio líquido e em temperatura ambiente. A conservação sob nitrogênio líquido permitiu estabelecer a atividade inicial da linamarase da mandioca, enquanto que, sob temperatura ambiente, transportada para o laboratório e usada como afluente, sendo avaliada a perda de atividade durante o transporte. A atividade também foi medida nos efluentes dos reatores acidogênico e metanogênico.

A linamarase, como enzima autóctone da mandioca, pode promover a destoxificação pelo cianeto já durante o processamento da mandioca. A medida da atividade dessa enzima na manipueira pôde fornecer informações a respeito do efeito não microbiano da degradação da linamarina e conseqüentemente de seus compostos intermediários no resíduo manipueira. Principalmente na diferença entre a amostra congelada e não congelada, já que diretamente sob a prensa, a presença de microrganismos era ainda mínima. No Quadro 12, as diferenças observadas nos valores de atividade das enzimas na manipueira, ou atividade inicial, provavelmente devam-se a diversos fatores, tais como, tipo de solo, variedade e idade da planta de mandioca (BORGES e FUKUDA, 1989; FUKUDA e BORGES, 1990), que podem originar plantas com diferentes atividades. Pode-se observar que a perda da atividade neste caso não foi tão significativa quanto à perda da atividade na manipueira que permaneceu a temperatura ambiente (afluente do reator acidogênico) submetida ao tratamento nos reatores (59%). Esse fato se deve a diferença de temperatura ambiente dentro dos reatores, onde é mantida a 35°C no acidogênico e em 32°C no metanogênico. Temperaturas acima de 35°C facilitam a ação da enzima de degradação da linamarina e a liberação de HCN. O tempo de

retenção em que o lote de manipueira foi submetido nos reatores foi bem maior em comparação com o tempo em que foi medida a atividade do afluente do reator acidogênico em relação a atividade inicial, por esta razão a enzima teve um tempo maior de ação sobre o substrato linamarina.

Quadro 12 - Atividade da enzima linamarase

Lotes Manipueiras	Amostragens	Atividade linamarase (UE/mL)	% final de cianeto total
1	Atividade inicial	3,38	
	Afluente reator acidogênico	2,67	
	Efluente reator acidogênico	1,84	
	Efluente reator metanogênico	1,32	81,46%
2	Atividade inicial	0,73	
	Afluente reator acidogênico	0,70	
	Efluente reator acidogênico	0,10	
	Efluente reator metanogênico	0,14	64,15
3	Atividade inicial	1,36	
	Afluente reator acidogênico	1,12	
	Efluente reator acidogênico	0,58	
	Efluente reator metanogênico	0,12	83,40
4	Atividade inicial	4,25	
	Afluente reator acidogênico	2,54	
	Efluente reator acidogênico	2,17	
	Efluente reator metanogênico	1,04	92,39
5	Atividade inicial	4,04	
	Afluente reator acidogênico	2,34	
	Efluente reator acidogênico	1,90	
	Efluente reator metanogênico	1,19	76,10

Os dados do Quadro 12 permitem observar que a enzima perde a sua atividade no transporte, em relação àquela coletada sob as prensas. Na situação do lote 1, a perda da atividade no transporte e armazenamento como afluente do reator acidogênico, foi de 21%. Durante o funcionamento dos reatores, a atividade da enzima na manipueira mantida a temperatura ambiente foi diminuindo ainda mais do reator acidogênico para o metanogênico. Para o lote 4, a redução da atividade da enzima foi de 59%, considerando desde o afluente do reator acidogênico até o efluente do reator metanogênico.

Comparando-se o mesmo lote (4) de manipueira coletada sob as prensas, onde uma parte, como no lote 1, foi mantida a temperatura ambiente (±27°C) (afluente do reator acidogênico) e a outra sob conservação em nitrogênio líquido, foi possível comparar estas duas situações e estabelecer a redução da atividade da enzima linamarase, que foi de 68% pelo transporte.

Observa-se no Quadro 12, que o comportamento foi diferente quando a atividade inicial da enzima era alta (lotes 4 e 5), a redução da atividade foi menor em comparação com a redução dos lotes de manipueira, mas quando a atividade da enzima já se encontra num valor mais baixo sob nitrogênio líquido (lote 2), sua atividade se mantém praticamente estável nas duas condições. Em decorrência, pode-se esperar uma atividade remanescente da linamarase, durante o tratamento da manipueira de farinheiras por digestão anaeróbia.

Relacionando atividade da enzima linamarase com teor de cianeto, observa-se no Quadro 12 para os lotes de manipueira 1, 5 e 6, que não necessariamente onde são maiores as remoções de cianeto, a enzima tem maior atividade. No lote 1 a atividade inicial da enzima foi 3,385 UE/mL e a remoção de cianeto total 81% e no lote 5 a atividade foi 4,092 UE/mL e a remoção de cianeto total 76%. Oliveira et al. (1998) estudaram o comportamento da enzima linamarase e os teores de cianeto em folhas de mandioca, onde concluíram que existe uma correlação entre a atividade da linamarase e teor de cianeto em certas épocas do ano. No caso dos resultados mostrados no Quadro 12, talvez a época do ano que as raízes de mandioca foram coletadas não coincidiram com atividade e teor de cianeto maiores ou também pode ser que a informação fornecida pelos pesquisadores seja válida somente para folhas de mandioca e não, no caso, para as raízes.

5.3 – Avaliação quantitativa da volatilização do cianeto nos reatores

No item anterior, ficou comprovado que existe atividade da linamarase autóctone da mandioca no substrato e que altas porcentagens de remoção de cianeto total foram obtidas, em acordo com a literatura. Para conhecer o destino final da degradação do cianeto, foi usada uma metodologia de captura para análise do cianeto arrastado pelos gases dos biodigestores. Tomou-se como hipótese que o HCN formado no processo de degradação da manipueira no sistema de reatores com separação de fases acidogênica e metanogênica, seria possivelmente

arrastado na forma gasosa junto dos gasômetros dos reatores. As condições dos reatores favorecem a eliminação do ácido cianídrico e também a sua volatilização, principalmente no reator acidogênico, pois suas condições de temperatura e pH que são 35°C e 5,5, respectivamente, propiciam a degradação da acetonacianidrina através de uma reação espontânea (McMahon et al., 1995). Por outro lado, o reator metanogênico atua em faixas de pH próximas das condições neutras. Estudos prévios em relação a perda de HCN na forma gasosa têm mostrado que o pH tem um efeito significativo na taxa de liberação do HCN na forma gasosa.

O Quadro 13 apresenta os resultados de redução de cianeto total e livre e volatilização do HCN durante os três ensaios realizados. Os resultados obtidos confirmam os de Barana (2000) que relata também redução de cianeto total por volta de 88% no tratamento da água de residual de mandioca em biodigestores com separação de fases. Nos três ensaios monitorados nesta pesquisa a maior remoção de cianeto total também ocorreu no reator metanogênico chegando em um valor máximo de 86,75%.

O reator acidogênico opera em condições ligeiramente ácidas (pH:5,5-6,0/T: 35°C). Por outro lado, o reator metanogênico atua em faixas de pH próximas das condições neutras (pH:6,5-7,0/T: 32°C). Provavelmente, as condições em que o reator acidogênico é conduzido para o tratamento da água de residual de farinheiras de mandioca faz com que seja favorecida a degradação da linamarina pela ação enzimática de linamarase da mandioca e de microrganismos, com posterior degradação da acetonacinidrina de maneira espontânea, liberando ácido cianídrico principalmente nessa fase. Fermentações em valores de pH menores ou iguais a 4,0, que inibem a decomposição espontânea da acetonacianidrina, fazendo com que fiquem retidas, resultam em maior toxicidade do resíduo, já que a linamarina não é decomposta (Tylleskar et al., 1992).

Os resultados de degradação da linamarina e do ácido cianídrico captado nos três ensaios são resumidos no Quadro 13. Considerando-se o valor médio de 45,91mg/L CN total (ensaio 1) com a vazão de 6L/reator/dia, obtém-se por cálculo 275,46 mg de cianeto total como correspondente ao que entrou com o substrato no reator acidogênico em 24 horas. Na saída, apenas 44,17 mg de cianeto total foram detectados, correspondendo a 265,02 mg/dia. A diferença, de 10,22 mg/dia, corresponde ao cianeto total removido em 24 horas. O ácido cianídrico correspondente a esta remoção poderia ser arrastado com os gases no reator

acidogênico e metanogênico. Apenas 0,14 mg/24 horas foram detectados no carbonato de sódio que capturou o acido cianídrico nos gases de cada reator no mesmo período. O mesmo cálculo pode ser feito para o reator metanogênico. Com vazão de 3,11L e com teor de cianeto na entrada de 44,17 mg/L (saída do acidogênico), calcula-se que entrou 137,37 mg de cianeto total em 24 horas. O teor de cianeto total na saída do reator metanogênico equivalente a 98,83mg/24 horas. Como no reator acidogênico, a diferença de 38,54mg/24 horas corresponde ao cianeto total removido, que também poderia ser arrastado com os gases do reator metanogênico. Segundo Lopes (2001), para cada mol (240mg) de linamarina degradada são geradas 27mg de HCN. Considerando-se esses equivalentes, a quantidade de ácido cianídrico detectados de 0,14 mg/24 horas corresponderia 1,24 mg/24 horas de linamarina para cada reator, com um total de 2,49 mg/24 horas. Este valor é muito menor que os 38,54 mg de cianeto total removidos em cada um dos reatores no mesmo período.

Os mesmos cálculos podem ser feitos com os resultados dos demais ensaios, como consta no Quadro 13. Esses resultados mostram que a quantidade de ácido cianídrico dosado nos gases corresponde a uma fração muito pequena da linamarina ou de seus metabólicos degradados. Mostram também que não se pode generalizar sobre em que reator ocorre maior arraste de cianeto com os gases. Se no ensaio 1 as quantidades foram iguais, no ensaio 2 houve quase o dobro de acido cianídrico no acidogênico e no ensaio 3, foi nos gases do metanogênico que foram detectados os maiores teores.

Os resultados obtidos mostram claramente que uma parte muito pequena de HCN foi eliminado na forma de ácido cianídrico (HCN) e que, mesmo havendo maior remoção de cianeto total no efluente do reator metanogênico (Quadro 11), o arraste para os gases não acompanhou esta tendência. Nas condições em que os ensaios foram realizados e que corresponderam aos resultados de digestão anaeróbia de água de prensagem da massa ralada de mandioca relatados na literatura, foi possível contatar que a maior degradação da linamarina ocorre no reator acidogênico, mas o produto da degradação é quase que totalmente metabolizada nos reatores e muito pouco é perdido na forma de HCN com os gases gerados. Como não foi comprovado o arraste do cianeto livre com os gases, cabe supor que a diferença pode ter sido metabolizada por microrganismos.

Quadro 13 - Balanço de teores de cianeto total nos reatores e HCN captado nos gases

	Vazão	**Cianeto Total**	**CianetoTotal**		**HCN**
	L/reator/dia	mg/L	mg/24 h.		mg/24 h.
			Entrada	Saída	Captado
Ensaio 1					
Acidogênico	6,00	45,91	275,46	265,02	0,14
Metanogênico	3,11	44,17 (31,78)	137,37	98,83	0,14
Total					0,28
Ensaio 2					
Acidogênico	6,00	47,23	283,38	269,16	0,29
Metanogênico	3,11	44,86 (41,26)	139,51	128,32	0,18
Total					0,47
Ensaio 3					
Acidogênico	6,00	60,67	364,02	299,58	0,10
Metanogênico	3,11	49,93(20,55)	155,28	63,91	0,19
Total					0,29

Legenda - valores entre parêntesis correspondem ao cianeto total de saída.

5.4 - Quantificação do metabolismo dos microrganismos sobre a linamarina

Embora tenha sido demonstrado que apenas uma pequena parte do HCN degradado dos efluentes do tratamento anaeróbio de água residual de manipueira tenha sido volatilizada através dos gasômetros dos reatores, essa volatilização sozinha não explica o destino da maior parte do ácido cianídrico presente na manipueira. Avaliada a volatilização, usou-se para esse fim testes microbiológicos *in vitro*. Os ensaios foram divididos em duas fases, primeiramente avaliou-se a linamarina exógena em concentração conhecida como principal fonte de nutrientes (C e N), para observar o metabolismo microbiano em condições controladas. Em um segundo ensaio, foi avaliado a degradação da acetonacianidrina em condições semelhantes.

Os Quadros 15, 16 e 17 e as Figuras 14, 15 e 16, ilustram os resultados dos ensaios onde a linamarina foi adicionada ao meio de cultivo tendo como inóculo manipueira e inóculos provenientes dos efluentes dos reatores. Cada Quadro e Figura, mostram o comportamento de cada inóculo em duas condições: para os inóculos provenientes da manipueira e efluente do reator acidogênico, condições aeróbia e anaeróbia e para o inóculo proveniente do efluente do reator metanogênico, condições sem e com amostragem de gás nos frascos. Nas seis situações, imediatamente após a introdução da linamarina no meio de cultivo (t=0), observou-se que já havia sido iniciada a degradação da linamarina.

Estudos com relação à atividade da enzima linamarase, revelam a importância do pH e da temperatura no processo de degradação da linamarina. A enzima possui estabilidade térmica entre 15 e 30°C e pH ótimo na faixa de 6,0 (CORREA et al. 2002). Os frascos-reatores onde foram realizados os testes microbiológicos foram incubados a 30±2°C e mantidos em valores de pH próximos àqueles dos reatores que deram origem aos inóculos.

Observa-se no Quadro 14 que, ao longo do processo de incubação, os valores de pH dos frascos-reatores mostraram alterações.

Quadro 14 – Valores de pH ao longo dos ensaios *in vitro* com a linamarina

Inóculo		**pH**	
	duplicatas	Inicial	Final
Manipueira	anaeróbio	5,4	3,1
	anaeróbio	5,4	3,1
	aeróbio	5,4	6,5
	aeróbio	5,4	6,6
Efluente acidogênico	anaeróbio	5,6	4,1
	anaeróbio	5,6	4,0
	aeróbio	5,6	7,4
	aeróbio	5,6	7,4
Efluente metanogênico	anaeróbio com amostragem de gás	6,8	6,3
	anaeróbio com amostragem de gás	6,8	6,4
	anaeróbio sem amostragem de gás	6,8	6,4
	anaeróbio sem amostragem de gás	6,8	6,3

Os frascos que receberam os inóculos manipueira e efluente do reator acidogênico tiveram seu pH inicial ajustado com ácido sulfúrico 1M para 5,4 e 5,6, respectivamente. Já os frascos que receberam inóculo do efluente do reator metanogênico tiveram seu pH ajustado com hidróxido de sódio 1N para 6,8.

Ao longo de 34 dias de incubação, observa-se que houve aumento de acidez nos frascos sob anaerobiose com inóculo de manipueira e com inóculo do efluente do reator acidogênico. A situação dos mesmos frascos sob aerobiose foi diferente e mais próximas da realidade dos reatores. Observou-se um aumento do pH indicando consumo dos compostos ácidos formados. Frascos com inóculo do reator metanogênico sob anaerobiose tiveram alteração no seu pH para valores menores, evidenciando acidificação, provavelmente devido a poucas bactérias metanogênicas presentes, pois o inóculo do reator metanogênico foi obtido de seu efluente e na da flora microbiana no interior do reator no meio suporte. Um fato que

reforça a ausência de microrganismos metanogênicos nesse inóculo, foi que medidas de gás da atmosfera destes frascos mostraram que não houve a produção de metano, comprovando a ausência de microrganismos metanogênicos.

Quadro 15 – Degradação da linamarina ao longo do tempo por inóculo manipueira

	Condições (mg/L)	
	concentração remanescente de linamarina	
tempo (dias)	aeróbia	anaeróbia
0	251,30	259,00
1	19,40	21,50
5	16,40	3,00
8	0,00	0,00
14	0,00	0,00
19	0,00	0,00
23	0,00	0,00
29	0,00	0,00
34	0,00	0,00

Partindo-se do tempo zero (Quadro 15), de uma concentração inicial de 250 mg/L em média, para as condição aeróbia e anaeróbia, temos que o inóculo manipueira apresentou melhor resultado na degradação da linamarina, pois conseguiu em oito dias de incubação uma degradação de toda a linamarina nas duas condições. Na Figura 14, nas duas condições (aeróbia e anaeróbia) a que os microrganismos foram expostos, a curva de degradação apresentou o mesmo perfil.

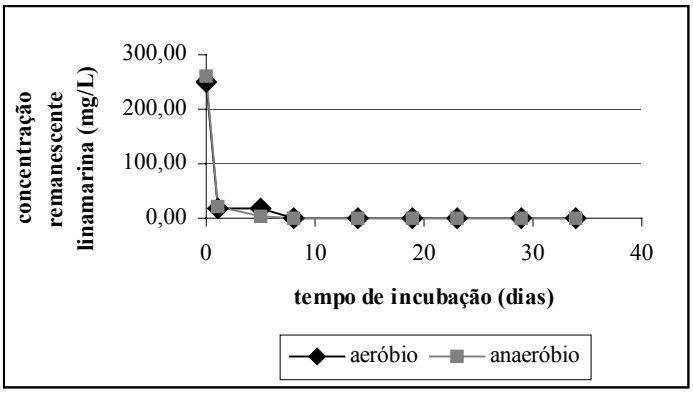


Figura 14 - Degradação da linamarina por inóculo proveniente da manipueira

O inóculo manipueira degradou por completo a linamarina em 8 dias, mas no primeiro dia de incubação, o teor já estava próximo de nulo, tanto nas condições aeróbias quanto nas condições anaeróbias, diferentemente do inóculo acidogênico o qual degradou a

linamarina em tempos diferentes para as duas condições, sendo a condição aeróbia mais rápida.

Quadro 16 – Degradação da linamarina ao longo do tempo por inóculo proveniente do efluente do reator acidogênico

	Condições (mg/L)	
	concentração remanescente de linamarina	
tempo (dias)	aeróbia	anaeróbia
0	0,80	0,69
1	0,78	0,61
5	0,65	0,58
8	0,61	0,20
14	0,00	0,21
19	0,00	0,20
23	0,00	0,19
29	0,00	0,00
34	0,00	0,00

Com relação ao inóculo do reator acidogênico (Quadro 16), a concentração em t=0 era de 0,80 mg/L em condição aeróbia e 0,69 mg/L em condição anaeróbia. Essas duas concentrações, em t=0, também foram baixas e ainda na condição anaeróbia a degradação foi muito lenta, pois a linamarina foi totalmente degradada em 29 dias, enquanto que já na condição aeróbia aos 14 dias havia desaparecido. Este fato já era esperado, pois no inóculo proveniente do efluente do reator acidogênico, os microrganismos são facultativos, portanto podem apresentar metabolismo sob aerobiose. Os microrganismos anaeróbios podem não estar em quantidades significativas neste inóculo.

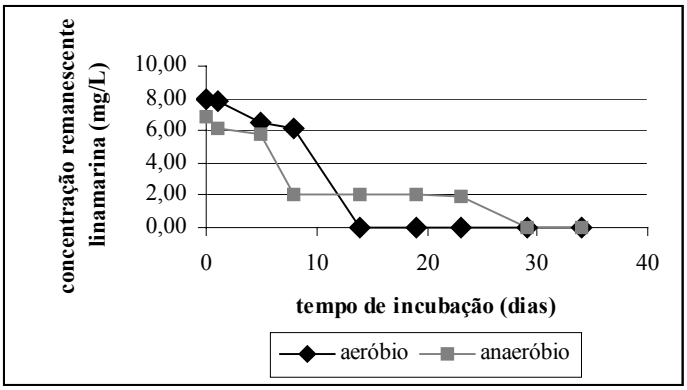


Figura 15 – Degradação da linamarina por inóculo proveniente do efluente do reator acidogênico

Observando a Figura 15, nas condições anaeróbias ocorreu um patamar do 8º ao 23º dia e apenas no 29º dia a linamarina foi totalmente degradada. Possivelmente, durante redução de atividade da linamarase possa ter havido o acúmulo de glicose, proveniente da quebra inicial da linamarina. Desta maneira, os microrganismos tendo como fonte de carbono e energia a glicose, priorizaram seu uso, esgotando-se a glicose, voltaram a degradar a linamarina.

Leituras para análise da composição gasosa da atmosfera dos frascos-reatores, mostraram que os resultados de degradação da linamarina foram semelhantes no tempo inicial (t=0) (Quadro 17). Os resultados de degradação da linamarina nas condições metanogênicas não foram afetados nos frascos onde foram feitas amostras para a leitura de gás, não havendo significativa volatilização de HCN dos frascos amostrados.

Quadro 17 – Degradação da linamarina ao longo do tempo por inóculo proveniente do efluente do reator metanogênico

	Condições (mg/L)	
	concentração remanescente de linamarina	
tempo (dias)	com amostragem de gás	sem amostragem de gás
0	6,50	5,30
1	0,00	4,79
5	0,00	0,00
8	0,00	0,00
14	0,00	0,00
19	0,00	0,00
23	0,00	0,00
29	0,00	0,00
34	0,00	0,00

Nos frascos onde ocorreu à amostragem de gases, 93,5% da linamarina havia sido degradada no t=0 e no frasco onde não foi feita a amostragem, 94,7% da linamarina havia sido degradada no mesmo tempo. Entretanto, nos frascos onde houve amostragem de gases, alteração da atmosfera interna, o consumo da linamarina foi mais rápido, ocorrendo em 1 dia, enquanto que nos frascos com atmosfera intacta, a degradação ocorreu em 5 dias.

Comparando-se os resultados de todos os inóculos testados no tempo zero, para o os ensaios, observa-se diferenças notáveis. Por exemplo, o inóculo proveniente da manipueira, o qual apresentou a maior concentração de linamarina remanescente (aeróbio: 251 mg/L; anaeróbio: 259 mg/L), enquanto que para os inóculos proveniente do reator acidogênico (aeróbio: 0,80 mg/L; anaeróbio: 0,69 mg/L) e proveniente do reator metanogênico (com amostragem de gás: 6,5 mg/L; sem amostragem de gás: 5,3 mg/L), valores bem menores de

linamarina remanescente foram observados, partindo-se de uma mesma concentração inicial para todos os inóculos.

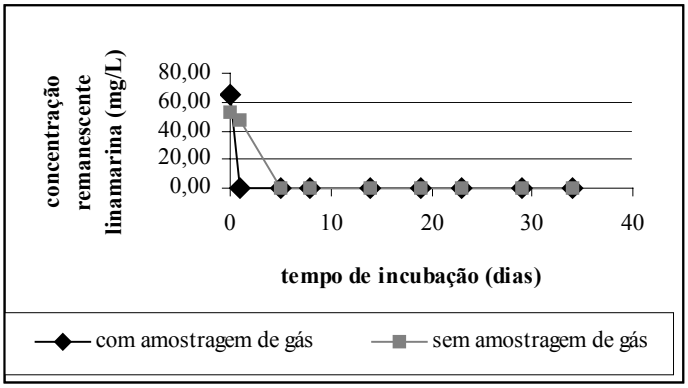


Figura 16 – Degradação da linamarina por inóculo proveniente do efluente do reator metanogênico, com e sem amostragem de gás.

Observando os demais resultados, tem-se que em um dia de incubação, o inóculo do reator metanogênico na condição com amostragem de gás, degradou uma concentração de 6,50 mg/L de linamarina, enquanto na condição sem amostragem de gás, foi degradada uma concentração de 5,30 mg/L em 5 dias. Esses resultados mostram que, o inóculo metanogênico mostrou-se também apto a degradar a linamarina, partindo-se de uma concentração bem pequena em t=0, mas não mostrou tanta eficiência na degradação quanto o inóculo de manipueira, que degradou, nas duas condições dos ensaios, uma média de 250 mg/L de linamarina em apenas oito dias.

A rapidez inicial (t=0), com que se deu a degradação da linamarina, nas condições de cada inóculo, explica-se pela ação da enzima linamarase autóctone já presente nos inóculos, enquanto a ação complementar provavelmente se deva à ação conjunta da linamarase remanescente e do metabolismo dos microrganismos. Esta afirmação encontra reforço no fato descrito no item 5.2 deste capítulo, de que foi detectada atividade da enzima linamarase em todos os passos do processo de degradação da manipueira, sendo decrescente, desde a coleta até a saída no efluente do reator metanogênico. Giraud et al (1992), estudaram o potencial de bactérias produtoras de ácido láctico na degradação da linamarina presente na mandioca e constataram, através de análises em HPLC, que a linamarina foi totalmente degradada gerando ácido láctico e acetonacianidrina depois de um curto período de incubação de 30 minutos a 30°C e pH 5,5 em meio aeróbio. Nos ensaios desta pesquisa também com linamarina, o

inóculo manipueira (pH 5,4) foi submetido a condições semelhantes e proporcionou rápida degradação de altas concentrações de linamarina em 8 dias nas condições aeróbia e anaeróbia.

A degradação da linamarina foi total em todos os ensaios e variou de 1 a 29 dias em função da condição e tipo de inóculo. A degradação mais rápida foi do inóculo metanogênico com amostragem de gás (1 dia) e a mais lenta, com 29 dias, corresponde ao inóculo acidogênico em condições anaeróbias.

Giraud et al (1992) avaliou a ação de bactérias produtoras de ácido láctico em um ensaio *in vitro,* partindo-se de um extrato de mandioca submetido à fervura para a inativação da enzima linamarase endógena e onde foi extraída a linamarina do extrato pela ação do ácido ortofosfórico. Estudou a liberação de cianeto livre num período de 180 minutos em quatro ensaios. No extrato de mandioca controle (extrato com linamarase inativada) não foi detectado cianeto livre, nem mesmo após a adição de linamarina (ensaio 1). Após a adição de linamarase, a quantidade de cianeto livre aumentou rapidamente e manteve-se em um patamar, após 60 minutos (ensaio 2). A adição de células da *L. plantarum* A6 ao extrato de mandioca (ensaio 3) resultou na geração de cianeto livre, comparado ao que havia sido previamente observado. A bactéria sozinha foi capaz de hidrolisar uma grande quantidade de linamarina (ensaio 4). Como pôde ser observado, várias são as rotas metabólicas utilizadas pelos microrganismos na degradação de cianeto, demonstrando a versatilidade da adaptação microbiana ao meio onde se encontram ou são inoculados.

A taxa de degradação da linamarina complementa os resultados de degradação pelos inóculos. Os Quadros 18, 19 e 20, apresentam taxas de degradação que permite comparar os resultados entre si. O Quadro 18 apresenta as taxas de degradação da linamarina com inóculo de manipueira.

Quadro 18 – Taxa de degradação da linamarina com inóculo de manipueira nas condições aeróbias e anaeróbias

Condições do inóculo					
Manipueira sob anaerobiose			Manipueira sob aerobiose		
tempo (dias)	linamarina remanescente (mg/L)	taxa de degradação (mg/24h.)	tempo (dias)	linamarina remanescente (mg/L)	taxa de degradação (mg/24h.)
0	259,00	-	0	251,3	-
1	21,50	237,50	1	19,40	231,90
5	3,00	4,63	5	16,40	0,75
8	0,00	1,00	8	0,00	5,47
14	0,00	0,00	14	0,00	0,00
19	0,00	0,00	19	0,00	0,00
23	0,00	0,00	23	0,00	0,00
29	0,00	0,00	29	0,00	0,00
34	0,00	0,00	34	0,00	0,00

As velocidades iniciais de degradação da linamarina com o inóculo manipueira foram as maiores quando comparados os três inóculos (faixa de 250mg/24h.) para as duas situações (anaeróbia e aeróbia). Fica claro, dessa maneira, que nessas condições a linamarina foi degradada mais rapidamente. No prazo de 8 dias o composto havia sido totalmente degradado nas duas condições (aeróbias e anaeróbias). A análise da taxa de degradação da linamarina permitiu confirmar que existem diferenças quanto à velocidade de degradação nas diferentes condições do ensaio.

No Quadro 19, comparando-se as duas condições (anaeróbia e aeróbia), observou-se inicialmente que a velocidade de degradação foi maior para a condição anaeróbia (0,80mg/24h.) com relação à velocidade para a condição aeróbia, levando a uma maior quantidade de linamarina remanescente na segunda condição.

Quadro 19 – Taxa de degradação da linamarina com inóculo proveniente do efluente acidogênico em condições aeróbias e anaeróbias

Condições do inóculo					
Acidogênico sob anaerobiose			Acidogênico sob aerobiose		
tempo (dias)	linamarina remanescente (mg/L)	taxa de degradação (mg/24h.)	tempo (dias)	linamarina remanescente (mg/L)	taxa de degradação (mg/24h.)
0	6,90	-	0	8,00	-
1	6,10	0,80	1	7,80	0,20
5	5,80	0,08	5	6,50	0,33
8	2,10	1,23	8	6,10	0,13
14	2,00	0,02	14	0,00	1,02
19	2,00	0,00	19	0,00	0,00
23	1,90	0,03	23	0,00	0,00
29	0,00	0,32	29	0,00	0,00
34	0,00	0,00	34	0,00	0,00

Neste item 5.4 (Figura 15), foi comentado que para esse mesmo inóculo na condição aeróbia, toda a linamarina havia sido degradada no 14º dia, enquanto que na anaeróbia, a linamarina somente foi totalmente degradada no 29º dia. Observando as taxas de degradação para cada intervalo, constata-se que na condição aeróbia a taxa de degradação no 14º dia aumentou seu valor em quase oito vezes (0,13 para 1,02mg/24h), enquanto que na condição anaeróbia, do mesmo ensaio e no mesmo tempo, a taxa de degradação diminuiu 60 vezes (1,23 para 0,02mg/24h.), explicando-se o fato da linamarina ter sido degradada totalmente em menor tempo na condição aeróbia. Reforçando estes resultados pode-se observar o que ocorreu em estudo já citado, Giraud et al (1992) estudando dez linhagens de bactérias na degradação da linamarina. Os autores descobriram que dentre as bactérias produtoras de ácido láctico, a *L. plantarum* A6 apresentou uma maior taxa na degradação da linamarina também em meio aeróbio.

Comparando as taxas de degradação da linamarina com os inóculos manipueira e efluente do reator acidogênico (Quadros 18 e 19), observa-se que quanto maior a taxa de degradação inicial, mais rápida é a degradação total da linamarina.

Quadro 20 – Taxa de degradação da linamarina com inóculo proveniente do efluente metanogênico com e sem amostragem dos gases

Condições do inóculo					
Metanogênico sob anaerobiose, com amostragem de gás			Metanogênico sob anaerobiose, sem amostragem de gás		
tempo (dias)	linamarina remanescente (mg/L)	taxa de degradação (mg/24h.)	tempo (dias)	linamarina remanescente (mg/L)	taxa de degradação (mg/24h.)
0	65	-	0	53	-
1	0,00	65,00	1	47,90	5,10
5	0,00	0,00	5	0,00	11,98
8	0,00	0,00	8	0,00	0,00
14	0,00	0,00	14	0,00	0,00
19	0,00	0,00	19	0,00	0,00
23	0,00	0,00	23	0,00	0,00
29	0,00	0,00	29	0,00	0,00
34	0,00	0,00	34	0,00	0,00

O teor de linamarina no tempo zero, nas duas condições, foi semelhante (65 e 53mg/L). Nos frascos com amostragem de gás, houve modificação da atmosfera interna. Na Figura 16 havia sido observado que esse procedimento não interferiu na concentração de linamarina no tempo inicial (t=0), mas sim na velocidade da degradação. Enquanto que, para

as condições com amostragem de gás, a velocidade foi muito maior (65,00 mg/24 horas). Nas situações onde não houve a leitura, a taxa de degradação foi bem menor, o que explica o tempo maior para a degradação total da linamarina na Figura 16. Nas condições onde houve leitura de gás, a linamarina foi degradada totalmente em um dia e na condição onde não houve a leitura a linamarina foi degradada em 5 dias.

Comparando as taxas de degradação apresentadas pelo inóculo acidogênico com as do inóculo metanogênico nas condições aeróbias e anaeróbias, observa-se que nas duas condições, a linamarina foi degradada mais rapidamente, com maior velocidade de degradação, com inóculo proveniente do efluente metanogênico (Quadro 20). Na presença do inóculo acidogênico, a linamarina somente foi totalmente degradada em um período comparativamente maior, pois a velocidade de degradação foi menor com relação ao inóculo metanogênico.

Para completar os resultados, foi feita dosagem de cianeto total e livre (produtos do metabolismo da linamarina). Estas dosagens foram realizados nas amostras dos ensaios *in vitro,* para que pudesse haver uma comparação com os a determinação por HPLC. O Quadro 21 apresenta as condições dos inóculos, aplicados nos testes *in vitro*, e as concentrações finais nos mesmos ensaios, com relação ao teor de cianeto total e livre.

Quadro 21 – Teores de cianeto total e livre medidos nos inóculos e ao final dos ensaios *in vitro* com a linamarina

	Condições Cianeto mg/L			
	Inóculo			
	total		**livre**	
Manipueira	63,15		15,93	
Efluente acidogênico	31,68		3,74	
Efluente metanogênico	3,69		3,76	
Manipueira	**anaeróbio**	**aeróbio**	**anaeróbio**	**aeróbio**
	34,21	0,00	28,70	0,33
	43,77	0,00	36,73	0,24
Efluente acidogênico	**anaeróbio**	**aeróbio**	**anaeróbio**	**aeróbio**
	23,18	0,0	24,69	0,23
	20,17	0,0	18,77	0,28
Efluente metanogênico	**anaeróbio com amostragem de gás**	**anaeróbio sem amostragem de gás**	**anaeróbio com amostragem de gás**	**anaeróbio sem amostragem de gás**
	25,64	22,07	14,28	10,84
	28,29	19,25	16,10	13,61

Os frascos-reatores aeróbios que receberam o inóculo manipueira tiveram o seu cianeto total degradado e pouco restou na forma livre, portanto esse inóculo foi mais eficiente. Da mesma forma, os frascos-reatores aeróbios com inóculo proveniente do efluente do reator acidogênico se mostrou mais eficiente na remoção de todo o cianeto total, com pouco cianeto livre residual.

Nas condições anaeróbias, onde foi empregado inóculo proveniente do efluente do reator metanogênico, a remoção de cianeto total foi similar àquelas dos frascos que receberam o inóculo proveniente do efluente do reator acidogênico em condições anaeróbias, isto é, houve remoção de cianeto total na faixa de 20%, mas a metade permaneceu como cianeto livre. Comparando-se as concentrações iniciais de cianeto total que acompanharam os inóculos, os frascos com inóculo do efluente do reator metanogênico já receberam inicialmente menos cianeto total que o nos inóculos anteriores.

A quantidade de cianeto livre produzida nas três condições do teste deve ser gaseificada ou metabolizada. Nas condições aeróbias com inóculo da manipueira e com inóculo do efluente do reator acidogênico as quantidades de cianeto livre foram baixas, caracterizando uma ou as duas hipóteses. De uma maneira geral, nas condições anaeróbias sem amostragem de gás e com inóculo do efluente do reator metanogênico, as quantidades de cianeto livre foram maiores do que as condições aeróbias citadas, já que a volatilização do cianeto livre foi reduzida pelo fechamento dos frascos.

5.5 - Quantificação do metabolismo dos microrganismos com a acetonacianidrina

A acetonacianidrina é produto do metabolismo da linamarina com a enzima linamarase. Como já citado, a enzima hidroxinitriloliase agindo na acetonacianidrina libera acetona e HCN. A ação desta enzima sobre a acetonacianidrina ocorre em pH entre 3,5-6,0 e temperaturas menores que 60°C. O ponto de ebulição da acetonacianidrina é 82°C.

Como nos ensaios *in vitro* com a linamarina, nas seis condições dos ensaios *in vitro* com a acetonacianidrina, foi observado que houve início à degradação do composto imediatamente após a introdução da acetonacianidrina em t=0. Neste caso também, a rapidez com que se deu esta degradação é explicada pela à ação da enzima hidroxinitriloliase

autóctone já presente nos inóculos, podendo também haver uma ação complementar dos microrganismos.

Em todos os ensaios ocorreu a degradação total da acetonacianidrina, variando de 23 a 94 dias, dependendo da condição e tipo de inóculo. Existe uma hipótese que explica porque os testes com a acetonacianidrina foram degradados de uma forma mais vagarosa. baseado na Figura 8 item 3.4.1 do capítulo Revisão Bibliográfica, quando a linamarina é hidrolisada existe a liberação de glicose, assim sendo, os microrganismos degradariam as moléculas de glicose, obtendo muito mais energia do que os microrganismos que estariam degradando a acetonacianidrina e desta maneira degradariam mais moléculas de linamarina em menor tempo.

A degradação mais rápida foi observada em condições anaeróbias com inóculo proveniente do reator acidogênico (23 dias) e a mais lenta ocorreu aos 94 dias, corresponde ao inóculo manipueira em condições anaeróbias.

As Figuras 17,18 e 19 e os Quadros 22, 23 e 24, ilustram os resultados de degradação da acetonacianidrina juntamente com o inóculo manipueira e inóculos provenientes dos efluentes dos reatores ao longo do tempo em testes *in vitro*. Os Quadros citados complementam as explicações para cada Figura correspondente. Cada inóculo foi submetido às mesmas condições que nos ensaios da linamarina *in vitro.*

Quadro 22 - Degradação da acetonacianidrina ao longo do tempo por inóculo proveniente da manipueira

	Condições (mg/L)	
	concentração remanescente de acetonacianidrina	
tempo (dias)	aeróbia	anaeróbia
0	237,20	225,40
2	165,40	207,90
14	14,80	196,00
23	4,00	187,10
35	4,30	177,80
45	3,10	169,20
87	0,00	0,00
94	0,00	0,00

Na Figura 17, a porcentagem de acetonacianidrina remanescente no t=0 para a condição aeróbia, foi de 237,20 mg/L. Apenas no 87º dia foi alcançada a total degradação da acetonacianidrina. Para a condição anaeróbia, a acetonacianidrina foi degradada de maneira

similar à condição aeróbia, isto é, em t=0 a concentração da acetonacianidrina era de 225,40 mg/L e todo o composto foi degradado também em 87 dias.

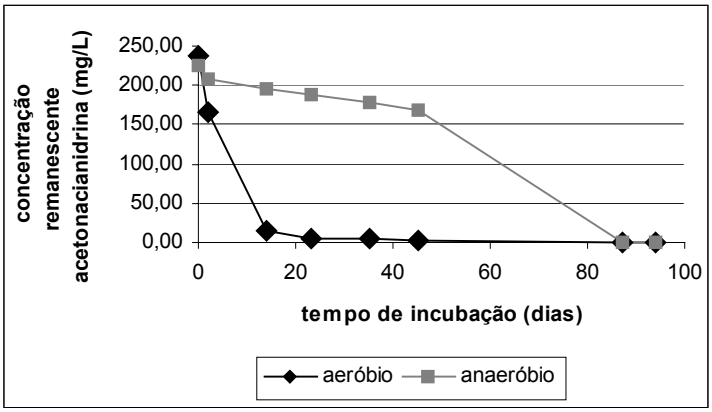


Figura 17 – Degradação da acetonacianidrina por inóculo manipueira

Com inóculo proveniente da manipueira, parece que os microrganismos ainda não estão totalmente adaptados para a degradação dos compostos de cianeto presentes, mas mesmo assim a condição aeróbia parece favorecer essa degradação se comparadas às condições anaeróbias.

Quadro 23 - Degradação da acetonacianidrina ao longo do tempo por inóculo proveniente do efluente do reator acidogênico

	Condições (mg/L)	
	concentração remanescente de acetonacianidrina	
tempo (dias)	aeróbia	anaeróbia
0	347,20	314,30
2	138,90	308,00
14	5,60	281,10
23	0,00	283,10
35	0,00	267,10
45	0,00	267,00
87	0,00	0,00
94	0,00	0,00

Na Figura 18, observa-se que, em condições aeróbias, a degradação da acetonacianidrina ocorreu de uma maneira mais rápida em relação às condições anaeróbias, com a degradação total alcançada no 23º dia. Na condição anaeróbia essa degradação total só ocorreu no 87º dia.

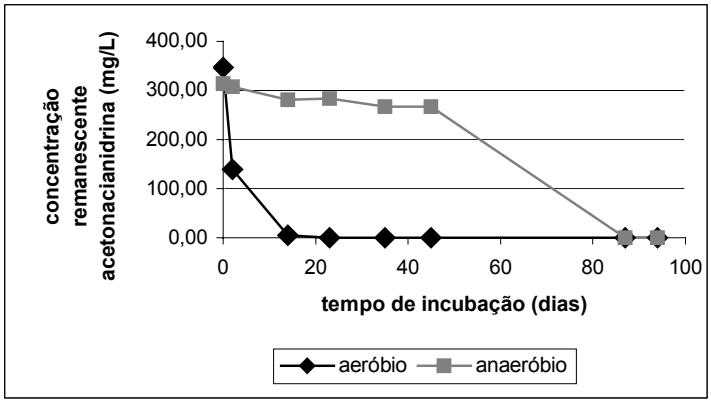


Figura 18 - Degradação da acetonacianidrina por inóculo proveniente do efluente do reator acidogênico

Mais uma vez a condição aeróbia, e principalmente o uso do inóculo proveniente do efluente do reator acidogênico, foi mais adequado à degradação da acetonacianidrina.

Quadro 24 - Degradação da acetonacianidrina ao longo do tempo por inóculo proveniente do efluente do reator metanogênico

	Condições (mg/L)	
	concentração remanescente de acetonacianidrina	
tempo (dias)	com amostragem de gás	sem amostragem de gás
0	382,86	323,80
2	382,00	315,00
14	263,50	271,30
23	254,70	240,34
35	243,90	238,10
45	233,50	271,30
87	51,20	16,70
94	0,00	0,00

Resultados de degradação da acetonacianidrina também não foram afetados pela amostragem de gases que poderiam ter alterado a composição da atmosfera dos frascos-reatores. As duas curvas de degradação apresentadas na Figura 19 são praticamente coincidentes.

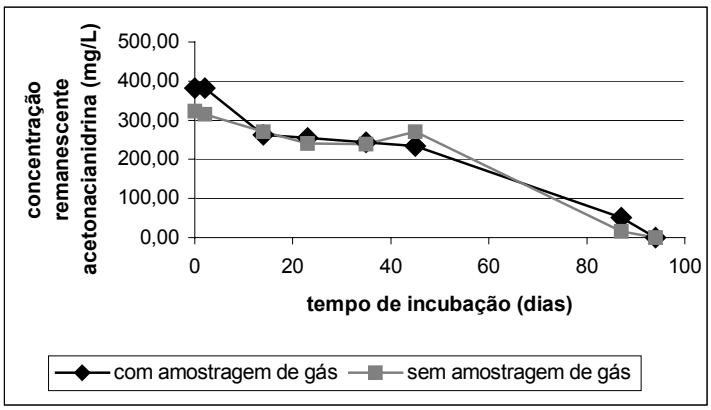


Figura 19 – Degradação da linamarina por inóculo proveniente do efluente do reator metanogênico

Segundo McMahon et al. (1995), a acetonacianidrina é hidrolisada no passo final da cianogênese. Essa reação pode ocorrer espontaneamente ou pela ação da ennzima hidronitriloliase. Devido à lentidão com que a acetonacianidrina foi degradada na maioria das condições, pode ser que a degradação deva-se a reação espontânea de degradação da acetonacianidrina em complemento com ação dos microrganismos.

Em complementação a degradação da acetonacianidrina ao longo do tempo de incubação, foram também realizados cálculos com relação à taxa de degradação pelos microrganismos nos testes *in vitro*, para comparação entre os ensaios.

De uma maneira geral, os testes *in vitro* com a acetonacianidrina quando comparados com os testes *in vitro* com a linamarina apresentaram uma diferença acentuada na rapidez com que o composto foi degradado. Os testes realizados com a acetonacianidrina revelaram uma degradação mais vagarosa, levando entre 87 a 94 dias para a total degradação do composto. No ensaio com a acetonacianidrina as condições com uso dos inóculos: proveniente do reator metanogênico, com e sem amostragem de gás, da manipueira, aeróbio e anaeróbio, e proveniente do efluente do reator acidogênico, aeróbio e anaeróbio, foram comparadas com uso dos mesmos inóculos no ensaio com a linamarina, mostrando que houve diferenças significativas com relação à rapidez de degradação, sendo a linamarina degradada em todas as condições mais rapidamente. Com inóculo proveniente do reator metanogênico, a acetonacianidrina foi totalmente degradada em 94 dias e a linamarina foi totalmente degradada, em um dia, sempre para as duas condições nos dois casos. Com o inóculo manipueira, a acetonacianidrina foi totalmente degradada em condições aeróbias em 87 dias e

em condições anaeróbias em 94 dias, já a linamarina em 8 dias para as duas condições, aeróbia e anaeróbia. O inóculo proveniente do efluente do reator acidogênico teve a total degradação da acetonacianidrina um pouco mais rápida na condição aeróbia: 23 dias e na condição anaeróbia: 87 dias, enquanto que a linamarina degradou-se totalmente em 14 dias na condição aeróbia e na condição anaeróbia em 87 dias.

Os Quadros 25,26 e 27 mostram as taxas de degradação para cada condição dos testes *in vitro*.

Quadro 25 – Taxa de degradação da acetonacianidrina com inóculo manipueira em condições anaeróbias e aeróbias

Condição do inóculo					
Manipueira aeróbio			Manipueira anaeróbio		
tempo (dias)	acetonacianidrina remanescente (mg/L)	taxa de degradação (mg/24h.)	tempo (dias)	acetonacianidrina remanescente (mg/L)	taxa de degradação (mg/24h.)
0	237,20	-	0	225,40	-
2	165,40	35,90	2	207,90	8,75
14	14,80	12,55	14	196,00	0,99
23	4,30	1,17	23	187,10	0,99
35	4,00	0,03	35	177,80	0,77
45	3,10	0,09	45	169,20	0,86
87	0,00	0,07	87	1,50	3,99
94	0,00	0,00	94	0,00	0,21

- não detectado

O Quadro 25 mostra que nas duas condições, anaeróbias e aeróbias, a atuação do inóculo manipueira foi similar em relação ao tempo inicial com quantidades quase iguais de acetonacianidrina remanescente. A partir deste tempo inicial observou-se que nas condições aeróbias as velocidades de degradação foram maiores permitindo reduções nas concentrações de acetonacianidrina, mas não na mesma velocidade que ocorreu em condição anaeróbia.

Quadro 26 – Taxa de degradação da acetonacianidrina com inóculo proveniente do efluente acidogênico

Condição do inóculo					
Acidogênico aeróbio			Acidogênico anaeróbio		
tempo (dias)	acetonacianidrina remanescente (mg/L)	taxa de degradação (mg/24h.)	tempo (dias)	acetonacianidrina remanescente (mg/L)	taxa de degradação (mg/24h.)
0	347,20	-	0	314,30	-
2	138,90	104,15	2	308,00	3,15
14	5,60	11,11	14	283,10	2,08
23	0,00	0,62	23	281,10	0,22
35	0,00	0,00	35	267,10	1,17
45	0,00	0,00	45	267,00	0,01
87	0,00	0,00	87	0,00	6,36
94	0,00	0,00	94	0,00	0,00
0	0,00	0,00	0	0,00	0,00

- não detectado

Comparando-se as duas condições no Quadro 26, observou-se que na condição aeróbia, as taxas de degradação da acetonacianidrina são maiores quando comparadas às taxas de degradação nas condições anaeróbias, e, portanto, o processo de destoxificação da acetonacianidrina foi mais rápido em condições aeróbias.

Quadro 27 – Taxa de degradação da acetonacianidrina com inóculo proveniente do efluente metanogênico.

Condição do inóculo					
Metanogênico com amostragem de gás			Metanogênico sem amostragem de gás		
tempo (dias)	acetonacianidrina remanescente (mg/L)	taxa de degradação (mg/24h.)	tempo (dias)	acetonacianidrina remanescente (mg/L)	taxa de degradação (mg/24h.)
0	382,86		0	323,80	
2	382,00	0,43	2	315,00	4,40
14	263,50	9,88	14	271,30	3,64
23	254,70	0,98	23	240,34	3,44
35	243,90	0,90	35	221,30	1,59
45	233,50	1,04	45	214,50	0,68
87	51,20	4,34	87	16,70	4,71
94	0,00	7,31	94	0,00	2,39

- não detectado

Os resultados apresentados no Quadro 27 mostram que os inóculos provenientes do efluente do reator metanogênico apresentaram comportamento similar nas duas condições (aeróbia e anaeróbia) com relação à quantidade de acetonacianidrina remanescente. Houve diferenças nas velocidades de degradação, mas não no tempo de degradação total da acetonacianidrina nas duas condições, que foi de aproximadamente 90 horas.

Como para a linamarina, foi também quantificada para acetonacianidrina, o cianeto total e livre neste nos ensaios *in vitro*. O Quadro 28 apresenta esses teores.

Quadro 28 – Resultados de cineto total e livre nos ensaios *in vitro* com a acetonacianidrina

	Condições Cianeto mg/L			
	Inóculo			
	total		**livre**	
Manipueira	83,52		15,58	
Efluente acidogênico	45,43		9,69	
Efluente Metanogênico	21,09		15,08	
Manipueira	**anaeróbio**	**aeróbio**	**anaeróbio**	**aeróbio**
	1774,14	56,15	564,50	9,74
	1937,80	11,61	700,49	4,70
Acidogênico	**anaeróbio**	**aeróbio**	**anaeróbio**	**aeróbio**
	1962,92	12,65	620,12	8,85
	1821,96	11,96	458,10	4,08
Metanogênico	**anaeróbio com amostragem de gás**	**anaeróbio sem amostragem de gás**	**anaeróbio com amostragem de gás**	**anaeróbio sem amostragem de gás**
	1608,78	1507,31	810,22	774,04
	1335,69	1367,25	626,69	644,58

Sob anaerobiose, para os três tipos de inóculos, os teores de cianeto total foram sempre maiores em comparação com os teores também de cianeto total sob aerobiose.

Para a remoção de cianeto livre, o inóculo do efluente do reator metanogênico na condição anaeróbia sem amostragem de gás, apresentou dentre as três condições dos inóculos, a menor remoção.

6. CONSIDERAÇÕES GERAIS

Pelos resultados apresentados, há a necessidade de mais avaliações para se elucidar completamente a degradação da linamarina em reatores biológicos. Algumas sugestões são feitas para a continuação da pesquisa:

- Maior número de testes poderão esclarecer se ocorrem diferentes taxas de volatilização de HCN durante o funcionamento dos reatores, na degradação da manipueira.

- Os teores de cianeto total e livre deveriam ser acompanhados também na manipueira (substrato) ao longo do período de um ano, am amostras conservadas sob congelamento em nitrogênio líquido. Análises poderiam ser feitas na manipueira ao sair das prensas, ao chegar no laboratório, como afluente do reator acidogênico e nos efluentes dos reatores acidogênico e metanogênico.

- Os testes de atividade da enzima linamarase devem ser realizados ao longo de um ano para o acompanhamento das diferentes safras de mandioca que são processadas nas farinheiras, pois a atividade enzimática varia numa mesma planta de mandioca ao longo do período de plantio.

- Os testes de degradação da acetonacianidrina deverão ser monitorados para verificar quanto do o composto foi degradado e quanto foi volatilizado, uma vez que a acetonacianidrina é altamente volátil em temperatura ambiente.

- Além dos três tipos de inóculos avaliados na presente pesquisa, seria importante avaliar também o inóculo obtido do interior do reator metanogênico, na degradação da linamarina e acetonacianidrina.

7 CONCLUSÕES

Da análise dos resultados obtidos, e nas condições em que a pesquisa foi realizada, pode-se concluir que:

- os sistemas de reatores acidogênico e metanogênico, funcionaram de forma adequada como relatado na literatura. O reator metanogênico removeu a maior porcentagem de DQO. L^{-1} reator. dia. $^{-1}$. A redução de carga variou de 5 a 36% no reator acidogênico e de 26 a 72% no reator metanogênico. A remoção de cianeto total variou de 33 a 42% no reator acidogênico e de 55 a 65% no reator metanogênico.

- em relação à atividade inicial de linamarase ($UE.mL^{-1}$) determinada em manipueira conservada em nitrogênio líquido, foi possível classificar os resultados em 2 grupos. Dos 5 lotes avaliados, três lotes apresentaram alta atividade, que variou de 3,38 a 4,25 $UE.mL^{-1}$. Dois lotes apresentaram baixa atividade, variando de 1,36 a 0,73 $UE.mL^{-1}$.

- não foi possível detectar correlação entre a atividade da linamarase com a porcentagem final de cianeto total nas amostras de manipueira e efluentes dos reatores acidogênico e metanogênico.

- não foi expressiva a perda de atividade da enzima linamarase entre a coleta da manipueira sob as prensas e a mesma manipueira usada como afluente do reator acidogênico. A maior perda de atividade ocorreu entre o afluente do reator acidogênico e o efluente do reator metanogênico.

- nos ensaios que testaram a volatilização do HCN nos gasômetros dos reatores, ocorreu arraste durante todo o período analisado, correspondendo a um mínimo de 0,28 e máximo de 0,47 mg. $24h.^{-1}$. A variação foi de 0,10 a 0,29 mg. $24h.^{-1}$ nos gases do reator acidogênico e de 0,14 a 0,29 mg. $24h.^{-1}$ nos gases do reator metanogênico, não sendo possível estabelecer em que condição (acidogênica ou metanogênica) ocorreu a maior volatilização.

- os valores de HCN captados e dosados nos gases corresponderam a uma parcela muito pequena da linamarina degradada e do cianeto livre e total dosados nos efluentes dos reatores.

- nos testes *in vitro* com a linamarina em condição aeróbia com inóculo manipueira, após um período de 34 dias de incubação, os teores de cianeto total foram nulos

para as duplicatas. No ensaio com a acetonacianidrina nas mesmas condições com 94 dias de incubação, os teores de cianeto total variaram de 12 a 56mg/L para as duplicatas.

- nos testes *in vitro*, no ensaio com a acetonacianidrina sob anaerobiose, para os três tipos de inóculos, os teores de cianeto total, após o período de incubação de 94 dias, foram sempre maiores em comparação com os teores de cianeto total com os mesmos inóculos sob aerobiose.

- nos testes *in vitro*, comparando-se o ensaio com a acetonacianidrina na condição anaeróbia, com o ensaio da linamarina na mesma condição, os teores de cianeto livre foram dez vezes maiores para o ensaio com a acetonacianidrina do que para o ensaio com a linamarina, embora, os dois ensaios apresentassem um perfil semelhante de variação.

- com relação ao tempo de degradação nos testes *in vitro*, com os três tipos de inóculos, sempre houve necessidade de maior tempo para a degradação da acetonacianidrina em relação a linamarina, tanto em condição aeróbia quanto em condição anaeróbia. A degradação desses compostos sob anaerobiose sempre exigiu maior tempo em relação à condição aeróbia, com exceção do ensaio da linamarina com inóculo proveniente do efluente do reator metanogênico, onde a aerobiose exigiu maior tempo para a degradação total da linamarina.

- o inóculo proveniente da manipueira, foi o mais eficiente para degradar a linamarina tanto em condição aeróbia quanto em condição anaeróbia; já, a degradação da acetonacianidrina se mostrou mais eficiente com inóculo proveniente do reator acidogênico na condição aeróbia.

- comparando-se as condições aeróbias e anaeróbias a que o inóculo proveniente do efluente do reator acidogênico foi submetido, na degradação da linamarina e da acetonacianidrina, constatou-se que as condições aeróbias foram mais eficientes que as anaeróbias.

- o inóculo proveniente do efluente do reator metanogênico apresentou maior eficiência na degradação da linamarina em relação a acetonacianidrina. A linamarina foi totalmente degradada em menos de 5 dias na presença deste inóculo, enquanto que a acetonacianidrina só foi totalmente degradada por volta de 100 dias. Os resultados de taxa de degradação da linamarina e da acetonacianidrina comprovaram tais resultados.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDREWS, J. F.; PEARSON, E. A. Interactive Journal Air Water Pollutant, v. 9, n. 439, 1965.

ARGUEDAS, P., COOKE, R. D. Concentraciones de cianuro residual durante a la extracción de almidón de yuca. **Yuca Boletim Informativo**, CIAT, v.10, p.7-9, 1982.

ASHCROFT, J. R.; HADDOCK, B. A. Synthesis of alternative membrane bound redox carries during aerobic growth of Escherichia coli in the presence of potassium cyanide. **Biochemical Journal**, n.148, p. 349-352, 1975.

ATKINSON, A. Bacterial cyanide detoxification. **Biotechnology and Bioengineering**, v.17, p.457-60, 1975.

BALAGOPALAN, C. et al. Cassava in food. Feed and Industry. Boca Raton: CRC Press, 1988.

BAHR, J. T.; BONNER, J. W. D. Journal Biology Chemical, v. 248, 3441p., 1973.

BARANA, A. C. **Estudo de carga orgânica de manipueira na fase metanogênica de reator anaeróbio de fluxo ascendente e leito fixo**. 1995. 82f. Dissertação (Mestrado em Agronomia/Energia na Agricultura) – Faculdade de Ciências Agronômicas, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 1995.

BARANA, A. C. **Avaliação de tratamento de manipueira em biodigestores fase acidogênica e metanogênica**. 2000. 96f. Tese (Doutorado em Agronomia/Energia na Agricultura) – Faculdade de Ciências Agronômicas, Universidade Estadual Paulista. Botucatu, 2000.

BATALHA, B. L. Água, saúde e desinfecção. São Paulo. Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental. 1994. Série Manuais nº 13.

BERNAL, E.; GIJZEN, H.; FERRER, H. Efecto del cianuro sobre los organismos que intervienen en la fermentación anaerobia del almidón de yuca. In: SEMINÁRIO-TALLER LATINOAMERICANO SOBRE TRATAMIENTO DE AGUAS RESIDUALES, 4. IV SEMINARIO-TALLER LATINOAMERICANO SOBRE TRATAMIENTO DE AGUAS RESIDUALES, 1996, Bucaramanga. **Tratamiento anaerobio**. Bucaramanga: Red Colombiana de Biotecnologia Ambiental, 1996. p.79-94.

BOWEN, T. J., BUTLER, P. J., HAPPOLD, F. C. Some properties of three rhodanese system of Thiobacillus denitrificans. **Biochemistry Journal**, n. 97, p. 651-657, 1965.

BRIMER, L. **Cyanide and cyanogenic compounds the occurrence in material of biological origin and the analysis**. 1996. Thesis. Royal Danish School of Pharmacy, Copenhagen, 1996.

BRYANT, M. P. Microbial methane production-Theoretical aspects. **Journal Animal Science**, v.48, p.193-201, 1979.

CAMPOS, J. R. **Alternativas para tratamento de esgotos**: pré-tratamento de águas de abstecimento. Americana: Consórcio Intermunicipal das Bacias dos rios Piracicaba e Capivari, 1994. 112p.

CARVALHO, J. P. C. C. **Studies on the aliphatic Ketone cyanohydrin hydroxynitrile lyase from *Manihot esculenta* Crantz,** 1979. Thesis (PhD) - University of California, Davis,. 1979.

CARVALHO, V. D.; CARVALHO, J. G. Princípios tóxicos da mandioca. **Inf. Agropec**., v. 5, p. 82-88, 1979.

CEREDA, M. P.; BRASIL, O. G.; FIORETTO, A. M. C. Atividade respiratória em microrganismos isolados de líquido residual de fecularias. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA, pp.11, 1981. Florianópolis. **Anais**...Florianópolis: 1981.
CEREDA, M. P., BONET, A. F, VALLES, S., ALBEROLA, J. Tratamento anaeróbio em duas fases, de suspensões amiláceas II: fase metanogênica: influência da adição de CN^-. **Review. Microbiology**, São Paulo, v. 21, n. 1, p. 73-78, 1990.

CEREDA, M. P. Resíduos da Industrialização da mandioca no Brasil. São Paulo: Editora Paulicéia, 174p., 1994.

CEREDA, M. P., MATTOS, M .C. Y. Linamarin: the toxic compound of casava. **Journal of Venomous Animals and Toxins**, v. 2, n. 1, p. 6-12, 1996.

CEREDA, M. P. Caracterização dos subprodutos da industrialização da mandioca. In: _____. **Manejo, uso e tratamento de subprodutos da industrialização da mandioca**. São Paulo: Fundação Cargill, 2001. v. 4, 320 p.

CEREDA, M. P.; VILPOUX, O., PIZA, I. T. Identification and development of suitable varieties of cassava for food security for Guiana's Hinterland cassava technology. **Brazil-Guyana Technical Cooperation Program**, p. 9-40, 2003.

CETESB. Determinação da DQO pelo método da ampola (colorimetria). São Paulo, s/d, 17p.

CETESB. Caracterização de efluentes de indústria de farinha de mandioca. São Paulo, 1994, 53p. Mimeografado.

COCK, J. H. **Cassava**: new potential for a neglected crop. London: Westfield Press, 1985. 191p.

COLARD, P. P. Species of corynebacterium isolated from fermented cassava roots. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 26, p. 115-116, 1978.

COOKE, R. D. An enzymatic assay for the total cyanide content of cassava (Manihot esculenta). **Journal Science and Food Agriculture**, v. 29, p. 345-352, 1978.

CORREA, A. D. et al. Farinha de folhas de mandioca I: efeito da secagem das folhas sobre a atividade da linamarase. **Revista Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 26, n. 2, p. 368-374, mar./abr., 2002.

DAMASCENO, S. **Manipueira como substrato para desenvolvimento de *Geotrichum fragans***. 1998. 117f. Tese (Doutorado em Agronomia/Energia na Agricultura) – Faculdade de Ciências Agronômicas,. Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 1998.

DEL BIANCHI, V. **Balanço de massa e de energia do processamento de farinha de mandioca em uma empresa de médio porte do Estado de São Paulo**. 1998. 118f. Tese (Doutorado em Agronomia/Energia na Agricultura) – Faculdade de Ciências Agronômicas, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 1998.

DIPALMA, J. R. Noxious gases and vapours: carbon monoxide, cyanides, methemoglobin and sulfhemoglobin. In: DRILL'S pharmacology in medicine. New York: McGraw-Hill. 1971. p. 1189-1205.

DODGE, B. F., ZABBAN, W . Disposal of plating room wastes IV: Batch volatilization of hydrogen cyanide from aqueous sollutions of cyanides. Plating, p. 1133-1139, 1952.

DUBEY, S. K.; HOLMES, D. S. Biological cyanide destruction mediated by microorganisms. **World Journal Microbiology Biotechnology**, n. 11, p. 257-265, 1995.

ESSERS, A. J. A. Manual "Assay for the cyanogen content in cassava products". (Preliminary Version, December, 1993). Department of Food Science, Wageningen. Agricultural University, Netherlands. 9p.

FARIA, A.S.Jr. **Estudos sobre o tratamento de águas resíduárias de fecularias de mandioca.** 1978. 127f. Dissertação (Mestrado em engenharia) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 1978.

FERNANDES JÚNIOR, A. **Ocorrência de instabilidade, forma de seu controle na digestão anaeróbia da manipueira, em reator de bancada de mistura completa**. 1989. 118f. Dissertação (Mestrado em Agronomia/Energia na Agricultura), Faculdade de Ciências Agronômicas, Universidade Estadual Paulista. Botucatu, 1989.

FERNANDES JÚNIOR, A. **Digestão anaeróbia de manipueira em separação de fases: cinética da fase acidogênica**. 1995. 139f. Tese (Doutorado em Agronomia/Energia na Agricultura) – Faculdade de Ciências Agronômicas. Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 1995.

FERNANDES JÚNIOR, A.; TAKAHASHI, M . Tratamento da manipueira por processos biológicos: aeróbio e anaeróbio. In: CEREDA, M. P. **Resíduos da industrialização da mandioca no Brasil.** São Paulo: Paulicéia, 1994. 133-149.

FIORETTO, A. M. C et al. **Manejo, uso e tratamento de subprodutos da industrialização da mandioca**. São Paulo: Fundação Cargil, 2001. 320 p. (série culturas de tuberosas amiláceas latino americanas, v. 4).

FUKUDA, W.M.G; BORGES, M. de F. Avaliação qualitativa de cultivares de mandioca de mesa. Revista Brasileira de mandioca, Cruz das Almas, v.7, n.1, p.63-71, 1990.

GABARDO, M. T. et al. Tratamento de despejos de fecularia por lagoa anaeróbia e aerada em série. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA SANITÁRIA E AMBIENTAL, 11, 1981, Fortaleza. **Anais**...Curitiba: Superintendência dos Recursos Hídricos e Meio Ambiente, 1981, p.1-55.

GHOSH, S. Kinetics of acid-phase fermentation in anaerobic digestion. **Biotechnology Bioengeneering. Symposyum**, v. 11, p. 301-313, 1981.

GIRAUD, E .; GOSSELIN, L .; RAIMBAULT, M . Degradation of cassava linamarin by lactic acid bacteria. **Biotechnology Letters.** France, v. 14, n. 7, p. 593-598, 1992.

HEATH, A. R., RUMBALL, J. A., BROWNER, R. E. A method for measuring HCN(g) emission from CIP/CIL Tanks. **Minerals Engineering**, v. 11, n. 8, p 749-761, 1998.

HENZE, M ., HARREMOES, P . Anaerobic treatment of wastewater in fixed film reactors: a literature review. **Water Science Technology**, v. 15, p. 1-101, 1983.

HOLMES, D. S., DUBEY, S. K. Biological cyanide destruction mediated by microrganisms. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, n. 11, p. 257-265, 1995.

HOSEL, W .; BARZ, W . β-glucosidases from Cicer arientum L. Eur. **Journal Biochemistry**, n. 57, p. 607-616, 1975.

HUGHES, M. A. The cyanogenic polymorphism in ***Trifolium repens*** L. (white clover). **Heredity**, n. 66, p. 105-115, 1991.

IKEDIOBI, C.; ONYIA, G.; ELUWAH, C. A rapid inexpensive enzymatic assay for total cyanide in cassava products. Agrc. Biol. Chem, n.44, p.2803-2809, 1980.

IKEDIOBI, C. O., ONYIKE, E . The use of linamarase in “gari” production. **Processes biochemistry**, n. 17, p. 2-5, 1982.

KNOWLES, C. J. Microrganisms and cyanide. **Bacteriological Reviews**, n. 40, p. 652-80, 1976.

KNOWLES, C. J., BUNCH, A .W. Microbial cyanide metabolism. **Advances in Microbial Phisiology**, n. 27, p. 73-111, 1986.

KOJUMA, M et al. Changes in cyanide content and linamarase activity in wounded cassava roots. **Plant Physiology**, v. 182, n. 72, 1982.

KORPRADITSKUL, R., KATAYAMA, A., KUWATSUKA, S. Degradation of atrazine by soil bacteria in stationary phase. **Journal Pesticide Science**, v. 18, p. 293-298, 1993.

KUNS, D. A. et al. Utilization of cyanide as a nitrogenous substrate by ***Pseudomonas fluorescens*** NCIMB 11764: evidence for multiple pathways of metabolic conversion. **Applied and Environmental Microbiology**, p. 2022-2029, 1992.

LACERDA, T. H. M. **Estudo cinético da fase metanogênica de substrato de manipueira**. 1991. 114f. Tese (Doutorado em Agronomia/Energia na Agricultura) – Faculdade de Ciências Agronômicas, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 1991.

LINARDI, V. R. Degradação biológica de cianetos. A importância do desenvolvimento de tecnologia para obtenção de um tratamento biológico. [on line]. Avaible from world wide web: UR:http://www.biotecnologia.com.br. [2000, jun.03}.

LOPES, A.M . **Avaliação da dose letal (DL_{50}) oral e efeitos metabólicos da linamarina extraída de mandioca, em ratos**. 2001. 85f: Tese (Doutorado em Agronomia/Energia na Agricultura) – Faculdade de Ciências Agronômicas. Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2001.

LORENZI, J. O.; DIAS, C. A. C. **Cultura da mandioca**. Campinas:. Coodenadoria de Assistência Técnica Integral, 1993. 41p. (Boletim Técnico, 211).

MACHADO, J. S.; LINARDI, V. R.; DIAS, J. C. T. Biodegradação de cianetos por uma linahagem de ***Pseudomonas***. In: **CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA**, 20, 1999, Salvador. Resumos...Rio de Janeiro, Sociedade Brasileira de Microbiologia, 1999. 256p.

MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; PARKER, J . **Brock biology of microorganisms** . 8th. ed. New Jersey: Prentice Hall, 1997. 986 p.

MAGALHÃES, C. P. Estudos sobre as bases bioquímicas da toxicidade da manipueira a insetos, nematóides e fungos, 1998. 121f. Dissertação (Mestrado) Centro de Ciências, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 1998.

McMAHON, J. M.; WHITE, W. L. B.; SAYRE, T. R. Cyanogenesis in cassava (*Manihot esculenta* Crantz). **Journal Experimental botany**, v. 46, n. 288, p. 731-741,1995.

MEER, J. R . van der; LEVEAU, J .; WERLEN, C . Genetic adaptation of microorganisms to environmental pollutants. **Eawag News** , n. 35E, 1994.

MKPONG, O. E.; YAN, H. ; CHISM, G.; SAYRE, R .T . Purification, characterization and localization of linamarase in cassava. Plant Physiology, n.93, p.176-81, 1990.

MOTTA, L. C. **Utilização de resíduos de industrialização de farinha de mandioca em digestão anaeróbia**. 1985.119f. Dissertação (Mestrado em Agronomia/Energia na Agricultura) – Faculdade de Ciências Agronômcas, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 1985.

MUIR, D. M., AZIZ, M ., HOECKER, W . Cyanide losses under CIP and effect of carbon on cyanide oxidation. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON HYDROMETALLURGY, 1., 1988, **Proceedings**… 1988, p. 461-465, 1988.

NAMBISAN, B . Cyanogenesis in cassava. In: INTERNATIONAL SCIENTIFIC MEETING, 1., 1992, Cartagena, Colombia. **The cassava biotechnology network**: proceedings. Colômbia, 25-28 august, 1992. v. 1.

NAMBISAN, B . Evaluation of the effect of various processing techiniques on cyanogens content redustion in cassava. In: INTERNATIONAL WORKSHOP ON CASSAVA SAFETY. 375, Tbadan. BOKANGA, M.; ESSERS, A.J.A., POUTER, N.; ROSLING, H.;TEWE, O. **Acta Horticulturae** –: WOCAS, v. 375, 1994, p.203-207.

NOK, A.J.; IKEDIOBI, C.O. Purification and some properties of linamarase from cassava (*Manihot esculenta*) cortex. **Journal of Food Biochemistry**. n. 14, p. 477-489, 1990.

OKE, O.L. Cassava as food in Nigéria. **World Review Nutritional Dietetics**, v. 96, p. 227-250, 1968.

OLIVEIRA, S.I.; CATANEO, A. C.; CEREDA, M. P. Atividade de linamarase (EC 3.2.121) e teores de cianeto e N total em folhas de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz). **Acta Biologica Leopoldensia**. v. 20, n. 2, p. 373-380, 1998.

OSUNTOKUM, B. O. Cassava diet, chronic cyanide intoxification and neuropathy in Nigerian Africans. **World Review of Nutrition and Dietetics**. n. 36. p. 141-173, 1981.

PAWLOWSKY, U. **Curso de Tratamento de Efluentes Industriais**: industrialização da mandioca. Toledo, 1991, 26p. Mimeografado.

PETRUCCIOLI, M.. et al. Production and properties of the linamarase and amygdalase activities of Penicillium aurantiogriseum P35. **Bioscience. Biotechnology. Biochemistry**, v. 63. n. 5, p. 805-812, 1999.

RAYBUCK, S.A. Microbes and microbial enzymes for cyanide degradation. **Biodegradation**, n. 3, p. 3-18, 1992.

REALI, M. A. P.; DANIEL, L. A.; CAMPOS, J. R. Conceitos gerais sobre técnicas de tratamento de águas de abastecimento, esgotos sanitários e desinfecção. São Carlos: Departamento de hidráulica e Saneamento, EDUSP, maio 2001.

ROBERTS, R.M. et al. Introduction to catalysis using enzymes and microrganisms. Cambridge University Press, 1995. não paginado.

SAMPAIO, B. M. L. **Viabilidade do processo de tratamento anaeróbio do resíduo da industrialização da mandioca em sistema de duas fases**. 1996. 144 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química), Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 1996.

SOBRINHO, P. A. Autodepuração dos corpos d'água. In: CURSO de Poluição das Águas. São Paulo, 1975. São Paulo: CETESB/ABES/BNH, 1975. Cap. 8, p.6-9 (apostila).
SOLOMONSON, L. P. Cyanide as a metabolic inhibitor. In: VENNESLAND, B. (Ed.). **Cyanide in biology.** London: Academic Press, 1981. p. 11-28.

SOUZA, M. E. Fatores que influenciam a digestão anaeróbia. In: SIMPÓSIO NACIONAL DE FERMENTAÇÃO, 5., 1980, Viçosa. Anais... São Paulo: Sociedade Brasileira de Microbiologia, 1982. p. 1-29.

SUFLITA, J. M., TOWNSEND, G. T. The microbial ecologyand physiology and aryl dehalogenation reactions and implications for bioremediation. In: CERNAGLIA, C.E.; YOUNG, L.Y., (Ed.). **Microbial transformation and degradation of toxic organic chemicals.** New York: Wiley-Liss, 1995. cap. 5, p. 243-268.

TAKAHASHI, M.; GULLI, V. F. B., CEREDA, M. P. Cinética da digestão anaeróbia da manipueira através do modelo de Chen e Hashimoto. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA EM CIÊNCIAS AGRÁRIAS, 5., 1985, Lavras. **Anais**...Lavras: UFV, 1985. p. 72.

TELES, F.F. Técnicas de liberação do HCN e toxidez cianogênica das mandiocas. **Information Agropecuary**. Belo Horizonte. v. 13, p. 18-22, 1987.

TOWILL, L.E. et al. **Reviews of the environmental effects of pollutants**, v. 5, 1978.

TYLLESTAR, T. et al. Cassava cyanogens and Konzo, na upper motoneuron disease found in Africa. **Lancet**, n. 339, p. 208-211, 1992.

VAZOLLER, R. F. **Avaliação do ecossistema microbiano de um biodigestor anaeróbio de fluxo ascendente e manta de lodo, operando com vinhaça sob condições termofílicas**. 1995, 259f. Tese (Doutorado/Hidráulica e Saneamento) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 1995.

VIEIRA, S. M. M., SOUZA, M .E. Métodos analíticos para o acompanhamento da biodigestão. **Energia**: Fontes Alternativas, v. 3, p. 26-36, 1981.

VILPOUX, O. As indústrias de mandioca nos estados de Santa Catarina, Paraná, São Paulo, Mato Grosso do Sul e Minas Gerais. Botucatu: CERAT, UNESP, 1998. 83 p.

WHEATLEY, C. C. et al. Quality evaluation of cassava core collection at CIAT. In: PROCEEDINGS OF THE FIRST INTERNATIONAL SCIENTIFIC MEETING, 1992, Cartagena. **The cassava biotechnology network**. Colmbia. P .255-264, 1993.

WHITE, W. L. B.; SAYRE, R . T. Partial purification and characterization of hydroxynitrile lyase from cassava. In: PROCEEDINGS OF THE FIRST INTERNATIONAL SCIENTIFIC MEETING, 1992, Cartagena. **The cassava biotechnology network**. Colombia, p. 379-383. 1992.

WHITE, W. L. B.; McMAHON, J. M .; SAYRE, R . T. Regulation of cyanogenesis in cassava. **Acta Horticulturae**, n.375, p.68-78, 1994.

WINTON, A. L ., WINTON, K .B . **Análisis de Alimentos**. 2 ed. Barcerlona: Hispano Americana. 1958. p. 262-266.