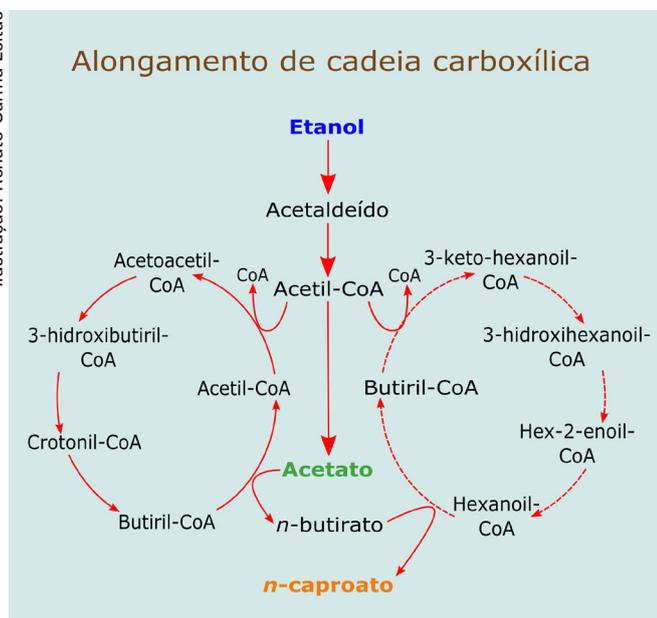


Ilustração: Renato Carrhá Leitão



Determinação do Potencial de Produção Biológica de Ácido Caproico

Rosemeri Ines Dams Medero¹
Alexandre de Araújo Guilherme²
Michael Barbosa Viana³
Isabele Baima Ferreira Freitas⁴
Willame de Araújo Cavalcante⁵
Tito Augusto Gehring⁶
Sandra Tédde Santaella⁷
Adrianus van Haandel⁸
Largus Angenent⁹
Renato Carrhá Leitão¹⁰

Ácidos carboxílicos são ácidos orgânicos fracos, dissociados, que possuem pelo menos um grupo carboxílico. Os ácidos orgânicos de cadeia curta (ácidos acético, propiônico e butírico) são os principais intermediários formados em uma fermentação primária usando culturas mistas. Na fermentação secundária, esses ácidos servem como substrato para formação de outros produtos, como o ácido caproico, por exemplo. O ácido caproico é um ácido carboxílico de cadeia média (seis átomos de carbono) e é um exemplo de

insumo de alto valor agregado, sendo produzido industrialmente a partir da matriz petroquímica, o que acarreta problemas ambientais diversos, incluindo a produção de gases de efeito estufa (WASEWAR; SHENDE, 2010). O ácido caproico possui muitas aplicações industriais, como combustíveis, corantes, lubrificantes, borracha e aditivo para ração animal.

A produção biológica de ácido caproico ocorre por processo bioquímico de alongamento de cadeia

¹ Farmacêutica-bioquímica, doutora em Microbiologia Ambiental, pós-doutoranda e bolsista DCR (CNPq/Funcap) na Embrapa Agroindústria Tropical, Fortaleza, CE, rosemedero@yahoo.co.uk

² Engenheiro de alimentos, doutor em Engenharia Química, pós-doutorando e bolsista DTA-A (CNPq) na Embrapa Agroindústria Tropical, Fortaleza, CE, alexandredearaujoguilherme@gmail.com

³ Tecnólogo em Gestão Ambiental, doutorando em Engenharia Civil, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, CE, michaelbviana@gmail.com

⁴ Graduanda em Ciências Ambientais, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, CE, isabelebaima@hotmail.com

⁵ Cientista ambiental, mestrando em Engenharia Civil pela Universidade de São Paulo, São Carlos, SP, willdeac@gmail.com

⁶ Engenheiro sanitário e ambiental, doutor em Engenharia Civil e Ambiental, Pós-Doutorando e Bolsista BJT (CNPq) na Embrapa Agroindústria Tropical, Fortaleza, CE, titogehring@gmail.com

⁷ Química, doutora em Hidráulica e Saneamento, professora titular da Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, CE, sandra@ufc.br

⁸ Engenheiro químico, doutorado em Engenharia Civil, professor-adjunto da Universidade Federal de Campina Grande, Campina Grande, PB, adrianusvh@gmail.com

⁹ Cientista ambiental, doutor em Engenharia Ambiental, professor na Universidade de Cornell, Ithaca, EUA, la249@cornell.edu

¹⁰ Engenheiro civil, doutor em Ciências Ambientais, pesquisador da Embrapa Agroindústria Tropical, Fortaleza, CE, renato.leitao@embrapa.br

carboxílica conhecido como β -oxidação reversa. Esse processo utiliza etanol ou hidrogênio como doadores de elétrons que, a partir de ácido acético, possibilitam a formação de ácido butírico e de ácido caproico (BAKER, 1947; BAKER; TAHA, 1942). Steinbusch et al. (2011) utilizaram etanol, hidrogênio e ácido acético para produção de ácido caproico e ácido caprílico em reator anaeróbio de fluxo ascendente e manta de lodo (UASB). Agler et al. (2012) realizaram testes para produção de ácido caproico a partir de fermentado de milho em reator sequencial em batelada (ASBR).

Neste trabalho, estabeleceram-se as condições anaeróbias de fermentação para determinação do potencial de produção de ácido caproico de um substrato (como, por exemplo, fermentado de cana-de-açúcar) e/ou inóculo (por exemplo, lodo anaeróbio proveniente de uma estação de tratamento de efluentes).

Produção Biológica de Ácido Caproico

Testes de determinação do potencial de produção de ácido caproico foram realizados na Embrapa Agroindústria Tropical para avaliar tipos de inóculo e fonte de carbono (substrato). Para tanto, utilizaram-se três fontes de inóculo separadamente: (1) lodo anaeróbio floculento de uma estação de tratamento de esgoto doméstico da Companhia de Águas e Esgoto do Ceará (Cagece); (2) lodo anaeróbio granular da estação de tratamento de uma indústria de cerveja; e (3) líquido ruminal obtido de caprinos abatidos. A inibição da metanogênese foi feita com adição de 0,05% de clorofórmio, mantendo-se o pH em 7,0.

Os seguintes substratos foram utilizados: (1) Etanol e ácido acético: 4,6 g/L (100 mM), 9,2 g/L (200 mM) e 18,4 g/L (400 mM) de etanol e 1,5 g/L (25 mM), 3 g/L (50 mM) e 6 g/L (100 mM) de ácido acético (essas concentrações garantem a relação molar 4:1 etanol:ácido acético); (2) Fermentado de melação de cana-de-açúcar (com 9% de etanol): 75 g/L de fermentado de melação de cana-de-açúcar, equivalente a 150 mM de etanol. Nesse caso, o ácido acético foi gerado no processo anaeróbio de acidogênese de carboidratos facilmente fermentescíveis contidos no fermentado de melação. A acidogênese ocorre paralelamente ao

processo de alongamento de cadeia na formação de ácido caproico. Foi necessário adicionar 1,0 g/L de Na_2CO_3 .

A cultura mista contida no lodo granular proveniente da indústria de cerveja foi a mais adequada para este processo, sendo capaz de produzir aproximadamente 4,5 g/L de ácido *n*-caproico em pH ~ 7,0 (com adição de 0,05% de clorofórmio para inibir a metanogênese), após 14 dias de fermentação, utilizando concentração de 9,2 g/L (200 mM) de etanol e 3 g/L (50 mM) de ácido acético. O potencial de produção de ácido caproico foi de 0,49 gC₆/g etanol.

Quando apenas fermentado de melação da cana-de-açúcar foi utilizado como substrato, a melhor produção de ácido *n*-caproico (2,08 g/L) ocorreu a partir de 85,3 g/L de fermentado (equivalente a aproximadamente 150 mM de etanol), em pH ~ 7,0 e adição de 0,05% de clorofórmio. Concentração mais alta de ácido caproico (3,56 g/L) foi obtida quando 1,78 g/L de ácido acético foi adicionado ao fermentado de melação da cana-de-açúcar. Com base na quantidade de etanol contida no fermentado, o potencial de produção de ácido caproico foi de 0,22 gC₆/g etanol usando fermentado puro e 0,49 gC₆/g etanol usando fermentado com adição de ácido acético. Considerando a quantidade de melação utilizada na fermentação, pode-se estimar o potencial de produção de ácido caproico em 0,07 e 0,15 gC₆/g melação, sem e com adição de ácido acético, respectivamente.

Recomendações para Determinação do Potencial de Produção de Ácido Caproico

Os testes de atividade anaeróbia para determinação do potencial de produção de ácido caproico devem seguir os procedimentos: nos frascos reatores, adiciona-se a solução de nutrientes, substratos, inibidor da atividade metanogênica e o inóculo nas quantidades descritas a seguir. Em seguida, completa-se o reator até 200 mL, corrige-se o pH para aproximadamente 7 e realiza-se a purga com nitrogênio para manutenção da atmosfera anaeróbia. Os frascos devem ser mantidos em agitação e temperatura controlados. O experimento deve ser feito em triplicata e conter frascos de

controle (sem substrato). Os detalhes de cada uma dessas fases estão descritos a seguir:

Inóculos – Podem ser obtidos em lodos de reatores anaeróbios, que normalmente contêm bactérias do gênero *Clostridium* sp., especialmente *Clostridium Kluyveri*, principais responsáveis pelo processo de alongamento de cadeia carboxílica. Os inóculos devem ser usados em concentração de 10% (v/v).

Reatores biológicos – Os experimentos devem ser realizados em frascos Schott, com volume útil de 200 mL, em condições anaeróbias através da purga da fase gasosa com nitrogênio por 1 min. Os frascos devem ser fechados com tampa e septo de borracha de forma a permitir a retirada de amostras com seringa. A incubação deve ser feita a 37 °C por 14 dias, sob agitação orbital de 120 rpm.

Inibição da atividade metanogênica – Dois métodos podem ser utilizados para a inibição da atividade metanogênica: (1) Controle de pH na faixa de 5,35 a 5,65, simulando a produção do ácido caproico em reator biológico no qual a atividade metanogênica é inibida mantendo-se o pH em valores inferiores ao suportado pelas arqueas metanogênicas; (2) Adição de 0,05% de clorofórmio, simulando a produção de ácido caproico em pH próximo a 7,0. O pH deve ser controlado adicionando-se NaOH ou HCl 2M.

Substratos – Etanol deve ser usado como doador de elétrons para o processo de alongamento de cadeia. O ácido acético pode ser produzido pela fermentação aeróbia de etanol proveniente da indústria alcooleira ou do processo anaeróbio de acidogênese de substratos facilmente fermentáveis. Deve-se manter a relação molar de 4:1 etanol:ácido acético (mol:mol) para garantir o processo de alongamento de cadeia. Para os testes em que o ácido acético será proveniente da acidogênese, deve-se adicionar uma fonte de CO₂, que pode ser K₂CO₃ (0,68 g/L) ou Na₂CO₃ (1,0 g/L).

Nutrientes – Deve-se utilizar solução de nutrientes *Clostridium Growth Medium* (CGM) (g/L): (NH₄)₂SO₄ (2,0), K₂HPO₄ (2,4), KH₂PO₄ (1,8), Na₂HPO₄ (0,6), MgSO₄ (0,1). Também deve-se adicionar 1 mL/L de solução de micronutrientes diluída em HCl 5M (g/L): FeSO₄.7H₂O (10,0), CaCl₂.2H₂O (2,0), ZnSO₄.5H₂O (2,0), MnSO₄.4H₂O

(0,5), CuSO₄.5H₂O (1,0), (NH₄)₆Mo₇O₂₄.4H₂O (0,1) e Na₂B₄O₇.10H₂O (0,02).

Monitoramento do reator – Alíquotas do líquido do reator devem ser retiradas no início e ao final do experimento para a determinação de ácidos graxos voláteis (AGV) e álcoois. As determinações de AGV e álcoois são realizadas por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Todos os ensaios devem ser feitos em triplicata.

Cálculos – O potencial de produção de ácido caproico (P_{C6}) é calculado pela Equação 1, em que $[C6]$ é a concentração de ácido caproico (g/L) ao final do experimento, v é o volume útil do frasco reacional (L) e m_s é massa do substrato utilizado (g).

$$P_{C6} = \frac{[C6] \times v}{m_s} \quad \text{Eq. 1}$$

Agradecimentos

Os autores agradecem o apoio financeiro da Embrapa, Edital 11/2012 – Macroprograma 3, à Funcap e ao CNPq pelo apoio financeiro para o desenvolvimento desta pesquisa (Processos nº 350365/2013-0 e DCR 002400477.02.00/12).

Referências

- AGLER, M. T.; SPIRITO, C. M.; USACK, J. G.; WERNER, J. J.; ANGENENT, L. T. Chain elongation with reactor microbiomes: upgrading dilute ethanol to medium-chain carboxylates. *Energy & Environmental Science*, v.5, n.8, p.8189-8192, 2012.
- BARKER H. A. *Clostridium Kluyveri*. *Antonie van Leeuwenhoek*, v.12, n.1, p.167-176, 1947.
- BARKER H. A.; TAHA S. M. *Clostridium kluyverii*, an organism concerned in the formation of caproic acid from ethyl alcohol. *Journal of Bacteriology*, v. 43, n. 3, p. 347-363, 1942.
- STEINBUSCH, K. J. J.; HAMELERS, H. V. M.; PLUGGE, C. M.; BUISMAN, C. J. N. Biological formation of caproate and caprylate from acetate: fuel and chemical production from low grade biomass. *Energy & Environmental Science*, v. 4, n.1, p. 216-224, 2011.
- WASEWAR, K. L.; SHENDE, D. Z. Extraction of caproic acid using Tri-n-butyl phosphate in benzene and toluene. *Journal of Chemical & Engineering*, v. 55, n. 9, p. 4121-4125, 2010.

**Comunicado
Técnico, 222**



Unidade responsável pelo conteúdo e edição:
Embrapa Agroindústria Tropical
Endereço: Rua Dra. Sara Mesquita 2270, Pici
CEP 60511-110 Fortaleza, CE
Fone: (85) 3391-7100
Fax: (85) 3391-7109 / 3391-7141
E-mail: www.embrapa.br/fale-conosco

1ª edição (2016): disponibilizada on-line no
formato PDF

**Comitê de
Publicações**

Presidente: *Gustavo Adolfo Saavedra Pinto*
Secretária-executiva: *Celli Rodrigues Muniz*
Secretária-administrativa: *Eveline de Castro Menezes*
Membros: *Janice Ribeiro Lima, Marlos Alves Bezerra,
Luiz Augusto Lopes Serrano, Marlon Vagner Valentim
Martins, Guilherme Julião Zocolo, Rita de Cássia Costa
Cid, Eliana Sousa Ximendes.*

Expediente

Supervisão editorial: *Sérgio César de França Fuck Júnior*
Revisão de texto: *Marcos Antônio Nakayama*
Normalização bibliográfica: *Rita de Cassia Costa Cid*
Editoração eletrônica: *Arilo Nobre de Oliveira*