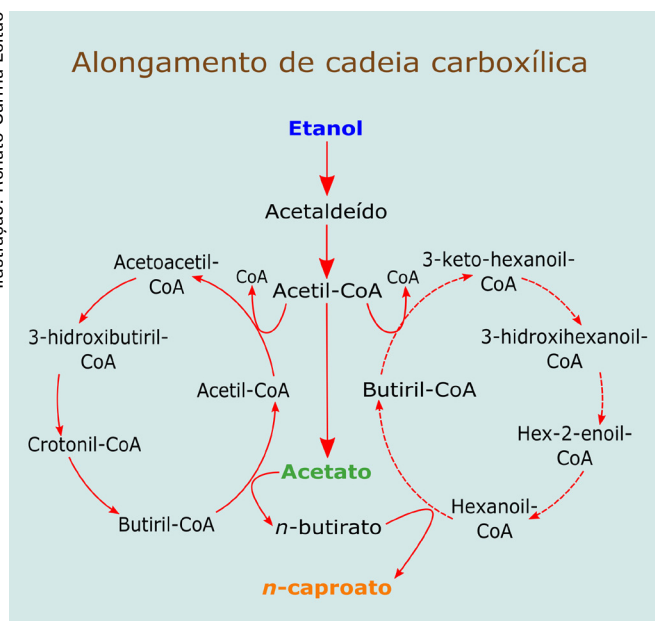


Ilustração: Renato Carrhá Leitão



## Determinação do Potencial de Produção Biológica de Ácido Caproico

Rosemeri Ines Dams Medero<sup>1</sup>  
Alexandre de Araújo Guilherme<sup>2</sup>  
Michael Barbosa Viana<sup>3</sup>  
Isabele Baima Ferreira Freitas<sup>4</sup>  
Willame de Araújo Cavalcante<sup>5</sup>  
Tito Augusto Gehring<sup>6</sup>  
Sandra Tédde Santaella<sup>7</sup>  
Adrianus van Haandel<sup>8</sup>  
Largus Angenent<sup>9</sup>  
Renato Carrhá Leitão<sup>10</sup>

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

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

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

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

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

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

<sup>6</sup> 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

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

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

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

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

carboxílica conhecido como  $\beta$ -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  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ .

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 gC<sub>6</sub>/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 gC<sub>6</sub>/g etanol usando fermentado puro e 0,49 gC<sub>6</sub>/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 gC<sub>6</sub>/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 CO<sub>2</sub>, que pode ser K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (0,68 g/L) ou Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (1,0 g/L).

**Nutrientes** – Deve-se utilizar solução de nutrientes *Clostridium Growth Medium* (CGM) (g/L): (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (2,0), K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (2,4), KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (1,8), Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (0,6), MgSO<sub>4</sub> (0,1). Também deve-se adicionar 1 mL/L de solução de micronutrientes diluída em HCl 5M (g/L): FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O (10,0), CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O (2,0), ZnSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O (2,0), MnSO<sub>4</sub>.4H<sub>2</sub>O

(0,5), CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O (1,0), (NH<sub>4</sub>)<sub>6</sub>Mo<sub>7</sub>O<sub>24</sub>.4H<sub>2</sub>O (0,1) e Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub>.10H<sub>2</sub>O (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](http://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*