



## II - 379 - PRODUÇÃO DE ÁCIDO CAPROICO POR MEIO DE BATELADA ÚNICA E SEQUENCIAL UTILIZANDO LODO DE CERVEJARIA E FLUIDO RUMINAL COMO INÓCULOS

### **Devson Paulo Palma Gomes<sup>(1)</sup>**

Engenheiro Ambiental pela Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia (UESB). Mestre e doutor em Engenharia Civil na área de Tecnologia Ambiental e Recursos Hídricos pela Universidade Federal de Pernambuco (UFPE). Parte do doutorado foi realizado na Universidade Autônoma do México (UNAM). Professor efetivo no Instituto Federal de Pernambuco (IFPE).

### **Alyne Soares Cabral Antunes**

Engenheira Civil pela Universidade Federal da Paraíba (UFPB). Mestre em Recursos Hídricos e Tecnologia Ambiental pela UFPE. Doutoranda em Tecnologia Ambiental e Recursos Hídricos na UFPE.

### **Shyrlane Torres Soares Veras**

Engenheira química pela UFPE. Mestre em Engenharia de Processos Químicos e Bioquímicos pela UFPE. Doutora em Engenharia Civil na área de Tecnologia Ambiental e Recursos Hídricos em regime de co-tutela com a *Universidad Autónoma de Madrid* (UAM). Pós doutora pela UFPE. Especialista na área de Eficiência Operacional na concessionária de saneamento Águas de Teresina (Grupo AEGEA).

### **Maria de Lourdes Florêncio dos Santos**

Engenheira Civil pela UFPE. Mestre em Hidráulica e Saneamento pela EESC-USP. Doutora em Tecnologia Ambiental e Ciências da Agricultura pela WAU. Pós-doutora pela *Delft University of Technology* (TUDELFT). Professora titular do Departamento de Engenharia Civil da UFPE.

### **Mario Takayuki Kato**

Engenheiro Civil pela Universidade Federal do Paraná (UFPR). Mestre em Hidráulica e Saneamento pela EESC-USP. Doutor em Tecnologia Ambiental e Ciências da Agricultura pela *Wageningen Agricultural University* – Holanda (WAU). Professor titular do Departamento de Engenharia Civil da UFPE.

**Endereço** <sup>(1)</sup>: Av. Prof. Luiz Freire, 500 - Cidade Universitária, Recife - PE, CEP:50740-545 - Brasil - Tel: (81) 995486172 - e-mail: [devsonpalma@recife.ifpe.edu.br](mailto:devsonpalma@recife.ifpe.edu.br)

## **RESUMO**

A crescente demanda por uma geração sustentável de energia e produtos químicos vêm impulsionando a busca por estudos baseados em processos biológicos como o alongamento de cadeia de carbono, que converte ácidos carboxílicos de cadeia curta em ácidos carboxílicos de cadeia média utilizando uma cultura mista de microrganismos. O presente estudo avaliou a produção de ácido caproico usando lodo de cervejaria e fluido ruminal como inóculos, com ácido acético e etanol como substratos sintéticos. Foram conduzidos experimentos de batelada única e sequencial com o substrato sintético formado por etanol e ácido acético, utilizando o inibidor químico 2-BES para inibição da metanogênese. Na batelada única, o lodo de cervejaria apresentou uma maior produção de ácido caproico ( $3,95 \pm 0,59$  g/L) em comparação com o fluido ruminal ( $3,56 \pm 0,36$  g/L). Na batelada sequencial, o fluido ruminal obteve uma maior produção na primeira batelada – B-I ( $8,14 \pm 0,41$  g/L), enquanto o lodo de cervejaria atingiu  $10,05 \pm 0,50$  g/L na terceira batelada – B-III. Conclui-se, que a adição sequencial de substratos possibilitou uma maior produção de ácido caproico em relação a batelada única, sendo necessário explorar a substituição de inibidores químicos e substratos sintéticos para alcançar a viabilidade econômica do processo.

**PALAVRAS-CHAVE:** Ácidos Carboxílicos de Cadeia Média, Ácido Hexanóico, Alongamento de Cadeia, Fermentação Anaeróbia, Culturas Mistas.



## INTRODUÇÃO

Com o aumento da população global, industrialização e urbanização é crescente a demanda por uma geração sustentável de energia (biocombustíveis) e de commodities (produtos químicos) em todo o mundo. Entre os processos biológicos destinados à produção de subprodutos químicos com alto valor agregado e biocombustíveis, pode-se citar o alongamento da cadeia de carbono (Debergh e Dael, Van, 2022).

O processo de alongamento da cadeia de carbono consiste na conversão de ácidos carboxílicos de cadeia curta (ACCC's) em ácidos carboxílicos de cadeia média (ACCM's), por meio da utilização de uma cultura pura ou mista de bactérias (Grootscholten et al., 2013). Geralmente, os ACCM's são provenientes do craqueamento do petróleo ou extraídos de óleos de plantas e gorduras de animais; porém, são produzidos em pequenas quantidades e podem acarretar impactos ao meio ambiente (ex: emissão de poluentes, efluentes e resíduos) (Nzeteu et al., 2022). Biologicamente, as vias metabólicas responsáveis pelo alongamento da cadeia de carbono para geração de ACCM's incluem a  $\beta$  – oxidação reversa e a biossíntese de ácidos graxos (Spirito et al., 2014). Por meio de um processo cíclico nas duas vias citadas, dois átomos de carbono são adicionados a uma molécula inicial (ácido acético ou butírico) e, da mesma forma, o ciclo se repete podendo alcançar a produção de ACCM's com 6 a 12 carbonos (Angenent et al., 2016).

O ácido caproico, caproato (forma dissociada) ou ácido hexanóico ( $C_5H_{11}COOH$ ) possui um amplo potencial de aplicação no mercado como, por exemplo, agente antimicrobiano na indústria farmacêutica, aditivo na alimentação animal, precursor químico para produção de compostos aromatizantes, corantes, lubrificantes, inibidores de corrosão, combustíveis de aviação e bioplásticos (Cavalcante et al., 2017). Do ponto de vista econômico, o ácido caproico apresenta um preço de mercado de aproximadamente USD \$2000-2500/ton que é de três a quatro vezes maior que o do ácido acético (USD \$400-800/ton) e do etanol (USD \$600-800/ton) (Bastidas-Oyanedel e Schmidt, 2018; Cavalcante et al., 2017).

Diante desse contexto, este trabalho teve como objetivo avaliar os desafios e as alternativas relacionadas à produção de ácido caproico a partir de dois diferentes inóculos, lodo de cervejaria e fluido ruminal, por meio do emprego de etanol e ácido acético como substratos sintéticos com a relação EtOH: AcOH igual a 2:1 em modo de batelada única e batelada sequencial.

## MATERIAIS E MÉTODOS

O substrato sintético foi composto por etanol e ácido acético igual a 2:1, de acordo com Gavazza et al. (2021). Para avaliar as melhores condições de produção de ácido caproico, foram estudados os seguintes inóculos: fluido ruminal e lodo de cervejaria. Adicionou-se ao meio uma solução de macro e microminerais, conforme Veras et al. (2020), tampão de bicarbonato de sódio (2,4 g/L) e pH ajustado para 6,8 por meio da adição de NaOH (1 M) e HCl (1 M). Os reatores foram inoculados com uma concentração final de 1 gST/L no licor misto para cada microbioma, e o gás nitrogênio (100%  $N_2$ ) foi purgado por 120 s para garantir condições anaeróbias, além de serem mantidos a uma temperatura de  $30 \pm 1$  °C e agitação de 100 rpm (Roghair et al., 2018). Inicialmente, foi realizada uma batelada com adição única de 4,61 g/L de etanol e 3 g/L de ácido acético em reatores de 250 mL. Posteriormente, foram realizadas 3 bateladas sequenciais (B-I, B-II e B-III) com adição de 10 g/L de etanol e 6,5 g/L de ácido acético a cada 12 dias em reatores de 610 mL. Para inibir a metanogênese foi adicionado 1 g/L de 2-bromoetanossulfonato (2-BES). A concentração de álcoois e ácidos carboxílicos foi medida através de um HPLC – High-performance liquid chromatography, acoplado a um detector de índice de refração modelo LC-20AT (Shimadzu). A coluna utilizada foi uma Aminex HPX-87H (300m x 7,8 mm) com fase móvel de ácido sulfúrico de 5 mM, fluxo de 0,6 mL.min<sup>-1</sup> e temperatura do forno igual a 40 °C.

## RESULTADOS

As concentrações de substratos consumidos e metabólitos produzidos durante a batelada única são apresentadas nas Figura 1 (a) e (b). A partir da análise dos resultados, verifica-se o consumo total de etanol e parcial de ácido acético em todas as condições experimentais analisadas, ocorrendo em alguns momentos a produção de ácido acético possivelmente por bactérias acetogênicas oxidadoras de etanol presentes no meio.



Nos experimentos em batelada única, os reatores com lodo de cervejaria apresentaram uma maior produção de ácido capróico ( $3,95 \pm 0,59$  g/L) (Figura 1 (a)) em relação ao fluido ruminal ( $3,56 \pm 0,36$  g/L) (Figura 1 (b)). Dessa forma, verifica-se que a diferença na produção de ácido capróico não foi significativa entre os inóculos utilizados na batelada única.

Nos experimentos em batelada sequencial, as concentrações de substratos consumidos e metabólitos produzidos durante as três bateladas (B-I, B-II e B-III) para os dois inóculos são apresentadas nas Figuras 1 (c) e (d). Durante a primeira batelada – B-I (0 - 12 dias), a produção de ácido capróico teve início após quatro dias de experimento nos dois inóculos, revelando uma rápida adaptação dos microrganismos, como descrito por Gavazza et al. (2021). Similarmente aos experimentos de Ma et al. (2021), o etanol foi convertido em ácido acético nos três primeiros dias em detrimento da geração de ACCM's, provavelmente por bactérias acetogênicas oxidadoras de etanol.

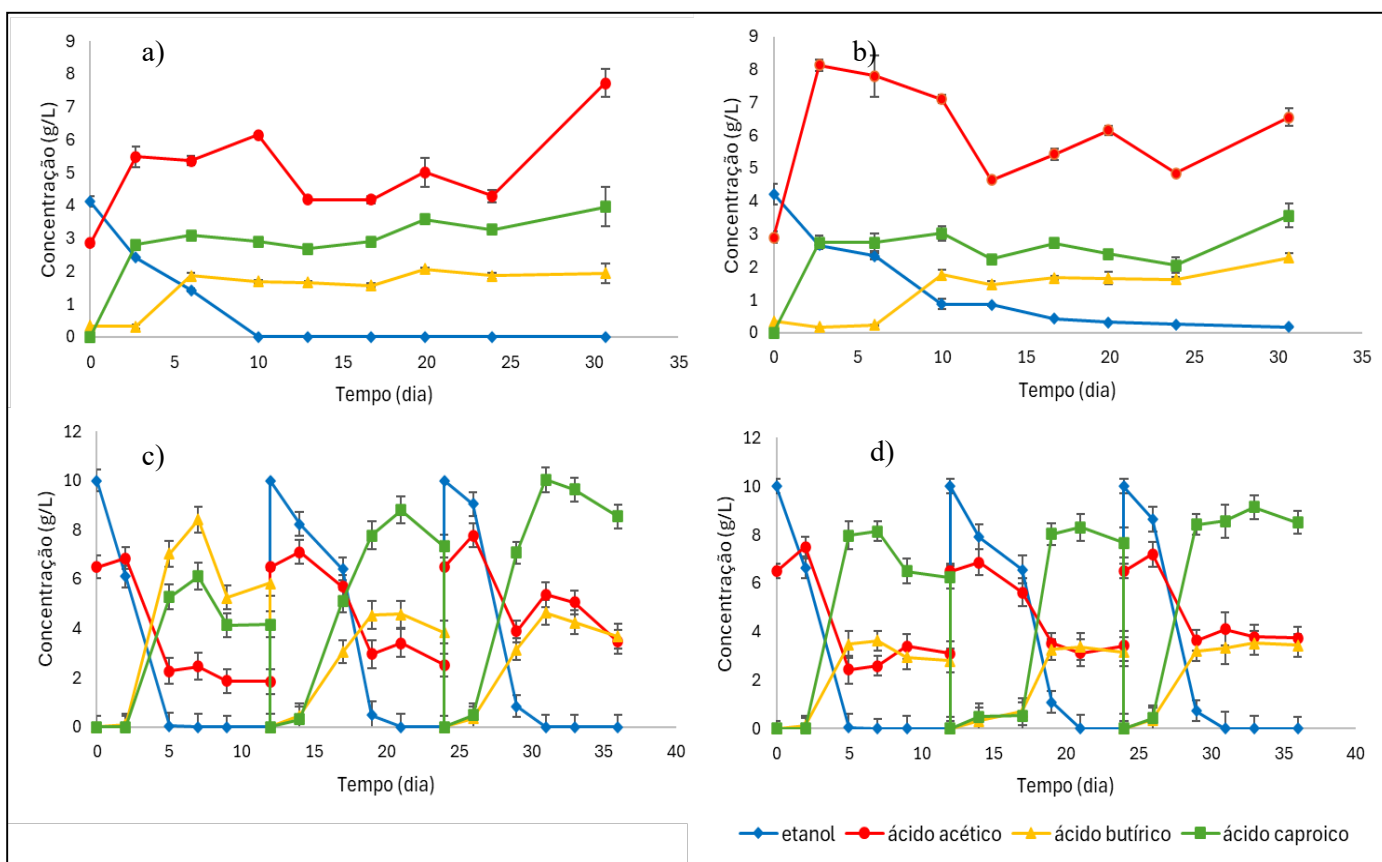
O pico de produção de ácido capróico na B-I foi alcançado após sete dias para todos os inóculos, mediante ao consumo total de etanol e parcial de ácido acético, com o fluido ruminal (8,14 g/L - Figura 1 (d)) seguido pelo lodo de cervejaria (6,11 g/L - Figura 1 (c)).

A segunda batelada – B-II (12-24 dias) teve como objetivo atenuar a toxicidade das formas não-dissociadas do ácido capróico em baixos valores de pH da batelada anterior, com ajuste do pH para 6,8 em todos os reatores mediante a utilização de NaOH e HCl. Diferentemente da B-I, a geração de ácido capróico começou antes dos primeiros quatro dias, em razão da adaptabilidade prévia dos inóculos para o processo de alongamento da cadeia, já reportada por Agler et al. (2011).

O pico de produção de ácido capróico na B-II foi alcançado após 9 dias (dia 21 – B-II), mediante o consumo total de etanol e parcial de ácido acético, com o lodo de cervejaria apresentando o maior valor (8,8 g/L – Figura 1 (c)), seguido pelo fluido ruminal (8,3 g/L– Figura 1(d)). A exemplo de comparação, Steinbusch et al. (2011) produziram cerca de 8,2 g/L de ácido capróico com etanol (2,3 g/L), ácido acético (3,0 g/L) e hidrogênio como substratos em um reator em semi-batelada com pH 7,0 e temperatura igual a 30 °C.

O pH foi novamente ajustado para 6,8 no início da B-III (24-36 dias). A operação dos reatores em B-III comprovou a alta capacidade de adaptação da comunidade microbiana para produção de ácido capróico nos três inóculos utilizados no presente experimento. A maior produção de ácido capróico foi novamente alcançada após 7 dias (dia 31 – B-III) com o consumo total de etanol e parcial do ácido acético pelo lodo de cervejaria (10,1 g/L– Figura 1 (c)), seguido pelo fluido ruminal (9,1 g/L- Figura 1 (d)). Grootscholten et al. (2013) produziram cerca de 11,1 g/L de ácido capróico, a partir de ácido acético (8,5 g/L) e etanol (26,0 g/L), com a utilização de um filtro anaeróbio e lodo anaeróbio como inóculo oriundo de uma estação de tratamento de efluentes de cervejaria.

Os resultados obtidos durante os experimentos demonstraram uma maior produção de ácido capróico por meio da adição sequencial em batelada de substratos em relação ao modo de batelada única. Possivelmente, a elevada produção de ácido capróico em modo de batelada sequencial para os dois inóculos foi decorrente de uma adaptação microbiana adequada, através do uso do inibidor de metanogênese 2-BES, do pH inicial próximo ao neutro e da razão entre os substratos sintéticos (etanol e ácido acético), ao longo das três bateladas realizadas, além da diminuição da toxicidade dos ácidos não-dissociados aos microrganismos no meio.



**Figura 1: Produção de ácidos carboxílicos e consumo de etanol em função do tempo para diferentes inóculos em regime de batelada única e batelada sequencial (a) lodo de cervejaria em batelada única (b) fluido ruminal em batelada única; (c) lodo de cervejaria em batelada sequencial (d) fluido ruminal em batelada sequencial.**

## CONCLUSÕES

Com base no trabalho realizado, concluiu-se que:

Os experimentos com lodo de cervejaria e fluido ruminal em batelada sequencial com adição de etanol e ácido acético resultaram em uma maior produção de ácido caproico quando comparado com a batelada única. Nos experimentos de batelada única, a maior produção de ácido caproico ( $3,95 \pm 0,59$  g/L) foi obtida quando o lodo de cervejaria foi utilizado como inóculo. Em relação aos experimentos em batelada sequencial, a primeira batelada (B-I) apresentou o melhor resultado ( $8,14 \pm 0,41$  g/L) com o fluido ruminal e na terceira batelada (B-III) com o lodo de cervejaria ( $10,05 \pm 0,50$  g/L). Experimentos futuros deverão abordar o aumento gradual da escala para reatores em batelada ou contínuos seguidos por técnicas de extração em linha, com o objetivo de garantir uma produção estável de ácido caproico e diminuição da toxicidade de sua forma não-dissociada. Além disso, ressalta-se a necessidade de estudos relacionados a substituição do uso de inibidores químicos (2-BES) e substratos sintéticos em razão dos seus altos custos, com o intuito de garantir a viabilidade econômica da produção biotecnológica de ácido caproico, contribuindo para o desenvolvimento de processos mais sustentáveis e economicamente viáveis na indústria química e energética.



## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AGLER, M. T. et al. Waste to bioproduct conversion with undefined mixed cultures: The carboxylate platform. *Trends in Biotechnology*, v.29, n. 2, p. 70–78, fev. 2011.
2. ANGENENT, L. T.; RICHTER, H.; BUCKEL, W.; SPIRITO, C. M.; STEINBUSCH, K. J. J.; PLUGGE, C. M.; STRIK, D. P. B. T. B.; GROOTSCHOLTEN, T. I. M.; BUISMAN, C. J. N.; HAMELERS, H. V. M. Chain Elongation with Reactor Microbiomes: Open-Culture Biotechnology to Produce Biochemicals. *Environmental Science and Technology*, v. 50, n. 6, p. 2796–2810, 15 mar. 2016.
3. BASTIDAS-OYANEDEL, J. R.; SCHMIDT, J. E. Increasing profits in food waste biorefinery-a techno-economic analysis. *Energies*, v. 11, n. 6, 1 jun. 2018.
4. CAVALCANTE, W. DE A.; LEITÃO, R. C.; GEHRING, T. A.; ANGENENT, L. T.; SANTAELLA, S. T. Anaerobic fermentation for n-caproic acid production: A review. *Process Biochemistry*, v. 54, p. 106–119, 1 mar. 2017.
5. DEBERGH, P.; DAEL, M. VAN. Production of caproic acid from acetate and ethanol through microbial chain elongation: A techno-economic assessment. *Bioresource Technology Reports*, v. 18, 1 jun. 2022.
6. GAVAZZA, S.; AMORIM, N. C. S.; KATO, M. T.; FLORENCIO, L.; AMORIM, E. L. C. Caproic Acid Formation by Carbon Chain Elongation During Fermentative Hydrogen Production of Cassava Wastewater. *Waste and Biomass Valorization*, v. 12, n. 5, p. 2365–2373, 1 maio 2021.
7. GROOTSCHOLTEN, T. I. M.; STEINBUSCH, K. J. J.; HAMELERS, H. V. M.; BUISMAN, C. J. N. Chain elongation of acetate and ethanol in an upflow anaerobic filter for high rate MCFA production. *Bioresource Technology*, v. 135, p. 440–445, 2013.
8. MA, H.; LIN, Y.; JIN, Y.; GAO, M.; LI, H.; WANG, Q.; GE, S.; CAI, L.; HUANG, Z.; LE, Q. VAN; XIA, C. Effect of ultrasonic pretreatment on chain elongation of saccharified residue from food waste by anaerobic fermentation. *Environmental Pollution*, v. 268, 1 jan. 2021.
9. NZETEU, C. ORLINE; COELHO, F.; TREGO, A. C.; ABRAM, F.; RAMIRO-GARCIA, J.; PAULO, L.; O'FLAHERTY, V. Development of an enhanced chain elongation process for caproic acid production from waste-derived lactic acid and butyric acid. *Journal of Cleaner Production*, v. 338, 1 mar. 2022.
10. ROGHAI, M. et al. Development of an effective chain elongation process from acidified food waste and ethanol into n-Caproate. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, v. 6, n. 50, 27 abr. 2018.
11. SAN-VALERO, P.; ABUBACKAR, H. N.; VEIGA, M. C.; KENNES, C. Effect of pH, yeast extract and inorganic carbon on chain elongation for hexanoic acid production. *Bioresource Technology*, v. 300, 1 mar. 2020.
12. SPIRITO, C. M.; RICHTER, H.; RABAEY, K.; STAMS, A. J. M.; ANGENENT, L. T. Chain elongation in anaerobic reactor microbiomes to recover resources from waste. *Current Opinion in Biotechnology*, v. 27, p. 115–122, 2014.
13. VERAS, S. T. S. et al. Anaerobic production of valeric acid from crude glycerol via chain elongation. *International Journal of Environmental Science and Technology*, v. 17, n. 3, p. 1847–1858, 1 mar. 2020.