UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA DE ENGENHARIA DE SÃO CARLOS
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA HIDRÁULICA E SANEAMENTO

WILLAME DE ARAÚJO CAVALCANTE

**Fermentação anaeróbia para formação de ácido caproico a
partir de produtos e subprodutos da cadeia produtiva da
cana-de-açúcar**

VERSÃO CORRIGIDA

São Carlos, SP

2016

WILLAME DE ARAÚJO CAVALCANTE

Fermentação anaeróbia para formação de ácido caproico a
partir de produtos e subprodutos da cadeia produtiva da cana-
de-açúcar

Dissertação apresentada à Escola de
Engenharia de São Carlos, da
Universidade de São Paulo, como parte
dos requisitos para obtenção do título de
Mestre em Ciências: Engenharia
Hidráulica e Saneamento.

Orientadora: Profa. Dra. Sandra Tédde
Santaella

São Carlos

2016

AUTORIZO A REPRODUÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

C377f Cavalcante, Willame de Araújo
Fermentação anaeróbia para formação de ácido caproico a partir de produtos e subprodutos da cadeia produtiva da cana-de-açúcar / Willame de Araújo Cavalcante; orientadora Sandra Tédde Santaella. São Carlos, 2016.

Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação e Área de Concentração em Hidráulica e Saneamento -- Escola de Engenharia de São Carlos da Universidade de São Paulo, 2016.

1. alongamento de cadeia carboxílica. 2. Clostridium Kluyveri. 3. ácidos orgânicos. 4. processo caprogênico. 5. indústria sucroalcooleira. I. Título.

FOLHA DE JULGAMENTO

Candidato: Bacharel **WILLAME DE ARAÚJO CAVALCANTE**.

Título da dissertação: "Fermentação anaeróbia para formação de ácido caproico a partir de produtos e subprodutos da cadeia produtiva da cana-de-açúcar".

Data da defesa: 09/05/2016

Comissão Julgadora:

Resultado:

Profa. Dra. **Sandra Tédde Santaella (Orientadora)**
(Universidade Federal do Ceará/UFC)

Aprovado

Prof. Dr. **Adrianus Cornelius Van Haandel**
(Universidade Federal de Campina Grande/UFCG)

Aprovado

Prof. Dr. **Arnaldo Sarti**
(Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho"/UNESP-Araraquara)

Aprovado

Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Hidráulica e Saneamento:

Profa. Associada **Maria Bernadete A. Varesche Silva**

Presidente da Comissão de Pós-Graduação:
Prof. Associado **Paulo César Lima Segantine**

ao meus pais, José Wilton e Antônia Célia, pelo amor e carinho;

à memória de minha avó, Maria Idelzuíte; a velhinha que tornou tudo isso possível.

Agradecimentos

Primeiramente à “Deus”.

À dona Célia e seu esposo José Wilton por acreditarem tanto em seu filho cheio de sonhos.

Aos meus irmãos Weudes, Wheverton e Williane por simplesmente existirem com suas mais diversas personalidades.

À minha tia Silvia Elena pelo apoio e pelo incentivo à vida acadêmica.

Aos meus orientadores Sandra Santaella e Renato Leitão pela contribuição pessoal e profissional ao longo de toda minha vida acadêmica. Obrigado pelas broncas e pelos desafios que juntos nos dispomos a superar.

À Kiemi Murata, pelo Incentivo, companheirismo, apoio e por sempre ter escutado minhas teorias “caprogênicas” por várias e várias horas. Apesar da distância você tornou essa jornada bem mais agradável.

Aos meus irmãos não sanguíneos: Daniel Rodrigues, Icaro Breno, Edilson Bieh e Vitor Mendes. Parceria, brigas e risos são coisas de irmãos.

À Isabele Baima minha querida amiga e parceira de trabalho. Não há palavras bonitas ou enfeitadas que possam descrever minha gratidão e felicidade por ter você como amiga.

À Clara Cabral e família, pela prontidão quase 100% em ajudar esse velho e implicante amigo.

Aos mais que companheiros de trabalho no ambiente da Embrapa: Beatriz, Aldo, Rose, Camila, Michael, Amanda, Netinho, Edna, Gleyciara, Ana Claudia, Vanessa, Matheus, Vitória, Halisson, Rayane, Eduardo, Yale, Menta, Niédja, Diego, Eligenes, Celso, Avelino e Alex.

Ao Prof. Adrianus Cornelius van Haandel pela colaboração na pesquisa.

Aos Professores Eduardo Cleto, Eugênio Forest e Marcia Damianovic pelo apoio durante minha qualificação.

Aos funcionários e técnicos da Embrapa: Francisca (Chiquinha), Ana Cassales, Natália e Lillian. Aqui deixo um misto de agradecimento e desculpas pelas inúmeras vezes que eu as perturbei.

Aos meus grandes conselheiros de cantina Alexandre Guilherme, Tito Gehring, Men de Sá e Socorro Vale. Aprendi lições de vida, de boas amizades e de honestidade com nossas horas de cantina.

Aos meus grandes amigos de horta, futebol e *jungle fight* da inoxidável Rep. XB: Rodrigo (Bel), Guilherme (Monstro) e Mateus (Teta). Vocês são estrogonoficamente sensíveis e inoxidáveis. Desejo que as placas tectônicas de suas cabeças abram para a entrada de mais conhecimento.

Aos membros da Rep. Senzala/Canapum: Fafito, Cumpadim, Gerffim e Jorjão pelo companheirismo, descontração e noites de conversa a dentro.

Aos grandes conselheiros de turma Thiago Borges (Topete) e Raimundo Neto pelos ensinamentos e apoio durante o mestrado. Até parecia que nosso curso era de políticas sociais.

Aos que ficaram na lembrança daquele um ano de São Carlos: Dayane (Day), Fernanda (Feer), Guilherme Morh, Juliana (Juu) e Daniele (pariconha).

Ao apoio, amizade e bom acolhimento de Bobo e Nay. Um casal batráqueo e retombante. Mesmo nascidos em regiões distantes nossos valores são próximos.

Aos irmãos que achei em São Carlos Cebola, Pauleta, Dico e Zé da correria pela amizade, gargalhadas e apoio. Tenho mais de mil histórias para contar aos meus futuros netos.

Aos quase agregados da Rep. XB: Seu Jorge, Mineiro, Marcão, Goiaba, Rafael; Alecrim, Chê, Lôide, Perri, Nay, Anne, Ynaê, Carlinha, Chamego, Daniel e Júlia pelas histórias construídas.

Aos meus conterrâneos de Quixeramobim Beatriz, Janilli, Renata, Jákson, Eugênia, Dorinha, Ana Mara, Nataline, Roberta e Bruna pelo apoio e amizade.

Aos amigos de oito anos de jornada em Fortaleza Paulo Lima, Rennyê, Paulo Ipiranga, André Pofório, Danilo, Clice, Rosinha e Lívia Pitombeira pelo apoio e amizade.

À Embrapa agroindústria tropical pelo suporte técnico e material para a realização dessa pesquisa.

À Universidade Federal do Ceará, em especial aos Professores (as): Carlos Teixeira, Daniele Garcez, Oscarina Viana e Eduardo Sávio do Instituto de Ciências do Mar - LABOMAR. Obrigado por contribuírem com minha formação acadêmica.

À Universidade de São Paulo, à Escola de Engenharia de São Carlos e ao Departamento de Hidráulica e Saneamento. Ao setor administrativo Sá e Priscila.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa concedida (processo: 130672/2014-9) e pelo financiamento do Projeto Universal Nº: 472420/2013-5.

*“Eu nasci no interior
nunca neguei a ninguém
a terra que a gente vem
merece todo amor
lá sorri e senti dor
lá eu fui feliz demais
Sempre que olho pra trás
quero voltar sem ter freio
Quem esquece de onde veio
não sabe pra onde vai”*

- Bráulio Bessa; O Poeta nordestino.

RESUMO

Cavalcante, W. A. **Fermentação anaeróbia para formação de ácido caproico a partir de produtos e subprodutos da cadeia produtiva da cana-de-açúcar**. 2016. 136 f. Dissertação (Mestrado). Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2016.

O ácido caproico é derivado da cadeia petroquímica e, tem diversas aplicações na indústria química. No entanto, este ácido pode ser produzido de forma mais ambientalmente adequada, a partir da fermentação anaeróbia. O objetivo dessa pesquisa foi investigar condições operacionais para a formação anaeróbia de ácido caproico a partir de produtos e subprodutos da indústria sucroalcooleira. Utilizou-se um reator anaeróbio de manta de lodo e fluxo ascendente (UASB - *Upflow Anerobic Sludge Blanket*), com volume útil de 13,8 L, alimentado com substratos simples (etanol e ácido acético) ou com substrato complexo (fermentado alcoólico de melaço de cana). Durante a operação do reator UASB, a COV variou de 2,0 a 5,5 gDQO.L⁻¹.d⁻¹ em pH ácido (5,3). A taxa de produção volumétrica de ácido caproico a partir de substrato simples (1,0 gC6.L⁻¹.d⁻¹) em reator UASB foi superior àquela com substrato complexo (0,2 gC6.L⁻¹.d⁻¹). Em pH de aproximadamente 5,3, a produção de ácido caproico ficou limitada a um valor de aproximadamente 2,8 gC6.L⁻¹ devido a maior presença de ácidos não dissociados. Utilizando fermentado de melaço de cana contendo etanol (150 mM de etanol), é possível atingir uma produção de até 4,0 gC6.L⁻¹ em pH com adição clorofórmio como inibidor seletivo para organismos metanogênicos. A presença de ácido acético acelera a formação de ácido butírico, resultando no acúmulo deste devido à ausência de etanol como doador de elétrons. Dessa forma, a formação de ácido caproico a partir de fermentado de melaço de cana não necessita da adição externa de ácido acético. É necessária extração seletiva do ácido caproico, evitando o acúmulo indesejado.

Palavras-chave: alongamento de cadeia carboxílica, *Clostridium Kluyveri*, ácidos orgânicos; processo caprogênico, indústria sucroalcooleira.

ABSTRACT

Cavalcante, W. A. **Anaerobic fermentation for caproic acid training from products and by-products of the sugarcane industry**. 2016. 136 f. Dissertação (Mestrado). Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2016.

Caproic acid is derived from the petrochemical production chain and has many applications in the chemical industry. However, this acid can be produced in a more environmental friendly technological route, using the anaerobic fermentation. The objective of this research was to investigate the operational conditions for anaerobic caproic acid formation using the products and by-products of the sugarcane industry. We used an upflow anaerobic sludge blanket and upflow (UASB - Upflow Sludge anaerobic Blanket), with a working volume of 13.8 L, fed with simple substrates (ethanol and acetic acid) or complex substrate (undistilled fermented molasses). During the UASB reactor operation, OLR ranged from 2.0 to 5.5 gDQO.L⁻¹.d⁻¹ at acid pH (5.3). The volumetric production rate of caproic acid from simple substrates (1.0 gC6.L⁻¹.d⁻¹) in UASB reactor was superior to that from complex substrate (0.2 gC6.L⁻¹.d⁻¹). At pH of approximately 5.3, caproic acid production was limited to a value of approximately 2.8 gC6.L⁻¹ due to the greater presence of non-dissociated acids. Using fermented sugar cane molasses containing ethanol (150 mM ethanol), can be achieved a production of up to 4.0 gC6.L⁻¹ in pH by adding chloroform as a selective inhibitor for methanogenic organisms. The presence of acetic acid accelerates the formation of butyric acid, resulting in the accumulation of this due to the absence of ethanol as an electron donor. Thus, the formation of caproic acid from fermented molasses does not require the external addition of acetic acid. It is necessary selective extraction of caproic acid, preventing unwanted accumulation.

Keywords: carboxylic chain elongation, *Clostridium kluyveri*, organics acids; caprogenic process, sugar-cane industry.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Fluxograma da unidade de processamento de cana-de-açúcar, adaptado de Dias et al. (2011), (2012), (2015); Mariano et al. (2013) e Nova projeção considerando a produção de ácido caproico conciliada ao processo sucroalcooleiro com adaptações para o ciclo de vida da unidade. Editado por Adrianus Van Haandel.	34
Figura 2 - Esquema simplificado da diversidade de metabólitos formados durante a fermentação anaeróbia, com ênfase à formação de ácido orgânicos em cultura mista. Adaptado de (MOSEY, 1983; WANG; MU; YU, 2007; AGLER et al., 2011; LIU; JARBOE, 2012).	38
Figura 3 - Resumo da rota metabólica de formação de ácido butírico e ácido caproico a partir de etanol e ácido acético; adaptado (STAMS, 1994a; HERRMANN et al., 2008; LI et al., 2008; SEEDORF et al., 2008; DEKISHIMA et al., 2011; GONZÁLEZ-CABALEIRO et al., 2013; CHEON et al., 2014; SPIRITO et al., 2014).	41
Figura 4 - Diagrama de dissociação do ácido caproico (—) e caproato (---) em função do pH; e concentração de ácido caproico (●) em função do limite de toxicidade teórico admitido para cada condição de pH.	51
Figura 5 - Fluxograma experimental da produção anaeróbia de ácido caproico em sistemas biológicos.	59
Figura 6 - Esquema e fotografia do reator UASB utilizado como unidade operacional para produção de ácido caproico.	61
Figura 7 - Teste em batelada com FMC.	65
Figura 8 – Produtos formados (ácido butírico (■) e ácido caproico (■)) e substratos remanescentes (etanol (O) e ácido acético (●)) com valores médios seguidos dos intervalos de confiança para cada variável das diferentes etapas de operação do reator UASB.	76

Figura 9 - Monitoramento do reator caprogênico UASB alimentado com substrato simples: A) COV de referência; B) substratos remanescentes; C) AGV produzidos e D) produção de biogás.....	79
Figura 10 - Taxa de produção volumétrica do PACC para produção de ácido butírico e ácido caproico.....	81
Figura 11 - Seletividade de elétrons durante o PACC e formação de ácido butírico (●) e ácido caproico (●) durante a operação do reator UASB alimentado com substrato simples.....	83
Figura 12 - Produção de biogás (A), hidrogênio (B), metano (C) e dióxido de carbono (D) no reator UASB caprogênico alimentado com substrato simples.	85
Figura 13 - Erro para o balanço de DQO para período de operação do reator UASB alimentado com substrato simples.....	86
Figura 14 –Concentrações de etanol (■) ácido acético (■), ácido butírico (●) e ácido caproico (■) durante os testes em batelada para as relações EtOH:C2 de: [a] 2:1; [b] 4:1; [c] 6:1; [d] 8:1; [e] 10:1 e [f] 150.	89
Figura 15 – Percentual de matéria orgânica incorporado aos produtos alongados durante o PACC; com formação de ácido butírico (C4) e ácido caproico (C6).	92
Figura 16- Regressão linear da produção de ácido butírico a partir do acréscimo de ácido acético adicionado; considerando todos os experimentos e sua resposta ao tempo de incubação: (D2) de dois dias, (D6) de seis dias e (D12) de dose dias.....	93
Figura 17 - Seletividade de: ácidos alongados (●), ácido butírico C4 (o), ácido caproico C6 (●). Rendimento do PACC para formação de ácido butírico C4 (□) e ácido caproico (■).....	95
Figura 18 - Produção total de biogás no final de 12 dias de incubação para o experimento em batelada.	98
Figura 19 – Monitoramento do reator caprogênico UASB alimentado com FMC: A) COV de referência; B) substratos remanescentes; C) AGV produzidos e D) produção de biogás.	101

Figura 20 -Seletividade da conversão de elétrons durante o PACC para formação de: ácido butírico (■), ácido caproico (■) e total de ácidos alongados (■) ao longo do período de operação do reator UASB alimentado com FMC.	102
Figura 21 – Resultados da produção de AGV nos dois lodos e nas três variações da concentração de substrato.	123
Figura 22 - Percentual de ácido acético (C2), ácido butírico (C4) e ácido caproico (C6) nos dois lodos e nas três variações da concentração de substrato.	124
Figura 23 - Fermentação alcoólica do melaço de cana-de-açúcar variando a concentração de levedura 5,0% (A) e 7,0% (B) em seis horas com concentrações de sacarose de 250 g.L ⁻¹ e em vinte e quatro horas com concentração de sacarose de 200 g.L ⁻¹ (C).	126
Figura 24 - Diagrama da preferência termodinâmica para o PACC em cultura mista: etanol como doador de elétrons.	130
Figura 25 - Diagrama da preferência termodinâmica para o PACC em cultura mista: hidrogênio como doador de elétrons	132
Figura 26 - Diagrama da preferência termodinâmica para o PACC em cultura mista: formação de substratos.	133
Figura 27 – Diagrama da preferência termodinâmica para o PACC em cultura mista: competição por substratos.	135
Figura 28 - Representação das interações termodinâmicas de dependência entre a pressão parcial de H ₂ e as diversas reações de fermentação secundária associadas à produção de ácido caproico em cultura mista anaeróbia: (A) oxidação de ácido propanoico a ácido acético; (B) oxidação de ácido butírico a ácido acético; (C) oxidação de etanol a ácido acético; (D) metanogênese acetoclástica; (E) oxidação de ácido acético pelas BRS; (F) processo caprogênico que usa etanol como doador de elétrons; (G) processo caprogênico que utiliza H ₂ como doador de elétrons; (H) metanogênese hidrogenotrófica; (I) processo caprogênico que utiliza H ₂ como doador de elétron; (J) oxidação de H ₂ pelas BRS.	136

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Principais ácidos orgânicos produzidos a partir da fermentação anaeróbia de compostos orgânicos	36
Tabela 2 - Principais reações anaeróbias envolvendo culturas mistas para produção de ácido caproico	46
Tabela 3 - Resumo da produção anaeróbia de ácido caproico com a utilização de culturas mistas em diversas condições operacionais	57
Tabela 4 - Concentração de nutrientes a ser mantida no afluente contendo etanol e acetato para produção de ácido caproico.	62
Tabela 5 - Variáveis operacionais pré-estabelecidas para a produção de ácido caproico a partir de substrato simples (etanol e ácido acético).	63
Tabela 6 - Descrição do teste em batelada para a produção de ácido caproico utilizando FMC.	66
Tabela 7 - Variáveis operacionais pré-estabelecidas para a produção de ácido caproico a partir de substrato simples (FMC).	67
Tabela 8 - Programa de monitoramento do sistema de produção de ácido caproico	68
Tabela 9: Resumo das variáveis operacionais durante o período de alimentação com substrato simples.	75
Tabela 10 - Resumo dos produtos consumidos e dos metabólitos produzidos nos experimentos em batelada com FMC.	88
Tabela 11 - Resumo das variáveis operacionais durante o período de alimentação com substrato complexo (FMC).	99
Tabela 12 – Cálculo da viação de ΔG das reações envolvendo no PACC: etanol como doador de elétrons.	129
Tabela 13 - Cálculo da variação de ΔG das reações envolvendo no PACC: hidrogênio como doador de elétrons.	131

Tabela 14 - Cálculo da variação de ΔG das reações envolvendo no PACC: glicose como fornecedor de substratos 132

Tabela 15 - Cálculo da variação de ΔG das reações envolvendo no PACC: competição por substratos..... 134

LISTA DE ABREVIATÖES

AGCC – Ácidos graxos de cadeia curta;
AGCM – Ácidos graxos de cadeia média;
AGV – Ácidos Graxos Voláteis;
AM – Arqueas metanogênicas;
AMA – Arqueas metanogênicas acetoclásticas;
AMH – Arqueas metanogênicas hidrogenotróficas;
ASBR – *Anaerobic Sequencing Batch Reactor ou Reator de batelada sequencial*;
ATP – Adenosina Trifosfato;
BRS – Bactérias redutoras de Sulfato.
CNTP – Condições normais de temperatura e pressão;
COV – Carga Orgânica Volumétrica;
CoA – Coenzima A;
STR – *Reator de mistura completa*;
DQO – Demanda Química de Oxigênio;
FA – Filtro anaeróbio;
FADH e FAD – Dinucleótido de Adenina Flavina
FAS – Fosforilação em nível de substrato;
HAc – Ácido acético;
HBu – Ácido butírico;
HCa – Ácido caproico;
HCp – Ácido caprílico;
HEn – Ácido enântico;
HPe – Ácido pelargônico;
HPr – Ácido propanoico;
HPLC – *High Performance Liquid Chromatographic* - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência;
LCCV – Líquido da casca do coco verde;

LDO – Lodo doméstico;

LGR – Lodo granular;

LTB – Laboratório de Tecnologia da Biomassa;

MC – Melaço de cana-de-açúcar;

FMC – Fermentado de melaço de cana-de-açúcar;

NADH e NAD – Nicotinamida-Adenina-Dinucleotídeo;

OFMSW – Fração líquida de resíduo orgânico doméstico;

PACC – Processo biológico de alongamento de cadeia carboxílica;

SGF – Fermentação do tipo gás de síntese;

SSV – Sólidos suspensos voláteis;

STR - *Stirred Tank Reactor* - Reator de mistura completo;

UASB – Upflow Anaerobic Sludge Blanket - Reator anaeróbio de fluxo ascendente e manta de lodo;

TDC – Tempo de retenção celular;

TDH – Tempo de detenção hidráulica;

2-BES – 2- bromoetanosulfônico.

LISTA DE SÍMBOLOS

- C2 – concentração total de ácido acético (gC2.L^{-1});
- C4 – concentração total de ácido butírico (gC4.L^{-1});
- C6 – concentração total de ácido caproico (gC6.L^{-1});
- C8 – concentração total de ácido caprílico (gC8.L^{-1});
- DQO_{C6} - Valor teórico (gDQO.gC6^{-1});
- DQO_{C2} - Valor teórico (gDQO.gC2^{-1});
- DQO_{EtOH} - Valor teórico (gDQO.gEtOH^{-1});
- EtOH – Concentração de etanol (gEtOH.L^{-1});
- EtOH:C2 – Relação molar etanol: ácido acético;
- Erro (%) – Erro para o balanço de DQO (%);
- K – Temperatura (Kelvin);
- pKa – Constante de Ionização Ácida;
- R – Constante dos gases ($0,0823 \text{ J mol}^{-1}$);
- SC_4 – Seletividade para produção de ácido butírico (% de elétrons equivalentes);
- SC_6 – Seletividade para produção de ácido caproico (% de elétrons equivalentes);
- S_{AGCM} – Seletividade para produção de ácidos graxos de cadeia média (% de elétrons equivalentes);
- V^1_{CNTP} = volume padrão de metano no biogás ($0,35 \text{ L CH}_4.\text{kg DQO}^{-1}$).
- V^2_{CNTP} = Volume padrão de hidrogênio no biogás ($1,46 \text{ L H}_2.\text{kg DQO}^{-1}$).
- Y_{C4} – Taxa de produção volumétrica de ácido butírico ($\text{gC4.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$);
- Y_{C6} – Taxa de produção volumétrica de ácido caproico ($\text{gC6.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$);
- Y_{C8} – Taxa de produção volumétrica de ácido caproico ($\text{gC8.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$);
- y_{AGV} = Coeficiente de produção celular para organismos acidogênicos em kgSV.kgDQO^{-1} ;
- μ_m – Taxa máxima de crescimento específico (d^{-1});
- ϕ_x - Coeficiente estequiométrico de uma dada reação (mol);
- ΔG_R^0 - Energia livre de Gibbs (kJ.mol^{-1});
- ΔG_R^1 - Variação da Energia livre de Gibbs em pH 7,0 ($\text{kJ}.\text{(mol H}^+)^{-1}$);

ΔG_R^2 - Variação da Energia livre de Gibbs em pH 5,3 ($\text{kJ} \cdot (\text{mol H}^+)^{-1}$)

ΔG_R^3 - Variação Energia livre de Gibbs em pH 7,0 e pressão parcial de H_2 de 1,0 bar ($\text{kJ} \cdot (\text{mol H}_2)^{-1}$);

$\%\text{CH}_4$ = Porcentagem de metano no biogás;

$\%\text{H}_2$ = Porcentagem de hidrogênio no biogás.

Sumário

1. INTRODUÇÃO	29
2. OBJETIVOS	31
2.1 Objetivo Geral	31
2.2 Objetivos Específicos	31
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	32
3.1 Cenário da cana-de-açúcar	32
3.2 Novos desafios	32
3.3 Plataforma de ácidos carboxílicos formados durante a fermentação anaeróbia	35
3.4 Fermentação anaeróbia	37
3.5 Alongamento de cadeia carboxílica	39
3.6 Efeito do substrato na produção de AGCM	43
3.6.1 Doadores de elétrons para o processo caprogênico	44
3.6.2 Influência da pressão parcial de hidrogênio	47
3.7 Condições operacionais para produção de ácido caproico em cultura mista	48
3.7.1 Competição biológica	48
3.7.2 Estratégias para evitar competição biológica	50
3.8 Sistema de produção de ácido caproico	55
4. MATERIAL E MÉTODOS	59
4.1 Descrição geral do experimento	59
4.2 Experimento 1: Produção de ácido caproico em reator UASB alimentado com substrato simples (etanol e ácido acético)	60
4.2.1 Reator UASB	60
4.2.2 Inóculo	61
4.2.3 Partida do reator UASB	62
4.3 Experimento 2: Substrato complexo em sistema de batelada	64
4.3.1 Ensaio em batelada	64
4.4 Experimento 3): Substrato complexo em reator UASB	66
4.5 Monitoramento do processo caprogênico	67
4.5.1 Métodos analíticos	68
4.5.2 Cálculos	69
4.5.3 Métodos estatísticos para tratamento dos dados	73
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	74
5.1 Experimento 1: operação do reator UASB com substrato simples	74

5.1.1	Etapa I - Partida e adaptação de inóculo.....	74
5.1.2	Etapa II - Interferências nutricionais	74
5.1.3	Avaliação do processo de alongamento de cadeia carboxílica	78
5.1.4	Produtividade do sistema caprogênico	80
5.1.5	Inibição da atividade metanogênica durante o Experimento 1	84
5.1.6	Balanço de massa	86
5.2	Experimento 2): Teste em batelada com substrato complexo	87
5.2.1	Produção de AGCM usando substrato complexo	87
5.2.2	Produtividade do PACC	94
5.2.3	Inibição da atividade metanogênica.....	96
5.3	Experimento 3: operação do reator UASB com substrato complexo (substituição).....	98
5.3.1	Substituição de substrato	98
5.3.1	Produção de AGV e implicações	102
6.	CONCLUSÕES	104
7.	SUGESTÕES DE CONTINUIDADE DA PESQUISA	105
8.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	106
9.	ANEXOS.....	122
9.1	ANEXO- A	122
9.2	ANEXO- B	125
9.2.1	Preparo do fermentado de melaço	125
9.2.2	Fermentação alcoólica do melaço	125
9.3	ANEXO C	127

1. INTRODUÇÃO

Desde final do século XX aumentou-se o número de pesquisas para minimizar e mitigar impactos ambientais causados pela exploração energética mundial. Nesse sentido, a fermentação anaeróbia tornou-se uma das biotecnologia mais exploradas, com intuito de gerar produtos viáveis econômica e ambientalmente, a partir da reutilização de uma variedade de biomassas, incluindo resíduos orgânicos (MATA-ALVAREZ et al., 2014).

O ácido caproico pode ser considerado um bioproduto de grande interesse para a indústria em geral (NAGAO; YANAGITA, 2010; LAYEK; SINGH, 2013; LAYEK et al., 2014), pois pode ser obtido a partir da fermentação anaeróbia, em substituição ao processo tradicional oriundo da cadeia produtiva petroquímica (WASEWAR; SHENDE, 2010). Na indústria de ração, o ácido caproico é considerado um controlador potencial de bactérias entéricas (IMMERSEEL et al., 2004), usado diretamente como aditivo em rações de frangos e suínos, em substituição aos “antibióticos promotores de crescimento¹” (ROSSI et al., 2010). Além disso, existem processos biológicos e químicos capazes de reduzir este ácido orgânico em hexanol (DEKISHIMA et al., 2011; HARVEY; MEYLEMANS, 2014). Misturas de hexanol no diesel, biodiesel ou na gasolina tornam o processo de combustão mais eficiente (MA; HANNA, 1999; SATHIYAGNANAM; SARAVANAN; GOPALAKRISHNAN, 2010).

Uma série de configurações de reatores anaeróbios acidogênicos, em escala de bancada, está sendo utilizada para avaliar a produção de ácidos graxos de cadeia média (AGCM), a partir da combinação de vários produtos orgânicos. Grootscholten et al., (2013b) e Grootscholten et al., (2013c), por exemplo, utilizaram substrato simples contendo etanol e ácido acético para produção de ácido caproico em filtro anaeróbio (FA). Nas duas pesquisas, foi encontrada uma taxa de produção volumétrica de ácido caproico entre 7,0 e 12,0 gC₆.L⁻¹.d⁻¹. Em outra vertente, Agler

¹ O efeito bactericida do ácido caproico controla comunidades entéricas, fazendo que animais juvenis de frangos e suínos possam crescer mais rápido devido à economia de energia. Por isso a denominação de antibiótico promotor de crescimento por Rossi et al. (2010).

et al. (2012) e Ge et al. (2015) utilizaram substrato complexo (fermentado de milho não destilado contendo etanol) como única fonte de carbono para produção de ácido caproico em reator anaeróbio sequencial de batelada (*Anaerobic Sequential Batch Reactor* - ASBR). Em ambas as pesquisas, a taxa de produção volumétrica de ácido caproico foi de 2,0 a 5,0 gC6.L⁻¹.d⁻¹.

A eficiência do processo anaeróbio de produção de ácido caproico (processo caprogênico) depende de várias condições operacionais e ambientais, tais como: temperatura, tempo de detenção, pH, mistura, nutrientes e inibição seletiva. Contudo, os ajustes desses indicadores ainda precisam ser discutidos em detalhe para a otimização do processo produtivo, garantindo ampliação de escala desse processo bioquímico.

A produção anaeróbia de ácido caproico, a partir de substratos complexos tem grande potencial para a produção tradicional desse ácido. Dessa maneira, existe a possibilidade de produzir ácido caproico a partir de produtos orgânicos gerados em grandes cadeias de produção agropecuárias. No Brasil, a cadeia produtiva de cana-de-açúcar é uma opção viável para obter uma fonte de carbono alternativa, por exemplo: o fermentado não destilado do caldo de cana-de-açúcar (mosto) e o melaço oriundo da produção de açúcar. Essa alternativa é vantajosa por diversificar os produtos da indústria sucroalcooleira a partir da inserção de uma plataforma carboxílica, gerando mais um produto com valor econômico alto. Além disso, alterar a fonte de carbono e o processo de produção pode trazer benefícios ambientais, já que o petróleo (matriz de produção comercial de ácido caproico) não é um recurso renovável e a indústria petroquímica é uma atividade causadora de impactos ambientais significativos.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar a produção anaeróbia de ácido caproico em reator UASB inoculado com cultura mista alimentado com substratos simples (prontamente disponíveis) e substrato complexo (não prontamente disponível).

2.2 Objetivos Específicos

- Monitoramento das condições operacionais de partida em reator UASB inoculado com cultura mista e alimentado com substrato simples (etanol e ácido acético) para produção de ácido caproico.
- Avaliar a produção de ácido caproico a partir de substrato simples (etanol e ácido acético) em reator UASB em pH ácido (aproximadamente 5,3), sem adição de inibidor seletivo para arqueas metanogênicas (AM).
- Avaliar a produção de ácido caproico a partir de substrato complexo (fermentado de melaço de cana) em sistema de batelada em pH neutro (aproximadamente 7,0), com adição de inibidor seletivo para AM.
- Avaliar a necessidade da adição externa de receptores de elétrons na forma ácido acético quando da utilização de substrato complexo (fermentado de melaço de cana).
- Monitoramento das condições operacionais para produção de ácido caproico em reator UASB alimentado com substrato complexo (fermentado não destilado de melaço de cana-de-açúcar).
- Avaliar a produção de ácido caproico a partir de substrato complexo em reator UASB em pH ácido (aproximadamente 5,3), sem adição de inibidor seletivo para arqueas metanogênicas (AM).

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Cenário da cana-de-açúcar

O Brasil e os Estados Unidos da América (EUA) geram aproximadamente 80% da produção mundial total de etanol (BAEYENS et al., 2015; GUPTA; PRAKASH, 2015; OECD-FAO, 2015). Enquanto o Brasil utiliza cana-de-açúcar como matriz orgânica para produção de etanol e açúcar, os EUA utilizam amido de milho. As indústrias brasileiras de processamento de cana são flexíveis quanto à produção de etanol e açúcar. De maneira que, a produção de um ou de outro dependerá do preço de mercado para cada produto. Contudo, em ambas as rotas de processamento de cana-de-açúcar, são gerados subprodutos diversos e de baixo valor de mercado, como, o bagaço da cana, o melaço e a levedura seca (ZHANG et al., 2010; LI et al., 2012). Essas biomassas contêm concentração elevada de carbono orgânico (SINDHU et al., 2016), representando um potencial para produção de ácidos orgânicos, inclusive o ácido caproico (ANGENENT, LARGUS T; AGLER, 2015).

De acordo com dados obtidos por levantamento anual, realizado pela Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB), a produção de cana no Brasil ocupa aproximadamente 9,0 milhões de hectares do território nacional (dados da safra 2015/2016) (CONAB, 2015). A produção de cana para a safra 2015/2016 foi estimada em aproximadamente 658,7 milhões de toneladas. A produção de etanol para esse mesmo período de safra foi de aproximadamente 30 bilhões de litros, com uma produção paralela de açúcar de aproximadamente 34,6 milhões de toneladas. De acordo com dados previstos pela *Organisation for Economic Co-operation and Development* (OEACD-FAO), o melaço proveniente da produção de açúcar, no Brasil, alcançará uma produção de aproximadamente 14,88 milhões de toneladas para o ano de 2016 (OECD-FAO, 2016).

3.2 Novos desafios

Estratégias e desafios para a produção de ácido caproico sem a necessidade de uso externo de etanol surgiram a partir dos estudos de Agler et al. (2012), nos

EUA. Esses autores utilizaram fermentado de amido de milho não destilado proveniente da indústria de etanol como único substrato para a produção anaeróbia de ácido caproico. Os autores sugeriram essa biotecnologia poder ser ampliada como forma de valorar biomassas dentro de uma usina de produção de etanol. Seguindo a proposta do estudo de Agler et al. (2012), com adaptações da patente de Angenent; Agler, (2015), é possível que produtos e subprodutos da cadeia produtiva da cana-de-açúcar, ricos em carboidratos, tornem-se potencial fonte de carbono para a produção ácido caproico.

A plataforma carboxílica sugerida nessa pesquisa mostra que é possível conciliar a produção de etanol e ácido caproico a partir produtos gerados na própria usina, como: caldo de cana, bagaço pré-tratado e melaço (Figura 1). As diversas combinações de produtos e subprodutos da cadeia produtiva da cana-de-açúcar que serviriam como fonte de carbono para a produção de ácido caproico são: fermentado alcoólico não destilado de caldo de cana, fermentado alcoólico não destilado de melaço e bagaço após pré-tratamento físico-químico para hidrólise da celulose e da hemicelulose (linha de produção de etanol de segunda geração). Dessa forma, as usinas de processamento de cana-de-açúcar não eliminariam as linhas de produção de etanol e açúcar, mas introduziriam uma nova unidade para produção de ácido caproico, diversificando, assim, os produtos da cadeia produtiva da cana-de-açúcar.

Agler et al. (2012) mostraram que, se o fermentado alcoólico de amido de milho é utilizado como substrato para a produção anaeróbia de ácido caproico em cultura mista, a massa produzida deste do ácido é cerca de 10% maior do que a massa de etanol (ambos medidos em função da DQO). Isso ocorre devido a conversão em DQO de outros substratos orgânicos presentes no fermentando de amido de milho (leveduras, células e carboidratos não digeridos).

A energia de combustão de glicose e de ácido caproico é de $2805,0 \text{ kJ.mol}^{-1}$ e $3452,0 \text{ kJ.mol}^{-1}$, respectivamente. A conversão teórica em massa de ácido caproico por massa de glicose é de 348 g por 720 g, isto é, a massa do produto desejado é de 48% da massa de açúcar convertido. Assim, pode-se afirmar que o processo de produção de ácido caproico a partir de glicose recupera uma grande parcela do

produção de ácido caproico (STEINBUSCH et al., 2011). O ácido caproico não é aplicável como biocombustível, contudo, a oxidação química desse ácido gera um álcool (hexanol) que possui um poder calorífero maior do que o etanol, podendo ser utilizado como combustível (HARVEY; MEYLEMANS, 2014).

Em se tratando de preço, a demanda de mercado do ácido capróico é cerca de US\$ 2,0 por quilo (1,07 L) de ácido, enquanto que o preço de mercado para o etanol é de aproximadamente US\$ 0,70 por quilo (1,26 L) (ALIBABA, 2016). Se o valor de mercado do ácido caproico é comparado ao preço de mercado do etanol, nota-se um ligeiro saldo quanto a produção de ácido caproico por consumo teórico de etanol (2 a 3 mols de etanol para formação de 1 mol de ácido caproico).

3.3 Plataforma de ácidos carboxílicos formados durante a fermentação anaeróbia

Na Tabela 1, estão expostas as características mais relevantes dos principais ácidos graxos voláteis (AGV) produzidos durante a fermentação anaeróbia, componentes da plataforma carboxílica. Esses ácidos podem ser separados de acordo com o número de átomos de carbono ligados à cadeia carboxílica: ácidos graxos voláteis de cadeia curta (AGCC), compreendendo ácidos monocarboxílicos saturados com até cinco átomos de carbono (LIU et al., 2014), e ácidos graxos de cadeia média (AGCM), denominados ácidos monocarboxílicos saturados com seis a nove átomos de carbono ligados à cadeia (NAGAO; YANAGITA, 2010; GROOTSCHOLTEN et al., 2014).

Tanto os AGCC quanto os AGCM são produtos economicamente atrativos por diversas aplicações na indústria em geral, como, vernizes, perfumes, desinfetantes, plastificantes, tensoativos, auxiliares têxteis, produtos farmacêuticos e produtos alimentícios (ABDEL-RAHMAN; TASHIRO; SONOMOTO, 2013; LIU et al., 2013, 2014; LEE et al., 2014). Além disso, os AGV podem ser produzidos usando-se bioprocessos anaeróbios a partir de substratos de fácil degradação, por exemplo, biomassas e resíduos orgânicos (RAPOSO et al., 2013).

Tabela 1 - Principais ácidos orgânicos produzidos a partir da fermentação anaeróbia de compostos orgânicos

Grupo	Nome comum	IUPAC	Símbolo	Formula	pKa	Massa molar (g.mol ⁻¹)	Densidade (kg.L ⁻¹)	Solubilidade (g.L ⁻¹)	DQO equivalente (g DQO g ⁻¹)
AGCC	Acético	Etanoico	HAc	C ₂ H ₄ O ₂	4,76	60,1	1,049	Completa	1,07
	Propiônico	Propanoico	HPr	C ₃ H ₆ O ₂	4,87	74,1	0,993	Completa	1,51
	Lático	2-Hidroxi propanoico	HLa	C ₃ H ₆ O ₃	3,86	90,08	1,206	Completa	1,32
	n-Butírico	Butanoico	HBu	C ₄ H ₈ O ₂	4,82	88,1	0,964	Completa	1,81
AGCM	n-Valérico	Pentanoico	HVa	C ₅ H ₁₀ O ₂	4,84	102,2	0,930	40	2,04
	n-Caproico	Hexanóico	HCa	C ₆ H ₁₂ O ₂	4,88	116,2	0,930	11	2,20
	n-Enântico	Heptanóico	HEn	C ₇ H ₁₄ O ₂	4,89	130,18	0,918	2,4	2,34
	n-Caprílico	Octanóico	HCp	C ₈ H ₁₆ O ₂	4,90	144,21	0,910	0,84	2,44
	n-Pelargônico	Nonanóico	HPe	C ₉ H ₁₈ O ₂	4,98	158,23	0,893	0,3	2,53

Fonte: Adaptado de Vertova et al. (2009); Oh; Martin, (2010); Raposo et al. (2013) .

3.4 Fermentação anaeróbia

De acordo com Mata-Alvarez et al. (2014), entre 2010 e 2014, a diversidade do uso de produtos e subprodutos ricos em carbono para digestão anaeróbia tem aumentado. Produtos ricos em proteínas, lipídeos e, principalmente, carboidratos são as fontes de carbono mais utilizadas quando se deseja produzir hidrogênio, metano, álcoois e ácidos carboxílicos a partir da fermentação anaeróbia em cultura mista (MIRON et al., 2000; AGLER et al., 2012a; KIM et al., 2012; FERRER et al., 2014).

De forma geral, a fermentação anaeróbia de matéria orgânica complexa pode ser resumida em três etapas principais (Figura 2): **A) hidrólise**, quando ocorre o consumo de água para quebrar moléculas orgânicas maiores; **B) fermentação primária**, em que os produtos hidrolisados são convertidos em ácidos, solventes e gases; **C) fermentação secundária**, na qual os produtos da fermentação primária podem ser convertidos em metano ou combinados entre si, para formar compostos carboxílicos mais complexos do que os produzidos durante a fermentação primária.

Nos processos de fermentação anaeróbia, o fluxo de elétrons é condicionado por coenzimas de difusão livre, tais como, a coenzima nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD^+) e a NAD-fosfato (NADP^+). Essas coenzimas são os transportadores mais importantes dos átomos de hidrogênio para a manutenção dos processos bioquímicos anaeróbios (MADIGAN; MARTINKO; PARKER, 2004). As bactérias acidogênicas, por exemplo, usam o fluxo redox do carregamento de elétrons entre as moléculas de NAD (forma oxidada de transporte de elétrons das cadeias orgânicas) para moléculas de NADH (forma reduzida), removendo hidrogênio de cadeias carbônicas e liberando-o para a solução como gás hidrogênio (Figura 2, rota C-III) (MOSEY, 1983).

Figura 2 - Esquema simplificado da diversidade de metabólitos formados durante a fermentação anaeróbia, com ênfase à formação de ácido orgânicos em cultura mista. Adaptado de (MOSEY, 1983; WANG; MU; YU, 2007; AGLER et al., 2011; LIU; JARBOE, 2012).

Conforme Mosey, (1983), durante o processo de fermentação primária, a produção de ácido acético ocorre com maior facilidade, pois essa reação fornece às bactérias acidogênicas um rendimento energético maior para o crescimento celular. A rota bioquímica de formação de ácido acético (acetogênese) é necessária para o processo de digestão completa da matéria orgânica, pois o ácido acético é substrato direto para a produção de metano por arqueas metanogênicas acetoclásticas (AMA) durante a fermentação secundária (Figura 2 C-a.).

Embora o processo de formação de ácido acético seja mais rápido em comparação ao processo metanogênico de consumo de ácido acético, as bactérias anaeróbias acidogênicas autorregulam-se em um consórcio que evita a sobrecarga de ácido acético. Para manter esse equilíbrio químico, as bactérias podem desviar rotas metabólicas em direção à formação de ácido butírico ou ácido propanoico (VAVILIN; RYTOW; LOKSHINA, 1995). Tanto a formação de ácido butírico, quanto a formação de ácido propanoico, a partir do ácido pirúvico, reduzem a produção de acidez e a produção de hidrogênio. Entretanto, a formação de ácido butírico leva a uma produção de ATP duas vezes maior do que a formação de ácido propanoico.

Os processos de fermentação secundária dependentes do consumo de ácido acético ocorrem, preferencialmente, quando a afinidade por esse substrato for maior que o seu consumo pelas AMA. Por exemplo, durante a fermentação secundária que leva à produção de ácido caproico, há consumo de ácido acético como rota principal e, em cultura mista, as AMA são as principais concorrentes. Pois, a geração de ácido caproico ocorre a partir do PACC da combinação de ácido acético e etanol (BARKER; KAMEN; BORNSTEIN, 1945; THAUER, R.K; JUNGGERMANN, K; HENNINGER, J; WENNING et al., 1977; AGLER et al., 2011).

3.5 Alongamento de cadeia carboxílica

O PACC para a formação de AGCM é um processo redox, no qual o material orgânico mais oxidado (AGCC) reage com o material orgânico mais reduzido (etanol). Os primeiros estudos sobre o processo biológico de alongamento de cadeia

carboxílica a partir de AGCC foram detalhados por Barker e Taha (1941), quando utilizaram uma cultura pura de *Clostridium Kluyveri* para produção de ácido caproico. A partir desse estudo, Barker; Kamen; Bornstein, (1945) observaram ser esse microrganismo capaz de produzir ácido butírico e ácido caproico em um meio contendo ácido acético e etanol. Barker; Kamen; Bornstein, (1945) realizaram um experimento com isótopo marcado (C^{14}) e identificou ser grande parte do ácido caproico formado derivado do ácido acético, comprovando o alongamento de cadeia carboxílica a partir de ácido acético.

Em algumas situações, o uso de culturas mistas em processos biotecnológicos anaeróbios oferece vantagens maiores quando comparado ao uso de cultura pura, como: sintrofismo, facilidade de controle e uso de substratos orgânicos diversos. Por essa razão, a produção de ácido caproico em culturas mistas anaeróbias está sendo estudada mais intensamente (DING; TAN; WANG, 2010; STEINBUSCH et al., 2011; ARSLAN et al., 2012; GROOTSCHOLTEN et al., 2013a; WEIMER, 2015). Isso se deve, principalmente, à pretensão de produção desse ácido a partir de substratos orgânicos mais complexos e mais baratos do que etanol e ácido acético. Essa alternativa tomou proporções maiores devido à possibilidade de maximizar o processo de produção biológica de ácido caproico em escala industrial, sem o requerimento de grandes cuidados operacionais. Outra vantagem do uso de culturas mistas para a produção de ácido caproico é o benefício energético do consórcio bacteriano anaeróbio entre a fermentação primária e a fermentação secundária (YANOWITZ; CHRISTENSEN; MCCORMICK, 2011; HOLLISTER et al., 2012; LIU; JARBOE, 2012).

A Figura 3 representa a formação de ácido caproico partindo da combinação de etanol e ácido acético, em dois ciclos bioquímicos consecutivos. Nesse processo, todo etanol é convertido em acetil-CoA, gerando equivalentes redutores (NADH) para manter o fluxo de elétrons ao longo do processo de BOR.

As rotas metabólicas de consumo de etanol para formação de ácido butírico e ácido caproico, a partir de ácido acético, nos ciclos de β -oxidação reversa (BOR), foram detalhadas por Buckel; Thauer, (2013), Seedorf et al. (2008) e Li et al. (2008). Todos esses estudos afirmam a exigência metabólica de substratos de fácil conversão em acetil-CoA, tanto para iniciar o ciclo de alongamento de cadeia carboxílica (fornecimento de coeficiente redutores), quanto para facilitar o fornecimento de ATP inicial a partir da fosforilação em nível de substrato (FNS) (STADTMAN; BARKER, 1950; AGLER et al., 2012a).

De forma geral, o PACC a partir de etanol e ácido acético pode ser descrito em: a) parte do etanol é oxidado a ácido acético para produção de ATP inicial (Figura 3; I); b) outra parte é convertida em acetil-CoA, fazendo o alongamento de cadeia carboxílica de acetato a n-butirato em uma rota cíclica, usando CoA, NADH e FADH₂ (Figura 3; IV) para acoplamento de acetil-CoA a butiril-CoA; c) alongamento de cadeia carboxílica a n-caproato a partir de n-butirato e etanol em uma rota cíclica semelhante à anterior (Figura 3; VII.), acoplando butiril-CoA a hexanoil-CoA.

Das enzimas envolvidas no metabolismo energético do processo de BOR, apenas duas são proteínas associadas à membrana (NAD e ferredoxina - Fd), resultantes da redução energeticamente favorável de crotonil-CoA a butiril-CoA por NADH, com a redução de Fd por NADH, no ciclo de formação de ácido butírico (Figura 3. rota III), conforme Equação 1 (LI et al., 2008; STAMS; PLUGGE, 2009; BUCKEL; THAUER, R.K; JUNGGERMANN, K; HENNINGER, J; WENNING, 2013). Reação semelhante ocorre também no segundo ciclo de formação do ácido caproico (Figura 3. rota VI), quando em substituição à crotonil-CoA, o 5-Hex-2-enoil-CoA é convertido em hexanoil-CoA (Equação 2). Dessa forma, ambas as reações possibilitam fluxo de H₂ e captação de energia pela translocação de prótons da oxidação de ferredoxina reduzida (Fd_{red}) com a redução do NAD⁺ através da membrana celular (Equação 3), possibilitando um ganho de ATP pela ATP-sintase (STAMS; PLUGGE, 2009; BUCKEL; THAUER, R.K; JUNGGERMANN, K; HENNINGER, J; WENNING, 2013). Isso ocorre porque, crotonil-CoA é reduzida a butiril-CoA dehidrogenase com butiril-CoA durante o ciclo de formação do ácido butírico, ou ainda, hex-2-enoil-CoA reduzido em hexanoil-CoA com hexanoil-CoA

dehidrogenase durante o ciclo de formação do ácido capróico (BUCKEL; THAUER, R.K; JUNGERMANN, K; HENNINGER, J; WENNING, 2013; SPIRITO et al., 2014).

Ao fim de cada rota cíclica de BOR, um acetil-CoA (derivado de etanol) é adicionado à cadeia carboxílica original, aumentando dois carbonos ao comprimento da cadeia carboxílica: de acetato a n-butirato e de n-butirato a n-caproato (BUCKEL; THAUER, R.K; JUNGERMANN, K; HENNINGER, J; WENNING, 2013). Se, na presença de etanol (convertido a acetil-CoA), houver acúmulo de n-caproato, a cadeia carboxílica será estendida a n-caprilato, acrescentando mais dois átomos de carbono à cadeia carboxílica (STEINBUSCH, 2010).

3.6 Efeito do substrato na produção de AGCM

O PACC de ácido acético para ácido butírico e depois para ácido caproico necessita de substratos simples, geralmente, produzidos durante a fermentação primária anaeróbia. Assim, a produção de ácidos carboxílicos com cadeias mais longas do que ácido acético pode ser realizada por duas formas principais: i) fornecimento dos substratos necessários de origem externa, com uso direto de substratos simples (prontamente disponíveis), em geral, na forma de etanol e/ou H_2 e ácido acético (STEINBUSCH et al., 2010), ou ii) de origem interna a partir da digestão primária de substratos complexos (não prontamente disponíveis), como

açúcares, ambos em cultura mista (AGLER et al., 2012a). Nesse último caso, os organismos produtores de AGCM podem coexistir, de forma vantajosa, com as bactérias fermentativas primárias, acidogênicas e acetogênicas, produtoras de ácido acético, etanol, hidrogênio e dióxido de carbono. Em paralelo, as bactérias homoacetogênicas podem utilizar H_2 e CO_2 para produzir mais ácido acético (NIE et al., 2007).

3.6.1 Doadores de elétrons para o processo caprogênico

Tanto o hidrogênio como o etanol podem ser utilizados como doadores de elétrons durante o PACC para formação de AGCM. No entanto, utilizar etanol como doador de elétrons oferece maiores vantagens, a saber: custo de controle e de operação, maior produção de equivalentes redutores e maior síntese de ácidos carboxílicos durante o processo de PACC (KENEALY; WASELEFSKY, 1985; DING; TAN; WANG, 2010).

Para a formação de ácido caproico em cultura mista, é preciso haver fornecimento de etanol e ácido acético em proporções molares (mol EtOH:mol C_2) superiores à razão estequiométrica de formação de ácido caproico, que é de 2 EtOH:1 C_2 (SPIRITO et al., 2014). Em proporção molar estequiométrica baixa (menor do que 2 EtOH:1 C_2), o ácido acético tende a reagir com todo etanol, formando ácido butírico (STADTMAN; BARKER, 1950). O ácido butírico representa o primeiro alongamento de cadeia carboxílica (SEEDORF et al., 2008; SPIRITO et al., 2014) (Tabela 2; Equação 05). Em proporção molar estequiométrica elevada (maior do que 2 EtOH:1 C_2), ocorre o consumo total de ácido acético para formação de ácido butírico, contudo, haverá remanescente de etanol. A presença de etanol na mesma concentração molar de ácido butírico beneficia o alongamento de ácido butírico a ácido caproico, formando o segundo alongamento de cadeia carboxílica (SEEDORF et al., 2008) (Tabela 2; Equação 06). Em sistemas anaeróbios alimentados com substratos simples (etanol e ácido acético), torna-se fácil o controle das proporções molares de substratos, facilitando a manipulação da produção de ácido caproico.

Alguns substratos complexos que contêm etanol em sua composição servem como substratos para a produção de ácido caproico, por exemplo, fermentados de amido de milho e subprodutos da cana-de-açúcar provenientes da indústria de etanol (AGLER et al., 2012b; ANGENENT, LARGUS T; AGLER, 2015). Além de etanol, os fermentados de milho contêm carboidratos e leveduras como parcela de matéria orgânica complexa, os quais, ao sofrer hidrólise e fermentação primária, fornecem os substratos necessários para o PACC (GE et al., 2015).

De acordo com a Tabela 2, as reações de conversão de carboidrato hidrolisados (por exemplo, a glicose proveniente da sacarose presente em melaço de cana) para ácido acético e ácido butírico são termodinamicamente favoráveis (ANEXO C). Ge et al. (2015) estudaram a produção de ácido caproico em um sistema do tipo bicrobiomas, nas mesmas condições operacionais de Agler et al. (2011) e concluíram que a matéria orgânica complexa presente no fermentado de amido de milho auxilia o PACC a partir da formação de receptores de elétrons na forma de ácido acético e ácido butírico.

De acordo com as reações de alongamento de cadeia carboxílica expostas na Tabela 2 (Equações de 5 a 11), em condições padrões de temperatura e pressão (CPTP), a formação de ácido caproico é termodinamicamente menos favorável quando se utiliza etanol como doador de elétrons do que quando H_2 é utilizado. Isso ocorre devido à maior afinidade de difusão de H_2 pela membrana citoplasmática (THAUER, R.K; JUNGGERMANN, K; HENNINGER, J; WENNING et al., 1977; SEEDORF et al., 2008). Esse último processo metabólico, porém, ocorre quando há concentrações baixas de etanol e concentrações elevadas de ACCC, como, ácido acético e ácido butírico (STEINBUSCH et al., 2011; ZHANG et al., 2013). No entanto, H_2 como doador de elétrons não promove produtividade elevada de ácido caproico, pois, nesse processo, há uma produção baixa de coeficientes redutores (importante para o fluxo de elétrons do PACC), diferentemente do que ocorre quando o etanol é doador de elétrons (DING; TAN; WANG, 2010).

Tabela 2 - Principais reações anaeróbias envolvendo culturas mistas para produção de ácido caproico

Chamada	Tipo	Reação	$^a\Delta G_R^1$	Ref.
Fonte de carbono para				
Eq.01	produção de etanol	glicose $\rightarrow$ 2 etanol + 2 CO ₂	-235,0	Stams e Plugge. (2009)
Eq.02	produção de ácido acético	glicose + 2 H ₂ O $\rightarrow$ 2 acetato ⁻ + 2 H ⁺ + 2 CO ₂ + 4 H ₂	-292,3	Arslan et al. (2012)
Eq.03	produção de ácido butírico	glicose $\rightarrow$ butirato ⁻ + H ⁺ + 2 CO ₂ + 2 H ₂	-309,4	Arslan et al. (2012)
Eq.04	oxidação energética	Etanol + H ₂ O $\rightarrow$ Acetato ⁻ + 2H ₂ + H ⁺	+9,0	Thauer et al. (1977)
Etanol como doador de elétrons				
Eq.05	alongamento 1:0	etanol + Acetato ⁻ $\rightarrow$ Butirato ⁻ + H ₂ O	-38,0	Barker, (1945)
Eq.06	alongamento 1:1	etanol + Butirato ⁻ $\rightarrow$ Caproato ⁻ + H ₂ O	-38,0	Barker, (1945)
Eq.07	alongamento 2:1	2 etanol + acetato ⁻ $\rightarrow$ Caproato ⁻ + H ₂ O	-71,0	Bornstein e Barker, (1947)
Eq.08	alongamento 12:5	12 etanol + 3 acetato ⁻ $\rightarrow$ 5 caproato ⁻ + 2 H ⁺ + 4 H ₂ + 8 H ₂ O	-195,0	Spirito et al. (2014);
Hidrogênio como doador de elétrons				
Eq.09	Alongamento	acetato ⁻ + butirato ⁻ + 2H ₂ + H ⁺ $\rightarrow$ caproato ⁻ + 2H ₂ O	-48,0	Yu, e Mu, (2006)
Eq.10	Alongamento	butirato ⁻ + 2CO ₂ + 6H ₂ $\rightarrow$ caproato ⁻ + 4H ₂ O	-143,0	Zhao et al, (2008)
Eq.11	Alongamento	3 acetato ⁻ + 2H ⁺ + 4H ₂ $\rightarrow$ caproato ⁻ + 4H ₂ O	-177,0	Zhang et al. (2013)
Consórcio bacteriano de consumo de substratos				
Eq.12	homoacetogênicas	2 HCO ₃ ⁻ + 4H ₂ $\rightarrow$ Acetato ⁻ + 4 H ₂ O	-104,0	Ye et al.(2014)
Eq.13	BM hidrogenotróficas	HCO ₃ ⁻ + 4 H ₂ + 4 H ⁺ $\rightarrow$ CH ₄ + 3 H ₂ O	-135,0	Schink,(1997)
Eq.14	BM acetoclásticas	acetato ⁻ + H ₂ O $\rightarrow$ CH ₄ + HCO ₃ ⁻	-31,0	Stams, (1994)
Eq.15	BRS acetotrófica	acetato ⁻ + SO ₄ ²⁻ $\rightarrow$ HS ⁻ + 2 HCO ₃ ⁻	-47,6	Muyzer e Stams, (2008)
Eq.16	BRS hidrogenotrófica	4H ₂ + SO ₄ ²⁻ + H ⁺ $\rightarrow$ HS ⁻ + 4 H ₂ O	-151,9	Muyzer e Stams, (2008)

Nota: ^(a) Variação da energia livre de Gibbs em kg.mol⁻¹ sob condição padrão de temperatura e pressão e em pH 7. Mais detalhes destes cálculos no item ANEXO C.

A conversão anaeróbia de produtos gasosos pode ser uma alternativa secundária à produção de ácido caproico (ARSLAN et al., 2012; VASUDEVAN; RICHTER; ANGENENT, 2014). A fermentação anaeróbia do tipo gás de síntese (SGF - *Syngas Fermentation*) utiliza CO, CO₂ e H₂, para formação de AGCC e álcoois (WANG; MU; YU, 2007; DING; TAN; WANG, 2010; ZHANG et al., 2013). Os microrganismos responsáveis pela SGF utilizam a rota do acetil-CoA para formar etanol, ácido acético, ácido butírico, além de outros produtos da fermentação primária anaeróbia (MUNASINGHE; KHANAL, 2011). Em pressão parcial de hidrogênio elevada (maior do que 1 atm), a conversão de gás de síntese em AGCC e etanol é termodinamicamente favorável (WANG; MU; YU, 2007) (cálculos detalhados em ANEXO C). Vasudevan; Richter; Angenent, (2014) afirmam que reatores anaeróbios do tipo SGF são capazes de produzir um efluente rico em etanol e AGCC, os quais aumentam consideravelmente a taxa de produção volumétrica de ácido caproico (Y_{C6}) em sistemas de dois estágios. No entanto, a geração direta de ácido caproico a partir de somente gás de síntese ainda não foi registrada (SPIRITO et al., 2014).

3.6.2 Influência da pressão parcial de hidrogênio

A pressão parcial de hidrogênio é um fator importante para a produção de ácido caproico em cultura mista alimentada com substrato complexo ou fonte de carbono não prontamente disponível. De acordo com a patente de Angenent; Agler, (2015), em reatores anaeróbios com cultura mista, destinados à produção de ácido caproico a partir de substrato contendo etanol, deve-se manter uma pressão parcial de hidrogênio entre 0,2 a 5,0 atm. Isso evita a oxidação de grande quantidade de etanol (GROOTSCHOLTEN et al., 2014; GE et al., 2015), bem como a oxidação de ácidos carboxílicos formados (VASUDEVAN; RICHTER; ANGENENT, 2014; GE et al., 2015) (cálculos detalhados em ANEXO C), muito embora saiba-se que pressão parcial de hidrogênio acima de 10^{-5} atm, em cultura mista, ativa a autorregulação anaeróbia e favorece a formação de ácidos butírico e/ou ácido propanoico em vez de ácido acético (HARPER; POHLAND, 1986).

A formação de ácido propanoico é indesejável durante o PACC, pois consome carbono e hidrogênio, além de não servir de substrato para nenhuma rota metabólica de formação de ácido caproico. O ácido butírico, ao contrário, na presença de etanol ou de hidrogênio, é consumido para formação de ácido caproico (DING; TAN; WANG, 2010). O PACC partindo de ácido butírico e de etanol segue uma rota metabólica mais curta do que partindo de ácido acético e etanol (Tabela 2). Dessa forma, por exemplo, é mais interessante para o PACC a partir de substratos complexos que a pressão parcial de hidrogênio seja mantida em valores tais (1,0 a 5,0 atm), beneficiando somente a fermentação primária para formar ácido butírico, em vez de ácido acético (GE et al., 2015).

3.7 Condições operacionais para produção de ácido caproico em cultura mista

3.7.1 Competição biológica

A produção anaeróbia de ácido caproico em culturas mistas pode ser prejudicada, caso haja intensa competição biológica pelo substrato; nesse caso, o sequestro de carbono deve ser evitado (AGLER et al., 2012a). Arqueas metanogênicas acetoclásticas (AMA) afetam a disponibilidade de ácido acético no meio (AGLER et al., 2011), o principal receptor de elétrons para o PACC (THAUER et al., 1968; STEINBUSCH et al., 2011; SPIRITO et al., 2014). Ademais, as arqueas metanogênicas hidrogenotróficas (AMH) consomem hidrogênio (STAMS et al., 2012; WANG et al., 2013), que, em pressão parcial de hidrogênio elevada e na ausência de etanol, pode ser doador de elétrons para produção de ácido caproico (WANG; MU; YU, 2007).

Outro processo competitivo a ser avaliado é o processo de sulfetogênese. As bactérias redutoras de sulfato (BRS) concorrem com as espécies metanogênicas pelos mesmos substratos (ácido acético e hidrogênio) (LOVLEY; DWYER; KLUG, 1982; LOVLEY; KLUG, 1983) (ANEXO C). O consumo de ácido acético e a oxidação completa da matéria orgânica pelas BRS ocorre quando a relação da massa DQO/SO₄²⁻ é menor do que 0,67; se a relação da massa DQO/SO₄²⁻ for maior do

que 0,67, ocorrerá oxidação parcial da matéria orgânica pelas BRS (OMIL et al., 1998).

Etanol, além de ser doador de elétrons para o processo caprogênico, é também doador de elétrons no processo de oxidação parcial da matéria orgânica pelas BRS (LIAMLEAM; ANNACHHATRE, 2007). Hu et al. (2015) avaliaram a influência da atividade sulfetogênica em condições de alta ($>0,67$) e baixa ($<0,67$) relação DQO/SO_4^{2-} , utilizando reator UASB alimentado com substrato simples constituído de etanol, ácido acético e sulfato. Em relação DQO/SO_4^{2-} alta, os autores identificaram maior densidade de espécies metanogênicas, bem como a presença da espécie *Clostridium Kluyveri*, ambas relacionadas à presença de ácido acético, sendo essa última mais correlacionada à presença de etanol. Em relação DQO/SO_4^{2-} baixa, a espécie *Clostridium Kluyveri* não foi identificada e as espécies metanogênicas acetoclásticas ocorreram em baixa concentração. Devido a isso, é possível que sistemas caprogênicos alimentados com substratos ricos em enxofre ocasionem aumento na competição biológica por etanol e ácido acético.

O comprometimento da produção de ácido caproico pela atividade metanogênica pode ser solucionado adicionando-se agentes químicos como o 2-Bromoetanosulfônico (2-BES) (ZINDER; ANGUISH; CARDWELL, 1984; SIRIWONGRUNGSON; ZENG; ANGELIDAKI, 2007; GROOTSCHOLTEN et al., 2013a; WANG et al., 2013) ou clorofórmio (CHIDTHAISONG; CONRAD, 2000; HAO et al., 2013), pois ambos inibem a rota da acetil-CoA. Alguns trabalhos discutem a possibilidade de o clorofórmio inibir, igualmente, a atividade anaeróbia das BRS (CHIDTHAISONG; CONRAD, 2000). Além do mais, a adição de molibdato torna esse processo mais eficiente (SCHOLTEN; CONRAD; STAMS, 2000), pois atua diretamente na inativação enzimática (NIELSEN; SANDO; PRATT, 1977; ALPERIN; REEBURGH, 1985). Contudo, esses tipos de inibição química oneram o processo de produção de ácido caproico (VASUDEVAN; RICHTER; ANGENENT, 2014). Alternativas como redução de pH (AGLER et al., 2012a; GE et al., 2015), restrição nutricional (AGLER et al., 2008), choques térmicos aplicados à biomassa ativa

(WANG; MU; YU, 2007; DING; TAN; WANG, 2010), dentre outras, devem ser estudadas para evitar o sequestro indesejado de carbono orgânico.

3.7.2 Estratégias para evitar competição biológica

3.7.2.1 *Controle do potencial hidrogeniônico (pH)*

Segundo estudos realizados por Steinbusch et al. (2010) e Kenealy; Waselefsky, (1985), o rendimento da produção de ácido caproico é maior em pH próximo de 7,0. Porém, essa condição favorece maior competição com as espécies metanogênicas acetoclásticas, sobretudo, quando etanol e ácido acético forem as únicas fontes de carbono para o PACC em cultura mista (GROOTSCHOLTEN et al., 2014; SPIRITO et al., 2014). A produção de ácido caproico pode ocorrer em pH baixo (aproximadamente 5,5) (AGLER et al., 2014; VASUDEVAN; RICHTER; ANGENENT, 2014). A vantagem operacional de utilizar pH baixo em processo acidogênico é que a maioria dos ácidos presentes no meio líquido estará na forma não ionizada, inibindo grande parte da atividade metanogênica (INFANTES et al., 2012), por exemplo, concentração de AGV não ionizado maior que 5,0 mM é suficiente para inibir a atividade metanogênica e beneficiar a produção de ácidos orgânicos como o ácido caproico (GROOTSCHOLTEN et al., 2013a). Por outro lado, concentrações mais elevadas de AGV não dissociados podem causar efeito tóxico para a comunidade anaeróbia acidogênica e comprometer o PACC (STEINBUSCH et al., 2010; VASUDEVAN; RICHTER; ANGENENT, 2014).

Valores de pH abaixo do valor de pKa da espécie ácida presente no meio líquido favorecem maior sequestro de prótons H^+ , deslocando o equilíbrio no sentido a formar ácidos não ionizados. A faixa de pH entre 5,5 e 6,0 adequa-se à produção de ácido caproico, pois inibe grande parte da atividade metanogênica acetoclástica e, ao mesmo tempo, beneficia a produção de AGCC (AGLER et al., 2014; WANG et al., 2014). Mesmo em uma faixa de pH entre 5,5 e 6,0, acima do pKa das espécies ácidas que se deseja produzir, ainda há presença de ácidos orgânicos não dissociados que podem causar toxicidade à microbiota anaeróbia acidogênica. De

acordo com Weimer et al. (2015), em pH 5,7, o ácido caproico não dissociado será tóxico em concentrações superiores a 6,9 mM. Da mesma forma, Ge et al. (2015) afirmaram que, em pH 5,5 o ácido caproico não dissociado será tóxico em concentrações superiores a 7,5 mM. De acordo com a Figura 4, em pH 5,7 e pH 5,5 a concentração do ácido caproico não dissociada (HCa) é de 13% e 19%, respectivamente. Admitindo corresponderem esses percentuais aos valores de inibição encontrados por Ge et al. (2015) e Weimer, Nerdahl, Brandl, (2015), pode-se supor que a concentração máxima de ácido caproico não dissociado capaz de causar inibição é de, aproximadamente, 800 mgHCa.L⁻¹. Nesse caso, para concentrações de HCa acima desse valor é necessário a extração seletiva concomitantemente à sua geração, de modo a reduzir problemas com toxicidade de ácidos não dissociados (AGLER et al., 2012a; ZHANG et al., 2013; GE et al., 2015).

Figura 4 - Diagrama de dissociação do ácido caproico (—) e caproato (---) em função do pH; e concentração de ácido caproico (●) em função do limite de toxicidade teórico admitido para cada condição de pH.

Existem várias técnicas capazes de extrair ácidos orgânicos provenientes dos processos de fermentação anaeróbia, incluindo: resina de troca iônica (GLUSZCZ et al., 2004; LEITE, 2005; LEITE et al., 2008), eletrodialise (WANG; LUO; YU, 2006; VERTOVA et al., 2009; TUGTAS, 2011) e membrana de extração líquido-líquido

(ALKAYA et al., 2009; MORAES et al., 2014; GE et al., 2015). Dentre esses métodos, o de membrana de extração líquido-líquido é um dos mais conhecidos e eficiente para a separação de ácidos orgânicos (MORAES et al., 2014). A eficiência desse método está associada a controle da concentração de equilíbrio entre as fases ácida e básica no meio líquido, concentração do extrator e tipo de diluente (ALKAYA et al., 2009). Solventes polares como éteres, álcoois de cetona, hidrocarbonetos alifáticos e organofosfatos são os diluentes mais utilizados para a extração de AGV (SINGHANIA et al., 2013; KANNENGIESSER et al., 2015).

3.7.2.2 *Redução do Tempo de Detenção Hidráulica (TDH)*

Variáveis operacionais, por exemplo, tempo de detenção hidráulica (TDH) e tempo de detenção celular (TRC), são fundamentais para a manutenção do processo anaeróbio desejado. Essas variáveis interferem diretamente na cinética de crescimento celular bacteriano, principalmente, na taxa máxima de crescimento celular específico ($\mu_{\max}$), a qual é diferente para espécies acidogênicas e espécies metanogênicas. Whang; Xu; Yang (2013) afirmaram que o uso de baixos TDH (menores que 6 h) em sistemas anaeróbios de mistura completa é uma estratégia eficiente para a inibição da biota metanogênica acetoclástica, visto ser a $\mu_{\max}$ dessa comunidade menor, quando comparada à da comunidade acidogênica.

Assim, alguns autores (GROOTSCHOLTEN et al., 2013b, 2013c) sugerem utilizar valores baixos de TDH como alternativa viável à inibição das AMA, em reator anaeróbio de fluxo contínuo, destinado à produção de ácido caproico. A alternativa inicialmente testada por Grootscholten et al. (2013b) e, posteriormente, reavaliada por Grootscholten et al. (2013c), consiste em relacionar o TDH do reator com a $\mu_{\max}$ dos microrganismos consumidores de ácido acético, ou seja, os produtores de metano e os produtores de ácido caproico. Como o tempo de duplicação celular das metanogênicas acetoclásticas é mais lento, a alternativa foi reduzir o TDH a um valor mínimo (entre 17 e 4,0 h), a ponto de atender à $\mu_{\max}$ das espécies produtoras de ácido caproico ($0,28 \text{ h}^{-1}$) e desfavorecer a $\mu_{\max}$ das metanogênicas acetoclásticas ($0,015 \text{ h}^{-1}$). Contudo, essa alternativa somente é considerada quando o sistema de

digestão anaeróbia é do tipo mistura completa, em que o TDC é semelhante ao TDH. Apesar do sucesso obtido com essa alternativa, os trabalhos de Grootcholten et al. (2013b) e Grootcholten et al. (2013c) podem ser questionados, pois o carregamento total da biomassa metanogênica acetoclástica pode não ter ocorrido adequadamente, uma vez que o sistema utilizado pelos autores era do tipo biomassa aderida e, nesse caso, o TDC é muito maior que o TDH.

3.7.2.3 Pré-tratamento térmico

A maioria das bactérias gram-positivas do gênero *Clostridium* spp. é capaz de formar esporos (SAUER et al., 1995). Essa característica representa vantagens relacionadas à resistência e resiliência em condições extremas de temperatura. Por essa razão, *Clostridium Kluyveri*, o principal organismo responsável pela produção de ácido caproico, é resistente a choques térmicos como pré-seleção em lodo de inóculo contendo culturas mistas (DING; TAN; WANG, 2010; AGLER et al., 2011).

Por outro lado, o pré-tratamento térmico do lodo pode reduzir ou eliminar espécies indiretamente necessárias ao processo de alongamento de cadeia carboxílica, (bactérias formadoras de ácido acético, ácido butírico e etanol) (LIAMLEAM; ANNACHHATRE, 2007; STAMS et al., 2012; WANG et al., 2013); isso quando o processo caprogênico for conduzido com alimentação não prontamente disponível. Por exemplo, Wang et al. (2007) testaram o efeito do pH na produção de H_2 a partir de sacarose, utilizando reator UASB contendo lodo metanogênico com e sem pré-tratamento térmico. Durante a pesquisa, foi observado consumo de hidrogênio para formação de ácido butírico e de ácido caproico, em pH inferiores a 4,0, com ambos os tipos de inóculo. A maior produção de ácido caproico ocorreu quando da utilização de lodo sem pré-tratamento térmico, provavelmente devido ao efeito negativo deste tipo de pré-tratamento nas espécies não esporulantes, que podem ser necessárias à produção de ácido caproico. Isso reforça a proposta de uma relação sintrófica em comunidade mista para a produção de ácido caproico (DING; TAN; WANG, 2010).

3.7.2.4 Condição nutricional

Mesmo em cultura mista anaeróbia, *C. Kluyveri* continua a ser o organismo mais importante para a produção biológica de ácido caproico (DING; TAN; WANG, 2010; AGLER et al., 2011; KANNENGIESSER et al., 2015; WEIMER; NERDAHL; BRANDL, 2015). Além das similaridades nutricionais com os demais organismos do mesmo gênero (BORNSTEIN; BARKER, 1948; RAMIÓ-PUJOL et al., 2015), *C. Kluyveri* tem uma exigência peculiar por carbono inorgânico (CO₂) como fonte de nutrientes para síntese de proteínas (TOMLINSON; BARKER, 1954). Alguns estudos apontam que, durante a produção de ácido capróico por *C. Kluyveri*, cerca de 30% do carbono assimilado à biomassa celular são derivados de CO₂, enquanto, aproximadamente, 70% são derivados de carbono orgânico (TOMLINSON; BARKER, 1954; JUNGGERMANN; THAUER, R.K; JUNGGERMANN, K; HENNINGER, J; WENNING; DECKER, 1968).

A produção de ácido caproico em cultura mista requer adição de uma fonte de carbonato como componente da solução nutritiva (KENEALY; CAO; WEIMER, 1995; GROOTSCHOLTEN et al., 2013c; VASUDEVAN; RICHTER; ANGENENT, 2014), principalmente quando a alimentação for composta de etanol e ácido acético. Processos de fermentação secundária anaeróbia a partir de substrato simples, como, etanol e ácido acético fornecem concentração baixa de CO₂. Por isso, alguns trabalhos apontam a existência de uma relação direta entre a produção de ácido caproico e a adição externa de CO₂, em sistema anaeróbio alimentado com substrato prontamente disponível (GROOTSCHOLTEN et al., 2013c). Contudo, na literatura, parece haver algumas tensões no tocante à adição ou não de uma fonte externa de carbono inorgânico no meio nutricional. Em algumas pesquisas, a presença de CO₂ é vista como possibilidade de aumento da competição por consumo de H₂ devido à atividade das AMH, sendo que a presença de H₂ é importante para manutenção de pressão parcial de hidrogênio elevada (VASUDEVAN; RICHTER; ANGENENT, 2014; GROOTSCHOLTEN et al., 2013a).

Em sistemas caprogênicos alimentados com substratos complexos adicionados de etanol, é dispensável a suplementação de carbono inorgânico, pois nessa condição, haverá produção interna de CO₂ devido à fermentação primária da matéria

orgânica complexa. Nessa condição de alimentação, é recomendado lavar o excesso de CO_2 produzido a fim de aumentar a pressão parcial de H_2 e evitar o consumo deste pelas AMH (ANGENENT, LARGUS T; AGLER, 2015). Lembrando que, nessa condição de alimentação, as AMH não podem ser consideradas organismos concorrentes, pois a presença de H_2 só é necessária como forma de melhorar o processo caprogênico.

Agler et al. (2011) afirmam que, quando se pretende produzir AGCM a partir de fermentado de milho, a inibição da AMA pode ocorrer pela baixa concentração de cobalto no meio líquido. Resíduos derivados do milho, por exemplo, contêm baixa concentração de cobalto, reduzindo naturalmente a produção de metano em até 30% (AGLER et al., 2008). O cobalto está presente na cianocobalamina (família da vitamina B12), essencial para várias reações bioquímicas do processo de digestão anaeróbia (KIDA et al., 2001; QIANG; LANG; LI, 2012), tanto na formação de metano pelas AMH, quanto pelas AMA (MOESTEDT et al., 2015).

3.8 Sistema de produção de ácido caproico

Steinbusch et al. (2011), utilizando etanol e hidrogênio como doares de elétrons para formação de AGCM a partir de ácido acético, em pH 7,0, alcançaram uma taxa de produção volumétrica de ácido caproico (Y_{C6}) de, aproximadamente, $0,5 \text{ gC6.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$. A taxa de produção volumétrica de ácido caprílico (Y_{C8}) foi de $0,054 \text{ gC8.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$. Agler et al. (2012), a partir de fermentado de milho não destilado em pH de aproximadamente 5,5, atingiram uma Y_{C6} de $2,1 \text{ gC6.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$. Diferentemente do descrito por Steinbusch et al. (2011), Agler et al. (2012) não mencionaram nenhuma quantidade significativa da produção de ácido caprílico. Isso pode ter ocorrido devido ao sistema de extração em linha de ácidos carboxílicos utilizado por Agler et al. (2012), o qual pode ter extraído ambos os ácidos: caproico e caprílico.

Para maximizar a produção de caproato a partir de etanol e ácido acético, sem inibição química da atividade metanogênica, Grootcholten et al. (2013c) utilizaram um filtro anaeróbio de fluxo ascendente e atingiram Y_{C6} de aproximadamente $16,0 \text{ gC6.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$, ou seja, superior aos valores iniciais encontrados por Steinbusch et

al. (2011). Esse resultado é justificado pela concentração elevada de biomassa do sistema com biomassa aderida utilizada por Grootscholten et al. (2013b). Outra diferença é que o inóculo utilizado por Grootscholten et al. (2013b) provinha do sistema produtor de ácido caproico de Steinbusch et al. (2011), os quais adicionaram inibidor químico 2-BES por mais de dois anos de operação. Dessa forma, havia maior garantia de baixa atividade metanogênica no lodo de inóculo utilizado por Grootscholten et al. (2013b), assegurando, uma grande produção de ácido caproico seguido da aplicação de TDH baixo (17 h) como variável para inibição da atividade metanogênica.

Em razão do sucesso da inibição metanogênica em pH neutro (próximo de 7,0), utilizando TDH de 17 h, Grootscholten et al. (2013c) mantiveram as mesmas condições operacionais de Grootscholten et al. (2013b), no entanto, diminuíram o TDH a um valor de 4,0 h. O aumento na produção de AGCM (Tabela 3) confirma que o alongamento de cadeia carboxílica, partindo de ácido acético em TDH baixo, é possível, havendo concomitante inibição das AMA. Segundo Ge et al. (2015), isso só foi possível porque a concentração de ácidos não dissociados no sistema de Grootscholten et al. (2013c) manteve-se abaixo de 1,9 mM (abaixo do valor de inibição de 7,5 mM), devido ao TDH curtos e à elevada diluição do afluente, em pH próximo de 7,0.

Assim como Agler et al. (2012), que utilizaram substrato complexo como fonte de carbono para produção de ácido caproico, Grootscholten et al. (2013a) investigaram se o alongamento da cadeia carboxílica poderia ser promovido durante a acidificação da fração sólida de resíduo orgânico municipal (OFMSW), suplementado com etanol, uma vez que o acidificado da OFMSW gera concentração elevada de AGV. Como resultado, obtiveram maior produtividade do processo caprogênico (Y_{C6} de 7,0 gC6.L⁻¹.d⁻¹) quando comparado ao trabalho de Agler et al. (2012) (Tabela 3). Agler et al. (2012), todavia, realizaram extração em linha do ácido caproico.

A Tabela 3 apresenta um resumo sobre estudos de bioprodução de ácido caproico, destacando as principais variáveis operacionais aplicadas aos reatores anaeróbios.

Tabela 3 - Resumo da produção anaeróbia de ácido caproico com a utilização de culturas mistas em diversas condições operacionais

Substrato	Microrganismo	Sistema de operação	pH	Y_{C6} (gC6.L ⁻¹ .d ⁻¹) ^(f)	[C6] (g.L ⁻¹) ^(g)	Referência
Acetato + etanol ^(a)	Cultura mista *	Batelada	neutro ^(e)	0,48	8,2	Steinbusch et al. (2011)
Fermentado de milho não destilado	Cultura mista enriquecida (Microbiomes)	ASBR	5,5 ^(d)	2,1	ND	Agle et al. (2012)
Acetato + etanol ^(b)	Cultura mista enriquecida	FA	neutro ^(e)	15,7	11,1	Grootscholten et al. (2013b)
OFMSW + etanol ^(a)	ND	BIOCEL	5,4 ^(e)	0,7	2,7	Grootscholten et al. (2013a)
OFMSW + etanol ^(b)	ND	BIOCEL	ND	12,6	ND	Grootscholten et al. (2014)
Etanol Syngas ^(c)	Cultura mista enriquecida (Microbiomes)	FA	5,5 ^(d)	1,7	1,7	Vasudevan et al. (2014)
Biomassa de celulose + etanol	Microflora ruminal + C. kluyveri 3231B	Batelada	ND	3,1	6,1	Weimer et al. (2015)
Fermentado de milho não destilado ^(c)	Cultura mista enriquecida (Microbiomes)	ASBR	5,5 ^(d)	3,6	ND	Ge et al. (2015)

Nota: (a) adição de inibidor químico 2-BES, 10g.L⁻¹; (b) inibição das AM pela redução do TDH; (c) inibição das AM pela redução do pH; (d) valor aproximado para meio ácido; (e) valor aproximado de 7,0; (f) taxa de produção volumétrica de ácido caproico em gC6. L⁻¹.d⁻¹; (g) concentração máxima de ácido caproico em g.L⁻¹; (ND) não definido.

Durante a investigação, Grootscholten et al. (2013a) justificaram que a hidrofobicidade do ácido caproico causou efeito negativo em sua quantificação no efluente, pois os resíduos não hidrolisados do acidificado da OFMSW adsorviam o ácido caproico. A fim de solucionar esse problema e otimizar a produção de AGCM, Grootscholten et al. (2014) avaliaram a Y_{C6} em sistema de dois estágios; um sistema acidogênico para aumentar a hidrólise e a produção AGCC a partir do recirculado da OFMSW que, em série, alimentava o sistema anaeróbio acidogênico produtor de AGCM. Dessa forma, aumentaram em até 70% a produção de ácido caproico, atingindo uma Y_{C6} de, aproximadamente, $13,0 \text{ gC6.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$. Outra grande diferença entre os dois trabalhos é que Grootscholten et al. (2013a) inibiram as AMA adicionando 2-BES, ao passo que Grootscholten et al. (2014) promoveram a inibição hidrodinâmica diminuindo o TDH, assim como Grootscholten et al. (2013c) e Grootscholten et al. (2013b).

Os trabalhos científicos que descrevem o processo caprogênico não apresentam maiores detalhes, principalmente, quanto às variáveis operacionais aplicadas, como: escala de operação, modo de alimentação, pH (em torno de 5,5) para evitar a adição de inibidores químicos metanogênicos e escolha de substratos complexos, ricos em carbono de fácil degradação, de preferência aqueles provenientes de grandes atividades agropecuárias como a cadeia de produção da cana-de-açúcar. Nessa configuração, a utilização de biomassas ou resíduos orgânicos para a produção anaeróbia de ácido caproico tornaria essa biotecnologia mais vantajosa, pois utilizaria de fontes renováveis de substratos, além de promover revalorização de biomassas e/ou resíduos.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Descrição geral do experimento

Para o processo de produção de ácido caproico em reatores biológicos, esse trabalho foi separado em três experimentos (Figura 5):

- 1) operação de sistema de fluxo contínuo em reator UASB alimentado com substrato simples (etanol e ácido acético) (linha preta);
- 2) teste em batelada com substrato complexo (fermentado de melaço de cana-de-açúcar (FMC) (linha azul);
- 3) substituição do substrato simples pelo substrato complexo no reator UASB (linha vermelha).

Figura 5 -Fluxograma experimental da produção anaeróbia de ácido caproico em sistemas biológicos.

Nesta pesquisa, foram estabelecidas duas formas de inibição da atividade metanogênica: 1) sem adição de inibidor químico, quando o pH do meio líquido foi controlado na faixa de 5,3 a 5,6; 2) com adição de clorofórmio (0,05%), quando o pH foi mantido em valores próximos de 7,0. Para ambas as condições, o pH foi controlado adicionando-se NaOH 2,0 N ou HCl 2,0 N.

4.2 Experimento 1: Produção de ácido caproico em reator UASB alimentado com substrato simples (etanol e ácido acético)

4.2.1 Reator UASB

O reator UASB foi instalado no Laboratório de Tecnologia da Biomassa da Embrapa Agroindústria Tropical. Esse reator foi construído em vidro borossilicato, com diâmetro de 0,10 m, altura de 1,35 m e volume útil de 13,8 L. Ao longo do reator, foram instaladas sete torneiras, a fim de propiciar as coletas para análise do perfil do lodo anaeróbio (Figura 6). Para facilitar o controle do pH, utilizou-se solução de hidróxido de sódio 1,0 N (NaOH), adicionada com auxílio de um controlador automático de pH. O biogás produzido no reator foi monitorado por um gasômetro da Ritter e analisado por cromatografia gasosa para determinação da concentração de CO₂, CH₄ e H₂.

Figura 6 - Esquema e fotografia do reator UASB utilizado como unidade operacional para produção de ácido caproico.

Legenda: (1) Tanque afluente; (2) coluna do reator; (3) separador trifásico; (4) selo hídrico; (5) medidor de gás; (6) medidor de pH online; (7) tanque de solução alcalina; (8) tanque efluente; (a) bomba dosadora de alimentação; (b) bomba dosadora de recirculação; (c) bomba dosadora de alcalinidade e; (d) mostrador de gás.

4.2.2 Inóculo

Lodo granular de reator UASB de estação de tratamento de efluentes de indústria cervejeira ($29,8 \text{ gSV.L}^{-1}$) foi usado como inóculo. Foram realizados estudos prévios em sistemas de batelada, de modo a averiguar a adaptabilidade deste lodo à produção de ácido caproico (detalhes em ANEXO A). Os critérios metodológicos para a seleção desse inóculo foram obtidos a partir da utilização de substrato simples, constituído de etanol e ácido acético (ver ANEXO A), baseados no estudo

de Steinbruch (2010), o qual utilizou lodo anaeróbio proveniente de estação de tratamento de efluentes de indústria cervejeira para produção de ácido caproico.

4.2.3 Partida do reator UASB

A partida do reator UASB produtor de ácido caproico foi realizada com alimentação controlada de etanol e ácido acético suplementado com macronutrientes e elementos-traço (Tabela 4).

Tabela 4 - Concentração de nutrientes a ser mantida no afluente contendo etanol e acetato para produção de ácido caproico.

Solução nutritiva	Concentração (mg.L ⁻¹)	Elementos traço	Concentração (mg.L ⁻¹)
MgCl ₂ .6H ₂ O	100	ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,03
NH ₄ H ₂ PO ₄	1080	CuCl ₂ .2H ₂ O	0,03
MgSO ₄ .7H ₂ O	60	NiCl ₂ .6 H ₂ O	0,06
CaCl ₂ .2H ₂ O	60	MnCl ₂ .4 H ₂ O	0,09
KCl	45	NaMo ₄ .2 H ₂ O	0,09
FeCl ₂ . 4H ₂ O	4,50	H ₃ BO ₃	0,90
Yeast Extract	600	Na ₂ SeO ₃ .5H ₂ O	0,03
(CH _{1,7} O _{0,5} N _{0,24})			

Adaptado de Ding et al. (2010); Steinbruch et al. (2011); Grootscholten et al. (2013b) e Thomas, 2015)

Após a partida, a composição nutricional sofreu duas alterações: 1) a fonte de potássio na forma de cloreto de potássio (KCl) foi substituída por carbonato de potássio (K₂CO₃) em concentração de 0,36 mg.L⁻¹, como fonte de potássio e CO₂ (GROOTSCHOLTEN et al., 2013b); e 2) foi adicionada uma concentração de 0,03 mg.L⁻¹ de cloreto de cobalto (Cl₂Co) como fonte de cobalto. Ambas intervenções foram realizadas devido a necessidade de vitaminas.

Na Tabela 5, estão apresentados os parâmetros operacionais pré-estabelecidos para o sistema UASB para o período de alimentação com substrato simples. A relação de substrato EtOH:C2 foi sugerida a partir das condições estequiométricas e bioquímicas estabelecidas na literatura (THAUER, R.K; JUNGGERMANN, K; HENNINGER, J; WENNING et al., 1977; BUCKEL; THAUER, R.K; JUNGGERMANN, K; HENNINGER, J; WENNING, 2013).

Tabela 5 - Variáveis operacionais pré-estabelecidas para a produção de ácido caproico a partir de substrato simples (etanol e ácido acético).

Variáveis operacionais	Etapa de operação			Unidade
	I	II(*)	III	
Relação EtOH:C2	4:1	4:1	4:1	$mol.mol^{-1}$
Concentração de EtOH afluente	2,8	4,6	6,9	$g.L^{-1}$
Concentração de EtOH afluente	60	100	150	$mmol.L^{-1}$
Concentração C2 afluente	0,9	1,5	2,2	$g.L^{-1}$
Concentração C2 afluente	15	25	37,5	$mmol.L^{-1}$
Volume do reator	13,8	13,8	13,8	L
Vazão	4,1	4,1	4,1	$L.d^{-1}$
TDH	3,4	3,4	3,4	d
DQO afluente	6,8	11,2	16,8	$g.L^{-1}$
DQO de etanol afluente	5,85	9,61	14,42	$gDQO.L^{-1}$
Vazão de etanol afluente	0,014	0,023	0,035	$L.d^{-1}$
DQO de C2 afluente	1,0	1,6	2,4	$gDQO.L^{-1}$
Vazão de C2 afluente	0,0033	0,0054	0,0082	$L.d^{-1}$
COV	2,03	3,33	5,00	$gDQO.L^{-1}.d^{-1}$
TRC	40	40	40	d
Concentração teórica máxima de C6	2,9	4,8	7,2	$g.L^{-1}$
$Y_{C6}^{(**)}$	0,85	1,4	2,2	$g.L^{-1}.d^{-1}$

Nota: (*) Etapa de operação que foi dividida em subetapas; (**) taxa de produção volumétrica de ácido capróico teórica EtOH concentração de etanol; C2 concentração de ácido acético; TRC tempo de retenção celular.

Como exposto na Tabela 5, o período de operação do Experimento 1 foi dividido em Etapas de acordo com o acréscimo de COV. A Etapa I foi classificada como período de partida e aclimação do lodo de inóculo às condições acidogênicas. A Etapa II foi dividida em três subetapa: Etapa IIa) período de operação sem interferência nutricional afluyente (seguindo a solução da Tabela 4); Etapa IIb) período de operação com adição de uma fonte externa de carbono inorgânico no afluyente; e Etapa IIc) período de operação com adição de uma fonte externa de cobalto no afluyente. Para amenizar a perda de DQO no afluyente, no início da Etapa III, a alimentação foi realizada diariamente. A refrigeração do afluyente só foi realizada na metade da Etapa III.

4.3 Experimento 2: Substrato complexo em sistema de batelada

4.3.1 Ensaio em batelada

Os testes em batelada foram conduzidos em frascos Schott de 100 mL, com volume útil de 75 mL (Figura 7). A temperatura foi mantida em $35,0 \pm 2^\circ\text{C}$, com agitação orbital contínua (120 rpm). A produção de AGV foi monitorada retirando-se amostra do líquido para análise de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC – *High Performance Liquid Chromatographic*). Foram retiradas amostras do início, 2º dia, 6º dia e 12º dia de incubação. A produção de biogás foi monitorada utilizando-se uma garrafa de Mariotte preenchida com solução salina (25 gNaCl.L^{-1}) acidificada a pH 2,0 com HCl 2,0 N. As concentrações de CO_2 , CH_4 , H_2S e H_2 no biogás produzido foram determinadas por cromatografia gasosa.

O inóculo foi o lodo proveniente do reator UASB operado no Experimento 1 ($25,8 \text{ gSV.L}^{-1}$). Cada frasco continha 10% desse inóculo, meio nutricional (Tabela 4) e solução de fermentado de melaço de cana² (preparada de acordo com as descrições em ANEXO B) diluído a uma concentração de etanol de 150 mM. Foi adicionado ácido acético em cinco concentrações pré-definidas em sete teste (Tabela 6). Adicionou-se clorofórmio (0,05%) em cada frasco, como inibidor seletivo

² Melaço de cana proveniente de indústria açucareira do Estado do Ceará.

para a atividade metanogênica. A purga de oxigênio foi realizada com injeção de N_2 100%, durante um minuto. Para consumo de alcalinidade e manutenção do pH entre 7,5 e 6,3, foi adicionado 1,0 g de $NaHCO_3 \cdot L^{-1}$. O teste de controle foi feito com frascos semelhantes, mas sem os substratos. Todos os testes foram realizados em triplicata.

Figura 7 - Teste em batelada com FMC.

Na Tabela 6 estão descritas as características de cada teste para esse experimento de avaliação da produção de ácido caproico, a partir da utilização de substratos complexo suplementado ou não com ácido acético.

Tabela 6 - Descrição do teste em batelada para a produção de ácido caproico utilizando FMC.

Nome do teste	Relação EtOH:C2	Substrato		DQO (g.L ⁻¹)	Relação A/M (gDQO.gSSV ⁻¹) ^(b)
		FMC (v:v) ^(a)	Ácido acético (mM)		
[controle]	(0:0)	0	0	0*	0
[a]	(2:1)	7,5	75,0	19,3	7,5
[b]	(4:1)	7,5	37,5	16,9	6,5
[c]	(6:1)	7,5	25,0	16,1	6,2
[d]	(8:1)	7,5	18,5	15,7	6,1
[e]	(10:1)	7,5	15,0	15,4	6,0
[f]	(150)	7,5	0	14,5	5,6

(*) não foi adicionado substratos, mas a DQO presente no lodo de inóculo foi considerada para os cálculos; (a) diluição do fermentado de melaço de cana em % para atingir uma concentração de 150 mM de etanol; (b) relação alimento microrganismo.

4.4 Experimento 3): Substrato complexo em reator UASB

O substrato simples que alimentava o reator UASB no Experimento 1 desta pesquisa foi substituído pela solução de FMC diluído, de forma a manter sempre a mesma concentração de, aproximadamente, 150 mM de etanol. A troca de substrato foi realizada gradualmente, substituindo-se a solução de substratos simples (etanol e ácido acético) pela solução de FMC. A substituição foi de 30%, 60% (v:v) e bruto, mantendo-se a concentração de aproximadamente 150 mM de etanol na solução de alimentação do reator (Tabela 7). Para essa substituição, foram mantidos constantes os parâmetros operacionais do reator UASB operado no Experimento 1. A mudança de operação era realizada à medida que havia estabilização aparente dos valores de produção de metabólitos (ácidos orgânicos e biogás).

Tabela 7 - Variáveis operacionais pré-estabelecidas para a produção de ácido caproico a partir de substrato simples (FMC).

Variáveis operacionais	Subetapas de operação			Unidade
	la	lb	lc	
Relação EtOH:C2	6:1	10:1	150	$mol.mol^{-1}$
Concentração de EtOH do FMC afluente	45	90	150	$mmol.L^{-1}$
Concentração de EtOH afluente	105	60	0	$mmol.L^{-1}$
Concentração C2-PA afluente	26	15	0	$mmol.L^{-1}$
Volume do reator	13,8	13,8	13,8	L
Vazão	4,1	4,1	4,1	$L.d^{-1}$
TDH	3,4	3,4	3,4	D
DQO afluente	16,3	15,7	15,1	$gDQO.L^{-1}$
DQO/EtOH afluente	14,6	14,4	14,42	$gDQO.L^{-1}$
DQO/C2 afluente	1,7	0,96	0	$gDQO.L^{-1}$
DQO extra ^(a)	0,2	0,4	0,7	$gDQO.L^{-1}$
COV	5,4	5,3	5,0	$gDQO.L^{-1}.d^{-1}$

Nota: (a) DQO exceto etanol e exceto ácido acético.

Durante o Experimento 3 foi aplicado apenas uma Etapa operacional (Etapa I) a qual foi dividida em três subetapas: Etapa la referente ao a substituição de 30% de solução de FMC (150 mM) em 60% de solução simples (150 mM); Etapa lb referente ao período de substituição gradual com 60% de de solução de FMC (150 mM) em 60% de solução simples (150 mM) e Etapa lc referente ao período de operação com adição bruto da solução diluída de FMC (150 mM).

4.5 Monitoramento do processo caprogênico

O desempenho do sistema anaeróbio produtor de ácido caproico foi avaliado baseando-se nos métodos estabelecido de acordo com o programa de monitoramento descrito na Tabela 8.

Tabela 8 - Programa de monitoramento do sistema de produção de ácido caproico

Variável	Frequência	Método /Referência
DQO	3x semana	Eaton ^(b)
pH	<i>Online</i>	Eaton ^(b)
Temperatura (°C)	<i>Online</i>	Termometria
Vazão (Q)	Diariamente	Relação volume/tempo
Produção de biogás	Diariamente	Gasometria
Alimentação afluenta	3x semana ^(a)	Volumetria
AGV afluenta e efluente	3x semana	HPLC
Etanol afluenta e efluente	3x semana	HPLC
Composição do biogás	2x semana	MicroGC
Sólidos totais (ST)	1 x mês	Eaton ^(b)
Sólidos totais voláteis (STV)	1 x mês	Eaton ^(b)
Sólidos totais fixos (STF)	1 x mês	Eaton ^(b)

Nota: (a) em alguns momentos essa frequência foi modificada para diariamente como alternativa de acondicionamento; (b) métodos descritos em Eaton et al. (2005).

4.5.1 Métodos analíticos

As concentrações de ácidos graxos voláteis (AGV) foram determinadas por Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC – *High Performance Liquid Chromatographic*), utilizando cromatógrafo VARIAN® 920 LC, equipado com detector de arranjo de fotodiodos (DAD) a 215 nm e coluna C18 Shimpack CLC-ODS, 5 µm,

(150 x 4,6 mm), mantida a 25 °C. Foi utilizado um sistema de eluição por gradiente, com fluxo de 0,4 mL/min, sendo solvente A, ácido fosfórico 0,1% e solvente B, acetonitrila, com perfil de 70, 40 e 70% para solvente A e de 30, 60 e 30% para o solvente B. O volume de amostra injetada foi de 20 µL. As amostras foram previamente filtradas em membrana de acetato de celulose ME25 com poro de 0,45 µm.

As determinações de glicose e etanol, foram realizadas por HPLC da marca Shimadzu, usando uma coluna Aminex HPX-87H (BIORAD), temperatura do forno de 65 °C, ácido sulfúrico 0,005 mM em água MiliQ, como fase móvel, e uma vazão de 0,6 mL/min com índice de refração como detecção (RID-10A, Shimadzu, Japão).

As concentrações de CH₄, H₂, CO₂ e H₂S no biogás produzido eram medidas por cromatógrafo gasoso (C2V-200 micro GC, *Thermo Fisher Scientific, The Netherlands*), equipado com um detector de condutividade térmica e uma coluna capilar de aço inoxidável (10 m x 0.5 mm). A temperatura do injetor, do forno e do detector foi de 120, 60 e 120 C, respectivamente.

4.5.2 Cálculos

O cálculo de matéria orgânica teórica foi baseado na somatória da concentração de DQO teórica dos metabólitos encontrados no efluente, de acordo com a Equação 4. Essa equação leva em consideração apenas o valor numérico para átomos de moléculas orgânicas, compostas por carbono (C), hidrogênio (H) e oxigênio (O) (KLEEREBEZEM; Van LOOSDRECHT, 2010).

$$DQO_{Teo} = \frac{8 \times (4 \times C) + H - (2 \times O)}{(12 \times C) + H + (16 \times O)} \dots\dots\dots \text{Eq. 4}$$

Em que:

DQO_{Teo} = massa de DQO teórica por massa de molécula orgânica;

C = número de átomos de carbono na molécula;

H = número de átomos de hidrogênio na molécula;

O = número de átomos de oxigênio na molécula.

O cálculo de erro de balanço de massa de DQO ($\text{Erro}_{(\%)}$) foi calculado como sendo a razão da massa diária de DQO de entrada pela massa de DQO convertida no sistema biológico (NUNES FERRAZ JÚNIOR; ETCHEBEHERE; ZAIAT, 2015) (Equação 5). A porção de DQO incorporada à fase sólida (DQO_s) foi calculada considerando condições bióticas acidogênicas com taxa de conversão celular (Y_{AGV}) de 0,118 gSSV.gDQO⁻¹ (Equação 6) (PAVLOSTATHIS; GIRALDO-GOMEZ, 1991; INFANTES et al., 2012). A porção de DQO convertida em biogás (DQO_g) foi calculada em função da proporção de DQO convertida em metano e em hidrogênio, sob condições padrão de temperatura e pressão (CNTP) (Equação 7).

$$\text{Erro}_{(\%)} = \left[\frac{(Q_{\text{Efl}} \times \text{DQO}_{\text{Efl}}) + (\text{DQO}_s) + (\text{DQO}_g)}{(Q_{\text{Afl}} \times \text{DQO}_{\text{Afl}})} \right] \dots \text{Eq. 5}$$

$$\text{DQO}_s = (Q_{\text{Efl}} \times \text{DQO}_{\text{Efl}}) \times (Y_{AGV}) \dots \text{Eq 6}$$

$$\text{DQO}_g = Q_{\text{gas}} \times \left[\left(\frac{(\%CH_4)}{V_1 \times \frac{(273 + T)}{(273 + \text{Atm})}} \right) + \left(\frac{(\%H_2)}{V_2 \times \frac{(273 + T)}{(273 + \text{Atm})}} \right) \right] \dots \text{Eq 7}$$

Em que:

Q_{Afl} e Q_{Efl} = vazão afluenta e vazão efluente em L.d⁻¹;

DQO_{Afl} e DQO_{Efl} = concentração de DQO afluenta e efluente em g.L⁻¹;

y_{AGV} = coeficiente de produção celular para organismos acidogênicos em kgSV.kgDQO^{-1} ;

Q_{gas} = vazão de biogás em L.d^{-1} ;

V_1 = volume padrão de metano no biogás em $0,35 \text{ L CH}_4.\text{kg DQO}^{-1}$.

V_2 = volume padrão de hidrogênio no biogás em $1,46 \text{ L H}_2.\text{kg DQO}^{-1}$.

$\%\text{CH}_4$ = porcentagem de metano no biogás;

$\%\text{H}_2$ = porcentagem de hidrogênio no biogás.

Para os experimentos em frascos de batelada foi calculado um rendimento da produção de ácido caproico em função da massa de DQO convertida (R_{C6}). Calculada de acordo com a Equação 8, admitindo o R_{C6} ser uma razão da massa teórica de DQO do produto formado pela massa teórica de DQO dos substratos adicionados.

$$R_{C6}(\%) = \left[\frac{(C6_{Efl} \times DQO_{C6})}{(EtOH_{Afl} \times DQO_{EtOH}) + (C2_{Afl} \times DQO_{C2})} \right] \times \left(\frac{V_{Efl}}{V_{Afl}} \right) \dots\dots\dots \text{Eq 8}$$

Em que:

R_{C6} = rendimento da produção de ácido caproico em gDQO do produto por gDQO do substrato;

$C6_{Efl}$ = concentração total de ácido caproico efluente em gC6.L^{-1} ;

$C2_{Efl}$ = concentração de ácido acético afluente em gC2.L^{-1} ;

$EtOH$ = concentração de etanol afluente em gEtOH.L^{-1} ;

DQO_{C6} = valor teórico em gDQO.gC6^{-1} ;

DQO_{C2} = valor teórico em gDQO.gC2^{-1} ;

DQO_{EtOH} = valor teórico em gDQO.gEtOH^{-1} ;

V_{Afl} e A_{Efl} = volume afluente e efluente, respectivamente, em L.

Para calcular a COV real (correspondente aos valores de vazão e concentrações afluente de DQO das análises de rotina) e a planejada (correspondente a partir dos valores teóricos estipulados) foram utilizadas a Equação 9 e 10.

$$COV = \frac{1}{TDH} \times (DQO_{Af}) \dots\dots\dots Eq. 9$$

$$TDH = \frac{V_{reator}}{Q_{Afl}} \dots\dots\dots Eq. 10$$

A taxa de produção volumétrica (Y_{AGV}) de produtos alongados, na forma de ácido butírico (Y_{C4}) e ácido caproico (Y_{C6}), foi definida pela concentração diária dividida pelo TDH do sistema (Equação 11) (GROOTSCHOLTEN et al., 2013c).

$$Y_{AGV} = \frac{[\text{Ácido produzido}]}{TDH} \dots\dots\dots Eq. 11$$

Em que:

$C4$ = concentração de ácido butírico no efluente em $g.L^{-1}$.

$C6$ = concentração de ácido caproico no efluente em $g.L^{-1}$.

O rendimento da produção de ácidos alongados foi calculado a partir do cálculo de seletividade de rota metabólica para cada alongamento de cadeia carboxílica. A seletividade é definida como a concentração de elétrons equivalentes para cada mol de produto formado (butirato ou caproato) dividido pela concentração

de elétrons equivalentes (mol.è.eq) consumidos na forma de etanol e ácido (Equação 12). Considerando conter o acetato 8 mols de elétrons por mol; etanol 12 mols de elétrons por mol; butirato 20 mols de elétrons por mol; e caproato 32 mols de elétrons por mol.

$$S_{\%} = \frac{[(P_{\text{Alongado}} \times \text{mol.è.eq})]}{[(\text{EtOH}_{\text{Consumido}} \times \text{mol.è.eq}) \times (\text{C2}_{\text{Consumido}} \times \text{mol.è.eq})]} \dots\dots\dots \text{Eq. 12}$$

Em que:

$P_{\text{alongados}}$ = produtos carboxílicos alongados totais ou parcial (somente C4 ou somente C6) em g.mol⁻¹.

$\text{EtOH}_{\text{consumido}}$ = etanol consumido em mol;

$\text{C2}_{\text{consumido}}$ = ácido acético consumido em mol;

4.5.3 Métodos estatísticos para tratamento dos dados

Estatística descritiva (média, máximo, mínimo e desvio padrão) foi aplicada para tratar os dados experimentais. A identificação e a remoção de valores extremos (*outlier*), nos dados coletados, foram realizadas de acordo com os métodos descritos por Miller e Miller, (2005). A avaliação do grau em que se manifesta a correlação entre as séries de dados efluentes de ácidos produzidos foi feita por meio do coeficiente de correlação de Pearson e do teste *t de student* a um nível de significância de 5%. Para confecção de gráficos e processamento dos testes estatísticos, foram utilizados os seguintes *softwares*: Excel 2010 (licença pessoal), Minitab 11.1 (licença disponibilizada pela USP), Oringin 9.1 (licença disponibilizada pela USP) e Action 3.0 (licença livre).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Experimento 1: operação do reator UASB com substrato simples

5.1.1 Etapa I - Partida e adaptação de inóculo

A Tabela 9 representa um resumo das variáveis operacionais monitoradas durante o período de operação do reator UASB, alimentado com substrato simples. O inóculo utilizado (lodo granular de um reator UASB proveniente de uma indústria de cerveja) sofreu rápido efeito das condições acidogênicas (faixa de pH de 5,2 a 5,6), visto pela queda da produção de biogás. Assim como reportado por outras pesquisas (AGLER et al., 2012; ANGENENT; AGLER, 2015), manter condição de pH baixo é uma alternativa operacional ideal para inibição da atividade metanogênica, em sistemas anaeróbios do tipo caprogênicos inoculados com culturas mistas.

5.1.2 Etapa II - Interferências nutricionais

Durante a Etapa IIa, observou-se redução do processo de conversão biológica dos substratos adicionados, resultando no decréscimo da formação de ácido butírico e ácido caproico. Possivelmente isto ocorreu por carência nutricional de uma fonte externa de carbono inorgânico (CO_2) na solução de substrato simples, uma vez que a presença de CO_2 no meio líquido é necessária como fonte de nutriente para a síntese de proteínas dos organismos formadores de ácido caproico (TOMLINSON; BARKER, 1954). Em sistemas anaeróbios caprogênicos, alimentados com etanol e ácido acético, a produção interna de CO_2 é pequena, sendo necessária a complementação de CO_2 (GROOTSCHOLTEN et al., 2013b).

Tabela 9: Resumo das variáveis operacionais durante o período de alimentação com substrato simples.

Etapa ^d	Tempo ^a	COV _b	Substrato ^c		DQO _{Af} _e	DQO _{Ef.B} ^f	DQO _{Ef.D} ^g	EtOH ^h	C2 ⁱ	C4 ^j	C6 ^k
			EtOH ^l	HAc ^m							
I	0-20	2,0	2,8	0,9	6,4	2,6	2,3	0,35±0,3	0,71±0,3	0,25±0,3	1,16±0,9
IIa	21-56	3,33	4,6	1,5	11,2	6,2	5,6	0,63±0,4	0,72±0,5	0,52±0,2	1,0±0,5
IIb	57-88	3,33	4,6	1,5	11,0	6,3	5,6	0,98±0,5	1,2±0,5	0,53±0,3	0,4±0,1
IIc	89-100	3,33	4,6	1,5	10,8	7,0	6,5	0,43±0,2	0,03±0,1	1,0±0,1	0,77±0,2
III	101-165	5,0	6,9	2,2	18,4	15,0	14,9	1,56±0,6	0,3±0,4	2,65±1,5	1,75±0,8

Nota: (IIa) período de operação sem interferência nutricional afluyente; (IIb) período de operação com adição de uma fonte externa de carbono inorgânico no afluyente; (IIc) período de operação com adição de uma fonte externa de cobalto no afluyente; ^(a) tempo de operação em dia; ^(b) média teórica em gDQO.L⁻¹.d⁻¹; ^(c) substratos adicionados no afluyente; ^(d) etapas de operação baseado de acordo com a COV aplicada; ^(e) média da DQO afluyente em g.L⁻¹; ^(f) média da DQO efluente bruta em g.L⁻¹; ^(g) média da DQO dissolvida em g.L⁻¹; ^(h) concentração média de etanol no efluente em g.L⁻¹; ⁽ⁱ⁾ concentração média de ácido acético no efluente em g.L⁻¹; ^(j) concentração média de ácido butírico no efluente em g.L⁻¹; ^(k) concentração média de ácido caproico no efluente em g.L⁻¹; ^(l) concentração teórica de etanol adicionado em g.L⁻¹; ^(m) concentração teórica de ácido acético adicionado em g.L⁻¹.

A partir do 57º dia de operação, Etapa IIb, foi adicionado carbonato de potássio ($0,3 \text{ gK}_2\text{CO}_3 \cdot \text{L}^{-1}$) Grooscholten et al. (2013b). Mesmo com essa correção nutricional, não foi observada modificação significativa de produção de ácido caproico (Figura 8), diferentemente de Grooscholten et al. (2013b), que aumentaram a produção em até 30%, após adição de K_2CO_3 na solução afluenta a um filtro anaeróbio operado em pH de aproximadamente 7,0. A diferença de pH entre o trabalho de Grooscholten et al. (2013b) e esta pesquisa pode ser o motivo dessa divergência, uma vez que a manutenção do pH baixo do reator UASB aqui operado (5,3) não permitiu grandes concentrações de CO_2 no meio líquido. Valores de pH abaixo do pKa de dissociação do CO_2 (6,3), acarretam em perda rápida do CO_2 dissolvido. Este tipo de observação não foi feita por Vasudevan; Richter; Angenent (2014), quando utilizaram um filtro anaeróbio para produção de ácido caproico alimentado com substrato simples em pH de 5,5, com adição externa de CO_2 . Talvez, essa seja um dos motivos para a baixa produção de ácido caproico encontrada pelos autores.

Figura 8 – Produtos formados (ácido butírico (■) e ácido caproico (■)) e substratos remanescentes (etanol (○) e ácido acético (●)) com valores médios seguidos dos intervalos de confiança para cada variável das diferentes etapas de operação do reator UASB.

Segundo Steinbusch, (2010), o pH ideal em sistemas caprogênicos alimentados com substrato simples é de aproximadamente 7,0. Esse pH favorece a produção e a manutenção de maiores concentrações de ácidos no meio líquido (GROOSCHOLTEN et al, 2013b), sem causar inibição por estes, além de beneficiar a permanência de CO₂ dissolvido. Entretanto, a eficiência de um processo caprogênico em pH aproximadamente 7,0 depende da inibição seletiva da atividade metanogênica. Para isso, alguns trabalhos reportaram o uso de agentes químicos como clorofórmio ou 2-BES (DING; TAN; WANG, 2010; STEINBUSCH et al., 2011). Contudo, o uso de agentes químicos como inibidores seletivos podem acarretar na produção de efluente de qualidade ambiental questionável.

A segunda razão para o decréscimo da produção de ácido caproico durante as Etapas IIa e IIb foi a carência nutricional do metal traço cobalto na solução afluyente. O cobalto está presente na cianocobalamina (família da vitamina B12), essencial para várias reações bioquímicas do processo de digestão anaeróbia (KIDA et al., 2001; QIANG; LANG; LI, 2012), tanto na formação de metano pelas AMH, quanto pelas AMA (MOESTEDT et al., 2015).

Agler et al. (2011) afirmam que, quando se pretende produzir AGCM a partir de fermentado de milho, a inibição da AMA pode ocorrer pela baixa concentração de cobalto no meio líquido. Resíduos derivados do milho, por exemplo, contêm baixa concentração de cobalto, reduzindo naturalmente a produção de metano em até 30% (AGLER et al., 2008). No entanto, em condições de limitação de cobalto, a produção de AGCM também é afetada, independente da concentração do substrato afluyente (FLORENCIO; FIELD; LETTINGA, 1995). Isso ocorre porque o cobalto é um micronutriente essencial para formação e ativação de vitaminas do grupo B12 (LJUNGDAHL, 1986).

Talvez, a redução da concentração de cobalto tenha impedido o desenvolvimento do PACC, durante a etapa inicial de operação do reator UASB alimentado com substrato simples. A presença de cobalto no lodo de inóculo pode ter auxiliado os processos bioquímicos acidogênicos até o momento de sua total lavagem no reator (início da Etapa IIb), pois, reatores de fluxo contínuo tentem a

carrear esse tipo de composto junto do efluente, devendo-se adicioná-lo junto com o afluente para suprir sua demanda (FERMOSO; BARTACEK; LENS, 2010).

Como apresentado na Figura 8, durante a Etapa II, houve a maior queda do processo bioquímico de formação de ácido butírico e ácido caproico, resultando no acúmulo dos substratos adicionados (etanol e ácido acético). No 89º dia de operação, início da Etapa IIc, foi adicionado cloreto de cobalto hexahidratado ($\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) como fonte de cobalto, mantendo uma concentração de $0,06 \text{ gCoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O} \cdot \text{L}^{-1}$ na solução afluente, adaptando os valores sugeridos por Steinbusch, (2010). A adição da fonte de cobalto no substrato simples aumentou rapidamente a produção de ácido butírico e ácido caproico (Figura 8) dia após dia. A produção crescente desses ácidos manteve-se até o aumento de COV para $5,0 \text{ gDQO} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ (Etapa III).

Durante a Etapa III, a produção de ácido butírico manteve-se superior à produção de ácido caproico. Certamente, o efeito da COV elevada e o pH de aproximadamente 5,3 tenham limitado o PACC para a formação de ácido caproico, pois verificou-se acúmulo de ácido butírico e etanol no efluente do reator UASB, nessa etapa.

5.1.3 Avaliação do processo de alongamento de cadeia carboxílica

Apesar dos problemas nutricionais ocorridos na Etapa II, houve formação de ácido caproico durante todo o período de operação. A Figura 9 representa a evolução dos metabólitos líquidos e gasosos produzidos pelo reator UASB, alimentado com substrato simples durante os 165 dias de operação.

Figura 9 - Monitoramento do reator caprogênico UASB alimentado com substrato simples: A) COV de referência; B) substratos remanescentes; C) AGV produzidos e D) produção de biogás.

Durante a COV 2,0 e 3,3 gDQO.L⁻¹.d⁻¹ (Etapas I e II), sem refrigeração do substrato afluente, ocorreu entrada irregular da massa de DQO, dificultando verificar o efeito da COV no PACC. Somente após refrigeração do afluente, a partir da COV de 5,0 gDQO.L⁻¹.d⁻¹ (Etapa III), foi possível observar maior produção de ácidos, decorrente do acréscimo de substrato adicionado. Embora, na Etapa III, tenha ocorrido maior acúmulo de substratos, a concentração máxima de ácido caproico nessa etapa foi de aproximadamente 2,8 gC6.L⁻¹. Esta concentração é aceitável, para a condição de pH aplicada (5,3), uma vez que em pH baixo ocorre limite da produção de ácidos devido ao acúmulo de ácidos não dissociados. Esse valor de concentração de ácido caproico é superior ao de Vasudevan Richter; Angenent, (2014), quando, a partir de substrato simples (etanol e ácido acético), em pH ácido

(5,5), obtiveram concentração máxima de $1,7 \text{ gC}_6\text{L}^{-1}$. Isso mostra que o processo caprogênico sofre limitações quando em pH ácido.

Os resultados da produção de ácido caproico obtidos nesta pesquisa assemelham-se aos de Grootscholten et al. (2013a), os quais utilizaram substrato complexo (acidificado não hidrolisado de OFMSW suplementado com etanol) e atingiram uma concentração máxima de ácido caproico de $2,7 \text{ gC}_6\text{L}^{-1}$. Segundo os autores, não foi possível atingir concentrações maiores devido ao pH ácido (5,5), resultando em concentração elevada de ácidos orgânicos não dissociados, principalmente, ácido caproico. Admitindo os valores médios de ácido capróico não dissociado (HCa) encontrados por Ge et al. (2015) e Weimer, Nerdahl, Brandl, (2015), pode-se supor que a concentração total de HCa capaz de causar inibição é de, aproximadamente, 800 mgHCa.L^{-1} .

5.1.4 Produtividade do sistema caprogênico

A Figura 10 representa a avaliação em *box plot* dos valores da taxa de produção volumétrica de ácido butírico (Y_{C4}) e da taxa de produção volumétrica de ácido caproico (Y_{C6}), durante a operação do reator UASB alimentado com substrato simples. Os valores foram separados conforme as etapas de operação, incluindo as subetapas presentes na Etapa II.

Na etapa final desse experimento (Etapa III), a Y_{C6} máxima foi de, aproximadamente, $1,0 \text{ gC}_6\text{L}^{-1}\text{.d}^{-1}$ seguida de uma Y_{C4} de, aproximadamente, $1,3 \text{ gC}_4\text{L}^{-1}\text{.d}^{-1}$. Esse valor de Y_{C6} foi superior ao valor máximo atingido por Steinbusch et al. (2011), quando avaliaram um estudo prévio em batelada para a produção de ácido caproico em dois experimentos, ambos alimentados com substrato simples, sendo um em pH 5,5 e outro em pH 7,0. Os autores atingiram uma concentração máxima de $8,17 \text{ gC}_6\text{L}^{-1}$ com Y_{C6} de $0,485 \text{ gC}_6\text{L}^{-1}\text{.d}^{-1}$, em condição de pH 7,0, enquanto a concentração máxima de ácido caproico em condição de pH 5,5 foi de $0,12 \text{ gC}_6\text{L}^{-1}$ com Y_{C6} de $7,0 \times 10^{-3} \text{ gC}_6\text{L}^{-1}\text{.d}^{-1}$, Steinbusch et al. (2011), também reportaram a produção de ácido caprílico em ambas as condições de pH avaliadas,

o que não foi encontrado nesta pesquisa, talvez, devido ao TDH baixo aplicado ao reator UASB (3,4 dias).

Figura 10 - Taxa de produção volumétrica do PACC para produção de ácido butírico e ácido caproico.

Além da taxa de produção volumétrica, o desempenho do processo caprogênico pode ser avaliado de acordo com o cálculo de seletividade de rota metabólica (descrito na Equação 12). A Figura 11 representa os valores de seletividade de elétrons para o PACC, que levou à formação de ácido butírico (S_{C4}) e ácido caproico (S_{C6}), durante todo o período de operação do reator UASB alimentado com substrato simples (etanol e ácido acético).

No início da etapa final deste experimento (Etapa III) (101º dia de operação), foi identificada seletividade de, aproximadamente, 60% para o processo caprogênico. Esses resultados foram abaixo dos obtidos por Grootsholten et al. (2013b), que utilizaram substrato simples em pH 7,0 (condições ótimas de pH) e encontraram Y_{C6} de 16,0 gC6.L⁻¹.d⁻¹ com seletividade de produto de 85%. Essa diferença pode ser atribuída à diferença de pH que foi ácido nessa pesquisa e neutro (aproximadamente 7,0) na pesquisa de Grootsholten et al. (2013b). Em um estudo posterior com o mesmo reator e mesmo substrato, Grootsholten et al. (2013c) conseguiram superar em até três vezes o valor da Y_{C6} (aproximadamente 52,0 gC6.L⁻¹.d⁻¹), embora, com menor S_{C6} do que a encontrada no trabalho anterior (apenas 80%). É importante ressaltar que esses dois estudos são sequenciais, diferenciando-se, principalmente, pela redução do TDH entre o primeiro e o segundo estudo (de 17 h para 4 h). Portanto, a queda da seletividade do processo caprogênico, identificado por Grootsholten et al. (2013c), pode ser um reflexo do acréscimo da COV em razão da redução do TDH.

A partir do 160º dia de operação, a S_{C6} começou a cair e, no fim da Etapa III, atingiu um valor mínimo de aproximadamente 30%. Considerando que a Y_{C4} máxima no fim dessa etapa foi de aproximadamente 1,5 gC4. L⁻¹.d⁻¹, com seletividade de 65%, pode-se admitir que esse produto intermediário teve maior produtividade e maior seletividade do que a formação de ácido caproico. A produção de ácido butírico dominou a maior parcela dos produtos do PACC no fim da Etapa III. Isso deve ter ocorrido devido a retirada de lodo para o Experimento 2.

Figura 11 - Seletividade de elétrons durante o PACC e formação de ácido butírico (●) e ácido caproico (●) durante a operação do reator UASB alimentado com substrato simples.

A inversão da seletividade da formação de ácido caproico para ácido butírico, no fim da Etapa III, assemelha-se aos resultados da produção de AGV atingido por Vasudevan; Richter; Angenent, (2014), quando utilizaram um reator anaeróbico de leito empacotado alimentado com substrato simples (etanol e ácido acético), e identificaram uma produtividade baixa de ácido caproico (aproximadamente $1,7 \text{ gC}_6 \cdot \text{L}^{-1} \text{d}^{-1}$), seguido do acúmulo de ácido butírico (aproximadamente $20,0 \text{ gC}_4 \cdot \text{L}^{-1} \text{d}^{-1}$) em pH baixo (aproximadamente 5,5). Assim como o trabalho de Vasudevan; Richter; Angenent, (2014), é possível que o acúmulo de ácidos não dissociados no meio líquido tenham acarretado deficiência do PACC em formar ácido caproico. Em acúmulo de ácido butírico e na presença de ácido acético e etanol, o PACC tende a formar mais ácido butírico até o esgotamento de ácido acético. A formação de grandes quantidades de ácido butírico pelo PACC em pH ácido gera acúmulo deste

na forma não dissociados, que provavelmente causará inibição e produção baixa de outros ácidos orgânicos, incluindo o ácido caproico. Durante este período de operação foi identificado haver dificuldades no controle da carga de ácidos.

5.1.5 Inibição da atividade metanogênica durante o Experimento 1

A estabilidade do PACC é afetada pelos processos de competição por substrato. Manter o pH do reator UASB em uma média de 5,3 foi eficiente para inibir a atividade metanogênica. Segundo Grootscholten et al. (2013a), com concentração de AGV não dissociada maior que 5,0 mM é possível inibir a atividade metanogênica e beneficiar o processo de produção de ácido caproico.

Após a partida do reator (início da etapa II), foi observada redução da produção de biogás, especialmente a de metano, a qual teve média de 20 mM.d⁻¹. Mesmo em pH ácido, é possível que essa produção de metano tenha ocorrido devido à atividade hidrogenotrófica, pois as AMH são mais resistentes às condições ácidas do que as AMA (HWANG et al., 2004). As concentrações baixas de H₂, identificadas no *headspace* reforçam a afirmativa da produção de metano ter ocorrido a partir da atividade hidrogenotrófica.

Alguns autores (VASUDEVAN; RICHTER; ANGENENT, 2014; ANGENENT, AGLER, 2015) recomendam limitar a disposição de CO₂, no meio líquido, como alternativa para inibição da atividade metanogênica hidrogenotrófica, em reatores do tipo caprogênicos. O consumo de H₂ dificulta manter a pressão parcial de hidrogênio elevada. Quando possível, o aumento da pressão parcial de hidrogênio, beneficia o processo de produção de ácido caproico (DING; TAN; WANG, 2010). Contudo, a produção de AGCM pelo PACC requer dióxido de carbono como nutriente para síntese de proteínas e a eliminação completa de CO₂ deve ser evitada.

Durante o Experimento 1, a produção de biogás (CH₄, H₂ e CO₂) avaliada no *headspace* do reator UASB foi baixa (Figura 12) e, portanto, não se deve considerar competição biológica das AMH por H₂. Este comportamento de competição deve ser avaliado quando a produção interna de CO₂ e H₂ forem suficientemente elevadas, ao ponto de ser possível aumentar a pressão parcial de hidrogênio para favorecer a

produção de ácido caproico. Contudo, ambas as comunidades de organismos (hidrogenotróficas e caprogênicas) podem ocorrer consorciadas, pois produzem metabólitos de valor energético elevado como H_2 e CH_4 (ANGENENT, LARGUS; AGLER, 2015).

A produção de H_2 avaliada no *headspace* do reator UASB foi baixa e só aumentou no final da Etapa III, quando a produção de ácido butírico começou a ultrapassar a produção de ácido caproico. Mesmo nessa Etapa, a maior produção de H_2 foi de apenas $6,0 \text{ mM.d}^{-1}$, correspondente a 1% do total de biogás produzido.

Figura 12 - Produção de biogás (A), hidrogênio (B), metano (C) e dióxido de carbono (D) no reator UASB caprogênico alimentado com substrato simples.

5.1.6 Balanço de massa

Durante a Etapa I (COV de 2,0 gDQO.L⁻¹.d⁻¹) foi observado que, os valores do balanço de DQO encontravam-se com Erro de aproximadamente 21,2±15,8%. Na Etapa II (COV de 3,3 gDQO.L⁻¹.d⁻¹), os valores do balanço de DQO apresentaram Erro de aproximadamente 22,1±5,8% (Figura 13). Ambos os comportamentos podem ser justificados pela perda de matéria orgânica (extremamente voláteis) no afluente, já que os reservatórios com o afluente e efluente eram mantidos em temperatura ambiente, o que facilitou a volatilização de etanol e ácido acético.

Figura 13 - Erro para o balanço de DQO para período de operação do reator UASB alimentado com substrato simples

No início da Etapa III (COV de 5,0 gDQO.L⁻¹.d⁻¹), a estratégia de alimentação diária fez com que o balanço de DQO apresentasse um Erro de, aproximadamente, 8,5±7,5%. A partir do 140º dia de operação (ainda na COV de 5,0 gDQO.L⁻¹.d⁻¹), foi observado ter sido a refrigeração do afluente e do efluente, importante alternativa para manter a uniformidade da massa de DQO do sistema caprogênico. Nessa

última Etapa o balanço de massa de DQO permaneceu com Erro de, aproximadamente, $8,5 \pm 3,5\%$. Contudo, deve-se ainda considerar o erro das parcelas de DQO não identificadas pelos métodos adotados.

5.2 Experimento 2): Teste em batelada com substrato complexo

5.2.1 Produção de AGCM usando substrato complexo

A Tabela 10 representa o resumo dos valores reais das concentrações de substrato complexo (MCF) adicionados e dos produtos finais após 12 dias de incubação. A partir da Tabela 10 observa-se que, em todos os testes, o consumo de etanol foi predominante para as rotas bioquímicas de formação de ácido butírico e ácido caproico.

A Figura 14 ilustra a evolução dos metabólitos líquidos (em g.L^{-1}) obtidos no experimento em batelada em função do tempo de incubação para cada um dos testes descritos na Tabela 10. Nesse experimento, foram avaliados a produção de ácido caproico a partir de, somente, FMC, e o incremento ou não da produtividade a partir da suplementação com ácido acético.

Tabela 10 - Resumo dos produtos consumidos e dos metabólitos produzidos nos experimentos em batelada com FMC.

Teste ^(a)	Relação EtOH:C2	Inicial (mM)		Final (mM)			
		EtOH	C2	EtOH	C2	C4	C6
[a]	(2:1)	177,3 ± 42,2	132,4 ± 20,7	LD	16,8 ± 3,0	102,5 ± 6,2	4,0 ± 0,6
[b]	(4:1)	130,0 ± 36,6	45,5 ± 12,2	LD	9,7 ± 0,7	36,0 ± 0,5	21,6 ± 1,8
[c]	(6:1)	158,0 ± 4,2	36,7 ± 0,8	LD	6,5 ± 0,6	24,0 ± 1,8	29,6 ± 3,6
[d]	(8:1)	157,5 ± 7,3	29,7 ± 1,2	8,9 ± 6,5	5,13 ± 0,5	25,0 ± 2,8	30,6 ± 0,2
[e]	(10:1)	183,6 ± 5,6	27,8 ± 1,7	3,9 ± 6,8	6,15 ± 1,0	18,8 ± 1,3	29,8 ± 3,8
[f]	(150)	198,6 ± 31,2	LD	39,8 ± 2,1	LD	11,8 ± 1,3	18,0 ± 2,8

Nota: (LD) valores abaixo do limite de detecção utilizado; (a) nomenclatura dos testes em batelada sem o teste controle, pois as concentrações de metabólitos encontradas foram abaixo dos métodos de detecção.

Figura 14 –Concentrações de etanol (▨) ácido acético (■), ácido butírico (●) e ácido caproico (■) durante os testes em batelada para as relações EtOH:C2 de: [a] 2:1; [b] 4:1; [c] 6:1; [d] 8:1; [e] 10:1 e [f] 150.

Durante o teste de menor relação EtOH:C2 (Figura 14, [a] (2:1)), foi observada maior velocidade de formação de ácido butírico, com pico de, aproximadamente, 10 gC4.L⁻¹, durante o 6º dia de incubação. O processo de alongamento de cadeia para esse teste cessou entre o 6º e o 12º dia de incubação, quando não mais havia etanol no meio líquido. Concentrações de ácido caproico só foram observadas no 12º dia de incubação (0,45 gC6.L⁻¹), enquanto, nesse mesmo

período, a concentração de ácido butírico representava aproximadamente 90% da massa total de DQO do teste [a] (Figura 15:[a]).

Comparando em sequência os testes que receberam ácido acético ([a], [b], [c], [d] e [e]), é possível observar uma queda gradual da formação de ácido butírico, acompanhado da queda do consumo de etanol do teste [a] ao teste [e]. À medida que a relação EtOH:C2 aumentava, diminuía a formação de ácido butírico (primeiro alongamento). Entre o 6º e o 12º dia de incubação, foi identificada presença de ácido caproico em todos os testes, sendo maior para os testes [d] e [e], com concentração de aproximadamente 3,6 gC6.L⁻¹ para ambos os testes. Isso foi resultado da reação de ácido butírico acumulado com etanol remanescente entre o 6º e o 12º dia de incubação. De acordo com a Figura 14, em todos os testes que receberam adição de ácido acético ([a], [b], [c], [d] e [e]), o etanol havia sido totalmente consumido no 12º dia de incubação por causa do inóculo utilizado, adaptado à presença de substratos prontamente disponíveis na forma de etanol e ácido acético.

De acordo com os resultados obtidos nos experimentos que receberam ácido acético ([a], [b], [c], [d] e [e]), pode-se dizer que o PACC estava interrompido e com acúmulo de ácido butírico devido à falta de doador de elétrons. Estes resultados assemelham-se aos de Steinbusch et al. (2011), quando, em teste em batelada usando substrato simples (etanol e ácido acético), observaram ocorrer rápido acúmulo de ácido butírico em baixa relação EtOH:C2, sendo necessário suplementar etanol para o ácido butírico acumulado ser convertido a ácido caproico.

A produção de ácido butírico a partir de etanol e ácido acético é um processo mais rápido do que a produção direta de ácido caproico a partir de etanol e ácido acético (SEEDORF et al., 2008), pois, durante a formação de ácido caproico, é necessária a presença de ácido butírico como produto intermediário, além da presença de etanol como doador de elétrons (SPIRITO et al., 2014; GE et al., 2015). De acordo com a termodinâmica do processo (cálculos detalhados em ANEXO C), sob condições padrões de temperatura e pressão, a variação da energia livre para ambas as reações de alongamento de cadeia carboxílica, em pH 7,0 é exotérmica e de mesmo valor, mostrando não haver preferência de formação de ácido butírico ou ácido caproico.

No experimento com somente FMC (Figura 14 [f];150), foi observado que a ausência de ácido acético prontamente disponível reduziu a velocidade do consumo de etanol, resultando em produção baixa de ácido butírico e ácido caproico. A presença de ácido butírico e etanol no fim do teste indicou que o PACC ainda não estava completo, como nos testes anteriores, indicando a necessidade de tempo de reação mais longo para que o processo possa ainda consumir todo etanol adicionado, no sentido à formação de ácido caproico. Contudo, o aumento do tempo de fermentação, em condições de pH próximo de 7,0, pode favorecer a formação de ácido caprílico caso haja acúmulo de ácido caproico na presença de etanol ainda remanescente.

De acordo com a Figura 15, o percentual de conversão de DQO do substrato foi maior para a formação de ácido butírico quando em baixa relação EtOH:C2, e aumentou para a formação de ácido caproico à medida em que se aumentou a relação EtOH:C2, adicionado inicialmente em cada teste. O maior percentual de recuperação de matéria orgânica para a formação de ácido caproico só foi observado nos testes [c], [d], [e] e [f] (Figura 15), ou seja, testes com as menores concentrações de ácido acético adicionados.

A Figura 16 mostra os resultados do teste de regressão linear realizado para analisar se a resposta da produção de ácido butírico é influenciada pela quantidade de ácido acético adicionado em cada teste e se essa influência independe do tempo de incubação. Para tal, a relação de referência EtOH:C2 foi invertida (C2:EtOH), uma vez que a concentração de etanol em todos os testes era constante. Assim, foram montados três testes de regressão, correspondentes a cada concentração de ácido butírico encontrada para cada teste com sua respectiva relação C2:EtOH, nos três dias de coleta de amostras: D2- dia 2, D6- dia 6 e D12- dia 12.

Figura 15 – Percentual de matéria orgânica incorporado aos produtos alongados durante o PACC; com formação de ácido butírico (C4) e ácido caproico (C6).

Figura 16- Regressão linear da produção de ácido butírico a partir do acréscimo de ácido acético adicionado; considerando todos os experimentos e sua resposta ao tempo de incubação: (D2) de dois dias, (D6) de seis dias e (D12) de dose dias.

De acordo com o teste de correlação e análise de resíduos, houve correlação positiva entre a concentração de ácido butírico e a de ácido acético adicionado para cada teste e para cada tempo de incubação amostrado. Ou seja, quanto maior a concentração de ácido acético adicionado ao teste, maior é a velocidade de formação de ácido butírico. Essa formação de ácido butírico tende a ocorrer até o total consumo de ácido acético do meio líquido. Assim, se todo ácido acético for convertido em ácido butírico e ainda existir etanol, o prolongamento de cadeia carboxílica seguirá para formação de ácido caproico e cessará no momento em que

todo etanol for consumido (SEEDORF et al., 2008). Caso contrário, haverá acúmulo de ácido butírico, assim como observado por Steinbusch (2010).

No 2º dia de incubação, houve correlação um pouco menos expressiva entre a produção de ácido butírico e a quantidade de ácido acético adicionado, pois nem todo ácido acético havia sido consumido. No 6º dia de incubação, foi observada correlação maior entre as duas variáveis, pois todo ácido acético havia sido consumido e a concentração de ácido butírico era máxima. No 12º dia de incubação a correlação voltou a ser um pouco menos expressiva, devido à formação de ácido caproico a partir do consumo de ácido butírico acumulado e o etanol remanescente.

Provavelmente, durante os testes sem adição de ácido acético, ocorreu limitação do processo caprogênico como resposta cinética. A relação alimento microrganismo (A/M) aplicada foi elevada (Tabela 6), sendo o lodo de inóculo mais adaptado à fermentação secundária de ácido acético e etanol prontamente disponíveis, indicando a necessidade de tempo de reação mais longo para completar o processo de consumo de etanol e ácido butírico para formação de ácido caproico. Provavelmente, outro fator limitante foi o processo de hidrólise do material orgânico, exceto etanol, presente no FMC, a qual deve ter sido comprometida devido ao lodo de inóculo adaptado a substrato simples (etanol e ácido acético). De acordo com Agler et al. (2012), que utilizaram fermentado de milho não destilado em vez de um substrato simples, a produção de ácido caproico foi limitada pela falta de produção de AGV proveniente da hidrólise e acidogênese da matéria orgânica presente no fermentado não destilado de amido de milho.

5.2.2 Produtividade do PACC

A Figura 17 representa a variação da seletividade do PACC e o rendimento em DQO da produção de ácido butírico e ácido caproico. A seletividade do processo de alongamento de cadeia foi mais expressiva para a produção de ácido butírico, quando a relação EtOH:C2, era menor. Nos testes com maior relação EtOH:C2, a seletividade de formação de ácido butírico diminuía e a de ácido caproico aumentava. O teste [e] (8:1) foi o teste com maior seletividade para o processo caprogênico, com, aproximadamente, 55%, enquanto, nesse mesmo teste, a

seletividade para o processo de formação de ácido butírico era de, aproximadamente, 25%. Entretanto, a seletividade do PACC para todos os testes que receberam adição de ácido acético chegou ao seu limite aparente, pois todo doador de elétrons (etanol) havia sido consumido: parte convertida em ácido butírico e parte convertida em ácido caproico.

Figura 17 - Seletividade de: ácidos alongados (●), ácido butírico C4 (○), ácido caproico C6 (●). Rendimento do PACC para formação de ácido butírico C4 (□) e ácido caproico (■).

Durante o teste sem adição de ácido acético ([f];150), houve seletividade baixa, tanto para a formação de ácido butírico (aproximadamente 10%), quanto para formação de ácido caproico (aproximadamente 30%). No entanto, a presença de

etanol no meio líquido indica que esses valores de seletividades podem aumentar. A tendência é o aumento da seletividade da formação de ácido caproico ocorrer a partir do consumo do ácido butírico acumulado e do etanol remanescente. Para isso, é necessário aumentar o tempo de incubação.

O cálculo de rendimento da conversão biológica de DQO serviu como suporte ao cálculo de seletividade de elétrons. De acordo com a Figura 17, os testes [c] (6:1), [d] (8:1) e [e] (10:1) foram os que recuperaram a maior parcela da matéria orgânica do substrato para a formação de ácido caproico ($0,4 \text{ gDQO}_{\text{C6}}.\text{gDQO}_{\text{Subs}}^{-1}$). A DQO recuperada para a produção de ácido butírico só foi maior nos testes [a] (2:1) e [b] (4:1), com valores de, aproximadamente, 0,6 e, aproximadamente, $0,4 \text{ DQO}_{\text{C4}}.\text{gDQO}_{\text{Subs}}^{-1}$, respectivamente.

5.2.3 Inibição da atividade metanogênica

O PACC a partir de substrato complexo (FMC), em sistema de batelada, em geral, ocasionou consumo baixo de alcalinidade. Portanto, os valores de pH de todos os testes permaneceram próximos ao valor fixado no início do experimento (7,5 a 6,3). O consumo baixo de alcalinidade indica que o PACC ocorreu em condições adequadas, pois neste processo há formação baixa de H^+ . Portanto, nesse experimento em batelada foi desconsiderada a inibição devido à carga de ácidos, pois o pH do meio permaneceu em condições tais (entre 7,5 a 6,3) que todos os AGV no meio líquidos estavam na forma dissociada.

A região de pH ótimo para o PACC (aproximadamente 7,0) é a mesma para a atividade metanogênica, e ambas as rotas metabólicas concorrem pelo ácido acético (KENEALY; WASELEFSKY, 1985). Portanto, para favorecer apenas o PACC, foi necessária a adição de clorofórmio como inibidor seletivo. Com isso, foi possível atingir valores maiores de seletividade para o PACC, partindo de ácido acético. Embora essa alternativa de inibição da atividade metanogênica seja eficaz, também é cara e, portanto, impraticável para um processo em escala maior. Além do mais, a

maioria dos trabalhos relacionados à produção de ácido caproico com adição de um inibidor químico não aplicou um processo de extração seletiva do ácido produzido.

A Figura 18 apresenta os valores da quantidade de biogás produzido em cada teste deste experimento em batelada. Em todos os testes, foi observada a produção de H_2S , CO_2 e H_2 , sendo a produção destes dois últimos uma resposta da fermentação primária da matéria orgânica complexa contida no FMC, sem interferência das AMH, indicando maior acúmulo de CO_2 e H_2 . A produção de ácido sulfídrico (H_2S) foi uma resposta das BRS devido à presença de enxofre no substrato.

Em pH ácido (5,8 a 5,0), a variação da energia livre de Gibbs torna a termodinâmica do PACC menos favorável do que em pH 7. A diferença de operar sistemas caprogênicos com substratos complexos (não prontamente disponíveis) do que um simples (prontamente disponíveis), é que, no primeiro, é possível uma produção maior de H_2 e CO_2 devido à fermentação primária da matéria orgânica. Mesmo em pH ácido, a atividade das AMH pode oferecer limite para o processo caprogênico, em razão de: consumo de CO_2 , nutriente importante para o PACC, e consumo de H_2 , que pode ser utilizado para aumentar a pressão parcial de hidrogênio do meio, beneficiando a produção de ácido caproico.

De acordo com a patente de Angenent; Agler (2015), mesmo em pH ácido, a atividade hidrogenotrófica deve ser evitada. Dessa forma, pode-se considerar que as bactérias hidrogenotróficas não competem pelo mesmo substrato durante o PACC. O consumo de H_2 em cultura mista só pode ser considerado como competição quando o PACC tiver apenas H_2 como doador de elétrons.

Apesar da adição de um inibidor seletivo para a atividade metanogênica, o consumo indesejado de ácido acético pode ter ocorrido a partir da atividade das BRS. Mesmo operando reatores acidogênicos em pH ácido, a inibição da atividade das BRS ainda representará efeito competitivo (LOVLEY; DWYER; KLUG, 1982). Em pH de 5,3, a variação da energia de livre de Gibbs torna mais favorável o consumo de ácido acético pelas BRS, do que o consumo de ácido acético pelos organismos caprogênicos (Figuras 24, 27 e 28 do ANEXO B). O aumento da pressão

de H_2 nada influencia nesses dois processos. Tudo indica que, a presença de enxofre nos subprodutos da cana de açúcar pode comprometer a produção de ácido caproico a partir dessa biomassa.

Figura 18 - Produção total de biogás no final de 12 dias de incubação para o experimento em batelada.

5.3 Experimento 3: operação do reator UASB com substrato complexo (substituição)

5.3.1 Substituição de substrato

O período de operação do reator UASB alimentado com fermentado de melaço de cana não destilado (FMC) começou no dia 166 e terminou no dia 211, totalizando 45 dias de operação. A Tabela 11 apresenta um resumo das variáveis operacionais monitoradas durante todo o período de operação do reator UASB alimentado com FMC.

Tabela 11 - Resumo das variáveis operacionais durante o período de alimentação com substrato complexo (FMC).

Etapa ^d	Tempo ^a	COV ^b	Substrato ^c			DQO _{Af} ^e	DQO _{Ef.B} ^f	DQO _{Ef.D} ^g	EtOH ^h	C2 ⁱ	C4 ^j	C6 ^k
			EtOH _{FMC} ^l	EtOH ^m	C2 ⁿ							
Ia	168-182	5,0	2,1	4,8	1,6	17,1	14,3	13,7	1,6±0,4	0,23±0,1	4,9±1,0	0,5±0,2
Ib	183-192	5,0	4,1	2,8	0,9	20,1	19,0	14,7	2,3±0,9	0,55±0,2	4,9±0,9	0,4±0,2
Ic	193-210	5,0	6,9	NA	NA	17,2	16,4	15,1	1,5±0,5	0,65±0,1	4,0±0,1	0,2±0,1

Nota: ^(a) em dia; ^(b) média teórica em gDQO.L⁻¹.d⁻¹; ^(c) substratos adicionados no afluente; ^(d) Etapas de operação baseado de acordo com a COV aplicada; ^(e) média da DQO afluente em g.L⁻¹; ^(f) média da DQO efluente bruta em g.L⁻¹; ^(g) média da DQO dissolvida em g.L⁻¹; ^(h) concentração média de etanol no efluente em g.L⁻¹; ⁽ⁱ⁾ concentração média de ácido acético no efluente em g.L⁻¹; ^(j) concentração média de ácido butírico no efluente em g.L⁻¹; ^(k) concentração média de ácido caproico no efluente em g.L⁻¹; ^(l) concentração teórica de etanol do fermentado de melaço de cana em adicionado g.L⁻¹; ^(m) concentração teórica de etanol adicionado em g.L⁻¹; ⁽ⁿ⁾ concentração teórica de ácido acético adicionado em g.L⁻¹.

Durante a mudança de substrato, tentou-se manter a COV em, aproximadamente, $5,0 \text{ gDQO.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$, nem sempre possível, pois a mistura gradual do substrato complexo no substrato simples acarretou na variação da DQO afluente devido à redução gradativa de ácido acético. A Figura 19 mostra a evolução dos metabólitos encontrados durante todo o período de operação do reator UASB, incluindo o período de substituição do substrato simples pelo FMC.

Mesmo com a substituição gradativa do substrato, a concentração de ácido acético no efluente do reator UASB permaneceu constante entre a Etapa Ia (30% de FMC) e a Etapa Ib (60% e FMC), tendo pequena variação no início da Etapa Ic (100% de FMC). A concentração de etanol no efluente variou, principalmente, na Etapa Ib (Tabela 11). A produção de ácido caproico permaneceu em queda, mesmo com a mudança de substrato ao contrário da produção de ácido butírico que aumentou consideravelmente, atingindo um pico de $6,0 \text{ gC}_4.\text{L}^{-1}$, durante a Etapa Ib. Talvez, seja necessário aumentar o TDH para o processo de fermentação primária poder fornecer receptores de elétrons (C_2 e C_4) na mesma velocidade de consumo destes pelo processo de fermentação secundária.

O aumento do TDH durante o PACC pode favorecer a formação de ácido caprílico, caso haja acúmulo de ácido caproico na presença de etanol. Para evitar esse próximo alongamento de cadeia carboxílica é ideal o acoplamento de um sistema de extração seletiva para o ácido caproico. Dessa forma, haverá limitação da formação de ácido caprílico devido a limitação da presença de ácido caproico no meio líquido. Além disso, o processo de extração em linha é capaz de reduzir a carga de ácidos, favorecendo o deslocamento do equilíbrio bioquímico do PACC no sentido à formação de ácido caproico a partir do consumo de etanol remanescente e ácido butírico acumulado. Dessa forma, é possível alcançar maiores rendimentos e maiores taxas de produção volumétrica de ácido caproico em condições de pH ácido (GE et al., 2015).

Figura 19 – Monitoramento do reator caprogênico UASB alimentado com FMC: A) COV de referência; B) substratos remanescentes; C) AGV produzidos e D) produção de biogás.

Antes de iniciar a mudança de substrato do Experimento 1 para o Experimento 3, foi necessária a retirada de lodo do reator UASB para os testes em batelada realizados no Experimento 2. Após a retirada de lodo, a queda da produção de ácido caproico foi mais acentuada. Logo em seguida, houve a mudança de substrato, tornando essa queda ainda maior, indicando, assim, ser necessário esperar o sistema caprogênico entrar em estado estacionário aparente para somente depois, realizar a troca de substrato.

5.3.1 Produção de AGV e implicações

A Figura 20 ilustra o comportamento da seletividade de elétrons do PACC para formação de ácido butírico e ácido caproico durante a Etapa IV, compreendendo todo o período de operação do reator UASB após substituição de substrato simples por FMC.

Figura 20 -Seletividade da conversão de elétrons durante o PACC para formação de: ácido butírico (■), ácido caproico (■) e total de ácidos alongados (■) ao longo do período de operação do reator UASB alimentado com FMC.

A seletividade do PCAA teve uma grande variação percentual (Figura 20; Box [a]), durante o período de alimentação com FMC. Mesmo assim, a seletividade do PACC para a formação de ácido butírico manteve-se sempre maior (aproximadamente 70%) do que os valores de seletividade para a formação de ácido caproico (aproximadamente 10%). A retirada de lodo para os testes em batelada pode ter agravado a estabilização do reator UASB após substituição de substrato.

O ácido butírico é um produto intermediário para a formação de ácido caproico e pode ser produzido na fermentação anaeróbia, tanto primária, quanto secundária. O ideal é a produção de ácido butírico ser realizada durante a fermentação primária, pois evita o consumo de etanol. No entanto, para que a produção de ácido butírico seja realizada durante o processo de fermentação primária é necessário manter pressão parcial de hidrogênio elevada. A utilização de FMC forneceu uma produção de H_2 abaixo da produção de H_2 obtida quando da utilização de fermentado de amido de milho (AGLER et al., 2012; Ge et al., 2015). Isso se deve à baixa concentração de matéria orgânica complexa no FMC. Nesse caso, para aumentar a pressão parcial de hidrogênio a condições de alimentação com FMC, é necessário fazer lavagem do biogás e reinjeção deste, conforme recomendações descritas na patente de Angenent; Agler (2015).

O cumprimento das exigências operacionais para a produção de ácido caproico em bioreatores anaeróbios (controle de pH, tipo de substrato, extração em linha dentre outros) possibilita minimizar as principais limitações do processo de produção de, como: toxicidade devido a carga de ácidos, competição biológica e produção de metano.

6. CONCLUSÕES

- As condições operacionais para maximizar a produção de ácido caproico em reator de fluxo contínuo alimentado com substrato simples são: pH ácido entre 5,6 e 5,3, COV entre 3,0 e 5,0 gDQO.L⁻¹.d⁻¹, suplementação nutricional com adição mínima de cobalto e refrigeração tanto do afluente quanto do efluente.
- Atingiu-se uma concentração de ácido caproico de até 2,8 gC₆.L⁻¹ (Y_{C₆} de no máximo 1,0 gC₆.L⁻¹.d⁻¹) em reator de fluxo contínuo alimentado com substrato sintético sob pH ácido de 5,3 sem adição de inibidor seletivo para AMA.
- A inibição total da atividade metanogênica com adição de clorofórmio torna possível operar biorreatores caprogênicos a um pH ótimo (aproximadamente 7,0), e atingir uma concentração de até 35 mM de ácido caproico (aproximadamente 4,0 gC₆.L⁻¹), a partir de fermentado de melaço de cana (FMC), contendo uma concentração de etanol de 150 mM e concentração de ácido acético de aproximadamente 15 mM.
- A fermentação primária da matéria orgânica complexa presente no FMC elimina a necessidade de adicionar fonte externa de ácido acético.
- A adição de ácido acético em substrato complexo contendo etanol como o FMC, acelera a formação de ácido butírico, levando ao rápido consumo de etanol e interrompendo o PACC com acúmulo de ácido butírico.
- As condições operacionais para maximizar a produção de ácido caproico em reator de fluxo contínuo alimentado com substrato simples são: pH ácido (aproximadamente 5,3) concentração de etanol de 100 a 150 mM, aumento do tempo de detenção hidráulica e talvez possível necessidade de um sistema de extração em linha para aumentar produtividade e o rendimento do PACC no sentido à formação de ácido caproico.

7. SUGESTÕES DE CONTINUIDADE DA PESQUISA

- Realizar estudo cinético variando o pH do meio reacional e estabelecer valores de concentração de ácidos não dissociados que afeta o PACC.
- Investigar a influência dos processos de sulfetogênese para confirmar se há viabilidade em utilizar os produtos/subprodutos da cadeia produtiva da cana-de-açúcar como fonte de substrato para a produção de ácido caproico.
- Investigar alternativas mais eficientes e econômicas para inibição seletiva dos organismos consumidores de ácido acético, exceto bactérias caprogênicas.
- Implementar estudos sobre a qualidade do efluente de sistemas caprogênicos e propor alternativas para o tratamento adequado.
- Análise do ciclo de vida do processo caprogênico (simulando o esquema da Figura 01) a partir da utilização de substratos de etanol.
- Investigar o processo de extração em linha mais adequado às condições operacionais de sistemas caprogênicos e investigar se a presença dos inibidores químicos mais comuns (clorofórmio ou 2-BES) interferem no processo de extração.
- Avaliar a utilização de reator em dois estágios para produção de ácido caproico alimentado com substrato complexo.
- Realizar uma avaliação econômica em torno do processo de produção de ácido caproico quando comparado à produção de etanol.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDEL-RAHMAN, M. A.; TASHIRO, Y.; SONOMOTO, K. Recent advances in lactic acid production by microbial fermentation processes. **Biotechnology advances**, v. 31, n. 6, p. 877–902, nov. 2013.

AGLER, M. T.; GARCIA, M. L.; LEE, E. S.; SCHLICHER, M.; ANGENENT, L. T. Thermophilic anaerobic digestion to increase the net energy balance of corn grain ethanol. **Environmental science & technology**, v. 42, n. 17, p. 6723–6729, 2008.

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, 2012.

AGLER, M. T.; SPIRITO, C. M.; USACK, J. G.; WERNER, J. J.; ANGENENT, L. T. Development of a highly specific and productive process for n-caproic acid production: applying lessons from methanogenic microbiomes. **Water science and technology: a journal of the International Association on Water Pollution Research**, v. 69, n. 1, p. 62–8, jan. 2014.

AGLER, M. T.; WRENN, B. a; ZINDER, S. H.; ANGENENT, L. T. Waste to bioproduct conversion with undefined mixed cultures: the carboxylate platform. **Trends in biotechnology**, v. 29, n. 2, p. 70–8, fev. 2011.

ALIBABA (2016) Chinese e-commerce. Organic chemical bulk prices. <www.alibaba.com>. Acessado em 11 de Maio de 2016.

ALKAYA, E.; KAPTAN, S.; OZKAN, L.; ULUDAG-DEMIRER, S.; DEMIRER, G. N. Recovery of acids from anaerobic acidification broth by liquid-liquid extraction. **Chemosphere**, v. 77, n. 8, p. 1137–1142, 2009.

ALPERIN, M. J.; REEBURGH, W. S. Inhibition experiments on anaerobic methane oxidation. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 50, n. 4, p. 940–945, 1985.

ANGENENT, Largus T.; AGLER, Matthew T. **Production of carboxylates and methane from biomass waste**. U.S. Patent Application n. 14/237,611, 8 ago. 2012.

ARSLAN, D.; STEINBUSCH, K. J. J.; DIELS, L.; DE WEVER, H.; BUISMAN, C. J. N.; HAMELERS, H. V. M. Effect of hydrogen and carbon dioxide on carboxylic acids patterns in mixed culture fermentation. **Bioresource technology**, v. 118, p. 227–34, ago. 2012.

BAEYENS, J.; KANG, Q.; APPELS, L.; DEWIL, R.; LV, Y.; TAN, T. Challenges and opportunities in improving the production of bio-ethanol. **Progress in Energy and Combustion Science**, v. 47, p. 60–88, abr. 2015.

BARKER, H. A.; KAMEN, M. D.; BORNSTEIN, B. T. The synthesis of butyric and caproic acids from ethanol and acetic acid by *Clostridium Kluyveri*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 31, n. 12, p. 373–381, 1945.

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, 1942.

BORNSTEIN, B. T.; BARKER, H. A. The Nutrition of *Clostridium kluyveri*. **Journal of bacteriology**, v. 55, n. 2, p. 223–230, 1948.

BUCKEL, W.; THAUER, R.K; JUNGERMANN, K; HENNINGER, J; WENNING, H. Energy conservation via electron bifurcating ferredoxin reduction and proton/Na(+) translocating ferredoxin oxidation. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1827, n. 2, p. 94–113, fev. 2013.

CHEON, Y.; KIM, J.-S.; PARK, J.-B.; HEO, P.; LIM, J. H.; JUNG, G. Y.; SEO, J.-H.; PARK, J. H.; KOO, H. M.; CHO, K. M.; PARK, J.-B.; HA, S.-J.; KWEON, D.-H. A biosynthetic pathway for hexanoic acid production in *Kluyveromyces marxianus*. **Journal of biotechnology**, v. 182-183, p. 30–6, 20 jul. 2014.

CHIDTHAISONG, A.; CONRAD, R. Specificity of chloroform, 2-bromoethanesulfonate and fluoroacetate to inhibit methanogenesis and other anaerobic processes in anoxic rice field soil. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 32, n. 7, p. 977–988, 2000.

DEKISHIMA, Y.; LAN, E. I.; SHEN, C. R.; CHO, K. M.; LIAO, J. C. Extending carbon chain length of 1-butanol pathway for 1-hexanol synthesis from glucose by engineered *Escherichia coli*. **Journal of the American Chemical Society**, v. 133, n. 30, p. 11399–11401, 2011.

DIAS, M. O. S.; CUNHA, M. P.; JESUS, C. D. F.; ROCHA, G. J. M.; PRADELLA, J. G. C.; ROSSELL, C. E. V.; MACIEL FILHO, R.; BONOMI, A. Second generation ethanol in Brazil: Can it compete with electricity production? **Bioresource Technology**, v. 102, n. 19, p. 8964–8971, 2011.

DIAS, M. O. S.; JUNQUEIRA, T. L.; JESUS, C. D. F.; ROSSELL, C. E. V.; MACIEL FILHO, R.; BONOMI, A. Improving second generation ethanol production through optimization of first generation production process from sugarcane. **Energy**, v. 43, n. 1, p. 246–252, 2012.

DIAS, M. O. S.; MACIEL FILHO, R.; MANTELATTO, P. E.; CAVALETT, O.; ROSSELL, C. E. V.; BONOMI, A.; LEAL, M. R. L. V. Sugarcane processing for ethanol and sugar in Brazil. **Environmental Development**, v. 15, p. 35–51, 2015.

DING, H.-B.; TAN, G.-Y. A.; WANG, J.-Y. Caproate formation in mixed-culture fermentative hydrogen production. **Bioresource technology**, v. 101, n. 24, p. 9550–9, dez. 2010.

EATON, A.D. APHA/AWWA/WEF. Standard methods for the examination of water and wastewater. 21^a ed. Washington: American Public Health Association. 1082 p.

FERMOSO, F. G.; BARTACEK, J.; LENS, P. N. L. Effect of vitamin B12 pulse addition on the performance of cobalt deprived anaerobic granular sludge

bioreactors. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 14, p. 5201–5205, 2010.

FERRER, P.; CAMBRA-LÓPEZ, M.; CERISUELO, A.; PEÑARANDA, D. S.; MOSET, V. The use of agricultural substrates to improve methane yield in anaerobic co-digestion with pig slurry: effect of substrate type and inclusion level. **Waste management (New York, N.Y.)**, v. 34, n. 1, p. 196–203, jan. 2014.

FLORENCIO, L.; FIELD, J. a.; LETTINGA, G. Substrate competition between methanogens and acetogens during the degradation of methanol in UASB reactors. **Water Research**, v. 29, n. 3, p. 915–922, 1995.

GE, S.; USACK, J.; SPIRITO, C. M.; ANGENENT, L. T. Long-term n-caproic acid production from yeast-fermentation beer in an anaerobic bioreactor with continuous product extraction. **Environmental Science & Technology**, p. 150505102250009, 2015.

GLUSZCZ, P.; JAMROZ, T.; SENCIO, B.; LEDAKOWICZ, S. Equilibrium and dynamic investigations of organic acids adsorption onto ion-exchange resins. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 26, n. 3, p. 185–190, 2004.

GONZÁLEZ-CABALEIRO, R.; LEMA, J. M.; RODRÍGUEZ, J.; KLEEREBEZEM, R. Linking thermodynamics and kinetics to assess pathway reversibility in anaerobic bioprocesses. **Energy & Environmental Science**, v. 6, n. 12, p. 3780, 2013.

GROOTSCHOLTEN, T. I. M.; KINSKY DAL BORG, F.; HAMELERS, H. V. M.; BUISMAN, C. J. N. Promoting chain elongation in mixed culture acidification reactors by addition of ethanol. **Biomass and Bioenergy**, v. 48, p. 10–16, 2013a.

GROOTSCHOLTEN, T. I. M.; STEINBUSCH, K. J. J.; HAMELERS, H. V. M.; BUISMAN, C. J. N. Improving medium chain fatty acid productivity using chain elongation by reducing the hydraulic retention time in an upflow anaerobic filter. **Bioresource technology**, v. 136, p. 735–8, maio 2013b.

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. 440–5, maio 2013c.

GROOTSCHOLTEN, T. I. M.; STRIK, D. P. B. T. B.; STEINBUSCH, K. J. J.; BUISMAN, C. J. N.; HAMELERS, H. V. M. Two-stage medium chain fatty acid (MCFA) production from municipal solid waste and ethanol. **Applied Energy**, v. 116, p. 223–229, mar. 2014.

GUPTA, A.; PRAKASH, J. Sustainable bio-ethanol production from agro-residues : A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 41, n. 2015, p. 550–567, 2015.

HANSELMANN, K. W. Microbial energetics applied to waste repositories. **Experientia**, v. 47, p. 645–687, 1991.

HAO, L.; LÜ, F.; LI, L.; SHAO, L.; HE, P. Response of anaerobes to methyl fluoride, 2-bromoethanesulfonate and hydrogen during acetate degradation. **Journal of Environmental Sciences (China)**, v. 25, n. 5, p. 857–864, 2013.

HARPER, S. R.; POHLAND, F. G. Recent developments in hydrogen management during anaerobic biological wastewater treatment. **Biotechnology and bioengineering**, v. 28, p. 585–602, 1986.

HARVEY, B. G.; MEYLEMANS, H. a. 1-Hexene: a renewable C6 platform for full-performance jet and diesel fuels. **Green Chemistry**, v. 16, n. 2, p. 770, 2014.

HERRMANN, G.; JAYAMANI, E.; MAI, G.; BUCKEL, W. Energy conservation via electron-transferring flavoprotein in anaerobic bacteria. **Journal of bacteriology**, v. 190, n. 3, p. 784–91, fev. 2008.

HOLLISTER, E. B.; FORREST, A. K.; WILKINSON, H. H.; EBBOLE, D. J.; TRINGE, S. G.; MALFATTI, S. a; HOLTZAPPLE, M. T.; GENTRY, T. J. Mesophilic and

thermophilic conditions select for unique but highly parallel microbial communities to perform carboxylate platform biomass conversion. **PloS one**, v. 7, n. 6, p. e39689, jan. 2012.

HU, Y.; JING, Z.; SUDO, Y.; NIU, Q.; DU, J.; WU, J.; LI, Y.-Y. Effect of influent COD/SO₄²⁻ ratios on UASB treatment of a synthetic sulfate-containing wastewater. **Chemosphere**, v. 130, n. 2015, p. 24–33, 2015.

HWANG, M. H.; JANG, N. J.; HYUN, S. H.; KIM, I. S. Anaerobic bio-hydrogen production from ethanol fermentation: the role of pH. **Journal of biotechnology**, v. 111, n. 3, p. 297–309, 2004.

IMMERSEEL, F. Van; BUCK, J. De; BOYEN, F.; BOHEZ, L.; VOLF, J.; SEVCIK, M.; RYCHLIK, I.; HAESBROUCK, F.; DUCATELLE, R.; IMMERSEEL, F. Van; BUCK, J. De; BOYEN, F.; BOHEZ, L.; PASMANS, F.; VOLF, J.; SEVCIK, M.; RYCHLIK, I.; HAESBROUCK, F.; DUCATELLE, R. Medium-chain fatty acids decrease colonization and invasion through hilA suppression shortly after infection of chickens with *Salmonella enterica* serovar Enteritidis. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 70, n. 6, p. 3582-3587, 2004.

INFANTES, D.; GONZÁLEZ DEL CAMPO, a.; VILLASEÑOR, J.; FERNÁNDEZ, F. J. Kinetic model and study of the influence of pH, temperature and undissociated acids on acidogenic fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 66, p. 66–72, jul. 2012.

JUNGERMANN, K.; THAUER, R.K; JUNGERMANN, K; HENNINGER, J; WENNING, H.; DECKER, K. The synthesis of one-carbon units from CO₂ in *Clostridium kluyveri*. **European journal of biochemistry / FEBS**, v. 3, n. 3, p. 351–359, 1968.

KANNENGIESSER, J.; SAKAGUCHI-SÖDER, K.; MRUKWIA, T.; JAGER, J.; SCHEBEK, L. Extraction of medium chain fatty acids from organic municipal waste and subsequent production of bio-based fuels. **Waste Management**, 2015.

KENEALY, W. R.; CAO, Y.; WEIMER, P. J. Production of caproic acid by cocultures

of ruminal cellulolytic bacteria and *Clostridium kluyveri* grown on cellulose and ethanol. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 44, n. 3-4, p. 507–13, dez. 1995.

KENEALY, W. R.; WASELEFSKY, D. M. Studies on the substrate range of *Clostridium kluyveri*; the use of propanol and succinate. **Archives of Microbiology**, v. 141, p. 187–194, 1985.

KIDA, K.; SHIGEMATSU, T.; KIJIMA, J.; NUMAGUCHI, M.; MOCHINAGA, Y.; ABE, N.; MORIMURA, S. Influence of Ni^{2+} and Co^{2+} on methanogenic activity and the amounts of coenzymes involved in methanogenesis. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 91, n. 6, p. 590–595, 2001.

KIM, H.; MOON, S.; ABUG, A.; CHOI, S.-C.; ZHANG, R.; OH, Y.-S. Effect of fermentation conditions on biohydrogen production from lipid-rich food material. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 37, n. 20, p. 15062–15069, out. 2012.

KLEEREBEZEM, R.; VAN LOOSDRECHT, M. C. M. A Generalized Method for Thermodynamic State Analysis of Environmental Systems. **Critical Reviews in Environmental Science and Technology**, v. 40, n. 1, p. 1–54, 2010.

LAYEK, B.; HALDAR, M. K.; SHARMA, G.; LIPP, L.; MALLIK, S.; SINGH, J. Hexanoic Acid and Polyethylene Glycol Double Grafted Amphiphilic Chitosan for Enhanced Gene Delivery: Influence of Hydrophobic and Hydrophilic Substitution Degree. **Molecular Pharmaceutics**, v. 11, p. 982–994, 2014.

LAYEK, B.; SINGH, J. Caproic acid grafted chitosan cationic nanocomplexes for enhanced gene delivery: Effect of degree of substitution. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 447, n. 1-2, p. 182–191, 2013.

LEE, W. S.; CHUA, A. S. M.; YEOH, H. K.; NGOH, G. C. A review of the production and applications of waste-derived volatile fatty acids. **Chemical Engineering Journal**, v. 235, p. 83–99, jan. 2014.

LEITE, José Alberto Corrêa. **Produção de ácidos graxos voláteis por fermentação acidogênica em reator anaeróbio de leito fixo e extração em resina de troca iônica e com solvente orgânico**. 2005. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

LEITE, José AC et al. Application of an anaerobic packed-bed bioreactor for the production of hydrogen and organic acids. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 33, n. 2, p. 579-586, 2008.

LI, FULI et al. Coupled ferredoxin and crotonyl coenzyme A (CoA) reduction with NADH catalyzed by the butyryl-CoA dehydrogenase/Etf complex from *Clostridium kluyveri*. **Journal of bacteriology**, v. 190, n. 3, p. 843-850, 2008.

LIAMLEAM, W.; ANNACHHATRE, A. P. Electron donors for biological sulfate reduction. **Biotechnology Advances**, v. 25, n. 5, p. 452–463, 2007.

LIU, P.; JARBOE, L. R. Metabolic engineering of biocatalysts for carboxylic acids production. **Computational and structural biotechnology journal**, v. 3, n. 4, p. e201210011, jan. 2012.

LIU, S.; BISCHOFF, K. M.; LEATHERS, T. D.; QURESHI, N.; RICH, J. O.; HUGHES, S. R. Butyric acid from anaerobic fermentation of lignocellulosic biomass hydrolysates by *Clostridium tyrobutyricum* strain RPT-4213. **Bioresource technology**, v. 143, p. 322–9, set. 2013.

LIU, Y.; LI, X.; KANG, X.; YUAN, Y.; DU, M. Short chain fatty acids accumulation and microbial community succession during ultrasonic-pretreated sludge anaerobic fermentation process: Effect of alkaline adjustment. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 94, p. 128–133, out. 2014.

LJUNGDAHL, L. G. The Autotrophic Pathway of acetate synthesis in acetogenic bacteria. **Annual review of microbiology**, n. 40, p. 415–450, 1986.

LOVLEY, D. R.; DWYER, D. F.; KLUG, M. J. Kinetic analysis of competition between sulfate reducers and methanogens for hydrogen in sediments. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 43, n. 6, p. 1373–1379, 1982.

LOVLEY, D. R.; KLUG, M. J. Sulfate Reducers Can Outcompete Methanogens at Concentrations Sulfate Reducers Can Outcompete Methanogens Sulfate Concentrationst at Freshwater. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 45, n. 1, p. 187–194, 1983.

MA, F.; HANNA, M. A. Biodiesel production : a review 1. v. 70, p. 1–15, 1999.

MADIGAN, Michael T.; MARTINKO, John M.; PARKER, Jack.: Microbiologia de **Brock**: Trradução e revisão técnica Cynthia Maria Kyaw. 10^a Ed, São Paulo: Prentice Hall, 2004.

MARIANO, A. P.; DIAS, M. O. S.; JUNQUEIRA, T. L.; CUNHA, M. P.; BONOMI, A.; FILHO, R. M. Utilization of pentoses from sugarcane biomass: techno-economics of biogas vs. butanol production. **Bioresource technology**, v. 142, n. 2013, p. 390–9, ago. 2013.

MATA-ALVAREZ, J.; DOSTA, J.; ROMERO-GÜIZA, M. S.; FONOLL, X.; PECES, M.; ASTALS, S. A critical review on anaerobic co-digestion achievements between 2010 and 2013. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 36, p. 412–427, ago. 2014.

MILLER, James N.; MILLER, Jane Charlotte. **Statistics and chemometrics for analytical chemistry**. Pearson Education, 2005.

MIRON, Y.; ZEEMAN, G.; VAN LIER, J. B.; LETTINGA, G. The role of sludge retention time in the hydrolysis and acidification of lipids, carbohydrates and proteins during digestion of primary sludge in CSTR systems. **Water Research**, v. 34, n. 5, p. 1705–1713, 2000.

MOESTEDT, J.; NORDELL, E.; YEKTA, S. S.; LUNDGREN, J.; MARTÍ, M.;

SUNDBERG, C. Effects of trace element addition on process stability during anaerobic co-digestion of OFMSW and slaughterhouse waste. **WASTE MANAGEMENT**, 2015.

MORAES, L. D. S.; KRONEMBERGER, F. D. A.; FERRAZ, H. C.; HABERT, A. C. Liquid-liquid extraction of succinic acid using a hollow fiber membrane contactor. **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**, p. 6–11, fev. 2014.

MOSEY, F. E. Mathematical Modelling of the anaerobic digesiton process: regulatory mechanisms for the formation of short-chain volatile acids from glucose. **Water Science & Technology**, v. 15, p. 209–232, 1983.

MUNASINGHE, P. C.; KHANAL, S. K. Biomass-derived syngas fermentation into biofuels. **Biofuels**, v. 101, n. 13, p. 79–98, 2011.

MUYZER, G.; STAMS, A. J. M. The ecology and biotechnology of sulphate-reducing bacteria. **Nature reviews. Microbiology**, v. 6, n. 6, p. 441–54, jun. 2008.

NAGAO, K.; YANAGITA, T. Medium-chain fatty acids: functional lipids for the prevention and treatment of the metabolic syndrome. **Pharmacological research : the official journal of the Italian Pharmacological Society**, v. 61, n. 3, p. 208–12, mar. 2010.

NIE, Y.; LIU, H.; DU, G.; CHEN, J. Enhancement of acetate production by a novel coupled syntrophic acetogenesis with homoacetogenesis process. **Process Biochemistry**, v. 42, n. 4, p. 599–605, abr. 2007.

NIELSEN, C. J.; SANDO, J. J.; PRATT, W. B. Evidence that dephosphorylation inactivates glucocorticoid receptors. **Proc. Acad. Sci**, v. 74, n. April 1977, p. 1398–1402, 1977.

NUNES FERRAZ JÚNIOR, A. D.; ETCHEBEHERE, C.; ZAIAT, M. Mesophilic hydrogen production in acidogenic packed-bed reactors (apbr) using raw sugarcane

vinasse as substrate: Influence of support materials. **Anaerobe**, v. 34, n. 2015, p. 94–105, 2015.

OECD, FAO. **OECD-FAO agricultural outlook**. 2015. <http://stats.oecd.org/Index.aspx?DataSetCode=HIGH_AGLINK_2016> Acessado em Janeiro de 2016.

OH, S. T.; MARTIN, A. D. Long chain fatty acids degradation in anaerobic digester: Thermodynamic equilibrium consideration. **Process Biochemistry**, v. 45, n. 3, p. 335–345, mar. 2010.

OMIL, F.; LENS, P.; VISSER, a.; HULSHOFF POL, L. W.; LETTINGA, G. Long-term competition between sulfate reducing and methanogenic bacteria in UASB reactors treating volatile fatty acids. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 57, n. 6, p. 676–685, 1998.

PAVLOSTATHIS, S. G.; GIRALDO-GOMEZ, E. Kinetics of anaerobic treatment: a critical review. **Critical Reviews in Environmental Science and Technology**, v. 21, n. 5-6, p. 411-490, 1991.

QIANG, H.; LANG, D. L.; LI, Y. Y. High-solid mesophilic methane fermentation of food waste with an emphasis on Iron, Cobalt, and Nickel requirements. **Bioresource Technology**, v. 103, n. 1, p. 21–27, 2012.

RAMI-PUJOL, S.; GANIGU, R.; BAERAS, L.; COLPRIM, J. How can alcohol production be improved in carboxydophilic clostridia? **Process Biochemistry**, v. 50, p. 1047–1055, 2015.

RAPOSO, F.; BORJA, R.; CACHO, J. a.; MUMME, J.; ORUPÖLD, K.; ESTEVES, S.; NOGUEROL-ARIAS, J.; PICARD, S.; NIELFA, a.; SCHERER, P.; WIERINCK, I.; AYMERICH, E.; CAVINATO, C.; RODRIGUEZ, D. C.; GARCÍA-MANCHA, N.; LENS, P. N. T.; FERNÁNDEZ-CEGRÍ, V. First international comparative study of volatile fatty acids in aqueous samples by chromatographic techniques: Evaluating sources of error. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, v. 51, p. 127–143, 2013.

ROSSI, R.; PASTORELLI, G.; CANNATA, S.; CORINO, C. Recent advances in the use of fatty acids as supplements in pig diets: A review. **Animal Feed Science and Technology**, v. 162, n. 1-2, p. 1–11, nov. 2010.

SATHIYAGNANAM, A. P.; SARAVANAN, C. G.; GOPALAKRISHNAN, M. Hexanol-Ethanol Diesel Blends on DI-Diesel Engine to Study the Combustion and Emission. In: Proceedings of the World Congress on Engineering 2010 Vol II, **Anais**.2010.

SAUER, U.; SANTANGELO, J. D.; TREUNER, A.; BUCHHOLZ, M.; D??RRE, P. Sigma factor and sporulation genes in Clostridium. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 17, n. 3, p. 331–340, 1995.

SCHINK, B. Energetics of syntrophic cooperation in methanogenic degradation. **Microbiology and molecular biology reviews : MMBR**, v. 61, n. 2, p. 262–80, jun. 1997.

SCHOLTEN, J. C. M.; CONRAD, R.; STAMS, A. J. M. Effect of 2-bromo-ethane sulfonate, molybdate and chloroform on acetate consumption by methanogenic and sulfate-reducing populations in freshwater sediment. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 32, n. 1, p. 35–42, 2000.

SEEDORF, H.; FRICKE, W. F.; VEITH, B.; BRÜGGEMANN, H.; LIESEGANG, H.; STRITTMATTER, A.; MIETHKE, M.; BUCKEL, W.; HINDERBERGER, J.; LI, F.; HAGEMEIERS, C.; THAUER, R.K; JUNGGERMANN, K; HENNINGER, J; WENNING, H.; GOTTSCHALK, G. The genome of Clostridium kluyveri, a strict anaerobe with unique metabolic features. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 105, n. 6, p. 2128–2133, 2008.

SINDHU, R.; GNANSOUNOU, E.; BINOD, P.; PANDEY, A. Bioconversion of sugarcane crop residue for value added products – An overview. **Renewable Energy**, p. 1–13, 2016.

SINGHANIA, R. R.; PATEL, A. K.; CHRISTOPHE, G.; FONTANILLE, P.; LARROCHE, C. Biological upgrading of volatile fatty acids, key intermediates for the

valorization of biowaste through dark anaerobic fermentation. **Bioresource Technology**, v. 145, n. 2013, p. 166–174, 2013.

SIRIWONGRUNGSON, V.; ZENG, R. J.; ANGELIDAKI, I. Homoacetogenesis as the alternative pathway for H₂ sink during thermophilic anaerobic degradation of butyrate under suppressed methanogenesis. **Water research**, v. 41, n. 18, p. 4204–10, out. 2007.

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. 115–22, jun. 2014.

STADTMAN, E. R.; BARKER, H. A. Fatty acid synthesis by enzyme preparations of *CClostridium Kluyveri*. **The journal os biological chemistry**, v. 184, p. 769–794, 1950.

STAMS, A. Metabolic Interactions Between Anaerobic-Bacteria in Methanogenic Environments. **Antonie Van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology**, v. 66, n. 1-3, p. 271–294, 1994.

STAMS, A. J. M.; PLUGGE, C. M. Electron transfer in syntrophic communities of anaerobic bacteria and archaea. **Nature reviews. Microbiology**, v. 7, n. 8, p. 568–77, ago. 2009.

STAMS, A. J. M.; SOUSA, D. Z.; KLEEREBEZEM, R.; PLUGGE, C. M. Role of syntrophic microbial communities in high-rate methanogenic bioreactors. **Water science and technology : a journal of the International Association on Water Pollution Research**, v. 66, n. 2, p. 352–62, jan. 2012.

STEINBUSCH, K. J. J. (2010). **Liquid biofuel production from volatile fatty acids**. PhD Thesis, Wageningen University, Wageningen, the Netherlands (2010).

STEINBUSCH, K. J. J.; ARVANITI, E.; HAMELERS, H. V. M.; BUISMAN, C. J. N. Selective inhibition of methanogenesis to enhance ethanol and n-butyrate production

through acetate reduction in mixed culture fermentation. **Bioresource technology**, v. 100, n. 13, p. 3261–7, jul. 2009.

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, 2011.

STEINBUSCH, K. J. J.; HAMELERS, H. V. M.; SCHAAP, J. D.; KAMPMAN, C.; BUISMAN, C. J. N. Bioelectrochemical ethanol production through mediated acetate reduction by mixed cultures. **Environmental science & technology**, v. 44, n. 1, p. 513–7, 1 jan. 2010.

THAUER, R. K.; JUNGGERMANN, K.; HENNINGER, H.; WENNING, J.; DECKE, K. The energy metabolism of *Clostridium kluyveri*. **European J. Biochem**, v. 4, p. 173–180, 1968.

THAUER, R.K; JUNGGERMANN, K; HENNINGER, J; WENNING, H.; JUNGGERMANN, K.; DECKER, K.; PI, P. P. H.--. Energy conservation in chemotrophic anaerobic bacteria. **Bacteriological reviews**, v. 41, n. 3, p. 809, set. 1977.

THOMAS, E. Microbial growth and physiology: A call for better craftsmanship. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, n. MAR, p. 1–12, 2015.

TOMLINSON, N.; BARKER, H. A. Carbon dioxide and acetate utilization by *Clostridium kluyveri*. I. Influence of nutritional conditions on utilization patterns. **Journal of Biological Chemistry**, v. 209, p. 585–595, 1954.

TUGTAS, A. E. Fermentative Organic Acid Production and Separation. **Fen Bilimleri Dergisi**, v. 23, n. 2, p. 70–78, 2011.

VASUDEVAN, D.; RICHTER, H.; ANGENENT, L. T. Upgrading dilute ethanol from syngas fermentation to n-caproate with reactor microbiomes. **Bioresource**

technology, v. 151, p. 378–82, jan. 2014a.

VASUDEVAN, D.; RICHTER, H.; ANGENENT, L. T. Upgrading dilute ethanol from syngas fermentation to n-caproate with reactor microbiomes. **Bioresource technology**, v. 151, p. 378–82, jan. 2014b.

VAVILIN, V. A.; RYTOW, S. V.; LOKSHINA, L. Y. Modelling hydrogen partial pressure change as a result of competition between the butyric and propionic groups of acidogenic bacteria. **Bioresource Technology**, v. 54, n. 2, p. 171–177, 1995.

VERTOVA, A.; ARICCI, G.; RONDININI, S.; MIGLIO, R.; CARNELLI, L.; D'OLIMPIO, P. Electrodialytic recovery of light carboxylic acids from industrial aqueous wastes. **Journal of Applied Electrochemistry**, v. 39, n. 11, p. 2051–2059, 21 mar. 2009.

WANG, D.; XU, X.; YANG, F. Multiple factors influencing anaerobic acidogenic pretreatment in an up-flow non-woven biofilm reactor. **Chemical Engineering Journal**, v. 221, p. 37–43, abr. 2013.

WANG, J.; LIU, H.; FU, B.; XU, K.; CHEN, J. Trophic link between syntrophic acetogens and homoacetogens during the anaerobic acidogenic fermentation of sewage sludge. **Biochemical Engineering Journal**, v. 70, p. 1–8, jan. 2013.

WANG, K.; YIN, J.; SHEN, D.; LI, N. Anaerobic digestion of food waste for volatile fatty acids (VFAs) production with different types of inoculum: effect of pH. **Bioresource technology**, v. 161, p. 395–401, jun. 2014.

WANG, Y.; MU, Y.; YU, H. Comparative performance of two upflow anaerobic biohydrogen-producing reactors seeded with different sludges. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 32, n. 8, p. 1086–1094, jun. 2007.

WANG, Z.; LUO, Y.; YU, P. Recovery of organic acids from waste salt solutions derived from the manufacture of cyclohexanone by electrodialysis. **Journal of Membrane Science**, v. 280, n. 1-2, p. 134–137, 2006.

WEIMER, P. J. Production of medium-chain volatile fatty acids by mixed ruminal microorganisms is enhanced by ethanol in co-culture with *Clostridium Kluyveri*. **Bioresource technology**, v. 175, p. 97–101, 2015.

WEIMER, P. J.; NERDAHL, M.; BRANDL, D. J. Production of medium-chain volatile fatty acids by mixed ruminal microorganisms is enhanced by ethanol in co-culture with *Clostridium kluyveri*. **Bioresource Technology**, v. 175, n. 2015, p. 97–101, 2015.

YANOWITZ, J.; CHRISTENSEN, E.; MCCORMICK, R. Utilization of renewable oxygenates as gasoline blending components. **Contract**, v. 303, n. August, p. 47, 2011.

YE, R.; JIN, Q.; BOHANNAN, B.; KELLER, J. K.; BRIDGHAM, S. D. Homoacetogenesis: A potentially underappreciated carbon pathway in peatlands. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 68, p. 385–391, jan. 2014.

YU, HAN-QING; MU, YANG. Biological hydrogen production in a UASB reactor with granules. I: Physicochemical characteristics of hydrogen-producing granules. **Biotechnology and bioengineering**, v. 94, n. 5, p. 980-987, 2006.

ZHANG, F.; DING, J.; ZHANG, Y.; CHEN, M.; DING, Z.-W.; VAN LOOSDRECHT, M. C. M.; ZENG, R. J. Fatty acids production from hydrogen and carbon dioxide by mixed culture in the membrane biofilm reactor. **Water research**, v. 47, n. 16, p. 6122–9, 15 out. 2013.

ZINDER, S. H.; ANGUISH, T.; CARDWELL, s c. Selective Inhibition by 2-Bromoethanesulfonate of Methanogenesis from Acetate in a Thermophilic Anaerobic Digester. **Applied and environmental microbiology**, v. 47, n. 6, p. 1343–1345, 1984.

9. ANEXOS

9.1 ANEXO- A

DESCRIÇÃO EXPERIMENTAL DO TESTE EM BATELADA PARA SELEÇÃO DE INÓCULO:

Produção de ácido caproico por culturas mistas em lodos distintos:

O primeiro teste de batelada foi conduzido em frascos Scott de 250 ml, com volume útil de 100 ml. Dois diferentes inóculos foram testados: lodo floculento retirado de um reator UASB tratando de águas residuárias doméstica (LDM) ($55,0 \text{ gVS.L}^{-1}$), lodo granular retirado de um reator UASB tratando efluente de indústria cervejeira (LGR) ($26,0 \text{ gSV.L}^{-1}$). Cada frasco continha 10,0 g de lodo, meio nutricional, etanol e ácido acético como substratos nas seguintes relações molares (EtOH:C₂): 400 mM:100 mM, 200 mM: 50 mM e 100 mM: 25 mM. O meio foi mantido em condições anaeróbias *com* expurga de nitrogênio por 1 minuto. Os testes foram conduzidos em condições de pH ácido (5,3) e em pH neutro (7,0). Todos os testes foram realizados em triplicata, além da adição de um frasco de controle, ou seja, sem adição de substrato. Os resultados dessa etapa não serão discutidos nessa pesquisa, uma vez que, esse experimento foi de responsabilidade de terceiros.

A Figura 21 representa a totalidade de AGV atingida com a variação da concentração de substrato na utilização de dos dois lodos para produção de ácido caproico.

Figura 21 – Resultados da produção de AGV nos dois lodos e nas três variações da concentração de substrato.

A Figura 22 apresenta o percentual de AGV produzidos durante todo o período de incubação desse experimento.

Figura 22 - Percentual de ácido acético (C2), ácido butírico (C4) e ácido caproico (C6) nos dois lodos e nas três variações da concentração de substrato.

9.2 ANEXO- B

DESCRIÇÃO EXPERIMENTAL DO PROCESSO DE FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA PARA OBTENÇÃO DO SUBSTRATO COMPLEXO PARA ALIMENTAÇÃO DOS TESTES EM BATELADA:

9.2.1 Preparo do fermentado de melaço

A fermentação alcoólica do melaço foi preparada em reator de mistura completa (STR - *Stirred Tank Reactor*) com volume total de 5,0 L. Foi necessário diluir o melaço bruto (Melaço comparado na empresa Melaço do Brasil) para uma concentração de açúcares (sacarose) de aproximadamente 200 g sacarose.L⁻¹ de modo a ser possível produzir um caldo fermentado com 6,0 a 9,0 % de etanol. O reator STR foi preenchido com volume de 2,0 L de melaço diluído e o pH foi corrigido para 5,5 com ácido clorídrico (0,2 N). A temperatura reacional variou entre 30 e 35 °C com concentração de inóculo de 5,0% a 7,0% de levedura comercial, *Saccharomyces cerevisiae*. O período de fermentação foi estipulado em ciclos de 6,0 h e de 24,0 h. Após fermentação, foi retirado apenas o sobrenadante como sendo o FMC, o qual foi armazenado a 4,0 °C para alimentação do sistema caprogênico.

9.2.2 Fermentação alcoólica do melaço

A Figura 23 mostra os resultados da fermentação alcoólica do melaço de cana-de-açúcar usando-se 5% (A) e 7% (B) (m/v) de leveduras para inocular os frascos de reação. Comparando-se os resultados, a fermentação alcoólica do melaço diluído com concentração de açúcar de 250 g.L⁻¹ foi mais eficiente quando utilizou-se 7% (m/v) de leveduras. Nesta condição, houve maior consumo de açúcar e, consequentemente, maior produção de etanol. No entanto, o rendimento global da produção de etanol foi baixo, em média 77%.

Figura 23 - Fermentação alcoólica do melaço de cana-de-açúcar variando a concentração de levedura 5,0% (A) e 7,0% (B) em seis horas com concentrações de sacarose de 250 g.L⁻¹ e em vinte e quatro horas com concentração de sacarose de 200 g.L⁻¹ (C).

Na Figura 23C, estão apresentadas as diferenças da produção de etanol com inóculo de 5,0% e 7,0% utilizando uma concentração de açúcar de 200 g.L⁻¹, com tempo de fermentação de 24 h. Mais uma vez, o melhor rendimento foi atingido com inóculo de 7,0%. Nessa condição, o rendimento da produção de etanol chegou a 82%, fornecendo um fermentado com uma concentração de etanol de, aproximadamente, 70 g.L⁻¹.

9.3 ANEXO C

BASE DE CÁLCULOS TERMODINÂMICOS: PRINCIPAIS REAÇÕES ENVOLVIDAS NO PROCESSO CAPROGÊNICO EM CULTURA MISTA

As tabelas 12, 13, 14 e 15 contêm valores teóricos dos cálculos termodinâmicos para as reações envolvidas no PACC. Para atingir estes valores foi necessário seguir recomendações da literatura (HANSELMANN, 1991; KLEEREBEZEM; VAN LOOSDRECHT, 2010; SPIRITO et al., 2014; ANGENENT, LARGUS T; AGLER, 2015; GE et al., 2015).

Em condições normais, a variação da energia livre de Gibbs (ΔG_R) de uma reação química descreve o grau de entalpia (ΔH) e o grau de entropia e da reação (ΔS) (Equação 13):

$$\Delta G_R^0 = \Delta H_R - T \times \Delta S \dots\dots\dots \text{Eq.13}$$

O padrão de alteração de energia livre de Gibbs (ΔG^0) de uma reação arbitrária pode ser calculado a partir dos valores de (G_f^0) dos compostos que participam na reação e o coeficiente estequiométrico (Φ_x) que acompanha esse composto. Este cálculo se aplica considerando a reação em equilíbrio (Equação 14).

$$\Delta G_R^0 = \sum_{i=1}^n \Phi_i \times G_{f_i}^0 \dots\dots\dots \text{Eq.14}$$

A variação de energia livre ΔG_R^1 e ΔG_R^2 em $\text{kJ} \cdot (\text{mol H}^+)^{-1}$ foi calculada sob condições padrão de temperatura e pressão, considerando a quantidade de prótons para as duas condições de pH. O cálculo de ΔG_R^1 foi estabelecido para condições de pH 7,0 (10^{-7}) (Equação 15), enquanto o cálculo de ΔG_R^2 foi estabelecido para condições de pH 5,3 ($10^{-5,3}$) (Equação 16).

$$\Delta G_R^1 = \Delta G_R^0 + R \times T \times \Phi_{H^+} \times \ln[1 \times 10^{-7}] \dots\dots\dots \text{Eq.15}$$

$$\Delta G_R^2 = \Delta G_R^0 + R \times T \times \Phi_{H^+} \times \ln[1 \times 10^{-5,3}] \dots\dots\dots \text{Eq.16}$$

Onde:

R: constante dos gases de $8,314 \text{ J.mol}^{-1}$ ou $0,082 \text{ Atm.mol}^{-1}$;

T: Temperatura de 25°C convertida em Kelvin ($298,15 \text{ K}$).

A variação da energia livre ΔG_R^3 em $\text{kJ} \cdot (\text{mol H}^+)^{-1}$ foi calculado em função do efeito da pressão parcial de hidrogênio) para as reações que envolvem o consumo de H_2 e para aquelas que envolvem a produção de H_2 durante o PACC em cultura mista. As equações 17.1 e 17.2 foram montadas seguindo o modelo genérico que acompanha cada equação de ΔG_R^3 :

Para a reação de consumo de H_2 :

$$\Delta G_R^3 = \Delta G_R^1 + R \times T \times \ln \left[\frac{(B_3)^{\Phi_3} \times (B_4)^{\Phi_4}}{p(H_2)^{\Phi_{H_2}} \times (A_1)^{\Phi_1} \times (A_2)^{\Phi_2}} \right] \dots\dots\dots \text{Eq.17.1}$$

Para reação de produção de H_2 :

$$\Delta G_R^3 = \Delta G_R^1 + R \times T \times \ln \left[\frac{p(H_2)^{\Phi_{H_2}} \times (B_3)^{\Phi_3} \times (B_4)^{\Phi_4}}{(A_1)^{\Phi_1} \times (A_2)^{\Phi_2}} \right] \dots\dots\dots \text{Eq.17.2}$$

Tabela 12 – Cálculo da viação de ΔG das reações envolvendo no PACC: etanol como doador de elétrons.

Etanol como doador de elétrons										
	G ^o _f KJ/m ol		R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7	
		Substrat OS	S _{EtO} H	S _{EtOH +} HAc	S _{2EtOH+H} ac	S _{4EtOH+H} ac	S _{EtOH+H} Bu	S _{2EtOH+H} bu	S _{4EtOH+H} bu	
		(1)x[mol _{substrato}] (-1)x[mol _{produto}]	Valores de ϕ _x							
H+	0		1			0.67		0.33	1	
H ₂	0		2			1.33		0.67	2	
H ₂ O	237.2		-1	1	2	2.67	1	1.33	2	
Etanol	181.8		-1	-1	-2	-4.00	-1	-2.00	-4	
Acetato	369.4		1	-1	-1	-1.00				
Butirato	352.6				1			-1	-1.00	-1
Caproat o	-336					1	1.67	1	1.33	2
ΔG ^o			49.6 0	-38.60	-77.40	-95.93	-38.80	-48.07	-66.60	
Sob pH 7,0.		ΔG ¹	10.2 2	-38.60	-77.40	-122.19	-38.80	-61.19	-105.98	
Sob pH 5,3.		ΔG ²	19.3 5	-38.60	-77.40	-116.10	-38.80	-58.15	-96.85	
PH2) 1,0 bar		ΔG ³	14.1 7			-148.39		-74.37	-128.06	

A Figura 24 ilustra o comportamento da variação de ΔG_R^0 para as diversas reações que utilizam etanol como doador de elétrons durante o PACC em cultura mista.

Figura 24 - Diagrama da preferência termodinâmica para o PACC em cultura mista: etanol como doador de elétrons.

Onde:

R1: oxidação de etanol a ácido acético;

R2: produção de C4 na relação molar 1mol de EtOH para 1 mol de C2.

R3: produção de C6 na relação molar 2mol de EtOH para 1 mol de C2.

R4: produção de C6 na relação molar 4mol de EtOH para 1 mol de C2.

R5: produção de C6 na relação molar 1mol de EtOH para 1 mol de C4.

R6: produção de C6 na relação molar 2mol de EtOH para 1 mol de C2

R7: produção de C6 na relação molar 4mol de EtOH para 1 mol de C2

Tabela 13 - Cálculo da variação de ΔG das reações envolvendo no PACC: hidrogênio como doador de elétrons.

H ₂ como doador de elétrons					
Estrutura	ΔG°_f KJ/mol		R8	R9	R10
		Substratos	S ₂ H ₂ +HAc + HBu	S ₄ H ₂ + 3 HAc	S ₆ H ₂ + HBu
			Valores de ϕ_x		
H+	0	(1)x[mol _{substrato}] (-1)x[mol _{produto}]	-1	-2	
H ₂	0		-2	-4	-6
CO ₂ (g)	-394.4				-2
H ₂ O	-237.2		2	4	4
Acetato	-369.4		-1	-3	
Butirato	-352.6		-1		-1
Caproato	-336		1	1	1
ΔG°			-88.40	-176.60	-143.40
Sob pH 7,0.		$\Delta G'$	-49.02	-97.83	-143.40
Sob pH 5,3.		$\Delta G''$	-58.15	-116.10	-143.40
PH2) 1,0 bar		$\Delta G'''$	-61.71	-123.02	-171.64

A Figura 25 ilustra o comportamento de interação e preferência de rota metabólica para a utilização de H₂ como doador de elétrons durante o PACC.

Onde:

R8: produção de C6 na relação molar de 2 mol de H₂ para 1 mol de C2 para 1mol de C4.

R9: produção de C6 na relação molar de 4 mol de H₂ para 3 mol de C2 para.

R10: produção de C6 na relação molar de 6 mol de H₂ para 1 mol de C4 para

Figura 25 - Diagrama da preferência termodinâmica para o PACC em cultura mista: hidrogênio como doador de elétrons

Tabela 14 - Cálculo da variação de ΔG das reações envolvendo no PACC: glicose como fornecedor de substratos

Glicose como fonte de matéria orgânica complexa							
Estrutura	ΔG°_f		R11	R12	R13	R14	R15
	KJ/mol	Substratos	S _{glicose}	S _{Glicose + 2H2O}	S _{glicose}	S _{Glicose + H2O}	S _{2Glicose}
		(1)x[mol _{substrato}] (-1)x[mol _{produto}]	Valores de ϕ_x				
H+	0		2111				
H ₂	0		4222				
H ₂ O	-237.2		-2-1				
CO ₂ (g)	-394.4		2	2	2	2	4
Etanol	-181.8		2			1	2
Acetato	-369.4			2		1	
Butirato	-352.6				1		1
Glicose	-919.8		-1	-1	-1	-1	-2
ΔG°			-232.60	-133.40	-221.60	-183.00	-454.20
Sob pH 7,0.		$\Delta G'$	-232.60	-212.17	-260.98	-222.38	-493.58
Sob pH 5,3.		$\Delta G''$	-232.60	-193.90	-251.85	-213.25	-484.45
PH2) 1,0 bar		$\Delta G'''$		-181.77	-232.01	-195.32	-453.19

A Figura 26 ilustra o comportamento de interação e preferência de rota metabólica para a formação de substratos para o PACC, a partir de glicose.

Onde:

R11: produção de EtOH a partir de glicose.

R12: produção de C₂ e H₂ a partir de glicose.

R13: produção de C₄ e H₂ a partir de glicose.

R14: produção de EtOH; C₂ e H₂ a partir de glicose.

R15: produção de EtOH, C₄ e H₂ a partir de glicose.

Figura 26 - Diagrama da preferência termodinâmica para o PACC em cultura mista: formação de substratos.

Tabela 15 - Cálculo da variação de ΔG das reações envolvendo no PACC: competição por substratos.

Limitantes e Competição em cultura mista								
Estrutura a	ΔG°_f		R16	R17	R18	R19	R20	R21
	KJ/mol	Substrato	S _{HAC} ; X _{BM}	S _{H2+CO2} ; X _{BM}	S _{H2+CO2} ; homoacetogênicas	S _{H2} ; X _{BRS}	S _{HAC} ; X _{BRS}	S _{EtOH} ; X _{BRS}
		(1)x[mol _{substrato}]; (-1)x[mol _{produto}]	Valores de ϕ_x					
H+	0		-1		-1	-2	-3	
H ₂	0			-4	-4	-4		
H ₂ O	-237.2			2	4	4	2	2
CO ₂ (g)	-394.4		1	-1			2	
HCO ₃ ⁻	-586.9				-2			
SO ₄ ²⁻	-744.6					-1	-1	-1
H ₂ S	-33.56					1	1	1
CH ₄	-50.7		1	1				
Etanol	-181.8							
Acetato	-369.4		-1		1		-1	2
ΔG°			-75.70	-130.70	-144.40	237.76	182.76	-138.56
Sob pH 7,0.		$\Delta G'$ $\Delta G''$ $\Delta G'''$	-36.32	-130.70	-105.02	158.99	-64.61	-138.56
Sob pH 5,3.			-45.45	-130.70	-114.15	177.26	-92.01	-138.56
PH2) 1,0 bar				-140.09	-122.07	168.24		

A Figura 27 ilustra o comportamento de interação dos processos de competição e limitação do PACC.

Onde:

R16: consumo de C2 pelas BM acetoclásticas.

R17: consumo de H₂ pelas BM hidrogenotróficas.

R18: consumo de H₂ pelas bactérias acidogênicas (BA) homoacetogênicas.

R19: consumo de H₂ pelas BRS.

R20: consumo de C2 pelas BRS.

R21: consumo de EtOH pelas BRS.

Figura 27 – Diagrama da preferência termodinâmica para o PACC em cultura mista: competição por substratos.

A Figura 28 representa as reações de interação entre os organismos anaeróbios durante os diversos processos de fermentação secundária em cultura mista.

Figura 28 - Representação das interações termodinâmicas de dependência entre a pressão parcial de H_2 e as diversas reações de fermentação secundária associadas à produção de ácido caproico em cultura mista anaeróbia: (A) oxidação de ácido propanoico a ácido acético; (B) oxidação de ácido butírico a ácido acético; (C) oxidação de etanol a ácido acético; (D) metanogênese acetoclástica; (E) oxidação de ácido acético pelas BRS; (F) processo caprogênico que usa etanol como doador de elétrons; (G) processo caprogênico que utiliza H_2 como doador de elétrons; (H) metanogênese hidrogenotrófica; (I) processo caprogênico que utiliza H_2 como doador de elétron; (J) oxidação de H_2 pelas BRS.