



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE TECNOLOGIA E GEOCIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA CIVIL E AMBIENTAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA CIVIL

DEVSON PAULO PALMA GOMES

**DESAFIOS E POTENCIALIDADES DO USO DE DIFERENTES INÓCULOS PARA
PRODUÇÃO BIOLÓGICA DE ÁCIDO CAPRÓICO**

Recife
2023

DEVSON PAULO PALMA GOMES

**DESAFIOS E POTENCIALIDADES DO USO DE DIFERENTES INÓCULOS PARA
PRODUÇÃO BIOLÓGICA DE ÁCIDO CAPRÓICO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Engenharia Civil da Universidade Federal de
Pernambuco, como requisito parcial para obtenção
do título de doutor em Engenharia Civil.
Área de concentração: Tecnologia Ambiental e
Recursos Hídricos.

Orientadora: Profa. Dra. Sávia Gavazza dos Santos Pessôa.

Coorientadora: Profa. Dra. Simone Machado Santos.

Orientador Externo: Prof. Dr. Germán Buitrón Méndez.

Recife

2023

Catálogo na fonte
Bibliotecária Margareth Malta, CRB-4 / 1198

G633d	Gomes, Devson Paulo Palma. Desafios e potencialidades do uso de diferentes inóculos para produção biológica de ácido capróico / Devson Paulo Palma Gomes. – 2023. 99 f.: il., fig., tab. e siglas. Orientador: Prof.^a Dr.^a Sália Gavazza dos Santos Pessôa. Coorientadora: Prof.^a Dr.^a Simone Machado Santos. Orientador Externo: Prof. Dr. Germán Builtrón Méndez. Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. CTG. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Civil, 2023. Inclui referências. 1. Engenharia Civil. 2. Ácidos carboxílicos de cadeia média. 3. Ácido capróico. 4. Culturas mistas. 5. Biologia molecular. 6. Processo biológico I. Pessôa, Sália Gavazza dos Santos (Orientador). II. Santos, Simone Machado (Coorientadora). III. Méndez, Germán Builtrón (Orientador Externo). IV. Título. UFPE 624 CDD (22. ed.) BCTG/2023-210
-------	--

DEVSON PAULO PALMA GOMES

**DESAFIOS E POTENCIALIDADES DO USO DE DIFERENTES INÓCULOS PARA
PRODUÇÃO BIOLÓGICA DE ÁCIDO CAPRÓICO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Engenharia Civil da Universidade Federal de
Pernambuco, Centro de Tecnologia e Geociências
como requisito parcial para obtenção do título de
doutor em Engenharia Civil.

Área de concentração: Tecnologia Ambiental e
Recursos Hídricos.

Aprovada em: 25/08/2023

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Sávia Gavazza dos Santos Pessôa

Coorientadora: Prof.^a Dr.^a Simone Machado Santos

Orientador Externo: Prof. Dr. Germán Builtrón Méndez

BANCA EXAMINADORA

participação por videoconferência

Prof. Dr. Fabrício Motteran (examinador interno)

Universidade Federal de Pernambuco

participação por videoconferência

Prof. Dr. Renato Carrhá Leitão (examinador externo)

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

participação por videoconferência

Prof.^a Dr.^a Norma Cândida dos Santos Amorim (examinadora externa)

Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Alagoas

participação por videoconferência

Dr.^a Shyrlane Torres Soares Veras (examinadora externa)

Aegea Saneamento

participação por videoconferência

Prof.^a Dr.^a Bruna Soares Fernandes (examinadora interna)

Universidade Federal de Pernambuco

Dedico este trabalho com amor aos meus avós, pais, irmãs e amigos.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente ao Grande Arquiteto do Universo, nas suas mais variadas formas, pela graça da vida e força para superar os obstáculos;

A minha orientadora, Sávia Gavazza, pela referência como profissional e ser humano, e por toda atenção e carinho nos momentos de dúvida, obrigado de coração;

A minha coorientadora, Simone Machado Santos, pela confiança e oportunidade desde os primeiros passos em Caruaru;

Ao meu coorientador, German Buitrón, por todo acolhimento e conhecimento compartilhado no período no México;

Aos órgãos de fomento CAPES, Propesq e CNPq, pelo apoio financeiro para participação em eventos e desenvolvimento dos experimentos.

Aos meus avós, Napoleão e Enedyr, pelo amor desde a infância e por serem exemplos de honestidade e perseverança ao longo da minha vida;

Aos meus pais, Ana Paula e Paulo Roberto, por serem alicerces em todas as minhas decisões e motivo de orgulho em todos os sentidos para mim;

A minha irmã, Ayanna Sophia, por todas as alegrias desde o seu primeiro sorriso;

Aos professores do LSA, Mário Kato, Lourdinha Florêncio, Bruna Fernandes, Fabrício Motteran, Wanderli Leite e Bruna Magnus por serem fundamentais no meu crescimento profissional ao longo da jornada;

Aos meus grandes amigos e técnicos, Danúbia, Iago e Ronaldo, por toda paciência, afeto e ajuda no desenvolvimento dos experimentos;

A aluna de iniciação científica e amiga, Thaise, pela ajuda, dedicação e responsabilidade durante os experimentos;

Aos amigos do laboratório, Norma, Sayonara, Shyrlane, Ana Carolina, Marcus, Marcos, Júlia, José Roberto, Antônio, Joelithon, Natanna, Agnes, Manu, Malu, Fernanda, Celinha, Alynne, Oucilane, Marília, Edilberto, Lucas, Henrique, Jocimar, Alfredo, companheiros de boas risadas e dificuldades ao longo do Doutorado;

Por fim, aos funcionários terceirizados, por todo suporte e cuidado para o funcionamento dos laboratórios.

RESUMO

O processo de alongamento da cadeia de carbono surge como uma oportunidade para produção biológica de produtos com alto valor agregado, como os ácidos carboxílicos de cadeia média (ACCM's). Entre os ACCM's, o ácido capróico, apresenta diversas aplicações no mercado como, antimicrobianos (indústria farmacêutica), aditivos (ração animal) e produtos químicos (produção de flavorizantes, biocombustíveis e bioplásticos). A produção biológica de ácido capróico, em maiores escalas (piloto e industrial), ainda apresenta diversos desafios, tais como: complexa estrutura dos microbiomas, presença de vias metabólicas competitivas, toxicidade dos ácidos nas formas não-dissociadas, além da viabilidade das técnicas de extração do meio. Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi avaliar o processo de alongamento da cadeia visando à produção de ácido capróico, por meio da utilização de diferentes inóculos (fluido ruminal, lodo granular anaeróbio e manipueira), separadamente ou em consórcio, a partir de dois experimentos com três bateladas (B-I, B-II e B-III) cada. Para tanto, reatores em diferentes escalas (reatores de 0,6 L – Artigo 1 e reator anaeróbio de 7 L – Artigo 2) foram empregados, fazendo-se uso de ácido acético e etanol como substratos. As maiores concentrações de ácido capróico no Artigo 1 foram obtidas na B-III, de acordo com os seguintes inóculos: 10,1 g.L⁻¹ para o lodo granular anaeróbio, 9,6 g.L⁻¹ para a manipueira e 9,1 g.L⁻¹ para o fluido ruminal. As análises microbianas revelaram uma maior dominância do filo *Firmicutes* e do gênero *Clostridium sensu stricto* 12 nos reatores, justificando assim, a elevada geração de ácido capróico. No Artigo 2, com a utilização de um reator anaeróbio de 7 L e inóculo misto (lodo granular anaeróbio e manipueira), atingiram-se as seguintes produções de ácido capróico: 7,5 g.L⁻¹ ao final da B-II e após o seu ajuste de pH, 7,8 g.L⁻¹. As análises microbianas indicaram o predomínio de microrganismos alongadores de cadeia, como *Caproiciproducens*, *C. sensu stricto* 12, *Enterococcus* e *Rummeliibacillus* nas duas primeiras bateladas. Dessa forma, o presente trabalho demonstrou que o aumento da escala e o uso de diferentes inóculos em condições adequadas (ex: uso de inibidores, pH inicial neutro etc.) nos reatores, favoreceram ao processo de produção biológica de ácido capróico.

Palavras-chave: ácidos carboxílicos de cadeia média; ácido capróico; culturas mistas; biologia molecular; processo biológico.

ABSTRACT

The carbon chain elongation process appears as an opportunity for the biological production of products with high added value, such as medium chain carboxylic acids (MCCAs). Among MCCAs, caproic acid has several applications in the market, such as antimicrobials (pharmaceutical industry), additives (animal feed), and chemical products (production of flavorings, biofuels, and bioplastics). The biological production of caproic acid, on larger scales (pilot and industrial), still presents different challenges, such as: the complex structure of microbiomes, the presence of competitive metabolic pathways, the toxicity of the undissociated acids, in addition to the viability of in-line extraction techniques. Thus, the objective of this work was to evaluate the chain elongation process aiming at the production of caproic acid, through the use of different inoculums (ruminal fluid, anaerobic granular sludge, and cassava wastewater), separately or in the consortium, from two experiments with three batches (B-I, B-II, and B-III) each. For that purpose, reactors in different scales (0.610 L reactors – Article 1 and 7 L anaerobic reactor – Article 2) were employed, using acetic acid and ethanol as substrates. The highest concentrations of caproic acid in article 1 were accepted in B-III, according to the following inocula: 10.1 g.L⁻¹ for anaerobic granular sludge, 9.6 g.L⁻¹ for cassava wastewater and 9.1 g.L⁻¹ for ruminal fluid. Microbial analyses revealed a greater dominance of the phylum *Firmicutes* and the genus *Clostridium sensu stricto 12* in the reactors, thus justifying the high generation of caproic acid. In article 2, using an anaerobic reactor with 7 L and mixed inoculum (anaerobic granular sludge and cassava wastewater), the following maximum productions of caproic acid were achieved: 7.0 g.L⁻¹ at the end of B-II and after its pH adjustment, 7.8 g.L⁻¹. Microbial analyses indicated the dominance of MCCA-producing microorganisms, such as *Caproiciproducens*, *C. sensu stricto 12*, *Enterococcus*, and *Rummeliibacillus* in the first two batches. Thus, the present work demonstrated that the increase in scale and the use of different inoculums under adequate conditions (e.g.: use of inhibitors, initial neutral pH, etc.) in the reactors, favored the process of biological production of caproic acid.

Keywords: medium chain carboxylic acids; caproic acid; mixed cultures; molecular biology; biological process.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

TESE

Figura 1 - Esquema das reações envolvidas na plataforma dos ácidos carboxílicos	19
Figura 2 - Via β -oxidação reversa para produção de ácido caprótico	23
Figura 3 - Via biossíntese de ácidos graxos para produção de ácido caprótico	24
Figura 4 - Representação esquemática dos experimentos realizados no presente estudo	49
Quadro 1 - Principais ACCM's e seus usos.....	46

ARTIGO 1 - PERCEPÇÕES SOBRE O ALONGAMENTO DA CADEIA DE CARBONO, COMUNIDADE MICROBIANA E VIABILIDADE PARA PRODUÇÃO DE ÁCIDO CAPRÓICO A PARTIR DE DIFERENTES INÓCULOS

Figura 1 - Representação esquemática dos reatores nas três bateladas (B-I, B-II e B-III)	55
Figura 2 - Produção de metabólitos em função do tempo para os diferentes inóculos. (a) fluido ruminal; (b) lodo granular anaeróbico; (c) manipueira. (—♦—) etanol; (—■—) ácido acético; (—▲—) ácido butírico; (—□—) ácido caprótico.....	58
Figura 3 - Variação do pH nos três inóculos durante o experimento. (—▲—) Fluido ruminal; (—♦—) Lodo granular anaeróbico; (—■—) Manipueira.....	60
Figura 4 - Classificação taxonômica da comunidade microbiana: as abundâncias relativas em filo (a) e gênero (b) nos três inóculos. FRU – Fluido Ruminal, MAN – Manipueira, LGA – Lodo Granular Anaeróbico	64
Figura 5 - Índice de diversidade de Shannon para filo (a) e gênero (b) nos três inóculos. (—▲—) Fluido ruminal; (—♦—) Lodo granular anaeróbico; (—■—) Manipueira	66
Figura 6 - Esquema do inóculo utilizado e funcionamento do reator anaeróbico	73

ARTIGO 2 - MANIPUEIRA E LODO GRANULAR ANAERÓBIO COMO INÓCULO MISTO PARA PRODUÇÃO DE ÁCIDO CAPRÓICO

Figura 1 - Produção de metabólitos em função do tempo para os diferentes inóculos. (●) etanol; (■) ácido acético; (▲) ácido butírico; (◻) ácido capróico; (✱) pressão parcial de hidrogênio	76
Figura 2 - Variação do pH(◆) e potencial redox (●) nas três bateladas durante o experimento.....	77
Figura 3 - Classificação taxonômica da comunidade microbiana: as abundâncias relativas em (a) filo e (b) níveis de gênero para o inóculo e as três bateladas (B-I,B-II e B-III), incluindo após os ajustes de pH em B-II e B-III.	81
Figura 4 - Microrganismos envolvidos nas três bateladas e possíveis rotas metabólicas	83
Figura 5 - Índice de diversidade de Shanon para filo(●) e gênero(▲) ao longo das três bateladas a ajustes de pH.* ajustes de pH.....	84

LISTA DE TABELAS

TESE

Tabela 1 - Características dos principais microrganismos alongadores da cadeia de carbono	36
Tabela 2 - Resumo de estudos que avaliaram a produção de ácido capróico com substratos sintéticos.....	41
Tabela 3 - Resumo de estudos que avaliaram a produção de ácido capróico com substratos reais	45

ARTIGO 1 - PERCEPÇÕES SOBRE O ALONGAMENTO DA CADEIA DE CARBONO, COMUNIDADE MICROBIANA E VIABILIDADE PARA PRODUÇÃO DE ÁCIDO CAPRÓICO A PARTIR DE DIFERENTES INÓCULOS

Tabela 1 - Estudos referentes à produção de ácido capróico com diferentes microrganismos	53
Tabela 2 - Caracterização dos inóculos utilizados no experimento	54
Tabela 3 - Parâmetros cinéticos da produção de ácido capróico durante o alongamento da cadeia	63
Tabela 4- Índice de dominância para filo e gênero nos três inóculos	67

ARTIGO 2 - MANIPUEIRA E LODO GRANULAR ANAERÓBIO COMO INÓCULO MISTO PARA PRODUÇÃO DE ÁCIDO CAPRÓICO

Tabela 1 - Caracterização do inóculo misto utilizado no experimento.....	73
Tabela 2 - Parâmetros cinéticos da produção para alongamento da cadeia no reator anaeróbio	80
Tabela 3 - Índice de dominância para filo e gênero ao longo das três bateladas e ajustes de pH	84

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

λ	Duração da fase lag
ΔG^0	Variação da energia livre de Gibbs
ACCC	Ácido carboxílico de cadeia curta
ACCM	Ácido carboxílico de cadeia média
ATP	Trifosfato de adenosina
BOS	Bactérias oxidantes de enxofre
BRS	Bactérias redutoras de sulfato
CoA	Coenzima A
DQO	Demanda química de oxigênio
EGSB	Reator anaeróbio de leito granular expandido
ETE	Estação de tratamento de efluentes
EtOH	Etanol
FAB	Biossíntese de ácidos graxos
FAD e FADH ₂	Dinucleótido de Adenina Flavina
FORSU	Fração orgânica dos resíduos sólidos urbanos
HAc	Ácido acético
HBu	Ácido butírico
HCa	Ácido capróico
NAD e NADH	Nicotinamida-Adenina-Dinucleotídio
P	Potencial máximo de produção de ácido capróico
pH	Potencial hidrogeniônico
R ²	Coeficiente de regressão linear
RBO	β -oxidação reversa
Rm	Taxa máxima de produção de ácido capróico
SF	Sólidos fixos
ST	Sólidos totais
SV	Sólidos voláteis
TDH	Tempo de detenção hidráulica
UASB	Reator anaeróbio de fluxo ascendente e manta de lodo
2-BES	Ácido 2-bromoetanosulfônico.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	14
2	OBJETIVOS	17
2.1	OBJETIVO GERAL	17
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	17
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	18
3.1	PLATAFORMA CARBOXILATO OU DOS ÁCIDOS CARBOXÍLICOS	18
3.2	VIAS BIOQUÍMICAS DO ALONGAMENTO DA CADEIA DE CARBONO	22
3.3	PARÂMETROS OU CONDIÇÕES OPERACIONAIS QUE INFLUENCIAM A GERAÇÃO DE ACCM`S	25
3.3.1	Temperatura.....	25
3.3.2	pH.....	26
3.3.3	Uso de aditivos e inibidores	28
3.3.3.1	Extrato de levedura	29
3.3.3.2	Íons metálicos	29
3.3.3.3	Materiais de carbono (biochar e carvão ativado)	29
3.3.3.4	Inibidores.....	30
3.3.4	Razão doadores/aceptores de elétrons	31
3.3.5	Pressão parcial de H₂	32
3.3.6	Tempo de detenção hidráulica	33
3.4	MICROORGANISMOS PRODUTORES DE ACCM`S	33
3.5	PRODUÇÃO DE ÁCIDO CAPRÓICO	37
3.5.1	Produção de ácido caprótico a partir de substratos sintéticos.....	37
3.5.1.1	Álcoois (etanol, metanol, galactitol e glicerol)	37
3.5.1.2	Lactato	38
3.5.1.3	Syngas ou gás de síntese	39
3.5.1.4	Açúcares	40
3.5.2	Produção de ácido caprótico a partir de substratos reais (resíduos e efluentes)	41
3.5.2.1	Efluentes de bebidas alcoólicas (vinícolas, cervejarias e licores) ...	42
3.5.2.2	Soro de leite ácido	42
3.5.2.3	Resíduos de alimentos.....	42
3.5.2.4	Culturas ricas em celulose ou gramíneas	44
3.5.2.5	Solos contaminados (solventes clorados, álcoois, ácidos)	44
3.6	PRINCIPAIS APLICAÇÕES, VIABILIDADE ECONÔMICA E MÉTODOS DE EXTRAÇÃO DE ACCM`S.....	45
3.6.1	Métodos de extração	47
3.6.1.1	Extração bifásica.....	47
3.6.1.2	Pertração.....	47
3.6.1.3	Eletrodialise ou membrana de troca iônica	48
3.7	CONSIDERAÇÕES FINAIS SOBRE A REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	48

4	ARTIGO 1: PERCEPÇÕES SOBRE O ALONGAMENTO DA CADEIA DE CARBONO, COMUNIDADE MICROBIANA E VIABILIDADE PARA PRODUÇÃO DE ÁCIDO CAPRÓICO A PARTIR DE DIFERENTES INÓCULOS	50
4.1	RESUMO	50
4.2	INTRODUÇÃO	51
4.3	MATERIAIS E MÉTODOS	54
4.3.1	Características dos inóculos	54
4.3.2	Método experimental	55
4.3.3	Métodos Analíticos	56
4.3.4	Análise cinética	56
4.3.5	Análise da comunidade microbiana	57
4.4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	57
4.4.1	Produção de ácido capróico e variação de pH nas três bateladas	57
4.4.2	Análise cinética do alongamento de cadeia	62
4.4.3	Análise microbiana	63
4.5	CONCLUSÕES	67
5	ARTIGO 2: MANIPUEIRA E LODO GRANULAR ANAERÓBIO COMO INÓCULO MISTO PARA PRODUÇÃO DE ÁCIDO CAPRÓICO	69
5.1	RESUMO	69
5.2	INTRODUÇÃO	70
5.3	MATERIAIS E MÉTODOS	72
5.3.1	Caracterização do inóculo	72
5.3.2	Método experimental	73
5.3.3	Métodos Analíticos	74
5.3.4	Análise cinética	74
5.3.5	Análise da comunidade microbiana	75
5.4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	75
5.4.1	Produção de ácido capróico e pH nas três bateladas	75
5.4.2	Análise cinética do alongamento da cadeia	80
5.4.3	Análise microbiana	80
5.5	CONCLUSÕES	85
6	CONCLUSÃO GERAL	86
6.1	QUANTO AO USO DE DIFERENTES INÓCULOS PARA PRODUÇÃO DE ÁCIDO CAPRÓICO A PARTIR DE ETANOL E ÁCIDO ACÉTICO	86
6.2	QUANTO AO AUMENTO DA ESCALA E USO DE INÓCULOS MISTOS ...	87
7	SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	88
	REFERÊNCIAS	89

1 INTRODUÇÃO

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

O processo de alongamento da cadeia de carbono consiste na conversão de ácidos carboxílicos de cadeia curta (ACCC's) em ácidos carboxílicos de cadeia média (ACCM's), por meio da utilização de uma cultura pura ou mista de bactérias (Grootscholten *et al.*, 2013a). Geralmente, os ACCM's são provenientes do craqueamento do petróleo ou extraídos de óleos de plantas e gorduras de animais; porém, são produzidos em pequenas quantidades (geralmente 8-15% de rendimento) e podem acarretar impactos ao meio ambiente (ex: emissão de poluentes) (Nzeteu *et al.*, 2022). Biologicamente, as vias metabólicas responsáveis pelo alongamento da cadeia de carbono para geração de ACCM's incluem a β – oxidação reversa e a biossíntese de ácidos graxos (Kim *et al.*, 2022; Spirito *et al.*, 2014). Por meio de um processo cíclico nas duas vias citadas, dois átomos de carbono são adicionados a uma molécula inicial (ácido acético ou butírico) e, da mesma forma, o ciclo se repete podendo alcançar a produção de ACCM's com 6 a 12 carbonos (Wang; Yin, 2022).

Os ACCM's (C₆-C₁₂) como, por exemplo, o ácido capróico (C₆), possuem uma cadeia de carbono mais longa, menor proporção oxigênio-carbono e baixa solubilidade em água (solubilidade do ácido capróico, 10,8 g.L⁻¹; do ácido heptanóico, 2,4 g.L⁻¹; e do ácido caprílico, 0,7 g.L⁻¹ nas suas formas não-dissociadas) em relação aos ACCC's (Gazzola *et al.*, 2022). Por conseguinte, os ACCM's apresentam um maior poder calorífico e melhor capacidade de extração do meio fermentativo devido ao seu caráter altamente apolar em relação aos ACCC's (Agler *et al.*, 2011). Dessa maneira, os ACCM's em função das suas propriedades físicas correspondem a vantajosos intermediários para geração de produtos químicos e combustíveis.

O ácido capróico, caproato (forma dissociada) ou ácido hexanóico (C₅H₁₁COOH) possui um amplo potencial de aplicação no mercado como, por exemplo, agente antimicrobiano na indústria farmacêutica, aditivo na alimentação animal, precursor químico para produção de compostos aromatizantes, corantes, lubrificantes, inibidores de corrosão, combustíveis de aviação e bioplásticos (Chen *et*

al., 2017; Duber *et al.*, 2018). Do ponto de vista econômico, o ácido capróico apresenta um preço de mercado de aproximadamente USD \$2000-2500/ton que é de três a quatro vezes maior que o do acetato (USD \$400-800/ton) e do etanol (USD \$600-800/ton) (Bastidas-Oyanedel; Schmidt, 2018; Cavalcante *et al.*, 2017).

Diferentes substratos sintéticos (ácidos, álcoois, lactato, celulose e açúcares etc.) e naturais (vinhaça, soro de leite, resíduos de alimentos e de gramíneas etc.), a partir de diferentes culturas puras ou mistas (lodos anaeróbios, manipueira, rúmens etc.), têm sido reportados como aptos para geração de ácido capróico a partir do alongamento da cadeia de carbono (Grootscholten *et al.*, 2013a; Wang; Yin, 2022; Wang *et al.*, 2022). Entre os microrganismos alongadores de cadeia, o *Clostridium kluyveri* é frequentemente citado na literatura como responsável pela geração de ácido capróico em reatores anaeróbios através de culturas puras e mistas (San-Valero *et al.*, 2020; Weimer *et al.*, 2015). Outros microrganismos, tais como *Megasphaera elsdenii*, *Ruminococcaceae bacterium CPB6*, *Eubacterium limosum* e *pyruvativorans*, *Caproiciproducens galactitolivorans* e *Enterococcus casseliflavus* também podem ser incluídos com a habilidade de síntese de ácido capróico com base em diversos estudos e substratos citados anteriormente (Candry; Ganigué, 2021; Luo *et al.*, 2022; Wang; Yin, 2022).

Entre os principais obstáculos relacionados a difusão e o desenvolvimento do processo de alongamento da cadeia para maiores escalas (piloto e industrial), podem-se citar os seguintes: complexa estrutura dos microbiomas anaeróbios, presença de vias metabólicas competitivas no meio (ex: metanogênese acetotrófica e hidrogenotrófica, sulfetogênese etc.), toxicidade dos produtos gerados nas formas não-dissociadas, além da viabilidade produtiva e econômica das técnicas de extração do meio fermentativo. Por exemplo, Debergh e Van Dael (2022), através da análise de custo-benefício de um sistema caprogênico em escala piloto com substratos sintéticos (etanol e ácido acético), determinaram que a produtividade de 2,5 g.L⁻¹.d⁻¹ e eficiência de conversão de DQO igual a 50% são insuficientes para tornar o processo competitivo com os preços atuais do ácido capróico no mercado. Salienta-se que o custo da matéria-prima, o CAPEX (despesas com equipamentos) e o consumo de eletricidade foram identificados como sendo os principais fatores limitantes para a viabilidade econômica da produção de ácido capróico em escala piloto.

Diante desse contexto, este trabalho tem como objetivo avaliar os desafios e alternativas relacionadas a produção de ácido capróico a partir de diferentes inóculos,

separadamente ou em consórcio, em modo batelada por meio do emprego de ácido acético e etanol como substratos sintéticos em duas diferentes escalas. O alongamento da cadeia de carbono foi efetuado mediante a utilização de reatores anaeróbios em pequena escala (0,6 L) – Artigo 1 e, sequencialmente, em um fermentador automático – reator anaeróbio (EZ2 Control de 7 L) – Artigo 2 para produção de ácido capróico.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar os desafios e alternativas relacionadas à produção de ácido capróico utilizando diferentes inóculos (fluido ruminal, lodo granular anaeróbico e manipueira), separadamente ou em consórcio, em reatores anaeróbios em batelada com duas diferentes escalas (reatores de 0,6 L e reator anaeróbico de 7 L).

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Avaliar a influência do inóculo em relação a produção de ácido capróico a partir de substratos sintéticos (ácido acético e etanol);
- b) Identificar as comunidades microbianas e possíveis sintrofias entre os microrganismos nos inóculos em relação a produção de ácido capróico a partir de substratos sintéticos (ácido acético e etanol);
- c) Otimizar a produção de ácido capróico por meio do uso de inóculos simples ou mistos a partir de substratos sintéticos (ácido acético e etanol);
- d) Avaliar a influência do escalonamento dos reatores em relação a produção de ácido capróico.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A presente seção abrange a fundamentação teórica (conceitos, estado da arte e exemplos) utilizada para o desenvolvimento desta pesquisa, visando a produção de ácido capróico a partir de diferentes inóculos e escalas.

3.1 PLATAFORMA CARBOXILATO OU DOS ÁCIDOS CARBOXÍLICOS

A plataforma carboxilato ou dos ácidos carboxílicos reside na conversão anaeróbia (hidrólises e fermentações) de matérias-primas orgânicas, oriundas de resíduos industriais ou de agricultura, em ácidos carboxílicos de cadeia curta e média utilizando uma comunidade mista de microrganismos anaeróbios (rúmen, lodos anaeróbios, manipueira etc.)(Agler *et al.*, 2011). Os ácidos carboxílicos são ácidos orgânicos fracos, com pelo menos um grupo carboxila (COOH) em sua composição (Spirito *et al.*, 2014).

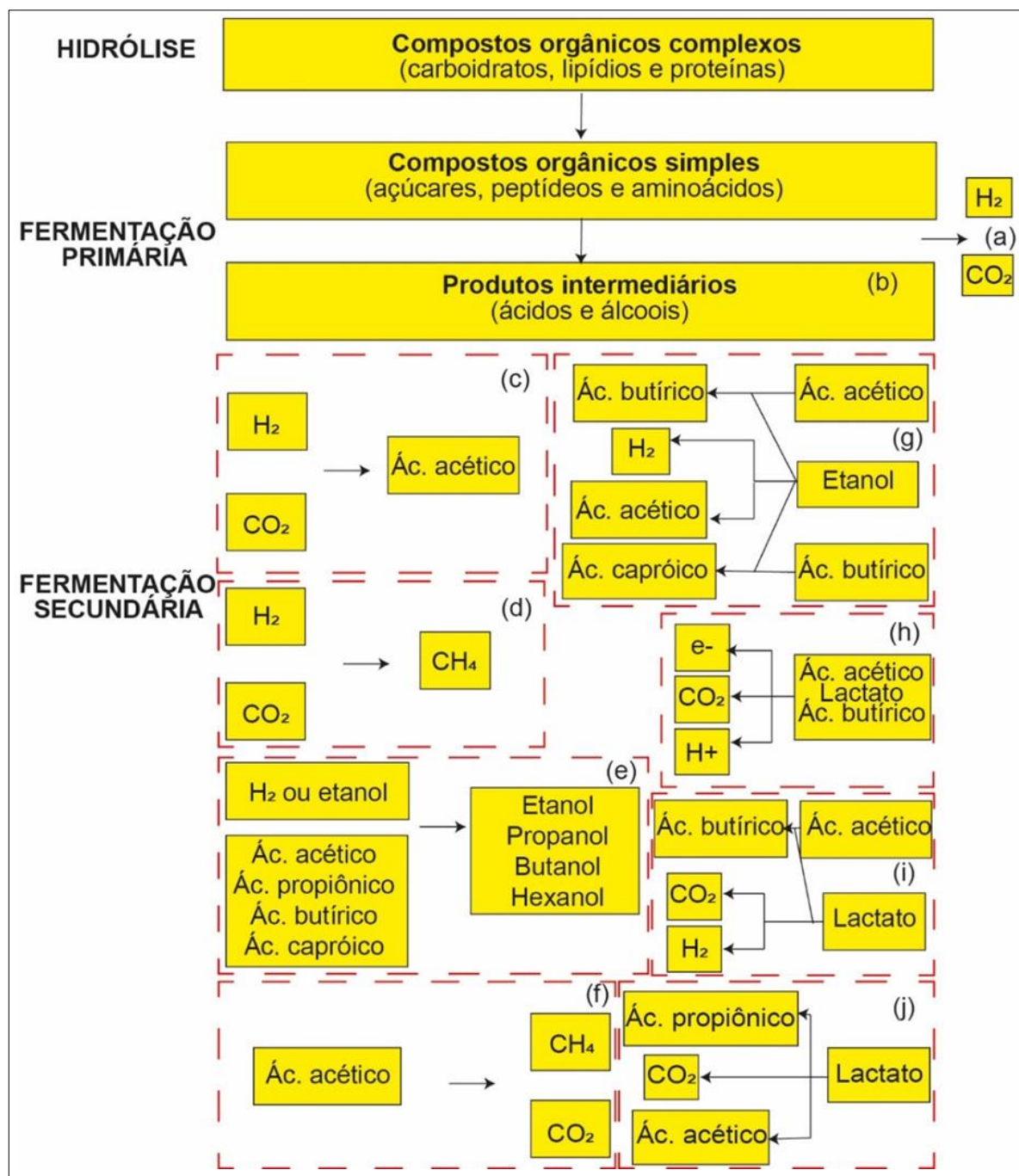
No início da plataforma carboxilato, moléculas complexas ou polímeros (carboidratos, proteínas e lipídios) são hidrolisadas em monômeros. Na fermentação primária (Figura 1), a partir dos monômeros (açúcares, peptídeos e aminoácidos) ocorre a geração de ácidos carboxílicos de cadeia curta (ACCC's) (ácido acético, propiônico e butírico), em conjunto com álcoois, dióxido de carbono (CO_2) e hidrogênio (H_2) (Kucek *et al.*, 2016; Spirito *et al.*, 2014).

Frequentemente, os ACCC's são empregados na produção de metano (CH_4), através da metanogênese acetoclástica presente na fermentação secundária (Figura 1f) (Grootscholten *et al.*, 2013a). Entretanto, o metano apresenta baixo valor de mercado e poder calorífico inferior aos demais produtos gerados (Eng Sánchez *et al.*, 2021). Dessa forma, os ACCC's podem constituir valiosos insumos para inúmeras aplicações industriais mais lucrativas como, por exemplo: ácido acético na produção de vinagre, plásticos e fibras; ácido propiônico na produção de conservantes alimentares e ração animal; e, ácido butírico na composição de aditivos alimentares e agentes de limpeza (Dams *et al.*, 2018).

Apesar dos ACCC's apresentarem diversas possibilidades de utilização como matéria-prima nas indústrias, seu processo de extração do caldo fermentativo é difícil e oneroso (Grootscholten *et al.*, 2013a). A dificuldade na extração dos ACCC's fundamenta-se em sua estrutura com elevada proporção oxigênio-carbono (caráter

polar e hidrofílico), além de constituírem insumos de baixo poder calorífico para produção de biocombustíveis (Steinbusch *et al.*, 2011). Logo, o processo de alongamento da cadeia de carbono surge como uma possível alternativa para geração e extração de produtos com maior densidade energética e menores custos (Angenent *et al.*, 2016).

Figura 1 - Esquema das reações envolvidas na plataforma dos ácidos carboxílicos



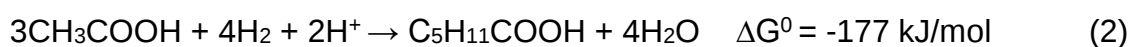
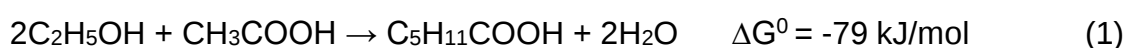
Fonte: Adaptado de Agler *et al.* (2011).

O processo de alongamento da cadeia de carbono baseia-se na reação entre ácidos carboxílicos de cadeia curta (ACCC's) (ex: ácido acético e butírico) e doadores de elétrons (ex: etanol, hidrogênio e lactato), oriundos da fermentação secundária (Figura 1g), resultando em ácidos carboxílicos de cadeia média (ACCM's) (C₆-C₁₂) (Spirito *et al.*, 2014; Yin *et al.*, 2017).

Os gases H₂, CO e CO₂, denominados de *Syngas* ou gás de síntese, também podem atuar como doadores de elétrons para o processo de alongamento da cadeia de forma direta ou indireta, através da sua conversão em álcoois (ex: etanol, propanol etc.) e ácidos (ex: acético, butírico etc.) (Baleeiro *et al.*, 2019).

De forma geral, os ACCM's são provenientes do craqueamento do petróleo ou extraído de óleos de plantas e gorduras de animais; porém, são produzidos em pequenas quantidades (usualmente 8 a 15% de rendimento) e podem acarretar impactos ao meio ambiente (Nzeteu *et al.*, 2022). Portanto, o processo de alongamento da cadeia, através de fermentações anaeróbias de águas residuárias por diferentes microrganismos, possibilita uma forma alternativa de geração de ACCM's em maior escala, com potencial viabilidade econômica e ambiental (Wang; Yin, 2022).

As equações 1 e 2 mostram as reações químicas mais comumente mencionadas como responsáveis pela geração de ácido capróico a partir de ácido acético e etanol (Equação 1) ou hidrogênio (Equação 2) (Yin *et al.*, 2017).



ΔG^0 (kJ/mol) é o valor de ΔG^0 em pH 7,0 sob condições padronizadas (todos os solutos têm a concentração de 1 mol/L e gases tem pressão parcial de 1 atm com temperatura igual a 25 °C).

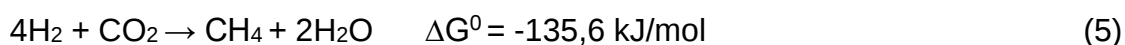
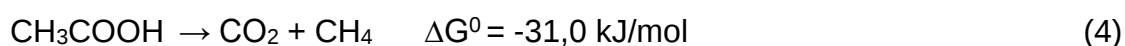
Com a finalidade de garantir uma produção eficiente e seletiva de ACCM's, é fundamental que os seguintes processos competitivos pelos substratos (ácido acético e etanol) sejam reduzidos ou minimizados:

- a) Oxidação excessiva de etanol, no qual outros microrganismos não-produtores de ACCM's oxidam o etanol em ACCC's, como o ácido acético, com uma

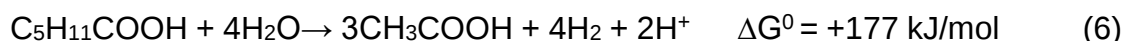
pressão parcial de hidrogênio relativamente baixa no meio (abaixo de 10^{-1} bar) (Equação 3) (Grootscholten *et al.*, 2014).



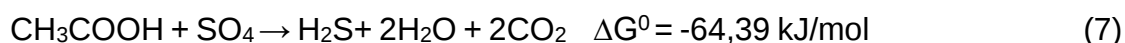
- b) Metanogênese acetotrófica, em que ocorre a conversão de ácido acético em metano, diminuindo assim o substrato disponível para o processo de alongamento da cadeia (Equação 4); salienta-se que, a metanogênese hidrogenotrófica (Equação 5) pode exercer um efeito indireto negativo ao processo de alongamento da cadeia, visto que o consumo do hidrogênio do meio é responsável pela diminuição da sua pressão parcial, acarretando assim, a oxidação excessiva do etanol em ácido acético (Equação 3) (Candry; Ganigué, 2021; Grootscholten *et al.*, 2014).



- c) Oxidação de ACCM's (ex: ácido capríco) em ácido acético, ocasionando assim, a perda dos produtos de interesse (Equação 6) (Grootscholten *et al.*, 2014).



- d) Redução de sulfato, realizada por microrganismos considerados anaeróbios estritos, conhecidos como Bactérias Redutoras de Sulfato (BRS), presentes principalmente em substratos ricos em sulfato. A redução de sulfato pode afetar o processo de alongamento da cadeia, pois as BRS competem pelos mesmos doadores e aceptores de elétrons (hidrogênio, ácido acético, ácido propiônico, ácido butírico e etanol) envolvidos no alongamento da cadeia (Equação 7) (Cavalcante *et al.*, 2017).



3.2 VIAS BIOQUÍMICAS DO ALONGAMENTO DA CADEIA DE CARBONO

As vias bioquímicas responsáveis pelo alongamento da cadeia de carbono para geração de ACCM's incluem a β – oxidação reversa e a biossíntese de ácidos graxos (Kim *et al.*, 2022; Spirito *et al.*, 2014). As Figuras 2 e 3 exibem o fluxo de metabólitos e intermediários no decorrer do processo de alongamento da cadeia para os dois mecanismos citados.

A via β – oxidação reversa é o mecanismo bioquímico mais conhecido no que se refere ao processo de alongamento da cadeia de carbono (Wang; Yin, 2022). Segundo Spirito *et al.* (2014), pode-se estabelecer duas condições ambientais para a realização da via β – oxidação reversa em microbiomas anaeróbios:

- a) Presença de compostos reduzidos (doadores de elétrons – ex: etanol e lactato), com o objetivo de fornecer energia, equivalentes redutores e intermediários como o Acetil-CoA;
- b) Pressão parcial de hidrogênio suficientemente alta para prevenir a oxidação dos produtos gerados, ou seja, a remoção ou consumo dos ACCM's.

Cavalcante *et al.* (2017) e Kim *et al.*, (2022) descrevem o ciclo da β – oxidação reversa por meio das três etapas descritas abaixo (Figura 2):

1ª Etapa: Parte do etanol (aproximadamente 1/6) é convertido em ácido acético, para fornecer energia inicial na forma de ATP (Adenosina Trifosfato) ao processo via fosforilação a nível de substrato;

2ª Etapa: O etanol remanescente (aproximadamente 5/6) é convertido primeiramente em acetaldeído e, sequencialmente, em acetil-CoA a partir de diferentes enzimas (etanol desidrogenase e acetaldeído desidrogenase), gerando redutores equivalentes (NADH) com a função de manter o fluxo de elétrons no processo. Ao acetil-CoA são acoplados dois átomos de carbono formando o Butiril – CoA, e sequencialmente, o ácido butírico por meio da utilização de NADH, FADH_2 e enzimas (Cetoacil-CoA redutase, hidroxiaçil-CoA desidratase e enoil-CoA redutase) (Yang *et al.*, 2021);

3ª Etapa: Por último, em um ciclo similar ao anterior, são acoplados dois átomos de carbono ao Butiril-CoA formando o Hexanoil-CoA, que após sucessivas reações,

a via biossíntese de ácidos graxos se mostrou mais ativa em relação a β – oxidação reversa, principalmente, a partir de microrganismos pertencentes a família *Planctomycetaceae*, além da *Methanolinea tarda* e *Bordetella avium*.

3.3 PARÂMETROS OU CONDIÇÕES OPERACIONAIS QUE INFLUENCIAM A GERAÇÃO DE ACCM'S

Os parâmetros ou condições operacionais, como temperatura, pH, pressão parcial de H_2 , presença de aditivos (ex: extrato de levedura, íons metálicos, materiais de carbono etc.) ou inibidores (ex: ácido 2-bromoetanosulfônico, clorofórmio, etileno etc.), razão entre doadores e aceptores de elétrons e tempo de detenção hidráulica (TDH), são os principais fatores que afetam os mecanismos responsáveis pelo processo de alongamento da cadeia de carbono (Wu *et al.*, 2022c).

3.3.1 Temperatura

A temperatura pode influenciar o crescimento dos microrganismos, a atividade enzimática, a taxa de hidrólise dos substratos e a produção e seletividade dos ACCM's (Holtzapple *et al.*, 2022). Com o objetivo de otimizar a temperatura para geração de ACCM's, Wu *et al.* (2020) operaram um reator EGSB (Reator anaeróbio de leito granular expandido) alimentado com um efluente oriundo da fabricação de bebidas alcoólicas chinesas. Os resultados apontaram que a faixa de temperatura, entre 35 e 40 °C, propiciou uma maior concentração de ACCM's ($2,6 \pm 0,1 \text{ g.L}^{-1}$). Entretanto, ao aumentar a temperatura para 45 °C, constatou-se um decréscimo na produção de ACCM's e desagregação de parte do lodo granular do reator. Entre as possíveis causas da diminuição na síntese de ácido capróico, pode-se mencionar as limitações termodinâmicas ocasionadas pela elevada temperatura, uma vez que dificulta a captação e aproveitamento dos doadores de elétrons (Grootscholten *et al.*, 2013b).

Dessa maneira, diversos estudos como os de Jeon *et al.* (2016), Wallace *et al.* (2003) e Yin *et al.* (2017) concluíram que a temperatura ideal para o crescimento dos microrganismos relacionados ao processo de alongamento da cadeia (*C. kluyveri*, *E. pyruvativorans*, *E. limosum* e *M. elsdenii*) situa-se na faixa mesófila de 37 a 39 °C. Porém, Sakarika *et al.* (2022) identificaram o gênero *Caproiciproducens* como responsável pelo alongamento da cadeia em faixa termófila (50 °C), com uma

concentração média de $7,2 \text{ g.L}^{-1}$ de ácido capróico a partir de açúcares (xilose e glicose) oriundos de resíduos de gramíneas. Frequentemente, experimentos utilizando culturas mistas adotam a temperatura de $30 \text{ }^{\circ}\text{C}$ para garantir a presença de diferentes microrganismos indiretamente relacionados a produção de ácido capróico (ex: bactérias hidrolíticas e acidogênicas) (Wang; Yin, 2022).

Xu *et al.* (2018), com intuito de atenuar o impacto do aumento da temperatura nos microbiomas anaeróbios alongadores de cadeia, desenvolveram um reator em dois estágios com diferentes temperaturas alimentado por efluentes da produção de iogurte grego. O primeiro estágio, com temperatura de $50 \text{ }^{\circ}\text{C}$ (faixa termófila), foi ideal para os microrganismos que convertem lactose e galactose em ácido láctico. Sequencialmente, o efluente rico em ácido láctico foi encaminhado para o segundo estágio, com temperatura por volta de $30 \text{ }^{\circ}\text{C}$ (faixa mesófila), favorecendo microrganismos produtores de ACCM's. Dessa forma, ao assegurar as temperaturas ótimas específicas para os microbiomas, o estudo alcançou uma taxa de produção de $1,2 \text{ mmol C.L}^{-1}.\text{dia}$ ($1,5 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$) de ácido láctico e de $81 \text{ mmol C.L}^{-1}.\text{dia}$ ($0,1 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$) de ácido capróico.

Para otimizar o processo de alongamento da cadeia, o pré-tratamento térmico do inóculo pode ser utilizado com a finalidade de manter bactérias relacionadas à geração de ACCM's, como as do gênero *Clostridium* na forma de esporos, que são resistentes a condições extremas de temperatura (Cavalcante *et al.*, 2017). Zagrodnik *et al.* (2020) examinaram o efeito da bioaugmentação com *Clostridium kluyveri* em lodo de digestores anaeróbios tratados termicamente para produção de ácido capróico. A partir de um substrato misto (lactose, lactato, acetato e etanol), os autores atingiram a concentração de $11,4 \pm 0,5 \text{ g.L}^{-1}$ de ácido capróico na segunda batelada do experimento. Entretanto, diversos autores, Dong *et al.* (2023), Wang e Yin (2022) e Zhu *et al.* (2022) relataram que valores elevados de temperatura podem reduzir ou eliminar, indiretamente, microrganismos com relações sintróficas ao processo de alongamento da cadeia de carbono.

3.3.2 pH

O pH representa um dos principais parâmetros operacionais responsáveis pela geração de ACCM's (Candry *et al.*, 2020; Holtzapple *et al.*, 2022). A maior parte dos estudos indicam que os valores ótimos de pH para geração de ácido capróico são

próximos a 7,0 ou da neutralidade (Grootscholten *et al.*, 2014; Gavazza *et al.*, 2020). Wu *et al.* (2022a) avaliaram diferentes valores de pH (10,0, 7,0 e 5,5) em relação ao alongamento da cadeia, a partir de um lodo aeróbio coletado em uma estação de tratamento de efluentes com um sistema de lodos ativados. Os resultados apontaram que a maior quantidade gerada de ácido capróico ocorreu em pH igual a 7,0 ($4,7 \text{ g.L}^{-1}$) em comparação com o pH 5,5 ($3,9 \text{ g.L}^{-1}$), não havendo produção com pH igual a 10,0. Liang e Wan (2015), de maneira similar, ao analisarem a influência dos valores de pH (7,0 e 10,0) na fermentação de grãos de uma cervejaria, verificaram que o pH em condições neutras favoreceu o processo caprogênico, com uma concentração média de $0,8 \text{ g.L}^{-1}$ de ácido capróico. San-Valero *et al.* (2019), por exemplo, obtiveram uma alta concentração de ácido capróico (acima de $20,0 \text{ g.L}^{-1}$) com pH igual a 6,8, a partir de uma mistura de ácido acético e butírico como aceptores de elétrons.

Os valores de pH próximos à neutralidade também podem favorecer a competição por substratos (ácido acético e etanol) com os microrganismos metanogênicos acetoclásticos, responsáveis pela produção de metano. Dessa forma, alguns trabalhos utilizam o pH 5,5 como pré-tratamento ácido com o objetivo de inibir o crescimento dos metanogênicos, facilitando assim a conversão dos substratos em ACCM's (Agler *et al.*, 2012; Vasudevan *et al.*, 2014).

Ge *et al.* (2015), com a utilização de um biorreator anaeróbio adotando pH de 5,5 alimentado por efluentes de uma cervejaria, obtiveram uma produção média de ácido capróico igual a $3,4 \pm 0,4 \text{ g.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$ e seletividade de $70,3 \pm 8,8\%$. De modo semelhante, Wu *et al.* (2020) observaram que, com a diminuição do pH de 6,5 para 5,4 em seu experimento, a produção de metano não foi detectada (inibição da metanogênese), e consequentemente, houve um aumento na concentração de ACCM's atingindo $2,9 \pm 0,1 \text{ g.L}^{-1}$ (cerca de 10,8% maior do que em pH 6,5).

A diminuição do pH até valores similares ou abaixo do pKa (por exemplo: 4,8 para ácido capróico) das espécies de ácidos presentes, proporciona uma maior absorção de íons H^+ e, consequentemente, uma maior proporção de ácidos não-dissociados no meio (Vasudevan *et al.*, 2014). Devido às suas características lipossolúveis, os ácidos não-dissociados podem atravessar facilmente a membrana celular das bactérias, provocando o rompimento da sua estrutura e dificultando a absorção dos substratos (Yuan *et al.*, 2022).

Dessa forma, os ácidos carboxílicos não-dissociados apresentam um caráter hidrofóbico e tóxico aos microrganismos, influenciando assim a viabilidade dos

consórcios anaeróbios responsáveis pelo alongamento da cadeia (Lambrecht *et al.*, 2019). De acordo com Roghair *et al.* (2018a) e San-Valero *et al.* (2020), a inibição da produção de ácido capróico nos microbiomas ocorre em concentrações acima de 20,0 g.L⁻¹ de ácidos dissociados e não-dissociados. Ge *et al.* (2015), por meio da utilização de um biorreator contínuo alimentado com efluentes de cervejaria durante 550 dias, afirmaram que a concentração limite de ácido capróico não-dissociado é de 7,5 mM (0,9 g.L⁻¹) em pH 5,5 para evitar a toxicidade aos microbiomas.

Entretanto, Duber *et al.*, (2018) ao operarem um reator contínuo alimentado com efluentes de indústrias de laticínios, verificaram que a inibição do processo ocorreu quando a concentração de ácido capróico não-dissociado foi superior a 17,2 mM (2,0 g.L⁻¹) com pH igual a 5,5. Portanto, a tolerância dos microrganismos alongadores de cadeia em relação a toxicidade dos ácidos não-dissociados, varia de acordo com o pH e o tipo de ácido orgânico (Dong *et al.*, 2023).

O pH também pode influenciar no estado de dissociação do CO₂ nas suas mais variadas formas (H₂CO₃/CO₂, HCO₃⁻ e CO₃²⁻). Segundo Tomlinson e Barker (1954), o CO₂ é primordial no fornecimento de carbono inorgânico para o crescimento de microrganismos alongadores de cadeia, como o *Clostridium kluyveri*. Por meio do emprego de radioisótopos, Jungermann *et al.* (1968) encontraram que 1/3 do carbono presente no *C. kluyveri* foi oriundo do CO₂. Além do CO₂, San-Valero *et al.* (2020) inferiram que a adição de HCO₃⁻ foi responsável pelo aumento na concentração de ácido capróico em seu experimento, atingindo cerca de 21,4 g.L⁻¹, devido a sua ação tamponante no meio.

Entre as estratégias que podem ser empregadas com o objetivo de mitigar ou eliminar a inibição dos ácidos não-dissociados, podem-se indicar as seguintes: diluição do caldo fermentativo, ajuste de pH e extração dos ACCM's gerados no meio (Angenent *et al.*, 2018).

3.3.3 Uso de aditivos e inibidores

Diversos aditivos vêm sendo empregados com a finalidade de estimular o processo de alongamento da cadeia de carbono através do crescimento microbiano, atividade enzimática e processos metabólicos (Wang; Yin, 2022). Entre os principais aditivos utilizados nos sistemas caprogênicos, podem-se citar os seguintes:

3.3.3.1 Extrato de levedura

Usualmente empregado em sistemas biológicos com o objetivo de fornecer nutrientes e fonte de carbono adicional para o crescimento e reprodução dos microrganismos (Wang; Yin, 2022). San-Valero *et al.* (2020) analisaram o efeito da adição do extrato de levedura na geração de ACCM's, a partir de ácidos (acético e butírico) e etanol com a utilização do microrganismo *Clostridium Kluyveri*. Os autores relataram que a presença do extrato de levedura proporcionou um aumento na concentração de ácido capróico de 18,3 para 21,4 g.L⁻¹, ao mesmo tempo que, sua supressão conduziu a uma diminuição do processo (12,0 g.L⁻¹), em decorrência do uso dos doadores e aceptores de elétrons para o crescimento da biomassa.

3.3.3.2 Íons metálicos

Participam ativamente de diferentes funções nas vias metabólicas responsáveis pelo alongamento da cadeia de carbono. Fazem parte da composição de enzimas (ex: níquel e ferro nas hidrogenases), coenzimas (ex: cobalto na cianocobalamina ou B12) e transportadores de elétrons (ex: ferro na ferredoxina) (Wang; Yin, 2022).

A influência de elevadas concentrações de metais (níquel, cobalto, ferro e zinco) na produção de ácidos carboxílicos foi investigada no estudo realizado por Sarkar *et al.* (2022). Os autores constataram que a produção de ácidos aumentou, significativamente, com a adição dos metais, alcançando o valor de 0,3 gDQO.gSV⁻¹ em comparação ao valor do controle (0,2 gDQO.gSV⁻¹). Metais, como o Fe⁰ e Fe²⁺, também podem atuar diretamente (oxidação) ou indiretamente (geração de H₂) no fornecimento de elétrons para produção de ACCM's (Sträuber *et al.*, 2018).

3.3.3.3 Materiais de carbono (biochar e carvão ativado)

Podem ser incorporados ao processo de alongamento da cadeia, com o objetivo de estimular o aumento na geração e seletividade de ACCM's e na redução da fase *lag* dos microrganismos (Ghysels *et al.*, 2021; Liu *et al.*, 2017). Entre as vantagens relacionadas ao uso de materiais de carbono, podem-se citar as seguintes: melhoria na eficiência da transferência de elétrons, diminuição na inibição dos

substratos e dos produtos, fornecimento de nutrientes e efeito tampão ao meio (Wang; Yin, 2022).

Ghysels *et al.* (2021), por exemplo, avaliaram o impacto do carvão ativado no crescimento e desempenho do microrganismo *C. kluyveri*. Os autores observaram que a adição de carvão ativado, particularmente em altas doses ($30,0 \text{ g.L}^{-1}$), ampliou o consumo de etanol e, conseqüentemente, a geração e seletividade do ácido capróico ($14,2 \text{ g.L}^{-1}$ e 92%, respectivamente).

3.3.3.4 Inibidores

A utilização de inibidores seletivos metanogênicos possibilita uma maior disponibilidade de substratos (ex: ácido acético) para o processo de alongamento da cadeia de carbono (Cavalcante *et al.*, 2017). Entre os exemplos de inibidores químicos, podem ser mencionados os seguintes: ácido 2-bromoetanossulfônico (2-BES), 2-cloroetanossulfonato (CES), 2-mercaptoetanossulfonato (MES), clorofórmio, etileno, entre outros. O 2-BES, por exemplo, pertence ao grupo de análogos estruturais a coenzima M, ou 2-sulfaniletanossulfonato, um cofator presente em todos os microrganismos metanogênicos (Menon; Lyng, 2021). A coenzima M atua na etapa final da metanogênese, ao reagir com a coenzima B (7-tioheptanoiltreoninafosfato), gerando um dissulfeto e liberando metano para o meio (Friedrich, 2005; Wongnate *et al.*, 2016).

Dessa forma, o 2-BES é amplamente utilizado em diversos estudos por apresentar um direcionamento específico na inibição da produção de metano em culturas mistas, sem afetar outros grupos de bactérias sintróficas (acidogênicas, acetogênicas etc.) (Grootscholten *et al.*, 2013a; Steinbusch *et al.*, 2011). Todavia, devido ao alto preço dos inibidores, as seguintes opções podem ser implementadas, com o intuito de inibir a metanogênese a um menor custo: redução do pH, deficiência de nutrientes, tratamento térmico do inóculo e remoção de CO_2 para diminuir a metanogênese hidrogenotrófica (Cavalcante *et al.*, 2017).

3.3.4 Razão doadores/aceptores de elétrons

Uma razão adequada entre doadores e aceptores de elétrons é considerada um fator essencial na condução dos processos fermentativos para geração e distribuição de ACCM's (Reddy *et al.*, 2018; Wang; Yin, 2022). Uma baixa razão entre doadores e aceptores de elétrons resulta em uma quantidade insuficiente de redutores equivalentes para o processo, da mesma forma que o excesso de doadores de elétrons (ex: etanol e lactato) pode tornar o ambiente tóxico para os microrganismos responsáveis pelo alongamento da cadeia (Lonkar *et al.*, 2016).

Segundo Liu *et al.* (2016), as razões entre doadores e aceptores maiores que 2:1 fornecem a quantidade suficiente de elétrons para as reações pertencentes ao alongamento da cadeia. Logo, razões menores que 2:1 favorecem o consumo de todo o etanol com ácido acético para geração de ácido butírico (Agler *et al.*, 2012). Enquanto, para valores maiores que 2:1, o ácido acético é completamente convertido em ácido butírico e, posteriormente, em ácido capríco (Spirito *et al.*, 2014).

Liu *et al.* (2016), por exemplo, obtiveram a maior concentração de ácido capríco ($3,0 \text{ g.L}^{-1}$) ao utilizar uma razão entre etanol e ácido acético igual a 3:1. De forma análoga, Bao *et al.* (2019) alcançaram a maior concentração de ácido capríco ($2,3 \text{ g.L}^{-1}$) com uma razão entre etanol e ácido acético igual a 4:1. Vale salientar que, do ponto de vista econômico, uma menor relação entre etanol e ácido acético (próxima ou igual a 2:1) é mais viável financeiramente em decorrência da redução na utilização de recursos ou insumos (substratos, energia, inibidores etc.) (Steinbusch *et al.*, 2011).

Diversos estudos, como os de Bao *et al.* (2019), Yin *et al.* (2017) e Villegas-Rodríguez e Buitrón (2022), recomendam a utilização de elevados valores de razão entre doadores e aceptores de elétrons, com a finalidade de promover a formação de ACCM's com a cadeia mais longa (ex: ácido capríco) e uma maior seletividade dos produtos gerados. Ao empregar uma razão entre etanol e ácido acético igual a 10:1, Villegas-Rodríguez e Buitrón (2020) alcançaram uma concentração de $5,8 \text{ g.L}^{-1}$ de ácido capríco e $2,8 \text{ g.L}^{-1}$ de ácido caprílico. Salienta-se que concentrações de etanol próximas a sua toxicidade ($10,0 - 20,0 \text{ g.L}^{-1}$) podem acarretar danos à membrana celular dos microrganismos alongadores de cadeia e, conseqüentemente, a inibição na produção de ácido capríco (Ge *et al.*, 2015; Wu *et al.*, 2022c).

3.3.5 Pressão parcial de H₂

A pressão parcial de hidrogênio é um importante parâmetro para produção de ACCM's em culturas mistas (Cavalcante *et al.*, 2017). Dentre as principais contribuições ao alongamento da cadeia pela pressão parcial de hidrogênio, podem-se citar as seguintes:

- a) A presença de hidrogênio pode fornecer redutores equivalentes para a caprogênese como, por exemplo, a conversão de CO₂ em ACCC's (homoacetogênese) e álcoois e, conseqüentemente, o alongamento para ACCM's (Steinbusch *et al.*, 2011);
- b) O hidrogênio pode atuar na inibição ou limitação do processo competitivo de oxidação excessiva do etanol. De acordo com Ge *et al.* (2015), uma pressão parcial de hidrogênio acima de 10⁻¹ bar é recomendada para prevenir a oxidação dos ACCM's em ACCC's. Para Roghair *et al.* (2018a), uma pressão parcial de hidrogênio acima de 14% pode impedir a oxidação excessiva de etanol e, conseqüentemente, aumentar a eficiência de sua conversão em ACCM's. Entretanto, uma elevada pressão parcial de H₂ também pode acarretar o acúmulo de ácido butírico e propiônico no meio, em função do aumento da razão NADH/NAD⁺ (Harper; Pohland, 1986; Menon; Lyng, 2021). Dessa forma, com o objetivo de manter uma proporção adequada de NADH/NAD⁺, a rota metabólica é direcionada para geração de ácido propiônico, por apresentar uma maior produção de NAD⁺ por mol de piruvato em relação ao ácido butírico (Cavalcante *et al.*, 2017).
- c) A suplementação com hidrogênio pode aumentar a eficiência da transferência de elétrons para geração de diferentes ACCM's (capróico, heptanóico e caprílico). Nzeteu *et al.* (2018), ao investigarem o impacto de doadores de elétrons (etanol e hidrogênio) na síntese de ácido capróico a partir de ACCC's (ácido acético e butírico), observaram que a adição de 0,5 bar de H₂ conduziu a um acréscimo na concentração de ácido capróico (aproximadamente 10,5 g.L⁻¹). Steinbusch *et al.* (2011) constataram que a adição de 200 mL.h⁻¹ de hidrogênio em um reator em batelada, foi

responsável pelo aumento na geração de ácido caprílico a partir de ácido acético e etanol como substratos.

3.3.6 Tempo de detenção hidráulica

O tempo de detenção hidráulica (TDH) é um parâmetro essencial para o crescimento microbiano e produção de ACCM's (Cavalcante *et al.*, 2017; Richter *et al.*, 2013). Por exemplo, ao reduzir os valores do TDH, dificulta-se o acúmulo de microrganismos com crescimento mais lento (ex: arqueas metanogênicas), favorecendo assim o predomínio de bactérias com rápido crescimento (acidogênicas e alongadoras de cadeia) (Holtzapple *et al.*, 2022). Grootcholten *et al.* (2013b), ao reduzirem o TDH de 17 para 4h em seu experimento com substratos sintéticos (ácido acético e etanol), atingiram uma produção volumétrica de ACCM's igual a 57,7 g.L⁻¹.d⁻¹.

3.4 MICRORGANISMOS PRODUTORES DE ACCM'S

Entre os principais microrganismos citados na literatura com a capacidade de realizar o alongamento da cadeia de carbono, podem-se indicar os seguintes:

a) *Clostridium kluyveri*

A maioria dos microrganismos relacionados à geração de ácido caprílico pertencem ao gênero *Clostridium* (*C. kluyveri*, *C. difficile*, *C. botulinum*, *C. thermocellum* etc.), caracterizado pela presença de bactérias anaeróbias gram-positivas e formadoras de esporos em condições adversas (ex: mudanças de temperatura e pH) (Han *et al.*, 2019; Jeon *et al.*, 2010; Yuan *et al.*, 2022).

O *Clostridium kluyveri* foi o primeiro microrganismo identificado com a capacidade de promover a formação de ácido butírico e caprílico, utilizando ácido acético e etanol como fontes de energia e carbono (Barker *et al.*, 1945; Seedorf *et al.*, 2008). Dessa maneira, desde 1950, tornou-se um microrganismo modelo para o estudo da biossíntese (vias ou rotas metabólicas) de ACCC's e ACCM's (Dong *et al.*, 2023). San-Valero *et al.* (2019), por exemplo, ao realizarem testes em batelada com

a razão etanol: ácido acético igual a 3,5 utilizando uma cultura pura de *C. Kluyveri*, obtiveram uma concentração de $6,8 \pm 0,6 \text{ g.L}^{-1}$ de ácido capróico. O *C. kluyveri* pode ser encontrado naturalmente em lamas de poços, leitos de rios e no rúmen de bovinos (Yuan *et al.*, 2022).

De forma geral, grande parte dos estudos como, Coma *et al.* (2016), Steinbusch *et al.* (2011), Villegas-Rodríguez e Buitrón (2020), Yang *et al.* (2018) e Wang e Yin (2022) corroboram que o *C. kluyveri* é dominante nos processos fermentativos caprogênicos em culturas mistas, particularmente, com efluentes ricos em etanol (ex: efluentes de cervejarias e vinícolas). Salienta-se que, para o processo de alongamento da cadeia de carbono, o *C. Kluyveri* necessita de CO_2 para síntese de proteínas, ao mesmo tempo que, a presença de altas pressões parciais de hidrogênio podem retardar seu crescimento (Schoberth; Gottschalk, 1969; Cavalcante *et al.*, 2017).

b) *Megasphaera elsdenii*

A *Megasphaera elsdenii* é uma bactéria gram-negativa, estritamente anaeróbia, encontrada principalmente em rúmen de ovinos e bovinos (Yuan *et al.*, 2022). A *Megasphaera elsdenii* apresenta a capacidade de metabolizar diferentes carboidratos e subprodutos (glicose, frutose, sucrose e lactato) para geração de CO_2 , H_2 e ACCM's (Jeon *et al.*, 2016; Kim *et al.*, 2020). Choi *et al.* (2013), ao avaliarem o alongamento da cadeia de carbono por intermédio da *M. elsdenii* com sucrose como substrato, obtiveram a concentração de $28,4 \text{ g.L}^{-1}$ de ácido capróico.

Diferentes autores como Andersen *et al.* (2015), Kim *et al.* (2020) e Nelson *et al.* (2017) relataram a predominância da *M. elsdenii* em culturas mistas para geração de ácido capróico a partir de substratos com grande proporção de açúcares e seus metabólitos, como o lactato (ex: vinhaça, cereais, soro de leite etc.).

Outra bactéria pertencente ao mesmo gênero e com habilidades semelhantes a *M. elsdenii*, denominada *M. hexanoica*, foi capaz de gerar $8,9 \text{ g.L}^{-1}$ de ácido capróico a partir de lactato como única fonte de elétrons (Kang *et al.*, 2022).

c) *Caproiciproducens galactitolivorans*

A *Caproiciproducens galactitolivorans* é uma bactéria gram-positiva em forma de bastonete, estritamente anaeróbia, encontrada em reatores anaeróbios (Bengelsdorf *et al.*, 2019). O microrganismo *Caproiciproducens galactitolivorans* apresenta a habilidade de empregar o álcool galactitol como fonte de carbono para geração de ácido capróico (Kim *et al.*, 2015). Jeon *et al.*, (2013) com a utilização do *C. galactitolivorans*, alcançaram a concentração de 7,0 g.L⁻¹ de ácido capróico, a partir do galactitol. Além do *C. galactitolivorans*, outras duas bactérias do mesmo gênero denominadas *Caproicibacter fermentans* EA1 e *Caproiciproducens* sp. 7D4C2 também possuem a capacidade de gerar ácido capróico, com a utilização de diferentes açúcares (hexose, frutose, sucrose etc.) (Wang; Yin, 2022).

d) *Ruminococcaceae* CPB6

A *Ruminococcaceae* CPB6 é uma bactéria gram-positiva, estritamente anaeróbia, presente no rúmen de bovinos e ovinos (Tao *et al.*, 2017). O microrganismo *Ruminococcaceae* CPB6 é capaz de fornecer ácido capróico, a partir de lactato, sucrose e ácido butírico. Zhu *et al.* (2017), através do *Ruminococcaceae* CPB6, produziram cerca de 16,6 g.L⁻¹ com o emprego de efluentes ricos em lactato.

e) *Eubacterium limosum* e *Eubacterium pyruvativorans*

As espécies *Eubacterium limosum* e *Eubacterium pyruvativorans* são bactérias gram-positivas, estritamente anaeróbias, presentes em reatores anaeróbios e ruméns de ovinos (Sharak Genthner *et al.*, 1981). A bactéria *Eubacterium limosum* pode produzir ácido acético, butírico e capróico a partir de álcoois (metanol, adonitol, arabitól, manitol e eritritol), açúcares (frutose e glicose), aminoácidos (isoleucina, ribose e valina), lactato e gás de síntese (H₂, CO e CO₂), como fontes de energia e carbono (Wang; Yin, 2022). De forma similar, a bactéria *Eubacterium pyruvativorans* utiliza o piruvato, oriundo de aminoácidos ou peptídeos, para geração de ácido valérico e capróico (Wallace *et al.*, 2003).

f) *Enterococcus casseliflavus*

A *Enterococcus casseliflavus* é uma bactéria anaeróbia gram-positiva, não formadora de esporos e com capacidade de mobilidade. O microrganismo *Enterococcus casseliflavus* é reconhecido pelos seus potenciais efeitos probióticos relacionados ao crescimento, imunidade e resistência a doenças para os seres humanos (Luo *et al.*, 2022). Em um estudo recente, Luo *et al.* (2022), a partir do isolamento de cepas da bactéria *Enterococcus casseliflavus* de uma bebida alcoólica chinesa, foi capaz de produzir cerca de 3,0 g.L⁻¹ de ácido capróico utilizando glicose como substrato.

A Tabela 1 apresenta um resumo das principais características dos microrganismos alongadores da cadeia de carbono mencionados no texto.

Tabela 1 - Características dos principais microrganismos alongadores da cadeia de carbono

Microrganismo	Fonte	pH e T*	Principais Substratos	P _{máx} ac* (g.L ⁻¹)	*Ref.
<i>Clostridium kluyveri</i>	Sedimento	6,8 e 34°C	Etanol e ácido acético	8,2	Steinbusch <i>et al.</i> (2011)
<i>Megasphaera elsdenii</i>	Rúmen ovino	7,4 e 38°C	Glicose e sacarose	28,4	Choi <i>et al.</i> (2013)
<i>Caproiciproducens galactitolivorans</i>	Reator anaeróbio	6,5 e 40°C	Galactitol	7,0	Kim <i>et al.</i> (2015)
<i>Ruminococcaceae CPB6</i>	Reator anaeróbio	5,5 e 30-40°C	Lactato	16,6	Zhu <i>et al.</i> (2017)
<i>Eubacterium limosum</i>	Rúmen ovino	7,4 e 39°C	Metanol	0,5	Genthner <i>et al.</i> (1981)
<i>Eubacterium pyruvativorans</i>	Rúmen ovino	7,0 e 39°C	Piruvato e aminoácidos	1,2	Wallace <i>et al.</i> (2003)
<i>Enterococcus casseliflavus</i>	Lama de poço	7,0 e 35°C	Glicose	3,0	Luo <i>et al.</i> (2022)

*T – Temperatura; *P_{máx}ac - Produção máxima de ácido capróico; *Referência.

Fonte: O Autor (2023).

3.5 PRODUÇÃO DE ÁCIDO CAPRÓICO

3.5.1 Produção de ácido capróico a partir de substratos sintéticos

A seguir, são apresentados estudos referentes à produção de ácido capróico com o emprego de diferentes doadores (etanol, lactato, metanol, galactitol, açúcares, Syngas etc.) e aceptores de elétrons (acético e butírico) sintéticos.

3.5.1.1 Álcoois (etanol, metanol, galactitol e glicerol)

O etanol é amplamente empregado como fonte de carbono e energia em processos caprogênicos (Kim *et al.*, 2022). Desde Barker *et al.* (1945), quando foi utilizado em conjunto com o ácido acético para síntese de ácido capróico, o etanol tornou-se o mais estudado doador de elétrons para as reações cíclicas de alongamento da cadeia (Cavalcante *et al.*, 2017; Spirito *et al.*, 2014).

Steinbusch *et al.* (2011) avaliaram a geração de ACCM's com a utilização de aceptores (ácido acético) e doadores de elétrons (etanol e hidrogênio) em dois valores de pH (5,5 e 7,0). Os resultados apontaram que a maior concentração de ácido capróico (8,2 g.L⁻¹) e ácido caprílico (0,3 g.L⁻¹) ocorreram em pH igual a 7,0.

Weimer e Stevenson (2012) analisaram a produção de ácido capróico a partir de etanol, ácido acético e succinato por intermédio do microrganismo *Clostridium kluyveri*, oriundo do rúmen bovino. Os autores relataram uma concentração máxima igual a 12,8 g.L⁻¹ de ácido capróico.

Grootscholten *et al.* (2013a) investigaram a produção de ACCM's em um filtro anaeróbio de fluxo ascendente com TDH igual a 17 h, utilizando etanol e ácido acético como substratos sintéticos. De acordo com os autores, a retenção de microrganismos geradores de ACCM's, em paralelo com a eliminação de metanogênicos devido as diferenças nas cinéticas de crescimento, conduziu a altos valores de produção volumétrica de ACCM's, geração e seletividade de ácido capróico (16,6 g.L⁻¹.d⁻¹, 11,1 g.L⁻¹ e 85%, respectivamente) no experimento. Com o objetivo de otimizar a geração de ACCM's, os autores realizaram outro experimento com a redução do TDH de 17 para 4 h, alcançando uma produção volumétrica igual a 57,7 g.L⁻¹.d⁻¹. Todavia, houve uma diminuição nos valores da concentração de ácido capróico (9,3 g.L⁻¹) com o TDH igual a 4 h (Grootscholten *et al.*, 2013b).

Candry *et al.* (2020) avaliaram a produção de ácido capróico a partir da utilização de diferentes inóculos (3 lodos anaeróbios, 2 dejetos de animais e 1 microbioma produtor de ácido capróico), com adição de etanol e ácido acético como substratos em dois valores de pH (5,5 e 7,0). Os autores inferiram que a maior concentração de ácido capróico foi obtida em pH igual a 7,0 ($6,4 \pm 1,6 \text{ g.L}^{-1}$) em relação ao pH 5,0 ($2,3 \pm 1,8 \text{ g.L}^{-1}$), com predomínio do microrganismo *Clostridium kluyveri* nos microbiomas.

Debergh e Van Dael (2022) exploraram a viabilidade econômica da conversão de etanol e ácido acético em ácido capróico, com base em dados de um reator em escala piloto, utilizando uma extração contínua do produto por pertração. Os autores verificaram que a produtividade de $2,5 \text{ g.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$ e conversão de 50% dos substratos em produtos em escala piloto, aliados ao alto custo das matérias-primas e do consumo de eletricidade, ainda não tornam o processo competitivo com os preços atuais de mercado a partir de fontes não-renováveis (combustíveis fósseis).

Os álcoois metanol, galactitol e glicerol surgem como fontes alternativas de doadores de elétrons, ou em conjunto com etanol para produção de ACCM's. Chen *et al.* (2016), por meio do emprego do microrganismo *Eubacterium limosum*, utilizaram metanol e etanol como substratos, atingindo a concentração de $16,8 \text{ g.L}^{-1}$ de ácido butírico e $0,3 \text{ g.L}^{-1}$ de ácido capróico. Jeon *et al.* (2010), ao empregarem galactitol e ácidos acético e butírico como substratos, obtiveram uma concentração de $3,0 \text{ g.L}^{-1}$ de ácido capróico. Leng *et al.* (2017), ao adotarem uma razão entre ácido acético e glicerol igual a 4, alcançaram a concentração de $1,4 \text{ g.L}^{-1}$ de ácido capróico.

3.5.1.2 Lactato

O lactato é considerado como o segundo doador de elétrons mais utilizado para geração de ACCM's (Han *et al.*, 2018). Ressalta-se que, os elétrons cedidos pelo lactato são gerados através da oxidação de lactato para piruvato e, sequencialmente, em acetil-CoA, o que pode diminuir a eficiência na transferência de elétrons para geração de ácido capróico em relação ao etanol (Menon; Lyng, 2021).

Kucek *et al.* (2016) avaliaram a geração de ácido capróico a partir do lactato, em um filtro anaeróbio de fluxo ascendente com sistema de extração (pertração). Os autores relataram que a produtividade máxima alcançada foi de $3,1 \text{ g.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$ de ácido capróico em pH 5,0, com uma carga orgânica de lactato igual a $8,5 \text{ g.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$.

Tang *et al.* (2022) testaram diferentes razões entre ácido acético e lactato (0,5 a 5,0) e cargas de substrato (20-180 mmol C.gSSV⁻¹). Os autores concluíram que a maior concentração de ácido capróico (3,1 g.L⁻¹) e seletividade (49,5%) foram encontrados em uma razão igual a 3,0 e carga de 100 mmol C.gSSV⁻¹.

Brodowski *et al.* (2022) analisaram a influência da adição de ácido acético no processo alongamento de cadeia com lactato como doador de elétrons em um reator contínuo. Os resultados indicaram uma produção estável de ácido capróico ($8,0 \pm 0,2$ g.L⁻¹.d⁻¹) e alta geração de hidrogênio (748 ± 76 mLH₂.d⁻¹) com a adição externa de ácido acético, revelando uma dominância dos microrganismos *Ruminococcaceae* CPB6 e *Acinetobacter* ao longo do processo.

3.5.1.3 Syngas ou gás de síntese

Além do etanol e lactato, o syngas ou gás de síntese (H₂, CO e CO₂) pode contribuir como uma fonte extra de elétrons e carbono para produção de ACCM's (Baleeiro *et al.*, 2019; Liu *et al.*, 2020). De acordo com Richter *et al.* (2013), o CO gasoso é previamente convertido em ácido acético e etanol pelo microrganismo *C. ljungdahlii* e, posteriormente, transformados em ACCM's através do microrganismo *C. kluyveri*.

Zhang *et al.* (2013) avaliaram a produção de ACCM's a partir de H₂ e CO₂ em um biorreator com membrana inoculado com uma cultura mista. Os autores alcançaram concentrações de ácido capróico e caprílico iguais a 1,0 e 0,4 g.L⁻¹, respectivamente. A partir de análises microbianas, verificou-se o predomínio dos microrganismos *Clostridium ljungdahlii* e *Clostridium kluyveri* nos biofilmes anaeróbios.

Vasudevan *et al.* (2014) ao estudarem a possibilidade de vincular a geração de gás síntese com o processo de alongamento da cadeia, encontraram taxas de produção volumétrica de ácido butírico e capróico iguais a 20,0 e 1,7 g.L⁻¹.d⁻¹, respectivamente.

3.5.1.4 Açúcares

Açúcares, como glicose, sacarose, frutose e lactose são capazes de atuar como doadores de elétrons e fornecedores de Acetil-CoA, ATP e NADH em sistemas caprogênicos (Kim *et al.*, 2022).

Jeon *et al.* (2016) avaliaram a geração de ACCM's com o emprego de uma mistura de frutose e ácidos (acético, propiônico e butírico) a partir do microrganismo *Megasphaera sp.* Os resultados apontaram a concentração de 5,7 g.L⁻¹ de ácido valérico, 9,7 g.L⁻¹ de ácido caprótico, 3,2 g.L⁻¹ de ácido heptanótico e 1,2 g L⁻¹ de ácido caprílico.

Kim *et al.* (2018) analisaram a geração de ácido caprótico a partir de uma co-cultura entre *Clostridium tyrobutyricum* e *Megasphaera Hexanoica*, em dois biorreatores de membrana (MBR) separados com frutose, sucrose, ácido acético e butírico como substratos. Os autores alcançaram a concentração e produtividade de ácido caprótico iguais a 10,1 g.L⁻¹ e 0,7 g.L⁻¹.h⁻¹, respectivamente.

Duber *et al.* (2022) investigaram o efeito da co-fermentação de lactose com lactato e etanol como doadores de elétrons em uma cultura mista. Os resultados indicaram que a maior eficiência e seletividade para produção de ácido caprótico (53 e 65%, respectivamente) foram encontradas quando a lactose foi utilizada em conjunto com lactato.

Jin *et al.* (2023) examinaram o crescimento da biomassa e os metabólitos gerados pelo microrganismo *Lacrimispora celerecrescens JSJ-1*, através de diferentes fontes de carbono (etanol, amido, sacarose e glicose). Os resultados apontaram uma alta concentração de ácido caprótico (9,6 g.L⁻¹), a partir da mistura de glicose e etanol com pH igual a 5,8 e adição de 1% de CaCO₃.

A Tabela 2 apresenta um resumo com estudos relacionados a geração de ácido caprótico a partir de diferentes substratos sintéticos e as suas respectivas concentrações máximas de ácido caprótico (g.L⁻¹):

Tabela 2 - Resumo de estudos que avaliaram a produção de ácido capróico com substratos sintéticos

Substratos	Temperatura e pH	Inóculo	Concentração máx. de ácido capróico	Referência
Etanol e ácido acético	30 °C e 7,0	Lodo de cervejaria	8,2 g.L ⁻¹	Steinbusch <i>et al.</i> (2011)
Etanol e ácido acético	30 °C e 6,5-7,2	Lodo de cervejaria	11,1 g.L ⁻¹	Grootscholten <i>et al.</i> (2013a)
Etanol e ácido acético	34 °C e 7,0	Lodo de cervejaria	6,4 g.L ⁻¹	Candry <i>et al.</i> (2020)
Metanol e etanol	30 °C e 5,9-6,5	<i>Eubacterium limosum</i>	0,06 g.L ⁻¹	Chen <i>et al.</i> (2016)
Galactitol e ácido acético	37 °C e 7,0	<i>Clostridium sp. BS-1</i>	32,0 g.L ⁻¹	Jeon <i>et al.</i> (2010)
Glicerol e ácido acético	37 °C e 7,0	Lodo anaeróbio de ETE	1,4 g.L ⁻¹	Leng <i>et al.</i> (2017)
Lactato e ácido acético	37 °C e 5,0	Lama de poço	3,1 g.L ⁻¹	Tang <i>et al.</i> (2022)
Syngas (H ₂ e CO ₂)	35 °C e 6,0	<i>C.ljungdahlii</i> e <i>C. kluyveri</i>	1,0 g.L ⁻¹	Zhang <i>et al.</i> (2013)
Frutose e ácidos	37 °C e 7,2	<i>Megasphaera sp</i>	9,7 g.L ⁻¹	Jeon <i>et al.</i> (2016)
Frutose, sucrose e ácidos	37 °C e 7,0	<i>C. tyrobutyricum</i> e <i>M. Hexanoica</i>	10,1 g.L ⁻¹	Kim <i>et al.</i> , (2015)
Etanol, amido, sacarose e glicose	34 °C e 5,8	<i>Lacrimispora celerecrescens</i>	9,6 g.L ⁻¹	Jin <i>et al.</i> (2023)

Fonte: O Autor (2023).

3.5.2 Produção de ácido capróico a partir de substratos reais (resíduos e efluentes)

A seguir, são descritos trabalhos relacionados à geração de ácido capróico a partir de resíduos ou efluentes, oriundos de diversas fontes (efluentes de bebidas alcoólicas, resíduos sólidos urbanos, soro de leite ácido, culturas ricas em celulose, solventes clorados etc.):

3.5.2.1 Efluentes de bebidas alcoólicas (vinícolas, cervejarias e licores)

Agler *et al.* (2012) utilizaram o etanol proveniente do processamento de milho em uma indústria de cervejas para produção e extração de ACCM's. Os resultados indicaram uma taxa de produção de ácido capróico igual a $1,5 \text{ g.L}^{-1}.\text{dia}^{-1}$.

Ge *et al.* (2015), a partir de um biorreator anaeróbio alimentado por efluentes de uma cervejaria, atingiram uma concentração de $3,4 \pm 0,4 \text{ g.L}^{-1}$ de ácido capróico, com rendimento de $70,3 \pm 8,8\%$ em um período de 55 dias.

Empregando efluentes oriundos da preparação de um tipo de licor chinês denominado *Yellow water*, Zhu *et al.* (2015) obtiveram uma concentração e taxa máxima específica de ácido capróico iguais a $23,4 \text{ g.L}^{-1}$ e $3,0 \text{ g.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$, respectivamente.

Villegas-Rodríguez e Buitrón (2020), ao aplicarem efluentes da produção de vinho tinto com substratos sintéticos (etanol e ácido acético), alcançaram uma concentração máxima e taxa volumétrica média de $6,0 \text{ g.L}^{-1}$ e $263,2 \text{ g.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$ de ácido capróico, respectivamente.

3.5.2.2 Soro de leite ácido

Xu *et al.* (2018), através da utilização de efluentes oriundos da produção de iogurte grego (rico em ácido láctico) em um reator em dois estágios com diferentes temperaturas, alcançaram a produção de $0,1 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ de ácido capróico.

Duber *et al.* (2018), a partir do soro de leite ácido com pH igual a 5,5, atingiram uma taxa média de ácido capróico igual a $0,1 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$, com seletividade variando entre 58 e 83%, durante 37 dias do experimento.

Chwialkowska *et al.* (2019) avaliaram o potencial do etanol e ácido láctico oriundo de soro de leite ácido no processo de alongamento da cadeia. Os resultados evidenciaram que com a concentração de $27,0 \text{ g.L}^{-1}$ de ácido láctico, alcançaram a concentração máxima de ácido capróico igual a $5,0 \text{ g.L}^{-1}$.

3.5.2.3 Resíduos de alimentos

Grootscholten *et al.* (2013c), ao avaliarem o potencial de aplicação da fração orgânica de resíduos sólidos urbanos na geração de ACCM's, a partir da adição

externa de etanol, obtiveram uma concentração de $2,8 \text{ g.L}^{-1}$ de ácido capróico e $1,6 \text{ g.L}^{-1}$ de ácido heptanóico. Grootsholten *et al.* (2014), ao empregarem um reator em dois estágios, com o intuito de otimizar as etapas de hidrólise e acidogênese, atingiram uma concentração de 12 g.L^{-1} de ácido capróico e $0,5 \text{ g.L}^{-1}$ de ácido heptanóico.

Roghair *et al.* (2018b), a partir de resíduos de alimentos acidificados e etanol em um reator contínuo com TDH igual a 4 dias, alcançaram uma concentração máxima e taxa de produção volumétrica iguais a $25,7 \text{ g.L}^{-1}$ e $5,5 \text{ g.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$ de ácido capróico, respectivamente.

Nzeteu *et al.* (2018) avaliaram a geração de ácido capróico, utilizando um reator semi-contínuo com carga orgânica de $80,0 \text{ g SV.L}^{-1}$, a partir de resíduos de alimentos. Os autores verificaram que a maior concentração foi igual a $10,0 \text{ g.L}^{-1}$ de ácido capróico, com uma elevada pressão parcial de hidrogênio no meio.

Contreras-Dávila *et al.* (2021) analisaram a fermentação de resíduos de alimentos a partir dos microrganismos *Lactobacillus spp.* e *Caproiciproducens sp.*, alcançando uma concentração máxima de $4,5 \text{ g.L}^{-1}$ de lactato e $5,4 \text{ g.L}^{-1}$ de ácido capróico.

Ma *et al.* (2021) investigaram a influência de diferentes pré-tratamentos (ultrassônico, hidrotérmico e alcalino-térmico) na geração de ácido capróico a partir de resíduos de alimentos fermentados. Os autores concluíram que os pré-tratamentos ultrassônico e hidrotérmico foram eficientes na produção de ácido capróico, atingindo uma produção de $207,8 \text{ mg DQO.gSV}^{-1}$ e $210,0 \text{ mg DQO.gSV}^{-1}$, respectivamente.

Gazzola *et al.* (2022) avaliaram a geração de ACCM's com a utilização de duas diferentes cargas orgânicas ($15,0$ e $20,0 \text{ g DQO.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$) formadas por resíduos de alimentos. A partir de uma carga orgânica igual a $15,0 \text{ g DQO.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$, obtiveram uma concentração máxima de ácido capróico igual a $8,0 \text{ g.L}^{-1}$, com predomínio de bactérias produtoras de lactato (*Corynebacterium*, *Lactobacillus* e *Olsenella*) e alongadoras de cadeia (*Clostridiaceae* e *Caproiciproducens*) no meio.

Wang *et al.* (2023) analisaram a produção de ácido capróico a partir de etanol e ácidos, gerados pela fermentação de levedura e acidogênese hidrolítica, respectivamente, utilizando resíduos de alimentos. Os resultados apontaram que a melhor proporção entre os produtos gerados pela fermentação e acidificação foi de 2:1, atingindo a maior produção de ácido capróico igual a $169,8 \text{ mg DQO.g SV}^{-1}$, com predomínio dos microrganismos *Romboutsia* e *Clostridium sensu stricto* 12.

3.5.2.4 Culturas ricas em celulose ou gramíneas

Khor *et al.* (2017), ao empregarem uma concentração de ácido láctico igual a 9,4 g.L⁻¹ oriunda da fermentação de resíduos de gramíneas, com pH entre 5,5 e 6,2, atingiram uma concentração máxima de 4,1 g.L⁻¹ de ácido capróico.

Sakarika *et al.* (2022) avaliaram o alongamento da cadeia a partir de resíduos de gramíneas em condições termófilas (50 °C). A concentração máxima de ácido capróico do experimento foi de 7,2 g.L⁻¹ no dia 197, com amplo predomínio do gênero *Caproiciproducens* na comunidade microbiana.

3.5.2.5 Solos contaminados (solventes clorados, álcoois, ácidos)

Visando avaliar a possibilidade de empregar o processo de alongamento da cadeia no fornecimento de hidrogênio para as reações de descloração redutora de solos contaminados com tricloroeteno, Robles *et al.* (2021) verificaram uma alta taxa de conversão de tricloroeteno em eteno (forma não-tóxica), a partir da liberação de hidrogênio oriundo da produção de ácido capróico e butírico, com ácido acético e etanol como substratos.

Ao avaliarem a possibilidade do alongamento da cadeia de carbono *in situ* em solos ricos em processos fermentativos (geração de álcoois e ácidos), Joshi *et al.* (2021) verificaram que 58% dos substratos (etanol e ácido acético) incorporados ao solo foram convertidos em ácido butírico, butanol e ácido capróico.

A Tabela 3 apresenta um resumo com estudos citados relativos à geração de ACCM's a partir de substratos reais (resíduos e efluentes) e as suas respectivas concentrações máximas de ácido capróico (g.L⁻¹):

Tabela 3 - Resumo de estudos que avaliaram a produção de ácido capróico com substratos reais

Substratos	Temperatura e pH	Inóculo	Concentração máx. de ácido capróico	Referência
Efluentes de cervejaria	30 °C e 5,0	Lodo de digestor anaeróbio	3,4 g.L ⁻¹	Ge <i>et al.</i> (2015)
Licor Yellow water	30 °C e 5,0-6,5	Lama de poço	23,4 g.L ⁻¹	Zhu <i>et al.</i> (2015)
Efluentes de vinícolas, etanol e ácidos	37 °C e 5,5	Efluentes de vinícolas	6,0 g.L ⁻¹	Villegas-Rodríguez e Buitrón (2020)
Soro de leite ácido	30 °C e 5,5	Lodo anaeróbio de ETE	10,5 g.L ⁻¹	Duber <i>et al.</i> (2018)
Soro de leite ácido	30 °C e 5,5	Lodo anaeróbio de ETE	5,0 g.L ⁻¹	Chwialkowska <i>et al.</i> (2019)
Resíduos de alimentos e etanol	30 °C e 6,5-7,0	Lodo de cervejaria	12,0 g.L ⁻¹	Grootscholten <i>et al.</i> (2014)
Resíduos de alimentos	37 °C e 7,0	Lodo de digestor anaeróbio	10,0 g.L ⁻¹	Nzeteu <i>et al.</i> (2018)
Resíduos de alimentos e etanol	30 °C e 6,8	Lodo de digestor anaeróbio	25,7 g.L ⁻¹	Roghair <i>et al.</i> (2018b)
Resíduos de alimentos	35 °C e 6,0	Lodo de digestor anaeróbio	5,4 g.L ⁻¹	Contreras-Dávila <i>et al.</i> (2021)
Resíduos de alimentos	37 °C e 6,0	Lodo de ETE	8,0 g.L ⁻¹	Gazzola <i>et al.</i> (2022)
Resíduos de gramíneas	35 °C e 5,5-6,2	Lodo de digestor anaeróbio	4,1 g.L ⁻¹	Khor <i>et al.</i> (2017)
Resíduos de gramíneas	50 °C e 6,0	Lodo de digestor anaeróbio	7,2 g.L ⁻¹	Sakarika <i>et al.</i> (2022)

Fonte: O Autor (2023).

3.6 PRINCIPAIS APLICAÇÕES, VIABILIDADE ECONÔMICA E MÉTODOS DE EXTRAÇÃO DE ACCM'S

O processo de alongamento da cadeia de carbono apesar de ser muito promissor na geração de produtos com alto valor agregado (ACCM's), ainda é pouco

explorado em escala piloto e industrial. Estudos recentes em escala piloto, como o de Zhu *et al.* (2022), demonstraram que um reator de 500 L com uma temperatura de 28 °C e pH igual a 6,0 foi capaz de produzir cerca de $14,5 \pm 0,6 \text{ g.L}^{-1}$ de ácido capróico, a partir de lactato como substrato.

Em nível industrial, algumas empresas como a *Chain Craft* (Holanda), *Afyren* (França), *Capro-X* (EUA) e *Ara* (EUA) já comercializam a plataforma carboxilato e seus derivados (bioplásticos, biocombustíveis e produtos de beleza) com diferentes aplicações no mercado, como pode ser visto no Quadro 1. O ácido capróico, por exemplo, alcançou um tamanho de mercado, que representa a quantidade máxima de vendas no período de um ano, de aproximadamente 172,5 milhões de dólares no ano de 2020 (Millati *et al.*, 2023).

Quadro 1 - Principais ACCM's e seus usos

Átomos de Carbono	Nome	Usos
6	Ácido Hexanóico/ Capróico	Aditivo alimentar, corante e aromatizante; fabricação de aromas artificiais e derivados hexílicos; intermediário para diversos produtos industriais como lubrificantes, tintas e plásticos/borrachas.
7	Ácido Heptanóico/ Enântico	Produção de ésteres utilizados em fragrâncias e aromas artificiais; fabricação de vários medicamentos à base de esteróides; suplemento nutricional.
8	Ácido Octanóico/ Caprílico	Produção de corantes e perfumes, pesticidas e desinfetantes; suplemento dietético para perda de peso e tratamento da epilepsia.
9	Ácido Nonanóico/ Pelargônico	Produção de herbicidas, aromatizantes, repelentes; tratamento de convulsão.
10	Ácido Decanóico/ Cáprico	Produção de aromas e perfumes; intermediário na fabricação de lubrificantes, tintas, produtos farmacêuticos e plásticos/borrachas;
11	Ácido Undecílico	Agente antifúngico
12	Ácido Dodecanóico /Láurico	Ácido graxo primário presente no leite/óleo de coco, óleo de louro e óleo de palmiste. Utilizado como componente de várias gorduras, óleos, produtos de panificação e lácteos, gelatinas e bebidas

Fonte: Adaptado de Menon; Lyng, (2021).

A busca pelo aumento na taxa de conversão dos substratos com alta seletividade para geração de ACCM's e a redução de custos (aquisição de matéria-prima, consumo de eletricidade, uso de inibidores) associados ao processo, são fundamentais para alcançar a viabilidade econômica e produtiva do alongamento da cadeia de carbono em maiores escalas. Debergh e Van Dael (2022), por exemplo, através da análise de custo-benefício de um sistema caprogênico em escala piloto com substratos sintéticos (etanol e ácido acético), determinaram que a produtividade de $2,5 \text{ g.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$ e eficiência de conversão de DQO igual a 50% são insuficientes para tornar o processo competitivo com os preços atuais do ácido capróico no mercado.

3.6.1 Métodos de extração

Entre os principais desafios relacionados a produção e utilização de ACCM's, pode-se citar a diminuição no custo da aplicação de técnicas de extração dos produtos presentes no caldo fermentativo. As técnicas de extração de ACCM's mais comumente aplicadas nos experimentos relacionados ao processo de alongamento da cadeia são descritas abaixo:

3.6.1.1 Extração bifásica

Método baseado na separação líquido-líquido com a utilização de solventes orgânicos extratores (ex: alamina 336 ou tri-n-butil fosfato) dissolvidos em diluentes (ex: álcool oleílico), com objetivo de recuperar os ácidos carboxílicos gerados no meio (Wasewar; Shende, 2011). A reação com o solvente de extração resulta na transferência do ácido capróico não-dissociado da fase aquosa para o meio de extração com óleo, o que pode acarretar efeitos tóxicos no contato com microbiomas alongadores de cadeia (Cavalcante *et al.*, 2017).

3.6.1.2 Pertração

Consiste na aplicação de membranas com o intuito de separar os microbiomas anaeróbios do extrator (ex: óxido de trioctilfosfina) dissolvido em óleo mineral (Gehring *et al.*, 2020). A extração dos ácidos carboxílicos fundamenta-se na criação de um gradiente de pH (5 a 9) e nas suas baixas solubilidades, que facilitam seu transporte

do meio para uma camada de óleo formada na superfície externa da membrana. Sequencialmente, por meio de uma segunda membrana, os ACCM's são novamente extraídos em uma solução alcalina na forma de sal (Cavalcante *et al.*, 2017; Xu *et al.*, 2021). No entanto, o custo do investimento em membranas hidrofóbicas continua a ser um obstáculo para a expansão do processo de pertração (Gehring *et al.*, 2020).

3.6.1.3 Eletrodialise ou membrana de troca iônica

O método de eletrodialise ou membrana de troca iônica fundamenta-se na separação e concentração da solução eletrolítica, com base na migração direcional de íons sob o campo elétrico e na permeabilidade seletiva da membrana de troca iônica (Dong *et al.*, 2023). Dessa forma, a criação de um gradiente de pH entre o cátodo (pH de 9-10, devido à produção de íons hidroxila) e ânodo (pH de 1-2, devido a produção de prótons), emprega a utilização da energia elétrica em substituição a adição de produtos químicos na extração dos ACCM's (Andersen *et al.*, 2015).

3.7 CONSIDERAÇÕES FINAIS SOBRE A REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A presente revisão bibliográfica foi fundamental na compreensão das principais rotas (β -oxidação reversa e biossíntese de ácidos graxos), parâmetros (temperatura, pH, pressão parcial de hidrogênio, adição de inibidores e aditivos, TDH etc.) e microrganismos (*Clostridium Kluyveri*, *Megasphaera elsdenii*, *Ruminococcaceae CPB6* etc.) relacionados a produção biológica de ácido capróico a partir de diferentes substratos sintéticos e naturais.

Como já citado ao longo do texto, o ácido capróico oferece uma ampla variedade de aplicações potenciais no mercado como agente antimicrobiano na indústria farmacêutica, aditivo na ração animal e matéria-prima para a produção de aromatizantes, bioplásticos e combustíveis para aviação. A partir da análise dos diferentes estudos mencionados, verifica-se a necessidade da garantia da viabilidade produtiva e econômica nos reatores caprogênicos para maiores escalas com a utilização de culturas mistas.

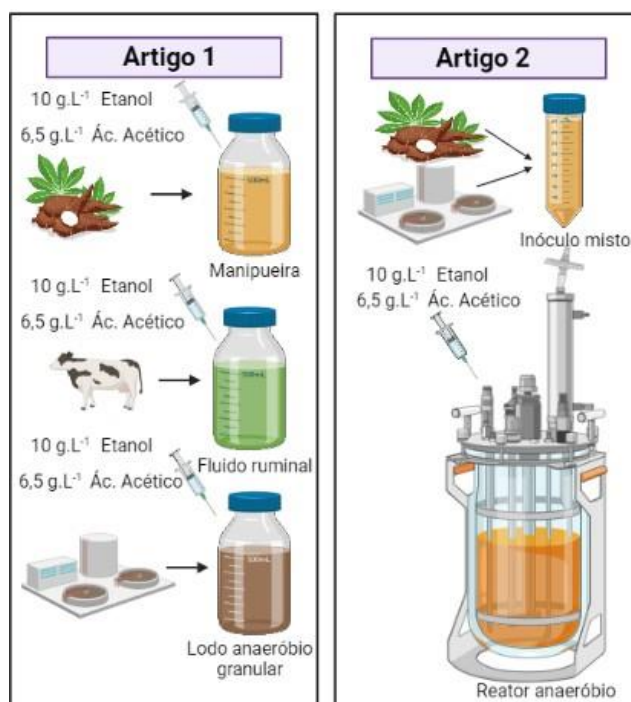
Entre os principais obstáculos relacionados a difusão e desenvolvimento do processo de alongamento da cadeia, podem-se citar os seguintes: (i) complexa

estrutura dos microbiomas anaeróbios; (ii) presença de vias metabólicas competitivas no meio (ex: metanogênese acetotrófica e hidrogenotrófica, sulfetogênese etc.) (iii) alto custo de inibidores químicos; (iv) toxicidade dos produtos gerados nas formas não-dissociadas e, (v) viabilidade das técnicas de extração do meio fermentativo.

Dessa forma, o objetivo do presente estudo foi investigar a produção de ácido capróico a partir de ácido acético e etanol por meio da utilização de diferentes inóculos (fluido ruminal, lodo granular anaeróbio e manipueira), separadamente ou em consórcio, em reatores em batelada com duas diferentes escalas (reatores de 0,6 L – Artigo 1 e reator anaeróbio de 7 L – Artigo 2).

Os experimentos do presente estudo foram conduzidos a partir de testes em batelada (Figura 4), com os resultados apresentados em formato de artigo. No experimento ou artigo 1, três inóculos (fluido ruminal, lodo granular anaeróbio e manipueira) foram avaliados em relação a produção de ácido capróico, parâmetros cinéticos e análises microbianas a partir de etanol e ácido acético como substratos. No experimento ou artigo 2, a produção de ácido capróico, parâmetros cinéticos e análises microbianas foram avaliadas em uma escala maior, a partir de um reator anaeróbio de 7 L, com uma mistura de inóculos (manipueira e lodo granular anaeróbio) a partir dos mesmos substratos sintéticos (etanol e ácido acético) do artigo 1.

Figura 4 - Representação esquemática dos experimentos realizados no presente estudo



Fonte: O Autor (2023).

4 ARTIGO 1: PERCEPÇÕES SOBRE O ALONGAMENTO DA CADEIA DE CARBONO, COMUNIDADE MICROBIANA E VIABILIDADE PARA PRODUÇÃO DE ÁCIDO CAPRÓICO A PARTIR DE DIFERENTES INÓCULOS

Nesta seção, estão descritos os experimentos executados com vista a avaliar o desempenho de três diferentes inóculos (fluido ruminal, lodo granular anaeróbio e manipueira) na produção de ácido capróico utilizando etanol e ácido acético. O artigo encontra-se em processo de submissão ao periódico *Environmental Science & Pollution research*, com o título: *Insights into carbon chain elongation, microbial community and viability for caproic acid production from different inocula*, sob autoria de Devson Paulo Palma Gomes, Thaise de Souza Santos, Fabrício Motteran, Mario T. Kato, Lourdinha Florêncio, Bruna Fernandes, Simone Machado e Sália Gavazza.

4.1 RESUMO

O processo de alongamento da cadeia de carbono para a produção de ácidos carboxílicos de cadeia média – ACCM's, como o ácido capróico, destaca-se como uma importante ferramenta para agregar valor à resíduos e subprodutos sintéticos e naturais. O ácido capróico tem várias aplicações no mercado como, por exemplo, agente antimicrobiano na indústria farmacêutica, aditivo para ração animal e matéria-prima para produção de flavorizantes, combustível de aviação, biocombustíveis e bioplásticos. Nesse contexto, este trabalho teve como objetivo avaliar o desempenho de três diferentes inóculos (fluido ruminal, lodo granular anaeróbio e manipueira) na produção de ácido capróico a partir de etanol e ácido acético. Os reatores anaeróbios (0,610 L), contendo os três inóculos individualmente, foram testados em três bateladas sequenciais alimentadas (B-I, B-II e B-III) de 12 dias cada, com etanol (10,0 g.L⁻¹) e ácido acético (6,5 g.L⁻¹) como substratos. A metanogênese foi inibida com a utilização do ácido 2-bromoetanossulfônico (2-BES). Ao final da terceira batelada, a maior concentração de ácido capróico foi obtida do reator inoculado com lodo granular anaeróbio (10,1 g.L⁻¹), seguido da manipueira (9,6 g.L⁻¹) e fluido ruminal (9,1 g.L⁻¹). As análises microbianas revelaram maior dominância do filo *Firmicutes* e maior abundância relativa do gênero *Clostridium sensu stricto 12* nos reatores, justificando a alta geração de ácido capróico a partir dos três inóculos. Experimentos futuros deverão abordar a viabilidade produtiva e econômica da produção de ácido capróico

a partir de diferentes tipos de resíduos (resíduos de alimentos, gramíneas, bebidas alcoólicas etc.) e escalas (piloto e industrial) com a utilização do processo de alongamento da cadeia de carbono.

Palavras-chave: ácidos carboxílicos de cadeia média; ácido capróico; culturas mistas; biologia molecular.

4.2 INTRODUÇÃO

No campo das aplicações destinadas ao aproveitamento da produção biológica de combustíveis e subprodutos químicos com alto valor agregado, o processo de alongamento da cadeia de carbono (ou plataforma carboxilato) vem se tornando uma opção viável por não requerer condições estéreis, culturas puras e substratos específicos para sua implementação (Grootscholten *et al.*, 2013a; Menon; Lyng, 2021).

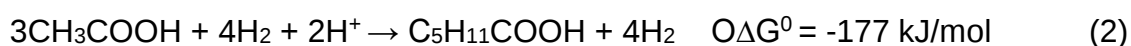
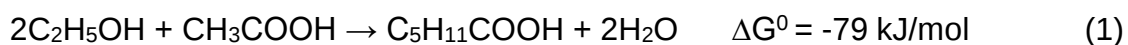
O processo de alongamento da cadeia de carbono é alcançado mediante a via β -oxidação reversa (RBO) ou via biossíntese de ácidos graxos (FAB), entre ácidos carboxílicos de cadeia curta (ACCC's) (ex: ácido acético e butírico) e doadores de elétrons (ex: etanol, hidrogênio e lactato). Como resultado, têm-se a formação de ácidos carboxílicos de cadeia média (ACCM's), como por exemplo, o ácido capróico e o caprilato (Spirito *et al.*, 2014).

Os ácidos carboxílicos de cadeia média (ACCM's) (C₆-C₁₂) possuem cadeia de carbono mais longa, menor proporção oxigênio-carbono e menor solubilidade em água (solubilidade do ácido capróico, 10,8 g.L⁻¹; ácido heptanóico, 2,4 g.L⁻¹; e ácido caprílico, 0,7 g.L⁻¹ nas suas formas não-dissociadas) em relação aos ACCC's (Gazzola *et al.*, 2022; Kim *et al.*, 2022). Dessa forma, os ACCM's apresentam maior poder calorífico que os ACCC's, o que facilita sua extração do meio fermentativo, tornando-se assim vantajosos intermediários para geração de produtos químicos e combustíveis (Steinbusch *et al.*, 2011).

O ácido capróico, caproato (forma dissociada) ou ácido hexanóico (C₅H₁₁COOH) apresenta um amplo potencial de aplicação no mercado como, por exemplo, agente antimicrobiano verde na indústria farmacêutica, aditivo na alimentação animal, precursor químico para produção de compostos flavorizantes,

combustíveis de aviação e bioplásticos (Cheng *et al.*, 2018; Duber *et al.*, 2018). As equações 1 e 2 mostram as vias metabólicas responsáveis pela geração de ácido capróico a partir de etanol, hidrogênio e ácido acético (Yin *et al.*, 2017).

A viabilidade da adição de etanol como doador de elétrons para a reação mostrada na Equação 1 é justificada, pois o poder calorífico de 1 mol de ácido capróico (3452 kJ) é superior ao de 2 mols de etanol (2638 kJ), necessários para produção de ácido capróico (Steinbusch *et al.*, 2011). Do ponto de vista econômico, o ácido capróico apresenta um preço de mercado de aproximadamente USD \$2500-3000/ton, que é entre três e quatro vezes maior que o do acetato (USD \$400-900/ton) e do etanol (USD \$600-800/ton) (Cavalcante *et al.*, 2017; Wu *et al.*, 2022c).



O microrganismo *Clostridium kluyveri* é frequentemente citado na literatura como responsável pela geração de ACCM's em reatores anaeróbios através de culturas puras e mistas. De acordo com Barker *et al.* (1945), o *Clostridium kluyveri* foi um dos primeiros microrganismos identificados com a capacidade de promover a formação de ácido capróico, utilizando ácido acético e etanol como fonte de energia e carbono. Outros microrganismos tais como *Megasphaera elsdenii*, *Ruminococcaceae bacterium CPB6*, *Eubacterium limosum* e *pyruvativorans*, *Caproiciproducens galactitolivorans* e *Enterococcus casseliflavus*, também podem ser incluídos com a habilidade de síntese de ácido capróico com base em diversos estudos empregando diferentes substratos (lactato, açúcares, aminoácidos, syngas etc.) (Tabela 1) (Candry; Ganigué, 2021; Luo *et al.*, 2022; Wang; Yin, 2022).

Espera-se que com a crescente busca por novos substratos e inóculos para geração de ACCM's, novos microrganismos que tenham a habilidade de realizar o alongamento da cadeia de carbono sejam identificados. Por exemplo, nos primeiros meses do ano de 2020 foram isoladas cinco novas bactérias produtoras de ACCM's (*Caproicibacter fermentans*; *Clostridium sp. BL-3*, *Clostridium sp. BL-4*, *Clostridium sp. BL-6*, *Caproiciproducens sp. 7D4C2*), provenientes de reatores anaeróbios (Stamatopoulou *et al.*, 202

Tabela 1 - Estudos referentes à produção de ácido capróico com diferentes microrganismos

Substratos	Inóculo	Microrganismo	Conc. de ácido capróico (g.L ⁻¹)	Referência
Acetato e etanol	Lodo de canal	<i>C. kluyveri</i>	8,4	Barker e Taha (1942)
Acetato, hidrogênio e etanol	Lodo anaeróbico	<i>C. kluyveri</i>	8,2	Steinbusch et al. (2011)
Biomassa celulósica e etanol	Rúmen bovino	<i>C. kluyveri</i>	6,1	Weimer et al. (2015)
Acetato, butirato e frutose	Rúmen bovino	<i>M. elsdenii</i>	9,7	Jeon et al. (2016)
Lactato, butirato e sucrose	Cultura pura	<i>R. bacterium</i>	16,8	Zhu et al. (2017)
Aminoácidos, peptídeos e piruvato	Rúmen ovino	<i>E. pyruvativorans</i>	1,5	Wallace et al. (2004)
Glicose e galactitol	Lodo anaeróbico	<i>C. galactitolivorans</i>	32,0	Jeon et al. (2013)

Fonte: O Autor (2023).

Dessa forma, recomenda-se a utilização de culturas mistas como inóculos, pois não necessitam de esterilização, apresentam maior diversidade de fontes de substratos, facilidade de controle operacional e possibilidade de interações sintróficas entre os microrganismos (Cavalcante *et al.*, 2017; Mariën *et al.*, 2022). Gavazza *et al.* (2020) apontaram que a manipueira pode fornecer cerca de 7,2 g.L⁻¹ de ácido capróico por meio da autofermentação com adição de etanol, porém não foram feitas análises relativas à diversidade e o papel dos microrganismos presentes no seu microbioma. Villegas e Buitrón (2020), ao avaliarem a utilização de diferentes inóculos em relação a geração de ACCM's, obtiveram uma alta taxa volumétrica e específica de produção de ácido capróico (263,0 g ácido capróico.L⁻¹.d⁻¹ e 13,0 g.g de sólidos totais⁻¹.d⁻¹), a partir de efluentes oriundos de vinícolas.

Nesse contexto, o presente estudo teve como objetivo avaliar o potencial para geração de ácido capróico por meio de três inóculos (fluido ruminal, lodo granular anaeróbico e manipueira), seus parâmetros cinéticos e suas respectivas comunidades

microbianas, a partir da utilização de substratos sintéticos (ácido acético e etanol) ao longo de três bateladas sequenciais (B-I, B-II e B-III).

4.3 MATERIAIS E MÉTODOS

Para avaliar o desempenho dos três inóculos na produção de ácido capróico a partir de etanol e ácido acético, os reatores anaeróbios foram testados em 3 bateladas sequenciais de 12 dias cada, conforme descrito abaixo:

4.3.1 Características dos inóculos

Os três inóculos testados e os pré-tratamentos realizados no presente experimento foram os seguintes: 1) Fluido ruminal (Peneiramento - peneiras com granulometria de 16 mesh, centrifugação a 5000 rpm durante 10 minutos e retirada do sobrenadante), oriundo de um abatedouro bovino; 2) Lodo granular anaeróbio, proveniente de um reator de circulação interna (IC) localizado em uma estação de tratamento de efluentes de uma cervejaria; 3) Manipueira (Fermentação durante 4 dias a 28 °C, filtração - filtros de papel número 103, centrifugação a 5000 rpm durante 10 minutos e retirada do sobrenadante), proveniente de uma casa de farinha em Taquarana, Alagoas, Brasil. A Tabela 2 apresenta a caracterização dos inóculos citados:

Tabela 2 - Caracterização dos inóculos utilizados no experimento

Inóculo	DQO* (mg.L ⁻¹)	pH	ST** (mg.L ⁻¹)	SV*** (mg.L ⁻¹)	SF**** (mg.L ⁻¹)
Fluido ruminal	37.069,0±3.405,2	5,9±0,2	20,7±0,5	13,4±0,2	7,3±1,4
Lodo anaeróbio	60.317,1±1.256,9	8,4±0,1	43,9±0,5	35,3±2,4	8,5±1,5
Manipueira	24.771,76±1.854,6	3,3±0,2	212,2±0,3	185,3±1,8	26,9±1,43

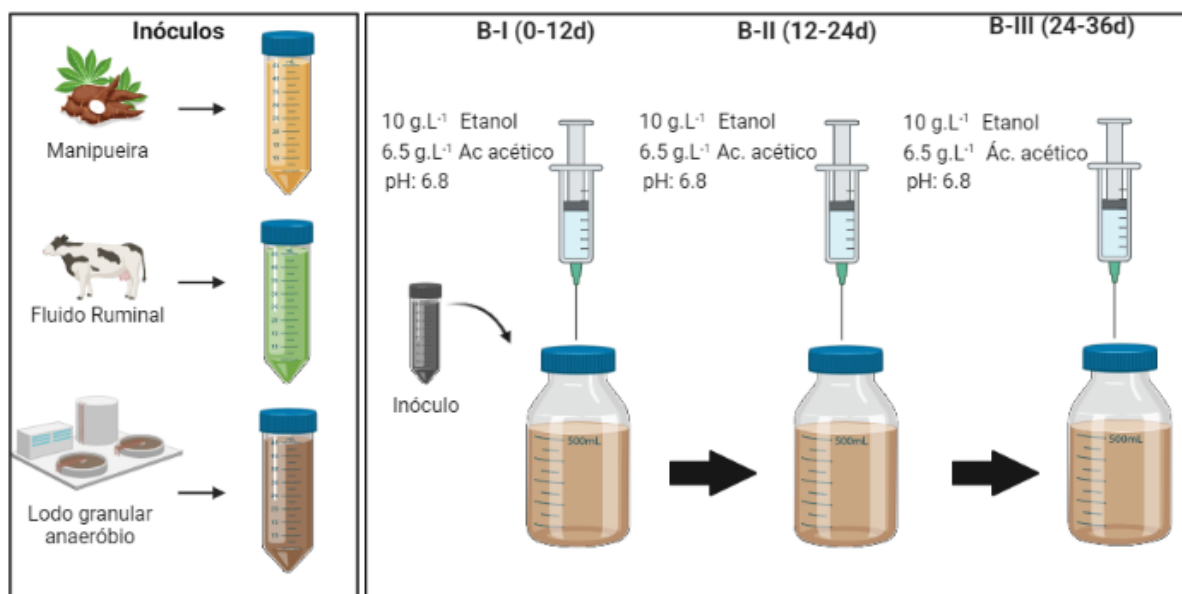
DQO* – Demanda Química de Oxigênio, ST** – Sólidos Totais, SV*** – Sólidos Voláteis, SF**** – Sólidos Fixos

Fonte: O Autor (2023).

4.3.2 Método experimental

Os testes foram realizados em reatores constituídos por frascos de vidro do tipo Duran (*Wertheim, Main, Germany*), com volume total de 610 mL e volume útil de 426 mL, selados com rolhas de borracha butílica e tampas de plástico. O meio sintético utilizado como substrato foi composto por etanol (EtOH) ($10,0 \text{ g.L}^{-1}$) e ácido acético (AcOH) ($6,5 \text{ g.L}^{-1}$), em uma razão estequiométrica de EtOH/AcOH igual a 2:1 (segundo Cavalcante *et al.* 2017 e Liu *et al.* 2016). Adicionou-se solução de macro e microminerais, conforme Veras *et al.* (2020), tampão de bicarbonato de sódio ($2,4 \text{ g.L}^{-1}$) e pH ajustado para 6,8 por meio da adição de NaOH (1 M) e HCl (1 M). Os reatores foram inoculados com uma concentração final de 1 g ST.L^{-1} no licor misto para cada microbioma, e o gás nitrogênio (100% N_2) foi purgado por 120 s para garantir condições anaeróbias, além de serem mantidos a uma temperatura de $30 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ e agitação de 100 rpm (Roghair *et al.*, 2018a; Yu *et al.*, 2019). O ácido 2-bromoetanosulfônico (2-BES) ($1,0 \text{ g.L}^{-1}$) foi utilizado como inibidor da metanogênese (adaptado de Steinbusch *et al.*, 2011). Os reatores foram montados em triplicata e receberam 3 alimentações em bateladas sequenciais, com duração de 12 dias cada, nomeadas como B-I, B-II e B-III (Figura 1).

Figura 1 - Representação esquemática dos reatores nas três bateladas (B-I, B-II e B-III)



Fonte: O Autor (2023)

4.3.3 Métodos Analíticos

Para a determinação dos álcoois e dos ácidos carboxílicos, as amostras foram centrifugadas (9300 g, 5 minutos) e o sobrenadante foi filtrado em uma membrana de nitrocelulose (0,45 µm) (Grootscholten *et al.*, 2013a). A concentração de álcoois e açúcares foi medida através de um HPLC – *High-performance liquid chromatography*, acoplado a um detector de índice de refração modelo LC-20AT (Shimadzu). A coluna utilizada foi uma Aminex HPX-87H (300m x 7,8 mm) com fase móvel de ácido sulfúrico de 5 mM, fluxo de 0,6 mL.min⁻¹ e temperatura do forno igual a 40 °C. Os ácidos carboxílicos foram analisados por um cromatógrafo a gás com detector de ionização de chama (GC-FID) modelo 7890 A – Agilent equipado com coluna DB-WAXetr (30 m x 0,53 mm). Demais parâmetros como pH, ST e DQO foram analisados de acordo com as metodologias descritas no *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* (APHA, 2012).

4.3.4 Análise cinética

Os parâmetros cinéticos do alongamento de cadeia dos reatores foram analisados através do software *Origin Pro* (*OriginLab Corporation*, versão 2022). O potencial máximo de produção de ácido capróico (P), a taxa máxima de produção de ácido capróico (R_m) e a duração da fase de adaptação (λ) foram determinados a partir do modelo de regressão de Gompertz modificado, indicado na Equação 8 (Wang *et al.*, 2022):

$$H = P_{\text{exp}} \left\{ -\exp \left[(\lambda - t) R_m \frac{e}{P} + 1 \right] \right\} \quad (8)$$

Onde H é a produção acumulada de ácido capróico (g.L⁻¹), P é o potencial máximo de produção de ácido capróico (g.L⁻¹), R_m é a taxa máxima de produção de ácido capróico (g.L⁻¹.d⁻¹), λ é o intervalo de tempo (fase *lag*) necessário para o início da produção exponencial de ácido capróico (d) e t é o tempo de experimento (d).

4.3.5 Análise da comunidade microbiana

Amostras do licor misto coletadas no início do experimento (inóculo) e no final de cada batelada para todos os reatores foram caracterizadas em relação a sua composição microbiana. Para a amostragem, foram coletados 15 mL do licor misto em tubos de cada uma das triplicatas, em ambiente anaeróbio (Glovebox), totalizando 45 mL de cada inóculo, que posteriormente foram centrifugadas e filtradas. Para extração do DNA, foi utilizado o kit *PowerSoil* (Mo Bio Laboratories Inc. Carlsbad, CA), de acordo com as instruções do fabricante. As concentrações de DNA em cada amostra foram determinadas por meio da leitura em *Nanodrop 2000 Espectrophotometer* (Thermo Scientific, USA). Os índices de diversidade de Shannon e de dominância foram calculados utilizando o software PAST (versão 4).

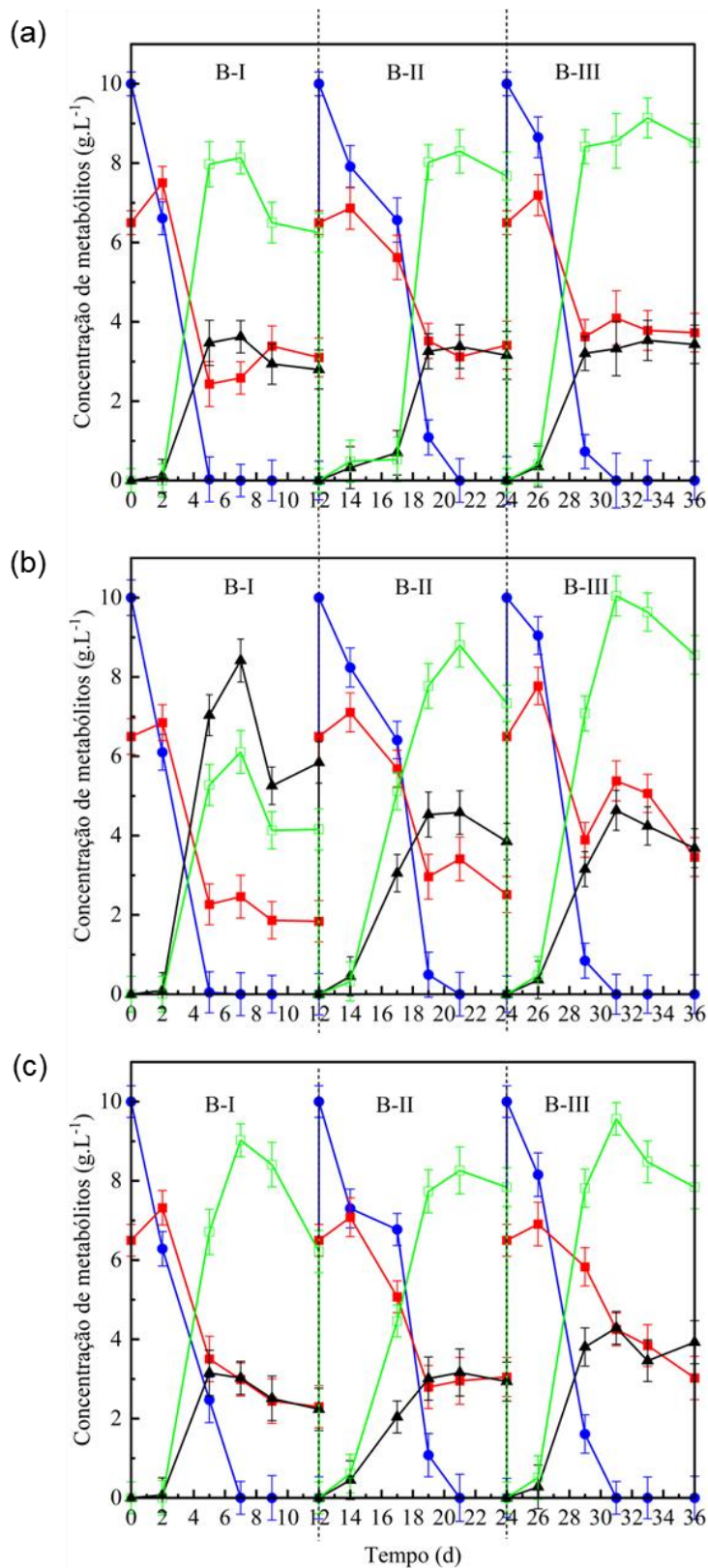
4.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.4.1 Produção de ácido capróico e variação de pH nas três bateladas

As concentrações de substratos consumidos e metabólitos produzidos durante as três bateladas (B-I, B-II e B-III) para cada inóculo são apresentadas na Figura 2. Durante a primeira batelada - B-I (0 - 12 dias – Figura 2), a produção de ácido capróico teve início após quatro dias de experimento para todos os inóculos, revelando uma rápida adaptação dos microrganismos, como descrito por Fernando-Foncillas e Varrone (2021), Gavazza *et al.* (2020) e Weimer *et al.* (2015). Similarmente aos experimentos de Ma *et al.* (2021) e Grootscholten *et al.* (2014), o etanol foi convertido em ácido acético nos três primeiros dias em detrimento da geração de ACCM's, provavelmente por bactérias acetogênicas oxidadoras de etanol.

O pico de produção de ácido capróico foi alcançado após sete dias para todos os inóculos, mediante ao consumo total de etanol e parcial de ácido acético, com a manipueira apresentando o maior valor (9,0 g.L⁻¹ – Figura 2c), seguido pelo fluido ruminal (8,1 g.L⁻¹ – Figura 2a) e pelo lodo granular anaeróbio (6,1 g.L⁻¹ – Figura 2b). Gavazza *et al.* (2020), por meio da autofermentação de uma concentração de 20,0 g DQO.L⁻¹ de manipueira com adição externa de etanol, produziram uma concentração máxima de 7,2 g.L⁻¹ de ácido capróico.

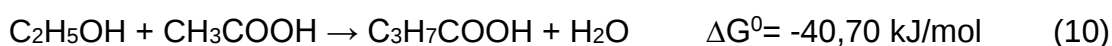
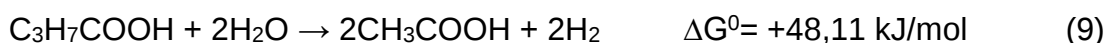
Figura 2 - Produção de metabólitos em função do tempo para os diferentes inóculos. (a) fluido ruminal; (b) lodo granular anaeróbico; (c) manipueira. (●) etanol; (■) ácido acético; (▲) ácido butírico; (◻) ácido capróico



Fonte: O Autor (2023).

A menor produção de ácido capróico e, em contrapartida, a alta produção de ácido butírico (8,4 g.L⁻¹) obtida para o lodo granular anaeróbio (Figura 2b), em relação aos outros inóculos, pode ser justificada pela origem do inóculo que operava sob condições metanogênicas em uma estação de tratamento de efluentes de cervejaria.

A inibição da metanogênese por meio do uso do 2-BES deve ter reduzido a atividade de microrganismos metanogênicos consumidores de hidrogênio, aumentando a pressão parcial do gás no *headspace*, deslocando a reação ou equação 9 para a esquerda, provocando assim, a produção de ácido butírico. Isso pode ter favorecido também a primeira etapa do alongamento da cadeia, devido ao consumo total de etanol e parcial de ácido acético (Equação 10).

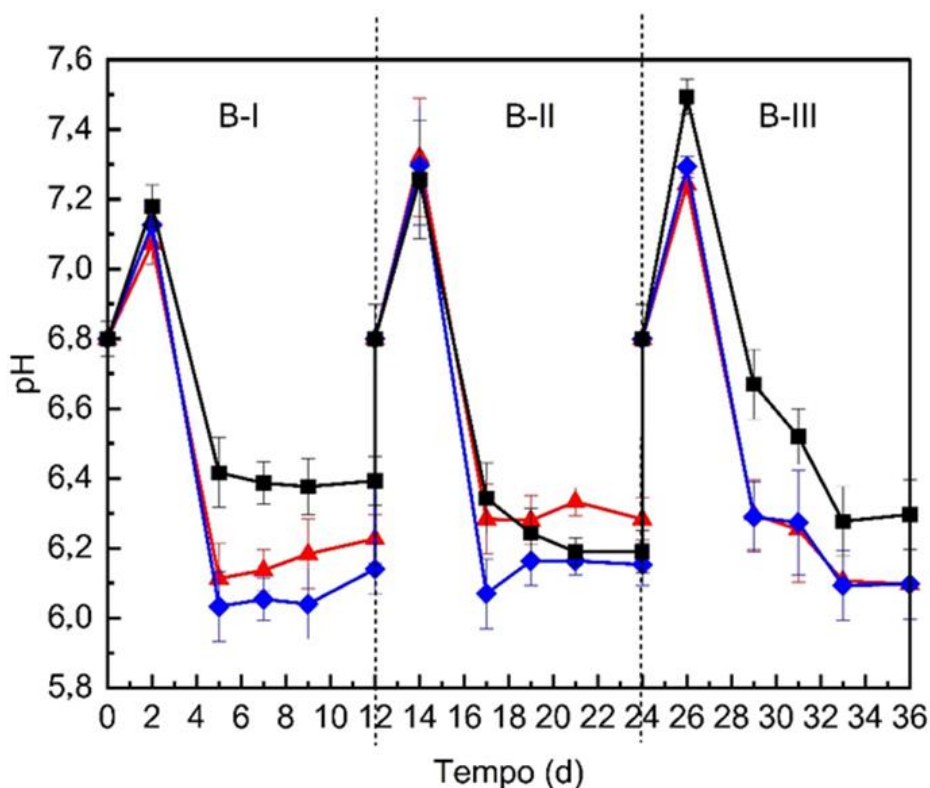


O pH é um dos principais parâmetros responsáveis pela ativação e manutenção do processo de alongamento da cadeia de carbono (Holtzaple *et al.*, 2022). Os valores de pH observados ao longo do experimento para os três inóculos durante as três bateladas podem ser vistos na Figura 3.

A maioria dos estudos indicam que os maiores valores de síntese de ácido capróico ocorrem próximo ao pH neutro, em função da menor toxicidade aos microrganismos da forma dissociada do ácido capróico (C₅H₁₁COO⁻) em relação a não-dissociada (C₅H₁₁COOH) (Lonkar *et al.*, 2016; San-Valero *et al.*, 2020).

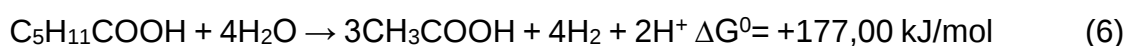
Os níveis de tolerância dos microrganismos alongadores de cadeia, em relação aos ácidos não-dissociados, variam de acordo com a sua resistência à toxicidade e condições específicas de pH (Duber *et al.*, 2018). Ge *et al.* (2015), por meio da utilização de um biorreator alimentado com efluentes de cervejaria, concluíram que a concentração limite de ácido capróico não-dissociado é de 0,9 g.L⁻¹ para um pH igual a 5,5, a fim de evitar a inibição completa do alongamento da cadeia. Vasudevan *et al.* (2014) relataram um valor ainda menor de ácido capróico não-dissociado (0,2 g.L⁻¹) como limite de tolerância.

Figura 3 - Variação do pH nos três inóculos durante o experimento. (—▲—) Fluido ruminal; (—◆—) Lodo granular anaeróbico; (—■—) Manipueira



Fonte: O Autor (2023).

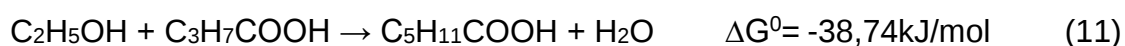
Ao final da B-I (Figura 3), com a diminuição do pH para 6,1 (fluido ruminal), 6,0 (lodo granular anaeróbico) e 6,4 (água residual da mandioca), a maior concentração de ácidos carboxílicos não-dissociados ($0,45 \text{ g.L}^{-1}$ para fluido ruminal, $0,4 \text{ g.L}^{-1}$ para lodo granular anaeróbico e $0,3 \text{ g.L}^{-1}$ para manipueira) e seus efeitos citotóxicos em conjunto com a depleção total do etanol, conduziram à redução na geração de ácido capróico e, posteriormente, sua oxidação para ácido acético (Equação 6).



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

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

Dessa forma, os resultados da B-II refletem a seleção e, principalmente, a adaptação e o predomínio dos microrganismos responsáveis pelo alongamento da cadeia de carbono no lodo granular anaeróbio, com o aumento do consumo de ácido butírico e, conseqüentemente, a produção de ácido capróico de acordo com a Equação 11.



Entre as condições ambientais que podem ter favorecido o processo de alongamento da cadeia de carbono nos inóculos, podem-se citar a adição do 2-BES (inibição da metanogênese), o pH próximo a neutralidade e a faixa ótima de temperatura (30 ± 1 °C), além da relação adequada de EtOH: AcOH.

O pH na B-II diminui novamente até valores próximos a 6,0, de forma similar a B-I, restringindo a atividade dos microrganismos alongadores de cadeia em razão do aumento da toxicidade dos ácidos carboxílicos na sua forma não-dissociada e depleção total do etanol (Figura 3) (Wu *et al.*, 2020).

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

Neste experimento, a produção máxima igual a $10,1 \text{ g.L}^{-1}$ de ácido capróico obtida na B-III a partir do lodo granular anaeróbio, foi próxima da sua máxima solubilidade em água ($10,8 \text{ g.L}^{-1}$) em baixos valores de pH próximos ao pKa. Esse resultado aponta para a possibilidade da separação e extração de ácido capróico através de diferentes técnicas físico-químicas como extração líquido-líquido, extração baseada em membrana e adsorção de resina de troca aniônica (Wang; Yin, 2022).

Além da possibilidade de extração, ressalta-se que uma maior geração de ácido capróico pode ter sido limitada devido à rápida depleção do etanol, que ocorreu no sétimo dia de experimento, em conjunto com o aumento da toxicidade dos ácidos não-dissociados aos inóculos (Steinbusch *et al.*, 2011). Vale salientar que os ácidos propiônico (C_3) e valérico (C_5) foram detectados em baixas concentrações ($<1 \text{ g.L}^{-1}$) ao longo do experimento, pois são mais comumente produzidos quando o lactato é utilizado como doador de elétrons.

Portanto, os resultados deste experimento indicam uma boa capacidade de alongamento da cadeia de carbono para produção de ácido capróico pelos três inóculos testados nas três bateladas sequenciais. Recomenda-se a ampliação da escala (piloto e industrial) para reatores em batelada ou contínuos associados as técnicas de extração em linha, com a finalidade de garantir uma produção estável de ACCM's e diminuição da toxicidade das suas formas não-dissociadas.

4.4.2 Análise cinética do alongamento de cadeia

O modelo de crescimento de Gompertz modificado foi uma ferramenta para prever a síntese de ácido capróico com base nos dados experimentais da produção cumulativa de n-caproato, recomendado por Zuo *et al.* (2020).

A Tabela 3 mostra que os maiores valores do potencial máximo de produção de ácido capróico (P) encontram-se na B-III nos três inóculos testados, indicando uma crescente adaptabilidade dos microbiomas em relação às condições operacionais do experimento.

Tabela 3 - Parâmetros cinéticos da produção de ácido capróico durante o alongamento da cadeia

Batelada	Inóculo	P (g.L ⁻¹)	Rm (g.L ⁻¹ .d ⁻¹)	λ (d)	R ²
B-I	Fluido Ruminal	7,2	63,2	3,0	0,96
	Lodo anaeróbico	4,9	38,1	2,1	0,92
	Manipueira	7,9	22,1	4,6	0,94
B-II	Fluido Ruminal	8,0	29,0	5,0	0,99
	Lodo anaeróbico	8,0	4,4	3,8	0,98
	Manipueira	8,0	4,2	3,9	0,99
B-III	Fluido Ruminal	8,7	4,6	2,1	0,99
	Lodo anaeróbico	9,4	25,9	4,7	0,99
	Manipueira	8,6	23,7	4,6	0,98

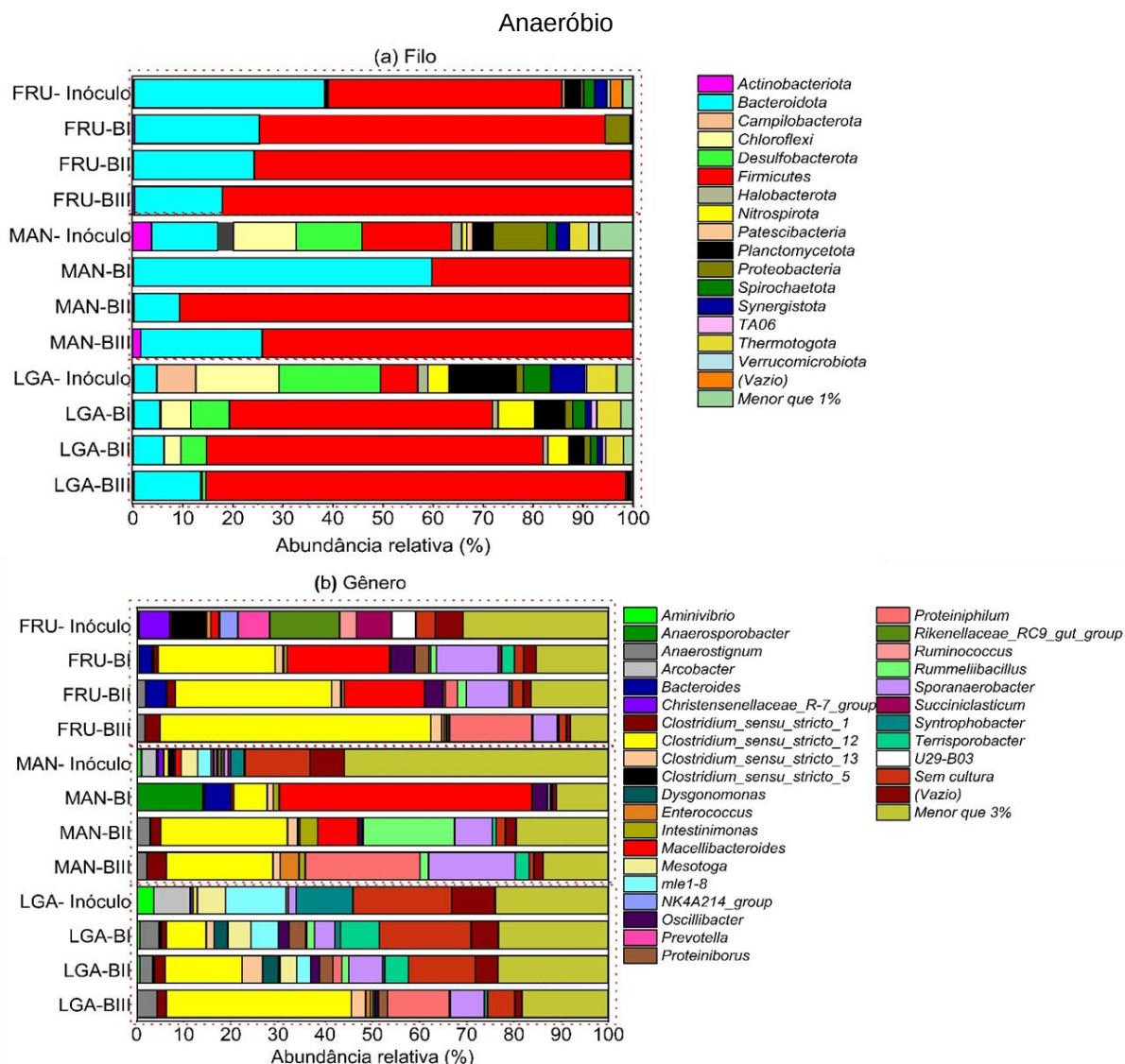
Fonte: O Autor (2023).

Os valores de λ foram inferiores a 5 dias, indicando um curto período de fase *lag*, ou seja, os microrganismos responsáveis pelo alongamento da cadeia foram capazes de se desenvolver rapidamente no início das três bateladas. A fase *lag* foi mais curta no presente experimento (λ = 5 dias) em relação a estudos anteriores com fluido ruminal (λ = 11 dias), manipueira (λ = 7 dias) e lodo granular anaeróbico (λ = 20 dias) (Fernando-Foncillas; Varrone, 2021; Gavazza *et al.*, 2020; Weimer *et al.*, 2015). Isso pode ser atribuído ao uso do inibidor de metanogênese 2-BES, que favoreceu o rápido desenvolvimento e predomínio dos microrganismos alongadores de cadeia.

4.4.3 Análise microbiana

As relações entre as comunidades microbianas desempenham um papel fundamental no processo de alongamento da cadeia de carbono (Han *et al.*, 2018; Robles *et al.*, 2021). A Figura 4 apresenta a estrutura da comunidade microbiana ao nível de filo e gênero para os três inóculos testados, englobando a condição inicial (inóculo) e as três bateladas do experimento (B-I, B-II e B-III). Ao avaliar as condições iniciais dos inóculos, verifica-se uma grande diversidade de filos e gêneros devido as suas diferentes fontes ou origens, principalmente no lodo granular anaeróbico e na manipueira.

Figura 4 - Classificação taxonômica da comunidade microbiana: as abundâncias relativas em filo (a) e gênero (b) nos três inóculos. FRU – Fluido Ruminal, MAN – Manipueira, LGA – Lodo Granular



Fonte: O Autor (2023).

Os filos *Firmicutes*, *Bacteroidota*, *Chloroflexi* e *Synergistota* foram encontrados nos três inóculos e são associados à geração sintrófica de metano, em diferentes microbiomas anaeróbios (Ottoni *et al.*, 2022). *Dessulfobacteriota* e *Campilobacterota*, presentes particularmente na manipueira e no lodo granular anaeróbio, relacionam-se ao ciclo do enxofre por abrangerem os gêneros *Dessulfomicrobium* (bactérias redutoras de sulfato – BRS) e *Arcobacter* (bactérias oxidantes de enxofre - BOS), respectivamente (Zhai *et al.*, 2022). O filo *Planctomycetota*, aproximadamente 13,4 % no lodo granular anaeróbio nas condições iniciais do experimento, representado por microrganismos da ordem *mle1-8*, geralmente são associados à oxidação anaeróbia de amônio (ANAMMOX), como já relatado por Suarez *et al.* (2022).

Após a terceira batelada, com aplicação do 2-BES (inibidor de metanogênese) e modificações nas condições operacionais (ex: queda do pH, geração de ácidos etc.), constatou-se uma redução na diversidade dos filos e gêneros por meio da diminuição dos valores do índice de diversidade de *Shannon* (Figura 5) e aumento dos valores do índice de dominância (Tabela 4), corroborando assim para uma maior seleção e predomínio dos microrganismos alongadores de cadeia, conforme descrito por Joshi *et al.* (2021).

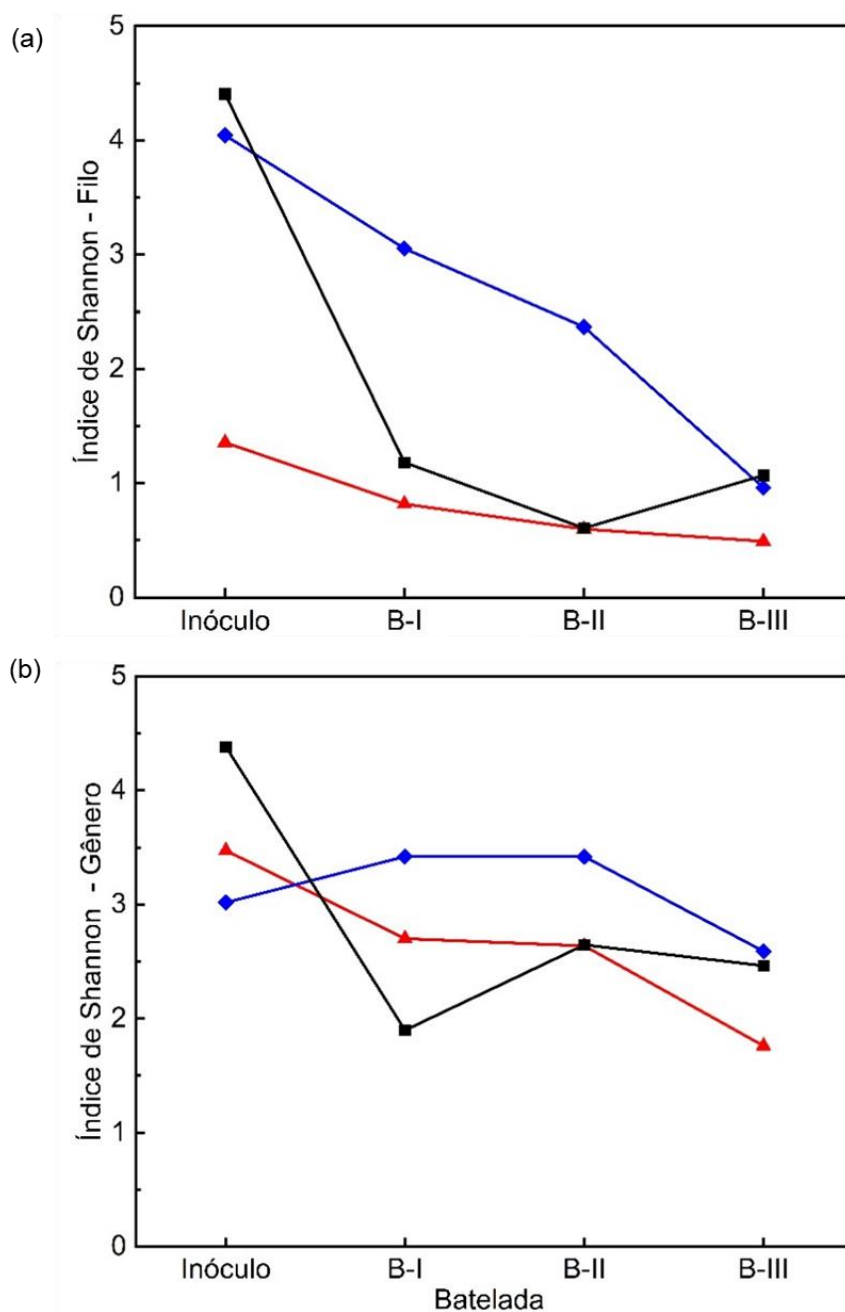
Firmicutes e *Bacteroidota* foram os filos dominantes no final do experimento (B-III) para todos os inóculos testados (Figura 4). O filo *Firmicutes*, particularmente a classe *Clostridia*, é amplamente relacionada à geração de ACCM's, a partir de diferentes reatores (contínuos e em batelada) e substratos (sintéticos e naturais) (San-Valero *et al.*, 2019; Seedorf *et al.*, 2008; Yin *et al.*, 2017). Dessa forma, o aumento na proporção do filo *Firmicutes* de 7,5% para 83,9%, ao final da B-III no lodo granular anaeróbio, pode justificar uma maior geração de ácido capróico (10,1 g.L⁻¹) em relação aos outros inóculos testados.

Entre os principais gêneros do Filo *Firmicutes* associados ao alongamento da cadeia presentes nos microbiomas anaeróbios, o *Clostridium sensu stricto 12* se destaca neste experimento, por apresentar as maiores proporções (57% no fluido ruminal, 22% na manipueira e 40% no lodo granular anaeróbio) (Figura 4), correlacionadas com a produção de altos valores de ácido capróico nos três inóculos (Figura 2). O *Clostridium Kluyveri*, pertencente ao gênero *Clostridium sensu stricto 12*, foi um dos primeiros e mais estudados microrganismos com a capacidade de produção de ácido capróico, mediante a via β – oxidação reversa, principalmente, a partir do etanol como doador de elétrons (Coma *et al.*, 2016; Steinbusch *et al.*, 2011; Yang *et al.*, 2018). Outros gêneros relacionados ao alongamento da cadeia, como *C. sensu stricto 1* e *C. sensu stricto 13*, também foram identificados em pequenas proporções nos inóculos ao longo das bateladas (Wang *et al.*, 2023; Yin *et al.*, 2022).

O filo *Bacteroidota*, representado pelo gênero *Protheoiphilum*, presente nos três inóculos (17% no fluido ruminal, 13% no lodo anaeróbio, 24% na manipueira) ao final da B-III, pode estar relacionado à degradação ou oxidação do ácido capróico para ácido acético, conforme Wang *et al.* (2022), através da via acetogênica, após a depleção completa do etanol disponível. O gênero *Sporanaerobacter*, presente na B-III dos três inóculos (5% no fluido ruminal, 7% no lodo anaeróbio, 18% na manipueira) é correlacionado positivamente a produção indireta de ácido capróico (ex: via

homoacetogênese), exercendo papel fundamental na transferência de elétrons entre as diferentes espécies nos microbiomas, conforme descrito por Zagrodnik *et al.* (2020) e Baleeiro *et al.* (2022).

Figura 5 - Índice de diversidade de Shanon para filo (a) e gênero (b) nos três inóculos. (—▲—) Fluido ruminal; (—◆—) Lodo granular anaeróbico; (—■—) Manipueira



Fonte: O Autor (2023).

Tabela 4 - Índice de dominância para filo e gênero nos três inóculos

Inóculo	Índice de dominância							
	Condição inicial		B-I		B-II		B-III	
	Filo	Gênero	Filo	Gênero	Filo	Gênero	Filo	Gênero
Fluido Ruminal	0,15	0,15	0,16	0,12	0,18	0,12	0,38	0,22
Lodo anaeróbio	0,12	0,34	0,30	0,33	0,46	0,17	0,72	0,17
Manipueira	0,11	0,15	0,52	0,16	0,82	0,18	0,60	0,37

Fonte: O Autor (2023).

4.5 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos no presente estudo indicaram uma alta geração de ácido capróico a partir dos três inóculos testados em relação a outros trabalhos com substratos sintéticos (etanol e ácido acético). A maior produção obtida foi de 10,1 g.L⁻¹ na última batelada (B-III), com o uso do lodo granular anaeróbio como inóculo. A produção máxima de ácido capróico correspondeu a 72,5%, 79,7% e 75,9% do valor teórico dos substratos para os inóculos fluido ruminal, lodo granular anaeróbio e manipueira, respectivamente. Esses valores são decorrentes de um eficiente processo de adaptação microbiana, através do uso do inibidor de metanogênese 2-BES, do pH inicial próximo ao neutro e de uma razão apropriada entre os substratos sintéticos (etanol e ácido acético).

As análises microbianas refletiram bem o processo de adaptação dos microrganismos às condições operacionais voltadas à geração de ácido capróico, com a dominância do gênero *Clostridium sensu stricto 12* do filo *Firmicutes*, reconhecidamente produtor de ACCM's, ao final das bateladas. A abundância relativa do gênero *Clostridium sensu stricto 12*, da condição inicial até a última batelada (B-III), passou de 0,1% para 57,4%, de 0,9 % a 39,2%, e de 1,0% a 22,5%, para os inóculos fluido ruminal, lodo granular anaeróbio e manipueira, respectivamente.

Experimentos futuros deverão abordar o aumento gradual da escala para reatores em batelada ou contínuos seguidos por técnicas de extração em linha, com o objetivo de garantir uma produção estável de ácido capróico e diminuição da

toxicidade de sua forma não-dissociada. Além disso, ressalta-se a necessidade de estudos relacionados a substituição do uso de inibidores químicos (2-BES) e substratos sintéticos em razão dos seus altos custos, com o intuito de garantir a viabilidade econômica da produção biológica de ácido capróico.

5 ARTIGO 2: MANIPUEIRA E LODO GRANULAR ANAERÓBIO COMO INÓCULO MISTO PARA PRODUÇÃO DE ÁCIDO CAPRÓICO

As informações contidas nesta seção serão publicadas em um periódico (a definir), com título: *Production of caproic acid in a scaled-up batch reactor using a mixed culture from granular anaerobic sludge and cassava wastewater*.

5.1 RESUMO

O ácido capróico ($C_5H_{11}COOH$) possui um amplo potencial de aplicação no mercado como matéria-prima na geração de aditivos, aromatizantes, corantes, lubrificantes, inibidores de corrosão, combustíveis de aviação e bioplásticos etc. O principal obstáculo relacionado à difusão do processo de alongamento da cadeia para produção de ácido capróico, reside na sua viabilidade produtiva e econômica em maiores escalas (piloto e industrial), com a utilização de diferentes culturas mistas. Nesse contexto, o objetivo deste trabalho foi avaliar a produção de ácido capróico a partir de uma mistura de inóculos (lodo granular anaeróbico e manipueira), em um reator anaeróbico (volume de 7 L), com três bateladas sequenciais de 23 dias cada (B-I, B-II e B-III). O substrato sintético utilizado foi composto por etanol ($10,0 \text{ g.L}^{-1}$) e ácido acético ($6,5 \text{ g.L}^{-1}$), com a metanogênese inibida pelo emprego do ácido 2-bromoetanossulfônico (2-BES). A maior concentração de ácido capróico foi atingida ao final da B-II, após o ajuste de pH ($7,8 \text{ g.L}^{-1}$); porém, o ácido butírico foi predominante na B-I ($8,5 \text{ g.L}^{-1}$) e B-III ($8,0 \text{ g.L}^{-1}$). As análises microbianas revelaram o predomínio de microrganismos alongadores de cadeia como *Caproiciproducens*, *Clostridium sensu stricto* 12, *Enterococcus* e *Rummeliibacillus*, nas duas primeiras bateladas. Os resultados demonstraram que o aumento da escala e a utilização de inóculos mistos nos reatores, podem favorecer a uma maior diversidade de microrganismos responsáveis pelo alongamento da cadeia.

Palavras-chave: ácidos carboxílicos de cadeia média; ácido capróico; culturas mistas; reatores anaeróbios; biologia molecular.

5.2 INTRODUÇÃO

O crescimento da população, associado à aceleração da urbanização nos países em desenvolvimento, demandam uma geração sustentável de energia e de *commodities* verdes (produtos químicos), em todo o mundo (Menon; Lyng, 2021; Wang *et al.*, 2023). Atualmente, cerca de 85% de toda energia consumida e grande parte das matérias-primas são obtidas a partir de fontes não-renováveis e poluentes, como carvão, gás natural e óleo (Abdalla *et al.*, 2018; Kiliç Depren *et al.*, 2022). De forma análoga à exploração dos combustíveis fósseis, um dos principais desafios globais consiste no gerenciamento dos resíduos orgânicos, que são produzidos em grandes quantidades e constituem potenciais fontes de degradação ao meio ambiente (Chu *et al.*, 2022; Steinbusch *et al.*, 2011).

Nesse cenário, o processo biotecnológico de alongamento da cadeia de carbono surge como alternativa para valoração ou aproveitamento de resíduos naturais e sintéticos para geração de biocombustíveis e matérias-primas (Brodowski *et al.*, 2020; Wang *et al.*, 2022). O alongamento da cadeia de carbono baseia-se na conversão de ácidos carboxílicos de cadeia curta (ACCC's) (ex: ácido acético e butírico) e doadores de elétrons (ex: etanol, hidrogênio e lactato) em ácidos carboxílicos de cadeia média (ACCM's) (ex: ácido capróico e caprílico) (Spirito *et al.*, 2014; Steinbusch *et al.*, 2011).

Entre as vantagens relacionadas ao alongamento da cadeia a partir de microbiomas anaeróbios, podem-se destacar as seguintes: não requer condições estéreis, culturas puras e substratos específicos para sua aplicação; os produtos gerados (ACCM's) apresentam maior poder calorífico, valor de mercado e facilidade de extração do meio fermentativo em relação aos ACCC's (Agler *et al.*, 2011; Grootscholten *et al.*, 2014).

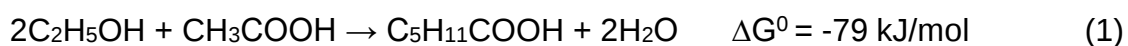
O ácido capróico, por exemplo, possui um amplo potencial de utilização no mercado como agente antimicrobiano na indústria farmacêutica, aditivo na alimentação animal, precursor químico para produção de compostos aromatizantes, corantes, lubrificantes, inibidores de corrosão, combustíveis de aviação e bioplásticos (Chen *et al.*, 2017; Duber *et al.*, 2018).

O principal obstáculo relacionado à difusão do processo de alongamento da cadeia reside na garantia da sua viabilidade produtiva e econômica para reatores em maiores escalas (Zhu *et al.*, 2022). Debergh e Van Dael (2022), através da análise de

viabilidade de um sistema caprogênico em escala piloto com substratos sintéticos (etanol e ácido acético), determinaram que a produtividade de $2,5 \text{ g.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$ e eficiência de conversão de DQO igual a 50% são insuficientes para tornar o processo competitivo com os preços atuais do ácido capróico no mercado.

Entre as principais estratégias que podem ser empregadas para alcançar um aumento na eficiência de conversão dos substratos (ácido acético e etanol) e, conseqüentemente, uma maior geração de ACCM's, destaca-se a minimização ou redução dos seguintes bioprocessos, de acordo com Dong *et al.* (2023) e Zagrodnik *et al.* (2020): (i) oxidação excessiva de etanol, no qual outros microrganismos acetogênicos oxidam o etanol em ACCC's (ácido acético), diminuindo assim a sua disponibilidade para o alongamento da cadeia; (ii) metanogênese acetotrófica, em que se realiza a conversão de ácido acético em metano, diminuindo assim o substrato disponível para o processo de alongamento da cadeia; (iii) oxidação de ACCM's em ácido acético, ocasionando assim a perda dos produtos de interesse (ex: ácido capróico); e (iv) redução de sulfato, realizada por microrganismos considerados anaeróbios estritos, conhecidos como Bactérias Redutoras de Sulfato (BRS), presentes principalmente em substratos ricos em enxofre. A redução de sulfato pode afetar o processo de alongamento da cadeia, pois competem pelos mesmos doadores e aceptores de elétrons (hidrogênio, ácido acético, ácido propiônico e ácido butírico).

Com a inibição das rotas metabólicas mencionadas através da adoção de pré-tratamentos (adição de 2-BES, choque térmico, mudança de pH, redução de TDH etc.), possibilita-se o predomínio das vias metabólicas responsáveis pelo alongamento da cadeia, que incluem a β – oxidação reversa e a biossíntese de ácidos graxos (Kim *et al.*, 2022; Spirito *et al.*, 2014). Por meio de um processo cíclico nas duas vias citadas, dois átomos de carbono são adicionados a uma molécula inicial (ácido acético ou butírico) e, sequencialmente, o ciclo se repete podendo atingir a produção de ACCM's com 6 a 12 carbonos (Equação 1) (Holtzapple *et al.*, 2022; Wang; Yin, 2022).



Diferentes microrganismos apresentam o complexo enzimático necessário para o alongamento da cadeia mediante a via β – oxidação reversa: (a) *C. kluyveri*, San-Valero *et al.* (2019) e Yin *et al.* (2017); (b) *Megasphaera elsdenii*, Choi *et al.* (2013) e Kim *et al.* 2020); (c) *Enterococcus casseliflavus*, Luo *et al.* (2022); (d) *Eubacterium*

pyruvativorans, Wallace *et al.* 2003 e Wallace *et al.* 2004; (e) *Caproiciproducens*, Bengelsdorf *et al.* (2019) e Kim *et al.* (2015); e (f) *Ruminococcaceae bacterium CPB6*, Tao *et al.* 2017 e Wang *et al.* 2018. A via biossíntese de ácidos graxos já foi observada em alguns microrganismos pertencentes a família *Planctomycetaceae*, além da *Methanolinea tarda* e *Bordetella avium*, conforme estudo de Han *et al.* (2018).

Diante desse contexto, este estudo teve como objetivo avaliar a geração de ácido capróico e seus parâmetros cinéticos, a partir de substratos sintéticos (ácido acético e etanol) com a utilização de um inóculo misto (lodo granular anaeróbio e manipueira), em um reator anaeróbio em batelada. Adicionalmente, a comunidade microbiana foi analisada para a condição inicial do inóculo misto e nas três bateladas sequenciais (B-I, B-II e B-III), incluindo após os ajustes de pH nas bateladas B-II e B-III.

5.3 MATERIAIS E MÉTODOS

Para avaliar o desempenho do inóculo misto na produção de ácido capróico a partir de etanol e ácido acético, um reator anaeróbio com volume útil de 4,8 L foi utilizado, em três bateladas sequenciais de 23 dias cada, conforme descrito abaixo:

5.3.1 Caracterização do inóculo

O inóculo utilizado para o presente experimento foi formado por uma mistura de lodo granular anaeróbio e manipueira (razão de ST 1:1), provenientes das seguintes fontes: a) Lodo granular anaeróbio, proveniente de um reator IC localizado em uma estação de tratamento de efluentes de uma cervejaria na cidade de Igarassu, Pernambuco, Brasil. b) Manipueira, proveniente de uma casa de farinha em Taquarana, Alagoas, Brasil. A Tabela 1 apresenta a caracterização dos inóculos citados.

Tabela 1 - Caracterização do inóculo misto utilizado no experimento

Inóculo	DQO* (mg. L ⁻¹)	pH	ST** (mg. L ⁻¹)	SV*** (mg. L ⁻¹)	SF**** (mg.L ⁻¹)
Lodo anaeróbio	60.317,1±1.256,9	8,4±0.1	43,9±0,6	35,38±2,4	8,6±1,6
Manipueira	24.771.7±1.854,6	3,3±0.2	212,2±0,4	185,30±1,80	26,9±1,4

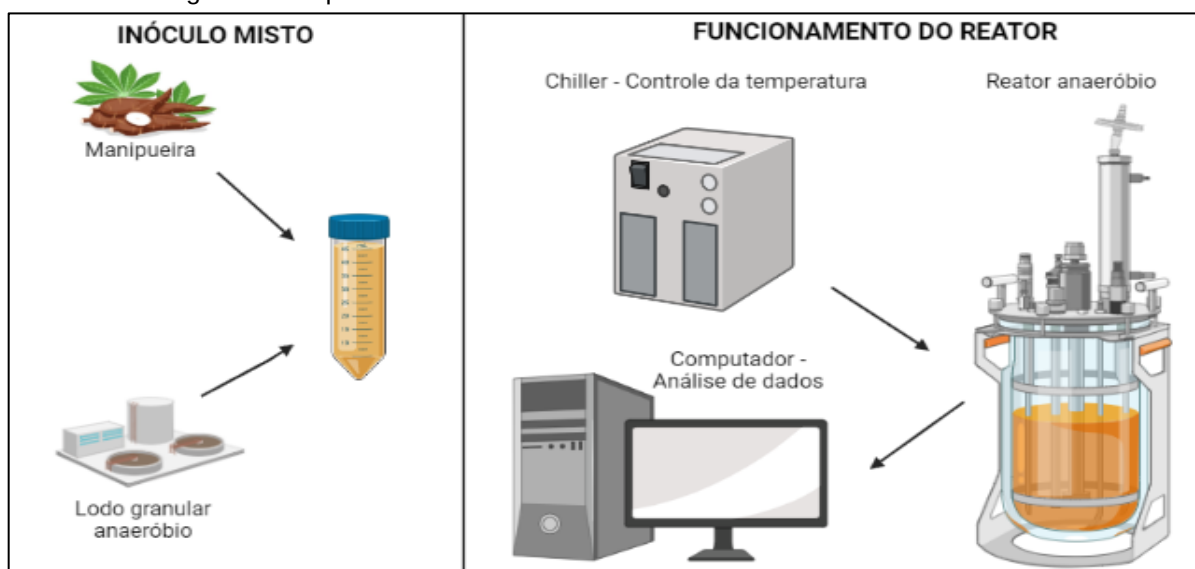
DQO* – Demanda Química de Oxigênio, ST** – Sólidos Totais, SV*** – Sólidos Totais Voláteis, SF**** – Sólidos Fixos.

Fonte: O Autor (2023).

5.3.2 Método experimental

O experimento foi realizado em um reator anaeróbio (*EZ2 Control 7 L, Netherlands*), com um volume útil de 4,8 L. O inóculo foi utilizado com uma concentração de 1 gST.L⁻¹ no licor misto. A Figura 1 mostra o esquema do experimento realizado, com a utilização do reator e dos acessórios para seu funcionamento (*chiller* e computador).

Figura 1 - Esquema do inóculo utilizado e funcionamento do reator anaeróbio



Fonte: O Autor (2023).

O meio sintético empregado foi composto por etanol (EtOH) e ácido acético (AcOH), na proporção estequiométrica de 2:1 (10,0 g.L⁻¹ de EtOH e 6,5 g.L⁻¹ de AcOH), complementado com uma solução de macro e micro minerais de acordo com

Veras *et al.* (2020) e, ajuste inicial do pH para 6,8. Gás nitrogênio foi purgado para garantir condições anaeróbias, e 1,0 g.L⁻¹ de ácido 2-bromoetanossulfônico (2-BES) foi adicionado como inibidor da metanogênese (adaptado de Steinbusch *et al.*, 2011). O reator anaeróbio foi mantido a uma temperatura de 30°C com agitação constante de 100 rpm. Foram aplicadas três bateladas sequenciais (B-I, B-II e B-III) ao reator anaeróbio de 23 dias cada.

5.3.3 Métodos Analíticos

Para a determinação dos álcoois e ácidos carboxílicos, as amostras foram centrifugadas (9300 g, 5 minutos) e o sobrenadante foi filtrado com filtros de membrana de nitrocelulose (0,45 µm) (Grootscholten *et al.*, 2013a). As concentrações de álcoois e açúcares foram medidas através de um HPLC – *High-performance liquid chromatography*, acoplado a um detector de índice de refração modelo LC-20AT (Shimadzu). A coluna utilizada foi *Aminex HPX-87H* (300m x 7,8 mm), com fase móvel de ácido sulfúrico de 5 mM, fluxo de 0,6 mL.min⁻¹ e temperatura do forno igual a 40 °C. Os ácidos carboxílicos foram analisados por um cromatógrafo a gás com detector de ionização de chama (GC-FID), modelo 7890 A – Agilent, equipado com coluna *DB-WAXetr* (30 m x 0,53 mm).

A determinação dos gases foi realizada no mesmo cromatógrafo, porém com um detector de condutividade térmica e argônio como gás de arraste. As temperaturas do injetor, do detector e do forno foram mantidas a 100 °C, 200 °C e 150 °C, respectivamente. A coluna empregada foi uma *Carboxen* - 1010 PLOT (30 m x 0,53 mm). A pressão parcial de H₂ foi estimada em porcentagem (%) ou subtraindo-se as pressões parciais de CH₄, N₂, O₂ e CO₂ da pressão total, que foi assumida como 1 atm (condições atmosféricas) (Grootscholten *et al.*, 2014). Demais parâmetros como pH e potencial redox foram medidos automaticamente através do reator anaeróbio *EZ2 Control 7 L*, Netherlands.

5.3.4 Análise cinética

Os parâmetros cinéticos do alongamento de cadeia nas três bateladas foram analisados através do software *OriginPro* versão 2023 (*OriginLab Corporation*, Northampton, MA, USA). O potencial máximo de produção de ácido capróico (P), a

taxa máxima de produção de ácido capróico (R_m) e a duração da fase de adaptação (λ) foram determinados a partir do modelo de regressão de Gompertz modificado, indicado na equação 8 (Wang *et al.*, 2022):

$$H = P_{\text{exp}} \left\{ -\exp \left[(\lambda - t) R_m \frac{e}{P} + 1 \right] \right\} \quad (8)$$

Onde H é a produção acumulada de ácido capróico (g.L^{-1}), P é o potencial máximo de produção de ácido capróico (g.L^{-1}), R_m é a taxa máxima de produção de ácido capróico ($\text{g.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$), λ é o intervalo de tempo (fase *lag*) necessário para o início da produção exponencial de ácido capróico (d) e t é o tempo de experimento (d).

5.3.5 Análise da comunidade microbiana

As amostras coletadas no início do experimento (inóculo misto) e em cada batelada no reator, incluindo após os ajustes de pH para B-II e B-III, foram caracterizadas em relação a sua composição microbiana. Para a amostragem, foram coletados cerca de 45 mL do licor misto que, posteriormente, foram centrifugados e filtrados. Para extração do DNA, foi utilizado o kit *PowerSoil* (Mo Bio Laboratories Inc. Carlsbad, CA), de acordo com as instruções do fabricante. As concentrações de DNA em cada amostra foram determinadas por meio da leitura em *Nanodrop 2000 Espectrophotometer* (Thermo Scientific, USA). O índice de diversidade de *Shannon* e dominância foram calculados utilizando o software PAST (versão 4).

5.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.4.1 Produção de ácido capróico e pH nas três bateladas

As concentrações dos substratos consumidos e metabólitos produzidos (incluindo a pressão parcial de H_2) durante as três bateladas (B-I, B-II e B-III), no reator anaeróbio, estão apresentadas na Figura 2.

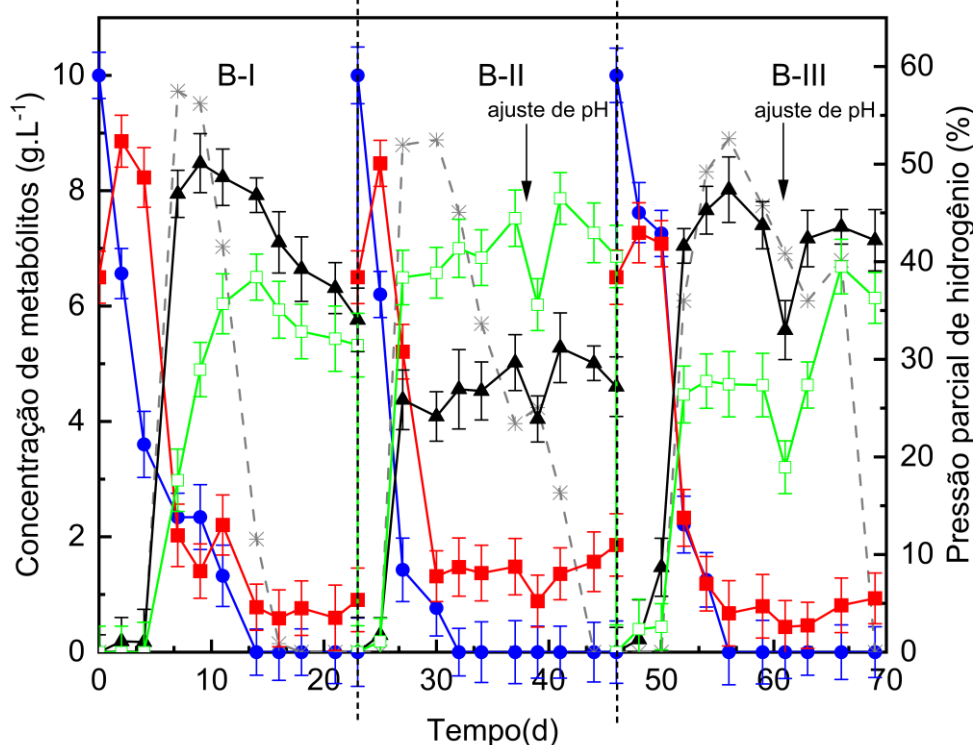
Após os primeiros dois dias da primeira batelada (B-I), verificou-se um aumento nas concentrações de ácido acético, alcançando cerca de $8,9 \text{ g.L}^{-1}$, em decorrência

da oxidação parcial de etanol em baixa pressão parcial de hidrogênio ($<10^{-1}$ atm ou $<14\%$) (Figura 1) (Equação 3) (Grootscholten *et al.*, 2014).



A produção de ácido capróico teve início após o sétimo dia de experimento, indicando uma rápida adaptação dos consórcios microbianos presentes no inóculo misto (lodo granular anaeróbico e manipueira), já relatados em estudos anteriores e na Seção 4 (Artigo 1) (Fernando-Foncillas; Varrone, 2021; Gavazza *et al.*, 2020).

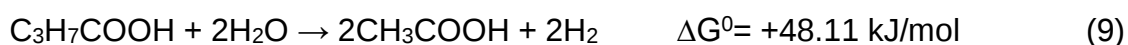
Figura 2 - Produção de metabólitos em função do tempo para os diferentes inóculos. (●) etanol; (■) ácido acético; (▲) ácido butírico; (□) ácido capróico; (*) pressão parcial de hidrogênio



Fonte: O autor (2023).

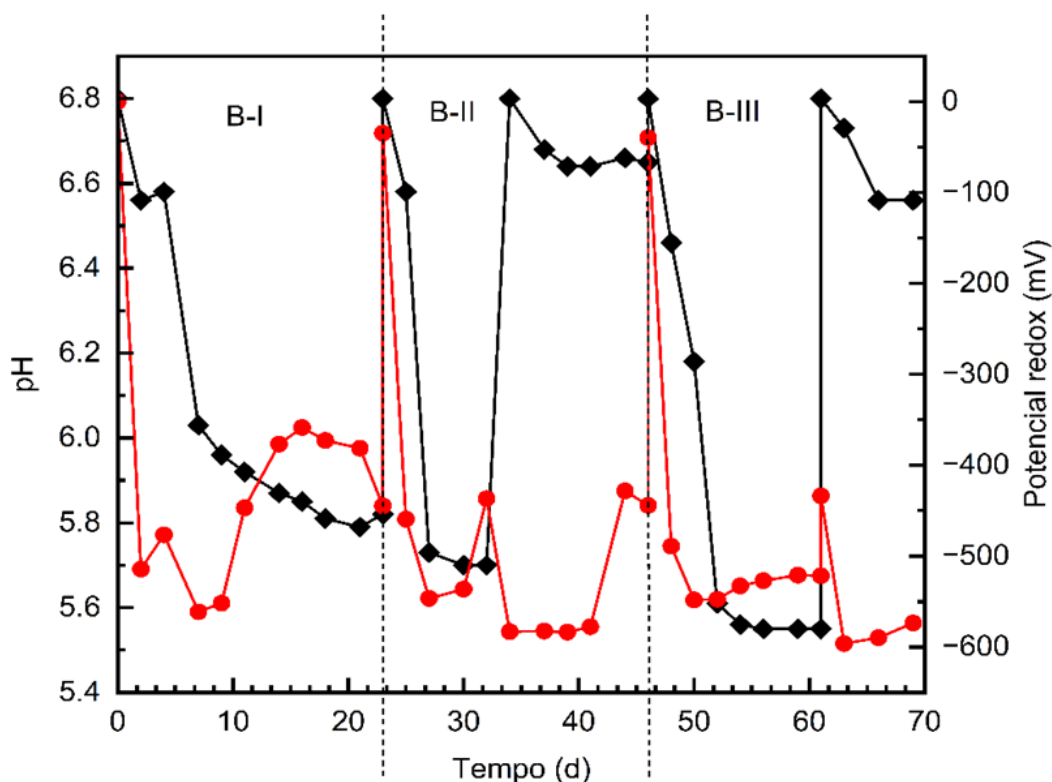
A concentração máxima de ácido capróico na B-I foi de $6,5 \text{ g.L}^{-1}$, o que correspondeu a um consumo total de etanol e parcial de ácido acético após 14 dias de experimento (Equação 1). Candry *et al.* (2020), com o emprego dos mesmos substratos sintéticos ($11,8 \text{ g.L}^{-1}$ de etanol e $2,5 \text{ g.L}^{-1}$ de ácido acético), obtiveram cerca de $6,4 \text{ g.L}^{-1}$ de ácido capróico com lodo anaeróbico oriundo de uma estação de tratamento de efluentes de cervejaria.

A produção de ácido butírico foi superior à de ácido capróico durante a B-I, atingindo uma concentração máxima de $8,5 \text{ g.L}^{-1}$ aos 9 dias de experimento, indicando assim, o alongamento incompleto da cadeia de carbono no meio. O aumento da pressão parcial de H_2 (56% ou 0,56 atm), como pode ser visto na Figura 1, em decorrência da inibição da metanogênese através do uso do 2-BES, pode ter favorecido o deslocamento da equação 9 para esquerda, promovendo a geração de ácido butírico. Segundo Pan et al. (2018), altas concentrações de ácido butírico no meio podem influenciar na inibição ou limitação da geração de ácido capróico, o que pode ter ocorrido na primeira batelada.



O pH e o potencial redox durante as três bateladas (B-I, B-II e B-III), no reator anaeróbio, podem ser vistos na Figura 3. O controle do pH constitui uma das estratégias mais eficazes para otimização do bioprocesso de alongamento da cadeia, visando a geração de ácido capróico (Cavalcante *et al.*, 2017; San-Valero *et al.*, 2020).

Figura 3 - Variação do pH(♦-) e potencial redox (-●-) nas três bateladas durante o experimento

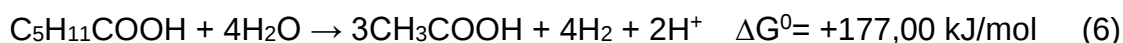


Fonte: O Autor (2023).

Em consonância com o pH, o potencial de oxirredução, não apenas indica a capacidade de redução e oxidação, mas também reflete a atividade ou via metabólica dos microrganismos no meio (metanogênese, alongamento de cadeia, redução de sulfato etc.) (Stamatopoulou *et al.*, 2020). Por exemplo, se houver excesso de poder redutor disponível no meio, o ácido acético pode ser convertido em etanol e, posteriormente, contribuir para geração de ACCM's como doador de elétrons (Holtzapple *et al.*, 2022).

A variação do pH inicial de 6,8 para 5,8 ao longo da B-I e, conseqüentemente, a diminuição dos valores do potencial de oxirredução (alcançando - 561 mV), justifica-se pelo consumo de etanol e geração de ácidos (capróico e butírico) no meio (Figura 3). A redução do pH acarreta uma maior absorção de íons H^+ e, por conseguinte, uma maior proporção de ácidos não-dissociados no meio (Vasudevan *et al.*, 2014).

O aumento da concentração dos ácidos não-dissociados promove uma maior toxicidade para os microrganismos alongadores de cadeia (Dong *et al.*, 2023). A maior concentração de ácido capróico não-dissociada ($C_5H_{11}COO^-$) na B-I foi igual a $0,7 \text{ g.L}^{-1}$ com o pH 5,9, valor inferior aos limites de toxicidade de $0,9 \text{ g.L}^{-1}$ e $1,0 \text{ g.L}^{-1}$ descritos por Ge *et al.* (2015) e Weimer *et al.* (2015), respectivamente. Ao final da B-I, a depleção total do etanol e o consumo do hidrogênio acarretaram uma diminuição na pressão parcial de H_2 e, conseqüentemente, o aumento nos valores do potencial de oxirredução no meio. Com o aumento dos valores do potencial de oxirredução no meio, o ácido capróico é prontamente oxidado em ácido acético (Equação 6).



A segunda batelada (B-II) foi caracterizada pelo predomínio do alongamento completo da cadeia, alcançando a concentração máxima de $7,5 \text{ g.L}^{-1}$ de ácido capróico aos nove dias (dia 32 – B-II) a partir de etanol ($10,0 \text{ g.L}^{-1}$) e ácido acético ($6,5 \text{ g.L}^{-1}$), em paralelo, com uma elevada pressão parcial de H_2 (45% ou 0,45 atm) (Figura 2). A exemplo de comparação, Yin *et al.* (2017) alcançaram a produção de $8,4 \text{ g.L}^{-1}$ de ácido capróico a partir de etanol ($23,0 \text{ g.L}^{-1}$) e ácido acético ($3,0 \text{ g.L}^{-1}$) como substratos em uma cultura pura de *Clostridium kluyveri*. Diferentemente da primeira batelada (B-I), nesta, o pH do meio decresceu rapidamente de 6,8 para 5,7, em paralelo com a diminuição dos valores do potencial de oxirredução (alcançando - 583 mV) nos primeiros quatro dias.

Dessa forma, a concentração de ácido capróico não-dissociado foi de $1,0 \text{ g.L}^{-1}$ no pH 5,7, valor considerado tóxico para os sistemas caprogênicos citados anteriormente (Ge et al., 2015; Weimer *et al.*, 2015). Após o ajuste do pH para 6,8, a produção de ácido capróico aumentou para $7,8 \text{ g.L}^{-1}$, a partir da utilização do hidrogênio e ácido acético presentes no meio como doador e acceptor de elétrons, respectivamente. Entretanto, com a redução da pressão parcial de H_2 e o aumento nos valores do potencial de oxirredução, o ácido capróico foi prontamente oxidado em ácido acético (Equação 6).

A terceira batelada (B-III) diferentemente da segunda (B-II), foi caracterizada pelo retorno da geração de ácido butírico, alcançando $8,0 \text{ g.L}^{-1}$ e elevada pressão parcial de H_2 (52% ou 0,52 atm), em detrimento do ácido capróico (alongamento incompleto da cadeia), devido a problemas operacionais no reator (ex: falta de energia, agitação não-uniforme dos substratos, variação na temperatura do meio etc.) (Figura 2). O pH, de forma similar a B-II, diminuiu rapidamente para 5,5 com a produção de aproximadamente $1,0 \text{ g.L}^{-1}$ de ácido capróico não-dissociado aos 14 dias de experimento.

Com o objetivo de atenuar a toxicidade dos ácidos não-dissociados para a microbiota, o pH foi ajustado novamente para 6,8, atingindo uma produção de $6,7 \text{ g.L}^{-1}$ de ácido capróico, a partir da utilização do hidrogênio e ácidos acéticos presentes no meio como doador e acceptor de elétrons, respectivamente. Com a redução da pressão parcial de H_2 e o aumento nos valores do potencial de oxirredução, o ácido capróico foi oxidado para ácido acético (Equação 6). Salienta-se que, ao final da B-III, verificou-se a presença de traços do gás metano (metanogênese - Equações 4 e 5), em decorrência da instabilidade operacional do reator anaeróbio, mencionada acima.

Portanto, os resultados deste experimento apontam a necessidade da manutenção de altos valores da pressão parcial de H_2 no meio para produção de ácido capróico a partir do inóculo misto nas três bateladas sequenciais. Recomenda-se também, a manutenção das condições operacionais (agitação uniforme dos substratos, faixa ótima de temperatura, pH neutro etc.) com a ampliação da escala para reatores em batelada, com o objetivo de prevenir o surgimento de processos competitivos como a metanogênese.

5.4.2 Análise cinética do alongamento da cadeia

A Tabela 2 apresenta os parâmetros cinéticos gerados pelo modelo de Gompertz modificado para o alongamento da cadeia nas três bateladas (B-I, B-II e B-III) no reator anaeróbio. Os valores de λ foram inferiores a 6 dias nas três bateladas, indicando que as bactérias relacionadas ao alongamento da cadeia foram capazes de se adaptar rapidamente ao meio, como mostrado na Seção 4 (Artigo 1).

Tabela 2 - Parâmetros cinéticos da produção para alongamento da cadeia no reator anaeróbio

Batelada	P(g.L ⁻¹)	Rm(g.L ⁻¹ .d ⁻¹)	λ (d)	R ²
B-I	5,8	1,8	5,3	0,98
B-II	7,0	5,0	2,1	0,97
B-III	5,0	1,8	3,9	0,85

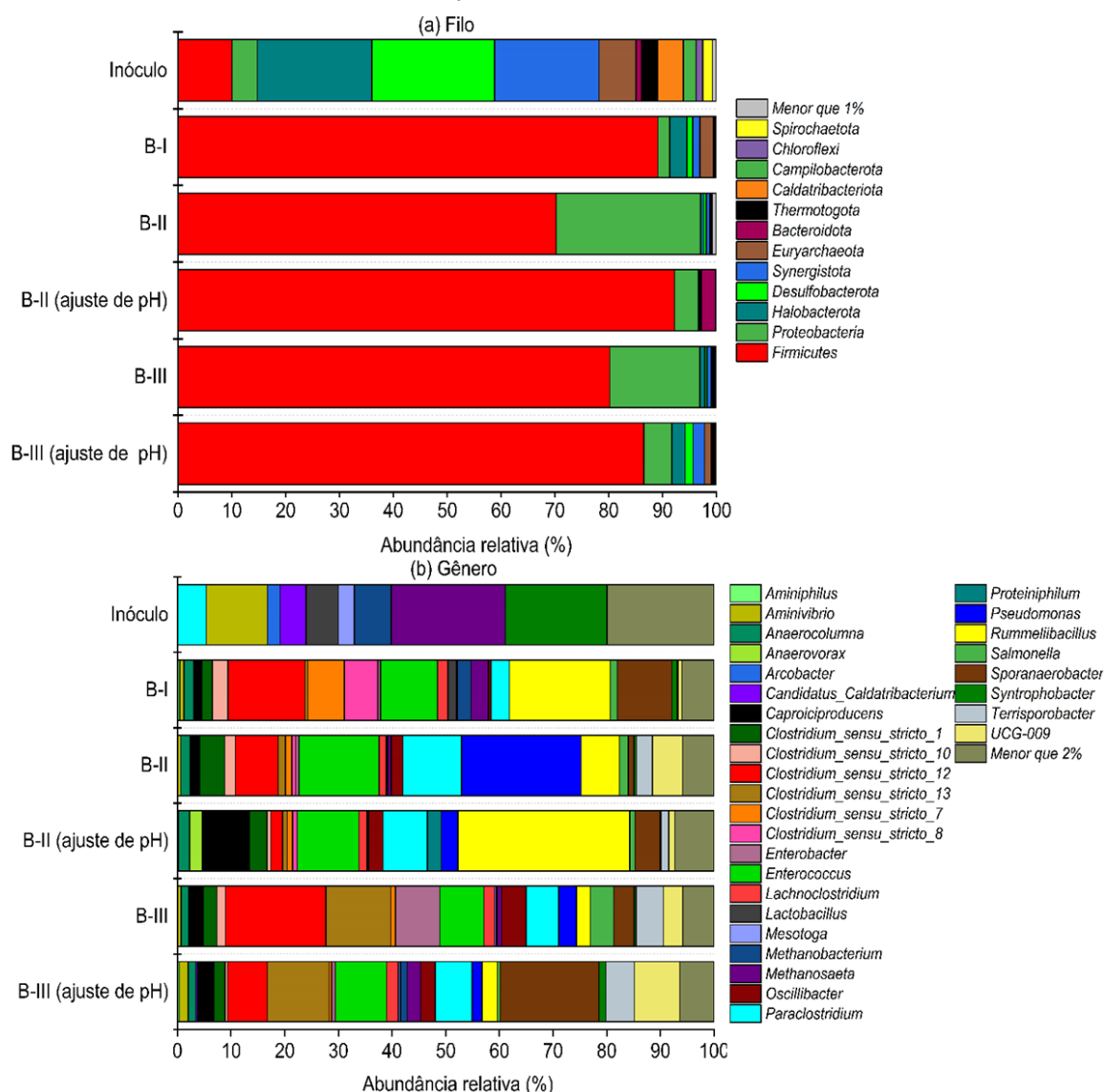
Fonte: O Autor (2023).

A taxa máxima de produção (Rm) de ácido capróico, em B-II, foi cerca de 2,8 vezes maior que B-I e B-III, ou seja, houve a necessidade de um menor tempo para alcançar a maior produção de ácido capróico, o que pode ser atribuído às mudanças na composição microbiana do meio. De forma análoga, o maior valor do potencial máximo de produção de ácido capróico (P) também foi verificado na segunda batelada (B-II), demonstrando assim que as condições operacionais (pH, pressão parcial de H₂, temperatura, agitação, uso do 2-BES etc.) foram adequadas na seleção e crescimento dos microrganismos responsáveis pela geração de ACCM's.

5.4.3 Análise microbiana

A Figura 1 apresenta a estrutura da comunidade microbiana em nível de filo e gênero para os seguintes períodos ou condições: condição inicial (inóculo misto), as três bateladas do experimento (B-I, B-II e B-III) e após o ajuste de pH para as duas últimas bateladas (B-II e B-III). A microbiota anaeróbia durante o experimento foi classificada em 16 filos, 31 classes, 52 ordens, 74 famílias e 135 gêneros ou respectivos táxons.

Figura 1 - Classificação taxonômica da comunidade microbiana: as abundâncias relativas em (a) filo e (b) níveis de gênero para o inóculo e as três bateladas (B-I, B-II e B-III), incluindo após os ajustes de pH em B-II e B-III.



O filo mais abundante no inóculo misto no início do experimento foi o *Desulfobacterota* (22,8%), seguido pelos *Halobacterota* (21,3%), *Synergistota* (19,4%) e *Firmicutes* (10,1%), característicos do lodo granular anaeróbico e da manipueira. *Firmicutes* e *Synergistota* compreendem microrganismos metanogênicos ou sintróficos que utilizam uma ampla variedade de substratos (ácido acético, H_2/CO_2 , compostos aromáticos) para produção de metano (Lyu *et al.*, 2018). O filo *Desulfobacterota* é composto por bactérias redutoras de sulfato (BRS), que competem com os microrganismos metanogênicos e alongadores de cadeia pelos mesmos

substratos (hidrogênio e ácido acético) em ambientes anaeróbios (Equações 2,4 e 5) (Tiong *et al.*, 2023).

Com o decorrer das bateladas (B-I, B-II e B-III), a proporção de *Firmicutes* passou de 10,1 % na condição inicial (inóculo misto) para aproximadamente 92,2%, após o ajuste do pH para 6,8 na B-II, justificando assim, a alta produção de ácido capróico (7,8 g.L⁻¹) na batelada. Por meio da utilização dos índices de *Shanon* e de dominância, verificou-se a diminuição na diversidade do inóculo misto, ao nível de filo, após as três bateladas, comprovando o predomínio de microrganismos alongadores de cadeia pertencentes ao filo *Firmicutes* (Fig. 1 e 3 e Tabela 3).

Dessa forma, o pré-tratamento químico (adição de 2-BES), associado às condições operacionais adequadas ao processo de alongamento da cadeia (pH, temperatura, agitação, pressão parcial de H₂ etc.), contribuíram para inibição da metanogênese, proporcionando assim, a geração de ácido butírico e capróico ao longo do experimento.

Ao nível de gênero, os índices de *Shanon* e de dominância não apontou grandes diferenças entre os valores a partir da B-I até a B-III, incluindo as mudanças de pH em B-II e B-III (Figura 3 e Tabela 3). Os gêneros *Rummeliibacillus*, *Enterococcus*, *Caproiciproducens* e *Clostridium sensu stricto* 12 se alternaram na dominância das bateladas, demonstrando flexibilidade dos microbiomas para produção de ácido butírico e capróico. Por exemplo, *Rummeliibacillus* (32%), *Enterococcus* (11,5%) e *Caproiciproducens* (8,7%) foram os principais gêneros presentes no período de maior produção de ácido capróico (B-II após o ajuste de pH). De forma similar, Zhu *et al.* (2022) constataram que os gêneros *Rummeliibacillus* (37,6%) e *Caproiciproducens* (12,8%) foram predominantes no inóculo para produção de 26,4 g.L⁻¹ de ácido capróico, a partir de efluentes da fabricação de bebidas alcoólicas com pH 6,0 e temperatura igual a 30°C.

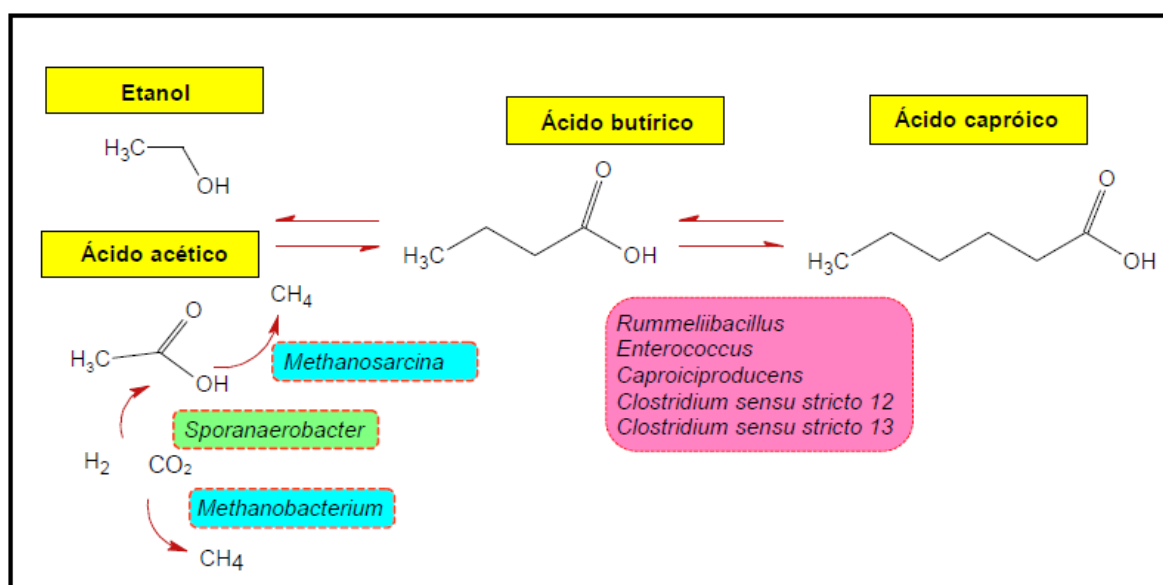
Ao final da B-III, verificou-se o domínio dos gêneros *Sporanaerobacter* (18,4%) e *Clostridium sensu stricto* 13 (11,5%), além do retorno de microrganismos metanogênicos pertencentes aos gêneros *Methanosaeta* (2,48%) e *Methanobacterium* (1,25%), presentes no inóculo inicial. O aumento na proporção do gênero *Sporanaerobacter* na B-III, de forma similar àquela mostrada na Seção 4 (Artigo 1), pode estar relacionada indiretamente à produção de ácido capróico, através da transferência de elétrons entre as espécies bacterianas no meio (via homoacetogênese, por exemplo), como relatado por Zagrodnik *et al.* (2020) e Baleeiro

et al. (2022). *Sporanaerobacter acetigenes*, por exemplo, possui a capacidade de fermentar açúcares em acetato e H_2 , além de utilizar o enxofre como acceptor de elétrons para produção de sulfeto no meio (Hernandez-Eugenio *et al.*, 2015). Os microrganismos do gênero *Clostridium sensu stricto* 13, presentes em maior proporção na B-III, podem utilizar etanol, ácido láctico e ácido acético como substratos para produção de ácido butírico e ácido capróico (Wang *et al.*, 2023; Yin *et al.*, 2022).

O decréscimo na geração de ácido capróico na B-III, em paralelo com o surgimento de microrganismos metanogênicos, podem estar correlacionadas com a formação de zonas mortas no interior do reator anaeróbio. As zonas mortas são caracterizadas pela distribuição ou agitação não-uniforme dos substratos, e microrganismos, em decorrência de instabilidades no fornecimento de energia elétrica no período (Abyaneh *et al.*, 2022).

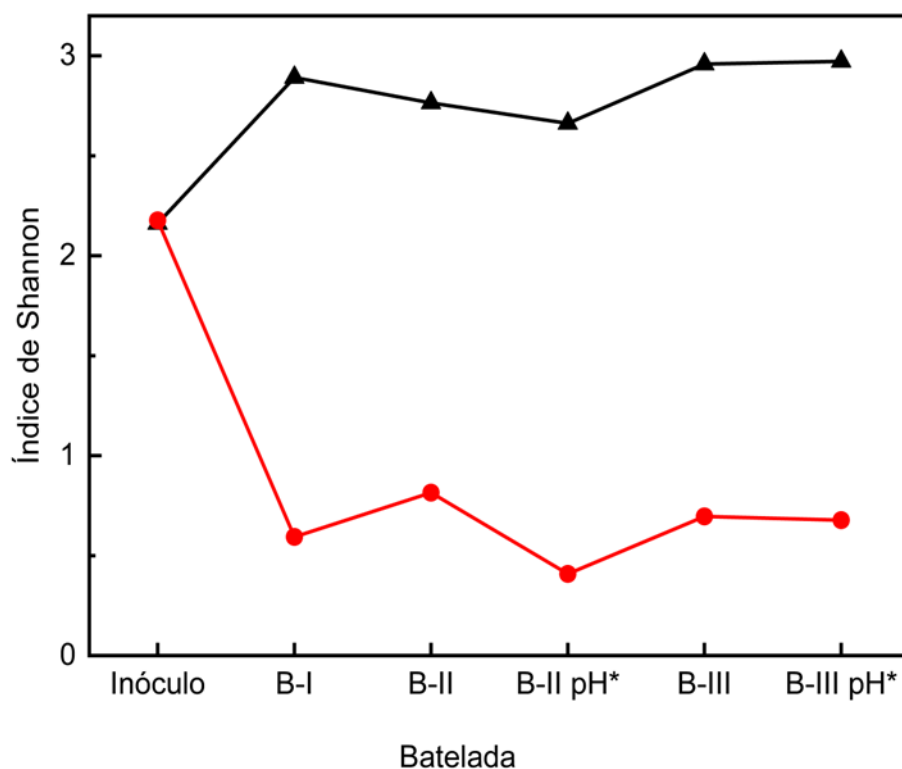
Dessa maneira, o aumento da escala pode ter gerado possíveis dificuldades operacionais (formação de zonas mortas e processos competitivos) ao processo de alongamento da cadeia de carbono; porém, ofereceu uma maior capacidade de resiliência para geração de ácido butírico e capróico, a partir de diferentes microrganismos (*Rummeliibacillus*, *Enterococcus*, *Caproiciproducens* e *Clostridium sensu stricto* 12). A Figura 2 mostra os principais microrganismos envolvidos nas três bateladas e suas principais vias metabólicas.

Figura 2 - Microrganismos envolvidos nas três bateladas e possíveis rotas metabólicas



Fonte: O Autor (2023).

Figura 3 - Índice de diversidade de Shanon para filo(●) e gênero(▲) ao longo das três bateladas a ajustes de pH.* ajustes de pH



Fonte: O Autor (2023).

Tabela 3 - Índice de dominância para filo e gênero ao longo das três bateladas e ajustes de pH

Batelada	Índice de dominância	
	Filo	Gênero
Inóculo	0,16	0,15
B-I	0,80	0,09
B-II	0,57	0,10
B-II (ajuste de pH)	0,85	0,14
B-III	0,67	0,08
B-III (ajuste de pH)	0,75	0,08

5.5 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos neste estudo mostraram a possibilidade da geração de ácido butírico e capróico, a partir da utilização de um inóculo misto (manipueira e lodo granular anaeróbio), em um reator anaeróbio de 7 L. A maior produção de ácido capróico obtida foi de 7,8 g.L⁻¹, após o ajuste de pH na segunda batelada (B-II). Entre os parâmetros analisados, verificou-se a necessidade da manutenção de altos valores da pressão parcial de H₂, em paralelo, com ajustes de pH (maior proporção de ácidos dissociados) para garantir uma produção estável de ácido capróico.

As análises microbianas indicaram o domínio de microrganismos relacionados ao alongamento da cadeia como *Caproiciproducens*, *Clostridium sensu stricto* 12, *Enterococcus* e *Rummeliibacillus*, nas primeiras duas bateladas. Comparando-se com o experimento apresentado na Seção 4 (Artigo 1), o aumento da escala nos reatores, bem como o uso de um inóculo misto, favoreceram uma maior diversidade de microrganismos responsáveis pela geração de ACCM's. No entanto, o aumento do volume do reator requer um maior monitoramento das condições operacionais (agitação, pH, temperatura etc.) adequadas a caprogênese, com o objetivo de evitar o aparecimento de rotas competitivas no meio. Experimentos futuros deverão abordar a substituição do uso de inibidores químicos (2-BES) e substratos sintéticos em razão dos seus altos custos, com o intuito de garantir a viabilidade econômica da produção biológica de ácido capróico em maiores escalas.

6 CONCLUSÃO GERAL

6.1 QUANTO AO USO DE DIFERENTES INÓCULOS PARA PRODUÇÃO DE ÁCIDO CAPRÓICO A PARTIR DE ETANOL E ÁCIDO ACÉTICO

Os resultados apresentados na Seção 4.4.1 (Artigo 1) mostram uma elevada geração de ácido capróico, a partir de três inóculos (fluido ruminal, lodo granular anaeróbico e manipueira). Dentre os três inóculos, a maior produção de ácido capróico foi alcançada pelo lodo granular anaeróbico ($10,1 \text{ g.L}^{-1}$), seguido pela manipueira ($9,6 \text{ g.L}^{-1}$) e o fluido ruminal ($9,1 \text{ g.L}^{-1}$). Possivelmente, a elevada produção de ácido capróico para os três inóculos foi decorrente de uma adaptação microbiana adequada, através do uso do inibidor de metanogênese 2-BES, do pH inicial próximo ao neutro e da razão entre os substratos sintéticos (etanol e ácido acético), ao longo das três bateladas realizadas, além da diminuição da toxicidade dos ácidos não-dissociados aos microrganismos no meio.

Em relação a análise cinética do alongamento da cadeia de carbono, apresentadas na Seção 4.4.2 (Artigo 1), os maiores valores de potencial máximo de produção de ácido capróico (P) encontram-se na B-III nos três inóculos testados, indicando uma crescente adaptabilidade dos microbiomas em relação às condições operacionais do experimento. Os valores de λ foram inferiores a 5 dias, indicando um curto período de fase *lag*. Em outras palavras, os microrganismos responsáveis pelo alongamento da cadeia foram capazes de se desenvolver rapidamente no início das três bateladas para os três inóculos empregados.

As análises microbianas dos inóculos na Seção 4.4.3 (Artigo 1), apontaram a dominância do gênero *Clostridium sensu stricto* 12 do filo *Firmicutes*, reconhecidamente produtor de ACCM's, ao final da B-III. A abundância relativa do gênero *Clostridium sensu stricto* 12, da condição inicial até a última batelada (B-III), passou de 0,1% para 57,4%, de 0,85 % a 39,2%, e de 1,0% a 22,5%, para os inóculos fluido ruminal, lodo granular anaeróbico e manipueira, respectivamente. Dessa forma, o aumento na abundância relativa do gênero *Clostridium sensu stricto* 12 nos inóculos, pode justificar a alta geração de ácido capróico, ao final do experimento. Experimentos futuros deverão abordar a substituição do uso de inibidores químicos (2-BES) e substratos sintéticos em razão dos seus altos custos,

com o intuito de garantir a viabilidade econômica da produção biológica de ácido capróico.

6.2 QUANTO AO AUMENTO DA ESCALA E USO DE INÓCULOS MISTOS

A Seção 5.4.1 (Artigo 2), apresenta a obtenção da produção de ácido butírico e capróico, a partir da utilização de um inóculo misto (manipueira e lodo granular anaeróbio), em um reator anaeróbio com uma maior escala empregada (7 L). A maior produção de ácido capróico obtida foi de $7,8 \text{ g.L}^{-1}$, após o ajuste de pH na segunda batelada (B-II).

As análises microbianas (seção 5.4.3, Artigo 2), revelaram o predomínio de microrganismos relacionados ao alongamento da cadeia, como *Caproiciproducens*, *Clostridium sensu stricto 12*, *Enterococcus* e *Rummeliibacillus*, nas primeiras duas bateladas. O aumento de escala e a utilização de um inóculo misto no reator podem ter favorecido uma maior diversidade de microrganismos responsáveis pelo alongamento da cadeia. Por outro lado, possivelmente, serão necessárias medidas para evitar a distribuição não-uniforme dos substratos e o aparecimento de rotas competitivas no meio, como a metanogênese.

De forma geral, os resultados do presente experimento foram promissores quanto ao emprego dos inóculos testados, separadamente ou em consórcio, em duas diferentes escalas, para produção de ácido capróico. Experimentos preliminares com a utilização de um substrato oriundo da fermentação de resíduos de alimentos, em condições operacionais similares às aquelas apresentadas na Seção 4.3.2 (Artigo 1), forneceram cerca de $8,6 \text{ g.L}^{-1}$ de ácido capróico, demonstrando assim a viabilidade do uso de resíduos (resíduos de alimentos e de gramíneas, vinhaça, soro de leite, etc.) no processo de alongamento da cadeia de carbono.

7 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- 1) Avaliar a produção de ácido capróico a partir de substratos ou resíduos reais ricos em etanol ou lactato com diferentes concentrações;
- 2) Analisar diferentes escalas (piloto e industrial) para produção de ácido capróico a partir de substratos ou resíduos reais;
- 3) Verificar a influência de diferentes valores da pressão parcial de hidrogênio na produção de ácido capróico;
- 4) Examinar, através de análises metagenômicas e metatranscriptômicas, novas rotas possíveis para o alongamento da cadeia de carbono.
- 5) Avaliar diferentes proporções de mistura entre inóculos para produção de ácido capróico;
- 6) Analisar diferentes pré-tratamentos com maior viabilidade econômica para seleção de microrganismos alongadores de cadeia no meio;
- 7) Verificar a viabilidade técnica e econômica para diferentes escalas de reatores para produção de ácido capróico.

REFERÊNCIAS

- ABDALLA, A. M. *et al.* Hydrogen production, storage, transportation and key challenges with applications: A review. **Energy Conversion and Management**, v. 165, p. 602–627, 1 jun. 2018.
- ABYANEH, Z. E. *et al.* Mixing assessment of an industrial anaerobic digestion reactor using CFD. **Renewable Energy**, v. 192, p. 537–549, 1 jun. 2022.
- AGLER, M. T. *et al.* Waste to bioproduct conversion with undefined mixed cultures: The carboxylate platform. **Trends in Biotechnology**, v.29, n. 2, p. 70–78, fev. 2011.
- AGLER, M. T. *et al.* Chain elongation with reactor microbiomes: Upgrading dilute ethanol to medium-chain carboxylates. **Energy and Environmental Science**, v. 5, n. 8, p. 8189–8192, 2012.
- ANDERSEN, S. J. *et al.* Electrolytic extraction drives volatile fatty acid chain elongation through lactic acid and replaces chemical pH control in thin stillage fermentation. **Biotechnology for Biofuels**, v. 8, n. 1, 21 dez. 2015.
- ANGENENT, L. T. *et al.* Chain Elongation with Reactor Microbiomes: Open-Culture Biotechnology to Produce Biochemicals. **Environmental Science and Technology**, v. 50, n. 6, p. 2796–2810, 2016.
- ANGENENT, L. T. *et al.* Integrating electrochemical, biological, physical, and thermochemical process units to expand the applicability of anaerobic digestion. **Bioresource Technology**, v. 247, p.1085–1094, 1 jan. 2018.
- APHA, 2012. Standard Methods For The Examination Of Water And Wastewater, 22nd Ed.: American Public Health Association, American Water Works Association, Water Environment Federation. Washington, DC.
- BALEEIRO, F. C. F. *et al.* Syngas-aided anaerobic fermentation for medium-chain carboxylate and alcohol production: the case for microbial communities. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.103, p. 8689–8709, 1 nov. 2019.
- BALEEIRO, F. C. F. *et al.* Mixotrophic chain elongation with syngas and lactate as electron donors. **Microbial Biotechnology**, v.16, p.322–336, 2022.
- BAO, S. *et al.* Effect of acid/ethanol ratio on medium chain carboxylate production with different VFAs as the electron acceptor: Insight into carbon balance and microbial community. **Energies**, v. 12, n. 19, p. 3720, 29 set. 2019.
- BARKER, H. A. *et al.* 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.
- BASTIDAS-OYANEDEL, J. R.; SCHMIDT, J. E. Increasing profits in food waste biorefinery-A techno-economic analysis. **Energies**, v. 11, n. 6, p. 1551, 2018.

BENGELSDORF, F. R. *et al.* Genome Sequence of the Caproic Acid-Producing Bacterium *Caproiciproducens galactitolivorans* BS-1 T (JCM 30532) . **Microbiology Resource Announcements**, v. 8, n. 31, ago. 2019.

BRODOWSKI, F. *et al.* Co-production of hydrogen and caproate for an effective bioprocessing of waste. **Bioresource Technology**, v. 318, p. 123895, julho 2020.

BRODOWSKI, F. *et al.* Effect of external acetate on lactate-based carboxylate platform: Shifted lactate overloading limit and hydrogen co-production. **Science of the Total Environment**, v. 802, p. 149885, 1 jan. 2022.

CANDRY, P. *et al.* Enrichment and characterisation of ethanol chain elongating communities from natural and engineered environments. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 3682, 1 dez. 2020.

CANDRY, P.; GANIGUÉ, R. **Chain elongators, friends, and foes. Current Opinion in Biotechnology**, v. 67, p. 99–110, 1 fev. 2021.

CAVALCANTE, W. DE A. *et al.* Anaerobic fermentation for n-caproic acid production: A review. **Process Biochemistry**, v. 54, p. 106–119, 2017.

CHEN, W. S. *et al.* Methanol as an alternative electron donor in chain elongation for butyrate and caproate formation. **Biomass and Bioenergy**, v. 93, p. 201–208, 1 out. 2016.

CHEN, W. S. *et al.* Production of Caproic Acid from Mixed Organic Waste: An Environmental Life Cycle Perspective. **Environmental Science and Technology**, v. 51, n. 12, p. 7159–7168, 2017.

CHENG, H. *et al.* Upgrading methane fermentation of food waste by using a hollow fiber type anaerobic membrane bioreactor. **Bioresource Technology**, v. 267, n. July, p. 386–394, 2018.

CHOI, K. *et al.* In situ biphasic extractive fermentation for hexanoic acid production from sucrose by *Megasphaera elsdenii* NCIMB 702410. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 171, n. 5, p. 1094–1107, 2013.

CHU, N. *et al.* **Microbial Electrosynthesis for Producing Medium Chain Fatty Acids. Engineering**, v.16, p.141–153, 1 set. 2022.

CHWIALKOWSKA, J. *et al.* Caproic acid production from acid whey via open culture fermentation – Evaluation of the role of electron donors and downstream processing. **Bioresource Technology**, v. 279, p. 74–83, 1 maio 2019.

COMA, M. *et al.* Product Diversity Linked to Substrate Usage in Chain Elongation by Mixed-Culture Fermentation. **Environmental Science and Technology**, v. 50, n. 12, p. 6467–6476, 2016.

CONTRERAS-DÁVILA, C. A. *et al.* Reactor microbiome enriches vegetable oil with n-caproate and n-caprylate for potential functionalized feed additive production via

extractive lactate-based chain elongation. **Biotechnology for Biofuels**, v. 14, n. 232, 1 dez. 2021.

DAMS, R. I. *et al.* Production of medium-chain carboxylic acids by anaerobic fermentation of glycerol using a bioaugmented open culture. **Biomass and Bioenergy**, v. 118, p. 1–7, 1 nov. 2018.

DEBERGH, P.; VAN DAEL, M. Production of caproic acid from acetate and ethanol through microbial chain elongation: A techno-economic assessment. **Bioresource Technology Reports**, v. 18, p. 101055, 1 jun. 2022.

DONG, W. *et al.* Caproic acid production from anaerobic fermentation of organic waste - Pathways and microbial perspective. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 175, p. 113181, 1 abr. 2023.

DUBER, A. *et al.* Exploiting the real wastewater potential for resource recovery: N - caproate production from acid whey. **Green Chemistry**, v. 20, n. 16, p. 3790–3803, 2018.

DUBER, A. *et al.* Lactate and Ethanol Chain Elongation in the Presence of Lactose: Insight into Product Selectivity and Microbiome Composition. **ACS Sustainable Chemistry and Engineering**, v. 10, n. 11, p. 3407–3416, 21 mar. 2022.

ENG SÁNCHEZ, F. *et al.* Value-added soluble metabolite production from sugarcane vinasse within the carboxylate platform: An application of the anaerobic biorefinery beyond biogas production. **Fuel**, v. 286, p.119378, 15 fev. 2021.

FERNANDO-FONCILLAS, C.; VARRONE, C. Effect of reactor operating conditions on carboxylate production and chain elongation from co-fermented sludge and food waste. **Journal of Cleaner Production**, v. 292, p. 126009, 2021.

FRIEDRICH, W. M. Methyl-Coenzyme M Reductase Genes: Unique Functional Markers for Methanogenic and Anaerobic Methane-Oxidizing Archaea. **Methods in Enzymology**, v. 397, p. 428–442, 2005.

GAVAZZA, S. *et al.* Caproic Acid Formation by Carbon Chain Elongation During Fermentative Hydrogen Production of Cassava Wastewater. **Waste and Biomass Valorization**, v. 12, n. 5, p. 2365–2373, 2020.

GAZZOLA, G. *et al.* Biorefining food waste through the anaerobic conversion of endogenous lactate into caproate: A fragile balance between microbial substrate utilization and product inhibition. **Waste Management**, v. 150, p. 328–338, ago. 2022.

GE, S. *et al.* Long-Term n-Caproic Acid Production from Yeast-Fermentation Beer in an Anaerobic Bioreactor with Continuous Product Extraction. **Environmental Science and Technology**, v. 49, n. 13, p. 8012–8021, 2015.

GEHRING, T. A. *et al.* Optimal pH set point for simultaneous production and pertraction of n-caproic acid: an experimental and simulation study. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 95, n. 12, p. 3105–3116, 2020.

GHYSELS, S. *et al.* Biochar and activated carbon enhance ethanol conversion and selectivity to caproic acid by *Clostridium kluyveri*. **Bioresource Technology**, v. 319, p. 124236, 1 jan. 2021.

GROOTSCHOLTEN, T. I. M. *et al.* Chain elongation of acetate and ethanol in an upflow anaerobic filter for high rate MCFA production. **Bioresource Technology**, v. 135, p. 440–445, 2013a.

GROOTSCHOLTEN, T. I. M. *et al.* 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. 735–738, 2013b.

GROOTSCHOLTEN, T. I. M. *et al.* Promoting chain elongation in mixed culture acidification reactors by addition of ethanol. **Biomass bioenergy**, v. 48, p. 10-16, 2013c.

GROOTSCHOLTEN, T. I. M. *et al.* Two-stage medium chain fatty acid (MCFA) production from municipal solid waste and ethanol. **Applied Energy**, v. 116, p. 223–229, 1 mar. 2014.

HAN, W. *et al.* Metabolic interactions of a chain elongation microbiome. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 84, n. 22, 1 nov. 2018.

HAN, W. *et al.* Road to full bioconversion of biowaste to biochemicals centering on chain elongation: A mini review. **Journal of Environmental Sciences (China)**, v. 86, p. 50–64, 1 dez. 2019.

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.

HERNANDEZ-EUGENIO, G. *et al.* *Sporanaerobacter*. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, 52, p. 1217–1223, 2015.

HOLTZAPPLE, M. T. *et al.* Microbial communities for valorizing biomass using the carboxylate platform to produce volatile fatty acids: A review. **Bioresource Technology**, v. 344, p. 126253, 1 jan. 2022.

JEON, B. S. *et al.* Production of hexanoic acid from d-galactitol by a newly isolated *Clostridium* sp. BS-1. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 88, n. 5, p. 1161–1167, nov. 2010.

JEON, B. S. *et al.* In situ extractive fermentation for the production of hexanoic acid from galactitol by *Clostridium* sp. BS-1. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 53, n. 3, p. 143–151, 15 ago. 2013.

JEON, B. S. *et al.* Biotechnology for Biofuels Production of medium - chain carboxylic acids by *Megasphaera* sp . MH with supplemental electron acceptors. **Biotechnology for Biofuels**, v. 9, n. 129, p. 1–9, 2016.

JIN, X. *et al.* Adding glucose delays the conversion of ethanol and acetic acid to caproic acid in *Lacrimispora celerecrescens* JSJ-1. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 107, n. 4, p. 1453–1463, 27 fev. 2023.

JOSHI, S. *et al.* The occurrence and ecology of microbial chain elongation of carboxylates in soils. **ISME Journal**, v. 15, n. 7, p. 1907–1918, 1 jul. 2021.

JUNGERMANN, K.; *et al.* The synthesis of one-carbon units from CO₂ in *Clostridium kluyveri*. **European journal of biochemistry**, v. 3, n. 3, p. 351–359, 1968.

KANG, S. *et al.* Chain elongation process for caproate production using lactate as electron donor in *Megasphaera hexanoica*. **Bioresource Technology**, v. 346, p. 126660, 1 fev. 2022.

KILIÇ DEPREN, S. *et al.* Energy consumption and environmental degradation nexus: A systematic review and meta-analysis of fossil fuel and renewable energy consumption. **Ecological Informatics**, v. 70, p. 101747, 1 set. 2022.

KIM, B. C. *et al.* *Caproiciproducens galactitolivorans* gen. Nov., sp. nov., a bacterium capable of producing caproic acid from galactitol, isolated from a wastewater treatment plant. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 65, n. 12, p. 4902–4908, 1 dez. 2015.

KIM, H. *et al.* New coculture system of *Clostridium* spp. and *Megasphaera hexanoica* using submerged hollow-fiber membrane bioreactors for caproic acid production. **Bioresource Technology**, v. 270, p. 498–503, 1 dez. 2018.

KIM, H. *et al.* Impact of feedstocks and downstream processing technologies on the economics of caproic acid production in fermentation by *Megasphaera elsdenii* T81. **Bioresource Technology**, v. 301, p. 122794, Set. 2020.

KIM, *et al.* Metabolic cascade of complex organic wastes to medium-chain carboxylic acids: A review on the state-of-the-art multi-omics analysis for anaerobic chain elongation pathways. **Bioresource Technology**, v.344, p. 126211, 1 jan. 2022.

KHOR, W. *et al.* Electricity-assisted production of caproic acid from grass. **Biotechnol Biofuels**, v.10, n.180, 2017.

KUCEK, L. A. *et al.* Conversion of L -lactate into n -caproate by a continuously fed reactor microbiome. **Water Research**, v. 93, p. 163–171, 2016.

LAMBRECHT, J. *et al.* Key sub - community dynamics of medium - chain carboxylate production. **Microbial Cell Factories**, v.18, n. 92, 2019.

LENG, L. *et al.* Thermodynamic and physiological study of caproate and 1,3-propanediol co-production through glycerol fermentation and fatty acids chain elongation. **Water Research**, v. 114, p. 200–209, 2017.

LIANG, S.; WAN, C. Carboxylic acid production from brewer's spent grain via mixed culture fermentation. **Bioresource Technology**, v. 182, p. 179–183, 1 abr. 2015.

LIU, Y. *et al.* Alcohol-to-acid ratio and substrate concentration affect product structure in chain elongation reactions initiated by unacclimatized inoculum. **Bioresource Technology**, v. 218, p. 1140–1150, 2016.

LIU, Y. *et al.* Significant enhancement by biochar of caproate production via chain elongation. **Water Research**, v. 119, p. 150–159, 2017.

LIU, C. *et al.* CO as electron donor for efficient medium chain carboxylate production by chain elongation: Microbial and thermodynamic insights. **Chemical Engineering Journal**, v. 390, p. 124577, 15 jun. 2020.

LONKAR, S. *et al.* Optimum alcohol concentration for chain elongation in mixed-culture fermentation of cellulosic substrate; Optimum alcohol concentration for chain elongation in mixed-culture fermentation of cellulosic substrate. **Biotechnol. Bioeng**, v. 113, p. 2597–2604, 2016.

LUO, H. *et al.* Isolation, Identification, and Fermentation Medium Optimization of a Caproic Acid Producing *Enterococcus casseliflavus* Strain from Pit Mud of Chinese Strong Flavor Baijiu Ecosystem. **Polish Journal of Microbiology**, v. 71, n. 4, p. 563–575, 1 dez. 2022.

LYU, Z. *et al.* Methanogenesis. **Current Biology**, v. 28, n.13, p.727–732, 9 jul. 2018.

MA, H. *et al.* Effect of ultrasonic pretreatment on chain elongation of saccharified residue from food waste by anaerobic fermentation. **Environmental Pollution**, v. 268, p.115936, 1 jan. 2021.

MARIËN, Q. *et al.* Substrate loading and nutrient composition steer caproic acid production and biofilm aggregation in high-rate granular reactors. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 10, n. 3, p. 107727, 1 jun. 2022.

MENON, A.; LYNG, J. G. Circular bioeconomy solutions: driving anaerobic digestion of waste streams towards production of high value medium chain fatty acids. **Reviews in Environmental Science and Biotechnology**, v. 20, n. 1, p. 189–208, 2021.

MILLATI, R. *et al.* Anaerobic digestion biorefinery for circular bioeconomy development. **Bioresource Technology Reports**, v. 21, p.101315, 1 fev. 2023.

NELSON, R. S. *et al.* Mixed carboxylic acid production by *Megasphaera elsdenii* from glucose and lignocellulosic hydrolysate. **Fermentation**, v. 3, n. 10, 1 mar. 2017.

NZETEU, C. O. *et al.* Reproducible, high-yielding, biological caproate production from food waste using a single-phase anaerobic reactor system. **Biotechnology for Biofuels**, v. 11, n. 108, abr. 2018.

NZETEU, C. O. *et al.* Development of an enhanced chain elongation process for caproic acid production from waste-derived lactic acid and butyric acid. **Journal of Cleaner Production**, v. 338, p. 130655, 1 mar. 2022.

OTTONI, J. R. *et al.* Cultured and uncultured microbial community associated with biogas production in anaerobic digestion processes. **Archives of Microbiology**, v. 204, n. 6, p. 340, 1 jun. 2022.

REDDY, M. V. *et al.* Medium-Chain Fatty Acids (MCFA) Production Through Anaerobic Fermentation Using *Clostridium kluyveri*: Effect of Ethanol and Acetate. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 185, n. 3, p. 594–605, 1 jul. 2018.

RICHTER, H. *et al.* Integrating syngas fermentation with the carboxylate platform and yeast fermentation to reduce medium cost and improve biofuel productivity. **Environmental Technology (United Kingdom)**, v. 34, n. 13–14, p. 1983–1994, 1 jul. 2013.

ROBLES, A. *et al.* Microbial Chain Elongation and Subsequent Fermentation of Elongated Carboxylates as H₂-Producing Processes for Sustained Reductive Dechlorination of Chlorinated Ethenes. **Environmental Science and Technology**, v. 55, n. 15, p. 10398–10410, 3 ago. 2021.

ROGHAIR, M. *et al.* Controlling Ethanol Use in Chain Elongation by CO₂ Loading Rate. **Environ. Sci. Technol.**, v.52, n.149, 5 jan. 2018a.

ROGHAIR, M. *et al.* Development of an effective chain elongation process from acidified food waste and ethanol into n-Caproate. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 6, n. 50, 27 abr. 2018b.

SAKARIKA, M. *et al.* Thermophilic caproic acid production from grass juice by sugar-based chain elongation. **Science of The Total Environment**, v. 860, n. 20, p. 160501, 24 nov. 2022.

SAN-VALERO, P. *et al.* Influence of electron acceptors on hexanoic acid production by *Clostridium kluyveri*. **Journal of Environmental Management**, v. 242, p. 515–521, 15 jul. 2019.

SAN-VALERO, P. *et al.* Effect of pH, yeast extract and inorganic carbon on chain elongation for hexanoic acid production. **Bioresource Technology**, v. 300, p. 122659, 1 mar. 2020.

SARKAR, O. *et al.* Effect of metals on the regulation of acidogenic metabolism enhancing biohydrogen and carboxylic acids production from brewery spent grains: Microbial dynamics and biochemical analysis. **Engineering in Life Sciences**, v. 22, n. 10, p. 650–661, 1 out. 2022.

SEEDORF, H. *et al.* 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.

SHARAK GENTHNER, B. R. *et al.* Features of Rumen and Sewage Sludge Strains of *Eubacterium limosum*, a Methanol-and H₂-CO₂-Utilizing Species. **Applied and environmental microbiology**, v. 42, n. 1, p.12–19, 1981.

SPIRITO, C. M. *et al.* Chain elongation in anaerobic reactor microbiomes to recover resources from waste. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 27, p. 115–122, 2014.

SCHOBERTH, S.; GOTTSCHALK, G. Considerations on the energy metabolism of *Clostridium kluyveri*. **Arch.Mikrobiol.**, v.65, n. 4, p.318–328,1969.

STAMATOPOULOU, P. *et al.* Fermentation of organic residues to beneficial chemicals: A review of medium-chain fatty acid production. **Processes**, v. 8, n.12, p.1571, 1 dez. 2020.

STEINBUSCH, K. J. J. *et al.* Biological formation of caproate and caprylate from acetate: Fuel and chemical production from low grade biomass. **Energy and Environmental Science**, v. 4, n. 1, p. 216–224, 2011.

STRÄUBER, H. *et al.* Carboxylic acid production from ensiled crops in anaerobic solid-state fermentation - trace elements as pH controlling agents support microbial chain elongation with lactic acid. **Engineering in Life Sciences**, v. 18, n. 7, p. 447–458, 1 jul. 2018.

SUAREZ, C. *et al.* Metagenomic evidence of a novel family of anammox bacteria in a subsea environment. **Environmental Microbiology**, v. 24, n. 5, p. 2348–2360, 1 maio 2022.

TANG, J. *et al.* Caproic acid production through lactate-based chain elongation: Effect of lactate-to-acetate ratio and substrate loading. **Environmental Technology and Innovation**, v. 28, p. 102918, 1 nov. 2022.

TAO, Y. *et al.* Complete genome sequence of Ruminococcaceae bacterium CPB6: A newly isolated culture for efficient n-caproic acid production from lactate. **Journal of Biotechnology**, v. 259, p. 91–94, julho 2017.

TIONG, Y. W. *et al.* Startup performance and microbial communities of a decentralized anaerobic digestion of food waste. **Chemosphere**, v. 318, p. 137937, mar. 2023.

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.

VASUDEVAN, D. *et al.* Upgrading dilute ethanol from syngas fermentation to n-caproate with reactor microbiomes. **Bioresource Technology**, v. 151, p. 378–382, 2014.

VERAS, S. T. S. *et al.* Anaerobic production of valeric acid from crude glycerol via chain elongation. **International Journal of Environmental Science and Technology**, v. 17, n. 3, p. 1847–1858, 1 mar. 2020.

VILLEGAS-RODRÍGUEZ, S.; BUITRÓN, G. Performance of native open cultures (winery effluents, ruminal fluid, anaerobic sludge and digestate) for medium-chain carboxylic acid production using ethanol and acetate. **Journal of Water Process Engineering**, v. 40, p. 101784, 2020.

WALLACE, R. J. *et al.* *Eubacterium pyruvativorans* sp. nov., a novel non-saccharolytic anaerobe from the rumen that ferments pyruvate and amino acids, forms caproate and utilizes acetate and propionate. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 53, n. 4, p. 965–970, jul. 2003.

WALLACE, R. J. *et al.* Metabolic properties of *Eubacterium pyruvativorans*, a ruminal “hyper-ammonia-producing” anaerobe with metabolic properties analogous to those of *Clostridium kluyveri*. **Microbiology**, v. 150, n. 9, p. 2921–2930, set. 2004.

WANG, H. *et al.* Improvement of n-caproic acid production with Ruminococcaceae bacterium CPB6: Selection of electron acceptors and carbon sources and optimization of the culture medium. **Microbial Cell Factories**, v. 17, n. 99, 2018.

WANG, J.; YIN, Y. Biological production of medium-chain carboxylates through chain elongation: An overview. **Biotechnology Advances**, v. 55, p. 107882, 1 mar. 2022.

WANG, Q. *et al.* Promoting chain elongation efficiency from food waste by refluxing chain elongation fermentation liquid. **Journal of Cleaner Production**, v. 368, p. 133220, set. 2022.

WANG, Q. *et al.* Efficient chain elongation synthesis of n-caproate from shunting fermentation of food waste. **Bioresource Technology**, v. 370, p. 128569, fev. 2023.

WASEWAR, K. L.; SHENDE, D. Z. Reactive extraction of caproic acid using tri-n-butyl phosphate in hexanol, octanol, and decanol. **Journal of Chemical and Engineering Data**, v. 56, n. 2, p. 288–297, 10 fev. 2011.

WEIMER, P. J.; STEVENSON, D. M. Isolation, characterization, and quantification of *Clostridium kluyveri* from the bovine rumen. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 94, n. 2, p. 461–466, 2012.

WEIMER, P. J. *et al.* 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.

WONGNATE, T. *et al.* The radical mechanism of biological methane synthesis by methyl-coenzyme M reductase. **Science**, v. 352, n. 6288, p. 953–958, 2016.

WU, Q. *et al.* Long-term medium chain carboxylic acids production from liquor-making wastewater: Parameters optimization and toxicity mitigation. **Chemical Engineering Journal**, v. 388, p. 124218, 15 maio 2020.

WU, Q. *et al.* Continuous medium chain carboxylic acids production from excess sludge by granular chain-elongation process. **Journal of Hazardous Materials**, v. 402, p. 123471, 15 jan. 2021.

WU, S. L. *et al.* Transforming waste activated sludge into medium chain fatty acids in continuous two-stage anaerobic fermentation: Demonstration at different pH levels. **Chemosphere**, v. 288, 1 fev. 2022a.

WU, Q. *et al.* Effect of substrate structure on medium chain fatty acids production and reactor microbiome. **Environmental Research**, v. 204, p. 111947, 1 mar. 2022b.

WU, L. *et al.* Medium-chain carboxylate productions through open-culture fermentation of organic wastes. **Journal of Cleaner Production**, v. 373, p. 133911, nov. 2022c.

XU, J. *et al.* Temperature-Phased Conversion of Acid Whey Waste Into Medium-Chain Carboxylic Acids via Lactic Acid: No External e-Donor. **Joule**, v. 2, n. 2, p. 280–295, 21 fev. 2018.

XU, J. *et al.* Long-Term Continuous Extraction of Medium-Chain Carboxylates by Pertraction With Submerged Hollow-Fiber Membranes. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 9, 13 ago. 2021.

YANG, P. *et al.* Upgrading lignocellulosic ethanol for caproate production via chain elongation fermentation. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 135, p. 103–109, 1 nov. 2018.

YANG, Q. *et al.* Butyryl/Caproyl-CoA:Acetate CoA-transferase: Cloning, expression and characterization of the key enzyme involved in medium-chain fatty acid biosynthesis. **Bioscience Reports**, v. 41, n. 8, 1 ago. 2021.

YIN, Y. *et al.* Biological caproate production by *Clostridium kluyveri* from ethanol and acetate as carbon sources. **Bioresource Technology**, v. 241, p. 638–644, 2017.

YIN, Y. *et al.* Co-fermentation of sewage sludge and lignocellulosic biomass for production of medium-chain fatty acids. **Bioresource Technology**, v. 361, p. 127665, 1 out. 2022.

YIN, Y.; WANG, J. Medium-chain carboxylates production by co-fermentation of sewage sludge and macroalgae. **Bioresource Technology**, v. 347, p. 126718, 1 mar. 2022.

YU, J. *et al.* Performance and microbial characterization of two-stage caproate fermentation from fruit and vegetable waste via anaerobic microbial consortia. **Bioresource Technology**, v. 284, p. 398–405, 1 jul. 2019.

YUAN, S. *et al.* Caproic Acid-Producing Bacteria in Chinese Baijiu Brewing. **Frontiers in Microbiology**, v. 13, p. 883142, 4 maio 2022.

ZAGRODNIK, R. *et al.* Enrichment Versus Bioaugmentation - Microbiological Production of Caproate from Mixed Carbon Sources by Mixed Bacterial Culture and *Clostridium kluyveri*. **Environmental Science and Technology**, v. 54, n. 9, p. 5864–5873, 5 maio 2020.

ZHAI, X. *et al.* Horizontal and vertical heterogeneity of sediment microbial community in Site F cold seep, the South China Sea. **Frontiers in Marine Science**, v. 9, 8 set. 2022.

ZHANG, F. *et al.* Fatty acids production from hydrogen and carbon dioxide by mixed culture in the membrane biofilm reactor. **Water Research**, v. 47, n. 16, p. 6122–6129, 15 out. 2013.

ZHU, X. *et al.* The synthesis of n-caproate from lactate: A new efficient process for medium-chain carboxylates production. **Scientific Reports**, v. 5, 25 set. 2015.

ZHU, X. *et al.* Production of high-concentration n-caproic acid from lactate through fermentation using a newly isolated Ruminococcaceae bacterium CPB6. **Biotechnology for Biofuels**, v. 10, n. 1, p. 1–12, 2017.

ZHU, X. *et al.* A preliminary study on the feasibility of industrialization for n-caproic acid recovery from food wastewater: From lab to pilot. **Bioresource Technology**, v. 366, p. 128154, 1 dez. 2022.

ZUO, X. *et al.* The relationships among sCOD, VFAs, microbial community, and biogas production during anaerobic digestion of rice straw pretreated with ammonia. **Chinese Journal of Chemical Engineering**, v. 28, n. 1, p. 286–292, 1 jan. 2020.