

**UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
DIRETORIA DE GRADUAÇÃO E EDUCAÇÃO PROFISSIONAL
COORDENAÇÃO DO CURSO DE TECNOLOGIA EM PROCESSOS QUÍMICOS**

ANDERSON LUIZ FIORENTIN

**PRODUÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS VOLÁTEIS POR FERMENTAÇÃO
ANAERÓBICA EM MEIO CONTENDO GLICEROL**

PROJETO DE TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

**TOLEDO - PARANÁ
NOVEMBRO, 2016**

ANDERSON LUIZ FIORENTIN

**PRODUÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS VOLÁTEIS POR FERMENTAÇÃO
ANAERÓBICA EM MEIO CONTENDO GLICEROL**

Projeto de trabalho de conclusão de Curso apresentado a Coordenação do Curso Superior de Tecnologia em Processos Químicos – COPEQ – da Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR *Campus* Toledo, como requisito parcial para obtenção do título de Tecnólogo em Processos Químicos.

Orientador: Eduardo Bittencourt Sydney

**TOLEDO - PARANÁ
NOVEMBRO, 2016**

**TERMO DE APROVAÇÃO
DO TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO**

ANDERSON LUIZ FIORENTIN

**PRODUÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS VOLÁTEIS POR FERMENTAÇÃO
ANAERÓBICA EM MEIO CONTENDO GLICEROL**

Trabalho apresentado como forma de avaliação para o Trabalho de Conclusão de Curso II do curso de Tecnologia em Processos Químicos da UTFPR, *Campus* Toledo, e aprovado pela banca examinadora abaixo.

Profº Dr. Eduardo Bittencourt Sydney

Profº Dr. Renato Eising

Profª Drª. Karina Graziella Fiametti Colombo

**TOLEDO - PARANÁ
NOVEMBRO, 2016**

SUMÁRIO

SUMÁRIO	4
RESUMO	10
INTRODUÇÃO	11
2.1 OBJETIVOS	14
2.1.1 Objetivo geral	14
2.1.2 Objetivos específicos	14
3.1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	14
3.1.1 O biodiesel	14
3.1.2 O glicerol	15
3.1.3 Uso do glicerol em substrato fermentação	16
3.1.4 Ácido acético	16
3.1.5 Ácido fórmico	16
3.1.6 O ácido succínico	17
3.1.7 O ácido butírico	18
4.1 MATERIAIS E MÉTODOS	19
4.1.1 Meio de cultivo	19
4.1.2 Preparação do meio anaeróbio	19
4.1.3 Bioprospecção	22
4.1.4 Medição de gases	22
4.1.5 HPLC	22
CONCLUSÃO	28
CONSIDERAÇÕES FINAIS	Erro! Indicador não definido.
ANEXOS	31
ANEXO 1 - CROMATOGRAMA DA LINHA DE BASE	31
ANEXO 2 - CROMATOGRAMA DO PADRÃO 3g/L	32

ANEXO 3 - CROMATOGRAMA DO PADRÃO 1,5 g/L.....	33
ANEXO 4 - CROMATOGRAMA DO PADRÃO 0,75 g/L.....	34
ANEXO 5 - CROMATOGRAMA DA AMOSTRA DE PORCO	35
ANEXO 6 - CROMATOGRAMA DA AMOSTRA DE BOI.....	36
ANEXO 7 - CROMATOGRAMA DA AMOSTRA DE SOLO DE ARARA	37
ANEXO 8 - CROMATOGRAMA DA AMOSTRA DO SOLO DO ZOOLOGICO	38
REFERÊNCIAS	39

LISTA DE SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS

T	temperatura (°C)
t	tempo (min)
V	volume de solução
λ	comprimento de onda
%	pureza

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Fluxograma da produção de Biodiesel.	15
Figura 2 – Aquecimento do meio e introdução de gás carbônico	20
Figura 3 – Técnica utilizada para eliminação de oxigênio do meio.....	21
Figura 4 – Atmosfera de gás carbônico nos tubos.....	21
Figura 5 – Volume de 6 ml de meio nos tubos.....	22
Figura 6 – Curva de calibração.....	26

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Composição do meio de cultivo	19
Tabela 2 – Padrões utilizados no trabalho	24
Tabela 3 – Pureza dos padrões	25
Tabela 4 – Resultados das amostras	27

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 – Produção de gás. 24

RESUMO

O biodiesel está em crescente produção tendo um potencial na substituição do diesel como combustível, a produção do biodiesel gera como resíduo a glicerina, que é altamente poluidora que necessita de tratamento para não agredir o meio ambiente, a fermentação anaeróbica pode ser utilizada para usar essa glicerina como fonte de carbono no crescimento microbiológico, no desenvolvimento de culturas capazes de metabolizar a glicerina, utiliza-se o glicerol para pesquisar microrganismos capazes de metabolizar e gerar novos produtos como os ácidos graxos voláteis. O glicerol tem seu destaque na formação de ácidos graxos voláteis como seus produtos a partir da fermentação anaeróbica, mostrando um potencial na conversão glicerol ácido graxo em produtos com valores industriais interessantes. Esses novos produtos gerados podem servir como solução e nova renda, principalmente para aquelas indústrias onde seu resíduo necessita de um tratamento especial, para ser disposto novamente no meio ambiente respeitando as legislações ambientais.

INTRODUÇÃO

Vivemos em uma época onde pesquisas sobre biotransformação de resíduos gerados de matéria-prima processadas de origem industriais vem servindo de alternativas de tratamento e, principalmente, de utilização para geração de mais subprodutos, impactando na menor geração de resíduos dispostos no meio ambiente.

Cerca de 80% da demanda de energia global é atendida por combustíveis fósseis (petróleo, gás natural e carvão), onde suas reservas vêm encolhendo com o passar dos anos (Leite et al, 2008 e Wu et al, 2013).

Essas energias embora necessárias no momento atual da economia global, tem perdido forças para energias renováveis, que há algum tempo, vem sendo alvo de pesquisa e investimento com o objetivo de adotar uma política, que permita a diminuição e substituição do uso de combustíveis de fontes esgotáveis, por combustíveis renováveis como o Biodiesel. O Brasil tem grande potencial para produção dessas energias limpas participando na distribuição e na diversificação de fontes que geram energia no país.

De acordo com Ministério de Minas e Energia, a matriz energética brasileira é uma das mais limpas do mundo, sendo constatado que 43,9% da energia fornecida no Brasil é de origem renovável (MME, 2016).

A presidente Dilma Rousseff sancionou no dia 23/03/2016, em cerimônia no Palácio do Planalto, a Lei do senado nº 613/2015, que eleva a mistura de biodiesel ao diesel comercializado para 8% (B8), a partir 23 de março de 2017. Atualmente, são adicionados 7% da mistura biodiesel/diesel comercializado.

Propostas após a sanção da lei é de elevação na porcentagem da mistura até valores de 15% na mistura. Além de sua aplicação no setor de transportes, o

biodiesel pode também ser utilizado para a geração e abastecimento de energia elétrica em diversas comunidades isoladas em nosso país (APROBIO, 2016).

A produção acumulada de biodiesel no Brasil em 2015, bateu recorde histórico e atingiu 3.937 milhões de litros, 15,1% a mais em relação ao total produzido no mesmo período do ano anterior, que foi de 3.420 milhões de litros (APROBIO, 2016).

Por volta de 10% de todo volume de biodiesel produzido resulta na produção de um subproduto com alto caráter poluidor: a glicerina. Um grande receio é que o excesso de glicerina produzida, possa ser descartada de maneira irresponsável no meio ambiente (Costa, 2008) ou necessite de estações de tratamento muito custosas que acabem por prejudicar a viabilidade econômica de empreendimentos de produção de biodiesel.

Com os mercados tradicionais do consumo de glicerol (indústria de cosméticos, de resinas, farmacêutica, têxtil, alimentícia) estão com suas capacidades de aproveitamento limitado. Com vista nesta realidade preocupante, surge uma proposta de aplicação deste resíduo na produção ácidos graxos voláteis (AGV's).

O glicerol tornou-se uma fonte de carbono de custo baixo e abundante devido a sua geração como um subproduto inevitável a partir da produção do combustível biodiesel. A cada 10 litros de biodiesel produzidos por transesterificação de óleos vegetais ou gorduras animais, 10 litros de glicerol bruto é gerado (YAZDANI, 2007).

O tremendo crescimento da indústria de biodiesel criou um excedente de glicerol. Esta diminuição dos preços representa um problema para as indústrias de produção e refinação de glicerol, e a viabilidade econômica da própria indústria do biodiesel têm se colocado em situação preocupante (MCCOY, 2005). O desenvolvimento de processos para converter glicerol bruto em produtos de maior valor é, claramente, uma necessidade urgente.

A utilização de glicerol como matéria-prima em processos de fermentação tem ainda outra vantagem: dada a natureza altamente reduzida dos átomos de carbono no glicerol, combustíveis e produtos químicos reduzidos podem ser produzidos a partir dele, com rendimentos mais elevados do que os obtidos a partir de açúcares comuns, tais como a glucose ou xilose. Para realizar plenamente estas vantagens, o

uso de fermentações anaeróbicas é altamente desejável (GONZALEZ, 2007; YAZDANI, 2007).

Embora muitos microrganismos sejam capazes de metabolizar o glicerol na presença de oxigênio, poucos são capazes de metabolizar o mesmo em condição anaeróbica. O metabolismo fermentativo do glicerol tem sido relatado em espécies dos gêneros *Klebsiella*, *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Clostridium*, *Lactobacillus*, *Bacillus*, *Propionibacterium* e *Anaerobiospirillum* (MCCOY, 2005).

No entanto, o potencial de utilização destes organismos a nível industrial poderia ser limitado devido a questões que incluem patogenicidade, exigência de condições anaeróbicas rigorosas, necessidade de suplementação com nutrientes ricos e indisponibilidade das ferramentas genéticas e conhecimentos fisiológicos necessários para a sua manipulação eficaz (MCCOY, 2006).

2.1 OBJETIVOS

2.1.1 Objetivo geral

Produção de AGV's por fermentação anaeróbica em meio contendo glicerol.

2.1.2 Objetivos específicos

Amostragem de amostras ambientais que apresentem microrganismos anaeróbicos capazes de metabolizar glicerol.

Preparar um meio de cultura anaeróbio viável para o cultivo desses microrganismos.

Realizar a identificação e quantificação da produção de ácidos graxos voláteis ao final da fermentação.

3.1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1.1 O biodiesel

Ganhando espaço no cenário de combustíveis e energias renováveis o biodiesel é obtido a partir de fontes biológicas renováveis, tais como óleos vegetais e gorduras animais. É biodegradável e apresenta baixa emissão de gases tóxicos, além de apresentar vantagens muito interessantes, como a possibilidade real de substituir grande parte dos derivados do petróleo.

O biodiesel é tipicamente produzido pela reação de transesterificação de diferentes tipos de óleos que, auxiliado por um catalisador, reagem quimicamente com um álcool (metanol ou etanol), para produzir ésteres (biodiesel) e glicerol (Marchetti et al., 2007).

Na figura a seguir é apresentado o fluxograma da produção do biodiesel.

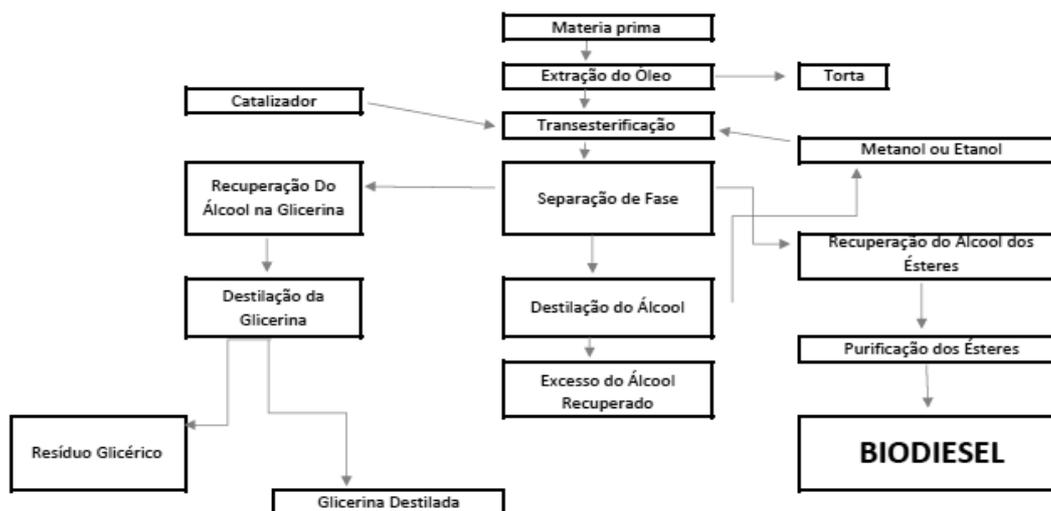


Figura 1 - Fluxograma da produção de Biodiesel

A combustão de derivados do petróleo, do carvão e gás natural, é responsável pela maior quantia de produção de energia no cenário mundial atual. A utilização de derivados do petróleo como combustível se estende desde o início do século XX, em substituição à madeira (FERREIRA, 2010 apud MOTA, 2006).

Mas devido às questões econômicas (distribuição desigual no globo terrestre) e ambientais (emissão de carbono fóssil), busca-se sua substituição por fontes renováveis e mais limpas.

O Biodiesel vem se destacando pelo seu potencial energético e queima limpa, não ser tóxico e estar livre de compostos sulfurados e aromáticos, possuindo potencial de substituir o diesel em qualquer uma de suas aplicações.

3.1.2 O glicerol

A produção acumulada de biodiesel no Brasil, em 2015, bateu recorde histórico e atingiu 3.937 milhões de litros, 15,1% a mais em relação ao total produzido no mesmo período do ano anterior, que foi de 3420 milhões de litros (APROBIO 2016).

Cerca de 10% de todo volume de biodiesel produzido resulta na produção de glicerina. Ou seja, de cada 100 m³ de Biodiesel produzido será gerado 10 m³ de glicerina com um grande potencial poluidor sendo que atualmente ainda não há definida na Política Nacional de biodiesel e com as fontes consumidoras do glicerol

estão limitadas (indústria de cosméticos, de resinas, farmacêutica, têxtil, alimentícia) a sobra deste elevado volume excedente é preocupante.

3.1.3 Uso do glicerol em substrato fermentação

Espécies de bactérias como *Clostridium*, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Klebsiella*, *Shigella*, *Nocardia*, *Enterococcus*, *L. lactis*, e espécies de *Pseudomonas* apresentam canais facilitadores de glicerol que tem a função de conduzir o glicerol para acontecer a fosforilação.

O glicerol começa a ser metabolizado já na membrana celular, dependendo das concentrações e das condições de oxigênio, onde pode ser fosforizado para glicerol-3-fosfato, ou catabolizado pela glicerol desidrogenase (PASTERIS; SAAD, 2008).

3.1.4 Ácido acético

O ácido acético é um produto químico orgânico importante produzido pela carbonilação do metanol, oxidação direta do etileno e oxidação em fase líquida do n-butano. O ácido acético também tem sido produzido a partir de etanol como vinagre desde os tempos antigos pela fermentação do vinho e cerveja (THOMAS et al, 2013).

Recentemente, um crescente interesse em produzir ácido acético a partir da fermentação anaeróbica de recursos renováveis, devido ao aumento da produtividade do produto e redução dos custos de produção (THOMAS et al, 2013).

O ácido acético produzido pela fermentação pode ser utilizado para fabricar acetato de cálcio-magnésio de baixo custo, como um produto orgânico biodegradável não corrosivo e como aditivo para unidades de combustão a carvão para controlar a emissão de enxofre (THOMAS et al, 2013).

3.1.5 Ácido fórmico

O ácido fórmico recebe esse nome pois a sua primeira obtenção foi por meio da destilação de formigas vermelhas (do latim formica = formiga), que injetam esse ácido carboxílico por meio de sua picada, causando uma dor intensa, inchaço e coceira. Essa substância é também encontrada em outros insetos como as abelhas (DUCLAUX, 1892).

Em temperatura ambiente, ele é incolor, líquido, cáustico, de cheiro forte e irritante. Esse ácido é usado como mordente, na produção de monóxido de carbono,

na produção de ácido oxálico, como germicida, como desinfetante, e na produção de outros produtos orgânicos (ASSOBHEI et al, 1998).

Atualmente, o ácido fórmico é obtido por meio da reação entre monóxido de carbono e soda cáustica. Essa reação é uma técnica similar à desenvolvida em 1855 pelo químico francês Marcellin Berthelot. Diferentemente dos outros ácidos carboxílicos, o ácido fórmico possui o grupo funcional dos aldeídos, o que lhe confere a propriedade de agir como redutor (DU et al, 2008).

3.1.6 O ácido succínico

O ácido succínico, também conhecido como ácido âmbar ou ácido butanodióico, é um ácido dicarboxílico tendo o ácido fórmula de $C_4H_6O_4$. Após a sua primeira purificação de ácido succínico a partir de âmbar por Georgius Agricola em 1546 (SONG and LEE, 2006).

O ácido succínico pode ser utilizado na indústria alimentar, farmacêutica e agrícola, precursor de muitos produtos químicos de importância industrial, incluindo ácido adípico, 1,4-butanodiol, tetrahidrofurano, N-metilpirrolidinona, 2-pirrolidinona, sais de succinato e gama-butirolactona (KHAN et al., 2009 ; BEAUPREZ et al, 2010).

Atualmente, o ácido succínico comercial é produzido principalmente pela forma de processo químico derivado de petróleo, o que limita a utilização de ácido succínico para uma vasta gama de aplicações devido ao alto custo de conversão.

No entanto, trabalhos recentes mostraram que a produção de ácido fermentação proveniente de fontes renováveis e um gás com efeito de estufa, o CO_2 poderia ser mais Petróleo (JIANG et al., 2010). Muitos pesquisadores na literatura mostraram produção biotecnológica de ácido succínico utilizando subprodutos como fonte de carbono, tais como: cana-de-açúcar melaço, glicerol.

Entre as suas principais aplicações destacam-se a preparação de solventes, vernizes, perfumes, na fabricação de tintas e corantes, plastificantes, poliésteres.

O polibutileno de succinato (PBS) é um bioplástico bastantes promissor produzido através do ácido succínico. Sua confecção é feita pela polimerização de ácido succínico e 1,4 butanodiol (DOMINGOS, 2016).

Na indústria alimentícia, o ácido é utilizado na produção de bebidas como refrigerantes, cervejas, etc. Ele serve como aromatizante e neutralizante, e é produzido pela fermentação de carboidratos. Já na indústria de medicamentos, é empregado na preparação de agentes que combatem a úlcera e de protetores

contra a radiação. Ele também é utilizado como um suplemento nutricional (SCHIESARI, 2012).

3.1.7 O ácido butírico

O ácido butírico é um ácido graxo de cadeia curta de 4 carbonos, usados em indústrias químicas, alimentares e farmacêuticas. A principal aplicação de ácido butírico está na fabricação de acetato de butirato de celulose, que é utilizado para produção de fibras têxteis. O ácido butírico é também utilizado diretamente como um aditivo às fibras para a resistência do calor e da luz solar.

A sua aplicação na produção de produtos biodegradáveis Polímero b-hidroxi-butirato está atualmente sob investigação. O butirato de cálcio tem sido utilizado em Curtimento de couro.

Os ésteres de ácido butírico foram amplamente utilizados como aditivos aromatizantes para aumentar a fragrância na indústria alimentar (ZIGOVA et al, 1999).

Vários derivados de ácido butírico são utilizados como fármacos vasoconstritores, em anestésicos bem como para antioxidantes. A aplicação de butírico no tratamento de hemoglobinopatias, câncer e doenças gastrointestinais é bem conhecido, e medicamentos derivados do ácido butírico têm sido amplamente investigadas e algumas formulações estão sendo desenvolvidas (HAMER et al, 2008).

Além disso, a adição de ácido butírico a um processo de fermentação de acetona-butanol-etanol (ABE) mostrou um aumento significativo do rendimento de bio-butanol (YANG, 2009).

Atualmente, a produção de ácido butírico é dominado pela síntese química com materiais de partida derivados de petróleo bruto (ZHU et al, 2004). Síntese química de ácido butírico é atualmente mais atraente devido ao seu baixo custo de produção e fornecimento em larga escala.

Apesar de custo de produção, o ácido butírico obtido por fermentação microbiana é frequentemente necessário para algumas aplicações específicas (YANG, 2009).

Com a diminuição da oferta de petróleo bruto mundial, o aumento da oferta de subprodutos da indústria alimentar que podem ser utilizados para a produção de ácido butírico e o aumento de consumidores de produtos naturais orgânicos aditivos

alimentares, produtos farmacêuticos e conservantes, a produção de ácido butírico através de microrganismos fermentação gerou novamente um negócio favorável (ZHU et al, 2004).

4.1 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1.1 Meio de cultivo

Tabela 1 – Composição do meio de cultivo

Composto	Concentração (g/L)
K ₂ HPO ₄	1,7
KH ₂ PO ₄	0,7
(NH ₄) ₂ SO ₄	1
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,1
CaCl ₂ .2H ₂ O	0,01
CaCO ₃	1
Extrato de Levedura	0,5
Glicerina	10

Os ensaios de meio de cultura foram preparados em um erlenmeyer de 1000 mL tendo seus reagentes utilizados conforme a tabela 1. A metodologia adotada para o preparo do meio de cultura foi a (CHATZIFRAGKOU et al., 2011).

Após o preparo do meio foi colocado em tubos de ensaio exatamente 6 ml do meio, em atmosfera de CO₂ conforme na técnica desenvolvida por Ralph S. Wolfe durante meados dos anos 1970, que é referido como " a técnica de Balch " conforme a figura 3 (Balch e Wolfe, 1976, Appl. Environ. Microbiol. 32:781-791; Balch et al., 1979, Microbiol. Rev. 43:260-296).

4.1.2 Preparação do meio anaeróbio

Os procedimentos para o crescimento do meio de cultura anaeróbico serão baseados na técnica desenvolvida por Ralph S. Wolfe durante meados dos anos 1970 , que é referido como " a técnica de Balch " (BALCH et al, 1976).

As duas partes cruciais da técnica consistem em realizar a remoção de oxigênio e com isso reduzir o potencial redox do meio de cultura pela adição de um agente redutor.

A remoção de oxigênio foi alcançada por ebulição do meio sob um ambiente sem presença de oxigênio (atmosfera de CO_2). O CO_2 foi adicionado a um tubo de parede espessa com uma solução de cobre aquecido a 150-200 °C. Conforme figura 2,3,4 e 5 a seguir (BALCH et al, 1976).

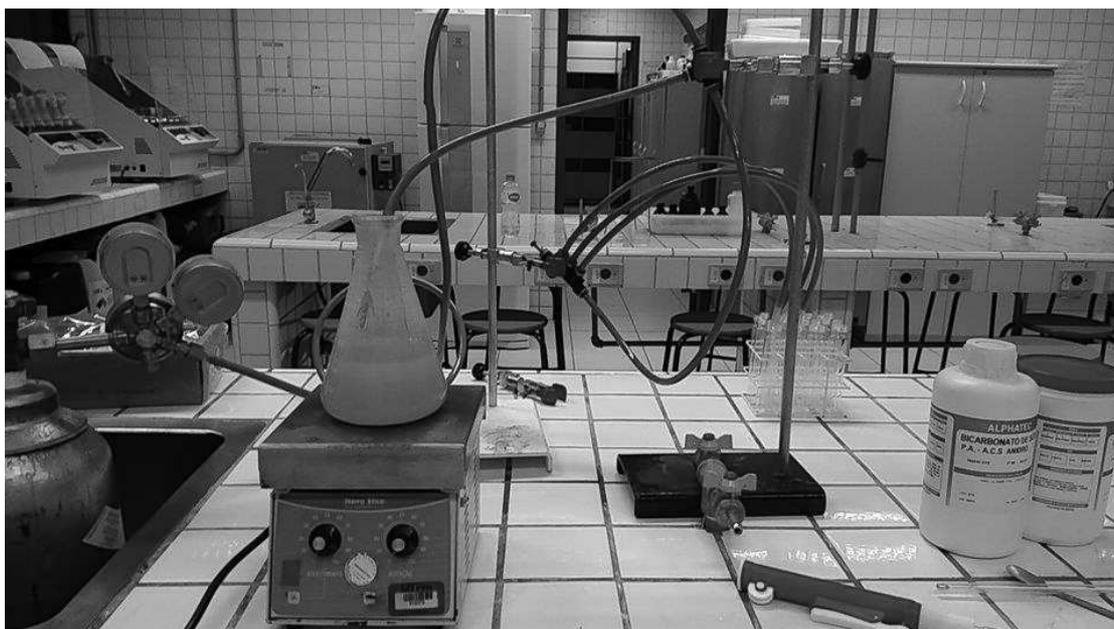


Figura 2 – Aquecimento do meio e introdução de gás carbônico

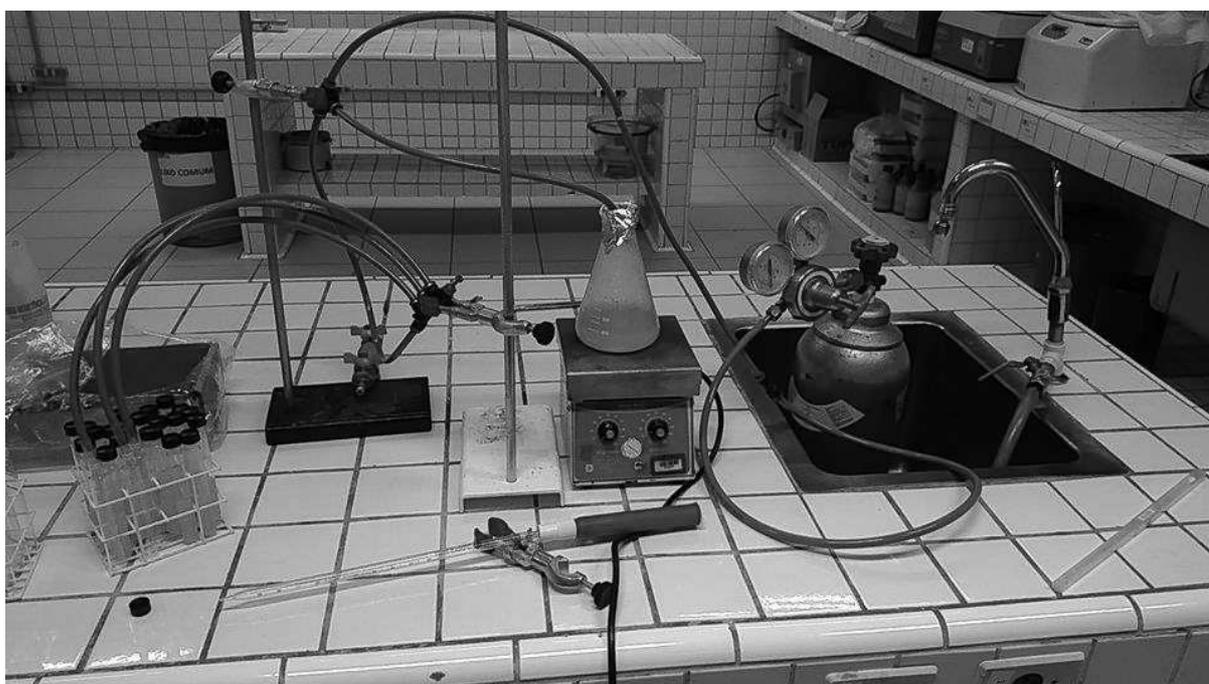


Figura 3 – Técnica utilizada para eliminação de oxigênio do meio

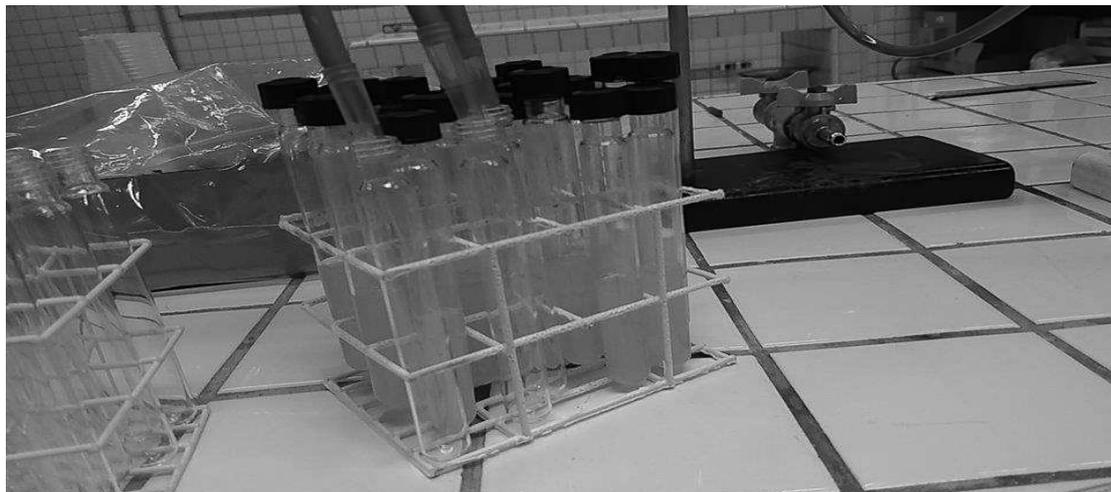


Figura 4 – Atmosfera de gás carbônico nos tubos

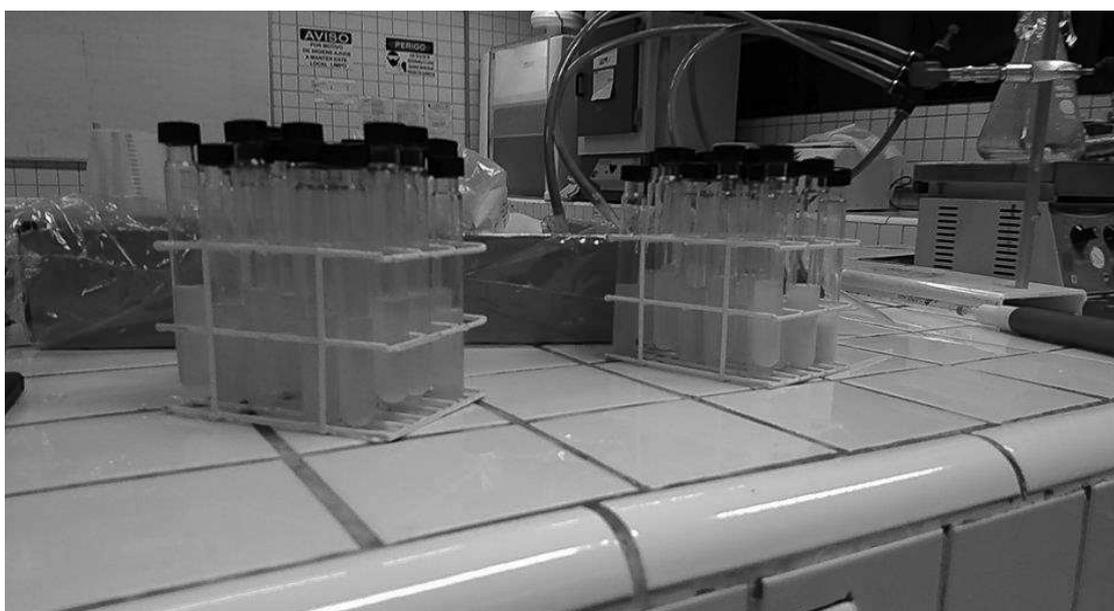


Figura 5 – Volume de 6 ml de meio nos tubos

O bicarbonato foi adicionado a uma temperatura de 85°C e cisteína a 65 ° C como agentes redutores para diminuir o potencial redox do meio. Após naturalmente resfriado até à temperatura ambiente, o meio foi distribuído em tubos de ensaio de 15ml sob atmosfera de CO₂ e autoclavado conforme a figura 4.

Os experimentos foram realizados em tubos de ensaio 15ml, com um volume trabalho de 6ml , selados com tampas autoclaváveis com rolha de borracha e incubada em uma estufa 37°C conforme figura 5.

As culturas foram mantidas nestas condições durante 1 semana, em seguida, inoculada em um novo meio. Cada nova cultura será chamado de "Geração" .

4.1.3 Bioprospecção

Foi realizada uma bioprospecção de consórcios de microrganismo capazes de produzir AGV's a partir de glicerol. Esses consórcios serão bioprospectados de ambientes que sustentam o crescimento de microrganismos anaeróbios, tal qual solo, dejetos de animais.

Foram testados no total 5 consórcios: dejetos de arara retirados do zoológico de Toledo, conteúdo estomacal de boi, conteúdo estomacal de porco, solo do viveiro de araras, solo do bosque do zoológico.

4.1.4 Medição de gases

Foram bioprospectados 500mg de cada consórcio em 5 tubos separados (um com cada consórcio), em atmosfera de CO₂, estes tubos permaneceram durante 7 dias em estufa a 37°C.

No sétimo dia é feito a medição de gás da geração com uma seringa de 20mL. Introduzindo ela a partir do septo de borracha do tubo, a pressão de gás é transferida para seringa sendo possível realizar a medição.

No sétimo dia é feito uma inoculação que consiste em retirar 1mL do tubo do estudo e passar para um novo tubo formando assim uma nova geração, no trabalho realizado foram no total de 7 gerações.

4.1.5 HPLC

A análise dos produtos de fermentação foi realizada em cromatógrafo líquido de alta eficiência, marca Thermo Scientific, modelo ULTIMATE3000, equipado com detector UV-VIS. A coluna usada será uma C18 de fase reversa da marca NST (125mm x 4,0mm x 5µm).

A análise de AGV'S foi conduzida na seguinte condição: mistura de metanol e água purificada na proporção respectivamente (10:90) e ajustado o pH para 3,0 com ácido clorídrico como fase móvel, vazão de 1,0mL/min e leitura a 210nm (EMPTAGE et al, 2000).

5.1 RESULTADOS E DISCUSSÕES

Foram feitas sete gerações de cada um dos cinco consórcios testados. O acompanhamento da produção dos mesmos foi feito a partir da medição do gás no sétimo dia de fermentação, tendo como resultados os dados expostos no gráfico a seguir.

O gráfico 1 mostra a quantidade de gás produzido de cada geração. A partir da quinta geração, observa-se que há uma estabilidade maior dos resultados, mostrando que os consórcios tendem ao equilíbrio. Na primeira geração o consórcio de dejetos de arara teve uma boa produção, mas quando replicado parou de produzir, com isso o consórcio não se mostrou interessante para o estudo e foi retirado das replicações seguintes.

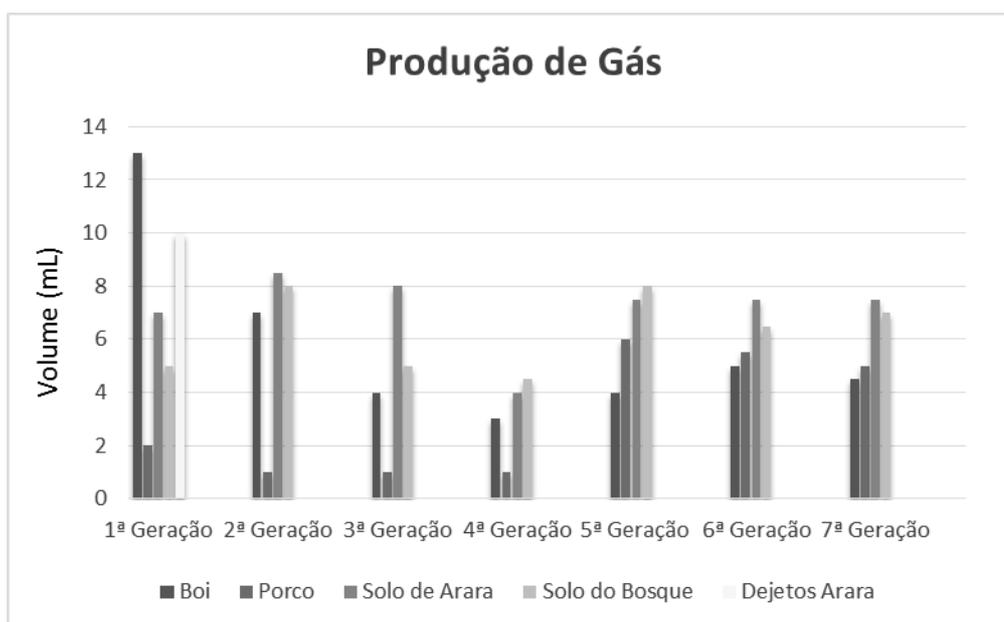


Gráfico 1 – Produção de gás

Conforme anexo 1 (Cromatograma de linha de base), percebe-se a confirmação da interação da fase móvel, não gerando nenhum pico que afete ou comprometa algum dado.

Tabela 2 – Padrões utilizados no trabalho

Nome do Pico	Padrão 0,75 g/L		Padrão 1,5 g/L		Padrão 3,0 g/L	
	Area (mAU*min)	Amount (g/L)	Area (mAU*min)	Amount (g/L)	Area (mAU*min)	Amount (g/L)
Ac. Fórmico	13,741	0,8565	24,679	1,5383	47,396	2,9543
Ac. Láctico	11,303	0,8235	21,063	1,5347	40,683	2,9643
Ac. Acético	7,652	0,7748	14,914	1,5101	29,518	2,9887
Ac. Succínico	8,893	0,827	16,939	1,5752	31,649	2,9431
Ac. Butírico	7,381	0,7402	14,882	1,4924	29,978	3,0062

Para realizar a identificação e quantificação dos AGV's produzidos foram preparados padrões de ácido láctico, ácido fórmico, ácido butírico, ácido acético e ácido succínico, ambos sendo preparados em três concentrações de 3,0g/L, 1,5g/L e 0,75g/L. Os resultados obtidos foram ilustrados na tabela 2, e seus dados foram retirados dos anexos 2, 3 e 4 (Cromatograma do padrão 3g/L; Cromatograma do padrão 1,5g/L; Cromatograma do padrão 0,75g/L).

Os resultados obtidos dos padrões nas concentrações de 1,5g/L e 3,0g/L foram satisfatórios, mostrando uma robustez na capacidade de detecção do cromatógrafo utilizado. Porém na concentração de 0,75g/L o equipamento mostrou uma defasagem na capacidade de detecção, onde os resultados obtidos com concentração inferiores possuem um pequeno desvio do seu valor verdadeiro.

Os padrões utilizados no preparo da curva de calibração têm suas informações ilustradas na tabela 3.

Tabela 3 - Pureza dos padrões

Padrão	Fabricante	Pureza (%)
Ácido Lático	SIGMA	85,0
Ácido Acético	SIGMA	99,7
Ácido Butírico	SIGMA	99,0
Ácido Succinico	SIGMA	99,0
Ácido Fórmico	SIGMA	95,0

Também foi analisado a linearidade da curva dos padrões nas três concentrações obtendo um r^2 0,999, onde mostra que a curva dos padrões é linear ilustrado na figura 6.

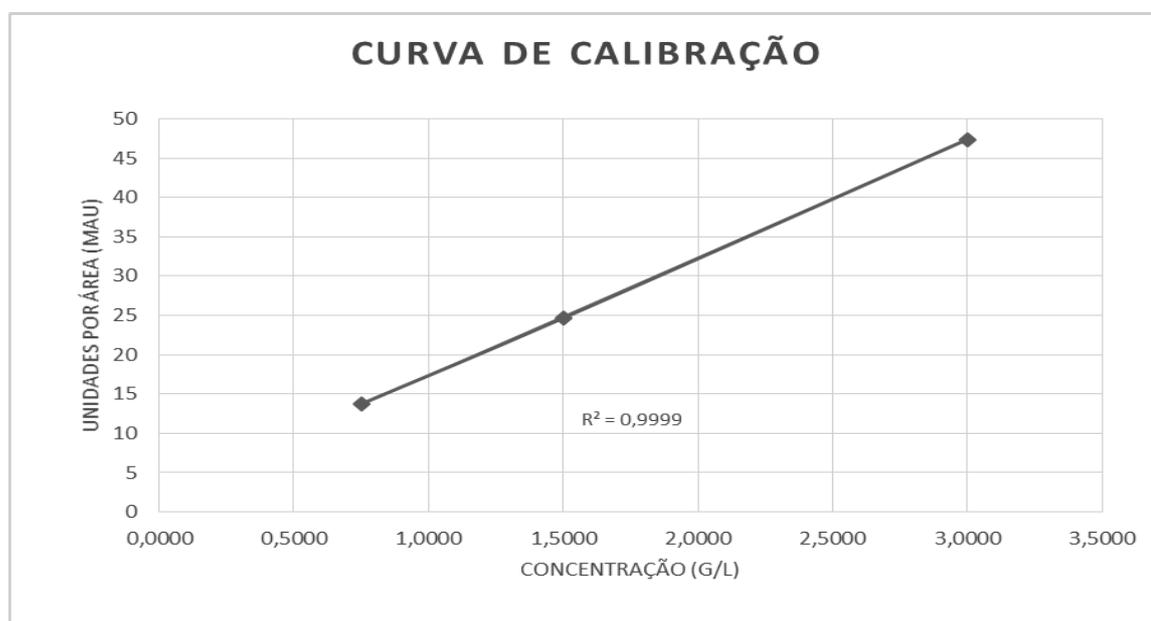


Figura 6 – Curva de calibração

Analisando os Cromatogramas ilustrado nos anexos 5, 6 e 7 (Cromatograma da amostra de porco; Cromatograma da amostra de boi; Cromatograma da amostra do solo de arara), pode-se afirmar que o método utilizado conseguiu identificar e quantificar ácidos graxos voláteis (AGV's) presentes nas amostras produzidas pelos consórcios.

Observou-se a formação de um pico não identificado em aproximadamente 8 min, que se repetiu ao se refazer os padrões. Os padrões foram injetados isoladamente (resultados não mostrados), e este pico não apareceu. Suspeita-se que deve haver uma interação do diluente com todos os padrões juntos, ou a coluna que estava com alguma substância retida. Todos os picos não formaram um ápice tendo pior caso o ácido butírico, que em sua assimetria explicada não tem acesso na universidade a coluna específica para ácidos graxos.

A fermentação anaeróbica da amostra de conteúdo estomacal de porco teve como destaque a produção de ácido láctico (1,17g/L) e ácido acético (0,8866g/L) (Anexo 5 – Cromatograma da amostra de porco), porém em quantidades relativamente baixas. Identificou-se também a produção de pequenas quantidades de ácido fórmico, succínico e butírico. No cromatograma observa-se também a presença de alguns picos desconhecidos, que podem ser outros tipos de AGV.

No Anexo 6 (Cromatograma da amostra de boi), mostra que a amostra do consórcio de boi produziu os AGV's em baixas concentrações o que o torna pouco interessante. Esperava-se que este consórcio fosse um dos maiores produtores, uma vez que há uma comunidade anaeróbica muito grande no estômago de ruminantes, porém o meio contém glicerol o qual não faz parte da dieta do animal. A fermentação com a amostra obtida do solo de criadouro de araras resultou na produção de ácido butírico e acético, com concentrações significativas de ácido láctico e succínico (Anexo 7 – Cromatograma da amostra do solo de arara). Esta mistura de AGV dificulta sua aplicação em um processo industrial por onerar a etapa de purificação.

No Anexo 8 (Cromatograma da amostra do solo do zoológico) temos o resultado mais promissor com produção de ácido succínico e ácido acético em grandes quantidades. Este consórcio se mostra com o maior potencial dentre os avaliados, para a conversão do glicerol em novos produtos via fermentação anaeróbica.

A tabela 3 ilustra os resultados de todos os consórcios, no qual o consórcio do solo do bosque se destaca fortemente em relação aos outros resultados. Dos 10g/L que foi fornecido no meio de glicerol foram 6g/L (3 de ácido succínico e 3 de ácido

acético) convertidos em produtos com alto valor comercial, onde mostra todo o potencial do meio analisado.

Nome do Pico	Solo do Bosque		Dejetos de Arara		Conteúdo Estomacal do Boi		Conteúdo Estomacal do Porco	
	Area mAU*min	Amount	Area mAU*min	Amount	Area mAU*min	Amount	Area mAU*min	Amount
Ác. Fórmico	2,24	0,1396	0,83	0,0518	2,201	0,1372	3,403	0,2121
Ác. Láctico	7,44	0,5421	5,529	0,4029	4,843	0,3528	16,089	1,1723
Ác. Acético	32,908	3,332	7,645	0,7741	0,196	0,0198	8,757	0,8866
Ác. Succínico	36,194	3,3657	5,911	0,5497	1,124	0,1046	3,497	0,3252
Ác. Butírico	Na	na	9,979	1,0007	9,16	0,9186	1,919	0,1924

Tabela 4– Resultados das amostras

6.1 TRABALHOS FUTUROS

Com os resultados discutidos anteriormente proponho que, para conseguir resultados melhores, é necessário trabalhar e realizar uma cromatografia com coluna específica para ácidos graxos, ou fazer cromatografia gasosa, tendo em vista que a coluna usada possui parâmetros que podem ser melhorados, como uma melhor separação dos picos e uma melhor assimetria dos picos. Isto pode ser melhorado com uma coluna específica para AGV'S juntamente com variações na fase móvel.

Segundo (TAVARES ET AL,2015) a produção do 1,3 propanodiol deve ocorrer com controle do pH para evitar que sua via metabólica seja deslocada para a produção AGV'S. Como não foi possível fazer o controle de pH pois o volume de trabalho de 6mL impossibilita esse fator, logo, para realizar o controle do pH, seria necessário o uso de reator anaeróbico e um volume de trabalho maior.

Dentre os consórcios microbianos estudados, aquele prospectado do solo do bosque do zoológico apresentou os resultados mais interessantes visando a produção de biomoléculas de alto valor agregado a partir do glicerol.

Ainda, sugere-se realizar estes experimentos utilizando um resíduo bruto vindo de uma usina de biodiesel para se comparar com os resultados aqui obtidos (meio sintético), avaliando-se o efeito de contaminantes da produção de biodiesel (como metanol ou etanol, por exemplo) no metabolismo desses consórcios.

CONCLUSÃO

Os consórcios analisados juntamente com as condições do meio usando glicerol como principal fonte de carbono, mostram resultados satisfatórios, principalmente o consórcio bioprospectado do solo de bosque, onde o mesmo produziu produtos de alto valor industrial, justificando um apelo para sequência da pesquisa sobre esse consórcio por se mostrar muito promissor.

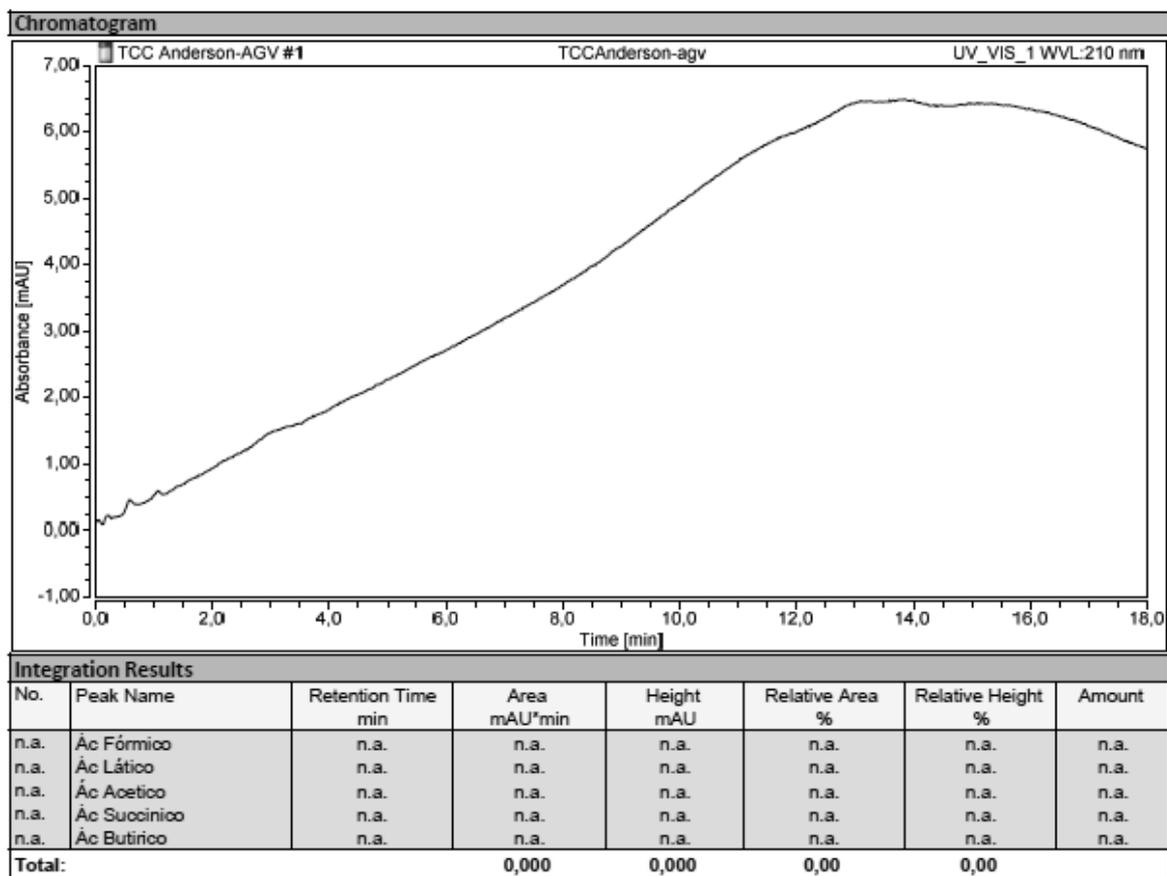
O método de cromatografia de alta eficiência atendeu os objetivos, sendo robusto e linear para realizar a identificação e quantificação de ácidos graxos voláteis.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

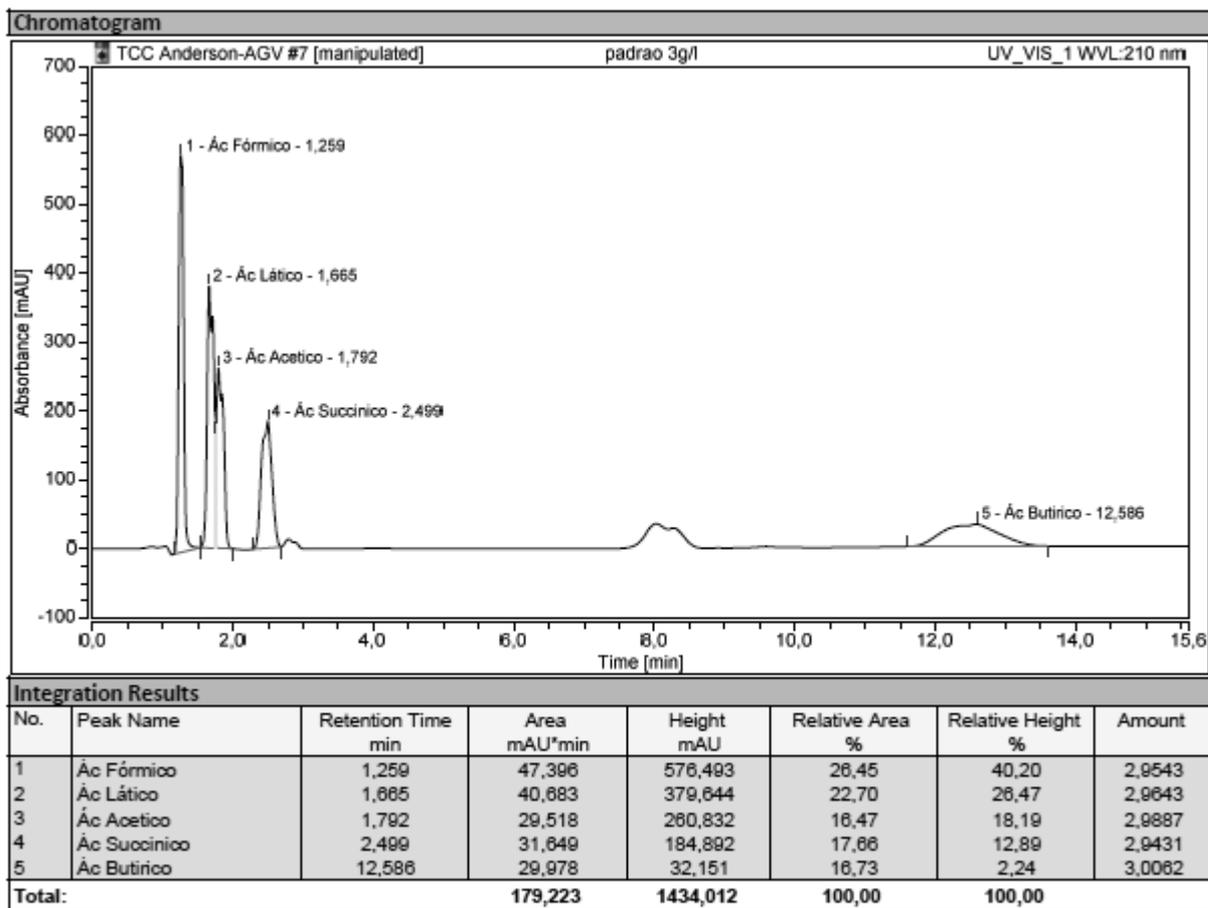
Tomando de ponto de partida a problemática em relação ao resíduo gerado pela fabricação do biodiesel sem ter como o mercado atual absorver todo esse resíduo (glicerol), a proposta futura de solução deste trabalho é utilizar o glicerol juntamente com um consórcio de microrganismos capaz de fazer a transformação do glicerol em AGV's e torná-lo um produto com rentabilidade industrial e também ambiental.

ANEXOS

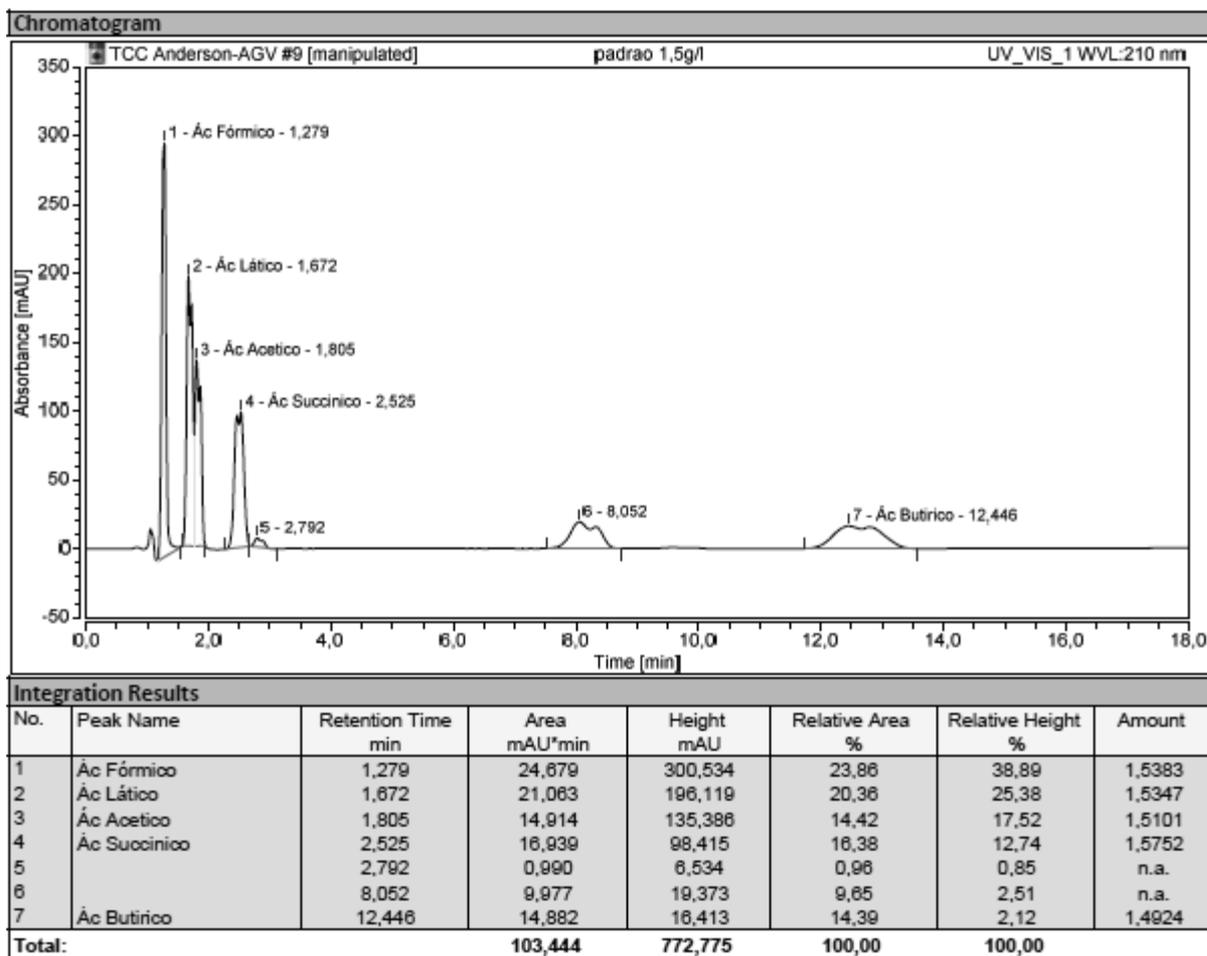
ANEXO 1 - CROMATOGRAMA DA LINHA DE BASE



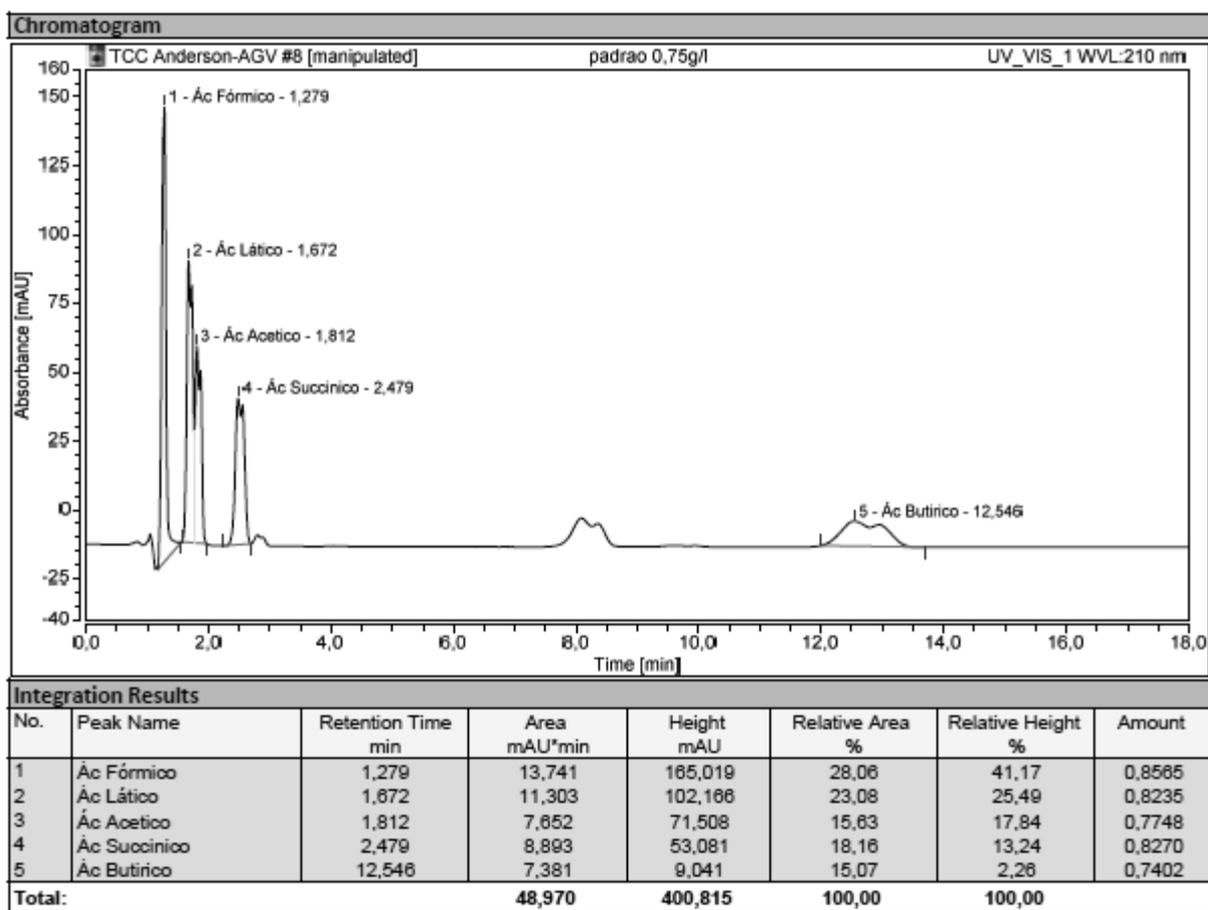
ANEXO 2 - CROMATOGRAMA DO PADRÃO 3g/L



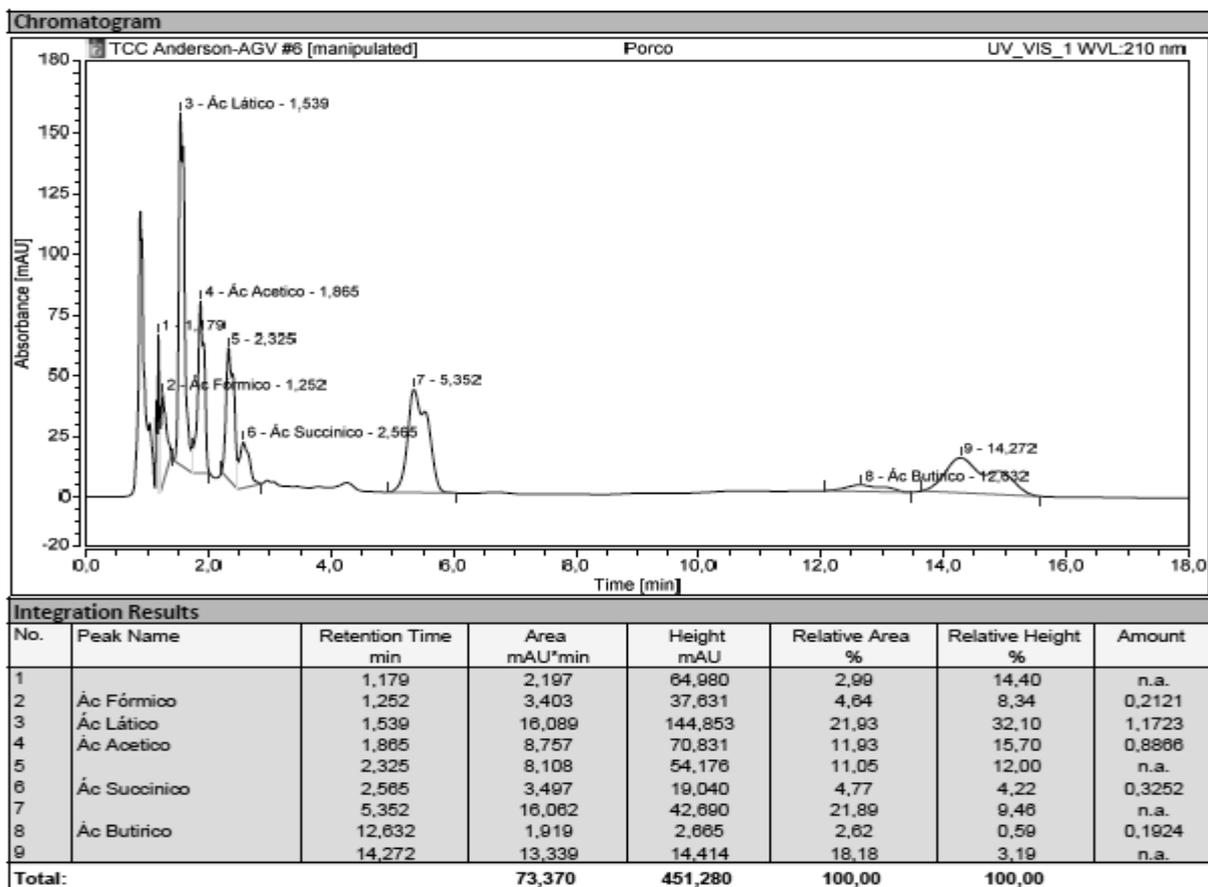
ANEXO 3 - CROMATOGRAMA DO PADRÃO 1,5 g/L



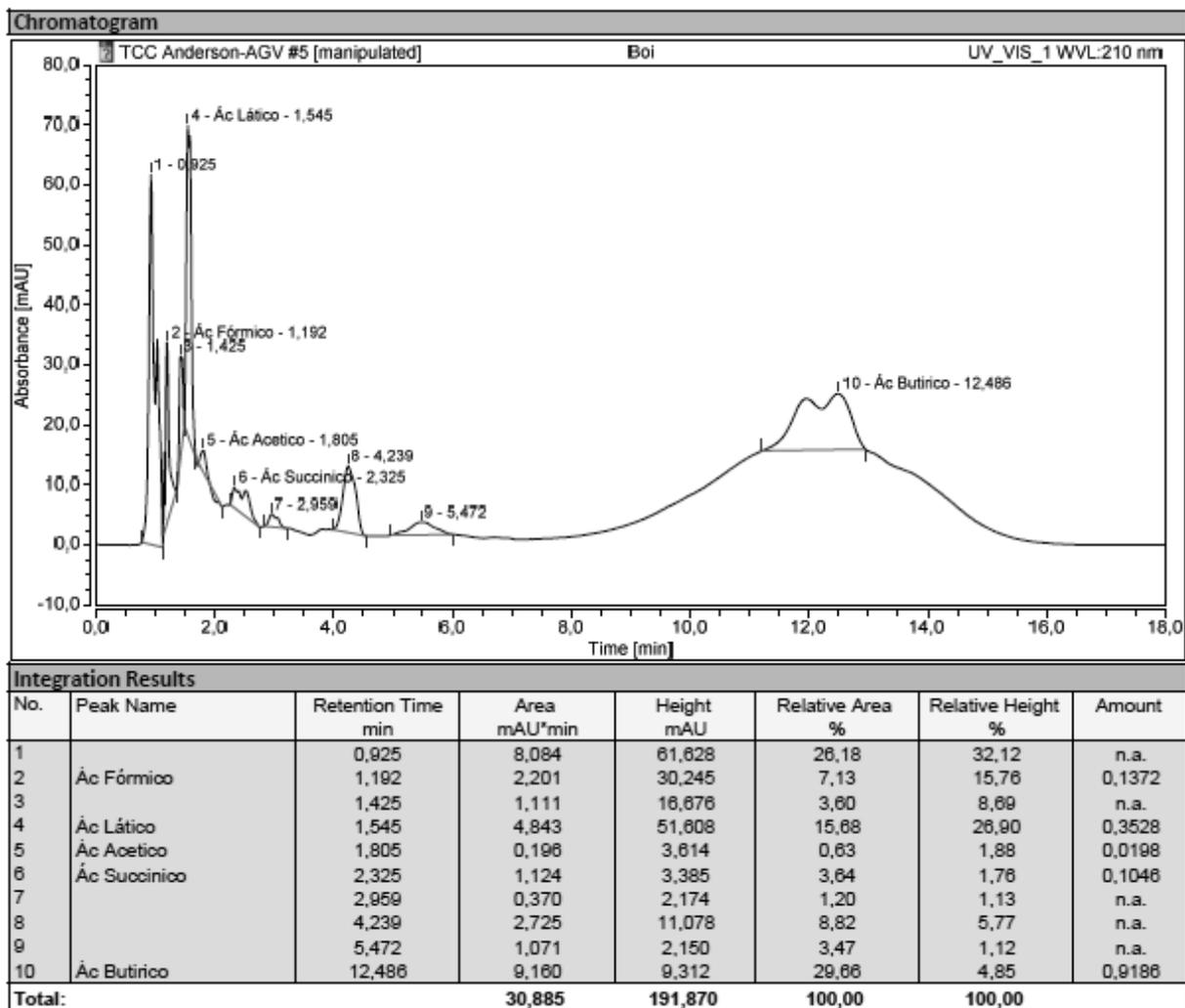
ANEXO 4 - CROMATOGRAMA DO PADRÃO 0,75 g/L



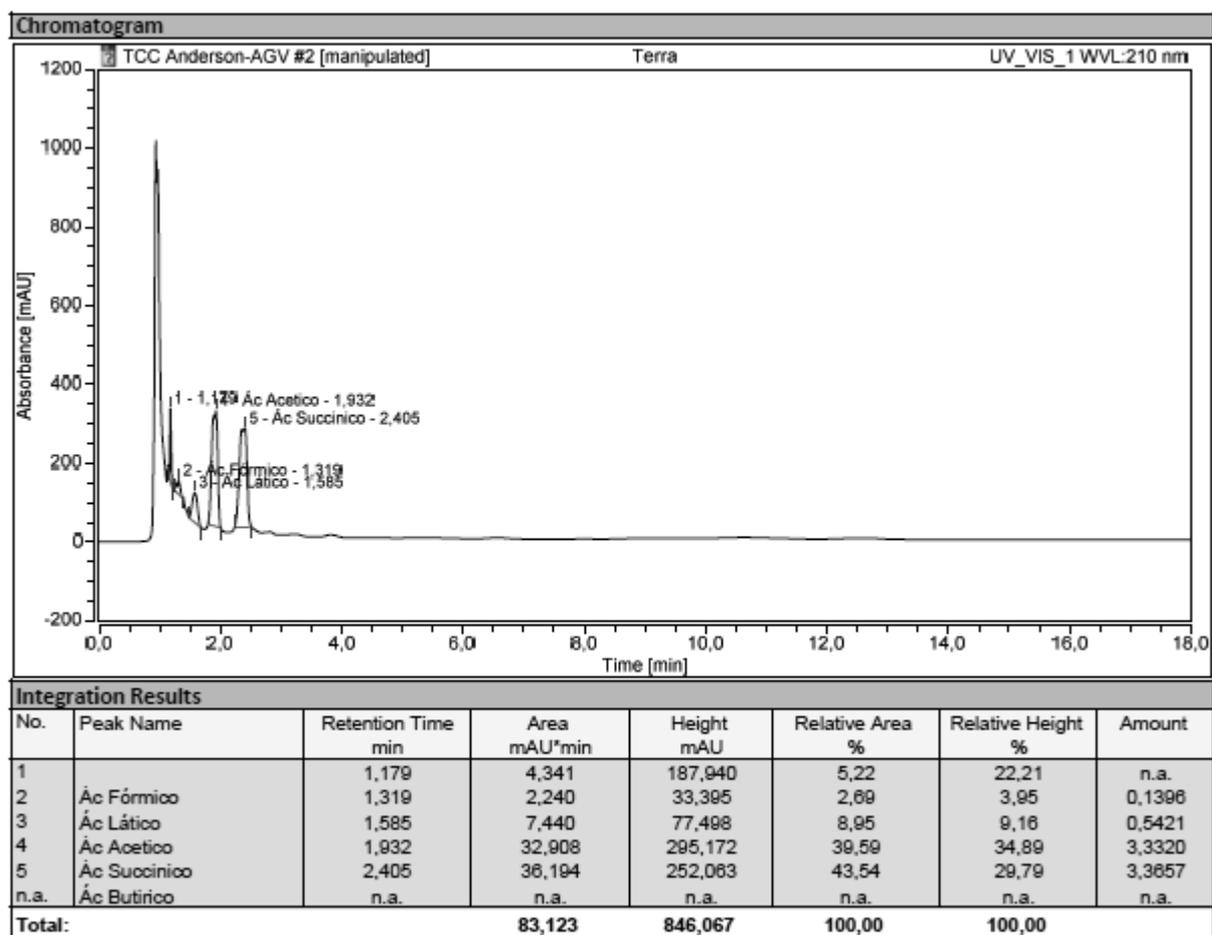
ANEXO 5 - CROMATOGRAMA DA AMOSTRA DE PORCO



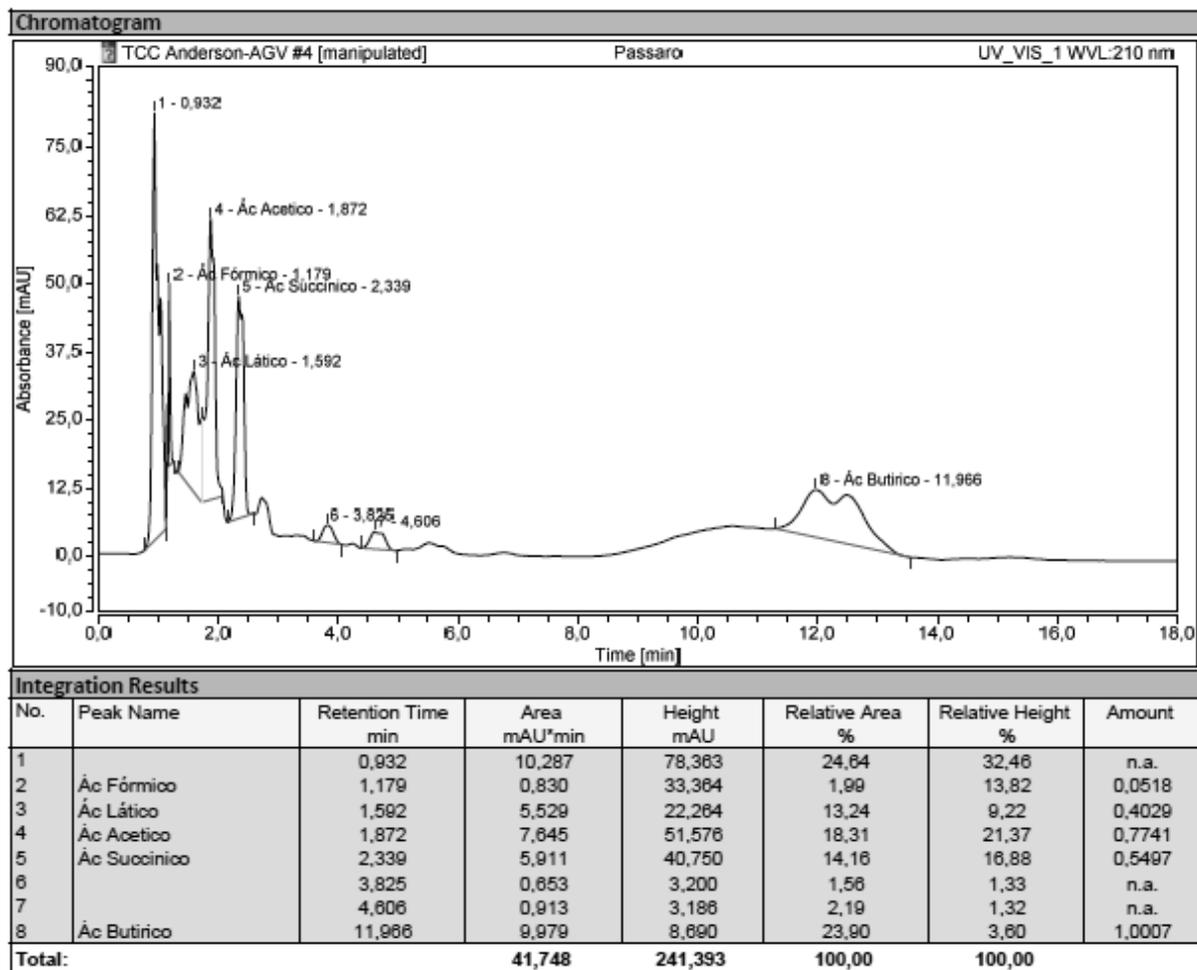
ANEXO 6 - CROMATOGRAMA DA AMOSTRA DE BOI



ANEXO 7 - CROMATOGRAMA DA AMOSTRA DE SOLO DE ARARA



ANEXO 8 - CROMATOGRAMA DA AMOSTRA DO SOLO DO ZOOLÓGICO



REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- LEITE, J. A. C.; FERNANDES, B. S.; POZZI, E.; BARBOZA, M.; ZAIAT, M. **“Application of an anaerobic packed-bed bioreactor for the production of hydrogen and organic acids. International Journal of Hydrogen Energy”**, v. 33, p. 579-586, 2008.
- WU, X.; ZHU, J.; MILLER, C. **“Kinetics study of fermentative hydrogen production from liquid swine manure supplemented with glucose under controlled pH, Journal of Environmental Science and Health, Part B: Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes.”** v. 48, n. 6, p. 477-485, 2013.
- FERREIRA, Hilder Caldas. **“Estudo da produção de hidrogênio através da reforma auto-térmica do glicerol em um reator poroso não-convencional.”** Fortaleza, 2010, p.71p, Tese (Graduação em Engenharia Química). Disponível em: <[http://www. eq.ufc.br/TFC/TFC_2010_Ferreira.pdf](http://www.eq.ufc.br/TFC/TFC_2010_Ferreira.pdf)> Acesso em: 25 Abril. 2016.
- LIMA, Paulo César Ribeiro. **“Biodiesel: um novo combustível para o Brasil.”** Caderno de Altos Estudos. Câmara dos Deputados. Brasília, 2005.
- RAMOS, L. P. et al. **“Biodiesel: Um projeto de sustentabilidade econômica e socioambiental para o Brasil”**. Revista Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento, v. 31, p.28-37, 2003.
- OLIVEIRA, Ângela Maria D. R. de. **“Matriz energética e impacto ambiental.”** 2009.
- RATHMANN, R. et al. **“Biodiesel: uma alternativa estratégica na matriz energética brasileira?”**, Curitiba, 2005. Acesso em: maio. 2016.
- PRESTES, Isabele Augusta Ferreira. **“Introdução do biodiesel na matriz energética do Ceará.”** PORTAL SÃO FRANCISCO. 2016. Acesso em: maio. 2016.
- NETO, Pedro R. Costa et al. **“Transesterificação de óleo comestível usado para a produção de biodiesel e uso em transportes.”** Acesso em: maio. 2016.
- APROBIO. **“CNPE define regras para as misturas de biodiesel B7 e B8.** Abril, 2016. Disponível em: <<http://aprobio.com.br>>

MINISTÉRIO DE MINAS E ENERGIA. **“Matriz energética de 2016 terá maior participação das energias renováveis.”** Disponível em <<http://www.mme.gov.br>> Acesso em Abril. 2016 .

EMPTAGE et al, **“Process for the biological production of 1,3-propanediol with high titer”** Número da publicação: US6514733 B1, Agosto, 2000.

SILVA G, P.; CONTIERO J.; NETO P. M. A.; LIMA C. J. B. (2014) **1,3-propanediol: production, applications and biotechnological potential** Química Nova v.37 no.3 SãoPaulo Junho 2014. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S01004042201400030002> Acesso 04/04/2016.

TAVARES, A. S.; MARTINS, F. F.; COELHO, M. A. Z.; FERREIRA, T. F.; **Produção de ácido butírico por clostridium butyricum a partir de glicerina**, p. 2159-2164. In: Anais do XX Congresso Brasileiro de Engenharia Química - COBEQ 2014 Magazine Blucher Chemical Engineering Proceedings, v.1, n.2, p. 17-19, 2014.

CHATZIFRAGKOU, A.; PAPANIKOLAOU, S.; DIETZ, D; DOULGERAKI, A.I.; NYCHAS, G.-J; ZANG, A.-P. **Production of 1,3-propanediol by Clostridium butyricum growing on biodieselderived crude glycerol through a non-sterilized fermentation process**. v. 91 p. 101-112, 2011.

BALCH, W.E. & R.S. WOLFE. (1976). **New approach to the cultivation of methanogenic bacteria: 2-mercaptoethanosulfonic acid-dependent growth of Methanobacterium ruminantium in a pressurized atmosphere**. Appl Environ Microbiol v.32, p.781-791, 1976.

PASTERIS, S.E.; STRASSER DE SAAD, A.M. **Transport of glycerol by Pediococcus pentosaceus isolated from wine**. Magazine Food microbiology. v. 25, p. 545-549, 2008.

YAZDANI, S. S., R. GONZALEZ. (2007) **Anaerobic fermentation of glycerol: a path to economic viability for the biofuels industry**. Curr. Opin. Biotechnol. V. 18 p. 213-219, 2007.

MCCOY, M. (2005) Magazine Chemie & Engineering **An unlikely impact**. v. 83, p. 24-26, 2005.

MCCOY, M. (2006). Magazine Chemie & Engineering **Glycerin surplus**. v. 84, p. 7-8, 2006.

ZIGOVA J, S TURDI'K E, VANDA'K D, SCHLOSSER S (1999) **Butyric acid production by Clostridium butyricum with integrated extraction and pertraction**. **Process Biochem** v. 34, p. 835–843, 1999.

HAMER H, JONKERS D, VENEMA K, VANHOUTVIN S, TROOST FJ, BRUMMER (2008) **Review article: the role of butyrate on colonic function**. **Aliment Pharmacol Ther** v. 27, p. 104–119, 2008.

YANG S (2009) (United States Ohio) The Ohio State University. **Preparing butanol comprises providing feedstock having carbohydrate source; fermenting the carbohydrate source with butyric-acid producing bacteria to give butyric acid and hydrogen; and hydrogenating butyric acid with catalyst** v.12, p.56-88, 2009

ZHU Y, YANG S-T (2004) **Effect of pH on metabolic pathway shift in fermentation of xylose by Clostridium tyrobutyricum**. **J Biotechnol** v. 110, p. 143–157, 2004.

SONG H., LEE S. Y., (2006) **Production of succinic acid by bacterial fermentation** Magazine Enzyme and Microb Tech V. 39, p. 352-361, 2006.

KHAN M. K., MISHRA P. K., KUMAR U., MISHRA M., SHARMA T., PERMAR V, (2009), **Production of succinic acid of related microbial strain**, **Glob J. of Biotechnol & Biochem**, V. 4, p. 47-50, 2009.

BEAUPREZ J. J., MEY M. DE, SOETAERT W. K., (2010), **Microbial succinic acid production: Natural versus metabolic engineered producers**, Magazine Process Biochem, v. 45, p. 1103-1114, 2010.

THOMAS B. CAUSEY; LONNIE O'NEAL INGRAM; KEELNATHAM SHANMUGAM; SHENGDE ZHOU. (United States Florida). University Of Florida Research Foundation. **Materials and methods for the efficient production of acetate and other products.** US n° 8383374 B2, 7 jun. 2011, 26 fev. 2013. v. 1, p. 10-35, 2013.

DUCLAUX, E. **Sur l'action antiseptique de l'acide formique.** Ann. Inst. Pasteur v.6, p.593-599, 1892.

ASSOBHEI, O., A. E. KANOUNI, M. ISMAILI, M. LOUTFI, AND H. PETITDEMANGE.1998. **Effect of acetic and butyric acids on the stability of solvent and spore formation by Clostridium acetobutylicum ATCC 824 during repeated subculturing.** J. Ferment. Bioeng. v.85, p.209-212, 1998.

DU, L., HUYGHE E, IZARD V, RIGOT JM, 2008. **Formic acid induces Yca1p-independent apoptosis-like cell death in the yeast Saccharomyces cerevisiae.** FEMS Yeast Res. v.8, p.531-539, 2008.