



UNIVERSIDADE DA BEIRA INTERIOR
Ciências

Biodegradação Anaeróbia do Bagaço de Azeitona

Vanessa da Rocha Soares Guilherme

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Química Industrial
(2º ciclo de estudos)

Orientador: Prof. Doutora Isolina Cabral Gonçalves
Co-orientador: Prof. Doutor António Miguel Morão

Covilhã, Setembro de 2012

Agradecimentos

Concluído este trabalho, é com enorme prazer e satisfação que manifesto todo o meu reconhecimento a todos os que, de forma directa ou indirecta, contribuíram para a sua realização.

Agradeço:

À Professora Doutora Isolina Cabral Gonçalves que sem a sua valiosíssima orientação, a conclusão deste trabalho não teria sido possível. Agradeço por todo o interesse, ajuda prestada ao longo da realização do trabalho laboratorial e escrito, incentivo, paciência, conhecimentos transmitidos, sugestões e críticas que permitiram melhorar este trabalho e acima de tudo pela permanente disponibilidade demonstrada.

Ao Professor Doutor António Miguel Mourão pela disponibilidade e pelo apoio manifestado.

À Professora Doutora Ana Carreira Lopes, além do apoio demonstrado ao longo dos anos se não tivesse motivado a prosseguir com o mestrado, certamente não estaria aqui.

Ao Rui e à D.Ana pelo apoio, incentivo, auxílio e conhecimentos transmitidos ao longo do trabalho.

Uma palavra de apreço também ao Sr Carlos Pereira pelos substratos disponibilizados, imprescindíveis para a realização do trabalho.

Aos meus amigos D.Julieta e Família Vale, pela inquestionável amizade e por estarem verdadeiramente sempre ao meu lado. Agora já me posso dedicar à reforma agrária...

À Nela, à minha avó, à Guiducha, ao Quim e a todos os meus familiares e amigos que sempre me apoiaram, incentivaram e encorajaram.

Ao meu pai, estiveste e estarás sempre a meu lado.

À minha mãe, às minhas irmãs e ao meu cunhado que por além de me aturarem... agradeço-vos POR TUDO. Se entrasse em pormenores, escrevia uma tese.

Resumo

As tecnologias aplicadas ao tratamento de resíduos têm actualmente como objectivo fundamental, não só a produção de água limpa para a reutilização e reciclagem, como também a recuperação de produtos químicos (nutrientes, celulose, polihidroxialcanoatos, entre outros compostos), a par da valorização energética dos poluentes, factores que constituem a força motriz subjacente à obtenção de um ecossistema sustentável. Considerando que nos anos vindouros serão geradas elevadas quantidades de resíduos agrícolas, devido a um aumento significativo do consumo nos países em desenvolvimento, a recuperação bioenergética e de subprodutos deste sector de actividade são de primordial importância. Neste contexto, estudou-se a produção de metano a partir do bagaço húmido e seco de azeitona, resíduos sólidos gerados durante o processo com extracção contínua de três fases de produção de azeite.

A fim de se obter uma melhor compreensão dos processos envolvidos na degradação de lignina, um resíduo lenhocelulósico, efectuou-se a degradação termofílica anaeróbia de aldeídos fenólicos, seringaldeido e *o*-vanilina (monómeros de lignina), numa primeira fase do trabalho experimental. Os resultados indicam que ambos os compostos são passíveis de degradação anaeróbia. A presença de co-substratos favorece claramente o processo de metabolização, embora o tempo de reacção necessário à degradação da *o*-vanilina seja cerca de 3 vezes superior ao obtido na degradação de igual quantidade de seringaldeido.

A digestão anaeróbia mesofílica do bagaço de azeitona mostra que o bagaço húmido apresenta um maior potencial de biogás (cerca de 93 ml/g) do que o obtido para o bagaço seco (11-13 ml/g), num período de tempo inferior (cerca de três vezes mais curto). Além disso, o potencial de produção de biogás do bagaço de azeitona húmido é maior (93,5 mL biogás/gVSS.d) do que o obtido para o bagaço de uva (43-65 mL biogás/gVSS.d) e dreche cervejeira (19-36 mL biogás/gVSS.d) em condições teste semelhantes (Oliveira, 2011; Tomé, 2009). Estes resultados sugerem que a biometanação do bagaço húmido é uma tecnologia promissora, pois além de converter os poluentes orgânicos em biodiesel com elevada eficiência, contribui ainda quer para a diminuição dos custos associados ao tratamento clássico de águas ruças, quer ao consumo de água fresca.

Palavras-chave

Bagaço de azeitona, biodegradação anaeróbia, compostos fenólicos, biogás

Abstract

Technologies applied for waste treatment have been changing their objectives, since besides producing clean water for reuse and recycling, the recently chemicals recovery (nutrients, cellulose, polyhydroxyalkanoates among others) along with the energetic valorisation of pollutants, have become more and more, the real driving forces for getting a sustainable ecosystem. Considering that large amounts of agricultural residues will be produced in coming years, due to a significant increase of consumption level in developing countries, the recovery of bioenergy and by-products of this activity sector is of primordial importance. In this context, the biomethanation of wet and dried olive pomace, solid waste generated from a three phase process of olive oil production, was evaluated.

In order to get a deeper understanding of the processes involved in lignin degradation, a lignocellulosic residue, anaerobic thermophilic degradation of phenolic aldehydes, syringaldehyde and *o*-vanillin (lignin monomers), has been carried out in the first phase of the experimental work. Results indicate that both compounds are amenable to anaerobic degradation. The presence of co-substrates clearly enhance the degradation process, although the reaction time necessary for *o*-vanillin degradation was car 3 times higher than that obtained for the same amount of syringaldehyde.

The anaerobic mesophilic digestion of olive pomace shows that wet residue has a higher potential biogas production (car 93 ml/g pomace) than the obtained for the dried olive pomace (11-13 ml/g pomace), in a shorter period of time (car three times less). Furthermore, the potential biogas production for wet olive pomace (93,5 mL biogas/gVSS.d) is greater than that obtained for grape pomace (43-65 mL biogas/gVSS.d) and spent brewery grain (19-36 mL biogas/gVSS.d) in similar test conditions (Oliveira, 2011; Tomé, 2009). These results suggest that the biomethanation of wet olive pomace is a promising technology, since not only converts organic pollutants into biodiesel with high efficiency, but also decrease both the associated costs to the classic olive oil effluents treatment and raw water consumption.

Keywords

Olive pomace, anaerobic biodegradation, phenolic compounds, biogas

Índice

CAPÍTULO I - Introdução	1
1.1. Objectivo da dissertação	2
1.2. Estrutura da dissertação	2
CAPITULO II - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
2.1. A oliveira e o cultivo da azeitona	3
2.1.1. Botânica da Oliveira	4
2.1.2. Desenvolvimento e maturação dos frutos	5
2.2. Sistemas de extracção de azeite	5
2.2.1. Sistema de prensa Hidráulica	7
2.2.2. Sistema de centrifugação contínua de três fases	8
2.2.3. Sistema de centrifugação contínua de duas fases	9
2.3. Resíduos provenientes dos olivais e dos lagares	10
2.3.1. Características físico-químicas dos subprodutos do olival	10
2.3.2. Produção de resíduos obtidos através dos diferentes processos de extracção de azeite	12
2.4. Processos Biológicos	16
2.4.1. Digestão Anaeróbia	16
2.4.2. Processo de digestão anaeróbia	18
2.4.3. Etapas envolvidas no processo da digestão anaeróbia	20
2.4.3.1. Hidrólise	20
2.4.3.2. Fermentação	20
2.4.3.3. Acidogénese	21
2.4.3.4. Acetogénese	21
2.4.3.5. Metanogénese	22
2.4.4. Parâmetros de processo importantes na digestão anaeróbia	24
2.5. Biodegradação de compostos aromáticos	27
2.5.1. Compostos Fenólicos	28
2.5.2. Lignina	29
2.5.2.1. Biodegradação anaeróbia da Lignina	30
2.5.2.2. Biodegradação anaeróbia de monómeros derivados da lignina	31
Capítulo III - Materiais e Métodos	33
3.1. Meio de cultura	33
3.2. Substratos utilizados nos ensaios de biodegradação	34
3.2.1 Siringaldeído	34

3.2.2 Vanilina	35
3.2.3. Bagaço de azeitona seco e húmido	36
3.3. Extracção do Azeite	37
3.3.1. Variedades de azeitona	37
3.3.2. Descrição do processo produtivo	38
3.4. Inóculo	44
3.5. Parâmetros Analisados	44
3.5.1. Absorvância	44
3.5.2. Carência Química de Oxigénio (CQO)	44
3.5.3. pH	45
3.5.4. Biogás	45
3.5.5. Sólidos	45
3.5.6. Teor de Proteína	46
3.5.6.1. Azoto de Kjeldahl	46
3.5.7. Azoto Amoniacal ($N - NH_4^+$)	47
3.5.8. Lignina	47
3.5.9. Compostos Fenólicos Totais	48
3.6 - Metodologia Experimental	51
3.6.1. Biodegradação anaeróbia de compostos aromáticos derivados de lignina	52
3.6.2. Biodegradação de bagaço de azeitona	56
3.6.2.1. Lixiviação do bagaço de azeitona seco e húmido a $T = 37 \pm 3^\circ C$ e $T = 50 \pm 2^\circ C$	56
3.6.2.2. Biodegradação anaeróbia mesófila	57
Capítulo IV - Análise dos resultados e discussão	59
4.1 Biodegradação anaeróbia de compostos aromáticos gerados por degradação da lignina	59
4.1.1. Caracterização da biomassa	59
4.1.2. Biodegradação do Siringaldeído	59
4.1.3. Biodegradação da <i>o</i> -vanilina	68
4.1.4. Análise Comparativa da biodegradabilidade de aldeídos fenólicos	74
4.2 Biodegradação anaeróbia do bagaço de azeitona húmido e seco	76
4.2.1 Ensaio de Lixiviação	76
4.2.2 Biodegradação anaeróbia de bagaço de azeitona	84
4.2.2.1. Caracterização da biomassa	85
4.2.2.2. Biodegradação anaeróbia de bagaço de azeitona seco e húmido	85

Capítulo V - Conclusão e perspectivas de trabalho futuro	95
Bibliografia	99
Cibergrafia	108

Lista de Figuras

Figura 1 - Estrutura da dissertação

Figura 2 - Corte transversal de uma azeitona com as suas partes constituintes (Ramalheiro, 2009)

Figura 3 - Esquema geral da extracção de azeite (adaptado de Silva, 2009)

Figura 4 - Tecnologias usadas pelos lagares europeus em 2003 (Estratégia Nacional para os Efluentes Agro-Pecuários e Agro-Industriais (ENEAPAI, 2007)

Figura 5 - Evolução da tipologia dos lagares entre 1999/2000 e 2004/05 (ENEAPAI, 2007)

Figura 6 - Sistema de prensagem para extracção de azeite (adaptado de Awad *et al.*, 2006)

Figura 7 - Processo de extracção de azeite de três fases (adaptado de Awad *et al.*, 2006)

Figura 8 - Produtos, subprodutos e resíduos provenientes dos lagares (adaptado por Freitas, 2007, de Centre d'Initiatives pour la Production Propre, 2000)

Figura 9 - Comparação dos métodos de duas e três fases na extracção de azeite (adaptado de Albuquerque *et al.*, 2004)

Figura 10 - Método da digestão anaeróbia (adaptado de Deublein & Steinhauser, 2008)

Figura 11 - Diferentes etapas da digestão anaeróbia (Carvalho, 2010)

Figura 12 - Representação esquemática da produção de biometano a partir de substâncias orgânicas complexas (adaptado de Oreopoulou & Russ, 2007)

Figura 13 - Etapa de acidogénese ilustrando os compostos orgânicos degradados e os produtos formados (adaptado de Deublein & Steinhauser, 2008)

Figura 14 - Ilustração da reacção de acetogénese (adaptado de Deublein & Steinhauser, 2008)

Figura 15 - Estrutura química da Lignina [2]

Figura 16 - Álcoois precursores das unidades fenilpropanóides guaiacilo, siringilo e p-hidroxifenol (Barbosa *et al.*, 2008)

Figura 17 - Esquema de produção de etanol e de metano a partir de compostos lenhocelulósicos (adaptado de Barakat *et al.*, 2012)

Figura 18 - Estrutura química do siringaldeído (Meyers and Norris, 1967)

Figura 19 - Estrutura química da o-vanilina (a) e vanilina (b) (Walton *et al.*, 2003)

Figura 20 - Orquídea *Vanilla planifolia* (Pacheco & Damásio, 2009)

Figura 21 - Esquema do sistema de extracção contínuo de três fases (adaptado de Aires, 2007)

Figura 22 - Tegão de recepção onde é descarregada a azeitona à entrada do lagar

Figura 23 - Limpadora da azeitona. a) Fracção de azeitona limpa, lavada e pesada. b) Tapete transportador. c) Depósito, no exterior do lagar, de folhas, ramos e pedras

Figura 24 - Moinho e termobatedeira vista lateral (a) e frontal (b)

Figura 25 - Termobatedeira. a) Entrada de depósito; b) e c) Depósito de pasta munido de pás

Figura 26 - Centrífuga horizontal (decanter)

Figura 27 - a) Etapa de descarga e separação de resíduos (bagaço húmido); b) Separação de águas-ruças; c) Descarga de bagaço húmido

Figura 28 - a) Depósito de descarga no exterior do bagaço seco; b) caldeira de aquecimento que utiliza o bagaço seco como combustível; c) depósito da caldeira cheia de bagaço seco

Figura 29 - Centrífuga Vertical

Figura 30 - Depósitos de azeite de aço inoxidável

Figura 31 - Fluxograma do procedimento adoptado para determinação da lignina (adaptado de Oliveira, 2011)

Figura 32 - Curva de calibração e respectivos desvios padrão obtidos pelo método de Folin-Ciocalteu para quantificação de fenóis. O ponto sem preenchimento não foi considerado para o cálculo da curva de calibração

Figura 33 - Apresentação esquemática geral do método utilizado para a análise de fenóis através do método de Folin- Ciocalteu.

Figura 34 - Representação esquemática do método dos ensaios de biodegradação anaeróbia

Figura 35 - Representação esquemática do método utilizado para o tratamento das amostras recolhidas ao longo do ensaio

Figura 36 - Espectro do siringaldeído para uma concentração de (a) 30 mg/L e (b) 50 mg/L

Figura 37 - Curvas de calibração e respectivos desvios padrão obtidos para o siringaldeído a: (a) 248 nm e (b) 364 nm. Os pontos sem preenchimento não foram considerados para o cálculo das curvas de calibração

Figura 38 - Representação esquemática do método utilizado para o tratamento das amostras recolhidas ao longo do ensaio de lixiviação

Figura 39 - Representação esquemática do método utilizado no final do ensaio

Figura 40 - Representação esquemática do método utilizado para o tratamento das amostras recolhidas ao longo do ensaio

Figura 41 - Variação do CQO em função do tempo para: (a) 500 mg/L Syr; (b) 500 mg/L Syr + 3 g/L (a+g); e (c) Controlo (3 g/L (a+g))

Figura 42 - Evolução dos espectros (diluídos de 1:10), relativamente aos ensaios: (a) 500 mg/L Syr; (b) 500 mg/L Syr + 3 g/L (a+g); e (c) Controlo (3 g/L (a+g))

Figura 43 - Sobreposição dos valores de CQO obtidos para cada ensaio

Figura 44 - Produção média de biogás acumulado obtido nos diferentes ensaios

Figura 45 - Biogás acumulado, variação de CQO e respectivos desvios padrão obtidos ao longo do tempo nos ensaios de: (a) 500 mg/L Syr; (b) 500 mg/L Syr + 3g/L (a+g); (c) Controlo (3 g/L (a+g))

Figura 46 - Evolução da percentagem de substrato consumido e produção de biogás acumulado para a) 500 mg/L Syr; b) 500 mg/L Syr + 3g/L (a+g); e c) Controlo (3 g/L (a+g))

Figura 47 - Variação da CQO, e respectivos desvios padrão, em função do tempo para os ensaios de biodegradação de 500 mg/L de *o*-vanilina (Van) com: (a) 0,5 g/L (a+g); (b) 1 g/L (a+g) e (c) 3 g/L (a+g), respectivamente

Figura 48 - Exemplos da variação dos espectros UV-visível (diluídos de 1:10), ao longo do tempo obtido nos ensaios de biodegradação de 500 mg/L de *o*-vanilina (Van) com: (a) 0,5 g/L (a+g); (b) 1g/L (a+g) e (c) 3 g/L (a+g), respectivamente

Figura 49 - Variação da CQO em função do tempo para os ensaios com *o*-vanilina (Van) na presença de diferentes teores de co-substratos

Figura 50 - Produção cumulativa de biogás a partir da biodegradação de 500 mg/L de *o*-vanilina (Van) com: 0,5 g/L (a+g) e 1 g/L de (a+g)

Figura 51 - Evolução da CQO e produção de biogás acumulado nos ensaios de biodegradação de 500 mg/L de *o*-vanilina (Van) com: (a) 0,5 g/L (a+g) e (b) 1 g/L (a+g)

Figura 52 - Comparação da degradação de 500 mg/L Syr + 3 g/L (a+g); 500 mg/L *o*-vanilina (Van) + 3g/L (a+g) e do controlo (3g/L (a+g))

Figura 53 - Valores da CQO obtida para os ensaios de 1; 2 e 5g de bagaço de azeitona seco e de 0,5 e 1g de bagaço de azeitona húmido a $37 \pm 2^\circ\text{C}$ a: (a) $T= 37 \pm 2^\circ\text{C}$ e (b) $T= 50 \pm 2^\circ\text{C}$

Figura 54 - Exemplo de espectros (diluídos de 1:10), obtidos ao longo do tempo para: (a) 1g; (b) 2g; e (c) 5g de bagaço de azeitona seco e (d) 0,5g; (e) 1g de bagaço de azeitona húmido, a $37 \pm 2^\circ\text{C}$

Figura 55 - CQO obtido, a $T= 37 \pm 2^\circ\text{C}$ para o : (a) Bagaço de azeitona seco e (b) Bagaço de azeitona húmido

Figura 56 - Biogás acumulado a $T= 37 \pm 2^\circ\text{C}$ para: (a) Bagaço de azeitona seco e (b) Bagaço de azeitona húmido

Figura 57 - Relação entre a CQO e o biogás acumulado, a $T= 37 \pm 2^\circ\text{C}$, obtido para o ensaio: (a) Bbs.1 e (b) Bbh.1

Figura 58 - Espectros (diluídos de 1:10), obtidos para a biodegradação a $T= 37 \pm 2^\circ\text{C}$ para o ensaio: (a) Bbs.1 e (b) Bbh.1

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Azeitona laborada e azeite extraído pelos lagares, por região, na campanha 2011/2012 (adaptado de INE, 2011)

Tabela 2 - Representatividade do olival no total da Superfície Agrícola Utilizável (SAU) (adaptado de MADRP/GPP, 2007)

Tabela 3 - Composição média das azeitonas (adaptado de Awad *et al.*, 2006)

Tabela 4 - Quantidade de resíduos provenientes de olivais e de lagares em Portugal (Freitas, 2007)

Tabela 5 - Principais elementos constituintes dos subprodutos dos lagares (adaptado por Freitas, 2007, de SODEAN, S.A., 2002)

Tabela 6 - Poder Calorífico do bagaço e do caroço de azeitona (adaptado por Freitas, 2007, de Centre d'Initiatives pour la Production Propre, 2000)

Tabela 7 - Dados comparativos da extracção de azeite e de resíduos produzidos através dos diferentes processos de extracção de azeite (Silva, 2009)

Tabela 8 - Características dos resíduos da produção de azeite, em Espanha, Portugal, Itália e Grécia (Freitas, 2007)

Tabela 9 - Composição média do bagaço seco (Silva, 2009)

Tabela 10 - População bacteriana proveniente de um digestor anaeróbio (adaptado de Eliyan, 2007, citado de Khanna *et al.*, 1995)

Tabela 11 - Equações que intervêm na degradação acetogénica (adaptado de Deublein & Steinhauser 2008)

Tabela 12 - Reacções que ocorrem durante a degradação metanogénica (adaptado de Deublein & Steinhauser, 2008)

Tabela 13 - Razão C/N de alguns resíduos (adaptado de Eliyan, 2007)

Tabela 14 - Concentração de inibidores na digestão anaeróbia (adaptado de Eliyan, 2007)

Tabela 15 - Composição do meio de cultura utilizado para o desenvolvimento da biomassa anaeróbia mista (adaptado de Wiegant and Lettinga, 1985, Brás, 2003 e Lopes, 2005).

Tabela 16 - Composição da solução de micronutrientes (adaptado de Wiegant and Lettinga, 1985 e Lopes, 2005)

Tabela 17 - Valores médios e respectivos desvios padrão do teor de Sólidos totais (ST); sólidos totais voláteis (STV) e teor de proteína no bagaço de azeitona seco e húmido. Os valores entre parênteses correspondem ao número de réplicas (n)

Tabela 18 - Concentração de sólidos suspensos (SS) e de sólidos suspensos voláteis (SSV) presentes no inóculo para o ensaio duplicado, da biodegradação da *o*-vanilina (Van).

Tabela 19 - Valores médios de CQO e correspondentes desvios padrão, obtidos nos ensaios da biodegradação do siringaldeído e do controlo do ensaio.

Tabela 20 - Biogás produzido nos diferentes ensaios

Tabela 21 - Produção média de biogás por unidade de massa de inóculo obtido para os diferentes ensaios.

Tabela 22 - Valor de k e de S_0 para cada ensaio

Tabela 23 - Valores de CQO e respectivos desvios padrão obtidos nos ensaios da biodegradação da *o*-vanilina (Van)

Tabela 24 - Valores de CQO e respectivos desvios padrão obtidos no duplicado dos ensaios da biodegradação da *o*-vanilina (Van)

Tabela 25 - Biogás acumulado e produção média de biogás por unidade de massa de inóculo obtido para os diferentes ensaios com *o*-vanilina (Van)

Tabela 26 - Denominação aplicada nos ensaios de lixiviação a $37 \pm 2^\circ\text{C}$

Tabela 27 - Denominação aplicada nos ensaios de lixiviação a $50 \pm 2^\circ\text{C}$

Tabela 28 - Valores iniciais e finais de CQO obtidos para a lixiviação a $T=37 \pm 2^\circ\text{C}$ do bagaço de azeitona

Tabela 29 - Valores iniciais e finais de CQO obtidos para a lixiviação a $T=50 \pm 2^\circ\text{C}$ do bagaço de azeitona

Tabela 30 - Concentração de azoto amoniacal ($\text{mg N-NH}_3/\text{L}$) na fracção solubilizada após acidificação da amostra para os ensaios de lixiviação a $T=37 \pm 2^\circ\text{C}$ e a $T=50 \pm 2^\circ\text{C}$ dos bagaços de azeitona

Tabela 31 - Concentração do teor de proteína (g/L) para os ensaios de lixiviação a $T=37 \pm 2^\circ\text{C}$ e $T=50 \pm 2^\circ\text{C}$ dos bagaços de azeitona medido no precipitado após acidificação da amostra

Tabela 32 - Concentração (g/L) de SS, Cinzas, SSV, LS, LPA e LT para os ensaios de lixiviação a (a) $T=37 \pm 2^\circ\text{C}$ e (b) $T=50 \pm 2^\circ\text{C}$, dos bagaços de azeitona

Tabela 33 - Concentração em fenóis (mg GAE/L) para os ensaios de lixiviação a $T=37 \pm 2^\circ\text{C}$ e $T=50 \pm 2^\circ\text{C}$ dos bagaços de azeitona

Tabela 34 - Concentração de sólidos suspensos (SS) e de sólidos suspensos voláteis (SSV) presentes no inóculo para o ensaio da biodegradação dos bagaços de azeitona a $37 \pm 2^\circ\text{C}$

Tabela 35 - Caracterização dos ensaios desenvolvidos para a biodegradação do bagaço de azeitona.

Tabela 36 - Resultados obtidos para o biogás acumulado e para a CQO final e inicial do processo

Tabela 37 - Produção média de biogás

Tabela 38 - Concentração residual de azoto amoniacal ($\text{mg NH}_3\text{-N/L}$) e respectiva % de remoção para os ensaios de biodegradação dos bagaços de azeitona a $T=37 \pm 2^\circ\text{C}$

Tabela 39 - Concentração residual do teor de proteína e respectiva % de remoção para os ensaios de biodegradação dos bagaços de azeitona a $T=37 \pm 2^\circ\text{C}$

Tabela 40 - Concentração residual de SS, SSV, Cinzas, LS, LPA e LT e % de remoção de LS e LPA para os ensaios de biodegradação dos bagaços de azeitona a $T=37 \pm 2^\circ\text{C}$

Tabela 41 - Concentração residual de fenóis e respectiva % de remoção para os ensaios de biodegradação dos bagaços de azeitona a $T=37 \pm 2^\circ\text{C}$

Tabela 42 - Eficiência de tratamento obtida no bagaço seco e no bagaço húmido a $37 \pm 2^\circ\text{C}$

Tabela 43 - Resultados comparativos da degradação anaeróbia mesófila de diferentes resíduos de indústrias agro-alimentares

Lista de Acrónimos

Abs	Absorvância
CQO	Carência Química de Oxigénio
ENEAPAI	Estratégia Nacional para os Efluentes Agro-Pecuários e Agro-Industriais
<i>GAE</i>	<i>Gallic acid equivalentes</i>
GPP	Gabinete de Planeamento e Política
INE	Instituto Nacional de Estatística
INGA	Instituto Nacional de Intervenção e Garantia Agrícola
LPA	Lignina precipitada em meio ácido
LS	Lignina solúvel
LT	Lignina total
MADRP	Ministério da Agricultura e Desenvolvimento Rural e das Pescas
SAL	Superfície Agrícola Utilizável
SODEAN	Sociedade para o Desenvolvimento Energético de Andaluzia
SS	Sólidos suspensos
SST	Sólidos suspensos totais
SSV	Sólidos suspensos voláteis
ST	Sólidos totais
SVT	Sólidos voláteis totais
Syr	Siringaldeído
UBI	Universidade da Beira Interior
UV	Ultravioleta
Van	Vanilina

Capítulo I - Introdução

A utilização de combustíveis fósseis tem vindo a fomentar uma crescente preocupação, não só relacionada com as questões ambientais, mas também devido a problemas que a dependência energética de fontes externas provoca nas economias nacionais. Com o objectivo de substituir os combustíveis fósseis tem-se estudado a viabilidade de fontes de energia alternativas que devido ao seu carácter ecológico, têm despertado muito interesse. Muitos processos de tratamento biológico produzem energia a partir de diversos tipos de resíduos de processos industriais.

Em Portugal a indústria oleícola representa um dos sectores fundamentais na estrutura da produção agrícola, mas tem o inconveniente de gerar grandes quantidades de resíduos e subprodutos.

Por razões de ordem ambiental tem-se procedido a uma acção de reestruturação das unidades de extracção do azeite onde, os sistemas de extracção clássica de prensas e os sistemas de centrifugação com extracção contínua de três fases estão a ser substituídos por sistemas de centrifugação com extracção contínua de duas fases, que além de reduzirem o consumo de água, geram menor quantidade de efluentes líquidos. O aproveitamento e eliminação dos resíduos e dos subprodutos obtidos a partir da extracção do azeite são fundamentais devido às graves repercussões ambientais que provocam. De forma a minimizar os efeitos negativos provocados por estes resíduos, tem-se estudado o seu reaproveitamento como matéria-prima na produção de energias renováveis.

A ideia do aproveitamento de resíduos resultantes do processo de extracção do azeite é a de se desenvolverem métodos que se tornem atractivos do ponto de vista económico, para que haja um aproveitamento dos resíduos de forma eficaz e rentável. Além disso, esta via alternativa de valorização de resíduos, contribui para reduzir a poluição ambiental, quer pela baixa produção de gases com efeito de estufa quando comparado à produção de energia a partir dos combustíveis fósseis, quer pela diminuição da poluição nos solos.

Resíduo de origem vegetal, o bagaço de azeitona é composto por um elevado teor de lignina. A lignina é um polímero aromático insolúvel e irregular que, quando presente em resíduos agrícolas e domésticos dificulta o seu tratamento biológico. Durante a degradação, a estrutura química da lignina é dividida em monómeros aromáticos mais pequenos e mais acessíveis à acção de populações microbianas, permitindo a degradação destes.

1.1. Objectivo do trabalho

Este trabalho teve como principais objectivos estudar a biodegradação anaeróbia e produção de biogás utilizando como substratos o bagaço seco e húmido de azeitona, resultante do processo produtivo do azeite a partir de um sistema de centrifugação com extracção contínua de três fases.

Como o Siringaldeído e a *o*-vanilina são compostos aromáticos derivados da lignina, de forma a complementar o estudo relativo ao bagaço de azeitona, outro dos objectivos deste trabalho consistiu no estudo da degradação anaeróbia de compostos modelo derivados da lignina (Siringaldeído e *o*-vanilina) em regime termófilo, de forma a ter noção do seu comportamento nas condições de processo. Para o Siringaldeído e para a *o*-vanilina, também foi estudado a influência da adição de co-substratos na sua degradação.

1.2. Estrutura da dissertação

O trabalho elaborado está organizado em cinco capítulos que seguem a ordem ilustrada na Figura 1.

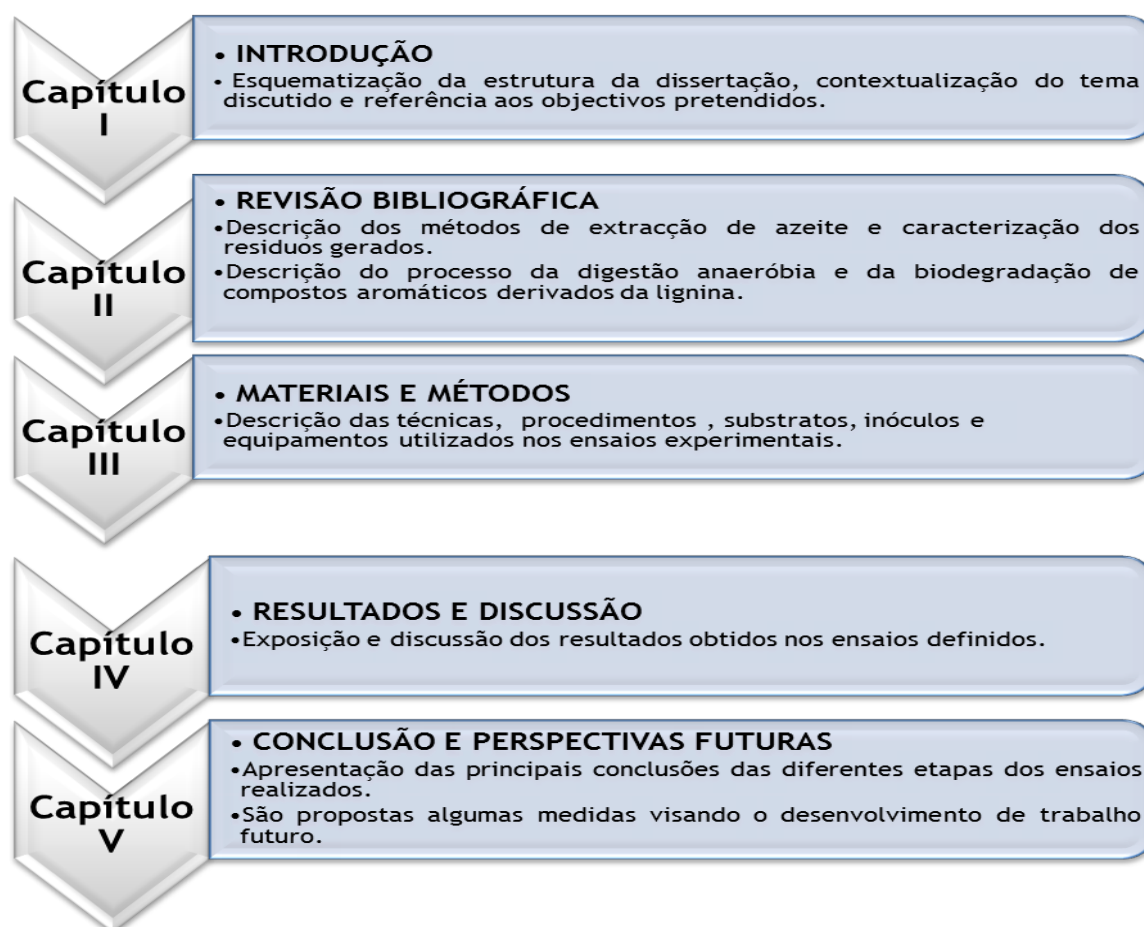


Figura 1 - Estrutura da dissertação

CAPITULO II - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. A oliveira e o cultivo da azeitona

O cultivo da oliveira e a produção de azeite tem aumentado muito nos últimos anos devido às propriedades preventivas e terapêuticas atribuídas ao consumo de azeite. Actualmente, 95% da superfície oleícola mundial encontra-se concentrada na bacia mediterrânica, onde o azeite é produzido há mais de 6000 anos (Malheiro, 2010).

A nível mundial estima-se que dos 9,5 milhões de hectares ocupados pelo cultivo da oliveira, 96% da produção é utilizada para a obtenção de azeite e os restantes 4% para a produção de azeitona de mesa (INE, 2010). A União Europeia é responsável por 78,1% da produção mundial de azeite, a Tunísia por 7,3%, a Síria por 3,7%, Marrocos por 2,5% e a Argélia por 1,7%. Dentro da Comunidade Europeia, a Espanha representa 34,6% da produção mundial, seguindo-se a Itália com 22,6%, a Grécia com 18,5% e Portugal, que actualmente representa 1,7% da produção mundial (INE, 2011).

Segundo o relatório anual do Ministério da Agricultura e Desenvolvimento Rural e das Pescas (MADRP) e do Gabinete de Planeamento e Política (GPP), na campanha de 2011/2012, Portugal registou num universo de 221 lagares inquiridos, um total de 465 toneladas de azeitona laborada (Tabela 1) (INE, 2011).

Tabela 1 - Azeitona laborada e azeite extraído pelos lagares, por região, na campanha 2011/2012 (adaptado de INE, 2011)

Região	Lagares (Nº)	Azeitona Laborada (kg)	Azeite Extraído		Rendimento Médio %
			(kg)	%	
Norte	76	75 347 747	11 558 380	16,4%	15,3%
Centro	61	49 913 871	6 334 624	9,0%	12,7%
Lisboa e Vale do Tejo	21	29 790 827	4 053 599	5,8%	13,6%
Alentejo	58	299 834 334	47 172 101	67,1%	15,7%
Algarve	5	9 481 366	1 212 341	1,7%	12,8%
Total	221	464 377 145	70 331 045	100%	15,1%

Em Portugal a olivicultura desempenha um papel fundamental, não só a nível económico mas também a nível social (Tabela 2). A oliveira encontra-se distribuída por todo o território nacional, que actualmente ocupa cerca de 335 586 hectares (INE, 2010).

Tabela 2 - Representatividade do olival no total da Superfície Agrícola Utilizável (SAU) (adaptado de MADRP/GPP, 2007)

Região	SAU (hectares)	SAU Por Olivais (%)
Entre Douro e Minho	994	9,2
Trás-os-Montes	72 202	27,6
Beira Litoral	17 381	32,1
Beira Interior	60 273	21,6
Ribatejo e Oeste	36 789	32,7
Alentejo	138 072	11,9
Algarve	8 718	14,3

SAU - Superfície agrícola utilizada

A representatividade do olival no total da Superfície Agrícola Utilizável (SAU) é elevada (Tabela 2), e apenas os prados e pastagens ocupam uma superfície superior (MADRP/GPP, 2007).

2.1.1. Botânica da Oliveira

A oliveira (*Olea europaea* L.) é uma árvore dicotiledónia pertencente à família *Oleaceae*, sendo a única espécie desta família que produz frutos comestíveis. É uma árvore típica da bacia mediterrânea e bem adaptada ao seu clima subtropical e temperado. O seu fruto, a azeitona, é valorizado comercialmente para a obtenção de azeite e para a produção de azeitona de mesa. Em termos botânicos a azeitona é uma drupa constituída pela cutícula, polpa e por um caroço (Figura 2), onde está a amêndoa e se encontra o embrião e as reservas alimentares do fruto (Ramalheiro, 2009).

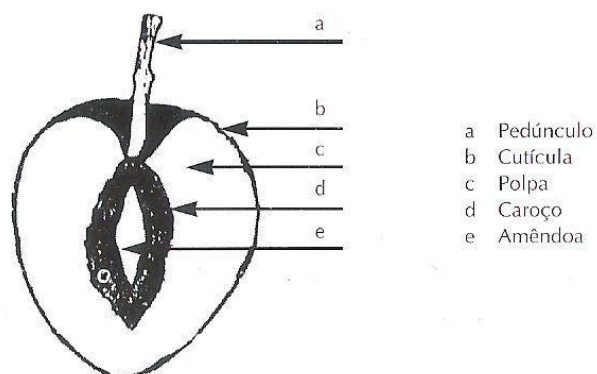


Figura 2 - Corte transversal de uma azeitona com as suas partes constituintes (Ramalheiro, 2009)

A azeitona é um fruto pequeno de forma elipsoidal a globular, que mede 1 a 4 cm de comprimento e 0,6 a 2 cm de diâmetro. Quando o fruto está completamente desenvolvido a

polpa representa, em média, 60 a 90 %, o caroço 10 a 40 % e a semente 1 a 2 % do peso total do fruto. A composição da polpa da azeitona varia entre 50 a 60 % de água e 20 a 30 % de gordura (Tabela 3) (Custódio 2009).

Tabela 3 - Composição média das azeitonas (adaptado de Awad *et al.*, 2006)

Constituintes	Polpa (% mássica)	Caroço (% mássica)	Semente (% mássica)
Água	50-60	9,3	30
Óleo	15-30	0,7	27,3
Constituintes azotados	2-5	3,4	10,2
Açúcares	3-7,5	41	26,6
Celulose	3-6	38	1,9
Minerais	1-2	4.1	1,5
Polifenóis (substâncias aromáticas)	2-22,5	0,1	0,5-1
Outros		3,4	2,4

2.1.2. Desenvolvimento e maturação dos frutos

Segundo Cobo *et al.*, (1998) e citado por Ramalheiro (2009), o período de floração da oliveira marca o início do desenvolvimento dos frutos. Considera-se como período de maturação o tempo decorrido desde o aparecimento de manchas violáceas na epiderme da azeitona, até ao período em que a coloração definitiva da epiderme (negro) cobre a totalidade do fruto. Na oliveira a maturação produz-se de um modo escalonado nas diferentes zonas da árvore. O período de amadurecimento é variável sendo afectado pelas condições climáticas, situação geográfica, condições de cultivo e tipo de solo, colheita do fruto, carga da árvore e características da variedade e de desenvolvimento da oliveira (Bolanos *et al.*, 2006).

Durante o amadurecimento do fruto ocorrem alterações importantes na sua constituição, nomeadamente a diminuição da proporção de ácido palmítico, polifenóis e tocoferóis (elementos de vitamina E) e um aumento na proporção de ácido linoleico (Bolanos *et al.*, 2006). O principal composto fenólico das azeitonas é a oleuropeína, que possui importantes propriedades antioxidantes, sendo responsável pelas propriedades nutricionais dos frutos e pelos mecanismos de defesa das folhas (Ramalheiro 2009).

2.2. Sistemas de extracção de azeite

A extracção de azeite envolve diferentes processos, desde a lavagem da azeitona, à moenda, batida e à extracção propriamente dita (Figura 3).

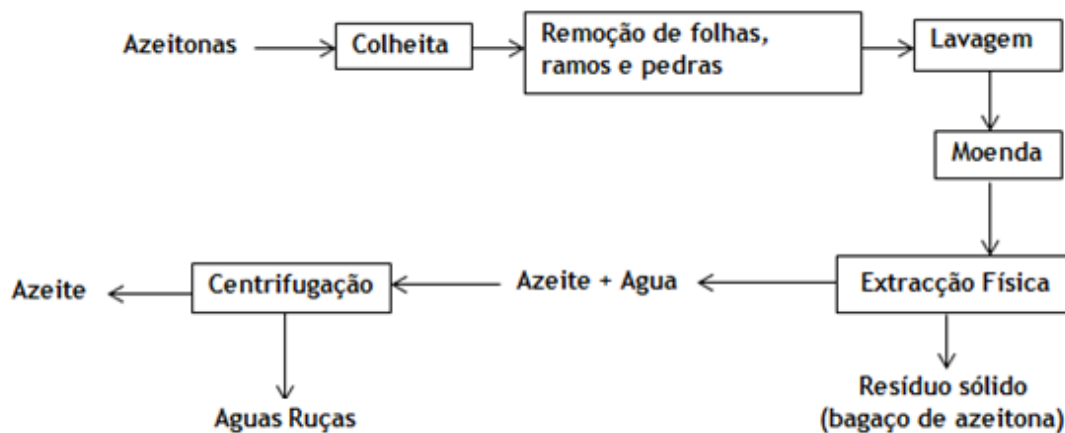


Figura 3 - Esquema geral da extração de azeite (adaptado de Silva, 2009)

Existem dois métodos de extração distintos: o método tradicional de prensa hidráulica, usado durante séculos, e o método de centrifugação com extração contínua que a indústria oleícola adoptou nas últimas décadas (Bolanos *et al.*, 2006).

Do novo método de centrifugação existem ainda dois sistemas distintos: o sistema de três fases e o sistema de duas fases. O sistema de centrifugação de três fases surgiu em substituição da clássica prensa hidráulica na década de setenta e o moderno sistema de extração de duas fases surgiu na década de noventa (Borja *et al.*, 2002).

O sistema de prensa hidráulica, embora obsoleto e menos eficiente, ainda é utilizado em muitos países, sendo que mais de 90% dos lagares funcionam com o moderno sistema de duas fases (Albuquerque *et al.*, 2004).

O sistema de extração contínua de três fases ainda é muito utilizado em Itália e na Grécia (Figura 4). Em Portugal, até aos anos oitenta, a extração de azeite realizava-se com o tradicional sistema da prensa hidráulica, o qual tem vindo a ser gradualmente substituído pelas tecnologias de centrifugação (Awad *et al.*, 2006)

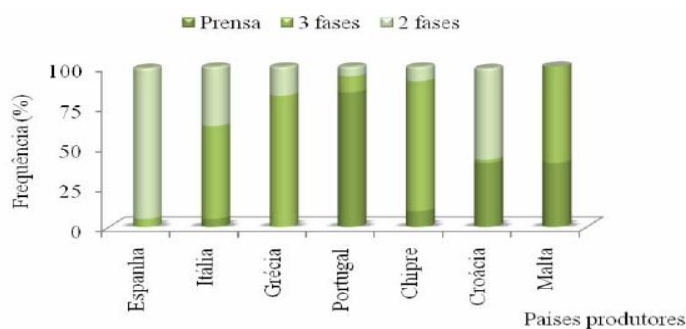


Figura 4 - Tecnologias usadas pelos lagares europeus em 2003 (Estratégia Nacional para os Efluentes Agro-Pecuários e Agro-Industriais (ENEAPAI, 2007)

Em Portugal, a quase totalidade da azeitona laborada é transformada em lagares reconhecidos pelo Instituto Nacional de Intervenção e Garantia Agrícola (INGA), com excepção de uma pequena quantidade laborada em pequenos lagares artesanais. Nos últimos anos o número de lagares reconhecidos pelo INGA, no âmbito da ajuda à produção de azeite tem diminuído, consequência das exigências impostas pela Legislação Comunitária (Despacho N° 8277/2007.D.R. N° 89, Série II de 2007-05-09), e também pela crise que se verifica no sector

O número de lagares em Portugal Continental decresceu, entre as campanhas de 1994/1995 e 1999/00, cerca de 32%. No mesmo período a quantidade de azeitona laborada aumentou 35%, traduzindo uma melhoria da eficiência produtiva (ENEAPAI, 2007). Nas campanhas de 2000/2005 ocorreu um decréscimo de 46% do número de lagares (resultante da acentuada redução do número de lagares de prensas, parcialmente compensada pelo aumento do número de lagares de sistemas contínuos) (ENEAPAI, 2007). Na Figura 5 apresenta-se a evolução, entre 2000/2005, da tipologia dos lagares que laboram em Portugal.

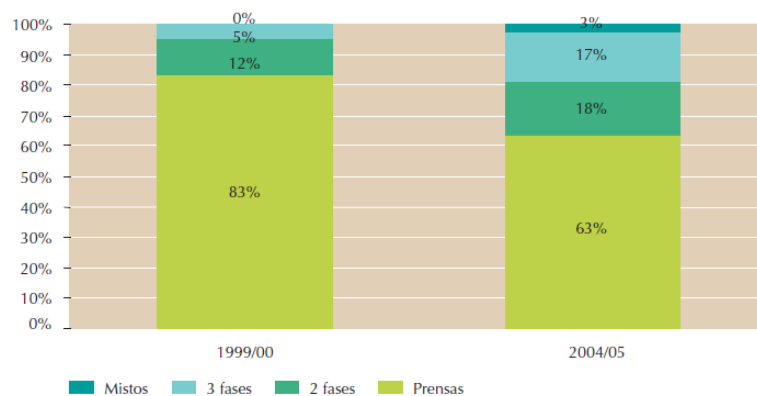


Figura 5 - Evolução da tipologia dos lagares entre 1999/2000 e 2004/05 (ENEAPAI, 2007)

Em 2005, a maior parte dos lagares a laborar ainda era de prensas (63%). Os lagares contínuos (de 2 e 3 fases) já eram maioritários em algumas regiões, como no Alentejo (70%) e em Trás-os-Montes (52%) (ENEAPAI,2007).

2.2.1. Sistema de prensa Hidráulica

No sistema de prensa hidráulica (Figura 6), a azeitona depois de convenientemente lavada, é moída e batida, obtendo-se uma pasta. Esta pasta é transferida para uma prensa que, através da pressão exercida (Gomez *et al.*, 2010), separa a fase líquida (mistura de azeite e de água residual) da fase sólida (bagaço de azeitona) cuja composição média, em Portugal, é de 35% de humidade e 8% de gordura (Freitas, 2007). A fase líquida é de seguida separada por centrifugação ou decantação obtendo-se azeite e um resíduo líquido, conhecido por água ruça.

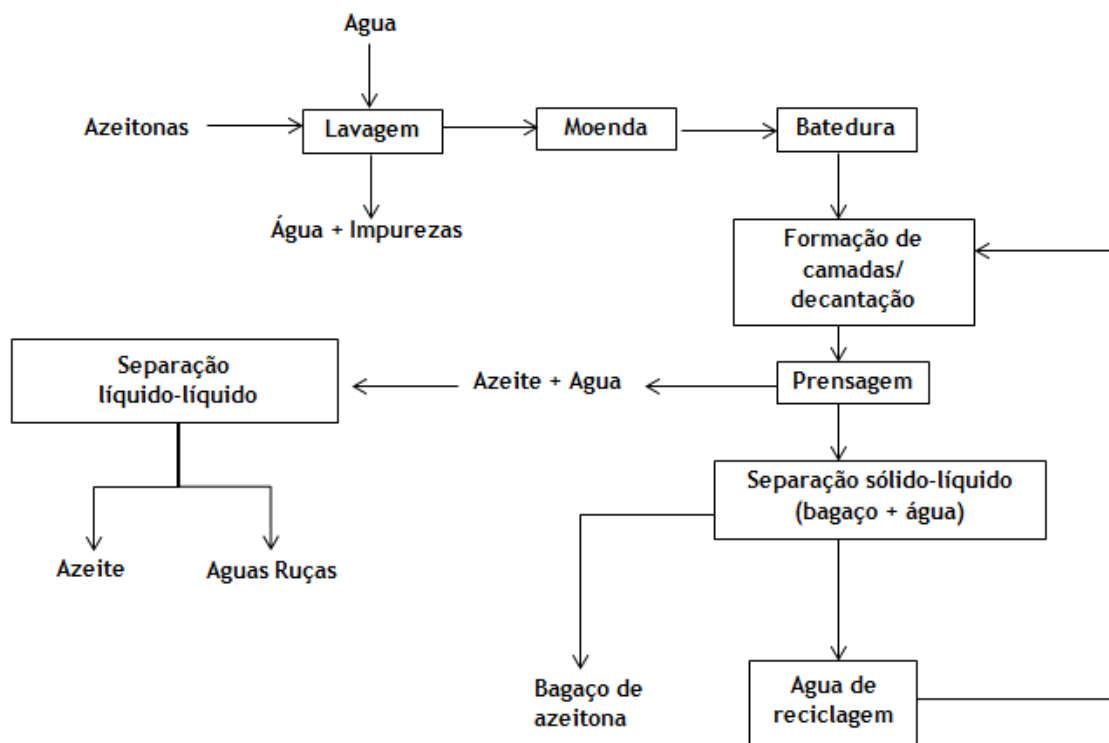


Figura 6 - Sistema de prensagem para extração de azeite (adaptado de Awad *et al.*, 2006)

2.2.2. Sistema de centrifugação contínua de três fases

A introdução do sistema de centrifugação de três fases (Figura 7) conduziu a um significativo progresso no processo de extração de azeite e a uma importante modificação no conceito dos subprodutos obtidos, tanto em quantidade e características, como no seu posterior aproveitamento (Gomez *et al.*, 2010). A principal vantagem do sistema de centrifugação, relativamente ao sistema de prensa, é o aumento da produtividade. O processo de extração é contínuo, não há necessidade de transferir a pasta para os decantadores, o que reduz o custo de produção e permite uma completa automatização do processo. O azeite assim obtido pode ter melhor qualidade (Gomez *et al.*, 2010).

A área industrial necessária à instalação deste sistema é menor, mas é mais dispendiosa e obriga a um maior consumo de água e de energia (Awad *et al.*, 2006; Gomez *et al.*, 2010), uma vez que a pasta tem de ser devidamente diluída em água quente antes de injectada nas centrífugas de eixo horizontal. As centrífugas, por diferença de densidade, separam o azeite, o bagaço e a água residual. Este sistema gera um maior caudal de águas ruças do que o sistema de prensa (Silva 2009). A fase sólida, bagaço seco, contém valores médios de 65% de humidade e 5% de gordura (Freitas, 2007).

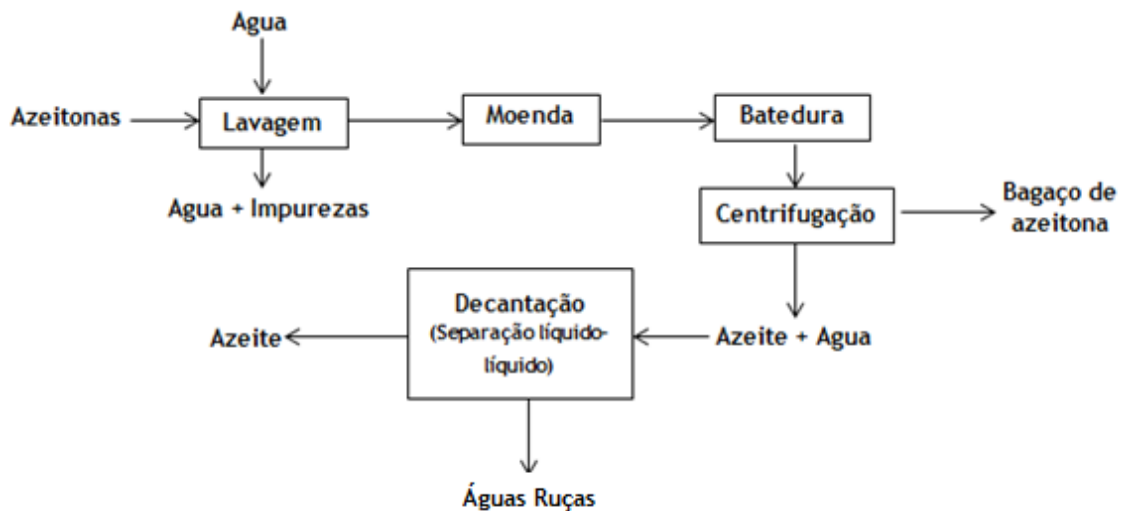


Figura 7 - Processo de extração de azeite de três fases (adaptado de Awad *et al.*, 2006)

2.2.3. Sistema de centrifugação contínua de duas fases

Estimulado por políticas nacionais espanholas que beneficiaram de fundos públicos para a sua implementação, o sistema de centrifugação contínua de duas fases surgiu nos anos noventa. O principal objectivo desta nova tecnologia foi a eliminação da água ruça gerada durante a extração de azeite, o que se conseguiu com a introdução de centrífugas que, sem necessidade de adição de água, separam por um lado o azeite e, por outro, os resíduos (Albuquerque *et al.*, 2004).

A inovação neste processo reside na quantidade de água adicionada à pasta, durante a extração do azeite. No sistema de duas fases apenas se adiciona água quando a pasta está muito seca e, a acontecer, é em pequenas quantidades resultando numa grande economia no consumo água (Borja *et al.*, 2002). Como não há adição de água à pasta, elimina-se a produção da água ruça, gerando-se um único resíduo que reúne os subprodutos sólidos (caroço, pele, polpa) e a água de vegetação das azeitonas, juntamente com alguma água adicionada à pasta e a água de lavagem (Borja *et al.*, 2006). Consequentemente, este novo bagaço tem um teor de humidade superior ao do anterior bagaço, pelo que se designa bagaço húmido.

Relativamente ao sistema de três fases, este sistema tem a vantagem de economizar cerca de 95% de água (Gurbuz *et al.*, 2004). A instalação destes lagares requer ainda um investimento 25% mais baixo e, não havendo necessidade de adicionar água quente à pasta, o consumo de energia é cerca de 20% inferior ao sistema de três fases (Azbar *et al.*, 2004 e citado por Silva, 2009). Perante estas características, este sistema é conhecido por sistema ecológico, mas a extração de azeite através deste processo continua a representar um problema ambiental devido à dificuldade em eliminar e manusear as elevadas quantidades de bagaço húmido produzido (Silva, 2009).

2.3. Resíduos provenientes dos olivais e dos lagares

Dos olivais resultam grandes quantidades de resíduos, obtidos quer através da poda das oliveiras, quer através da laboração da azeitona nos lagares.

O cultivo da oliveira obriga a podas anuais relativamente intensas de modo a permitir a formação correcta da árvore e a recolha mecanizada, ao mesmo tempo que se tenta corrigir a “alternância” (safra e contra-safra), que é uma tendência natural de produzir colheitas normais em anos alternados, independentemente dos factores climáticos (Freitas, 2007).

As características químicas e biológicas dos resíduos de lagares dependem das condições climáticas e de cultivo que afectam a árvore, da época de recolha da azeitona, da variedade de oliveira cultivada e do processo mecânico utilizado na extracção do azeite (Silva, 2009).

Na tabela 4 quantifica-se a produção média de resíduos de olivais e de lagares para uma colheita média de 3 milhões de toneladas/ano de azeitona. Considera-se que toda a produção de azeite se obtém pelo sistema de centrifugação de três fases (Freitas, 2007).

Tabela 4 - Quantidade de resíduos provenientes de olivais e de lagares em Portugal (Freitas, 2007)

Resíduo	Produção Anual (milhões de toneladas)
Bagaço de azeitona	1,3
Água Ruça	4,3
Madeira	12
Folha	1

2.3.1. Características físico-químicas dos subprodutos do olival

Os subprodutos oriundos do olival englobam o bagaço de azeitona, as folhas da limpeza da azeitona nos lagares e resíduos provenientes da poda das oliveiras. Estes produtos são susceptíveis de serem valorizados energeticamente.

Segundo Freitas (2007), até 2002 não existia em Portugal informação disponível quanto à composição e características do material de poda dos olivais, assim como dos resíduos obtidos através dos diferentes métodos de extracção. A Sociedade para o Desenvolvimento Energético de Andaluzia (SODEAN, S.A.) (Freitas, 2007), apresentada as características físico-químicas dos constituintes dos resíduos provenientes dos lagares (Tabela 5), verificando-se que o bagaço virgem apresenta um elevado teor de humidade.

Devido à diversidade de métodos de extracção de azeite e de produtos e resíduos obtidos a partir de cada método, utilizaram-se as seguintes designações:

- Água Ruça - resíduo aquoso produzido nos sistemas de prensa hidráulica e centrifugação de três fases (Silva, 2009).
- Água Residual - efluente resultante do sistema de extracção de duas fases (Silva, 2009).
- Bagaço virgem - resíduo da primeira extracção do azeite, com teores elevados de água (24%) e de azeite (9%) (Sancoucy, 1984 citado por Freitas, 2007).
- Bagaço Seco - resíduo sólido produzido nos sistemas de prensa hidráulica e centrifugação de três fases (Silva, 2009).
- Bagaço Extractado - resíduo obtido depois de extraído o óleo de bagaço de azeitona com um solvente orgânico, geralmente hexano (Freitas, 2007).
- Bagaço Seco Extractado - resíduo produzido nas unidades extractoras após extracção do azeite residual contido no bagaço seco.
- Bagaço Húmido - resíduo semi-sólido produzido no sistema de centrifugação de duas fases.
- Bagaço Húmido Extractado - resíduo sólido resultante da extracção de azeite residual do bagaço húmido.

Tabela 5 - Principais elementos constituintes dos subprodutos dos lagares (adaptado por Freitas, 2007, de SODEAN, S.A., 2002)

	Material de poda	Bagaço virgem	Bagaço extractado	Caroço
ANÁLISE DIRECTA (% peso)				
Carbono	14,67	7,31	22,13	21,98
Voláteis	72,83	30,65	72,29	76,4
Cinzas	1,55	6,75	4,58	1,62
Humidade	10,95	55,29	12,69	13,12
ANÁLISE ELEMENTAR (% peso)				
Carbono	49,52	47,03	50,54	50,79
Hidrogénio	5,9	5,64	5,86	5,95
Azoto	0,39	0,97	0,97	0,48
Enxofre	< 0,05	0,09	0,07	0,04
Oxigénio	44,19	46,27	42,56	42,74

O poder calorífico do bagaço de azeitona, obtido a partir dos diferentes métodos de extracção de azeite (Tabela 6), tende a ser mais elevado no bagaço obtido no processo de 2 fases.

Tabela 6 - Poder Calorífico do bagaço e do caroço de azeitona (adaptado por Freitas, 2007, de Centre d'Initiatives pour la Production Propre, 2000)

	Valor (Kcal/kg)
Bagaço de lagares de prensas	2 800 - 3 000
Bagaço de lagares a 3 fases	2 500 - 2 800
Bagaço de lagares a 2 fases	3 500
Caroço	4 000

Na Figura 8 resume-se o método de obtenção de azeite e dos resíduos sólidos e líquidos provenientes da extracção do azeite, através dos três métodos de extracção.

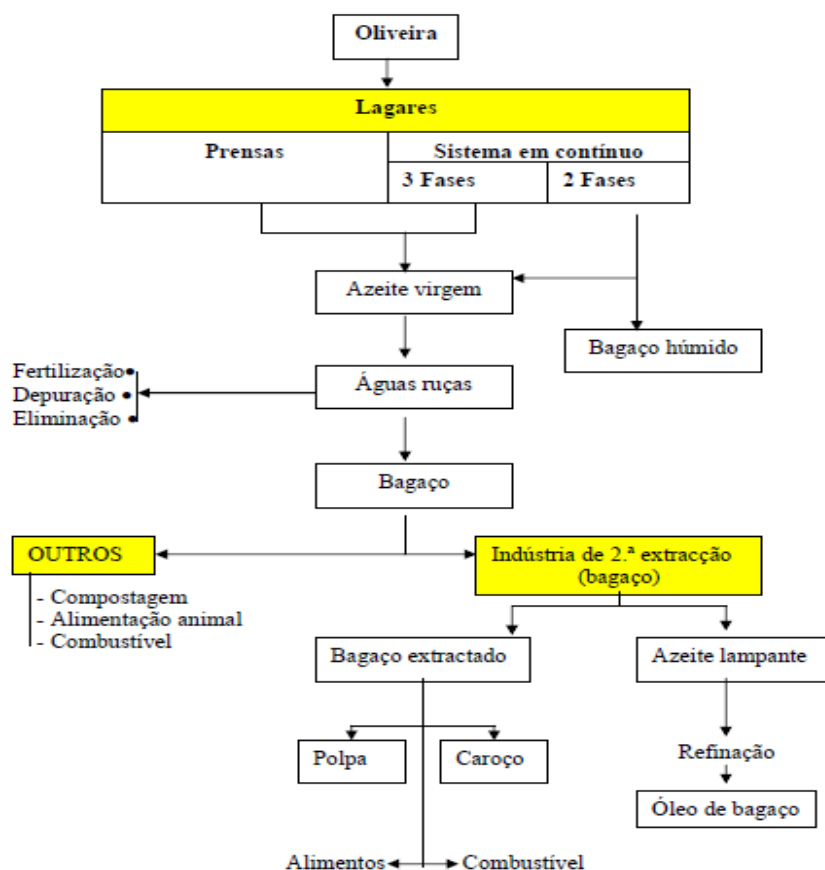


Figura 8 - Produtos, subprodutos e resíduos provenientes dos lagares (adaptado por Freitas, 2007, de Centre d'Initiatives pour la Production Propre, 2000)

2.3.2. Produção de resíduos obtidos através dos diferentes processos de extracção de azeite

Em média, apenas 21% do peso da azeitona corresponde a azeite e os restantes 79% consistem em água, casca, polpa e caroço (Albuquerque *et al.*, 2004), gerando-se no processo de

extração de azeite elevadas quantidades de resíduos. As proporções, quantidades e teor de humidade dos resíduos obtidos variam substancialmente com o método de extração utilizado, conforme se pode observar na Tabela 7.

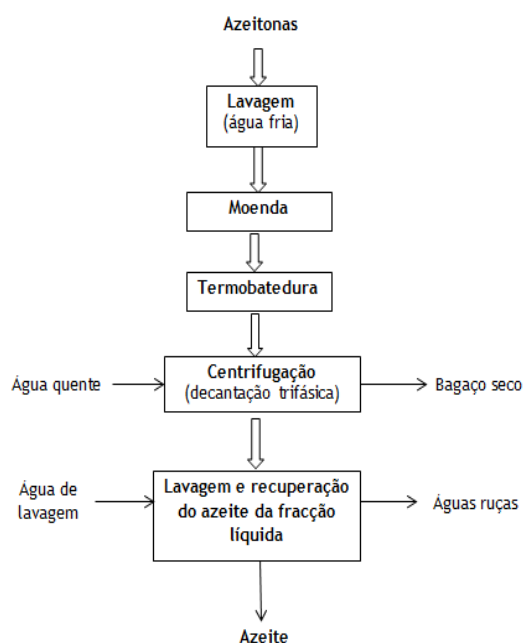
Tabela 7 - Dados comparativos da extração de azeite e de resíduos produzidos através dos diferentes processos de extração de azeite (Silva, 2009)

Processo Produção	Entradas	Quantidade	Saídas	Quantidade (kg)
Prensas	Azeitona	1000 kg	Azeite	200
	Água lavagem	0.10 a 0.12 m ³	Água ruça	600
	Água pasta	0.4 a 0.6 m ³		
	Energia	40 a 63 kWh ⁻¹	Bagaço seco	400
Três fases	Azeitona	1000 kg	Azeite	200
	Água lavagem	0.10 a 0.12 m ³	Água ruça	1000 a 2000
	Água pasta	0.5 a 1 m ³		
	Energia	90 a 117 kWh ⁻¹	Bagaço seco	500-600
Duas fases	Azeitona	1000 kg	Azeite	200
	Água lavagem	0.10 a 0.12 m ³		
	Energia	<90 a 117 kWh ⁻¹	Bagaço húmido	800-950

Os bagaços de azeitona são diferentes quando provenientes de diferentes sistemas de extração mecânica do azeite (Centre d'Initiatives pour la Production Propre, 2000). Assim, os lagares que laboram com o sistema de prensa hidráulica e o sistema de extração de três fases geram dois tipos de resíduos: a água ruça e o bagaço seco (Figura 9). Este último é normalmente submetido a uma posterior extração química do azeite residual gerando o bagaço seco extractado.

Por sua vez, o sistema de extração de duas fases gera um único resíduo (Figura 9), o bagaço húmido. Este também pode ser submetido a uma extração química para remoção do azeite residual, gerando-se um bagaço húmido extractado (Silva, 2009).

Sistema de centrifugação de três fases



Sistema de centrifugação de duas fases

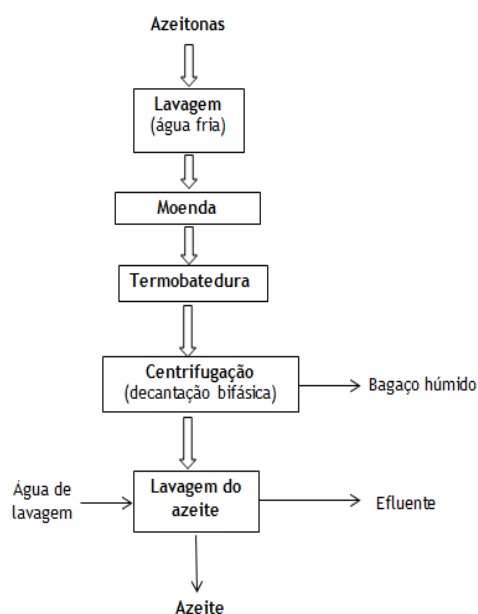


Figura 9 - Comparação dos métodos de duas e três fases na extracção de azeite (adaptado de Albuquerque *et al.*, 2004)

A Tabela 8 resume as características dos resíduos sólidos da produção de azeite, obtidos a partir de diferentes sistemas de extracção, nos quatro principais países produtores de azeite da Europa.

Tabela 8 - Características dos resíduos da produção de azeite, em Espanha, Portugal, Itália e Grécia (Freitas, 2007)

Parâmetro	Sistema de duas fases				Sistema de três fases			Sistema de prensas			Bagaço extractado		
	E	P	I	G	P	I	G	P	I	G	P	I	G
Humidade (%)	65	75	70	62-70	65	50	45-55	35	25	30	10		60
Óleo residual (%)	2.5	3	3-4	4.65	5	3-4	4.5-7	8	6-7	6-11	1	0.5	
Mineral (%)	13-15	(40)	15-17		(40)	30	39-49	(40)	40	60-65	50	60	
Valor calorífico (Kcal/kg)		<4000			<3000			<2000			4200	3000-3500	3000-4000

E - Espanha; P - Portugal; I - Itália; G - Grécia

A diferença observada no teor de gordura proveniente dos diferentes métodos de extracção deve-se fundamentalmente à eficácia de extracção dos sistemas tradicionais. A implantação progressiva dos sistemas em contínuo de 2 fases com a finalidade de reduzir a produção de

águas ruças deu lugar ao crescente aparecimento do bagaço húmido, subproduto de consistência pastosa devido à sua elevada humidade.

Na Tunísia, Grécia, e em menor escala em Itália, assiste-se à substituição progressiva dos lagares que utilizam o sistema de extracção de três fases pelo sistema de extracção de duas fases. Segue-se o problema da gestão/reutilização dos bagaços que é encarada como um dos maiores problemas do sector. Nos países Mediterrâneos produzem-se anualmente grandes quantidades de bagaço de azeitona que provocam graves problemas de natureza ambiental (Zorpas *et al.*, 2010).

O bagaço húmido é obtido a partir do método de extracção de duas fases e retém toda a água de vegetação do fruto apresentando uma humidade média de 65 a 75% (Tabela 8) (Freitas, 2007), valor bastante superior ao do bagaço procedente do sistema de três fases e daquele procedente do sistema de prensas, o que dificulta o posterior processo de extracção de óleo de bagaço (Sanchez *et al.*, 2007).

No sistema de duas fases, verifica-se ainda um aumento de produção de bagaço húmido em cerca de 50% relativamente ao sistema de três fases (Borja *et al.*, 2003), devido ao aumento do teor de água (que no sistema anterior seria constituinte da água ruça).

O bagaço seco, como contém um teor de gordura residual considerável, constitui matéria-prima para outras indústrias onde, por acção de solventes químicos, se extrai essa gordura, obtendo-se o óleo de bagaço de azeitona. O resíduo destas unidades extractoras é chamado de bagaço extractado. Este bagaço pode ser posteriormente aproveitado como combustível ou para alimentação animal (García-Ortiz e Frias, 1995 e citado por Silva, 2009).

Segundo Oktay (2006) e citado por Silva (2009), com base no seu peso seco, o bagaço seco contém cerca de 15 % de gordura, 6% de proteínas, 16% de hidratos de carbono e 63% de fibras. O seu poder calorífico é de aproximadamente 15 771.68 kJ kg⁻¹. É um resíduo de natureza lenhocelulósica, considerado recalcitrante à biodegradação. Como se pode observar na Tabela 9, o bagaço seco apresenta uma elevada razão C/N e um baixo teor em nutrientes (Albuquerque *et al.*, 2004).

Tabela 9 - Composição média do bagaço seco (Silva, 2009)

Parâmetro	Valor
C (g kg ⁻¹)	462
N (g kg ⁻¹)	11
P (g kg ⁻¹)	1.0
K (g kg ⁻¹)	6.5
Celulose (g kg ⁻¹)	266
Lenhina (g kg ⁻¹)	294
Ácidos húmicos (g kg ⁻¹)	19

2.4. Processos Biológicos

O tratamento de resíduos baseados em processos biológicos são os mais utilizados uma vez que permitem o tratamento de resíduos ao transformar compostos orgânicos em CO₂ e H₂O (ou CH₄ e CO₂), com custos relativamente baixos.

A capacidade que certos microrganismos têm para degradar substâncias orgânicas tóxicas é um facto bem documentado. O tratamento biológico fundamenta-se na utilização dos compostos de interesse, como substrato para o crescimento e a manutenção de microrganismos (Freire *et al.*, 2000).

2.4.1. Digestão Anaeróbia

No processo de digestão anaeróbia através da utilização de microrganismos, o carbono orgânico é convertido por oxidações e reduções sucessivas ao seu estado oxidado (CO₂) e reduzido (CH₄), de modo a produzir uma mistura gasosa maioritariamente composta de metano e dióxido de carbono, conhecido por biogás (Figura 10) (Angelidaki *et al.*, 2004).

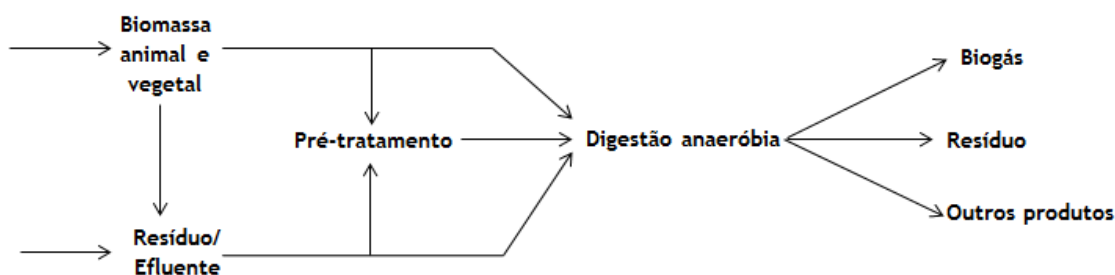


Figura 10 - Método da digestão anaeróbia (adaptado de Deublein & Steinhauser, 2008)

A utilização de matéria orgânica para a produção de energia não é uma ciência recente. Na realidade, documentos antigos fazem referência à utilização de energias renováveis antes do nascimento de Cristo. Existem registos que no ano 3000 a.C., o povo Sumério aplicava o método de tratamento anaeróbio de resíduos (Verma, 2002).

Em 1776 Alessandro Volta recolheu gás do lago Como para o examinar e verificou que a formação de gás depende de um processo fermentativo. O físico inglês Faraday também realizou algumas experiências com gás recolhido em pântanos e identificou um hidrocarboneto na sua composição (Silva, 2009). Mais tarde, por volta de 1800, Dalton, Henry e Davy descreveram a estrutura química do metano. Em 1821, Avogadro definiu a fórmula de estrutura do metano (Verma, 2002).

Na segunda metade do século 19, em França, o processo de fermentação anaeróbia foi estudado com o objectivo de retirar o odor libertado pelos efluentes. Durante a investigação foram identificados alguns dos organismos que actualmente se considera possuírem um papel fundamental no processo fermentativo. Em 1868 Béchamp propôs, pela primeira vez, a presença de uma população mista de microrganismos que convertem etanol em metano, uma vez que verificou que dependendo do substrato, havia formação de vários produtos durante o processo fermentativo (Verma, 2002).

Actualmente, a digestão anaeróbia é um método bem estabelecido e aplicado no tratamento de vários resíduos de origem doméstica, municipal, industrial e agrícola. Como vantagens da digestão anaeróbia nomeia-se a baixa formação de biomassa bacteriana, o tratamento de elevadas cargas orgânicas, elevado valor energético do metano gerado e o baixo consumo energético (Botheju *et al.*, 2011). Tendo em consideração a consciencialização global relativamente à sustentabilidade ambiental, a digestão anaeróbia é considerada um processo promissor para a geração de energia renovável e como método de estabilização de resíduos (Borja *et al.*, 2002; Rincon *et al.*, 2008)

Num futuro próximo, é muito provável que a digestão anaeróbia seja o processo de tratamento de resíduos mais utilizado por razões ambientais. O futuro da digestão anaeróbia deverá ser direccionado no sentido de ser o processo mais utilizado no tratamento sustentável de resíduos. Das vantagens da utilização da digestão anaeróbia para o tratamento de resíduos destacam-se as seguintes (Brites & Gafeira, 2007):

- Tecnologia de tratamento de efluentes
 - Processo natural de tratamento de resíduos
 - Menores custos de implantação pois requer menos espaço do que o tratamento aeróbio
- Benefícios ambientais
 - Elimina odores
- Benefícios energéticos
 - Processo de produção em cadeia
 - Produz combustível renovável de elevada qualidade

Todavia, também existem inconvenientes relativamente a este sistema, dos quais se destacam:

- O início do processo da digestão anaeróbia é um processo lento
- Dependendo do tipo de composto a tratar, é um processo mais sensível a agentes tóxicos
- Eficiência de tratamento em geral mais baixo do que o dos processos aeróbios

Segundo RISE-AT (1998) os seguintes factores influenciarão o custo total do biogás produzido pelo tratamento anaeróbio:

- Preços da energia
- Impostos de energia assim como das políticas de energia renováveis
- Preço dos terrenos para a implantação de instalações de tratamento de resíduos
- Despesa com a mão-de-obra
- Custo de construção e da matéria-prima

2.4.2. Processo de digestão anaeróbia

A biodegradação anaeróbia de matéria orgânica ocorre na ausência de oxigénio e na presença de microrganismos anaeróbios. Na Tabela 10 estão exemplos do tipo de microrganismos e populações de microrganismos envolvidos neste processo.

Este processo é consequência de uma série de interações metabólicas entre vários grupos de microrganismos e de uma serie de reacções químicas durante as quais a matéria orgânica é decomposta (Eliyan, 2007).

Tabela 10 - População bacteriana proveniente de um digester anaeróbio (adaptado de Eliyan, 2007, citado de Khanna *et al*, 1995)

Grupo	Células/mL
Bactérias hidrolíticas totais	10^8 - 10^9
Proteolíticas	10^7
Celulolíticas	10^5
Hemicelulolíticas	10^6 - 10^7
Bactérias acetogénicas produtoras de hidrogénio	10^8 - 10^9
Bactérias homoacetogénicas	10^6
Bactérias metanogénicas	10^5 - 10^6
Bactérias sulfato-redutoras	10^4

A digestão anaeróbia é um processo complexo (Figura 11) que pode ser dividido em quatro fases de degradação - hidrólise, acidogénese, acetogénese e metanogénese - de acordo com a principal reacção de decomposição que ocorre em cada fase (Eliyan 2007; Carvalho, 2010).

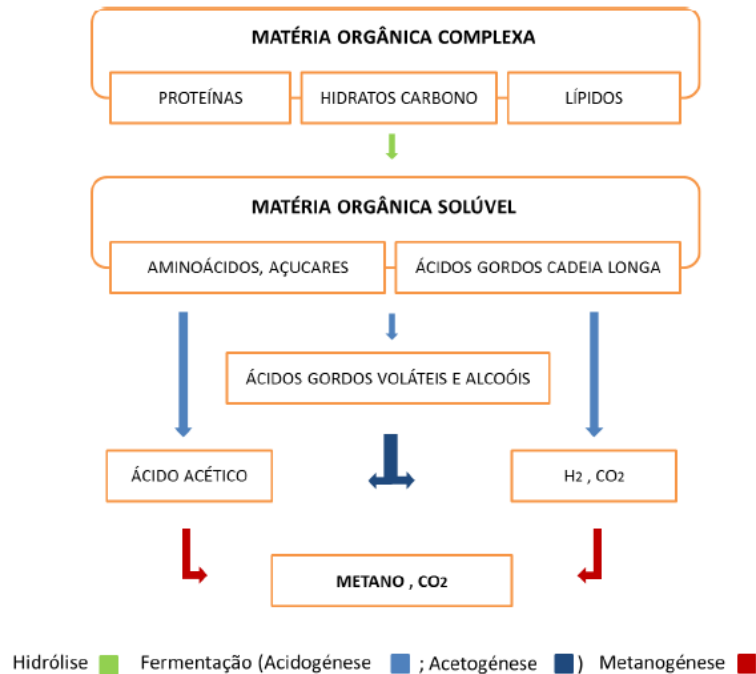


Figura 11 - Diferentes etapas da digestão anaeróbia (Carvalho, 2010)

As diferentes etapas são levadas a cabo por diferentes grupos de microrganismos que estabelecem uma inter-relação sintrófica e impõem diferentes características ao meio (Figura 12) (Verma 2002).

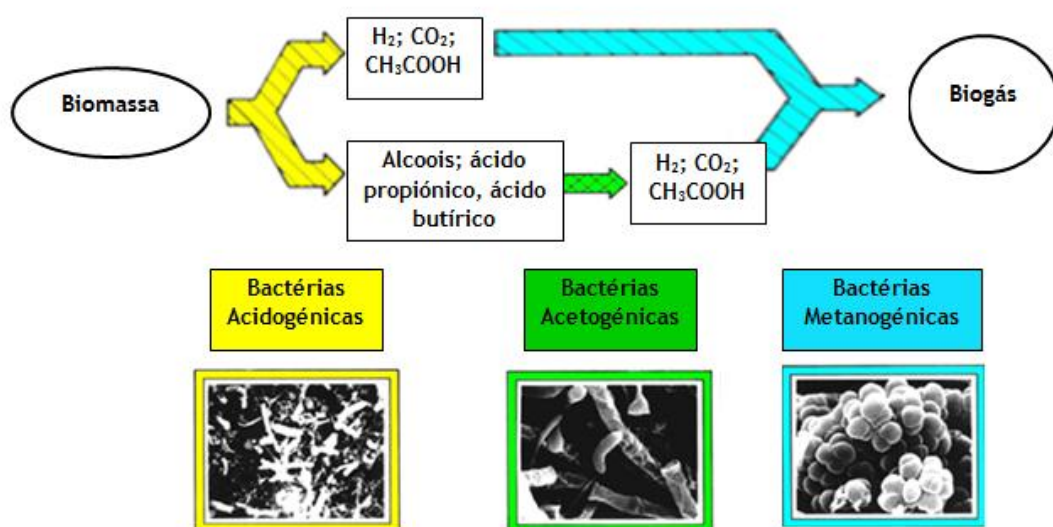


Figura 12 - Representação esquemática da produção de biometano a partir de substâncias orgânicas complexas (adaptado de Oreopoulou & Russ, 2007)

2.4.3. Etapas envolvidas no processo da digestão anaeróbia

Neste capítulo descreve-se resumidamente as principais fases envolvidas na digestão anaeróbia.

2.4.3.1. Hidrólise

Na fase de hidrólise os compostos insolúveis de cadeia longa como lípidos, polissacáridos, proteínas e ácidos nucleicos são divididos em moléculas mais pequenas e solúveis, que podem posteriormente ser consumidas por microrganismos durante a fase de fermentação acidogénica. Estes componentes solúveis incluem ácidos gordos, monossacáridos, aminoácidos, compostos aromáticos simples e outros compostos de cadeia curta. A hidrólise é catalisada por enzimas extracelulares (Civit, 2009) (e.g. celulases, celobiasas, xilanasas, amilases, lipases e proteases) segregadas para o meio por diferentes tipos de bactérias hidrolíticas (Carvalho 2010). Considera-se que este grupo de organismos é composto por bactérias facultativas que podem viver na presença (*Streptococci*) ou na ausência de oxigénio (*Bactericides* e *Clostridia*) (Yadvika *et al.*, 2003; Botheju *et al.*, 2011). A hidrólise de hidratos de carbono ocorre em poucas horas, a hidrólise de proteínas e lípidos ocorre em alguns dias e a hidrólise da lenhoceluloses e da lignina é lenta e incompleta (Botheju *et al.*, 2011).

No processo de biodegradação anaeróbia a hidrólise tem um papel preponderante na quantidade final de biogás produzido, na velocidade da reacção global e pode ser o passo limitante do processo (Angelidaki *et al.*, 2004). A velocidade desta etapa depende de factores tais como o pH, temperatura, composição e tamanho da partícula do substrato e da concentração de produtos intermediários (Juanga, 2005). Esta limitação é ultrapassada, em alguns processos industriais, através da aplicação de reagentes químicos de modo a promover a hidrólise que resulta num tempo de digestão mais curto e maior produção de metano (RISE-AT, 1998).

As reacções de decomposição dos diferentes compostos orgânicos, que ocorrem durante a hidrólise são:

- Lípidos ⇒ Ácidos Gordos
- Polissacárideos ⇒ Monossacáridos
- Proteínas ⇒ Aminoácidos
- Ácidos Nucleicos ⇒ Purinas e Pirimidinas

2.4.3.2. Fermentação

Muitos dos microrganismos anaeróbios facultativos obtêm a sua energia de crescimento através da fermentação de carbono orgânico. A fermentação consiste num processo que pode ocorrer na ausência de luz através de bactérias anaeróbias estritas ou facultativas. Na

fermentação, os compostos orgânicos não só servem como doadores de electrões, como também actuam como receptores de electrões (Barakat *et al.*, 2012).

2.4.3.3. Acidogénese

Os componentes orgânicos solúveis, que incluem os produtos da hidrólise, são degradados a compostos mais simples (Figura 13) como por exemplo CO₂, H₂, etanol, propanol, butanol, metanol, glicerina e acetona, ácido acético (CH₃COOH), propiónico (CH₃CH₂COOH), butírico (CH₃CH₂CH₂COOH), fórmico (HCOOH), capríónico e láctico (C₃H₆O₃) (Boubaker, 2008).

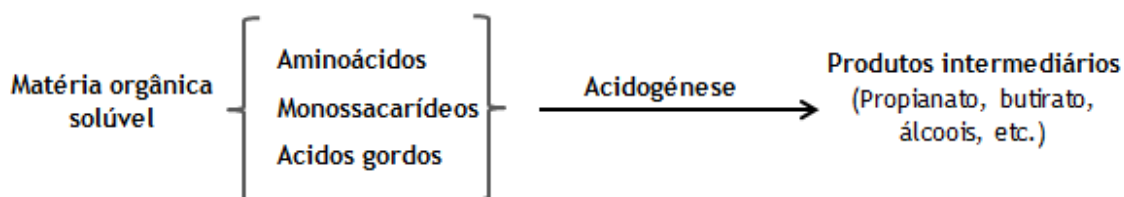
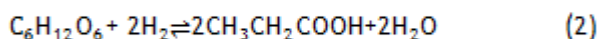
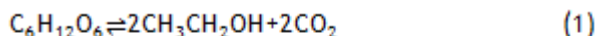


Figura 13 - Etapa de acidogénese ilustrando os compostos orgânicos degradados e os produtos formados (adaptado de Deublein & Steinhauser, 2008)

As equações 1, 2 e 3 representam três reacções típicas da acidogénese onde a glucose é convertida respectivamente a etanol, propionato e ácido acético (Deublein & Steinhauser, 2008).



Devido à sua capacidade de duplicação e reduzida sensibilidade às oscilações de pH, as bactérias acidogénicas normalmente representam cerca de 90% da população bacteriana nos digestores (Civit, 2009). Quando o meio se torna demasiado ácido, significa que a produção de ácido pelas bactérias acidogénicas é mais rápido do que o seu consumo pelas bactérias metanogénicas, o que faz com que o valor de pH do meio diminua, provocando um desequilíbrio, que leva à inibição da formação de metano. Uma forma de corrigir esta situação consiste em alcalinizar o meio (por exemplo, pela adição de bicarbonato de sódio) de modo a neutralizar o pH e equilibrar novamente o sistema (Eliyan, 2007).

2.4.3.4. Acetogénese

Na acetogénese, os restantes produtos da acidogénese, i.e. ácido propiónico, ácido butírico e álcoois, são transformados pelas bactérias acetogénicas a hidrogénio, dióxido de carbono e acetato (Figura 14) (Deublein & Steinhauser 2008; Carvalho 2010; Weiland, 2010).

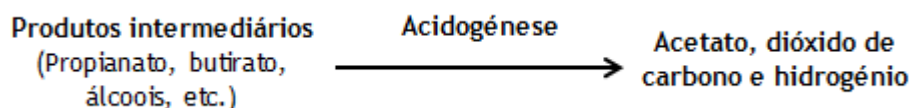


Figura 14 - Ilustração da reacção de acetogénese (adaptado de Deublein & Steinhauser, 2008)

Neste processo o hidrogénio desempenha um papel fundamental uma vez que a reacção só ocorrerá se a pressão parcial do hidrogénio for suficientemente baixa de modo a permitir a conversão de todos os ácidos. Esta diminuição da pressão parcial do hidrogénio está a cargo de bactérias que o consomem (Deublein & Steinhauser, 2008).

Relativamente às reacções que ocorrem nesta etapa, a equação que representa a conversão do ácido propiónico a acetato (Tabela 11), apenas alcançável quando a pressão de hidrogénio for baixa, é das mais importantes (Ostrem, 2004) uma vez que, de todos os produtos metabolizados pela população acidogénica, apenas o hidrogénio e o acetato podem ser utilizados directamente pela população metanogénica (Louzada, 2006).

Tabela 11 - Equações que intervêm na degradação acetogénica (adaptado de Deublein & Steinhauser 2008)

Substrato	Reacção
Ácido propiónico	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)\text{COOH} + 2\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{CH}_3\text{COOH} + \text{CO}_2 + 3\text{H}_2$
Ácido butírico	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_2\text{COO}^- + 2\text{H}_2\text{O} \rightarrow 2\text{CH}_3\text{COO}^- + \text{H}^+ + 2\text{H}_2$
Ácido valérico	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_3\text{COOH} + 2\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{CH}_3\text{COO}^- + \text{CH}_3\text{CH}_2\text{COOH} + \text{H}^+ + 2\text{H}_2$
Ácido isovalérico	$(\text{CH}_3)_2\text{CHCH}_2\text{COO}^- + \text{HCO}_3^- + \text{H}_2\text{O} \rightarrow 3\text{CH}_3\text{COO}^- + \text{H}_2 + \text{H}^+$
Ácido capriónico	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4\text{COOH} + 4\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{CH}_3\text{COO}^- + \text{H}^+ + 5\text{H}_2$
Dióxido de carbono/Hidrogénio	$2\text{CO}_2 + 4\text{H}_2 \rightarrow \text{CH}_3\text{COO}^- + \text{H}^+ + 2\text{H}_2\text{O}$
Glicerina	$\text{C}_3\text{H}_8\text{O}_3 + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{CH}_3\text{COOH} + 3\text{H}_2 + \text{CO}_2$
Ácido láctico	$\text{CH}_3\text{CHOHCOO}^- + 2\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{CH}_3\text{COO}^- + \text{HCO}_3^- + \text{H}^+ + 2\text{H}_2$
Etanol	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)\text{OH} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{CH}_3\text{COOH} + 2\text{H}_2$

2.4.3.5. Metanogénese

A metanogénese é um processo comum a muitos meios anaeróbios. Este processo estritamente anaeróbio é frequentemente associado à decomposição de matéria orgânica. O acetato, dióxido de carbono e o hidrogénio são provavelmente os substratos mais importantes para as bactérias metanogénicas em ecossistemas naturais.

Uma vez que estes organismos utilizam apenas compostos simples para sustentar o seu crescimento, eles dependem da associação com bactérias fermentativas que degradam compostos orgânicos complexos em substratos úteis. Na maior parte das vezes, estas

associações sintróficas entre as bactérias metanogénicas e fermentativas são obrigatórias (Berry *et al.*, 1987).

As *arquea* metanogénicas, que se desenvolvem em meios de baixo potencial redox e estritamente anaeróbios, são responsáveis pela última fase do processo metabólico de degradação anaeróbia (Yadvika *et al.*, 2003; Weiland, 2010). O acetato, o CO₂ e o H₂ resultantes da fermentação são metabolizados a CH₄ (60-70%), CO₂ (30-40%) e outros gases (Botheju *et al.*, 2011). A produção de metano é maior quando formado a partir da redução do dióxido de carbono, no entanto, a baixa concentração de hidrogénio nos digestores faz com que a reacção de acetato seja a principal produtora de metano (Verma, 2002).

Segundo Coates *et al* (1996) e Neves (2009), citados por Carvalho (2010), a metanização dos substratos é realizada através de dois grupos fundamentais de bactérias metanogénicas (Tabela 12):

- *Arquea* hidrogenofílicas, que convertem H₂/CO₂ a metano, ao desenvolverem uma bioregulação da pressão parcial de H₂ que se sabe ser inibidor da acção das bactérias acetogénicas.
- *Arquea* acetofílicas, que convertem o acetato a CH₄ e CO₂, contribuindo com cerca de 70% do metano total. Os microrganismos deste grupo possuem uma baixa velocidade de crescimento, constituindo a etapa mais lenta do processo de metanização.

As bactérias metanogénicas incluem, entre outras, as espécies *methanobacterium*, *methanobacillus*, *methanococcus* e *methanosarcina* (Rincon *et al.*, 2008) e podem ser divididas em três grupos (Rincon *et al.*, 2008) (Tabela 12), em função do tipo substrato metabolizado:

(CO₂): CO₂, HCOO⁻, CO

(Metilo): CH₃OH, CH₃NH₂, (CH₃)₂NH₂⁺, (CH₃)₃NH⁺, CH₃SH, (CH₃)₂S

(Acetato): CH₃COO⁻

Em geral, pode dizer-se que as espécies *methanosarcina spp.* e *methanosaeta spp.* são consideradas as mais importantes da digestão anaeróbia uma vez que consomem acetato, H₂ e CO₂ (Karakashev *et al.*, 2005) e estão presentes na maioria das populações dos digestores anaeróbios.

A carga orgânica, o tipo de substrato, a temperatura e o tempo de retenção hidráulico são alguns dos parâmetros que afectam a diversidade das *arquea* metanogénicas.

Tabela 12 - Reacções que ocorrem durante a degradação metanogénica (adaptado de Deublein & Steinhauser, 2008)

Tipo de substrato	Reacção Química	$\Delta G_f'$ (substrato) (kJ mol ⁻¹)
CO ₂	$4H_2 + HCO_3^- + H^+ \rightarrow CH_4 + 3H_2O$	-135,4
	$CO_2 + 4H_2 \rightarrow CH_4 + 2H_2O$	-131,0
CO ₂	$4HCOO^- + H_2O + H^+ \rightarrow CH_4 + 3HCO_3^-$	-130,4
Acetato	$CH_3COO^- + H_2O \rightarrow CH_4 + HCO_3^-$	-30,9
Metilo	$4CH_3OH \rightarrow 3CH_4 + HCO_3^- + H^+ + H_2O$	-314,3
Metilo	$CH_3OH + H_2 \rightarrow CH_4 + H_2O$	-113,0
<i>Exemplo do tipo metilo:</i>		
Etanol	$2CH_3CH_2OH + CO_2 \rightarrow CH_4 + 2CH_3COOH$	-116,3

* $\Delta G_f'$ - Energia livre de formação do metano

2.4.4. Parâmetros de processo importantes na digestão anaeróbia

A velocidade à qual os microrganismos crescem é de importância primordial nos processos de digestão anaeróbia. Os parâmetros de operação do digestor têm de ser controlados de modo a favorecer a actividade microbiana e, conseqüentemente aumentar a eficiência da degradação anaeróbia do sistema (Borja *et al.*, 2004). Alguns destes parâmetros estão descritos abaixo.

- **Carga Orgânica Alimentada** - A carga orgânica pode ser definida como a medida da capacidade de conversão biológica de um sistema anaeróbio (Juanga, 2005). É caracterizada pela quantidade de sólidos voláteis (SV) ou carência química de oxigénio (CQO) que entra por dia e por unidade de volume no digestor (Nayono, 2009).

- **pH** - As bactérias metanogénicas têm um metabolismo bastante sensível ao pH. A produção de uma grande quantidade de ácidos gordos voláteis na acidogénese pode provocar uma descida do pH que pode levar à destruição da população metanogénica se o valor deste baixar dos 6,5 ou aumentar acima de 8,5 (RISE-AT, 1998; Civit 2009; Liu, 2011).

Quando não há separação física das diferentes fases, para que a digestão anaeróbia decorra normalmente, a concentração de ácidos gordos voláteis no meio deve ser inferior a 2000mg/L (Yadvika *et al.*, 2003).

- **Temperatura** - A temperatura influencia as propriedades físico-químicas dos componentes existentes no substrato, a velocidade de crescimento e o metabolismo dos microrganismos logo, influencia directamente a dinâmica da população existente no digestor (Apples *et al.*, 2008). O aumento da temperatura aumenta a velocidade das reacções de

decomposição de compostos orgânicos, mas diminui a solubilidade de gases dissolvidos na água [1].

A digestão anaeróbia pode ocorrer a temperaturas que variam entre a temperatura psicrófila (5°C - 20°C) e a temperatura termófila (50°C - 60°C). De acordo com RISE-AT,1998, o intervalo mesófilo (20 a 40°C, sendo a temperatura óptima de 35°C), e o intervalo termófilo (50 a 60°C) promovem as condições ótimas para a produção de biogás.

À medida que a temperatura aumenta a produção de biogás vai ser superior e o processo digestivo torna-se mais rápido (Liu, 2011). No entanto, o aumento da temperatura também contribui para o aumento da concentração de amónia no meio (1,5 - 3,0 mg/L NH_4^+ a pH > 7,6 (Tabela 14)), o que pode inibir a actividade microbiana (Dererie, 2010).

- **Razão Carbono/ Azoto (C/N)** - De forma a se obter um processo de digestão anaeróbia eficiente é importante garantir uma razão carbono/azoto (C/N) apropriada. A razão óptima de C/N em reactores anaeróbios é de 20-30 (Verma, 2002). Se a razão C/N for elevada promove a formação e acumulação de ácidos e é indicadora do rápido consumo do azoto pela população metanogénica (Verma, 2002). Esta acumulação de ácidos, atrasa ou inibe a actividade metanogénica e a produção de metano diminui. Por outro lado, se a razão C/N for demasiado baixa, provoca a acumulação de azoto e o aumento do valor de pH acima de 8,5 (Yadvika *et al.*, 2003). Consequentemente, a amónia atinge concentrações que são tóxicas aos microorganismos (Mata-Alvarez, 2000 e citado por Eliyan, 2007).

Razões ótimas C/N do digestor podem ser obtidas ao se misturar resíduos que contenham razões C/N elevados com resíduos cuja razão C/N é baixa (Verma, 2002). A razão C/N de diferentes resíduos encontram-se ilustradas na Tabela 13.

Tabela 13 - Razão C/N de alguns resíduos (adaptado de Eliyan, 2007)

Resíduo	Razão C/N
Estrume de pato	8
Excrementos humanos	8
Estrume de galinha	10
Estrume de cabra	12
Estrume de porco	18
Estrume de ovelha	19
Estrume de vaca	24
Jacinto de água	25
Resíduos sólidos urbanos	40
Estrume de elefante	43
Palha de milho	60
Palha de arroz	70
Palha de aveia	90
Serradura	> 20

- **Substâncias Tóxicas** - Segundo Mata-Alvarez (2003) e citado por Eliyan (2007), a presença de vários tipos de substâncias tóxicas é responsável pela inibição da metanogênese, o que resulta numa baixa produção de biogás e aumento da concentração de ácidos voláteis. Apesar de a biometanogênese ser sensível a vários agentes tóxicos (Tabela 14), não existe um consenso geral relativamente à tolerância dos microrganismos às substâncias tóxicas. O efeito de toxicidade depende da concentração de biomassa assim como da capacidade que as bactérias têm de se adaptar aos efeitos tóxicos e às condições do meio, isto é, variações de pH e temperatura.

Tabela 14 - Concentração de inibidores na digestão anaeróbia (adaptado de Eliyan, 2007)

Inibidor	Concentração (mg/L)
Ácidos voláteis	> 2,000 (como ácido acético) ^a
Azoto amoniacal	1,500 - 3,000 (a pH > 7,6)
Sulfureto (solúvel) ^b	> 200
	> 300 (tóxico)
Cálcio	2,500 - 4,500; 8,000 extremamente inibitório
Magnésio	1,000 - 1,500; 3,000 extremamente inibitório
Potássio	2,500 - 4,500;
Sódio	12,000 extremamente inibitório 3,500 - 5,500;
Cobre	8,000 extremamente inibitório 0,5 (metal solúvel)
Cádmio	150 ^c
Ferro	1,710 ^c
Cr ⁻⁶	3
Cr ⁻³	500
Nickel	2 ^d

^aentre pH 6,6 - 7,4 e tamponização adequada, pode ser tolerada uma concentração de ácidos voláteis de 6,000 a 8,000 mg/L

^b concentração de gás de exaustão acima de 6% é tóxica

^c Milímol de metal por kg de sólido seco

^d Quando existente em baixas concentrações, promove a formação de metano. Necessário às bactérias metanogénicas

- **Agitação** - Nos sistemas anaeróbios, o objectivo da agitação é o de misturar o substrato com a biomassa, evitar a formação de espuma assim como evitar gradientes de temperatura dentro do digestor. No entanto, uma agitação excessiva pode afectar a acção dos microrganismos destruindo os agregados formados, sendo preferível utilizar velocidades de agitação mais baixas (RISE-AT, 1998).

2.5. Biodegradação de compostos aromáticos

Apesar da existência de organismos capazes de degradar uma grande variedade de substratos, que se conheça, não existe uma única espécie na natureza que seja capaz de degradar todas as substâncias naturais. A diversidade dos processos metabólicos reflecte a diversidade de organismos existentes na composição da biomassa bacteriana. Pode-se esperar um maior número de populações bacterianas à medida que a mistura de substrato se torna mais complexa. A natureza permite que determinadas populações microbianas se tornem dominantes para a conversão de determinado tipo de substrato, e que mais tarde sejam

substituídas por outras populações que atacam outro tipo de substratos (Heider & Fuchs, 1997).

Nas primeiras etapas da degradação de compostos aromáticos, a diversidade da população microbiana depende do tipo de ligações intramoleculares que têm de ser hidrolisadas e do tipo de monómeros resultantes da fermentação. As ligações glicosídicas, peptídicas e ester são facilmente hidrolisadas enquanto as ligações C-C e éter requerem condições oxidantes extremas (Kaiser & Hanselman, 1982).

Muitos organismos anaeróbios produzem grande quantidade de produtos finais reduzidos. A composição dos produtos depende do metabolismo energético dos organismos envolvidos e este pode ser alterado, ao se ajustarem as condições de crescimento dos organismos, o meio de cultura ou através da utilização de populações mistas de organismos (Kaiser & Hanselman, 1982).

O tratamento termoquímico tem sido utilizado de modo a aumentar o rendimento durante a digestão de matéria orgânica. Sob condições de temperatura e pH elevado, os componentes são parcialmente solubilizados e são produzidos compostos aromáticos de baixo peso molecular que são, de seguida, degradados a CH_4 e CO_2 (Healy & Young, 1979; Healy *et al.*, 1980; Sleat & Robinson, 1984).

Healy & Young (1979) investigaram a susceptibilidade da degradação anaeróbia de compostos monoaromáticos que incluíam, entre outros, o ácido vanílico, ácido ferúlico, fenóis, ácido p-hidroxibenzóico e o siringaldeído. Durante a investigação, os autores observaram que em todos os casos ocorreu a fissão do anel aromático e a conseqüente produção de CO_2 e CH_4 . Mostraram que, após um curto período de aclimatização, tanto os catecóis como os fenóis podem ser fermentados por uma população mista de bactérias a CO_2 e CH_4 .

2.5.1. Compostos Fenólicos

Os compostos fenólicos são estruturas químicas que apresentam grupos hidroxilo e anéis aromáticos, na forma simples ou de polímeros, que lhes confere poder antioxidante (Cormenzana, 1996). Estes compostos podem ser naturais ou sintéticos. Quando presentes em vegetais podem existir na forma livre ou complexada como, por exemplo, a açúcares e proteínas. Entre os compostos mais importantes, destacam-se os flavonóides, os ácidos fenólicos, os taninos e os tocoferóis (Angelo & Jorge, 2007).

Muitos dos derivados hidrocarbonados, maioritariamente constituídos por compostos fenólicos, são subprodutos obtidos a partir de processos de transformação industrial (Healy & Young, 1979). Esta fracção fenólica, constituída essencialmente por ácidos e aldeídos, é responsável pela elevada acção antibacteriana detectada nestes resíduos devido à sua

elevada toxicidade, especialmente para as bactérias metanogénicas, fazendo com estes resíduos sejam muito difíceis de degradar biologicamente (Benitez *et al.*, 1997).

O ciclo do carbono depende de um equilíbrio dinâmico entre a síntese e a degradação do carbono orgânico. Estes compostos recalcitrantes, juntamente com alguns polímeros recalcitrantes naturais, acabam como resíduos e eventualmente acumulam-se no meio ambiente, pelo que surge a necessidade de reduzir a quantidade de material recalcitrante existente nos resíduos (Healy & Young 1979, Tuomela *et al.*, 2000).

2.5.2. Lignina

A lignina (Figura 15) é responsável pela integridade e rigidez estrutural das plantas superiores e evita o entumescimento da lenhocolose. É o composto aromático mais abundante na Terra e um importante constituinte da biomassa terrestre (Li *et al.*, 2009). É um complexo polímero aromático, tridimensional, de elevado peso molecular que consiste de várias unidades de fenilpropano unidas por ligações C-C e de diaril-éter (Healy & Young, 1979).

Ao reagir com agentes oxidantes fracos, a lignina decompõe-se em monómeros fenólicos mais pequenos (Healy & Young, 1980; Taherzadeh *et al.*, 2008; Yogui *et al.*, 2010).

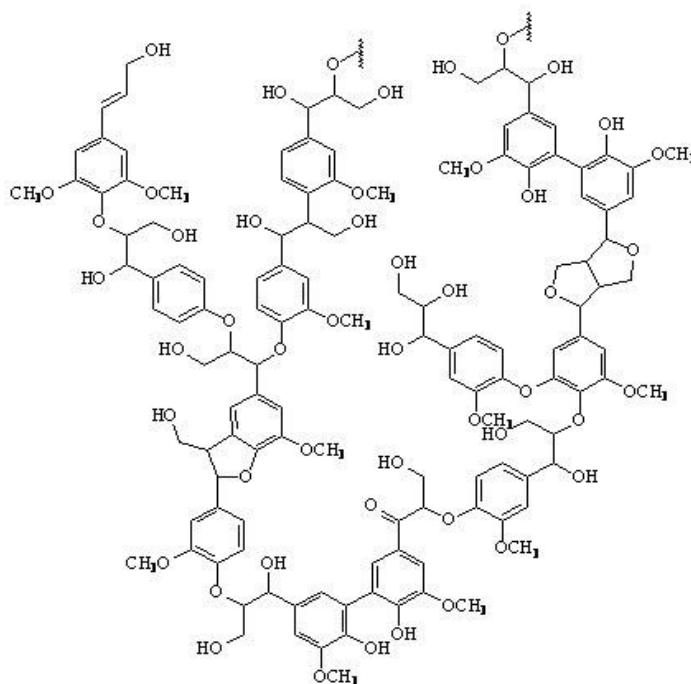


Figura 15 - Estrutura química da Lignina [2]

A lignina, que se considera ser um material recalcitrante sob condições anaeróbicas (Healy & Young, 1980; Bahri *et al.*, 2008), encontra-se em resíduos domésticos e industriais. É sintetizada por plantas ao ligar álcoois cumarílico, coniferílico e sinapílico (Figura 16) de

modo a formar p-hidroxifenol (H), guaiacilo (G) e siringilo (S), que são respectivamente unidades monoméricas da lignina (Klink *et al.*, 2004; Bahri *et al.*, 2006). A lignina é biossintetizada via radical livre por reacções de acoplamento iniciada por peroxidases e lacases.

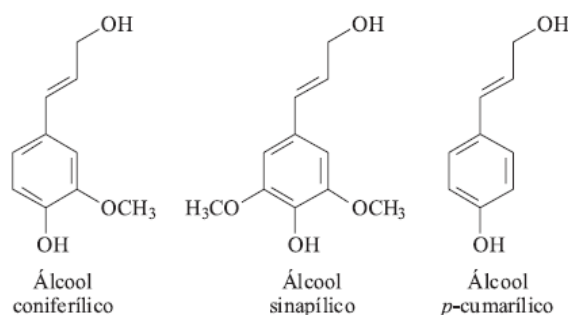


Figura 16 - Álcoois precursores das unidades fenilpropanóides guaiacilo, siringilo e p-hidroxifenol (Barbosa *et al.*, 2008)

A estrutura aromática de elevado peso molecular, baixa solubilidade, rigidez, heterogeneidade e reticulação das ligações intramoleculares faz a lignina praticamente inacessível tanto a microrganismos como a enzimas. Devido a estas características, alguns autores consideram que a lignina contribui substancialmente na estabilidade do carbono nos solos (Bot *et al.*, 2005).

Apenas um número limitado de microrganismos são capazes de produzir oxiredutases específicas que são necessárias para clivar estas ligações. (Kirk and Farrell, 1987 citado por Bahri *et al.*, 2006). O método do tratamento térmico sob condições alcalinas, para aumentar a biodegradabilidade anaeróbia da lignina e de outros materiais recalcitrantes, tem sido estudado. Neste método, espera-se quebrar a estrutura da lignina em compostos aromáticos mais simples que possam ser degradados. Esta solução irá diminuir a quantidade de matéria recalcitrante uma vez que serão utilizados para a produção de biometano (Healy & Young, 1979).

2.5.2.1. Biodegradação anaeróbia da Lignina

Em condições anaeróbias, a lignina pode ser degradada por bactérias. Segundo Li *et al.*, (2009), a primeira demonstração da produção de gás a partir de derivados monoméricos da lignina foi feita por Boruff & Buswell (1934) que mostraram que 54% da lignina existente em talos de milho foi convertida a CO₂ e CH₄ após 600 dias de incubação.

Têm sido estudados microrganismos capazes de degradar a lignina e compostos relacionados a subprodutos úteis (Chen *et al.*, 1985). Em trabalhos desenvolvidos por Crawford *et al.*, (1983) e Kern *et al.*, (1987), citados por Li *et al.*, (2009), das espécies mais activas na degradação

aeróbia de ligninas sintéticas, conhecidas até à data, destacam-se a estirpe 99 de *Xanthomonas* sp e a *Streptomyces viridosporus*. De modo a se obter processos úteis que desintegram a lignina em monómeros mais simples, é importante que se utilizem métodos que deixam o núcleo aromático intacto e que assegurem a conversão microbiana da mistura resultante, em compostos fenólicos mais simples (Li *et al.*, 2009).

Na natureza, a degradação da lignina ocorre através da acção sequencial de diferentes populações microbianas. Healy & Young (1979) juntaram comunidades metanogénicas à degradação de monómeros de lignina obtidos a partir do tratamento térmico alcalino do madeira. Foram estudados 11 monómeros da lignina e em todos os casos observou-se a degradação dos compostos aromáticos e consequente produção de biometano.

A produção de biocombustíveis e de bioenergia obtido a partir de resíduos lenhocelulósicos é considerada uma das soluções mais promissoras de modo a diminuir o efeito de estufa, provocado pelas emissões de gás e de modo a promover uma alternativa às energias fósseis (Wong, 2009).

2.5.2.2. Biodegradação anaeróbia de monómeros derivados da lignina

O siringaldeído e a vanilina são formados a partir da despolimerização parcial de polímeros da lignina através das unidades siringilo (S) e guaiacilo (G), respectivamente. A natureza e a quantidade de monómeros (G,S) pode variar consoante a espécie, idade e sua localização na parede celular da planta (Benner *et al.*, 1984; Barbosa *et al.*, 2008; Barakat *et al.*, 2012).

Vários investigadores têm demonstrado que na degradação anaeróbia a metano e dióxido de carbono de compostos monoméricos aromáticos, incluindo os que derivam da lignina, o oxigénio molecular não é necessário para a clivagem da estrutura dos anéis aromáticos. No entanto, o oxigénio molecular é necessário para a clivagem das ligações intermonoméricas presentes nas ligninas (Benner *et al.*, 1984).

Benner *et al.*, (1984) verificaram que a lignina das madeiras gimnospérmicas e angiospérmicas é parcialmente degradada a produtos finais gasosos sob condições anaeróbias. Healy & Young (1979) mostraram que um meio constituído por uma população de bactérias anaeróbias, enriquecido com excrementos, é capaz de clivar os anéis aromáticos de 11 derivados de lignina e que os substratos aromáticos são estequiometricamente fermentados a dióxido de carbono e metano. Colberg & Young (1985) sugeriram que, em condições anaeróbias, a produção de metano e de dióxido de carbono a partir de substratos derivados da lignina é mediada por diferentes populações de microrganismos.

A fracção sólida de biomassa lenhocelulósica, rica em celulose pode ser convertida a bioetanol e biometano (Figura 17). A fracção líquida consiste essencialmente de hidrolisados

hemicelulósicos ricos em xilose e arabinose, além de conter outros subprodutos que podem inibir a fermentação a bioetanol. O biometano pode ser produzido a partir da fracção líquida (Barakat *et al.*, 2012).

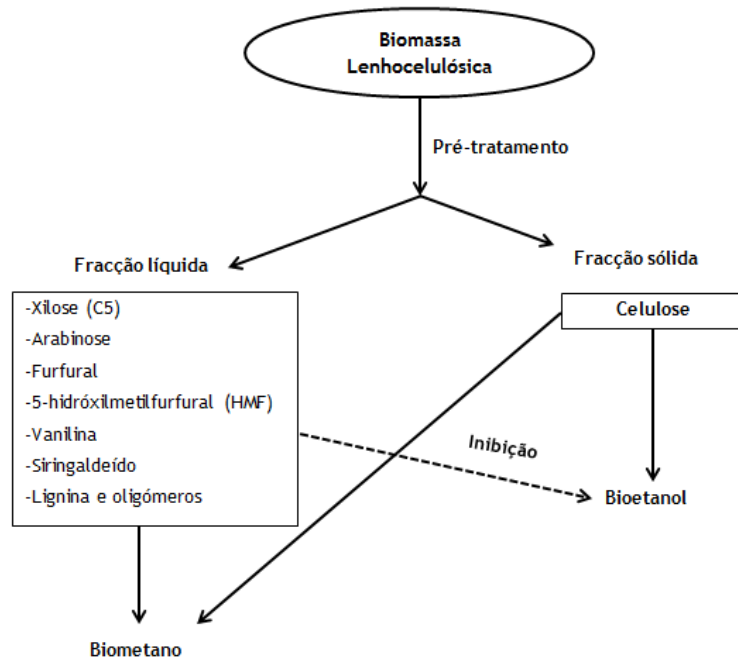


Figura 17 - Esquema de produção de etanol e de metano a partir de compostos lenhocelulósicos (adaptado de Barakat *et al.*, 2012)

Barakat *et al.*, (2012) investigaram a biodegradação anaeróbia em regime mesófilo, de polímeros derivados da lignina (furfural e 5-hidróxilmetilfurfural (HMF)) e dos seus derivados (vanilina e siringaldeído). Efectuaram a digestão anaeróbia, em contínuo, da xylose (1g/L) na presença de furfural, HMF, vanilina e siringaldeído (1g/L). Os autores concluíram que a quantidade final de metano produzido (mL/gSV) foi mais elevada para a mistura de xilose (1g/L) com siringaldeído (1g/L) ou HMF do que para as outras misturas. A vanilina foi convertida a metano em menor percentagem. Ainda no referido trabalho foi efectuada a digestão anaeróbia em contínuo de furfural, HMF, siringaldeído e vanilina numa concentração de 2g/L sem adição de xilose. Geraram-se 105 mL CH₄/g_{vanilina} e 435 mL CH₄/g_{siringaldeído}. À excepção da vanilina, os restantes compostos foram quase totalmente degradados por digestão anaeróbia. No entanto, ao compararem estes resultados com os obtidos na presença de xilose, após 5 dias de fermentação, verificaram que a velocidade da digestão de furfural, HMF, vanilina e siringaldeído era mais lenta. Estes resultados sugerem que a presença de um co-substrato (xilose) facilita a digestão destes subprodutos.

A baixa produção de metano a partir da vanilina comparada aos outros subprodutos pode ser explicada pela rápida conversão da vanilina a um derivado fenol que pode actuar como inibidor da digestão anaeróbia a estas concentrações (Barakat *et al.*, 2012).

Capítulo III - Materiais e Métodos

Neste capítulo apresenta-se a descrição dos materiais e reagentes utilizados, bem como da metodologia experimental seguida.

3.1. Meio de cultura

O meio base contém os nutrientes essenciais para o desenvolvimento de populações anaeróbias mistas. O meio de cultura, constituído pelo meio base e substrato, utilizado no presente trabalho encontra-se descrito por Wiegant and Lettinga., 1985 (Tabela 15). Para neutralizar e tamponizar o meio de cultura utilizou-se um tampão de fosfato constituído por Na_2HPO_4 (3g/L) e NaH_2PO_4 (0,3g/L).

Tabela 15 - Composição do meio de cultura utilizado para o desenvolvimento da biomassa anaeróbia mista (adaptado de Wiegant and Lettinga, 1985, Brás, 2003 e Lopes, 2005).

Componentes	Substância	Concentração
Nutrientes	CaCl_2	0,058 g/L
	KCl	0,025g/L
	NH_4Cl	0,017 g/L
	MgCl_2	0,011 g/L
	NaH_2PO_4	0,037 g/L
	Solução de micronutrientes	1,0 ml/L
Fonte de Carbono	Glucose	1,8 g/L
Tampão fosfato	Na_2HPO_4	3,0 g/L
	NaH_2PO_4	0,3 g/L

A solução de micronutrientes, que é utilizada para a introdução de oligoelementos, continha a composição indicada na Tabela 16.

Tabela 16 - Composição da solução de micronutrientes (adaptado de Wiegant and Lettinga, 1985 e Lopes, 2005)

Compostos	Concentração
H ₃ BO ₃	50 mg/L
FeCl ₂ .4H ₂ O	2000 mg/L
ZnCl ₂ .2H ₂ O	50 mg/L
CuCl ₂ .2H ₂ O	30 mg/L
HCl (37%)	1 mL/L
(NH ₄) ₆ MoO ₇ .4H ₂ O	90 mg/L
NiCl ₂ .6H ₂ O	50 mg/L
Na ₂ SeO ₃ .5H ₂ O	100 mg/L
MnCl ₂ .4H ₂ O	500 mg/L
EDTA	1000 mg/L

Como co-substrato nos ensaios de biodegradação de compostos modelo como a vanilina e o siringaldeído usou-se uma solução de acetato de sódio e glucose (a+g). Para esta solução, adicionou-se num balão volumétrico de 100 mL (NORMAX), 80 mL da solução de glucose (g) 55 g/L e 20 mL da solução de acetato de sódio (a) 55 g/L.

3.2. Substratos utilizados nos ensaios de biodegradação

3.2.1 Siringaldeído

O siringaldeído é um composto orgânico que se encontra espalhado na natureza. Encontra-se na madeira de várias espécies de árvores uma vez que é um monómero resultante da degradação da lignina. Como contém vários grupos funcionais, pode ser classificado como um composto aromático, fenólico ou aldeído. É um sólido incolor solúvel em álcoois e solventes orgânicos polares (Figura 18) (Meyers and Norris, 1967).

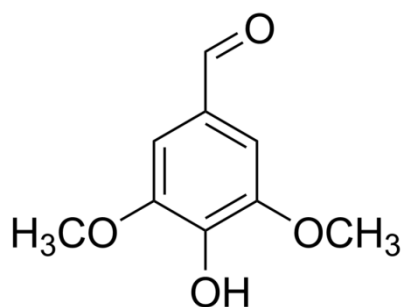


Figura 18 - Estrutura química do siringaldeído (Meyers and Norris, 1967)

Para os ensaios da biodegradação anaeróbia do siringaldeído, foi preparada uma solução de 500 mg/L em meio base.

3.2.2 Vanilina

A vanilina, 4-hidróxi-3-metoxibenzaldeído, tradicionalmente conhecida como aroma de baunilha é um composto cristalino de cor amarela, solúvel em clorofórmio e éter (Figura 19). Apresenta como um dos isômeros a *o*-vanilina muito usada como precursor na produção de fármacos.

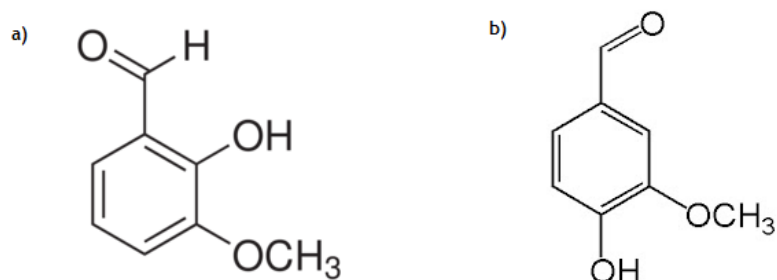


Figura 19 - Estrutura química da *o*-vanilina (a) e vanilina (b) (Walton *et al.*, 2003)

A vanilina é obtida tradicionalmente da vagem de uma orquídea tropical, a *Vanilla planifolia* (Figura 20), fazendo dela a única orquídea de interesse comercial fora do contexto ornamental.



Figura 20 - Orquídea *Vanilla planifolia* (Pacheco & Damásio, 2009)

Ambas as formas de vanilina são aromatizantes, sendo largamente utilizados em alimentos, bebidas, perfumes e fármacos. Existem várias espécies do gênero *Vanilla*, que crescem em locais diferentes e, conseqüentemente produzem aromas que possuem leves variações (Pacheco & Damásio, 2009). Aproximadamente 50% da produção mundial de vanilina sintética são usados como intermediários para a síntese de herbicidas, agentes antiespumantes ou drogas tais como a papaverina, L-dopa, L-metildopa e agentes antimicrobianos (Walton *et al.*, 2003). A vanilina possui propriedades antimicrobianas e antioxidantes. É eficaz contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas que provocam a degradação de alimentos e tem sido eficaz na inibição do desenvolvimento de fungos na fruta (Walton *et al.*, 2003).

A acção antimicrobiana do fenol e dos seus derivados lesam as células microbianas ao alterar a permeabilidade selectiva da membrana citoplasmática, provocando a perda das substâncias intracelulares vitais. Esses compostos também desnaturam proteínas (Walton *et al.*, 2003; Pacheco & Damásio, 2009). As propriedades antioxidantes da vanilina devem-se ao facto de esta interagir com espécies radicais, evitando os processos oxidativos (Angelo & Jorge, 2007). Tais características justificam o amplo uso da vanilina em alimentos na condição de conservantes. Todavia, o efeito antimicrobiano da vanilina bem como de vários outros extractos vegetais ainda não é totalmente compreendido (Pacheco & Damasio, 2009). A reactividade da *o*-vanilina difere da vanilina devido aos impedimentos estereoquímicos relacionados com a posição do grupo -OH no anel aromático e à ligação intramolecular do hidrogénio com o oxigénio do grupo carbonilo do aldeído (ponte de hidrogénio).

Para os ensaios da biodegradação anaeróbia da *o*-vanilina, foi preparada uma solução de 500 mg/L dissolvida em meio base.

3.2.3. Bagaço de azeitona seco e húmido

O processo de extracção de azeite gera uma quantidade de subprodutos sólidos e líquidos que, para serem reaproveitados, terão de estar sujeitos a tratamentos diversos. As azeitonas, cujo bagaço é utilizado neste trabalho, foram colhidas entre 25/11/2011 e 17/12/2011, sendo o azeite extraído a 19/12/2011 num lagar da região da Cova da Beira.

As condições climatéricas observadas em 2011 (temperaturas elevadas no Outono e pouca precipitação) assim como pragas que afectaram as oliveiras provocaram uma maturação mais tardia da azeitona. Estes factores influenciaram, de forma negativa, tanto a quantidade de azeitona colhida como a sua composição traduzindo-se num rendimento de extracção de azeite mais baixo.

Os subprodutos utilizados neste trabalho provêm do sistema de extracção por centrifugação contínua de 3 fases. O bagaço seco foi obtido no final do processo depois da sua separação, por centrifugação, das águas ruças e do azeite e após secagem (Figura 21 a 28). De modo a ser utilizado nos ensaios, o bagaço seco foi fragmentado num almofariz de pedra e peneirado durante uma hora com crivos com abertura de malha (D_i) de 0,25mm a 0,40 mm. Foi recolhido o bagaço seco retido entre estas duas medidas de modo a se obter diâmetros de partícula com características uniformes entre $0,25\text{mm} < D_i < 0,40\text{mm}$. O bagaço seco foi armazenado em sacos de plástico selados de modo a evitar contaminações exteriores.

O bagaço húmido (Figura 27 (c)) foi retirado do processo antes da separação das águas ruças do bagaço e da sua posterior transferência para o secador. Para a sua utilização nos ensaios, o bagaço húmido foi homogeneizado de modo a se obter uma pasta com características uniformes. O bagaço foi armazenado num recipiente de plástico e refrigerado num

refrigerador FOC 2251 a 4°C de modo a evitar evaporação da água remanescente assim como a possível fermentação do bagaço.

Os bagaços foram caracterizados em laboratório, estando as principais características apresentadas na Tabela 17.

Tabela 17 - Valores médios e respectivos desvios padrão do teor de Sólidos totais (ST); sólidos totais voláteis (STV) e teor de proteína no bagaço de azeitona seco e húmido. Os valores entre parênteses correspondem ao número de réplicas (n)

Substrato \ Parâmetros	ST g _{ST} /g _{bagaço}	STV g _{STV} /g _{bagaço}	Cinzas g _{cinzas} /g _{bagaço}	Proteína mg N-NH ₃ /g _{bagaço}
Bagaço de Azeitona Seco	0,9411 ± 0,0004 (2)	0,7552 ± 0,0004 (2)	0,1859 ± 0,0009 (2)	28,6 ± 1,3 (2)
Bagaço de Azeitona Húmido	0,4360 ± 0,0050 (2)	0,4223 ± 0,0068 (2)	0,0137 ± 0,0019 (2)	14,3 ± 0,6 (2)

3.3. Extracção do Azeite

3.3.1. Variedades de azeitona

As azeitonas são fruto de oliveiras da zona sul da Beira Interior e foram colhidas de forma manual. O bagaço utilizado nos ensaios é um subproduto da indústria oleícola, para a produção de azeite, característico de azeitonas das variedades [3]:

- **Verdeal** - Bastante regular e produtiva. Adapta-se bem em solos Alentejanos e noutras regiões de Portugal. Caracteriza-se por um fruto que amadurece tardiamente, utilizado para conserva em verde ou triturado, mas principalmente para a extracção de azeite, com um bom rendimento. O azeite resultante é bastante fino, com um frutado marcante, persistente, com verde de folha e sabor bastante amargo e picante.



- **Cordovil** - Pode ser utilizada para conserva em verde, mas a sua principal utilização é para a extracção de azeite, pois apresenta bons rendimentos. O azeite é muito rico em ácido oleico, é muito fino, com frutado intenso e característico, acentuado verde de folha e medianamente amargo e picante.



- **Galega** - Variedade mais difundida no território português e apresenta aptidão dupla, tanto para conserva como para a elaboração de azeite. O azeite obtido é doce e suave, caracterizando-se ligeiramente frutado com aroma acentuado de maçã. Quando as azeitonas são apanhadas mais



verdes, o azeite resultante é amargo e picante.

3.3.2. Descrição do processo produtivo

Uma vez que a qualidade do azeite, assim como as características dos resíduos provenientes da extração do azeite dependem da variedade da azeitona, condições climáticas, método de colheita da azeitona e método de extração de azeite, descreve-se no presente trabalho o método de extração de azeite e separação dos respectivos resíduos.

O azeite, a partir do qual o bagaço obtido é um subproduto, foi extraído através de um sistema de extração contínuo de três fases (Figura 21), envolvendo as seguintes etapas:



Figura 21 - Esquema do sistema de extração contínuo de três fases (adaptado de Aires, 2007)

- *Recepção, Limpeza e Lavagem da azeitona* - A recepção da azeitona faz-se no pátio de recepção onde esta é descarregada em tegões de aço inoxidável (Figura 22).



Figura 22 - Tegão de recepção onde é descarregada a azeitona à entrada do lagar

A azeitona é encaminhada por tapetes transportadores até à limpadora onde são retirados, entre outros, folhas, ramos, pedras e areia (Figura 23).



Figura 23 - Limpadora da azeitona. a) Fracção de azeitona limpa, lavada e pesada. b) Tapete transportador. c) Depósito, no exterior do lagar, de folhas, ramos e pedras

Nesta etapa de limpeza e lavagem, as folhas e os restantes resíduos são separados para um lado e a azeitona limpa para outro, onde é pesada e transportada para os tegões de armazenamento. O tempo de chegada até ser moída não deve ultrapassar as 12 horas de modo a evitar fermentações indesejáveis (Aires, 2007).

- **Moenda**- O primeiro passo da extracção do azeite é a moenda das azeitonas para produzir pasta de azeitona, através de diferentes tipos de prensas. A moenda é feita por moinhos de martelos, e consiste na trituração da azeitona até formar uma pasta (Figura 24).

Uma vez que este procedimento influencia bastante a qualidade, durante a moenda é de primordial importância (Aires, 2007):

- o uso de crivos adequados conforme o estado de maturação das azeitonas;
- moenda realizada de maneira a obter uniformidade relativamente ao grau de moenda desejado;
- tempo reduzido de contacto da massa de azeitona com o ar;
- redução da superfície livre de massa, diminuindo assim as perdas de aroma do azeite.

Este grau de trituração ou moagem é ajustado consoante o estado de maturação da azeitona, para uma melhor extracção do azeite [4].



Figura 24 - Moinho e termobatedeira vista lateral (a) e frontal (b)

Num estudo de Angerosa e Di Giacinto (1995) e de Luaces *et al.*, (2005, 2006), citados por Custódio (2009), concluiu-se que o sistema da moenda influencia a qualidade do azeite e que a temperatura da azeitona durante a moenda é o principal factor responsável pela quantidade de compostos voláteis e pigmentos do azeite virgem, estando relacionada com a actividade do sistema enzimático.

- **Termobatedura** - A termobatedura consiste num batimento lento e contínuo da massa da azeitona resultante da moenda (Figura 25). Esta massa de azeitona é batida e aquecida simultaneamente numa termobatedeira durante cerca de 45 minutos a uma temperatura inferior a 30 °C [4].

O aumento da temperatura da pasta de azeitona reduz a sua viscosidade. A redução da viscosidade facilita a separação e obtêm-se rendimentos de extracção mais elevados, mas a qualidade do azeite diminui. Estudos de Morales e Aparicio (1999) e de Ranalli *et al.* (2001), citados por Custódio (2009), mostram que realizar a termobatedura a 30°C permite obter o aroma «verde» agradável e rendimentos de extracção satisfatórios, mas a 35°C a qualidade e o número de defeitos aumenta e o rendimento de extracção não aumenta substancialmente. Pretende-se, na termobatedura, formar uma fase oleosa contínua através do aquecimento e movimento lento de pás sobre a pasta de azeitona. Desta forma, a emulsão água/azeite é destruída, como também se facilita a união de pequenas gotas de azeite em gotas de diâmetro superior [5].

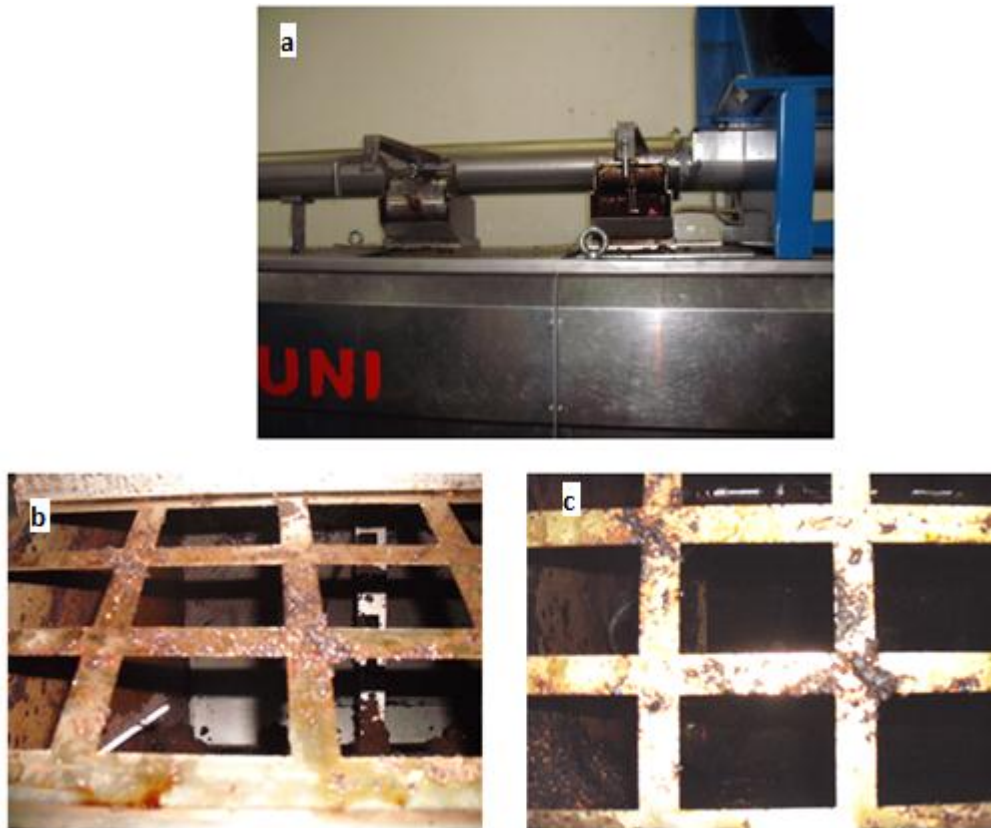


Figura 25 - Termobatedeira. a) Entrada de depósito; b) e c) Depósito de pasta munido de pás

- **Separação sólido-líquido** - Nos lagares com sistema contínuo por centrifugação, a separação da fase sólida da fase líquida ocorre por acção da força centrífuga, que acentua a diferença entre os pesos específicos dos líquidos imiscíveis e do material sólido. Neste processo utiliza-se uma centrífuga horizontal chamada *decanter* (Figura 26).



Figura 26 - Centrífuga horizontal (decanter)

Os *decanter*s são constituídos por um tambor cilindro-cónico que tem no seu interior um parafuso sem-fim. É devido a uma pequena diferença de velocidade do tambor e do parafuso

interior (mais rápido), que o bagaço húmido é arrastado para uma das extremidades e o azeite, ainda misturado com alguma água residual, é arrastado para o lado oposto (Aires, 2007).

Após a moenda e a termobatedura, a massa de azeitona é submetida a uma centrifugação a alta velocidade numa centrífuga horizontal. A separação entre a fase sólida e a líquida, por centrifugação, é facilitada pela adição de água morna com o intuito de tornar a massa mais fluida.

Os bagaços húmidos são encaminhados através de sem-fins ao descaroador, máquina que separa o caroço partido da azeitona (que serve de combustível para a secagem do bagaço e aquecimento das caldeiras (Figura 27)), das águas ruças.



Figura 27 - a) Etapa de descarga e separação de resíduos (bagaço húmido); b) Separação de águas-ruças; c) Descarga de bagaço húmido

A polpa húmida entra no secador de bagaços onde, através de calor, é evaporada para a atmosfera (Figura 28).

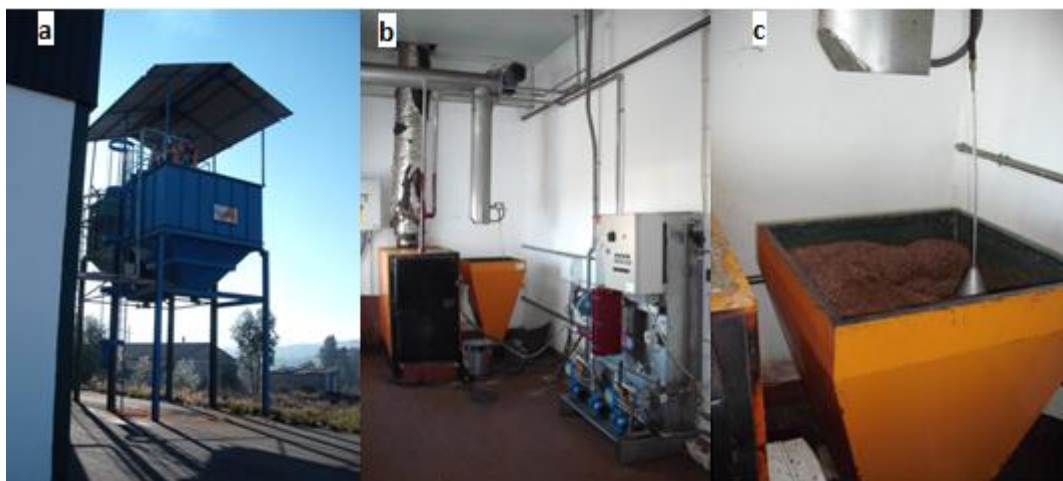


Figura 28 - a) Depósito de descarga no exterior do bagaço seco; b) caldeira de aquecimento que utiliza o bagaço seco como combustível; c) depósito da caldeira cheia de bagaço seco

- *Separação líquido-líquido* - Após a separação do bagaço e das águas ruças, a fase líquida, é encaminhada para uma centrífuga vertical onde se faz a separação do azeite e da água residual (Figura 29).



Figura 29 - Centrífuga Vertical

O azeite é armazenado em depósitos de aço inoxidável em ambiente inerte e com pouca luminosidade (Figura 30). O ideal é que as paredes e tectos protejam o azeite de temperaturas elevadas e que não deixem passar odores estranhos. A temperatura ideal de armazenamento é entre os 15 e os 18°C para permitir uma correcta maturação dos azeites sem favorecer a sua oxidação (Custódio, 2009).



Figura 30 - Depósitos de azeite de aço inoxidável

3.4. Inóculo

Os inóculos (lamas mistas) usados nos ensaios anaeróbios, foram desenvolvidos em reactores descontínuos sem agitação, em condições mesófilas ($37 \pm 2^\circ\text{C}$) e termófilas ($50 \pm 2^\circ\text{C}$). Foram alimentados, por substituição do sobrenadante por alimentação fresca, de forma descontínua em intervalos de 48h.

A caracterização e quantificação da biomassa nos reactores foi realizada através da determinação dos Sólidos Suspensos (SS) e Sólidos Suspensos Voláteis (SSV). Admite-se para este efeito que a concentração dos SSV é proporcional à concentração de células no inóculo.

3.5. Parâmetros Analisados

3.5.1. Absorvância

A absorvância foi medida após todas as recolhas efectuadas, através de um espectrofotómetro UV-Visível Evolution 260 BIO. As amostras foram diluídas de 1:10 para se efectuarem as leituras UV-Visível.

3.5.2. Carência Química de Oxigénio (CQO)

A determinação da carência química de oxigénio (CQO) foi realizada segundo o Standard Methods (APHA, AWWA 2005).

A CQO é usada para quantificar a matéria orgânica, contida numa amostra, susceptível de ser oxidada por um oxidante forte. O método seguido na determinação de CQO baseia-se na oxidação da amostra, em refluxo fechado, por um excesso conhecido de dicromato de potássio numa solução de ácido sulfúrico concentrado/sulfato de prata, durante 2 horas, à

temperatura de refluxo do ácido ($148 \pm 2^\circ\text{C}$). Nestas condições a oxidação da matéria orgânica a CO_2 e H_2O é acompanhada da redução de uma quantidade equivalente de dicromato hexavalente (cor amarela) a crómio trivalente (cor verde).

Depois da oxidação, é titulado o dicromato que não reagiu e os equivalentes de oxidante consumidos durante a reacção são convertidos em mg CQO por litro de amostra.

3.5.3. pH

O pH foi medido durante os ensaios num equipamento 744 pH Meter da Methrom. O pH é um dos parâmetros mais importantes a considerar durante os ensaios de biodegradação anaeróbia. No presente estudo a existência de alcalinidade nos frascos de reacção, dentro dos valores considerados óptimos para a biodegradação anaeróbia, é um factor importante a ser controlado de modo a evitar um aumento na concentração de ácidos orgânicos voláteis, que podem provocar uma descida no valor de pH, e consequente inibição do processo (Dublein & Steinhäuser, 2008).

O hidrogenofosfato de sódio (Na_2HPO_4) e o dihidrogenofosfato de sódio (NaH_2PO_4) foram os reagentes utilizados, quando necessário, para manipular a alcalinidade, mantendo o pH no intervalo de 7,0 - 8,0.

3.5.4. Biogás

Antes de cada recolha, a quantidade de biogás produzido foi medido através de uma Seringa Hipodérmica Intermutável (NORMAX PORTUGAL) de 20 mL.

3.5.5. Sólidos

A quantificação de Sólidos Suspensos Totais (SST), Sólidos Suspensos Voláteis (SSV), Sólidos Totais (ST) e Sólidos Voláteis Totais (SVT) foi realizada segundo o Standard Methods (APHA, AWWA 2005).

Os SST foram determinados por filtração a vácuo de um volume conhecido de amostra, utilizando membranas Whatmann GF/C de $1,2 \mu\text{m}$ de porosidade, e posterior secagem da fracção sólida retida na membrana em estufa Bindman a $105 \pm 2^\circ\text{C}$ durante 24h. Depois de seca, a fracção sólida retida na membrana foi pesada numa balança Mettler Toledo AB204-S. O peso destes sólidos retidos na membrana, após estufa indica a quantidade de SST.

Para determinação dos SSV, depois de secas a 105°C e pesadas, as fracções sólidas retidas nas membranas foram calcinados numa mufla Nabertherm L9/12/B170 a 500°C durante doze horas. Após arrefecimento, foram novamente pesadas numa balança Mettler Toledo AB204-S.

A diferença de peso verificado entre a fracção sólida retida na membrana depois da estufa e a fracção sólida retida na membrana depois de calcinada indica a quantidade de SSV.

Para determinar os ST e os SVT em substratos sólidos com a finalidade de caracterizar os bagaços de azeitona, o procedimento foi essencialmente o mesmo com a diferença de que não houve filtração de volume conhecido, sendo inicialmente pesada uma massa conhecida de amostra. À excepção deste passo, repetiu-se o restante procedimento para a cálculo de SST e SSV.

3.5.6. Teor de Proteína

O teor de proteína foi calculado a partir da determinação do azoto de Kjeldahl. Para se obter o teor de proteína, multiplica-se o azoto de Kjeldahl por um factor, k_p , o qual varia em função do tipo de proteína. Para o bagaço de azeitona utilizou-se um factor de Kjeldahl (k_p) de 6,25 g-proteína/g-N-NH₃ (Briggs, 1998 e citado por Tomé, 2009).

3.5.6.1. Azoto de Kjeldahl

O procedimento seguido para a determinação do azoto total de Kjeldahl foi o indicado no Standard Methods, 2005 (APHA,AWWA 2005).

O método de Kjeldahl é uma técnica analítica utilizada para avaliar o azoto presente na forma trivalente negativa em substâncias orgânicas. Através desta técnica é avaliado o azoto presente na amostra na forma orgânica (proteínas, aminoácidos, péptidos, ácidos nucleicos, ureia e outros materiais orgânicos sintéticos) e de NH₃. O azoto presente em ligações do tipo N-N e N-O (como por exemplo, azidas, nitratos, nitritos, outros grupos azotados), não é quantificado através do método de Kjeldahl.

O método de Kjeldahl envolve a mineralização, destilação e titulação de uma amostra. A mineralização consiste na digestão da amostra a quente, em meio ácido (H₂SO₄ concentrado) e na presença de um catalisador (mercúrio, cobre ou selénio), durante a qual ocorre a transformação do azoto orgânico e do azoto amoniacal em NH₃, o qual reage com o H₂SO₄ originando, entre outros compostos, sulfato de amónio (NH₄)₂SO₄ [6].

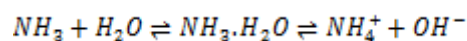
A destilação tem por objectivo promover a libertação do NH₃ presente no (NH₄)₂SO₄. A libertação do NH₃ ocorre pela alcalinização do meio através da adição de uma base forte (hidróxido de sódio/tiosulfato de sódio), sendo depois fixado numa solução de ácido bórico e indicadores. A concentração da amónia é então determinada por titulação com ácido sulfúrico, de um modo indirecto, pois na prática o ácido mede a quantidade de ião borato presente na solução.

3.5.7. Azoto Amoniacal (N – NH₄⁺)

O procedimento seguido para a determinação do azoto amoniacal foi o indicado no Standard Methods, 2005 (APHA,AWWA 2005).

Segundo Raij (1991) e citado por Santos (2007), uma pequena parte de azoto presente no solo, designado azoto inorgânico, encontra-se nas formas amoniacal (NH₄⁺), nítrica (NO₃⁻) e nitrosa (NO₂⁻). O amoníaco e os nitratos são as formas mais importantes de azoto inorgânico.

O amoníaco é muito solúvel em água e reage com ela para formar o ião amónio, NH₄⁺, num equilíbrio que se desloca para a esquerda a pH elevado (Peixoto, 2008):



Antes da destilação, e de forma a libertar o NH₃, alcaliniza-se o meio através da adição de uma base forte de modo a elevar o pH da solução.

3.5.8. Lignina

O método aplicado para a determinação da lignina divide-se em duas etapas de hidrólise ácida cujo objectivo é o de separar a amostra, em compostos que sejam quantificados de forma mais simples. A lignina é separada em compostos que são solúveis e insolúveis em ácidos. Os compostos insolúveis em ácido (lignina insolúvel) podem incluir proteínas e cinzas, pelo que estes compostos devem ser considerados durante a análise gravimétrica. A lignina solúvel é determinada por espectroscopia UV-Visível. Durante a hidrólise, os hidratos de carbono poliméricos são hidrolisados em formas monoméricas solúveis na fracção líquida (Sluiter *et al.*, 2008).

A lignina solúvel foi medida a 280 nm por espectroscopia UV-Visível através de um espectrofotómetro Evolution 260 BIO.

Para a determinação da lignina solúvel e lignina precipitada em meio ácido (insolúvel), utilizou-se o método descrito por Sluiter *et al.*, 2008 e esquematizado na Figura 31.

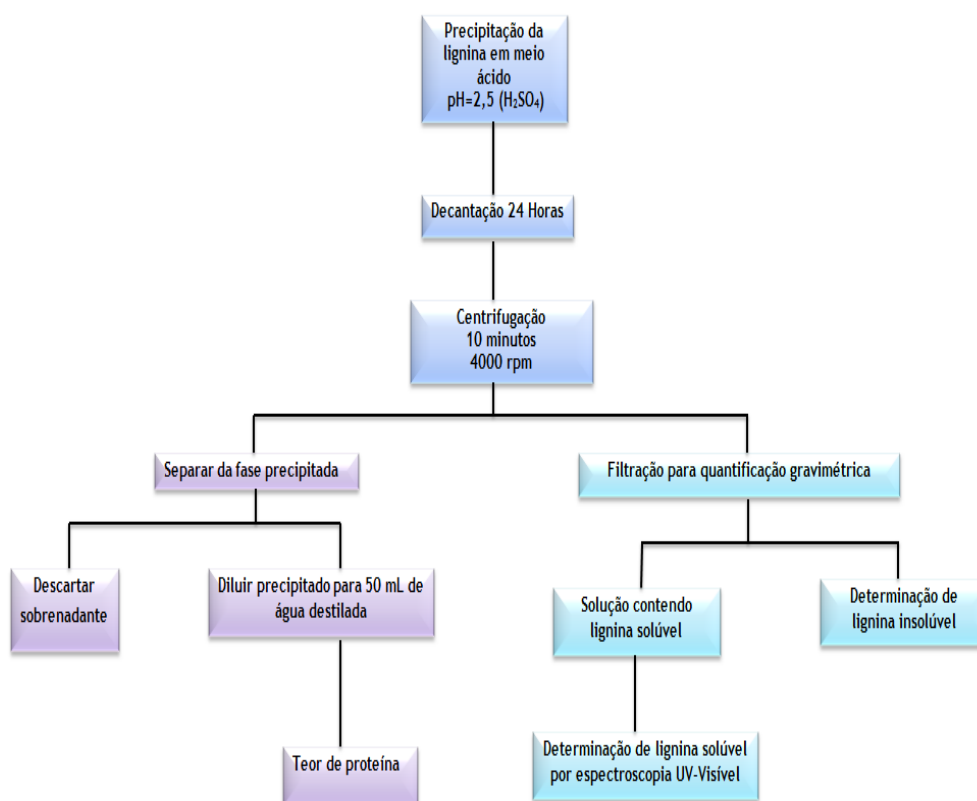


Figura 31 - Fluxograma do procedimento adoptado para determinação da lignina (adaptado de Oliveira, 2011)

3.5.9. Compostos Fenólicos Totais

O conteúdo em compostos fenólicos totais foi determinado segundo o método de Folin-Ciocalteu, tendo como base o uso do reagente de Folin-Ciocalteu (FC) e de ácido gálico como substância de referência. O método consiste numa reacção de redução do reagente pelos compostos fenólicos da amostra que na presença de carbonato de sódio, produzem uma apreciável concentração de iões fenolato. Estes iões fenolato reduzem o reagente FC (cor amarela) a uma solução azul que depois é analisada por espectrofotometria (Cicco & Lattanzio, 2011). Este reagente é uma mistura dos ácidos fosfomolibdico ($H_3PMo_{12}O_{40}$) e fosfotúngstico ($H_3W_{12}O_{40}$) que ao oxidar os fenóis, é reduzida a uma mistura de óxidos azuis de tungsténio (W_8O_{23}) e de molibdénio (Mo_8O_{23}) de coloração azul. Esta solução azul tem o máximo de absorção próximo de 750 nm (apesar de na generalidade se considerar o máximo de absorção a 750 nm, neste trabalho e de acordo com vários autores (Waterhouse, 2002; Remóne et al., 2009), mediu-se a absorvância a um comprimento de onda de 765 nm) e é proporcional ao teor de compostos fenólicos (Jornal da Comissão Europeia, 2010).

Devido à complexidade e competitividade das reacções envolvidas no método de Folin-Ciocalteu, a reacção de equilíbrio é muito instável e não é fácil encontrar as condições exactas para o ensaio (Cicco & Lattanzio, 2011). A falta de selectividade do reagente de

Folin-Ciocalteu para os grupos fenólicos permite a ocorrência de interferências por parte de outras substâncias redutoras presentes na amostra, tais como aminas alifáticas terciárias, dióxido de enxofre, alguns aminoácidos, Fe (II), ácido ascórbico e açúcares redutores que podem provocar uma leitura excessiva do conteúdo fenólico existente na amostra (Magalhães *et al.*, 2007; Remóne *et al.*, 2009). Uma vez que o ensaio revela a presença de várias substâncias diferentes, de modo a minimizar as interferências, utiliza-se um padrão de referência e o resultado do teste deve ser quantificado em termos de equivalentes de concentração do padrão. É frequentemente utilizado o ácido gálico como padrão de referência, porque é um reagente relativamente barato e estável na forma pura. Contudo, quando em solução, o ácido gálico oxida rapidamente, pelo que deve ser armazenado em frascos completamente cheios, devidamente selados e refrigerados. O tempo de armazenamento da solução não deve exceder duas semanas (Waterhouse, 2002).

Além das interferências referidas acima, segundo Cicco & Lattanzio (2011), sob determinadas condições pode ainda ocorrer a formação de precipitados, o que limita a aplicação do método. No entanto, a adição de sulfato de lítio previne a precipitação de sais complexos de sódio (Agostini-Costa *et al.*, 1999).

Segundo Cicco *et al.*, (2009), o máximo de absorção do espectro depende do pH da solução e da concentração de compostos fenólicos existentes na solução. Estes autores consideram que o método de Folin-Ciocalteu é uma técnica generalista porque alguns dos parâmetros mais específicos do método (quantidade de reagente Folin-Ciocalteu utilizado, concentração de carbonato de sódio, a sequência pela qual os reagentes são adicionados, comprimento de onda, padrão utilizado, tempo de adição dos reagentes e tempo e temperatura de incubação da amostra), podem ser adaptados consoante a natureza da amostra em estudo. Apesar dos parâmetros poderem ser adaptados, é necessário ter especial atenção ao tempo de reacção e à temperatura de ensaio porque, a reacção de oxidação provocada pelo reagente de Folin-Ciocalteu é lenta e o produto corado formado é instável. Como a medição é baseada na cinética do processo, o tempo de leitura colorimétrico, assim como a temperatura do ensaio afectam a extensão da reacção. A temperatura elevada, o produto azul tem um tempo de vida curto, pelo que é aconselhável trabalhar a temperatura ambiente (Waterhouse, 2002)

O conteúdo em fenóis totais foi padronizado para a concentração de ácido gálico através da determinação de uma recta de calibração para este mesmo composto, e os resultados expressos em mg de equivalentes de ácido gálico (*GAE - gallic acid equivalents*) (Pimpão, 2009).

Para a determinação da recta de calibração (Figura 32) pipetou-se 0, 5, 10, 20, 40, 60, 80 e 100 µL da solução de ácido gálico (5g/L) diferentes balões de 10 mL, perfazendo-se o volume final com água destilada. De cada solução pipetaram-se 400 µL e adicionaram-se 2000 µL de

reagente de Folin-Ciocalteu (1:10). Ao fim de 8 minutos adicionaram-se 1600 μL de carbonato de sódio 7,5%. Os tubos foram agitados e de seguida incubados, à temperatura ambiente, durante 90 minutos, até a solução adquirir uma cor azul. Leu-se a absorvância a 765nm num espectrofotómetro Evolution 260 BIO, considerando que o branco da solução contém 0 μL de ácido gálico, e obtendo-se a curva de calibração com a seguinte equação:

$$\lambda = 765 \text{ nm}$$

$$Abs = 11,101 \times C - 0,0119 \quad R^2 = 0,9968$$

Onde:

$Abs(\lambda_{765 \text{ nm}})$ – Absorvância ao comprimento de onda de 765 nm

C – Concentração fenóis (mgGAE /L)

R^2 – Coeficiente de determinação

Os valores representados indicam a média de quatro determinações experimentais e respectivos desvios padrão (Figura 32).

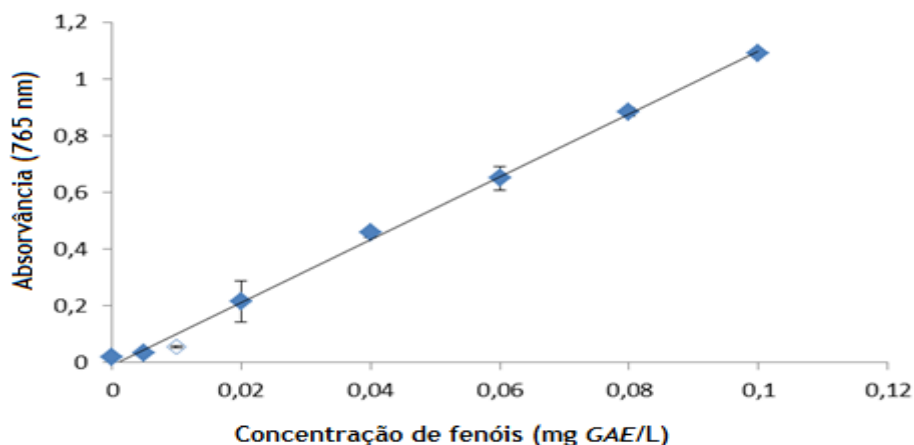


Figura 32 - Curva de calibração e respectivos desvios padrão obtidos pelo método de Folin-Ciocalteu para quantificação de fenóis. O ponto sem preenchimento não foi considerado para o cálculo da curva de calibração

Para a análise das amostras seguiu-se o método resumido na Figura 33. Como branco do método utilizou-se, como amostra, água destilada.

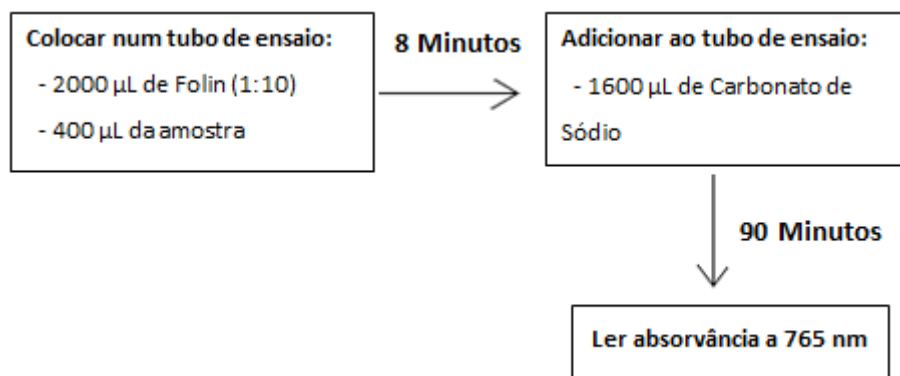


Figura 33 - Apresentação esquemática geral do método utilizado para a análise de fenóis através do método de Folin- Ciocalteau.

Para quantificação dos fenóis nas amostras recolhidas nos ensaios de lixiviação dos bagaços de azeitona, efectuou-se uma diluição de 1:4.

3.6 - Metodologia Experimental

Os ensaios de biodegradação (Figura 34) foram utilizados com o intuito de quantificar tanto a biodegradabilidade do substrato, como o potencial de produção do biogás produzido pela conversão anaeróbia de substrato orgânico, em regime mesófilo ($37 \pm 2^\circ\text{C}$) e termófilo ($50^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$), durante um intervalo de tempo definido.

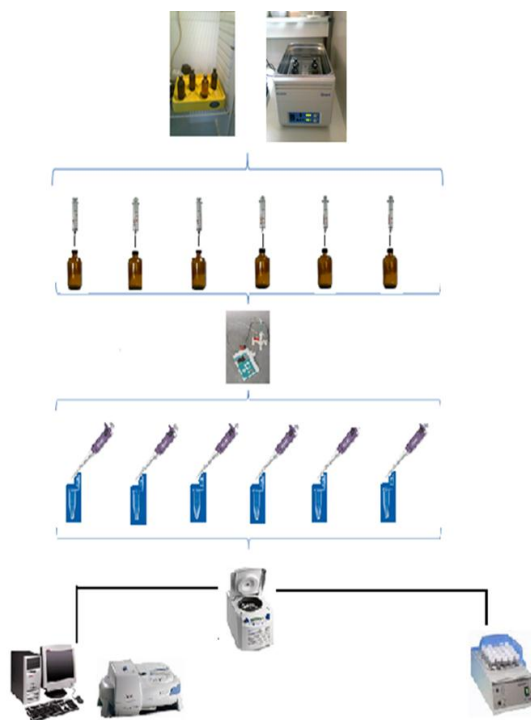


Figura 34 - Representação esquemática do método dos ensaios de biodegradação anaeróbia

Para o estudo, a biomassa usada como inóculo foi previamente lavada duas vezes com solução tampão de fosfato (Na_2HPO_4 (3g/L) e NaH_2PO_4 (0,3g/L)), para remoção do substrato residual. A lavagem foi efectuada à temperatura de incubação das culturas. Entre cada lavagem deixou-se decantar o meio, separou-se o sobrenadante que era descartado e a seguir adicionou-se novo volume de solução tampão.

3.6.1. Biodegradação anaeróbia de compostos aromáticos derivados de lignina

Os ensaios em regime termófilo de biodegradação anaeróbia do siringaldeído e da *o*-vanilina consistiram basicamente na incubação em descontínuo, das soluções com biomassa anaeróbia termófila, em frascos Amber Screw cap bottles da SUPELCO, de 100 ml de capacidade, agitados a 50 rpm e aclimatizados a $50 \pm 3^\circ\text{C}$ num banho OLS 200 Grant.

Foi preparada uma solução de 500 mg/L de siringaldeído (Syr) ou *o*-vanilina (Van) em meio base e uma solução de acetato de sódio + glucose em meio base, conforme descrita na secção 3.1.

Os ensaios foram preparados em frascos de incubação Amber Screw cap bottles da SUPELCO. Após a adição da mistura reaccional (solução e inóculo) os frascos foram de seguida fechados agitados e incubados no banho OLS 200 GRANT 200 a $50 \pm 3^\circ\text{C}$ e a 50 rpm.

As soluções, depois de devidamente aclimatizadas, foram adicionadas aos frascos de incubação nas composições indicadas (totalizando um volume de solução de 58 mL):

A - Ensaio com o siringaldeído (Syr):

- 55 mL da solução de 500 mg/L Syr, 3 mL de meio base
- 55 mL da solução de 500 mg/L Syr, 3 mL da solução (a+g)

B - Ensaio com a *o*-vanilina (Van):

- 55 mL da solução de 500 mg/L Van, 2,5 mL de meio base, 0,5 mL da solução (a+g)
- 55 mL da solução de 500 mg/L Van, 2 mL de meio base, 1 mL da solução (a+g)
- 55 mL da solução de 500 mg/L Van, 3 mL da solução (a+g)

Ensaio controlo (a+g):

- 3 mL da solução de acetato de sódio + glucose (a+g)

Cada frasco foi incubado com 10 mL de biomassa termófila de modo a obter-se um teor de SSV entre 0,5 e 2 $\text{g}_{\text{SSV}}/\text{L}$. Agitou-se a mistura reaccional e mediu-se o pH. De seguida foi retirada uma amostra de modo a determinar as condições iniciais do ensaio. O procedimento

experimental seguido está resumido na Figura 35. Antes da recolha da amostra procedeu-se à medição do biogás formado.

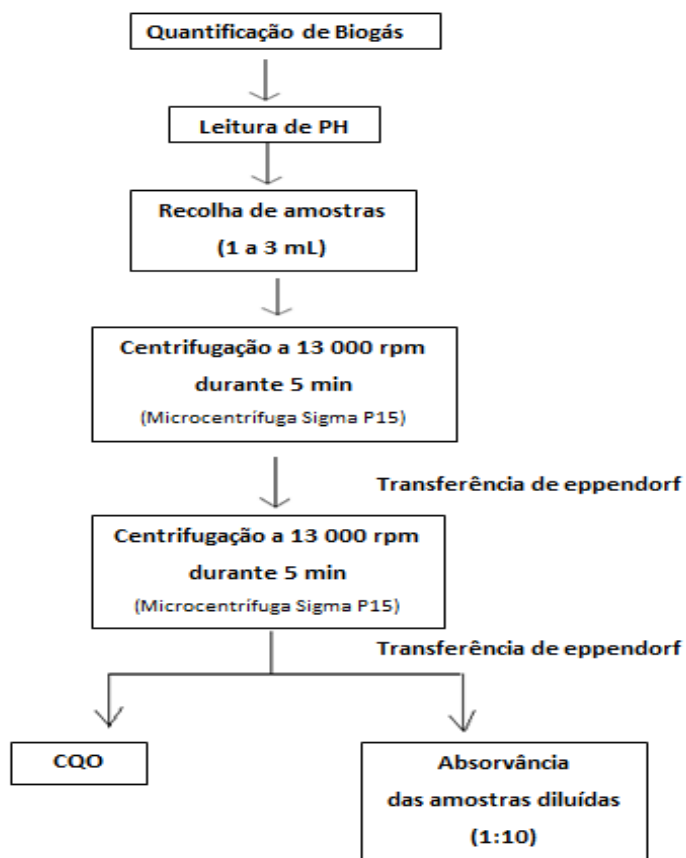


Figura 35 - Representação esquemática do método utilizado para o tratamento das amostras recolhidas ao longo do ensaio

Os ensaios relativos ao siringaldeído decorreram durante 95 dias, tendo sido recolhidas amostras ao fim de 0, 1, 6, 8, 12, 14, 18, 26, 28, 31, 35, 39, 52, 60, 68, 75, 88, 94 e 95 dias.

Os ensaios relativos à *o*-vanilina decorreram durante 120 dias, tendo sido recolhidas amostras ao fim de 0, 1, 6, 8, 12, 19, 28, 30, 33, 37, 41, 54, 62, 70, 71 e 90, 107 e 120 dias. Repetiu-se o ensaio relativo à biodegradação anaeróbia em regime termófilo da *o*-vanilina, tendo-se procedido exactamente como ilustrado na Figura 35 com excepção das condições de centrifugação da última amostra (20 minutos a 4000 rpm numa centrífuga Eppendorf 5702 RH). Estes ensaios decorreram durante 56 dias, tendo sido recolhidas amostras ao fim de 0, 6, 21, 26, 43 e 56 dias.

Para se quantificar o teor de siringaldeído por espectrofotometria de UV-Visível, traçou-se uma curva de calibração ao comprimento de onda de 248 nm e outro de 364 nm. Seleccionaram-se estes comprimentos de onda, a partir do espectro obtido para uma solução de 30 mg/L e de 50 mg/L de siringaldeído (Figura 36).

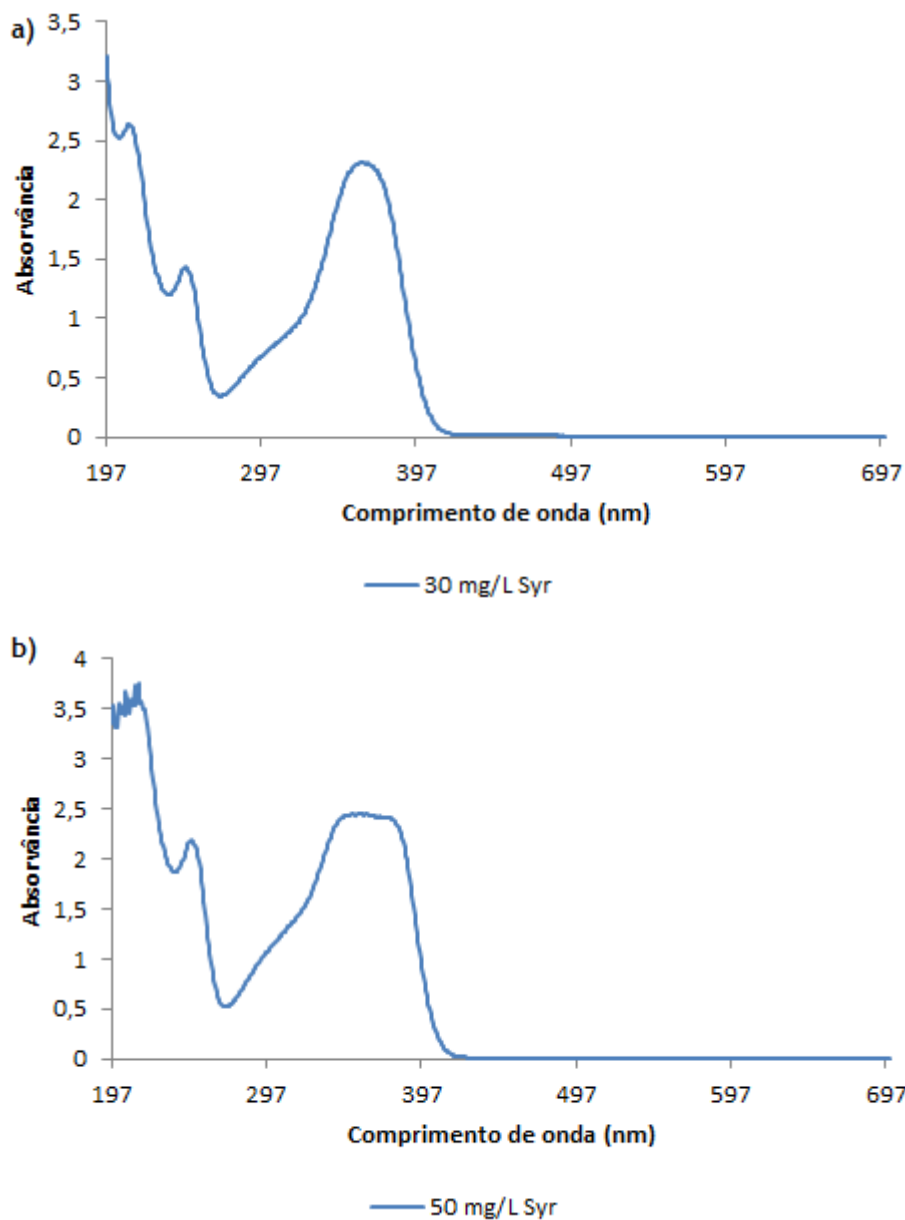


Figura 36 - Espectro do siringaldeído para uma concentração de (a) 30 mg/L e (b) 50 mg/L

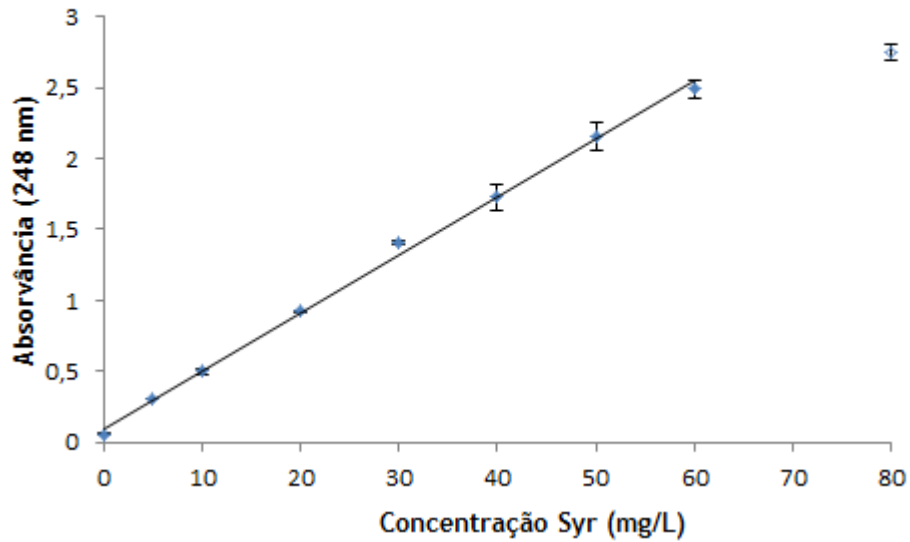
Para se efectuar a curva de calibração (Figura 37), preparou-se em meio base, uma solução mãe de siringaldeído 100 mg/L. Foram feitas diluições, em quadruplicado, a partir da solução mãe de 0, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60 e 80 mg/L. Leu-se a absorbância de cada amostra a 248 nm e a 364 nm, considerando que o branco da solução contém 0 mL de siringaldeído.

Procedeu-se ao cálculo da média e respectivo desvio padrão dos diferentes valores obtidos para cada concentração e obtiveram-se as curvas de calibração com as seguintes equações:

a) $\lambda = 248 \text{ nm}$

$$Abs = 0,0408 \times C_s + 0,0982$$

$$R^2 = 0,9978$$



b) $\lambda = 364 \text{ nm}$

$$Abs = 0,0757 \times C_s + 0,1022$$

$$R^2 = 0,9895$$

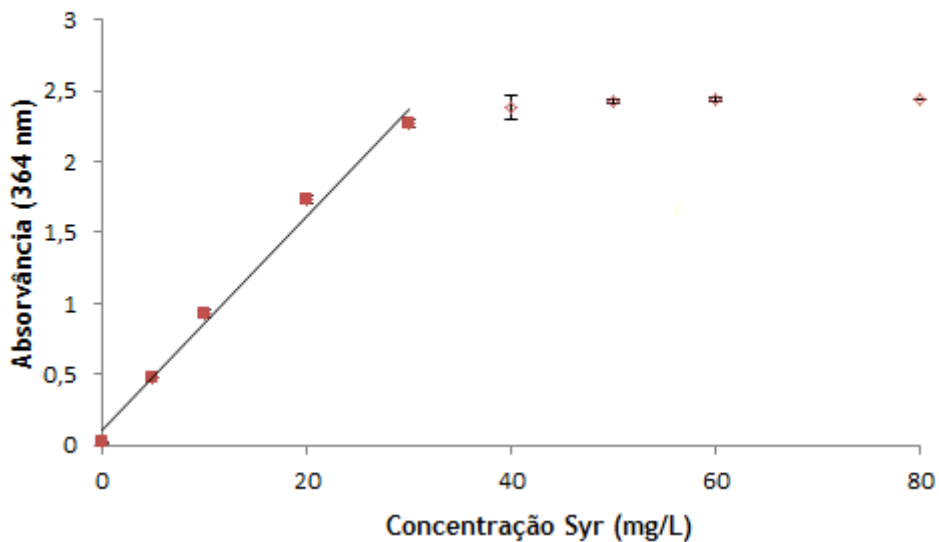


Figura 37 - Curvas de calibração e respectivos desvios padrão obtidos para o siringaldeído a: (a) 248 nm e (b) 364 nm. Os pontos sem preenchimento não foram considerados para o cálculo das curvas de calibração

3.6.2. Biodegradação de bagaço de azeitona

Para completar a informação sobre as características das amostras que são retiradas durante o decorrer dos ensaios de biodegradação com bagaços de azeitona, efectuaram-se ensaios de lixiviação.

3.6.2.1. Lixiviação do bagaço de azeitona seco e húmido a $T = 37 \pm 2^\circ\text{C}$ e $T = 50 \pm 2^\circ\text{C}$

Para os ensaios de lixiviação mesófila e termófila de bagaço de azeitona seco e húmido colocou-se em cada frasco de incubação, providos de um agitador magnético, 60 ml de meio base preparado com solução tampão fosfato ($3\text{g/L Na}_2\text{HPO}_4 + 0,3\text{ g/L NaH}_2\text{PO}_4$) e bagaço húmido (0,5 a 1g) ou bagaço seco (1 a 5g). Os frascos foram fechados, colocados sobre uma placa de agitação e aclimatizados numa estufa de incubação termostaticada FOC 225 a $37 \pm 3^\circ\text{C}$ ou a $50 \pm 2^\circ\text{C}$ num agitador orbital Aralab Agitorb 200, a 150 rpm.

Os ensaios decorreram durante 16 dias, tendo sido recolhidas amostras ao fim de 2, 66 e 186 minutos e de 1, 2, 6 e 16 dias. Antes de cada recolha foi lido o pH e de seguida procedeu-se conforme ilustrado na Figura 38.

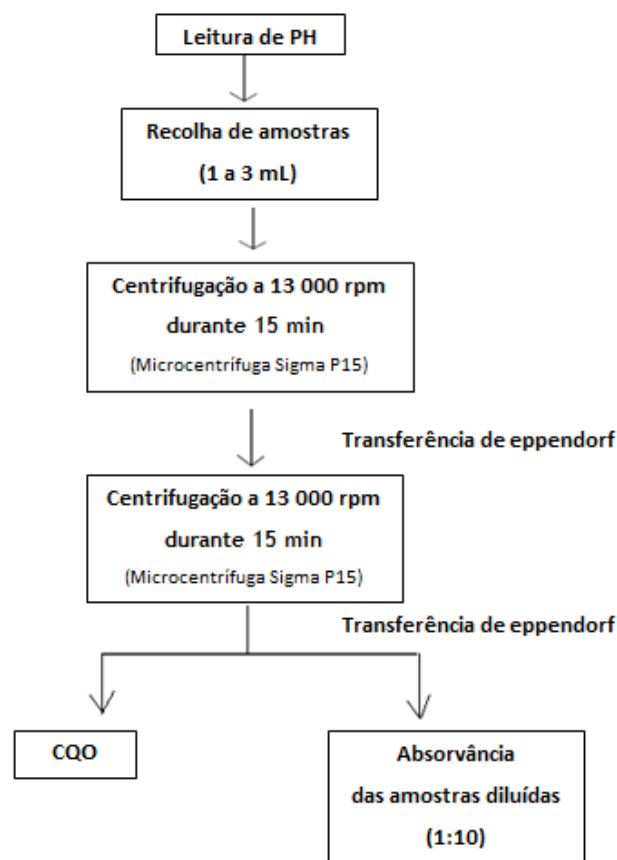


Figura 38 - Representação esquemática do método utilizado para o tratamento das amostras recolhidas ao longo do ensaio de lixiviação

As amostras recolhidas no final do ensaio foram usadas para a determinação de sólidos, CQO, lignina, fenóis, azoto amoniacal, proteína e espectrofotometria de UV-visível. O procedimento utilizado no final do ensaio está resumido na Figura 39.

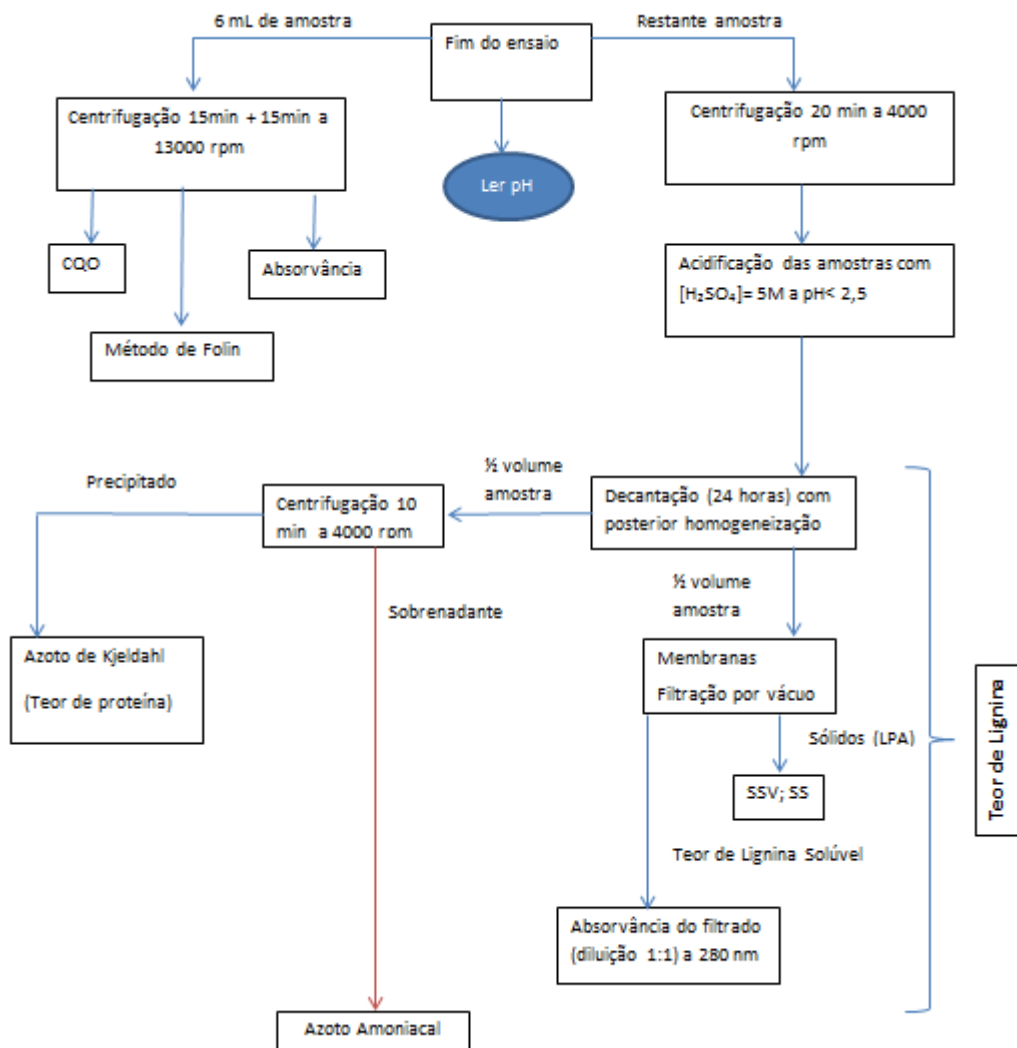


Figura 39 - Representação esquemática do método utilizado no final do ensaio

3.6.2.2. Biodegradação anaeróbia mesófila

Os ensaios de biodegradação anaeróbia de bagaço de azeitona foram realizados em quadruplicado. No início do ensaio, colocou-se em cada frasco de incubação 50 ml meio base preparado com solução tampão fosfato, previamente aclimatizado, 10 mL de biomassa previamente lavada e sedimentada e 5g bagaço de azeitona seco cuja granulometria se encontra entre 0,25 D_{50} 40 mm ou 1g de bagaço húmido. Todos os frascos, antes da adição da biomassa, foram borbulhados com azoto durante 5 minutos.

À excepção das últimas duas recolhas, para a análise das amostras recolhidas ao longo do ensaio, seguiu-se a metodologia indicada na Figura 40. As duas últimas amostras recolhidas para o bagaço seco foram centrifugadas durante 20 minutos a 4000 rpm numa centrífuga

eppendorf 5702RH, transferindo-se o sobrenadante para eppendorfs limpos e repetiu-se este procedimento mais duas vezes. O restante método seguiu a metodologia indicada na Figura 40.

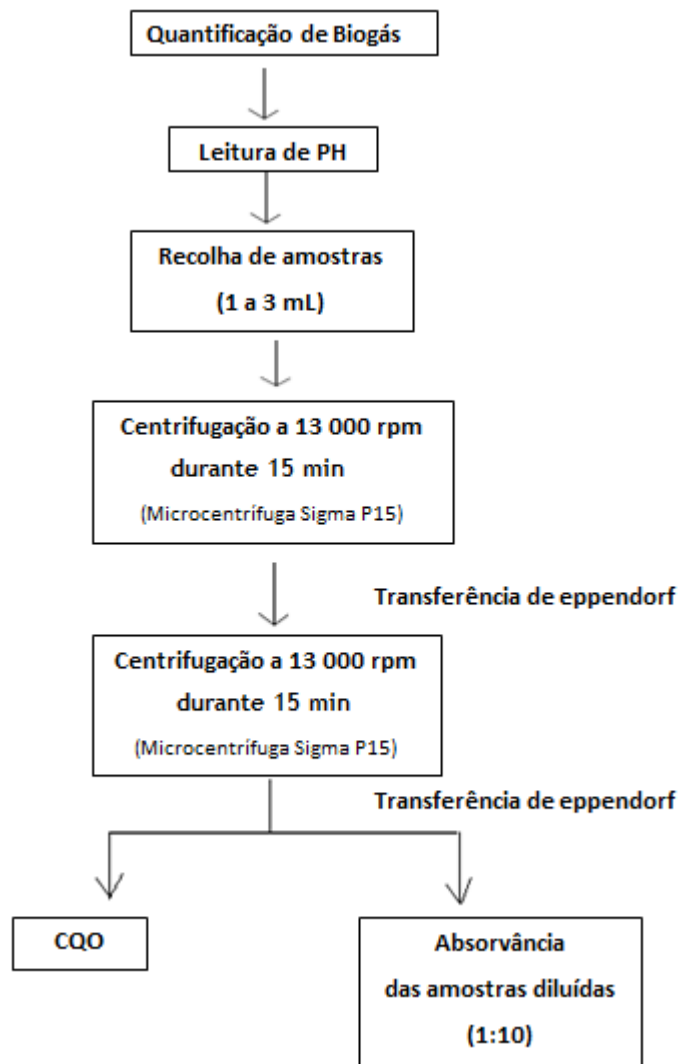


Figura 40 - Representação esquemática do método utilizado para o tratamento das amostras recolhidas ao longo do ensaio

Terminados os ensaios, quantificou-se o biogás, leu-se o pH e prosseguiu-se a monitorização. As amostras foram de seguida centrifugadas para determinação de sólidos, CQO, lignina, fenóis, azoto amoniacal e proteína conforme a Figura 39.

Com base na produção cumulativa de biogás obtido nos ensaios de biodegradabilidade anaeróbia, foi calculada a produção média de biogás por unidade de massa de biomassa e por unidade de tempo.

Capítulo IV - Análise dos resultados e discussão

Os resultados experimentais obtidos durante o decurso do trabalho experimental foram tratados e analisados com o intuito de dar uma pequena contribuição para a evolução das tecnologias de digestão anaeróbia. A aplicação mais controlada da biotecnologia permite gerir a poupança de matéria-prima, a valorização de resíduos orgânicos de indústrias agro-alimentares, a produção de biocombustíveis (ao formar, entre outros compostos, metano) e contribuir para a diminuição do impacto ambiental causado pela descarga descontrolada de resíduos.

4.1 Biodegradação anaeróbia de compostos aromáticos gerados por degradação da lignina

No presente subcapítulo foi analisado a biodegradação anaeróbia, em regime termófilo ($50 \pm 2^\circ\text{C}$), do siringaldeído (Syr) e da *o*-vanilina (Van), que constituem aldeídos fenólicos resultantes da degradação de polímeros de lignina.

De modo a compreender-se melhor o comportamento da população mista anaeróbia, utilizou-se também um controlo do método, composto apenas de biomassa anaeróbia e de solução de glucose e acetato de sódio (a+g).

4.1.1. Caracterização da biomassa

No início de cada conjunto de ensaios caracterizou-se a biomassa anaeróbia mista, determinando a concentração de sólidos suspensos (SS) e de sólidos suspensos voláteis (SSV). No primeiro ensaio ocorreu um erro experimental não se tendo, por este motivo, considerado os valores obtidos. Assim, assumiram-se para os cálculos, quando necessário, os valores relativos ao segundo ensaio (Tabela 18).

Tabela 18 - Concentração de sólidos suspensos (SS) e de sólidos suspensos voláteis (SSV) presentes no inóculo para o ensaio duplicado, da biodegradação da *o*-vanilina (Van).

SS (g/L)	SSV (g/L)
35,1	7,7

4.1.2. Biodegradação do Siringaldeído

Foram efectuados em cada lote de ensaios, testes com solução 500 mg/L de siringaldeído (Syr), com mistura de 500 mg/L de Syr e 3 g/L de acetato de sódio e glucose (a+g), e com solução 3 g/L de acetato de sódio e glucose (a+g). Na Tabela 19 estão apresentados os valores

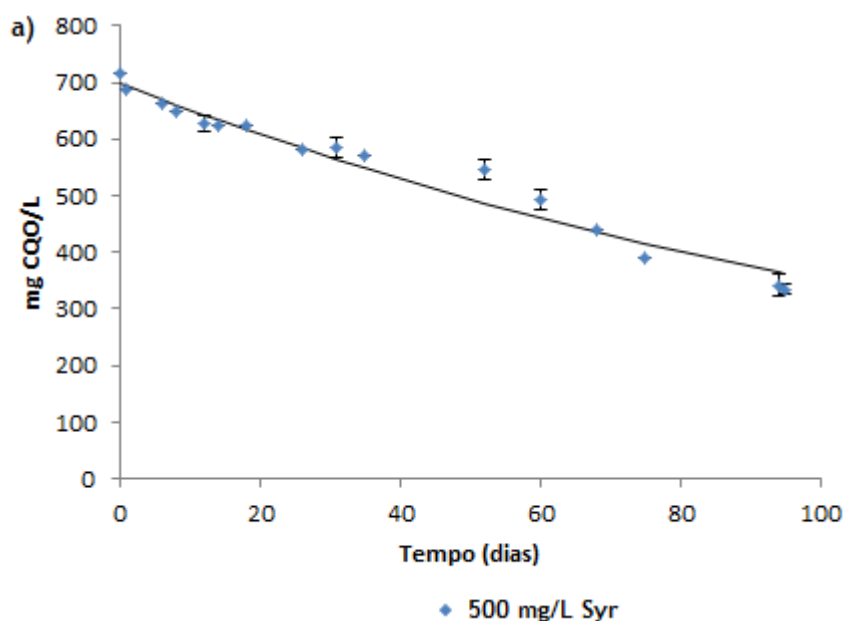
relativos à CQO registados no início e no fim do ensaio, bem como o período de tempo relativo a cada um.

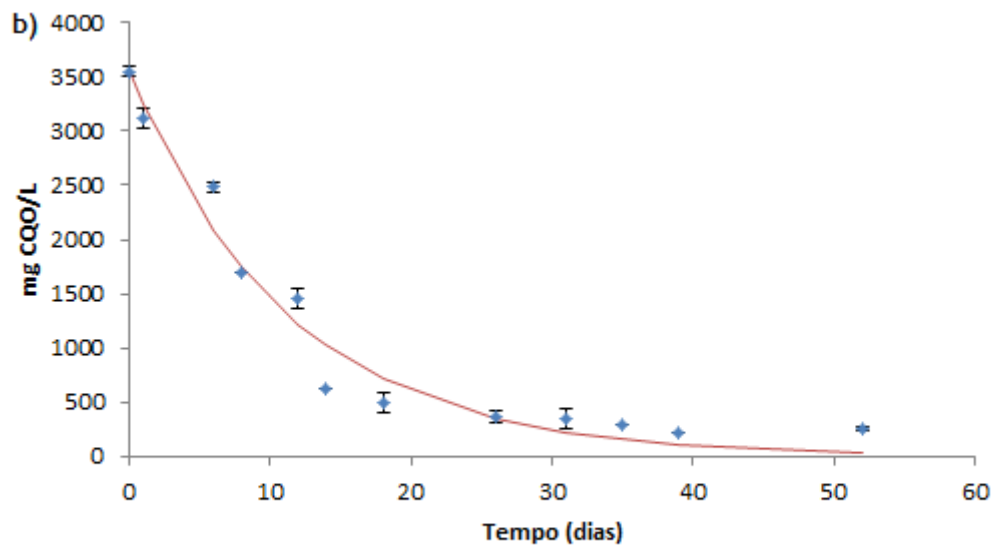
Tabela 19 - Valores médios de CQO e correspondentes desvios padrão, obtidos nos ensaios da biodegradação do siringaldeído e do controlo do ensaio.

Ensaio \ Parâmetros	CQO Inicial (mg CQO/L)	CQO Final (mg CQO/L)	% Remoção CQO	Tempo Ensaio (Dias)
500 mg/L Syr	716	335 ± 10 (2)*	53,5	95
3 g/L (a+g) + 500 mg/L Syr	3545 ± 47 (2)*	253	93	52
Controlo 3 g/L (a+g)	2856 ± 102 (2)*	120 ± 19 (2)*	95	28

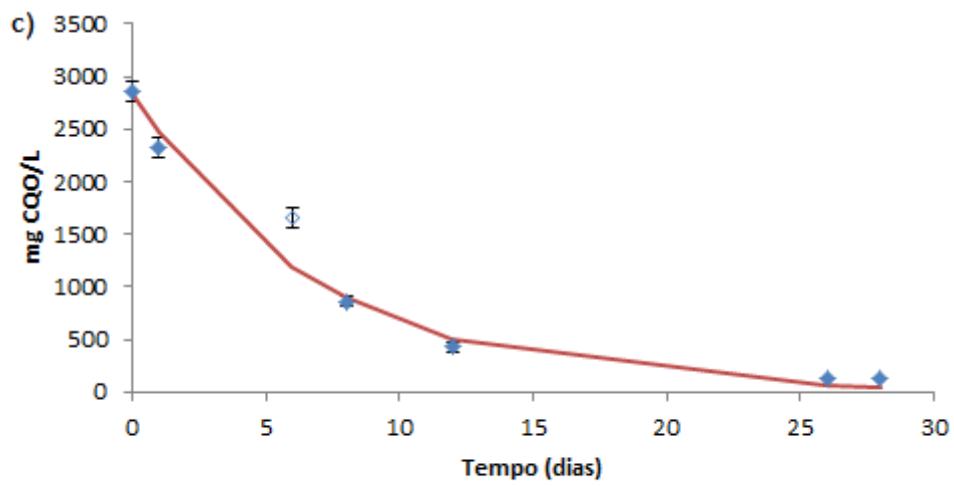
*Entre parentesis está indicado o número de análises efectuadas para cada concentração

Os resultados da carência química de oxigénio bem como a evolução dos espectros de UV-visível relativos aos ensaios com siringaldeído estão apresentados nas Figuras 41 e 42.





◆ 3 g/L (a+g) + 500 mg/L Syr



◆ 3g/L (a+g)

Figura 41 - Variação do CQO em função do tempo para: (a) 500 mg/L Syr; (b) 500 mg/L Syr + 3 g/L (a+g); e (c) Controlo (3 g/L (a+g))

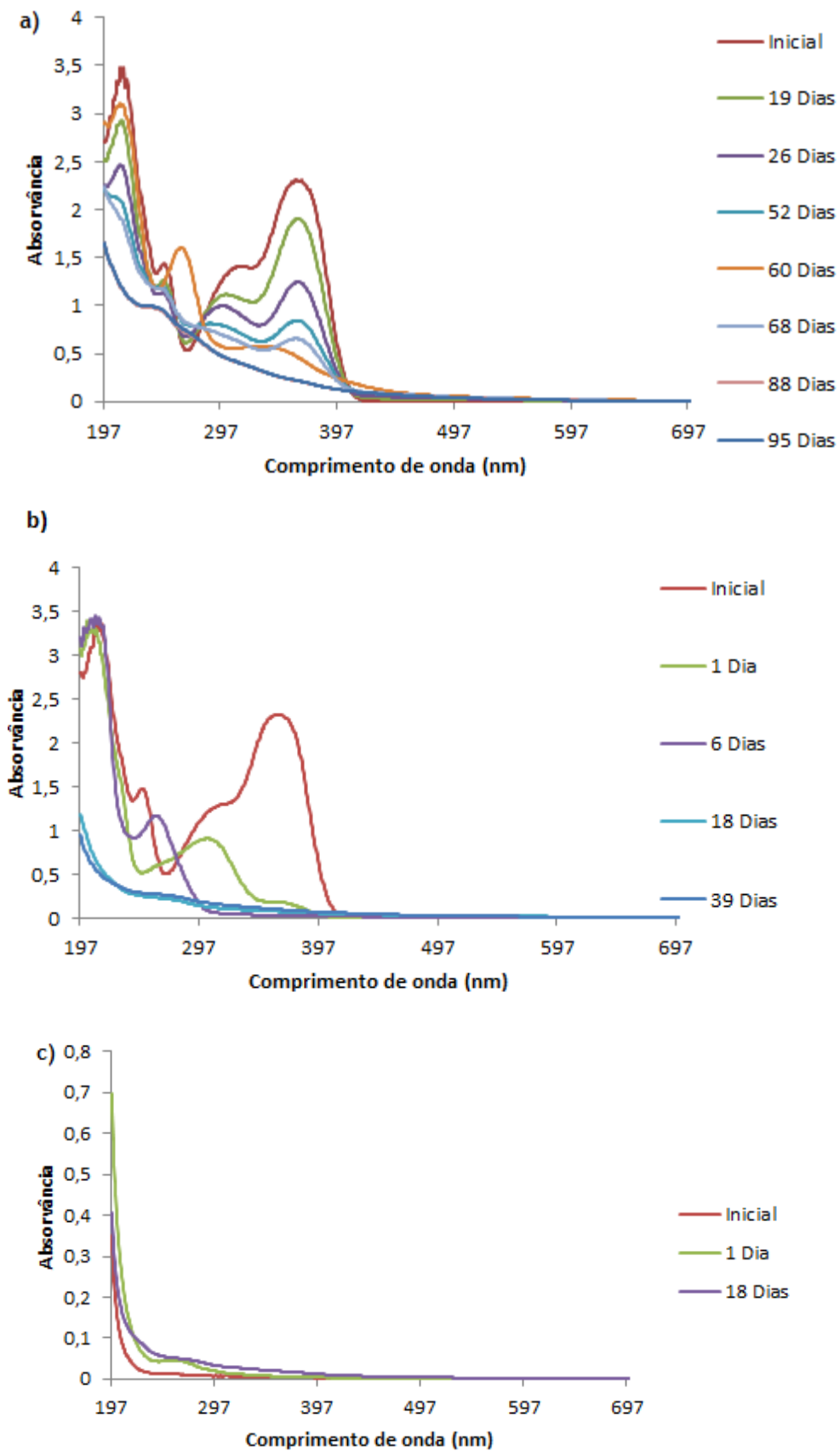


Figura 42 - Evolução dos espectros (diluídos de 1:10), relativamente aos ensaios: (a) 500 mg/L Syr; (b) 500 mg/L Syr + 3 g/L (a+g); e (c) Controlo (3 g/L (a+g))

Pela análise das Figuras 41 e 42 e da Tabela 19 verifica-se que a adição de (a+g) à solução reaccional, proporciona um aumento significativo no valor de CQO inicial, que se traduz numa maior quantidade de matéria orgânica disponível para a fermentação microbiana. A velocidade de degradação do siringaldeído é maior e mais eficiente quando se adicionam co-substratos (acetato de sódio e glucose) aproximando-se, no final, ao perfil de CQO obtido para o controlo (Figura 43). De facto, verifica-se uma redução de CQO, corroborada pela análise dos espectros de cada ensaio, na ordem dos 53,5%, em 95 dias, para o ensaio de 500mg/L de siringaldeído; 93%, em 52 dias, para o ensaio de 3g/L de (a+g) + 500 mg/L de siringaldeído e de 95%, em 28 dias, para o controlo.

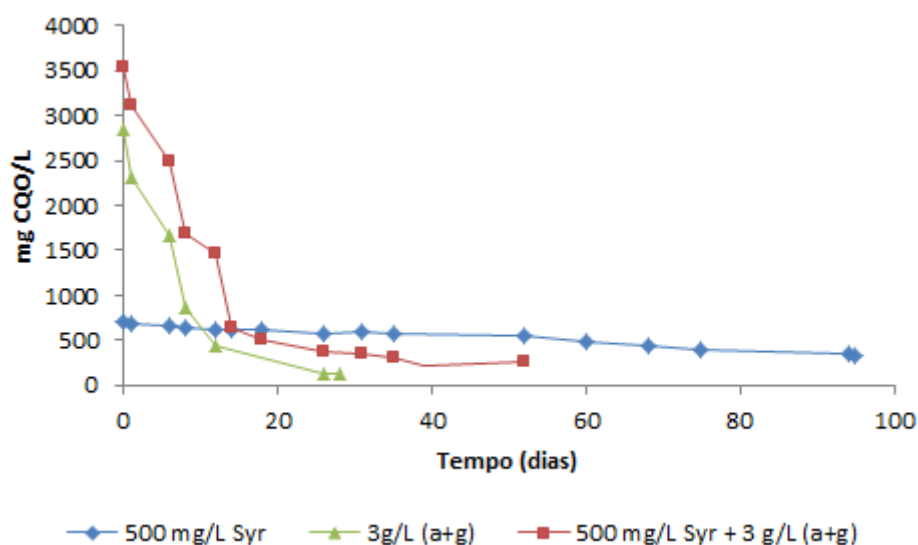


Figura 43 - Sobreposição dos valores de CQO obtidos para cada ensaio

Pela evolução da CQO verifica-se que a partir de 18 dias de ensaio, a CQO do controlo se aproxima do valor de CQO obtido para o ensaio com 500 mg/L Syr + 3 g/L (a+g). No ensaio com Syr apenas ao fim de 95 dias de reacção se obtém um valor de CQO de cerca de metade do inicial, indiciando uma velocidade de degradação mais lenta. Este tipo de resposta indica uma alteração significativa da estrutura molecular do siringaldeído, a qual é corroborada pelos espectros de UV-Visível obtidos (Figura 42 (a)). No ensaio com apenas 500 mg/L de Syr a alteração dos espectros é lenta e gradual, observando-se o desaparecimento dos picos de absorção a 366 nm, a 314 nm e a 212 nm ao final de 95 dias de ensaio. A presença de co-substrato 3 g/L (a+g) implica uma alteração rápida e acentuada da estrutura molecular, podendo considerar-se o composto, ao final de 18 dias, degradado (Figura 42 (b)).

A produção média de biogás para a mistura de siringaldeído com glucose e acetato foi mais elevada. No ensaio de siringaldeído na presença de co-substratos produziu-se uma maior quantidade de gás num intervalo de tempo significativamente menor (Figura 44 e Tabela 20). Todavia, o valor máximo acumulado para o biogás na mistura Syr e (a+g), é inferior à soma do

controle e da solução de Syr, o que se pode atribuir a eventuais fugas ocorridas no sistema de medição.

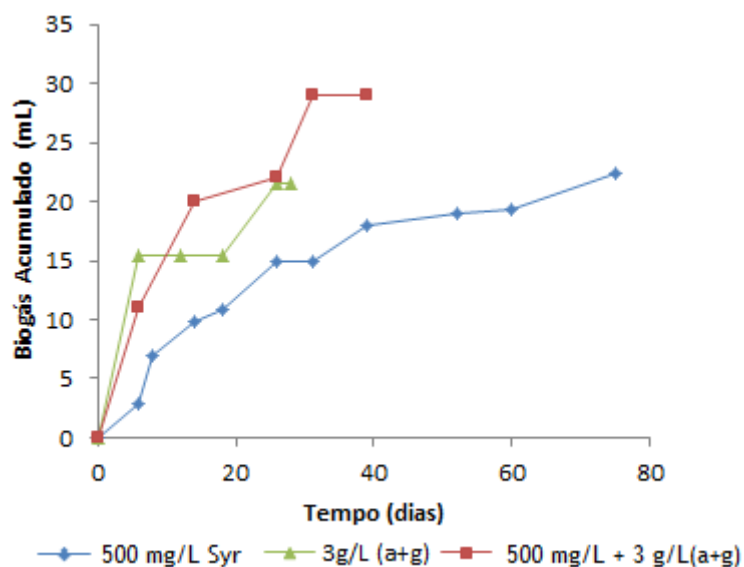


Figura 44 - Produção média de biogás acumulado obtido nos diferentes ensaios

Tabela 20 - Biogás produzido nos diferentes ensaios

Ensaio \ Parâmetros	Biogás Acumulado (mL)	Tempo Ensaio (Dias)
500 mg/L Syr	22	95
3 g/L (a+g) + 500 mg/L Syr	29	31
Controlo	22	26

À medida que aumenta a produção de biogás, os valores de CQO tendem a diminuir (Figura 45), sendo indicativo da eficiência de conversão da matéria orgânica, presente no meio, em biogás. Teoricamente a partir da degradação do siringaldeído deveriam ter sido produzidos $548 \text{ mL}_{\text{CH}_4}/\text{g}_{\text{composto}}$ (Barakat *et al.*, 2012), o que corresponde ao dobro do volume experimental obtido, calculado nas mesmas condições ($281 \text{ mL}_{\text{CH}_4}/\text{g}_{\text{Syr}}$). Este resultado está coerente, pois no final do ensaio a remoção de CQO foi apenas de 53,2%, ou seja, apenas metade do siringaldeído foi biotransformado.

Nos ensaios com co-substratos, os resultados experimentais indicam a existência de perdas significativas no biogás recolhido, pelo que não se efectuou uma análise comparativa entre o valor experimental e o teoricamente esperado.

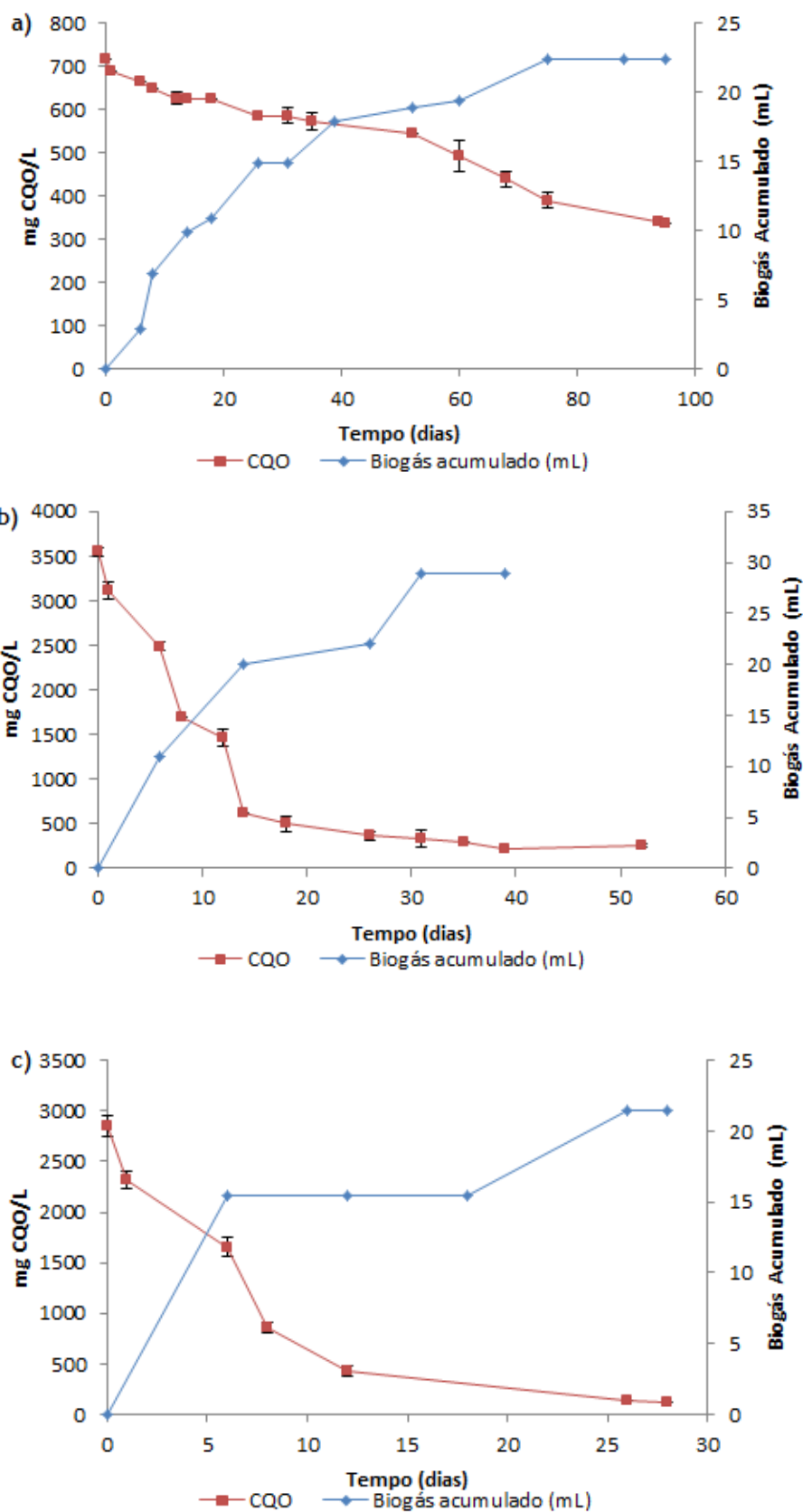


Figura 45 - Biogás acumulado, variação de CQO e respectivos desvios padrão obtidos ao longo do tempo nos ensaios de: (a) 500 mg/L Syr; (b) 500 mg/L Syr + 3g/L (a+g); (c) Controlo (3 g/L (a+g))

A produção média de biogás, por unidade de massa de inóculo e por unidade de tempo foi determinada através da expressão:

$$\text{Produção média de biogás} = \frac{\text{Volume biogás (mL)}}{\text{Massa inóculo (mgSSV)} \times \text{Tempo (dias)}}$$

Apesar de se admitir a existência de perdas significativas na recolha do biogás, observe-se que os valores obtidos no ensaio com co-substrato foram idênticos (Tabela 21) aos do ensaio com 500 mg/L Syr e 3g/L de (a+g), o que se justifica pelo facto da carga da CQO inicial ser relativamente próxima.

Tabela 21 - Produção média de biogás por unidade de massa de inóculo obtido para os diferentes ensaios.

Parâmetro \ Ensaio	500 mg/L Syr	500 mg/L Syr + 3 g/L (a+g)	3 g/L (a+g)
Produção média de biogás (mL biogás/(g SSV _(biomassa) ·dia))	4	12	11

A cinética de degradação da CQO dos diferentes ensaios aproxima-se de um modelo de pseudo primeira ordem, em que a concentração de substrato residual foi determinada a partir de:

$$\frac{dS}{dT} = -kS \Leftrightarrow \frac{dS}{S} = -k dT \Leftrightarrow \int_{S_0}^S \frac{1}{S} dS = -k \int_{t_0}^t dT$$

Desenvolvendo a expressão anterior obtém-se:

$$S = S_0 e^{(-kt)}$$

onde:

S - Concentração substrato residual (mg CQO/L)

S₀ - Concentração inicial de substrato (mgCQO/L)

k - Constante cinética (dia⁻¹)

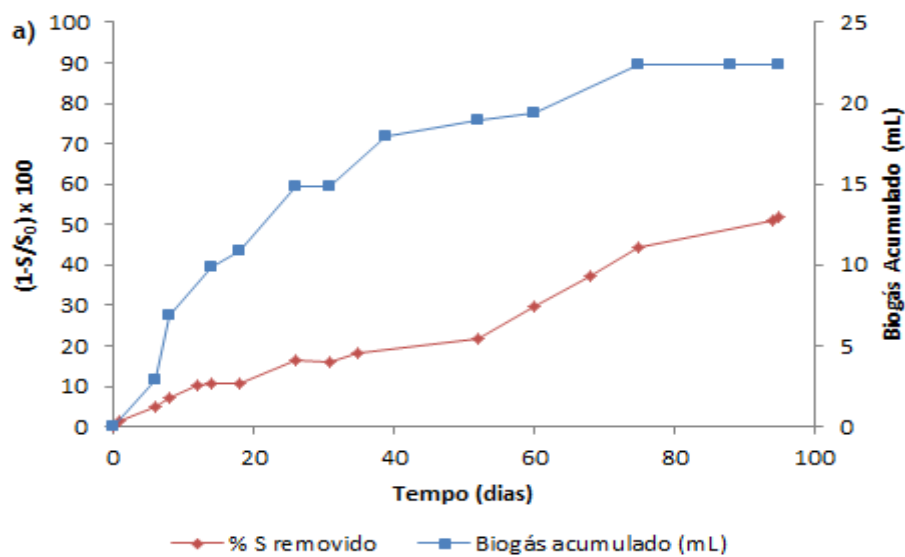
t - Tempo (dias)

O valor de S₀ e k para cada ensaio (Tabela 22) foi determinado através do método dos mínimos quadrados, por ajuste do modelo proposto aos pontos experimentais. Pelos resultados obtidos observa-se que na presença de co-substrato a velocidade de reacção é significativamente mais elevada, indicando que a velocidade da reacção depende da concentração do substrato.

Tabela 22 - Valor de k e de S₀ para cada ensaio

Parâmetros \ Ensaio	500 mg/L Syr	500 mg/L Syr + 3 g/L (a+g)	Controlo
k (d ⁻¹)	0,007	0,089	0,145
S ₀ (mg CQO/L)	699	3557	2846

A variação do substrato removido (%) e da produção de biogás com o tempo de incubação mostram uma evolução semelhante. Pela análise da Figura 46, verifica-se que à medida que o substrato removido aumenta, a produção de biogás também aumenta, o que traduz a conversão efectiva dos substratos. Saliente-se que o ensaio com 500 mg/L de Syr (Figura 46 (a)) necessitou de aproximadamente o dobro do tempo de reacção do observado nos ensaios com 500 mg/L Syr e 3 g/L (a+g) (Figura 46 (b)), para se obter uma taxa de conversão da CQO de cerca de metade. Assim, para culturas anaeróbias não adaptadas a aldeídos fenólicos, a presença de co-substratos parece ter um papel determinante no mecanismo subjacente à metabolização destes contaminantes.



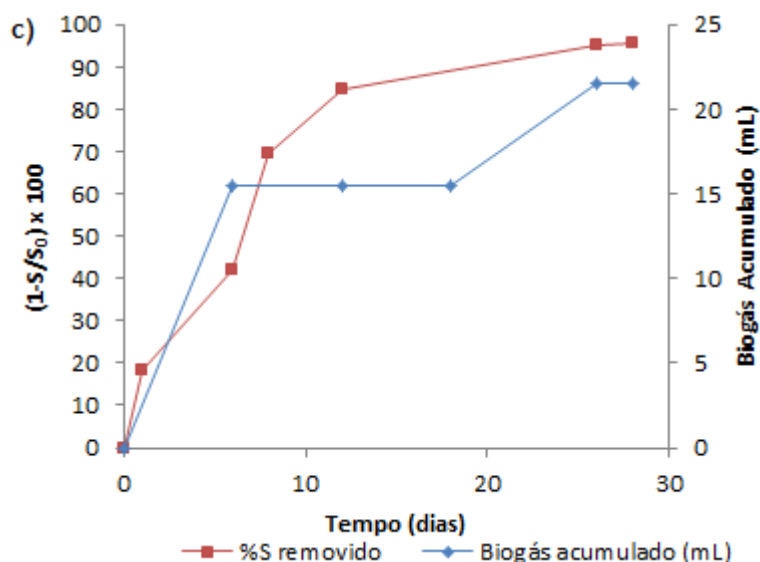
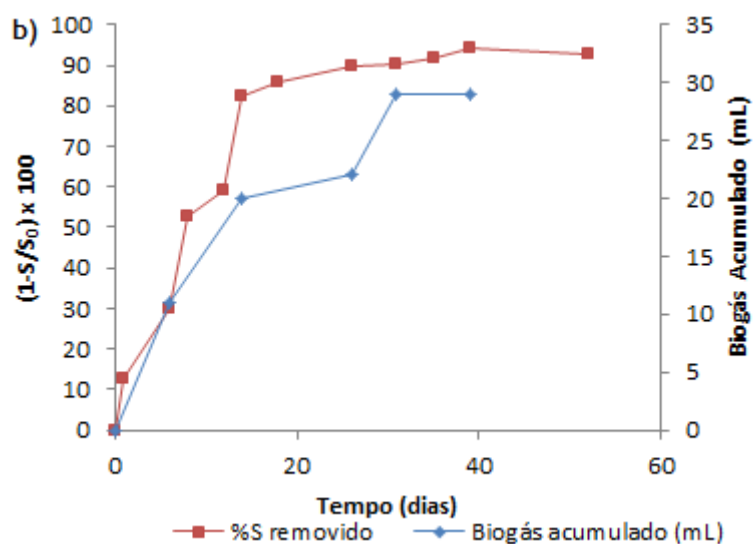


Figura 46 - Evolução da porcentagem de substrato consumido e produção de biogás acumulado para a) 500 mg/L Syr; b) 500 mg/L Syr + 3g/L (a+g); e c) Controle (3 g/L (a+g))

4.1.3. Biodegradação da *o*-vanilina

Efectuaram-se ensaios em duplicado no estudo da biodegradação anaeróbia da *o*-vanilina (Van) em regime termófilo. Os ensaios prolongaram-se por um período entre 98 e 120 dias. O ensaio em duplicado da *o*-vanilina (ensaio 2) foi desenvolvido cerca de dois meses depois do primeiro ensaio e apesar de existir alguma variação, os resultados foram similares (Tabelas 23 e 24).

Tabela 23 - Valores de CQO e respectivos desvios padrão obtidos nos ensaios da biodegradação da *o*-vanilina (Van)

Ensaio	Parâmetros	CQO Inicial (mg CQO/L)	CQO Final (mg CQO/L)	% Remoção de CQO	Tempo ensaio (dias)
0,5g/L (a+g) +500 mg/L Van		1271 ± 40 (2)*	656 ± 29 (2)*	48,4	120
1 g/L (a+g) +500 mg/L Van		1697 ± 141 (2)*	523 ± 14 (2)*	69,1	120
3 g/L (a+g) +500 mg/L Van		3545 ± 47 (2)*	479 (2)*	86,5	120

* Entre parentesis está indicado o nº de análises efectuadas para cada concentração

Tabela 24 - Valores de CQO e respectivos desvios padrão obtidos no duplicado dos ensaios da biodegradação da *o*-vanilina (Van)

Ensaio	Parâmetros	CQO Inicial (mg CQO/L)	CQO Final (mg CQO/L)	% Remoção de CQO	Tempo do Ensaio (dias)
0,5g/L (a+g) +500 mg/L Van		1211 ± 19 (2)*	754 ± 19 (2)*	37,7	98
1 g/L (a+g) +500 mg/L Van		1697 ± 47 (2)*	795 (2)*	53,2	98
3 g/L (a+g) +500 mg/L Van		3395 (2)*	754 (2)*	77,8	98

*Entre parentesis está indicado o nº de análises efectuadas para cada concentração

Em termos percentuais há uma redução de CQO na ordem dos 48,4 % para 0,5 g/L de (a+g) + 500 mg/L de *o*-vanilina e de 37,7 % no respectivo duplicado; de 69,1% para 1 g/L de (a+g) + 500 mg/L de *o*-vanilina e de 53,2 % no respectivo duplicado; de 86,5% para 3 g/L de (a+g) + 500 mg/L de *o*-vanilina e de 77,8% no respectivo duplicado.

A variação da CQO em função do tempo nos ensaios efectuados com a *o*-vanilina está apresentada na Figura 47. Os resultados indicam um lento processo de degradação da *o*-vanilina em regime termófilo, independentemente da presença de co-substratos. Apenas ao final de 50 - 60 dias de ensaio ocorre uma diminuição acentuada da CQO, altura a partir da qual se observa uma remoção significativa deste composto, confirmada pela evolução dos espectros de UV-Visível (Figura 48), nos quais se observa alterações acentuadas para um tempo de reacção idêntico.

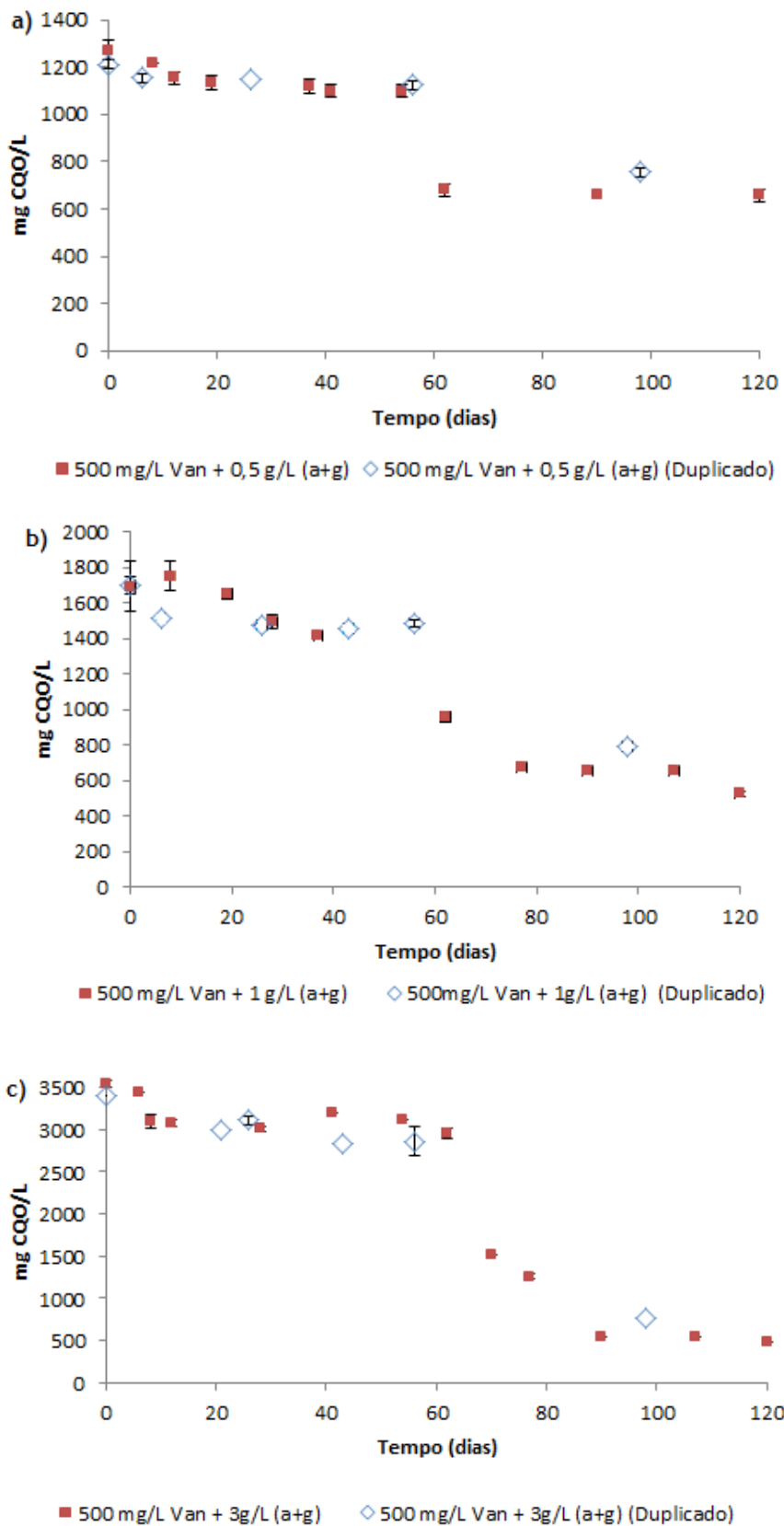


Figura 47 - Variação da CQO, e respectivos desvios padrão, em função do tempo para os ensaios de biodegradação de 500 mg/L de *o*-vanilina (Van) com: (a) 0,5 g/L (a+g); (b) 1 g/L (a+g) e (c) 3 g/L (a+g), respectivamente

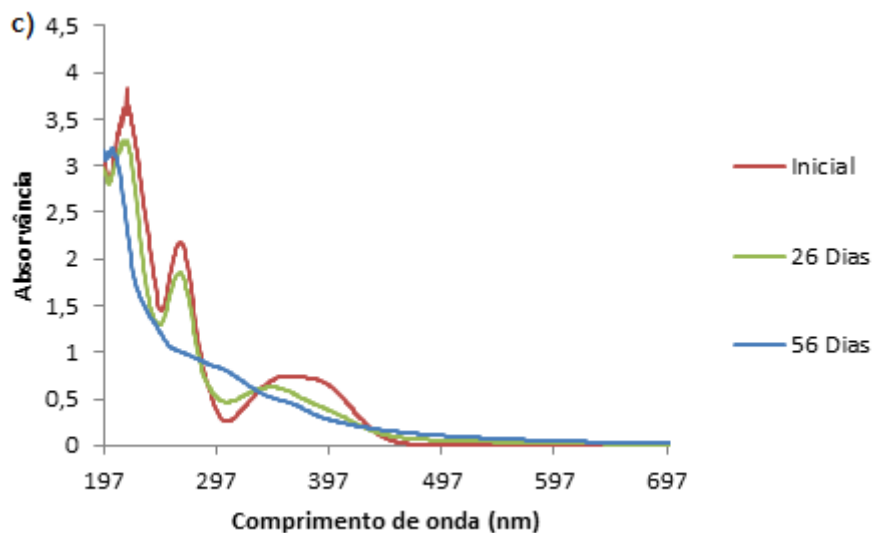
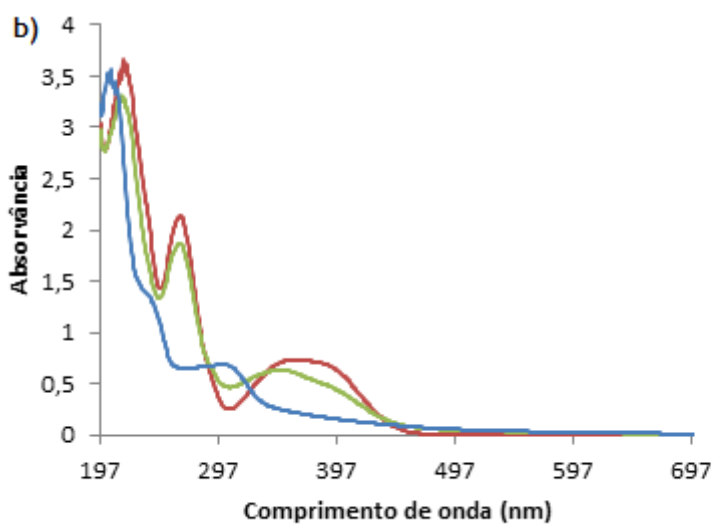
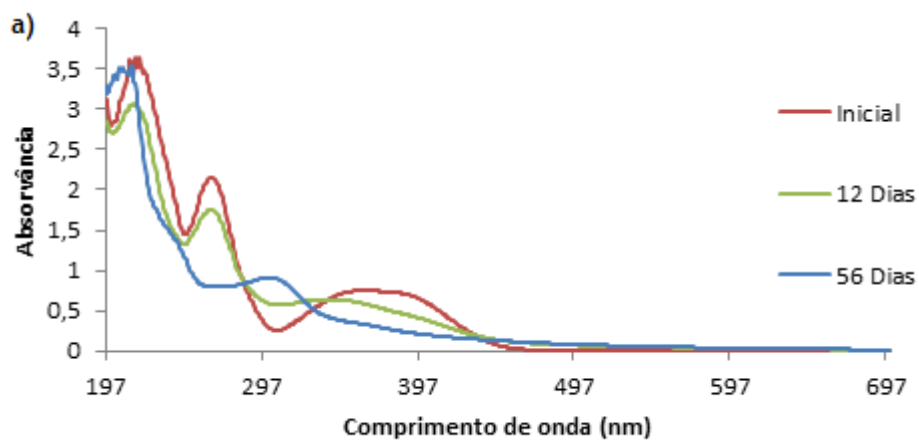


Figura 48 - Exemplos da variação dos espectros UV-visível (diluídos de 1:10), ao longo do tempo obtido nos ensaios de biodegradação de 500 mg/L de *o*-vanilina (Van) com: (a) 0,5 g/L (a+g); (b) 1g/L (a+g) e (c) 3 g/L (a+g), respectivamente

À medida que se aumenta a concentração de co-substrato (a+g) na mistura reaccional, regista-se um aumento no valor inicial de CQO, que se traduz numa maior quantidade de matéria orgânica disponível para a fermentação microbiana (Figura 49). Para igual período de tempo, o ensaio efectuado com 3 g/L de (a+g) tende a ser mais eficiente, pois obtém-se valores da CQO residual no final, mais baixos. O facto destas populações mistas terem acesso a co-substratos directos e facilmente metabolizáveis, favorece o seu desenvolvimento mesmo na presença de outros compostos de difícil degradação (*o*-vanilina). Estas condições podem causar uma maior actividade metabólica, tornando as populações menos susceptíveis a potenciais efeitos inibitórios, o que pode explicar um consumo da CQO mais eficiente.

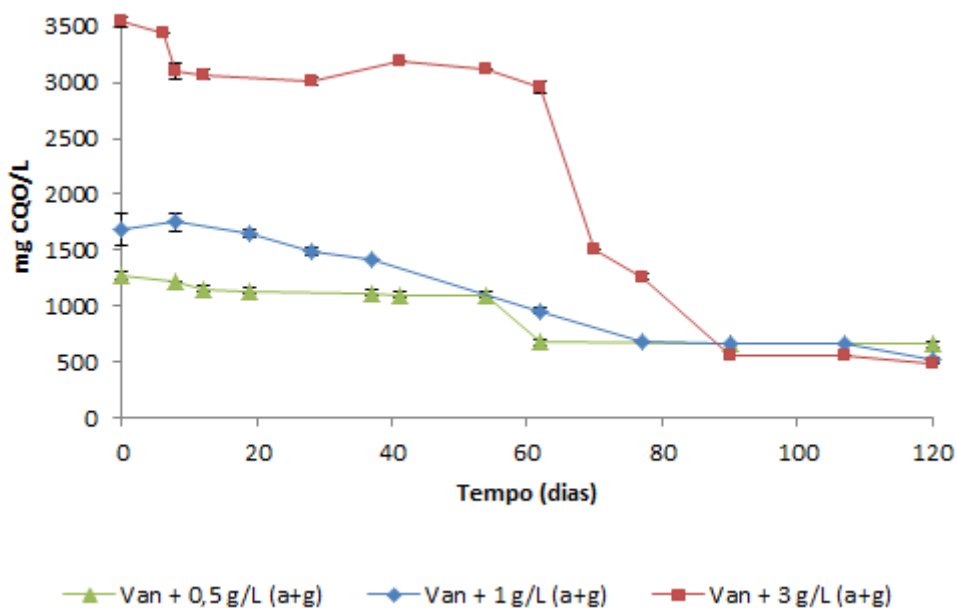


Figura 49 - Variação da CQO em função do tempo para os ensaios com *o*-vanilina (Van) na presença de diferentes teores de co-substratos

As curvas cumulativas de biogás estão apresentadas na Figura 50. A degradação da vanilina por via anaeróbia deve gerar teoricamente, 626 mL de $\text{CH}_4/\text{g}_{\text{composto}}$ (Barakat *et al.*, 2012). Como a mistura reaccional continha cerca de 50% de *o*-vanilina e 50% de (a+g), o volume de metano no biogás deve corresponder a cerca de 51,6%, ou seja, deveria obter-se 968 mL_{biogás}/g_{mistura reaccional}. Obtiveram-se experimentalmente 418 mL biogás/g_{mistura} de Van e (a+g), que corresponde a uma fracção de cerca de metade (48,3%) do teoricamente esperado, o que está de acordo com o valor da CQO efectivamente removida (48,4%).

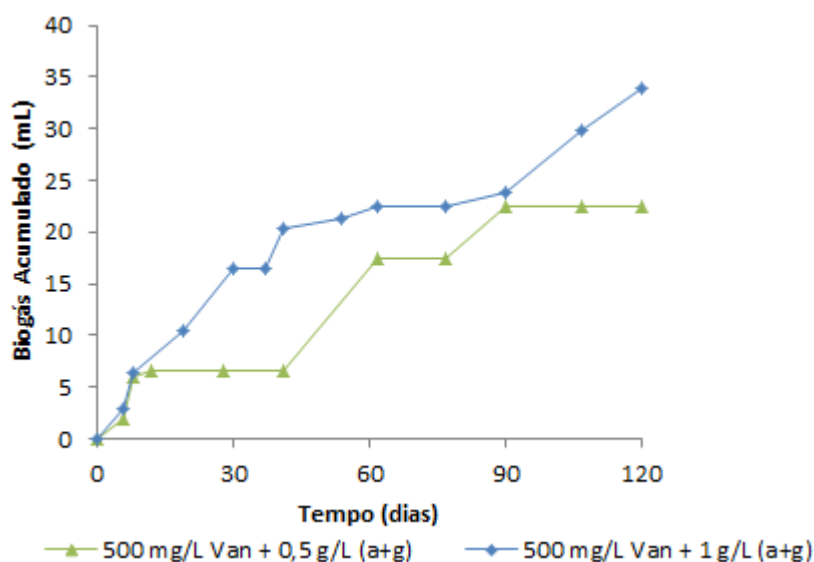


Figura 50 - Produção cumulativa de biogás a partir da biodegradação de 500 mg/L de *o*-vanilina (Van) com: 0,5 g/L (a+g) e 1 g/L de (a+g)

Seria de esperar que a produção de biogás fosse mais elevada no ensaio com 3 g/L (a+g), uma vez que é o que contém mais matéria orgânica na mistura reaccional. Verifica-se que no ensaio que contém 1 g/L de (a+g), a produção média de biogás é superior à observada para o ensaio de 0,5g/L (a+g), o que está de acordo com o esperado (Tabela 25). Por outro lado, à medida que se aumenta a concentração inicial de (a+g) a produção de biogás tende a aumentar. Visto isto, pode-se considerar a possibilidade de terem ocorrido perdas significativas de gás ao longo dos ensaios de 500 mg/L de *o*-vanilina com 3g/L de (a+g), uma vez que a percentagem de remoção de CQO foi elevada (86,5% para o primeiro ensaio e 77,8 % no ensaio duplicado).

Tabela 25 - Biogás acumulado e produção média de biogás por unidade de massa de inóculo obtido para os diferentes ensaios com *o*-vanilina (Van)

Ensaio	Parâmetros	Biogás Acumulado (mL)	Tempo (dias)	Produção Média Biogás (mL _{biogás} /gSSV _{biomassa} .d)
500 mg/L Van + 0,5 g/L (a+g)		23	120	2,5
500 mg/L Van + 1 g/L (a+g)		34	120	3,7
500 mg/L Van + 3 g/L (a+g)		11	120	1,2

Na Figura 51, ilustra-se a relação entre a remoção de CQO e a produção de biogás. Em todos os casos verifica-se que à medida que a CQO é removida, o biogás é produzido. Entre os ensaios com 0,5 e 1 g/L de (a+g), à medida que aumenta a percentagem da CQO removida obtém-se uma maior conversão de matéria orgânica em biogás.

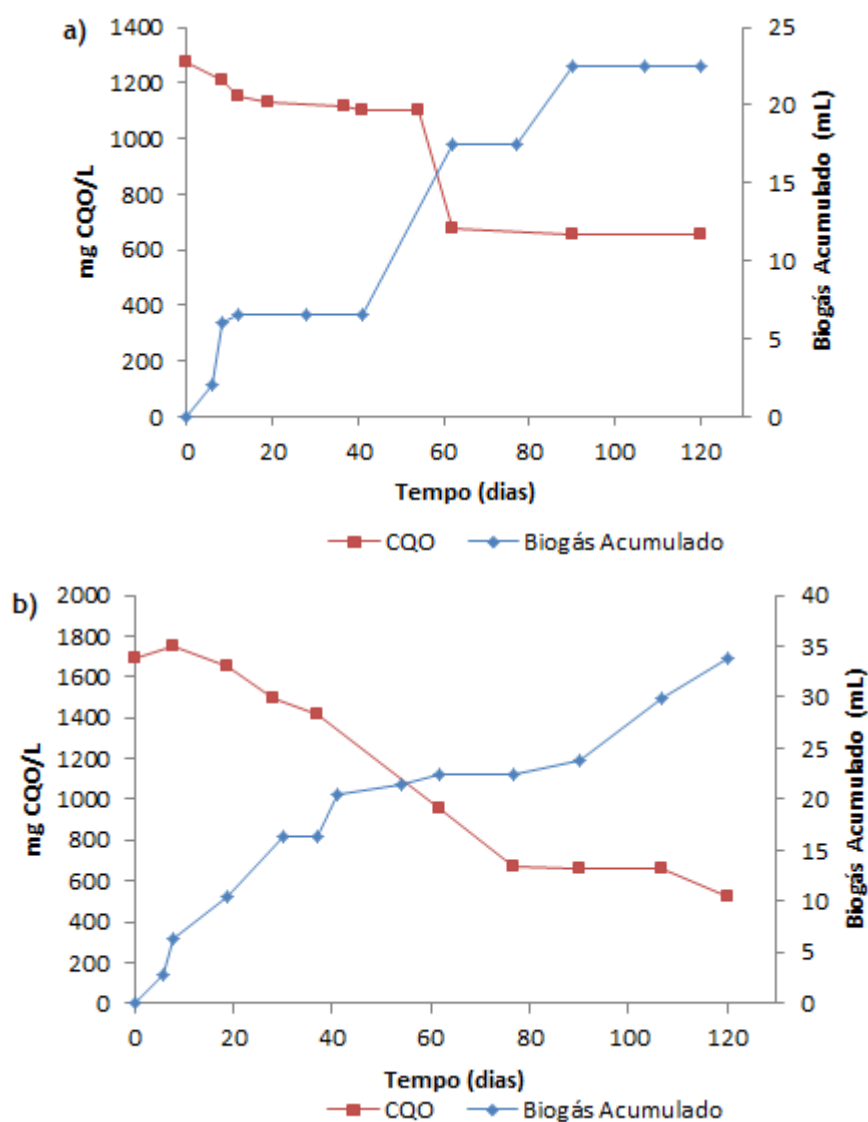


Figura 51 - Evolução da CQO e produção de biogás acumulado nos ensaios de biodegradação de 500 mg/L de *o*-vanilina (Van) com: (a) 0,5 g/L (a+g) e (b) 1 g/L (a+g)

Durante o decorrer da fase experimental para análise dos espectros e da CQO foram recolhidas amostras ao longo do tempo. Apesar do volume total recolhido para análise ter sido diferente no primeiro ensaio e no ensaio duplicado, a evolução dos resultados parece não ser afectada, pois foi similar (Figura 47).

4.1.4. Análise Comparativa da biodegradabilidade de aldeídos fenólicos

Face aos resultados obtidos, pode-se dizer que a adição de um co-substrato à mistura reaccional favorece a degradação do siringaldeído e da *o*-vanilina. Este resultado é evidente quando se compara a diferença da degradação observada no ensaio de 500 mg/L de siringaldeído, com a observada no ensaio que contém a mesma concentração de siringaldeído, mas em que se adicionou 3g/L de (a+g). Os meios de cultura enriquecidos com co-substratos parecem favorecer a conversão da matéria orgânica em biogás.

Como a glucose é facilmente metabolizada por populações anaeróbias e o acetato um substrato directo das bactérias *arquea* metanogénicas acetoclásticas, a sua adição ao meio de cultura contribui para o aumento da actividade das populações acetogénicas e metanogénicas (Louzada, 2006). Segundo Lopes (2005) e citado por Oliveira (2011), “a presença de acetato no início da reacção deve contribuir para um aumento da predominância das *arquea* metanogénicas acetoclásticas, obtendo-se deste modo um aumento da actividade e um aumento do biogás produzido”. Ainda segundo Oliveira (2011), “a glucose parece estimular significativamente a produção média de biogás, o que pode indicar um controlo da reacção de degradação por parte das acidogénicas fermentativas, que ao produzirem substratos das acetogénicas e metanogénicas, estimulam indirectamente o crescimento destas populações”.

Comparando os ensaios de 3g/L (a+g) + 500 mg/L de siringaldeído e de 3g/L (a+g) + 500 mg/L de *o*-vanilina (Figura 52), constata-se que, em condições idênticas, a degradação do siringaldeído é mais rápida. Relativamente à CQO, em menos tempo de ensaio, o siringaldeído é praticamente todo degradado (93 % de remoção de CQO), aproximando-se dos resultados obtidos para o ensaio do controlo (3g/L) (95 % de remoção de CQO).

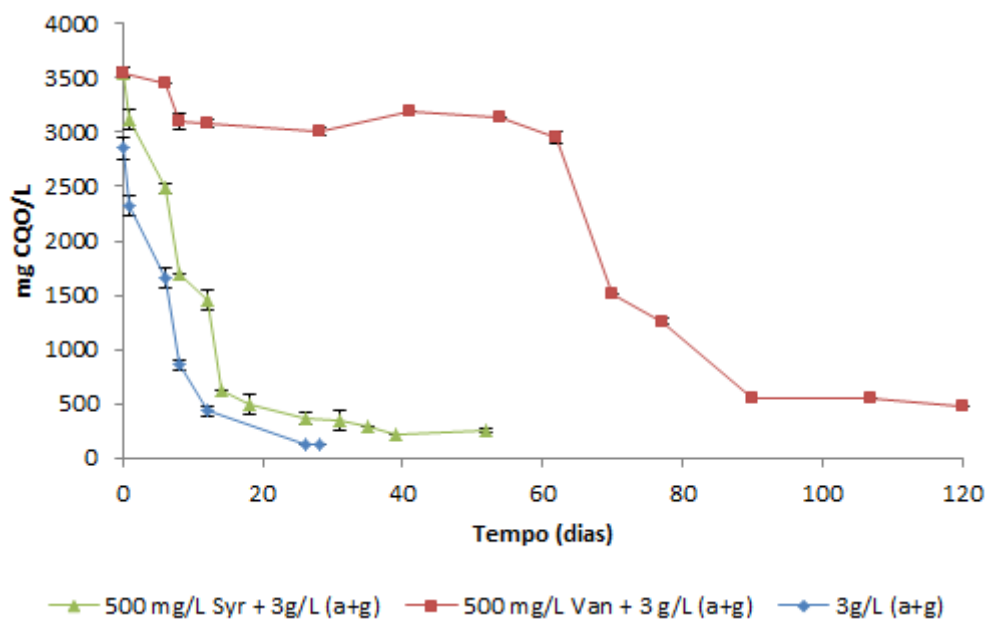


Figura 52 - Comparação da degradação de 500 mg/L Syr + 3 g/L (a+g); 500 mg/L *o*-vanilina (Van) + 3g/L (a+g) e do controlo (3g/L (a+g))

Num estudo sobre os mesmos compostos mas em regime mesófilo, Barakat *et al.*, (2012) obtiveram um resultado semelhante no que diz respeito à degradação do siringaldeído e da vanilina. Tendo em consideração as propriedades antimicrobianas e antioxidantes da vanilina, estes autores justificam que a baixa produção de biogás a partir da vanilina é provocada pela rápida conversão da vanilina a um derivado fenólico que actua como inibidor da digestão

anaeróbia. Quando se analisa com mais pormenor o gráfico referente à variação da CQO na degradação da *o*-vanilina (Figura 49), verifica-se que há um período de remoção seguido de um patamar no qual a CQO permanece aproximadamente constante. Após este período observa-se uma diminuição da CQO mais acentuada. Este comportamento pode indicar uma aclimatização das culturas à presença de compostos intermediários que se vão acumulando, os quais não têm contudo, um efeito inibitório permanente sobre a população, pois são degradados numa segunda etapa de reacção (a partir do 58º dia de reacção).

4.2 Biodegradação anaeróbia do bagaço de azeitona húmido e seco

A lixiviação consiste na extracção dos constituintes solúveis contidos numa fase sólida por contacto com um solvente. Como a população microbiana envolvida na biodegradação do bagaço de azeitona depende da quantidade de substrato acessível, estudou-se a lixiviação de compostos da fase sólida do bagaço de azeitona para o meio aquoso.

4.2.1 Ensaio de Lixiviação

Para os bagaços de azeitona seco e húmido foram desenvolvidos ensaios de lixiviação a $37 \pm 2^\circ\text{C}$ e $50 \pm 2^\circ\text{C}$, de acordo com o descrito na secção 3.6.2.1., por um período de 16 dias.

No decorrer do tratamento de resultados os ensaios de lixiviação a $37 \pm 2^\circ\text{C}$ e $50 \pm 2^\circ\text{C}$ serão representados de acordo com a denominação que se apresenta nas Tabelas 26 e 27.

Tabela 26 - Denominação aplicada nos ensaios de lixiviação a $37 \pm 2^\circ\text{C}$

Ensaio	Massa de bagaço de azeitona
LBS.1	1g bagaço de azeitona seco
LBS.2	2g bagaço de azeitona seco
LBS.5	5g bagaço de azeitona seco
LBH.0,5	0,5g bagaço de azeitona húmido
LBH.1	1g bagaço de azeitona húmido

Tabela 27 - Denominação aplicada nos ensaios de lixiviação a $50 \pm 2^\circ\text{C}$

Ensaio	Massa de bagaço de azeitona
LBS.1*	1g bagaço de azeitona seco
LBS.2*	2g bagaço de azeitona seco
LBS.5*	5g bagaço de azeitona seco
LBH.0,5*	0,5g bagaço de azeitona húmido
LBH.1*	1g bagaço de azeitona húmido

O aumento da matéria orgânica carbonada na fase aquosa foi quantificado pela evolução dos valores de CQO (Tabela 28 e 29) e por espectrofotometria de UV-visível.

Tabela 28 - Valores iniciais e finais de CQO obtidos para a lixiviação a $T=37 \pm 2^\circ\text{C}$ do bagaço de azeitona

Ensaio \ Parâmetros	CQO Inicial (mg CQO/L)	CQO Final (mg CQO/L)	Tempo do ensaio (dias)
LBS.1	54	301	16
LBS.2	27	820	16
LBS.5	134	2665	16
LBH.0,5	403	2118	16
LBH.1	537	2911	16

Tabela 29 - Valores iniciais e finais de CQO obtidos para a lixiviação a $T=50 \pm 2^\circ\text{C}$ do bagaço de azeitona

Ensaio \ Parâmetros	CQO Inicial (mg CQO/L)	CQO Final (mg CQO/L)	Tempo do ensaio (dias)
LBS.1*	74	588	16
LBS.2*	154	1141	16
LBS.5*	322	2522	16
LBH.0,5*	494	661	16
LBH.1*	967	1657	16

Para ambas as temperaturas (Tabelas 28 e 29) e à medida que se aumenta a massa de bagaço seco e húmido, o valor final da CQO tende a aumentar o que se explica pelo aumento do teor de compostos que são lixiviados para a fase líquida. Um dado curioso relativamente a estes resultados é que se observa em geral uma melhor eficiência de lixiviação de bagaço seco para a temperatura de $50 \pm 2^\circ\text{C}$. A $37 \pm 2^\circ\text{C}$ obteve-se para o bagaço húmido uma melhor lixiviação dos compostos. Este factor pode provavelmente ser atribuído a uma diferença na composição das fracções, que podem ser mais ou menos solúveis a determinadas temperaturas. Além do aumento de matéria orgânica na fase aquosa ser quantificado pela evolução dos valores da CQO (Figura 53), os espectros traçados ao longo do tempo apontam no mesmo sentido (Figura 54).

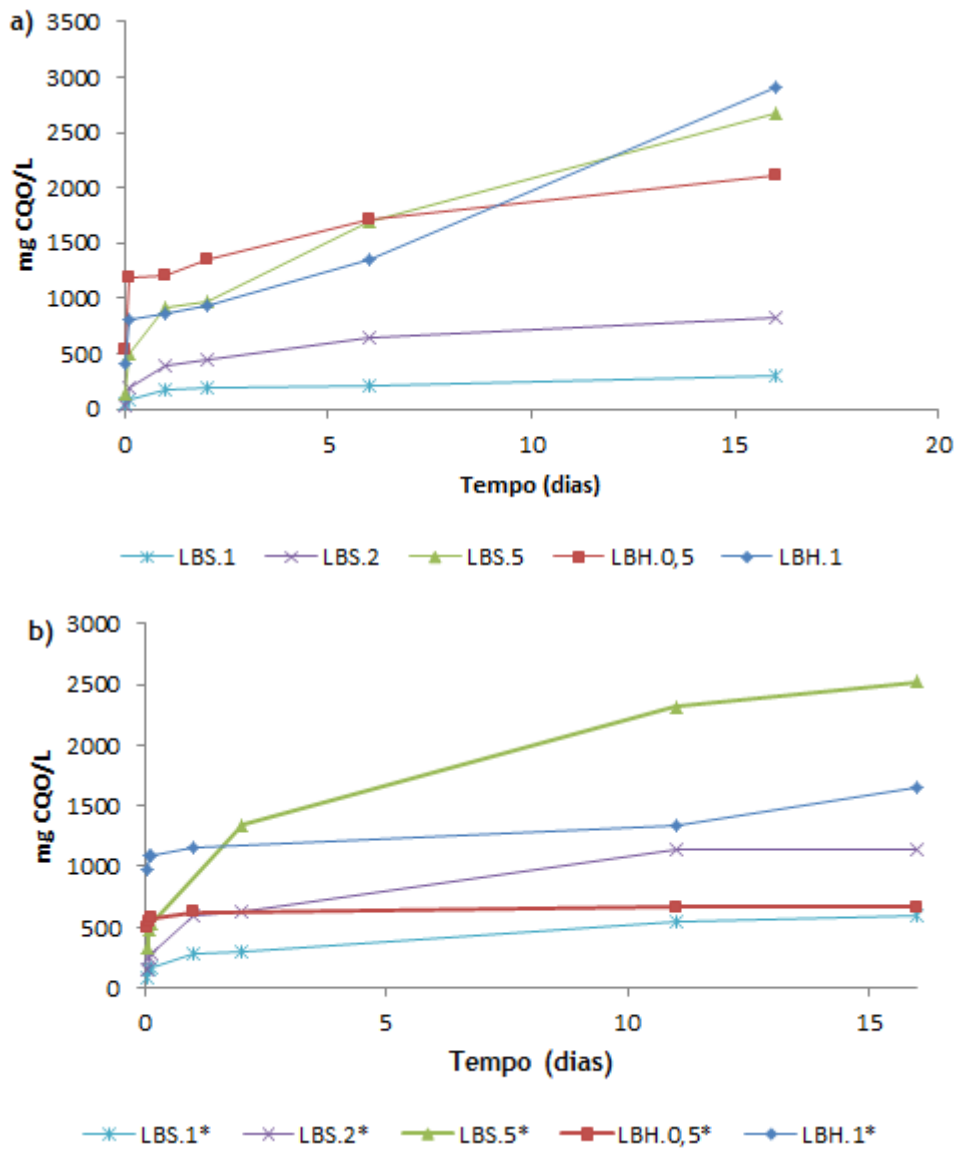
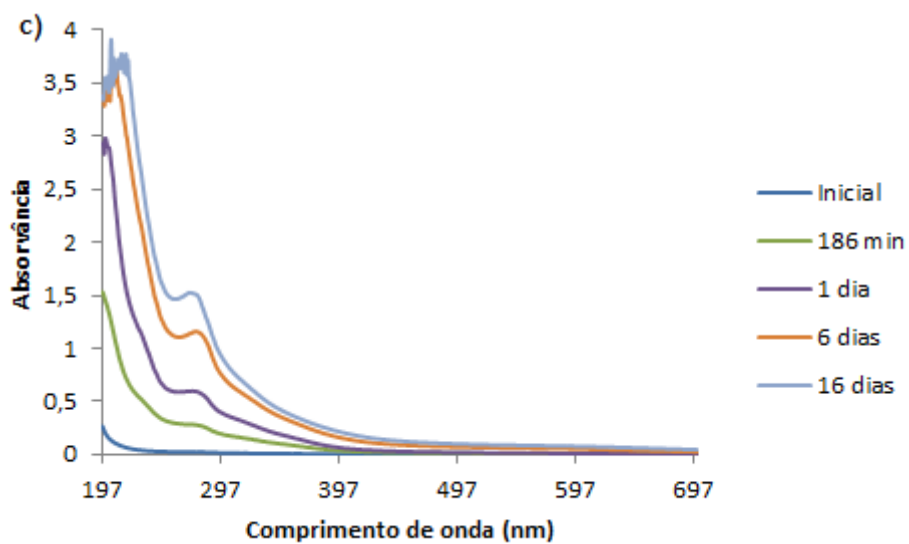
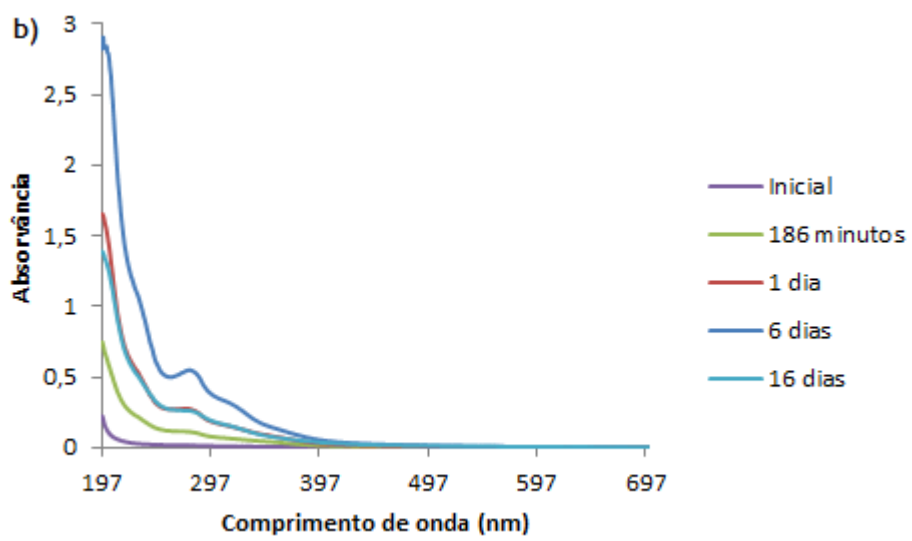
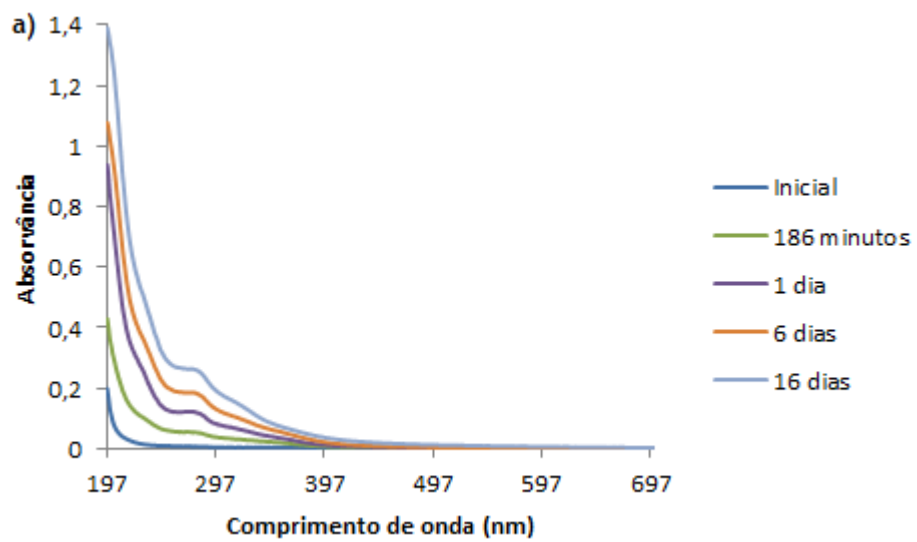


Figura 53 - Valores da CQO obtida para os ensaios de 1; 2 e 5g de bagaço de azeitona seco e de 0,5 e 1g de bagaço de azeitona húmido a 37 ± 2°C a: (a) T= 37 ± 2°C e (b) T= 50 ± 2°C



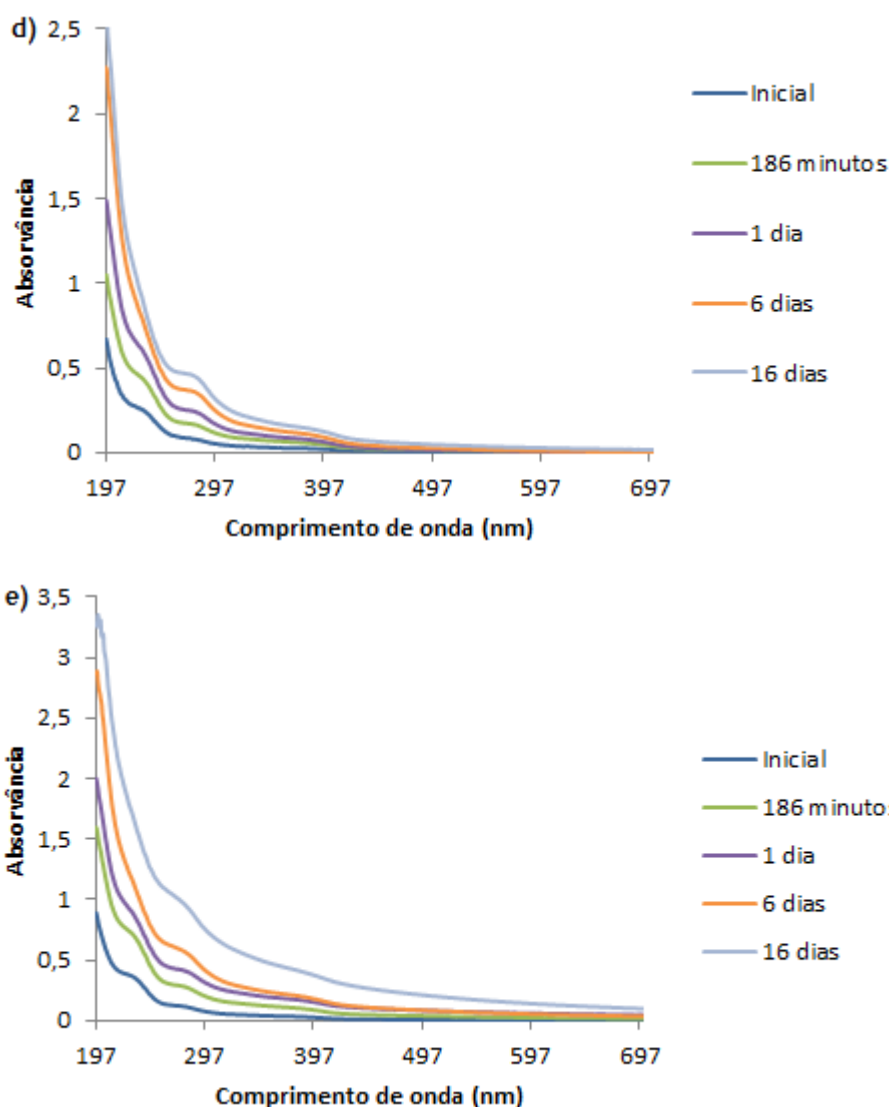


Figura 54 - Exemplo de espectros (diluídos de 1:10), obtidos ao longo do tempo para: (a) 1g; (b) 2g; e (c) 5g de bagaço de azeitona seco e (d) 0,5g; (e) 1g de bagaço de azeitona húmido, a $37 \pm 2^\circ\text{C}$

De modo a aprofundar o estudo relativo à evolução da CQO e dos espectros de UV-Visível, no final do ensaio, procedeu-se à análise da concentração de fenóis, teor de proteína, azoto amoniacal, SSV, SS, LT, LS e LPA.

O azoto amoniacal (Tabela 30) foi quantificado na fracção solubilizada obtida após a acidificação da amostra para a precipitação da lignina insolúvel em meio ácido (LPA). Independentemente da massa e do tipo de bagaço os valores obtidos foram bastante similares.

Tabela 30 - Concentração de azoto amoniacal (mg N-NH₃/L) na fracção solubilizada após acidificação da amostra para os ensaios de lixiviação a T=37 ± 2°C e a T=50 ± 2°C dos bagaços de azeitona

	T= 37 ± 2°C	T= 50 ± 2°C
Parâmetros	Azoto Amoniacal (mg NH ₃ -N/L)	Azoto Amoniacal (mg NH ₃ -N/L)
Ensaio		
Lixiviado de 1g de bagaço seco	38	31 ± 1,7 ¹⁾ (2) ²⁾
Lixiviado de 2g de bagaço seco	43	40 ± 4,0 ¹⁾ (2) ²⁾
Lixiviado de 5g de bagaço seco	51	60 ± 5,0 ¹⁾ (2) ²⁾
Lixiviado de 0,5g de bagaço húmido	36	31 ± 3,4 ¹⁾ (4) ²⁾
Lixiviado de 1g de bagaço húmido	40	38 ± 2,6 ¹⁾ (2) ²⁾

¹⁾ Desvio padrão

²⁾ N^o de análises efectuadas para cada concentração

O teor de proteína nos lixiviados do bagaço de azeitona (T=37 ± 2°C), calculado a partir do azoto de Kjeldahl do precipitado em meio ácido (Tabela 31), é significativamente mais elevado no bagaço húmido (para cerca de 1g de bagaço) do que para o bagaço seco. Contudo, comparativamente aos resultados obtidos no bagaço de uva obtiveram-se valores bastante inferiores (para 0,5g de bagaço de azeitona húmido, o teor de proteína foi de 0,119 g/L e para igual massa de bagaço de uva o teor de proteína foi de 0,308 g/L (Oliveira, 2011)). A lixiviação a temperaturas mais elevadas originou nos lixiviados teores de proteína inferiores.

Tabela 31 - Concentração do teor de proteína (g/L) para os ensaios de lixiviação a $T=37 \pm 2^\circ\text{C}$ e $T=50 \pm 2^\circ\text{C}$ dos bagaços de azeitona medido no precipitado após acidificação da amostra

Parâmetros Ensaio	$T= 37 \pm 2^\circ\text{C}$	$T= 50 \pm 2^\circ\text{C}$
	Teor de Proteína (g/L)	Teor de Proteína (g/L)
Lixiviado de 1g de bagaço seco	0,068	$0,050 \pm 0,004^{1)}$ (2) ²⁾
Lixiviado de 2g de bagaço seco	0,084	$0,049 \pm 0,003^{1)}$ (2) ²⁾
Lixiviado de 5g de bagaço seco	0,178	$0,106 \pm 0,002^{1)}$ (2) ²⁾
Lixiviado de 0,5g de bagaço húmido	0,119	$0,028 \pm 0,050^{1)}$ (4) ²⁾
Lixiviado de 1g de bagaço húmido	0,208	$0,096 \pm 0,003^{1)}$ (2) ²⁾

¹⁾ Desvio padrão

²⁾ Nº de análises efectuadas para cada concentração

A lignina precipitada em meio ácido (LPA) no bagaço seco a $37 \pm 2^\circ\text{C}$ variou entre 0,900 e 1,248 g/L e a $50 \pm 2^\circ\text{C}$ entre 0,923 e 1,669 g/L. Neste caso o aumento da temperatura do ensaio contribuiu para um aumento do teor de (LPA) lixiviado (Tabela 32 (a) e (b)). Para o bagaço húmido o LPA diminuiu quando se efectuaram ensaios a temperaturas mais elevadas, por exemplo, para 1g de bagaço húmido o LPA diminuiu de 2,839 g/L a $37 \pm 2^\circ\text{C}$ para 1,494g/L a $50 \pm 2^\circ\text{C}$. No geral, o teor de LPA para o bagaço de azeitona foi superior ao obtido para o bagaço de uva. A uma $T=37 \pm 2^\circ\text{C}$, o LPA para 0,5g de bagaço de uva foi de 0,451 g/L (Oliveira, 2011).

A diminuição do teor de LPA e do teor de proteína no bagaço de azeitona húmido, quando se efectuaram ensaios de lixiviação a temperaturas mais elevadas (Tabelas 31 e 32) está de acordo com a diminuição obtida nos valores da CQO (Tabela 29), podendo justificar os resultados obtidos.

O teor de lignina solúvel (LS) no licor lixiviado foi em geral superior a temperaturas mais altas.

O teor de fenóis (mg GAE/L) do lixiviado parece manter-se constante e é independente da temperatura, tendo para a mesma massa de bagaço valores muito próximos (Tabela 33).

Tabela 32 - Concentração (g/L) de SS, Cinzas, SSV, LS, LPA e LT para os ensaios de lixiviação a (a) $T=37 \pm 2^\circ\text{C}$ e (b) $T=50 \pm 2^\circ\text{C}$, dos bagaços de azeitona

a)

Parâmetros Ensaio	SS (g/L)	Cinzas (g/L)	SSV (g/L)	LS (g/L)	LPA (g/L)	LT (g/L)
Lixiviado de 1g de bagaço seco	0,984	0,016	0,968	0,063	0,900	0,963
Lixiviado de 2g de bagaço seco	1,080	0,032	1,048	0,108	0,964	1,072
Lixiviado de 5g de bagaço seco	1,530	0,104	1,426	0,109	1,248	1,357
Lixiviado de 0,5g de bagaço húmido	2,024	0,153	1,871	0,070	2,115	2,185
Lixiviado de 1g de bagaço húmido	2,330	0,100	2,233	0,092	2,839	2,931

b)

Parâmetros Ensaio	SS (g/L)	SSV (g/L)	Cinzas (g/L)	LS (g/L)	LPA (g/L)	LT (g/L)
Lixiviado de 1g de bagaço seco	$1,476 \pm 0,065^*$ (2)	$0,973 \pm 0,698^*$ (2)	0,5 (2)	$0,106 \pm 0,001^*$ (2)	$0,923 \pm 0,701^*$ (2)	$1,029 \pm 0,701^*$ (2)
Lixiviado de 2g de bagaço seco	$1,465 \pm 0,107^*$ (2)	$0,1443 \pm 0,106^*$ (2)	0,020 (2)	0,109 (2)	$1,394 \pm 0,103^*$ (2)	$1,502 \pm 0,102^*$ (2)
Lixiviado de 5g de bagaço seco	$1,934 \pm 0,457^*$ (2)	$1,867 \pm 0,410^*$ (2)	0,07 (2)	$0,113 \pm 0,001^*$ (2)	$1,669 \pm 0,280^*$ (2)	$1,875 \pm 0,412^*$ (2)
Lixiviado de 0,5g de bagaço húmido	$1,450 \pm 0,347^*$ (4)	$1,242 \pm 0,086^*$ (4)	0,21 (4)	$0,100 \pm 0,007^*$ (4)	$1,214 \pm 0,083^*$ (4)	$1,314 \pm 0,088^*$ (4)
Lixiviado de 1g de bagaço húmido	$2,117 \pm 0,564^*$ (2)	$1,590 \pm 0,164^*$ (2)	0,53 (2)	$0,114 \pm 0,004^*$ (2)	$1,494 \pm 0,167^*$ (2)	$1,608 \pm 0,168^*$ (2)

* Desvio padrão

Entre parentesis está indicado o nº de análises efectuadas para cada concentração

Tabela 33 - Concentração em fenóis (mg GAE/L) para os ensaios de lixiviação a $T=37 \pm 2^\circ\text{C}$ e $T=50 \pm 2^\circ\text{C}$ dos bagaços de azeitona

	$T= 37 \pm 2^\circ\text{C}$	$T= 50 \pm 2^\circ\text{C}$
Parâmetros Ensaio	Concentração Fenóis (mg GAE/L)	Concentração Fenóis (mg GAE/L)
Lixiviado de 1g de bagaço seco	66	$79 \pm 22^{1)}$ (2) ²⁾
Lixiviado de 2g de bagaço seco	120	$104 \pm 8^{1)}$ (2) ²⁾
Lixiviado de 5g de bagaço seco	306	$258 \pm 23^{1)}$ (2) ²⁾
Lixiviado de 0,5g de bagaço húmido	60	$27 \pm 4^{1)}$ (4) ²⁾
Lixiviado de 1g de bagaço húmido	87	$70 \pm 9^{1)}$ (2) ²⁾

¹⁾ Desvio padrão

²⁾ Nº de análises efectuadas para cada concentração

Apesar de alguma variabilidade, estes resultados indicam a presença, no licor sobrenadante, de um elevado teor de matéria orgânica solubilizada, a qual pode incluir lignina, proteínas e fenóis.

4.2.2 Biodegradação anaeróbia de bagaço de azeitona

O processo biodegradação anaeróbia é consequência de uma série de reacções metabólicas de vários grupos de microrganismos, durante as quais a matéria orgânica é decomposta (Eliyan, 2007), gerando produtos que podem ser valorizados a nível económico e ambiental. A valorização energética do bagaço de azeitona, para produção de biogás, constitui uma via alternativa aos processos clássicos de tratamento de resíduos, contribuindo em simultâneo para a diminuição do impacto ambiental associado à descarga directa destes nos ecossistemas. Os ensaios de degradação em descontínuo, permitem uma recolha de dados e de informação sobre a viabilidade de aplicação dos processos anaeróbios à valorização destes resíduos relevante e pertinente, nomeadamente por se tratarem de substratos complexos, podendo seguir-se a cinética envolvida (incluindo o tempo de reacção). Neste contexto, procedeu-se ao estudo da degradação do bagaço de azeitona de diferentes características em processos descontínuos anaeróbios.

4.2.2.1. Caracterização da biomassa

No início do ensaio caracterizou-se a biomassa anaeróbia mista utilizada quanto à concentração de sólidos suspensos (SS) e de sólidos suspensos voláteis (SSV) (Tabela 34), verificando-se que o inóculo continha um elevado teor de inertes (cerca de 83%).

Tabela 34 - Concentração de sólidos suspensos (SS) e de sólidos suspensos voláteis (SSV) presentes no inóculo para o ensaio da biodegradação dos bagaços de azeitona a $37 \pm 2^\circ\text{C}$

SS (g/L)	SSV (g/L)
20,9	3,53

4.2.2.2. Biodegradação anaeróbia de bagaço de azeitona seco e húmido

No presente subcapítulo foi analisada a biodegradação anaeróbia em regime mesófilo do bagaço de azeitona seco e húmido. Com base nos resultados obtidos nos ensaios de lixiviação, optou-se por se utilizarem massas de bagaço para as quais se obtiveram lixiviados mais concentrados. Esta maior concentração de matéria orgânica presente nos lixiviados, faz com que o substrato a degradar esteja mais disponível à população microbiana. Os ensaios foram desenvolvidos em quadruplicado (Tabela 35). Selecionou-se para este estudo uma massa de bagaço seco de 5g e de bagaço húmido de 1g, pelo facto dos lixiviados apresentarem nestas condições características relativamente próximas (Tabelas 28 a 33), nos parâmetros analisados. Saliente-se porém que o teor de fenóis era cerca de 3,5 vezes superior no bagaço seco (Tabela 33), podendo implicar um processo de degradação mais lento.

Tabela 35 - Caracterização dos ensaios desenvolvidos para a biodegradação do bagaço de azeitona.

Parâmetros Ensaio	Massa de Bagaço (g)	Volume Inóculo (mL)	Volume meio base (mL)
Bbs.1 Bbs.2 Bbs.3 Bbs.4	5 g de bagaço de azeitona seco	10	50
Bbh.I Bbh.II Bbh.III Bbh.IV	1 g de bagaço de azeitona húmido	10	50

Ao longo do ensaio, a biodegradação do bagaço de azeitona foi quantificado a partir da medição do biogás produzido, da análise da CQO e pela leitura dos espectros de cada recolha. Os resultados da CQO inicial e final, assim como a produção cumulativa de biogás estão

apresentados na Tabela 36. Considerou-se como CQO inicial o valor máximo obtido em cada ensaio de lixiviação. Em todos os casos até ao 6º dia, verificou-se um aumento do valor da CQO, que se pode atribuir à lixiviação mais acentuada dos compostos solúveis do bagaço.

Tabela 36 - Resultados obtidos para o biogás acumulado e para a CQO final e inicial do processo

Parâmetros		CQO Máximo*	CQO Final	% CQO	Tempo do ensaio	Biogás Acumulado
Ensaio		(mg CQO/L)	(mg CQO/L)	removido	(dias)	(mL)
Bbs.1	5g bagaço seco	2665	562	78,9	100	67
Bbs.2			672	74,8	100	57
Bbs.3			630	76,4	100	54
Bbs.4			713	73,2	100	34
Bbh.I	1g bagaço húmido	2911	219	92,5	28	92,5
Bbh.II			219	92,5	28	41**
Bbh.III			260	91,1	28	34**
Bbh.IV			260	91,1	28	40

* Considerando o valor da CQO final dos lixiviados a $37 \pm 2^\circ\text{C}$

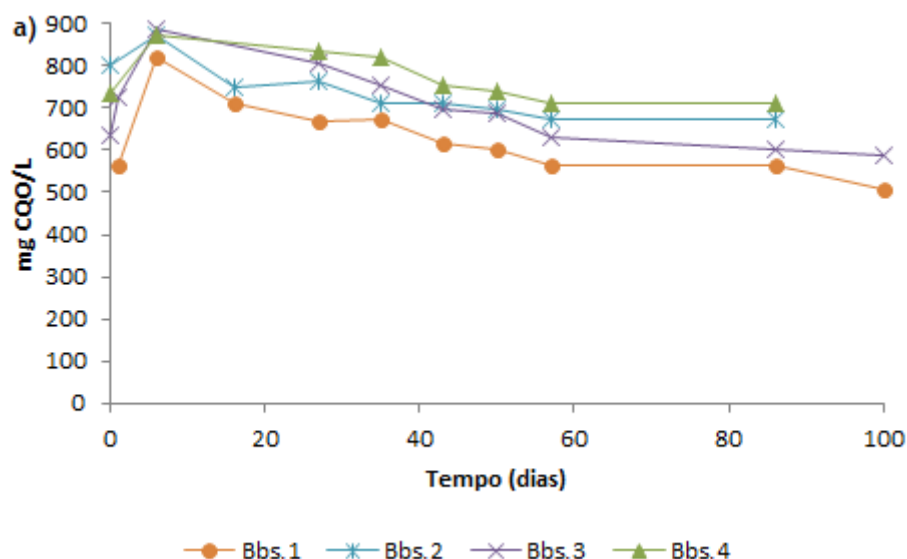
**Foram registadas fugas significativas durante o processo de medição

Apesar dos ensaios terem sido desenvolvidos em quadruplicado, exibem comportamentos diferentes, principalmente na evolução da CQO residual (Figura 55). As variações no valor da CQO durante a fase inicial da reacção podem dever-se a uma homogeneização insuficiente da amostra do bagaço utilizado em cada ensaio, ou ainda a uma deficiente agitação da mistura reaccional durante o decorrer do ensaio. O bagaço húmido é constituído por uma mistura complexa de óleo residual e de água residual do processo de extracção e de vegetação residual, tornando-se difícil uma homogeneização eficiente da amostra. Para o bagaço seco observou-se um teor de CQO máximo no vaso de incubação no 6º dia de ensaio, altura a partir da qual a CQO diminui paulatinamente. Para a mesma temperatura de ensaio, a CQO máxima obtida nos lixiviados para 5g de bagaço seco foi de 2665 mg CQO/L (Tabela 28), valor significativamente mais elevado do que a CQO residual obtida no final dos ensaios (entre 562-713 mg CQO/L). Estes resultados indicam claramente que ocorreu degradação da matéria orgânica que se vai solubilizando, sendo a remoção obtida de 73,2 a 78,9% (Tabela 36). O processo de metabolização dos substratos é contudo lento, sendo necessários cerca de 100 dias para se obterem teores de degradação relevantes. Relativamente à variação da CQO residual para os ensaios com bagaço húmido observou-se uma variabilidade acentuada nos resultados na fase inicial da reacção (Figura 55 (b)). Considerando a evolução da CQO nos ensaios de lixiviação para o bagaço húmido (Figura 53 (b)) pode dizer-se que a solubilização dos compostos ocorre predominantemente nas primeiras 24 horas (1 dia), devendo os valores da CQO ser bastante elevados. Assim, considera-se que estes ensaios necessitam de ser confirmados, devendo-se prestar particular atenção quer à homogeneização da amostra do

bagaço a analisar, quer à agitação magnética durante os ensaios de degradação, quer à recolha da amostra a analisar para quantificação da CQO.

A partir dos 5 dias de ensaio a CQO tende sempre a diminuir, confirmando a ideia de que a lixiviação é de facto significativa na fase inicial. O facto de ocorrer uma lixiviação de compostos de forma rápida e acentuada, pode implicar a existência de períodos de aclimatização mais alargados, uma vez que a população anaeróbia não estava adaptada a este tipo de substratos complexos. Por outro lado, convém realçar, pela evolução da CQO inicial, das primeiras 24h (Figura 55), que o processo de hidrólise de matéria complexa, seguida da fermentação anaeróbia, se inicia rapidamente, estando praticamente completo para o bagaço húmido nos primeiros 15 dias de ensaio.

O biogás acumulado em resultado da degradação da matéria orgânica variou no bagaço seco entre 54 e 67 mL (Figura 56 (a)), sendo por grama de bagaço seco de 11 a 13 mL. Desprezou-se o valor obtido no ensaio Bbs4 por ser muito inferior, indiciando fugas no sistema. Para o bagaço húmido os resultados não são concordantes, pois o valor deveria ser superior ao medido no bagaço seco, pelo que se apresentam os resultados obtidos experimentalmente a título meramente exemplificativo (Figura 56 (b)). Pode apenas referir-se que por grama de bagaço húmido a produção deveria ter sido cerca de 7 vezes superior à obtida para igual massa de bagaço seco (pelos dados obtidos, a produção variou entre 34-92,5 mL/g_{bagaço húmido}), sendo o resultado de 92,5 mL o mais próximo do valor esperado. Refira-se o facto de terem ocorrido fugas significativas durante o processo de medição do biogás nos ensaios Bbh.II e Bbh.III.



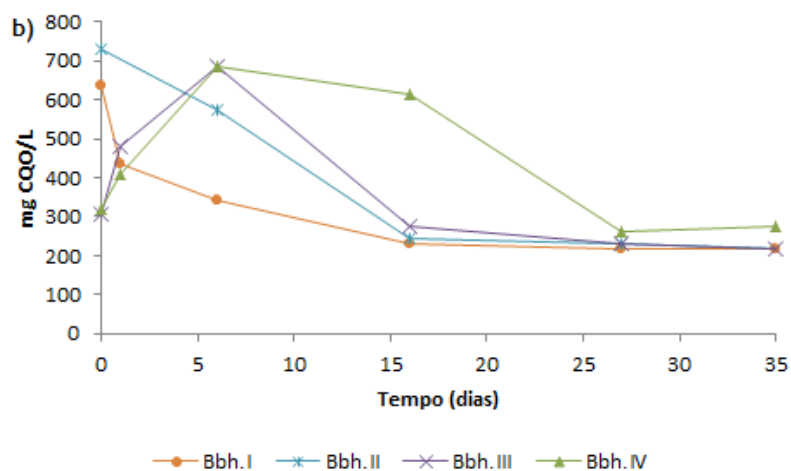


Figura 55 - CQO obtido, a $T = 37 \pm 2^\circ\text{C}$ para o : (a) Bagaço de azeitona seco e (b) Bagaço de azeitona húmido

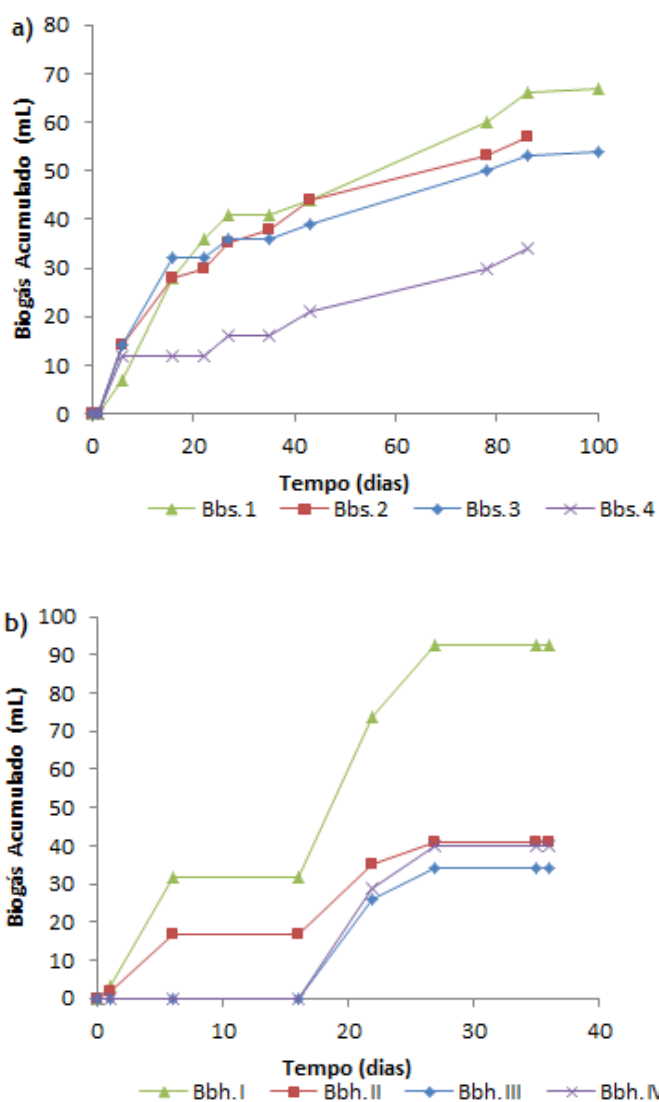


Figura 56 - Biogás acumulado a $T = 37 \pm 2^\circ\text{C}$ para: (a) Bagaço de azeitona seco e (b) Bagaço de azeitona húmido

Com base nestes resultados, verifica-se que é no ensaio Bbs.1 que se obteve uma maior produção de biogás. À medida que o valor da CQO diminui, a produção de biogás aumenta, o que exprime a conversão do substrato em biocombustível (Figura 57).

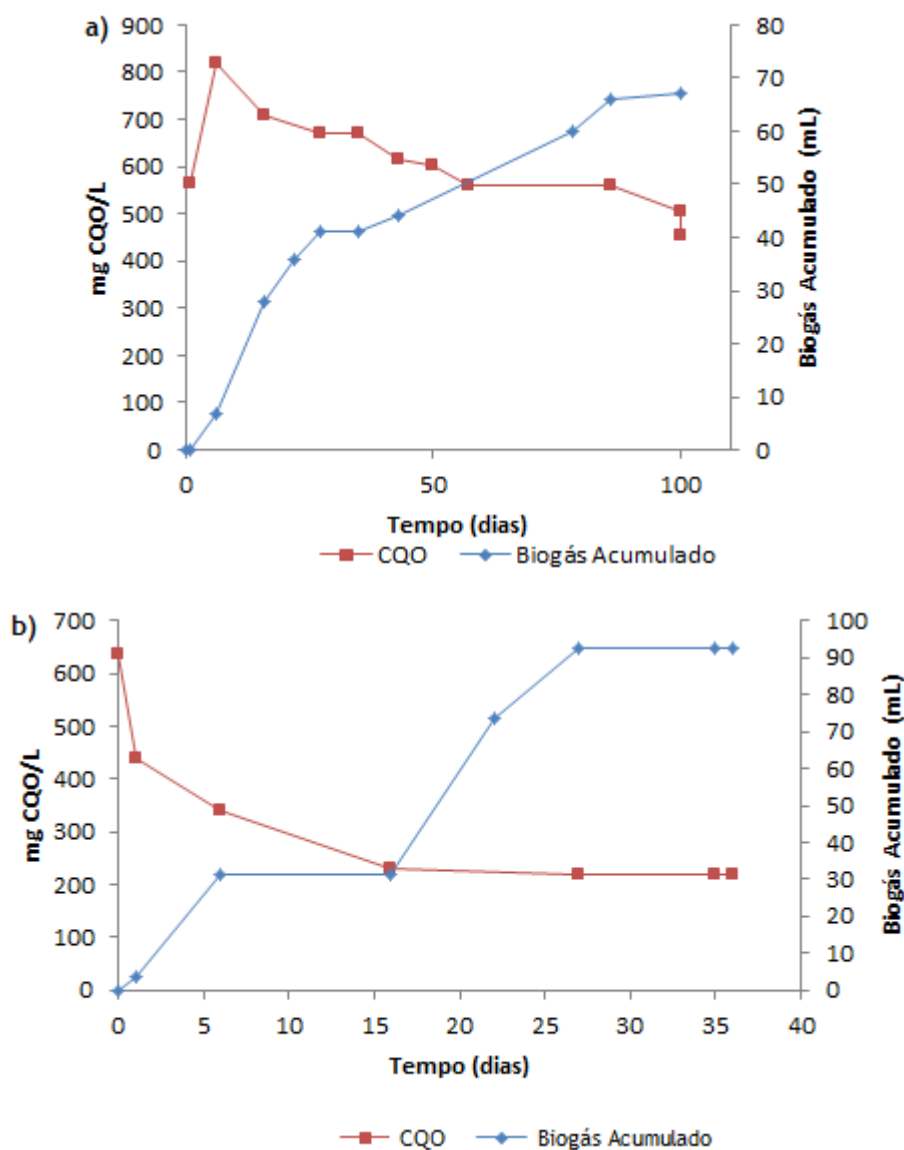


Figura 57 - Relação entre a CQO e o biogás acumulado, a $T= 37 \pm 2^{\circ}\text{C}$, obtido para o ensaio: (a) Bbs.1 e (b) Bbh.1

Note-se que, apesar do tempo de reacção para o ensaio referente ao bagaço húmido ser menor, a percentagem de remoção da CQO é maior, quando comparada ao valor obtido para o bagaço seco (Tabela 36).

A evolução dos espectros ao longo do tempo (Figura 58) manteve-se para o bagaço seco praticamente constante, bastante diferente da evolução observada para os ensaios com o bagaço húmido. Neste último, as absorvâncias aumentam nas primeiras 24 horas, diminuindo a partir desta altura, estando este tipo de resposta de acordo com a obtida para a evolução

da CQO em alguns dos ensaios (Figura 55 (b)). Para o bagaço seco, o facto do processo de lixiviação ocorrer de forma mais lenta, pode favorecer o processo de adaptação de culturas mistas de microrganismos aos novos substratos. Todavia, o teor de fenóis mais elevado a par da presença de ácidos húmicos (Silva, 2009), que vão sendo lixiviados (Tabela 33), pode ajudar a explicar um processo de degradação mais lento, e valores de absorvância mais elevados (Figuras 55 (a) e 58 (a)) registados nestes ensaios. De acordo com a literatura sobre o assunto, os compostos fenólicos podem originar a inibição de alguma população anaeróbia (Eliyan, 2007).

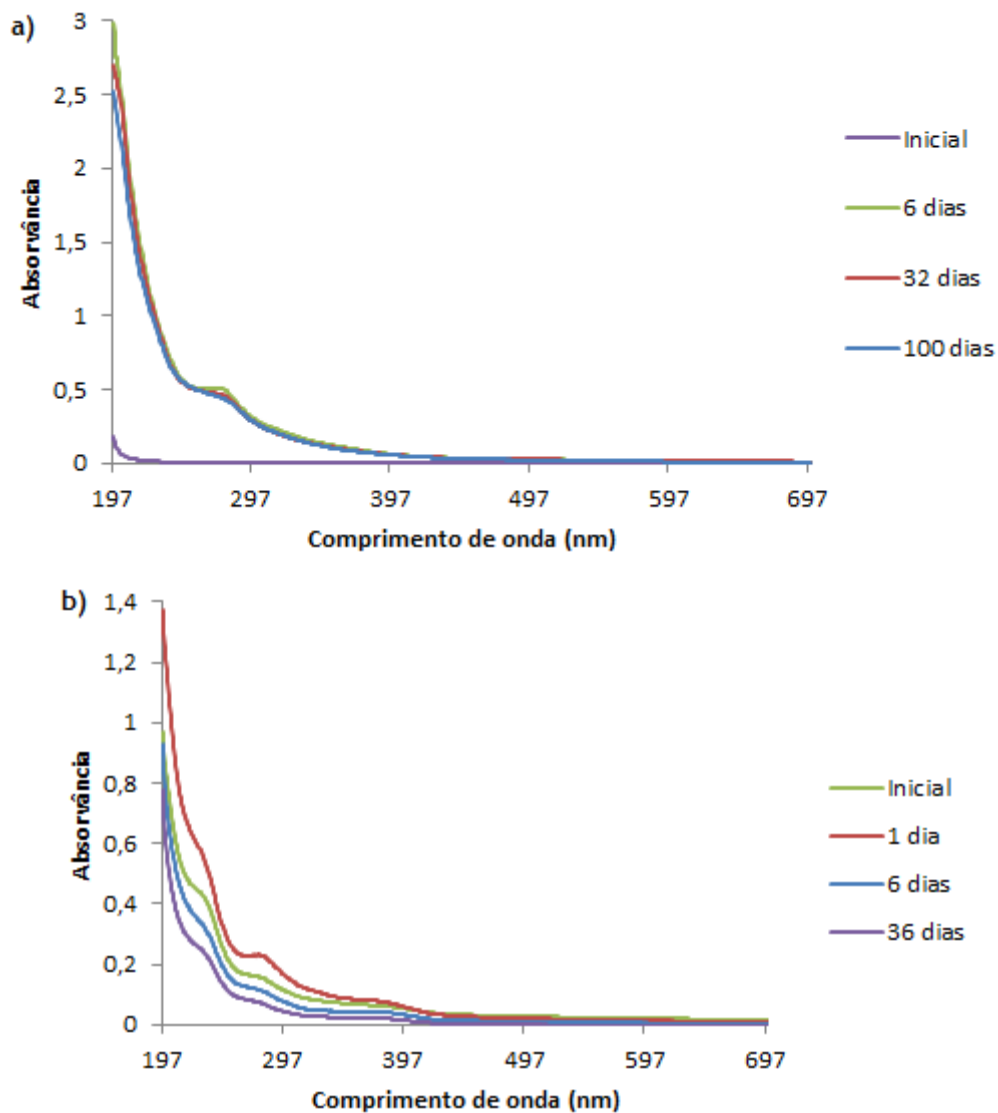


Figura 58 - Espectros (diluídos de 1:10), obtidos para a biodegradação a $T = 37 \pm 2^\circ\text{C}$ para o ensaio: (a) Bbs.1 e (b) Bbh.I

A diferença na composição do bagaço pode estar associada à presença de lípidos em teores mais elevados nos lixiviados do bagaço húmido. Sabe-se que o bagaço obtido nestas

condições, ainda contém um teor significativo de matéria gorda (subcapítulo 2.3.2), estando por isso presente na fase líquida em contacto com este bagaço. Como se sabe os lípidos são hidrolisados, na primeira fase do processo de digestão anaeróbia, a ácidos gordos de cadeia longa, que são depois consumidos por microrganismos durante a fase acidogénica. A fase de hidrólise tem um papel fundamental na quantidade de biogás produzido, na velocidade da reacção global e pode ser o passo determinante do processo (Carvalho, 2010). Considerando os valores referidos na literatura sobre o assunto para a composição do bagaço seco e do bagaço húmido (Rincon *et al.*, 2008; Silva, 2009), verifica-se que estes são ricos em carbono e apresentam um elevado teor em celulose (18-20%), proteína, gordura, açúcares e lignina (13-15%). Entre os compostos orgânicos presentes no bagaço húmido incluem-se açúcares (3%), ácidos gordos voláteis (C2-C7) (1%), proteínas (1,5%), pigmentos (0,5%), polifenóis (0,2%) e polialcoóis (0,2%) (Borja *et al.*, 2003; Rincon *et al.*, 2008; Silva, 2009). Para além disso, de acordo com Silva (2009), os bagaços secos têm uma elevada razão C/N e são pobres em nutrientes, facto que pode ser determinante na escolha dos processos anaeróbios para a sua tratabilidade e valorização.

A celulose é um polímero facilmente hidrolisável, e a hemicelulose é constituída por açúcares igualmente degradáveis. Porém, a lignina está ligada à celulose e hemicelulose formando uma estrutura de difícil acesso aos microrganismos, e pode ter efeito inibitório sobre as populações, embora esse efeito seja temporário, visto haver possibilidade das populações se regenerarem e reiniciarem o processo de conversão dos substratos. Este comportamento observado por outros autores no estudo da degradação anaeróbia mesofílica de compostos lenhocelulósicos (Rincon *et al.*, 2008), está de acordo com os resultados obtidos no presente trabalho.

Com base nos resultados obtidos, é possível que o facto dos lípidos presentes em maior quantidade no bagaço húmido (cerca de 2,5 a 3% de azeite é retido na polpa (Rincon *et al.*, 2008)), terem como co-substratos proteínas e açúcares, favoreça a sua degradabilidade, diminuindo potenciais efeitos inibitórios associados à presença de ácidos gordos voláteis de cadeia longa (Cirne *et al.*, 2007). A própria temperatura de processo pode aumentar a solubilidade dos compostos orgânicos (Apples *et al.*, 2008) no meio reaccional fazendo com que sejam mais facilmente metabolizados. Como a hidrólise pode ser a etapa que define a velocidade do processo (Angelidaki *et al.*, 2004; Carvalho, 2010), a rápida conversão dos ácidos gordos, que depois são consumidos pelos microrganismos durante a fase acidogénica, resulta numa velocidade de degradação mais elevada e conseqüentemente numa maior produção de biogás.

As celulosas e hemicelulosas, por hidrólise podem originar açúcares, nomeadamente pentoses (xilose e arabinose) e hexoses (glucose, manose e galactose), que são substratos das bactérias fermentativas (fase acidogénica). As ligninas podem ser transformadas em polifenóis e fenóis

e estes últimos são passíveis de metabolização por microrganismos anaeróbios (Yadvika *et al.*, 2003; Deublein & Steinhäuser, 2008; Civit, 2009 ; Carvalho, 2010; Botheju *et al.*, 2011 Barakat *et al.*, 2012).

No bagaço húmido, tanto o processo de lixiviação/solubilização dos compostos como a degradação, ocorrem em tempos de ensaio mais curtos, comparativamente aos observados para o estudo do bagaço seco. O elevado grau de humidade, bem como o teor mais elevado de compostos hidrofílicos, proporcionam a formação de lixiviados mais concentrados para igual massa de bagaço. A presença desta matéria orgânica favorece o desenvolvimento das populações anaeróbias, originando a formação de biogás. Assim, no processo produtivo, a diminuição do caudal de águas ruças em detrimento da formação de um bagaço húmido como resíduo, pode ser uma boa escolha, pois verifica-se um elevado grau de tratabilidade.

A produção média de biogás, tal como foi efectuado para os ensaios da biodegradação da vanilina e do siringaldeído, estão apresentados na Tabela 37.

Tabela 37 - Produção média de biogás

Parâmetros Ensaio	Produção média de biogás (mL biogás/(g SSV _(biomassa) ·dia))	Produção média de biogás (mL biogás/(g _(bagaço) ·dia))
Bbs.1	19,0	0,13
Bbs.2	16,1	0,11
Bbs.3	15,3	0,11
Bbs.4	9,6	0,07
Bbh.I	93,5	3,30
Bbh.II	_____	_____
Bbh.III	_____	_____
Bbh.IV	_____	_____

Relativamente aos valores apresentados na Tabela 37, é no ensaio Bbh.I que a quantidade média de biogás produzido é maior. No caso do bagaço seco, a quantidade média de biogás produzido variou entre 18 e 22 mL_{biogás}/g_{SSV}·dia (admite-se que no caso Bbs.4 tenham ocorrido fugas de biogás).

A degradação da proteína, azoto amoniacal, ligninas LS, LT e LPA e concentração de fenóis foi monitorizada por quantificação destes compostos no final dos ensaios de biodegradação (Tabelas 38 a 41) e de lixiviação (Tabelas 30 a 33).

Tabela 38 - Concentração residual de azoto amoniacal (mg NH₃-N/L) e respectiva % de remoção para os ensaios de biodegradação dos bagaços de azeitona a T=37 ± 2°C

Parâmetros Ensaio	Azoto Amoniacal (mg (NH ₃ -N)/L)	% Remoção* (NH ₃ -N)
Bbs. 1	29	43,1
Bbs. 2	25	51,0
Bbs. 3	26	49,0
Bbs. 4	27	47,0
Bbh. I	16	60,0
Bbh. II	15	62,5
Bbh. III	13	67,5
Bbh. IV	11	72,5

*Considerando o teor de NH₃-N lixiviados

Tabela 39 - Concentração residual do teor de proteína e respectiva % de remoção para os ensaios de biodegradação dos bagaços de azeitona a T=37 ± 2°C

Parâmetros Ensaio	Teor Proteína (g/L)	% Remoção* (Teor Proteína)
Bbs. 1	0,045	74,8
Bbs. 2	0,035	80,3
Bbs. 3	0,029	83,7
Bbs. 4	0,044	72,3
Bbh. I	0,027	87,0
Bbh. II	0,027	87,0
Bbh. III	0,026	87,5
Bbh. IV	0,042	79,8

*Considerando o teor de proteína lixiviados

Considerando os valores obtidos na caracterização efectuada aos lixiviados a 37 ± 2°C (Tabelas 30 a 33) pode dizer-se que, após os ensaios de biodegradação anaeróbia efectuados à mesma temperatura, que houve uma remoção significativa dos compostos analisados (Tabelas 38 a 41), corroborando os resultados obtidos para a CQO e biogás (Tabela 36). Verificou-se, em geral, uma tendência para taxas mais elevadas de remoção da matéria solubilizada nos ensaios com bagaço húmido, em particular para a lignina precipitada em meio ácido (LPA) (Tabela 40) e fenóis (Tabela 41).

Tabela 40 - Concentração residual de SS, SSV, Cinzas, LS, LPA e LT e % de remoção de LS e LPA para os ensaios de biodegradação dos bagaços de azeitona a $T=37 \pm 2^\circ\text{C}$

Parâmetros Ensaio	LS (g/L)	LPA (g/L)	LT (g/L)	SS (g/L)	SSV (g/L)	Cinzas (g/L)	% Remoção LS*	% Remoção LPA*
Bbs.1	0,023	0,272	0,295	0,417	0,317	0,100	78,9	78,2
Bbs.2	0,015	0,298	0,313	0,400	0,333	0,067	86,2	76,1
Bbs.3	0,020	0,304	0,324	0,383	0,333	0,050	81,6	75,6
Bbs.4	0,016	0,489	0,505	0,550	0,533	0,017	85,3	60,8
Bbh.I	0,015	0,143	0,158	0,270	0,170	0,100	83,7	94,5
Bbh.II	0,017	0,213	0,230	0,260	0,240	0,020	81,5	92,5
Bbh.III	0,014	0,134	0,148	0,180	0,160	0,020	84,8	95,5
Bbh.IV	0,013	0,208	0,221	0,260	0,250	0,010	85,6	92,7

*Considerando o teor de LS e LPA lixiviados

Tabela 41 - Concentração residual de fenóis e respectiva % de remoção para os ensaios de biodegradação dos bagaços de azeitona a $T=37 \pm 2^\circ\text{C}$

Parâmetros Ensaio	Fenóis (mg GAE/L)	% Remoção fenóis*
Bbs.1	71	76,8
Bbs.2	67	78,1
Bbs.3	65	78,8
Bbs.4	86	71,9
Bbh.I	3	96,6
Bbh.II	3	96,5
Bbh.III	4	95,4
Bbh.IV	5	94,3

*Considerando o teor de concentração de fenóis lixiviados

Capítulo V - Conclusão e perspectivas de trabalho futuro

A aplicação das tecnologias de digestão anaeróbia tem actualmente como objectivo fundamental o reaproveitamento de sub-produtos e resíduos que permitem simultaneamente a sua valorização como biocombustível, contribuindo para a produção de energia de forma sustentada, bem como a sua valorização orgânica, gerando como produto final uma biomassa estabilizada que eventualmente, após tratamento de polimento, poderá ser aplicada para fins agrícolas (composto). Neste contexto, seleccionou-se um estudo comparativo sobre a degradabilidade anaeróbia do bagaço seco (processo de 3 fases) e de bagaço húmido (processo de duas fases) gerados como resíduo na produção de azeite, em regime mesófilo.

Numa primeira etapa do trabalho experimental efectuaram-se ensaios de degradação de compostos modelo derivados da lignina, aldeídos fenólicos, visto que os polifenóis podem ter efeitos bacteriostáticos, sendo de difícil degradação. Os resultados indicaram que o siringaldeído é degradado mais rapidamente do que a *o*-vanilina, por populações mistas anaeróbias adaptadas a glucose (subcapítulo 4.1.). A presença de co-substratos directos de populações acidogénicas, acetogénicas e metanogénicas contribuem para uma diminuição do tempo necessário à degradação destes compostos. Por exemplo, por análise dos espectros de UV-visível e na presença de 3g/L de uma mistura de glucose e acetato de sódio (a+g), a degradação ocorre em cerca de 18 dias, tempo bastante inferior ao necessário para obter uma degradação idêntica quando alimentada como substrato único (Figuras 41 e 42). A degradação do siringaldeído na presença de co-substratos tende a seguir uma cinética de pseudo-primeira ordem, verificando-se um aumento da constante de velocidade cinética (*k*) com a adição de co-substratos (Tabela 22).

A *o*-vanilina, apesar de apresentar uma estrutura química muito similiar à do siringaldeído, demonstrou ser um composto de degradação mais lenta, observando-se neste caso, claramente, a formação de um patamar, sendo necessário cerca de 60 dias para se iniciar o processo de degradação efectivo, mesmo na presença de co-substratos (Figura 49). Comparando as curvas cumulativas de biogás para o siringaldeído (Figuras 45 e 46) e *o*-vanilina (Figuras 50 e 51), pode referir-se que na *o*-vanilina a produção tende a manter-se constante num período de tempo que coincide com o patamar observado para o valor da CQO, observando-se a partir do dia 90 um aumento mais acentuado da sua produção (até aos 120 dias), sendo no siringaldeído a produção mais acentuada para tempos inferiores a 40 dias.

Em média, a produção de biogás foi de 532 mL/g de siringaldeído e de 418 mL biogás/ g mistura a 50% de *o*-vanilina e solução de glucose e acetato de sódio. Estes resultados sugerem

uma menor taxa de conversão da *o*-vanilina, pois mesmo na presença de substratos facilmente metabolizáveis originam uma menor produção de biogás.

Atendendo a que nos resíduos de agro-industriais a formação de siringaldeído e vanilina, por hidrólise das ligninas, ocorre na presença de outros co-substratos como açúcares, proteínas e lípidos, admite-se que em resíduos reais a sua biodegradabilidade seja favorecida. Neste contexto, o estudo do efeito da adição de outros co-substratos complexos a estes compostos fenólicos seria um trabalho futuro a propor. Para uma melhor compreensão da degradação de compostos fenólicos simples e polifenóis seria ainda interessante analisar o efeito da temperatura e da separação de fases no processo de digestão anaeróbia, bem como da mistura de compostos fenólicos na presença de co-substratos.

A análise preliminar do estudo destes compostos fenólicos permitiu um melhor entendimento sobre o comportamento de populações mistas anaeróbias durante o processo de bio-remediação de resíduos sólidos gerados na produção de azeite. Na segunda etapa do presente estudo avaliou-se o potencial de produção de biogás durante a degradação anaeróbia de bagaços seco e húmido, recolhidos numa unidade de processamento de azeite da Beira Interior. Optou-se por estudar a sua degradação por via húmida, pois o processo de biodegradação efectuado por microrganismos é bastante mais eficaz na presença de elevados teores de humidade. Os compostos orgânicos, antes de serem metabolizados pelas culturas microbiológicas são solubilizados, para posterior hidrólise a compostos mais pequenos, por exo-enzimas e finalmente metabolizados no interior das células.

Os testes preliminares de lixiviação indicaram que para se obter uma carga orgânica (expressa em CQO), aproximadamente igual em ambos os bagaços, deveriam-se estudar massas diferentes. Para o bagaço seco seleccionou-se uma massa de 5g ($CQO_{\text{lixiviado}} \approx 2665 \text{ mgCQO/L}$) e para o húmido uma massa de 1 g ($CQO_{\text{lixiviado}} \approx 2911 \text{ mgCQO/L}$). A caracterização dos lixiviados dos bagaços, efectuado a $37 \pm 2^\circ\text{C}$, indicou uma presença significativa de matéria orgânica constituída por azoto amoniacal, proteína, lignina (solúvel e precipitada em meio ácido) e ainda de fenóis (Tabelas 30 a 33). A lixiviação de compostos ocorre de forma mais acentuada nos primeiros dias de ensaio, sendo mais elevada para o bagaço húmido, principalmente nas primeiras horas (Figura 53). No geral pode referir-se que a lixiviação é predominante nos primeiros 5-6 dias.

Apesar de se ter efectuado a sua caracterização a $50 \pm 2^\circ\text{C}$, não se deu muita relevância a este estudo, pois durante o decorrer do trabalho experimental não foi possível efectuar ensaios de biodegradação em regime termófilo, ficando esta tarefa a executar como trabalho futuro, de forma a complementar o presente estudo.

Relativamente ao bagaço seco observou-se que o processo de degradação dos lixiviados é significativamente mais lento (pelo menos 100 dias) do que para o bagaço húmido (que ocorre predominantemente em cerca de 20 dias) (Figura 54). A diferença na composição físico-química destes bagaços pode explicar a diferença de resposta nos testes efectuados.

Refira-se todavia que, considerando o valor máximo obtido para os diferentes parâmetros nos lixiviados, obtiveram-se boas eficiências de remoção de matéria orgânica. Para o bagaço seco a remoção de CQO variou de 73-79%, a de azoto amoniacal de 43-51%, a de proteína de 72-84%, a de LPA de 61-78% e a de fenóis de 72 a 79%. Estes valores foram no geral inferiores aos obtidos no estudo do bagaço húmido (Tabela 42), indiciando uma melhor eficiência de tratamento deste tipo de resíduos. Pela CQO removida estima-se que a produção de biogás neste resíduo se aproxime, no caso do bagaço seco, do valor experimental ($11 - 13 \text{ mL/g}_{\text{bagaço seco}}$), devendo no bagaço húmido ser cerca de 7 vezes superior.

Tabela 42 - Eficiência de tratamento obtida no bagaço seco e no bagaço húmido a $37 \pm 2^\circ\text{C}$

Parâmetros \ %Remoção	Bagaço seco	Bagaço húmido
CQO	73-79	91-94
Azoto Amoniacal	43-51	60-72
Concentração de proteína	72-84	80-88
Lignina (LPA)	61-78	92-95
Fenois	72-79	94-97

Face aos resultados alcançados deve-se salientar a importância da biometanização do bagaço húmido, o qual além de ser eficientemente degradado, apresenta um elevado potencial energético, evitando-se simultaneamente na prática, a produção de águas ruças no processo produtivo, caracterizadas pela sua elevada carga orgânica de difícil remediação. A composição do bagaço húmido parece favorecer o processo de degradação anaeróbia por via mesófila, em detrimento do bagaço seco, resíduo para o qual se pode eventualmente optar por uma via de valorização alternativa e indicada na literatura sobre o assunto como, por exemplo, a compostagem e posterior aplicação do composto como correctivo de solos, alimentação animal e como combustível.

Em condições idênticas de degradação anaeróbia mesófila, obtiveram-se para 1 g de resíduo de indústrias agro-alimentares os resultados apresentados na Tabela 43.

Tabela 43 - Resultados comparativos da degradação anaeróbia mesófila de diferentes resíduos de indústrias agro-alimentares

Resíduo	Biogás ($\text{mL}_{\text{biogás}}/\text{g}_{\text{SSV}} \cdot \text{d}$)
Dreche cervejeira ⁽¹⁾	19-36
Bagaço de uva ⁽²⁾	43-65
Bagaço de azeitona húmido	93,5
Bagaço de azeitona seco	15-19

⁽¹⁾ (Tomé, 2009)

⁽²⁾ (Oliveira, 2011)

No domínio da degradação anaeróbia e de forma a investigar mais detalhadamente os mecanismos intervenientes nestes processos, são ainda propostos alguns outros aspectos de trabalho futuro:

- Ensaio de biodegradação do bagaço de azeitona seco e húmido em regime termófilo.
- Co-remediação com outros bagaços nomeadamente de uva, visto apresentar uma composição diferente e um potencial de biogás semelhante.
- Ensaio de degradação de lípidos presentes no bagaço de azeitona e na presença de co-substratos.
- Análise do teor de CH_4 .
- Caracterização microbiológica da população para identificar as espécies dominantes envolvidas na degradação.
- Digestão anaeróbia em fases (hidrólise, acidogénese e metanogénese), desenvolvendo cada fase da degradação com espécies microbianas específicas.

O objectivo das propostas de trabalho futuro é o de se adquirir um conhecimento mais profundo do tema e da viabilidade do processo como tecnologia de valorização.

Bibliografia

Agostini-Costa, T; Gurruti, D; Lima, L; Freire, S; Abreu, F; Feitosa, T. (1999). “Avaliação de metodologias para a determinação de taninos no suco de caju”; B.CEPPA, Curitiba, 17, 2:167-176.

Aires, C. (2007). “Contribuição para o estudo da aplicação de subprodutos da indústria de extração de azeite em solos agrícolas - Efeito sobre alguns parâmetros químicos indicadores do estado de fertilidade do solo, o estado de nutrição e produtividade de algumas culturas”. Dissertação de Doutorado, Instituto Superior de Agronomia, Universidade Técnica de Lisboa.

Albuquerque, J; Gonzalvés, J; García, D; Cegarra, J. (2004). “Agrochemical characterisation of ‘alperujo’, a solid by-product of the two-phase centrifugation method for olive oil extraction”. *Bioresource Technology*, 91:195-200

Angelidaki, I; Sanders, W. (2004). “Assessment of the anaerobic biodegradability of macropollutants”. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*, 3: 117-129.

Angelo, P; Jorge, N. (2007). “Compostos fenólicos em alimentos - Uma breve revisão”. *Revista do Instituto Adolfo Lutz*, 66(1): 232-240.

APHA AWWA, 2005, *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*, 21 th edition., American Public Health Association/ American Water Works Association/Water Environment Federation, Washington DC, USA.

Appels, L; Baeyens, J; Degève, J; Dewil R. (2008). “Principles and potential of the anaerobic digestion of waste-activated sludge”. *Progress in Energy and Combustion Science*, 34:755-781

Awad, A; Salman, H; Hung, Y. (2006). “Olive Oil Waste Treatment”. Taylor & Francis Group, LLC.

Bahri, H; Dignac, M; Rumpel, C; Rasse, D; Chenu, C; Mariotti, A. (2006). “Lignin turnover kinetics in an agricultural soil is monomer specific”. *Soil Biology & Biochemistry*, 38:1977-1988.

Bahri, H; Rasse, D; Rumpel, C; Dignac, M; Bardoux, G; Mariotti, A. (2008). "Lignin degradation during a laboratory incubation followed by ¹³C isotope analysis". *Soil Biology & Biochemistry*, 40:1916-1922

Barakat. A; Monlau, F; Steyer, J.P; Carrere, H. (2012). "Effect of lignin-derived and furan compounds found in lignocellulosic hydrolysates on biomethane production". *Bioresource Technology*, 104: 90-99

Barbosa, L; Maltha, C; Silva, V; Colodette, J. (2008). "Determinação da relação siringila/guaiacila da lignina em madeiras de eucalipto por pirólise acoplada à cromatografia gasosa e espectrometria de massas (pi-cg/em)". *Quimica Nova*, 31:8, 2035-2041

Benitez, F; Heredia, J; Gonzalez, T; Real, F. (1997). "UV photodegradation of phenolic aldehydes present in industrial wastewaters, *Journal of Environmental Science and Health*". *Environmental Science and Engineering and Toxicology*, 32:9-10, 2599-2612

Benner, R; Maccubbin, A.E; Hodson, R. (1984) "Anaerobic Biodegradation of the Lignin and Polysaccharide Components of Lignocellulose and Synthetic Lignin by Sediment Microflora". *Applied and Environmental Microbiology*, 998-1004

Berry, D; Francis, A; Bollagi, J. (1987). "Microbial Metabolism of Homocyclic and Heterocyclic Aromatic Compounds under Anaerobic Conditions". *Microbiological Reviews*, 51:43-59

Bolaños, J; Rodríguez, G; Rodríguez, R; Guillén, R; Jiménez, A. (2006). "Potential use off olive by-products: Extraction of interesting organic compounds from olive oil waste". *Grasas y Aceites*, 57 (1): 95-106

Borja, R; Rincón, B; Raposo, F; Alba, J; Martín. A. (2002). "A study of anaerobic digestibility of two-phases olive mill solid waste (OMSW) at mesophilic temperature" *Process Biochemistry*, 38:733/742

Borja, R; Rincón, B; Raposo, F; Alba, J; Martín. A. (2003). "Kinetics of mesophilic anaerobic digestion of the two-phase olive mill solid waste" *Biochemical Engineering Journal*, 15:139-145

Borja, R; Rincón, B; Raposo, F; Alba, J; Martín. A. (2004). "Assessment of kinetic parameters for the mesophilic anaerobic biodegradation of two-phase olive pomace" *International Biodeterioration & Biodegradation*, 53:71 - 78

Borja, R; Sánchez,E; Raposo,F; Rincón, B; Jiménez,A; Martín, A. (2006). “A study of the natural biodegradation of two-phase olive mill solid waste during its storage in an evaporation pond”. *Waste Management*, 26:477-486

Bot, A; Benites, J. (2005). “The importance of soil organic matter: Key to drought-resistant soil and sustained food and production”. Food and Agriculture organization of the United Nations (FAO); Rome.

Botheju, D; Bakke, R. (2011). “Oxygen Effects in Anaerobic Digestion - A Review”. *The Open Waste Management Journal*, 4:1-19

Boubaker, F; Ridha, B.C. (2008). “Modelling of the mesophilic anaerobic co-digestion of olive mill wastewater with olive mill solid waste using anaerobic digestion model no.1 (ADM1),” *Bioresource Technology*, 99:6565-6577.

Brás R. (2003), Biodegradação anaeróbia de corantes AZO com culturas mistas e metanogénicas. Tese de Mestrado, UBI, Portugal.

Brites, O; Gafeira, T. (2007). “Biogás”. Planeamento e Produção de Electricidade. Coimbra

Bueno, F; Machareth, M; Panizzon, G; Lopes, G; Mello. J; Leite-Mello, E. (2011). “Development of a UV/VIS spectrophotometric method for analysis of total polyphenols from *Caesalpinia peltophoroides* Benth”. *Quimica Nova*, 15:1-5.

Carvalho, L. (2010). “Avaliação do potencial de produção de biogás a partir de biomassa proveniente de culturas dedicadas e de lamas ETARI”. Dissertação de Mestrado; Instituto Superior de Agronomia, Universidade Técnica de Lisboa.

Centre d'Activités Régionales pour la Production Propre (CAR/PP); Plan d'Action pour la Méditerranée. (2000). “Prévention de la pollution dans la production d'huile d'olive”. Ministère de l'Environnement; Espagne

Chen, W; Ohmiya, K; Shimuzu,S; Kawakami, H. (1985). “Degradation of Dehydrodivanillin by Anaerobic Bacteria from Cow Rumen Fluid”. *Applied and Environmental Microbiology*, 49:211-216.

Cicco N., Lanorte M., Paraggi M., Viggiano M., Lattanzio, V. (2009). A reproducible, rapid and inexpensive Folin-Ciocalteu micro-method in determining phenolics of plant methanol extracts”. *Microchemical Journal*, 91: 107-110.

Cicco, N; Lattanzio, V. (2011). "The Influence of Initial Carbonate Concentration on the Folin-Ciocalteu Micro-Method for the Determination of Phenolics with Low Concentration in the Presence of Methanol: A Comparative Study of Real-Time Monitored Reactions". *American Journal of Analytical Chemistry*, 2:840-848

Cirne, D.G; Paloumet, X; Bjornsson, L; Alves, M.M; Mattiasson, B. (2007). "Anaerobic digestion of lipid rich-waste - Effects of lipid concentration". *Renewable Energy*: 965-975.

Civit, J. (2009). "Anaerobic digestion of slaughterhouse waste: Impact of the LCFA inhibition". Doctoral Dissertation, Escola Tècnica Superior d'Enginyeria Agrària, Universitat de Lleida.

Colberg, P; Young, L. (1985). "Anaerobic Degradation of Soluble Fractions of [¹⁴C-Lignin] Lignocellulose". *Applied and Environmental Microbiology*: 345-349

Cormenzana, A; Jiménez, B; Pareja, M. (1996). "Antimicrobial Activity of Olive Mill Waters (Alpechin) and Biotransformed Mill Wastewater". *International Biodeterioration & Biodegradation*: 283-290

Custódio, T. (2009). "Azeites extra-virgem comerciais: composição em compostos voláteis e relação com parâmetros químicos de qualidade". Dissertação de Mestrado, Universidade do Porto.

Dererie, D. (2010). "Integrated Production of Bioethanol and Biogas from Agricultural Residue: Comparison of Pretreatment Methods Using Mass Flow and Energy Yields Analysis". Master's Thesis. Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala

Deublein, D; Steinhauser, A. (2008). "Biogas from Waste and Renewable Resources: An Introduction". WILEY & Co.; Weinheim

Eliyan, C. (2007). "Anaerobic digestion of municipal solid waste in thermophilic continuous operation". Master's Thesis. Institute of Technology School of Environment, Resource and Development; Thailand

ENEAPAI: Estratégia Nacional para os Efluentes Agro-Pecuários e Agro-Industriais. (2007). Ministério do Ambiente, do Ordenamento do Território e do Desenvolvimento Regional.

Fezzani, B; Cheikh, R. (2010). "Two-phase anaerobic co-digestion of olive mill wastes in semi-continuous digesters at mesophilic temperature". *Bioresource Technology*, 101:1628-1634

Freire, R; Pelegrini, R; Kubota, L; Durán, N; Zamora, P. (2000). “Novas tendências para o tratamento de resíduos industriais contendo espécies organocloradas”. *Química Nova*: 23(4).

Freitas, M. (2007). “Avaliação do potencial energético dos resíduos sólidos dos lagares do Alentejo”. Dissertação de Mestrado. Instituto Superior de Agronomia, Universidade Técnica de Lisboa.

Gabinete de Planeamento e Políticas; Ministério da Agricultura, do Desenvolvimento Rural e das Pescas. (2007). “Olivicultura - Diagnóstico Sectorial”.

Gómez, A; Zubizarreta, J; Rodrigues, M; Dopazo, C; Fueyo, N. (2010). “An estimation of the energy potential of agro-industrial residues in Spain”. *Resources, Conservation and Recycling*, 54:972-984

Gurbuz, S; Kiran-Ciliz, N; Yenigun, O. (2004). “Cleaner production implementation through process modifications for selected SMEs in Turkish olive oil production”. *Journal of Cleaner Production*, 12:613-621

Healy, J; Young, L. (1979). “Anaerobic Biodegradation of Eleven Aromatic Compounds to Methane”. *Applied and Environmental Microbiology*, 38(1):84.

Healy, J; Young, L; Reinhard, M. (1980). “Methanogenic Decomposition of Ferulic Acid, a Model Lignin Derivative”. *Applied Environmental Microbiology*, 39(2):436

Heider, J; Fuchs, G. (1997). “Review: Anaerobic metabolism of aromatic compounds” *European Journal of Biochemistry*, 243:577-596

Instituto Nacional de Estatística, 2010, “Estatísticas Agrícolas 2010”. Edição 2011. ISSN 0079-4139

Instituto Nacional de Estatística, 2011, “Estatísticas Agrícolas 2011”. Edição 2012. ISSN 0079-4139

Juanga, J. (2005). “Optimizing dry anaerobic digestion of organic fraction of municipal solid waste”. Master’s Thesis. School of Environment, Resources and Development. Asian Institute of Technology. Thailand

Kaiser, J; Hanselmann, K. (1982). “Aromatic chemicals through anaerobic microbial conversion of lignin monomers”. *Experientia*, 38: 167-176. Switzerland

Karakashev, D; Batstone, D; Angelidaki, I. (2005). "Influence of environmental conditions on methanogenic compositions in anaerobic biogas reactors". *Applied Environmental Microbiology*, 71(1):331-338.

Klinke, H; Thomsen, A; Ahring, B. (2004). "Inhibition of ethanol-producing yeast and bacteria by degradation products produced during pre-treatment of biomass" *Applied Microbiology Biotechnology*, 66: 10-26

Li, J; Yuan, H; Yang, J. (2009). "Review: Bacteria and lignin degradation". *Frontiers of Biology in China*, 4(1): 29-38

Liu, Z. (2011). "Anaerobic codigestion of municipal wastewater sludge and restaurant grease". Master's Thesis, University of Alberta

Lopes L. (2005). Biodegradação anaeróbia de poluentes têxteis em sistemas mesófilos e termófilos. Dissertação de Mestrado, Departamento de Química, UBI, Covilhã.

Louzada, A. (2006). "Avaliação da actividade metanogénica específica de lodos com condicionamento hidrolítico provenientes do sistema UASB+BFs". Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Espírito Santo

Magalhães L.M., Segundo M.A., Reis S., Lima J.L.F.C., Tóth I.V., Rangel A.O.S.S. (2007). "Automatic flow system for sequential determination of ABTS•+ scavenging capacity and Folin-Ciocalteu index: A comparative study in food products"; *Analytica Chimica Acta*, 592: 193-201.

Malheiro, R. (2010). "Influência da cultivar nas características físico-químicas, sensoriais e biológicas de azeitonas verdes descaroçadas". Dissertação de Mestrado. Escola Superior Agrária de Bragança.

Meyer. H.J; Norris, D.M. 1967. "Vanillin and syringaldehyde as attractants for *Scolytus multistriatus* (Coleoptera: Scolytidae)". *Annals of Entomological Society of America*, 60:858-859

Ministérios do Ambiente, do Ordenamento do Território e do Desenvolvimento Regional e da Agricultura, do Desenvolvimento Rural e das Pescas. Despacho Nº 8277/2007.D.R. Nº 89, Série II de 2007-05-09

Nayono, S. (2009). "Anaerobic digestion of organic solid waste for energy production". Doctoral Dissertation; Karlsruhe Institut für Technologie.

Oliveira, R. (2011). “Valorização do Bagaço de uva: Avaliação da potencialidade de produção de Biogás”. Dissertação de Mestrado. Universidade da Beira Interior

Oreopoulou, V; Russ, W. (2007). “Utilization of by-products and treatment of waste in the food industry”. University of Iceland

Ostrem, K. (2004). “Greening waste: Anaerobic digestion for treating the organic fraction of Municipal Solid Wastes”. Master’s Thesis. Columbia University

Pacheco, S; Damasio, F. (2009). “Vanilina: Origem, propriedades e produção”. Química Nova na Escola, 32:4.

Peixoto, J. (2007/2008). “Azoto Kjeldahl e amoniacal”. Documento adaptado das aulas de Elementos de Engenharia do Ambiente. Instituto Superior Técnico de Lisboa

Pimpão, R. (2009). “Compostos Fenólicos e a sua actividade antioxidante em espécies de Juniperus: Análise da produção sazonal e sob condições de stresse”. Dissertação de Mestrado. Universidade de Lisboa.

Ramalheiro, J. (2009). “Contribuição para a caracterização bioquímica do estado de maturação de azeitonas de diferentes variedades”. Dissertação de Mestrado. Instituto Superior de Agronomia da Universidade Técnica de Lisboa

Regulamento (CE) nº 1234/2007 do Conselho - Jornal Oficial da União Europeia (PT) 19.2.2010, C 43/12

Remón, A; González, A; Ros, R; Lacueva, C; Estruch, R; González, M; Espino, J; Raventos, R. (2009). “Rapid Folin-Ciocalteu method using microtiter 96-well plate cartridges for solid phase extraction to assess urinary total phenolic compounds, as a biomarker of total polyphenols intake”. Analytica Chimica Acta, 634:54-60

Rincón, B; Borja, R; González, J; Portillo, M; Jiménez, C. (2008). “Influence of organic loading rate and hydraulic retention time on the performance, stability and microbial communities of one-stage anaerobic digestion of two-phase olive mill solid residue”. Biochemical Engineering Journal, 40: 253-261

RISE-AT. (1998). “Review of Current Status of Anaerobic Digestion Technology for Treatment of Municipal Solid Waste”. Institute of Science and Technology Research and Development. Chiang Mai University

Sánchez, E; Rincón, B; Borja, R; Travieso, L; Raposo, F; Colmenarejo, M. (2007). "Aerobic degradation kinetic of the effluent derived from the anaerobic digestion of two-phase olive mill solid residue". *International Biodeterioration & Biodegradation*, 60:60-67

Santos, J. (2007). "Caracterização físico-química e biológica em diferentes laboratórios de produtos obtidos a partir da compostagem de resíduos orgânicos biodegradáveis". Dissertação de Mestrado. Faculdade de Ciências da Universidade do Porto

Silva, C. (2009). "Aplicación directa de residuos de almazaras de dos fases en un olivar con riego localizado: Efectos en las propiedades edáficas y el cultivo". Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias; Universidad de Extremadura.

Sleat, R; Robinsons, J. (1984). "A Review: The bacteriology of anaerobic degradation of aromatic Compounds". *Journal of Applied Bacteriology*, 38:1-394

Sluiter,A; Hames,B; Ruiz, R; Scarlata, C; Sluiter, J; Templeton, D and Crocker, D. (2008). "Determination of Structural Carbohydrates and Lignin in Biomass", LAP, Technical Report NREL/TP-510-42618.

Taherzadeh, M; Karimi, K. (2008). "Pretreatment of Lignocellulosic Wastes to Improve Ethanol and Biogas Production: A Review". *International Journal of Molecular Sciences*, 1621-1651.

Tomé A. (2009). "Estudo da biodegradabilidade anaeróbia de compostos lenho-celulósicos e da recuperação dos produtos residuais". Dissertação de mestrado Universidade da Beira Interior.

Tuomela, M; Vikman, M; Hatakka, A; Itavaara, M. (2000). "Biodegradation of lignin in a compost environment: a review". *Bioresource Technology*, 72:169-183

Verma, S. (2002). "Anaerobic digestion of biodegradable organics in municipal solid wastes". Master's Thesis. Columbia University.

Walton, N; Mayer, M; Narbad, A. (2003). "Molecules of Interest: Vanillin". *Phytochemistry*, 63:505-515

Waterhouse, A. (2002). "Determination of Total Phenolics". *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*, 111-118

Weiland, P. (2010). "Biogas production: current state and perspectives". *Applied Microbiology and Biotechnology*, 85:849-860

Wiegant, W.M.; Lettinga, G (1985). "Thermophilic anaerobic digestion of sugars in upflow anaerobic sludge blanket reactors". *Biotechnology and bioengineering*, 27: 1603-1607

Wong, D. (2009). "Structure and Action Mechanism of Ligninolytic Enzymes". *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 157:174-209

Yadvika; Santosh; Sreekrishnan, T; Kohli, S; Rana, V. (2003). "Enhancement of biogas production from solid substrates using different techniques: a review". *Bioresource Technology*, 95,1:1-10

Yogui, G; Ribas, L; Rezende, E. (2010). "Caracterização preliminar de materiais de referência interna para análise de fenóis marcadores de lignina". III Congresso Brasileiro de Oceanografia - CBO. Rio Grande.

Zorpas, A; Costa N. (2010). "Combination of Fenton oxidation and composting for the treatment of the olive solid residue and the olive mill wastewater from the olive oil industry in Cyprus". *Bioresource Technology*, 101:7984-7987

Cibergrafia

[@1] - <http://pt.scribd.com/doc/79867838/Fasciculo-5-Caracteristicas-Fisicas-das-Aguas>

[@2] - <http://wdict.net/es/word/lignina/>

[@3] - <http://www.alentejana.com.br/azeitonas.php>

[@4] - <http://www.probeira.pt/azeiteprocesso.htm>

[@5]- <http://www.cfnumao.com/174>

[@6] - <http://pt.scribd.com/doc/44361716/5/Determinacao-do-Teorde-Azoto-Kjeldahl-NK-em-Aguas-e-Efluentes>