

**Universidade da Beira Interior**



**Departamento de Química**

**Estudo da biodegradabilidade  
anaeróbia de compostos lenho-celulósicos e  
da recuperação dos produtos residuais**

**Dissertação de Mestrado**

**Andreia Sofia da Fonseca Tomé**

**Covilhã, 2009**

Andreia Sofia da Fonseca Tomé

**Estudo da biodegradabilidade  
anaeróbia de compostos lenho-celulósicos e  
da recuperação dos produtos residuais**

Dissertação apresentada para obtenção do  
grau de Mestre no ramo de Química pela  
Universidade da Beira Interior

**Orientador:** Professor Doutor António Miguel Morão

**Co-orientador:** Professora Doutora Isolina Cabral Gonçalves

Ao Pedro,

à minha afilhada Beatriz e à minha sobrinha Mariana

## **Agradecimentos**

Antes de apresentar este trabalho gostaria de agradecer a todas as pessoas que directamente ou indirectamente me ajudaram na realização deste:

À Professora Dr.<sup>a</sup>Isolina Gonçalves e ao Professor Dr. António Miguel Morão, pela disponibilidade, apoio, orientação, ajuda e transmissão de conhecimentos, dados na realização deste trabalho e ao longo destes anos;

À Professora Dr.<sup>a</sup> Ana Paula Duarte, pela disponibilidade e contributo prestado;

À D.Ana Braz, funcionária do Departamento de Química, Universidade da Beira Interior, pela ajuda prestada na realização deste trabalho;

Ao Pedro Melfe, pelo apoio, paciência, e incentivo, em todas as horas e

À minha família, especialmente aos meus pais, que contribuíram para o meu desenvolvimento pessoal e profissional e sem os quais não seria possível chegar até aqui.

A todos, um sincero obrigado



## Resumo

Este trabalho visa esclarecer o processo de biodegradação anaeróbia da dreche cervejeira, por populações mistas, sob condições mesófilas ( $37 \pm 2^\circ\text{C}$ ) e termófilas ( $55 \pm 2^\circ\text{C}$ ), na presença de co-substratos solúveis (glucose e acetato) e de um corante azo, Acid Orange 7. Efectuaram-se ainda ensaios de remoção da CQO residual por aplicação de tecnologias de polimento (microfiltração e coagulação/floculação).

Os ensaios de Actividade Metanogénica Específica (*SMA*) foram efectuados com as populações mistas mesófilas, desenvolvidas usando glucose como substrato principal, e com duas populações mistas termófilas desenvolvidas, uma com glucose e a outra com substratos múltiplos (dreche cervejeira e glucose). Os valores mais elevados da actividade metanogénica específica (*SMA*), no geral, foram alcançados para as populações mesófilas incubadas com dreche (que variam entre  $1,01 \pm 0,08$  e  $2,75 \pm 0,01$  Lbiogás/gSSV.d). A presença de um co-substrato parece aumentar os valores da *SMA*, particularmente para as culturas termófilas alimentadas com acetato de sódio. Nestes ensaios foi também obtida uma remoção de cor elevada ( $93\% \pm 2\%$ ).

Os ensaios de biodegradação anaeróbia visaram avaliar a biodegradabilidade da dreche cervejeira. Os produtos de degradação foram monitorizados por quantificação da CQO, da lignina solúvel (LS) e da lignina precipitada em meio ácido (LPA), no licor sobrenadante. O teor de LPA depende da hidrodinâmica do sistema (descontínuo ou contínuo), da temperatura e do pré-tratamento da dreche (por exemplo para culturas mesófilas incubadas com SBG e glucose o teor de LPA no licor residual de reactores descontínuos foi de  $0,17 \pm 0,01$  g/L e no efluente tratado de um reactor termófilo contínuo foi de  $0,02$  g/L). A dreche pré-lavada é mais susceptível à degradação em regime termofílico.

Estudou-se a remoção da carga residual de dois efluentes diferentes provenientes do tratamento biológico em bioreactores *UASB* a operarem em condições termófilas ( $55 \pm 2^\circ\text{C}$ ) e mesófilas ( $34 \pm 2^\circ\text{C}$ ) com dreche incorporada no leito de biomassa bacteriana. Para este estudo recorreu-se à microfiltração e coagulação/floculação, sendo a eficiência determinada em função do teor de lignina e índice de carga orgânica (CQO), obtendo-se

para a microfiltração uma remoção de  $62 \pm 2$  % da CQO residual no efluente mesófilo e  $8 \pm 3$  %, no efluente termófilo. A coagulação/floculação removeu  $67 \pm 4$  % e  $97 \pm 1$  % da CQO presente nos efluentes mesófilos e termófilo respectivamente. No entanto, foi necessária uma dosagem superior de coagulante para conseguir essa eficiência ( $0,5 \text{ g Al}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot 16\text{H}_2\text{O} / \text{L}$ ).

## Abstract

This study aims to investigate the anaerobic biodegradation of spent brewery grains (SBG) under anaerobic mesophilic and thermophilic regime, in the presence of a soluble co-substrate (glucose or acetate) and an azo dye, Acid Orange 7. Polishing technologies such as microfiltration and coagulation/flocculation were tested in order to remove the residual COD.

Higher values of specific methanogenic activity (SMA) were in general attained for mesophilic populations incubated with SBG (ranging from  $1,01 \pm 0,08$  to  $2,75 \pm 0,01$  Lbiogás / gSSV.d). The presence of a co-substrate seems to enhance SMA results, particularly for thermophilic cultures supplemented with acetate. A high colour removal was also attained ( $93\% \pm 2\%$ ).

Biodegradation experiments were performed to evaluate SBG degradation. Results for degradation by-products were followed by quantification of COD, acid precipitable polymeric lignin (APPL) and residual soluble lignin. Depending on the hydrodynamics of the system (batch or continuous), the temperature and the pre-treatment of SBG (at  $37 \pm 2$  °C or  $50 \pm 2$  °C), APPL is present in bigger or smaller amounts (for instance, for mesophilic cultures incubated with SBG and glucose the APPL content in the residual liquor was  $0,17 \pm 0,01$  g/L in batch mode and of  $0,02$  g/L in the treated effluent of a thermophilic continuous reactor). Pre-washed SBG is more prone to biodegradation under thermophilic conditions.

Results from polishing treatments applied to the treated effluents from mesophilic and thermophilic continuous reactors show that microfiltration remove  $62 \pm 2$  % of residual COD in the mesophilic effluent and  $8 \pm 3$  % in the thermophilic effluent. Coagulation/flocculation removes  $67 \pm 4$  % and  $97 \pm 1$  % of the residual COD present in the mesophilic and thermophilic effluents, respectively. However a higher coagulant dosage was necessary to get this efficiency ( $0,5$  g  $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot 16\text{H}_2\text{O}/\text{L}$ ).



## Abreviaturas

**APCV** – Associação Portuguesa de Produtores de Cerveja

**AGV**- Ácidos gordos voláteis

**AO7** – *Acid Orange 7*

**BSG** – *Brewer's Spent Grain*

**IUPAC** – *International Union of Pure and Applied Chemistry*

**LAP** – *Laboratory Analytical Procedure*

**LPA** – Lignina precipitada em meio ácido

**LS** – lignina que permanece solúvel após acidificação do meio

**PIB** – Produto Interno Bruto

**PVC**- Plicloreto de vinilo (nome IUPAC: policloroeteno)

**SMA** – *Specific Methanogenic Activity*

**SEM** – Microscopia electrónica de varrimento

**UV** – Ultra-violeta

## Nomenclatura

<b>Símbolo</b>	<b>Significado</b>	<b>Unidade</b>
A	Área	$m^2$
Abs	Absorvância	-
CQO	Carência química de oxigênio	$mgO_2/L$
$J_v$	Fluxo de permeado	$L/(h.m^2)$
$L_p$	Permeabilidade hidráulica	$m.s^{-1}.Pa^{-1}$
m	Massa de biomassa	gSSV
R	Constante dos gases perfeitos	$J/(mol.K)$
SS	Sólidos suspensos	g/L
SSV	Sólidos suspensos voláteis	g/L
SMA	Actividade metanogénica específica	$L_{biogás}/(gSSV.d)$
t	Tempo	h
T	Temperatura	K
$V_d$	Volume disponível	$m^3$
$V_m$	Volume molar	$m^3/mol$
$\Delta P$	Variação de pressão	Pa/dia
$\Delta G^\circ$	Variação da energia de Gibbs	KJ/mol
$\epsilon$	Absortividade	$L/(g.cm)$
$\eta_w$	Viscosidade da água	Pa.s
$\lambda$	Comprimento de onda	nm

# ÍNDICE

1 - Introdução	1
2 - Processos de degradação anaeróbia	3
2.1 - Bioquímica e Microbiologia do processo	4
2.1.1- Hidrólise	5
2.1.2- Acidogénese/Fermentação	6
2.1.3- Acetogénese	6
2.1.4- Metanogénese	7
2.2 - Factores Físico-Químicos	8
2.2.1 - Temperatura	9
2.2.2 - Actividade metanogénica específica	12
3 - Compostos lenho-celulósicos	15
3.1 - Dreche cervejeira	17
3.2 - Degradação da lignina	19
3.3 - Produção de metano por digestão anaeróbia	21
3.4 - Produção de etanol por fermentação	21
4 - Processos de Afinação	23
4.1 - Processos de separação com membranas	23
4.1.1 – Microfiltração	26
4.1.2 – Ultrafiltração	27
4.2 - Coagulação/floculação	29
5 - Material e Métodos	33
5.1 - Inoculo e condições de cultura	33
5.2 - Dreche cervejeira	37
5.2.1 – Dreche pré-lavada	37
5.2.3 – Lixiviado da dreche	37

5.3 - Corante Acid Orange AO7	38
5.4 - Métodos analíticos	39
5.4.1 - pH	39
5.4.2 - Sólidos	39
5.4.3 - Carência química de oxigênio	39
5.4.4 - Cor	40
5.4.5 - Determinação do teor de proteína	40
5.4.6. - Determinação da lignina	41
5.4.6.1 - Lignina precipitada em meio ácido	41
5.4.6.2 - Lignina Solúvel	42
5.4.7 - Microscopia electrónica de varrimento	43
5.5 - Metodologia experimental	44
5.5.1 - Ensaio de actividade metanogénica específica e biodegradabilidade anaeróbia	44
5.5.2 - Ensaio de afinação	47
5.5.2.1 – Microfiltração	48
5.5.2.2 - Coagulação/floculação	51
6 - Resultados e Discussão	53
6.1 - Actividade metanogénica específica e Biodegradabilidade anaeróbia	53
6.2 – Remoção de Corante AO7	67
6.3 – Degradação da lignina	70
6.4 - Processos de afinação	80
6.4.1 - Microfiltração	81
6.4.2 - Coagulação/Floculação	85
7 – Conclusão e perspectivas de trabalho futuro	89
Bibliografia	93



## **1.Introdução**

A conservação do ambiente tem vindo a adquirir uma crescente importância ao nível social e económico. As preocupações inerentes à protecção ambiental e ao desenvolvimento sustentável têm culminado num enquadramento legal que preconiza a gestão de efluentes e resíduos assente em medidas que visam a sua minimização, reciclagem e valorização, tendo por objectivo a prevenção e o controlo integrado da poluição.

O tratamento das águas residuais pode ser efectuado por tecnologias alternativas que envolvem processos biológicos e/ou físico-químicos. As estações de tratamento de águas residuais (ETAR) são na sua maioria concebidas com base em processos biológicos, em ambientes anaeróbios, aeróbios ou anóxicos, sendo o pré-tratamento e o tratamento de polimento assente em tecnologias físico-químicas.

A aplicação do processo biológico anaeróbio oferece várias vantagens em comparação com o processo aeróbio, entre as quais, menor consumo de energia, menor produção de lamas e, além disso, requer uma menor área de implantação e gera metano como bio-combustível (energia).

O desenvolvimento sustentado das sociedades prevê a poupança de recursos, a redução da poluição proveniente das actividades industriais a par de uma produção de bens de

consumo menos agressiva para os ecossistemas. Quase todos os países estão a tentar adaptar-se a esta realidade, alterando os seus processos de modo que os seus resíduos possam ser reciclados, reutilizados ou valorizados. A maioria das grandes empresas já não considera os resíduos como tal, mas sim como uma matéria-prima para outros processos. A indústria cervejeira é um desses exemplos (Mussatto e outros, 2006 (a)).

A indústria cervejeira é geradora de grandes quantidades de subprodutos e resíduos sendo os mais comuns a dreche, resíduos de lúpulo e levedura. Estes subprodutos são, na maioria, de origem agrícola, e podem ser facilmente valorizados (Mussatto. e outros, 2006 (a)).

Tendo a industria cervejeira um peso significativo na economia nacional, representando cerca de 1,5% do PIB (produto Interno Bruto), a valorização da dreche gerada como subproduto pode ser considerada sob os seguintes aspectos:

- Como bioadsorvente, agente modificador (suporte) da biomassa bacteriana e substrato complexo na produção de biocombustível ( $H_2$ ,  $CH_4$  e etanol) por fermentação anaeróbia.
- Agente de bioenriquecimento bacteriano de populações anaeróbias mistas (mesófilas e termófilas) favorecendo a biodegradabilidade de compostos xenobióticos como corantes azo.

## **2. Processos de degradação anaeróbia**

Os processos biológicos têm sido largamente utilizados no tratamento de efluentes municipais e industriais, revelando-se, na maior parte dos casos, mais económicos e eficientes do que os processos físico-químicos. Durante as duas últimas décadas o processo de digestão anaeróbia tem vindo a assumir um papel importante no tratamento de águas residuais, tornando-se uma alternativa economicamente viável face aos processos aeróbios tradicionais (Lettinga e outros, 1980). Nestes sistemas a matéria orgânica existente na água residual, é convertida em biogás, uma fonte de energia renovável, simultaneamente ao processo de depuração (Rajeshwar e outros, 2000; Gijzen, e outros 2002).

Na literatura sobre o assunto são referidas várias vantagens dos processos anaeróbios face aos aeróbios, tais como: necessidades nutricionais reduzidas, baixa produção de sólidos, menor consumo de energia, baixos custos de investimento e operação, produção de um biocombustível (metano), capacidade da biomassa preservar a sua actividade após longos períodos sem operar e tolerância a condições ambientais adversas (Lettinga e outros, 1980; Eckenfelder e outros, 1988; Van Lier e outros, 1997; Chernicharro, 1997; Speece, 1996).

A aplicação dos processos de degradação anaeróbia apesar de se encontrar muito focada no tratamento de efluentes facilmente biodegradáveis, como os efluentes da indústria

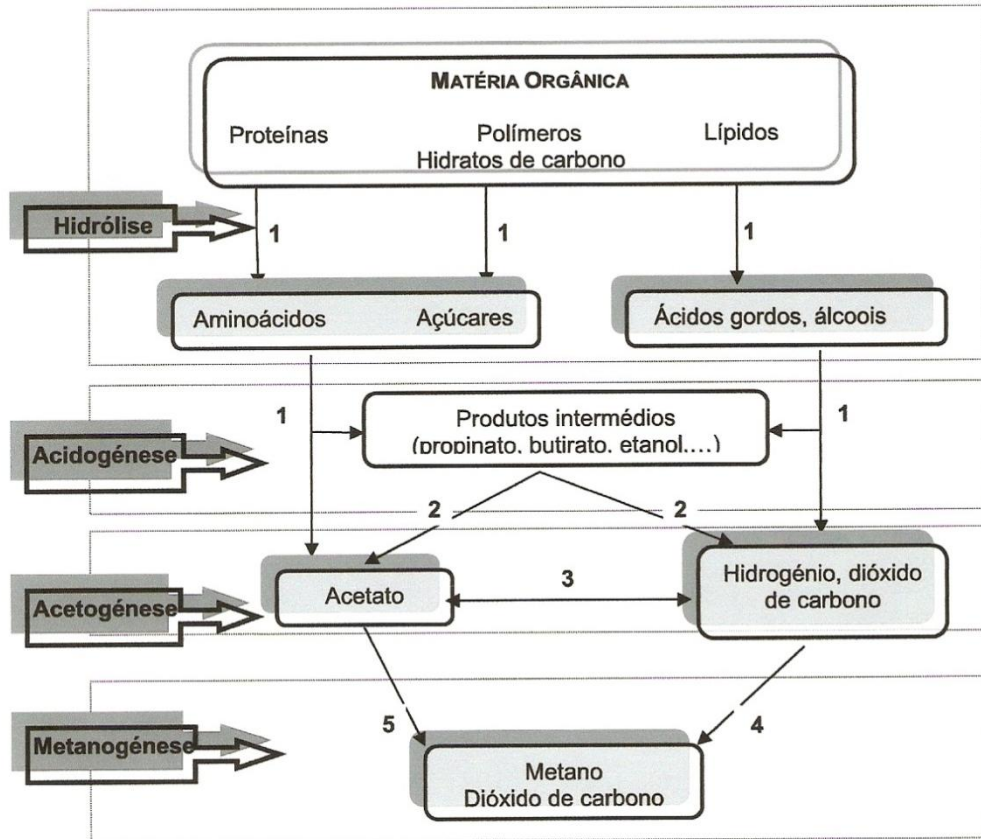
alimentar e relacionadas, tem-se vindo a demonstrar, que as bactérias envolvidas no processo têm capacidade para degradar uma larga gama de compostos orgânicos recalcitrantes, tais como compostos aromáticos policíclicos, compostos orgânicos clorados ou ácidos gordos de cadeia longa (Speece, 1996). A possibilidade de “construir” consórcios específicos para degradar determinados compostos, de modo a acelerar o processo de adaptação natural, surge como um potencial campo de investigação futura. É importante conhecer a sensibilidade dos microrganismos envolvidos no processo de digestão anaeróbia a compostos potencialmente inibitórios, e avaliar a sua eventual capacidade de adaptação.

A aplicação de uma tecnologia adequada, mantendo as condições ambientais óptimas, aliada a uma aclimatização do consórcio são factores que permitem a aplicação do processo de degradação anaeróbia ao tratamento de qualquer tipo de efluente (Lettinga e outros, 1997).

## **2.1. Bioquímica e microbiologia do processo**

A digestão anaeróbia é um processo natural, realizado por um consórcio de diferentes tipos de microrganismos que na ausência de oxigénio e interagindo entre si promovem a fermentação estável e auto-regulada (degradação) da matéria orgânica e ocasionalmente inorgânica, sendo por isso fundamental a existência de uma relação equilibrada e coordenada entre os diferentes grupos tróficos de bactérias presentes. Durante o processo, a matéria orgânica é convertida maioritariamente em metano, dióxido de carbono e biomassa, podendo o metano ser utilizado como fonte alternativa de energia (Pires, 2007 ).

O processo de digestão anaeróbia ocorre de forma sequencial em 4 etapas principais, cada uma com sua população bacteriana específica: Hidrólise, fermentação e acidogénese, acetogénese e metanogénese (figura 2.1 adaptado de Costa, 2005).



- (1) Bactérias fermentativas
- (2) Bactérias acetogénicas produtoras de hidrogénio
- (3) Bactéria acetogénicas consumidoras de hidrógeno
- (4) Bactérias metanogénicas hidrogenotróficas
- (5) Bactérias metanogénicas acetoclásticas

**Figura 2.1:** Diagrama ilustrativo das quatro principais fases envolvidas no processo de digestão anaeróbia.

### 2.1.1- Hidrólise

A hidrólise constitui o primeiro passo da degradação anaeróbia e consiste na conversão de materiais particulados, pólimeros (proteínas, hidratos de carbono e lípidos) nos seus monómeros (aminoácidos, açúcares e ácidos gordos de cadeia longa, respectivamente) pela acção de enzimas extracelulares produzidas por bactérias hidrolíticas. A velocidade da conversão anaeróbia da matéria orgânica é, muitas vezes, limitada pela hidrólise. Nesta etapa a velocidade de hidrólise é dependente da temperatura, uma vez que a hidrólise é

uma reacção química catalisada por enzimas, as quais são muito sensíveis á temperatura (Mahmound e outros , 2003).

### **2.1.2 - Acidogénese /Fermentação**

Na acidogénese ou fermentação, os produtos da hidrólise são transportados para o interior da célula, onde são transformados em acetato, produtos intermediários (ácidos gordos voláteis (AGV), álcoois) e hidrogénio.

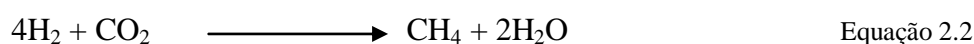
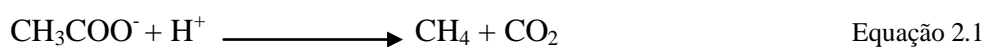
A diversidade e número das espécies bacterianas fermentativas envolvidas no processo depende largamente da composição do substrato e o comportamento da fase acidogénica afecta a metanogénese (Britz e outros, 1994). Estudos efectuados em digestores anaeróbios mostraram que as maiorias das bactérias fermentativas são anaeróbias obrigatórias sendo algumas anaeróbias facultativas (Pires, 2007). Estas últimas permitem manter o potencial redox no meio em níveis baixos, consumindo o oxigénio que eventualmente possa entrar no digestor, dissolvido no efluente a tratar. As bactérias fermentativas têm tempos de duplicação muito curtos, verificando-se que a fermentação nunca é limitante no processo global da degradação anaeróbia (Gujer e outros, 1983).

### **2.1.3 - Acetogénese**

A acetogénese constitui uma etapa importante nos processos anaeróbios devido ao facto de 70% da metanogénese ocorrer por via acetato. O objectivo é produzir, a partir dos produtos da fermentação, os substratos necessários na metanogénese, nomeadamente acetato e hidrogénio. Cerca de 60% do acetato é formado por oxidação directa de aminoácidos, açúcares simples e lípidos. No entanto as bactérias acetogénicas também medeiam a oxidação de produtos intermediários (propionato, butirato e álcool) a acetato. O acetato pode ainda ser produzido por acção das bactérias acetogénicas hidrogenotróficas. Estas, em conjunto com as bactérias metanogénicas hidrogenotróficas, mantêm a pressão de hidrogénio a um nível baixo ( $10^{-4} - 10^{-6}$  atm), formando com as bactérias produtoras de hidrogénio uma simbiose trófica que favorece termodinamicamente a reacção global. (Pires, 2007 e Lopes, 2005).

### 2.1.4 - Metanogénese

Constitui a etapa final do processo, na qual se produz metano a partir da descarboxilação do acetato desencadeada pela acção de bactérias acetoclásticas ou pela hidrogenação do dióxido de carbono por bactérias hidrogenotróficas. Sendo o acetato o principal precursor do metano por processos mesófilos (70% do metano provém do acetato) torna-se evidente a importância desta conversão no conjunto de todas as etapas da degradação anaeróbia. As bactérias metanogénicas desempenham, talvez, o papel mais importante em todo o processo de digestão anaeróbia, por serem as produtoras directas do metano. São anaeróbias estritas, requerendo para o seu desenvolvimento um potencial redox entre -250 e -300 mV, possuem coenzimas e cofactores específicos (coenzima F420, F430, coenzima M, Metanopterin e Metanofurano (Wolfe, 1992)) e degradam apenas um número limitado de substratos com baixo número de carbonos: acetato, metanol, metilaminas, formato, e hidrogénio e dióxido de carbono. Elas são divididas em dois grupos principais de acordo com os substratos utilizados para produzir metano: um que forma metano a partir de ácido acético ou metanol segundo a equação 2.1 (bactérias metanogénicas acetoclásticas, responsáveis por 60-70% de toda a produção de metano a partir do grupo metil do ácido acético), e o segundo que produz metano a partir do hidrogénio e dióxido de carbono (hidrogenotróficas, constituída por uma gama bem mais ampla de espécies do que as acetoclásticas) (equação 2.2). Esses dois grupos de bactérias são responsáveis pelo consumo de hidrogénio das fases anteriores (Sousa, 1996 e Lopes, 2005).



As bactérias metanogénicas apresentam um crescimento lento e são relativamente sensíveis a factores ambientais (temperatura e pH), constituindo o grupo de microrganismos limitante da digestão (em particular as acetoclásticas que apresentam velocidade de crescimento mais lenta que as hidrogenotróficas) (Lopes, 2005).

Para alcançar uma digestão anaeróbia eficiente, é necessário considerar os parâmetros físicos e químicos favoráveis ao crescimento das populações, sendo os mais importantes

pH, temperatura, alcalinidade e toxicidade realçando-se neste trabalho efeito da temperatura (regimes mesófilo e termófilo).

## **2.2. Factores físicos e químicos**

A eficiência da digestão anaeróbia necessita de um equilíbrio entre as velocidades de produção e de consumo de produtos intermediários nas diferentes fases do processo. Para conseguir alcançar essa eficiência, é necessário considerar os parâmetros físicos e químicos favoráveis ao crescimento das populações. Entre eles destacam-se a temperatura, alcalinidade, toxicidade, pH pressão parcial de hidrogénio. Outros factores, como a transferência de massa, sobrecargas hidráulicas e a actividade metanogénica, também desempenham papéis importantes no processo (Moraes, 2005; Chernicharo, 1997).

De um modo geral a digestão anaeróbia têm um bom desempenho a valores de pH entre 6 e 8 (Lopes, 2005). Contudo as bactérias produtoras de metano têm um crescimento óptimo na faixa de pH entre os 6,6 e os 7,4. As bactérias produtoras de ácidos têm um crescimento óptimo na faixa de pH entre os 5,0 e os 6,0, mas podem mostrar-se activas mesmo para valores de pH da ordem dos 4,5.

Durante a digestão anaeróbia é necessária alcalinidade suficiente como efeito tampão para servir a fim de compensar a diminuição de pH causada pela formação de ácidos orgânicos voláteis durante a acetogénese (Lopes, 2005).

Como em todos os processos biológicos, a digestão anaeróbia necessita de nutrientes inorgânicos em quantidade suficiente para que a manutenção/actividade dos microrganismos seja realizada com sucesso. (Moraes, 2005).

Dado que a metanogénese é normalmente a etapa limitante do processo de degradação anaeróbia, é fundamental satisfazer os requisitos nutricionais deste grupo trófico, de modo a assegurar a eficiência e a estabilidade operacionais. Se houver limitação de nutrientes, o crescimento é deficiente, embora tenha sido demonstrado que, mesmo nessas condições, pode ocorrer uma significativa redução da carga poluente, o que pode ser interessante na perspectiva da redução da produção de biomassa (Oliveira, 2005).

### **2.2.1. Temperatura**

A temperatura é um dos factores ambientais mais importantes no controlo da digestão anaeróbia, pois afecta o processo biológico de diferentes maneiras. A actividade microbiológica dos digestores anaeróbios, a velocidade das reacções químicas e bioquímicas (Moraes, 2005), e a produção de metano dependem da temperatura.

Os microrganismos não possuem meios de controlar a sua temperatura interna, e dessa forma, a temperatura no interior da célula é determinada pela temperatura ambiente. Logo dos factores físicos que afectam o crescimento microbiano, a temperatura é um dos mais importantes para a sobrevivência e crescimento das espécies.

Podem classificar-se os organismos com base na temperatura óptima e na faixa de temperatura nas quais são capazes de crescer e metabolizar, (Lettinga e outros, 2001). Genericamente existem três intervalos de temperatura óptimos e favoráveis à digestão anaeróbia: psicrófilo de 0 °C a 20°C, mesófilo de 25 °C a 45 °C e termófilo de 45 °C a 70 °C. O mesófilo é o mais comum e tem sido amplamente implementado à escala real. O termófilo, tem sido alvo de muitos estudos, enquanto o psicrófilo não tem merecido muita atenção por parte dos investigadores, provavelmente pelo facto da velocidade das reacções ser mais lenta (Lopes, 2005).

A taxa de crescimento microbiano em temperaturas próximas à mínima é normalmente baixa, aumentando exponencialmente com o acréscimo da temperatura, até a um valor máximo. A partir deste ponto de crescimento óptimo, o aumento de alguns graus provoca uma queda abrupta na taxa de crescimento, tendendo para o valor zero (Moraes, 2005 e Chernicharo, 1997).

Em condições psicrófilas, devido às baixas velocidades de crescimento de microrganismos metanogénicos, obtém-se uma baixa produção de metano. Logo são necessários elevados tempos de retenção de sólidos e baixos caudais para se obterem eficiências de remoção de CQO (Carência Química de Oxigénio) satisfatórias. Devido também à baixa produção de metano, ocorrem limitações por difusão dos substratos e produtos metabólicos originados pelos efeitos de mistura. Neste caso seria necessário um dispositivo de agitação, acarretando um custo adicional da aplicação (Lopes, 2005).

A degradação anaeróbia em condições termófilas apresenta vantagens em relação aos processos psicrófilos. As temperaturas elevadas favorecem o desenvolvimento de culturas com maiores velocidades de crescimento, podendo-se usar reactores mais pequenos e obtendo-se maior produção de metano. Apesar das vantagens existem problemas de estabilidade dos processos termófilos, tais como dificuldade de agregação dos microrganismos no interior do reactor devido à maior velocidade de crescimento da biomassa, degradação incompleta, podendo ocorrer acumulação de ácidos orgânicos voláteis no efluente (*Van Lier 1997; Lopes, 2005*).

Os processos mesófilos encontram-se entre os processos psicrófilos e os termófilos, nomeadamente no diz respeito à velocidade de crescimento bacteriano, aos tempos de retenção hidráulico e aos caudais de tratamento.

O efeito da temperatura na actividade biológica está relacionado, em grande parte, ao impacto na actividade enzimática ou nas reacções bioquímicas. Assim, um aumento na temperatura resulta num aumento da actividade enzimática, enquanto uma diminuição na temperatura resulta numa diminuição da actividade enzimática. Embora os microrganismos anaeróbios possam ser aclimatizados a temperaturas de operação fora da sua faixa óptima, a actividade da biomassa e o desempenho do reactor podem ser afectados adversamente. Devido aos microrganismos formadores de metano crescerem lentamente e serem muito sensíveis a pequenas mudanças de temperatura, a aclimatização dos mesmos deve ser realizada lentamente (*Gerardi, 2003*).

Segundo a lei de Van't Hoff-Arrhenius uma elevação de temperatura de reacção correspondente a 10°C, provocará uma duplicação da sua velocidade. Esta lei serve apenas de referência, não sendo precisa na maior parte das reacções, mas a sua idéia está correta, ou seja, um aumento de temperatura provoca um aumento de velocidade da reacção (*Atkins, 2003*).

A temperatura influencia não somente os microrganismos geradores de metano, mas também os geradores de ácidos. Portanto, flutuações na temperatura podem acarretar vantagens para certos grupos e desvantagens para outros. Desta forma, a alteração na actividade de diferentes grupos de microrganismos geradores de ácidos gordos voláteis resulta em alteração na quantidade relativa de ácidos orgânicos e álcoois, os quais são

utilizados directa ou indirectamente como substrato pelos microrganismos formadores de metano, afectando o desempenho global do digestor (Gerardi, 2003).

Outra dificuldade em relação à digestão anaeróbia é a presença de diferentes grupos de microrganismos que possuem valores, ou faixas de valores, óptimos diferentes para uma determinada condição operacional. Os microrganismos acetogénicos possuem uma temperatura óptima de 30 °C, enquanto a temperatura óptima para os metanogénicos já é de 35 °C (Gerardi, 2003).

Um outro factor importante refere-se a flutuações na temperatura. Neste caso, a actividade dos microrganismos geradores de metano é afectada mais intensamente do que em relação à temperatura de operação constante. Dependendo da diminuição da temperatura, pode não haver alteração na velocidade de produção dos ácidos, enquanto a produção de metano pode ocorrer mais lentamente (Gerardi, 2003).

O regime termófilo, têm sido adoptado na digestão anaeróbia, o qual tem apresentando algumas vantagens quando comparado com o regime mesófilo, nomeadamente o aumento da velocidade de destruição de sólidos orgânicos, separação sólido líquido melhorada, e aumento de destruição de patogénicos (Kim e outros, 2003).

A influência da temperatura não se limita à velocidade de digestão. E também afectada a fracção de sólidos orgânicos que pode ser metabolizada no processo de digestão anaeróbia. A fracção de material orgânico digerida diminui significativamente com a temperatura. Esta redução provavelmente pode ser atribuída a uma baixa velocidade de hidrólise, fazendo com que grande parte das partículas sólidas e macromoléculas permaneçam intactas (Kim e outros, 2003).

Embora todas as reacções metabólicas sejam catalisadas por enzimas, só ocorrem se forem termodinamicamente viáveis. As reacções bioquímicas podem ser mais ou menos espontâneas em determinadas condições de pH, temperatura e pressão. Quanto menor a energia livre de Gibbs,  $\Delta G^\circ$ , mais exotérmica é a reacção ocorrendo de forma mais espontânea (tabela 3.1) (Lopes, 2005).

**Tabela 2.1:** Reacções bioquímicas envolvidas na conversão da matéria orgânica em ambiente anaeróbio e sua energia livre de Gibbs para regime mesófilo e termófilo (adaptado de Santos, 2005).

Reacções	$\Delta G^{\circ}_{25^{\circ}\text{C}}$ (KJ/mol)	$\Delta G^{\circ}_{55^{\circ}\text{C}}$ (KJ/mol)
<b>Acetogénicas</b>		
Glicose + 12 H <sub>2</sub> O $\longrightarrow$ 6 HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> + 12 H <sub>2</sub> + 6 H <sup>+</sup>	+3,2	-51,8
Glicose + 4 H <sub>2</sub> O $\longrightarrow$ 2 Acetato + 2 HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> + 4 H <sub>2</sub> + 4 H <sup>+</sup>	-206,3	-232,2
Etanol + H <sub>2</sub> O $\longrightarrow$ Acetato + 2 H <sub>2</sub> + H <sup>+</sup>	+9,6	+1,7
Lactano + 2 H <sub>2</sub> O $\longrightarrow$ Acetato + HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> + 2H <sub>2</sub> + H <sup>+</sup>	-4,2	-12,6
Acetato + 4 H <sub>2</sub> O $\longrightarrow$ 2 HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> + 4 H <sub>2</sub> + H <sup>+</sup>	+104,2	+89,8
Propionato + 3 H <sub>2</sub> O $\longrightarrow$ Acetato + HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> + 3 H <sub>2</sub> + H <sup>+</sup>	+76,5	+64,7
Propionato + 3 HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> $\longrightarrow$ Acetato + 3 Formato + H <sup>+</sup>	+72,4	+61,6
Butirato + 2 H <sub>2</sub> O $\longrightarrow$ 2 Acetato + 2 H <sub>2</sub> <sup>+</sup> + H <sup>+</sup>	+48,3	+39,5
Butirato + 2 HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> $\longrightarrow$ 2 Acetato + 2 Formato + H <sup>+</sup>	+30,6	+20,9
<b>Homoacetogénicas</b>		
Acetato + 4 H <sub>2</sub> O $\longrightarrow$ 2 HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> + 4 H <sub>2</sub> + H <sup>+</sup>	+104,6	+90,2
2CO <sub>2</sub> + 4 H <sub>2</sub> $\longrightarrow$ Acetato + 2 H <sub>2</sub> O	-55,0	-33,5
<b>Metanogénicas</b>		
4 H <sub>2</sub> + HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> + H <sup>+</sup> $\longrightarrow$ CH <sub>4</sub> + 3 H <sub>2</sub> O	-135,6	124,9
4 Formato + H <sub>2</sub> O + H <sup>+</sup> $\longrightarrow$ CH <sub>4</sub> + 3HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	-130,4	-118,9
Acatato + H <sub>2</sub> O $\longrightarrow$ HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> + CH <sub>4</sub>	-31,0	-34,7

### 2.2.2 Actividade metanogénica específica

A actividade metanogénica específica (*SMA – Specific Methanogenic Activity*) pode ser definida como a capacidade máxima de conversão biológica de um determinado composto a CH<sub>4</sub> e CO<sub>2</sub>, por um consórcio de microrganismos anaeróbios, realizada em condições controladas de laboratório, para viabilizar a actividade bioquímica máxima de

conversão de substratos orgânicos a biogás. (Coat e outros, 1996; Brás, 2005; Aquino e outros, 2007).

A *SMA* também pode ser utilizada para quantificar o nível de toxicidade ou inibição exercida por dadas condições sobre uma cultura anaeróbia. Pode ser expressa nas unidades (massa de CQO-CH<sub>4</sub> por unidade de massa de SSV x dia), pois em geral baseia-se na quantificação de biogás produzido (CH<sub>4</sub> e CO<sub>2</sub>) e não tanto na quantificação do consumo de substrato fornecido (Coates e outros, 1996 e Brás, 2005)

A determinação da *SMA* é importante porque a remoção de electrões-equivalente (equivalente redutor), ou seja, compostos reduzidos, responsáveis pela carência química de oxigénio (CQO), do efluente a ser tratado, só ocorrerá com a formação do metano, que escapa facilmente da fase líquida pois é praticamente insolúvel em água (Aquino e outros, 2007). Sendo assim, a *SMA* pode ser utilizada como um parâmetro de monitorização da eficiência da população metanogénica presente num reactor biológico e, como tal, é ainda uma ferramenta importante para o controle operacional de reactores anaeróbios (Aquino e outros, 2007).

Em última análise, o conhecimento da *SMA* da biomassa de um dado reactor, permite estabelecer a capacidade de máxima remoção de CQO da fase líquida, e estimar a carga orgânica máxima que pode ser aplicada, com minimização dos riscos de destabilização do processo anaeróbio. Numa análise inversa, pode estimar-se a massa mínima de biomassa anaeróbia a ser mantida no reactor para a remoção de determinada carga orgânica aplicada pela *SMA*.



### **3. Compostos lenho-celulósicos**

A maioria dos resíduos lenho-celulósicos é derivada de práticas agrícolas e de agro-indústrias. Estes resíduos podem ser usados como substratos, para produção de energia e combustíveis.

Os principais componentes dos resíduos lenho-celulósicos são a celulose, as hemiceluloses e a lignina.

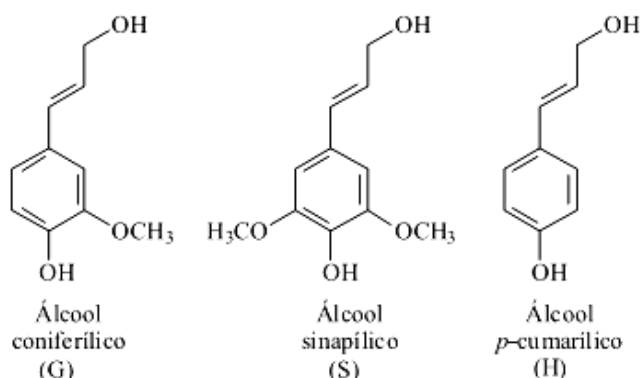
A celulose, principal componente da parede celular da fibra vegetal, é um polímero linear formado por unidades de  $\beta$ -D-glucose cujas unidades estão unidas por ligações  $\beta$  (1-4) (Carvalho e outros, 2005; Bianchi, 1995 e Hendriks e outros 2009). As moléculas de celulose tendem a formar pontes de hidrogénio intermoleculares (entre unidades de glucose da mesma molécula) e extramoleculares (entre unidades de glucose de moléculas adjacentes). O primeiro tipo de interação é responsável por uma certa rigidez das cadeias unitário, e o último pela formação de fibra vegetal (Bianchi, 1995 e Hendriks e outros 2009). A celulose é constituída por uma estrutura cristalina (ordenada) e uma amorfa (desordenada) (Carvalho; Bianch., 1995 e Hendriks e outros, 2009).

A biodegradação das moléculas de celulose está relacionada com a distribuição e configuração da sua estrutura, como também com a sua associação a outros polímeros tais como, a lignina, hemiceluloses, amido, proteínas e compostos minerais.

Outros constituintes dos materiais lenho-celulósicos são as hemiceluloses, que não constituem uma única substância, mas sim uma mistura de polissacarídeos de baixa massa molecular, os quais estão associados à celulose e à lignina. As unidades de açúcares que formam as hemiceluloses podem ser subdivididas em pentoses (como a xilose e arabinose) e hexoses (como manose, glicose e galactose) (Carvalho e outros, 2005; Bianchi, 1995 e Hendriks, 2009).

O principal componente da fracção hemicelulósica dos resíduos agro-industriais é o xilano, polímero constituído por unidades de xilose (Carvalho e outros, 2005).

Além da celulose e hemiceluloses, a lignina, é o polímero mais abundante na natureza, e está também presente na parede celular da biomassa vegetal. Além da protecção contra a acção de microrganismos, a lignina é responsável pela resistência mecânica, pelo transporte de nutrientes e pela impermeabilidade. A lignina presente na matriz dos compostos lenho-celulósicos, dificulta a hidrólise da celulose e hemiceluloses (Bianchi, 1995 e Hendriks e outros 2009). A biossíntese da lignina ocorre através da polimerização radicalar dos seus precursores: álcoois coniferílico, sinapílico e *p*-cumarílico (figura3.1). Em geral, é classificada de acordo com a quantidade relativa dos monómeros, guaiacila (G), siringila (S) e *p*-hidroxifenilo (H), derivados dos seus precursores, respectivamente (Amparado, 2006)



**Figura 3.1:** Álcoois precursores das unidades fenilpropanóides guaiacila (G), Siringila (S) e *p*-hidroxifenilo (H). (Amparado, 2006)

O aproveitamento dos resíduos florestais e agro-industriais, como substratos em processos biotecnológicos para a produção de produtos de elevado valor, é uma alternativa atractiva e promissora, uma vez que estes materiais são abundantes, renováveis e de baixo custo. A bioconversão destes materiais poliméricos requer um processo que compreende duas etapas: hidrólise (ácida ou enzimática) dos polímeros de açúcares em monossacarídeos, e a bioconversão dos monómeros em produtos de interesse industrial (Carvalho e outros, 2005).

### 3.1. Dreche cervejeira

A dreche cervejeira (*Brewer's Spent Grain*) é o principal subproduto residual da indústria cervejeira, representando cerca de 85% do total de subprodutos gerados. A *BSG* corresponde à fracção insolúvel do mosto, preparado por moagem e mistura dos cereais como o malte, a cevada germinada, e cereais não maltados, arroz ou trigo, separada por filtração (Unicer 2007). É um composto lenho-celulósico contendo cerca de 17% de celulose, 28% de polissacarídeos não-celulósicos (principalmente arabinóxilano) e 28% de lignina (Mussatto e outros, 2006; Carvalheiro e outros, 2004). Este resíduo lenho-celulósico é um material rico em proteínas e fibras, geralmente é utilizado para alimentação animal (Carvalheiro e outros., 2004; Santos e outros, 2003). Dada a composição deste material, têm vindo a ser estudadas novas aplicações, como aditivo alimentar, para recuperação de polissacarídeos e como suporte de imobilização de biomassa (Branyik, e outros;2004) e também como bioadsorvente. As dreches podem constituir uma alternativa economicamente vantajosa nos processos de tratamento de águas residuais (Silva e outros, 2004).

Carvalheiro e outros, (2004) apresentam a seguinte composição média para as dreches que analisaram (em base de peso seco): glucano (21,9 %), xilano (20,6 %), arabinano (9,0 %), lenhina Klason – resíduo insolúvel em ácido (21,7 %), grupos acetil (1,1 %), proteína (24,6 %) e cinzas (1,2 %).

A composição *BSG* pode variar dependendo da variedade de cevada utilizada, o período da sua colheita, as características do lúpulo e de outros adjuvantes adicionados, e da tecnologia utilizada na produção da cerveja (Carvalheiro e outros., 2004; Santos e

outros., 2003). Na tabela 3.1 encontra-se a composição química de uma dreche, em que não foi adicionado nenhum adjuvante (Mussato e outros, 2006.)

A *BSG* pode ser usada como produtora de energia, pela combustão directa ou por fermentação produzindo biogás. Uma alternativa para produção de energia através da *BSG* é a fermentação anaeróbia, a qual pode ser mais eficiente se dividida em duas fases: hidrolítica e fermentativa/metanogénica. A hidrólise do material fibroso da *BSG* é a etapa limitante para a degradação completa do material. Na fase fermentativa/metanogénica, os microrganismos acidogénicos convertem macromoléculas complexas em ácidos gordos voláteis, acetato, butirato e propionato, e posteriormente, as bactérias metanogénicas convertem estes ácidos em metano (Mussatto e outros 2006).

**Tabela 3.1:** Composição química da dreche cervejeira (Mussato e outros, 2006)

<b>Componentes</b>	<b>Peso Seco (g.kg<sup>-1</sup>)</b>	<b>Minerais</b>	<b>mg.kg<sup>-1</sup></b>
Celulose	167,8	Cálcio	3515,0
Hemiceluloses	284,2	Potássio	258,1
Xilose	199,4	Fósforo	5186,0
Arabinose	84,8	Sódio	309,3
Lignina total	277,8	Ferro	193,4
Lignina de Klason	229,6	Zinco	178,0
Proteínas (N.6,25)	152,5	Silício	10740,0
Cinzas	46,0		
Extractivos	58,2		

A *BSG* também pode ser usada em processos biotecnológicos. Esta é rica em polissacáridos bem como proteínas e minerais sendo um substrato de elevado valor em biotecnologia. A este respeito têm sido estudadas diversas aplicações em processos biotecnológicos, nomeadamente no tratamento anaeróbio de águas residuais e como suporte de imobilização de biomassa (Mussatto, 2006, Silva e outro., 2004).

Sendo a dreche um produto lenho-celulósico com um teor de lignina elevado pode eventualmente ser utilizado com o intuito de produzir lignina purificada, a qual neste caso deve ser recuperada da biomassa vegetal.

### 3.2 Degradação da lignina

Os materiais lenho-celulósicos são abundantes e encontrados em resíduos de cereais, bagaço da cana-de-açúcar, dreche cervejeira e florestais, entre outros sendo os seus principais componentes a celulose, a hemiceluloses e a lignina.

A degradação de substâncias lenho-celulósicas liberta furano e compostos fenólicos que são tóxicos aos microrganismos do metabolismo fermentativo (Santos, 2007)

Apesar de amplamente distribuídos na natureza os compostos fenolicos fazem parte dos principais poluentes tóxicos residuais descartados pela industria petroquímica, têxtil, papelreira entre outras. Os compostos fenólicos dividem-se em taninos, ligninas e álcoois fenólicos (Santos e outros, 2003).

A lignina, como visto no capítulo 3, é uma molécula muito complexa e de difícil caracterização. Devido aos seus precursores (também conhecidos por monoglicóis) interligam-se numa malha complexa, resistente à hidrólise ácida e alcalina e a vários complexos enzimáticos, não podendo ser clivada por enzimas hidrolíticas, sendo por isso de difícil degradação (Amparado, 2006 e Santos e outros, 2003).

A lignina está geralmente presente na forma solúvel e insolúvel. Têm sido utilizados vários métodos para quantificação da lignina nomeadamente métodos gravimétricos e métodos não gravimétricos. O primeiro grupo inclui o método da lignina precipitada em meio ácido em solução de a 72% de  $H_2SO_4$  - também conhecida por lignina ácida ou lignina *Klason*; oxidação da lignina pelo clorito de sódio; oxidação pelo permanganato de potássio; solubilização da macromolécula em solução ácida de trietilenoglicol. Os métodos não gravimétricos incluem aqueles por espectroscopia dos raios infravermelhos e os baseados nas propriedades ópticas da lignina, tais como a técnica da lignina solúvel em brometo de acetila (Santana e outros, 2006).

A recuperação da lignina pode ser efectuada por diferentes metodologias, nomeadamente por coagulação/floculação e por tecnologias de membranas (microfiltração e ultrafiltração) (Pérez e outros, 2002)

Outro aspecto a avaliar é o da degradação da lignina por via biológica. Dependendo do tipo de lignina (tamanho da molécula, facilidade em sofrer reacção de hidrólise,

heterogeneidade e complexidade molecular), a degradação biológica pode ser oxidativa e não específica, mediada por enzimas extracelulares (Péres e outros, 2002).

Associado ao interesse de se aprofundar o estudo da biodegradação da lignina, considera-se relevante o facto das enzimas lenholíticas, quando presentes na biomassa bacteriana, favorecendo a biodegradação de compostos recalcitrantes (Revinocvich e outros, 2004).

A maioria dos estudos da biodegradabilidade da lignina tem sido efectuada em meios oxidativos (aeróbios), sendo escassa a literatura sobre a degradação da lignina em meios redutores (anaeróbios). Porém, devido à elevada biodeversidade dos consórcios bacterianos presentes nos sistemas anaeróbios, e sendo conhecida a sua capacidade em degradar compostos aromáticos (compostos fenólicos, azo, aminas entre outros) não deve ser descartada uma eventual bioeliminação da lignina por via anaeróbia (Hendriks e outros, 2009 e Ravinocvich e outros, 2004).

Esposito e Azevedo, 2004 citado por Santos (Santos, 2007), afirmam que existem três modos principais de degradação da lignina: ruptura oxidativa de cadeias laterais envolvendo o C $\alpha$  e o C $\beta$  levando à formação de ácidos carboxílicos, ruptura de ligações  $\beta$ -aril-éter com consequente modificação das cadeias laterais, e degradação de núcleos aromáticos a partir da abertura oxidativa dos anéis.

Na biodegradação da lignina as enzimas ligninolíticas desempenham um papel importante nas indústrias papeleiras no branqueamento químico de pasta e de papel, bem como no campo da engenharia ambiental onde é sabido que enzimas “ligninolíticas” podem degradar xenobióticos recalcitrantes, tais como dioxinas devido à ampla especificidade do substrato destas enzimas e também na descontaminação de efluentes (Hendriks e outros, 2009).

### **3.3 Produção de metano por digestão anaeróbia**

A produção de metano a partir de material lenho-celulósico, pode consistir em três fases, a primeira inclui nomeadamente pré-tratamento, hidrólise anaeróbia e fermentação anaeróbia, seguindo-se a produção de metano, e o pós tratamento da fracção líquida. O passo de separação de produtos não é necessário durante a formação de metano, pois o metano é um gás em condições normais e pressão e temperatura, pelo que se irá separar facilmente da fase líquida (Hendriks e outros, 2009).

O pré tratamento pode ser feito para melhorar o rendimento da hidrólise e o rendimento total do metano. A hidrólise da matéria lenho-celulósica e a fermentação anaeróbia, bem como a conversão do metano ocorre num reactor como resultado da actividade microbiana exercida por um consórcio de microrganismos. Por vezes efectua-se apenas a segunda fase, hidrólise e a produção de metano para produção de energia (Hendriks e outros, 2009).

A vantagem de utilizar uma mistura de microrganismos é que quase todos os produtos, como pentoses, hexoses, produtos voláteis e por vezes compostos inibidores como furfural e a lignina podem ser convertida a metano após um período de adaptação (Hendriks e outros, 2009).

### **3.4 Produção de etanol por fermentação**

A produção de etanol a partir de matéria lenho-celulósica consiste basicamente em cinco etapas: pré-tratamento, (enzimático), hidrólise, fermentação, separação de produtos, e pós-tratamento da fase líquida. O pré-tratamento tem por objectivo melhorar a taxa de produção e a produtividade total dos açúcares monómeros na fase da hidrólise.

A conversão de (hemi) celulosas em açúcar pode ser feita quimicamente por ácidos, ou enzimáticamente através da adição de celulasas (enzimas responsáveis pela hidrólise de celulose).

As hexoses manoméricas (açúcares, 6 carbonos) podem ser convertidas, facilmente a etanol por fermentação, ao passo que a fermentação de pentoses (açúcares, 5 carbonos)

só é feita por alguns. Produtos voláteis também não são facilmente fermentados a etanol. Um problema associado à fermentação é o facto do produto formado, etanol, ser um inibidor das leveduras/bactérias que realizam a fermentação, limitando a concentração de açúcares fermentáveis. Na produção de metano este problema não se verifica, uma vez, que este é pouco solúvel na fase líquida. Após a fermentação, o etanol precisa de ser recuperado por destilação. O furfural e outros inibidores como compostos solúveis derivados da lignina, podem afectar a fase de fermentação (Hendriks e outros, 2009).

## **4. Processos de afinação**

Os processos de afinação, usados no tratamento de efluentes, destinam-se normalmente a complementar os processos anteriores, aumentando a eficiência de remoção de sólidos em suspensão, de nutrientes (azoto, fósforo) ou compostos tóxicos específicos que não possam ser eliminados pelos processos de tratamento convencionais. Estes processos também são conhecidos como tratamento terciário e envolvem operações como a adsorção, filtração, processos electroquímicos, cloração e tecnologias de membrana (microfiltração, ultrafiltração, nanofiltração e osmose inversa), entre outros.

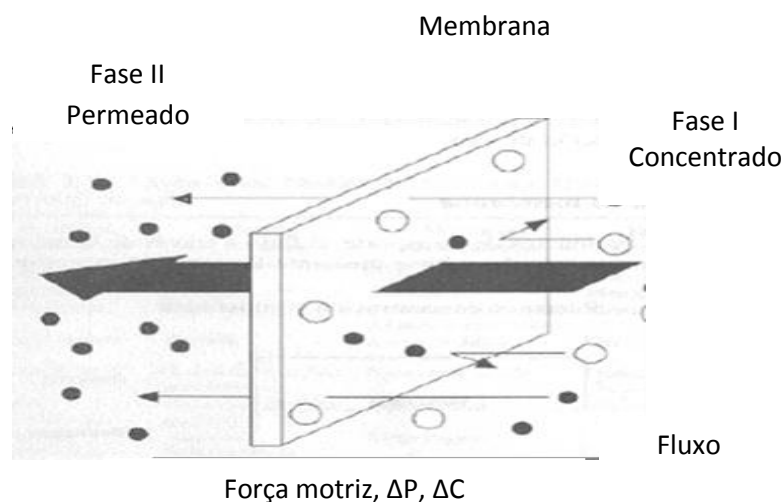
### **4.1 Processos de separação com membranas**

Os processos de separação com membranas, embora recentes, têm vindo a ser cada vez mais utilizados com o intuito de se melhorar a qualidade dos diferentes tipos de água na superfície terrestre. As tecnologias de membranas também são usadas em indústrias, tais como as químicas, farmacêuticas, têxteis, do papel e alimentares, quer na recuperação de produtos, quer nos seus sistemas de tratamento. Nas tecnologias por membrana, é possível separar e remover solutos dispersos em solução ou suspensão. Desta maneira, as membranas são utilizadas tanto para purificar produtos como para concentrá-los. Estes processos apresentam como principais atractivos, em relação aos processos convencionais de separação, o baixo consumo de energia, a redução do número de

etapas, maior eficiência na separação e elevada qualidade do produto final (Mulder, 1996).

As membranas permitem separar substâncias com diferentes propriedades físico-químicas (tamanho, forma, difusibilidade, etc.). O trabalho prático dessas barreiras fundamenta-se nas características das membranas semi-permeáveis que podem ser definidas como o conjunto de métodos e propriedades que contribuem para o transporte de matéria através de materiais com permeabilidade selectiva. Uma membrana semi-permeável é, portanto, uma barreira que permite transferências de matéria entre dois meios que ela separa (Pelegrin, 2004).

As membranas são meios filtrantes que apresentam uma barreira selectiva, a qual retém partículas de tamanho e peso molecular diferentes, segundo o diâmetro dos seus poros ou por difusão dos solventes através da membrana. Os processos de separação com membranas podem ser classificados de acordo com a natureza da sua força motriz ou gradiente de separação: pressão, potencial químico e potencial eléctrico. A aplicação de uma força motriz promotora de movimento, tal como a pressão, provoca o fluxo do solvente e soluto através da membrana. A parte da solução conhecida como “permeado” ou “filtrado” consiste em moléculas menores do que o tamanho médio dos poros da membrana que, juntamente com o solvente, passam através da membrana. A outra parte da solução a ser tratada, que fica retida, é denominada “concentrado” ou “retido” e é composta por solutos de alta massa molecular, tais como as macromoléculas e partículas coloidais (figura 4.1).



**Figura 4.1:** Representação de um processo de separação de duas fases por uma membrana  
**Fonte:** Adaptado de Ayala e outros, 2006

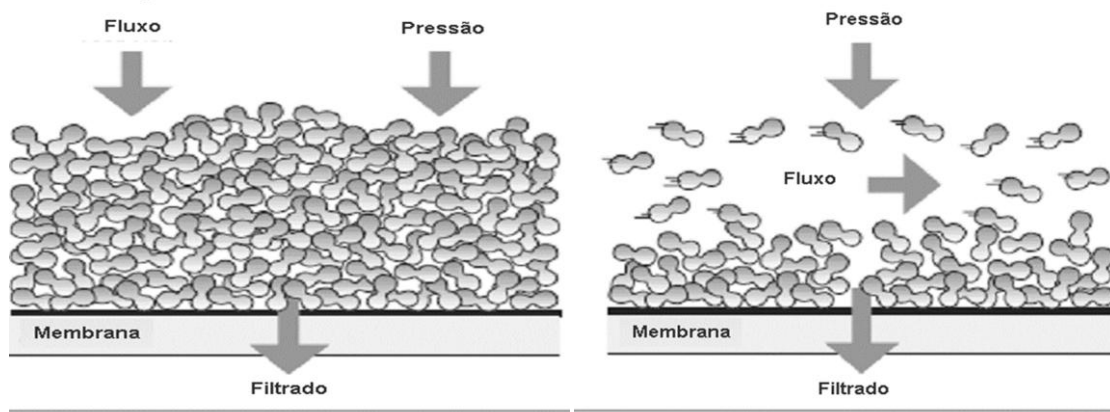
Em relação aos processos de membranas onde se utiliza a pressão como força motriz para a transferência de massa podem ser classificados dentro de quatro classes principais de acordo com as dimensões das partículas a reter (tabela 4.1). O tamanho das partículas diminui quando se passa da microfiltração para a ultrafiltração, depois à nanofiltração e por fim à osmose inversa (Maurel, 1996). Estes processos têm sido utilizados para concentrar, fracionar e purificar soluções diluídas, em particular soluções aquosas.

**Tabela 4.1:** Intervalos de pressão e fluxos volumétricos de permeado para processos de membrana cuja força motriz seja uma diferença de pressão (adaptado de Mulder, 1996).

Processo	Tamanho das partículas retidas	Gama de pressões (bar)	Gama de fluxo ( $L.m^{-2}.h^{-1}.bar^{-1}$ )
Microfiltração	0,1 – 10 $\mu m$	0,1 – 2,0	>50
Ultrafiltração	1 – 100 nm	1,0 – 5,0	10 – 50
Nanofiltração	0,5 – 5 nm	5,0 – 20	1,4 – 120
Osmose Inversa	< 1 nm	10 – 100	0,05 – 1,4

Os processos de separação envolvendo fases líquidas e que têm como força motriz da separação um gradiente de pressão podem ser de dois tipos: filtração convencional, em que o fluxo de fluido (suspensão ou solução) alimentado é perpendicular à membrana e paralelo ao fluxo de permeado; e filtração tangencial, em que o fluxo de suspensão ou solução alimentada é perpendicular ao fluxo de permeado.

Na filtração convencional as partículas ou macrosolutos retidos formam uma camada ou bolo sobre a membrana que aumenta de espessura com o tempo de filtração. Na filtração tangencial, a espessura da camada depositada não aumenta indefinidamente, pois as tensões de corte, originadas pelo fluxo tangencial à superfície da membrana, provocam o transporte das partículas ou macrosolutos de volta ao seio da solução (Motta, 2006) (figura 4.2).



a) Filtração convencional

b) Filtração tangencial

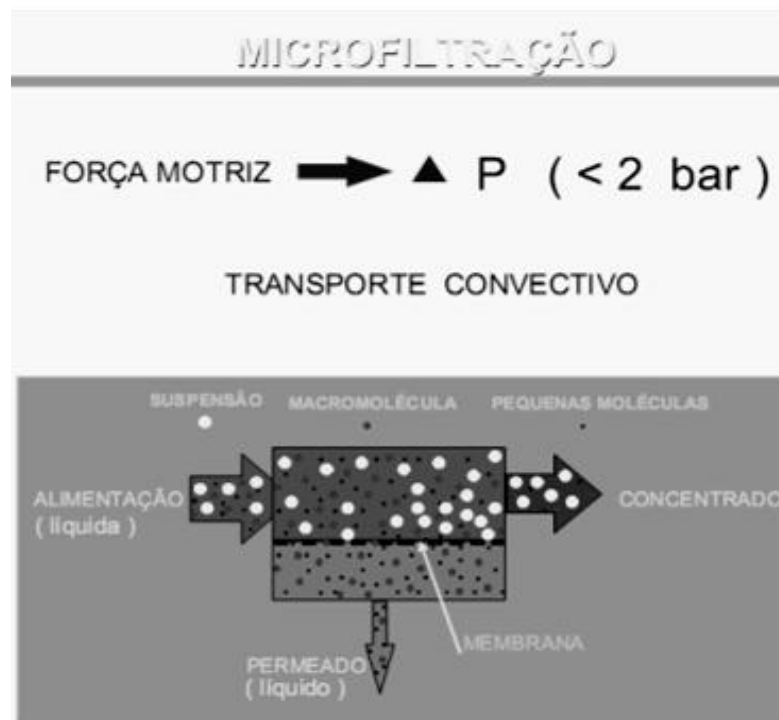
**Figura 4.2:** Comparação entre filtração convencional a) e filtração tangencial b).

Fonte: Motta 2006

Os processos de separação com membranas possuem algumas vantagens em relação a outros processos: economia de energia, selectividade, possibilidade de separar compostos sensíveis ao calor e, simplicidade de operação e escalamento.

#### 4.1.1 Microfiltração

A microfiltração é um processo de separação por membranas em que a força motriz é a diferença de pressão através da membrana e os poros da membrana, para separação ou concentração de partículas suspensas, de microrganismos, de grandes moléculas e de emulsões (Nogueira, 2003). Uma membrana típica de microfiltração possui o tamanho dos poros entre 0,1 e 10  $\mu\text{m}$ , sendo portanto processos indicados para a retenção de materiais em suspensão e emulsão. Na microfiltração o solvente e todo o material solúvel permeiam a membrana. Apenas o material em suspensão é retido. As características básicas do processo de microfiltração são resumidas na Figura 4.3 (Motta, 2006).



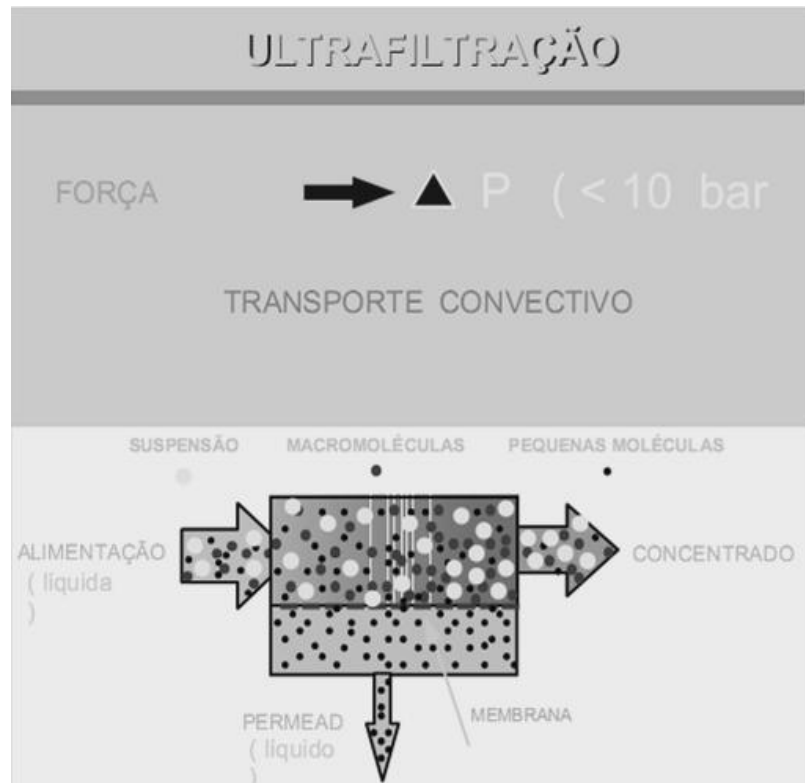
**Figura 4.3:** Características básicas da microfiltração

O desempenho da microfiltração em muitas aplicações é limitado pela colmatção de membranas, que acarreta um decréscimo no fluxo de filtrado. As perdas contínuas na capacidade do filtro são devidas à formação de depósito que surge naturalmente na superfície da membrana durante a microfiltração e que, em adição à queda do fluxo da membrana, age como uma membrana secundária reduzindo a selectividade da membrana original (Motta, 2006).

#### 4.1.2 Ultrafiltração

A ultrafiltração é um processo de separação com membrana, em que o líquido a ser tratado circula, sob uma certa pressão, em contacto com a membrana. Através desta o solvente e algumas espécies de baixo peso molecular conseguem passar para o permeado, enquanto que as moléculas de pesos moleculares maiores permanecem no concentrado. Neste processo utilizam-se membranas microporosas, cujos diâmetros dos poros estão compreendidos entre 1 e 100 nm portanto mais fechadas do que as membranas de microfiltração. Estas possuem baixa retenção de sais e moléculas orgânicas de massa molar inferior a 200 Da (1Da=1g/mol), e retêm significativamente moléculas de massa molar elevada, tais como polímeros, proteínas, e em geral de forma

total partículas coloidais (Mulder,1996 e Maurel, 1996). Na Figura 4.4 estão apresentadas as características básicas do processo de ultrafiltração (Motta, 2006).



**Figura 4.4:** Características básicas da ultrafiltração.

Como as membranas de ultrafiltração apresentam uma distribuição de tamanho de poros elas podem reter de maneira distinta, solutos de pesos moleculares diferentes. O Coeficiente de rejeição,  $R$ , de uma membrana para um dado soluto é definido pela relação:

$$R = 1 - \frac{C_p}{C_o} \quad \text{Equação 4.1}$$

onde  $C_p$  e  $C_o$  representam a concentração do soluto no permeado e na alimentação, respectivamente.

No caso da ultrafiltração, a selectividade de uma membrana é, em geral, caracterizada pelo *cut-off*. Este é um termo usado para classificar membranas de ultrafiltração, sendo um dado frequentemente fornecido pelos fabricantes de membranas. Contudo, o seu significado é por vezes ambíguo, caso não sejam especificadas as condições de determinação. Na maior parte dos casos indica a massa molar dos solutos a partir da qual a rejeição é superior a 90 % (Maurel, 1996).

## 4.2. Coagulação /floculação

As águas residuais e potáveis, em quantidades diferentes, contêm material em suspensão, sólidos que podem sedimentar e/ou sólidos dispersos que têm dificuldade em sedimentar graviticamente. Uma parte desses sólidos podem ser coloides. Nos coloides, cada partícula encontra-se estabilizada por uma série de cargas (eléctricas) superficiais do mesmo sinal, as quais geram entre si repulsão electrostática. Uma vez que este fenómeno impede o choque entre as partículas, não existe tendência natural para que as partículas formem agregados de maiores dimensões, designados por flocos. As operações da coagulação e floculação destabilizam os coloides originando a sua agregação e sedimentação. Isto consegue-se em geral pela adição de agentes químicos aplicando agitação (Trindade e outros, 2006).

Os processos de coagulação/ floculação têm sido utilizados para o tratamento de água potável e de efluentes industriais, tanto como etapa de pré tratamento como etapa de tratamento terciário (Furlan, 2008).

Vulgarmente os termos coagulação e floculação utilizam-se indistintamente em relação à formação de agregados de partículas. No entanto, convém salientar as diferenças conceptuais entre estas duas operações. A coagulação corresponde ao fenómeno de destabilização da suspensão coloidal, enquanto a floculação limita-se às acções de transporte das partículas coaguladas para provocar colisões entre elas promovendo a sua aglomeração (Trindade e outros, 2006).

O termo coagulação, deriva da palavra latina **coagulare**, que significa juntar. A coagulação descreve o efeito produzido pela adição de um produto químico a uma dispersão coloidal . Esta adição provoca uma destabilização de um coloide produzida

pela eliminação da dupla camada eléctrica que envolve as partículas coloidais com a formação de núcleos microscópicos (Trindade e outros, 2006). Nesta etapa ocorre a formação de partículas, que estarão propícias a realizar a etapa seguinte a floculação.

A floculação deriva do verbo Latino **floculare**, que significa formar um floco ou uma aglomeração de partículas (Soares, 2004). Aglomeração das partículas desestabilizadas primeiro em microflocos e posteriormente em aglomerados mais volumosos chamados flocos.

Durante o processo de floculação, os agregados de partículas, inicialmente pequenos, tendem a juntar-se em aglomerados de maiores dimensões (capazes de sedimentar graviticamente), quando se promove o contacto entre eles através de agitação da suspensão (Trindade e outros, 2006).

O tratamento prévio aos coloides, tendo em vista a sua separação por precipitação, implica portanto duas etapas sequenciais (Trindade e outros, 2006):

1. Destabilização (as teorias sobre o mecanismo deste fenómeno baseiam-se na química coloidal e de superfícies)
2. Transporte de núcleos microscópicos para formar agregados densos ( a teoria do transporte baseia-se na mecânica dos fluidos).

Têm-se postulado diversas teorias para descrever o fenómeno das repulsões entre partículas coloidais. Essencialmente o que é necessário para caracterizar um sistema coloidal é o conhecimento da natureza e amplitude das cargas electrostáticas das partículas. A intensidade da carga superficial determina a distância mínima (de equilíbrio) a que as partículas se podem aproximar entre si. Quanto maior for essa carga, maiores serão as forças de repulsão e portanto maiores os impedimentos electrostáticos à aproximação das partículas (Matos e outros, 2007; Trindade e outros, 2006).

O potencial zeta é uma medida desta força de repulsão. Quanto maior for o seu valor absoluto, maior será a carga superficial da partícula. À medida que diminui o seu potencial zeta as partículas podem aproximar-se mais aumentando a probabilidade de uma colisão. Os coagulantes fornecem cargas de sinal contrário para atenuar ou eliminar esse potencial. Note-se que no entanto a coagulação pode decorrer a um potencial baixo sem necessidade de completa neutralização. Se for adicionado demasiado coagulante as

partículas ficam carregadas com sinal contrário (ao inicial) e podem voltar a dispersar-se no líquido formando de novo uma suspensão estável (Trindade e outros, 2006).

Para complementar e tornar efectiva a adição do agente coagulante é necessário promover a homogeneização da suspensão para que se produza a destruição da estabilidade do sistema coloidal (destabilização). Para que as partículas se aglomerem devem chocar entre si, sendo necessária agitação do meio. O movimento *browniano*, movimento aleatório induzido nas pequenas partículas ao serem atingidas por moléculas da solução, está sempre presente como uma força homogeneizadora natural. No entanto, a sua acção não é suficiente sendo necessária uma energia adicional de mistura, uma agitação de grande intensidade que distribua o coagulante e origine colisões rápidas. Também são importantes na coagulação a frequência e o número de colisões entre as partículas (Trindade e outros, 2006).

Depois de adicionado o coagulante e realizado a operação de coagulação passa-se à etapa de formação de flocos sedimentáveis. Pode acontecer que o floco formado pela aglomeração de vários coloides não seja suficientemente grande para sedimentar com a rapidez pretendida. Por isso, é por vezes conveniente utilizar produtos coadjuvantes da floculação, designados simplesmente por agentes floculantes. Um floculante reúne partículas numa “rede”, formando “pontes” de ligação entre estas e associando desta forma as partículas individuais em aglomerados. A floculação é estimulada por uma mistura lenta que junta (associa) pouco a pouco os flocos. Uma agitação demasiado intensa pode desagregar os flocos rompendo as baixas energias de aglutinação entre as partículas. Uma boa floculação favorece o tratamento das lamas (desidratação, filtração, etc.) (Trindade e outros, 2006).

Normalmente, os coagulantes metálicos (sais de ferro e alumínio), são os mais usados na clarificação de águas (Barros e outros, 2002; Matos e outros, 2007). Têm a enorme vantagem de actuar simultaneamente como coagulantes e floculantes. Em solução, estes agentes formam espécies complexas hidratadas e carregadas positivamente ( $Fe(H_2O)_6^{3+}$  e  $Al(H_2O)_6^{3+}$ ). No entanto têm o inconveniente de serem muito sensíveis a variações no pH da solução. Se este não se encontra no intervalo adequado a clarificação é pouco efectiva e pode solubilizar o ferro ou o alumínio originando eventuais problemas no processo (Trindade e outros, 2006).

A simulação dos tratamentos de coagulação/ floculação à escala laboratorial é geralmente levada a cabo em aparelhos designados por *Jar test*. Os ensaios realizados *Jar test* reproduzem as condições segundo as quais se processará o tratamento físico-químico à escala real (Furlan, 2008).

O decurso da operação de tratamento engloba três fases fundamentais que na prática correspondem às três etapas do processo: agitação rápida, que promove a dispersão do coagulante (coagulação); agitação lenta, que favorece a agregação dos flocos formados (floculação); e a fase de repouso, durante a qual ocorre a sedimentação dos flocos e a clarificação do líquido tratado (sedimentação) (Furlan 2008).

As dosagens de coagulante e auxiliar de coagulação necessárias para o tratamento de um efluente são de difícil determinação de forma analítica, pois existem inter-relações complexas entre o coagulante químico e os diversos componentes presentes nos efluentes a serem tratados. Portanto, são utilizados os testes (*jar test*) para obter a dosagem mais eficiente e económica de coagulante, para uma determinada intensidade e duração da mistura. A quantidade exacta de coagulante a ser usada e o valor de pH óptimo para que ocorra sedimentação são determinados ensaios com adição de quantidades crescentes de coagulante a um valor de pH pré-determinado (Furlan, 2008).

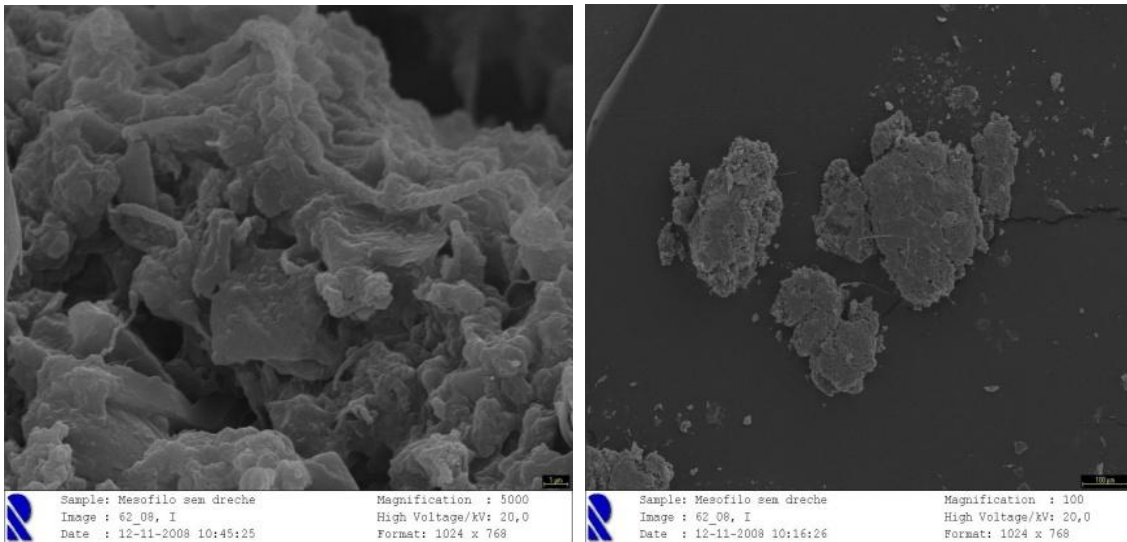
## **5. Material e métodos**

### **5.1. Inoculo e condições de cultura**

Os inoculos (lamas mistas) usados nos ensaios anaeróbios foram desenvolvidos em dois reactores descontínuos sem agitação, um em condições mesófilas ( $37 \pm 2$  °C) e outro em regime termófilo ( $55 \pm 2$ °C).

Ambas as populações foram alimentadas, por substituição do sobrenadante por alimentação fresca, de forma descontínua em intervalos de 24h.

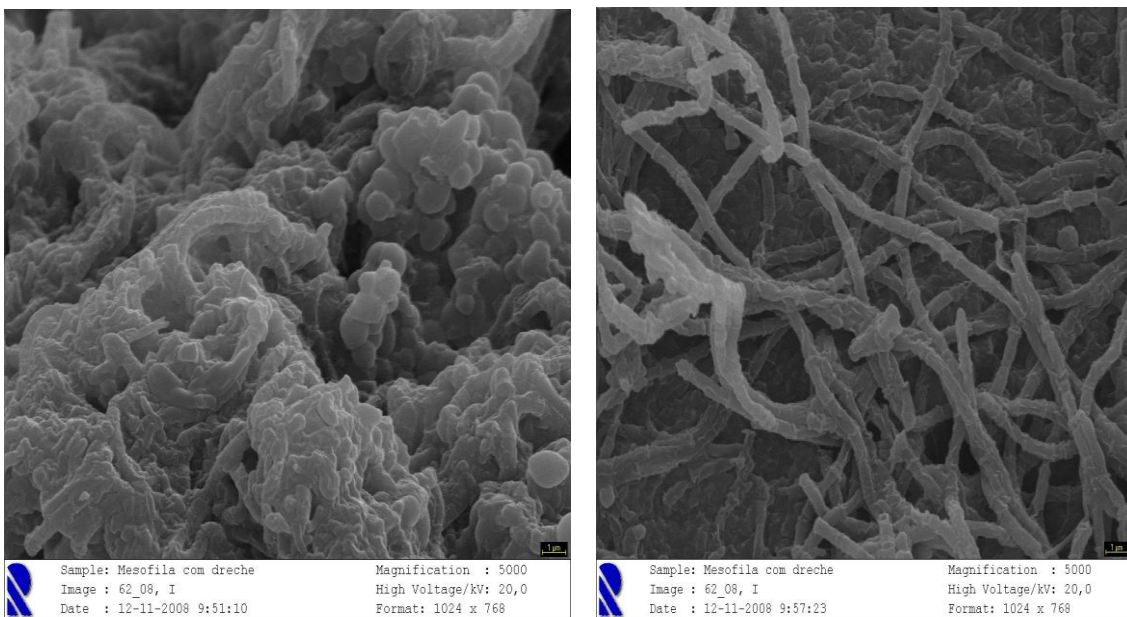
As figuras 5.1, 5.3 e 5.4 mostram as imagens em microscópio electrónico de varrimento das diferentes biomassas usadas, biomassa mesófila sem dreche, biomassa termófila sem dreche e biomassa termófila com dreche incorporada, respectivamente. Na figura 5.2 encontram-se imagens de microscopia electrónica de varrimento de biomassa mesófila com dreche incorporada (não usada neste trabalho) a título de comparação com as restantes (Farropas, 2009).



(a)

(b)

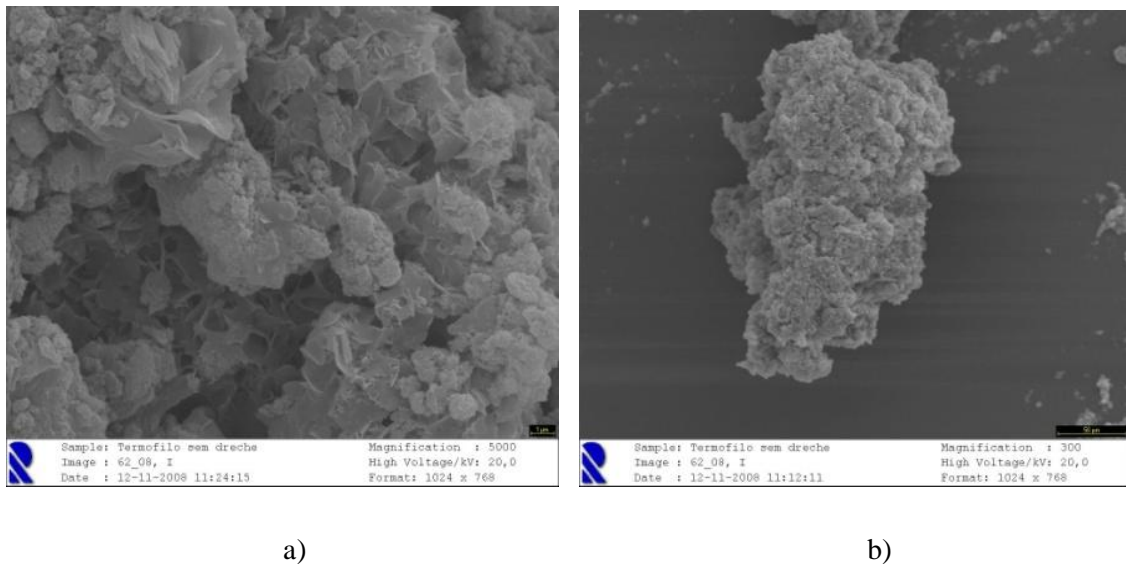
**Figura 5.1:** Biomassa mesófila, com formas esféricas (cocos) e bacilos agrupados, incorporados na biomassa; a) grânulos agrupados em colonias a uma ampliação de 5000 e b) aspecto do grânulo a uma ampliação de 100.



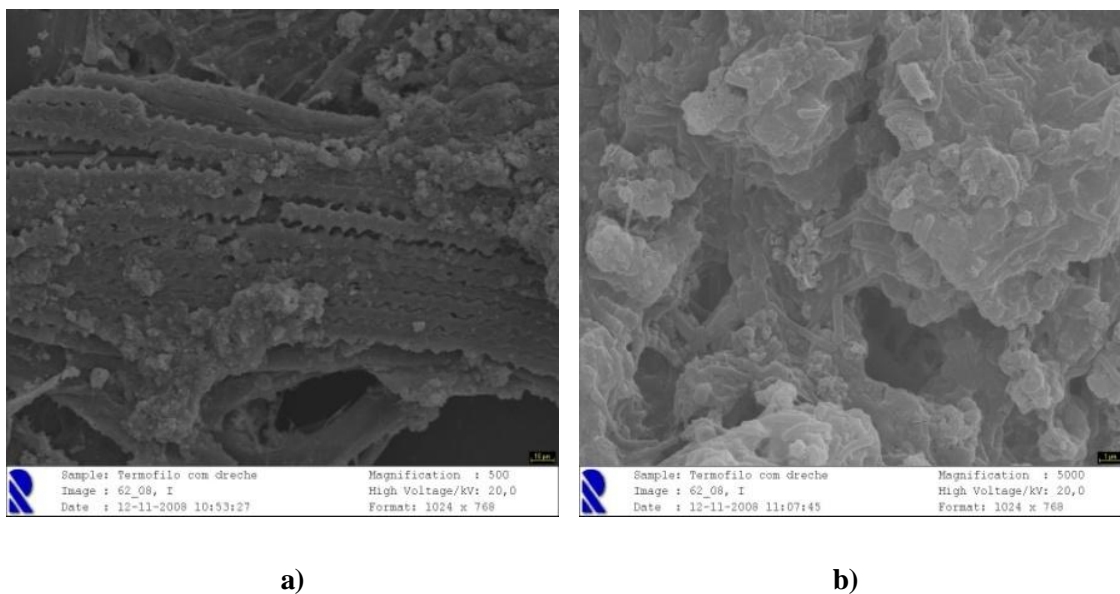
(a)

(b)

**Figura 5.2:** Biomassa mesófila com dreche incorporada, (a) microrganismos com formas esféricas (cocos) agrupados e bacilos agrupados, incorporados na biomassa; (b) microrganismos em forma de bastão (bacilos).



**Figura 5.3:** Biomassa termófila sem dreche, a) ampliação de 5000 e b) formação de um grânulo a uma ampliação de 300.



**Figura 5.4:** Biomassa termófila com dreche parcialmente degradada e bem incorporada na biomassa; a) ampliação de 500 e b) ampliação 5000.

O substrato (glucose) foi dissolvido num meio de cultura (alimentação) com os nutrientes essenciais ao desenvolvimento de populações anaeróbias mistas. O meio de cultura foi resumido nas tabela 5.1 e 5.2. Para neutralizar e tamponizar o meio de cultura utilizou-se bicarbonato de sódio ( $\text{NaHCO}_3$ ), ou um tampão de fosfato (nos ensaios da actividade).

A caracterização e quantificação da biomassa nos reactores foram realizadas 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 inoculo.

**Tabela 5.1:** Composição do meio de cultura utilizado para o desenvolvimento da biomassa anaeróbia mista (adaptado de Brás, 2003 e Lopes, 2005).

<b>Componentes</b>	<b>Substância</b>	<b>Concentração</b>
<b>Nutrientes</b>	CaCl <sub>2</sub>	0,058 g/L
	KCl	0,025g/L
	NH <sub>4</sub> Cl	0,017 g/L
	MgCl <sub>2</sub>	0,011 g/L
	Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	1 g/L
	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	0,037 g/L
	Solução de micronutrientes	0,5 ml/L
	NaHCO <sub>3</sub>	3,7 – 4 g/L
<b>Fonte de Carbono</b>	Glucose	1,5 g/L
<b>Tampão fosfato</b>	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1,28g/L
	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,42g/L

A solução de micronutrientes, que é utilizada para a introdução de oligoelementos, continha a composição indicada na tabela 5.2.

**Tabela 5.2:** Composição da solução de micronutrientes (adaptado de Lopes, 2005)

<b>Compostos</b>	<b>Concentração</b>
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0,1 g/L
FeCl <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O	4 g/L
ZnCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,1 g/L
CuCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,06 g/L
HCl (37%)	1 mL/L
(NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> MoO <sub>7</sub> .4H <sub>2</sub> O	0,18 g/L
NiCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,1 g/L
Na <sub>2</sub> SeO <sub>3</sub> .5H <sub>2</sub> O	0,2 g/L
MnCl <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O	0,5 mg/L

A composição de micronutrientes, compostos inorgânicos, fornece os nutrientes necessários ao bom desenvolvimento da biomassa.

## 5.2. Dreche cervejeira

A dreche utilizada neste trabalho provém de uma empresa de produção de cervejas da região de Lisboa, tendo sido utilizada sem qualquer processo de modificação adicional. A única operação a que foi sujeita constitui numa secagem a 60°C durante 12 h, da responsabilidade da empresa e que teve como principal objectivo aumentar o seu tempo de armazenamento, e reduzir os custos de transporte e armazenamento.

A dreche é um resíduo granular castanho amarelado que resulta da separação do mosto durante o processo de fabricação da cerveja, é constituído por proteínas, glícidos, lenhina, celulose, lípidos e cinzas.

A composição química da dreche cervejeira, utilizada neste trabalho, é descrita na tabela 5.3

**Tabela 5.3:** Composição química da dreche cervejeira utilizada, Silva e outros, 2004.

Componentes	Massa seca (%)
Cinzas	4,6
Extractivos*	9,5
Lignina	16,9
Holocelulose**	67,2

\* Em etanol/tolueno

\*\* Celulose + hemiceluloses, sendo a celulose 25,3 % da holocelulose

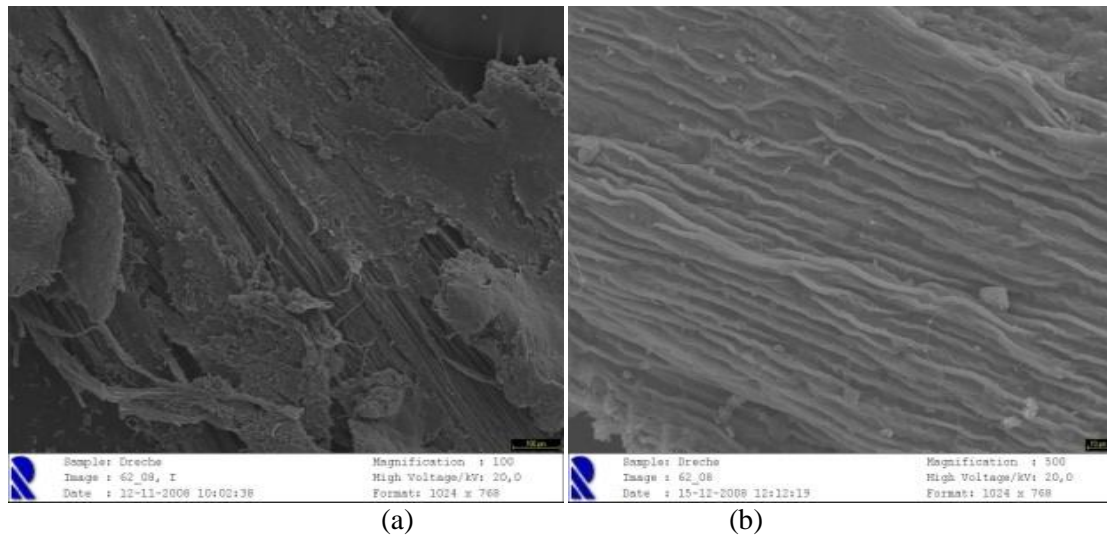
Na figura 5.5 encontra-se a imagem da dreche obtida em microscópio electrónico de varrimento.

### 5.2.1. Dreche Pré-lava

A dreche pré-lavada foi preparada com a dreche referida em 5.2, a qual foi colocada em meio base (tabela 5.1) a 20%, durante 15 – 20 dias, com agitação duas vezes ao dia. Estes ensaios foram efectuados em condições não esterilizada, a  $37 \pm 2$  °C e  $50 \pm 2$  °C .

### 5.2.2. Lixiviado da dreche

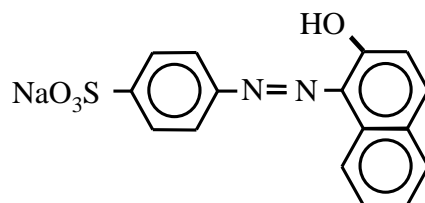
Foi considerado lixiviado da dreche o sobrenadante residual dos referidos em 5.2.1.



**Figura 5.5:** Dreche cervejeira observada por microscopia de varrimento; a) e b) filamentos da dreche a diferentes ampliações: 100 e 500 respectivamente.

### 5.3. Corante Acid Orange 7

O corante usado nos testes foi o *Acid Orange 7* (AO7) – *color Index* nº 15510, com forma molecular  $\text{NaC}_{16}\text{H}_{11}\text{N}_2\text{SO}_4$  e massa molar 350 g/mol. Na figura 5.6 está a representação da sua estrutura química.



**Figura 5.6:** Estrutura molecular do *Acid Orange 7*

O AO7 apresenta um pico de absorvância máximo a um comprimento de onda de 482 nm, sendo a sua curva de calibração, determinada por Brás, 2003 num intervalo de concentrações do corante de 0-55mg/L, a seguinte:

$$\text{Abs (482 nm)} = (0,0590 + 0,0008) \times C (\text{AO7}) + (0,00 + 0,02) \quad \text{equação 5.1}$$

Em que Abs é o valor da absorvância e C a concentração de corante (mg/L).

## 5.4. Métodos analíticos

### 5.4.1 pH

Para medir o pH utilizou-se um aparelho de pH *Methrom 744*. A leitura do pH foi feita no início de cada ensaio e no fim dos mesmos após recolha de cada amostra.

### 5.4.2 Sólidos

A determinação dos sólidos suspensos (SS) e sólidos suspensos voláteis (SSV), foi realizada de acordo com as normas descritas no *Standard Methods 1992*.

Resumidamente para os SS, filtrou-se a vácuo, com membranas Whatmann GF/C de 1,0 µm, um certo volume de amostra e os sólidos retidos na membrana foram secos numa estufa a  $102 \pm 2$  °C durante mais ou menos 24h. Os SS correspondem à diferença de peso entre a membrana com a amostra filtrada a vácuo e a mesma seca na estufa. Para os SSV, continuou-se o procedimento já realizado para os SS em que a membrana e os sólidos contidos nela foram colocados na mufla a  $550 \pm 50$  °C durante 24 h. Os SSV obtiveram-se pela diferença do peso antes e depois da ignição na mufla.

### 5.4.3 Carência Química de Oxigénio (CQO)

A determinação da CQO foi feita pelo método da oxidação em refluxo fechado, num digestor com dicromato, por titulação do dicromato que fica por reagir, após a digestão do material orgânico. A digestão das amostras foi feita em H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a, durante 2 h, a  $148 \pm 2$ °C. Nestas condições, a matéria orgânica é oxidada a CO<sub>2</sub> e água. Para evitar a interferência dos cloretos, usou-se sulfato de mercúrio, que é adicionado à solução padrão de dicromato (solução I). Para garantir a oxidação dos álcoois e ácidos de cadeia longa usou-se o sulfato de prata como catalisador, que foi adicionado à solução de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrada (solução II). Para 1,5 ml de amostra adiciona-se 1 ml de solução I e 2 ml de solução II. O excesso de dicromato foi titulado com uma solução de sulfato ferroso amoniacal, usando-se como indicador uma solução aquosa de ferroína.

A CQO foi determinada na fase solúvel das amostras. As amostras recolhidas no final dos testes foram previamente centrifugadas a 4000 rpm durante 10 minutos a fim de separar a matéria em suspensão.

#### 5.4.4 Cor

A análise do corante foi feita por espectrofotometria na região do ultravioleta visível (entre 200 nm e 800 nm), tendo sido utilizado um aparelho de duplo feixe, *Perkin-Elmer*, modelo Lambda 6. As diferentes leituras de absorvância foram efectuadas em células de 1 cm de espessura.

#### 5.4.5 Determinação do teor de proteína

Neste trabalho o teor de proteína foi calculado a partir da determinação do azoto de *Kjeldahl*. Para se obter o teor de proteína deve multiplicar-se o azoto de *Kjeldahl* por um factor,  $k_p$ , o qual varia em função do tipo de proteína. Para as bactérias e arquea anaeróbias utilizou-se um factor de *Kjeldahl* ( $k_p$ ) de 4,2 g-proteína/g-N-NH<sub>3</sub> (Schmidt e outros, 1994) e para a dreche de 6,25 g-proteína/g-N-NH<sub>3</sub> (Briggs, 1998).

O procedimento seguido para a determinação do azoto total de *Kjeldahl* foi o indicado no *Standard Methods*, 1992.

Este método baseia-se numa mineralização dos compostos orgânicos contidos na amostra, com formação de sulfato de amónio NH<sub>4</sub>HSO<sub>4</sub>, após o que se procede à libertação de amoníaco, por destilação, sendo fixado numa solução de ácido bórico e indicadores, realizando-se então uma titulação com ácido sulfúrico que permite obter o valor de azoto presente na amostra.

Este método passa por três fases: ataque da amostra, destilação e titulação. Durante o ataque forma-se um complexo de cobre e amónia que é decomposto pelo tiosulfato de sódio.

A libertação do amoníaco contido no hidrogenossulfato de amónio consegue-se por adição de base concentrada em quantidade suficiente para elevar o pH a valores iguais ou superiores a 11, realizando-se de seguida a destilação. O destilado, contendo o amoníaco é recolhido numa solução indicadora de ácido bórico, sendo fixado pelo ácido.

A concentração da amónia foi 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. Calculou-se de seguida o teor de proteína expresso em mg NH<sub>3</sub>-N/L.

#### 5.4.6 Determinação da lignina

Este procedimento foi feito em dois passos: determinação da lignina solúvel que permanece após acidificação do meio (LS) e lignina precipitada em meio ácido (LPA). A matéria insolúvel pode conter cinzas e proteínas, o que deve ser contabilizado no decurso da análise gravimétrica. A lignina solúvel é medida por espectroscopia UV-visível.

Sabendo a quantidade de lignina solúvel e Insolúvel pode-se calcular a lignina total, sendo esta dada por:

$$\text{Lignina total} = \text{lignina solúvel} + \text{lignina precipitada em meio ácido} \quad \text{Equação 5.2}$$

##### 5.4.6.1 Lignina precipitada em meio ácido

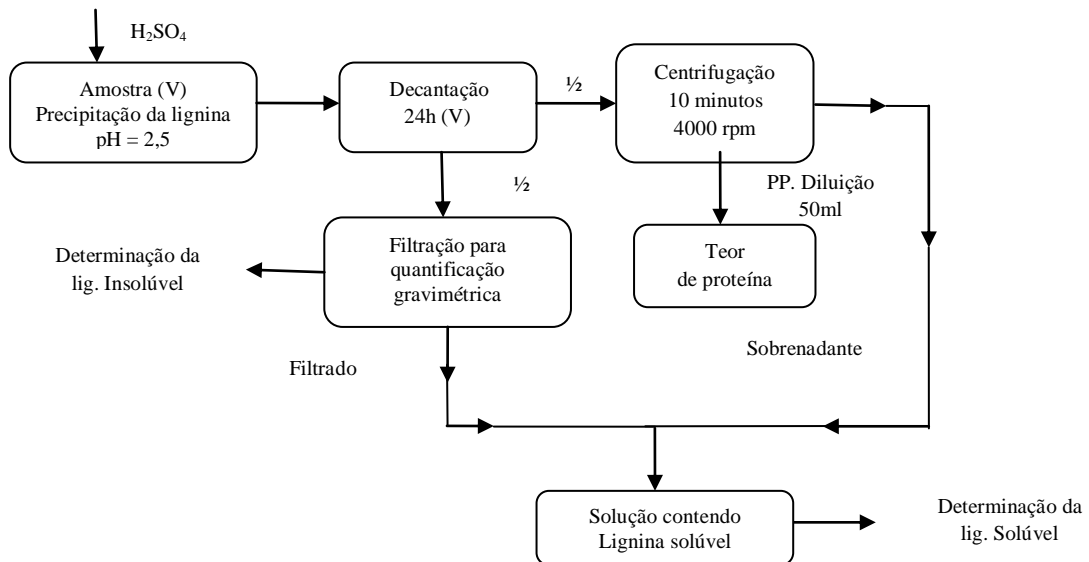
Para a determinação da lignina precipitada em meio ácido (LPA), inicialmente foi adicionado à  $\text{H}_2\text{SO}_4$  concentrado até pH 2.5 para levar à precipitação da lignina, deixando-se posteriormente decantar durante 24h.

Após decantação, homogeneizou-se a solução e dividiu-se em duas partes de igual volume, uma para quantificação gravimétrica (solução I) e a outra para a determinação do teor de proteína (solução II).

Para a quantificação gravimétrica (determinação de SS, SSV e cinzas) filtrou-se a solução I e procedeu-se como o já descrito na secção 5.4.2 guardando-se o filtrado para posterior análise da lignina solúvel.

As amostras usadas na quantificação do teor de proteína solução II foram centrifugadas durante 10 minutos a 4000 rpm, numa centrifugadora opendorf 5702RH. Concluída a centrifugação recolheu-se o sobrenadante, o qual foi adicionado ao filtrado da solução I e homogeneizou-se esta nova solução. Transferiu-se o precipitado para um balão de 50ml, perfazendo-se o volume com água destilada, para posterior análise do teor de proteína.

Na figura 5.7 encontra-se, numa forma esquemática, os passos seguidos para determinação da lignina.



**Figura 5.7:** Esquema do procedimento para determinação da lignina.

O teor de lignina (L) foi calculado através da seguinte expressão:

$$(L) = Pp \text{ da centrifugação (ou teor de SS) - teor de cinzas - teor de proteínas} \quad \text{Equação 5.3}$$

sendo a respectiva percentagem dada por:

$$\% L = \frac{\text{teor de L}}{SS} \times 100 \quad \text{Equação 5.4}$$

O teor de cinzas é dado por:

$$\text{Teor de cinzas (g/L)} = SS - SSV \text{ (g/L);}$$

em que

Pp – teor de precipitado (g/L),

SS- teor de sólidos suspensos (g/L) e

SSV- teor de sólidos voláteis (g/L).

#### 5.4.6.2 Lignina solúvel após precipitação em meio ácido

A determinação da lignina solúvel (LS) foi feita através da análise espectrofotométrica por UV- Visível da solução remanescente da filtração e do sobrenadante resultante da centrifugação da lignina precipitada em meio ácido. A absorvância foi medida ao comprimento de onda de máxima absorção, seleccionado para este tipo de lignina,

sendo usado como branco água destilada (tabela 5.4). Esta etapa deve ser efectuada no mais breve espaço de tempo, a fim de se evitar a hidrólise de compostos que poderão afectar a quantificação da lignina (de preferência nas primeiras 6 horas após a recolha da fracção solúvel).

A quantidade de LS presente da amostra é assim dada pela seguinte equação:

$$LS = \frac{Abs \times V_{filtrado} \times Diluição}{\epsilon} \quad \text{Equação 5.5}$$

em que

LS –lignina solúvel que permanece após acidificação do meio;

Abs – absorvância da amostra para o comprimento de onda de absorção máxima;

V – Volume de filtrado (ml);

$\epsilon$  – Absortividade da biomassa a um comprimento de onda específico (nm)

**Tabela 5.4:** Comprimento de onda de absorvância máxima e constantes de absortividade para determinação da lignina consoante o tipo de biomassa usado. (adaptada Sluiter, e outros; 2008)

Tipo de biomassa	Comprimento de onda recomendado (nm)	Absortividade ao comprimento de onda recomendado (L/g.cm)
Bagaço NIST SRM 8493	240	25
Restolho de milho – NREL	320	30

*NREL – National Renewable Energy Laboratory*

#### 5.4.7 Microscopia electrónica de varrimento

Para se realizarem as análises por microscopia electrónica de varrimento (*SEM-scan electronic microscopy*) a amostras de biomassa anaeróbia mesófila e termófila incubadas com dreche e sem dreche, foi necessária uma preparação prévia destas. Assim, foi introduzida um volume pequeno de cada amostra em receptáculos individuais cilíndricos de PVC perfurado milimetricamente, com dimensões próximas de 1,5 cm de diâmetro por 1,5 cm de altura. De seguida, todas as amostras foram

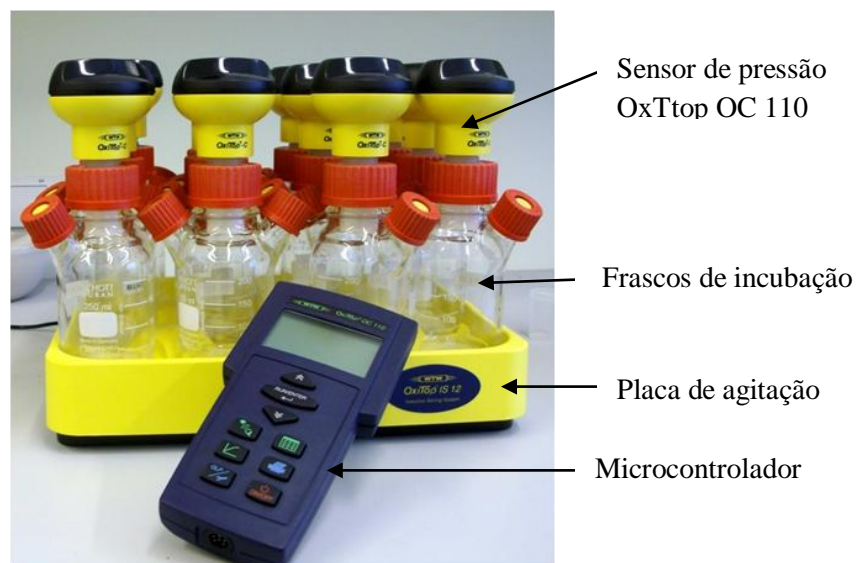
imersas, por um período de 120 minutos, num volume de 25 ml de uma solução de glutaraldeído a 4 %. Posteriormente, os receptáculos foram imersos, por períodos de 15 minutos, em sucessivas soluções aquosas de etanol com concentrações crescentes de 10, 20, 30, 50, 70 e 90%, finalmente, imersas por três vezes consecutivas (15 minutos cada) em etanol puro, para desidratação da amostra. Após desidratação a amostra passou por um processo de substituição do álcool por CO<sub>2</sub> e posterior metalização com ouro. Após a preparação das amostras foram obtidas as imagens por *SEM* num microscópio electrónico de varrimento Hitachi- 2700.

## 5.5 Metodologia experimental

### 5.5.1 Ensaio de actividade metanogénica específica e biodegradabilidade anaeróbia

Os ensaios, de Actividade Metanogénica Específica (SMA- *Specific Methanogenic Activity*), e da Biodegradabilidade Anaeróbia, foram realizados em sistemas manométricos OxiTop OC 110, da WTW (figura 5.8). Estes sistemas permitem o registo da variação da pressão durante o período de incubação, em hPa, através de um sensor electrónico. O incremento da pressão nos frascos de incubação depende da actividade metabólica da biomassa, inoculo, nas condições específicas do ensaio.

Estes ensaios tiveram por objectivo quantificar o biogás produzido na conversão de substrato orgânico por culturas anaeróbias durante um intervalo de tempo definido.



**Figura 5.8:** Frascos de incubação com Sistema OxiTop

Os ensaios constituíram basicamente na incubação em contínuo, de amostras de biomassa anaeróbia mesófila e termófila, conforme as condições pretendidas, em frascos de 250 ml de capacidade, com agitação magnética, mantidos em estufas termostatizadas a  $37 \pm 2$  °C, regime mesófilo e  $50 \pm 2$ °C, regime termófilo respectivamente.

A biomassa, inóculo referido na secção 5.1, foi previamente lavada duas vezes com solução tampão de fosfato (1.28 g/L  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  e 0.42 g/L  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ), para remoção do substrato residual. A lavagem foi efectuada à temperatura de incubação das culturas.

No início do ensaio, colocou-se em cada frasco de incubação 22 ml meio base (tabela 5.2) preparado com solução tampão de fosfato (59% v/v), biomassa previamente lavada e sedimentada (26,5% v/v), e dreche cervejeira (6,5 v/v) humedecida em solução tampão fosfato ou dreche pré-lavada (secção 5.2.2). Efectuou-se uma purga do meio reaccional (biomassa, solução basal e dreche) com azoto durante cerca de 10 minutos. Os frascos foram em seguida fechados, colocaram-se os sensores OxiTop e mantiveram-se nas estufas termostatizadas em ambiente mesófilo e termófilo durante  $\pm 12$  h, a fim de se estimular o consumo da matéria orgânica armazenada nas células, e para adaptação das lamas às condições específicas do ensaio, completando-se um período de carência de substrato de aproximadamente 24 h. Após este período, foi injectada de solução concentrada de substrato (fonte de carbono solúvel a 55g/L), glucose ou acetato de sódio (referida como acetato no presente trabalho) de forma a garantir no meio de cultura dos frascos de incubação as concentrações pretendidas (3,85 g/L na fase líquida). Simultaneamente e quando necessário injectou-se solução de corante (1g/L) de modo a obter uma concentração na fase líquida nos frascos de 50 mg/L. A adição do substrato e corante foi cerca de 8% (v/v) de volume total da mistura reaccional. Para o estudo da SMA usou-se como branco uma mistura reaccional idêntica, mas sem adição de substrato e corante (10ml biomassa  $\pm$  25 ml meio base). No estudo da biodegradabilidade o branco além de conter 10 ml biomassa e 25 ml de meio base, também continha 2,5 ml de dreche cervejeira húmida.

A composição da solução basal é igual à do meio de cultura, sem fonte de carbono mas com solução tampão fosfato (20g/L  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  e 2 g/L  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ).

A contagem do tempo de incubação iniciou-se após a adição de substratos e corante. As medições da variação de pressão foram realizadas automaticamente pelo sensor de

acordo com os intervalos de tempo programados, tendo sido a análise da *SMA* efectuada pela leitura de pressão no controlador após 24 h de incubação nos frascos, considerando-se, normalmente, apenas os resultados obtidos nos primeiros 60 minutos.

Os ensaios foram realizados em duplicado, quer para determinação da actividade, quer para a biodegradabilidade.

A *SMA* é em geral expressa em função do volume de biogás, vindo expressa em unidades de  $L_{(\text{biogás})}/(\text{gSSV} \times \text{d})$ . Os testes de actividades devem se efectuados com culturas na fase de crescimento exponencial (excesso de substrato) na qual a reacção ocorre à velocidade máxima. A actividade anaeróbia deve ser calculada à velocidade máxima de produção de biogás, a partir do declive máximo ( $m$ ) da curva obtida por representação dos valores do incremento da pressão em função do tempo de incubação.

Para o cálculo da *SMA*, converteu-se o valor do declive (hPa/h) em volume de biogás produzido por hora, a partir da lei dos gases perfeitos e dividiu-se pela massa de biomassa contida no frasco de incubação, quantificada como sólidos suspensos voláteis (SSV). A equação 4.5 Apresenta a equação geral para a determinação da actividade metanogénica específica:

$$SMA = \frac{P \times V_d \times V_m}{R \times T \times m} \quad \text{Equação 5.6}$$

em que:

*SMA*- actividade metanogénica específica ( $L_{\text{biogás}}/(\text{gSSV} \times \text{d})$ );

P-Variação de pressão por unidade de tempo (Pa/d);

$V_m$ - volume molar à pressão e temperatura de trabalho ( $\text{m}^3/\text{mol}$ );

$V_d$ - volume disponível para o gás ( $\text{m}^3$ );

R- constante dos gases perfeitos ( $8,314 \text{ J}/(\text{mol} \cdot \text{K})$ );

T- temperatura (K) ;

m- massa de biomassa (gSSV) e

$V_d$ -Volume disponível =  $V_{\text{total}} - V_{\text{mistura reaccional}}$ .

Nos estudos de biodegradação as medições de pressão foram realizadas de acordo com intervalos de tempo programados, entre 24 a 28 dias, sendo os seus valores registados e

guardados nos sensores automaticamente. No final do período de incubação, os valores foram transferidos para um controlador, e deste para um computador permitindo o tratamento de resultados e respectiva representação gráfica.

Terminados os ensaios (28 dias após o início) as amostras foram recolhidas, e leu-se o respectivo pH para posterior análise da biodegradabilidade anaeróbia. Para tal as amostras foram centrifugadas para determinação de CQO, Cor, e lignina. A concentração de corante foi determinada por espectrofotometria, sendo a absorvância medida ao comprimento de onda correspondente à absorvância máxima ( $\lambda_{\max} = 482$  nm). A concentração de corante em g/L foi calculada de acordo com a lei de Lambert-Beer pela curva de calibração, equação 5.1.

Com base nas curvas cumulativas de biogás obtidas nos ensaios de biodegradabilidade anaeróbia foi calculada a produção média de biogás por unidade de massa de biomassa e por unidade de tempo.

### 5.5.2 Ensaio de afinação

Recorreu-se aos processos de afinação com o objectivo de remover a carga poluente residual

Os processos de afinação, usados em tratamento de efluentes, destinam-se normalmente a complementar os processos anteriores, aumentando a eficiência de remoção de sólidos em suspensão, de nutrientes ou compostos tóxicos específicos que não possam ser eliminados pelos processos de tratamento convencionais.

Neste trabalho foram usados como processos de afinação, tecnologias de membranas, mais propriamente a microfiltração, e também a testes de coagulação/floculação.

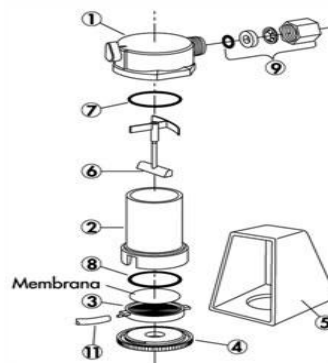
Em cada um destes métodos visou-se sobretudo reduzir a quantidade de matéria orgânica, bem como a de outros sólidos, mais propriamente a lignina, presentes no efluente a tratar. A eficiência de cada tipo de tratamento foi determinada em função da capacidade de remoção de lignina e índice de carga orgânica (CQO).

Nos processos de afinação aqui estudados, usou-se dois tipos de efluentes de descarga diferentes, provenientes do tratamento biológico em bioreactores UASB – *Upflow*

*Anaerobic Sludge Blanket*, a operarem em condições termófilas ( $55 \pm 2^\circ\text{C}$ ) - efluente termófilo e mesófilas ( $34 \pm 2^\circ\text{C}$ ) – efluente mesófilo, com dreche incorporada no leito da biomassa bacteriana. Os reactores em causa estavam a ser aplicados ao tratamento de um efluente têxtil simulado sem adição de corantes.

### 5.5.2.1 Microfiltração

Os ensaios de microfiltração foram levados a cabo em uma célula da *Amicon/Millipore* modelo 8010, onde foram realizados ensaios a baixa pressão (de 0,5 a 2 bar). Na figura 5.9 pode ver-se a célula de microfiltração com agitação *Amicon/Millipore* 8010 de 10 mL utilizada neste trabalho, bem como a sua representação esquemática.



#### Legenda:

- |  |   |
|--|---|
| 1 – Tampa                                      | 6 - Agitador magnético                      |
| 2 - Corpo da célula                            | 7 - o-ring                                  |
| 3 - Suporte da membrana                        | 8 - o-ring                                  |
| 4 – Base                                       | 9 –Ligação ao tubo que vem da garrafa de N2 |
| 5- Suporte da célula (evita que a tampa salte) | 11 – Tubo do permeado                       |

**Figura 5.9:** Célula de microfiltração com agitação *Amicon/Millipore* 8010 de 10 ml.

Fonte: <http://www.microglass.it>

As membranas usadas neste trabalho foram membranas de microfiltração: FSM 0.45 PP, encontrando-se as suas características resumidas na tabela 5.5.

**Tabela 5.5:** Resumo das características da membrana utilizada.

<b>Membrana</b>	<b>FSM 0.45PP</b>
Material	PVDF hidrofílico
Tipo de membrana	Microfiltração

Os ensaios de microfiltração com membranas foram efectuados em duas partes principais: uma primeira parte que inclui o estudo do fluxo crítico para a membrana com o efluente em estudo, e numa segunda parte foram feitos testes de microfiltração a um fluxo abaixo do fluxo crítico.

Primeiramente procedeu-se à determinação do fluxo crítico, pois trabalhar em condições de filtração a regime crítico gera um consumo elevado de energia e aumento dos custos de operação, como também a colmatção certamente irreversível, uma vez que o fluxo crítico determina o fluxo a partir do qual se pode trabalhar na membrana sem haver colmatção irreversível, podendo causar sérios danos à membrana. Portanto a determinação experimental do fluxo crítico é importante para o bom desempenho da membrana.

Previamente aos ensaios, de microfiltração, as membranas foram compactadas e deixadas em repouso durante pelo menos 1 h imersas em água destilada. Esta compactação foi feita fazendo passar água destilada, na célula de microfiltração com agitação a 900 rpm, durante quatro minutos a 2 bar, repetindo-se este procedimento até estabilização dos fluxos.

### Fluxo Crítico

Antes e após dos ensaios para a determinação do fluxo crítico foram realizados testes de permeabilidade hidráulica, para verificar a colmatção da membrana.

O ensaio de permeabilidade hidráulica foi levado a cabo na célula de filtração com agitação de 900 rpm. Estes consistiram na introdução de 10 mL de água destilada na célula de ultrafiltração, registando-se a temperatura ambiente para poder corrigir sempre cada valor para a temperatura de referência, 25 °C. Seguidamente ajustou-se o manómetro à pressão pretendida, (0,5; 1; 1,5 e 2 bar), recolheu-se volume para um copo

previamente tarado, registou-se o tempo para recolha desse volume, mediu-se a massa de permeado recolhido e calculou-se o fluxo de permeação à temperatura ambiente e corrigido para 25 °C usando a seguinte equação

$$J_v(25^\circ C) = J_v(T / ^\circ C) \frac{\eta_w(T / ^\circ C)}{\eta_w(25^\circ C)} \quad \text{Equação 5.7}$$

onde

$J_v(T / ^\circ C)$ - fluxo de permeado à temperatura de trabalho

$$J = \frac{V}{A \times \Delta t} \quad \text{Equação 5.8}$$

em que:

A- Área da membrana

$\Delta t$  -Tempo de filtração

$\eta_w$  - viscosidade da água

Sendo  $\eta_w$  calculada pela equação

$$\eta_w(cP) = 0.398 + 1.39e^{-\frac{T(^{\circ}C)}{23.8}} \quad \text{Equação 5.9}$$

A permeabilidade hidráulica ( $L_p$ ) pode ser calculada por regressão linear dos valores dos fluxos corrigidos para a temperatura de referência (25 °C) em função da pressão, de acordo com a equação:

$$L_p = \frac{J_w}{\Delta P} \quad \text{Equação 5.10}$$

Os ensaios para o cálculo do fluxo crítico também foram feitos na célula de filtração com agitação de 900 rpm, em que se filtrou, a solução a ser estudada, durante 5 minutos a diferentes pressões (0,5; 1;1,5 e 2 bar) começando-se com a pressão mais baixa, registando-se os fluxos obtidos. Para cada valor de pressão repetiu-se o procedimento 10 vezes excepto para a  $P = 2\text{bar}$ , em que apenas se repetiu 5 vezes, até se verificar uma variação pouco significativa de fluxos, que indicam a ausência de colmatação irreversível.

### Microfiltração

Calculado o fluxo crítico procedeu-se aos ensaios de microfiltração a fim de estudar a remoção de lignina nos diferentes efluentes em estudo. Para isso usou-se a célula de microfiltração mas agora à pressão atmosférica com auxílio de uma bomba peristáltica, Watson Marlow 101 U/R, que recolhia o permeado por sucção.

Todos os ensaios de microfiltração foram feitos durante 30 minutos. Para tal, encheu-se a célula com 10 ml do efluente em estudo, e com o auxílio da bomba peristáltica recolheu-se o permeado, cerca de 8 mL a uma velocidade de agitação do efluente de 900 rpm. Todos os ensaios foram feitos em quadruplicado.

Após recolha dos permeados procedeu-se à análise destes, nomeadamente remoção de CQO pelo método analítico referido no sub capítulo 5.4.3 e também análise da remoção de lignina por espectrofotometria na região do ultravioleta- visível referida no sub-capítulo 5.4.4.

#### **5.5.2.2 Coagulação/floculação**

Os ensaios de coagulação/floculação foram efectuados através do *jar test*, tendo-se utilizado para o efeito um floculador de 6 posições, *Stuart Scientific*, modelo Flocculator SW1, com uma velocidade variável entre 7 e 240 rotações por minuto(rpm).

Os ensaios no *jar test* foram efectuados em três fases: coagulação, realizada com a agitação máxima, durante 2 minutos; floculação, durante 30 minutos a uma velocidade de agitação igual a 20 rpm, e sedimentação das amostras (sedimentação), a qual ocorreu durante 1 hora. Nestes ensaios de *jar test* usou-se como agente coagulante, sulfato de Alumínio,  $Al_2(SO_4)_3 \cdot 16H_2O$  [97%], preparando-se uma solução aquosa (10g/L) deste.

Iniciaram-se os ensaios com 1L do efluente em estudo colocado em copos de vidro de 1L de capacidade, (previamente agitado para boa homogeneização); introduziram-se as pás de agitação dentro dos copos, ligou-se o aparelho e ajustou-se a velocidade de agitação para o máximo. Seguidamente adicionaram-se a cada copo quantidades crescentes da solução de agente floculante, preparada previamente (de acordo com a tabela 5.6), mantendo-se a velocidade por mais dois minutos (coagulação); Após este período de tempo reduziu-se a velocidade de agitação para 20 rpm durante 30 minutos

(floculação). Desligou-se a agitação, retiraram-se as pás e deixou-se o meio sedimentar durante 1h (sedimentação). Após sedimentação recolheram-se amostras de cada copo, cerca de 100ml, do sobrenadante de cada copo para posterior análise.

**Tabela 5.6:** Volumes de solução coagulante adicionada em cada copo e respectiva concentração de coagulante no copo

<b>Copo</b>	<b>V (mL) Sol.coagulante</b>	<b>C (g/L) Dentro do copo</b>
1(branco <sup>(1)</sup> )	0	0
2	10	0,1
3	25	0,25
4	50	0,50
5	75	0,75
6	100	1

(1) Usou-se como branco o efluente em estudo

Finalmente, procedeu-se à leitura do pH, espectrofotometria de UV-visível, CQO, turbidez e lignina de cada amostra retirada, assim como à determinação de lignina pelo método descrito na secção 5.4.6, bem como à análise espectrofotométrica. Fazendo-se também estas análises para o branco.

A leitura turbidez das amostras, foi feita usando um turbidímetro da marca *Orbeco-Hellige (Digital Direct Reading Turbidimeter)*, modelo 965-53 com três escalas:0,00-9,99; 00,0-99,9 e 000-999.

## 6. Resultados e Discussão

### 6.1. Ensaios de Actividade Metanogénica Específica e Biodegradabilidade Anaeróbia

A digestão anaeróbia requer a actividade metabólica estável de uma população mista de bactérias, sendo a população metanogénica a mais sensível de entre os membros de todo o acervo bacteriano anaeróbio (Lopes, 2005). Desta forma, um dos primeiros indicadores da falência do processo da digestão anaeróbia é a diminuição da produção de metano.

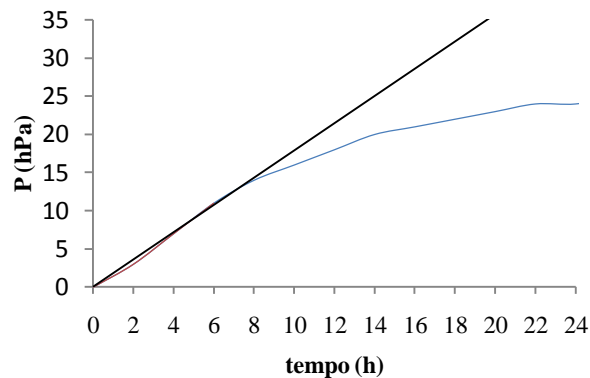
Os ensaios da actividade metanogénica específica consistiram em avaliar a capacidade de culturas mistas, desenvolvidas em diferentes ambientes, termófilo e mesófilo, em converter substratos solúveis (acetato e glucose) e sólidos (dreche cervejeira) em metano e CO<sub>2</sub>. Determinou-se a SMA de culturas mistas desenvolvidas com glucose, em ambiente termófilo e mesófilo e de culturas mistas desenvolvidas com dreche e glucose em ambiente termófilo.

Os testes da SMA foram realizados de acordo com a metodologia descrita na secção 5.5.1.

A figura 6.1 mostra, a título de exemplo, uma das curvas obtidas por representação dos valores de pressão em função do tempo de incubação, a partir da qual se determinaram os valores das actividades. A actividade anaeróbia foi calculada com base no valor do declive máximo da curva, o qual representa a taxa máxima de produção de biogás

(hPa/h). Esta taxa pode ser convertida em volume de biogás por unidade de tempo, pela equação dos gases perfeitos. A SMA foi expressa em relação à massa de biomassa introduzida em cada frasco de incubação, quantificada com base no teor de SSV.

A actividade metanogénica específica foi medida no início da reacção, fase para a qual a velocidade de formação de biogás, nas condições do ensaio, é máxima (ver secção 5.5.1)



**Figura 6.1:** Exemplo de uma curva experimental de actividade metanogénica, usando-se o sistema OxiTop.

Na tabela 6.1 estão representados os valores do teor de sólidos suspensos e sólidos suspensos voláteis obtidos para os diferentes inoculos usados nos ensaios de SMA e biodegradabilidade. Em cada frasco de incubação foi adicionado cerca de 26,5% (v/v) de inoculo, de modo a obter um teor de inoculo no meio reaccional de 2,2-13,4 g SSV/L.

**Tabela 6.1:** Caracterização dos diferentes tipos de biomassa estudados, Sólidos suspensos (SST) e sólidos voláteis (SSV), para os diferentes ensaios.

Inóculos	Ensaio					
	1 a 6			7 a 11		
	SS (g/L)	SSV (g/L)	%inertes	SS (g/L)	SSV (g/L)	%inertes
<b>Termófilas 1</b>	89,2	22,2	75	74,0	15,7	79
<b>Termófilas 2</b>	153,5	28,4	81	-	-	-
<b>Termófilas 3</b>	84,0	27,6	67	-	-	-
<b>Termófilas 4</b>	204,6	46,9	77	-	-	-
<b>Mesófilas 1</b>	8,1	7,8	4	-	-	-
<b>Mesófilas 2</b>	16,7	13,5	19	-	-	-
<b>Mesófilas 3</b>	14,0	12,0	14	13,4	11,2	16

Para os ensaios em regime termófilo usaram-se os inoculos desenvolvidos com glucose (termófilas 1, 2 e 3) e um inoculo tendo como fonte de carbono glucose (solúvel) e substratos complexos presentes na drecche cervejeira (termófilas 4). Neste caso os valores de *SMA* foram calculados para as primeiras duas horas de ensaio (tabela 6.2).

Nos ensaios em regime mesófilo usaram-se três tipos de inoculos (mesófilas 1, mesófilas 2 e mesófilas 3), todos desenvolvidos tendo apenas a glucose como substrato principal. Os valores de *SMA* foram calculados para as primeiras duas horas de ensaio com o inoculo mesófilas 3 e para os primeiros 20 minutos de ensaio com os inoculos mesófilas 1 e 2 (tabela 6.3).

Nas tabelas 6.2 e 6.3 estão indicados os valores médios das actividades metanogénicas específicas para as diferentes condições testadas, em ambiente termófilo e mesófilo respectivamente.

Comparando os valores de *SMA* obtidos para os inoculos de biomassa termófila incubada com glucose (termófilas 1, 2 e 3), verifica-se que se obtiveram actividades muito menores para o inoculo termófilas 3, independentemente da fonte de carbono adicionada. Considerando que o teor de SSV era idêntico nos 3 inoculos, bem como o teor de inertes, e ainda que os tipos de substratos eram semelhantes (Tabelas 6.1 e 6.2) dever-se-á admitir que as diferenças nos valores de *SMA* para o inoculo 3 se devem a interferências originadas por oscilações de temperatura, presença de algum teor de oxigénio residual no meio e fugas de biogás nos frascos de incubação. Estes factores actuando de modo somativo poderão originar discrepâncias acentuadas nos resultados finais. As fugas de biogás, principalmente a temperaturas tão elevadas ( $50 \pm 2^\circ\text{C}$ ), são passíveis de ocorrer, pois o limite máximo de temperatura aconselhado pelo fabricante para se efectuarem medições de pressão com o equipamento Oxitop<sup>®</sup> da WTW, é de  $50^\circ\text{C}$ . A esta temperatura os sistemas tornam-se menos estanques e mais susceptíveis a fugas. Por outro lado não se devem deixar de considerar possíveis efeitos de inibição causados por eventuais erros na preparação dos meios de cultura.

**Tabela 6.2:** Valores médios de SMA (Lbiogás/(gSSV.d)) e respectivos desvios padrão, obtidos para culturas mistas termófilas. Os valores entre parêntesis indicam o número de réplicas (n).

Ensaio	Substrato adicionado	Actividade Metanogénica Específica (Lbiogás/(gSSV.d))			
		Termófilas 1	Termófilas 2	Termófilas 3	Termófilas 4
1	Dreche	1,25 (1)	0,63 $\pm 0,06$ (2)	0,37 $\pm 0,00$ (2)	0,95 $\pm 0,11$ (2)
2	Dreche e glucose	1,18 $\pm 0,07$ (2)	1,1 $\pm 0,2$ (2)	0,40 $\pm 0,02$ (2)	0,78 $\pm 0,11$ (2)
3	Dreche, glucose e AO7	1,1 $\pm 0,2$ (2)	0,88 $\pm 0,09$ (2)	0,40 (1)	0,76 $\pm 0,008$ (2)
4	Dreche e acetato	1,20 $\pm 0,03$ (2)	1,44 (1)	0,389 $\pm 0,009$ (2)	1,28 $\pm 0,06$ (2)
5	Dreche, acetato e AO7	1,00 $\pm 0,06$ (2)	1,4 $\pm 0,1$ (2)	0,37 $\pm 0,02$ (2)	1,39 $\pm 0,0$ (2)
6	Dreche e AO7	1,254 $\pm 0,073$ (2)	0,5 (1)	-	0,93 (1)
7	Glucose	1,19 (1)	-	-	-
8	Lixiviado da dreche (10%, v/v)	1,2 $\pm 0,1$ (2)	-	-	-
9	Dreche pré-lavada	1,48 $\pm 0,04$ (2)	-	-	-
10	Dreche pré-lavada e glucose	1,2 $\pm 0,2$ (2)	-	-	-
11	Lixiviado da dreche (50% , v/v))	0,72 $\pm 0,08$ (2)	-	-	-

Termófilas 1, 2 e 3- biomassa termófila desenvolvida com glucose; Termófila 4- Biomassa termófila desenvolvida com glucose e dreche.

Relativamente aos ensaios efectuados com o inoculo termófilas 4 (desenvolvido na presença de glucose e dreche), verifica-se que este apresenta actividades semelhantes às obtidas com os inoculos termófilas 1 e 2 (desenvolvidos com glucose), não se identificando efeitos significativos nos valores de SMA quando se utiliza um inoculo adaptado a dreche e glucose.

Por comparação das actividades em função do substrato adicionado (tabela 6.2) observa-se que estas são mais elevadas na presença de dreche e acetato (no ensaio 4 a

*SMA* foi de  $1,20 \pm 0,03$  e  $1,44$  Lbiogás/(gSSV.d) para os inoculos termófilas 1 e 2, respectivamente, e de  $1,28 \pm 0,06$  Lbiogás/(gSSV.d) para as termófilas 3). Sendo o acetato um substrato directo das *arquea* metanogénicas acetoclásticas, a sua adição ao meio de cultura origina um estímulo à produção de metano, a qual deve ser mais acentuada na fase inicial das reacção bioquímicas. Para além disso, em condições termófilas a metanogénese do acetato ocorre quer por via da descarboxilação, quer pela oxidação do acetato a  $\text{CO}_2$  e  $\text{H}_2$  seguida pela redução do  $\text{CO}_2$  a  $\text{CH}_4$  por co-culturas sintróficas (Santos e outros, 2004).

A adição de glucose não afectou os valores de *SMA*. Relativamente à degradação da dreche em meio anaeróbio, sabe-se que esta contém na sua composição celulosas e hemicelulosas (tabela 5.3), que por hidrólise podem originam açúcares, nomeadamente pentoses (xilose e arabinose) e hexoses (glucose, manose e galactose), que são substratos das bactérias fermentativas (fase acidogénica). A fase de hidrólise consiste na primeira etapa da digestão anaeróbia, sendo necessárias 4 etapas da digestão anaeróbia para mineralização dos compostos (secção 2.1).

A adição de corante com concentração (50mg/L) introduz uma ligeira diminuição das actividades para a maioria dos ensaios, indiciando a existência de inibição para qualquer dos inoculos (tabela 6.2).

Verifica-se uma actividade maior (tabela 6.2) quando se utiliza como substrato dreche pré-lavada (*SMA* de  $1,48 \pm 0,04$  Lbiogás/(gSSV.d)) relativamente à obtida para a dreche “tal qual” (*SMA* de  $1,25$  Lbiogás/(gSSV.d)). Esta diferença pode ser atribuída a um processo de degradação mais fácil, após se tratar a dreche em meio base a  $50 \pm 2^\circ\text{C}$ , por um período de 15-20 dias. O lixiviado da dreche causou inibição da actividade quando se aumentou a sua concentração no meio base de 10 para 50% (v/v), tendo-se registado uma diminuição de *SMA* de  $1,20 \pm 0,10$  Lbiogás/(gSSV.d) para  $0,72 \pm 0,08$  Lbiogás/(gSSV.d), respectivamente.

A actividade da biomassa mesófila, desenvolvida com glucose, para os diferentes tipos de substrato, revela também uma elevada variabilidade de resultados (Tabela 6.3). Os inoculos mesófilas 1 e 2 foram testados apenas durante 24 horas, tendo-se calculado a actividade nos primeiros 20 minutos de ensaio. Os valores de *SMA* foram mais elevados nestes 2 inoculos relativamente ao inoculo mesófilas 3. Neste último caso, a actividade

foi calculada nas primeiras 2 horas de ensaio, tendo o tempo total de teste sido de 28 dias. Assim, esta actividade resulta da média de um conjunto de valores muito mais elevado e maiores tempos de reacção, o que pode levar à presença de produtos metabólicos no meio que afectam a velocidade de reacção directa ou à formação de patamares associados à adaptação do inoculo aos substratos múltiplos, dentre deste intervalo de tempo, diminuindo o declive da curva de actividade em regime mesófilo e consequentemente os valores de *SMA* (Figura 6.1).

Os valores de *SMA* mais elevados para as mesófilas 1 em comparação com mesófilas 2 (Tabela 6.3) podem atribuir-se ao menor teor de inertes presente no inoculo mesófilas 1 (Tabela 6.1)

**Tabela 6.3:** Valores médios da *SMA* (Lbiogás/(gSSV.d)) e respectivos desvios padrão obtidos para culturas mistas mesófilas, para os diferentes substratos adicionados. Os valores entre parêntesis indicam o número de réplicas (n).

Ensaio	Substrato adicionado	Actividade Metanogénica Específica (Lbiogás/(gSSV.d))		
		Mesófilas 1	Mesófilas 2	Mesófilas 3
1	Dreche	2,4 (1)	1,8 ± 0,1 (2)	0,56 ± 0,06 (3)
2	Dreche e glucose	2,75 ± 0,01 (2)	1,66 ± 0,02 (2)	0,80 ± 0,08 (4)
3	Dreche, glucose e AO7	2,2 ± 0,4 (2)	1,14 ± 0,03(2)	0,67 ± 0,08(4)
4	Dreche e acetato	-	1,14 ± 0,08(2)	0,47 ± 0,09 (4)
5	Dreche, acetato e AO7	2,2 ± 0,2 (2)	1,08 ± 0,03(2)	0,45 ± 0,04(4)
6	Dreche e AO7	2,4 ± 0,2(2)	1,01 ± 0,08(2)	0,41 ± 0,01(4)
7	Glucose	-	-	0,5 (1)
8	Lixiviado da dreche (10%, v/v)	-	-	0,51±0,00 (2)
9	Dreche pré-lavada	-	-	0,5 (1)
10	Dreche pré-lavada e glucose	-	--	-

Mesófilas 1,2 e 3- biomassa mesófila desenvolvida com glucose

Relativamente à fonte de carbono, os valores mais elevados foram obtidos para a mistura de substratos dreche e glucose. A adição de acetato como substrato solúvel não teve o efeito estimulador observado nas termófilas (Tabela 6.2). Este tipo de resposta pode dever-se ao facto de em regime mesófilo o acetato ser preferencialmente utilizado pelas metanogénicas acetoclásticas, não sendo favorecidas outras vias metabólicas alternativas para a sua degradação.

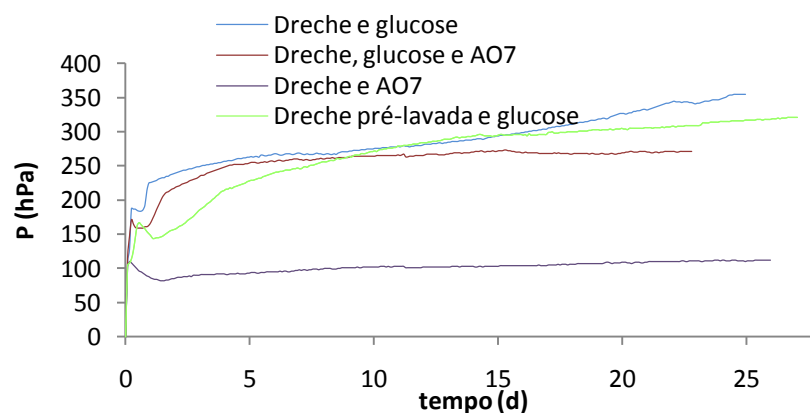
A par do observado em regime termófilo a adição de corante origina uma diminuição da *SMA*. A título de exemplo a *SMA* obtida com biomassa mesófila 1 (dreche e glucose) diminuiu de  $2,75 \pm 0,01$  Lbiogás/(gSSV.d) para  $2,20 \pm 0,40$  Lbiogás/(gSSV.d) ao se adicionar AO7 (Tabela 6.3).

Brás, 2003 obteve para culturas mesófilas mistas incubadas com glucose valores de actividade de  $0,66 \pm 0,03$  Lbiogás/(gSSV.d). Lopes, 2005 obteve para o mesmo tipo de cultura e substrato valores de  $0,27 \pm 0,09$  Lbiogás/(gSSV.d). O mesmo tipo de população desenvolvida com glucose, quando incubada com acetato revelou uma actividade significativamente menor, de  $0,099 \pm 0,03$  Lbiogás/(gSSV.d), de acordo com Lopes, 2005. No presente trabalho obteve-se um valor de  $0,5$  Lbiogás/(gSSV.d) para culturas mistas mesófilas incubadas com glucose. Refira-se ainda que o acetato suplementado ao substrato complexo (dreche) em populações mesófilas mistas não surtiu alterações nos valores de *SMA* (Tabela 6.3). Estes valores de *SMA* encontram-se dentro do referido na literatura sobre resultados de actividade anaeróbia, podendo as diferenças estar associadas a diferentes fases de crescimento da biomassa mesófila. A composição do meio de cultura de desenvolvimento do inoculo, principalmente do tipo de substrato, e o tipo de reactor influenciam a actividade anaeróbia da biomassa e determinam a composição e a morfologia da comunidade microbiológica (Frang e outros, 1994 citado e Brás, 2003).

A escassez de resultados de *SMA* em regime termófilo não permitiu estabelecer comparações com a literatura. Os valores para a *SMA* foram superiores aos obtidos em regime mesófilo se calculados nas primeiras 2 horas de ensaio (Termófilas 1 – Tabela 6.2 e Mesófilas 3 – Tabela 6.3). Convém realçar que os testes em termófilo foram efectuados a  $50 \pm 2^\circ\text{C}$ , temperatura inferior à tipicamente usada nestes sistemas (entre  $55$  e  $65^\circ\text{C}$ ).

Para um estudo mais aprofundado da biodegradabilidade anaeróbia destes substratos, seguiu-se o procedimento indicado na secção 5.5.1, tendo-se prolongado os testes por um período de 28 dias. Utilizaram-se os inoculos termófilas 1e mesófilas 3 (Tabela 6.3), estando o teor de SSV indicado na Tabela 6.1.

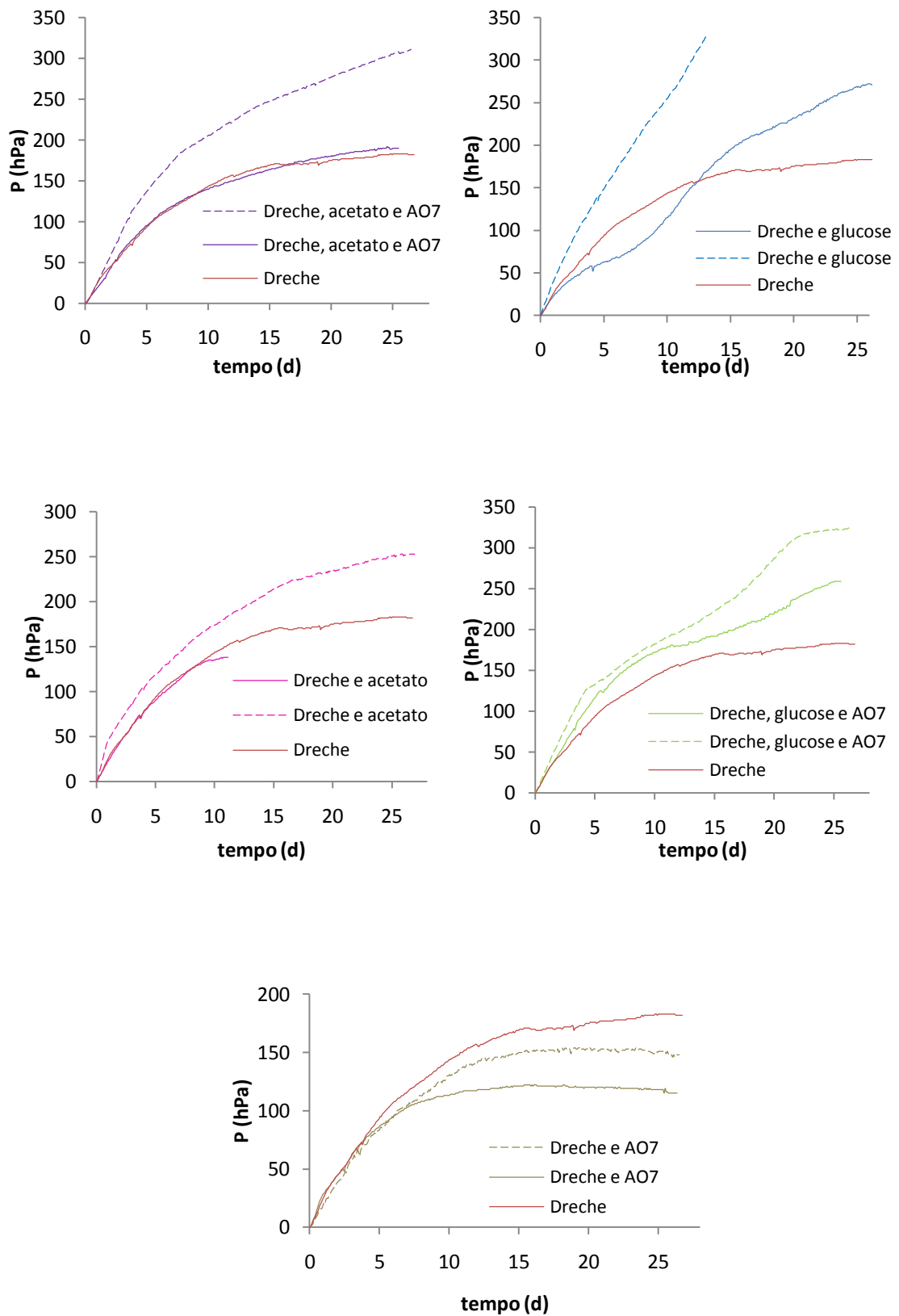
Na figura 6.2 encontram-se representados exemplos de algumas curvas da evolução da produção de biogás resultante da degradação dos diferentes substratos adicionados nos testes de biodegradabilidade realizados em ambiente termófilo, durante 24 dias.



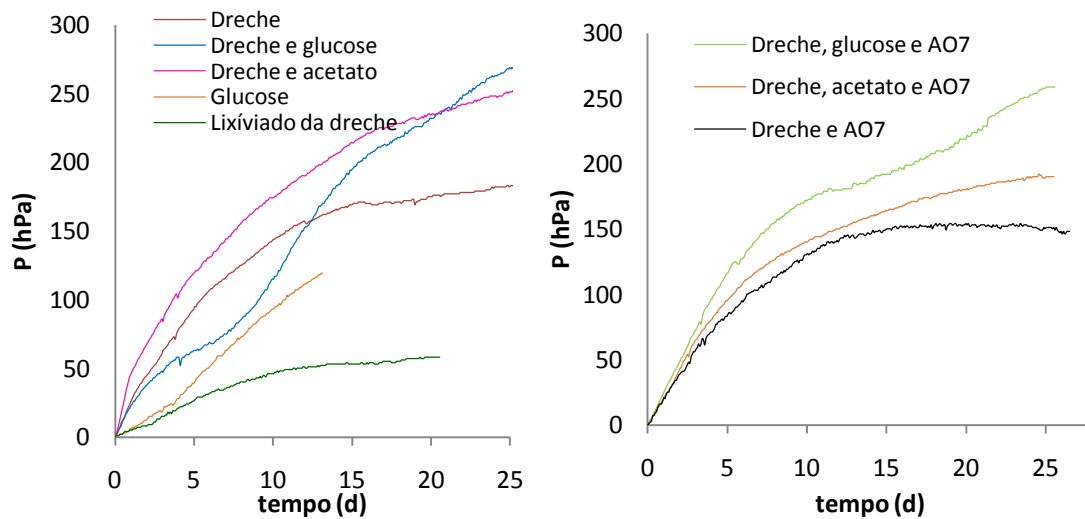
**Figura 6.2:** Exemplos de curvas de pressão de biogás acumulado em função do tempo, para os diferentes substratos adicionados à biomassa termófila.

Para os ensaios termófilos, a maior produção de biogás foi obtida quando se usou dreche e glucose como substrato (Figura 6.2 e Tabela 6.4).

Na figura 6.3 encontra-se representada a evolução da produção de biogás resultante da degradação dos diferentes substratos adicionados nos testes de biodegradabilidade realizados em ambiente mesófilo, apresentando-se as curvas em duplicado.



**Figura 6.3:** Exemplos de curvas de pressão de biogás acumulado em função do tempo, para os diferentes substratos adicionados, à biomassa mesófila.



**Figura 6.3 (continuação):** Exemplos de curvas de pressão de biogás acumulado em função do tempo, para os diferentes substratos adicionados à biomassa mesófila.

De acordo com o obtido para os testes em termófilo observou-se em regime mesófilo uma maior acumulação de biogás para os substratos múltiplos glucose/dreche (Tabela 6.4 e Figura 6.2).

O ensaio que continha dreche e acetato, como substrato, acumulou uma maior quantidade de biogás na fase inicial (até ao vigésimo dia), altura a partir da qual se obtiveram valores cumulativos mais elevados para os substratos dreche e glucose (entre 0,033 e 0,040 Lbiogás/gSSV.d); o maior volume de biogás acumulado para estes ensaios, está de acordo com os valores mais elevados obtidos para a SMA (Tabela 6.3).

A adição de substratos solúveis (glucose e acetato) parece favorecer a degradação da dreche, quer em regime mesófilo, quer em termófilo. Os valores calculados para a taxa específica média de utilização do substrato (Tabela 6.4) corroboram essa ideia. A presença de corante implicou em geral uma diminuição do biogás gerado.

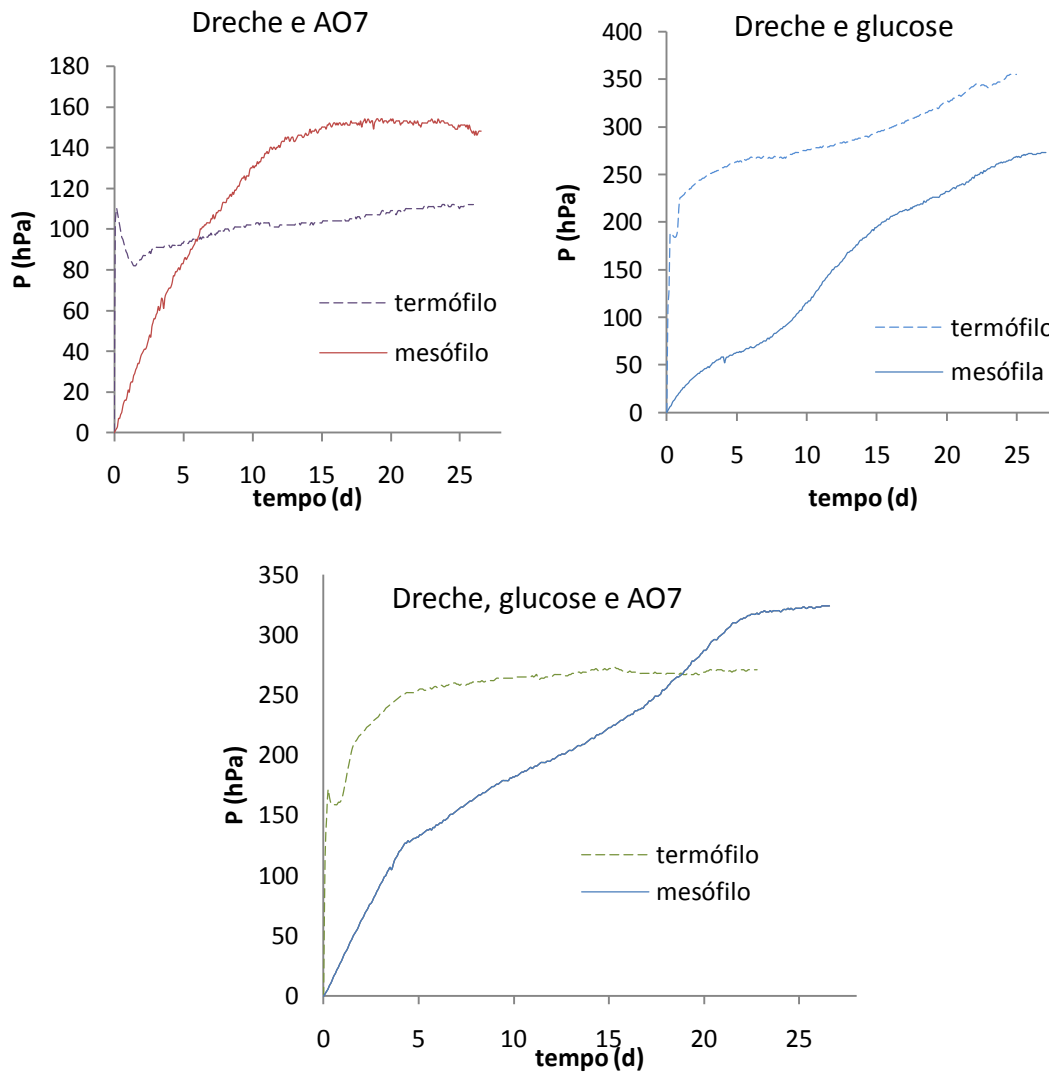
Na fase inicial de reacção (até cerca de 5 dias) registou-se uma taxa de produção de biogás mais elevada em regime termófilo (Figura 6.2), comparativamente à obtida em regime mesófilo (Figura 6.3). Estes resultados podem justificar-se pelas diferenças de concentração dos inoculos usados nos ensaios (Tabela 6.1), não se reflectindo nos

valores de *SMA* por esta ser uma taxa específica (calculada por unidade de massa de biomassa).

**Tabela 6.4:** Quantidade média de biogás produzido (Lbiogás/(gSSV.d)) para os diferentes inoculos, mesófilo e termófilo, indicando também os respectivos desvios padrão. O número de réplicas está indicado entre parêntesis (n).

Ensaio	Substrato adicionado	mLbiogás/(gSSV.d)	
		Termófilo	Mesófilo
1	Meio base	-	-
2	Dreche	-	15 (1)
3	Dreche e Glucose	40 (1)	33 (1)
4	Dreche, Glucose e AO7	27±1 (2)	40±11 (2)
5	Dreche e Acetato	-	25±5 (2)
6	Dreche, Acetato e AO7	-	30±19 (2)
7	Glucose	10 (1)	13 (1)
8	Dreche e AO7	4 (1)	8±2 (2)
9	Lixiviado da dreche	-	2 (1)
10	Dreche pré lavada e glucose	36±1(2)	-
11	Drehe pré lavada (10%, v/v)	4 (1)	-

Alguns exemplos comparativos das curvas cumulativas de biogás em regime termófilo e mesófilo estão apresentados na Figura 6.4.



**Figura 6.4:** Exemplos de curvas da pressão de biogás acumulado em função do tempo para as diferentes condições ambientais, mesófilas (mesófilas 3) e termófilas (termófilas 1).

Os valores de CQO das soluções adicionadas aos diferentes tipos de inoculo no início e nas amostras recolhidas no final dos ensaios de biodegradabilidade anaeróbia em sistemas mesófilos e termófilos estão indicados nas Tabelas 6.5 e 6.6.

**Tabela 6.5:** Valores de CQO inicial dos meios com os vários substratos testados

<b>Solução inicial</b>	<b>CQO inicial (mg/L)</b>
Meio base	13,30
Acetato	1757±166
Glucose	2398±386
AO7	83±19
Acetato e AO7	1494
Glucose e AO7	2663
Lixiviado da dreche termófilo	6812
Lixiviado da dreche mesófilo	8301

**Tabela 6.6:** Valores médios da CQO residual e correspondentes desvios padrão das amostras recolhidas no final dos ensaios de biodegradação para os diferentes substratos adicionados, para os ambientes em estudo.

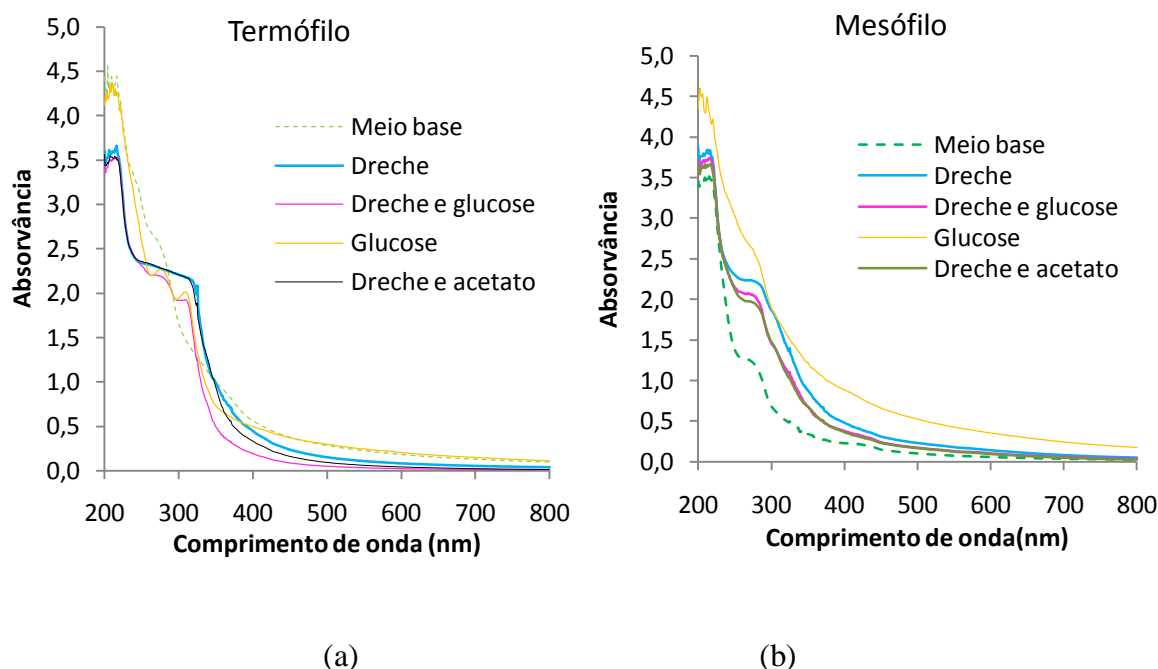
<b>Ensaio</b>	<b>Substrato adicionado</b>	<b>CQOfinal (mg/L)</b>	
		<b>Termófilo</b>	<b>Mesófilo</b>
1	Meio base	273±13	416±97
2	Dreche	1488±660	425±220
3	Dreche e Glucose	1717±173	872±410
4	Dreche, Glucose e AO7	2194±56	342±161
5	Dreche e Acetato	2502±129	342±247
6	Dreche, Acetato e AO7	1880±116	518±205
7	Glucose	598±56	415±147
8	Dreche e AO7	1553±289	436±29
9	Lixiviado da dreche (10% v/v)	505±28	145±29
10	Dreche pré lavada e glucose	798±56	1743±234
11	Dreche pré lavada	678±28	1370±293

Os substratos residuais gerados por degradação da dreche apresentam valores mais elevados de CQO em regime termófilo, na maioria dos ensaios. Apesar de se obterem curvas de produção de biogás na fase inicial mais elevadas em regime termófilo, ao final de 24-28 dias de ensaio, a produção de biogás é mais elevada em regime mesófilo. Em regime termófilo parece ocorrer uma maior acumulação de produtos os quais contribuem para o aumento da CQO. Saliente-se no entanto, que a dreche pré-lavada é mais facilmente degradada em termófilo, possivelmente por lixiviação de alguns componentes da fase sólida para a fase líquida e por poder ocorrer hidrólise parcial de alguns compostos, o que facilita a fermentação ácida e a metanogénese. Contudo, no

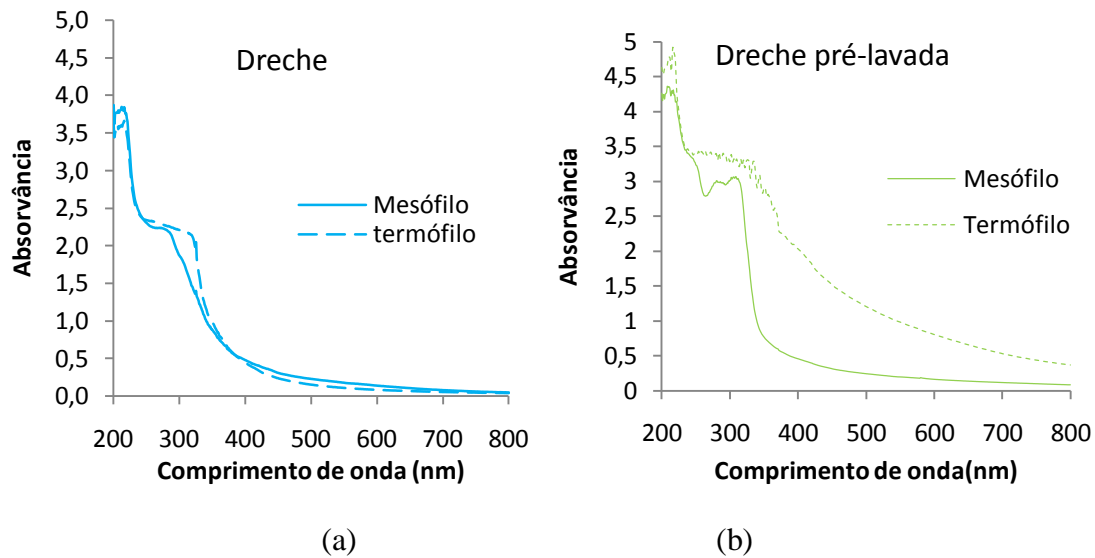
processo de degradação da dreche “tal qual” em regime termófilo os produtos lixiviados para a fase líquida parecem introduzir algum efeito inibitório nas fases de fermentação ácida e metanogénica, por acumulação destes, e o conseqüente aumento da CQO residual (tabela 6.6). Neste sentido foram obtidas percentagens de remoção de CQO para o ensaio com lixiviado de dreche a 10% (v/v) em meio base em regime termófilo de 26%, indicando baixa biodegradabilidade.

Os espectros de UV-visível do sobrenadante das soluções residuais recolhidas no final dos ensaios, indicam bandas de absorção significativamente mais largas nos ensaios em termófilo para os substratos dreche, glucose e acetato (figura 6.5 (a) e (b); e figura 6.6 (a)). Estes resultados estão de acordo com valores de CQO residual obtidos nos ensaios termófilos, os quais são mais elevados do que os dos ensaios mesófilos (Tabela 6.6).

Para a dreche pré-lavada, os valores mais elevados da CQO residual em regime mesófilo são corroborados pelas absorvâncias mais acentuadas na região do UV (Figura 6.6 (b)).



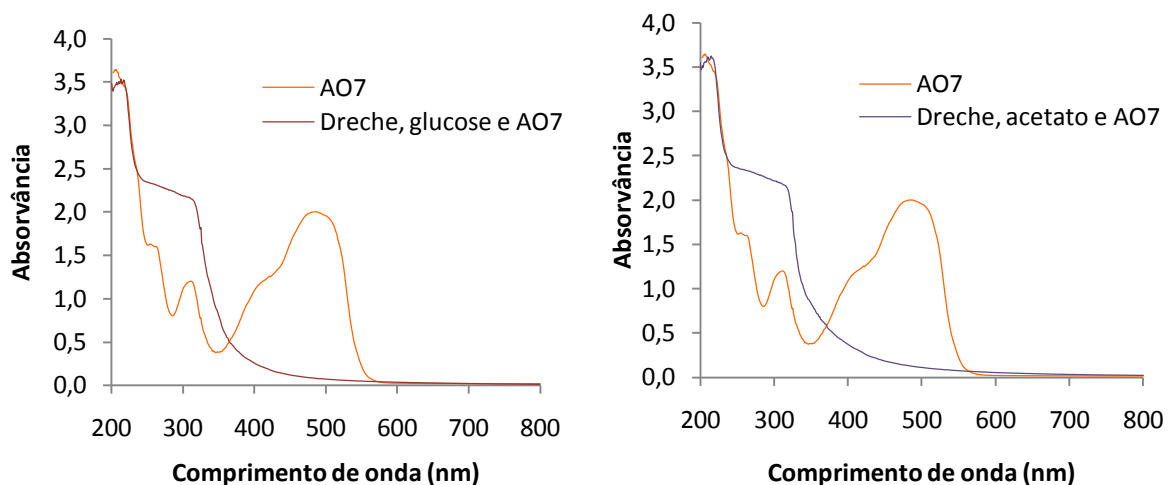
**Figura 6.5:**Exemplos dos espectros traçados para UV-visível do sobrenadante das soluções residuais recolhidas no final dos ensaios: (a) termófilo e (b) mesófilo.



**Figura 6.6:** Espectros traçados para UV-visível do sobrenadante das soluções residuais recolhidas no final dos ensaios termófilo e mesófilo, usando como substrato (a) dreche e (b) dreche pré-lavada.

## 6.2. Remoção de corante AO7

O estudo da degradação do corante AO7 foi efectuado através de espectrofotometria do UV – visível, como o indicado na secção 5.4.4. Nas figuras 6.7 e 6.8 estão representados os espectros traçados para os diferentes meios de cultura testados, termófilo e mesófilo respectivamente, no final dos ensaios de biodegradação anaeróbia.



**Figura 6.7:** Espectros obtidos no final do ensaio de biodegradabilidade para o ensaios termófilo em que houve adição de corante AO7 ( $C_0=33,9 \pm 0,6$  g/L).

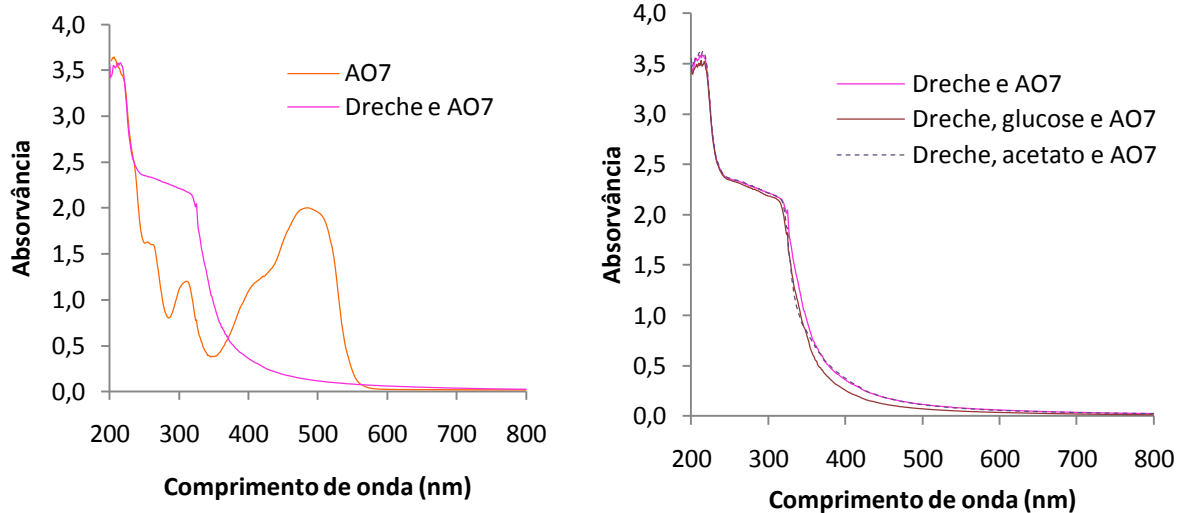


Figura 6.7 (continuação): Espectros obtidos no final do ensaio de biodegradabilidade para o ensaios termófilo em que houve adição de corante AO7 ( $C_0=33,9 \pm 0,6$  g/L).

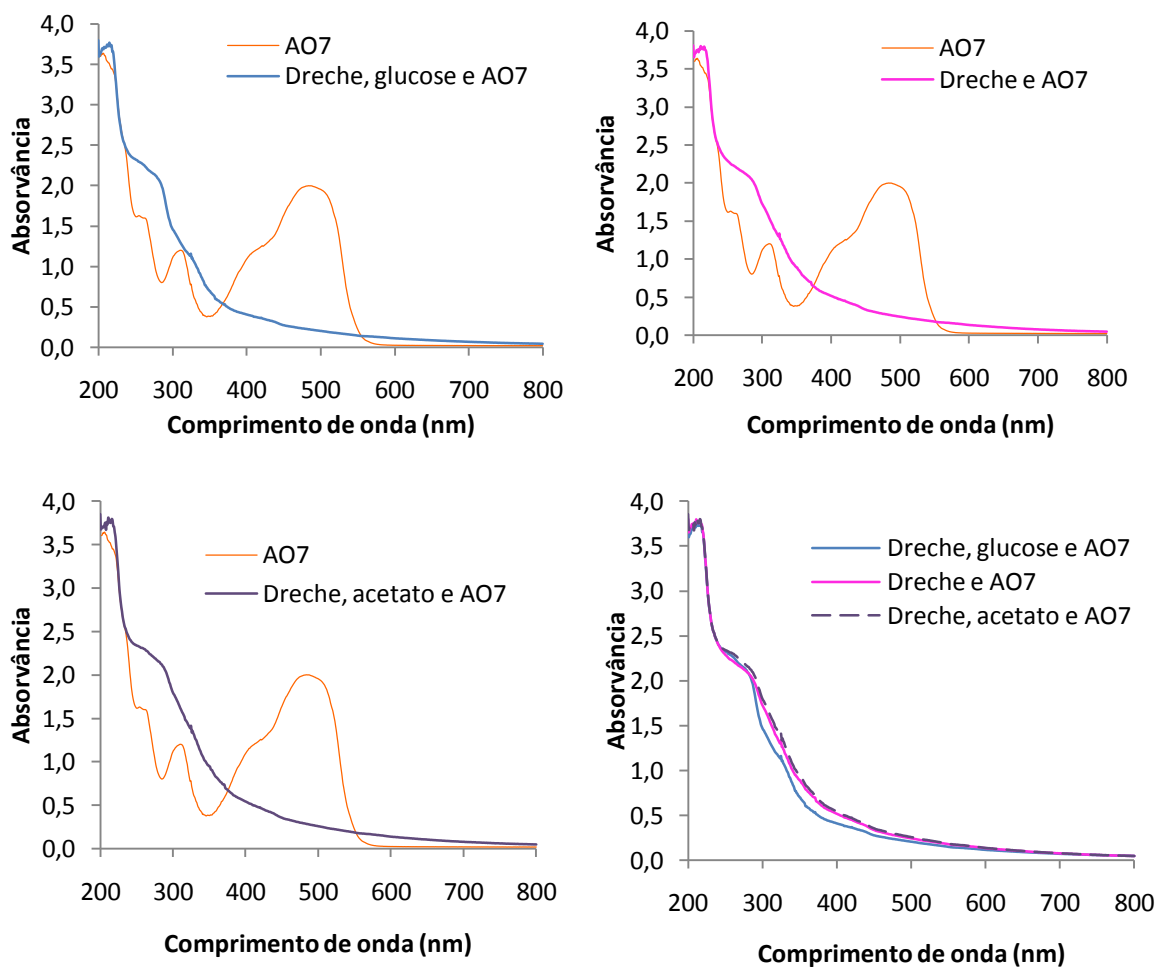


Figura 6.8: Espectros obtidos no final do ensaio de biodegradabilidade para os ensaios mesófilos em que houve adição de corante AO7 ( $C_0=33,9 \pm 0,6$  g/L).

Verifica-se que para o final de todos os ensaios efectuados o corante foi reduzido praticamente na sua totalidade, sendo um pouco mais notório para os ensaios onde foi utilizada glucose como substrato solúvel. A descoloração anaeróbia do corante AO7 deve-se à redução da ligação azo. A adição de dreche à biomassa implica o desenvolvimento de culturas mais diversificadas, além de poder actuar como agente condicionador, adsorvente e transportador de electrões, factores que no seu conjunto favorecem a descoloração. A possibilidade de ocorrer mineralização de algumas aminas é de se considerar, contudo são necessárias análises de *HPLC* (não efectuadas no âmbito do presente trabalho) para se confirmar esta hipótese.

Na tabela 6.7 estão representados os valores da concentração residual de AO7 (mg/L), bem como as respectivas remoções (%). As concentrações foram calculadas usando a recta de calibração para a corante determinada por Brás, 2003 (ver secção 5.3). Para o cálculo da remoção usou-se o valor da concentração inicial,  $C_0$ , que foi em média de  $33,9 \pm 0,6$  mg/L

**Tabela 6.7:** Valores médios da concentração final de corante AO7 e remoção média do mesmo para os diferentes meios de cultura estudados, representando-se também os respectivos desvios padrão. Entre parêntesis está indicado o número de réplicas (n).

Substrato adicionado	Concentração final de AO7 (mg/L)		Remoção de AO7 (%)	
	Mesófilo	Termófilo	Mesófilo	Termófilo
Dreche, Glucose e AO7	$3,8 \pm 0,7$ (2)	$1,5 \pm 0,2$ (2)	$89 \pm 2$ (2)	$95,6 \pm 0,7$ (2)
Dreche, Acetato e AO7	$6 \pm 1$ (2)	$2,2 \pm 0,5$ (2)	$84 \pm 4$ (2)	$93 \pm 2$ (2)
Dreche e AO7	$4,3 \pm 0,6$ (2)	$2,3 \pm 0,2$ (2)	$87 \pm 2$ (2)	$93,1 \pm 0,6$ (2)

$C_0(\text{AO7}) = 33,9 \pm 0,6$  mg/L ( $\lambda = 482$ nm)

Ocorreu remoção do corante em todos os ensaios analisados. Para ambas as condições em estudo verifica-se uma eficiência de remoção do AO7 acima dos 84%, sendo mais acentuada em regime termófilo (entre  $93,0 \pm 2,0$  e  $95,6 \pm 0,7\%$ ).

### 6.3 Degradação da lignina

Com o objectivo de se avaliar a degradação dos compostos lenho-celulósicos presentes na dreche cervejeira, para além da CQO, efectuou-se a quantificação da lignina no licor sobrenadante (fase líquida), no final dos ensaios de biodegradabilidade. A determinação da lignina foi feita após acidificação do meio (pH de 2,5), nas duas fases resultantes (como descrito no subcapítulo 5.4.6): lignina solúvel que permaneceu no licor sobrenadante após a acidificação (LS) e lignina precipitada em meio ácido que precipitou (LPA). A soma das duas fracções (LPA+ LS) foi usada no cálculo da lignina total da fase líquida (LT). Paralelamente quantificou-se o teor de proteína que precipitou com a lignina em meio ácido.

Estas análises foram efectuadas para os ensaios em que se utilizaram os inoculos termófilas 1 e mesófilas 3 (Tabela 6.1).

Nas tabelas 6.9 e 6.10 encontram-se os valores obtidos pela análise gravimétrica (sólidos suspensos – SS, sólidos suspensos voláteis – SSV e cinzas) e para o teor de proteínas em regime termófilo e mesófilo, respectivamente.

A quantidade de precipitado formada após a acidificação do licor residual (teor de SS) dos ensaios termófilos foi mais elevada quando se utilizou apenas dreche como substrato ( $0,8 \pm 0,2$  mgSS/L, variando a percentagem de SSV entre 29 e 38%) (Tabela 6.8). Para substratos múltiplos (dreche e acetato ou dreche e glucose) o teor de SS diminuiu a percentagem de SSV no precipitado foi também mais baixa (variou entre 7 e 20%). A percentagem de SSV foi mais elevada na dreche pré-lavada (cerca de 74%) relativamente à dreche, indicando uma maior susceptibilidade de degradação da primeira em condições termófilas (de acordo com os valores de CQO, Tabela 6.6). Observou-se também uma formação de precipitado relativamente mais baixa (valor de SS de  $0,23 \pm 0,02$  gSS/L), a par de um menor teor de proteína ( $35 \pm 1$  g proteína/L) nos ensaios com dreche pré-lavada. O teor de proteína variou entre  $23 \pm 9$  e  $116$  g proteína/L.

Para os ensaios mesófilos (Tabela 6.9) o teor de precipitado variou entre  $0,19 \pm 0,04$  e  $0,74 \pm 0,07$  gSS/L, tendo sido mais elevada para a dreche pré-lavada. Neste último caso obtiveram-se valores de CQO residual também mais elevados (Tabela 6.6), indicando a presença de compostos de difícil degradação nestas condições de ensaio. O teor de

proteína variou entre  $12 \pm 1$  e  $381 \pm 29$  g proteína/L, sendo também maior para a dreche pré-lavada.

**Tabela 6.8:** Valores médios da quantificação gravimétrica e respectivos desvios padrão, obtidos no licor sobrenadante recolhido nos ensaios com culturas mistas termófilas 1. Os valores entre parêntesis indicam o número de réplicas (n).

Ensaio	Substrato adicionado	SS (g/L)	SSV (g/L)	Cinzas (g/L)	Teor de proteínas (g proteína/L)
0	Meio Base	0,3 $\pm 0,1$ (3)	0,13 $\pm 0,07$ (3)	0,2 $\pm 0,2$ (3)	73 $\pm 12$ (3)
1	Dreche	0,8 (1)	0,3 (1)	0,5 (1)	116 (1)
2	Dreche e Glucose	0,3 $\pm 0,2$ (2)	0,021 $\pm 0,008$ (2)	0,2 $\pm 0,2$ (2)	48 $\pm 1$ (2)
3	Dreche, Glucose e AO7	0,481 $\pm 0,009$ (2)	0,06 $\pm 0,03$ (2)	0,42 $\pm 0,06$ (2)	23 $\pm 9$ (2)
4	Dreche e Acetato	0,4 $\pm 0,3$ (2)	0,05 $\pm 0$ (2)	0,3 $\pm 0,3$ (2)	80 $\pm 2$ (2)
5	Dreche, Acetato e AO7	0,5 $\pm 0,1$ (2)	0,1 $\pm 0,1$ (2)	0,43 $\pm 0,04$ (n=2)	88 $\pm 19$ (2)
6	Dreche e AO7	0,8 $\pm 0,2$ (2)	0,23 $\pm 0,06$ (2)	0,7 $\pm 0,2$ (2)	65 $\pm 12$ (2)
7	Glucose	0,2 $\pm 0,1$ (2)	0,1 $\pm 0,1$ (2)	0,062 $\pm 0,002$ (2)	67 $\pm 16$ (2)
8	Lixiviado da dreche (10%, v/v)	0,20 $\pm 0,07$ (2)	0,12 $\pm 0,07$ (2)	0,080 $\pm 0,002$ (2)	34 $\pm 14$ (2)
9	Dreche pré lavada	0,23 $\pm 0,02$ (2)	0,17 $\pm 0,02$ (2)	0,06 $\pm 0,02$ (2)	35 $\pm 1$ (2)
10	Dreche pré lavada e glucose	0,147 $\pm 0,003$ (2)	0,07 $\pm 0,04$ (2)	0,07 $\pm 0,04$ (2)	54 $\pm 10$ (2)

**Tabela 6.9:** Valores médios da quantificação gravimétrica e respectivos desvios padrão, obtidos no licor sobrenadante recolhido nos ensaios com culturas mistas mesófilas 3. Os valores entre parêntesis indicam o número de réplicas (n).

Ensaio	Substrato adicionado	SS (g/L)	SSV (g/L)	Cinzas (g/L)	Teor de proteínas (g proteína/L)
0	Meio Base	0,4 $\pm 0,1$ (3)	0,20 $\pm 0,04$ (3)	0,2 $\pm 0,2$ (3)	94 $\pm 20$ (3)
1	Dreche	0,6 (1)	0,1 (1)	0,5 (1)	133 (1)
2	Dreche e Glucose	0,5 $\pm 0,1$ (2)	0,176 $\pm 0,005$ (2)	0,3 $\pm 0,1$ (2)	12 (1)
3	Dreche, Glucose e AO7	0,4 $\pm 0,125$ (n=2)	0,13 $\pm 0,10$ (2)	0,22 $\pm 0,02$ (2)	17 $\pm 8$ (2)
4	Dreche e Acetato	0,5 $\pm 0,2$ (2)	0,17 $\pm 0,03$ (2)	0,3 $\pm 0,1$ (2)	18 $\pm 8$ (2)
5	Dreche, Acetato e AO7	0,558 $\pm 0,002$ (2)	0,16 $\pm 0,02$ (2)	0,40 $\pm 0,03$ (2)	56 $\pm 20$ (2)
6	Dreche e AO7	0,5 $\pm 0,3$ (2)	0,21 $\pm 0,1$ (2)	0,3 $\pm 0,2$ (2)	23 $\pm 8$ (2)
7	Glucose	0,40 $\pm 0,07$ (2)	0,2 $\pm 0,1$ (2)	0,17 $\pm 0,08$ (2)	127 $\pm 16$ (2)
8	Lixiviado da dreche (10%, v/v)	0,19 $\pm 0,04$ (2)	0,08 $\pm 0,05$ (2)	0,14 $\pm 0,01$ (2)	77 $\pm 37$ (2)
9	Dreche pré lavada	0,74 $\pm 0,07$ (2)	0,4 $\pm 0,2$ (2)	0,3 $\pm 0,2$ (2)	381 $\pm 29$ (2)
10	Dreche pré lavada e glucose	0,6 $\pm 0,3$ (2)	0,27 $\pm 0,04$ (2)	0,4 $\pm 0,3$ (2)	278 $\pm 89$ (2)

O teor de proteína do meio base pode resultar da lise das células e das substâncias extracelulares poliméricas.. Ao final de 24-28 dias as células sem substrato podem rebentar libertando produtos metabólicos residuais (com estrutura semelhante à das substâncias húmicas) para o meio reaccional, o que contribui para a libertação de proteínas. Nos ensaios com glucose, sendo este um substrato de rápida assimilação, espera-se obter ao final de 28 dias uma situação semelhante à do meio base (Tabelas 6.8 e 6.9). Neste sentido, os valores de CQO residual no ensaio com meio base e no ensaio com glucose foram também relativamente próximos (Tabela 6.6).

As análises ao teor de lignina (Tabelas 6.10 e 6.11) revelaram uma elevada variabilidade, independentemente do tipo de substrato adicionado (a lignina total, LT, variou entre  $0,068 \pm 0,008$  e  $0,24 \pm 0,05$  g/L em regime termófilo e entre  $0,022 \pm 0,009$  e  $0,0,20 \pm 0,03$  g/L em regime mesófilo). Em regime termófilo os valores mais baixos de lignina precipitada em meio ácido (LPA) e total (LT) foram para os meios que continham dreche e glucose ou dreche e acetato (Tabela 6.10). Assim, a matéria orgânica presente nas amostras recolhidas no final dos ensaios (expressa em termos de CQO, Tabela 6.6) poderá ser originada pela lignina residual (embora em baixas teores) e por outro tipo de compostos, nomeadamente proteínas residuais, polifenóis, ácidos voláteis e ainda outros produtos intermediários resultantes do metabolismo anaeróbio, que são mais dificilmente degradados a temperaturas mais elevadas ( $50 \pm 2$  °C).

Em condições termófilas a lignina parece ser mais degradável para substratos múltiplos (dreche e glucose ou dreche e acetato) independentemente da dreche se encontrar na forma hidrolisada ou “tal qual”. O teor de lignina precipitada em meio ácido (LPA) na dreche pré-lavada a  $50 \pm 2$  °C foi inferior ao da dreche (de  $0,13 \pm 0,02$  g/L e de  $0,16$  g/L, respectivamente).

Em regime termófilo, a fase de pré-lavagem parece favorecer a degradação da dreche. Os ensaios com dreche pré-lavada indicam valores de CQO mais baixos, associados a baixos teores de proteína, nas amostras recolhidas no final dos ensaios (Tabelas 6.6 e 6.10). A lavagem prévia da drechede pode assim ser uma etapa determinante do processo de degradação termófilo.

Os resultados obtidos em mesófilo (Tabela 6.11) indicam um maior teor de lignina para os ensaios com dreche, ensaios para os quais o teor de proteína (Tabela 6.9) e os valores da CQO residual foram mais baixos (Tabela 6.6). O facto da dreche ter sido tratada com meio base durante 15 dias a  $37 \pm 2$  °C, pode ter deixado a lignina mais exposta ao ataque microbiano. Porém, registaram-se baixos teores de lignina precipitada em meio ácido no licor sobrenadante dos ensaios com dreche pré-lavada e valores significativamente mais elevados da CQO residual (Tabela 6.6) e de proteína (Tabela 6.9), o que poderá ser indicativo de existência de inibição, devido a uma acumulação da fonte de azoto (proteína contida na dreche, Tabela 5.3 subcapítulo 5.2). A degradação da dreche não sujeita a lavagem prévia parece ser mais favorável em regime mesófilo, originando um

licor residual com lignina precipitada em meio ácido que poderá eventualmente ser recuperada.

O lixiviado da dreche, apesar de mais degradado por via mesófila, apresentou teores de lignina precipitada em meio ácido e proteína relativamente baixos em ambos os regimes (Tabelas 6.10 e 6.11).

**Tabela 6.10:** Valores médios e percentagens médias dos diferentes tipos de lignina solúvel – LS; precipitada em meio ácido (LPA) e total - LT, e respectivos desvios padrão, obtidos no licor sobrenadante recolhido nos ensaios com culturas mistas termófilas 1. Os valores entre parêntesis indicam o número de réplicas (n).

Ensaio	Substrato adicionado	LPA(g/L)	LPA(%)*	LS(g/L)	LT(g/L)
0	Meio base	-	-	-	-
1	Dreche	0,16 (1)	21,2 (1)	0,08 (1)	0,24 (1)
2	Dreche e Glucose	-	-	0,068 $\pm 0,008$ (2)	0,068 $\pm 0,008$ (2)
3	Dreche, Glucose e AO7	0,03 $\pm 0,04$ (2)	7 $\pm 7$ (2)	0,078 $\pm 0,001$ (2)	0,11 $\pm 0,04$ (2)
4	Dreche e Acetato	-	-	0,078 $\pm 0,001$ (2)	0,078 $\pm 0,001$ (2)
5	Dreche, Acetato e AO7	0,06 $\pm 0,09$ (1)	10 14+ (2)	0,08 $\pm 0,00$ (2)	0,14 $\pm 0,09$ (2)
6	Dreche e AO7	0,16 $\pm 0,05$ (2)	22 $\pm 12$ (2)	0,08 $\pm 0,00$ (2)	0,24 $\pm 0,05$ (2)
7	Glucose	-	-	-	-
8	Lixiviado da dreche (10%, v/v)	0,09 $\pm 0,06$ (2)	42 $\pm 14$ (2)	0,044 $\pm 0,008$ (2)	0,13 $\pm 0,06$ (2)
9	Dreche pré lavada	0,13 $\pm 0,02$ (2)	58 $\pm 2$ (2)	0,070 $\pm 0,001$ (2)	0,20 $\pm 0,02$ (2)
10	Dreche pré lavada e glucose	0,02 $\pm 0,03$ (2)	11 $\pm 16$ (2)	0,052 $\pm 0,002$ (2)	0,07 $\pm 0,03$ (2)

(\*) – teor de lignina em (%) no precipitado (SS)

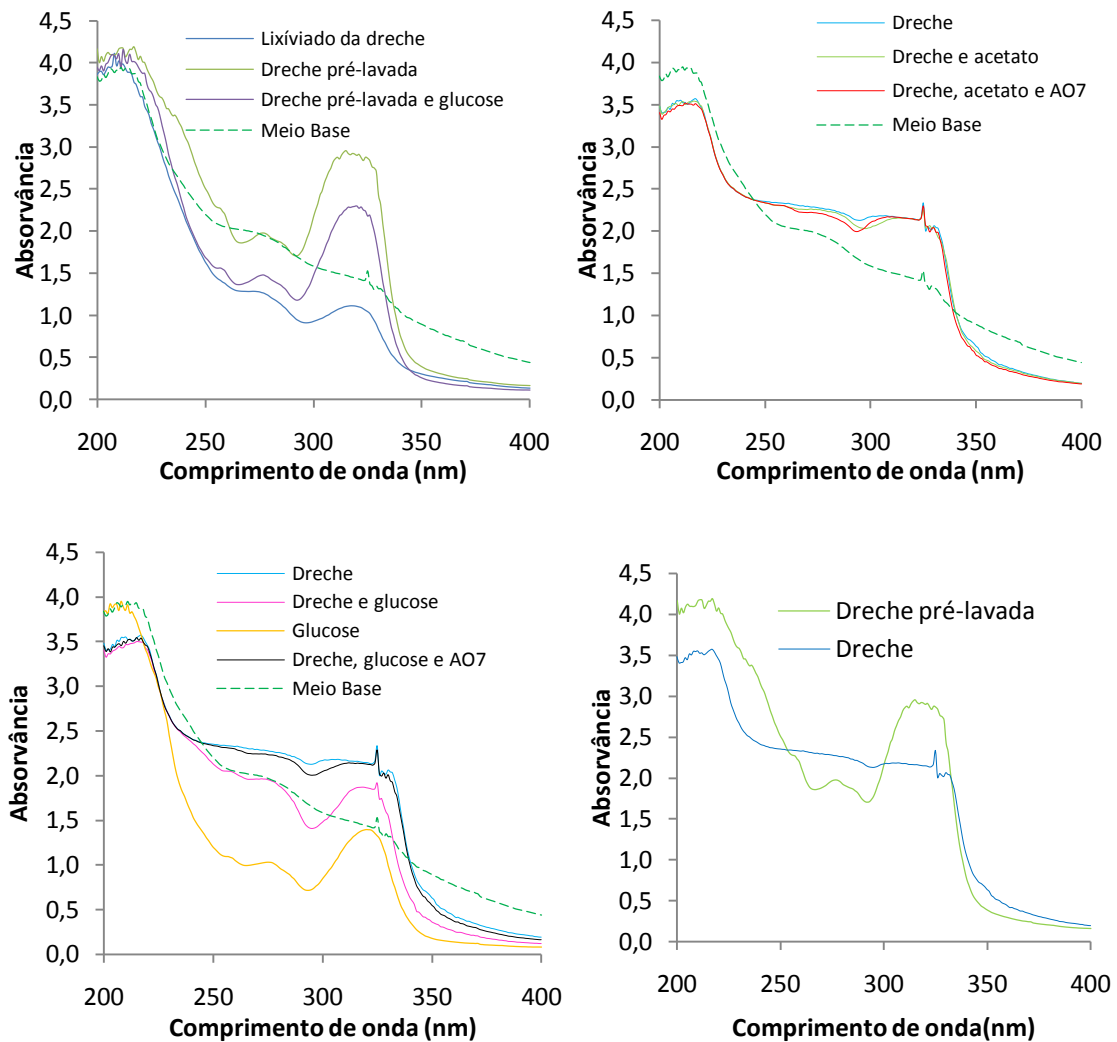
**Tabela 6.11:** Valores médios e percentagens médias dos diferentes tipos de lignina solúvel – LS; precipitada em meio ácido (LPA) e total - LT, e respectivos desvios padrão, obtidos no licor sobrenadante recolhido nos ensaios com culturas mistas mesófilas 3. Os valores entre parêntesis indicam o número de réplicas (n).

Ensaio	Substrato adicionado	LPA (g/L)	LPA (%)*	LS (g/L)	LT(g/L)
0	Meio base	-	-	-	-
1	Dreche	0,014 (1)	2,44 (1)	0,06 (1)	0,07 (1)
2	Dreche e Glucose	0,17 $\pm 0,01$ (2)	38 $\pm 13$ (2)	0,058 $\pm 0,006$ (2)	0,2 $\pm 0,1$ (2)
3	Dreche, Glucose e AO7	0,1 $\pm 0,1$ (2)	28 $\pm 17$ (2)	0,056 $\pm 0,008$ (2)	0,2 $\pm 0,1$ (2)
4	Dreche e Acetato	0,15 $\pm 0,04$ (2)	32 $\pm 2$ (2)	0,05 $\pm 0,01$ (2)	0,20 $\pm 0,03$ (2)
5	Dreche, Acetato e AO7	0,101 $\pm 0,004$ (2)	18 $\pm 2$ (2)	0,072 $\pm 0,002$ (2)	0,174 $\pm 0,007$ (2)
6	Dreche e AO7	0,18 $\pm 0,09$ (2)	36 $\pm 4$ (2)	0,057 $\pm 0,006$ (2)	0,2 $\pm 0,1$ (2)
7	Glucose	-	-	-	-
8	Lixiviado da dreche (10%, v/v)	-	-	0,022 $\pm 0,009$ (2)	0,022 $\pm 0,009$ (2)
9	Dreche pré lavada	0,05 $\pm 0,08$ (2)	8 $\pm 12$ (2)	0,06 $\pm 0,02$ (2)	0,1 $\pm 0,1$ (2)
10	Dreche pré lavada e glucose	0,01 $\pm 0,02$ (2)	3 $\pm 4$ (2)	0,06 $\pm 0,02$ (2)	0,074 $\pm 0,000$ (2)

(\*) – teor de lignina em (%) no precipitado (SS)

As figuras 6.9 e 6.10 representam os espectros traçados para os diferentes meios de cultura termófilas 1 e mesófilas 3 respectivamente, usados na determinação da lignina solúvel, depois de acidificado o meio (após a precipitação). O teor de lignina solúvel no licor sobrenadante foi calculado, com base nas leituras de absorvância efectuadas a um comprimento de onda típico para este tipo de lignina ( $\pm 280$  nm) (Tabela 5.4).

As figuras 6.9 e 6.10 representam os espectros traçados para os diferentes meios de cultura termófilo 1 e mesófilo 3 respectivamente, para a determinação da lignina solúvel. A partir destes pode-se ter uma ideia sobre o teor de lignina solúvel, através dos picos de absorção para o comprimento de onda típico para este tipo de lignina ( $\pm 280$  nm) (tabela 5.4).



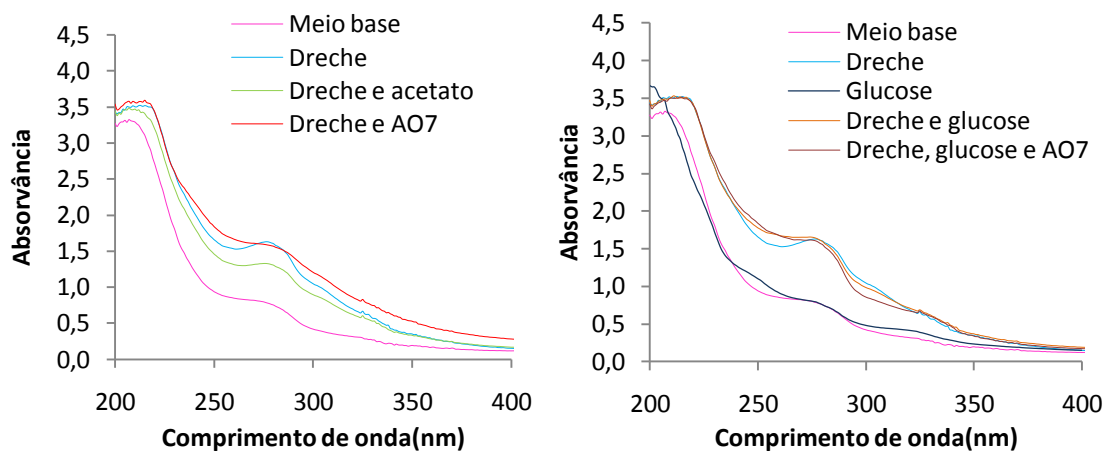
**Figura 6.9:** Espectros traçados para quantificação da lignina solúvel para o inoculo termófilo 1, para os diferentes substratos adicionados.

Em meio termófilo observou-se a formação de bandas de absorvância na região do ultravioleta, até por volta dos 320 nm (Figura 6.9). Estas bandas alargam-se quando o meio contém dreche. A adição de glucose ou acetato à dreche não afectou significativamente a evolução dos espectros. Assim, para os ensaios com dreche “tal

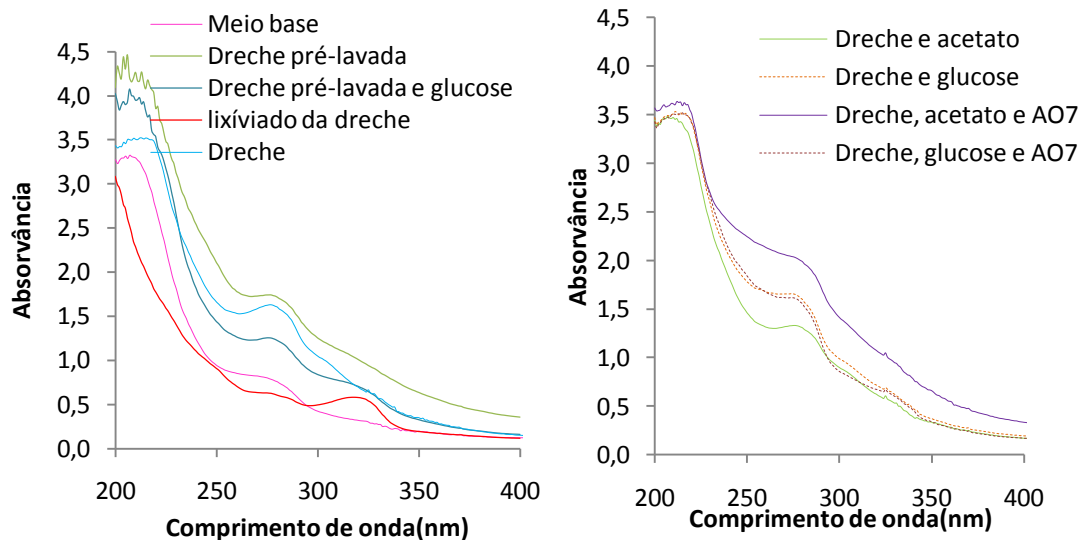
qual”, o teor de lignina solúvel não apresentou grandes variações (Tabela 6.10). Relativamente aos ensaios com dreche pré-lavada verificou-se que no licor sobrenadante ocorreu um acentuar do pico a 320 nm. Este pico pode ser atribuído à presença de diversos compostos no meio, incluindo compostos fenólicos. Os compostos fenólicos estão naturalmente presentes na casca dos grãos de cevada. Porém, a lignina é uma macromolécula polifenólica (Mussato e outros., 2006) e o aparecimento de um novo pico a 320 nm pode dever-se à formação de compostos fenólicos originados pela degradação desta. O facto dos valores de CQO residual na descarga terem sido mais baixos para os ensaios com dreche pré-lavada, indica que a formação destes compostos não afecta a digestão anaeróbia. Os compostos fenólicos são passíveis de degradação condições anaeróbias e a sua mineralização poderia ser conseguida por prolongamento dos ensaios de degradação (Srekanth e tal., 2009).

Em regime mesófilo não se registou a formação de picos de absorção por volta dos 320nm (Figura 6.10), com excepção do ensaio com lixiviado da dreche. No entanto, a formação de um pico por volta dos 280 nm indica a presença de lignina solúvel. No geral, os valores do teor de lignina total tendem a ser mais elevados para os ensaios com dreche em regime mesófilo.

A figura 6.11 é elucidativa da evolução dos espectros de UV obtidos na fase líquida (LS) após precipitação da lignina em meio ácido, para os diferentes inoculos estudados. Refira-se que as absorvâncias são em geral mais elevadas em regime termófilo, indicando uma presença mais acentuada de produtos metabólicos residuais, que contribuem para a CQO residual.

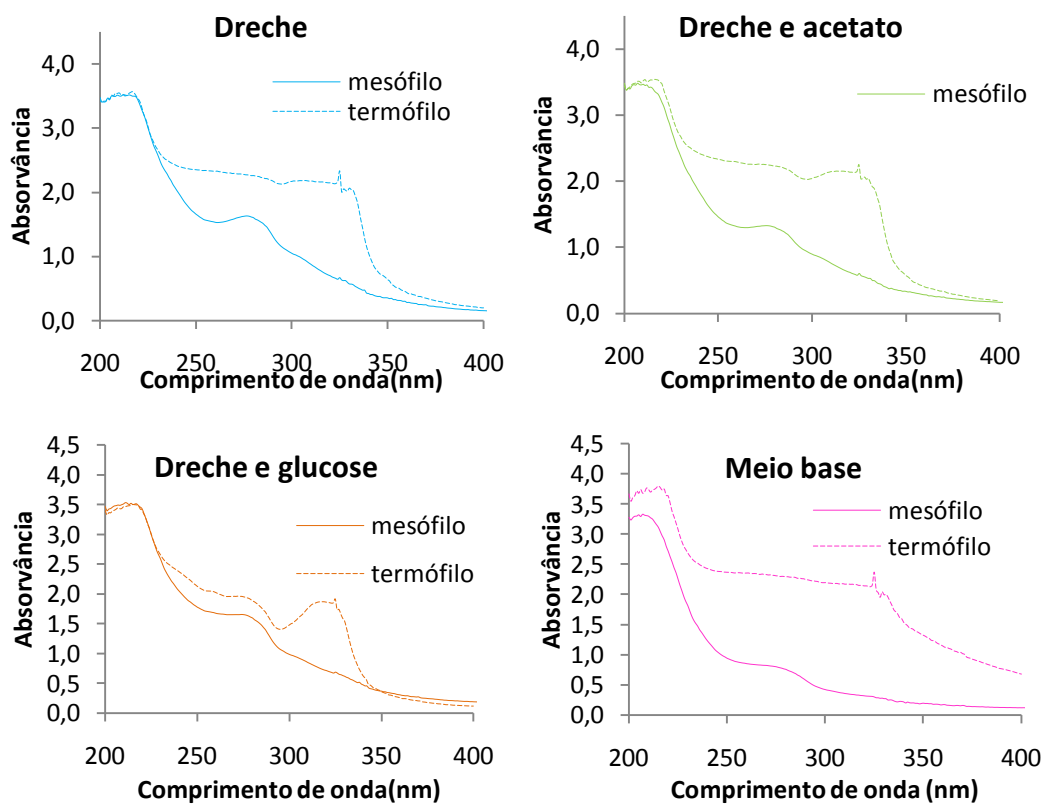


**Figura 6.10:** Espectros traçados para quantificação da lignina solúvel para o inoculo mesófilo para os diferentes substratos adicionados.

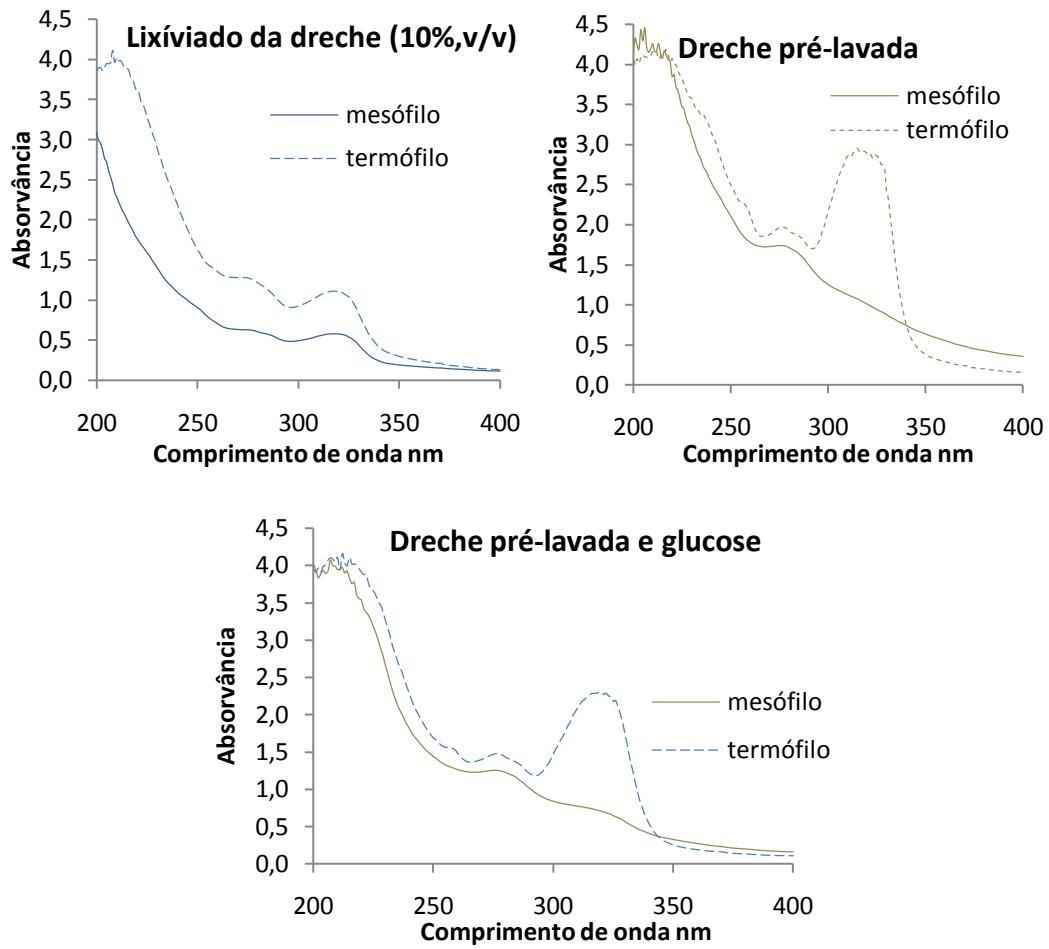


**Figura 6.10 (continuação):** Espectros traçados para quantificação da lignina solúvel para o inóculo mesófilo para os diferentes substratos adicionados.

Na figura 6.11 pode-se observar uma comparação dos espectros para os diferentes inóculos estudados.



**Figura 6.11:** Comparação dos Espectros traçados para quantificação da lignina solúvel para os diferentes inóculos termófilo 1 (tracejado) e mesófilo 3.



**Figura 6.11:** Comparação dos Espectros traçados para quantificação da lignina solúvel para os diferentes inoculos termófilo 1 (tracejado) e mesófilo 3.

## 6.4. Processos de afinação

Os processos de afinação, (como descrito no subcapítulo 5.5.2), foram efectuados com dois efluentes de descarga diferentes proveniente de reactores contínuos UASB, o efluente termófilo e o efluente mesófilo.

Antes dos ensaios de afinação propriamente ditos, procedeu-se à quantificação da lignina dos dois efluentes de descarga provenientes de reactores contínuos UASB, usados nos testes de afinação. Esta quantificação foi efectuada como o descrito no subcapítulo 5.4.6: lignina solúvel, que permaneceu no efluente de descarga (LS) e lignina precipitada em meio ácido (LPA). Paralelamente quantificou-se o teor de proteína que precipitou com a lignina em meio ácido, tabela 6.12.

**Tabela 6.12:** Valores dos diferentes tipos de lignina e teor de proteína obtidos nos diferentes efluentes de descarga, termófilo e mesófilo.

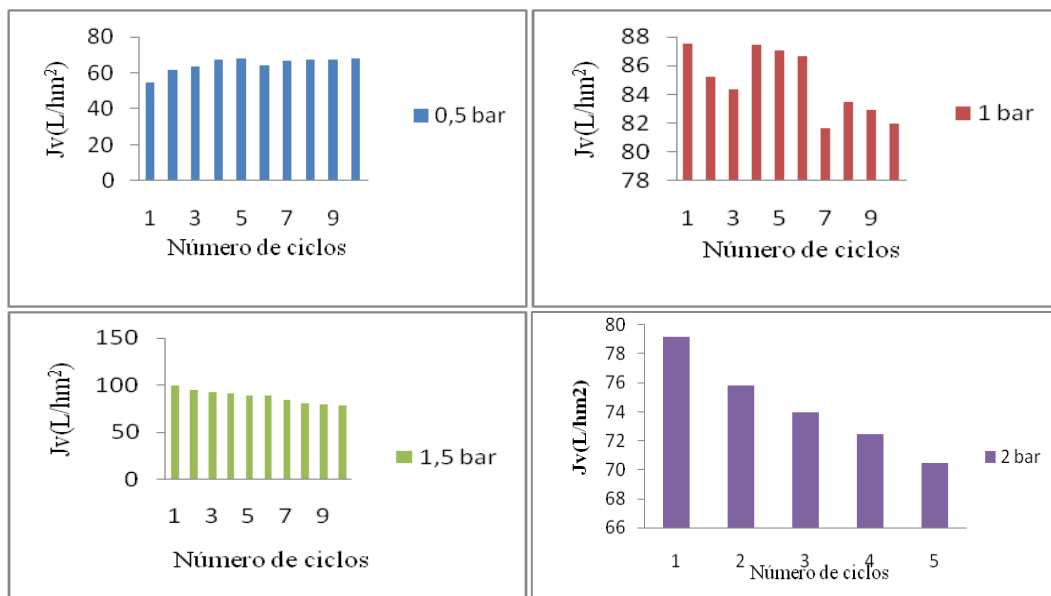
	<b>Efluente de descarga</b>	
	<b>Termófilo</b>	<b>Mesófilo</b>
<b>Lignina precipitada em meio ácido (g/L)</b>	0,02	0,11
<b>Lignina solúvel (g/L)</b>	0,01	0,01
<b>Lignina total (g/L)</b>	0,03	0,12
<b>Teor de proteína (g proteína/L)</b>	57	55

A análise dos teores de lignina (tabela 6.12) mostra que o efluente mesófilo apresenta valores mais elevados de lignina total (0,12 g/L) que o efluente residual termófilo (0,03). Em relação ao teor de proteína os dois efluentes não apresentam diferenças significativas.

### 6.4.1 Microfiltração

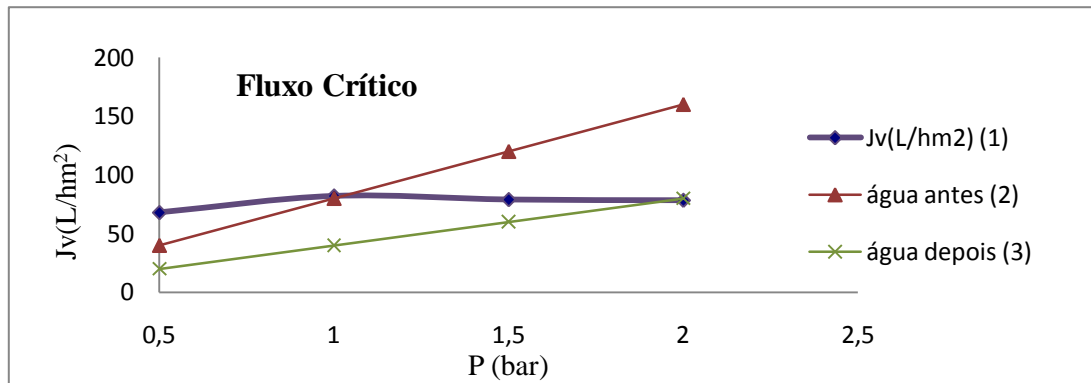
Os ensaios de microfiltração iniciaram-se com testes preliminares para determinação do fluxo crítico, efectuados com efluentes de descarga provenientes de dois reactores anaeróbios contínuos, um termófilo e outro mesófilo, nos quais foi incorporada dreche cervejeira.

Os diferentes resultados referentes ao fluxo crítico estão indicados na figura 6.12 em que estão representados os gráficos de barras que correspondem os fluxos críticos ( $J_v$ ) para cada ensaio realizado nas diferentes pressões de trabalho ( $P$ ). Observa-se que a 0,5 bar não estava a haver colmatação significativa, sendo os valores de fluxo de  $67,4 \pm 0,5$  L/hm<sup>2</sup>. Acima dos 0,5 bares já ocorre colmatação, verificando-se uma descida dos fluxos ao longo dos ciclos para cada pressão.



**Figura 6.12:** Representação grafica correspondente aos fluxos críticos para cada ensaio realizado nas diferentes pressões de trabalho.

Na figura 6.13 representam-se graficamente os valores dos fluxos de permeado calculados anteriormente para cada pressão num gráfico  $J_v$  versus  $P$ , bem como os ensaios de permeabilidade feitos com água antes e depois dos ensaios referentes ao fluxo crítico.



(1) Fluxo calculado às diferentes pressões; (2) e (3) ensaio de permeabilidade com água antes e após ensaios de fluxo crítico respectivamente.

**Figura 6.13:** Ensaio de permeabilidade hidráulica e fluxo crítico

Observa-se uma diminuição da permeabilidade hidráulica ( $L_p$ ), confirmando-se que houve colmatção nos ensaios a pressão mais elevada, sendo claramente acentuada quando se aplicou a pressão de 1 bar (figura 6.13). Desta forma, considerou-se que o fluxo crítico será aproximadamente  $67,4 \pm 0,5 L/hm^2$ , que é o correspondente à pressão de trabalho de 0,5 bar. Sendo a área da membrana de  $4,1 cm^2$  o fluxo crítico corresponde a um caudal de  $27,6 \pm 0,3 mL/h$ .

Após os ensaios preliminares, o efluente tratado nos reactores anaeróbios contínuos, operado com biomassa anaeróbia mista e dreche cervejeira incorporada no leito, tinha as características indicadas na tabela 6.13.

**Tabela 6.13:** Variação dos valores de CQO e respectivos desvios padrão para os diferentes efluentes. Os valores entre parêntesis indicam o número de réplicas (n).

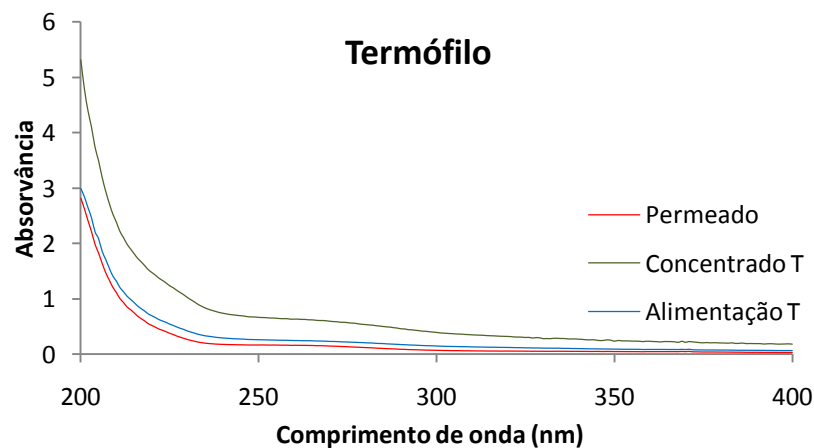
Amostra	CQO ( $mgO_2/L$ )	
	Termófilo	Mesófilo
Alimentação	$1171 \pm 57$ (2)	$686 \pm 57$ (2)
Permeado	$1070 \pm 23$ (4)	$262 \pm 8$ (4)
<b>Remoção de CQO (%)</b>	$8 \pm 3$ (4)	$62 \pm 2$ (4)

Este efluente foi tratado na célula de microfiltração (descrita no subcapítulo 5.5.2.1), tendo-se obtido valores de CQO no permeado e de percentagem de remoção de CQO bastante distintos. No efluente proveniente do reactor mesófilo (efluente mesófilo) a CQO foi cerca de metade da CQO do efluente do reactor termófilo.

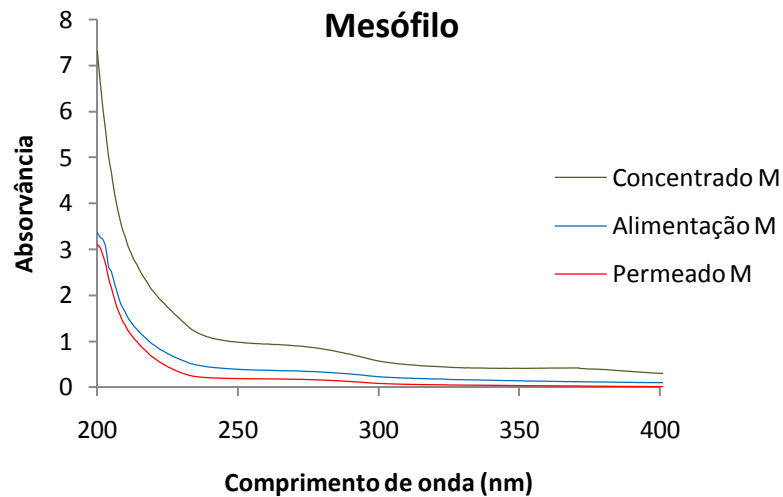
A aplicação da microfiltração aos dois efluentes revela uma maior eficiência para o efluente de descarga mesófilo (% remoção de CQO de  $62 \pm 2\%$ ), indicando a presença de compostos de massa molar superior.

O efluente de descarga do sistema termófilo (efluente termófilo), apesar de apresentar um teor de matéria orgânica muito mais elevado (tabela 6.13), não pode ser purificado por microfiltração (membrana FSM 0.45 PP), pois as moléculas tendem a não ser retidas pela membrana (%remoção de CQO de  $8 \pm 3\%$ )

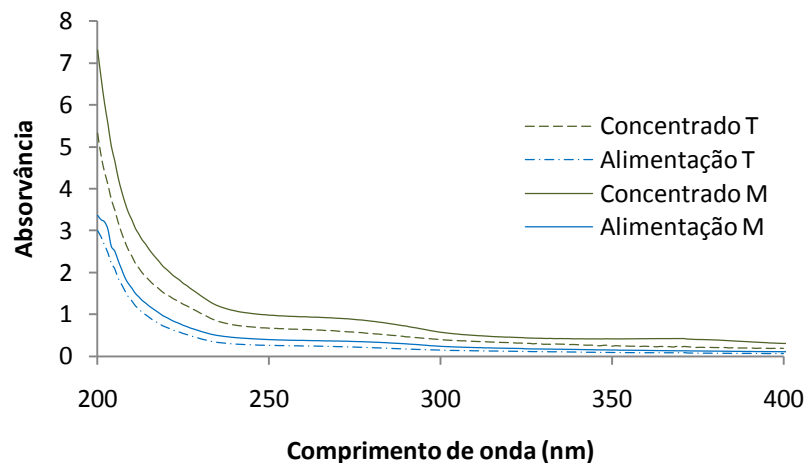
Pelos espectros obtidos para os permeados e concentrados recolhidos na microfiltração, bem como para os efluentes iniciais (alimentação), verificam-se diferenças significativas, em particular no concentrado, tendo-se obtido valores de absorvâncias na região dos 200 aos 300 nm muito mais elevados no tratamento do efluente mesófilo (figuras 6.14, 6.15 e 6.16), o que está de acordo com os resultados de CQO.



**Figura 6.14:** Espectros inicial e após microfiltração do efluente termófilo (T)



**Figura 6.15:** Espectros inicial e após microfiltração do efluente mesófilo (M)



**Figura 6.16:** Comparação dos espectros do concentrado e alimentação dos efluentes mesófilo (M) e termófilo (T) após a microfiltração.

É de realçar também a presença de um pico mais significativo por volta dos 280 nm indicando a possível presença de lignina. Não tendo sido possível determinar os diferentes tipos de lignina, apresenta-se contudo a remoção de absorvância a 280 nm, que se pode relacionar com o conteúdo de lignina. Deste modo obtiveram-se valores de remoção iguais a  $51 \pm 6\%$  para o permeado do efluente mesófilo. No efluente termófilo

não foi considerada esta quantificação visto não se ter observado de forma tão nítida a formação de uma banda a cerca de 280 nm. Porém, observou-se concentração de outro tipo de moléculas, provavelmente de polifenóis ou outros intermediários que podem não ser também degradados por via termófila, explicando-se assim o elevado teor de matéria orgânica solubilizada presente no efluente.

A utilização da microfiltração, utilizando membranas FSM 0.45PP, como processo de afinação é mais eficiente para efluentes tratados em regime mesófilo.

### 6.2.2 Coagulação/Floculação

Nos ensaios realizados no equipamento *jar test*, foram testadas várias concentrações de coagulante como descrito em 5.5.2.2. Procurou-se avaliar o desempenho das melhores condições de coagulação/floculação, quanto à clarificação, remoção de CQO e remoção de lignina do efluente.

Os resultados foram conduzidos a um pH de  $\pm 8$ , correspondente ao pH do efluente antes do processo de coagulação/floculação.

Os valores de CQO bem como a percentagem de remoção de CQO, em função da concentração de coagulante ( $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot 16\text{H}_2\text{O}$ ) estão apresentados na tabela 6.14.

**Tabela 6.14:** Variação dos valores de CQO das amostras para os diferentes efluentes em estudo

Ensaio	$C_{\text{coagulante}}$ (g/L)	CQO ( $\text{mgO}_2/\text{L}$ )		Remoção de CQO (%)	
		Termófilo	Mesófilo	Termófilo	Mesófilo
1 (branco)	0	1211 $\pm$ 57	727 $\pm$ 57	-	-
2	0,1	1050	162	16 $\pm$ 5	78 $\pm$ 3
3	0,25	969	323	22 $\pm$ 8	55,6 $\pm$ 0,2
4	0,50	40	242	97 $\pm$ 1	67 $\pm$ 4

A variação dos valores da CQO obtidos, tabela 6.14, indicam remoção da matéria orgânica. Para o regime termófilo, percentagem de remoção de CQO aumentou com o aumento da dose de coagulante, variando de  $16 \pm 5\%$  até  $97 \pm 1\%$  para uma concentração de 0,1 g/L até 0,5 g/L respectivamente. Já para o regime mesófilo, essa tendência não se verificou, obtendo-se uma maior remoção de CQO ( $78 \pm 3\%$ ) para uma concentração de 0,1g/L, e menor remoção para a concentração de 0,25 g/L ( $55,6 \pm 0,2\%$ ).

Pela análise da tabela 6.14 também se pode verificar que o efluente termófilo após coagulação, apresenta valores de CQO muito inferiores aos obtidos para o efluente mesófilo (ensaio 4), indicando uma coagulação mais eficiente. O efluente termófilo apresenta maior variação quanto da remoção de CQO ( $16 \pm 5\%$  a  $97 \pm 1\%$ ) para as diferentes dosagens de coagulante, do que a obtida para o efluente, mesófilo no qual essa variação foi pequena ( $55,6 \pm 0,2\%$  a  $78 \pm 3\%$ ).

Na tabela 6.15 encontram-se representados os valores da % de remoção de turbidez, dos diferentes efluentes estudados, para as diferentes concentrações de coagulante adicionado.

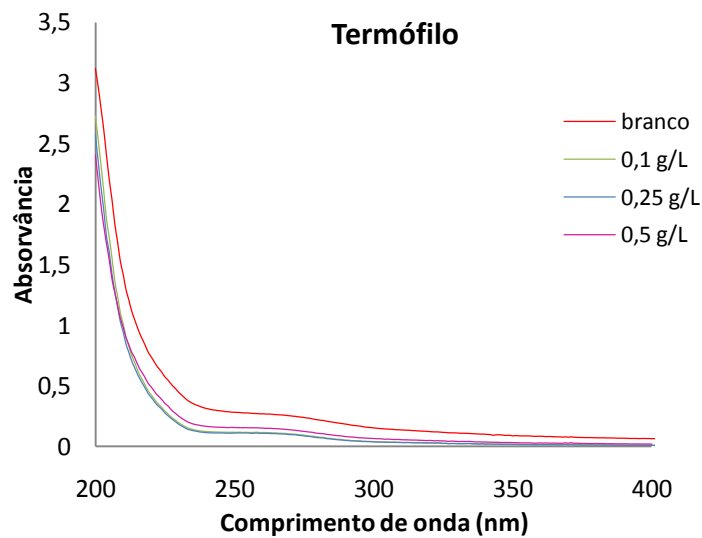
**Tabela 6.15:** % de remoção da turbidez para as diferentes amostras dos efluentes em estudo, em função da concentração de coagulante adicionado

Amostra	C <sub>coagulante</sub> (g/L)	Remoção de turbidez (%)	
		Termófilo	Mesófilo
2	0,1	88	74
3	0,25	84	73
4	0,50	83	53

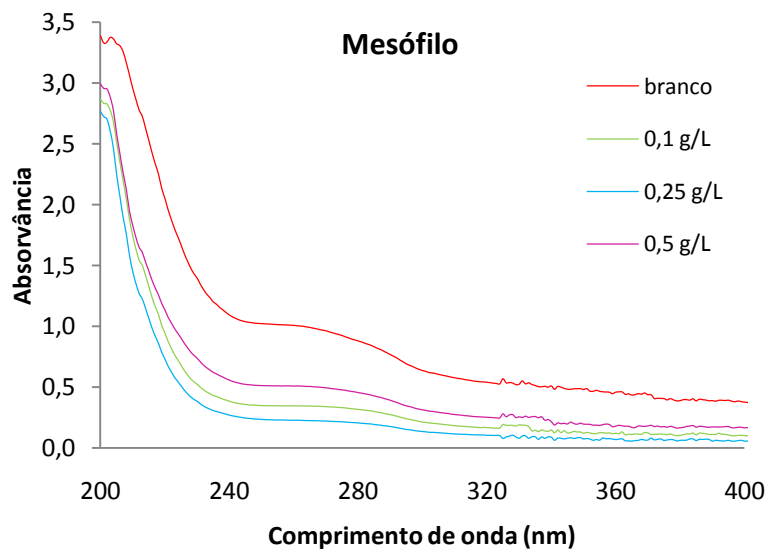
A remoção de turbidez para o efluente mesófilo variou entre 53% , correspondente a uma concentração de coagulante 0,5g/L de coagulante adicionado e 73-74% para concentrações de 0,1-0,25g/L. Para o regime termófilo a remoção para ambas as concentrações variou ligeiramente entre 88 e 83% tendendo a diminuir à medida que se aumenta a concentração de coagulante (tabela 6.15). De um modo geral pode admitir-se

que a remoção de turbidez foi mais eficiente para o efluente tratado em regime anaeróbio termófilo.

As figuras 6.17 e 6.18 mostram os espectros obtidos em amostras com diferentes concentrações de coagulante, adicionado para os efluentes de descarga dos reactores termófilo e mesófilo respectivamente.



**Figura 6.17:** Espectros inicial e após coagulação/floculação, das diferentes amostras do efluente termófilo.



**Figura 6.18:** Espectros inicial e após coagulação/floculação, das diferentes amostras do efluente mesófilo.

Os espectros, do ultravioleta - visível, indicam que houve remoção da lignina, medida a um comprimento de onda de 280 nm. No efluente mesófilo há uma maior diferença nos picos de absorção máxima, e conseqüentemente maior diferença nas percentagens de remoção de lignina, do que a obtida para o efluente termófilo (tabela 6.16).

Na tabela 6.5 encontram-se registrados os valores das absorvâncias lidas no comprimento de onda característico para ligninas (280nm), bem como a quantidade de lignina solúvel e sua % de remoção para as diferentes amostras, a diferentes concentrações de coagulante, para ambos os efluentes estudados.

**Tabela 6.16:** Absorvâncias, lignina solúvel(LS) e %de remoção de lignina solúvel para as diferentes concentrações de coagulante adicionado.

Amostras	C <sub>coagulante</sub> (g/L)	Abs. (280nm)		LS (g/L)		Remoção de LS (%)	
		Termófilo	Mesófilo	Termófilo	Mesófilo	Termófilo	Mesófilo
1 (branco)	0	0,219	0,878	0,008	0,032	-	-
2	0,1	0,079	0,317	0,0029	0,01153	63,93	63,9
3	0,25	0,075	0,207	0,0027	0,0075	65,75	76,4
4	0,50	0,112	0,452	0,0041	-	48,86	-

Analisando a tabela 6.16 pode-se dizer que a amostra com uma concentração de coagulante de 0,25g/L para ambos os regimes, no final apresenta menor quantidade de lignina solúvel, ou seja houve maior remoção desta sendo maior para o ambiente mesófilo. Mas o efluente termófilo apresenta menores quantidades de lignina o que sugere que em ambiente termófilo esta degrada-se mais.

## **7. Conclusões e perspectivas de trabalho futuro**

Face aos resultados obtidos, apresentados e discutidos no capítulo 6, pode-se concluir que a temperatura tem influência nos processos de biodegradabilidade anaeróbia de compostos lenho – celulósicos.

Quando se estudou a influência dos diferentes meios de cultura termófilos, para as actividades, concluiu-se que a dreche e glucose não afectaram as actividades pois apresentam actividades semelhantes às obtidas para a cultura com glucose. Por exemplo quando se adicionou como substrato dreche e acetato obtiveram-se para as actividades valores de  $1,20 \pm 0,03$  Lbiogás/(gSSV.d) e  $1,28 \pm 0,06$  Lbiogás/(gSSV.d), respectivamente para culturas adaptadas à glucose e culturas adaptadas à dreche e glucose.

Para as culturas termófilas adaptadas com glucose (inoculo termófilas 2), tendo dreche e acetato como substratos, as actividades são superiores às obtidas para dreche e glucose, sendo de  $1,44$  Lbiogás/(gSSV.d) e  $1,1$  Lbiogás/(gSSV.d), respectivamente (tabela 6.2). Já para as mesófilas concluiu-se o contrário (tabela 6.3), a adição de dreche e glucose como substratos, origina actividades maiores  $1,7 \pm 0,2$  Lbiogás/(gSSV.d) não apresentando o acetato  $1,14 \pm 0,03$  o efeito observado para as termófilas. No geral as actividades das culturas termófilas são maiores do que as das mesófilas (tabelas 6.2 e

6.3) quando a actividade é calculada nas primeiras 2 horas. A SMA calculada nos primeiros 20 minutos foi maior para as culturas mesófilas.

Ocorreu remoção do corante AO7 em ambas as culturas (maior que 84%) sendo mais acentuada para a termófila (acima dos 93%), tabela 6.8.

De acordo com os valores obtidos para a degradação da dreche (CQO, sólidos, proteína e lignina), pode-se dizer que as culturas mesófilas e termófilas degradam a dreche de maneira diferente, parecendo a lignina ser mais degradada em condições termófilas, quando a dreche se encontra pré-lavada. Em regime mesofilo a dreche pré-lavada apresenta maior percentagem de SSV no precipitado recolhido no licor sobrenadante (74%) tabela 6.1, em relação à dreche (o que está de acordo com os valores de CQO (tabela 6.6). A LPA (lignina precipitada em meio ácido) da dreche pré-lavada foi inferior ao da dreche “tal qual”(de  $0,13 \pm 0,02$  g/L e de  $0,16$  g/L, respectivamente).

A degradação da dreche não sujeita à pré-lavagem parece ser mais favorável em condições mesófilas, sendo o teor de LPA mais acentuado no licor sobrenadante (tabela 6.12). A presença de LPA contribui para o aumento dos valores da CQO residual (tabela 6.6).

Da análise dos resultados obtidos dos processos de afinação nas várias condições de operação testadas, concluiu-se que a microfiltração é mais eficiente para a concentração e tratamento do efluente de descarga de um reactor contínuo mesófilo. Obteve-se uma remoção de CQO de  $62 \pm 2$  %, bastante mais elevada do que a obtida para o efluente de descarga de um reactor contínuo termófilo (remoção de CQO de  $8 \pm 3$  %). Estes resultados indicam que os efluentes são constituídos por compostos residuais diferentes. O efluente mesófilo parece conter um maior teor de lignina do que o termófilo, de acordo com os resultados obtidos em descontínuo (tabelas 6.10 e 6.11). O efluente proveniente do reactor anaeróbio termófilo tende a não ser retido pelas membranas de microfiltração FSM 0.45PP, indicando a presença de moléculas menores, possivelmente compostos resultantes da degradação da lignina, como compostos fenólicos entre outros.

Analisando os resultados da coagulação/floculação conclui-se que este processo é mais eficiente para o efluente de descarga termófilo, apresentando estes valores de remoção de CQO e turbidez maiores ( $97 \pm 1$ %, e  $83$  % respectivamente) tabela 6.14 e tabela 6.15.

O tipo de produtos de degradação residuais gerados em sistemas contínuos mesófilos e termófilos, implica a utilização de diferentes pós-tratamentos, tendo em vista quer a recuperação de compostos para valorização (por exemplo de lignina ou polifenóis), quer a purificação do efluente tratado, para uma possível reutilização ao processo produtivo.

Ensaio de degradação anaeróbia com dreche hidrolisada (por exemplo em condições ácidas) poderiam ajudar a definir se a hidrólise dos compostos lenho-celulósicos constitui a etapa limitante do processo de degradação anaeróbia.

Devido ao elevado teor de proteínas obtido nos ensaios mesófilos com dreche pré-lavada (tabela 6.9), pode admitir-se que a presença de azoto amoniacal no meio seja elevada, devendo-se proceder à sua monitorização, a fim de se avaliarem eventuais efeitos inibitórios. Este tipo de procedimento é ainda aconselhado nos ensaios com dreche “tal qual”, pois em ambas as situações a CQO residual no licor sobrenadante foi elevada (tabela 6.6).

Para além da quantificação da lignina, presente no licor sobrenadante recolhido nos ensaios com culturas mistas, aqui estudada seria importante quantificar também a lignina presente na biomassa, bem como a quantificação dos açúcares por HPLC no licor sobrenadante.

Uma vez que neste estudo se verificou a possível formação de compostos fenólicos provenientes da degradação da lignina seria interessante, quantificar e identificar estes compostos por HPLC.

Visto que a microfiltração usando membranas FSM 0.45PP, não é muito eficiente, seria de interesse estudar um outro tipo de membrana de microfiltração ou até mesmo aplicar a ultrafiltração tendo em vista a recuperação de lignina quer a purificação da água residual.



## Bibliografia

Amparado K. F. (2006), Caracterização química da madeira de *Eucalyphus pellitta* e *Pinus taeda* com extractos e sem extractos por infravermelho. Monografia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Brasil.

Aquino S.F., Chernicharro C.A.L., Foresti E., Santos M.L.F. e Monteggia L.O. (2007), Methodologies for determining the specific methanogenic activity (SMA) in anaerobic Sludges. *Engenharia Sanitária e Ambiental*, Vol.12, No 2, p. 192-201.

APHA, (1992); Standar Methods for the Examination of Water and Wastewater, 18 th ed., American Public Health Association/American Water Works Association/Water Environment Federation, Washington DC, USA.

Atkins P. e de Paula J. (2003), *Atkins Físico-Química*; vol. 3; 7ª edição; LTC editora.

Ayala M.E., Penuela M.G. e Montoya J.L. M, (2006), Membrane processes for treatment of acid yellow color 23 highly loaded residual waters. *Rev.fac.ing.univ. Antioquia*, No.38, p.53-63.

Barros M. J. e Nozaki J. (2002), Redução de poluentes de efluentes das indústrias de papel e celulose pela floculação/coagulação e degradação fotoquímica. *Química Nova*, Vol. 25, No. 5, p. 736-740.

Bianchi M. L. (1995), Polpação de palha de milho utilizando-se diferentes processos organosolv. Tese de Mestrado, Universidade Estadual de Campinas, Brasil.

Branyik T., Vicente A., Oliveira R. e Teixeira J. (2004), Physicochemical Surface properties of brewing yeast influencing their immobilization on to spent grains in continuous reactor. *Biotechnology and Bioengineering*, Vol.88, No. 1, p. 84-93.

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

Briggs D.E. (1998), *Malts and Malting*. Blackie Academic e professional, 1ª edição.

Britz T.J., Spangenberg G. e Venter C.A. (1994), Acidogenic microbial species diversity in anaerobic treating different substrates. *Water Science Technology*. Vol. 30, No. 12, p.55-61.

Carvalho F., Esteves M.P., Parajó J.C, Pereira H. e Gírio F.M. (2004); Production of Oligosaccharides by autohydrolysis of brewery's spent grain. *Bioresource Technology*. Vol.91, No. 1, p. 93-100.

Carvalho G.B.M., Ginoris Y. P., Cândido E.J., Canilha L., Carvalho W. e Silva J.B.A. (2005), Avaliação do hidrolisado de cavacos de eucalipto em diferentes concentrações para fins biotecnológicos. *Revista Analytical*.No. 17, p.33-37.

Chernicharo L. (1997), Sebenta sobre reactores anaeróbios, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Brasil.

Coates J.D. e Coughlam M.F. (1996), Simple method for the measurement of the hydrogenotrophic methanogenic activity of anaerobic sludges. *Journal of microbiological methods*. Vol. 26, No. 3, p.237-246.

Costa C. (2005), Aplicação de Sistemas parciais para supervisão e controlo de processos combinados de tratamento de efluentes. Tese de Mestrado, Universidade do Minho, Portugal.

Eckenfelder W.W., Potoczka J.B. e Pulliam G.W. (1988), Anaerobic versus aerobic waste treatment in the U.S.A. *A WARE Incorporated, 227 French Landig, Nashville, TN 37228, U.S.A.*

Farropas S. (2009) Influência da temperatura na bio-remoção anaeróbia de corantes azo. Projecto de Investigação, Universidade da Beira Interior, Portugal.

Furlan F. (2008), Avaliação da eficiência do processo de coagulação - floculação e adsorção no tratamento de efluentes têxteis. Tese de Mestrado, Universidade Federal de Santa Catarina, Brasil.

Gerardi M.H. (2003), The microbiology of anaerobic digester. *Wiley Interscience, USA.*

Gijzen H.J. (2002), Anaerobic digestion for sustainable development: a natural approach. *Water Science Technology* Vol. 45, No. 10, p.321-328.

Gujer W. e Zehnder A.J.B. (1983), Conversion processes in anaerobic digestion. *Water Science and Technology*, Vol. 15, No. 8/9, p. 127-167.

Hendriks A.T.W.M. e Zeeman G. (2009), Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass. *Bioresource Technology*, Vol. 100, p. 10-18.

Kim M., Gomes C.Y., Ahn Y. e Speece R.E. (2003) Hydrolysis and acidogenesis of particulate organic material in mesophilic and termophilic anaerobic digestion. *Environmental Technology*, Vol.24, p. 1183-1190.

Ko J.J., Shimizu Y., Ikeda K., Kim S.K., Park C.H. e Matsui S. (2009), Biodegradation of high molecular weight lignin under sulfate reducing conditions: Lignin degradability and degradation by-products. *Bioresource Technology*, Vol. 100, p. 1622-1627.

Lettinga G. (2001), Digestion and degradation, air for life. *Water Science Technology* Vol.44, No. 8, p. 157-176.

Lettinga G., Field J., Van Lier J., Zeeman G. e Pol L.W.H. (1997), Advanced anaerobic wastewater treatment in the near future. *Water Science Technology*, Vol. 35, No.10, p. 5-12.

Lettinga G., Van Velsen A.F.M., Hobma S. M., de Zeeuw W. e Klapwijk A. (1980), Use of upflow sludge blanket (USB) reactor concept for biological wastewater treatment, especially for anaerobic treatment. *Biotechnology and Bioengineering*, Vol.22, p. 699-734.

Lopes L. (2005), Biodegradação anaeróbia de poluentes têxteis em sistemas mesófilos e termófilos. Tese de Mestrado, Universidade da Beira Interior, Portugal.

Mahmound N., Zeeman G., Gijzen H. e Lettinga G. (2003), Solids removal in upflow anaerobic reactors, a review. *Bioresource Technology*, Vol. 90, No. 1, p. 1-9.

Matos A.T., Cabanellas C.F.G, Cecon P.R., Brasil M.S. e Mudado C.S. (2007), Efeito da concentração de coagulantes e do pH da solução na turbidez da água, em

recirculação, utilizada no processamento dos frutos do cafeeiro. *Engenharia Agricola, Jaboticabal*, Vol.27, No. 2, p.544-551.

Maurel A. (1996), Techniques séparatives à membranes- Osmose inverse, nanofiltration, ultrafiltration, microfiltration tangentielle- Considérations théoriques; *Techniques de L'Ingenieur J2-II-Génie des Procédés*,J2790.

Moraes L.M. (2005), Avaliação da biodegradabilidade anaeróbia de lodos de esgoto provenientes de reatores anaeróbios sequenciais. Tese de Doutorado, Universidade Estadual de Campinas, Brasil.

Motta M. (2006), Sebenta: Introdução aos processos de separação por membranas. Universidade Federal de Pernambuco, Brasil.

Mussato S.I., Dragone G. e Roberto I.C. (2006), Brewers's spent grain: generation, characteristics and potential applications. *Journal of cereal Science*, Vol. 43, p. 1-14.

Mussato S.I. e Roberto I.C. (2006), Chemical characterization and liberation of pentose sugars from brewer's spent grain. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, Vol. 81 p. 268-274.

Mulder M. (1996), Basic principles of Membranes Technology. 2ª edição, Kluwer Academic publishers.

Nicolaisen B. (2003), Developments in membrane technology for water treatment. *Desalination*, Vol. 153, No. 1-3, p.355-360.

Nogueira A. (2007), Tratamento de efluentes de uma indústria do ramo têxtil. Relatório do mini-anteprojecto, Tese de Mestrado, Universidade do Minho, Portugal.

Oliveira L. (2005), Digestão anaeróbia: Uma visão sustentável no tratamento dos subprodutos de origem animal. Tese de Mestrado, Universidade dos Açores, Portugal.

Pelegrin D. (2004), Microfiltração tangencial de efluentes sanitários após tratamento biológico. Tese de Mestrado, Universidade de Santa Catarina, Brasil.

Pérez S., Muñoz-Dorado J., de la Rubia T. e Martínez S. (2002), Biodegradation and biological treatment of cellulose, hemicellulose and lignin: an overview. *International microbiology*, Vol.5, p. 53-63.

Pires O.C.P. (2007), Sistemas Inteligentes para monitorização e controlo de processos integrados de tratamento biológico e efluentes. Tese de Doutoramento, Universidade do Minho, Portugal.

Rajeshwar V. (2000), State-of-the-art of anaerobic digestion technology for industrial wastewater treatment. *Renewable & Sustainable Energy Reviews*, Vol.4, p.135-156.

Ravinovich M.L., Bolobova A.V. e Vasil'chenko L.G. (2004), Fungal decomposition of natural aromatic structures and xenobióticos, a review. *Applied Microbiology and Biotechnology*, Vol. 40, p. 5-23.

Santana M.C.A e Cavali J. (2006), Fundamentos e avaliação comparativa de métodos para análise de lignina em forragens. *Revista Electrónica de Veterinária*, Vol.7, No 11.

Santos A.B. (2005), Fundamentos da tecnologia aplicada à remoção de cor de esgotos têxteis. *Revista Tecnologia*, Vol. 26, No 1, p. 80-90.

Santos M., Jimenez J.J., Bartalome B., Gomes-Cordoves C., e del Nozal M.J. (2003), Variability of brewer's spent grain within a brewery. *Food chemistry*, Vol.80, No. 1, p. 17-21

Santos E. (2007), Microrganismos Promissores para a Degradação de Compostos Fenólicos Presentes em Bagaço-de cana, Lodo e Águas Residuárias de Agroindustria Sucro-Alcooleira. Tese de Mestrado, Universidade Federal de Alagoas, Brasil.

Schmidt J. E.E. e Ahring B.K. (1994), Extracellular polymers in granular sludge from different upflow anaerobic sludge blanket (UASB) reactors. *Applied Microbiology and Biotechnology*, Vol. 42, No. 2-3, p. 457-462.

Silva J.P., Sousa S., Rodrigues J. Antunes H., Porter J.J., Gonçalves I. e Ferreira-Dias S. (2004), Adsorption of acid Orange 7 dye in aqueous solutions by spent brewery grains. *Separation and Purification Technology*, Vol. 40, No 3, p. 309-315.

Sluiter A., Hames B., Ruiz R., Scarlata C., Sluiter J., Templeton D. e Crocker D. (2008), Determination of Structural Carbohydrates and Lignin in Biomass. Laboratory Analytical Procedure (LAP), *Technical Report, National Renewable Energy Laboratory*.

Sousa J. (1996), Pós-tratamento de efluente de reator anaeróbio de fluxo ascendente em reator aeróbio sequencial em batelada e coluna de lodo anaeróbio para desnitrificação. Tese de Doutoramento, Universidade de São Paulo, Brasil.

Speece R.E. (1996), Anaerobic biotechnology for industrial wastewaters. *Archae Press, Nashville, Tennessee.*

Sreekanth D., Sivaramakrishna D., Himabindu V. e Anjaneyulu Y. (2009), Thermophilic degradation of phenolic compounds in lab scale hybrid up flow anaerobic sludge blanket reactors. *Journal of hazardous materials*, Vol. 164, No. 3-3, p. 1532-1539.

Trindade T. e Manuel R. (2006), Ensaio de Tratabilidade em Águas Residuais - Tratamentos Físico-Químicos: Coagulação/Floculação, Protocolo Experimental, departamento de Engenharia Química Instituto Superior de Engenharia de Lisboa, Portugal.

UNICER 2007, Relatório de Actividades.

Van Lier J.B., Rebac S. e Lettinga G. (1997), High-rate anaerobic wastewater treatment under psychrophilic and thermophilic conditions. *Water Science and Technology*, Vol. 35, No. 10, p. 199-206.

Wolfe. R. (1992), Biochemistry of methanogenesis In: The Archaeobacteria. Biochemistry and Biotechnology, *Biochemical Society Symposia* No.58, p. 41-49.

## **Cibergrafia**

[@1] [www.apcv.pt/asp/docs\\_artigos/](http://www.apcv.pt/asp/docs_artigos/) - consultado em 7/2/2009.