



**Daniel Henriques da  
Silva Cruz**

**Acidificação de soro de queijo para produção de  
PHAs**



**Daniel Henriques da  
Silva Cruz**

**Acidificação de soro de queijo para produção de  
PHAs**

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em engenharia do ambiente, realizada sob a orientação científica da Dra. Isabel Capela, Professora associada do Departamento de ambiente e ordenamento da Universidade de Aveiro



## **o júri**

presidente

**Professor Doutor Luis Manuel Guerreiro Alves Arroja**  
Professor Associado do Departamento de Ambiente e Ordenamento da Universidade de Aveiro

arguente

**Professor Doutor Cheng Chia-Yau**  
Professor Auxiliar Convidado da Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto

orientador

**Professor Doutor Maria Isabel Aparício Fernandes Capela**  
Professora Associada do Departamento de Ambiente e Ordenamento da Universidade de Aveiro

## **Agradecimentos**

Agradeço á minha orientadora Professora Maria Isabel Aparício Fernandes Capela pelo apoio e por tornarado a finalização do meu mestrado possível.

Aos meus colegas de laboratório do departamento de ambiente e ordenamento da Universidade de Aveiro pela constante ajuda prestada e pelo companheirismo.

A todos os meus colegas e amigos pela amizade, força e motivação que me transmitiram ao longo de todo o meu percurso académico.

Obrigado.

## palavras-chave

AOVs, PHAs, biopolímeros, Digestão anaeróbia, MBBR, CSTR.

## resumo

A diminuição dos recursos fósseis bem como a abundância de biomassa renovável e que pode ser valorizada tem levado a encarar com boas perspectivas o processo de biorefinaria, sendo actualmente uma área em grande desenvolvimento. No sector dos plásticos os PHAs tem-se revelado uma alternativa sustentável em relação aos plásticos convencionais. O principal substrato para produzirem estes biopolímeros são os AOVs, produtos resultantes da fermentação acidogénica de resíduos orgânicos, como por exemplo o soro de queijo. Os AOV são compostos de alto valor económico devido às suas diversas aplicações. Neste trabalho foi estudado o processo de acidificação anaeróbio de soro de queijo, com a imposição na alimentação de valores de alcalinidade de 2000 e 5000 mg CaCO<sub>3</sub>/L e cargas orgânicas de 20 e 50 gCQO/L.d. Foram avaliadas as condições que produzem maior quantidade de ácidos e quais os tipos de ácidos mais produzidos em cada condição, num reactor MBBR. Foi também comparado a produção de AOV num reactor CSTR para a condição de 2000 mgCaCO<sub>3</sub>/L e 20 gCQO/L.d. Comparando as condições de 20 g CQO/Ld. e alcalinidade 2000 mg CaCO<sub>3</sub>/L e 5000 mg CaCO<sub>3</sub>/L é possível verificar que a produção de ácidos foi de 43301 mgCQO/L ± 618,3 e 5184,4 mgCQO/L ± 640,5, respectivamente, e o grau de acidificação foi de 41,6% ± 5,9 e 50,8%, respectivamente. Para a carga de 50 gCQO/L.d. e 2000 mgCaCO<sub>3</sub>/L verifica-se uma produção de ácidos de 10335,7 mgCQO/L ± 1077,6 e um grau de acidificação de 41,3%. Enquanto que para a mesma carga orgânica e alcalinidade 5000 mgCaCO<sub>3</sub>/L obteve-se 8693,6 mgCQO/L ± 1960,2 e um grau de acidificação de 30,1%. O ácido n-butírico é o mais produzido nas quatro condições. No reactor CSTR obteve-se uma média de 3555,69 mgCQO/L ± 706,89 e um grau de acidificação de 34,9%, valores estes menores do que os obtidos no MBBR nas mesmas condições. Todos os tipos ácidos são produzidos em maiores quantidades no MBBR, excepto o ácido i-valérico e n-caproico.

**keywords**

AOVs, PHAs, biopolymers, Anaerobic Digestion, MBBR, CSTR

**abstract**

The decrease of fossil resources and the abundance of renewable biomass can be valued has led to face with good prospects biorefinery process , currently being an area in great development . In the plastics sector PHAs has proved to be a sustainable alternative to conventional plastics. The main substrate to produce these biopolymers are AOVs , products resulting from acidogenic fermentation of organic wastes such as cheese whey . AOVs have high economic value due to its various applications . In this work was studied,for various conditions of alkalinity , 2000 and 5000 mgCaCO<sub>3</sub> / L and organic loading rate of 20 and 50 gCOD / L.d. that produced the largest amount of AOVs and wich kind of acids were produced in each condition , on a MBBR reactor . It was also compared the production of acids in a CSTR for the condition of 2000 mgCaCO<sub>3</sub> / L and 20 gCOD / L.d. Comparing the conditions of 20 gCOD / L.day to 2000 mg CaCO<sub>3</sub> / L and 5000 mg CaCO<sub>3</sub> / L is possible to verify that the production of AOV were 43301 mgCQO/L ± 618,3 and 5184,4 mgCQO/L ± 640,5, respectively, and the degree of acidification was 41,6% ± 5,9 and 50,8% ± 3,9,respectively. For organic loading rate of 50 g COD / L.d. and 2000 mg CaCO<sub>3</sub> / L there is a production of acids of 10335.7 mg COD / L ± 1077.6 and a degree of acidification of 41,32 %. While in the same organic loading and alkalinity of 5000 mg CaCO<sub>3</sub> / L was obtained 8696,6 mg COD / L ± 1960,2 of AOVs and a degree of acidification of 30,1 %. N-butyric acid is the most produced AOV on all MBBR conditions. In the CSTR was obtained an average of 3555.69 COD mg / l ± 706.89 of AOVs and a degree of acidification of 34.92 %, which are lower than those obtained in the MBBR the same conditions. All kind of AOV are produced in a larger quantities on MBBR except i-valeric and n-caproic.

# Índice

---

Índice.....	i
Abreviaturas.....	iii
Índice de tabelas.....	iv
Índice de figuras.....	v
1 Introdução.....	1
2 . Revisão Bibliográfica .....	3
2.1 Conceito de Biorrefinaria.....	3
2.2 Indústria de Lacticíneos .....	5
2.2.1 Enquadramento do sector .....	5
2.2.2 Produção de queijo e seus efluentes industriais. ....	7
2.3 Biopolímeros.....	12
2.3.1 Polihidroxialcanoatos (PHA) .....	13
2.4 Digestão anaeróbia .....	15
2.4.1 História da digestão anaeróbia .....	15
2.4.2 Comparação entre digestão anaeróbia e aeróbia para tratamento de efluentes.    16	
2.4.3 Etapas do processo da digestão anaeróbia .....	17
2.4.4 Inibição da metanogénese.....	21
2.5 Fermentação acidogénica.....	23
2.5.1 Condições operacionais que influenciam o processo de acidogénese.       27	
2.5.2 Influência da geometria dos reatores no processo de acidogénese. ...	31
3 Materiais e Métodos.....	33



3.1	Descrição geral do procedimento.....	34
3.2	Parâmetros a monitorizar .....	36
3.2.1	Carência química de oxigênio:.....	37
3.2.2	Sólidos suspensos totais (SST) e Sólidos suspensos voláteis SSV) .....	38
3.2.3	pH e alcalinidade.....	38
3.2.4	Biogás .....	39
3.2.5	AOV .....	40
3.3	Cálculos .....	40
4	Resultados .....	43
4.1	MBBR.....	43
4.1.1	Carga orgânica de 50 gCQO/L/d. ....	43
4.1.2	Carga orgânica de 20 gCQO/L/d .....	50
4.1.3	Comparação do efeito da carga orgânica e da alcalinidade na fermentação acidogénica .....	57
4.2	CSTR .....	60
4.2.1	Evolução temporal da concentração de AOV e CQO.....	60
4.3	Comparação de desempenho entre MBBR e CSTR .....	62
5	Conclusão .....	65
6	Bibliografia .....	67

## Abreviaturas

---

AOV	Ácidos orgânicos voláteis
CBO	Carência Bioquímica de Oxigênio
CQO	Carência química de oxigênio
CSTR	Continuous Stirred Tank Reactor
MBBR	Moving Bed Biofilm Reactor
PHA	Polihidroxialcanoatos
HAc	Ácido acético
n-Hbut	Ácido n-butírico
i-Hbut	Ácido i-butírico
Hprop	Ácido propiónico
n-Hval	Ácido n-valérico
i-Hval	Ácido i-valérico
Hcap	Ácido caproico
Alk	alcalinidade
ORL	Organic loading rate (carga orgânica)
PBS	Polibutileno Succinato
PE e PPP	Polietileno e poly (p-phenylene)
PTT	politrimetileno teraftalato
SSV	Sólidos suspensos voláteis
ST	Sólidos totais
SV	Sólidos voláteis

## Índice de tabelas

---

Tabela 1: Produção mundial e europeia de leite em 2000, 2009 e 2010 em bilhões de litros (Horticulture and Board 2012) .....	6
Tabela 2: Produção, fornecimento e procura de queijo em Portugal em 2010, 2011 e 2012 (Mendes 2011).....	7
Tabela 3: Caracterização típica do soro de queijo em relação a vários parâmetros (Prazeres, Carvalho et al. 2012).....	10
Tabela 4: Principais características dos biopolímeros polihidroxibutirato (P(3HB)), polihidroxialcanoato (PHO) e do polímero propileno (PP) (Carminatti, El Messane et al. 2006).....	14
Tabela 5: Diferenças entre digestão aeróbia e Digestão anaeróbia (Parawira 2004) .....	16
Tabela 6: Condições obtidas na produção de AOV por diferentes autores .....	26
Tabela 7: Condições experimentais dos ensaios efectuados .....	33
Tabela 8: Parâmetros a analisar e períodos de amostragem no MBBR e CSTR .....	37
Tabela 9: Valores do declive da recta de calibração para os diferentes ácidos.....	40
Tabela 10: Fator de conversão de massa de ácido em massa de CQO .....	41
Tabela 11: Resumo da média de AOV, média de biogás, redução de CQO e Grau de acidificação para o reator MBBR para a fase estacionária.....	46
Tabela 12: Percentagem média do tipo de AOV obtido durante a fase estacionária em todas as condições aplicadas ao MBBR.....	47
Tabela 13: Resumo da média de AOV, de redução de CQO e Grau de acidificação para o reator CSTR para a fase estacionária.....	62

## Índice de figuras

---

Figura 1: Conceito de biorefinaria (Kamm and Kamm 2004; Kamm and Kamm 2004) .....	3
Figura 2: Processo esquemático da produção de bioplásticos PHA através de um efluente de soro de queijo.....	5
Figura 3: Processo de produção de queijo curado (Moutinho, Rosa et al. 2011).....	8
Figura 4: Processo de produção do queijo fresco (Moutinho, Rosa et al. 2011) .....	8
Figura 5: Diferentes tipos de polímeros tendo por base o tipo de processo (Babu, O'Connor et al. 2013) .....	12
Figura 6: Estrutura base de um polihidroxialcanoato .....	13
Figura 7: Estrutura base de um PHB-PHV.....	15
Figura 8: Via metabólica de produção de AOV (Kim, Kang et al.) .....	19
Figura 9: Esquema geral dos processos de digestão anaeróbias, com as etapas e os componentes intervenientes (Parawira 2004).....	21
Figura 10: Ilustração de um reator MBBR (Pozo, Villamar et al. 2012).....	31
Figura 11: Carrier com biomassa .....	31
Figura 12: Esquema típico de um CSTR (Li, Zheng et al. 2009) .....	32
Figura 13: Ilustração do processo experimental e dos seus componentes integrantes.....	35
Figura 14: Ilustração do processo experimental do CSTR e dos seus componetes integrantes.....	36
Figura 15: Evolução do processo de digestão anaeróbia para a condição 50_Alk 2000 ....	44
Figura 16: Evolução do processo de digestão anaeróbia para a condição 50_Alk 5000 ....	44
Figura 17: Evolução do perfil de AOV para a condição 50_Alk 2000 em fase estacionária	46
Figura 18: Evolução do perfil de AOV para a condição 50_Alk 5000 .....	48
Figura 19: Evolução dos AOV para as condições de 50_Alk 2000 e 50_Alk 5000.....	49
Figura 20: Evolução do pH nas condições de 50_Alk 2000 e 50_Alk 5000 .....	49
Figura 21: Evolução do processo de digestão anaeróbia para a condição 20_Alk 5000 ....	51
Figura 22: Evolução do processo de digestão anaeróbia para 20_Alk 2000.....	52
Figura 23: Perfil de AOV para 20_Alk 5000 .....	54
Figura 24: Perfil de ácidos para 20_Alk 2000 .....	54

Figura 25: Concentração de AOV para as condições de 20_Alk 2000 e 20_Alk 5000.....	55
Figura 26: Evolução dos AOV para as condições de 20_Alk 2000 e 20_Alk 5000 .....	55
Figura 27: Concentração média de AOV e respectivos desvios-padrões para as quatro condições estudadas em MBBR .....	57
Figura 28: Evolução do processo de digestão anaeróbia para o reator CSTR.....	60
Figura 29: Evolução do processo de digestão anaeróbia na fase estacionária para a condição 20_Alk 2000 em CSTR. ....	61
Figura 30: Comparação entre evolução de CQO In S, CQO Out S e AOV para a condição 20_Alk 2000 no MBBR e CSTR .....	62
Figura 31: Comparação percentual entre os mesmos ácidos em MBBR e CSTR .....	64

# 1 Introdução

---

Durante o século XX com a revolução industrial os produtos de base petroquímica foram substituindo os produtos de base biológica (Yang 2011). Esse processo evolutivo acarretou problemas ambientais como a destruição da camada do ozono, o degelo dos glaciares, o aumento dos resíduos urbanos. Nestes últimos estão incluídos os plásticos, extremamente resistente à degradação natural tornando-se um grave problema ambiental para os animais marinhos e terrestres assim como para a saúde pública em geral.

Além disso o petróleo é um recurso que se torna cada vez mais escasso devido ao uso intensivo deste, uma vez que é a base de produção de muitos produtos e de uma grande parte do sector da energia. À medida que a existência deste recurso se torna cada vez mais escassa, os preços do barril de petróleo são também inflacionados.

Todos estes factores levam a comunidade científica e as empresas estudar alternativas de produzir e processar produtos a partir de fontes renováveis em vez dos hidrocarbonetos fósseis, através do conceito de biorefinaria.

Um exemplo desses produtos são os bioplásticos. Apesar de, atualmente, serem mais caros que os plásticos convencionais. Por outro lado, os bioplásticos têm a vantagem de serem biodegradáveis. Os processos, que estão a ser desenvolvidos na sua produção são cada vez mais otimizados, obtendo-se uma larga gama de produtos com aplicações em tecnologias de produção de alimentos ou mesmo aplicações industriais (Sutherland).

O crescimento na produção mundial a acumulação de plásticos no ambiente é uma preocupação crescente em todo o mundo. A este ritmo de inovação e os recentes avanços no desenvolvimento de produtos, levam a indústria dos bioplásticos prever um aumento pela procura de polímeros biodegradáveis nos próximos anos, sendo o crescimento anual deste tipo de produtos de 20% (Metabolix 2013).

A produção excessiva de plásticos nos dias de hoje acarreta preocupações ambientais, pois a maior parte dos plásticos são constituídos por polímeros sintéticos, o que significa que poderão não ser biodegradáveis. Devido à sua elevada persistência, algumas comunidades estão agora mais sensibilizadas para o impacto da sua deposição

no meio ambiente, devido aos efeitos negativos na qualidade estética das cidades e florestas e para a vida selvagem. Quando estes materiais são lançados para o solo os microorganismos não vão conseguir degradá-los, preservando as suas propriedades num período bastante grande. Isto representa um perigo para vários ecossistemas já que a sua incorporação em seres vivos através de ingestão poderá causar a sua morte.

O aumento dos custos de deposição dos resíduos sólidos nos aterros sanitários, como os plásticos, bem como os potenciais riscos da incineração desses resíduos como as emissões de dioxinas através, por exemplo, da queima de plástico PVC fazem da gestão de resíduos dos plásticos sintéticos um problema (Ojumo, Yu et al. 2003).

É portanto evidente que a produção de polímeros utilizando hidrocarbonetos como matéria-prima condensa a sustentabilidade do ponto de vista ambiental deste sector industrial imprescindível no mundo actual. Para além disso, os plásticos sintéticos (constituídos por polímeros) são resistentes à degradação e essas desvantagens estão a alimentar a comunidade internacional para o desenvolvimento de biopolímeros (Kolybaba, Tabil et al. 2003).

O presente trabalho tem como principal objectivo estudar um processo com vista à valorização do soro de queijo, um resíduo proveniente da indústria de lacticínios. O objecto de estudo é a digestão anaeróbia com vista à produção de ácidos orgânicos voláteis (AOV). A produção de AOV é a primeira etapa de um bioprocessamento de 3 fases, onde estes compostos são produzidos para servirem como matéria-prima para culturas mistas aeróbias produzirem PHA (2ª e 3ª fase). Para obtenção dos AOV serão estudadas diferentes condições de operação como carga orgânica e alcalinidade em dois tipos de reatores contínuos: MBBR (moving bed biofilm reactor) e CSTR (Continuous stirred-tank reactor).

A tese foi desenvolvida como parte integrante do projeto 'Polibio: Produção de biopolímeros como uma nova abordagem no tratamento de efluentes'.

## 2 . Revisão Bibliográfica

### 2.1 Conceito de Biorrefinaria

A biorrefinaria é definida (segundo a Agência Internacional de energia (IEA)) como o processamento sustentável de biomassa num largo espectro de produtos comercializáveis e energia. Por outras palavras, a biomassa é usada de forma sustentável como uma fonte de produção de calor, energia, combustíveis, químicos e outros materiais (Hackl and Harvey 2010).

A biomassa que pode ser usada como matéria-prima na biorrefinaria (Figura 1) é constituída, por exemplo, por resíduos agrícolas, material linhocelulósico, resíduos sólidos urbanos e algas (Kamm and Kamm 2004). Estes materiais são obtidos em diferentes setores: agricultura, florestas, indústrias e aquaculturas. As biorrefinarias aplicam uma larga gama de tecnologias para separar os constituintes estruturais da biomassa, como o hidrogénio, hidratos de carbono e proteínas, que são convertidos em produtos de valor acrescentado.

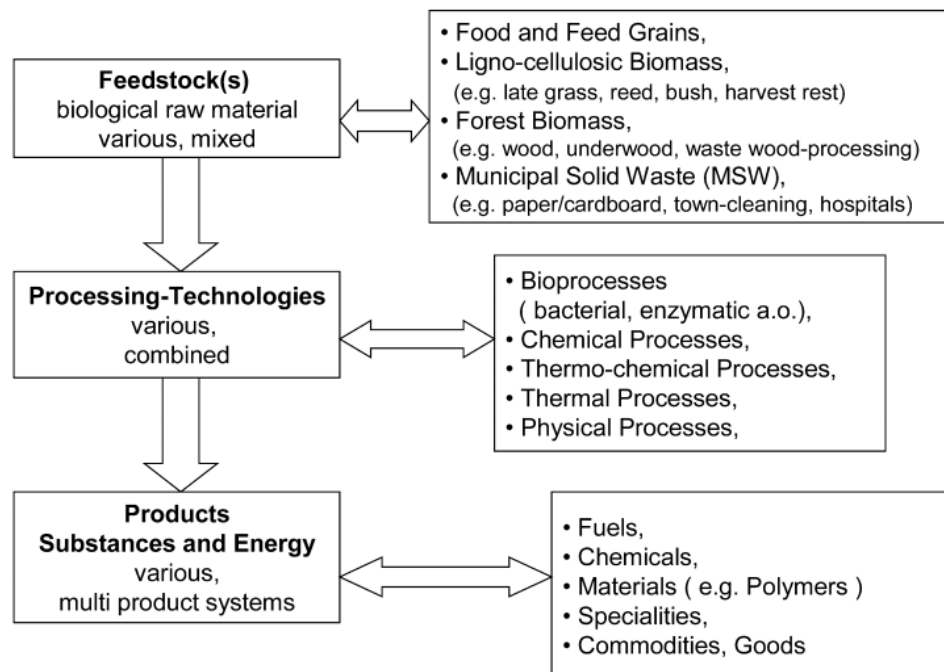


Figura 1: Conceito de biorrefinaria (Kamm and Kamm 2004; Kamm and Kamm 2004)



Hoje, apenas uma pequena fração da biomassa é usada na produção de compostos químicos de origem biológica devido aos seus elevados custos de conversão. O crescimento de produtos de origem biológica a longo prazo irá depender das tecnologias com custos competitivos e do acesso a diversos mercados. O aumento dos avanços tecnológicos nos processos de produção pode levar a uma redução dos custos dos produtos de origem biológica, permitindo que estes possam competir num mercado aberto com os produtos de origem petrolífera.

Os produtos de base biológica resultam do processamento químico e físico da biomassa, como celulose, amido, óleos, proteína, lenhina como se pode ver na figura 1. Outros produtos são indiretamente processados a partir de hidratos de carbonos através de processos biotecnológicos englobando microrganismos, como é o caso da fermentação e processamento enzimático (Yang 2011). A fermentação do etanol e biodiesel são exemplos de combustíveis biológicos. O etanol é um composto essencial, precursor de outros compostos químicos orgânicos necessários para a produção de tintas, solventes, roupas, fibras sintéticas e plásticos. Enquanto o etanol é o produto com maior produção e mais barato através de processos fermentativos, outros compostos químicos como o ácido láctico estão em desenvolvimento como materiais virgens para outros processamentos. Outros compostos químicos biológicos que estão também a tornar-se economicamente mais competitivos. Por exemplo, os óleos de tintas vegetais e ácidos gordos representam 8 e 40% da respetiva área de mercado nos Estados Unidos. Os compostos químicos biológicos, á exceção dos combustíveis, representam a maior oportunidade a curto-prazo para substituir os produtos petrolíferos por fontes renováveis.

Existem atualmente várias tecnologias que convertem biomassa em biocombustíveis, através de várias plataformas, como açucares, processos termoquímicos, cadeias ricas em carbono e a plataforma do biogás. Relativamente a este último, durante o processo de digestão anaeróbia é potencializada a fase acidogénica, em que ocorre a formação de ácidos orgânicos voláteis (AOV) (Chang, Kim et al. 2010).

Existem já algumas empresas empenhadas na busca de soluções ambientalmente mais sustentáveis no sector dos plásticos, como por exemplo, a empresa Metabolix com a

produção de polihidroxicanoatos (PHA) concebidos através da fermentação de matérias-primas renováveis, concebendo plásticos 100% biológicos (Metabolix 2013).

O projeto “polibio” tem também o objectivo de produzir biopolímeros PHA, como já foi referido, usando AOV como substrato.

Na Figura 2 encontra-se representado o esquema do processo de produção de biopolímeros PHA a partir da biomassa de um efluente de soro de queijo. Neste trabalho o soro de queijo é fermentado, pretendendo-se atingir o estado de acidificação para obter AOV, que vão ser o substrato para as bactérias produzirem PHA no meio intracelular.

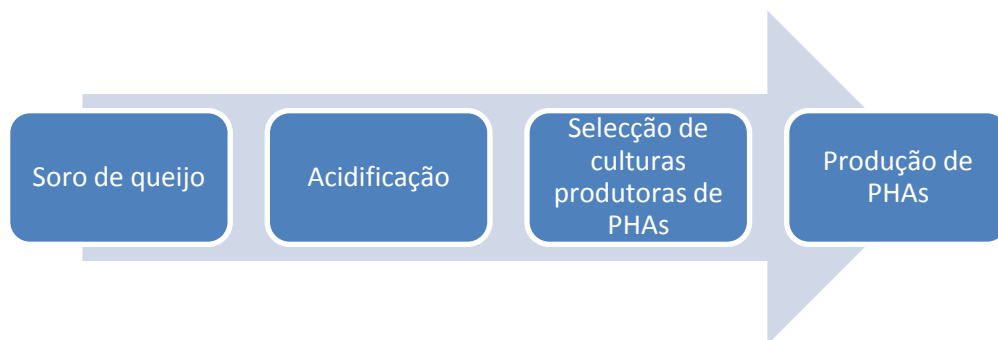


Figura 2: Processo esquemático da produção de bioplásticos PHA através de um efluente de soro de queijo.

## 2.2 Indústria de Lactícineos

### 2.2.1 Enquadramento do sector

A indústria de lacticínios é uma das componentes mais importantes no sector industrial da alimentação. Os componentes do leite, matéria-prima base dos lacticínios são essenciais para o crescimento e saúde dos seres humanos. Para além de ser um alimento rico em proteínas, hidratos de carbono e lípidos, o leite é também uma fonte importante de cálcio, sendo este um elemento decisivo no desenvolvimento e manutenção de ossos fortes tanto nas crianças como nos adultos.

Em 1999, houve um consumo de pelo menos 556 milhões de toneladas de lacticínios em todo o mundo (Pritchard 2001). O leite é o produto mais importante, e por isso mais consumido, entre os lacticínios. Ao longo dos últimos anos tem-se revelado um aumento da produção mundial de leite, tal como é possível observar a tabela 1, o que revela uma procura cada vez maior por este alimento, e pelos produtos lácteos em geral.

Tabela 1: Produção mundial e europeia de leite em 2000, 2009 e 2010 em bilhões de litros (Horticulture and Board 2012)

Ano	2000	2009	2010
<b>Mundo</b>	476	569,6	582,2
<b>UE-15</b>	119,6	114,4	116,7
<b>EU-25</b>	140,8	135,9	137,7
<b>EU-27</b>	146,4	142	143,1
<b>Reino Unido</b>	14,1	12,9	13,6
<b>EU-27%</b>	30,7%	24,9%	24,6%
<b>Reino Unido %</b>	3%	2,3%	2,3%

A distribuição do consumo por pessoa de laticínios no mundo é variável geograficamente, sendo que, invariavelmente, os países industrializados apresentam um maior consumo do que os países menos desenvolvidos. Tipicamente, o consumo de laticínios nos países mais desenvolvidos aumenta à medida que a população cresce. Os aspectos demográficos também são importantes no que toca ao consumo de laticínios, com os jovens a consumirem maior quantidade por pessoa, do que a população mais envelhecida. Isto significa que, no mundo ocidental, com o envelhecimento da população existem grandes desafios para os produtores de laticínios manterem a produção (Pritchard 2001).

A atividade básica da indústria dos laticínios é a da produção de alimentos baseados no leite ou derivados deste. Estes produtos vão desde o leite pasteurizado, à manteiga, aos queijos, ao iogurte, gelados e sobremesas geladas, ou produtos condensados ou em pó, como o leite ou o soro (Moutinho, Rosa et al. 2011)

O queijo é um dos produtos mais antigos e mais produzidos a partir do leite. O queijo é obtido por coagulação e dessoração do leite, que o leite total ou parcialmente desnatado mesmo que reconstituído, assim como da nata, do leite e a mistura de alguns ou de todos estes produtos (incluindo lacto-soro), com ou sem a adição de géneros alimentícios (Moreira 2011). Existem ainda várias classificações para os diversos tipos de

queijo, de acordo com o seu conteúdo em humidade ou o tipo de cura (Moutinho, Rosa et al. 2011).

Em Portugal a indústria de lacticínios está virada sobretudo para o mercado interno. Contudo a necessidade de exportação torna-se cada vez efectiva devido à queda no consumo interno causada pela crise económica que Portugal atravessa (Mendes 2011).

Atualmente, a maior parte das exportações de queijo são da região autónoma dos Açores e destinam-se a países africanos e a comunidades emigrantes portuguesas na França, Suíça, Venezuela, Estados Unidos da América e Canadá. As empresas produtoras focam-se cada vez mais no mercado externo devido à diminuição do consumo interno (Mendes 2011). Na tabela 2 encontram-se os valores de produção, abastecimento e procura de queijo no ano de 2010, 2011 e 2012 em Portugal.

Tabela 2: Produção, fornecimento e procura de queijo em Portugal em 2010, 2011 e 2012 (Mendes 2011)

	2010 (megatoneladas)	2011 (megatoneladas)	2012 (megatoneladas)
<b>Produção</b>	53	56	58
<b>Importações dentro UE-</b>	29	26	25
<b>Importações totais</b>	29	26	25
<b>Fornecimento total</b>	82	82	83
<b>Exportações fora EU</b>	4	4	5
<b>Total exportações</b>	7	7	9
<b>Consumo humano</b>	75	75	75
<b>Consumo total</b>	75	75	75
<b>Uso total</b>	82	82	83
<b>Distribuição total</b>	82	82	83

## 2.2.2 Produção de queijo e seus efluentes industriais.

### 2.2.2.1 Produção de queijo

Em Portugal, a produção de queijo tradicional é realizada em unidades localizadas, essencialmente, na região da Beira Interior, na zona da Serra da Estrela, na península de

Setúbal e no Alentejo. As unidades de grande dimensão existentes no país representam cerca de 5% do total de unidades (Ministério do Ambiente 2007).

Nesta indústria, a produção envolve uma grande variedade de operações unitárias sendo, no entanto, grande parte delas comuns aos vários processos de fabrico. As operações de clarificação, separação, pasteurização juntamente com a esterilização, a coagulação e a incubação, podem ser consideradas as operações principais da indústria dos lacticínios (Moutinho, Rosa et al. 2011). Contudo existem algumas particularidades dependendo do tipo de queijo produzido, como se pode ver nas figuras 3 e 4.

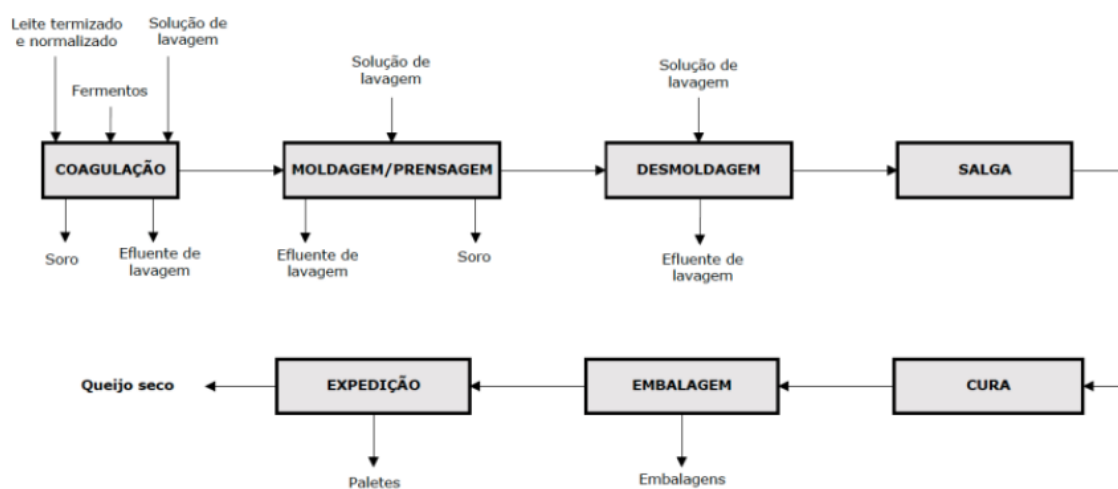


Figura 3: Processo de produção de queijo curado (Moutinho, Rosa et al. 2011)

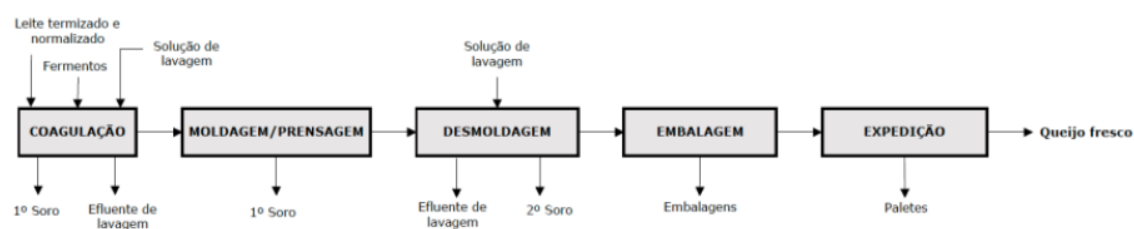


Figura 4: Processo de produção do queijo fresco (Moutinho, Rosa et al. 2011)

A indústria de lacticínios está dividida em vários sectores de produção, onde são produzidas várias correntes, e com características diferentes, em função também do tipo de produto lácteo produzido, sendo o principal o soro de leite.

Estas correntes apresentam cargas orgânicas elevadas, em que o CBO e CQO apresentam valores na gama de  $0,1-100 \text{ kg.m}^{-3}$ , e um índice de biodegradabilidade ( $\text{CBO}_5/\text{CQO}$ ) entre  $0,4-0,8$  (Prazeres, Carvalho et al. 2012)

### **2.2.2.2 Soro de queijo**

O soro de queijo é considerado o resíduo mais contaminante gerado pela indústria de produção de queijo. As suas características dependem da qualidade do leite usado no seu processo de produção, que por sua vez depende da raça, alimentação e saúde dos animais de onde foi retirado esse leite. Uma caracterização típica de soro de queijo está descrito na tabela 3. O volume de efluente de soro de queijo produzido aumenta à medida que aumenta a produção de queijo da empresa em causa. Pode-se considerar que para a produção de 1 quilo de queijo, são necessários 10 quilos de leite, originando 9 quilos de soro de queijo. A produção mundial de soro de queijo é de 40,7 milhões de toneladas por ano (Prazeres, Carvalho et al. 2012).

Tabela 3: Caracterização típica do soro de queijo em relação a vários parâmetros (Prazeres, Carvalho et al. 2012)

<b>Características típicas do soro de queijo</b>	
<b>CBO<sub>5</sub></b>	27-60 Kg.m <sup>-3</sup>
<b>CQO</b>	50-102 Kg.m <sup>-3</sup>
<b>CBO<sub>5</sub>/CQO</b>	<0,5
<b>Sais minerais (NaCl, KCl e sais de cálcio)</b>	0,46-10%
<b>SST</b>	0,1-22 kg.m <sup>-3</sup>
<b>Fósforo</b>	0,006-0,5 kg.m <sup>-3</sup>
<b>pH</b>	3,3-9
<b>Azoto de Kjeldahl</b>	0,001-1,7 kg.m <sup>-3</sup>
<b>Carga orgânica</b>	0,6-102 kg.m <sup>-3</sup>
<b>Lactose</b>	0,18-60 kg.m <sup>-3</sup>
<b>Proteínas</b>	1,4-33,5 kg.m <sup>-3</sup>
<b>Gorduras</b>	0,08-10,58 kg.m <sup>-3</sup>

Antes da implementação do primeiro tratamento dos efluentes das indústrias de produção de queijo, e de laticínios em geral, estas empresas descarregavam esse resíduo directamente no solo, ou nas massas de água (rios, oceanos, lagos etc.). Quando a produção de queijo tomou uma dimensão mais industrial, onde são produzidos diariamente milhares de litros de soro de queijo, o seu escoamento processa-se com alguma dificuldade devido à elevada produção.

Devido às suas propriedades esta corrente não pode ser descarregada directamente no meio ambiente sem um tratamento adequado ou valorização.

Inicialmente o soro de queijo era considerado um resíduo sem valor, cuja única preocupação dos produtores era livrar-se dele e desse modo, quando não era lançado directamente nos solos ou linhas de água, era redistribuído a produtores de leite como alimento para os seus animais. Com o aumento das unidades produtoras de queijo, houve uma necessidade crescente na redução do CQO e CBO desse efluente e maximizar os ganhos em materiais virgens, encorajando os produtores na procura de novas formas de usar o soro de queijo (Moulin and Galzy 1984). Além disso, a questão mais problemática,

é o facto de nas quintas que produzem a pequena-escala ou pequenos produtores de queijo, vulgarmente situados em áreas rurais isoladas, o soro de queijo não é recuperado, e tem de ser tratado juntamente com outros efluentes produzidos nas instalações. Isso porque as quantidades produzidas nestes casos não justificam a aquisição de equipamento necessário para a valorização do resíduo (Frigon, Breton et al. 2009).

G. Moulin e P. Galzy (1984) compilaram no seu trabalho um conjunto de formas de valorização do soro de queijo já descritas por outros autores. Em 1977 o soro de queijo em solução, ou seja, na forma líquida, é utilizado na produção de bebidas através da fermentação láctica; o soro de queijo em pó é utilizado na alimentação de animais; o soro de queijo doce é incorporado também em alimentos humanos como em sobremesas, produtos feitos á base de queijo e sopas; o soro de queijo em pó é utilizado também na indústria de produção de alimentos, padarias e em indústrias de processamento de carnes (Moulin and Galzy 1984).

Neste trabalho aborda-se uma outra forma de valorização do soro de leite, através da acidificação deste subproduto. O resultado da acidificação são AOV que podem funcionar como precursores químicos para produção de produtos de valores acrescentado.

A produção dos AOV é feita numa das etapas da digestão anaeróbia, acidogénese.



## 2.3 Biopolímeros

Os biopolímeros são uma alternativa mais sustentável em relação aos polímeros de base petroquímica, uma vez que são formados através de fontes renováveis.

A área dos biopolímeros é bastante abrangente e com uma grande variedade de materiais com diversas aplicações em vários sectores da economia. Por exemplo, podem ser usados como adesivos, absorventes, lubrificantes, condicionadores de solo, cosméticos, veículos, têxteis, materiais de alta resistência estrutural e dispositivos de comutação computacional (Assessment 1993).

Actualmente continuam a surgir novos biopolímeros como o ácido poliláctico (PLA), polihidroxialcanoatos (PHA) e termoplásticos poliuretanos biológicos (TPU). Foram também produzidos polietileno (PE) e polipropileno (PP) através de cana de açúcar no Brasil (Jones 2009).

A grande diversidade de biopolímeros deve-se também ao facto de terem várias fontes de produção. Por exemplo, existem biopolímeros produzidos através de recursos agrícolas como polissacarídeos e lípidos, através da fermentação utilizado microorganismos, como os PHA e biopolímeros convencionais como PE, PTT, PPP, PBS produzidos pela síntese convencional através da biotecnologia, como é possível observar através da figura 5.

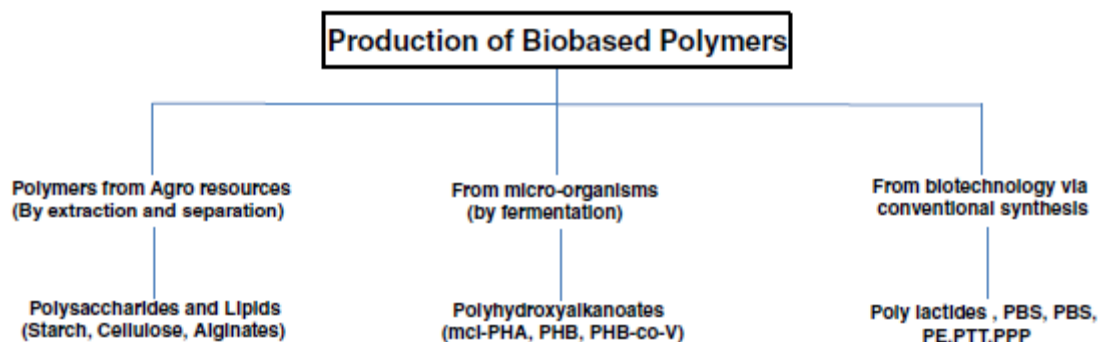


Figura 5: Diferentes tipos de polímeros tendo por base o tipo de processo (Babu, O'Connor et al. 2013)

### 2.3.1 Polihidroxicanoatos (PHA)

Os PHA são poliésteres de monómeros de ácidos hidroxialcanoicos e/ou hidroxialcenóicos, que podem ser acumulados por diversos microorganismos em grande quantidade sem afetar a pressão osmótica das células (Carminatti, El Messane et al. 2006). A estrutura base de um PHA está representada na figura 6. Estes microorganismos acumulam os polímeros na forma de grânulos intracelulares, podendo chegar a constituir 80% da massa seca das células (Carminatti, El Messane et al. 2006). O polímero acumulado no interior dos grânulos tem como principal função à reserva de carbono e energia.

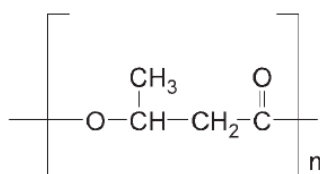


Figura 6: Estrutura base de um polihidroxicanoato

O primeiro PHA identificado foi o PHB, descoberto e identificado quimicamente nos anos 20, como sendo um componente granular das células de algumas bactérias (Lenz and Marchessault 2004).

Os PHA são materiais que apresentam propriedades semelhantes aos termoplásticos e elastômeros biodegradáveis (Carminatti, El Messane et al. 2006). As propriedades físicas e mecânicas desses materiais dependem da composição monomérica, peso molecular e da distribuição de peso molecular do polímero, sendo os dois últimos, características importantes para a sua adequação comercial. O peso molecular dos polímeros depende do microorganismos que os produzem e das condições de crescimento (Van de Velde and Kiekens 2002).

Os PHA apresentam como características essenciais uma rápida biodegradabilidade e propriedades termoplásticas (Khosravi-Darani, Mokhtari et al. 2013).

As principais propriedades dos termoplásticos são: elevado ponto de fusão, baixa rigidez, alta resistência à pressão, resistência ao alongamento antes da ruptura e forte resistência ao impacto.

Tabela 4: Principais características dos biopolímeros polihidroxibutirato (P(3HB)), polihidroxialcanoato (PHO) e do polímero propileno (PP) (Carminatti, El Messane et al. 2006).

Característica	P(3HB)	PHO	PP
<b>Ponto de fusão</b>	180°C	61°C	176°C
<b>Tg</b>	5°C	-35°C	-10°C
<b>Densidade</b>	1,18-1,25 g/cm <sup>3</sup>	1,02 g/cm <sup>3</sup>	0,905 g/cm <sup>3</sup>
<b>Cristalinidade</b>	70%	25%	70%
<b>Permeabilidade ao O<sub>2</sub></b>	45 (cm <sup>3</sup> /m <sup>2</sup> at dia)	-	1700 (cm <sup>3</sup> /m <sup>2</sup> at dia)
<b>Transmissão de vapor</b>	60-70 (g/cm <sup>3</sup> .dia)	-	-
<b>Módulo de young</b>	3500 MPa	8 MPa	1700 MPa
<b>Tensão de cisalhamento</b>	40 MPa	9 MPa	38 MPa
<b>Resistência á rutura</b>	5%	380%	400%
<b>Massa molecular</b>	1-8*10 <sup>-5</sup>	-	2,2-7*10 <sup>-5</sup>

Os PHA são acumulados no meio intracelular na forma de grânulos em condições de excesso de carbono e poucos nutrientes como azoto e fósforo. O principal substrato para a síntese de PHA são os ácidos orgânicos voláteis (AOV) como fonte de carbono (Jarpa, Pozo et al. 2012)

Dentro da família dos PHA existem mais de 150 combinações de monómeros possíveis, obtendo-se materiais com propriedades bastante distintas (Khosravi-Darani, Mokhtari et al. 2013)

Os PHA são sintetizados através da coenzima A-thioster usando ácidos gordos como substrato. Existem três classes de AOV que estão na origem dos PHA: ácidos de cadeia curta (3-5 átomos de carbono), ácidos de cadeia média (6-14 átomos de carbono) e ácidos de cadeia longa (15 ou mais átomos de carbono) (figuras 6 e 7).

O PHB foi o primeiro PHA descoberto, e também é o mais estudado e caracterizado. Tem propriedades mecânicas muito semelhantes aos plásticos convencionais como o polipropileno e polietileno (Khosravi-Darani, Mokhtari et al. 2013). Na figura 7 apresenta-se a estrutura base de um PHB. Tipicamente os PHA produzidos através de ácidos de cadeia curta são altamente cristalinos, quebradiços e possuem baixa elasticidade (Khosravi-Darani, Mokhtari et al. 2013). Os PHA sintetizados a partir de ácidos de cadeia longa são mais dúcteis e fáceis de moldar.

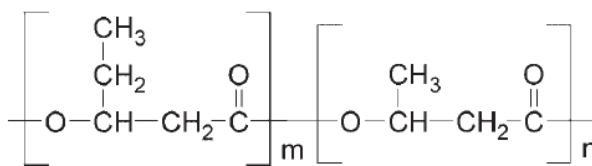


Figura 7: Estrutura base de um PHB-PHV

## 2.4 Digestão anaeróbia

### 2.4.1 História da digestão anaeróbia

Alessandro Volta, em 1776, foi o primeiro investigador do processo anaeróbio. Este físico descobriu que havia uma relação direta entre a quantidade de matéria orgânica degradada e a quantidade de metano produzido nos sedimentos existentes em alguns lagos e cursos de água (Wust L 2003).

A primeira referência à aplicação da digestão anaeróbia para o tratamento de efluentes foi feita pelo francês Louis Mouras (1860), que descreveu a liquefação da matéria orgânica de um efluente doméstico em condições anaeróbias. Donald Cameron modificou o tanque de Louis Mouras e deu-lhe o nome de tanque séptico, que foi o sistema escolhido em 1897 pelo governo da cidade de Exeter, em Inglaterra, para o tratamento de todos os efluentes da cidade (Fonseca and Teixeira 2007).

Durante a maior parte do século XX, o desenvolvimento de tecnologias de digestão anaeróbia permanecia exclusivamente ligado à estabilização de putrescíveis sólidos das águas residuais urbanas e aplicados também à despoluição dos efluentes industriais (Abbasi, Tauseef et al. 2011).

Os efluentes gerados pelas diferentes fontes de produção, antes de serem lançados para o meio ambiente, têm de se sujeitar a um determinado tratamento em estações criadas para esse fim, para não prejudicar o meio ambiente.

Hoje em dia o desafio da gestão de águas residuais passa por estudar e potenciar o uso desse efluente como uma matéria-prima para a obtenção de produtos ou bens que poderão ser utilizados pela sociedade, uma vez que a grande maioria dos resíduos agro-florestais e industriais são um recurso renovável.

No presente trabalho de investigação vai ser aplicada a acidogénese (uma etapa da digestão anaeróbia) para a valorização do soro de leite.

#### 2.4.2 Comparação entre digestão anaeróbia e aeróbia para tratamento de efluentes.

A digestão aeróbia e anaeróbia são dois tipos de aplicações usadas no tratamento biológico de efluentes e resíduos orgânicos. Contudo as condições de operação e os microorganismos intervenientes no processo são bastante diferentes diferenciando desse modo os produtos obtidos, bem como o processo geral em si.

Os processos aeróbios são mais vulgarmente usados no tratamento de águas residuais orgânicas para atingir elevadas eficiências de tratamento, enquanto o tratamento anaeróbio, para além de ser fundamental no controlo da poluição, é usado numa perspectiva de recuperação energética dos produtos resultantes do processo (Chan, Chong et al. 2009).

Para além da recuperação energética, a digestão anaeróbia tem também como vantagens a baixa produção de lamas (comparativamente com outros processos), e baixas necessidades energéticas para o processo produtivo (Chen, Cheng et al. 2008).

As principais desvantagens da digestão anaeróbia em relação à digestão aeróbia é o facto de a primeira necessitar de um controlo do processo mais apertado, podia gerar odores derivados de compostos sulfurados ( $H_2S$ ) e de apenas reduzir a poluição orgânica entre 85-90%, o que significa que muitas vezes é necessário um segundo processo, geralmente aeróbio, para garantir uma elevada qualidade do efluente tratado (Parawira 2004). As diferenças entre a digestão aeróbia e anaeróbia encontram-se mais detalhadas na tabela 5.

Tabela 5: Diferenças entre digestão aeróbia e Digestão anaeróbia (Parawira 2004)

	Digestão aeróbia	Digestão anaeróbia
<b>Arranque</b>	Período curto de arranque	Longo período de arranque
<b>Processo</b>	- Produção de quantidades elevadas de lamas em excesso - Necessidade de reactor de grande volume - Necessidades elevadas de nutrientes	- Não há remoções de azoto e fósforo significativas - Baixa produção de lamas em excesso (5-20%) - Uso de reactores de volumes pequenos

		- Baixas necessidades de nutrientes
<b>Balanco de carbono</b>	- 50-60% incorporado em CO <sub>2</sub> - 40-50% incorporado em biomassa.	- 95% convertido em biogás - 5% incorporado em biomassa microbiana
<b>Balanco de energia</b>	- 60% da energia disponível é usada em biomassa nova - 40% usada no aquecimento do processo	- 90% retida como CH <sub>4</sub> - 3-5% é perdida como calor - 5-7% é usada para formar nova biomassa
<b>Resíduos</b>	- Produção de lamas em excesso - Não é necessário pós-tratamento.	- Biogás e azoto mineralizado em amónia - Necessidade de pós-tratamento para remoção de alguma matéria orgânica e compostos malcheirosos
<b>Custos</b>	- Baixos custos de investimento; - Altos custos de operação	- Moderados custos de investimento; - Baixos custos de operação
<b>Estado de desenvolvimento</b>	- Tecnologia já estabelecida	- Ainda em desenvolvimento para aplicações específicas

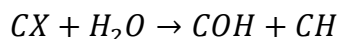
### 2.4.3 Etapas do processo da digestão anaeróbia

A digestão anaeróbia envolve a degradação e estabilização de matéria orgânica, associado ao controlo da poluição, e conduz á produção de biogás, mistura de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) e metano (CH<sub>4</sub>) e á produção de biomassa microbiana. O biogás pode ser utilizado para produção de energia, devida á sua elevada composição em metano, e nestes moldes, é considerado uma fonte de energia renovável.

As características das comunidades microbianos dependem do tipo de substrato que está a ser digerido. As conversões de materiais orgânicos complexos a substâncias mais simples são realizadas por 4 tipos de microorganismos diferentes: bactérias hidrolíticas, bactérias acidogénicas fermentativas, bactérias acetogénicas e metanogénicas.

#### 1) Hidrólise

De um modo geral a hidrólise é definida como as reacções químicas em que os componentes dissolvidos na água são degradados por reacções com água, pelo hidrogenião (H<sup>+</sup>) ou pelo ião hidroxilo (OH<sup>-</sup>). A reacção descritiva deste processo é a seguinte:



Onde o CX é o substrato orgânico reagente e o COH e CH são os produtos da reacção, mais simples do que o substrato inicial.

Durante a acidificação anaeróbia, a matéria orgânica particulada é hidrolisada a açúcares, ácidos gordos e aminoácidos por enzimas extra-celulares produzidos pelos microorganismos (Demirel, Yenigun et al. 2005), como por exemplo, celulasas, amilases, proteases e lipases.

As proteínas dão origem a aminoácidos, pequenos peptídeos, amónia e CO<sub>2</sub>. Os polissacarídeos são convertidos em açúcares mais simples, monoméricos ou diméricos. O amido é degradado a unidades de glucose. A hidrólise da celulose através da enzima celulase origina glucose. A hemicelulose é degradada através de enzimas específicas em vários monossacarídeos como a glucose, galactose, xilose, arabinose e manose. Os lípidos são hidrolisados a ácidos gordos de cadeia longa e glicerol pelas lípases e fosfolípases. As lípases catalisam a hidrólise de esteres a triglicerídeos e eventualmente glicerol. O metabolismo fosfolipídico pelas fosfolípases resultam na produção de ácidos gordos e e, vários compostos orgânicos, dependendo do substrato em causa.

## **2) Acidogénese**

Durante a acidogénese numa primeira fase estes compostos relativamente simples são depois fermentados a ácidos gordos de cadeia curta, álcoois dióxido de carbono e hidrogénio através de bactérias formadoras de ácidos (Demirel, Yenigun et al. 2005). A população acidogénica apresenta baixos tempos de duplicação, pelo que esta nunca é a etapa limitante do processo (Fonseca and Teixeira 2007).

A maior parte dos produtos formados no metabolismo da glucose tem como composto intermediário o ácido pirúvico. Dependendo das espécies microbianas anaeróbias presentes, e das condições do reactor, o ácido pirúvico leva à formação de vários compostos constituídos por 1 a 4 átomos de carbono, como os ácidos orgânicos voláteis (acético, propiónico e butírico, por exemplo), ácido fórmico, ácido láctico, bem como outros orgânicos tais como álcoois, cetonas e aldeídos.

Na figura 8, encontram-se precisamente as vias metabólicas intervenientes na acidogénese bem como os compostos intervenientes no processo, a partir das macromoléculas de proteínas, hidratos de carbono e lípidos.

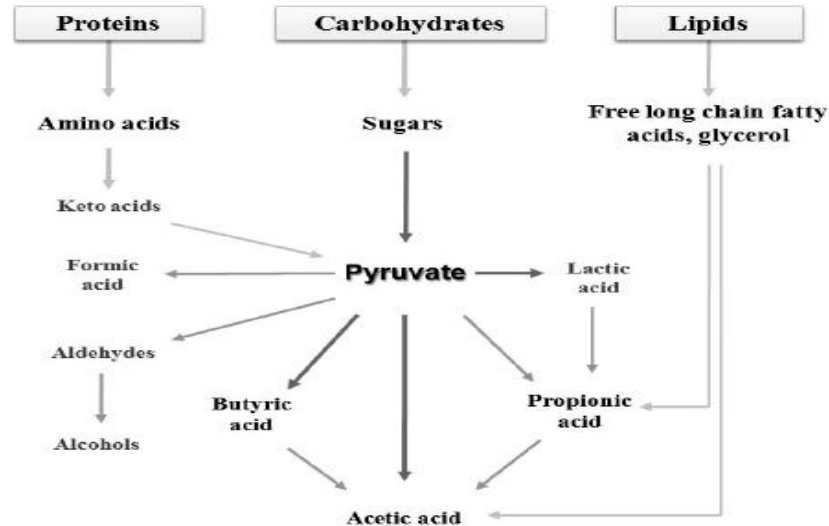


Figura 8: Via metabólica de produção de AOV (Kim, Kang et al.)

### 3) Acetanogénese

A acetanogénese consiste na transformação dos produtos da fermentação em acetato, dióxido de carbono e hidrogénio por acção das bactérias homoacetogénicas e das bactérias sintróficas (ou bactérias produtoras obrigatórias de hidrogénio). As primeiras produzem acetato a partir de  $H_2$  ou  $CO_2$ . (Fonseca and Teixeira 2007).

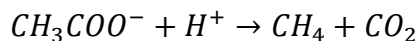
A transformação do substrato constituído por matéria orgânica em ácidos orgânicos faz baixar o pH do sistema. Isto é benéfico para as bactérias acidogénicas e acetanogénicas que preferem um ambiente relativamente ácido (pH 4.5-5.5).

### 4) Metanogénese

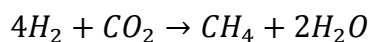
Esta é a última etapa do processo de digestão anaeróbia, que proporciona a formação de biogás. É uma mistura gasosa combustível, de alto poder calorífico, sendo composto maioritariamente por metano ( $CH_4$ ), entre 60% a 70% do biogás, e dióxido de carbono ( $CO_2$ ), que corresponde maioritariamente á restante percentagem de biogás, 30% a 40%. Existem também outros gases na mistura, mas em quantidades muito reduzidas, como o azoto, hidrogénio e ácido sulfídrico. A produção de biogás é levada a cabo por um grupo de bactérias, designadas por bactérias metanogénicas, entre as quais se destacam as acetanotróficas e as hidrogenotróficas:



As primeiras quebram o acetato a metano e dióxido de carbono:



As bactérias hidrogenotróficas usam o hidrogénio presente no meio como dador de electrões e o dióxido de carbono como receptor de electrões, formando metano (Ferry 1992):



As bactérias acetanogénicas e as bactérias metanogénicas são dois tipos de bactérias com necessidades totalmente diferentes e que crescem no mesmo reactor. É portanto difícil manter um equilíbrio entre estes dois tipos de microorganismos devido às suas características particulares e às necessidades ambientais da cultura serem bastante diferentes. Por exemplo, estas bactérias variam em termos de fisiologia, necessidades alimentares, cinéticas de crescimento e sensibilidade às condições ambientais do meio (Chen, Cheng et al. 2008). Quando este equilíbrio é interrompido o processo de metanogénese é interrompido. É por isso que alguns investigadores optam por realizar a digestão anaeróbia em duas fases diferentes num determinado projecto, onde cada fase é realizada em reatores diferentes e assim poderem-se cultivar, em cada um deles, os diferentes tipos de bactérias nas suas condições óptimas de crescimento (Wang, Zhang et al. 2009).

Na figura 8 encontram-se representadas as várias etapas da digestão anaeróbia bem como os principais produtos resultantes das respectivas etapas. A variedade de componentes formados ao longo do processo demonstra também a existência de um consórcio de microorganismos, como já foi referido.

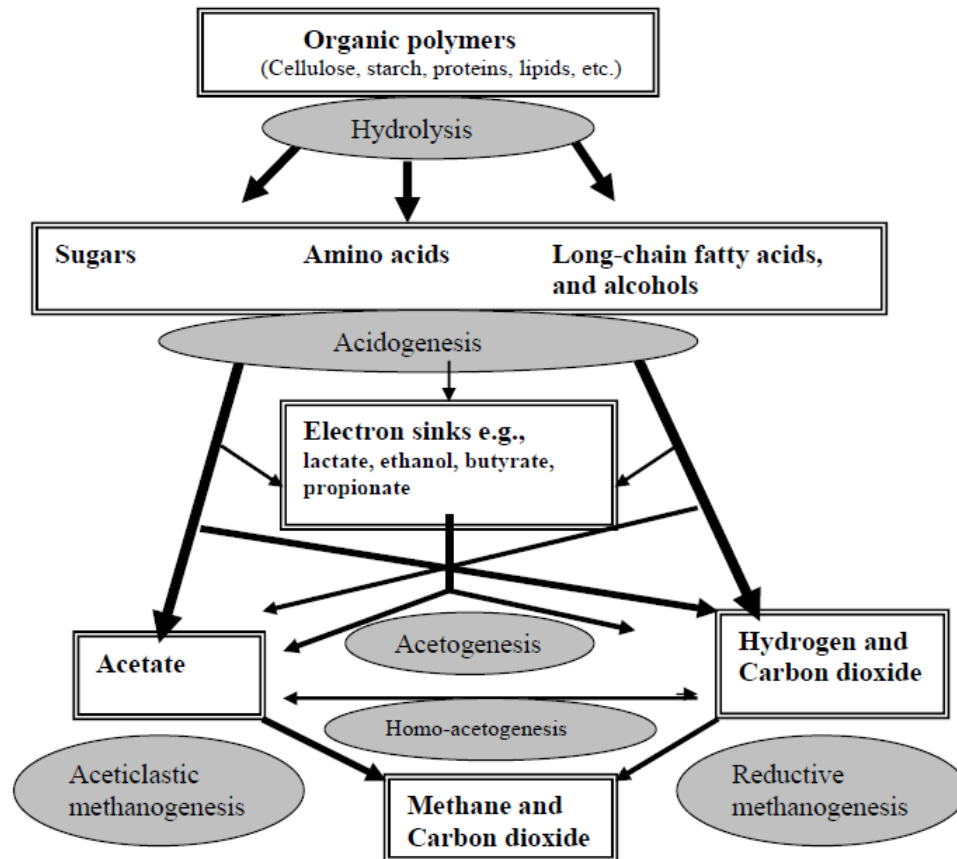


Figura 9: Esquema geral dos processos de digestão anaeróbica, com as etapas e os componentes intervenientes (Parawira 2004)

#### 2.4.4 Inibição da metanogénese

Os parâmetros que influenciam negativamente a digestão anaeróbia são considerados inibidores. Um material é considerado inibidor quando causa uma mudança de forma adversa na população microbiana ou causa inibição do crescimento bacteriano. A inibição é, usualmente, indicada pelo decréscimo na taxa de produção de metano e na acumulação de ácidos orgânicos voláteis (Chen, Cheng et al. 2008). Segundo estes autores os principais compostos que influenciam a DA são:

- Sulfito

Nos reactores anaeróbios, o sulfato é reduzido a sulfito através das bactérias redutoras de sulfato (Chen, Cheng et al. 2008)

- Iões metálicos leves

Altos índices de sais causam a desidratação das células bacterianas devido à pressão osmótica. Apesar dos catiões dos sais em solução estarem associados aos

respectivos aniões, a toxicidade dos sais deve-se predominantemente aos catiões. Enquanto concentrações moderadas de sais em solução estimulem o crescimento microbiano, quantidades excessivas abrandam o seu crescimento, ou poderão revelar-se tóxicas se estiverem presentes em maiores concentrações (Chen, Cheng et al. 2008)

- Metais pesados

Os metais pesados mais preocupantes são o crómio, ferro, cobalto, cobre, zinco, cádmio e níquel. Vários estudos sobre o desenrolar do processo de digestão anaeróbia, verificaram que a toxicidade dos metais pesados é uma das maiores causas de inibição nos digestores (Chen, Cheng et al. 2008)

- Materiais orgânicos:

Os compostos orgânicos que poderão ser tóxicos para os processos anaeróbios são os benzenos, fenóis, alcanos, álcoois, aldeídos, éteres, cetonas, ácidos carboxílicos e amidas (Chen, Cheng et al. 2008)

- Amónia

A concentração de amónia livre depende principalmente de três parâmetros: concentração total de amónia, temperatura e pH. Alguns autores descobriram que a fermentação a metano a partir de efluentes com altas concentrações de amónia torna-se mais inibidor a temperaturas termofílicas do que a temperaturas mesofílicas. Isto vai de encontro ao facto de que a concentração de amónia livre aumenta com o aumento da temperatura. Além disso, a produção de biogás, relativamente á amónia, é afectada com o aumento do valor de pH, que mais uma vez provoca o aumento da concentração de amónia livre (Hansen, Angelidaki et al. 1998).

Os processos de inibição da metanogénese podem ocorrer consoante os parâmetros de operação aplicados, como por exemplo pH e temperatura. Como as bactérias acetanogénicas e metanogénicas são microorganismos bastante diferentes as suas necessidades físicas e nutritivas também são diferentes e podem diminuir a actividade com temperaturas altas e pH abaixo dos 6.

Como foi abordado anteriormente na descrição das diferentes fases da digestão anaeróbia, em cada fase do processo intervêm diferentes tipos de

microorganismos, cada um associado a determinada fase, formando um consórcio de bactérias dentro do reactor.

Os produtos terminais da fermentação produzidos durante a fase acidogénica são muito importantes para o desempenho de todo o sistema, porque estes podem afectar a eficiência e o decorrer da fase metanogénica. A taxa de conversão de AOV em ácido acético irá afetar a quantidade de bactérias metanogénicas e consequentemente afectar a taxa de degradação de ácido acético para originar metano. Em muitos estudos já realizados, mostraram que a taxa de conversão de AOV para metano varia em função do tipo de ácidos e outros compostos, sendo os que mais contribuem para essa conversão são o ácido acético, etanol, ácido butírico e ácido propiónico, por ordem decrescente respectivamente (Wang, Zhang et al. 2009).

Uma vez que o objectivo do trabalho em causa é produzir ácidos orgânicos voláteis, sendo estes compostos intermédios de todo o processo de digestão anaeróbia, é necessário inibir os processos que decorrem depois da fase acidogénica. Deste modo, ao recolher o efluente depois de passar pelo reactor acidogénico vai obter-se então a melhor concentração de ácidos orgânicos voláteis possíveis para produzir PHA na fase seguinte de um processo de produção de biopolímeros.

## **2.5 Fermentação acidogénica**

Os AOV são ácidos monocarboxílicos de cadeia curta constituídos entre 2 a 8 átomos de carbono por molécula. São geralmente formados através da biodegradação anaeróbia de grandes moléculas orgânicas, estando, portanto, presentes em águas residuais municipais, efluentes da indústria alimentar, águas residuais da indústria pecuária, lamas, lixiviados de aterros etc. e são emitidos por alguns animais e plantas. Os AOV desempenham um papel fundamental no tratamento biológico de águas residuais e são compostos intermediários importantes na conversão de substratos orgânicos a metano (Zygmunt and Banel 2009). São exemplos de AOV os ácidos acético, propiónico, butírico, valérico e o caproico. No corpo humano existe também a produção desses ácidos, que ocorre no intestino durante a digestão dos alimentos.

Na produção industrial, os AOV são normalmente derivados de combustíveis fósseis através de reacções químicas como outro tipo de produto químico. Contudo a fermentação, usando recursos renováveis, é preferível do ponto de vista do desenvolvimento sustentável e saúde humana (Singhania, Patel et al. 2013).

No processo de digestão anaeróbia os AOV são formados a partir de macromoléculas como lípidos, carboidratos e proteínas (Zygmunt and Banel 2009), como se encontra também representado na figura 7.

No conceito de biorrefinaria, os AOV podem ser utilizados para várias aplicações. Por exemplo, os AOV podem ser usados na produção de ésteres metílicos ou etílicos, que devido ao seu elevado valor de octanas, podem ser usados de forma vantajosa como aditivos de gasolina (Sans and Mata-Alvarez).

Por outro lado os AOV têm também elevado potencial como matéria-prima para a produção de um novo tipo de biocombustível, o hidrogénio. Actualmente todo o hidrogénio utilizado nas indústrias provém em 90% de combustíveis fósseis, dentro dos quais 50% são provenientes do gás natural, surgindo então a possibilidade dos processos anaeróbios serem uma boa alternativa para a sua produção. A fermentação do hidrogénio está dependente dos AOV como substrato para a foto-fermentação, sendo o acetato, o propionato e o butirato os ácidos mais importantes nesse processo (Hu and Le 2011).

Os AOV são também conhecidos pela sua aplicação em outros processos como nutrientes biológicos, remoção de fósforo e produção de PHA (Cysneiros, Banks et al. 2012). Quanto a estes últimos, o acetato e o butirato têm tendência a formar o monómero hidroxibutirato (HB), enquanto que a presença de propionato aumenta a presença de hidroxivalerato no biopolímero (Hansen, Angelidaki et al. 1998). As propriedades físicas e mecânicas dos PHA são dependentes da composição dos monómeros que compõem o polímero (Bengtsson, Hallquist et al. 2008).

Na perspectiva do tratamento de águas residuais, as elevadas cargas orgânicas presentes surgem como uma óptima solução, em termos de matéria-prima, na digestão anaeróbia para a produção de AOV, que serviram de substrato na síntese de PHA. Para além das vantagens associadas aos biopolímeros que foram anteriormente referidas, este processo remete para outra perspectiva vantajosa, que é o facto do efluente ser considerado como uma mais-valia e não um resíduo como é habitualmente encarado.

Para além disso os custos associados ao tratamento de efluentes têm grandes custos envolvidos.

Na tabela 7 estão representados os resultados obtidos na produção de AOV obtidos a partir de diferentes substratos e condições tendo como base o processo de digestão anaeróbia.

Tabela 6: Condições obtidas na produção de AOV por diferentes autores

Substrato	Produto obtido	Condições	Referência
Soro de queijo	AOV	0,93 g AOV como CQO/g SCQO efluente TRH = 95 h	(Bengtsson, Hallquist et al. 2008)
Pasta de papel	AOV	0.75 g AOV-CQO/g SCQO efluente TRH = 24 h	
Água residual indústria laticínios	AOV – aumento do grau de acidificação em 56%	Alteração do TRH de 24 h para 12 h	(Demirel, Yenigun et al. 2005)
Soro de queijo	Ácido Acético	TRH=0,4 dias ; pH=6 T=54,1 °C	(Yang, Yu et al. 2003)
	Ácido butírico	TRH=0,22 dias ; pH=6,5 ; T=51,9 °C	
Resíduos de milho	Ácido acético e butírico	pH=6,5	(Cysneiros, Banks et al. 2012)
	Ácido propiónico	Baixo pH	

Sendo os AOV substratos ideais para a produção de PHA, a sua formação pode ser potencializada para a produção desses polímeros.

Hoje em dia o desafio no conceito de águas residuais passa por estudar e potencializar o uso desses efluentes como uma matéria-prima para a obtenção de matérias, ou bens que poderão ser aproveitados pela sociedade em seu próprio proveito. Assim, esses compostos podem ser utilizados como recurso para produzir determinados produtos que actualmente são produzidos recorrendo a processos de produção e

matérias-primas que ponham em causa a boa qualidade ambiental dado os efluentes serem considerados uma fonte “renovável”.

Os efluentes industriais e urbanos são tratados nas Estações de Tratamento de Águas Residuais (ETAR) e rejeitados para o meio ambiente. Os parâmetros da qualidade da água do efluente rejeitado podem excepcionalmente ser emitidos em concentrações que prejudiquem o meio ambiente em causa, devido a falhas no sistema de tratamento. Esse facto, a juntar-se aos grandes custos associados aos processos de tratamento revelam grandes desvantagens para o actual modelo de gestão de efluentes líquidos, surgindo actualmente um novo paradigma para este sector.

A concepção do trabalho experimental a realizar surge na convergência destes dois temas anteriormente abordados: a produção de AOV e o uso de águas residuais, como recurso ou matéria-prima. O facto das águas residuais serem caracterizadas por altos valores de cargas orgânicas, levam a ser considerados o substrato ideal para a produção de AOV que por sua vez serão a fonte de produção de PHA.

## **2.5.1 Condições operacionais que influenciam o processo de acidogénese.**

### **2.5.1.1 Temperatura**

A temperatura tem uma influência significativa nos sistemas biológicos, afectando o metabolismo existente, o equilíbrio iónico a solubilidade do substrato e gorduras e a disponibilidade biológica de ferro (Wust L 2003).

A temperatura é um dos factores que mais influencia a eficiência do processo de degradação anaeróbia. Normalmente são consideradas três gamas de temperaturas: mesófila (20 a 45°C), termófila (> 45°) e psicrófila (< 20°C).

Os regimes de temperatura mesofílica têm sido adaptados desde à muito tempo na digestão anaeróbia, tendo demonstrado bons resultados operacionais. O regime termofílico também tem sido adoptado na digestão anaeróbia, revelando algumas vantagens em alguns casos específicos como por exemplo um aumento da destruição de sólidos orgânicos, um aumento do processo de separação dos sólidos da fase líquida e uma maior destruição de organismos patogénicos (Kim, Ahn et al. 2002).



K. Komemoto et al (2009) estudaram o efeito da temperatura na produção de AOV e biogás. Chegaram à conclusão que na gama de temperatura mesofílica, o grau de solubilização do substrato era maior do que em relação aos ensaios a temperaturas termofílicas. A produção de biogás também foi maior a temperaturas mesofílicas. Em relação ao ácido láctico, houve um decréscimo deste durante a segunda fase das experiências a 25°C e em condições mesofílicas, 35 e 45°C. A 15°C e 55°C houve um decréscimo mais moderado e a 65°C manteve-se sensivelmente constante após ter atingido o seu pico. A formação de ácido acético e biogás é favorecido a temperaturas mesofílicas. Na gama termófila nem o ácido láctico nem os AOV decrescem e não houve produção de biogás. Foi também verificado que o aumento da concentração de ácido butírico na segunda metade do período deste estudo em todas as temperaturas, permanecendo relativamente até ao fim da experiência, especialmente na gama mesófila (35°C e 45°C). Deste modo, pode concluir-se que o ácido butírico não contribuiu para a produção de biogás (Komemoto, Lim et al. 2009)

Lu J. et al (2005) investigaram o efeitos de várias temperaturas termofílicas (55, 60, 65, 70, 75 e 80 °C) e com vários tempos de retenção hidráulico (0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5 e 3 dias), e concluíram, que o maior número de compostos originados na fase acidogénica corresponderam aos ensaios a temperaturas elevadas de 70°C e 75°C e tempo de retenção hidráulico de 2 dias. Nessas circunstâncias a atividade das metanogénicas foi inibida e não houve produção de metano (Lu and Ahring 2005).

#### **2.5.1.2 pH e alcalinidade**

No reactor anaeróbio o pH é um importante parâmetro a ser considerado e por isso é também frequentemente monitorizado. Os vários tipos de microorganismos que intervêm no processo de digestão anaeróbia tem diferentes necessidades para o seu crescimento, tal como as concentrações do substrato de entrada e nutrientes bem como o pH (Cysneiros, Banks et al. 2012). À medida que se vão produzidos os ácidos orgânicos voláteis, o pH no interior do sistema biológico diminui. Por forma a diminuição do pH não ser prejudicial aos microorganismos presentes no processo de digestão anaeróbia é adicionada alcalinidade, de forma a controlar os níveis de pH.

No efluente de soro de queijo, as altas concentrações de lactose, a sua rápida conversão em ácidos e a baixa alcalinidade resulta numa queda abrupta do pH (Stamatelatou, Giantsiou et al. 2012). A queda do pH tem um efeito inibitório em primeiro lugar nas bactérias metanogénicas e quando o pH é inferior a 4,5 torna-se inibitório para as bactérias acidogénicas (Sans and Mata-Alvarez)

K. Stamatelatou et al (2012) estudaram experimentalmente a digestão anaeróbia de um efluente de soro de queijo num sistema com duas fases, para que as propriedades da fase acidogénica não afectassem as da fase metanogénica. Sem controlo do pH concluíram que este na fase acidogénica baixava até 3,2-3,4 e na fase metanogénica entre 6,3 e 6,6. Na produção de AOV é necessário, portanto impedir que o pH desça até essa gama de valores. Para isso é necessário aumentar a alcalinidade na alimentação para provocar o efeito tampão que permita um controlo do pH dentro do reactor. Alcalinidade é a capacidade tampão de uma solução aquosa. Mede a capacidade de uma solução neutralizar ácidos e bases, mantendo portanto um pH estável. Uma solução que produz um bom efeito tampão contém compostos, tais como bicarbonatos, carbonatos e hidróxidos que combinam com os iões H<sup>+</sup> presentes na água, fazendo com que o pH aumente. Sem essa capacidade tampão qualquer ácido produzido ou adicionado a essa solução iria provocar uma diminuição imediata no pH (Addy, Green et al. 2004).

### ***2.5.1.3 Tempo de retenção hidráulico (TRH)***

O TRH é um parâmetro fundamental para o dimensionamento de um sistema de tratamento anaeróbio, e exprime o tempo médio que um determinado volume de efluente permanece no digestor.

Lu e Ahring (2005) estudaram a influência do TRH e da temperatura no processo de digestão anaeróbia. Este estudo foi realizado com vários reactores CSTR cada um a uma temperatura (55°C, 60°C, 65°C, 70°C, 75°C e 80°C) e fazendo variar o TRH entre 0,5 e 3 dias para cada um. Para tempos de retenção hidráulicos pequenos, neste caso inferiores a 1 dia, a produção de metano é praticamente nula, o que indica que neste caso o TRH é um factor limitante para as bactérias metanogénicas. É portanto neste período que se revela a maior acumulação de AOV nos reatores (Lu and Ahring 2005).

#### **2.5.1.4 Agitação e mistura**

A agitação desempenha várias funções em simultâneo: auxilia a transferência de massa e de calor, e agita as suspensões. No que toca á biomassa, o tipo de agitação cria no meio tensões de corte elevadas, o que torna estes reactores inapropriados para a cultura de células ou agregados sensíveis a esse tipo de forças. Por último, os custos de construção e manutenção do equipamento são elevados, especialmente devido selagens mecânicas que o compõem e á potência de agitação de que necessitam (Fonseca and Teixeira 2007).

A agitação mecânica está associada ao processo de mistura que promove a homogeneidade do sistema, como foi referido acima. Num sistema bem misturado, homogéneo, não se encontram variações espaciais nas variáveis que o descrevem. A boa mistura torna-se importante sempre que as heterogeneidades de um sistema sejam nefastas para o processo. No caso dos reactores biológicos, gradientes de concentração de um nutriente importante, de pH ou de temperatura, podem impedir a manutenção de condições óptimas para todas as células presentes no reactor biológico e consequentemente diminuir a produtividade. A mistura é fundamental sobretudo nos processos aeróbios com meios muito viscosos para assegurar a transferência de oxigénio a zonas do reactor longe do agitador, de modo a não baixar para níveis que afectem as células.

## 2.5.2 Influência da geometria dos reatores no processo de acidogênese.

### 2.5.2.1 Moving Bead Biofilm Reactor (MBBR)

Os reatores MBBR tem vindo a ser usados nos últimos tempos para tratar vários tipos de águas residuais, promovendo um tratamento de alta eficiência para a remoção de CBO (85-99%) e CQO (24-82%) com um tempo de retenção hidráulico inferior a duas horas (Pozo, Villamar et al. 2012).

O processo dentro de um reactor MBBR baseia-se no princípio de que o crescimento de biomassa dá-se dentro de carriers que se movem dentro do reactor devido à agitação mecânica (Odegaard, Gisvold et al.). Os carriers proporcionam uma grande superfície larga onde se forma o biofilme (Hassan and Nelson 2012). São feitos de polietileno com uma densidade próxima de  $1 \text{ g/cm}^3$ , o que possibilita a sua fácil movimentação no reactor até ao ponto em que os carriers representam 70% do volume do reactor vazio (Ødegaard, Gisvold et al. 2000).

Esta tecnologia permite taxas de remoção de azoto e  $\text{CBO}_5$  semelhantes às aquelas conseguidas em processos aeróbios de lamas activadas, com a vantagem de requerer um menor volume de reator (Calderón, Martín-Pascual et al. 2012). Dentro do reactor, a difusão de substrato e nutrientes no biofilme é bastante limitada. Durante períodos de baixa ou altas concentrações de substrato a água poderá transportar solutos para o biofilme, mas este não permite o acesso às comunidades de bactérias, onde estas adoptam estratégias específicas de sobrevivência (Pozo, Villamar et al. 2012)

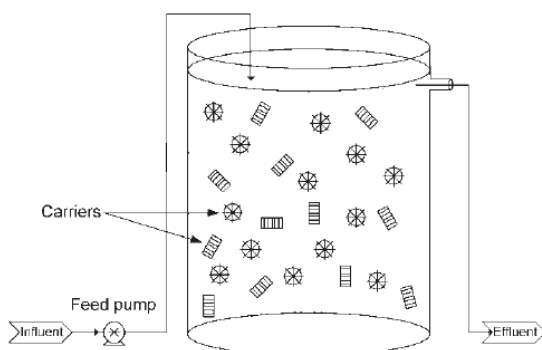


Figura 10: Ilustração de um reator MBBR (Pozo, Villamar et al. 2012)

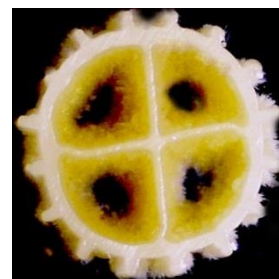


Figura 11: Carrier com biomassa

### 2.5.2.2 *Continuous Stirred Tank Reactor (CSTR)*

Em termos gerais um CSTR consiste num tanque equipado com um agitador. Pode ser operado sob condições de estado transiente ou estacionário, sendo alimentado de forma contínua bem como a saída dos produtos. Se a mistura reaccional é perfeitamente agitada, o estado estacionário é atingido mais facilmente uma vez que a concentração, temperatura e outros parâmetros são uniformes.

Os reactores CSTR tem sido usado no tratamento de efluentes de soro de queijo diluído, podendo obter-se taxas de conversão de CQO entre 94,6% e 96,4% sob condições termofílicas e 10 dias de tempo de retenção hidráulico. Contudo o efluente apresenta CQO residual quatro vezes superior que o limite legal.

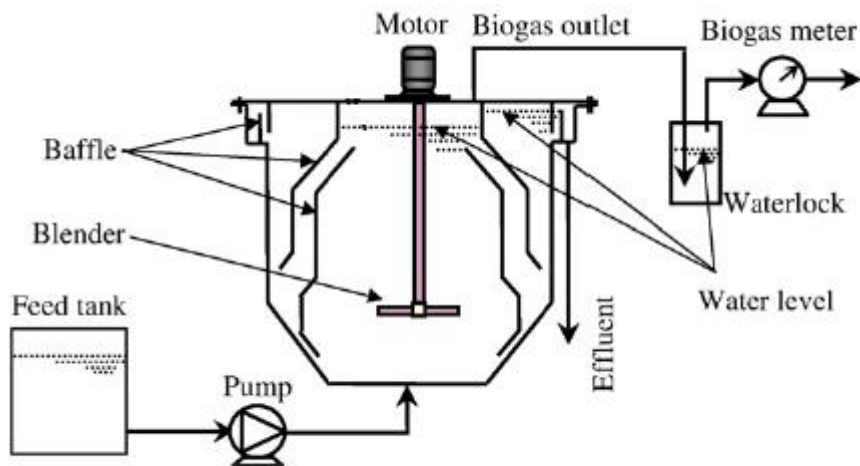


Figura 12: Esquema típico de um CSTR (Li, Zheng et al. 2009)

### 3 Materiais e Métodos

No desenvolvimento do trabalho foram utilizados dois tipos de reatores: MBBR e CSTR.

Numa fase inicial o trabalho foi realizado no reactor MBBR, onde se estudaram 4 condições diferentes variando os parâmetros de carga orgânica, e alcalinidade a que o reator era sujeito. Numa segunda fase foi montado um reactor CSTR com o intuito de aplicar as mesmas condições a que o reactor MBBR estava a operar no momento com o objectivo de comparar os resultados obtidos utilizando dois tipos diferentes de reatores biológicos.

Foram realizados cinco ensaios no total, cada um com uma determinadas condições operacionais, sendo que a temperatura foi e o TRH foram constantes em todas as condições, 35°C (mesofílica) e 12 horas, respectivamente. Esses ensaios e as respectivas condições de operação encontram-se descritos na tabela 7.

**Tabela 7: Condições experimentais dos ensaios efectuados**

Ensaio	Reactor	Carga orgânica (g CQO/L/d)	Alcalinidade (mg CaCO <sub>3</sub> /L)	Período de operação (dias)
1	MBBR	50	2000	141
2	MBBR	50	5000	43
3	MBBR	20	5000	15
4	MBBR	20	2000	17
5	CSTR	20	2000	59

O substrato utilizado foi soro de queijo em pó, proveniente de uma indústria de produção de queijos.

O soro em pó foi guardado em sacos e manteve-se aí armazenado, sempre bem fechado para evitar a sua degradação e assim diminuir o valor real de CQO, até ao

momento de ser utilizado para preparar a alimentação dos reactores. Antes de preparar a alimentação, foi necessário quantificar o CQO presente no soro de queijo para saber que quantidade devia ser utilizado na sua preparação.

### 3.1 Descrição geral do procedimento

A alimentação dos reactores é constituída por soro de queijo diluído em água, pesado consoante a carga orgânica pretendida, e também  $\text{NaHCO}_3$  (bicarbonato de sódio) e  $\text{KHCO}_3$  (bicarbonato de potássio). Estes dois últimos compostos adicionam alcalinidade à solução, devido á presença de bicarbonato ionizado, sendo desse modo que se pode impor a alcalinidade pretendida dentro do reactor. A alimentação é agitada durante cerca de uma hora antes de ser utilizada de modo a dissolver o soro de queijo, o bicarbonato de sódio e o de potássio. Neste processo ocorre já a hidrólise das moléculas de soro de queijo em pó, portanto, 1ª etapa da digestão anaeróbia. A alimentação chega ao reactor através de uma bomba peristáltica que debita o caudal pretendido, aplicando o número de rotações da bomba adequado para o efeito. No reactor MBBR, o soro de queijo vai ser acidificado pelas bactérias acidogénicas e acetanogénicas presentes na biomassa, produzindo então os AOV. A produção e acumulação dos AOV no reactor vai provocar a diminuição do pH, que será atenuada devido ao efeito tampão da alcalinidade presente na alimentação, caso contrário, a diminuição do pH para níveis muito baixos poderia ser um factor limitante para os microorganismos. O reactor está também envolvido por uma mangueira por onde passa água à temperatura de 35°C proveniente de um banho em recirculação onde está uma bomba termostática, permitindo que a operação decorra à temperatura termofílica pretendida. Na parte superior do MBBR sai a fracção de biogás através de uma mangueira ligada a um borbulhador. O biogás é contabilizado a jusante do borbulhador através de um contador de gás húmido. No início da mangueira está presente um sistema, onde se faz a extracção do biogás por uma seringa de volume conhecido. Essa quantidade de biogás é injetada no cromatógrafo gasoso para analisar a fracção de metano e dióxido de carbono aí presentes. O efluente acidificado sai na parte superior do MBBR e é recolhido num recipiente. Existem vários parâmetros a medir e monitorizar no efluente de saída. Em primeiro lugar, a medição frequente do volume de

saída que permite concluir se de facto a bomba está a debitar o caudal pretendido de alimentação. A medição do volume é realizada todos os dias. Além disso também é retirado 10 ml desse efluente para a medição de sólidos suspensos totais (SST) e voláteis (SSV), 5 ml para cada réplica. A quantificação de SST e SSV é feita de acordo com o procedimento do “Standard Methods”.

Os ácidos orgânicos voláteis (ácido acético, propiónico, iso-butírico, n-butírico, iso-valérico, n-valérico e ácido capróico) são quantificados por cromatografia, usando um cromatógrafo, GC.

Na figura 12 e 13 encontram-se representados os esquemas dos equipamentos experimentais, para o MBBR e o CSTR, respectivamente.

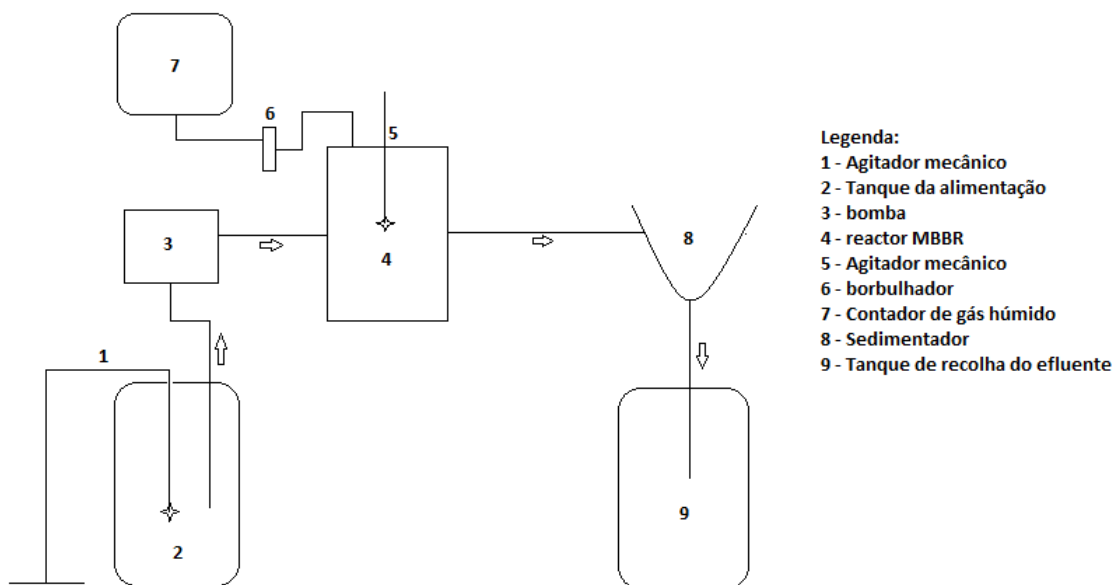


Figura 13: Ilustração do processo experimental e dos seus componentes integrantes



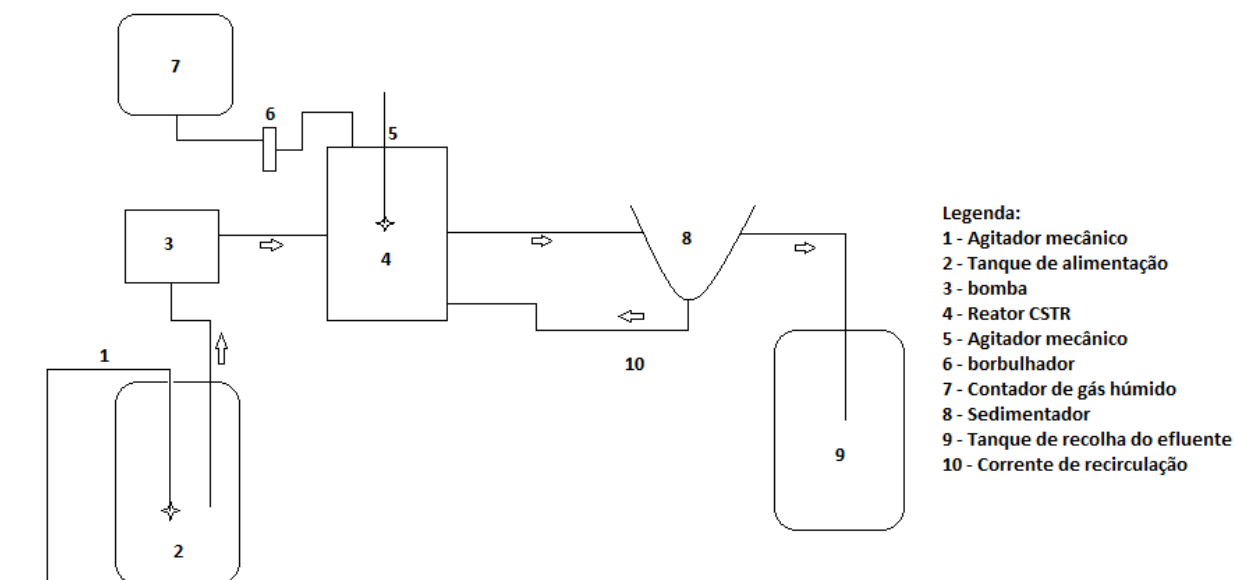


Figura 14: Ilustração do processo experimental do CSTR e dos seus componentes integrantes

O reator MBBR já estava em operação no início do trabalho experimental, não sendo por isso necessário tratar dos procedimentos habituais relacionadas com a introdução das lamas biológicas nem com os carriers. O volume deste reator é de 2,54 litros e o tempo de retenção hidráulico pretendido para todos os ensaios a realizar no MBBR é de 12 horas.

No caso do reator CSTR, que foi montado de origem, as lamas biológicas usadas como inóculo do reator foram recolhidas à saída do MBBR. O volume do CSTR é maior do que o MBBR, 3,97 L. Este reator tem a particularidade de ter recirculação de lamas, uma vez que ao contrário do MBBR em que as lamas conservam-se dentro do reator devido aos carriers, no CSTR como as lamas encontram-se dispersas na solução à medida que sai o efluente também há saída de uma grande quantidade de lamas que precisa de ser reposta, para não ocorrer “wash-out”.

### 3.2 Parâmetros a monitorizar

Para assegurar que as condições impostas ao reator (carga orgânica, alcalinidade e TRH) eram efectivamente as pretendidas estas variáveis foram controladas. Periodicamente foram também determinados outros parâmetros importantes na averiguação dos resultados finais obtidos: CQO total e solúvel à saída do reator para

saber a quantidade de matéria orgânica que foi degradada, pH à saída do reactor para poder concluir sobre o efeito provocado pela adição de determinada alcalinidade, os AOV que são os compostos que importam produzir neste trabalho, os sólidos suspensos totais (SST) e sólidos suspensos voláteis (SSV) de modo a observar a quantidade de biomassa envolvida no processo e a composição do biogás de modo a determinar se o processo estava a decorrer em condições de inibição metanogénica. A periodicidade da análise dos parâmetros encontram-se resumidos na tabela 8.

**Tabela 8: Parâmetros a analisar e períodos de amostragem no MBBR e CSTR**

Parâmetro a monitorizar	Periodicidade da amostragem	Ponto de amostragem
<b>CQO Total entrada</b>	3 vezes por semana	Na alimentação
<b>CQO Total saída</b>	3 vezes por semana	À saída do reactor
<b>CQO solúvel saída</b>	3 vezes por semana	À saída do reactor
<b>Caudal</b>	1 vez por dia	À saída do reactor
<b>Alcalinidade à entrada</b>	3 vezes por semana	Na alimentação
<b>Alcalinidade à saída</b>	3 vezes por semana	À saída do reactor
<b>AOV</b>	3 vezes por semana	À saída do reactor
<b>Biogás</b>	3 vezes por semana	Na linha de biogás
<b>SST e SSV</b>	3 vezes por semana	À saída do reactor

### 3.2.1 Carência química de oxigénio:

A carência química de oxigénio (CQO) é a quantidade de oxigénio necessária para oxidar os compostos orgânicos presentes.

Na quantificação do CQO (total da alimentação e na saída e solúvel no efluente de saída) foi utilizado o método do refluxo fechado com determinação espectrofotométrica (Eaton, Franson et al. 2005). Neste método analítico, a amostra é oxidada com uma

quantidade em excesso de dicromato de potássio (oxidante químico em excesso), em condições ácidas. Este método apresenta uma gama de medição entre 100 mg O<sub>2</sub> L<sup>-1</sup> e 900 mg O<sub>2</sub> L<sup>-1</sup>, pelo que amostras que apresentaram teores de CQO mais elevados precisaram de ser diluídas, antes de serem analisadas.

Quando se pretendeu determinar a carência química de oxigénio total (CQO total) procedeu-se à retirada de uma amostra devidamente agitada e homogeneizada. Relativamente a fracção filtrada (CQO solúvel), procedeu-se de igual forma, mas efectuou-se previamente a sua filtração com papel de filtro (marca Reeve Angel; grade 403, Ø=0,45µm). Na análise foram utilizadas três réplicas para cada amostra.

Após o arrefecimento das amostras digeridas, até à temperatura ambiente, foram medidas as suas absorvâncias, a um comprimento de onda de  $\lambda = 600$  nm utilizando um espectrofotómetro (marca Aqualytic, modelo PC023212), que converte as absorvâncias das amostras em concentração (mgO<sub>2</sub>/L).

### **3.2.2 Sólidos suspensos totais (SST) e Sólidos suspensos voláteis SSV)**

A quantificação de Sólidos Suspensos Totais (SST) e Voláteis (SSV) foi realizada segundo o procedimento descrito no livro “Standard Methods for Examination of Wastewater” (Eaton, Franson et al. 2005). O método contempla a filtração de um volume conhecido de amostra com papel de filtro (marca Reeve Angel; grade 403) e posterior secagem na estufa a 105°C durante 24 horas para assim determinação dos sólidos suspensos totais. Seguidamente, o mesmo filtro contendo a amostra seca é calcinado na mufla a 550°C para determinação dos sólidos suspensos voláteis, figura. Os sólidos suspensos voláteis correspondem maioritariamente à biomassa (matéria orgânica) em suspensão contida na amostra, enquanto os sólidos suspensos totais representam a matéria orgânica e inorgânica em suspensão na amostra.

### **3.2.3 pH e alcalinidade**

A alcalinidade foi determinada pelo método 2320 da 21ª edição do “Standard Methods for Examination of Wastewater” (Eaton, Franson et al. 2005), usando o aparelho portátil Consort C-515 para medir a quantidade de uma solução de ácido forte

(HCl) de concentração conhecida necessária para titular 50 ml de amostra até se atingir o valor de pH=4,5. O teor de alcalinidade medido como carbonato de cálcio na amostra, em mg/L, é dado por:

$$\text{Alcalinidade} \left( \frac{\text{mg CaCO}_3}{\text{L}} \right) = \frac{V_{\text{HCl}}(\text{ml}) * N_{\text{HCl}} \left( \frac{\text{mol}}{\text{L}} \right) * 50000 \left( \frac{\text{mg}}{\text{mol}} \right)}{V_{\text{amostra}} * 10^{-3}}$$

### 3.2.4 Biogás

Como foi referido anteriormente o biogás é uma mistura de gases, composto essencialmente por dióxido de carbono e metano, mas também outros gases em menor quantidade, como por exemplo o hidrogénio. Estes compostos são formados pelo consórcio de bactérias presentes no meio, como as bactérias fermentativas, responsáveis pela formação de CO<sub>2</sub> e H<sub>2</sub>, e as bactérias metanogénicas que formam metano.

A medição da fracção de CH<sub>4</sub> e CO<sub>2</sub> é feita através de cromatografia gasosa, utilizando para o efeito um cromatógrafo gasoso (marca SRI, modelo 8610C). O procedimento consiste em retirar uma amostra de 2,5 ml, com uma seringa, do septo existente na tubagem que liga o reactor ao contador de gás húmido. De seguida essa amostra é introduzida no cromatógrafo gasoso que fornece um cromatograma onde é possível identificar picos, cujas áreas correspondem a determinada quantidade de certos compostos, CO<sub>2</sub> e CH<sub>4</sub>.

Os resultados traduziam-se em cromatogramas que fornecem as áreas dos picos correspondentes aos componentes gasosos referidos. Através de uma curva de calibração, o próprio aparelho converte os valores das áreas em volume (ml). Assim, uma vez que o volume de biogás injectado correspondia a cerca de 2,5 ml, através da relação destes dois valores volumétricos obtém-se o percentual (volumétrico) de cada tipo de gás da amostra.

A amostragem de biogás era realizada com recurso a uma seringa de volume útil de 5 mL.

### 3.2.5 AOV

Os ácidos acético, propiônico, i-butírico, n-butírico, i-valérico, n-valérico e capróico foram medidos por cromatografia gasosa num cromatógrafo Clarus 480 da marca Perkin Elmer equipado com uma coluna Chrompack CPSIL-5CB de 25m x 0,25mm. As determinações foram realizadas com a injeção de 0,5 µL de amostra filtrada contendo 10% de ácido fórmico. Como gás carrier foi usado Hélio. A programação da temperatura foi a seguinte: 1 min a 70°C, seguida de uma rampa de 20°C/min até aos 100°C, mantendo-se a esta temperatura durante 2 minutos. Novamente uma rampa de 10°C/min até 140°C e mantida durante 3 minutos.

### 3.3 Cálculos

O cálculo da carga orgânica Carga orgânica imposta ao sistema, baseia-se no CQO total de entrada e no TRH:

$$ORl \left( \frac{g}{L.d.} \right) = \frac{CQO_{In} \left( \frac{mg}{L} \right)_{In}}{TRH(d)} * \frac{1}{1000}$$

O grau de acidificação foi calculado baseado na seguinte expressão:

$$Grau \text{ acidificação}(\%) = \frac{Total \ AOVs \left( \frac{mg \ CQO}{L} \right)}{CQO_{In} \left( \frac{mg \ CQO}{L} \right)} * 100$$

Para o cálculo da concentração de AOV usaram-se os valores das áreas obtidas no cromatograma dos AOV e através do declive das rectas de calibração para cada ácido é possível obter a concentração de AOV em mg/L. Os valores do declives das rectas de calibração para cada ácido encontram-se na tabela 9.

Tabela 9: Valores do declive da recta de calibração para os diferentes ácidos

<b>Ácido Acético</b>	<b>335,38</b>
<b>Ácido propiônico</b>	731,64
<b>Ácido i-butírico</b>	895,82
<b>Ácido n-butírico</b>	951,60
<b>Ácido i-valérico</b>	1092,20
<b>Ácido n-valérico</b>	1013,40
<b>Ácido n-caproico</b>	1139,90

De seguida para obter a concentração em mg CQO/L é necessário multiplicar os valores da concentração obtidos por um factor de conversão. Esses valores encontram-se na tabela 10.

Tabela 10: Fator de conversão de massa de ácido em massa de CQO

<b>Ácido Acético</b>	<b>1,066 (mg CQO/mg ácido acético)</b>
<b>Ácido propiónico</b>	1,512 (mg CQO/mg ácido propiónico)
<b>Ácido i-butírico</b>	1,816 (mg CQO/mg ácido i-butírico)
<b>Ácido n-butírico</b>	1,816 (mg CQO/mg ácido n-butírico)
<b>Ácido i-valérico</b>	2,037 (mg CQO/mg ácido i-valérico)
<b>Ácido n-valérico</b>	2,037 (mg CQO/mg ácido n-valérico)
<b>Ácido n-caproico</b>	2,204 (mg CQO/mg ácido n-capróico)

Por fim, a concentração total de AOV em mgCQO/L é dada pela seguinte expressão:

$$\text{Concentração AOVs} \left( \frac{\text{mgCQO}}{\text{L}} \right) = \text{Concentração AOVs} \left( \frac{\text{mg}}{\text{L}} \right) * \text{fator de conversão}$$



## 4 Resultados

---

### 4.1 MBBR

Foram estudadas quatro condições em reator MBBR para identificar a melhor condição na produção de AOV a partir de soro de queijo, e identificar as melhores condições para a produção de determinados tipos de AOV com vista á produção de PHA. As condições impostas aos reatores, bem como o respectivo período de operação encontram-se resumidas na tabela 7, da secção “materiais e métodos”. Foram testadas duas cargas orgânicas aplicadas (20 e 50 gCQO/L/d.), cada uma com dois valores de alcalinidade na alimentação (2000 e 5000 mg CaCO<sub>3</sub>/L).

#### 4.1.1 Carga orgânica de 50 gCQO/L/d.

##### *i)* Comportamento do reator

As figura 15 e 16 mostram o comportamento do reator para a carga de 50 gCQO/L/d. e alcalinidades 2000 e 5000 mg CaCO<sub>3</sub>/L, respectivamente. São apresentados os valores de CQO total de entrada, bem como o CQO total de saída, o solúvel de saída e a quantidade total de AOV produzidos. O reator de carga 50 e alcalinidade 2000 mg CaCO<sub>3</sub>/L funcionou durante 141 dias e na alcalinidade de 5000 mg CaCO<sub>3</sub>/L funcionou durante 43 dias.



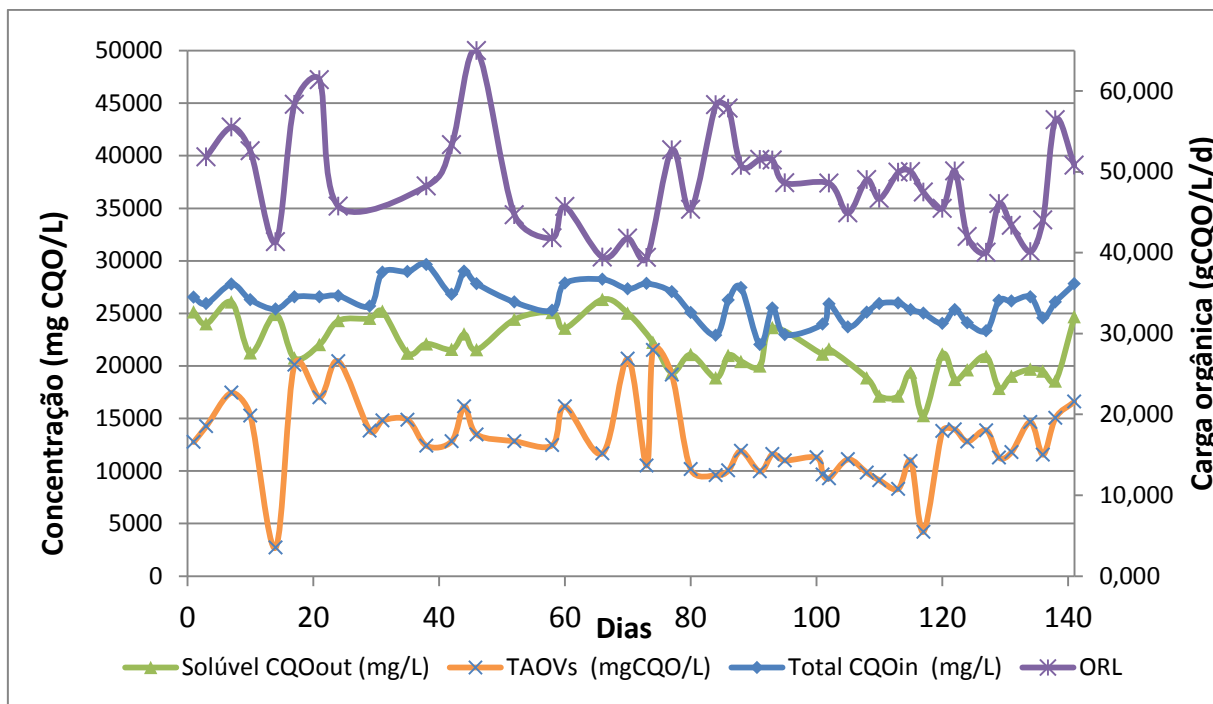


Figura 15: Evolução do processo de digestão anaeróbia para a condição 50\_Alk 2000

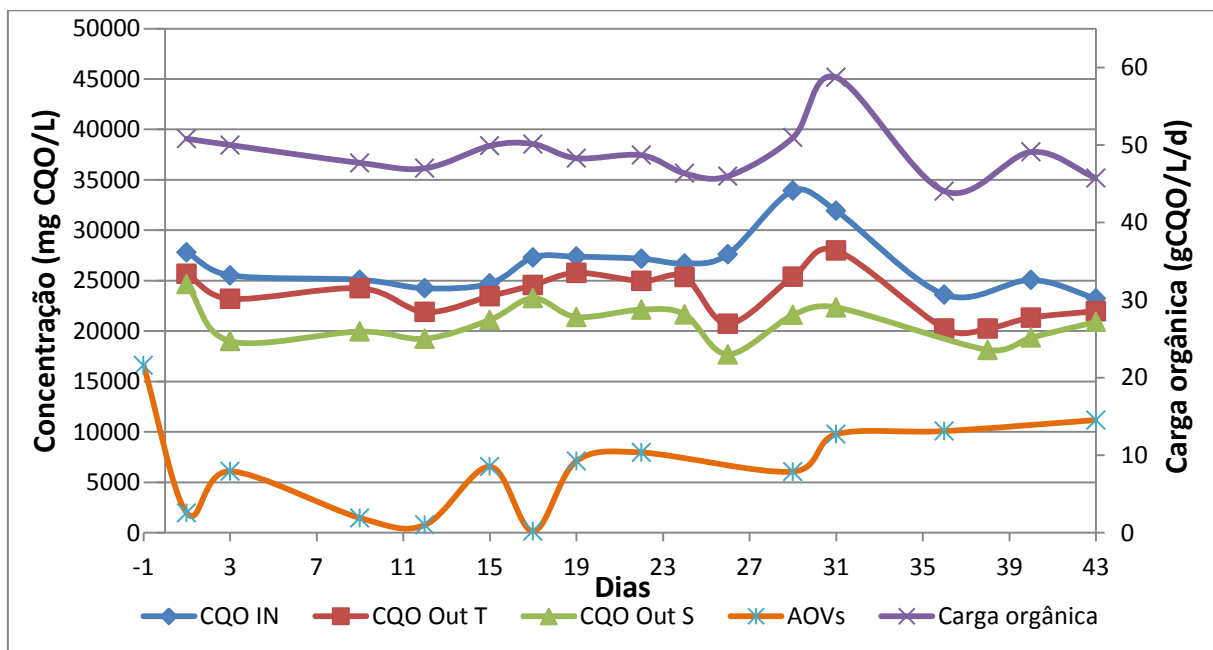


Figura 16: Evolução do processo de digestão anaeróbia para a condição 50\_Alk 5000

No ensaio 1, 50 g CQO/L/d e alcalinidade de 2000 mg CaCO<sub>3</sub>/L, com um caudal de alimentação de 4,7 L/d. ± 0,8 e CQO total de entrada de 26704 mgCQO/L ± 1688 obteve-se uma carga orgânica de 48,7 gCQO/L/d. ± 6,1 ao longo dos 141 dias de operação. A

quantidade total de AOV á saída do reator nesse período foi de 12994 mgCQO/L  $\pm$  3761. Durante o tempo de operação houve uma redução de CQO de 17,7%.

Depois de um período de cerca de 86 dias de instabilidade do reator devido às bruscas variações da carga orgânica de entrada no reator, onde por isso também se verificou uma inconstância dos ácidos formados, a partir do dia 88 ocorre a estabilização da carga orgânica de entrada, mantendo-se muito próxima dos 50 g CQO/L/d como pretendido. Neste momento o reator encontra-se mais perto do estado estacionário e a produção de ácidos também atinge um patamar constante. Esse período mais estável ocorre entre os dias 88 e 115.

Com a mudança de alcalinidade o reator teve os primeiros 15 dias com alguma instabilidade verificando-se os valores de AOV mais baixos (Figura 16). Apesar de o pH ter aumentado (com o aumento da alcalinidade), este destabilizou o consórcio microbiano. É possível logo no primeiro dia verificar que houve uma queda abrupta na quantidade de ácidos produzidos, passando dos 16596 mgCQO/L da condição anterior para 1959 mgCQO/L no primeiro dia de medição na condição de 50 gCQO/L/d. e 5000 mgCaCO<sub>3</sub>/L. Nos dias 29 e 31 observa-se uma subida no CQO total de entrada e conseqüentemente também uma subida na carga orgânica para os mesmos dias. Isto deveu-se ao facto de se ter utilizado um novo soro de queijo em que com maior quantidade de CQO/g soro de queijo. Durante os 43 dias de operação o caudal foi de 4,7 L/d.  $\pm$  0,3 e o CQO total de entrada foi de 26757 mgCQO/L  $\pm$  2839, obtendo-se uma carga orgânica de 48,9 gCQO/L/d.  $\pm$  3,3. Nestas condições verificou-se uma redução de CQO de 22,1% em média, ao longo do período experimental. Por outro lado, a produção média de biogás foi de 11,5 L/dia  $\pm$  4,1. É possível observar que a partir do dia 19 há uma estabilização na produção de AOV, considerando desse modo o início do estado estacionário.

Adicionar tabela

## **ii) Análise do estado estacionário**

Na figura 17 apresenta-se o perfil de ácidos para a fase estacionária, ou seja, entre os dias 88 e 115 de operação, da condição de 2000 mg CaCO<sub>3</sub>/L de alcalinidade. Durante a fase estacionária, a produção de AOV foi de 10336 mg CQO/L  $\pm$  1078 e o grau de

acidificação para o período correspondente foi de  $41,3\% \pm 5,2$ . A produção média de biogás nesse período foi de  $9,1 \text{ L/d} \pm 4$  e a redução de CQO foi de  $20,4\%$  (Tabela 11).

Tabela 11: Resumo da média de AOV, média de biogás, redução de CQO e Grau de acidificação para o reator MBBR para a fase estacionária.

MBBR	Condições	Média de AOV (mgCQO/L)	Biogás (L/dia)	Redução de CQO	Grau acidificação
	20 g CQO/L/d e 2000 mg CaCO <sub>3</sub> /L	$4330 \pm 618$	$1,7 \pm 1,3$	30,3%	$41,6 \pm 5,9$
50 g CQO/L/d e 2000 mg CaCO <sub>3</sub> /L	$10336 \pm 1078$	$9,1 \pm 4$	20,8%	$41,3\% \pm 5,2$	
20 g CQO/L/d e 5000 mg CaCO <sub>3</sub> /L	$5184 \pm 641$	$1,6 \pm 0,5$	29,7%	$50,8\% \pm 3,9$	
50 g CQO/L/d e 5000 mg CaCO <sub>3</sub> /L	$8694 \pm 1960$	$11,5 \pm 4,1$	22,1%	$30,1\% \pm 8,6$	

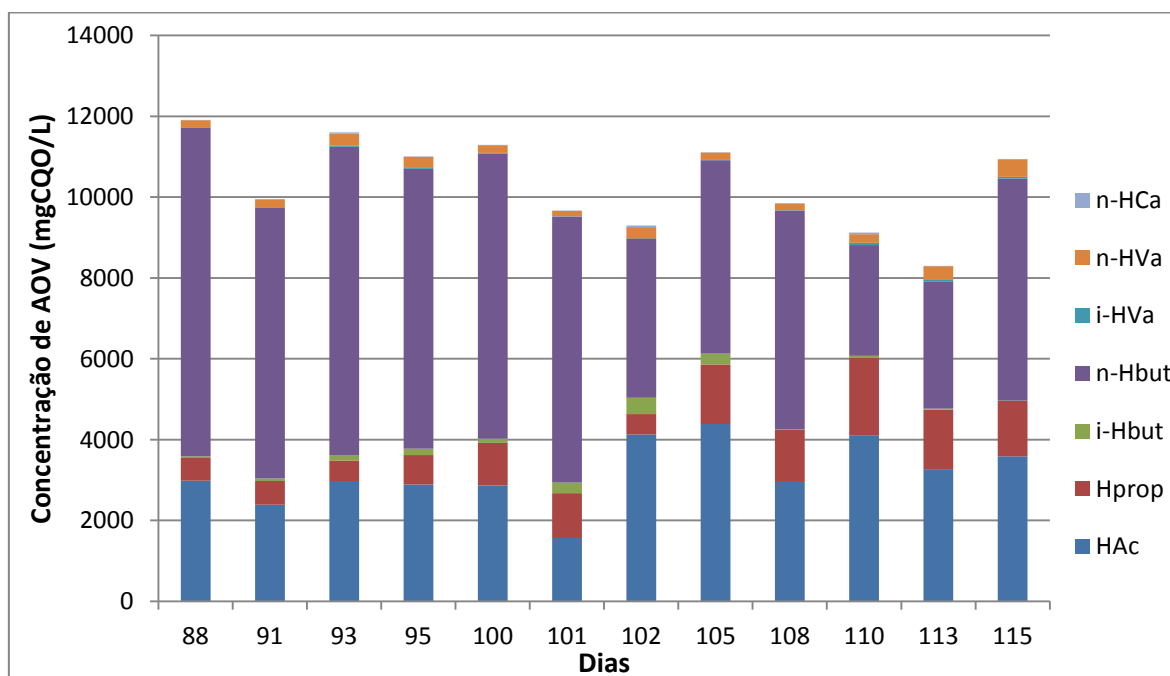


Figura 17: Evolução do perfil de AOV para a condição 50\_Alq 2000 em fase estacionária

O perfil de AOV da condição de 2000 mg CaCO<sub>3</sub>/L mostra que os três ácidos mais produzidos são o n-butírico, o ácido acético e o ácido propiónico, por ordem decrescente respectivamente. É de salientar que nesta condição o ácido n-HBut apresenta valores bastante relevantes no início do estado estacionário começando a decrescer ao longo do tempo, observando-se por sua vez um aumento gradual da produção de HAc e Hprop. Nos dias 102, 105 e 110 a produção de HAc é maior do que o n-Hbut. As percentagens médias relativas á produção de cada tipo de ácido, ao longo da fase estacionária, encontra-se na tabela 12.

**Tabela 12: Percentagem média do tipo de AOV obtido durante a fase estacionária em todas as condições aplicadas ao MBBR.**

AOVs (%)	Carga orgânica - 50 g CQO/L		Carga orgânica - 20 g CQO/L	
	2000 mg CaCO <sub>3</sub> /L	5000 mg CaCO <sub>3</sub> /L	2000 mg CaCO <sub>3</sub> /L	5000 mg CaCO <sub>3</sub> /L
Hac	31,1% ± 9,1	4,9% ± 2	20,1% ± 4,1	19% ± 14,3
Hpro	10,5% ± 5,4	6,3% ± 1,3	9% ± 4	18% ± 10,4
i-Hbut	4,4% ± 1,3	0,6% ± 0,5	0,55% ± 0,3	1% ± 0,4
n-Hbut	51,3% ± 13,4	82,3% ± 2,6	63,43% ± 4,1	51% ± 21,9
i-HVa	0,2% ± 0,2	0,2% ± 0,2	0,46% ± 0,3	1% ± 0,5
n-HVa	2,4% ± 0,9	2,8% ± 1,8	6,34% ± 3,0	9% ± 3,6
H-Cap	0,1% ± 0,1	2,9% ± 2,5	0,1% ± 0,1	1% ± 0,9

A figura 18 apresenta o perfil de ácidos quando se aumentou a alcalinidade para 5000 mg CaCO<sub>3</sub>/L, na fase estacionária, ou seja, entre os dias 19 e 43. Nesse período a média de ácidos produzida foi de 8694 mg CQO/L ± 1960 e o grau de acidificação para esses dias foi de 30,1% ± 8,6.

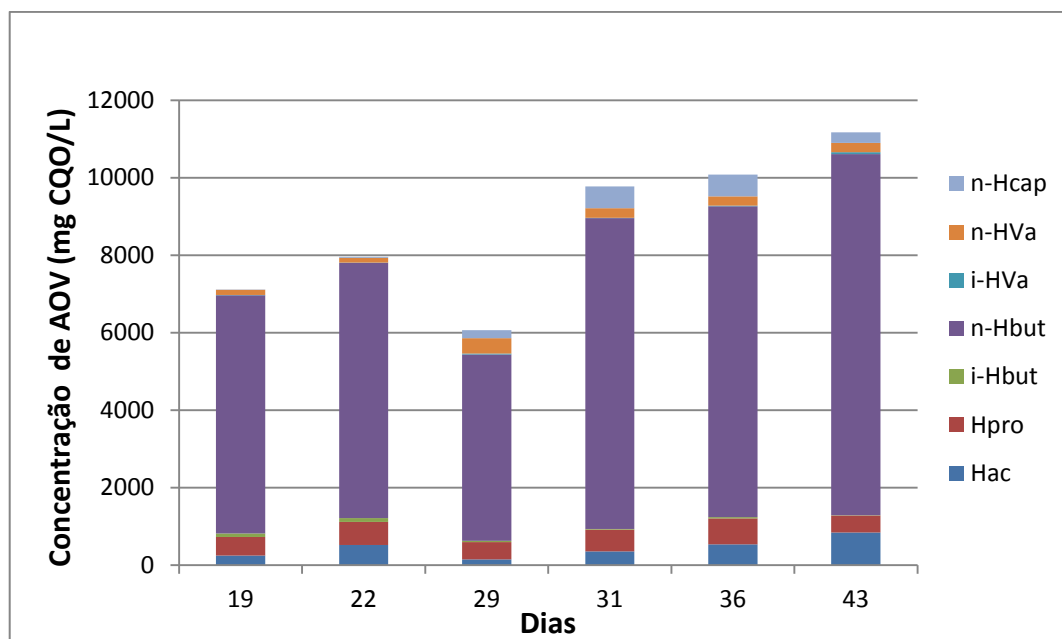


Figura 18: Evolução do perfil de AOV para a condição 50\_Alk 5000

Através da análise da figura 18 podemos concluir que em todos os dias em que foram medidos AOV, o ácido mais produzido é o n-HBut, com grande expressão relativamente aos dois ácidos seguintes mais produzidos, o ácido acético e o propiónico. Nesta condição a produção de HAC é bastante inferior à quantidade produzida para a mesma carga e 2000 mg CaCO<sub>3</sub>/L. É possível também verificar que a partir do 29º dia começa a ocorrer a produção de ácido n-HCap embora que em pequenas quantidades. Mesmo assim a sua produção supera a produção do ácido i-butírico, que nos primeiros dias revelou-se maior que o n-capróico. As percentagens de cada tipo de ácido em relação ao total produzido nesta condição encontra-se, mais uma vez, na tabela 12.

No seguinte gráfico é possível comparar o valor de AOV produzidos para diferentes alcalinidades (2000 mg CaCO<sub>3</sub>/L e 5000 mg CaCO<sub>3</sub>/L) com uma carga orgânica de 50 g CQO/L/d.

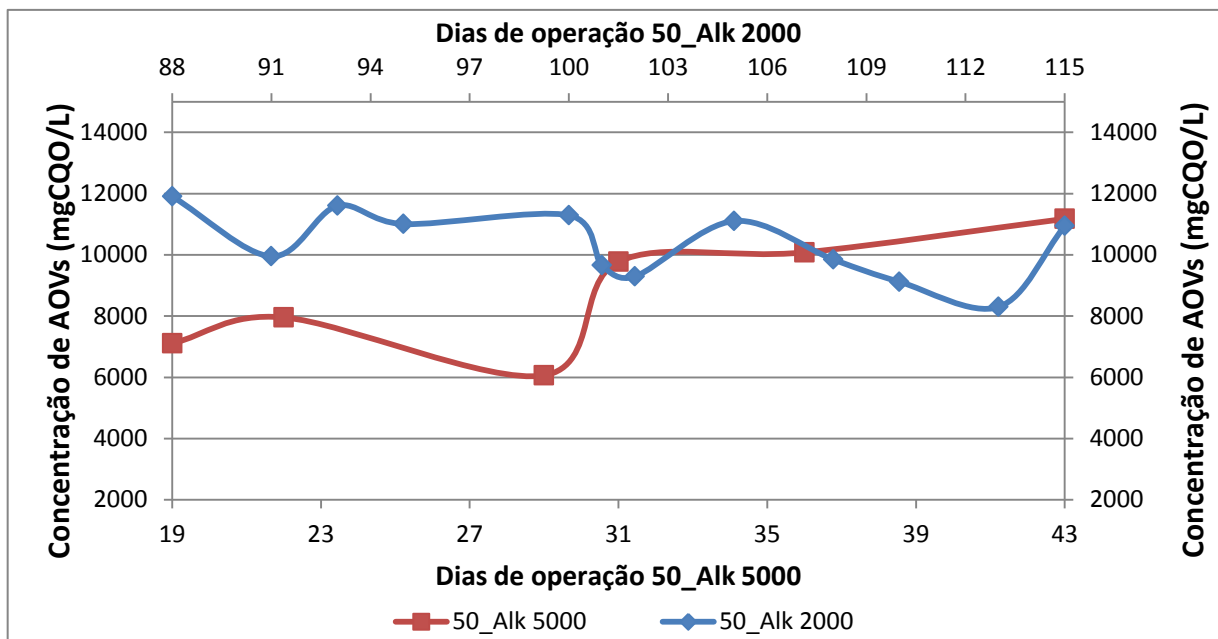


Figura 19: Evolução dos AOVs para as condições de 50\_Alk 2000 e 50\_Alk 5000

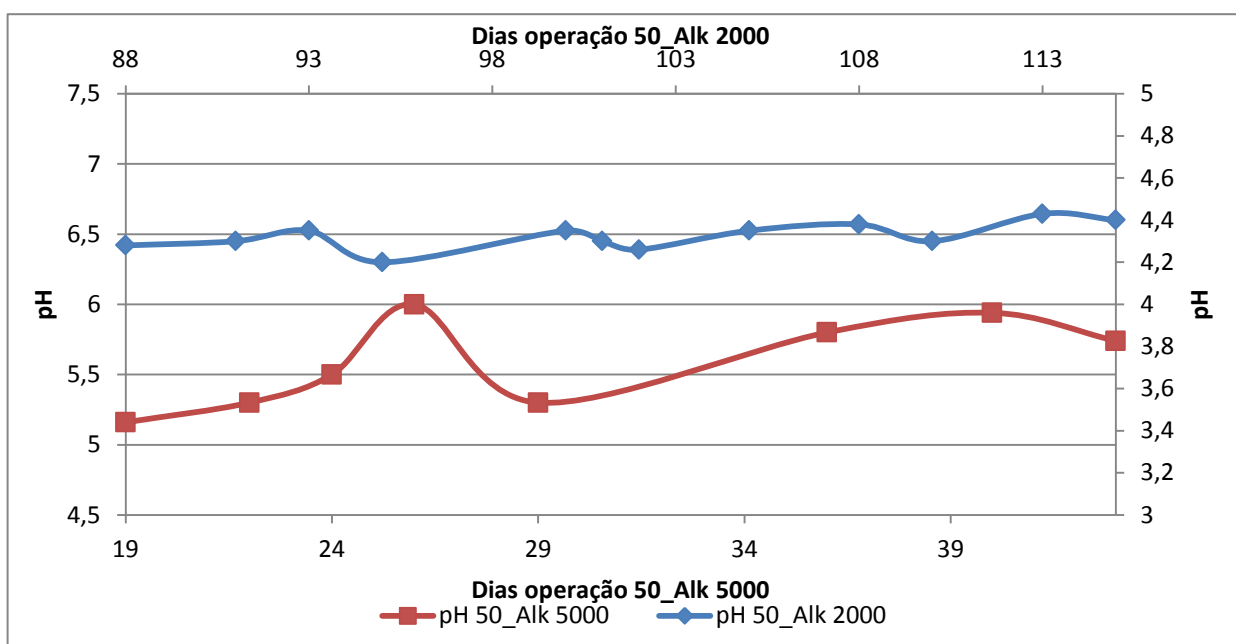


Figura 20: Evolução do pH nas condições de 50\_Alk 2000 e 50\_Alk 5000

A alcalinidade de 2000 mg CaCO<sub>3</sub>/L.d. fez com que o pH no respectivo reator fosse de 4,3 ± 0,1 e para uma alcalinidade de 5000 mg CaCO<sub>3</sub>/L.d fez com que o pH no reator fosse de 5,3 ± 0,4, no estado estacionário.

Na figura 19 é possível verificar uma diferença entre a quantidade de ácidos produzidos entre ambas as condições, mostrando que para uma carga orgânica de 50 g CQO/L/d existe maior quantidade de AOV produzidos no reator com alcalinidade 2000 mgCaCO<sub>3</sub>/L (10336 mgCQO/L ± 1078) do que em relação ao reator com alcalinidade de 5000 mg CaCO<sub>3</sub>/L (8694 mg CQO/L ± 1960). Através da análise da figura 19 e 20 é possível verificar também que a produção de ácidos é maior para um pH de 4,3 ± 0,1 do que quando existe um aumento de pH para 5,3 ± 0,4 devido ao aumento da alcalinidade para 5000 mg CaCO<sub>3</sub>/L. Além disso, obteve-se um grau de acidificação de 42,7%, para a alcalinidade de 2000 mg CaCO<sub>3</sub>/L, e apenas conseguiu-se obter um grau de acidificação de 30,1% quando se aumentou a alcalinidade para 5000 mg CaCO<sub>3</sub>/L. O que significa que quando se aumentou a alcalinidade a mesma quantidade de substrato produziu uma menor quantidade de ácidos.

#### **4.1.2 Carga orgânica de 20 gCQO/L/d**

##### ***i)* Comportamento do reator**

As figuras 21 e 22 apresentam os valores de CQO de entrada no reator, bem com o CQO total de saída, o solúvel de saída e o número de AOV produzidos nos dias monitorizados para as condições de 20 gCQO/L/d e alcalinidade 5000 mg CaCO<sub>3</sub>/L e 20 gCQO/L/d e 2000 mg CaCO<sub>3</sub>/L, respectivamente. O tempo de operação do reator com a condição de 20 gCQO/L/d e alcalinidade 5000 mg CaCO<sub>3</sub>/L foi de 15 dias e para o reator de 20 gCQO/L/d e 2000 mg CaCO<sub>3</sub>/L foi de 17 dias.

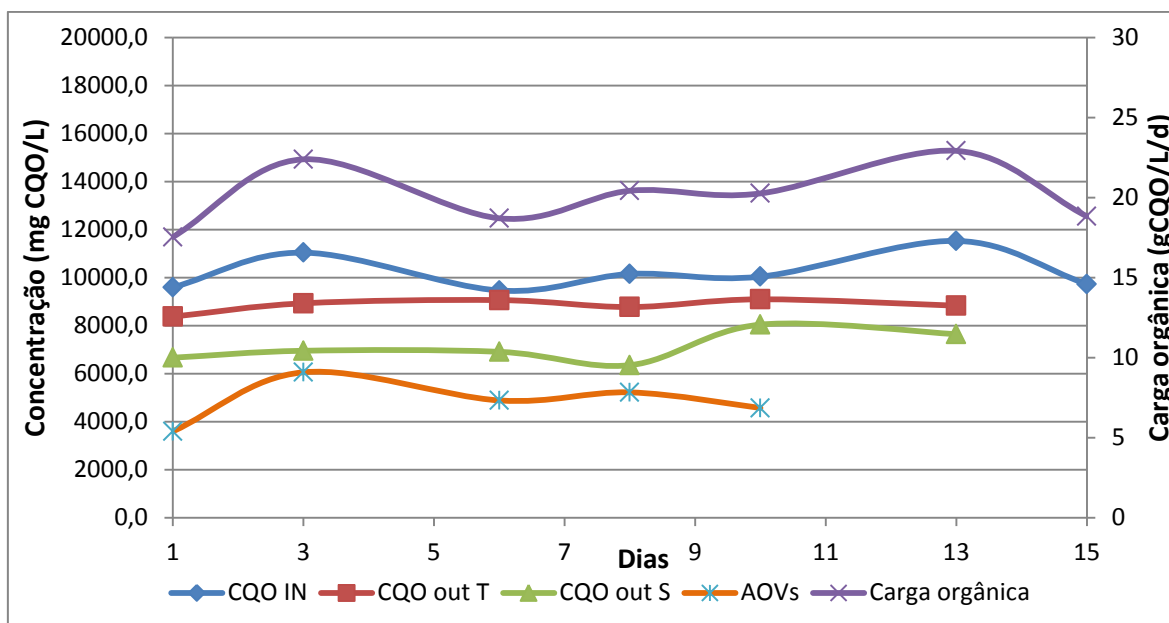


Figura 21: Evolução do processo de digestão anaeróbia para a condição 20\_Alk 5000

No primeiro dia de medição da condição de 5000 mgCaCO<sub>3</sub>/L de alcalinidade, a quantidade de ácidos produzidos é menor que nos restantes dias uma vez que as condições do MBBR foram alteradas para as presentes condições e essa mudança fez com que os microorganismos tivessem de se adaptar às novas condições. Além disso esse valor reduzido também poderá ter sido devido ao baixo valor de carga orgânica no reator para esse dia. A carga orgânica ao longo dos 15 dias de operação foi de 20 gCQO/L/d  $\pm$  2. O terceiro dia mostra que a quantidade de AOV subiu e nos restantes dias a quantidade de ácidos parece estabilizar próximo dos 5000 mgCQO/L, como se verifica na figura 21. O valor médio de AOV produzidos ao longo deste período é de 4867 mgCQO/L  $\pm$  810 e obteve-se um grau de acidificação médio de 48,2%  $\pm$  6,9.

A redução de CQO foi de 30,6% em relação ao CQO do substrato, e a quantidade de biogás produzido foi de 1,6 L/dia  $\pm$  0,5 (tabela 11).

O estado estacionário é considerado desde o terceiro dia de operação até ao dia 15.



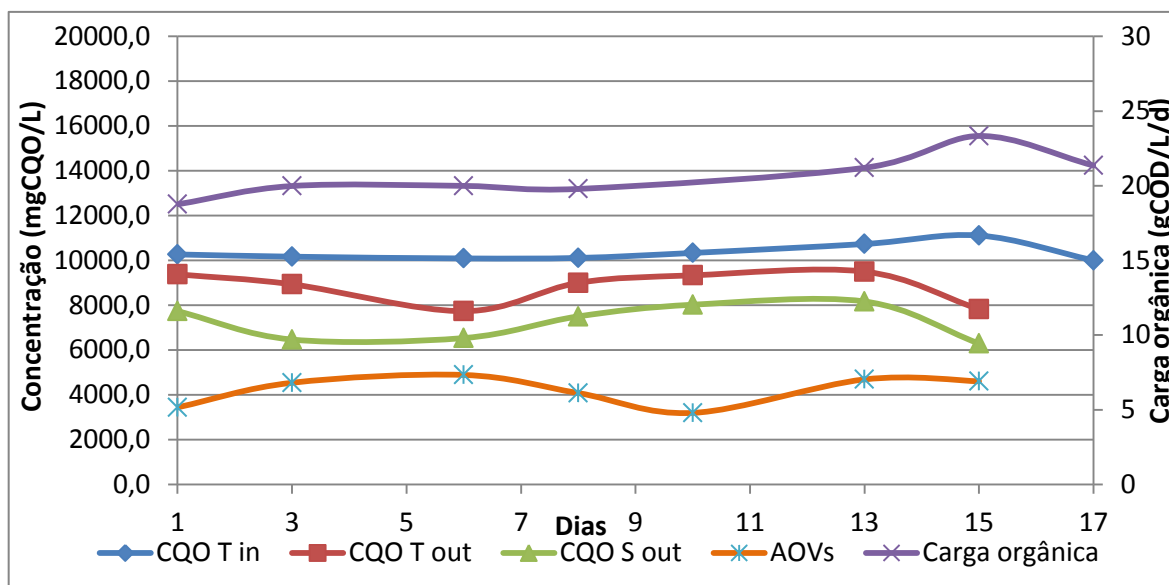


Figura 22: Evolução do processo de digestão anaeróbia para 20\_Alk 2000

Na condição seguinte (figura 22), onde se diminui a alcalinidade para 2000 mgCaCO<sub>3</sub>/L, após 17 dias de fermentação acidogénica verificou-se uma formação de AOV com uma média de produção de 4203 mg CQO/L  $\pm$  608 e o grau de acidificação nesse período de tempo foi de 40,4%  $\pm$  6,2.

O primeiro dia de medição de ácidos revela um valor inferior aos ácidos obtidos nos restantes dias, à excepção do 10º dia em que ocorre a produção mínima de AOV, 3192 mg CQO/L. No segundo e terceiro dia de medição de AOV constata-se uma subida na produção, situando-se próxima dos 5000 mg CQO/L. Os seguintes valores mostram novamente que a produção de AOV foi próximo dos 5000 mg CQO/L. No primeiro dia, a baixa produção de AOV, relativamente à maioria dos restantes dias pode dever-se ao facto do reator ter iniciado as condições em causa e os microorganismos necessitarem de um período de adaptação a essas novas condições. No oitavo dia ocorre uma diminuição na produção de AOV até atingir o mínimo no 10º dia, podendo dever-se ao facto de no 8º dia ter havido um aumento acentuado de SST à saída do reator (2108 mg/L), valor este superior à média de SST obtido nestes 17 dias (1252 mg/L  $\pm$  486), o que significa que houve menos biomassa nos carriers por algum momento e que pode ter-se traduzido numa menor produção de AOV.

A remoção total de CQO é de 30,3%. Foram assim consumidos 3152 mg CQO/L para manutenção celular dos microrganismos e para biogás. A média de produção de biogás foi de 1,5 L/dia  $\pm$  1,1, como se apresenta na tabela 11.

Normalmente os valores de redução do CQO no tratamento anaeróbio situam-se no intervalo de 85-98%. Como neste caso específico o objetivo é a produção de AOV, foram utilizadas condições como uma elevada quantidade de substrato que leva a uma inibição da população das bactérias metanogénicas. A produção de biogás descrita em cima foi consequência dos carriers utilizados no MBBR que funcionam como microambientes para o consórcio microbiano. Como se pode constatar pela figura 11 as *archaea* são protegidas pelas restantes populações da cultura anaeróbia, desta forma alguns dos ácidos são convertidos em CO<sub>2</sub> e CH<sub>4</sub> e medidos no medidor de gás. Este facto não deixa de ser interessante, pois não só se formam os produtos intermediários da digestão anaeróbia, como também se consegue obter interessantes quantidades de biogás, apesar das condições levarem à sua inibição.

### **ii) Análise do estado estacionário**

Na condição de 20 gCQO/L e alcalinidade 5000 mg CaCO<sub>3</sub>/L, para a fase estacionária, foi produzido um total de 5184  $\pm$  641 mgCQO/L de AOV e obteve-se um grau de acidificação de 50,8%  $\pm$  3,9. A redução de CQO foi semelhante ao mesmo valor para o período total de operação, 30,5%, assim como a quantidade de biogás formado (Tabela 11).

Nas figura 23 e 24 encontram-se os perfis de ácidos com uma carga orgânica de 20 gCQO/L/d. e alcalinidades 5000 mgCaCO<sub>3</sub>/L e 2000 mgCaCO<sub>3</sub>/L, respectivamente, na fase estacionária.

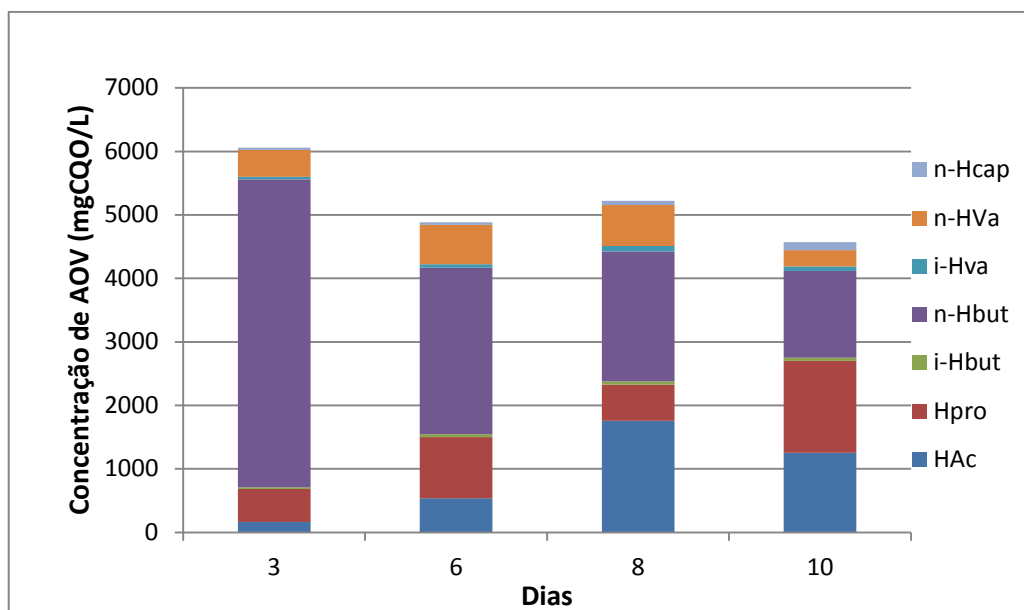


Figura 23: Perfil de AOV para 20\_Alk 5000

Na figura 23, numa fase inicial o ácido mais produzido é o n-Hbut, sendo que a sua produção tende a diminuir ao longo do tempo, aumentando por sua vez a produção de HAC e Hpro. Esta situação pode dever-se ao facto de nos primeiros dias os microorganismos ainda estarem adaptados às condições de alcalinidade anteriores (2000 mg CaCO<sub>3</sub>/L) e por isso o perfil de AOV para esses primeiros dias se assemelharem ao perfil dos AOV no gráfico dessas condições. Deste modo, o aumento da alcalinidade, o que corresponde também a um aumento do pH, favorece então a formação de HAC e Hpro.

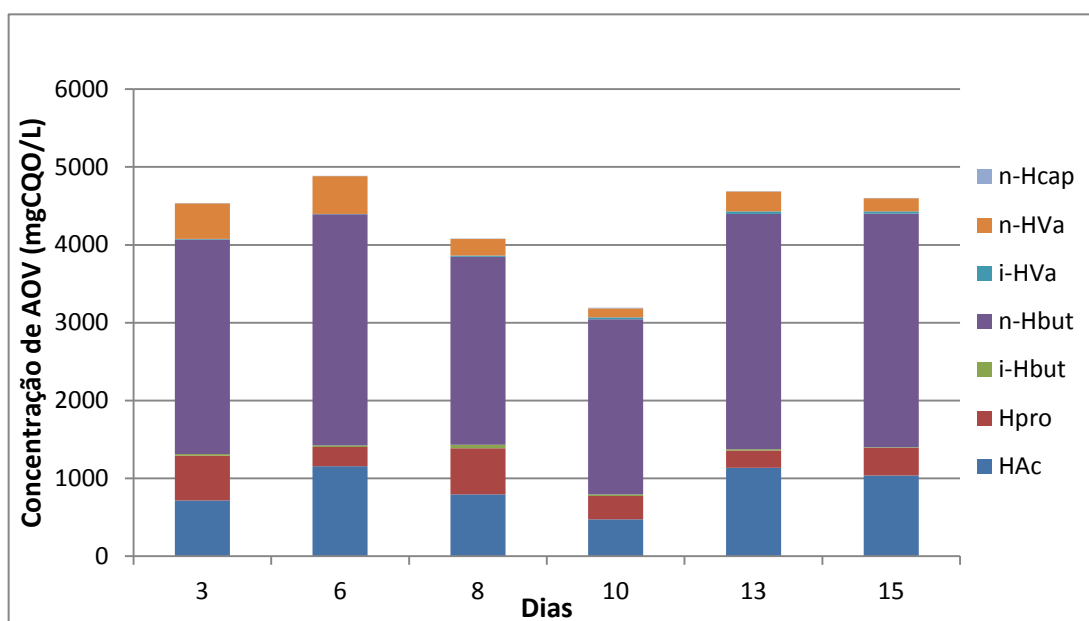


Figura 24: Perfil de ácidos para 20\_Alk 2000

Relativamente á condição do ensaio 4, 20 gCQO/L/d. e 2000 mgCaCO<sub>3</sub>/L (figura 24), o ácido orgânico volátil mais produzido foi o n-HBut, seguido do HAc e do HPr. Uma vez comparado em percentagem verifica-se uma relação HAc:HPr:n-HBut:n-HVal de 21:11:61:6 (tabela 11), os restantes ácidos encontram-se em quantidades residuais.

Ainda para esta condição, no estado estacionário obteve-se uma produção de AOV de 4330 ± 618 e um grau de acidificação de 41,6% ± 5,9. A redução de CQO foi de 30,3%, semelhante á redução para os 15 dias de operação e a produção de biogás foi de 1,7 L/d. ± 1,3.

Na figura 25 é possível comparar a produção de ácidos para a carga orgânica de 20 g CQO/L/d quando foi imposta uma alcalinidade de 2000 mg CaCO<sub>3</sub>/L e 5000 mg CaCO<sub>3</sub>/L

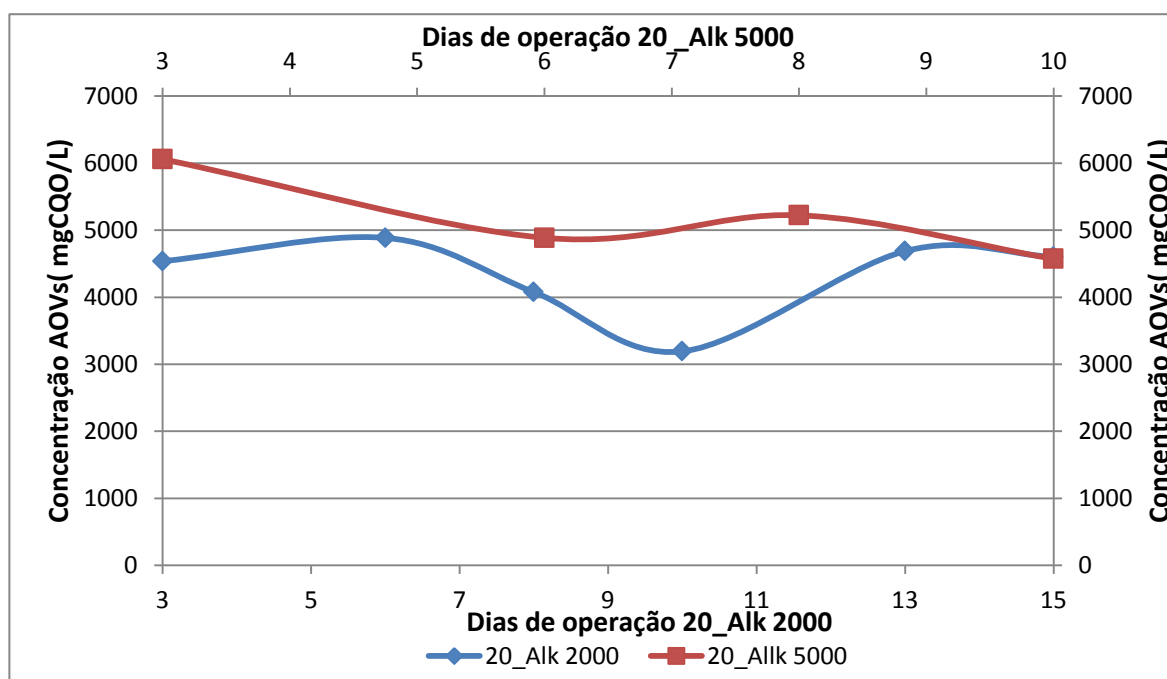


Figura 25: Concentração de AOV para as condições de 20\_Alk 2000 e 20\_Alk 5000

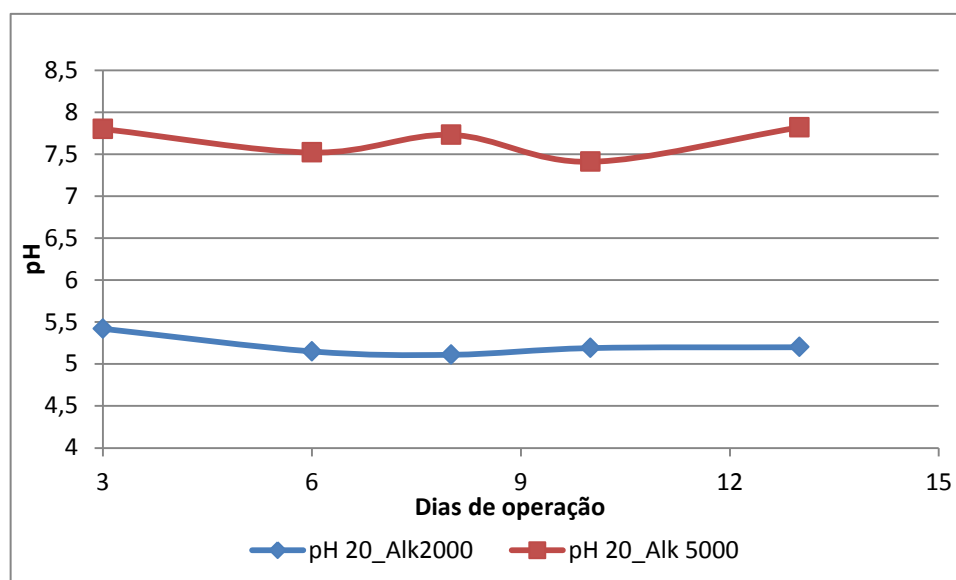


Figura 26: Evolução do pH para condições de 20\_AlK 2000 e 20\_AlK 5000

Com uma carga orgânica de 20 gCQO/L/d e uma alcalinidade de 2000 mgCaCO<sub>3</sub>/L verifica-se que o pH no reator desce dos 5,8 para os 5,2 o que pode justificar a tendência no perfil de AOV com uma concentração de HBut três vezes superior à produção de HAC, uma vez que a pH inferiores a 6 os AOV de cadeia longa como o HBut são favorecidos.

Comparando as duas condições, com a mesma carga orgânica e alcalinidades diferentes, podemos observar diferenças quanto á média de ácidos produzidos bem como em relação ao perfil de AOV para as duas condições. Quanto á média, para a carga de 20 g CQO/L/d e 2000 mg CaCO<sub>3</sub>/L de alcalinidade, é de 4203 mg CQO/L ± 608 e para a condição de 20 g CQO/L/d e alcalinidade 5000 mg CaCO<sub>3</sub>/L a média de ácidos produzidos é de 4867 mg CQO/L ± 810 permitindo concluir que o aumento de alcalinidade, ou seja, para um pH médio de 7,6 é mais favorável á produção de ácidos, em termos quantitativos, do que para a condição 1, onde o pH médio foi de 5,3. Em termos de perfil de ácidos, para 20\_AlK 2000 (pH de 5,3) nota-se de forma clara que o ácido n-butírico é o ácidos mais produzido, enquanto que para 20\_AlK 5000 (pH de 7,6), revela-se que a produção de ácido propiónico tende a crescer, chegando a ser produzido em maior quantidade relativamente ao n-butírico no último dia de medição efectuada. Além disso a produção de ácido acético, para esta condição é maior do que na outra.

Simon Bengtsson et al (2008) estudaram também a influência do pH na produção de ácidos, utilizando também o soro de queijo como substrato. No seu trabalho á medida

que o pH foi sendo aumentado de 5 para valores próximos de 6 os valores de ácido acético, n-Hbut descem e ocorre uma subida do ácido propiónico, verificando-se o mesmo neste trabalho quando se compara o perfil de AOV entre as alcalinidades de 2000 mg CaCO<sub>3</sub>/L e 5000 mg CaCO<sub>3</sub>/L para 20 gCQO/L/d.

#### 4.1.3 Comparação do efeito da carga orgânica e da alcalinidade na fermentação acidogénica

Como já foi referido a carga orgânica e a alcalinidade, são parâmetros importantes no processo de digestão anaeróbia e portanto é estudado o seu efeito na produção de AOV. As cargas orgânicas comparadas foram de 20 g CQO/L/d e 50 g CQO/L/d com uma alcalinidade de 2000 mg CaCO<sub>3</sub>/L e 5000 mg CaCO<sub>3</sub>/L para ambas as cargas. A produção média de AOV, em estado estacionário, para as 4 condições encontra-se representada na figura 27.

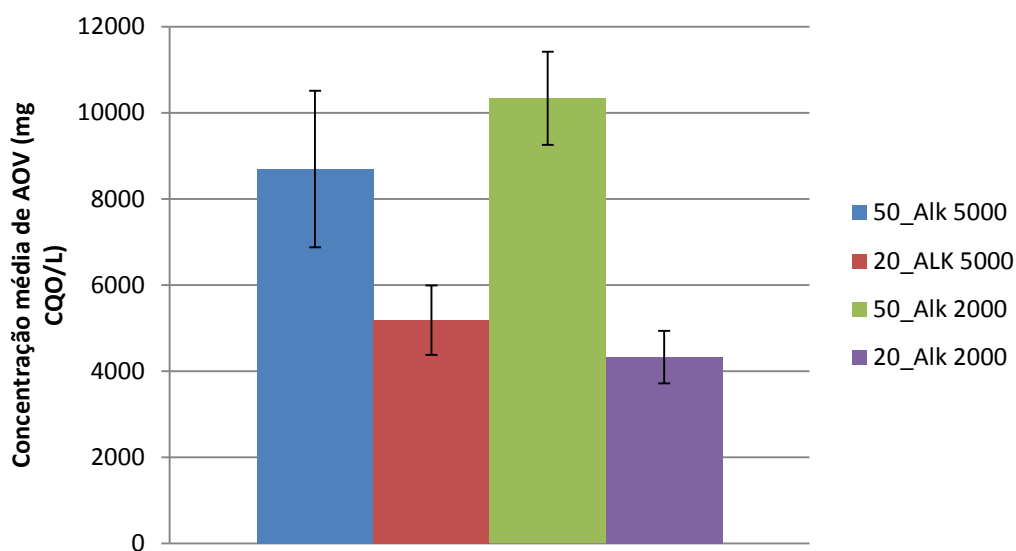


Figura 27: Concentração média de AOV e respectivos desvios-padrões para as quatro condições estudadas em MBBR

É possível observar que para ambas as condições de alcalinidade, a produção de ácidos aumenta, à medida que se aumenta a carga orgânica de 20 g CQO/L/d para 50 g

CQO/L/d. Para a alcalinidade de 5000 mg CaCO<sub>3</sub>/L existe um aumento na produção total de AOV de 166%, enquanto que para a alcalinidade de 2000 mg CaCO<sub>3</sub>/L o aumento ainda foi maior, 246%. Estes resultados vão de encontro às mesmas conclusões obtidas por Pozo et al. (2011) em que á medida que aumentava a carga orgânica no reactor (5,1, 8,1 e 12 Kg CQO/m<sup>3</sup>.dia<sup>-1</sup>), havia um aumento da actividade microbiana hidrolítica, proporcionando também um aumento na produção de AOV.

Para a alcalinidade de 2000 mg CaCO<sub>3</sub>/L o grau de acidificação diminui 0,3% com o aumento da carga orgânica. Pelo contrário para a alcalinidade de 5000 mg CaCO<sub>3</sub>/L ocorre um aumento no grau de acidificação quando a carga orgânica aumenta, pois é de 30,1% para 20 gCQO/L/d. e 41,3% para 50 gCQO/L/d. Isto significa que para um pH entre 4,4 e 5,3 (alcalinidade 2000 mg CaCO<sub>3</sub>/L) o aumento da carga orgânica tem um efeito positivo na produção de AOV, aumentando também o seu grau de acidificação, mostrando que os microorganismos acidogénicos são favorecidos neste tipo de condições. Para um pH entre 5,5 e 7,6 (alcalinidade 5000 mg CaCO<sub>3</sub>/L), o mesmo já não acontece de uma forma tão evidente, uma vez que apesar do número de AOV aumentar com o aumento da carga orgânica, o grau de acidificação baixou cerca de 20 % como já foi referido. Isto significa que nesta gama de pH a fase acidogénica não é tão favorecida com o aumento da carga orgânica como foi numa gama mais baixa.

A tabela 11 traduz, quanto ao perfil de ácidos, que é notório uma diminuição da percentagem de ácido n-valérico, i-valérico e i-butírico quando se aumenta a carga orgânica, para ambas as alcalinidades. Também em ambas alcalinidades e para as duas cargas orgânicas o ácido mais produzido é o n-butírico, como já foi referido anteriormente.

Para a alcalinidade de 2000 mg CaCO<sub>3</sub>/L o efeito do aumento da carga orgânica no perfil de ácidos parece estar coincidente com os resultados de Jiang et al. (2013). Isto porque há um aumento da produção de ácido acético e uma diminuição na produção de ácido propiónico e butírico á medida que se aumenta a carga orgânica.

Para a carga orgânica de 5000 mg CaCO<sub>3</sub>/L ocorre uma diminuição clara do ácido acético com o aumento da carga orgânica, e um aumento do ácido n-butírico. Resultados

estes semelhantes aos obtidos por Wijekoon et al (2011).(Wijekoon, Visvanathan et al. 2011)

Resumindo, a condição que produz maior número de AOV é a de 50 g CQO/L/d. e alcalinidade de 2000 mgCaCO<sub>3</sub>/L, 10336 mgCQO/L ± 1078. Contudo, é normal que as condições com maiores cargas orgânicas produzam também maiores quantidades de ácidos. Mas por exemplo, para a carga de 50 g CQO/L/d. e 5000 mg CaCO<sub>3</sub>/L obteve-se um grau de acidificação apenas de 30,1% enquanto que para a mesma carga orgânica e 2000 mgCaCO<sub>3</sub>/L obteve-se um grau de acidificação de 46,1%, o que significa que para a mesma massa de soro de queijo obtém-se uma maior quantidade de ácidos para 50\_Alk 2000. Isto significa que esta condição é preferível em relação á de 50\_Alk 5000. Para a carga orgânica de 20 gCQO/L obtém-se graus de acidificação entre os 41,6% e 50,8%, apesar dos AOV serem mais reduzidos em relação aos obtidos para as cargas de 50 gCQO/L.

Como vimos também a alcalinidade tem influência do tipo de ácidos produzidos e a melhor opção da condição a utilizar estará relacionada com o tipo de ácidos que se pretende obter.



## 4.2 CSTR

### 4.2.1 Evolução temporal da concentração de AOV e CQO

O modo de operação do reato foi outro dos parâmetro estudados, uma das grandes diferenças entre o MBBR e o CSTR é este ultimo não possuir carriers e que influenciara o consórcio misto produtor de AOV.

O CSTR operou com um TRH de 12 horas e com recirculação de biomassa. Na figura 26 está representada a evolução da formação de AOV e a variação do carbono em CQO, e na figura 27 encontra-se representado os mesmos parâmetro para a fase estacionária.

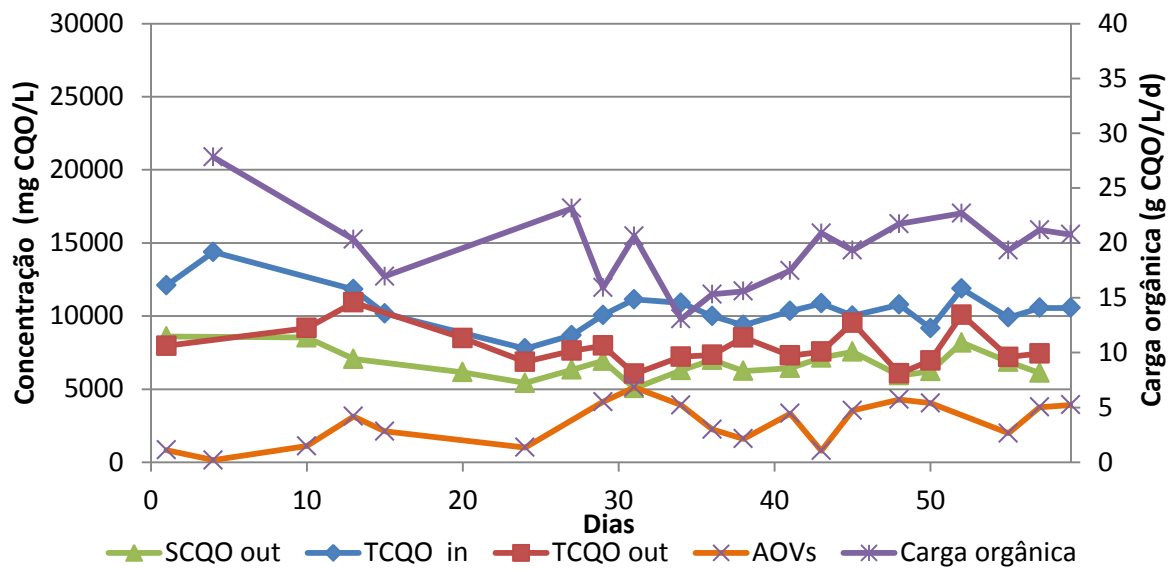


Figura 28: Evolução do processo de digestão anaeróbia para o reator CSTR

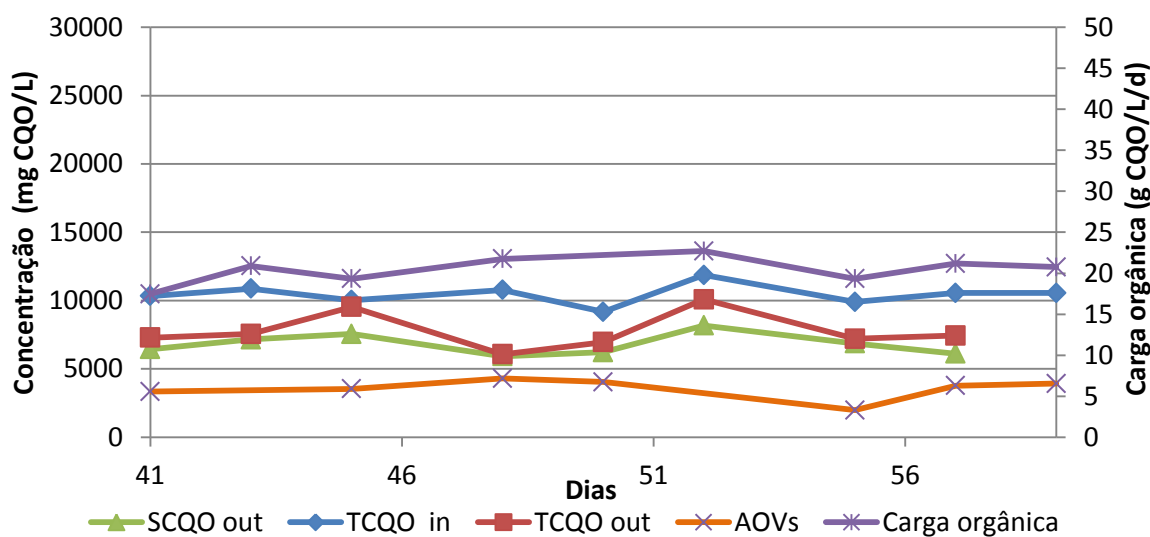


Figura 29: Evolução do processo de digestão anaeróbia na fase estacionária para a condição 20\_Alk 2000 em CSTR.

A média de ácidos produzidos no estado estacionário foi de 3553 mg CQO/L  $\pm$  707 (tabela 13). No primeiro ponto do estado estacionário a concentração de ácidos foi mais baixa do que a tendência ao longo desse período, devendo esse facto resultar das condições instáveis da fase anterior. No dia 52 a produção de ácidos foi também mais baixa devendo esse dia corresponder a uma maior produção de metano, ou seja, um aumento do volume de biogás. Azheem Kalid et al (2011) também referem que o aumento da produção de AOV na digestão anaeróbia provoca inibição nas bactérias metanogénicas, responsáveis pela produção de metano. Em relação á diminuição do CQO é possível observar-se que 34,84 % do CQO total de entrada é removido.

No trabalho de Bengtsson et al (2008) cerca de 75% do CQO solúvel é convertido em AOV com um pH no reactor de 7,3 utilizando pasta de papel como substrato também num reator com mistura agitada a operar em contínuo. No presente trabalho 52% do CQO solúvel é convertido em AOV, com um pH médio de 5,6.

Tabela 13: Resumo da média de AOV, de redução de CQO e Grau de acidificação para o reator CSTR para a fase estacionária.

Condição	Média de AOV (mgCQO/L)	Redução de CQO	Grau acidificação
CSTR (20 gCQO/L/d e 2000 mg CaCO <sub>3</sub> /L)	3553,23 ± 706,89	34,8%	34,9% ± 12

### 4.3 Comparação de desempenho entre MBBR e CSTR

Como já foi referido o facto de usar tecnologias diferentes no tratamento de efluentes proporciona também resultados diferentes, tanto em eficiências de remoção de CQO como também o tipo de compostos produzidos ao longo do processo biológico.

A figura 30 apresenta a comparação da evolução do CQO total de entrada, CQO solúvel de saída e AOV para os dois reatores, durante a fase estacionária.

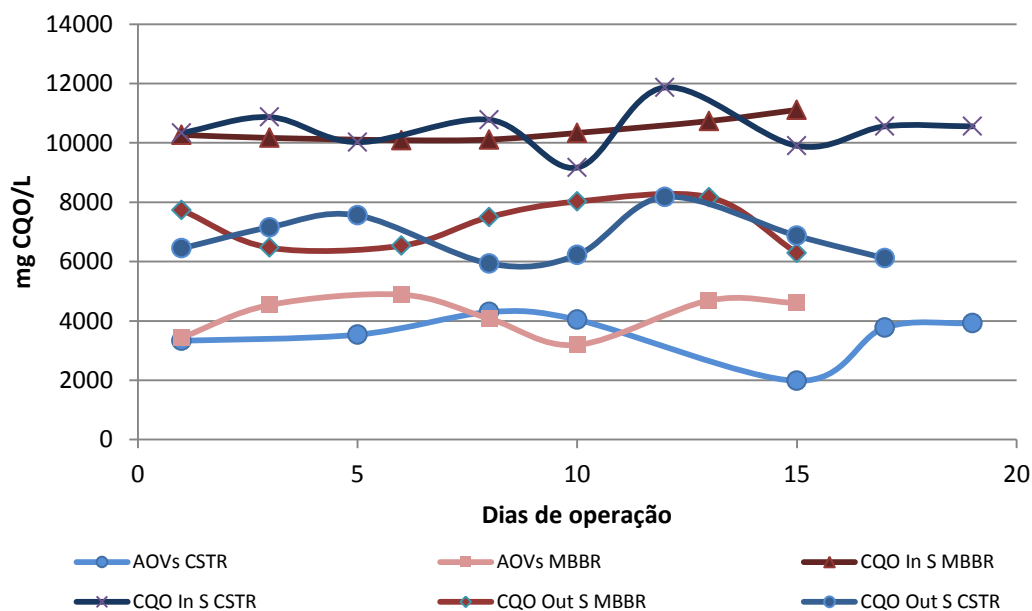


Figura 30: Comparação entre evolução de CQO In S, CQO Out S e AOV para a condição 20\_Alk 2000 no MBBR e CSTR

O reator MBBR apresenta uma maior quantidade de AOV produzidos comparativamente com o reator CSTR, 4203 mg CQO/L e 3553,23 mg CQO/L, em média respectivamente. No primeiro dia de medição de ácidos o valor é semelhante nos dois reatores, como é visível no gráfico xx, sendo que no CSTR nos dias seguintes os AOV permanecem sensivelmente nesse nível inicial, á excepção do dia 24, em que há uma diminuição para cerca de 2000 mg CQO/L de AOV. No reactor MBBR, os ácidos logo no segundo dia de medição, sobem para concentrações próximas dos 5000 mg CQO/L, á excepção do 13º e 15º dia, em que ocorre uma diminuição destes. A maior quantidade de AOV produzida no MBBR pode ser explicada pela facto dos carriers, onde cresce o biofilme, proporcionar condições mais favoráveis ao desenvolvimento de microorganismos acidogénicos e de servir como uma estrutura não só de suporte para o crescimento de biomassa mas também de protecção contra as mudanças do meio que poderão prejudicar a biomassa. Por outro lado, no reactor CSTR os microorganismos são colocados e crescem directamente no meio, e com a agitação mecânica a biomassa pode não formar agregados tão grandes como os biofilmes que crescem nos carriers do MBBR.

Por outro lado, quanto o CSTR permitiu uma maior redução do CQO de entrada no reator, cerca de 26% em relação a esse valor inicial, enquanto que no MBBR essa redução foi apenas de 15%. Esses valores encontram-se também relacionados com os AOV, que contribuem na contabilização do CQO e como houve uma maior quantidade de ácidos no MBBR do que no CSTR é normal que a diminuição de CQO neste último fosse mais acentuada.

Na figura 28 apresenta-se a comparação entre cada tipo de AOV em relação ao total de ácidos produzidos nos dois reatores.

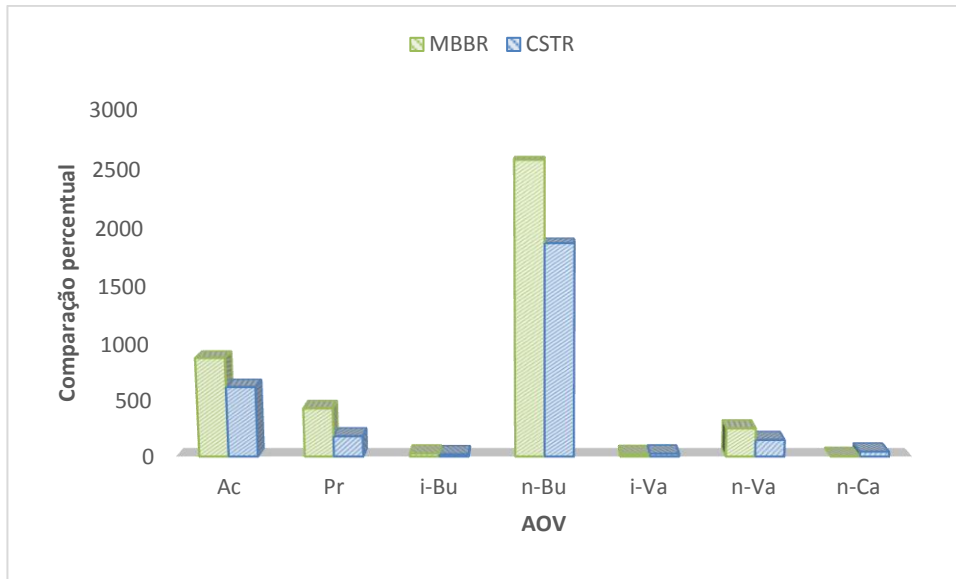


Figura 31: Comparação percentual entre os mesmos ácidos em MBBR e CSTR

Da análise à figura 28 é possível observar que o reactor MBBR houve uma maior produção em quase todos os ácidos comparativamente com os mesmos ácidos produzidos no CSTR, à exceção do ácido n-caproico e do ácido i-valérico. É de salientar também que a diferença entre a percentagem de ácido caproico produzido no reactor CSTR em relação à quantidade produzido no reactor MBBR é bastante significativa, mais de 90%. Quanto ao ácido i-valérico, a sua predominância em relação à sua produção no MBBR, traduz-se em 55 % do total deste ácido produzido nos dois reactores.

## 5 Conclusão

---

Neste trabalho propôs-se valorizar subprodutos industriais, o soro de leite da indústria agroalimentar, através da produção de AOVs.

Os ácidos orgânicos voláteis são precursores químicos utilizados como substrato de bioprocessos para a obtenção de produtos de valor acrescentado como os PHAs.

Estudou-se o efeito da variação da carga orgânica e concluiu-se que a quantidade de AOV produzidos aumenta com o aumento da carga orgânica, sendo esse aumento mais significativo quando a alcalinidade adicionada ao reator foi de 2000 mg CaCO<sub>3</sub>/L.

Em relação ao perfil de AOV, o aumento da carga orgânica provoca uma diminuição generalizada de ácido n-valérico, i-valérico e i-butírico. O ácido mais produzido nas quatro condições estudadas é o n-butírico. O ácido acético aumenta com o aumento da carga orgânica para a alcalinidade de 2000 mg CaCO<sub>3</sub>/L e diminui para a alcalinidade de 5000 mg CaCO<sub>3</sub>/L.

No estudo do efeito da alcalinidade na produção de AOV encontra-se resultados contraditórios para as duas cargas orgânicas: para 20 g CQO/L/d o aumento da alcalinidade provoca uma maior produção média de AOV, enquanto que para 50 g CQO/L/d com o aumento da alcalinidade ocorre uma diminuição na produção de AOV. Contudo, ao comparar o efeito da alcalinidade é importante considerar-se que a mesma alcalinidade para diferentes cargas orgânicas não significa que a influência no pH seja a mesma, pois a neutralização dos AOVs existentes em cada condição é diferente, fazendo com que o pH final seja diferente.

Por fim, analisando o modo de operação do reator biológico, conclui-se que a produção de AOV no MBBR revelou uma produção 15% superior á produção de AOV no CSTR, que poderá ser explicado pelo facto dos carriers no MBBR serem não só um suporte para o crescimento de biomassa, mas também uma estrutura de protecção para as bactérias acidogénicas, permitindo uma maior acumulação destas do que no reator CSTR. Por outro lado, do ponto de vista ambiental o CSTR conseguiu produzir um efluente com uma maior redução de CQO, comparativamente com o efluente do MBBR.

Em suma, este trabalho mostrou que é possível produzir AOVs a partir de resíduos industriais, utilizando um processo biológico simples, viável e económico, como é a digestão anaeróbia. Os resultados obtidos levantam a hipótese de se poder manipular o perfil de AOVs obtidos, modificando as condições de operação e o tipo de substrato

## 6 Bibliografia

- Abbasi, T., S. M. Tauseef, et al. (2011). Biogas Energy, Springer.
- Addy, K., L. Green, et al. (2004). pH and Alkalinity. U. o. R. island.
- Assessment, U. S. C. O. o. T. (1993). Biopolymers: making materials nature's way, The Office.
- Babu, R., K. O'Connor, et al. (2013). "Current progress on bio-based polymers and their future trends." Progress in Biomaterials **2**(1): 8.
- Bengtsson, S., J. Hallquist, et al. (2008). "Acidogenic fermentation of industrial wastewaters: Effects of chemostat retention time and pH on volatile fatty acids production." Biochemical Engineering Journal **40**(3): 492-499.
- Calderón, K., J. Martín-Pascual, et al. (2012). "Comparative analysis of the bacterial diversity in a lab-scale moving bed biofilm reactor (MBBR) applied to treat urban wastewater under different operational conditions." Bioresource Technology **121**(0): 119-126.
- Carminatti, C., F. El Messane, et al. (2006). Produção de polihidroxialcanoatos (PHAs). Florianópolis, Universidade Federal de Santa Catarina.
- Chan, Y. J., M. F. Chong, et al. (2009). "A review on anaerobic-aerobic treatment of industrial and municipal wastewater." Chemical Engineering Journal **155**(1-2): 1-18.
- Chang, H., N.-J. Kim, et al. (2010). "Biomass-derived volatile fatty acid platform for fuels and chemicals." Biotechnology and Bioprocess Engineering **15**(1): 1-10.
- Chen, Y., J. J. Cheng, et al. (2008). "Inhibition of anaerobic digestion process: A review." Bioresource Technology **99**(10): 4044-4064.
- Cysneiros, D., C. J. Banks, et al. (2012). "The effect of pH control and 'hydraulic flush' on hydrolysis and Volatile Fatty Acids (VFA) production and profile in anaerobic leach bed reactors digesting a high solids content substrate." Bioresource Technology **123**(0): 263-271.
- Demirel, B., O. Yenigun, et al. (2005). "Anaerobic treatment of dairy wastewaters: a review." Process Biochemistry **40**(8): 2583-2595.
- Eaton, A. D., M. A. H. Franson, et al. (2005). Standard Methods for the Examination of Water & Wastewater, American Public Health Association.
- Ferry, J. G. (1992). "Biochemistry of Methanogenesis." Critical reviews in Biochemistry and Molecular Biology **27**(6): 473-503.
- Fonseca, M. M. d. and J. A. Teixeira (2007). Reactores Biológicos. Lidel: 373.
- Frigon, J. C., J. Breton, et al. (2009). "The treatment of cheese whey wastewater by sequential anaerobic and aerobic steps in a single digester at pilot scale." Bioresource Technology **100**(18): 4156-4163.
- Hackl, R. and S. Harvey (2010). Opportunities for Process Integrated Biorefinery Concepts in the Chemical Cluster in Stenungsund. Göteborg, Sweden, Chalmers University of Technology.
- Hansen, K. H., I. Angelidaki, et al. (1998). "ANAEROBIC DIGESTION OF SWINE MANURE: INHIBITION BY AMMONIA." Water Research **32**(1): 5-12.



- Hassan, A. N. and B. K. Nelson (2012). "Invited review: Anaerobic fermentation of dairy food wastewater." Journal of Dairy Science **95**(11): 6188-6203.
- Horticulture, A. a. and D. Board (2012). Dairy statistics An insider's guide 2012. Stoneleigh Park, Kenilworth, Warwickshire, DairyCo.
- Hu, R. and S. Le (2011). VFA as a Route to Renewable Transport Fuel. Utilization of Biomass for the Production of Chemicals or Fuels, Hotel Orsa Maggiore, Castro Marina, Lecce, Italy.
- Jarpa, M., G. Pozo, et al. (2012). "Polyhydroxyalkanoate biosynthesis from paper mill wastewater treated by a moving bed biofilm reactor." Journal of Environmental Science and Health, Part A **47**(13): 2052-2059.
- Jiang, J., Y. Zhang, et al. (2013). "Volatile fatty acids production from food waste: Effects of pH, temperature, and organic loading rate." Bioresource Technology **143**(0): 525-530.
- Jones, R. (2009) "Economics, sustainability and the public perception of biopolymers."
- Kamm, B. and M. Kamm (2004). "Principles of Biorefineries."
- Kamm, B. and M. Kamm (2004). "Principles of biorefineries." Applied Microbiology and Biotechnology **64**(2): 137-145.
- Khosravi-Darani, K., Z.-B. Mokhtari, et al. (2013). "Erratum to: Microbial production of poly(hydroxybutyrate) from C1 carbon sources." Applied Microbiology and Biotechnology **97**(12): 5657-5657.
- Khosravi-Darani, K., Z.-B. Mokhtari, et al. (2013). "Microbial production of poly(hydroxybutyrate) from C1 carbon sources." Applied Microbiology and Biotechnology **97**(4): 1407-1424.
- Kim, M., Y.-H. Ahn, et al. (2002). "Comparative process stability and efficiency of anaerobic digestion; mesophilic vs. thermophilic." Water Research **36**(17): 4369-4385.
- Kolybaba, M., L. G. Tabil, et al. (2003). Biodegradable Polymers: Past, Present, and Future. CSAE/ASAE Annual Intersectional Meeting f. The Society for engineering in agricultural, and biological systems. 301 3rd Avenue North\_Fargo, North Dakota, USA, ASAE Meeting Presentation. **03**.
- Komemoto, K., Y. G. Lim, et al. (2009). "Effect of temperature on VFA's and biogas production in anaerobic solubilization of food waste." Waste Management **29**(12): 2950-2955.
- Lenz, R. W. and R. H. Marchessault (2004). "Bacterial Polyesters: Biosynthesis, Biodegradable Plastics and Biotechnology." Biomacromolecules **6**(1): 1-8.
- Li, J., G. Zheng, et al. (2009). "Hydrogen-producing capability of anaerobic activated sludge in three types of fermentations in a continuous stirred-tank reactor." Biotechnology Advances **27**(5): 573-577.
- Li, Y., D. Hua, et al. (2013). "Volatile fatty acids distribution during acidogenesis of algal residues with pH control." World Journal of Microbiology and Biotechnology **29**(6): 1067-1073.
- Lu, J. and B. K. Ahring (2005). Effects of temperature and hydraulic retention time on thermophilic anaerobic pretreatment of sewage sludge. ADSW 2005, Environmental Microbiology and Biotechnology Group, Building 227, Biocentrum, Technical University of Denmark, Kgs. Lyngby-2800, Denmark.

- Mendes, D. M. (2011). Portugal Dairy Annual Voluntary Report 2011. Madrid: 9.
- Metabolix. (2013). "Metabolix Performance PHA Biopolymers." from <http://www.metabolix.com/products/biopolymers>.
- Ministério do Ambiente, d. O. d. T. e. d. D. R. (2007). Estratégia Nacional para os Efluentes Agro-Pecuários e Agro-Industriais 176.
- Moreira, C. P. M. (2011). Desenvolvimento de Metodologias Analíticas para Queijos, Instituto Superior de Agronomia.
- Moulin, G. and P. Galzy (1984). "Whey, a potencial substrate for biotechnology." Biotechnology and Genetic Engineering Reviews **1**: 28.
- Moutinho, A. M. R., C. M. F. G. d. Rosa, et al. (2011). Inspeções ambientais à indústria do leite e derivados. Angra do Heroísmo, Região Autónoma dos Açores Secretaria Regional do Ambiente e do Mar Inspeção Regional do Ambiente.
- Odegaard, H., B. Gisvold, et al. "The Influence of carrier size and shape in the moving bed biofilm process."
- Ødegaard, H., B. Gisvold, et al. (2000). "The influence of carrier size and shape in the moving bed biofilm process." Water Science and Technology **41**
- Ojumo, T. V., J. Yu, et al. (2003). "Production of Polyhydroxyalkanoates, a bacterial biodegradable polymer." African Journal of Biotechnology **3**.
- Parawira, w. (2004). Anaerobic Treatment of Agricultural Residues and Wastewater. Doctoral, Lund University.
- Pozo, G., C. A. Villamar, et al. (2012). "Effect of organic load and nutrient ratio on the operation stability of the moving bed bioreactor for kraft mill wastewater treatment and the incidence of polyhydroxyalkanoate biosynthesis." Water Science & Technology **66.2**.
- Prazeres, A. R., F. Carvalho, et al. (2012). "Cheese whey management: A review." Journal of Environmental Management **110(0)**: 48-68.
- Pritchard, B. (2001). Current global trends in the dairy industry. University of Sydney.
- Sans, C. and J. Mata-Alvarez VOLATILE FATTY ACIDS PRODUCTION BY ANAEROBIC FERMENTATION OF URBAN ORGANIC WASTES. Department of Chemical Engineering University of Barcelona, E-08028. F. Cecchi, P. Pavan. University of Venice, 1-30123.
- Singhania, R. R., A. K. Patel, et al. (2013). "Biological upgrading of volatile fatty acids, key intermediates for the valorization of biowaste through dark anaerobic fermentation." Bioresource Technology **145(0)**: 166-174.
- Stamatelatou, K., N. Giantsiou, et al. (2012). Anaerobic digestion of cheese whey wastewater through a two stage system. 3rd International Conference on Industrial and Hazardous Waste Management Crete, Greece.
- Sutherland, I. W. 978-1-84826-258-5. 978-1-84826-258-5. E. o. L. S. Systems. Institute of cell and Molecular Biology, University of Edinburgh, Edinburgh, United Kingdom.
- Van de Velde, K. and P. Kiekens (2002). "Biopolymers: overview of several properties and consequences on their applications." Polymer Testing **21(4)**: 433-442.
- Wang, Y., Y. Zhang, et al. (2009). "Effects of volatile fatty acid concentrations on methane yield and methanogenic bacteria." Biomass and Bioenergy **33(5)**: 848-853.
- Wijekoon, K. C., C. Visvanathan, et al. (2011). "Effect of organic loading rate on VFA production, organic matter removal and microbial activity of a two-stage

- thermophilic anaerobic membrane bioreactor." Bioresource Technology **102**(9): 5353-5360.
- Wust L, E. (2003). Single-phase and two-phase cheese wastewater treatment by anaerobic SBRs. Master of Science, Marquette University.
- Yang, K., Y. Yu, et al. (2003). "Selective optimization in thermophilic acidogenesis of cheese-whey wastewater to acetic and butyric acids: partial acidification and methanation." Water Research **37**(10): 2467-2477.
- Yang, S. T. (2011). Bioprocessing for Value-Added Products from Renewable Resources: New Technologies and Applications, Elsevier Science.
- Zygmunt, B. and A. Banel (2009). Formation, occurrence and determination of volatile fatty acids in environmental and related samples. 3rd WSEAS Int. Conf. on WASTE MANAGEMENT, WATER POLLUTION, AIR POLLUTION, INDOOR CLIMATE, Department of Analytical Chemistry Gdansk University of Technology 11/12 Narutowicza Str., 80-952 Gdańsk POLAND.