



Universidade de Aveiro
2019

Departamento de Química

**Rita Fernandes Estudo da biodegradabilidade anaeróbia de
dos Santos efluentes do branqueamento de pasta *kraft***



Universidade de Aveiro Departamento de Química
2019

Rita Fernandes dos
Santos

**Estudo da biodegradabilidade anaeróbia de
efluentes do branqueamento de pasta *kraft***

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Biotecnologia no ramo industrial e ambiental realizada sob orientação da Professora Doutora Maria Isabel Aparício Paulo Fernandes Capela, Professora Associada do Departamento de Ambiente e Ordenamento da Universidade de Aveiro, e co-orientação da Professora Doutora Isabel da Silva Henriques, Professora Auxiliar do Departamento de Ciências da Vida da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra.

o júri

Presidente

Professora Doutora Sónia Patrícia Marques Ventura

Professora Auxiliar em Regime Laboral, Universidade de Aveiro

Professora Doutora Maria Helena Gomes de Almeida Gonçalves Nadais

Professora Auxiliar, Universidade de Aveiro

Professora Doutora Maria Isabel Aparício Paulo Fernandes Capela

Professora Associada, Universidade de Aveiro

agradecimentos

Dedico este espaço da minha dissertação para homenagear todos os que contribuíram para a elaboração da mesma.

À minha família agradeço pelo apoio incondicional, por toda a confiança que depositaram em mim e pela oportunidade de estudar e viver nesta cidade.

A ti, Daniel agradeço-te por todo o apoio, paciência e por estares sempre presente para me animar nos melhores e piores momentos.

Agradeço às minhas companheiras de laboratório e amigas de aventuras. Flávia sabes o importante papel que tiveste durante o meu percurso académico e em particular na realização desta dissertação. Rita, Maria, Sara, Cátia, Raquel e Laura obrigada por terem sido um porto sempre seguro durante esta longa jornada.

Tânia, agradeço-te pela orientação e apoio durante este ano. Obrigada pelos conhecimentos e pela infindável paciência. Catarina obrigada pelos favores e conselhos. Foram incansáveis!

Ao Frederico Leitão agradeço pelo apoio no laboratório de microbiologia.

Agradeço à Doutora Diana Patoilo pela disponibilidade e toda a ajuda prestada.

Às minhas orientadoras, professora Isabel Capela e professora Isabel Henriques, agradeço pelo apoio no desenvolvimento da dissertação e pela oportunidade de trabalhar neste projeto.

palavras-chave D0; AOX; Biodegradabilidade; Metano; Efluente; Tratamento anaeróbio; PCR; DGGE; *Archaea*, *Bacteria*

resumo O presente trabalho teve como objetivo a realização de testes descontínuos de biodegradabilidade anaeróbia de efluentes provenientes da primeira etapa de branqueamento de pasta *kraft* (D0), ricos em compostos recalcitrantes e potencialmente inibidores (AOX).

No presente trabalho foram avaliados os efeitos na remoção de AOX e na produção de metano por aplicação de várias condições no tratamento anaeróbio, a temperatura mesófila, do efluente D0: carga orgânica aplicada; adição de um co-substrato; adição de cinzas como suplemento e aplicação de um pré-tratamento enzimático ao D0. Assim, foi estudada a utilização de duas cargas orgânicas de D0 diferentes (3 e 2 g-CQO_s·L⁻¹), verificando-se remoções de AOX de 70,6 e 74,2 %, remoções de CQO_s de 47,5 e 26,2 % e produção de CH₄ de 121,7 e 193,9 mL-CH₄·g-CQO_s inicial, respectivamente. A adição acetato e glucose conduziu a remoções de AOX de 52,6 e 70,4 %, respectivamente, remoções de CQO_s de 76,2 e 42,9 %, e eficiências de metanização de 335,0 e 124,0 mL-CH₄·g-CQO_s inicial. Concluiu-se que a remoção de AOX foi maximizada no reator alimentado com 2 g-CQO_s·L⁻¹ de D0.

Foi estudada a digestão anaeróbia da mistura filtrada e não filtrada de D0 com cinzas volantes da caldeira auxiliar (CA5), cinzas volantes da caldeira de queima de biomassa (CTB) e lamas de cal obtendo-se remoções de AOX entre 62,0 e 74,4 %. Nos reatores alimentados com a mistura não filtrada de D0 neutralizado com cinzas CA5 e cinzas CTB ocorreu a produção de 166,3 e 157,2 mL-CH₄·g-CQO_s inicial⁻¹, respectivamente. A utilização de cinzas CA5 e CTB parece ter sido vantajosa na remoção de AOX, com remoções de 70,1 e 62,0%, e não ter efeitos significativos na produção de metano (CH₄).

Estudou-se a adição de enzimas e de cinzas CA5 e CTB. Verificou-se que nas condições aplicadas, a utilização de enzimas e cinzas parece não ter o efeito pretendido.

No estudo das comunidades *Archaea* e *Bacteria* verificou-se que a aplicação do D0 como substrato parece ter conduzido a mudanças na composição das comunidades presentes nas lamas biológicas.

Concluindo, a digestão anaeróbia demonstrou ter potencial para o tratamento do D0, nomeadamente a remoção de AOX, e para a produção de CH₄.

keywords D0; AOX; Biodegradability; Methane; Effluent; Anaerobic treatment; DGGE; PCR; *Archaea*; *Bacteria*

abstract The present work had as objective the accomplishment of batch tests of anaerobic biodegradability of effluents from the first stage of kraft pulp bleaching (D0), rich in recalcitrant and potentially inhibitory compounds (AOX).

The effects on the removal of AOX and on the production of methane were evaluated by applying several conditions in the anaerobic treatment of the effluent D0: applied organic load; addition of a co-substrate; addition of ashes as a supplement and application of an enzymatic pre-treatment to D0.

Thus, the use of two different organic loads of D0 (3 and 2 g-CQO_s·L⁻¹) was studied, with AOX removals of 70.6 and 74.2 %, removals of COD_s of 47.5 and 26.2 % and CH₄ production of 121.7 and 193.9 mL-CH_{4 initial}·g-COD⁻¹, respectively. Addition of acetate and glucose led to AOX removals of 52.6 and 70.4 %, respectively, COD removals of 76.2 and 42.9 %, and methanization efficiencies of 335.0 and 124.0 mL-CH_{4 initial}·g-COD⁻¹. It was concluded that the AOX removal was maximized in the reactor fed with 2 g-COD·L⁻¹ of D0.

Anaerobic digestion of the filtered and unfiltered D0 mixture with CA5, CTB and lime sludge ash was studied, was obtained AOX removals between 62.0 and 74.4 %. In reactors fed with unfiltered D0 mixture neutralized with CA5 ashes and CTB ashes occurred the production of 166.3 and 157.2 mL-CH_{4 initial}·g-COD⁻¹, respectively. The use of CA5 and CTB ashes appears to have been advantageous in the removal of AOX and have no significant effects on CH₄ production.

The addition of enzymes, and CA5 and CTB ashes was studied. It has been found that under the conditions applied, the use of enzymes and ashes together does not appear to have the desired effect.

In the study of the *Archaea* and *Bacteria* communities it was verified that the application of D0 as substrate seems to have led to changes in the composition of the communities present in the biological sludge.

In conclusion, anaerobic digestion has been shown to have potential for the treatment of D0, namely the removal of AOX, and to produce CH₄.

Lista de Abreviaturas

AOV	Ácidos orgânicos voláteis
AOV/Alc	Rácio entre ácidos orgânicos voláteis e alcalinidade
AOX	Haleto Orgânico Adsorvíveis (<i>Adsorbable Organic Halides</i>)
<i>BREF</i>	<i>Best available techniques REFERENCE documents</i>
CA5	Cinza volante da caldeira auxiliar
CBO ₅	Carência Bioquímica de Oxigênio cinco dias
CQO	Carência Química de Oxigênio
CQO _s	Carência Química de Oxigênio solúvel
CQO _t	Carência Química de Oxigênio total
CTB	Cinza volante da caldeira de queima de biomassa
D0	Efluente da primeira etapa de branqueamento com dióxido de cloro de pasta <i>kraft</i>
<i>DDGE</i>	<i>Eletroforese em gel de gradiente desnaturante (denaturing gradient gel electrophoresis)</i>
<i>DNA</i>	<i>Ácido desoxirribonucleico</i>
<i>ECF</i>	<i>Isento de cloro elementar (Elemental Chlorine Free)</i>
MM	Massa Molar
<i>PCR</i>	<i>Reação em cadeia da polimerase (Polymerase Chain Reaction)</i>
<i>RNA</i>	<i>Ácido ribonucleico (RiboNucleic Acid)</i>
SST	Sólidos Suspensos Totais
SSV	Sólidos Suspensos Voláteis
<i>TCF</i>	<i>Totalmente isento de cloro (Total Chlorine Free)</i>

Índice de Tabela

Tabela 1 – Principais compostos químicos envolvidos no processo de branqueamento tradicional, ECF e TCF (adaptado de [10], [14]).	6
Tabela 2 – Poluentes produzidos em cada etapa de produção de pasta (adaptado de [10]).	7
Tabela 3 – Caracterização do efluente D0[17],[10].	8
Tabela 4 – Valores de referência de emissão de CQO, SST e AOX segundo o BREF [21] e exemplo dos valores máximos de emissão segundo o licenciamento ambiental de uma empresa de pastas e papel [22].	10
Tabela 5 - Ordens de microrganismos produtores de CH ₄ e respectivos substratos [40].	16
Tabela 6 – Bactérias que utilizam os compostos organoclorados como co-metabolitos em condições anaeróbias [4].	25
Tabela 7 – Bactérias utilizadoras de compostos organoclorados através de desalogenação reductiva [4].	26
Tabela 8 – Caracterização do efluente do branqueamento <i>Kraft</i> .	31
Tabela 9 – Composição química das cinzas CA5, CTB [65]–[67] e lamas de cal [68].	32
Tabela 10 – Caracterização da biomassa anaeróbia.	33
Tabela 11 – Concentração de macro e micronutrientes da solução stock utilizada.	35
Tabela 12 – Nomenclatura utilizada para cada um dos reatores em função da alimentação aplicada.	47
Tabela 13 – Variação de quantidade de sólidos entre o início e o fim dos reatores.	48
Tabela 14 – Taxas de remoção de carga orgânica, de metanização e de acidificação de cada reator.	55
Tabela 15 – Caracterização do D0 com adição de cinzas CTB, CA5 e lamas de Cal filtrados e não filtrados.	60
Tabela 16 – Variação de quantidade de SSV e SST entre o momento inicial e final dos tratamentos anaeróbios.	63
Tabela 17-Concentração de íons de cálcio, sódio, alumínio, ferro, manganês e magnésio no filtrado dos reatores no momento inicial e final, e concentrações estimuladoras [25] e inibitórias da digestão anaeróbia [35], [47].	67
Tabela 18 – Quantidade de CH ₄ (% e mL) em cada reator no final do ensaio.	70
Tabela 19 – Remoção de matéria orgânica, grau de metanização e de acidificação, produtividade em CH ₄ e rácio AOV/Alc de cada um dos reatores.	72
Tabela 20 – Rácio CBO ₅ /CQO _s do efluente inicial e tratado.	75
Tabela 21 – Caracterização do D0 a pH 5, 6 e 7.	76
Tabela 22 – Caracterização do D0 após o tratamento enzimático.	76
Tabela 23 – Caracterização do D0 tratado enzimaticamente e com adição de cinzas CA5 e CTB.	77

Tabela 24 – Variação de quantidade de sólidos entre o início e o fim dos reatores.....	79
Tabela 25-Concentração de íons de cálcio, sódio, alumínio, ferro, manganês e magnésio no filtrado dos reatores no momento inicial e final, e concentrações estimuladoras [25] e inibitórias da digestão anaeróbia [35], [47]......	82
Tabela 26 – Estimativa do volume de CH ₄ produzido.	86
Tabela 27 - Remoção de matéria orgânica, grau de metanização e de acidificação, produtividade em CH ₄ e rácio AOV/Alc de cada um dos reatores.....	88
Tabela 28 – Rácio CBO ₅ /CQO _s do efluente inicial e tratado.	89
Tabela 29 – Valores dos parâmetros de riqueza, índice de diversidade e índice de Pielou das comunidades microbianas presentes em cada reator do primeiro ensaio.	92
Tabela 30 - Valores dos parâmetros de riqueza, índice de diversidade e índice de Pielou das comunidades microbianas presentes em cada reator do 2º e 3ºEnsaio.	94
Tabela 31 - Valores dos parâmetros de riqueza, índice de diversidade e índice de Pielou das comunidades <i>Archaea</i> presentes em cada reator do trabalho.....	96
Tabela 32 – Resumo da performance dos reatores alimentados com D0.....	99

Índice de figuras

Figura 1 - Esquema do processo de produção de pasta e de papel (adaptado de [9]).	4
Figura 2 – Esquema geral da digestão anaeróbia (adaptado de [9])......	14
Figura 3 – Cinzas CA5, CTB e lamas de cal.....	31
Figura 4 – Esquema de montagem dos reatores da primeira fase de trabalho.....	34
Figura 5 –Esquema de montagem dos reatores da segunda fase de trabalho.....	35
Figura 6 - Esquema de montagem dos reatores da terceira fase de trabalho.....	36
Figura 7 – Concentração de SST e SSV no ponto inicial e final dos reatores.....	48
Figura 8 – pH (a) e alcalinidade (b) iniciais e finais dos reatores.	50
Figura 9 – AOX inicial e final dos reatores D3, D2, DA e DG.....	51
Figura 10 – Concentração de cloretos nos reatores no início e no fim tratamento.....	52
Figura 11 – Produção de CH ₄ pelos reatores ao longo dos 25 dias de tratamento.	54
Figura 12 – CQO e AOV nos reatores no momento inicial e final.	55
Figura 13 – Sólidos suspensos iniciais e finais dos reatores com D0 neutralizado com cinzas CA5, CTB e lamas de Cal.....	62
Figura 14 – pH e alcalinidade inicial e final dos reatores alimentados com D0 neutralizado com cinzas CA5, cinzas CTB e lamas de cal, filtrado e não filtrado	64
Figura 15 – Remoção de AOX obtida nos reatores alimentados com a mistura filtrada e não filtrada de D0 com cinzas CA5, CTB e lamas de Cal.	68

Figura 16 – Quantidade de cloretos presentes no início e no fim do tratamento anaeróbio para cada um dos reatores.	69
Figura 17 – Percentagem de CH ₄ dentro dos reatores ao longo dos 25 dias no ensaio que utilizou cinzas.....	70
Figura 18 – CQO _s inicial e final dos reatores alimentados com D0 neutralizado com cinzas CA5, cinzas CTB e lamas de cal, filtrado e não filtrado.....	71
Figura 19 – Sólidos suspensos iniciais e finais dos reatores com D0 tratado enzimaticamente, a pH 5 e 6, e neutralizado com cinzas CA5 e CTB.....	79
Figura 20 – pH (a) e alcalinidade (b) inicial e final dos reatores alimentados com D0 tratado enzimaticamente e neutralizado com cinzas CA5 e CTB.	80
Figura 21 – Remoção de AOX obtida nos reatores alimentados com D0 tratado enzimaticamente e neutralizado com cinzas CA5 e CTB.	83
Figura 22 – Quantidade de cloretos presentes no início e no fim do tratamento anaeróbio para cada um dos reatores.	84
Figura 23 - Percentagem de CH ₄ dentro dos reatores ao longo dos 25 dias no ensaio que utilizou cinzas e tratamento enzimático.	85
Figura 24 – CQO _s inicial e final e AOV individuais dos reatores alimentados com D0 tratado enzimaticamente e neutralizado com cinzas CA5 e CTB.	87
Figura 25 – Dendrograma representativo da similaridade das comunidades bacterianas dos reatores do primeiro ensaio.	91
Figura 26 – Dendrograma obtido a partir do perfil de <i>DGGE</i> das comunidades bacterianas dos reatores do segundo e terceiro ensaio.....	93
Figura 27 – Dendrograma obtido a partir do perfil de <i>DGGE</i> das comunidades <i>Archaea</i> dos reatores do primeiro, segundo e terceiro ensaio.	95

Índice

Contextualização	1
1. Revisão de Literatura	3
1.1. Indústria papelreira	3
1.1.1. Processo de produção de pasta de celulose	3
1.1.2. Processo de branqueamento da pasta de celulose.....	5
1.1.3. Resíduos provenientes da produção de pasta	7
1.1.3.1. Características dos efluentes provenientes do branqueamento.....	7
1.1.4. Implicações ambientais dos efluentes da indústria de pasta.....	9
1.2. Métodos de tratamento de compostos recalcitrantes	10
1.2.1. Tratamentos físicos e químicos	11
1.2.2. Tratamentos biológicos	12
1.3. Processo de digestão anaeróbia	13
1.3.1. Fundamentos	13
1.3.2. Fatores ambientais e parâmetros operacionais de controlo	17
1.3.3. Potencial de biodegradabilidade anaeróbia	20
1.4. Digestão anaeróbia de efluentes de branqueamento da indústria papelreira	21
1.5. Microrganismos envolvidos na degradação de AOX.....	23
1.6. Recurso energético produzido	27
1.7. Considerações finais.....	27
2. Objetivo	29
3. Metodologia experimental e materiais	31
3.1. Preparação e caracterização dos substratos e da biomassa.....	31
3.1.1. Efluente de branqueamento de pasta <i>kraft</i>	31
3.1.2. Cinzas do processo de produção de pastas <i>kraft</i>	31
3.1.1. Co-substratos: Glucose e Acetato.....	32
3.1.2. Enzimas	32
3.1.3. Biomassa anaeróbia.....	33
3.2. Ensaio anaeróbios de biodegradabilidade.....	33
3.3. Parâmetros físicos e químicos analisados	36
3.3.1. Biogás.....	37
3.3.2. Sólidos suspensos totais e sólidos suspensos voláteis.....	38
3.3.3. Carência química de oxigénio	38
3.3.4. Carência bioquímica de oxigénio - 5 dias	39
3.3.5. Haletos orgânicos adsorvíveis	39
3.3.6. Ácidos Orgânicos Voláteis.....	40
3.3.7. pH e alcalinidade	41

3.3.8.	Determinação de cloretos	41
3.3.9.	Espectrometria de adsorção e de emissão atômica.....	41
3.4.	Dinâmica microbiana	42
3.4.1.	Extração do DNA e amplificação do gene rRNA 16S	42
3.4.2.	Eletroforese em gel de gradiente desnaturante (<i>DGGE</i>)	43
3.4.1.	Cálculos.....	44
4.	Resultados e Discussão	47
4.1.	Estudo do efeito da carga orgânica e da adição de co-substratos.....	47
4.1.1.	Funcionamento geral dos reatores.....	47
4.1.1.1.	SST e SSV.....	47
4.1.1.2.	pH e alcalinidade.....	49
4.1.2.	Remoção de AOX	50
4.1.3.	Produção de CH ₄	53
4.1.4.	Remoção de matéria orgânica, grau de metanização e de acidificação.....	54
4.1.5.	Considerações gerais sobre o ensaio	59
4.2.	Biodegradabilidade do D ₀ com a adição de cinzas	60
4.2.1.	Caracterização do D ₀ com a adição de cinzas.....	60
4.2.2.	Funcionamento geral dos reatores.....	62
4.2.2.1.	SST e SSV.....	62
4.2.2.2.	pH e alcalinidade.....	63
4.2.2.3.	Macro e micronutrientes.....	65
4.2.3.	Remoção de AOX	68
4.2.4.	Produção de CH ₄	69
4.2.5.	Remoção de matéria orgânica, grau de metanização e de acidificação.....	71
4.2.6.	Considerações gerais sobre os ensaios com adição de cinzas	75
4.3.	Biodegradabilidade do D ₀ com pré-tratamento enzimático e adição de cinzas	76
4.3.1.	Tratamento enzimático.....	76
4.3.2.	Funcionamento geral dos reatores.....	78
4.3.2.1.	SST e SSV.....	78
4.3.2.2.	pH e alcalinidade.....	80
4.3.2.3.	Macro e micronutrientes derivados das cinzas.....	81
4.3.3.	Remoção de AOX	83
4.3.4.	Produção de CH ₄	85
4.3.5.	Remoção de matéria orgânica, grau de metanização e de acidificação.....	86
4.3.6.	Considerações sobre o ensaio.....	90
4.4.	Dinâmica microbiana	91
5.	Conclusão.....	99

6. Trabalho futuro	103
7. Bibliografia	105
Anexos.....	111
Anexo A – Retas de calibração.....	111
Anexo B – Biogás produzido nos reatores do primeiro ensaio.....	113
Anexo C – Biogás produzido nos reatores do segundo ensaio	115
Anexo D – Biogás produzido nos reatores do terceiro ensaio.....	117

Contextualização

Após ser utilizada em atividades humanas, a água com parâmetros químicos e/ou físicos alterados é considerada água residual. No caso de apenas parâmetros físicos terem sido alterados, como por exemplo temperatura, poderá apenas ser necessário arrefecê-la até à temperatura próxima da inicial antes de a descarregar no meio ambiente. No entanto, se a água residual estiver contaminada com matéria orgânica ou inorgânica solúvel ou insolúvel, será necessário recorrer a uma série de tratamentos mecânicos, químicos ou biológicos para proteger o ambiente destes contaminantes.

O setor industrial é um componente essencial na economia mundial. No entanto, estas atividades são uma grande fonte de consumo de recursos naturais e de emissão de resíduos nos ecossistemas [1]. A indústria da pasta e do papel é responsável por depositar no ambiente uma grande variedade de resíduos sólidos, líquidos e gasosos. O depósito de águas residuais é o mais preocupante tanto devido à quantidade, como devido às características que apresenta. Dependendo da matéria prima, são necessários milhares de litros de água para a produção de uma tonelada de papel e cerca de 75 % da água total utilizada surge como efluente, contendo alta carga de matéria orgânica poluente [2], [3]. Estas águas residuais possuem elevada carência química e bioquímica de oxigénio (CQO e CBO, respetivamente), compostos clorados, sólidos suspensos, ácidos gordos, ácidos resínicos, lenhina, entre outros.

Dos diferentes resíduos gerados durante a produção de pasta, os efluentes provenientes da unidade de branqueamento são considerados os mais tóxicos devido à produção de vários compostos organoclorados, tais como ácidos resínicos clorados, hidratos de carbono clorados, fenóis clorados, catecóis, guaiacóis, furanos, dioxinas, siringóis e vanilinas. Estes compostos recalcitrantes são estimados coletivamente como haletos orgânicos adsorvíveis (AOX). Devido à gravidade dos efeitos dos AOX nos ecossistemas, muitos países impuseram limites de descarga para AOX das fábricas de celulose [4]. Por este motivo, os resíduos da indústria papelreira passam por tratamentos físico, químicos, mecânicos e biológicos (aeróbios e anaeróbios) de forma a reduzir a sua toxicidade [4].

O sistema de tratamento anaeróbio tem-se mostrado uma alternativa ao tradicional tratamento aeróbio por gerar menos lamas residuais e por ser uma opção menos dispendiosa. O tratamento por digestão anaeróbia proporciona também benefícios económicos devido à produção simultânea de metano (CH_4) durante o processo de tratamento [5].

1. Revisão de Literatura

1.1. Indústria papelreira

A indústria papelreira consiste no conjunto de entidades responsáveis pelo fabrico de pastas e de diferentes tipos de papéis. Esta indústria está envolvida nos vários estágios de vida do papel: produção da matéria prima (produção florestal) e transformação em pasta de papel, produção dos diferentes tipos de papel e tratamento dos produtos no final de vida, através da reciclagem e valorização energética de papéis velhos [6].

Desde 2008 a produção nacional de pasta de fibra virgem tem vindo a aumentar. Em 2017, a produção aumentou cerca de 1 % em relação ao ano anterior, tendo sido produzidas 2,753 mil toneladas de pasta. Do total da pasta produzida, o eucalipto foi matéria prima de 2,592 mil toneladas de pasta e o pinho foi matéria prima das restantes. Em comparação com o ano anterior, verificou-se o aumento de 1,1 % na produção de pasta de eucalipto e a diminuição de 3 % na produção de pasta de pinho [6].

De acordo com a Confederação Europeia da Indústria Papelreira [6], em 2017, os países europeus representados por esta entidade produziram cerca de 37,8 milhões de toneladas de pasta. Em relação ao ano anterior, a produção de pasta aumentou 1,7 %. Este aumento deveu-se à produção de pastas químicas nesses países. Cerca de 73 % do total de pastas produzidas corresponderam a pastas químicas, registando-se um aumento de 3,3 % face a 2016. A produção de pastas mecânicas e semi-mecânicas representou 26 % do total das pastas produzidas, verificando-se uma diminuição de 2,6 % da produção do ano anterior [6].

Em 2017, Portugal foi o terceiro maior produtor europeu de pasta, sendo responsável pela produção de 7,3 % das pastas totais. A Suécia e Finlândia ocupam as primeiras posições, produzindo cerca de 31 % e 29 % do total de pasta, respetivamente. Portugal, foi também o terceiro maior produtor europeu de pastas químicas, sendo responsável pela produção de 9,9 % das pastas deste tipo. No mesmo ano, exportou pasta para 27 países, demonstrando assim o importante posicionamento nacional da indústria de produção de pastas tanto a nível europeu como mundial [6].

1.1.1. Processo de produção de pasta de celulose

As pastas de celulose podem ser preparadas a partir de uma grande variedade de matérias primas de origem vegetal tais como madeiras, palha e ervas, bambus, canas e juncos. No entanto, a madeira é a matéria prima mais utilizada para o fabrico de pasta de papel [7]. Os principais tipos de madeira utilizados são provenientes de *Pinus radiata* (pinho) e *Eucalyptus globulus* (eucalipto) [8].

A produção de pasta de papel envolve cinco passos fundamentais: o descascamento das matérias primas, a conversão dos materiais em pasta, o branqueamento das pastas, a lavagem das

pastas e a triagem. Cada uma destas etapas pode ser realizada por diversos métodos, sendo que surgem efluentes de cada uma das unidades processuais que podem ser tratados individualmente ou em conjunto [3]. A Figura 1 resume o processo de produção de pasta.

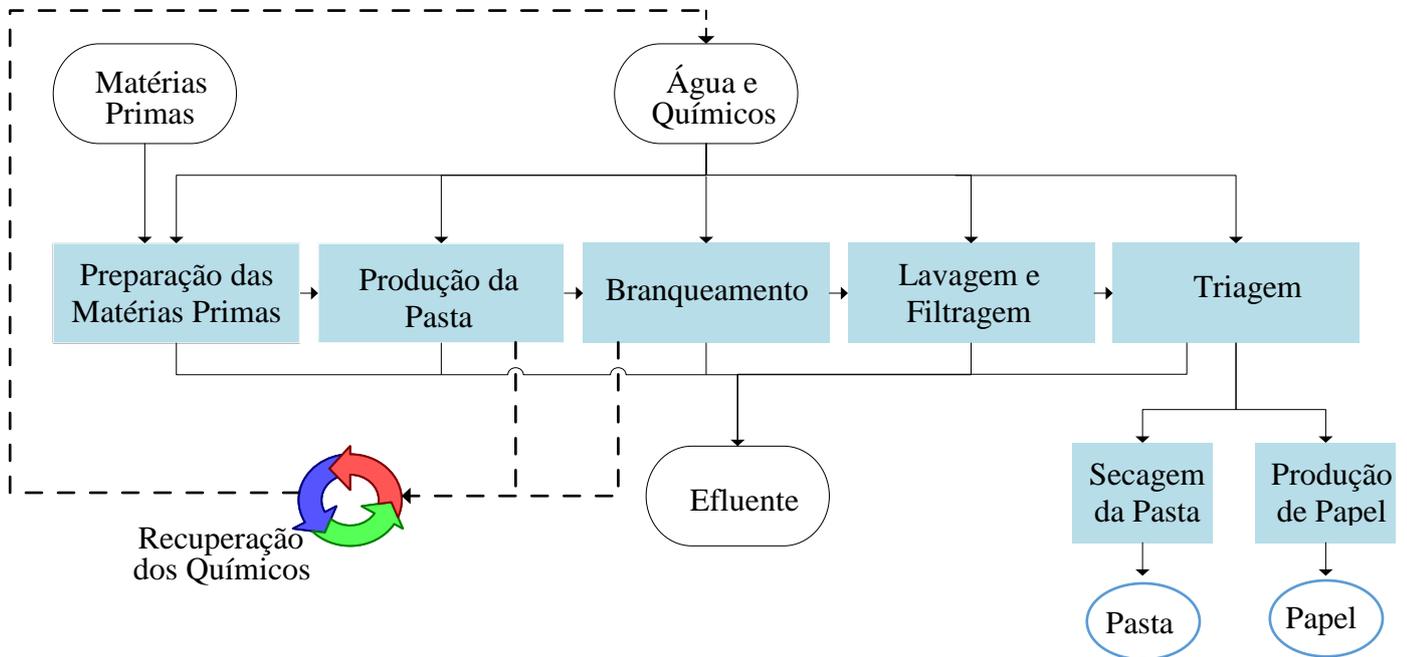


Figura 1 - Esquema do processo de produção de pasta e de papel (adaptado de [9]).

O primeiro passo, a preparação das matérias primas, consiste na remoção da casca da madeira e na redução do tamanho dos materiais a aparas. Na segunda etapa, as aparas de madeira ou de outros materiais lenhocelulósicos são sujeitos a processos mecânicos e/ou químicos com o intuito produzir a pasta de celulose [10]. Em processos mecânicos, as fibras são separadas utilizando o atrito dos materiais lenhocelulósicos, preservando todos os constituintes da madeira (por exemplo, celulose, lenhina e hemicelulose) com apenas modificações químicas moderadas [11]. Apesar das pastas obtidas por este método serem produzidas com elevado rendimento (90 a 98 %) e baixo custo, o papel obtido apresenta baixa resistência devido à lenhina presente na pasta interferir com as ligações de hidrogénio entre as fibras. Além disso, a presença da lenhina na pasta conduz a uma coloração amarelada quando a pasta é exposta à luz e ao ar [12].

As pastas podem ainda ser produzidas por processos químico-mecânicos e por processos termo-mecânicos. Na produção químico-mecânica, a matéria prima é tratada quimicamente e sujeita a tratamentos mecânicos com o intuito de promover a separação das fibras. Apesar de possuir rendimento inferior ao das pastas mecânicas (85 a 90 %), a pasta obtida apresenta maior qualidade [7]. A produção termo-mecânica envolve vapor a altas temperaturas antes do refinamento, provocando a remoção parcial das camadas exteriores das fibras, expondo desse modo as superfícies celulósicas para ligações inter-fibras [10].

As pastas químicas podem ser divididas em dois grupos principais: as de *kraft* e as de cozimento ao sulfito. Cerca de 89 % das pastas químicas são obtidas pelo processo de *kraft* e apenas 5,3 % são obtidas pelo processo ao sulfito.

No processo de *kraft*, parte da lenhina e hemiceluloses presentes nas aparas de madeira são despolimerizadas e dissolvidas através do cozimento num licor branco constituído principalmente por hidróxido de sódio (NaOH) e sulfato de sódio (Na₂SO₄). O processo ocorre a pH superior a 12 e a temperaturas entre os 160 e os 180°C, durante 0,5 a 3 horas [11]. O licor obtido após o cozimento, o licor negro, pode ser recuperado de forma a ser utilizado novamente no cozimento das madeiras. No processo ao sulfito, a lenhina da madeira é dissolvida pelo cozimento das aparas numa mistura de ácido sulfuroso (H₂SO₃) e iões bissulfureto (HSO₃⁻) [7].

1.1.2. Processo de branqueamento da pasta de celulose

As pastas obtidas através das diferentes técnicas de produção apresentam coloração e por isso podem ter de passar por processos de branqueamento adequados às características idealizadas para os produtos finais. As pastas conseguidas pelo método de *kraft* apresentam coloração acastanhada necessitando de ser branqueadas para a maioria das utilizações. Por outro lado, as pastas obtidas por processos mecânicos e por cozimento ao sulfito apresentam cores mais claras podendo ser utilizadas sem passarem pelo branqueamento, por exemplo, como papel para jornal [13].

A lenhina na madeira apresenta pouca coloração, no entanto após o cozimento, particularmente no cozimento *kraft*, é altamente colorida. A adoção de um cozimento mais prolongado para reduzir as impurezas da pasta, levaria à degradação da celulose, comprometendo desta forma a composição do produto final. O branqueamento das pastas químicas é conseguido pela remoção da lenhina residual e dos compostos cromóforos provenientes da madeira, da etapa de cozimento ou de fontes externas. É desejável que este processo seja tão seletivo quanto possível de forma a evitar a degradação dos hidratos de carbono presentes na pasta, o que conduziria à redução da qualidade da mesma [14].

O branqueamento é um processo que contempla diversas fases, alternando etapas de deslenhificação e etapas de extração do material dissolvido. A maior parte dos compostos utilizados são agentes oxidantes que reagem com a lenhina levando à produção de grupos ácidos. Desta forma, se a fase de branqueamento for realizada em meio ácido, a extração será realizada em condições alcalinas para remover os produtos ácidos insolúveis em água.

Diversos compostos à base de cloro e de oxigénio mostraram ser eficientes no branqueamento químico das pastas, uma vez que aplicados sequencialmente removem seletivamente os compostos cromóforos. Geralmente, o branqueamento é realizado em pelo menos três etapas que utilizam compostos como cloro (Cl₂), dióxido de cloro (ClO₂), peróxido de hidrogénio (H₂O₂) e ozono (O₃). A utilização de várias etapas é benéfica pois permite a redução

da quantidade de compostos químicos utilizados [10]. Cada etapa de branqueamento tem uma função específica. Desta forma, as etapas iniciais da sequência são as responsáveis pela remoção da maior parte da lenhina residual e as etapas finais são as responsáveis pela eliminação dos compostos cromóforos, aumentando desta forma a brancura da pasta. A combinação das diferentes etapas cria sequências de branqueamento que podem conter ou que não conter cloro elementar [14].

O branqueamento com cloro elementar leva à produção de grandes quantidades de compostos organoclorados. Devido à crescente preocupação com a produção destes compostos durante o branqueamento, esta técnica tem vindo a ser substituída por métodos que não utilizam cloro elementar (*elemental chlorine free – ECF*) e por métodos totalmente isentos de cloro (*total chlorine free - TCF*) [10]. Os principais compostos químicos aplicados no processo de branqueamento de pastas e respetivos símbolos encontram-se na Tabela 1.

Tabela 1 – Principais compostos químicos envolvidos no processo de branqueamento tradicional, ECF e TCF (adaptado de [10], [14]).

Tratamento Químico	Fórmula química	Abreviatura
Cloro (em meio ácido)	Cl ₂	C
Dióxido de cloro (em meio ácido)	ClO ₂	D
Hipoclorito (em meio alcalino)	NaClO	H
Deslenhificação com oxigénio (alta pressão em meio alcalino)	O ₂	O
Peróxido de hidrogénio	H ₂ O ₂	P
Ozono	O ₃	Z
Ácido peracético	CH ₃ COOOH	Paa
Extração alcalina	NaOH	E
Extração alcalina reforçada com O ₂	NaOH e O ₂	EO
Extração alcalina com adição de H ₂ O ₂ e reforçada com O ₂	NaOH, O ₂ , H ₂ O ₂	EOP
Tratamento ácido		A
Compostos quelantes	EDTA	Q

No processo de branqueamento *ECF* o ClO₂ é o único agente de branqueamento empregue que possui cloro. Este composto é utilizado em combinação com ácido sulfúrico (pH entre 2 e 3) ou em combinação com hidróxido de sódio (pH>10). Frequentemente são utilizadas sequências de branqueamento do género D₀ EOP D₁, D₀ EOP D₁ D₂ e A D₀ EOP D₁ P.

No processo *TCF*, diferentes etapas que não contêm cloro são combinadas de diversas formas, por exemplo Q P Z P, evitando desta forma a formação de compostos organoclorados nos

efluentes. Neste tipo de branqueamento os compostos mais utilizados são o peróxido de hidrogénio (P) em conjunto com o ozono (Z) e o ácido peracético (Paa) Estas etapas incluem a utilização de oxigénio, peróxido de hidrogénio, ozono, agentes quelantes, entre outros [11].

O *design* final da sequência de branqueamento depende das prioridades em relação ao custo dos produtos químicos, custos operacionais, restrições específicas do processo e do rendimento do processo de branqueamento.

1.1.3. Resíduos provenientes da produção de pasta

1.1.3.1. Características dos efluentes provenientes do branqueamento

Cada etapa de fabrico de pastas branqueadas, acarreta a produção de uma série compostos poluentes. A Tabela 2 sumaria a composição das águas residuais das principais etapas de produção de pastas branqueadas [10].

Tabela 2 – Poluentes produzidos em cada etapa de produção de pasta (adaptado de [10]).

Etapa Processual	Água residual		
	Volume	Carga poluente	Conteúdo
Preparação da matéria prima	Baixo	Baixa	Sólidos Suspensos, CBO e CQO
Produção da pasta	Baixo	Elevada	Cor, Sólidos suspensos, resinas, ácidos gordos, AOX, compostos orgânicos voláteis, CQO, CBO e compostos inorgânicos dissolvidos
Branqueamento	Elevado	Elevada	Lenhina solúvel, cor, CQO, hidratos de carbono, cloros inorgânicos, AOX, compostos orgânicos voláteis.

Os efluentes do branqueamento são os produzidos em maior quantidade e são os que trazem mais preocupações ambientais devido aos compostos tóxicos que são gerados quando são utilizados compostos à base de cloro (tais como Cl_2 e ClO_2). Durante este processo a lenhina é degradada, clorada e finalmente dissolvida no efluente, levando à produção de águas residuais acastanhadas. A quantidade de compostos organoclorados varia de acordo com o tipo de matéria prima, o número *kappa* da polpa (que indica a quantidade de lenhina presente na polpa), a sequência de branqueamento e as condições operacionais [7]. Geralmente estes efluentes são constituídos por lenhina dissolvida, hidratos de carbono, cor, compostos inorgânicos clorados (por exemplo ClO_3^-), compostos organoclorados (dioxinas, furanos, clorofenóis, etc.) e compostos

orgânicos voláteis (cloreto de metileno, dissulfeto de carbono, clorofórmio, clorometano, tricloroetano, etc.), entre outros [7].

De todos os componentes da biomassa, a lenhina é o composto mais dificilmente degradado através de meios biológicos. A lenhina é degradada durante o processo de produção de pasta em compostos de alto e de baixo peso molecular clorados e não clorados. A lenhina e os seus derivados são recalcitrantes e altamente tóxicos e são responsáveis pelos valores elevados de CQO e CBO, assim como pela cor do efluente da produção de pastas [15].

Processos que não utilizam Cl_2 como agente branqueador (*ECF* e *TCF*) geralmente produzem menores cargas de compostos orgânicos halogenados por tonelada de pasta seca, do que os métodos que utilizam este composto. A redução das descargas de compostos organoclorados através da substituição de métodos que utilizam Cl_2 por métodos *ECF* e *TCF* conduz também à diminuição da toxicidade do efluente [5]. Segundo Vidal *et al.* [5], quando a toxicidade para microrganismos metanogénicos de águas residuais é comparada, os efluentes de branqueamento que utilizam Cl_2 são altamente tóxicos, enquanto que efluente *ECF* e *TCF* são parcialmente tóxicos e não tóxicos, respetivamente.

O ClO_2 é utilizado como agente principal do branqueamento no processo de *ECF*, uma vez que apresenta elevada seletividade para remoção da lenhina. Na primeira etapa de branqueamento com ClO_2 (etapa D0), este composto reage com os componentes poliméricos da pasta gerando uma grande variedade de compostos organoclorados de diferentes massas moleculares [16]. Os compostos organoclorados são geralmente quantificados em conjunto como AOX. Esta etapa é responsável por gerar grande parte do AOX concebido durante todo o processo *ECF*. Na Tabela 3 estão sumariadas as características de um efluente da etapa D0 de branqueamento de pasta *kraft* [17].

Tabela 3 – Caracterização do efluente D0[17],[10].

Parâmetros	Efluente da etapa D₀
pH	3,9
CQO (mg·L⁻¹)	2900
SST (mg·L⁻¹)	4200
AOX (mg·L⁻¹)	24,1

Foram identificados cerca de 456 compostos diferentes nos efluentes das unidades de branqueamento de pasta e cerca de 330 desses constituintes são organoclorados. Os principais compostos AOX pertencem às famílias de clorofenóis, clorocatecois, clorobenzenos, cloroguaiacois, dibenzodioxinas cloradas e dibenzofuranos [4]. Estes compostos podem ser divididos em dois grupos: organoclorados de elevada massa molecular ($\text{MM} > 1000$ Da) e

organoclorados de baixa massa molecular ($MM < 1000$ Da). Cerca de 80 % dos compostos organoclorados possuem massa molecular superior a 1000 Da e são compostos maioritariamente hidrofílicos e não aromáticos, que geralmente são biologicamente inativos e têm reduzidas propriedades tóxicas e mutagénicas [4]. Yan e Allen [18] e Savant et al. [4] alertaram para os potenciais problemas dos restantes 20 % que possuem baixa massa molecular [10]. Parte desta fração tem capacidade de penetrar nas membranas celulares e de se acumular nos tecidos gordos dos organismos, sendo potencialmente tóxicos, mutagénicos e carcinogénicos. Alguns dos componentes maioritários desta fração são hidrossolúveis e quebrados antes ou durante o biotratamento aeróbio e/ou anaeróbio dos resíduos [14].

1.1.4. Implicações ambientais dos efluentes da indústria de pasta

Os poluentes emitidos pela indústria de produção de pasta de papel afetam a qualidade da água, do ar e da terra. Segundo a CELPA [6], em 2017 foram captados cerca de 106 milhões de m^3 de água para a indústria e mais de 85 milhões de m^3 de efluentes líquidos pré-tratados foram descarregados, no oceano, em estuários, em rios e em albufeiras. Nestes efluentes estão presentes vários compostos poluentes, tais como sólidos suspensos, compostos organoclorados, azoto e fósforo.

O efluente proveniente do branqueamento da pasta de celulose tem um efeito perceptível na qualidade da água recetora. Vários autores reportam a toxicidade destes efluentes para várias espécies de peixes [7], [19]. Os AOX contribuem para a elevada toxicidade destes efluentes. Certas dioxinas cloradas (2,3,7,8-tetraclorodibenzofurano e 2,3,7,8-tetraclorodibenzodioxina) provenientes do branqueamento, são altamente tóxicas, carcinogénicas e bioacumuláveis. Estes compostos apresentam reduzida solubilidade em água e tendem a acumular-se em elevadas concentrações em animais predadores. Os efeitos negativos das dioxinas também são válidos para a saúde dos seres humanos. Mesmo em concentrações reduzidas, as dioxinas podem levar à desregulação hormonal, a distúrbios no sistema reprodutivo e imunológico e ao desenvolvimento anormal dos fetos [4].

A exposição de peixes a clorofenóis resulta em danos hepáticos, alterações no sistema enzimático e no ciclo metabólico e pode provocar malformações na coluna vertebral e subdesenvolvimento das gonadas. Os clorocatecois são altamente mutagénicos e os cloroguaiacóis são conhecidos por se acumularem nas cadeias alimentares. Os clorobenzenos são carcinogénicos, causam múltiplos efeitos no sistema nervoso central e têm efeitos adversos nos pulmões, conduzem à degeneração renal e à porfíria [14].

Devido a todos os efeitos adversos da deposição destas águas residuais em ambientes aquáticos foram implementadas regras que limitam as descargas industriais destes compostos poluentes. Por este motivo, as empresas deste setor são obrigadas a possuir uma licença ambiental. As licenças ambientais baseiam-se em documentos de referência, denominados de BREF, que

definem as Melhores Técnicas Disponíveis. O BREF atualmente em vigor estabelece que o limite máximo das emissões de AOX em efluentes de produção de pasta *kraft* branqueada é de 0,2 kg·ton⁻¹ de pasta seca ao ar [20].

Na Tabela 4 são apresentados os valores de CQO, sólidos suspensos totais (SST) e AOX do BREF e da licença ambiental atribuída pela Agência Portuguesa do Ambiente a uma fábrica de pasta *kraft* para papel. Um dos objetivos das empresas deste setor passa por diminuir da carga de poluentes nos efluentes, nomeadamente CQO e AOX [21].

Tabela 4 –Valores de referência de emissão de CQO, SST e AOX segundo o BREF [21] e exemplo dos valores máximos de emissão segundo o licenciamento ambiental de uma empresa de pastas e papel [22].

Parâmetro	Valor (kg·ton ⁻¹ de pasta)	
	BREF	Empresa
CQO	7 a 20	20
SST	0,3 a 1,5	1,3
AOX	0 a 0,20	0,24

A rotulagem ambiental é uma ferramenta de mercado que tem como objetivo estimular a oferta e a procura de produtos com baixo impacte ambiental, colaborando assim para o desenvolvimento sustentável. Este rótulo possibilita a comunicação do desempenho ambiental do produto e guia o comprador para escolhas de mercado mais sustentáveis, indicando quais os produtos com menor impacto ambiental, em comparação com produtos destinados ao mesmo fim. Desta forma, o rótulo ecológico é considerado um método de marketing para as empresas [23]. Em 2019, a União Europeia implementou a atribuição do rótulo ecológico às pastas com branqueamento *ECF* em que, entre outros critérios, a quantidade de AOX emitida durante a produção seja inferior a 0,17 kg·ton⁻¹ de pasta. Segundo o mesmo documento, o valor de referência de CQO emitida devido à produção de pastas branqueadas *kraft* é de 16 kg·ton⁻¹ de pasta [24].

Ao longo dos anos têm vindo a ser descritos vários métodos físicos-químicos, eletroquímicos, enzimáticos e biológicos (aeróbios e anaeróbios), capazes de degradar os vários compostos poluentes (AOX, CQO, CBO, SST, etc.) presentes nestes efluentes. No entanto é necessário continuar a desenvolver métodos para que as emissões de compostos poluentes sejam cada vez menores.

1.2. Métodos de tratamento de compostos recalcitrantes

Os efeitos nefastos dos compostos recalcitrantes têm levado à imposição de normas regulamentadoras das descargas de AOX no meio ambiente. Apesar dos métodos de produção de pastas de papel terem vindo a ser desenvolvidos para evitar a produção destes compostos, vários

poluentes continuam a ser encontrados nos efluentes industriais. Métodos físicos, químicos e biológicos têm sido desenvolvidos para potenciar a degradação de AOX.

1.2.1. Tratamentos físicos e químicos

Durante as duas últimas décadas, tem sido documentada a capacidade de vários processos físico-químicos para a remoção de compostos tóxicos e sólidos suspensos de águas residuais geradas nas unidades de produção de pasta e de papel [8]. Alguns desses métodos são a adsorção e coagulação, métodos oxidativos, a utilização de membranas e a oxidação supercrítica da água.

A adsorção é uma técnica usada para a remoção de substâncias que estão em solução, acumulando-as numa fase sólida. [25]. Processos de adsorção são geralmente utilizados para a remoção de cor, CQO e de AOX. Estes processos são bastante dispendiosos, no entanto a utilização de carvão ativado, Terra *Fuller* e de cinzas volantes como adsorventes, têm demonstrado elevados rendimento na remoção de cor [7]. Shawwa *et al.* [26] reportou o uso de carvão ativado para a remoção de cor, CQO e AOX de efluentes de branqueamento de pasta, com eficiência superior a 90 %. Xilei *et al.* [27] propuseram a combinação de tratamentos de adsorção e de coagulação, para a remoção da coloração e de CQO. Estes autores reportaram eficiências de 60,87 % e 41,38 % de remoção de CQO e de coloração, respetivamente.

Möbius e Helble [28] propuseram o tratamento de efluentes de indústria de pasta através da combinação da ozonização e da biodegradação em reator de biofilme. Através deste método foi alcançada simultaneamente uma extensa eliminação de CQO, AOX e cor. Foram obtidas taxas de eliminação de CQO de até 60 % e 85 %, em processos de uma e de duas etapas, respetivamente. A qualidade do efluente tratado por este método atende às necessidades de água doce para a maioria dos processos de produção de papel.

Segundo Moiseev *et al.* [29], a tecnologia de oxidação foto-catalítica é promissora na destruição de compostos recalcitrantes ou inibidores. A remoção de AOX por métodos fotocatalíticos foi também relatada por Uğurlu e Karaoğlu [30]. Estes autores estudaram a remoção de AOX, azoto total e lenhina clorada em efluentes provenientes da produção de pasta *kraft* branqueada. Através da oxidação por radiação UV na presença de H₂O₂ e utilizando dióxido de titânio (TiO₂) como fotocatalisador, os autores obtiveram um rendimento de aproximadamente 100 % na remoção de AOX.

Têm sido desenvolvidas várias tecnologias que utilizam membranas para o tratamento de águas residuais provenientes da indústria da pasta [8]. Yao *et al.* [31] obtiveram a redução de 99 % de AOX através de ultrafiltração e de nanofiltração de efluentes do branqueamento de pastas *kraft*. A osmose reversa com pressões na gama de 3,5 a 5,5 MPa ou superior também pode ser útil para a remoção de AOX [4]. Seiss e Neissner [32] estudaram a combinação do tratamento de degradação oxidativa UV e com a remoção de iões cloreto das águas residuais através de diálise.

Nesse estudo, foi demonstrado que a remoção dos íons cloreto levou ao aumento da degradação da CQO total (CQOt) e de AOX.

Apesar das elevadas eficiências de remoção apresentadas, os processos com membranas requerem pré-tratamentos e técnicas dispendiosas. Além disso, a incrustação das membranas utilizadas é outro problema associado a estes métodos [4].

A oxidação supercrítica da água tem sido também sugerida para a remoção de AOX. A corrente residual pressurizada é aquecida com um oxidante a uma temperatura acima do ponto crítico da água (374°C), o que permite a oxidação total dos resíduos orgânicos. Esta técnica foi testada em vários efluentes de indústria de pastas, entre eles misturas de efluentes de branqueamento *kraft*, tendo sido obtido um rendimento de remoção de 99,99 %. No entanto, o tratamento acarreta elevados custos operacionais devido à tecnologia subdesenvolvida e a reações colaterais indesejáveis [4].

1.2.2. Tratamentos biológicos

i) Tratamentos aeróbios

A oxidação biológica é a técnica mais amplamente utilizada para remover a CBO de águas residuais. Esta técnica permite a oxidação completa dos compostos orgânicos em CO₂ e água [4]. Para a aplicação de tratamentos aeróbios é necessário que esteja disponível oxigênio molecular suficiente para a oxidação biológica dos compostos poluentes uma vez que a taxa de degradação destes compostos é proporcional ao O₂ dissolvido disponível. Portanto, a necessidade de oxigenação dos processos requer elevada quantidade de energia o que os torna dispendiosos [4].

O processo de lama ativada tem sido o principal método de tratamento aplicado em efluentes de pasta de papel. Em biorreatores de lama ativada, substâncias orgânicas, nutrientes, compostos tóxicos e patogênicos são removidos eficientemente por comunidades aeróbias heterotróficas [10]. Gergov *et al* investigaram a eficiência de remoção de compostos poluentes através deste método, obtendo um rendimento de 48 a 65 % de remoção de AOX [4].

Pokhrel e Viraraghavan [7] reviram estudos sobre o desempenho de lagoas arejadas no tratamento de efluentes de fábricas de pasta e papel. Estes autores concluíram que tais métodos foram eficientes na remoção de mais de 95 % de CBO, de 85 % de compostos fenólicos, de 60 a 70 % de CQO e de cerca de 50 % de AOX, na maioria dos resultados relatados.

A utilização de fungos tem vindo a ser reportada para a redução de CQO, de CBO e de cor, com simultânea remoção de compostos clorados. Devido à degradação ser geralmente incompleta, este processo requer associação bacteriana subsequente para mineralização completa dos poluentes.

ii) Tratamentos anaeróbios

O uso do tratamento anaeróbio na indústria de celulose de papel começou na década de 1970. Desde então, várias configurações diferentes de reatores têm sido definidas para o tratamento anaeróbio de águas residuais. Algumas destas configurações são: lagoa anaeróbia, processo anaeróbio de contacto, filtro anaeróbio, reator anaeróbio de manta de fluxo ascendente (*Upflow Anaerobic Sludge Blanket – UASB*), reator de leito fluidizado, reator de leito granular expandido, reator de circulação interna, reator anaeróbio compartimentado, acoplamento de membrana de alta taxa e reator perfeitamente agitado (*Continuous Stirred-Tank Reactor – CSTR*) [9].

A digestão anaeróbia mostra ser uma tecnologia vantajosa, quando comparada com as tecnologias aeróbias. Algumas dessas vantagens são a utilização de menor quantidade de energia, uma vez que não há a necessidade de arejamento, a produção de energia na forma de CH_4 , a produção de menor quantidade de biomassa e conseqüentemente a menor necessidade de nutrientes, a possível aplicação de maiores cargas orgânicas, permitindo o uso de reatores de menor volume e a possibilidade de transformar vários solventes perigosos tais como clorofórmio, tricloroetano e tricloroetileno em formas mais biodegradáveis.

A eficiência do tratamento de efluentes da indústria de pastas através de digestão anaeróbia é discutida na secção 1.4.

1.3. Processo de digestão anaeróbia

A digestão anaeróbia tem sido vista como uma solução para algumas preocupações ambientais e como um recurso energético para a demanda do atual estilo de vida. Na Europa, em 2015, existiam mais de 17000 unidades de produção de biogás através de digestão anaeróbia de resíduos agrícolas, lamas provenientes do tratamento de esgotos, resíduos de aterros e outros tipos de resíduos [33].

1.3.1. Fundamentos

A digestão anaeróbia consiste na oxidação biológica de matéria orgânica através da ação de vários grupos tróficos dos reinos *Archaea* e *Bacteria* que interagem de forma equilibrada e coordenada na ausência de oxigênio molecular. Neste processo, matéria orgânica complexa é convertida em biogás, nutrientes e material celular. Tipicamente, o biogás é constituído por CH_4 (55 % a 70 %), dióxido de carbono (30 % a 45 %) e por quantidades vestigiais de vapor de água e ácido sulfídrico (H_2S). Esta composição varia de acordo com a composição e a biodegradabilidade da matéria orgânica a tratar [34].

A digestão anaeróbia pode ser dividida em quatro etapas principais de degradação, representadas na Figura 2, sendo que os produtos de um grupo de microrganismos servem como

substrato para o grupo seguinte. As etapas da digestão anaeróbia são: a hidrólise, a acidogênese, a acetogênese e a metanogênese.

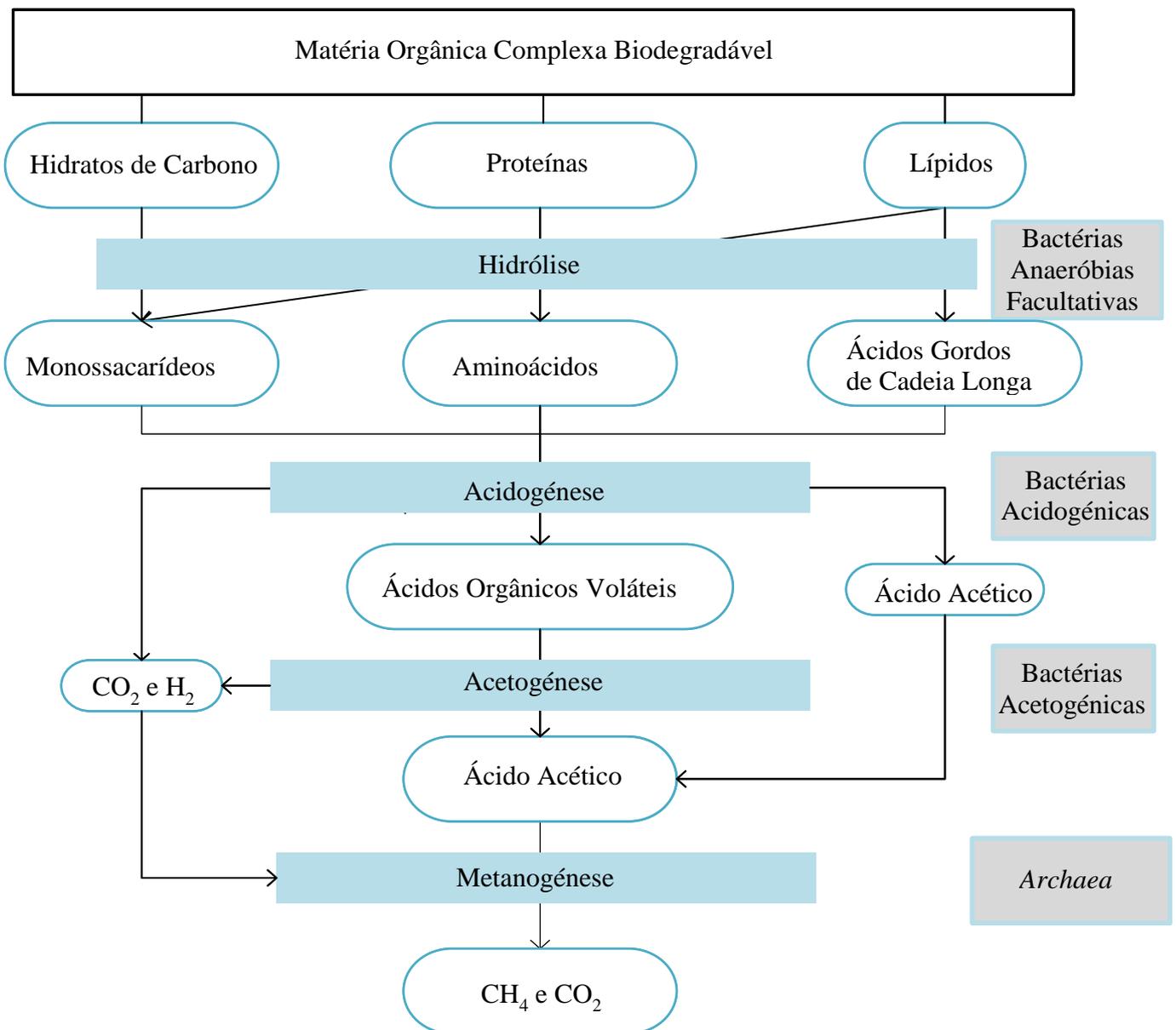


Figura 2 – Esquema geral da digestão anaeróbia (adaptado de [9]).

Durante a **hidrólise**, a primeira etapa da digestão anaeróbia, polímeros complexos tais como proteínas, polissacarídeos e ácidos gordos, são degradados a monómero solúveis por exoenzimas hidrolíticas. As exoenzimas excretadas pelas bactérias hidrolíticas degradam as proteínas em poli(peptídeos), os polissacarídeos em mono e dissacarídeos, e os lípidos em ácidos gordos de cadeia longa e glicerol. Esta degradação é necessária uma vez que as bactérias acetogênicas e metanogênicas são incapazes de utilizar os substratos complexos como fonte de carbono e de energia. Desta forma, a hidrólise é essencial para aumentar a biodisponibilidade dos substratos [34].

Alguns dos microrganismos hidrolíticos que se destacam durante a digestão anaeróbia por serem capazes de produzir enzimas extracelulares hidrolíticas que atacam os substratos mais complexos são dos seguintes gêneros: *Clostridium*, *Proteus*, *Peptococcus*, *Bacteroides*, *Bacillus* e *Vibrio*, na produção de proteases; *Clostridium*, *Acetovibrio* e *Staphylococcus*, na produção de celulases, hemicelulases, xilanases e amilases; e *Clostridium*, *Micrococcus* e *Staphylococcus* na produção de lipases e fosfolipases [35].

A taxa de decomposição dos efluentes a tratar depende da sua natureza. Por exemplo, a degradação de celuloses e hemicelulose é geralmente mais lenta do que a hidrólise de proteínas [36]. Além disso, nem toda a matéria orgânica é biodegradável existindo frações particuladas e/ou solúveis que são anaerobicamente inertes [37].

Na **acidogênese**, os compostos solúveis resultantes da fase hidrolítica (aminoácidos, ácidos gordos de cadeia longa e açúcares) são metabolizados por bactérias acidogênicas, que excretam substâncias mais simples tais como ácidos orgânicos voláteis (AOV) de cadeia curta (entre eles, ácido acético, propanoico e butírico), álcoois (metanol e etanol), CO₂ e H₂.

A acidogênese é desempenhada por um diversificado grupo de bactérias anaeróbias obrigatórias e facultativas, pertencentes aos gêneros *Clostridium*, *Bacteroides*, *Ruminococcus*, *Butyribacterium*, *Propionibacterium*, *Eubacterium*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Pseudomonas*, *Desulfobacter*, *Micrococcus*, *Bacillus* e *Escherichia* [35], [37]. Os produtos gerados nesta fase são importantes substratos para os microrganismos acetogênicos e metanogênicos.

Durante a **acetogênese**, as bactérias acetogênicas são responsáveis pela produção de acetato, CO₂ e H₂, compostos eficientemente metabolizáveis por microrganismos metanogênicos, durante a etapa final da digestão anaeróbia. Com base no metabolismo, as bactérias acetogênicas podem ser divididas em dois grupos: as acetogênicas sintróficas (produtoras obrigatórias de H₂) e as homoacetogênicas [38].

As bactérias acetogênicas sintróficas (produtoras obrigatórias de H₂) convertem os ácidos orgânicos intermediários (ácido propiônico e butírico), álcoois e outros ácidos orgânicos maiores (ácido valérico, isovalérico e palmítico) em acetato, H₂ e CO₂ [38]. As transformações acetogênicas realizadas por bactérias sintróficas são termodinamicamente desfavoráveis quando a pressão parcial de H₂ é superior a 10⁻⁴ atm. Devido à relação de simbiose mantida com *Archaea* metanogênicas consumidoras de H₂, os ambientes metanogênicos asseguram concentrações de H₂ suficientemente baixas para o crescimento das bactérias acetogênicas, evitando-se assim a acumulação de ácidos [34]. Os microrganismos deste grupo que foram identificados são dos gêneros *Syntrophomonas* e *Syntrophobacter* [35].

As bactérias homoacetogênicas são microrganismos anaeróbios obrigatórios que reduzem constantemente o H₂ e CO₂ presentes no meio a ácido acético. Os microrganismos

homoacetogénicos identificados pertencem aos géneros: *Acetobacterium*, *Acetoanaerobium*, *Thermoanaerobacter*, *Clostridium* e *Pelobacter* [38].

O CH₄ é um subproduto metabólico de microrganismos pertencentes ao reino *Archaea* [37]. Estes microrganismos anaeróbios obrigatórios produzem CH₄ a partir de acetato, H₂ e CO₂. Sem a metanogénese, a rutura final do material orgânico não ocorreria, havendo a acumulação dos produtos finais das bactérias acetogénicas [35].

A **metanogénese** é a etapa mais lenta no processo de digestão anaeróbia. Os microrganismos metanogénicos são mais ativos na gama de pH entre 6,5 8,0 e sensíveis em ambientes pouco protegidos contra a acidificação causada pelos produtos das bactérias acidogénicas e acetogénicas. De acordo com a especificidade do substrato, os metanogénicos são divididos em três grupos: os metanogénicos acetoclásticos, os hidrogenotróficos e metilotróficos [35].

Os microrganismos metanogénicos acetoclásticos são de grande importância na produção de biogás uma vez que são responsáveis pela produção de cerca de 70 % do CH₄ do digestor através da quebra do ácido acético (Equação 1 – Tabela 5). Cerca de 30 % do CH₄ gerado em digestores anaeróbios é produzido por microrganismos metanogénicos hidrogenotróficos. Estes microrganismos metanogénicos produzem CH₄ através da redução do CO₂, utilizando H₂ [38],[39]. Ao converterem o CO₂ em CH₄, estes microrganismos ajudam a manter a pressão parcial de H₂ no digestor que é requerida pelas bactérias acetogénicas. Os metanogénicos metilotróficos crescem em substratos que contêm grupos metil (-CH₃), por exemplo, metanol (CH₃OH) e metilaminas ((CH₃)₃-N) (Equações 4 e 5 da Tabela 5 , respetivamente).

Os microrganismos metanogénicos estão divididos em cinco ordens diferentes: *Methanosarcinales*, *Methanobacteriales*, *Methanococcales*, *Methanomicrobiales* e *Methanopyrales* (Tabela 5).

Tabela 5 - Ordens de microrganismos produtores de CH₄ e respetivos substratos [40].

Grupo	Ordens	Reações	
Acetoclásticos	<i>Methanosarcinales</i>	$\text{CH}_3\text{COOH} \rightarrow \text{CH}_4 + \text{C}_2\text{O}$	(1)
Hidrogenotróficos	<i>Methanosarcinales</i>	$\text{CO}_2 + 4\text{H}_2 \rightarrow \text{CH}_4 + 2\text{H}_2\text{O}$	(2)
	<i>Methanobacteriales</i>	$4 \text{HCOOH} \rightarrow \text{CH}_4 + 3\text{CO}_2 + 2\text{H}_2\text{O}$	(3)
	<i>Methanococcales</i>		
	<i>Methanomicrobiales</i>		
	<i>Methanopyrales</i>		
Metilotróficos	<i>Methanosarcinales</i>	$4\text{CH}_3\text{OH} \rightarrow 3\text{CH}_4 + \text{CO}_2 + 2\text{H}_2\text{O}$	(4)
		$4(\text{CH}_3)_3 - \text{N} + 6\text{H}_2\text{O} \rightarrow 9\text{CH}_4 + 3\text{CO}_2 + 4\text{NH}_3$	(5)

1.3.2. Fatores ambientais e parâmetros operacionais de controle

O metabolismo microbiano do consórcio anaeróbio é determinado direta ou indiretamente por diversos parâmetros físicos e químicos e por isso, para que o tratamento do resíduo seja otimizado, é necessário ter em conta e controlar diversas variáveis [34], [41]. O pH, a alcalinidade, a temperatura, nutrientes, agitação, relação carbono/azoto (C/N) e a presença de compostos inibitórios são alguns dos parâmetros que afetam as taxas de conversão das etapas da digestão anaeróbia.

i) pH

O pH é um parâmetro importante na digestão anaeróbia uma vez que afeta a cinética das reações químicas e a taxa de crescimento de microrganismos alterando a constituição dos consórcios microbianos. Desta forma cada grupo de microrganismos apresenta uma gama de pH ótimo de funcionamento. Por este motivo, a digestão anaeróbia é muito sensível às variações de pH do sistema.

O pH na digestão anaeróbia deve de ser mantido entre 6,8 e 7,4 [42]. Em termos de gamas de pH ótimo de funcionamento, os microrganismos envolvidos na digestão anaeróbia podem ser divididos em dois grupos: *Archaeas* metanogénicas e bactérias acidogénicas. A gama de pH ótima para os microrganismos metanogénicos demonstrou ser entre 6,5 e 7,5 e para os acidogénicos entre 5,5 e 6,5. Em culturas mistas geralmente o pH operacional utilizado é entre 6,8 a 7,2, sendo o pH neutro o ótimo de forma a não comprometer a metanogénese [43], [34]. De acordo com Leitão *et al.* [44], a atividade metanogénica é significativamente reduzida a pH inferior a 6,3.

ii) Alcalinidade

A produção de ácidos orgânicos durante a acetogénese provoca a diminuição do pH do sistema. No entanto, é essencial manter o pH numa gama neutra (entre 6,8 e 7,2) ótima para a atividade dos microrganismos. Desta forma, a alcalinidade no sistema deve de ser suficiente para neutralizar os ácidos gerados durante o metabolismo. A pH entre 6,5 e 7,5 é a alcalinidade do bicarbonato que determina a capacidade tampão do sistema [34].

Um sistema de digestão anaeróbia tem a sua própria capacidade de tamponamento contra as variações bruscas de pH. O CO₂ proveniente da degradação da matéria orgânica reage com os iões de amónia libertados durante a degradação das proteínas e com os catiões provenientes da metabolização dos ácidos orgânicos, para a produção de bicarbonatos. No entanto, os álcoois e os açúcares são compostos neutros e por isso não formam catiões para neutralizar os ácidos produzidos durante o metabolismo. Por esta razão é necessário adicionar alcalinidade ao digestor, sendo geralmente utilizado bicarbonato de sódio [45]. Para a maioria dos casos práticos, uma alcalinidade entre 2500 e 5000 mg de CaCO₃·L⁻¹ é suficiente para se obter um adequado poder tampão do sistema [34].

iii) Temperatura

O processo de digestão anaeróbia, tal como outros processos biológicos é altamente influenciado pela temperatura. Geralmente são consideradas três gamas diferentes de temperatura: a psicrófila (entre 5 e 15°C), a mesófila (entre 30 e 35°C) e a termófila (entre 50 e 60°C). Os microrganismos anaeróbios estão mais ativos a temperaturas mesófilas e termófilas, sendo que baixas temperaturas processuais resultam em baixo crescimento microbiano, reduzidas taxas de utilização de substratos e, conseqüentemente, reduzida produção de biogás [46]. Por outro lado, condições termófilas possibilitam maior remoção de CQO e produção de biogás rico em CH₄. A condições termófilas a taxa de crescimento microbiano máximo é maior, o que conduz a maior eficiência na degradação da matéria orgânica, na remoção da cor e na capacidade de desinfecção em menor tempo de operação [9].

A temperaturas entre os 40 e 50°C, os microrganismos produtores de CH₄ podem ter a sua ação inibida, resultando no decréscimo da produção de biogás, rico em CH₄. Além disso, as alterações e flutuações de temperatura devem de ser evitadas pois podem afetar negativamente a produção de biogás.

O método anaeróbio sob condições termófilas oferece potencialidades atraentes para o tratamento de efluentes da indústria de pasta e papel, uma vez que permite a aplicação de maiores cargas orgânicas e elimina a necessidade de arrefecimento do efluente [45].

iv) Nutrientes

As necessidades nutricionais das bactérias anaeróbias são de suma importância, pois os nutrientes suprem as necessidades básicas do crescimento celular e asseguram que as células sejam capazes de sintetizar as enzimas e cofatores que impulsionam as reações bioquímicas e metabólicas. É essencial que tanto os macro como os micronutrientes estejam presentes e disponíveis no ambiente de crescimento. Idealmente, os níveis de nutrientes devem exceder a concentração ideal necessária, pois os microrganismos anaeróbios podem ser severamente inibidos até mesmo por pequenas deficiências nutricionais. Por outro lado, quando presentes em altas concentrações, os nutrientes essenciais podem tornar-se tóxicos [35]. As concentrações estimuladoras e inibitórias variam significativamente entre estudos devido a vários fatores tais como, abundância, a composição e o tempo de adaptação do consórcio anaeróbio, a biodisponibilidade dos metais que está dependente do pH, potencial redox e presença de compostos quelantes, que podem alterar a sua estrutura química, e os efeitos antagônicos e sinérgicos entre os elementos [47].

Todos os processos microbianos requerem concentrações suficientes de macro (azoto (N), fósforo (P) e enxofre (S)) e de micro nutrientes (cobalto (Co), ferro (Fe), níquel (Ni), enxofre (S), selênio (Se), tungstênio (W) e molibdênio (Mo)) para suportar a síntese de biomassa e assegurar a eficiência da digestão dos resíduos e efluentes [9].

Se o efluente a tratar não possuir as concentrações requeridas destes nutrientes, então será necessário adicioná-los ao digestor. A necessidade de nutrientes varia de acordo com a carga orgânica. Frequentemente, para efluentes com cargas orgânicas elevadas é adicionado N e P na proporção 1000:7:1 (CQO:N:P) e para efluentes com cargas orgânicas baixas são adicionados na proporção 350:7:1 [42].

v) **Agitação**

A maioria dos digestores anaeróbios são agitados para potenciar a transferência do material orgânico para a biomassa microbiana, para libertar as bolhas de gás presas no meio e para evitar a sedimentação de materiais particulados mais densos [42].

vi) **Relação C/N**

A relação C/N considerada ótima para o processo anaeróbio varia entre 20 e 30. Valores de pelo menos 25:1 são sugeridos para a produção de ótima de biogás. Quando o rácio C/N é muito elevado, os microrganismos metanogénicos consomem rapidamente o azoto presente no meio durante a síntese proteica. No entanto se o rácio C/N for muito baixo, o azoto é libertado e acumulado como ião amónio (NH_4), levando ao aumento do pH, o que poderá levar à inibição da população metanogénica.

vii) **Inibição**

De todo o consórcio microbiano da digestão anaeróbia, os microrganismos metanogénicos são os mais sensíveis à presença de compostos tóxicos. A presença de substâncias inibitórias perturba a digestão anaeróbia podendo mesmo levar à falha do reator. Os compostos inibitórios incluem compostos de enxofre inorgânicos (sulfato, sulfito e sulfureto), oxidantes (p.e. H_2O_2), compostos orgânicos de baixo peso molecular, constituintes da madeira entre outros [45].

Em tratamentos anaeróbios, a presença de **enxofre** inorgânico pode inibir a produção de CH_4 . As bactérias redutoras de sulfato competem com os microrganismos metanogénicos pelos substratos disponíveis tais como hidrogénio, acetato e metanol e com as bactérias acetogénicas por compostos como propionato. Estas reações realizadas pelas bactérias redutoras de sulfato são termodinamicamente mais favoráveis do que as reações metabolizadas pelos microrganismos metanogénicos e acetogénicos. Além disso, o sulfeto de hidrogénio formado na metabolização do acetato, propionato, butirato e lactato pelas bactérias redutoras de sulfato é tóxico, inibe a atividade metanogénica, é corrosivo e contribui para a CQO do efluente [41], [45], [48]. Desta forma a presença de enxofre inorgânico pode conduzir à redução da produção de CH_4 .

Os microrganismos metanogénicos são anaeróbios obrigatórios sendo que o oxigénio e outros **oxidantes** presentes nos efluentes são altamente tóxicos para os microrganismos metanogénicos. As pastas mecânicas são frequentemente branqueadas através de H_2O_2 . Embora

o H_2O_2 seja considerado tóxico para as bactérias em geral, é especialmente tóxico para os microrganismos metanogénicos por estes não possuírem a enzima catalase responsável pela decomposição deste composto. As bactérias acidogénicas produzem esta enzima. Desta forma, a remoção do H_2O_2 pode ser efetuada através da separação física das fases acidogénicas e metanogénicas [45].

Normalmente, **compostos orgânicos de baixo peso molecular**, tais como ácidos orgânicos voláteis, açúcares e álcoois são gerados em alta quantidade durante a produção de pastas de papel. Estes compostos podem inibir o processo de digestão anaeróbia [45]. Geralmente os ácidos não dissociados têm efeito inibitório, uma vez que penetram nas células e provocam desnaturação de proteínas [41]. A presença de AOV conduz à acidificação do meio, podendo provocar a inibição dos microrganismos metanogénicos quando a concentração destes compostos é superior a $1500 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$. Desta forma, deve de ser realizada a monitorização periódica do conteúdo de AOV no reator para detetar e corrigir eventuais problemas, evitando assim que ocorra a falha do processo [45].

Dependendo da concentração em que se encontram nas águas residuais, os **extrativos da madeira**, tais como ácidos resinosos, ácidos gordos de cadeia longa, lenhina, terpenos voláteis e taninos também inibem a digestão anaeróbia.

Os **compostos que contêm cloro**, tais como os AOX, são tóxicos para a comunidade microbiana. Segundo Ferguson *et al.*, em escala laboratorial, concentrações de AOX acima de $100 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ têm efeito tóxico para consórcios microbianos anaeróbios, levando à diminuição da produção de biogás [49].

1.3.3. Potencial de biodegradabilidade anaeróbia

A biodegradabilidade anaeróbia é definida como a fração de compostos orgânicos presentes no substrato que, sob condições anaeróbias, pode ser convertida em biogás [50].

O potencial de biodegradabilidade anaeróbia é determinado através da quantidade de substrato gasto, através da quantidade de compostos intermediários produzidos (tais como AOV) ou através do volume de biogás produzido pelo consórcio microbiano. A maioria dos métodos de determinação do potencial de biodegradabilidade baseia-se na medição da produção de biogás. A medição da produção deste produto final pode ser realizada pela determinação do aumento do volume a pressão constante (métodos volumétricos), pela determinação do aumento de pressão a volume constante (métodos manométricos) ou pela determinação da formação de CH_4 através de cromatografia gasosa [51].

Os testes de biodegradabilidade podem ser realizados através de métodos descontínuos (*batch*) e de métodos contínuos. Em reatores *batch* o substrato é incubado com o inóculo anaeróbio em condições operacionais e ambientais definidas e a avaliação do grau de degradação do substrato é realizada em intervalos de tempo pré-definidos. Os métodos contínuos são

realizados em reatores perfeitamente agitados operados a temperatura específica e com diferentes tempos de retenção hidráulicos. Após o estado estacionário ser alcançado, o efluente é analisado de forma a determinar a taxa de biodegradabilidade alcançada.

Estes tipos de protocolos são realizados para a definição clara de todos os parâmetros que podem afetar significativamente os resultados dos ensaios de digestão anaeróbia tais como a temperatura, pH, agitação, substratos e relação substrato/inóculo [52].

1.4. Digestão anaeróbia de efluentes de branqueamento da indústria papelreira

Vários tipos de configurações de digestores anaeróbios para degradação de efluentes da indústria das pastas têm vindo a ser relatados na literatura.

Chaparro et.al. [53] estudaram a eficiência de remoção de matéria orgânica e a diminuição dos efeitos tóxicos e mutagénicos do efluente de branqueamento *ECF* de pasta *kraft* tratado através de digestão anaeróbia. A eficiência de remoção de matéria orgânica medida em CQO variou entre 45 % e 55 % e a remoção de AOX variou entre 40 % e 45 %. Os efeitos tóxicos e crónicos agudos, bem como os efeitos citotóxico, genotóxico e mutagénicos, diminuíram à medida que a fração biodegradável dos compostos orgânicos foi removida. Estes resultados, juntamente com a medição da carga orgânica dos efluentes do tratamento anaeróbio, indicam que esses efluentes são recalcitrantes, mas não tóxicos.

Larsson et al. [54] estudaram a digestão anaeróbia de águas residuais de branqueamento *ECF* de pastas *kraft* em dois reatores anaeróbios mesófilos. Num deles utilizaram efluentes provenientes da produção de pasta *kraft* a partir de eucalipto e no outro a partir de pinho. Obtiveram maiores produções de CH_4 no reator com efluentes derivados da produção com eucalipto ($200 \text{ NmL} \cdot \text{g-COT}_{\text{adicionado}}^{-1}$) do que com pinho ($100 \text{ NmL} \cdot \text{g-COT}_{\text{adicionado}}^{-1}$). Obtiveram remoções de COT (carbono orgânico total) filtrado de 60 % e de 43 % nos efluentes derivados da produção de pastas branqueadas a partir de eucalipto e de pinho, respetivamente.

Buzzini *et al.* [55] investigaram o desempenho de um sistema *UASB* para o tratamento de efluentes simulados provenientes da produção pasta de celulose branqueada e não branqueada. Estes autores obtiveram taxas de remoção média de CQO e de compostos organoclorados de 76 % e 99,7 %, respetivamente, no tratamento de resíduos simulados. Não foram observados efeitos inibitórios dos compostos organoclorados na remoção de CQO.

A desalogenação termófila foi reportada por vários autores. Lepisto e Rintala [56] utilizaram quatro tipos de reatores anaeróbios em condições termófilas (55°C) para a remoção de compostos fenólicos clorados de efluentes de branqueamento de pasta *kraft* com cloro. Estes autores utilizaram reatores *UASB*, reatores *UASB* enriquecidos com sulfato, reatores *UASB* com recirculação e um digestor de leito fixo com recirculação, obtendo eficiências de remoção de cerca de 80 a 95 % dos fenóis clorados, catecóis, guaiacóis e hidroquinonas. Todos os digestores

utilizados por estes autores removeram entre 30 % e 70 % da CQO e entre 25 % e 67 % do AOX presente no efluente testado.

A flexibilidade metabólica dos microrganismos e as associações sintróficas nos processos anaeróbios criam um ambiente competitivo no sistema. Vários grupos microbianos podem competir por substratos como doadores de elétrons e fontes de carbono disponíveis, e a dominância de um ou mais grupos é influenciada por um grande número de fatores bioquímicos e operacionais, tais como CQO, pH, a temperatura, parâmetros enzimáticos, entre outros.

Fitzsimons *et al.* [16] estudaram a influência da adição de fontes de carbono prontamente metabolizáveis na remoção anaeróbia de compostos clorados de elevada massa molecular em efluentes provenientes de plantas de branqueamento de pastas *kraft* com cloro. Este autor estudou o efeito da adição de glucose, formato, acetato e metanol aos reatores. Segundo os resultados obtidos, a remoção de CQO em meios enriquecidos com acetato e metanol é mais eficiente do que realização do mesmo procedimento com glucose, formato e sem a adição de fonte de carbono. Em relação à remoção de AOX, foi reportado que a utilização de acetato como fonte de carbono adicional foi mais eficiente (redução ~20 % do AOX inicial) do que em qualquer outro caso em que a eficiência foi aproximadamente 14 % [16].

Ali e Sreekrishnan *et al.* [57] estudaram o tratamento anaeróbio num sistema *batch* de efluentes de branqueamento de polpa proveniente de resíduos agrícolas (mistura de bagaço, arroz e palha). Reportaram o aumento da degradação de AOX e CQO quando o efluente a tratar foi suplementado com glucose. Segundo estes autores, a adição de 1 % m/V de glucose gerou um rendimento de 76 % em CH₄ e a redução de 73 % de AOX e 66 % de CQO. Nos ensaios realizados sem a adição de suplemento de carbono, verificou-se um rendimento em CH₄ de 27 % e uma remoção de CQO de 31 %. Estas observações indicam que quando expostas o tempo suficiente e com o suplemento adequado, os microrganismos anaeróbios são capazes de resistir aos compostos recalcitrantes e inibitórios e de os degradar [57].

Deshmukh *et al.* [58] relataram a degradação de AOX a partir de um efluente de branqueamento de pastas com cloro elementar usando um filtro anaeróbio com fluxo ascendente. Foram observadas taxas de remoção de AOX de 88 % e de 28 % nas concentrações iniciais de 28 e 42 mg de AOX · L⁻¹, respetivamente, com tempo de retenção hidráulico de 20 dias. No mesmo trabalho [58], descreveram o efeito da utilização de glucose e acetato como aceitadores de elétrons na remoção de AOX e reportaram ainda que em efluentes com 28 mg AOX·L⁻¹, a adição de glucose, e de uma mistura de acetato e glucose induziu ao aumento da eficiência de remoção de AOX para 91, 90 e 93 %, respetivamente. Da mesma forma, em efluentes com 48 mg AOX·L⁻¹, a adição de glucose, acetato e de glucose e acetato induziu ao aumento da eficiência para 57, 56,6 e 79,6 %, respetivamente. Os resultados revelaram uma melhoria significativa na degradação de AOX quando o efluente de branqueamento de pasta foi suplementado com acetato e glucose, e ambos.

Estes estudos demonstram que a adição de aceitadores de eletrões e de fontes de carbono prontamente disponíveis ao reator aumentam a eficiência do tratamento das águas residuais. Resíduos provenientes das indústrias de pasta podem ser co-digeridos com outros resíduos industriais ou alimentares, de forma a ajustar o rácio C/N. Por exemplo, resíduos da produção de glutamato monossódico e resíduos alimentares foram utilizados como co-substrato no tratamento de lamas do processo de produção de pasta de papel [58].

Ekstrand *et al.* [11] estudaram o potencial de CH₄ de 62 águas residuais provenientes de várias etapas de produção de pastas de papel de diferentes empresas. Os ensaios foram realizados em reatores *batch* de 320 mL mostraram uma grande variação de rendimentos em CH₄ entre os diferentes efluentes. Nos efluentes de produção de pasta *kraft*, foram obtidos rendimentos em CH₄ acima de 50 % em efluentes de cozimento da madeira, em efluentes de máquinas de papel e em efluentes condensados. Os efluentes de branqueamento ácido *ECF* mostraram ser os mais tóxicos para os consórcios microbianos uma vez que deram origem a taxas de produção de CH₄ reduzidas. Estes autores ainda concluíram que as taxas de produção de CH₄ a partir de efluentes provenientes do branqueamento alcalino *ECF* dependem da matéria prima utilizada. Ou seja, quando a matéria prima utilizada é madeira proveniente de árvores coníferas (*softwood*, por exemplo *Pinus*), os rendimentos de produção de CH₄ são inferiores aos obtidos quando os mesmos processos são realizados com madeira proveniente de árvores folhosas (*hardwood*, por exemplo *Eucalyptus globulus*) [11].

É essencial a realização de mais estudos de forma a identificar estratégias para reduzir o impacto ambiental causado pelos efluentes da produção de pastas. O tratamento anaeróbio dos efluentes provenientes da produção de pastas tem sido relatado na literatura e aplicado em situações empresariais. No entanto, os efluentes de branqueamento ácido *ECF* possuem elevada carga poluente e de baixa biodegradabilidade. Desta forma é necessária a realização de mais estudos com o intuito de determinar as condições ambientais e as condições operacionais que maximizam a biodegradabilidade destes compostos, aumentando simultaneamente a produção de biogás rico em CH₄.

1.5. Microrganismos envolvidos na degradação de AOX

Como referido anteriormente, AOX consiste numa mistura de diferentes compostos organoclorados. Estes compostos são tóxicos para grande parte dos microrganismos metanogénicos. Assim, com o intuito de tornar os microrganismos mais resistentes às condições adversas impostas pela presença de compostos tóxicos e dificilmente biodegradáveis, durante a operação dos biorreatores, os consórcios microbianos anaeróbios devem ser aclimatizados aos compostos tóxicos presentes nos efluentes. Ou seja, inicialmente o consórcio microbiano deve de ser exposto a níveis subtóxicos destes compostos e a diluição das águas residuais deve ser

reduzida aos poucos. Desta forma, os microrganismos vão se adaptando à toxicidade dos efluentes através do desenvolvimento de capacidades para degradar os compostos orgânicos [14].

Várias culturas de bactérias anaeróbias que degradam compostos organoclorados foram isoladas e classificadas. As bactérias capazes de degradar os compostos organoclorados são classificadas como desalogenadoras alquilo e desalogenadoras arilo [59].

Segundo Savant *et al.*[4], as bactérias desalogenadoras alquilo abrangem um grupo diversificado de anaeróbios facultativos e obrigatórios. Dentro deste grupo estão vários microrganismos metanogênicos e espécies de *Clostridium*, *Acetobacterium woodii* e *Shewanella* que degradam principalmente compostos de baixa massa molecular (com até dois carbonos), tais como clorofórmio, tetracloro-eteno, dicloro-eteno, dicloro-metano, tricloro-etano, tricloro-eteno, entre outros. A maioria dos microrganismos desalogenadores arilo pertencem às proteobactérias e a gêneros tais como *Desulfitobacterium* e *Desulfobacter*.

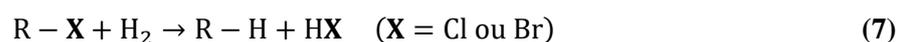
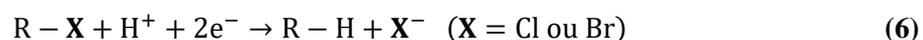
Foram sugeridos três mecanismos de metabolização dos compostos organoclorados pelas bactérias anaeróbias: como fonte de carbono, como co-metabolito e como aceitador de elétrons [15]. Certas bactérias anaeróbias utilizam compostos halogenados como fonte de carbono e de energia [4]. *Dehalobacterium formicoaceticum* estirpe DMC utiliza diclorometano como fonte de carbono e de energia, convertendo este composto em acetato e formato na razão de 2:1. Da mesma forma, a estirpe MC utiliza clorometano como fonte de energia, produzindo acetato como produto principal da fermentação [60].

O co-metabolismo é um processo no qual ocorre a modificação fortuita do composto por enzimas ou cofatores que normalmente catalisam outras reações. Esta reação acidental não é energeticamente útil para o microrganismo. Desta forma, estas reações somente ocorrem na presença de uma fonte de carbono e/ou aceitador de elétrons [60]. Este mecanismo pode ser encontrado em *Shewanella putrefaciens*, *Acetobacterium woodii*, *Clostridium* e em muitas espécies metanogênicas como mostrado na Tabela 6.

Tabela 6 – Bactérias que utilizam os compostos organoclorados como co-metabolitos em condições anaeróbias [4].

Microrganismo	Compostos
<i>Acetobacterium woodii</i>	Clorofórmio, tetracloreto de carbono, tetracloroetano
<i>Clostridium formicoaceticum</i>	Tetracloroetano
<i>Fusobacterium mortiferum</i>	Hexaclorociclohexano
<i>Moorella thermoacetica</i>	Tetraclorociclohexeno
<i>Desulfobacterium autotrophicum</i>	Tricloroetano, tetracloreto de carbono
<i>Methanosarcina barkeri</i>	Tetracloreto de carbono, 1,2-dicloroetano, clorofórmio
<i>Methanosarcina mazei</i>	Tetracloreto de carbono, 1,2-dicloroetano, clorofórmio
<i>Methanotherix soehngeni</i>	1,2-Dicloroetano
<i>Methanobacterium thermoautotrophicum</i>	Tetracloreto de carbono, 1,2-dicloroetano
<i>Methanosarcina thermophila</i>	Tricloroetano
<i>Methanlobus tindarius</i>	Tetracloroetano
<i>Shewanella putrefacien</i>	Tetracloreto de carbono
<i>Sporomusa ovata</i>	Tetracloroetano
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	1,2,4-Triclorobenzeno

A desalogenação redutiva é o mecanismo dominante na remoção de compostos halogenados em condições anóxicas. Este processo envolve a remoção do substituinte halogenado de uma molécula com a adição de um próton e de dois elétrons (Equação (6)), originando um composto orgânico menos clorado. Os prótons e elétrons podem derivar diretamente do H₂ (Equação (7)), da fermentação do piruvato (Equação (8)) ou de outros compostos orgânicos [61]. O objetivo final deste processo respiratório é sintetizar ATP (adenosina trifosfato).



As bactérias com capacidade de desalogenação pertencem a uma ampla gama de gêneros, tais como *Desulfitobacterium*, *Sulfurospirillum* e *Enterobacter*. Estas bactérias são capazes de utilizar o composto organoclorado como recetores de elétrons e compostos tais como triptofano, piruvato, acetato ou H₂ como dadores de elétrons [4], como se encontra apresentado na Tabela 7.

Tabela 7 – Bactérias utilizadoras de compostos organoclorados através de desalogenação redutiva [4].

Microrganismos	Aceitadores de eletrões	Dadores de eletrões
<i>Desulfomonile tiedjei</i>	Tetracloroetano, tricloroetano, 3-clorobenzoato, pentaclorofenol	H ₂ , piruvato, formato
<i>Desulfitobacterium chlororespirans</i>	2,4,6-Triclorofenol, 3-cloro-4-hidroxi-fenilacetato	H ₂ , piruvato, formato
<i>Desulfitobacterium hafniense</i>	Pentaclorofenol, 3-cloro-4-hidroxi-fenilacetato	Piruvato, triptofano
<i>Desulfitobacterium hafniense</i>	2,4,6-Triclorofenol, 3-cloro-4-hidroxi-fenilacetato	Piruvato
<i>Desulfitobacterium dehalogenans</i>	Tetracloroetano, 3-cloro-4-hidroxi-fenilacetato, 2,4,6-triclorofenol	H ₂ , piruvato, formato
<i>Desulfitobacterium PCE-1</i>	Tetracloroetano, 2-clorofenol, 3-cloro-4-hidroxi-fenilacetato 2,4,6-triclorofenol	Piruvato, formato
<i>Desulfitobacterium PCE-S</i>	Tetracloroetano, tricloroetano, 2,4,5-triclorofenol, Pentaclorofenol	Piruvato
<i>Dehalobacter restrictus</i>	Tetracloroetano, tricloroetano	H ₂
<i>Sulfurospirillum multivorans</i>	Tetracloroetano, tricloroetano	H ₂ , piruvato, formato
<i>Desulfuromonas chloroethenica</i>	Tetracloroetano, tricloroetano	Piruvato, acetato
<i>Dehalococcoides mccartyi</i>	Tetracloroetano, tricloroetano, dicloroetano, cloroetano	H ₂
<i>Enterobacter strain MS-1</i>	Tetracloroetano, tricloroetano	Formato, piruvato, acetato
<i>Enterobacter agglomerans</i>	Tetracloroetano, tricloroetano	Formato, piruvato, acetato
<i>Desulfovibrio dechloroacetivorans</i>	2-Clorofenol, 2,6-diclorofenol	Acetato, fumarato, lactato, propionato, piruvato, alanina e etanol
<i>Desulfitobacterium metallireducens</i>	3-Cloro-4-hidroxi-fenilacetato, tricloroetileno, tetracloroetileno	Formato, etanol, butanol, butirato, malato, piruvato, lactato
<i>Anaeromyxobacter dehalogenans</i>	2-Clorofenol, 2,6-diclorofenol, 2,5-diclorofenol	H ₂ , acetato, piruvato, succinato, formato, lactato

O uso de culturas microbianas mistas pode superar alguns dos problemas apresentados pelas monoculturas, tais como as limitações nutricionais e a toxicidade de certos compostos. Por exemplo, culturas mistas conseguem degradar vários compostos fenólicos com diferentes estruturas e toxicidades [15]. Além disso, os produtos de um grupo de bactérias podem servir de substrato para outros grupos de forma a que a degradação dos compostos poluentes seja mais eficaz. Por estes motivos, a adoção de culturas mistas em detrimento de culturas puras é bastante favorável a nível económico e a nível operacional.

1.6. Recurso energético produzido

Através da digestão anaeróbia de resíduos obtém-se biogás. A composição e características do biogás produzido varia de acordo com a matéria prima utilizada. Os seus constituintes principais são o CH₄ e o dióxido de carbono, podendo possuir ainda reduzidas quantidades de azoto, ácido sulfídrico, amoníaco, monóxido de carbono e compostos orgânicos voláteis. O conteúdo em CH₄ geralmente varia entre 48 % e 65 % e o conteúdo em dióxido de carbono geralmente varia entre 35 % e 41 % [62].

O biogás pode ser utilizado como uma fonte de energia renovável para gerar calor e energia, como combustível para veículos e como substituto do gás natural. O conteúdo energético do biogás é diretamente proporcional à concentração de CH₄. Por este motivo, após a sua produção pode ser necessário remover parte do dióxido de carbono presente, aumentando desta forma o seu conteúdo energético [63]. O biogás, composto essencialmente por CH₄ (40 a 70 %) e dióxido de carbono tem elevado poder calorífico (5 000 kcal·m⁻³) e pode ser utilizado como combustível ou utilizado para gerar eletricidade. No entanto têm de ser realizados mais estudos para determinar o potencial de produção de CH₄ a partir de efluentes do branqueamento de pastas *kraft*. A maioria dos estudos existentes foca-se na degradação dos compostos poluentes e não na produção de biogás.

1.7. Considerações finais

Em Portugal, em 2017 foram produzidos 85 milhões de m³ de efluentes líquidos pelo setor de produção de pastas de papel. Estes efluentes possuem elevadas cargas de SST, CQO e AOX pelo que existe uma crescente necessidade de desenvolver técnicas para tratar e valorizar estes resíduos. Como foi revisto ao longo do trabalho, os diferentes sistemas de tratamento anaeróbio são uma opção viável para o tratamento de efluentes provenientes da indústria de pastas e de papel, nomeadamente para o tratamento de efluentes de branqueamento de pastas *kraft*. Além de produzir reduzidas quantidades de lamas, este tipo de tratamento também é vantajoso na medida em que produz energia renovável (biogás) durante a degradação dos compostos orgânicos.

A utilização de compostos que tornem a comunidade anaeróbia mais robusta, tais como nitratos e sulfatos, pode ser uma mais valia para a degradação uma vez que bactérias reductoras de

sulfato e de nitrato têm mostrado ser eficazes na remoção de compostos recalcitrantes. A digestão anaeróbia em condições termófilas também é atrativa para o tratamento de efluentes da indústria da pasta, uma vez que permite a aplicação de maiores cargas orgânicas sem a necessidade de arrefecer os efluentes.

2. Objetivo

O objetivo principal desta dissertação passa pela obtenção de um processo biológico anaeróbio estável a nível operacional e a nível de população microbiana mista que permita reduzir a carga poluente de efluentes provenientes da primeira etapa de branqueamento de pastas *kraft* ricas em compostos recalcitrantes e potencialmente tóxicos. Desta forma, pretende-se obter um efluente tratado de elevada qualidade para ser descarregado no meio recetor e um subproduto de valor acrescentado: o CH₄. Assim, são propostos quatro objetivos específicos para a realização do trabalho experimental:

- i. Realizar testes descontínuos de biodegradabilidade anaeróbia, a temperatura mesófila (36°C), de compostos recalcitrantes e potencialmente tóxicos (AOX), com a avaliação do efeito da adição de uma fonte de carbono como co-substrato (glucose e acetato), adição de um suplemento alcalino e de micronutrientes (cinzas CA5, CTB e lamas de cal) e ainda a realização de um pré-tratamento por enzimas. Esta adição tem como objetivo diminuir a toxicidade do efluente a tratar e obter uma comunidade microbiana mais robusta.
- ii. Determinar a influência dos diferentes aditivos e pré-tratamento na produção de CH₄ por digestão anaeróbia aplicado ao efluente proveniente do processo de branqueamento da pasta *kraft* (D0).
- iii. Monitorizar os parâmetros físico químicos relativos ao processo biológico anaeróbio, para otimização da sua eficiência.
- iv. Caracterizar as populações microbiológicas tendo em conta as diferentes condições aplicadas nos testes, relacionando essas populações com condições operatórias e desempenho do sistema anaeróbio.

3. Metodologia experimental e materiais

3.1. Preparação e caracterização dos substratos e da biomassa

3.1.1. Efluente de branqueamento de pasta *kraft*

O efluente utilizado (D0) é proveniente de uma unidade de branqueamento com ClO_2 de pasta *kraft*. Na Tabela 8 encontra-se a caracterização do D0 utilizado em termos de pH, CQO_t , CQO_s e AOX. Ao longo do trabalho foram realizados diversos pré-tratamentos ao D0, procedendo-se à caracterização do mesmo após cada tratamento. Esses resultados são apresentados na secção 4.

Tabela 8 – Caracterização do efluente do branqueamento *Kraft*.

Parâmetros	D0 origem
pH	2,21±0,13
CQO_t ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	3,64±0,68
CQO_s ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	3,43±0,63
AOX ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)	86,6±15,0

3.1.2. Cinzas do processo de produção de pastas *kraft*

Foram utilizadas cinzas volantes CA5, CTB e lamas de cal – Figura 3 – provenientes do processo de produção de pasta *kraft* para papel. As cinzas volantes são resíduos inorgânicos alcalinos. As provenientes da caldeira auxiliar de queima de biomassa (casca de eucalipto) são designadas por cinzas CA5 e as da caldeira de queima de material proveniente do exterior (bagaço de azeitona, bagaço de uva, aparas e serrim, entre outros) são designadas por cinzas CTB [64]. As lamas de cal são geradas no processo de recuperação química do licor negro (no processo de conversão do licor verde em licor branco).

As cinzas apresentam pH aproximadamente de 12 [65] pelo que foram utilizadas para neutralizar o efluente D0. As CQO_s referentes às cinzas CA5, CTB e lamas de cal, nas concentrações utilizadas neste trabalho, foram determinadas em água, no entanto foram obtidos valores abaixo da gama de determinação do método.



Figura 3 – Cinzas CA5, CTB e lamas de cal.

A composição química das cinzas CA5, CTB e lamas de cal, determinada por fluorescência de raio-X é apresentada na Tabela 9 [65]–[68].

Tabela 9 – Composição química das cinzas CA5, CTB [65]–[67] e lamas de cal [68].

% (m/m)	CA5 [65]–[67]	CTB [65]–[67]	Lamas de Cal [68]
Na₂O	3,30 – 6,23	0,90 – 1,50	1,10
MgO	3,61 – 6,63	2,30 – 3,31	0,61
Al₂O₃	3,64 – 11,3	9,30 – 13,3	0,06
SiO₂	11,0 – 28,0	41,0 – 52,1	0,18
P₂O₅	0,90 – 2,28	0,90 – 1,43	0,52
SO₃	1,12 – 3,60	0,45 – 3,60	0,20
K₂O	2,07 – 8,77	3,90 – 4,25	0,03
CaO	25,3 – 40,1	11,4 – 23,3	55,0
TiO₂	0,21 – 0,30	0,40 – 0,66	0,00
MnO	0,70	0,30 – 0,4	*
Fe₂O₃	1,89 – 5,18	2,60 – 5,30	0,03
Cl	13,8	1,70	*

*não analisado

A constituição das cinzas volantes depende da composição química da biomassa e das condições da combustão (tipo de caldeira, temperatura de combustão, entre outras). A constituição da biomassa utilizada também varia dependendo do local de origem, forma de cultivo e do armazenamento aplicado, sendo que estes fatores influenciam as propriedades das cinzas. Desta forma, é admissível que as cinzas provenientes da mesma caldeira apresentem algumas diferenças em termos de constituição química.

3.1.1.Co-substratos: Glucose e Acetato

Foram preparadas duas soluções, uma de glucose e outra de acetato, para utilização como co-substrato nos reatores. Estas soluções foram preparadas pela adição de 5,5 g de glucose/acetato a 100 mL de água destilada, tendo apresentado uma CQO_s de 67,4±0,85 g-CQO_s·L⁻¹ e 42,6±0,17 g-CQO_s·L⁻¹, respetivamente. A determinação da CQO_s foi realizada em triplicado.

3.1.2.Enzimas

Neste trabalho utilizou-se o preparado enzimático comercial *SERZIM 50*, comercializado pela *Sertec 20* (Espanha). Este preparado é composto por diferentes tipos de enzimas que reagem com o exterior das fibras de celulose. Tem na sua constituição endo-1, α-β-D-glucanase que

produz um efeito de fibrilação, acelerando a rutura das ligações glicosídicas. Com a utilização desta enzima é esperado que ocorra a diminuição do tamanho das cadeias dos detritos celulósicos que possam estar presentes no D0 e que, conseqüentemente, estes compostos se tornem mais biodegradáveis, funcionando como substrato para os consórcios microbianos.

3.1.3. Biomassa anaeróbia

A biomassa anaeróbia (lama biológica) utilizada provém de um digestor anaeróbio da estação de tratamento de águas residuais dos municípios de Aveiro – SIMRIA.

Antes da utilização das lamas, estas foram lavadas através da adição de água. Após repousarem durante 24 horas, as lamas sedimentaram por gravidade e, assim, foi possível descartar-se o sobrenadante. De seguida, procedeu-se à caracterização das lamas. A biomassa utilizada em cada ensaio foi diferente, atendendo à caracterização em termos de sólidos apresentados na Tabela 10.

Tabela 10 – Caracterização da biomassa anaeróbia.

Parâmetro	Ensaio 1	Ensaio 2	Ensaio 3
SST ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	12,93	24,77	28,10
SSV ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	9,37	20,30	21,85
SSV/SST (%)	72,42	81,96	77,76
Alcalinidade ($\text{mg}\cdot\text{CaCO}_3\cdot\text{L}^{-1}$)	2250	2550	2350

3.2. Ensaio anaeróbios de biodegradabilidade

Para determinar a biodegradabilidade anaeróbia do D0 foram utilizados reatores Oxitop-C com um volume total de 330 mL. Este equipamento tem a capacidade de medir a variação de pressão causada pela produção de biogás dentro do reator. A aquisição dos dados é realizada através do controlador OC110 e através do *software Achat OC* (versão 3.2.0.0).

Todos os reatores foram operados em descontínuo, ou seja, apenas foi adicionada a alimentação no momento inicial de montagem dos reatores. Após a adição da mistura reacional aos reatores, estes foram incubados a 36 °C durante 25 dias, com agitação magnética.

O trabalho experimental decorreu em 3 fases. Durante a primeira fase foram utilizados seis reatores *batch* com dois objetivos: estudar a carga orgânica de D0 aplicada (Reator D3 e D2) e determinar a biodegradabilidade anaeróbia do D0 com e sem adição de co-substratos: glucose e acetato (Reator D2, DA, DG, A e D). Na Figura 4 é apresentada a constituição de cada uma das misturas reacionais utilizadas. A mistura reacional antes e após o tratamento anaeróbio foi

analisada em termos de pH, alcalinidade, CQO_s, sólidos (SST e SSV), AOX, AOV e cloretos. A nomenclatura de cada reator bem como a cor utilizada são mantidas ao longo do trabalho.

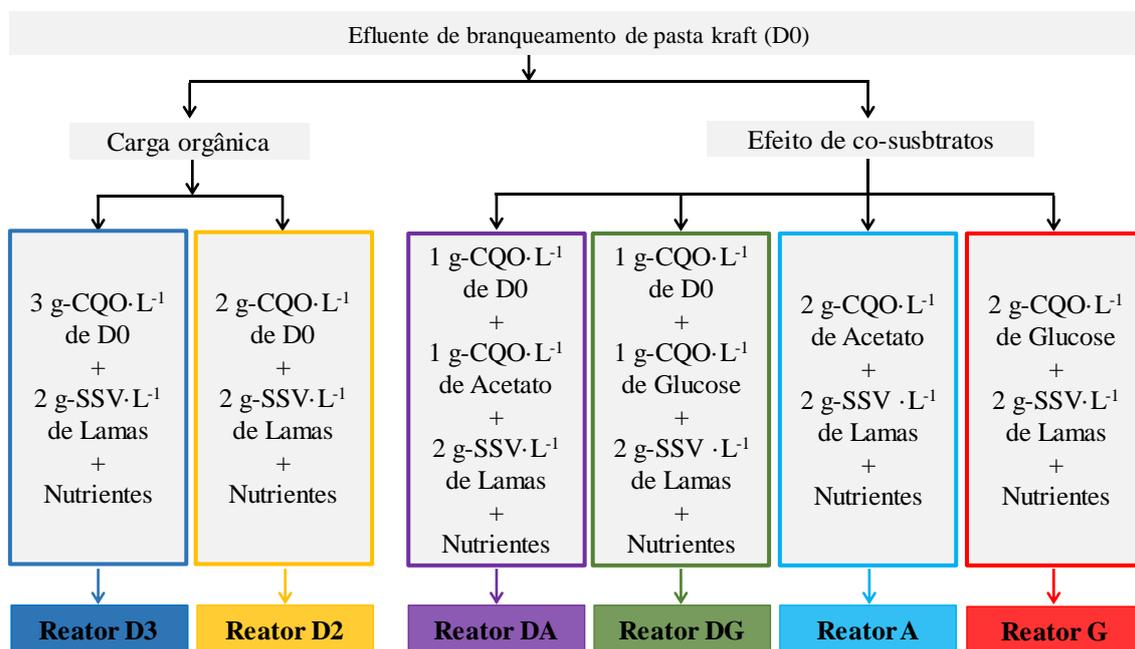


Figura 4 – Esquema de montagem dos reatores da primeira fase de trabalho.

Na segunda fase do trabalho foram utilizadas cinzas CA5, cinzas CTB e lamas de Cal para neutralizar o D0 (pH≈7). Foram necessárias 17,22, 4,97 e 3,92 g·L⁻¹ de cinzas CTB, CA5 e lamas de CAL, para ajustar o pH do D0 para 7,34, 7,04 e 7,14, respetivamente. De seguida, procedeu-se à caracterização da mistura original e filtrada do D0 neutralizado com cinzas, estudando desta forma as vantagens que este suplemento pode ter no processo. O D0 com as cinzas foi submetido a digestão anaeróbia, adicionando-se a cada reator 2 g-CQO_s·L⁻¹ de D0, 2 g-SSV·L⁻¹ de biomassa e as soluções de nutrientes. Após purgar com N₂ e fechar o reator, iniciou-se a medição das variações de pressão.

Na Tabela 11 é apresentada a constituição das soluções stock de nutrientes utilizada nos reatores anaeróbios. Foi adicionado 1 mL por litro da solução de micro e 2 mL por litro da solução de macronutrientes.

Tabela 11 – Concentração de macro e micronutrientes da solução stock utilizada.

	Composto químico	Concentração na Solução Stock (mg·L ⁻¹)
Macronutrientes	NH ₄ Cl	88,802
	KH ₂ PO ₄	16,456
	CaCl ₂ .2H ₂ O	4,248
	MgSO ₄ .7H ₂ O	1,733
Micronutrientes	FeCl ₂ .6H ₂ O	0,403
	CaCl ₂ .6H ₂ O	0,483
	MnCl ₂ .4H ₂ O	0,135
	CuCl ₂ .2H ₂ O	0,011
	ZnCl ₂	0,023
	H ₃ BO ₃	0,009
	(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ .4H ₂ O	0,048
	Na ₂ SeO ₃ .5 H ₂ O	0,029
	NiCl ₂ .6 H ₂ O	0,012
	EDTA (C ₁₀ H ₁₆ N ₂ O ₈)	0,976

Na Figura 5 é apresentada a preparação de cada um dos D0 utilizados como substratos nesta etapa e os constituintes da mistura reacional de cada um dos reatores.

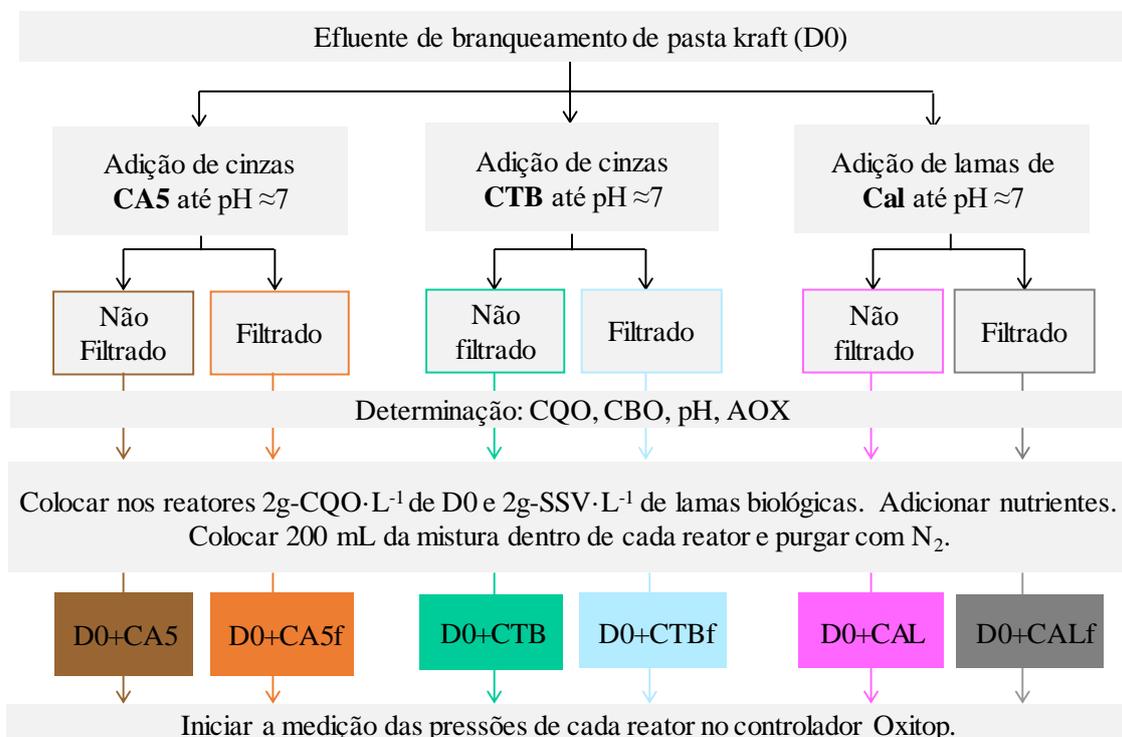


Figura 5 –Esquema de montagem dos reatores da segunda fase de trabalho.

Na terceira fase do trabalho, pretendeu-se estudar a biodegradabilidade anaeróbia do D0 neutralizado com cinzas e tratado enzimaticamente com o preparado comercial *Serzym 50*. Pretendeu-se ainda determinar a ordem pela qual o tratamento deve ser realizado e avaliar se o pH final influencia a degradação anaeróbia do efluente.

Com estes objetivos, a preparação do D0 foi realizada tal como indicado na Figura 6. Em dois dos efluentes preparados utilizaram-se cinzas CA5 e CTB para regular o pH até 7, aplicando-se de seguida o tratamento enzimático. Em dois dos reatores utilizou-se NaOH para ajustar o pH para 6 e em outros dois para ajustar o pH para 5. Nos efluentes a pH 6 foram adicionadas cinzas CA5 e CTB até pH 7 enquanto que nos efluentes a pH 5 adicionaram-se cinzas até pH 6. De seguida procedeu-se ao tratamento enzimático dos efluentes, a 50 °C durante 1 hora, adicionando-se 0,1 mL de enzima por litro de D0. Por fim, as misturas foram caracterizadas e 2 g-CQO_s·L⁻¹ de D0 e 2 g-SSV·L⁻¹ de biomassa foram colocadas nos reatores. Após a adição dos nutrientes, e de purgar o reator com N₂, este foi fechado e iniciou-se a medição de pressões na cabeça do Oxitop.

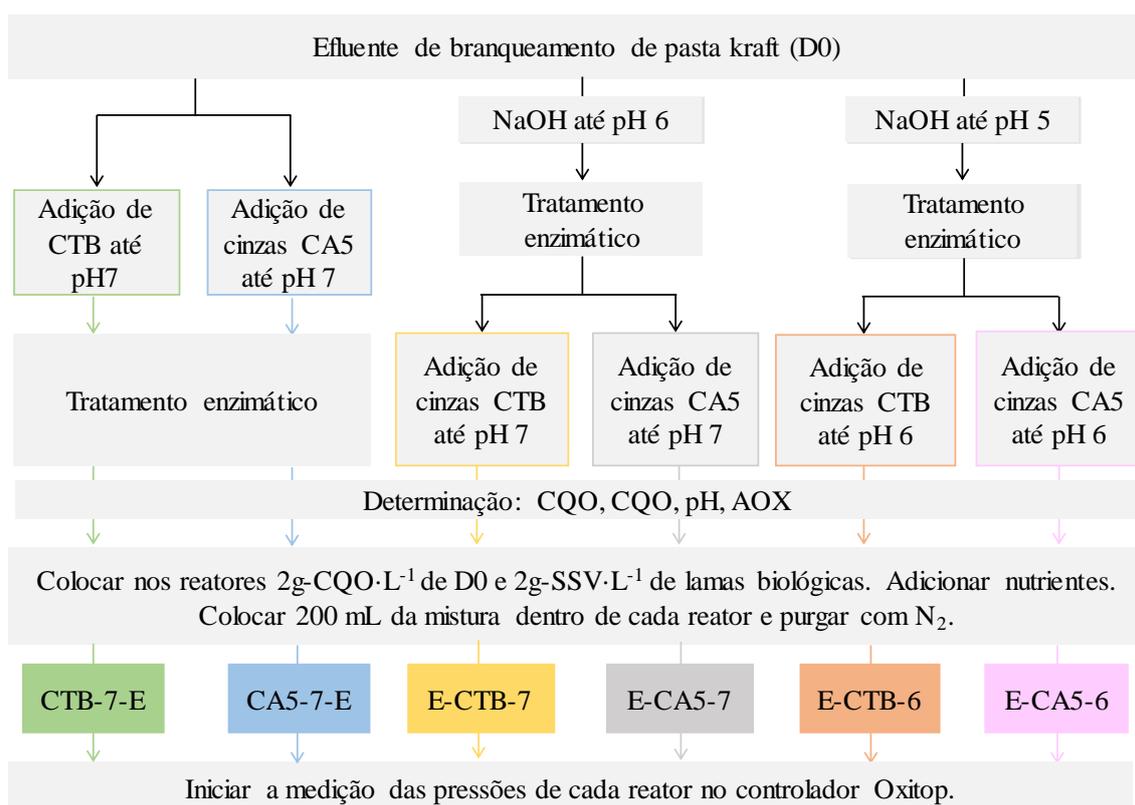


Figura 6 - Esquema de montagem dos reatores da terceira fase de trabalho.

3.3. Parâmetros físicos e químicos analisados

As misturas reacionais dos reatores anaeróbios operados foram analisadas no momento inicial e após o tratamento anaeróbio estar concluído. Foi quantificada a CQO_t e CQO_s, a CBO₅, os SST, os SSV, o pH, a alcalinidade, a concentração de AOX, de AOV, de cloretos e de metais.

3.3.1. Biogás

Através da Equação (9) e das pressões fornecidas pelo sistema Oxitop é possível converter a variação de pressão dentro do reator em número de moles de biogás produzido.

$$n_{\text{biogás}}(\text{mol}) = \frac{\Delta p \times V_g}{R \times T} \times 10^{-4} \quad (9)$$

Na Equação (9), $n_{\text{biogás}}$ corresponde ao número de moles de biogás formado, Δp à variação de pressão, em hPa, devido ao biogás produzido, fornecida pelo sistema oxitop, V_g ao volume de fase gasosa dentro do reator, em mL, R à constante dos gases ideais e T corresponde à temperatura do sistema, em K.

Para obter o volume de biogás à pressão e temperatura ambiente recorre-se à Equação (10).

$$V_{\text{biogás}}(\text{mL}) = \frac{n_{\text{biogás}} \times R \times T}{p} \times 10^4 \quad (10)$$

Na equação (10), T e p correspondem à temperatura (K) e à pressão ambiente (hPa), respetivamente.

A composição do biogás em termos de CO_2 e CH_4 foi estudada através de um cromatógrafo gasoso (marca SRI, modelo 8610C) equipado com detetor de condutividade térmica ajustado para 75°C e uma coluna 80/10 x 2.5 m CRS Hayesep. Como gás de arraste foi utilizado hélio com caudal de $10 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$. O forno foi mantido a 61°C durante os 5 minutos de análise. Para a análise, 2 mL de biogás recolhidos com seringa são injetados no cromatógrafo.

Os resultados são obtidos e analisados através do *software Peak Simple* que fornece o valor das áreas de cada pico do cromatograma. Aos 0,86 minutos aparece o primeiro pico que corresponde à quantidade de Ar (N_2 , H_2 , H_2S , etc.) presente na amostra. O segundo pico, aos 1,05 minutos, corresponde à área de CH_4 e o último pico, aos 2,05 minutos, corresponde à área de dióxido de carbono. As áreas dos picos do cromatograma são convertidas em percentagem de CH_4 e CO_2 através das Equações (11) e (12), respetivamente.

$$\text{CH}_4(\%) = 0,9896 \times \frac{A_{\text{CH}_4}}{A_{\text{CH}_4} + A_{\text{CO}_2}} \times 100 \quad (11)$$

$$\text{CO}_2(\%) = 0,9924 \times \frac{A_{\text{CO}_2}}{A_{\text{CH}_4} + A_{\text{CO}_2}} \times 100 \quad (12)$$

Nas Equações e (11) e (12), A_{CH_4} e A_{CO_2} correspondem à área de CH_4 e à área de dióxido de carbono, respetivamente, obtidas pela análise do cromatograma.

3.3.2. Sólidos suspensos totais e sólidos suspensos voláteis

Para a determinação dos sólidos, SSV e SST, foi necessário calcinar cadinhos de porcelana e filtros de microfibras de vidro (com poros de 47µm de diâmetro). Para este efeito, os cadinhos com os filtros foram colocados durante uma hora na mufla a 550 °C. De seguida, o arrefecimento ocorreu dentro do exsiccador, até à temperatura ambiente. Os cadinhos e os filtros calcinados foram pesados. Para a quantificação dos sólidos suspensos totais (método 2540-D [69]), o filtro calcinado foi utilizado num equipamento de filtração para filtrar um dado volume de amostra. Após a filtração, o filtro foi transferido para o cadinho que permaneceu 24 horas na estufa a 100°C, até ser atingido um peso constante do mesmo. Após arrefecidos no exsiccador a temperatura ambiente, os cadinhos contendo os filtros foram pesados. Os SST são calculados através da Equação (13).

$$SST \left(\frac{g}{L} \right) = \frac{\text{massa}_{\text{após estufa}} (g) - \text{massa}_{\text{cadinho+filtro}} (g)}{\text{Volume}_{\text{amostra}} (mL)} \times 1000 \quad (13)$$

A determinação dos sólidos suspensos voláteis (método 2540-E [69]) foi realizada com recurso aos filtros obtidos para determinação dos SST. Para determinar os SSV estes filtros foram colocados durante 2 horas na mufla a 550 °C. Após arrefecidos no exsiccador à temperatura ambiente, os cadinhos foram pesados ($m_{\text{após mufla}}$). Os SSV foram calculados através da Equação (14).

$$SSV \left(\frac{g}{L} \right) = \frac{\text{massa}_{\text{após estufa}} (g) - \text{massa}_{\text{após mufla}} (g)}{\text{Volume}_{\text{amostra}} (mL)} \times 1000 \quad (14)$$

A determinação dos SST e SSV foi sempre realizada em triplicado.

3.3.3. Carência química de oxigénio

A carência química de oxigénio é definida como a quantidade de um oxidante específico que reage com a amostra sob condições controladas. O oxidante químico reage com a matéria orgânica e inorgânica presente na amostra, no entanto a matéria orgânica encontra-se em maior quantidade e é a que tem maior interesse. Foi utilizado o método de refluxo fechado com determinação por colorimetria método 5520-D descrito em *APHA Standard Methods* [69], utilizando um termoreator *Aqualytic™* AL125 e um espectrofotómetro da marca *Aqualytic™* COD Vario PC.

Para a determinação da CQO das amostras foram utilizados tubos com tampa adequados para a realização desta análise. Nos tubos foi adicionado 3,5 mL de uma solução contendo ácido sulfúrico (H_2SO_4) e sulfato de prata ($AgSO_4$), 1,5 mL de uma solução de dicromato de potássio ($K_2Cr_2O_7$) contendo sulfato de mercúrio ($HgSO_4$) e 2,5 mL de amostra. Para a determinação da CQO_t das amostras é utilizada a amostra tal e qual enquanto que para a determinação da CQO_s a amostra tem de ser previamente filtrada. A filtração foi realizada utilizando filtros com tamanho

de poro de 47 μ m. Após misturar e agitar os reagentes, a solução foi digerida durante 2 horas a 150 °C. A gama de concentrações do método utilizado é entre 100 e 900 mg-CQO \cdot L⁻¹.

Após arrefecimento à temperatura ambiente, a absorvância das amostras foi lida com recurso a um espectrofotómetro e convertida em concentração de CQO (mgO₂ \cdot L⁻¹). Este parâmetro foi determinado em triplicado.

3.3.4. Carência bioquímica de oxigénio - 5 dias

O método para medição da CBO₅ consiste na quantificação do oxigénio molecular utilizado na degradação bioquímica de material orgânico e material inorgânico, durante um período de 5 dias. Esta determinação foi realizada segundo o método 5210B descrito em *APHA Standard Method* [69]. Neste método, procede-se à incubação da amostra com uma semente (população de microrganismos capazes de oxidar a matéria orgânica biodegradável na amostra) e com nutrientes, durante 5 dias a 20 \pm 1 °C com agitação. Este procedimento fornece uma estimativa da CBO (mg-O₂ \cdot L⁻¹) a pH entre 6,5 e 7,5. Foi ainda adicionado sulfito de sódio para diminuir as interferências do cloro na população microbiana.

Assumindo que os nutrientes não estão presentes ou estão presentes em quantidades insuficientes no efluente, para o normal desenvolvimento da comunidade bacteriana, procedeu-se à adição destes compostos. Desta forma, foi adicionado 1 mL por litro de cada uma das seguintes soluções: solução de 0,25 g \cdot L⁻¹ de cloreto de ferro hexahidratado, solução de 25,5 g \cdot L⁻¹ de cloreto de cálcio anidro e solução de 22,55 g \cdot L⁻¹ de sulfato de magnésio hepta-hidratado. A quarta solução adicionada é composta por fosfato monobásico de potássio (8,5 g \cdot L⁻¹), fosfato dissódico heptahidratado (21,7 g \cdot L⁻¹) e cloreto de amónio (1,7 g \cdot L⁻¹).

3.3.5. Haletos orgânicos adsorvíveis

A determinação de AOX foi realizada com recurso ao equipamento analisador de AOX da marca *Thermo Fisher Scientific*, modelo ECS 1200, através do método da norma ISO 3562. Este método é aplicado para determinar a concentração de cloro, brometo e iodo (expressos como cloro) ligados organicamente.

As amostras a serem analisadas são diluídas de forma a que a concentração de AOX esteja dentro da gama de leitura do equipamento. Num frasco erlenmeyer com tampa, a 100 mL de amostra diluída e acidificada são adicionados 5 mL de uma solução de NaNO₃ acidificada com ácido nítrico e 50 mg de carvão ativado (medidos com colher de medição). Desta forma, o material orgânico presente na amostra é adsorvido no carvão ativado e os haletos inorgânicos adsorvidos no carvão ativado são removidos através do deslocamento competitivo com os iões de nitrato. De seguida, a solução é colocada a agitar durante duas horas, é filtrada e o bolo acumulado no filtro é incinerado a 1000 °C num tubo de quartzo. Os filtros utilizados são de policarbonato com diâmetro de 25 mm e tamanho de poro 0,4 μ m (*Whatman® Nuclepore™ Track-Etched*

Membranes). No forno, o carbono orgânico é convertido em dióxido de carbono (CO₂) e o cloro ligado ao carvão ativado é convertido a ácido clorídrico. O ácido clorídrico é adsorvido no eletrólito e quantificado através de titulação microcoulométrica. O *software* fornece um gráfico da titulação sendo que a área integrada sob a curva, dada em Coulomb (C), é proporcional ao número de moles de halogénio recuperadas.

A concentração mássica dos AOX, $\rho_{Cl}(AOX)$, em mg·L⁻¹, é obtida pela Equação (15).

$$\rho_{Cl}(AOX) = \frac{(Q_s - Q_0) \times M}{V \times F} \times 1000 \quad (15)$$

Na Equação (15), Q_s corresponde ao valor da área da amostra, Q_0 ao valor da área do branco, M à massa atômica relativa do cloro, V ao volume da amostra e F à constante de Faraday.

3.3.6. Ácidos Orgânicos Voláteis

A quantificação dos AOV foi realizada através de cromatografia gasosa, segundo o trabalho de Gameiro *et al.* [70]. A análise das amostras acarreta uma pré-preparação em que 1mL de amostra filtrada é misturada com 0,25 mL de ácido fórmico (*Panreac*TM). As amostras para analisar foram armazenadas a 4 °C.

A quantificação de AOV foi realizada por cromatografia gasosa, injetando 0,5 µL de amostra filtrada e acidificada num cromatógrafo de gás *PerkinElmer*TM *Clarus 480*.

A temperatura do injetor foi definida para 300°C e a do detetor de ionização de chama para 240 °C. O gás de arraste utilizado foi o hélio. O programa de temperatura utilizada passa pelo arranque durante 1 minuto a 70 °C, sendo que de seguida ocorre o aumento de 20 °C por minuto até atingir os 100 °C que se mantém durante 2 minutos. A temperatura volta a aumentar 10 °C por minuto até aos 140 °C, e é mantida por 1 minuto. Por fim, segue-se o aumento de 35 °C por minuto até atingir os 235 °C, temperatura que é mantida por 6 minutos. O tempo total de corrida é então 18,2 minutos [70].

A curva de calibração é obtida através da injeção de soluções *standard* de ácido acético, propiónico, iso-butírico, n-butírico, iso-valérico e n-caproico (*Riedel-de Haën*TM). As concentrações de ácidos são convertidas em CQO de acordo com a estequiometria de oxidação: 1,067 mg-CQO·mg⁻¹ de ácido acético, 1,514 mg-CQO·mg⁻¹ de ácido propiónico, 1,818 mg-CQO·mg⁻¹ de ácido n-butírico ou iso-butírico, 2,039 mg-CQO·mg⁻¹ de ácido n-valérico ou iso-valérico e 2,207 mg-CQO·mg⁻¹ de ácido caproico [70]. As retas de calibração utilizadas são apresentadas no Anexo A.1.

3.3.7. pH e alcalinidade

O pH foi determinado através do equipamento Consort C-515 acoplado a um eletrodo de pH.

A alcalinidade foi determinada através do método 2320-B descrito em *APHA Standard Methods* [69]. A alcalinidade foi quantificada através de titulação de 50 mL da amostra com ácido clorídrico (1N) até pH de 4,5, com o auxílio do aparelho Consort C-515. Este procedimento permite determinar a capacidade tampão do sistema, que pode ser calculada pela Equação (16).

$$\text{Alcalinidade} \left(\frac{\text{mg}_{\text{CaCO}_3}}{\text{L}} \right) = \frac{V_{\text{HCl}}(\text{mL}) \times N_{\text{HCl}} \times 50000}{V_{\text{amostra}}(\text{mL})} \quad (16)$$

Na Equação (16), V_{HCl} corresponde ao volume de HCl utilizado na titulação da amostra até pH 4,5, em mL, N_{HCl} à normalidade da solução de HCl utilizada na titulação, que neste caso foi de 1 N, e V_{amostra} ao volume de amostra utilizado, em mL.

3.3.8. Determinação de cloretos

A concentração de cloretos presentes nas amostras foi determinada com recurso ao método do eletrodo do ião seletivo, descrito no método 9212 disponibilizado pela *United States Environmental Protection Agency* [71]. As amostras foram recolhidas, filtradas e armazenadas a 4 °C até ao momento da análise. Para determinar as concentrações de cloreto através deste método é necessário a preparação de padrões com recurso a uma solução *stock* de cloreto de sódio (1000 mg-Cl⁻·L⁻¹). O cloreto de sódio utilizado foi seco durante duas horas a 110 °C e permaneceu no exsiccador. As soluções padrão preparadas através da solução *stock* com concentração final de 1,00, 3,00, 10,0, 30,0 e 100,0 mg-Cl⁻·L⁻¹ foram analisadas com o eletrodo seletivo para cloreto sob agitação e foi obtida a reta de calibração disponível no Anexo A.2. As amostras foram analisadas do mesmo modo.

3.3.9. Espectrometria de adsorção e de emissão atômica

A espectrometria de adsorção e de emissão atômica foi realizada com recurso ao equipamento da *PerkinElmer*, para determinar a concentração de iões presentes nas amostras iniciais e finais dos reatores que foram alimentados com D0 e com cinzas (ensaio 2 e 3).

Na espectrometria de emissão atômica, a amostra é sujeita a um ambiente térmico com elevada energia, através de uma chama ou de plasmas, para que os seus átomos sejam excitados. No entanto, como nesse estado energético os átomos estão instáveis, estes voltam espontaneamente ao estado fundamental emitindo luz. A intensidade de uma linha de emissão aumenta à medida que o número de átomos excitados do elemento aumenta. Desta forma, neste método determina-se a intensidade da radiação emitida durante o decaimento.

No método de adsorção atômica, os átomos no estado fundamental absorvem um comprimento de onda específico ao ficarem excitados. Desta forma, a quantidade de átomos é proporcional à quantidade de luz absorvida e assim é possível proceder a uma determinação quantitativa do analito presente na solução.

O íon Na^+ foi analisado por emissão atômica sendo que os restantes foram analisados por adsorção. Na análise do Mg^{2+} , do Ca^{2+} e do Fe^{2+} foi necessário adicionar 1 mL da solução de lantânio e na análise do Fe^{3+} foi necessário adicionar 1 mL de cloreto de cálcio para diminuir as interferências.

Para esta análise foi necessário preparar retas de calibração a partir de soluções com concentrações conhecidas de cada íon. As retas de calibração utilizadas são apresentadas no Anexo A.3.

3.4. Dinâmica microbiana

3.4.1. Extração do DNA e amplificação do gene rRNA 16S

As lamas iniciais e após o tratamento anaeróbico do D0 foram recolhidas em microtubos esterilizados e congeladas em azoto líquido a $-80\text{ }^\circ\text{C}$ até ao momento da extração do DNA. A extração de DNA para o estudo das comunidades bacterianas e *Archaea* foi realizada com o auxílio do *kit* comercial *DNeasy PowerSoil Kit* (comercializado pela Qiagen), de acordo com as instruções do fabricante.

Com o intuito de avaliar a integridade e possíveis contaminações dos fragmentos de DNA extraídos, foi realizada uma eletroforese em gel de agarose a 1,5 % (m/v), durante 1 hora a 90 V, em TAE 1x. O TAE (tampão de Tris-Acetato-EDTA) é comercializado pela Qiagen numa concentração de 50x, sendo necessário diluir para a solução de trabalho x1. De seguida, os géis foram colocados durante 20 minutos numa solução de brometo de etídeo a $0,5\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ e 10 minutos em água destilada. A aquisição das imagens dos géis foi realizada através do sistema de imagem *Gel DOCTM XR+ SYSTEM* (Bio-Rad).

Analisou-se o gene 16S rRNA com o objetivo de avaliar a dinâmica microbiana. A região variável (V3) deste gene foi amplificada por *PCR* e os fragmentos resultantes foram analisados por *DGGE* (eletroforese em gel com gradiente desnaturante - “*denaturing gradient gel electrophoresis*”).

As combinações de *primers* 338F_GC (5'-ACTC CTACGGGAGGCAGCAGGCCCGCCGCGCGGGCGGGGCGGGGGCACG GGGGGCCTA-3') e 518R (5'-ATTACCGCGGCTGCTGG-3'), específica para *Bacteria*, e a combinação A344F (5'-ACGGGGTGCAGCAGGCGCGA-3') e A934R (5'-GTGCTCCCCCGCCAATTCCT-3'), específica para *Archaea*, foram utilizadas para amplificar genes 16S rRNA de *Bacteria* e de *Archaea*, respetivamente.

Os reagentes utilizados na reação de *PCR* são da marca NZYtech. Cada reação de amplificação foi realizada num volume total de 25 μ L, contendo Mix NZYtech 2x Green Master (2,5 mM MgCl₂; 200 μ M dNTPs; 0,2 U $\cdot\mu$ L⁻¹ DNA polimerase), *primers* 10 μ M, DNA extraído (50-100 ng) e água ultrapura. Os controlos negativos para *PCR* foram preparados substituindo o DNA por água esterilizada. As condições para o *PCR* de *Bacteria* realizado no termociclador (*Bio-Rad iCycler Thermal Cycler*) incluem um passo inicial de desnaturação a 94 °C durante 5 minutos, 35 ciclos (30 segundos a 92 °C, 30 segundos a 55 °C, 30 segundos a 72 °C), e um passo de extensão final de 30 minutos a 72 °C.

O *PCR* para *Archaea* foi realizado segundo Perreault *et al.* [72]. A desnaturação inicial ocorreu durante 5 minutos a 95 °C, o emparelhamento foi ajustado para 60 °C diminuindo 1 °C a cada ciclo (10 ciclos, 1 ciclo/minuto), seguindo-se 20 ciclos adicionais. Nestes ciclos a desnaturação ocorre a 94 °C (1 minuto), o emparelhamento a 50 °C (1 minuto) e extensão durante 3 minutos a 72 °C. Para evitar a geração de bandas duplas no gel *DGGE* realizou-se uma extensão final a 72 °C durante 30 minutos.

3.4.2. Eletroforese em gel de gradiente desnaturante (*DGGE*)

Os produtos de *PCR* foram analisados em géis de poliacrilamida a 8 % (m/v) com um gradiente de desnaturação de 35 a 60 % (*Bacteria*) e 40 a 70 % (*Archaea*) (onde 100 % corresponde a 7 M de ureia e 40 % de formamida). Com o intuito de induzir a polimerização do gel, adicionou-se 140 μ L de persulfato de amónia (*Bio-Rad*) 10 % (m/v) e 14 μ L de TEMED (*NZYtech*). Após polimerização do gel, este foi colocado em TAE (x1) a 60 °C e em cada poço foi aplicado 20 μ L de produto de *PCR* e 5 μ L de tampão de carga. Nas extremidades do gel foram colocados marcadores que permitem o alinhamento do gel [73]. O gel foi submetido a uma corrente de 20 V por 10 minutos e depois a 75 V durante 16 horas.

De seguida, os géis foram colocados 10 minutos numa solução de brometo de etídeo a 0,5 μ g/mL e 20 minutos em água destilada. A aquisição das imagens dos géis foi realizada através do sistema de imagem *Gel DOCTM XR+ SYSTEM* (*Bio-Rad*). Os perfis de *DGGE* foram analisados utilizando o *software GelCompar II* e com base na presença (1) ou ausência (0) de bandas individuais em cada *lane*, uma matriz binária foi construída. Os dados binários que representam os padrões de bandas foram usados para gerar uma matriz de distâncias, utilizada para gerar os dendrogramas.

Para a análise dos padrões de *DGGE* foram calculados os índices de diversidade Shannon-Weaver (H') e de equitabilidade de Pielou (J'). Estes índices foram calculados pelas Equações (17) e (18). Para a realização destes cálculos foi necessário associar a intensidade das bandas a valores numéricos, criando-se assim uma matriz de intensidades através do *software BioNumerics*.

$$H' = - \sum_{i=1}^s P_i(\ln P_i) \quad (17)$$

$$J' = \frac{H'}{\ln S} \quad (18)$$

Nas Equações (17) e (18), P_i corresponde à intensidade relativa da banda e S ao número de bandas na *lane* do *DGGE*.

3.4.1. Cálculos

O sistema Oxitop forneceu uma tabela de dados que indica a diferença de pressão ao longo do tempo dentro dos reatores. Através das diferenças de pressão e das percentagens de CH_4 obtidas por cromatografia gasosa, é possível determinar o número de moles de CH_4 dentro dos reatores. Para isso foi utilizada a Equação (19).

$$p \times V = n \times R \times T \quad (19)$$

Na Equação (19), p corresponde à pressão em atmosferas, V ao volume do *headspace* em mL, T à temperatura de incubação em kelvin e R à constante universal dos gases perfeitos.

No cálculo do número de moles de gases formados (n), utilizou-se a temperatura operacional de 36 °C (309,15 K), R igual a 8,314 J·(K·mol)⁻¹, V igual ao volume do *headspace* e p igual às diferenças de pressão obtidas através do sistema Oxitop em hPa. Estes valores foram aplicados na Equação (9).

Com o intuito de determinar o número de moles de CH_4 produzido, o número de moles de gases formados foi multiplicado pela percentagem de CH_4 . De seguida, foi aplicada a Equação (20) para determinar o volume de CH_4 no interior dos reatores.

$$V_{\text{CH}_4}(\text{mL}) = n_{\text{CH}_4} \times R \times T \times 10^3 \quad (20)$$

O valor da contante R aplicada na Equação (20) foi de 0,082 atm·L·(mol·K)⁻¹, e considerou-se a pressão atmosférica (1 atm).

Para calcular a massa de CQO no CH_4 é necessário ter em conta a reação de oxidação completa do CH_4 , apresentada na Equação (21). Através desta equação é possível verificar que são necessárias duas moles de oxigénio (O_2) para a oxidação do CH_4 a dióxido de carbono e água.



Atendendo à estequiometria da Equação (21), é possível obter-se a Equação (22) que relaciona o volume de CH₄ (em mL) no interior do reator a 309,15 K com a massa de CQO no CH₄ (g-CQO_{CH₄}).

$$m(\text{g} - \text{CQO}_{\text{CH}_4}) = n_{\text{CH}_4} \times 64 \quad (22)$$

A percentagem de remoção de matéria orgânica, considerando o valor de CQO inicial, é calculada a partir da Equação (23). Na expressão CQO_{inicial} e CQO_{final} correspondem à CQO determinada no início e no fim do tratamento anaeróbio, respetivamente.

$$\% \text{ Rem (inicial)} = \frac{(CQO_{\text{inicial}} - CQO_{\text{final}}) \times 100}{CQO_{\text{inicial}}} \quad (23)$$

O grau de acidificação é calculado através da Equação (24).

$$\text{Grau de Acidificação \%} = \frac{\sum AOV_{\text{final}} (\text{como CQO})}{CQO_{\text{inicial}}} \times 100 \quad (24)$$

O rendimento de produção de CH₄ por CQO removido, é calculado através da Equação (25).

$$\gamma_{\frac{\text{CH}_4}{\text{CQO}_{\text{rem}}}} = \frac{\text{Volume}_{\text{CH}_4 \text{ acumulado}}}{CQO_{\text{inicial}} - CQO_{\text{final}}} \quad (25)$$

O rendimento de produção de CH₄ por CQO adicionado é dado pela Equação (26).

$$\text{Metanização, \%} = \frac{\text{CH}_4 \text{ como CQO}}{CQO_{\text{inicial}}} \times 100 \quad (26)$$

A percentagem de AOX removido é calculada segundo a Equação (27).

$$\text{Remoção de AOX, \%} = \frac{AOX_{\text{inicial}} - AOX_{\text{final}}}{AOX_{\text{inicial}}} \times 100 \quad (27)$$

4. Resultados e Discussão

4.1. Estudo do efeito da carga orgânica e da adição de co-substratos

O primeiro ensaio teve como objetivos a otimização da carga orgânica do D0 a ser aplicada nos ensaios anaeróbios seguintes e a verificação de eventuais benefícios da adição de acetato e de glucose ao D0 como co-substratos. Para este efeito foram utilizados seis reatores: em dois foram utilizadas duas cargas orgânicas diferentes ($2 \text{ g-CQO}_s \cdot \text{L}^{-1}$ e $3 \text{ g-CQO}_s \cdot \text{L}^{-1}$) com apenas D0 como substrato; outros dois reatores foram alimentados na proporção 1:1 em CQO ($1 \text{ g-CQO}_s \cdot \text{L}^{-1}$ de D0 e $1 \text{ g-CQO}_s \cdot \text{L}^{-1}$ de co-substrato (glucose ou acetato)); e os dois reatores restantes foram alimentados apenas com os co-substratos ($2 \text{ g-CQO}_s \cdot \text{L}^{-1}$ de acetato ou de glucose). A nomenclatura utilizada na designação dos reatores é apresentada na Tabela 12.

Tabela 12 – Nomenclatura utilizada para cada um dos reatores em função da alimentação aplicada.

Nome do Reator	D0 ($\text{g-CQO}_s \cdot \text{L}^{-1}$)	Glucose ($\text{g-CQO}_s \cdot \text{L}^{-1}$)	Acetato ($\text{g-CQO}_s \cdot \text{L}^{-1}$)
D3	3	-	-
D2	2	-	-
DA	1	-	1
DG	1	1	-
A	-	-	2
G	-	2	-

4.1.1. Funcionamento geral dos reatores

Para avaliar a estabilidade do funcionamento dos reatores foi analisado o pH, a alcalinidade e a quantidade de SST e SSV no início e no fim dos ensaios.

4.1.1.1. SST e SSV

A determinação dos sólidos suspensos permite verificar a quantidade de matéria orgânica e inorgânica particulada presente nos reatores no momento inicial e final. A evolução dos SSV dão uma indicação da evolução da biomassa. Na Figura 7 apresenta-se a concentração do material particulado em termos de SST e SSV para o primeiro e último dia do tratamento anaeróbio e na Tabela 13 está apresentada a variação de SSV e SST.

Comparando a evolução dos SSV dos reatores D3 e D2, verifica-se que a utilização de uma carga orgânica de $3 \text{ g-CQO}_s \cdot \text{L}^{-1}$ conduziu à diminuição de 2,5 % dos SSV presentes no momento inicial, enquanto que no reator alimentado com $2 \text{ g-CQO}_s \cdot \text{L}^{-1}$ verificou-se um aumento de 13,7 % dos SSV, possivelmente devido ao crescimento microbiano. O único substrato utilizado

nos reatores D3 e D2 foi o efluente D0, substrato este que contém elevada quantidade de compostos inibitórios, nomeadamente AOX, para o crescimento microbiano. Desta forma, é razoável concluir que a utilização de uma maior carga orgânica, associada a uma maior quantidade de AOX, possa ter conduzido à inibição do crescimento microbiano, verificada no reator com maior carga orgânica (D3).

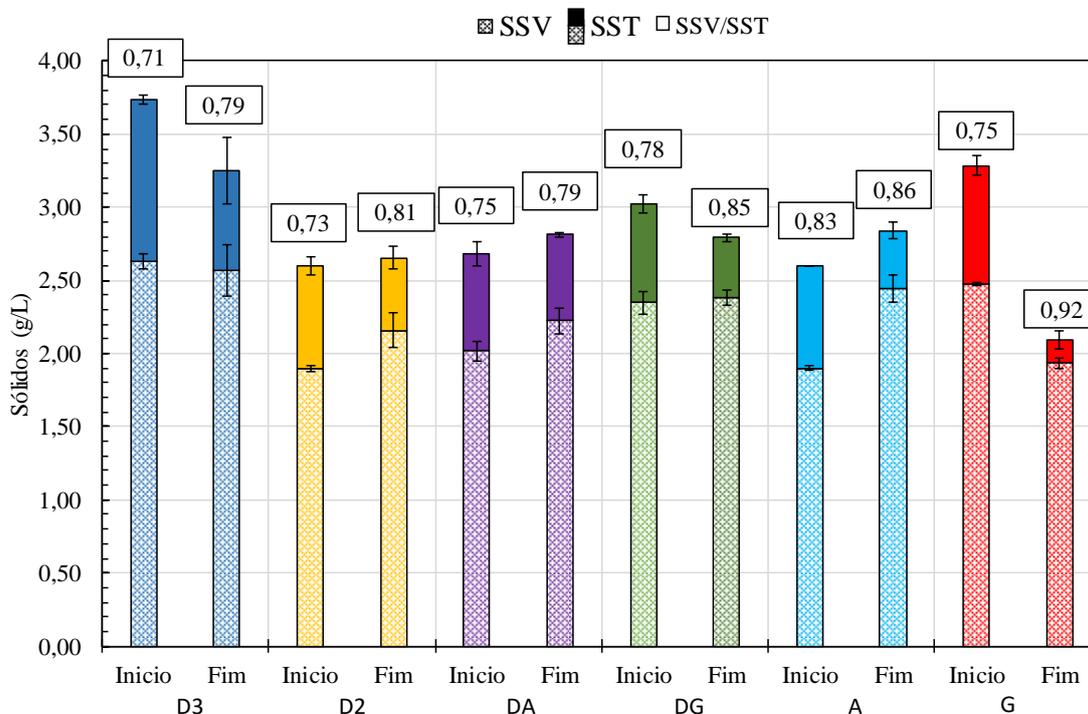


Figura 7 – Concentração de SST e SSV no ponto inicial e final dos reatores.

Tabela 13 – Variação de quantidade de sólidos entre o início e o fim dos reatores.

	D3	D2	DA	DG	A	G
Varição SSV (%)	-2,50	13,7	10,3	1,42	28,5	-21,9
Varição SST (%)	-13,0	2,05	4,81	-7,60	9,29	-36,2

*variação negativa corresponde à diminuição de SSV e SST, enquanto que a positiva corresponde à produção.

No reator DA, em que acetato + D0 ($1 \text{ g-CQO}_s \cdot \text{L}^{-1} + 1 \text{ g-CQO}_s \cdot \text{L}^{-1}$) foram utilizados como substratos, verificou-se um aumento de 10,3 % de SSV. O aumento de SSV no reator A, onde não estão presentes os compostos menos biodegradáveis e potencialmente inibitórios que constituem o D0, foi o que apresentou o maior crescimento de 28,5 %, dado também ser o co-substrato mais biodegradável. Desta forma, verifica-se, a partir dos reatores DA e A, que a presença de D0 no reator DA fez com que o crescimento microbiano fosse inferior ao de A, devido à presença de compostos organoclorados no D0 menos biodegradáveis.

No reator DG a quantidade de SSV inicial foi de $2,35 \pm 0,08 \text{ g-SSV} \cdot \text{L}^{-1}$ e a final foi de $2,38 \pm 0,05 \text{ g-SSV} \cdot \text{L}^{-1}$, verificando-se que não ocorreu um aumento significativo de SSV. No reator G, a utilização de apenas glucose como substrato conduziu à diminuição de SSV, dado neste reator haver mais glucose ($2 \text{ g-CQOs} \cdot \text{L}^{-1}$) do que no reator DG, e como parte deste material está na forma particulada, irá contribuir para o SSV inicial. Assim, foi observada uma diminuição de SSV, muito provavelmente devido à solubilização do substrato particulado e do pouco crescimento bacteriano.

Pelas variações de SSV nos reatores D2, DA e DG, constata-se que a utilização de D0 com adição de uma fonte de carbono prontamente disponível, glucose ou acetato, não resultou no aumento do crescimento de SSV, em relação com o reator alimentado apenas com $2 \text{ g-CQOs} \cdot \text{L}^{-1}$ de D0, provavelmente por a comunidade existente estar adaptada aos substratos mais biodegradáveis.

O rácio SSV/SST (0,71-0,92) para todos os reatores indica que tanto no início como no final do tratamento anaeróbio a maior parte dos sólidos suspensos eram voláteis e adequados para um tratamento biológico. Pela análise da Figura 7 ainda é possível verificar que a quantidade de sólidos suspensos fixos (diferença entre os SST e os SSV) diminuiu com o tratamento anaeróbio, para todos os reatores.

4.1.1.2. pH e alcalinidade

De acordo com a literatura, a digestão anaeróbia é sensível às mudanças de pH, principalmente devido aos microrganismos metanogénicos que crescem a pH superior a 6,6 [9]. Por outro lado, as bactérias acidogénicas são menos sensíveis e crescem entre pH 4,0 e 8,5 [9]. Na Figura 8 são apresentados os valores iniciais e finais de pH e de alcalinidade dos reatores.

No gráfico (a) da Figura 8 verifica-se que o pH final da maioria dos reatores (D3, D2, DA, DG e A) se situou entre 6,65 e 7,74 estando, portanto, dentro da gama de pH ótimo para a produção de CH_4 [9]. A alcalinidade nestes reatores aumentou entre o momento inicial e o final o que contribuiu para que o pH final estivesse dentro da gama de pH de produção de CH_4 .

O pH final do reator alimentado apenas com glucose foi 5,59, o que indicia que as condições não foram favoráveis à atividade da comunidade metanogénica. Para além disso, houve uma diminuição da alcalinidade pelo que a alcalinidade final deste último é inferior à alcalinidade inicial. Verifica-se que os reatores com glucose apresentaram uma menor alcalinidade inicial, pelo que foram mais suscetíveis ao abaixamento de pH. Desta forma, é possível prever que a produção e acumulação de AOV neste reator levou ao abaixamento do pH dado a alcalinidade não ter sido suficiente para contrariar essa produção.

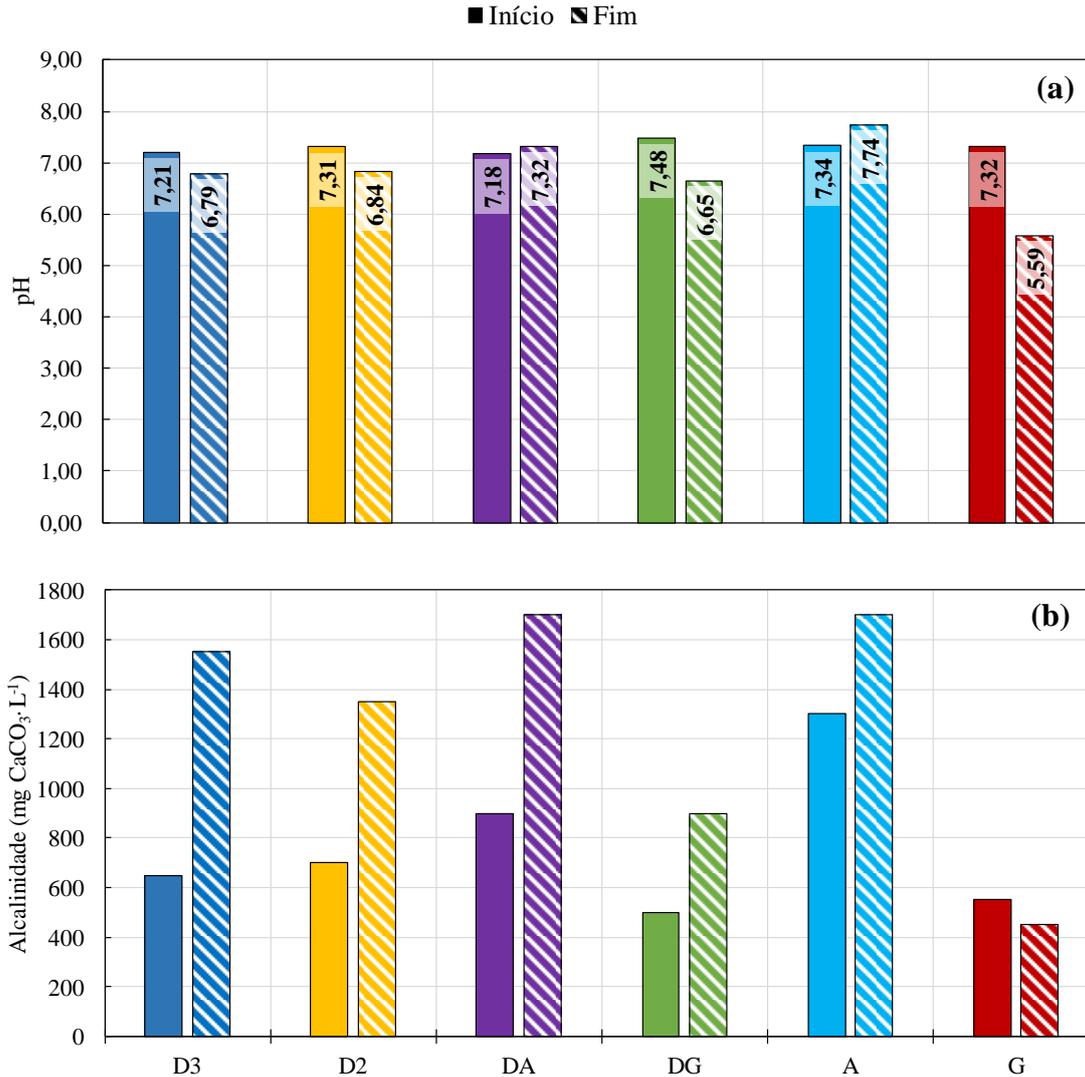


Figura 8 – pH (a) e alcalinidade (b) iniciais e finais dos reatores.

4.1.2. Remoção de AOX

Na Figura 9 são apresentadas as concentrações de AOX iniciais e finais dos reatores D3, D2, DA e DG. Os reatores A e G não continham AOX, uma vez que não foram alimentados com D0, e por este motivo, não são apresentados.

O reator D2 foi o que apresentou maior taxa de remoção de AOX, com uma remoção de 74,2 % do AOX inicial, seguindo-se o reator D3, com uma remoção de 70,6 %. Verifica-se ainda que a utilização de acetato e de glucose como co-substrato conduziu a remoções de 52,6 % e 70,4 % do AOX inicial, respetivamente. Estes resultados são expectáveis dado o AOX inicial ser mais elevado para D2 e D3, e por isso maior contribuição para a sua adsorção nas lamas, para além da biodegradação. No D3, dado o AOX ser um composto inibidor, não conduziu no global a remoções tão elevadas como no D2.

As remoções obtidas com a utilização de glucose como co-substrato são semelhantes às referidas na literatura. A taxa de remoção de AOX no reator DG é semelhante à obtida por Ali e Sreerishnan [57]. Estes autores reportaram que a adição de 1 % (m/v) de glucose no tratamento anaeróbio, em reator *batch*, de efluentes de branqueamento de pastas provenientes de resíduos agrícolas com concentração inicial $32 \text{ mg-Cl}\cdot\text{L}^{-1}$, conduziu à remoção de 73 % do AOX presente, ao fim de 70 dias de operação [57].

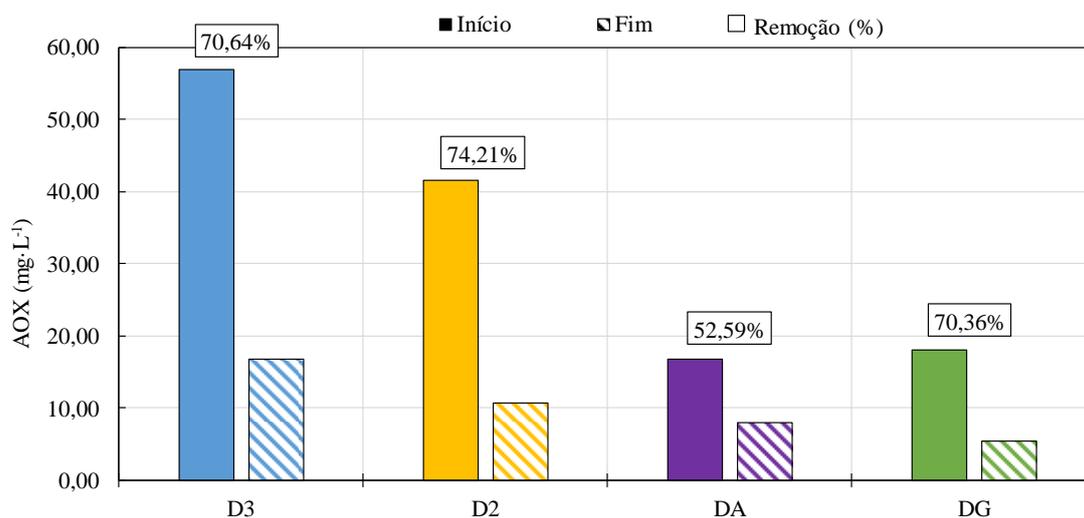


Figura 9 – AOX inicial e final dos reatores D3, D2, DA e DG.

Deshmukh *et.al.*[58], estudaram a adição de glucose e de acetato em efluentes de branqueamento de pasta com concentrações de AOX de $28 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$. Estes autores obtiveram remoções de AOX de 88, 90,7 e 92,2 % sem a adição de fonte de carbono suplementar, com a adição de $4 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de glucose e com a adição de $4 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de acetato, respetivamente. No presente trabalho foi adicionada $1 \text{ g-CQO}_s\cdot\text{L}^{-1}$ de co-substrato. Comparando os resultados obtidos com os descritos por Deshmukh *et.al.*[58], pode-se prever que possivelmente a adição de maior quantidade de co-substrato poderia conduzir à maior remoção de AOX. No entanto para tal acontecer seria utilizada maior quantidade de acetato do que do efluente que se pretende tratar o que não parece ser uma opção economicamente viável para o tratamento do resíduo.

No que diz respeito à utilização de glucose e de acetato contribuir para o aumento da eficiência de remoção de AOX os resultados obtidos no presente trabalho não corroboram com o que foi relatado [58]. No entanto, é de referir que a concentração inicial de AOX é bastante mais baixa (menos de metade), nos ensaios onde se adicionou co-substrato, o que terá contribuído para uma menor adsorção nas lamas e por conseguinte uma menor remoção global deste composto.

Deshmukh *et.al.*[58] também relataram remoções de 28 % de AOX quando a concentração inicial foi de $48 \text{ mg-Cl}\cdot\text{L}^{-1}$. Chaparro *et.al.*[53] obtiveram remoções de AOX entre 40 e 45 % quando trataram num reator anaeróbio de leito fixo efluentes de branqueamento *ECF* de pasta *kraft*. Buzzini *et.al.*[55] removeram 99,7 % dos compostos organoclorados presentes

num efluente de branqueamento de pasta *kraft* simulado. Desta forma, as remoções obtidas nos reatores D2 e D3, 74,21 e 70,64 %, estão entre as remoções relatadas na literatura.

As concentrações finais de AOX dos reatores DA (7,95 mg-AOX·L⁻¹) e DG (5,37 mg-AOX·L⁻¹) são inferiores às dos reatores D2 (10,7 mg-AOX·L⁻¹) e D3 (16,7 mg-AOX·L⁻¹). Ou seja, os reatores alimentados com menor quantidade de AOX e com acetato e glucose apresentaram valores de AOX finais inferiores aos dos restantes reatores. Isto pode dever-se à presença de menores quantidades de AOX, ou então à utilização dos co-substratos. Mais estudos terão de ser realizados com o intuito de verificar se a utilização dos co-substratos realmente conduziu a concentrações finais de AOX inferiores. A halorespiração e co-metabolismo são os principais mecanismos de remoção de compostos organoclorados. Os eletrões necessários para a desalogenação reductiva são gerados a partir da oxidação do H₂ que provém da fermentação de compostos orgânicos como glucose, acetato, butirato, etc. Desta forma, a suplementação dos doadores de eletrões fornece, teoricamente, condições termodinamicamente mais favoráveis para a reação de decloração microbiana [58], algo que não foi evidente no presente trabalho.

As remoções de AOX obtidas podem dever-se à bioissorção destes compostos por parte das lamas [18], à interação destes compostos com outros que promovem a degradação dos compostos organoclorados, a alterações no pH que conduzam à degradação do AOX [74] e também à biodegradação anaeróbia destes compostos.

As bactérias anaeróbias têm a capacidade de transformar os compostos clorados em compostos que são mais facilmente degradados, através de mecanismos de desalogenação. Através deste processo ocorre a libertação de iões cloreto. Por este motivo, procedeu-se à análise dos iões cloreto presentes nos reatores no momento inicial e após o tratamento anaeróbio. Os resultados obtidos estão representados na Figura 10.

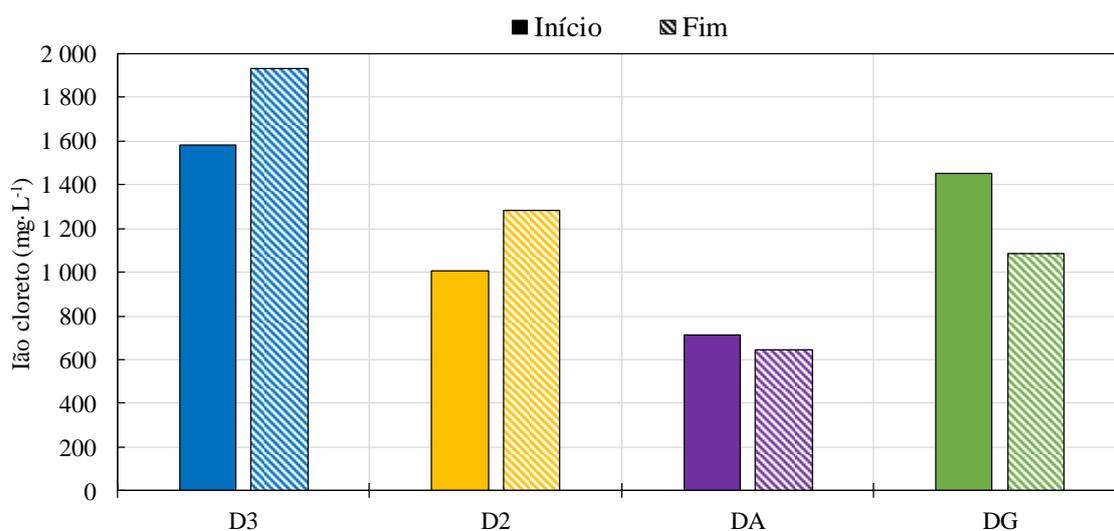


Figura 10 – Concentração de cloretos nos reatores no início e no fim tratamento.

Na Figura 10 é possível verificar que a concentração inicial de cloretos variou entre 713,72 e 1580,90 mg·L⁻¹. Nos primeiros dois reatores apresentados na figura verifica-se o aumento de iões cloreto entre o início e o fim do tratamento anaeróbio. Inicialmente, os filtrados dos reatores D3 e D2 possuíam cerca de 1580,90 e 1007,70 mg·L⁻¹ e após o tratamento os filtrados continham cerca de 1933,26 e 1280,44 mg·L⁻¹, tendo ocorrido o aumento de 22,3 e 27,1 % de cloretos, respetivamente. Este aumento provavelmente está relacionado com a libertação de iões cloreto que ocorre durante a desalogenação reductiva do AOX, processo este que leva à diminuição da bio refratariedade dos compostos organoclorados [75].

O balanço de massa aos cloretos dos reatores D3 e D2, tendo em conta a soma da quantidade de AOX e de cloretos (apresentados em mg·Cl·L⁻¹ nas Figura 9 e Figura 10, respetivamente), mostra que a concentração de iões cloreto no final do tratamento é superior à que aparentemente estava presente na inoculação. Parker *et.al.* [76], propuseram duas hipóteses para justificar este resultado. A primeira hipótese indica que o cloreto adicional pode ser resultado da libertação de cloretos intracelulares do inóculo. No entanto esta hipótese foi descartada pelo autor quando colocou as lamas em água durante 14 dias a 35°C e verificou que a quantidade de cloreto inicial e final era inferior ao limite de deteção do método (10mg·L⁻¹). A segunda hipótese supõe que o cloreto adicional pode resultar da degradação da matéria organoclorada que não é quantificada na determinação de AOX. Esta hipótese foi testada pelo autor que analisou as concentrações de cloreto, AOX e haleto total em amostras que de seguida foram armazenadas. Após dois meses, concluíram que em comparação com as concentrações iniciais, as soluções finais continham menor quantidade de AOX e maior quantidade de cloretos. Além disso verificaram que a soma da quantidade de cloretos e de AOX era inferior à quantidade de haleto total. Os autores concluíram que este resultado pode ser consequência da deterioração da matéria organoclorada durante o armazenamento e que o cloreto adicional produzido durante o tratamento anaeróbio pode ter sido originado pela matéria organoclorada que não foi detetada pelo método de determinação de AOX utilizado [76].

Nos reatores DA e DG, verifica-se que apesar de ter ocorrido remoção de AOX a quantidade de iões cloreto diminuiu com o tratamento anaeróbio. Neste caso, propõe-se a hipótese dos iões cloreto poderem ter sido adsorvidos pelas lamas biológicas.

4.1.3. Produção de CH₄

Na Figura 11 são apresentados os volumes de CH₄ acumulados produzidos por cada um dos reatores. O gráfico da pressão acumulada, volume de biogás e percentagem de CH₄ estão disponíveis no Anexo B. Verifica-se que a produção de CH₄ começou mais cedo, ao décimo primeiro dia, nos reatores alimentados com acetato, reatores A e DA. Além disso, verifica-se que foi nestes reatores que ocorreu maior produção de CH₄, sendo que no reator A foram produzidos cerca de 77 mL e no reator DA foram produzidos cerca de 85 mL.

Comparando os reatores DG e DA com o reator D2, no que diz respeito ao desempenho quanto ao volume de CH₄ produzido, verifica-se que a adição de glucose e de acetato ao D0 resultou no aumento do volume de CH₄ produzido em cerca de 3,0 e 66,6 %, respetivamente. Verifica-se ainda que esta adição levou a que a metanogénese começasse mais rapidamente e que o CH₄ fosse detetado a partir do décimo primeiro e décimo quarto dia nos reatores DA e DG, respetivamente. A maior parte do CH₄ produzido no reator DA ocorreu até ao décimo quarto dia.

O reator G apresentou menor produção de CH₄ do que os restantes reatores, o que pode estar associado à acidificação do mesmo, uma vez que o pH final deste foi 5,59. Desta forma, provavelmente alguns microrganismos da comunidade metanogénica, sensíveis às variações de pH, foram inibidos resultando na menor produção de CH₄.

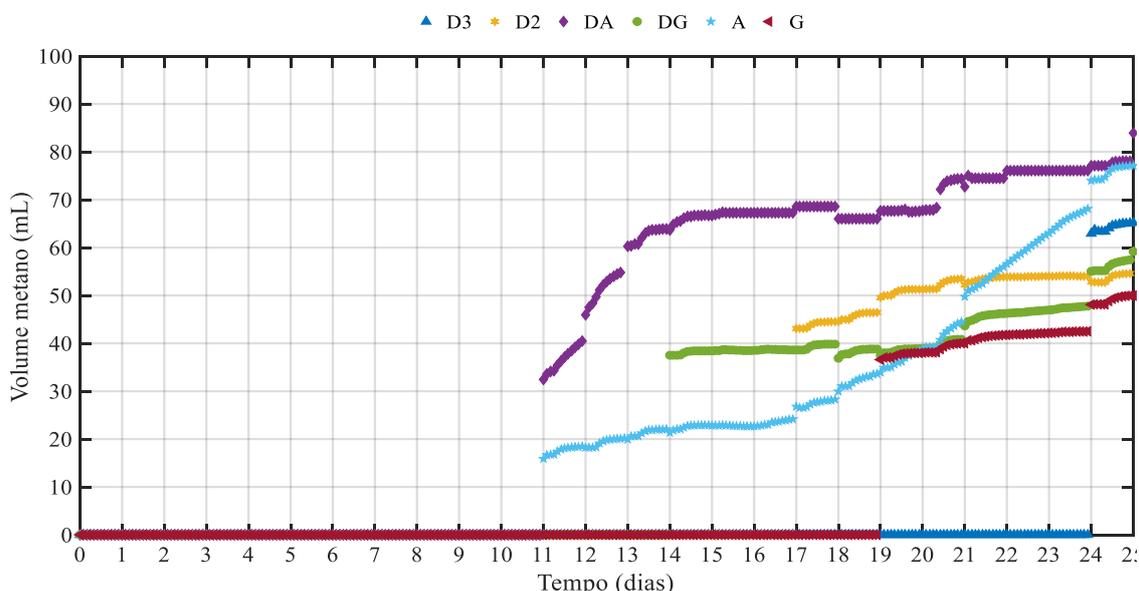


Figura 11 – Produção de CH₄ pelos reatores ao longo dos 25 dias de tratamento.

A utilização de uma carga orgânica mais elevada no reator D3 do que em D2 fez com que a produção de CH₄ se iniciasse mais tarde, o que indicia o potencial inibidor do substrato. Como é possível verificar, só foi detetado CH₄ no reator D3, no vigésimo quarto dia. No entanto, o volume final de CH₄ no reator D3 é superior ao produzido por D2.

Através deste parâmetro verifica-se que a utilização de acetato e de glucose como co-substrato nestes reatores, parece ter reforçado a comunidade metanogénica levando a que a produção de CH₄ ocorresse mais rapidamente. Além disso, a presença de acetato parece ter levado à maior produção de CH₄.

4.1.4. Remoção de matéria orgânica, grau de metanização e de acidificação

Na Figura 9 observa-se a composição inicial e final dos reatores em termos de CQO_s. Além disso, está representada a constituição da CQO_s em termos dos AOV individuais.

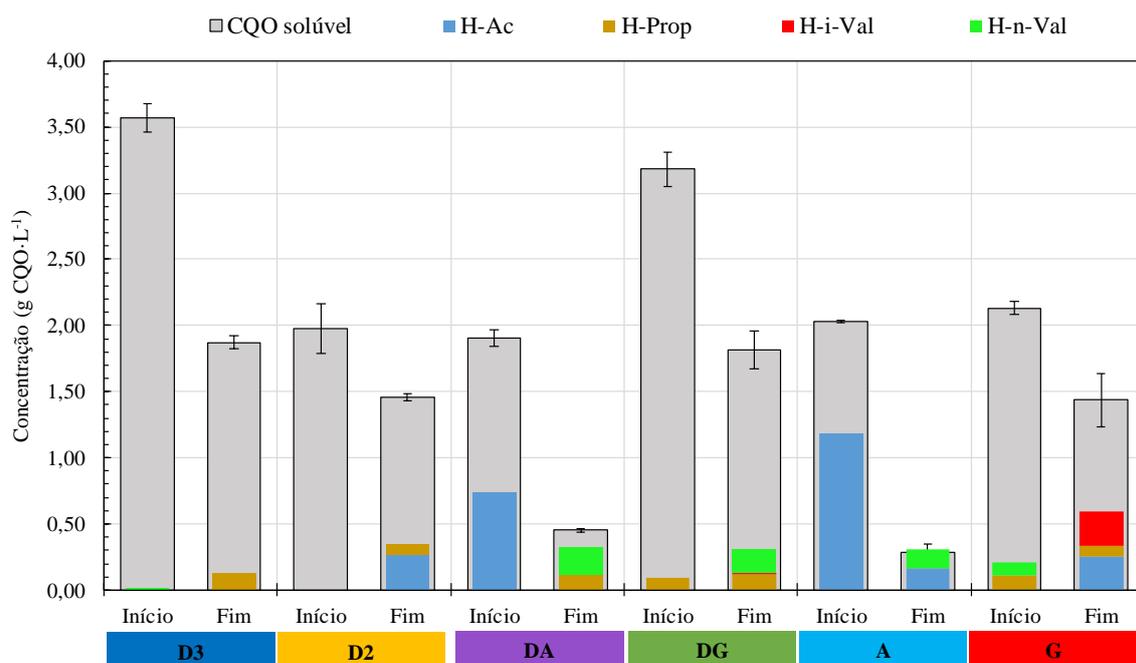


Figura 12 – CQO e AOV nos reatores no momento inicial e final.

O valor esperável para a CQO_s inicial dos reatores D2, DA, DG, A e G era 2 g-CQO_s·L⁻¹. No entanto, como é possível verificar na Figura 12, a CQO_s inicial do reator DG foi superior à esperada, provavelmente devido à presença de sólidos orgânicos na solução de glucose utilizada na preparação do substrato. A CQO_s inicial dos reatores D2, DA, A e G foi próximo do esperado. No reator D3 foi adicionado cerca de 3 g-CQO_s·L⁻¹, e por isso o valor mais elevado no gráfico.

Pela análise da mesma figura, verifica-se que em todos os reatores ocorreu remoção da CQO_s durante o tratamento anaeróbio. As taxas de remoção de matéria orgânica são apresentadas na Tabela 14.

Segundo os valores apresentados na Tabela 14, as taxas de remoção de matéria orgânica, variaram entre 26,2 e 85,7 %, tendo aumentado segundo a ordem D2 < G < DG < D3 < DA < A.

Tabela 14 – Taxas de remoção de carga orgânica, de metanização e de acidificação de cada reator.

	Remoção de CQO _s (%) *	Metanização (%) *	Acidificação (%) *	CH ₄ /CQO _s inicial (mL-CH ₄ ·g-CQO _s inicial ⁻¹)	AOV/Alc
D3	47,5	30,7	3,69	121,7	0,08
D2	26,2	46,5	17,4	193,9	0,25
DA	76,2	74,1	17,2	335,0	0,19
DG	42,9	31,3	9,57	124,0	0,34
A	85,7	64,0	15,0	253,6	0,18
G	32,6	39,5	33,5	156,4	1,58

*considerando o valor de CQO_s inicial

A maior taxa de remoção de matéria orgânica (85,7 %) foi obtida no reator A, seguido pelo reator DA (76,2 %). Pela comparação da eficiência de remoção obtidas nestes reatores com a obtida no reator D2 (26,6 %), pode-se concluir que, para cargas orgânicas iniciais próximas de 2 g-CQO_s·L⁻¹, a presença de acetato conduziu a maiores remoções de CQO_s. Isto deveu-se ao facto de o acetato ser um composto com elevada biodegradabilidade anaeróbia e um dos principais substratos para os microrganismos metanogénicos na produção de CH₄. Desta forma, o acetato foi mais rapidamente utilizado pelo consórcio microbiano, o que conseqüentemente conduziu a uma maior remoção de matéria orgânica. Vários estudos [53], [54], [58] indicam que a presença de maiores quantidades de AOX conduz à diminuição da eficiência de remoção da CQO_s e da produção de CH₄, desta forma, é previsível que nos reatores alimentados com maior quantidade de D0 ocorra menor produção de CH₄ e remoção de CQO.

Na utilização de D0 juntamente com acetato e glucose (reatores DA e DG, respetivamente) verificaram-se remoções de matéria orgânica de 76,2 e 42,9 %, respetivamente, o que confirma que o acetato é o substrato preferencial da comunidade metanogénica. Os reatores DA e DG apenas contêm 1 g-CQO_s·L⁻¹ de D0 e, por isso, têm menor quantidade de compostos inibitórios. Assim, o aumento da remoção de matéria orgânica nos reatores DA e DG em comparação com o D2 pode dever-se tanto à presença dos co-substratos (acetato e glucose), que são compostos mais biodegradáveis do que o D0, como à menor quantidade de D0 presente. Ali *et. al.* [57] reportaram a remoção de 66 % da CQO quando adicionaram 1 % (m/v) de glucose ao efluente de branqueamento a tratar anaerobiamente. No trabalho realizado foi adicionada uma menor quantidade, de cerca de 0,1 % (m/v) de glucose, o que contribuiu para que a remoção de CQO_s fosse inferior à indicada na literatura [57].

O aumento da carga orgânica de 2,0 para 3,0 g-CQO_s·L⁻¹, não foi inibitório na remoção de matéria orgânica, uma vez que a remoção no reator D3 foi superior à obtida em D2, 47,5 e 26,2 %, respetivamente. Chaparro *et al.* [53] obtiveram remoções de CQO_s entre 50 e 52 % no tratamento de efluente de branqueamento de pasta *kraft* (ECF) operando um reator de leito fixo, com tempo de retenção hidráulico de 25 horas, e com a biomassa aclimatizada. A performance do reator anaeróbio é altamente influenciada pela biomassa utilizada sendo que, segundo Speece [77], a biomassa aclimatizada e imobilizada parece ser um fator chave na tolerância e biodegradação dos compostos tóxicos. Buzzini *et al.* [55] reportaram a remoção de 76 % da CQO de efluentes simulados de branqueamento de pastas *kraft* contendo até 1,4 g-CQO·L⁻¹ e concluíram ainda que, nas condições utilizadas e com o reator *UASB*, a presença dos compostos organoclorados apresentou baixo impacto na remoção do CQO. O mesmo se verificou nos reatores D3 e D2 uma vez que as concentrações iniciais de AOX eram de 56,9 e 41,6 mg-Cl·L⁻¹ e no primeiro ocorreu maior remoção de CQO_s do que no segundo.

A remoção de matéria orgânica do efluente ocorre principalmente com a produção de CH₄ e de dióxido de carbono. De acordo com a Tabela 14, o grau de metanização dos reatores

variou entre 30,7 e 74,1 %, aumentando de acordo com a seguinte ordem: D3 < DG < G < D2 < A < DA.

Os reatores D2 e G apresentaram taxas de remoção de matéria orgânica de 26,2 e 32,6 % e graus de metanização de 46,5 e 39,5 %, respectivamente. Estes resultados não são concordantes uma vez que indicam que ocorreu maior produção de CH₄ (em CQO) do que remoção de matéria orgânica (em CQO_s). Duas hipóteses são propostas para justificar este resultado. Por um lado, os resultados podem ser justificados pela solubilização de matéria orgânica que inicialmente não foi contabilizada na CQO_s, conforme foi confirmado na solução de glucose que apresentava sólidos suspensos. Após a solubilização, estes compostos passam a estar disponíveis como substrato para as bactérias anaeróbias para produção de AOV e CH₄. Por outro lado, o volume de CH₄ produzido pode ter sido calculado em excesso devido a erros no sistema Oxitop.

Os reatores alimentados com acetato, reatores A e DA, apresentaram graus de metanização de 64,0 e 74,1 %, respectivamente. Estes valores são superiores ao grau de metanização obtido no reator D2 (46,5 %). Esta tendência era a esperada uma vez que o acetato é facilmente convertido em CH₄ durante a digestão anaeróbia e, por isso, nos casos em que foi utilizado maior quantidade de acetato, ocorreu maior conversão de CQO_s em CH₄. Por outro lado, apesar de a quantidade de acetato no reator A ser superior à do reator DA, verificou-se uma maior taxa de remoção de matéria orgânica, mas um grau de metanização inferior ao do reator DA. Desta forma, verifica-se que o consórcio microbiano do reator DA, em particular os microrganismos metanogénicos, não foram tão inibidos pela presença dos compostos organoclorados presentes no D0 (a concentração de AOX era baixa), como a inibição verificada nos microrganismos metanogénicos no reator A, devido à presença de alta concentração de acetato (2 g-CQO·L⁻¹).

Os reatores DG e G apresentaram graus de metanização de 31,3 e de 39,5 %, respectivamente, valores estes inferiores ao obtido no reator D2 (46,5 %). Estes reatores foram os que apresentaram menores valores de pH final (6,65 e 5,59), o que pode ter conduzido à inibição da comunidade metanogénica, e consequentemente a um grau de metanização mais reduzido, e um favorecimento da comunidade acidogénica. Na Figura 12 é possível verificar que no reator G ocorreu acumulação de AOV, o que conduziu à acidificação do meio. Os reatores G e DG apresentaram um grau de acidificação de 9,57 e 33,5 %, respectivamente.

O reator D3 foi o que teve menor grau de metanização. Este reator foi alimentado com maior quantidade de D0 do que os restantes e, consequentemente, com maior quantidade de AOX. O menor grau de metanização pode ser explicado pela maior quantidade de compostos recalcitrantes e potencialmente inibidores presentes neste reator, que pode ter levado a que parte dos microrganismos metanogénicos fossem inibidos. Apesar da comunidade metanogénica parecer ter sido inibida neste reator, foi ainda obtida uma taxa de remoção de matéria orgânica de

47,5 %. O grau de acidificação deste reator foi também o mais reduzido (3,69 %), o que indica que não ocorreu acumulação de AOV.

A produtividade em CH_4 do reator D3 foi de $121,7 \text{ mL-CH}_4 \cdot \text{g-CQO}_{\text{s inicial}}^{-1}$, para D2 foi de $193,9 \text{ mL-CH}_4 \cdot \text{g-CQO}_{\text{s inicial}}^{-1}$, para DA foi de $335,0 \text{ mL-CH}_4 \cdot \text{g-CQO}_{\text{s inicial}}^{-1}$, para DG foi de $124,0 \text{ mL-CH}_4 \cdot \text{g-CQO}_{\text{s inicial}}^{-1}$, para A foi de $253,6 \text{ mL-CH}_4 \cdot \text{g-CQO}_{\text{s inicial}}^{-1}$ e para G foi de $156,4 \text{ mL-CH}_4 \cdot \text{g-CQO}_{\text{s inicial}}^{-1}$. No trabalho de Larsson *et al.* [54] foram obtidas produtividades de $76,9 \text{ mL-CH}_4 \cdot \text{g-CQO}_{\text{s inicial}}^{-1}$ na digestão anaeróbia de efluentes de branqueamento *ECF* de pasta *kraft*, num reator *UASB* em 150 dias de operação. No presente trabalho obteve-se produtividades em CH_4 superiores às obtidas nesse trabalho.

Os AOV (principalmente, o ácido acético) são os principais intermediários que conduzem à produção de CH_4 , no entanto a sua acumulação durante o processo de digestão anaeróbia pode levar à diminuição do pH para valores em que os microrganismos metanogênicos são inibidos. Desta forma, nos reatores metanogênicos, espera-se que não ocorra uma acumulação substancial de AOV. Pela análise da Figura 12 verifica-se que a concentração total final de ácidos para todos os reatores é inferior a $0,75 \text{ g-CQO} \cdot \text{L}^{-1}$.

Comparando a produção de AOV dos reatores D2 e D3 verifica-se que ao final de 25 dias de tratamento anaeróbio o reator com menor carga orgânica (D2) contém maior quantidade de AOV ($0,344 \text{ g-CQO} \cdot \text{L}^{-1}$ de ácido propiónico e acético) do que o reator alimentado com $3 \text{ g-CQO} \cdot \text{L}^{-1}$ ($0,132 \text{ g-CQO} \cdot \text{L}^{-1}$, contendo ácido propiónico), o que confirma o potencial inibidor do D0.

Cerca de 72,4 % e de 100 % da CQO_{s} final nos reatores DA e A corresponde a ácido propiónico e valérico e a ácido acético e valérico, respetivamente. Desta forma é possível prever que para tratamentos anaeróbios mais prolongados, nas condições aplicadas, provavelmente seriam obtidas remoções de matéria orgânica próximas de 100 %, uma vez que os ácidos poderiam ser utilizados na produção de CH_4 .

Um dos critérios utilizados para avaliar a estabilidade dos reatores durante o tratamento anaeróbio baseia-se no rácio AOV/Alcalinidade (AOV/Alc). Os reatores encontram-se estáveis para o tratamento anaeróbio quando este rácio é inferior a 0,4. O rácio AOV/Alc do reator G (1,58) é significativamente superior a 0,4, o que aponta para a instabilidade deste reator no que diz respeito à produção de CH_4 . Os rácios AOV/Alc dos restantes reatores são inferiores a 0,4, pelo que é previsível que as condições aplicadas possibilitem a produção de CH_4 .

O grau de acidificação, de metanização e o rácio AOV/Alc indicam que os reatores D3, D2, DA, DG e A funcionaram bem como metanogênicos, enquanto que o reator G apresentou um comportamento acidogénico, benéfico para a produção de AOV.

4.1.5. Considerações gerais sobre o ensaio

Dos reatores que foram alimentados com D0, o reator que foi suplementado com acetato (DA) obteve maiores taxas de remoção de CQO_s e de metanização, em comparação com os restantes. A taxa de remoção de CQO_s e o grau de metanização foi 2,9 e 1,6 vezes maior no reator alimentado com D0 e acetato (DA) do que no reator D2, respetivamente. Desta forma, o acetato parece ter reforçado o consórcio microbiano para a produção de CH₄. No entanto, este reator foi o que obteve menor taxa de remoção de AOX (52,6%).

A adição de glucose ao D0 (na proporção de 1:1 em CQO) conduziu ao aumento de apenas 3,0 % na produção de CH₄, quando comparado com o reator apenas alimentado com D0 a 2 g-CQO_s·L⁻¹, pelo que se pode assumir que esta adição não é vantajosa a nível de utilização de recursos. A remoção de AOX no reator DG foi superior à obtida no reator DA, mas ambas foram inferiores à do reator D2.

Em termos de carga orgânica em D0, conclui-se que a utilização de 2 g-CQO_s·L⁻¹ parece ter sido a mais benéfica do que a utilização de 3 g-CQO_s·L⁻¹. O grau de metanização do reator D2 foi mais elevado do que o do reator D3, 46,5 e 30,7 %, respetivamente. O reator alimentado com 2 g-CQO_s·L⁻¹ foi também o que levou à remoção de maior quantidade de AOX.

Os resultados apresentados indicam que a utilização dos co-substratos utilizados parece não compensar a sua utilização em termos de remoção de AOX, apesar de ter havido alguma melhoria em termos de remoção de matéria orgânica e de grau de metanização. Por este motivo, nos ensaios seguintes não se utilizou glucose nem acetato e a carga orgânica escolhida foi de 2 g-CQO_s·L⁻¹.

4.2. Biodegradabilidade do D0 com a adição de cinzas

Nesta parte do trabalho pretendeu-se estudar a biodegradabilidade do D0 após ser neutralizado com cinzas CA5, CTB e lamas de Cal provenientes do processo industrial. Desta forma, antes da realização do ensaio anaeróbio, procedeu-se à caracterização e discussão dos resultados obtidos apenas com a adição das cinzas ao D0, sendo posteriormente analisada a biodegradabilidade anaeróbia destas misturas originais (não filtradas) e filtradas.

4.2.1. Caracterização do D0 com a adição de cinzas

Procedeu-se à caracterização dos diferentes substratos a utilizar nos reatores. Na Tabela 15 é apresentada a caracterização do D0 a pH 7 (adição de NaOH) e das misturas originais e filtradas do D0 com as diferentes cinzas utilizadas, em termos de pH, CQO_s, AOX, CBO₅ e CBO₅/CQO_s inicial. A concentração de AOX do D0 original utilizado neste ensaio, antes de qualquer adição era de 69,5 mg-Cl⁻·L⁻¹ e o pH era de 2.

Tabela 15 – Caracterização do D0 com adição de cinzas CTB, CA5 e lamas de Cal filtrados e não filtrados.

Parâmetros	D0 pH7 (com NaOH)	D0+CTB		D0+CA5		D0+CAL	
		Filtrado	Não filtrado	Filtrado	Não filtrado	Filtrado	Não filtrado
pH	7,01±0,009	7,34		7,04		7,14	
AOX (mg·L ⁻¹)	57,0	44,9		46,0		46,1	
CQO _s (g·L ⁻¹)	2,62±0,02	2,72±0,02		2,60±0,05		2,69±0,06	
CBO ₅ (g·L ⁻¹)	0,234±0,053	0,186	0,176	0,336	0,309	0,200	0,176
CBO ₅ /CQO _s	0,097±0,022	0,068	0,065	0,129	0,119	0,074	0,065

A neutralização do D0 conduziu à diminuição da quantidade de AOX presente na solução, fenómeno já descrito [74]. Tal se verificou com a neutralização do D0 com NaOH uma vez que este procedimento removeu cerca de 18 % do AOX, passando de 69,5 para 57,0 mg- Cl⁻·L⁻¹.

Comparando a concentração de AOX do D0 a pH 2, com a concentração destes compostos no D0 neutralizado com cinzas CTB, cinzas CA5 e lamas de cal, verifica-se que com a neutralização, a concentração de AOX diminuiu para 44,9, 46,0 e 46,1 mg-Cl⁻·L⁻¹, obtendo-se taxas de remoção de 35,4, 33,8 e 33,6 %, respetivamente. Pelos resultados apresentados, verifica-se que a adição de cinzas ao D0 com o intuito de o neutralizar, conduziu a maiores taxas de remoção AOX do que quando foi utilizado NaOH. Como indicado por Novais e Rajamma [65], [78], as cinzas contêm elementos metálicos, como Ca, Al, K, Fe e Mg, principalmente na forma oxidada. Quando as cinzas são misturadas com água, estas são hidrolisadas e são parcialmente solubilizadas [79]. A fração solúvel das cinzas, os iões, conduzem ao aumento do pH do efluente,

enquanto que a parte insolúvel pode funcionar como adsorvente [79]. Desta forma, as cinzas podem ter adsorvido parte do AOX presente no D0 conduzindo à sua diminuição no efluente. A adsorção de compostos organoclorados por cinzas volantes foi relatado por Sell *et al.*[80]. Este autor utilizou diferentes tipos de cinzas para remover compostos organoclorados misturados em água e CQO de efluentes de branqueamento de pasta. Nesse estudo foram obtidas remoções entre 65,7 e 99 % dos compostos organoclorados, dependendo das cinzas utilizadas. Com cinzas acidificadas obtiveram a remoção de 72,1 e 95,4 % da CQO [80]. No presente trabalho não se verificou a remoção de CQO_s com a aplicação de cinzas, no entanto, do ponto de vista de remoção de AOX, é possível concluir que a substituição do NaOH por cinzas alcalinas provenientes da queima de resíduos para neutralizar o D0 é economicamente e ambientalmente favorável.

O aumento do CBO₅ indica o aumento da biodegradabilidade devido à conversão de substratos orgânicos não biodegradáveis em compostos mais biodegradáveis. A razão CBO₅/CQO_s é frequentemente utilizada como um fator que indica a biodegradabilidade do efluente. Enquanto que razões superiores a 0,500 indicam que o resíduo é facilmente biodegradável, razões inferiores a 0,300 mostram que o resíduo apresenta reduzida biodegradabilidade devido aos compostos recalcitrantes e potencialmente tóxicos presentes [25]. Na Tabela 15 verifica-se que a razão CBO₅/CQO_s do D0, com e sem a adição das cinzas e das lamas calcárias, apesar de aumentar, é inferior a 0,300 o que indica a reduzida biodegradabilidade do efluente em estudo.

A razão CBO₅/CQO_s obtida para o D0 neutralizado com NaOH foi de 0,097±0,022 o que indica que cerca de 9,7 % da matéria orgânica presente no D0 é facilmente biodegradável aerobiamente. Verificou-se que a adição de cinzas CTB e lamas de cal conduziram à diminuição desta razão. A mistura filtrada e não filtrada de D0 neutralizado com cinzas CTB apresenta uma razão CBO₅/CQO_s de 0,068 e 0,065, respetivamente, e a mistura filtrada e não filtrada de D0 neutralizado com lamas de cal apresenta uma razão de 0,074 e 0,065, respetivamente. A diminuição desta razão deve-se à neutralização do D0 com cinzas CTB e lamas de cal ter conduzido ao aumento da CQO_s do efluente e à diminuição da CBO₅. Estes resultados levam a teorizar que tenha ocorrido a produção de compostos menos biodegradáveis devido à interação dos constituintes do D0 com os das cinzas e das lamas de cal, ou à inibição dos consórcios microbianos pela presença das cinzas e/ou de compostos particulados solubilizados que tenham conduzido ao aumento da CQO_s.

Por outro lado, a mistura filtrada e não filtrada do D0 neutralizado com cinzas CA5, levou ao aumento deste rácio para 0,129 e 0,119, respetivamente, indicando que a utilização destas cinzas tornou o efluente mais facilmente biodegradável. Neste caso, a CBO₅ aumentou de 0,234 para 0,336 e 0,309, nas misturas filtrada e não filtrada, respetivamente, sendo que o CQO_s se manteve igual à inicial.

Através dos dados apresentados verifica-se também que as razões CBO_5/CQO_s das misturas filtradas do D0 neutralizado com as cinzas CA5, CTB e com as lamas de Cal são superiores às razões da mistura original (sem filtração).

4.2.2. Funcionamento geral dos reatores

Para avaliar a estabilidade do funcionamento dos reatores foi analisado o pH, a alcalinidade e a quantidade de SST e SSV iniciais e finais nos reatores alimentados com D0 neutralizado com cinzas CA5 (D0+CA5), com cinzas CTB (D0+CTB) e com lamas de cal (D0+CAL) e reatores alimentados com as misturas filtradas do D0 neutralizado com cinzas CA5 (D0+CA5f), com cinzas CTB (D0+CTBf) e com lamas de cal (D0+CALf). Foi ainda determinada a quantidade de macro e micronutrientes presentes nos reatores.

4.2.2.1. SST e SSV

Na Figura 13 são apresentadas as concentrações de material particulado em termos de SST e SSV para o primeiro e último dia do tratamento anaeróbio.

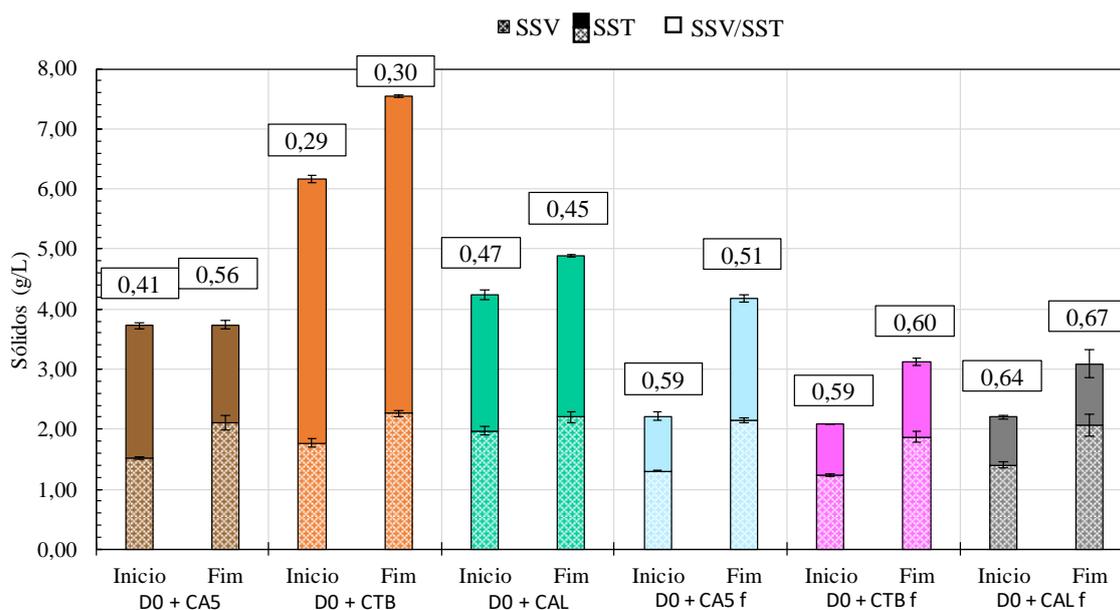


Figura 13 – Sólidos suspensos iniciais e finais dos reatores com D0 neutralizado com cinzas CA5, CTB e lamas de Cal.

Tal como representado na Figura 13, à semelhança do que aconteceu no reator D2 (Figura 1 – Secção 4.1.1.1), verifica-se que a concentração de SSV aumentou entre o início e o fim do tratamento anaeróbio. As taxas de aumento de SSV e de SST são apresentadas na Tabela 16.

Tabela 16 – Variação de quantidade de SSV e SST entre o momento inicial e final dos tratamentos anaeróbios.

	D0+CA5	D0+CTB	D0+CAL	D0+CA5f	D0+CTBf	D0+CALf
Aumento SSV (%)	28,30	21,68	10,45	39,44	34,11	32,30
Aumento SST (%)	0,53	18,30	13,37	46,96	33,16	28,80

O aumento de SSV ocorreu pela ordem $D0+CAL < D2 < D0+CTB < D0+CA5 < D0+CALf < D0+CTBf < D0+CA5f$. Desta forma, é possível verificar que nos reatores com substrato filtrado, ocorreu maior aumento de SSV, do que nos restantes casos, o que parece indicar uma continuação da atividade das cinzas.

Os reatores D0+CA5, D0+CTB e D0+CAL têm rácios SSV/SST iniciais inferiores a 0,5. Ou seja, apresentam maior quantidade de sólidos suspensos fixos do que de SSV. Este resultado era esperado e deve-se à presença das cinzas volantes adicionadas para a neutralização, uma vez que estas não são volatilizáveis. Nos restantes reatores, alimentados com a mistura filtrada, verifica-se que os rácios SSV/SST iniciais e finais são superiores a 0,5, ou seja, que existe maior quantidade de SSV do que de sólidos suspensos fixos.

4.2.2.2. pH e alcalinidade

O pH e a alcalinidade inicial e final dos reatores D0+CA5, D0+CTB, D0+CAL, D0+CA5f, D0+CTBf e D0+CALf estão apresentados na Figura 14.

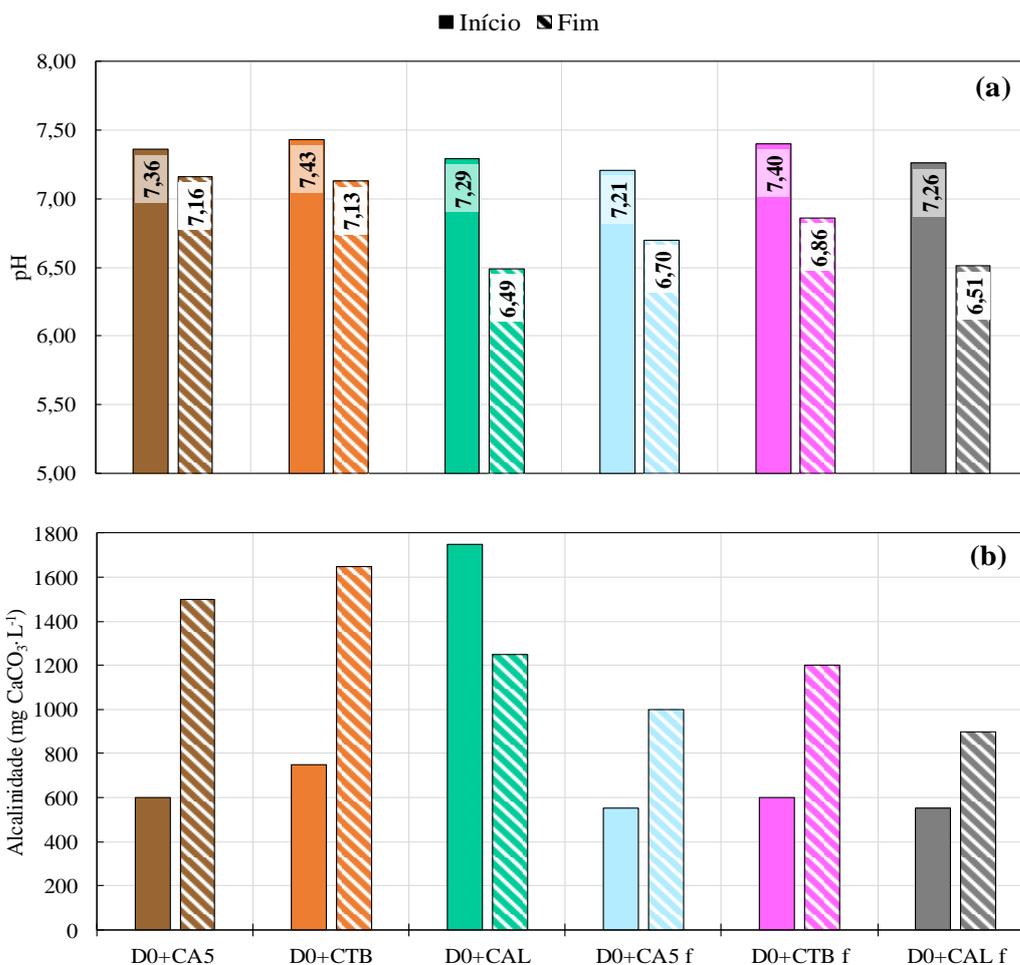


Figura 14 – pH e alcalinidade inicial e final dos reatores alimentados com D0 neutralizado com cinzas CA5, cinzas CTB e lamas de cal, filtrado e não filtrado

Para que nos reatores anaeróbios ocorra produção de CH₄, o pH deve de ser mantido entre 6,8 e 7,4 [42]. Como é possível verificar na Figura 14, os reatores D0+CAL, D0+CA5f e D0+CALf obtiveram valores de pH final de 6,49, 6,70 e 6,51, sendo que nestas gamas de pH vários grupos de metanogénicos podem-se encontrar inibidos. Os restantes reatores apresentaram pH acima de 6,86. O reator D0+CAL foi o único reator em que se verificou a diminuição da alcalinidade durante o período do tratamento anaeróbio, no entanto, foi o que apresentou alcalinidade inicial e final mais elevadas.

Pela análise do pH e alcalinidade dos reatores alimentados com D0 neutralizado com cinzas CA5 e CTB verifica-se que os reatores alimentados com a mistura não filtrada (D0+CA5 e D0+CTB) apresentaram pH e alcalinidade finais mais elevados do que os alimentados com a mistura filtrada. Os reatores D0+CA5 e D0+CTB apresentaram pH final superior a 7, ao contrário do que se verificou nos restantes reatores. Desta forma, pode-se verificar que a permanência das cinzas CA5 e CTB durante a digestão anaeróbia forneceu maior alcalinidade aos reatores, indiciando também uma continuação da sua ação. Segundo os trabalhos de Rajamma [65] e Gonçalves [67], a alcalinidade destas cinzas deve-se à presença dos metais alcalinos sódio e

potássio. O aumento da alcalinidade nos reatores que permaneceram com as cinzas durante a digestão anaeróbia, pode dever-se à transferência destes metais das cinzas para o meio líquido tornando-o, desta forma, mais alcalino [65], [67].

4.2.2.3. Macro e micronutrientes

É essencial que tanto os macro como os micronutrientes estejam presentes e disponíveis no ambiente de crescimento, uma vez que estes suprem as necessidades básicas do crescimento celular e asseguram que as células sejam capazes de sintetizar as enzimas e cofatores que impulsionam as reações bioquímicas e metabólicas. No entanto, quando presentes em altas concentrações os nutrientes essenciais podem tornar-se tóxicos [35].

Como apresentado na Tabela 9 da secção 3.2.1., as cinzas têm na sua constituição íões de sódio, magnésio, alumínio, silício, fósforo, enxofre, potássio, cálcio, manganês e ferro. Na Tabela 17 são apresentadas as concentrações de íões de cálcio, sódio, silício, ferro, manganês e magnésio, elementos maioritários das cinzas, presentes na digestão anaeróbia, assim como as concentrações inibitórias e estimulantes destes íões [35].

Durante o tempo do tratamento anaeróbio, as cinzas dos reatores D0+CA5, D0+CTB e as lamas do reator D0+CAL, permaneceram a 36 °C e sob agitação. Desta forma, o aumento da concentração de alguns dos íões entre o início e fim do processo, demonstrado na Tabela 17, deve-se provavelmente à lixiviação (transferência dos metais do estado sólido para a solução aquosa) destes compostos. Por outro lado, a diminuição da quantidade destes compostos deve-se provavelmente ao seu consumo pela comunidade bacteriana, à adsorção destes compostos pelas lamas e/ou à precipitação dos mesmos.

A quantidade de Fe em todos os reatores diminuiu entre o momento inicial e final, provavelmente devido à precipitação do mesmo. Efetivamente, após abrir os reatores verificou-se a existência de partículas magnéticas agarradas ao magnete o que justifica a diminuição deste composto em solução.

Apenas os reatores alimentados com cinzas CA5 e CTB apresentavam Al, entre 7,5 e 10 ppm. No entanto, a análise final aos reatores mostrou que o Al não estava presente no final do tratamento anaeróbio. O íão Al^{3+} a pH neutro pode ter precipitado sob a forma de $Al(OH)_3$.

Comparando as concentrações de íões presentes nos reatores com as concentrações inibitórias, verifica-se que em nenhum dos reatores a concentração de íões é superior à concentração indicada como inibitória, portanto pode-se concluir que provavelmente o tratamento anaeróbio não foi inibido pelo excesso dos íões estudados. No caso do Na, Fe e Mg verifica-se que a concentração nos reatores foi inferior à estimuladora. Desta forma, verifica-se que talvez uma suplementação extra do meio com Na, Fe e Mg pudesse ter um efeito vantajoso na digestão anaeróbia. No entanto, é preciso ter em consideração que as concentrações de nutrientes variam entre estudos de acordo com o tipo de substrato e de microrganismos utilizados e que, por isso,

mais estudos têm de ser realizados para determinar a quantidade de nutrientes que maximiza e inibe a digestão anaeróbia do D0 nas condições utilizadas.

A concentração de macro e micronutrientes no D0 também foi determinada por este método e está disponível no Anexo E.

Tabela 17-Concentração de íons de cálcio, sódio, alumínio, ferro, manganês e magnésio no filtrado dos reatores no momento inicial e final, e concentrações estimuladoras [25] e inibitórias da digestão anaeróbia [35], [47].

Reatores	Elemento	Concentração (ppm)			
		Inicial	Final	Estimuladora [25]	Inibitória [35], [47]
D0+CA5	Ca	367,4	423,3	100<Ca<1035	2500 < Ca < 8000
D0+CTB		418,6	493,0		
D0+CAL		395,3	479,1		
D0+CA5f		358,1	344,2		
D0+CTBf		376,7	362,8		
D0+CALf		367,4	400,0		
D0+CA5	Na	735,8	796,6	100 < Na < 200	3500 < Na < 8000
D0+CTB		727,1	704,0		
D0+CAL		712,9	679,3		
D0+CA5f		746,5	786,5		
D0+CTBf		688,8	675,6		
D0+CALf		657,9	689,6		
D0+CA5	Al	7,5	0,0	-	1000 < Al < 2500
D0+CTB		7,5	0,0		
D0+CAL		0,0	0,0		
D0+CA5f		7,5	0,0		
D0+CTBf		10,0	0,0		
D0+CALf		0,0	0,0		
D0+CA5	Fe	11,5	3,9	20 < Fe < 100	-
D0+CTB		10,0	3,6		
D0+CAL		7,6	4,4		
D0+CA5f		12,1	3,2		
D0+CTBf		10,9	3,9		
D0+CALf		8,5	5,2		
D0+CA5	Mn	7,3	7,1	< 0,027	-
D0+CTB		5,1	4,4		
D0+CAL		2,7	2,8		
D0+CA5f		7,4	5,6		
D0+CTBf		5,3	3,6		
D0+CALf		2,5	2,4		
D0+CA5	Mg	16,2	15,4	75 < Mg < 150	1000 < Mg < 3000
D0+CTB		6,9	16,6		
D0+CAL		7,1	8,6		
D0+CA5f		13,7	21,6		
D0+CTBf		13,5	5,5		
D0+CALf		4,0	5,8		

4.2.3. Remoção de AOX

Como é possível verificar na Figura 15, neste ensaio obtiveram-se remoções de AOX entre os 62,0 e os 74,4 %. A remoção de AOX nos reatores aumentou segundo a ordem: D0+CTB < D0+CAL < D0+CALf < D0+CA5f < D0+CA5 < D0+CTBf.

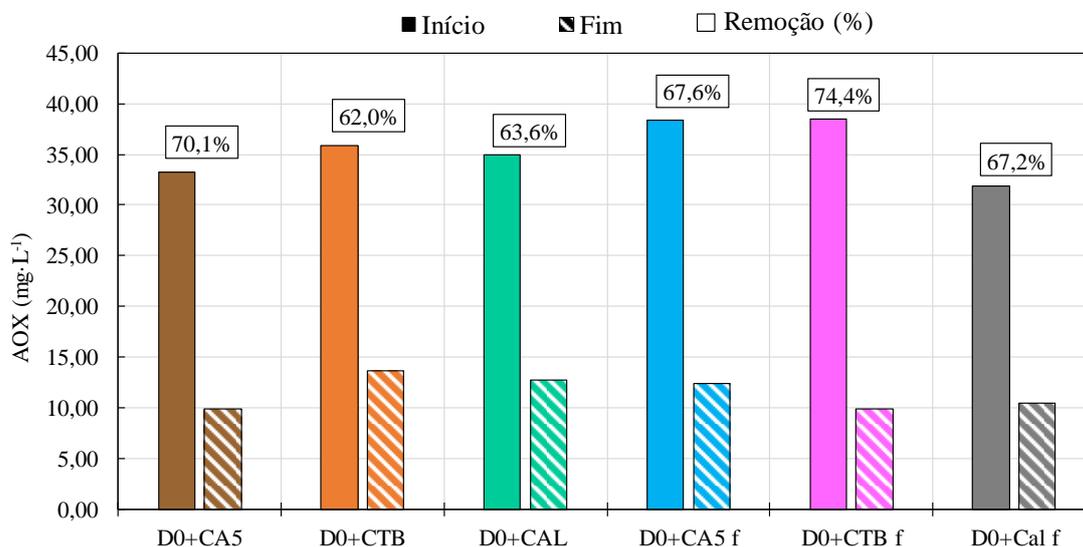


Figura 15 – Remoção de AOX obtida nos reatores alimentados com a mistura filtrada e não filtrada de D0 com cinzas CA5, CTB e lamas de Cal.

O reator D0+CTBf apresentou a maior remoção de AOX (74,4 %) provavelmente por ter sido alimentado com maior quantidade de AOX (38,5 mg·L⁻¹) do que os restantes. Foi também o reator que apresentou menor concentração final destes compostos (9,87 mg·L⁻¹).

Nos reatores alimentados com a mistura original e filtrada do D0 neutralizado com cinzas CA5 verifica-se que ocorreu a remoção de 70,1 e 67,6 % do AOX, respetivamente. Nestes reatores verificou-se ainda que a concentração final de AOX foi 9,94 e 12,4 mg·L⁻¹, respetivamente.

Os reatores alimentados com a mistura filtrada de D0 e cinzas CTB e lamas de cal apresentaram maiores taxas de remoção de AOX (74,4 e 67,2 %) do que os reatores alimentados com a mesma mistura, mas não filtrada (62,0 e 63,6 %). Os resultados indicam que possivelmente a permanência das cinzas CTB e das lamas de cal nos reatores não foi benéfica para a remoção de AOX.

No reator D2, em que o D0 foi neutralizado com NaOH, ao invés de cinzas, verificou-se uma remoção de AOX de 74,2 %. No presente ensaio verificou-se uma remoção de 74,4 % do AOX no reator D0+CTBf. Os resultados indicam remoções de AOX idênticas quando utilizado NaOH na neutralização do D0 e quando utilizada a mistura filtrada de D0 neutralizado com cinzas CTB. Desta forma, este pré-tratamento do D0 parece ser benéfico para a remoção destes compostos tóxicos presentes no efluente. Nos restantes reatores as remoções foram mais baixas e variaram entre 62,0 e 70,1 %.

A remoção dos compostos organoclorados poderá conduzir à produção de Cl^- e por este motivo é esperado que a quantidade de Cl^- aumente com o tratamento anaeróbio. As concentrações de Cl^- iniciais e finais são apresentadas na Figura 16.

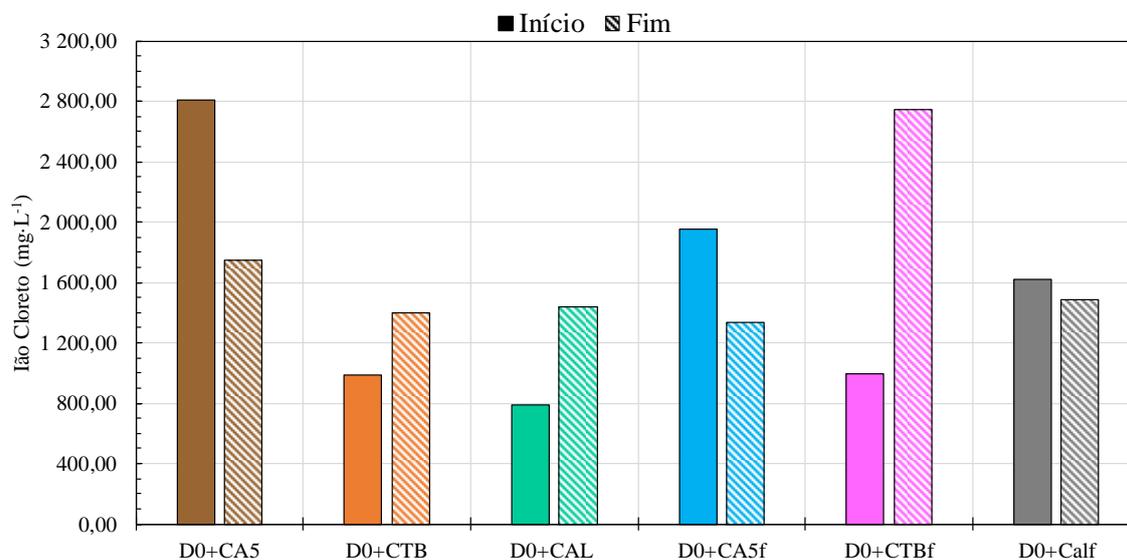


Figura 16 – Quantidade de cloretos presentes no início e no fim do tratamento anaeróbio para cada um dos reatores.

A quantidade de Cl^- aumentou 41,9, 82,9 e 174,8 % com o tratamento anaeróbio nos reatores D0+CTB, D0+Cal e D0+CTBf, respectivamente. O aumento de cloretos superior à remoção de AOX pode dever-se à degradação de compostos organoclorados que não são detetados no método de medição de AOX e à lixiviação do cloro presente nas cinzas. Por outro lado, a diminuição do cloro no líquido pode dever-se sua adsorção nas lamas. Desta forma, futuramente, será interessante determinar a quantidade de cloretos e de AOX presentes nas lamas.

4.2.4. Produção de CH_4

As percentagens de CH_4 no biogás produzido por cada um dos reatores são apresentadas na Figura 17.

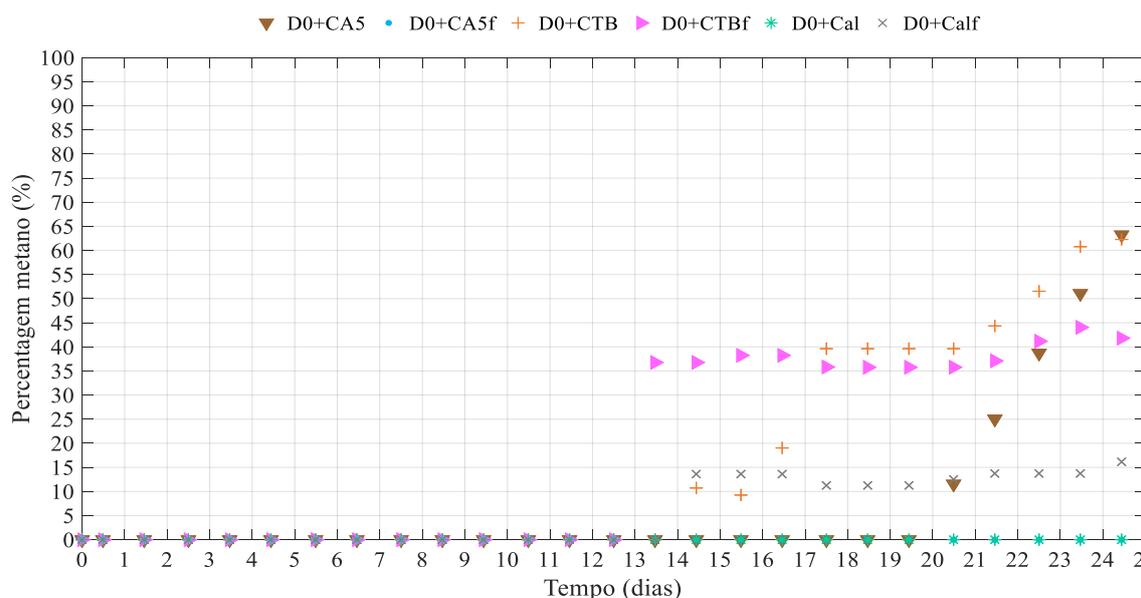


Figura 17 – Percentagem de CH₄ dentro dos reatores ao longo dos 25 dias no ensaio que utilizou cinzas.

Pela análise da Figura 17, verifica-se que ocorreu produção de CH₄ nos reatores D0+CA5, D0+CTB, D0+CTBf e D0+CALf. Os reatores D0+CTB, D0+CTBf e D0+CALf começaram a produzir CH₄ mais cedo, entre o décimo terceiro e o décimo quinto dia, e no reator D0+CA5 foi detetado CH₄ ao vigésimo dia. É ainda possível verificar que nos reatores D0+CA5f e D0+CAL não ocorreu produção de CH₄ durante os 25 dias de operação dos reatores.

A percentagem e quantidade de CH₄ no final do processo é apresentada na Tabela 18.

Tabela 18 – Quantidade de CH₄ (% e mL) em cada reator no final do ensaio.

Reator	CH ₄ (%)	CH ₄ (mL)
D0+CA5	63,2	63,9
D0+CTB	62,3	66,7
D0+CAL	0,00	0,00
D0+CA5f	0,00	0,00
D0+CTBf	41,8	33,7
D0+CALf	16,2	6,22

Pela análise da Tabela 18, verifica-se que nos reatores D0+CA5 e D0+CTB ocorreu a produção de 63,9 e 66,7 mL de CH₄, respetivamente. Estes foram os reatores que registaram a maior produção de CH₄, seguindo-se os reatores D0+CTBf e D0+Calf que produziram 33,7 e 6,22 mL respetivamente.

4.2.5. Remoção de matéria orgânica, grau de metanização e de acidificação

A CQO_s inicial e final, assim como os diferentes AOV no final do ensaio, dos reatores alimentados com D0 neutralizado com cinzas CA5, cinzas CTB e lamas de cal, filtrado e não filtrado, são apresentados na Figura 18.

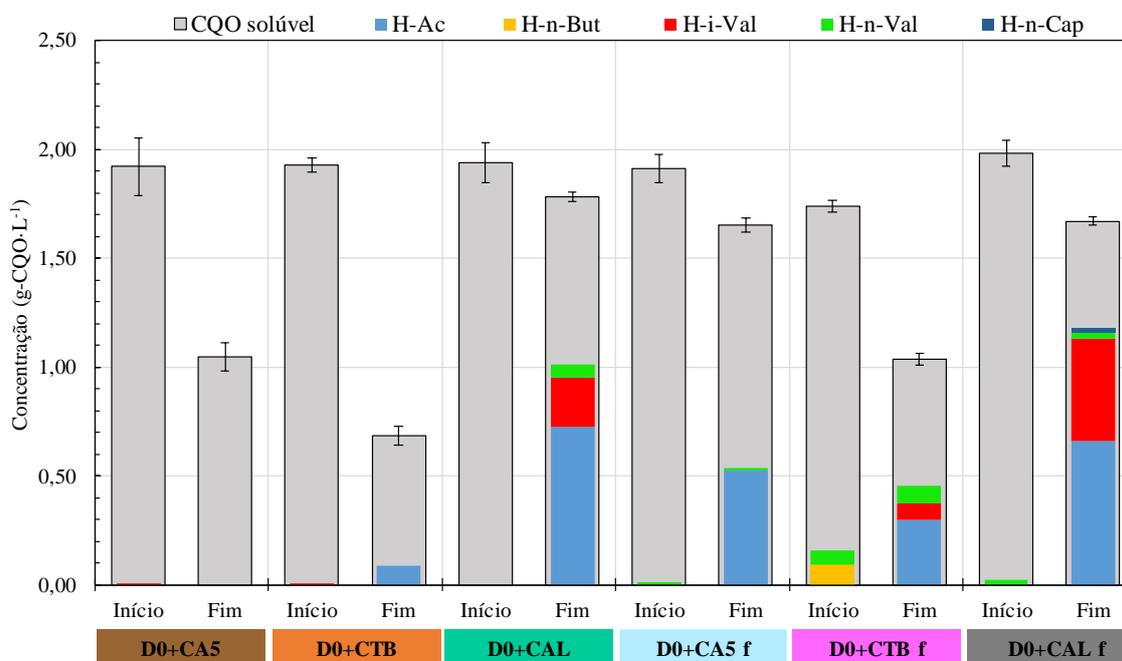


Figura 18 – CQO_s inicial e final dos reatores alimentados com D0 neutralizado com cinzas CA5, cinzas CTB e lamas de cal, filtrado e não filtrado.

Pela análise da Figura 18 verifica-se que a CQO_s inicial dos reatores esteve no intervalo de $1,86 \pm 0,12$ g-CQO·L⁻¹ e que em todos os reatores ocorreu remoção e matéria orgânica. Em termos de AOV, verifica-se que após o fim do tratamento anaeróbio apenas o reator D0+CA5 não continha ácidos orgânicos e que o reator D0+CTB apresentava cerca de $0,088$ g-CQO·L⁻¹ de ácido acético. Nos reatores D0+Cal, D0+CA5f, D0+CTBf e D0+Calf, verifica-se que ocorreu a produção de 1,01, 0,54, 0,45 e 1,18g-CQO·L⁻¹ de AOV, respetivamente. Nos reatores que apresentam ácidos, mais de 50 % do total de ácidos corresponde a ácido acético e não foi detetado ácido propiónico.

Na Tabela 19 é apresentada a remoção de matéria orgânica, o grau de metanização e de acidificação, a produtividade e o rácio AOV/Alc dos reatores.

Tabela 19 – Remoção de matéria orgânica, grau de metanização e de acidificação, produtividade em CH₄ e rácio AOV/Alc de cada um dos reatores.

Reator	Remoção de CQO_s (%)	Metanização (%)*	mL-CH₄·g-CQO_sconsumido⁻¹	mL-CH₄·g-CQO_sinicial⁻¹	Acidificação (%)*	AOV/Alc
D0+CA5	45,5	42,0	365,7	166,3	0,00	0,00
D0+CTB	64,6	43,7	267,9	157,2	4,57	0,05
D0+Cal	8,00	0,00	0,00	0,00	52,2	0,81
D0+CA5f	13,4	0,00	0,00	0,00	28,0	0,53
D0+CTBf	40,4	23,3	227,9	92,1	26,1	0,38
D0+Calf	15,7	5,05	127,6	20,0	59,5	1,31

*considerando o valor de CQOs inicial

A produtividade em CH₄ dos reatores D0+CA5, D0+CTB, D0+CTBf e D0+Calf foi de 365,9, 267,9, 227,9 e 127,6 mL-CH₄·g-CQO_sconsumido⁻¹, respetivamente. Desta forma verifica-se que o reator D0+CA5 foi o que produziu maior quantidade de CH₄ em relação à quantidade de CQO_s consumido. Os resultados também sugerem que a permanência das cinzas no interior do reator (D0 sem filtração) parece ter sido benéfica para a produção de CH₄ provavelmente devido à presença de iões que potenciaram essa produção e à adsorção de AOX nas cinzas que terá levado a uma menor inibição dos microrganismos metanogénicos (proporcionado pela cinza, neste caso) que contribuiu para melhorar a eficiência do processo biológico, que neste caso é evidenciado pelo aumento da produção de CH₄ [81].

O reator D0+CA5 foi o único em que não se verificou a presença de AOV no efluente tratado. Cerca de 45,5 % da CQO_s inicialmente adicionada ao reator foi removida, obtendo-se um grau de metanização de 42,0 %. À semelhança do reator D0+CA5, o reator D0+CTB não acumulou ácidos sendo que a análise dos AOV no momento final do reator apenas detetou a presença de 0,088 mg-AOV·L⁻¹ (ácido acético), que corresponde a um grau de acidificação de 4,57 %. Sendo o ácido acético o principal substrato das metanogénicas para a produção de CH₄, provavelmente este composto seria degradado levando a uma maior taxa de remoção de CQO_s. Neste reator verificou-se uma remoção de matéria orgânica de cerca de 64,4 % e uma taxa de metanização de cerca de 43,7 %.

Nos reatores alimentados com D0 neutralizado com lamas de Cal (D0+CAL e D0+CALf) verificou-se a maior acumulação de AOV, 1,010 e 1,179 g-AOV·L⁻¹, respetivamente. Em termos de composição de AOV, estes reatores produziram em maior quantidade ácido acético, seguido de ácido n-valérico e de i-butírico. O reator D0+CALf produziu ainda em menores quantidades ácido caproico. Desta forma verifica-se que a utilização de lamas de cal potenciou a acumulação

de AOV em detrimento da produção de metano. Estes compostos intermediários possuem valor acrescentado uma vez que são fontes de carbono utilizadas na produção de polihidroxicanoatos (valorização material) e de bioenergia (valorização energética).

Tal como indicado na Tabela 19, os reatores D0+CAL, D0+CA5f e D0+CALf apresentaram taxas de remoção de matéria orgânica solúvel muito baixas, de 8,0, 13,4 e 15,7 %, assim como graus de metanização também muito baixos, de 0, 0 e 5,05 %, respetivamente. Os resultados apresentados indicam que nestes reatores ocorreu reduzida remoção de matéria orgânica e, conseqüentemente, reduzida produção de CH₄. No entanto, o grau de acidificação destes reatores variou entre 28,0 e 59,5 %. Estes resultados sugerem que a alcalinidade destes reatores não foi suficiente para equilibrar a produção de AOV, levando à diminuição do pH. Efetivamente, o pH final destes reatores foi inferior ao inicial, apresentado valores de 6,49, 6,70 e 6,51, respetivamente. A este pH vários microrganismos metanogénicos encontram-se inibidos, resultando na acumulação de AOV que tornam o ambiente mais ácido, o que conseqüentemente conduz à maior inibição da atividade microbiana. Desta forma, quando o pH dos reatores atinge níveis em que as *Archaea* são inibidas, a remoção de matéria orgânica, assim como a produção de CH₄ são mais reduzidas. Por outro lado, a comunidade bacteriana que é mais resistente a variações de pH, continua ativa e a produzir AOV até pH 4 [9]. As conclusões sugeridas são reforçadas pelos valores dos rácios AOV/Alc superiores a 0,4, que indicam que o sistema de tratamento anaeróbio se encontrou desequilibrado para a produção de metano, mas favorecido para a acidificação anaeróbia com vista à valorização material (ácidos voláteis). No entanto, apesar de não ocorrerem remoções significativas de matéria orgânica, o efluente tornou-se mais biodegradável, como é possível verificar na Tabela 20.

O reator D0+CTBf apresentou uma taxa de remoção de matéria orgânica e grau de metanização de 40,4 e 23,3 %, respetivamente, inferiores aos obtidos para os reatores D0+CA5 e D0+CTB. Também se verificou que ocorreu a produção de ácido acético, butírico e valérico, num volume total de 0,453 g-CQO·L⁻¹, correspondendo a um grau de acidificação de 26,1 %, superior aos outros dois reatores mencionados acima. O pH final deste reator superior a 6,8 juntamente com o rácio AOV/Alc inferior a 0,4 e a produção tanto de ácidos como de CH₄, indicam que provavelmente o consórcio microbiano esteve em equilíbrio, sendo que os microrganismos pertencentes a *Archaea* e *Bacteria* se encontravam em simbiose.

No reator D2 alimentado com 2 g-CQO_s·L⁻¹ e neutralizado com NaOH obteve-se uma produtividade de CH₄ em termos de CQO adicionado de 193,9 mL-CH₄·g-CQO_{inicial}⁻¹. Tendo em conta os valores apresentados na Tabela 19, verifica-se que os reatores deste ensaio produziram menor quantidade de CH₄ em relação à CQO_s adicionada do que o reator D2. Os resultados sugerem que, nas condições dos ensaios efetuados, a adição das cinzas não contribuiu para o aumento da produção de CH₄, mas contribuiu para poupança de custos referentes à neutralização do D0. Efetivamente foi relatado o efeito positivo de metais vestigiais presentes nas cinzas na

digestão anaeróbia de vários resíduos. A adição de cinzas no tratamento anaeróbio de lamas secundárias da indústria de pasta e papel e no tratamento de resíduos sólidos urbanos revelou um aumento na produção de CH₄ em 135 % [81] e 6 % [82], respectivamente, quando comparado com os ensaios sem a utilização de cinzas. Milán *et al.*[83], utilizaram um efluente simulado com AOV, para estudar a influência da concentração de metais na produção de CH₄ e na atividade metanogênica específica. Nesse trabalho, concluíram que a suplementação de metais pesados em digestores, conduz ao aumento da produção de CH₄ e que o tipo de metal suplementado influencia a predominância de grupos microbianos, onde o níquel e o cobalto favorecem a presença de *Methanosaeta*, enquanto o magnésio estimula a *Methanosarcina* [81]. O Mn participa nas reações redox que ocorrem na transformação do CO₂ em CH₄ pela estabilização da metiltransferase, uma enzima que demonstrou ser dependente da vitamina B12 e é importante na biossíntese de CH₄ a partir de metanol por *M. barkerii*. Por outro lado, o Mn juntamente com o Ca presente na cinza precipita o excesso de AOV, ajudando a aumentar o pH do meio e evitando ou diminuindo a possível toxicidade dos AOV no processo [81]. No presente trabalho a adição das cinzas parece não ter conduzido à produção de maiores quantidades de CH₄, provavelmente, como referido, a presença de íons lixiviados das cinzas pode ter levado à diminuição de AOV e, por conseguinte, de metano.

É preciso ter em consideração que a digestão anaeróbia de cada tipo de efluente/resíduo apresenta diferentes características e necessidades nutricionais pelo que é necessário a análise individual de cada um dos resíduos inorgânicos a utilizar. Deste modo, mais estudos devem ser realizados de forma a perceber se a adição de maiores ou menores quantidades de cinzas podem ser benéficas na digestão anaeróbia do D0.

Pelos rácios CBO₅/CQO₅ do efluente antes (0,065-0,129) e após o tratamento anaeróbio (0,291-0,407), apresentados na Tabela 20, verifica-se que com a aplicação das diferentes condições de tratamento, a biodegradabilidade do efluente aumentou. O aumento da biodegradabilidade do efluente revela que a CQO₅ presente no final do tratamento é mais biodegradável, possivelmente devido à existência de AOV, à transformação de compostos complexos em outros mais simples e mais biodegradáveis e à remoção de AOX durante o processo de digestão anaeróbia. Desta forma, todos os efluentes obtidos neste tratamento podem ser posteriormente submetidos a um tratamento biológico aeróbio para remoção complementar dos compostos orgânicos.

Tabela 20 – Rácio CBO₅/CQO₅ do efluente inicial e tratado.

Reatores	Rácio CBO ₅ /CQO ₅	
	Início	Fim
D0+CA5	0,129	0,325
D0+CTB	0,068	0,338
D0+CAL	0,074	0,291
D0+CA5f	0,119	0,323
D0+CTBf	0,065	0,364
D0+CALf	0,066	0,407

4.2.6. Considerações gerais sobre os ensaios com adição de cinzas

O objetivo deste conjunto de ensaios passou por perceber se a adição de cinzas CA5, CTB e de lamas de cal ao D0 de forma a neutralizá-lo (substituição da adição de NaOH) eram benéficas durante o processo de tratamento anaeróbio, nomeadamente na produção de CH₄ e na remoção de AOX.

Nos reatores D0+CTB e D0+CA5 ocorreu a produção de 157,2 e 166,3 mL-CH₄·g-CQO_{inicial}⁻¹. Nos reatores D0+CTBf e D0+CALf ocorreram produções mais baixas de 92,6 e 19,98 mL-CH₄·g-CQO_{inicial}⁻¹, respetivamente. Os reatores D0+CaL e D0+CA5f não produziram CH₄, tendo-se verificado a acidificação do processo. Desta forma, verifica-se que ocorreu maior produção de CH₄ nos reatores que permaneceram com as cinzas no seu interior durante o tratamento anaeróbio. O reator D2 (com neutralização do D0 com NaOH) teve uma produtividade de 193,9 mL-CH₄·g-CQO_{inicial}⁻¹, concluindo-se que em nenhum dos reatores deste conjunto de ensaios obteve uma produtividade em CH₄ superior a este.

Nos reatores D0+CTB, D0+CA5 e D0+CAL ocorreu a remoção de 70,1, 62,0 e 63,3 % do AOX presente inicialmente. Nos reatores D0+CTBf, D0+CA5f e D0+CALf ocorreu a remoção de 74,4, 67,6 e 67,2 % do AOX inicialmente no reator. Desta forma, é possível verificar que ocorreu maior remoção de AOX nos reatores em que as cinzas da neutralização foram removidas, provavelmente por transportarem AOX adsorvido. No reator D2 obteve-se uma remoção de AOX de 74,2 %, semelhante à ocorrida no reator D0+CTBf.

Desta forma, pode-se concluir que apesar de não ter ocorrido a produção de maior quantidade de CH₄ e de apenas no reator D0+CTBf se ter obtido maior remoção de AOX, a utilização de cinzas no tratamento do D0 parece ser uma opção viável e que, por isso, merece mais investigação científica com a realização de ensaios para otimizar o protocolo utilizado neste trabalho. Desta forma, será possível a substituição do NaOH, utilizado na neutralização do D0, por resíduos provenientes da indústria de pasta para papel.

4.3. Biodegradabilidade do D₀ com pré-tratamento enzimático e adição de cinzas

O presente capítulo tem o objetivo de apresentar e discutir o efeito da aplicação de um pré-tratamento enzimático ao D₀, antes e após neutralização com cinzas CA5 e CTB. Para este efeito começou-se por determinar o resultado do tratamento enzimático do D₀ neutralizado com NaOH. De seguida, procedeu-se à caracterização do D₀ com a adição de cinzas e com tratamento enzimático. Por fim, submeteu-se o efluente tratado com enzimas e com cinzas ao tratamento anaeróbio, caracterizando a mistura reacional inicial e final.

4.3.1. Tratamento enzimático

O D₀ foi tratado com o preparado enzimático comercial *SERZIM 50*. Com este intuito, o pH do efluente foi ajustado a 5, 6 e 7 com NaOH e aquecido até atingir 50 °C. O tratamento enzimático foi realizado adicionando o preparado comercial de enzimas ao D₀, durante 30 e 60 minutos, com agitação. A caracterização do D₀ antes e após cada um dos tratamentos é apresentada na Tabela 21 e Tabela 22, respetivamente.

Tabela 21 – Caracterização do D₀ a pH 5, 6 e 7.

Parâmetros	D ₀		
	pH5	pH6	pH7
CQO _t (g-O ₂ ·L ⁻¹)	-	-	3,68±0,09
CQO _s (g-O ₂ ·L ⁻¹)	-	-	2,50±0,17
CBO ₅ (g-O ₂ ·L ⁻¹)	-	-	0,180
CBO ₅ /CQO _s	-	-	0,072
AOX (mg-Cl·L ⁻¹)	82,7	76,38	77,3

Tabela 22 – Caracterização do D₀ após o tratamento enzimático.

Parâmetros	Tratamento enzimático do D ₀ a 50°C					
	D ₀ pH5		D ₀ pH6		D ₀ pH7	
	30 min	60 min	30 min	60 min	30 min	60 min
CQO _t (g-O ₂ ·L ⁻¹)	3,79±0,14	3,85±0,04	4,00±0,35	3,21±0,05	3,64±0,09	3,37±0,20
CQO _s (g-O ₂ ·L ⁻¹)	2,56±0,04	2,52±0,06	2,46±0,11	2,39±0,01	2,44±0,07	2,49±0,07
CBO ₅ (g-O ₂ ·L ⁻¹)	0,156	0,194	0,317	0,301	0,294	0,336
CBO ₅ /CQO _s	0,061	0,0770	0,129	0,126	0,120	0,135
AOX (mg-Cl·L ⁻¹)	79,8±3,85	84,2±0,50	79,1±3,82	77,6±4,98	82,2±2,60	73,4±2,59

O D0 antes do tratamento enzimático apresentava um rácio CBO_5/CQO_s de 0,072. Com o tratamento enzimático é esperado um aumento da CQO_s , uma vez que as endoglucanases hidrolisam aleatoriamente as ligações β -1,4-glicosídicas, dentro da molécula da celulose, aumentando a biodisponibilidade da mesma [84].

O tratamento enzimático do D0 a pH 5 durante 30 minutos parece não ter aumentado a biodegradabilidade do efluente, uma vez que o rácio entre a CBO_5 e a CQO_s foi de 0,061. Por outro lado, aumentando o tempo de tratamento para 60 minutos verifica-se o aumento deste rácio para 0,08.

A pH 6, a razão entre a CBO_5 e a CQO_s do efluente tratado enzimaticamente durante 30 e 60 minutos foi de 0,129 e 0,126, respetivamente. A pH 7 estes tratamentos conduziram a rácios de 0,120 e 0,135, respetivamente. Desta forma, verifica-se o aumento da biodegradabilidade aeróbia do D0 com o tratamento enzimático a pH 6 e 7, durante 30 e 60 minutos.

O tratamento enzimático também influenciou a quantidade de AOX presente no D0.

4.3.1.1. Tratamento enzimático e adição de cinzas CA5 e CTB

Pretendeu-se estudar a biodegradabilidade anaeróbia do D0 tratado com enzimas e com a adição de cinzas CA5 e CTB. Os tratamentos aplicados ao D0 estão descritos na secção 3.2 - Ensaio anaeróbios de biodegradabilidade.

Na Tabela 23 é apresentada a caracterização do D0 após a adição das cinzas e após o tratamento enzimático. Na nomenclatura da tabela, a letra “E” é referente ao tratamento enzimático, CA5 e CTB correspondem às cinzas utilizadas e o número corresponde ao pH teórico final do D0. A ordem em que a nomenclatura aparece corresponde à ordem do tratamento. Ou seja, E-CTB-7 indica que o D0 foi tratado com enzimas e de seguida foi adicionado cinzas CTB até pH 7. Por outro lado, CA5-7-E, indica que ao D0 foram adicionadas cinzas CA5 até atingir pH 7, sendo que de seguida foi aplicado o tratamento enzimático, tal como descrito na Figura 6 da secção 3.2 - Ensaio anaeróbios de biodegradabilidade.

Tabela 23 – Caracterização do D0 tratado enzimaticamente e com adição de cinzas CA5 e CTB.

Parâmetros	E-CTB-7	E-CA5-7	CTB-7-E	CA5-7-E	E-CTB-6	E-CA5-6
pH	7,29	7,33	7,02	7,12	5,59	6,02
CQO_s ($g \cdot L^{-1}$)	3,69	3,19	3,18	2,64	3,43	3,4
CBO_5 ($g \cdot L^{-1}$)	0,180	0,296	0,206	0,36	0,38	0,334
CBO_5/CQO_s ($g \cdot L^{-1}$)	0,049	0,09	0,06	0,136	0,111	0,098
AOX ($mg \cdot L^{-1}$)	52,6	48,6	61,5	60,2	56,8	54,7

A CQO_s do D0 a pH 7 foi de $2,50 g-O_2 \cdot L^{-1}$, verificando-se que o tratamento enzimático e a adição de cinzas ao D0, fez com que o efluente apresentasse um valor de CQO_s superior em

todas as condições. Este resultado indica que a adição de cinzas e o tratamento enzimático em conjunto aumentam a CQO_s da solução.

A razão CBO_5/CQO_s obtida para o D0 neutralizado com NaOH foi de 0,072, o que indica que cerca de 7 % da matéria orgânica presente no D0 é aerobiamente biodegradável em cinco dias. Além disso, verificou-se que a aplicação da sequência de tratamentos E-CTB-7 e CTB-7-E conduziu à diminuição desta razão para 0,050 e 0,060, respectivamente. Nas restantes sequências de tratamento verifica-se que o rácio CBO_5/CQO_s aumentou. O D0 tratado com a sequência CA5-7-E foi o que apresentou o rácio mais elevado (0,136), ou seja, este tratamento foi o que conduziu ao maior aumento da biodegradabilidade do efluente.

Comparando os valores de AOX apresentados na Tabela 21, Tabela 22 e Tabela 23 verifica-se que a quantidade de AOX presente no D0 não diminuiu com apenas o tratamento enzimático, mas que quando foi aplicado o tratamento enzimático e as cinzas CA5 e CTB, ocorreu diminuição da concentração de AOX. A diminuição de AOX também foi evidenciada quando o D0 foi neutralizado com cinzas (sem tratamento com enzimas). Como já referido, quando as cinzas são misturadas com água, a fração solúvel, os iões, conduzem ao aumento do pH do efluente, enquanto que a parte insolúvel pode funcionar como adsorvente [79]. Desta forma, as cinzas podem ter adsorvido parte do AOX presente no D0, conduzindo à sua diminuição no efluente. Já a aplicação de enzimas que degradam detritos celulósicos que possam estar presentes no D0, faz com que possa existir mais glucose disponível no meio.

4.3.2. Funcionamento geral dos reatores

Após avaliar as características do D0 com as sequências de pré-tratamento aplicadas e descritas submeteu-se o D0 a tratamento anaeróbio. De forma a avaliar o funcionamento geral dos reatores, estudaram-se os sólidos, pH e alcalinidade, e os iões metálicos presentes no início e fim da digestão anaeróbia. O nome dado aos reatores é o mesmo do tratamento a que o D0 foi submetido.

4.3.2.1. SST e SSV

Na Figura 19 são apresentadas as concentrações de material particulado em termos de SST e SSV para o primeiro e último dia do tratamento anaeróbio, para os reatores CTB-7-E, CA5-7-E, E-CTB-7, E-CA5-7, E-CTB-6 e E-CA5-6. Também é apresentado o rácio SSV/SST.

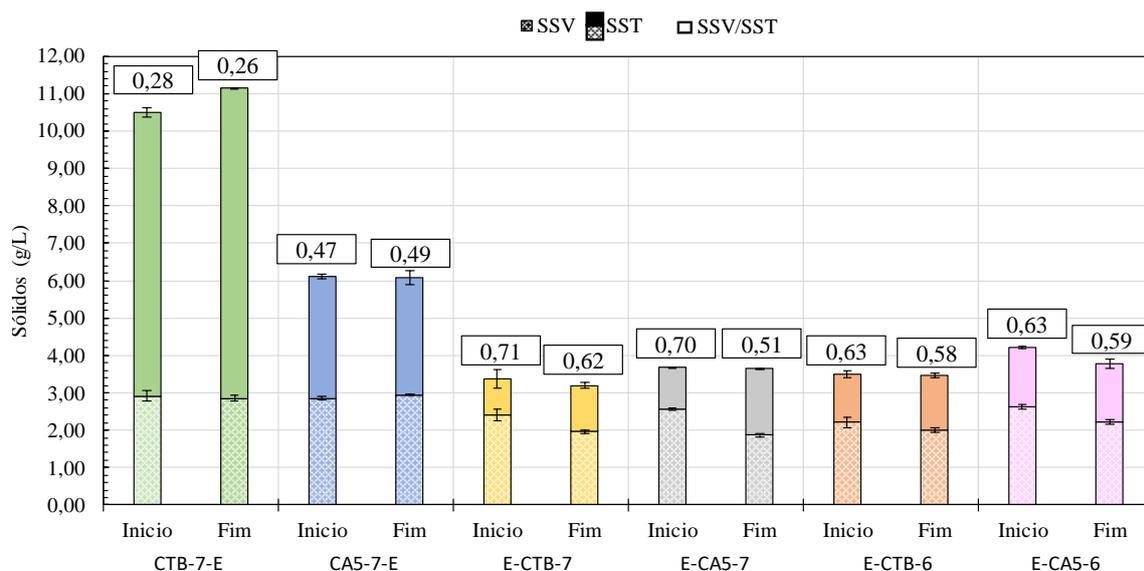


Figura 19 – Sólidos suspensos iniciais e finais dos reatores com D0 tratado enzimaticamente, a pH 5 e 6, e neutralizado com cinzas CA5 e CTB.

Como se verifica na Figura 19, os reatores CTB-7-E e CA5-7-E apresentam maior quantidade de sólidos totais fixos do que os restantes reatores, uma vez que o D0 destes reatores apenas foi neutralizado com cinzas, enquanto o pH dos restantes foi primeiro ajustado com NaOH a 5 e 6 antes do tratamento enzimático. Desta forma, a estes dois reatores foi adicionada maior quantidade de cinzas, o que leva a que o rácio SSV/SST seja inferior a 0,5. Nos restantes reatores o rácio é superior a 0,5, o que indica que a maior parte dos sólidos presentes correspondem a SSV.

Na Tabela 24 é apresentada a variação de SST e SSV nos reatores.

Tabela 24 – Variação de quantidade de sólidos entre o início e o fim dos reatores.

	CTB-7-E	CA5-7-E	E-CTB-7	E-CA5-7	E-CTB-6	E-CA5-6
Varição relativa SSV (%)	-2,58	3,16	-21,83	-37,68	-10,13	-18,47
Varição relativa SST (%)	5,83	-0,55	-5,64	-0,82	-0,67	-11,31

*variação negativa corresponde à remoção de SST e SSV e a positiva corresponde à produção.

No reator CA5-7-E verifica-se que houve um aumento (cerca de 3%) da quantidade de SSV entre o início e o final do tratamento anaeróbio. Em todos os restantes reatores, verifica-se que ocorreu uma diminuição dos SSV (2,5 a 37,7%). A quantidade de SSV diminuir pode dever-se à degradação de algum material particulado, bem como devido à morte de microrganismos.

Desta forma, conclui-se que em nenhum dos reatores se verificou o aumento significativo de SSV e que as diminuições mais significativas de SSV ocorreram nos reatores alimentados com D0 tratado enzimaticamente antes da adição de cinzas (E-CTB-7, E-CA5-7, E-CTB-6 e E-CA5-6). Esta diminuição pode assim dever-se à morte celular.

4.3.2.2. pH e alcalinidade

O pH e a alcalinidade inicial e final dos reatores CTB-7-E, CA5-7-E, E-CTB-7, E-CA5-7, E-CTB-6 e E-CA5-6 estão apresentados na Figura 20.

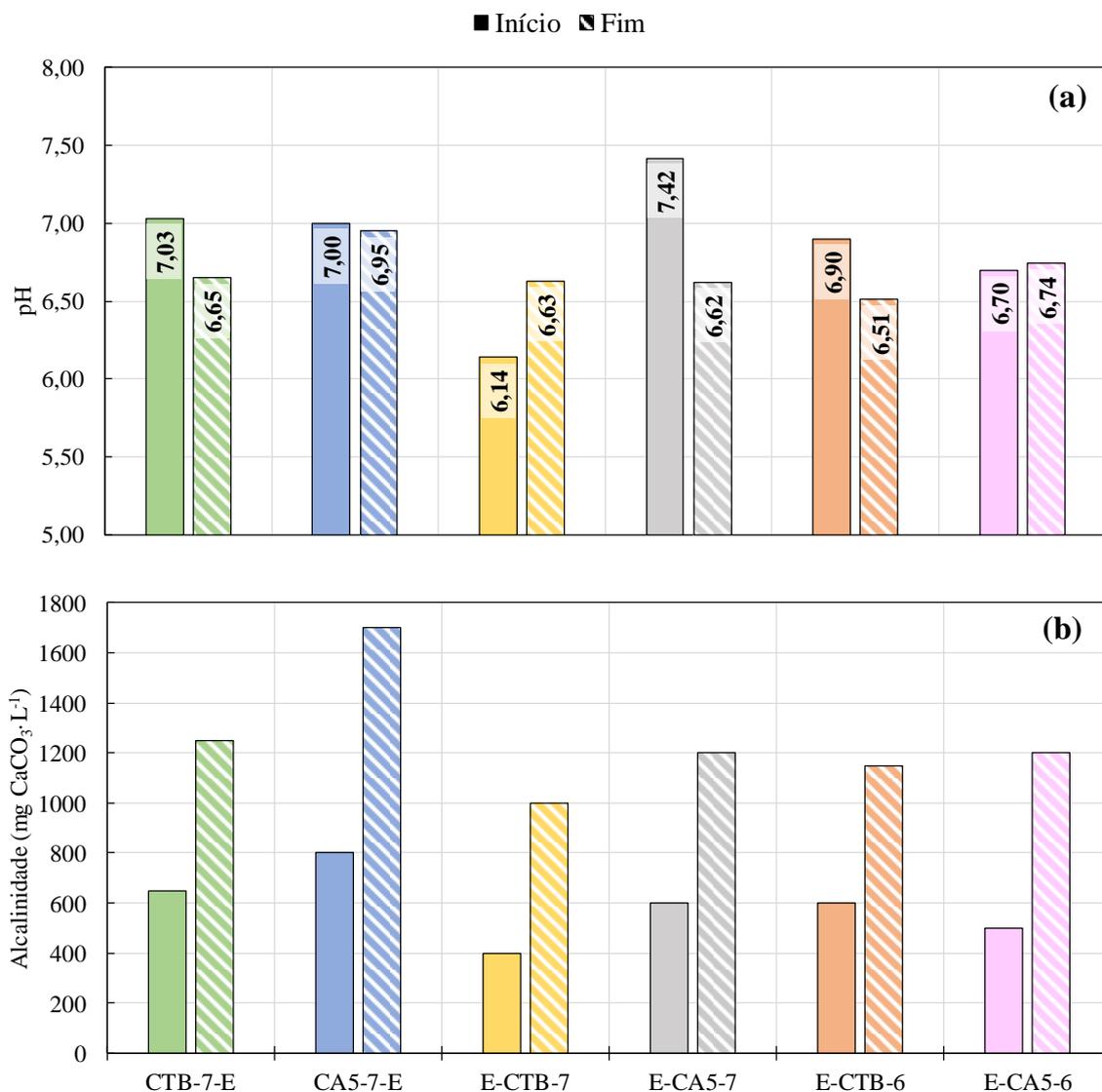


Figura 20 – pH (a) e alcalinidade (b) inicial e final dos reatores alimentados com D0 tratado enzimaticamente e neutralizado com cinzas CA5 e CTB.

Para que nos reatores anaeróbios ocorra produção de CH₄, o pH deve de ser mantido entre 6,8 e 7,4 [42]. Como é possível verificar na Figura 20, o pH final do reator CA5-7-E foi 6,95, sendo que esteve dentro da gama de pH indicada para a produção de CH₄. Os restantes reatores apresentaram pH final entre 6,14 e 6,74, pelo que parte dos microrganismos da comunidade metanogénica pode ter sido inibida.

Em termos de alcalinidade final é possível verificar que esta foi mais elevada nos reatores CTB-7-E e CA5-7-E do que nos restantes. A alcalinidade adicional deve-se provavelmente à

presença das cinzas CTB e CA5 que estão em maior quantidade nestes dois reatores do que nos restantes.

4.3.2.3. Macro e micronutrientes derivados das cinzas

Na Tabela 25 são apresentadas as concentrações de iões de cálcio, sódio, alumínio, ferro, manganês e magnésio presentes no momento inicial e final dos reatores. Também são disponibilizadas as concentrações estimulantes [25] e inibitórias [35], [47] de cada um destes compostos.

Antes do tratamento enzimático do D0 alimentado nos reatores E-CTB-7, E-CA5-7, E-CTB-6 e E-CA5-6 foi necessário ajustar o pH a 6 e 5, para que não ocorresse a desnaturação das enzimas devido ao pH ácido do D0. Devido à adição de NaOH com o intuito de ajustar o pH, a quantidade de Na nestes reatores é superior à quantidade nos restantes.

Nos reatores E-CTB-7, E-CA5-7 e E-CTB-6, a concentração inicial de Ca é inferior à indicada como estimuladora, no entanto verifica-se que no momento final a concentração deste composto aumentou para valores próximos do indicado como estimulador, devido provavelmente à lixiviação das cinzas.

A concentração de Fe e Mg nos reatores é inferior a 20 e a 75 ppm, respetivamente, ou seja, à quantidade referida na literatura como estimuladora. Desta forma, poderia ser benéfica a suplementação dos reatores com estes nutrientes. No reator CA5-7-E não foi detetado Fe no efluente final, o que se pode dever à precipitação do mesmo. Desta forma, a ausência de Fe pode ter conduzido a desequilíbrios no metabolismo dos microrganismos. Em nenhum outro reator se verifica a falta de nutrientes.

Com esta análise conclui-se que, com exceção do Fe no reator CA5-7-E, os nutrientes presentes nos reatores parecem suprir as necessidades nutricionais dos consórcios anaeróbios, sem ocorrer inibição devido à presença dos mesmos em quantidades inibitórias.

Tabela 25-Concentração de íons de cálcio, sódio, alumínio, ferro, manganês e magnésio no filtrado dos reatores no momento inicial e final, e concentrações estimuladoras [25] e inibitórias da digestão anaeróbia [35], [47].

Reatores	Elemento	Concentração (ppm)			
		Inicial	Final	Estimuladora [25]	Inibitória [35], [47]
CTB-7-E	Ca	276,7	362,8	100<Ca<1035	2500 < Ca < 8000
CA5-7-E		285,7	295,3		
E-CTB-7		60,5*	94,2*		
E-CA5-7		67,4*	93,0*		
E-CTB-6		60,5*	81,4*		
E-CA5-6		101,2	94,2*		
CTB-7-E	Na	746,8	716,1	100 < Na < 200	3500 < Na < 8000
CA5-7-E		741,1	733,6		
E-CTB-7		1360	1288,7		
E-CA5-7		1453,9	1315,5		
E-CTB-6		1440,2	1352,9		
E-CA5-6		1358,4	1375,7		
CTB-7-E	Fe	7,6*	5,5*	20 < Fe < 100	-
CA5-7-E		6,1*	0,0*		
E-CTB-7		5,2*	2,7*		
E-CA5-7		3,6*	11,4*		
E-CTB-6		7,0*	2,1*		
E-CA5-6		5,5*	5,5*		
CTB-7-E	Mn	7,2	7,6	< 0,027	-
CA5-7-E		10,8	12		
E-CTB-7		2	3,4		
E-CA5-7		2,6	3,6		
E-CTB-6		2,7	3,5		
E-CA5-6		3,4	4,7		
CTB-7-E	Mg	22,8*	25,9*	75 < Mg < 150	1000 < Mg < 3000
CA5-7-E		37,2*	37,2*		
E-CTB-7		7,5*	7,4*		
E-CA5-7		6,0*	9,6*		
E-CTB-6		7,7*	7,9*		
E-CA5-6		8,4*	9,4*		
CTB-7-E	Al	10,0	10,0	-	1000 < Al < 2500
CA5-7-E		7,5	0,0		
E-CTB-7		0,0	0,0		
E-CA5-7		0,0	0,0		
E-CTB-6		0,0	0,0		
E-CA5-6		0,0	0,0		

*Valores a baixo da gama estimuladora

4.3.3. Remoção de AOX

A Figura 21 apresenta os valores de remoção de AOX, em termos de quantidade e de percentagem removida. Neste ensaio obtiveram-se remoções de AOX entre os 57,8 e os 86,5 %. A remoção de AOX nos reatores aumentou de acordo com a seguinte ordem: E-CTB-6 < E-CTB-7 < E-CA5-6 < E-CA5-7 < CTB-7-E < CA5-7-E.

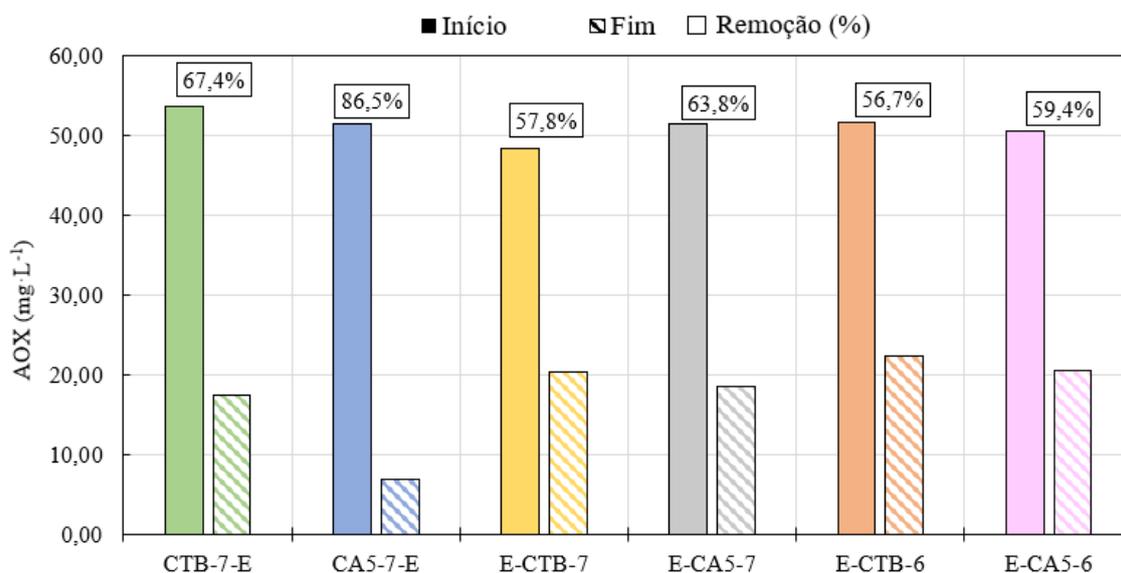


Figura 21 – Remoção de AOX obtida nos reatores alimentados com D0 tratado enzimaticamente e neutralizado com cinzas CA5 e CTB.

A taxa de remoção de AOX do reator CA5-7-E foi de 86,5 %. A remoção de AOX dos restantes reatores variou entre 57,8 e 67,4 %. No reator D2 (em que, como substrato, foi utilizado 2g-CQO_s·L⁻¹) obteve-se uma remoção de AOX de 74,2 %. Desta forma, verifica-se que no reator CA5-E-7 ocorreu maior remoção de AOX do que com o D0 sem tratamento enzimático e sem adição de cinzas.

Pela análise da Figura 21, verifica-se ainda que nos reatores CTB-7-E e CA5-7-E, ocorreu maior remoção de AOX (67,4 e 86,5 %) do que nos restantes reatores deste ensaio. No entanto, remoções de 62,0 e 70,1 % foram obtidas quando não foi realizado tratamento enzimático, nos reatores D0+CTB e D0+CA5, respetivamente. Desta forma, verifica-se que o tratamento enzimático após a neutralização do D0 com cinzas CA5 e CTB parece ter contribuído para uma maior remoção do AOX. O preparado comercial de enzimas é composto por endoglucanases que quebram ligações glicosídicas na celulose. Desta forma, estas enzimas não são diretamente responsáveis pela degradação do AOX. No entanto, ao deixarem os detritos celulósicos (que eventualmente estejam presentes no D0) mais biodisponíveis para a comunidade microbiana, então esta pode ter sido reforçada e, por sua vez, ter removido maior quantidade de compostos organoclorados.

Na mesma figura verifica-se que os reatores CA5-7-E, E-CA5-7 e E-CA5-6 apresentaram taxas de remoção de AOX superiores à dos reatores que tiveram o mesmo tratamento, mas com as cinzas CTB. Tal também se verificou no ensaio anterior em que as remoções de AOX nos reatores D0+CA5 e D0+CTB foram de 70,1 % e 62,0 %, respetivamente. Desta forma, verifica-se a possibilidade das cinzas CA5 permitirem maiores remoções de AOX do que as cinzas CTB.

Como mencionado anteriormente, a degradação de compostos organoclorados conduz à produção de cloretos. A quantidade de cloretos presentes em cada reator no momento inicial e final é apresentado na Figura 22.

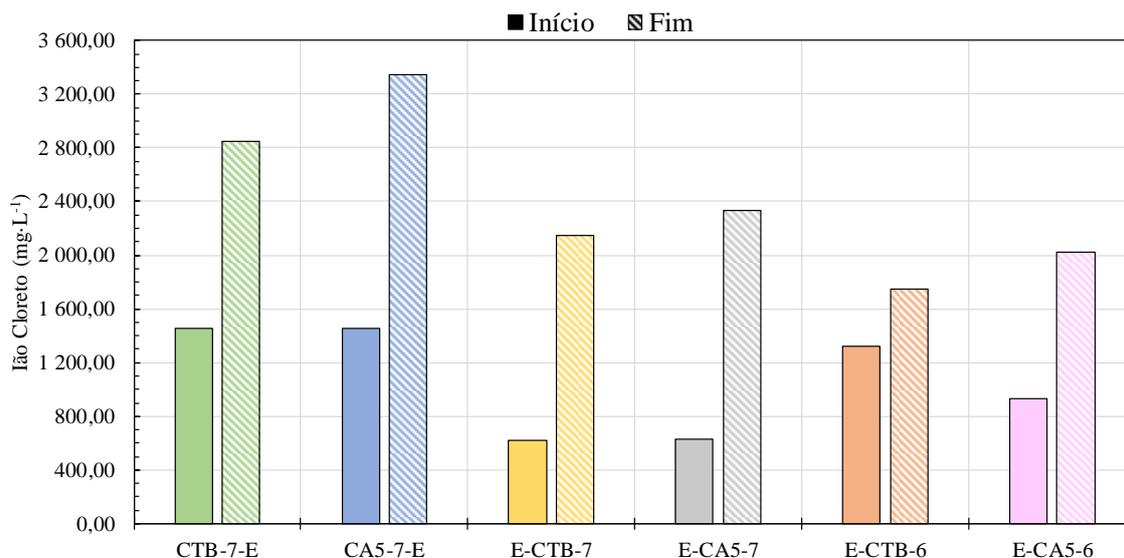


Figura 22 – Quantidade de cloretos presentes no início e no fim do tratamento anaeróbico para cada um dos reatores.

Pela análise da Figura 22 verifica-se que a quantidade de iões Cl⁻ aumentou entre o momento inicial e o momento final. Além disso, o aumento de Cl⁻ em solução é superior à quantidade de Cl⁻ removida em termos de AOX, o que indica que o Cl⁻ presente no efluente tratado não deriva apenas da degradação do AOX. O Cl⁻ pode resultar da lixiviação deste ião que se encontra presente nas cinzas e/ou da degradação dos compostos organoclorados presentes no D0 (não contabilizados como AOX).

Neste ensaio foi utilizado sulfito de sódio (Na₂SO₃) com o intuito de reduzir o cloro livre presente no D0. O cloro livre em concentrações superiores a 0,5 ppm inibe a atividade das enzimas utilizadas. Desta forma, a reação do Na₂SO₃ com o cloro leva à produção de Cl⁻ que não inibem o tratamento enzimático. Esta pode ser outra contribuição para o aumento da concentração de Cl⁻ entre o início e o fim do tratamento anaeróbico.

4.3.4. Produção de CH₄

As percentagens de CH₄ no biogás produzido ao longo de 24 dias nos reatores são apresentadas na Figura 23.

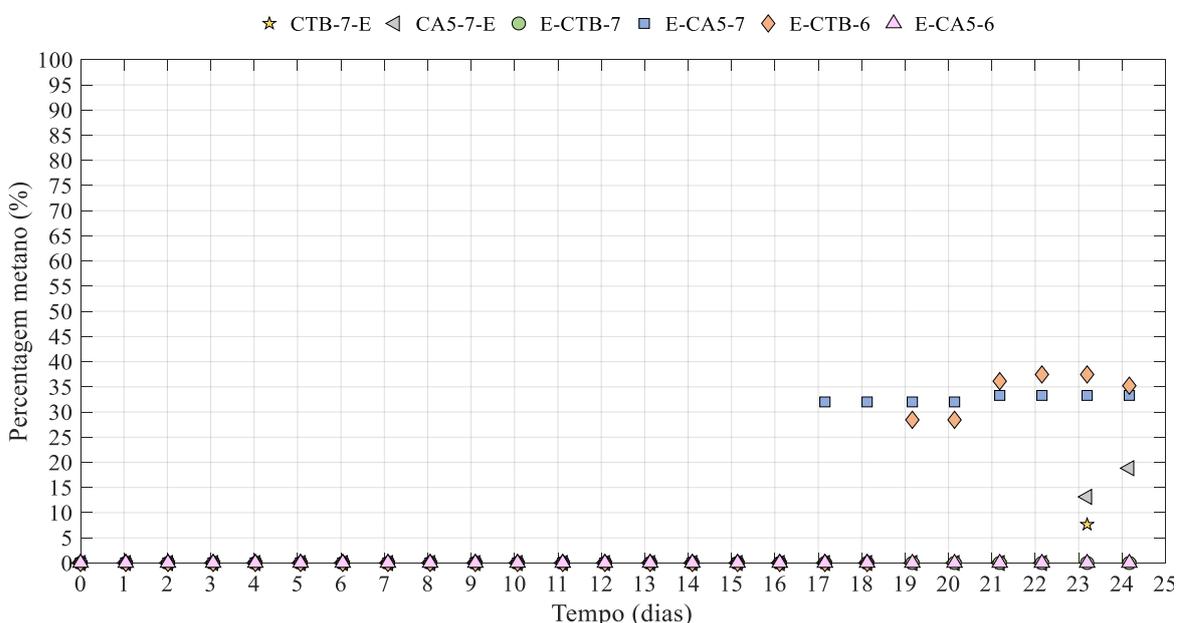


Figura 23 - Percentagem de CH₄ dentro dos reatores ao longo dos 25 dias no ensaio que utilizou cinzas e tratamento enzimático.

Através das percentagens de CH₄ apresentadas na Figura 23, verifica-se que ocorreu produção de CH₄ nos reatores E-CTB-6, E-CA5-7, CA5-7-E e CTB-7-E, sendo que no último dia de operação dos reatores a percentagem de CH₄ dentro dos mesmos era 35,2, 33,3, 18,8 e 0,00 %, respetivamente. Através do mesmo gráfico, verifica-se que os reatores E-CA5-7 e E-CTB-6 começaram a produzir CH₄ mais cedo, no décimo sétimo e no décimo nono dia, respetivamente. Nos reatores CTB-7-E e CA5-7 apenas começou a ser detetado CH₄ no vigésimo terceiro dia, sendo que no reator CTB-7-E apenas foi detetado CH₄ nesse dia (7,65 %). Nos reatores D2 e D3 em que o D0 foi utilizado sem tratamento enzimático nem adição de cinzas, verificou-se que a produção de CH₄ teve início ao décimo primeiro e ao vigésimo quarto dia, respetivamente. Nos reatores do presente conjunto de ensaios a carga orgânica inicial variou entre 2,49 e 2,81 g-CQO_s·L⁻¹ e a produção de CH₄ iniciou-se entre o décimo sétimo e o vigésimo terceiro dia. Os resultados apresentados sugerem que quanto maior for a carga orgânica aplicada, mais tempo será necessário para que o reator comece a produzir CH₄. Tal pode dever-se à presença dos compostos organoclorados que podem inibir os microrganismos metanogénicos. Por outro lado, nestes reatores o D0 foi tratado enzimaticamente e foram aplicadas cinzas CA5 e CTB que também podem estar na origem da diferença de tempo de início de produção de CH₄. Além disso, entre ensaios foram utilizadas lamas diferentes que em nenhum dos casos estavam adaptadas. Desta forma, a diferença de resultados entre ensaios, pode também estar associada às comunidades

microbianas presentes nas lamas no momento inicial, bem como aos microrganismos estarem mais ou menos ativos.

Não foi possível fazer o cálculo do volume de CH₄ produzido através das variações de CH₄ obtidas pelo sistema Oxitop, para todos os reatores. Provavelmente, devido a alguma avaria nas cabeças Oxitops não foram detetadas variações de pressão durante o processo de tratamento. O gráfico da pressão dos reatores em que foi possível obter esses valores, pode ser consultado no Anexo D.

À semelhança do realizado para o ensaio anterior, com o intuito de conseguir um valor aproximado do volume de CH₄ produzido, após o término dos reatores, procedeu-se à remoção do biogás do seu interior com o auxílio de uma seringa e o volume removido foi mensurado. O volume de CH₄ estimado desta forma é apresentado na Tabela 26.

Tabela 26 – Estimativa do volume de CH₄ produzido.

Reatores	CH₄ (%)	CH₄ (mL)
CTB-7-E	0	0
CA5-7-E	33,3	2,71
E-CTB-7	0	0
E-CA5-7	18,8	19,1
E-CTB-6	35,23	7,23
E-CA5-6	0	0,00

Na Tabela 26 verifica-se que nos reatores CTB-7-E, E-CTB-7 e E-CA5-7 não foi detetado CH₄ e que nos reatores CA5-7-E, E-CA5-7 e E-CTB-6 ocorreu a produção de 2,71, 19,09 e 7,23 mL de CH₄. No ensaio em que foi estudada a biodegradabilidade anaeróbia do D0 alimentado com 2 g-CQO_s·L⁻¹ (reator D2) verificou-se a produção de 57,45 mL de CH₄. Nos reatores alimentados com D0 neutralizado com CA5 (D0+CA5) e CTB (D0+CTB) verificou-se a produção de 63,87 e 66,65 mL de CH₄, respetivamente. Desta forma, estes resultados indicam que o tratamento enzimático em conjunto com a adição de cinzas ao mesmo D0 levou à produção de menores quantidades de CH₄, quando este foi tratado anaerobiamente.

4.3.5. Remoção de matéria orgânica, grau de metanização e de acidificação

A CQO_s inicial e final dos reatores alimentados com D0 neutralizado com cinzas CA5, cinzas CTB e tratado enzimaticamente está apresentado na Figura 24.

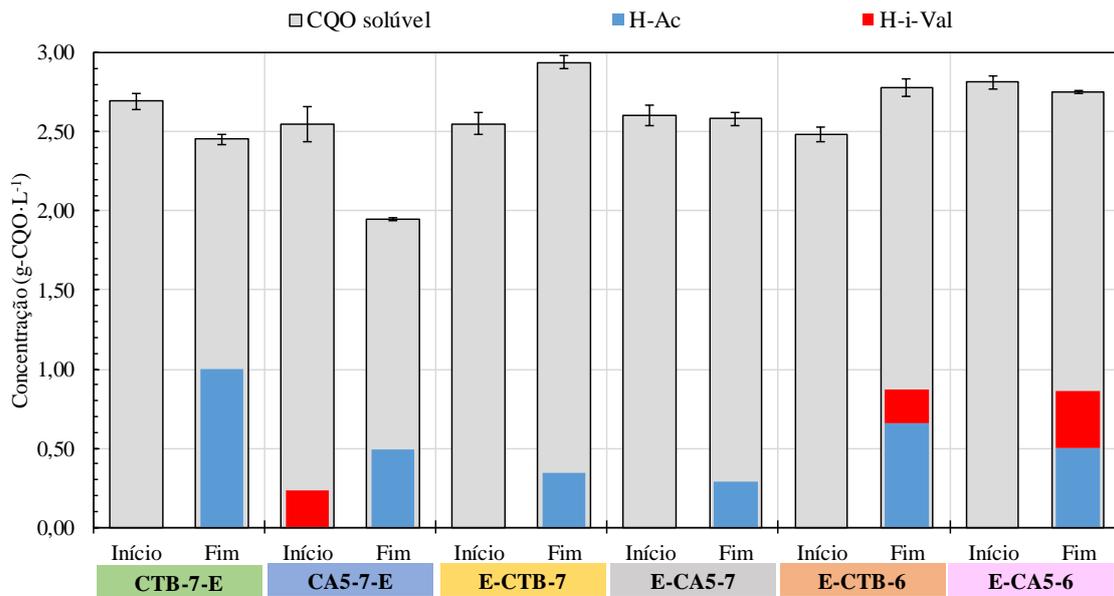


Figura 24 – CQO, inicial e final e AOV individuais dos reatores alimentados com D0 tratado enzimaticamente e neutralizado com cinzas CA5 e CTB.

Através da Figura 24 verifica-se que em todos os reatores ocorreu a produção de AOV. Nos reatores CTB-7-E, CA5-7-E, E-CTB-7 e E-CA5-7 apenas foi detetado ácido acético e nos reatores E-CTB-6 e E-CA5-6 verificou-se também a presença de ácido i-valérico. Segundo Bajpai [45], a produção de CH_4 pode ser inibida pela presença de AOV em concentrações superiores a $1500 \text{ mg-CQO}\cdot\text{L}^{-1}$, ou então quando a alcalinidade não é suficiente para prevenir as oscilações de pH que podem conduzir à inibição das comunidades metanogénicas. A concentração máxima dos AOV totais nos reatores foi no reator CTB-7-E, com um valor de $1000 \text{ mg-CQO}\cdot\text{L}^{-1}$, ou seja, abaixo da concentração indicada como inibitória. A produção de ácidos parece ter levado à diminuição do pH final de todos os reatores, fazendo com que ocorresse reduzidas remoções da CQO_s através do CH_4 .

Na Tabela 27 é apresentada a remoção de matéria orgânica, o grau de metanização e de acidificação, a produtividade em CH_4 e o rácio AOV/Alc dos reatores.

Tabela 27 - Remoção de matéria orgânica, grau de metanização e de acidificação, produtividade em CH₄ e rácio AOV/Alc de cada um dos reatores.

Reator	Remoção CQO _s (%)	Metanização (%)*	mL-CH ₄ ·g- CQO _s removido ⁻¹	mL-CH ₄ ·g- CQO _s inicial ⁻¹	Acidificação (%)*	AOV/Alc
CTB-7-E	8,97	0,00	0,00	0,00	37,25	0,80
CA5-7-E	23,53	1,34	30,15	5,32	19,42	0,29
E-CTB-7	**	0,00	-	0,00	13,60	0,35
E-CA5-7	0,83	3,66	-	33,93	11,22	0,24
E-CTB-6	**	3,67	-	14,55	30,60	0,76
E-CA5-6	2,16	0,00	0,00	0,00	35,22	1,03

* tendo em conta o CQO_s inicial

**ocorreu o aumento de CQO_s

Nos reatores E-CTB-7 e E-CTB-6 verifica-se que com o tratamento anaeróbio a CQO_s aumentou 13,3 e 10,6 %, respetivamente, como é possível observar na Figura 24. O aumento da CQO_s pode dever-se à solubilização de matéria particulada que pode ter sido estimulada pela ação das enzimas utilizadas no tratamento enzimático do D0, que ao terem continuado funcionais degradaram detritos presentes nos reatores. Desta forma, o cálculo da produtividade de CH₄ por CQO_s removido dos reatores E-CTB-7 e E-CTB-6 não pode ser calculado. Os reatores CTB-7-E, CA5-7-E e E-CA5-6 apresentaram taxas de remoção de matéria orgânica de 8,97, 23,53 e 2,16 %. Destes três últimos, apenas no reator CA5-7-E foi registada a produção de CH₄, com uma produtividade de 30,15 mL-CH₄·g-CQO_s removido⁻¹.

No reator E-CA5-7 obteve-se a remoção de apenas 0,83 % da CQO_s adicionada e a produção de cerca de 19,1 mL de CH₄. Desta forma, o cálculo da produtividade em CH₄ por CQO_s removido apresenta um valor acima do teórico (400 mL-CH₄·g-CQO_s removido). A solubilização de detritos celulósicos, talvez devido à ação das enzimas, pode ter levado a que os consórcios microbianos tenham tido acesso a mais matéria orgânica solúvel do que a contabilizada, justificando desta forma a produção de CH₄ acima do valor teórico.

Neste ensaio, verificaram-se valores de produtividade em CH₄ em termos de CQO_s adicionada inferiores aos obtidos no reator apenas com D0 (reator D2). A produtividade no reator D2 foi de 193,92 mL-CH₄·g-CQO_s inicial⁻¹ e nos reatores CA5-7-E, E-CA5-7 e E-CTB-6 obtiveram-se produtividades de 5,32, 33,9 e 14,55 mL-CH₄·g-CQO_s inicial⁻¹. Nos reatores em que não foi realizado tratamento enzimático, reatores D0+CA5 e D0+CTB, verificaram-se produtividades de 166,33 e 157,24 mL-CH₄·g-CQO_s inicial⁻¹, valores superiores aos obtidos no presente ensaio. Os reduzidos volumes de CH₄ produzidos indicam a possibilidade de a adição de cinzas em conjunto com o tratamento enzimático poder ter levado à inibição da metanogénese.

Pela Figura 24 verifica-se que em todos os reatores ocorreu a produção de AOV. Atendendo aos rácios AOV/Alc apresentados na Tabela 27, verifica-se que os reatores CTB-7-E, E-CTB-6 e E-CA5-6 apresentam rácios AOV/Alc superiores a 0,4, o que pode indicar que a alcalinidade do reator não foi suficiente para equilibrar o pH devido à produção de ácidos, conduzindo desta forma à acidificação do sistema. Com isto, os microrganismos metanogénicos provavelmente foram inibidos, justificando a reduzida remoção de matéria orgânica e a ausência de CH₄. A reduzida produção de CH₄, ou ausência da mesma, pode então ser justificada pelos valores de pH finais inferiores a 6,8. Apesar de não se ter detetado produção de CH₄ no reator E-CTB-7, o rácio AOV/Alc do foi 0,35. O grau de acidificação dos reatores CTB-7-E, E-CTB-7 e E-CA5-6 foi de 37,25, 13,60 e 35,22 %, respetivamente.

Na Tabela 28 é apresentado o rácio CBO₅/CQO_s do efluente dos diferentes reatores operados neste ensaio, antes e após tratamento anaeróbio.

Tabela 28 – Rácio CBO₅/CQO_s do efluente inicial e tratado.

Reatores	CBO ₅ /CQO _s	
	Início	Fim
CTB-7-E	0,065	*
CA5-7-E	0,136	*
E-CTB-7	0,049	*
E-CA5-7	0,093	0,357
E-CTB-6	0,111	*
E-CA5-6	0,098	0,352

*Não foi possível obter o valor da CBO₅.

Os efluentes finais dos reatores E-CA5-7 e E-CA5-6 apresentam rácios bastante superiores aos iniciais, o que indica que ocorreu o aumento da biodegradabilidade do efluente, o que corrobora com os resultados anteriormente apresentados. Estes reatores apresentaram baixas remoções de CQO_s, no entanto ocorreu remoção de cerca de 64 e 59 % do AOX presente e produção de AOV, o que tornou o CQO_s presente no efluente final mais biodegradável. Para completar o tratamento do efluente seria recomendado um tratamento biológico aeróbio. Nos restantes reatores não foi possível obter o resultado da CBO₅ devido a problemas no equipamento de leitura.

4.3.6. Considerações sobre o ensaio

O objetivo deste ensaio passou por perceber se o tratamento enzimático com endoglucanases e a adição de cinzas CA5, CTB ao D0 era benéfico para o processo de tratamento anaeróbio, nomeadamente na produção de CH₄ e na remoção de AOX.

Neste estudo verificou-se que os tratamentos realizados com a adição de cinzas e enzimas conduziu a reduzidas produções de CH₄. Em três das condições aplicadas (reatores CTB-7-E, E-CTB-7 e E-CA5-6) não se verificou produção de CH₄, sendo que nos restantes reatores as produtividades de CH₄ variaram entre 5,32 e 33,93 mL-CH₄·g-CQO_{s inicial}⁻¹. Nos reatores D2 e D3 em que não foram utilizadas nem cinzas nem tratamento enzimático, verificaram-se produtividades superiores de 193,92 e de 121,72 mL-CH₄·g-CQO_{s inicial}⁻¹, o que teoriza que a utilização de cinzas em conjunto com o tratamento enzimático não teve um efeito positivo na produção de CH₄. Comparando as produtividades dos reatores deste ensaio com os reatores D0+CTB e D0+CA5 em que houve a produção de 157,2 e 166,3 mL-CH₄·g-CQO_{s inicial}⁻¹, verifica-se mais uma vez que a produção de CH₄ no ensaio com a aplicação das enzimas foi mais reduzida. As produções mais reduzidas de CH₄ podem não estar relacionadas com o pré-tratamento a que o D0 foi sujeito, mas sim com a comunidade metanogénica presente inicialmente nas lamas. Desta forma, este ensaio deverá ser repetido com o intuito de se perceber se na realidade o tratamento aplicado ao D0 foi prejudicial, ou não, para a comunidade metanogénica.

A remoção de AOX obtida neste ensaio foi entre 56,7 e 86,5 %. O reator em que o substrato utilizado foi D0 neutralizado com CA5 até pH 7 e, posteriormente, tratado com enzimas, obteve as maiores remoções de AOX registadas neste trabalho. Nos reatores D3 e D2 verificaram-se a remoções de AOX de 70,64 e 74,21 %, desta forma verifica-se que com o tratamento aplicado no reator CA5-7-E obteve-se maiores remoções de AOX. As remoções de AOX obtidas no reator CTB-7-E (67,4 %) e no reator CA5-7-E (86,5 %) foram também superiores às obtidas nos reatores às obtidas nos reatores D0+CTB (62,0 %) e D0+CA5 (70,1%).

A remoção de matéria orgânica máxima obtida neste ensaio foi no reator CA5-7-E (23,53 %).

4.4. Dinâmica microbiana

Na Figura 25 é apresentado o dendrograma correspondente aos perfis de *DGGE* obtidos a partir das comunidades bacterianas do primeiro ensaio em que foi estudada a carga orgânica aplicada (2 e 3 g-CQO_s·L⁻¹ de D0) e a utilização de glucose e acetato como co-substratos. Nas tabelas, D3, D2, DA, DG, A e G correspondem aos reatores alimentados com 3 g-CQO_s·L⁻¹ de D0, 2 g-CQO_s·L⁻¹ de D0, D0 e acetato, D0 e glucose, acetato e glucose, respetivamente. A nomenclatura de cada reator é explicada na secção 3.2.

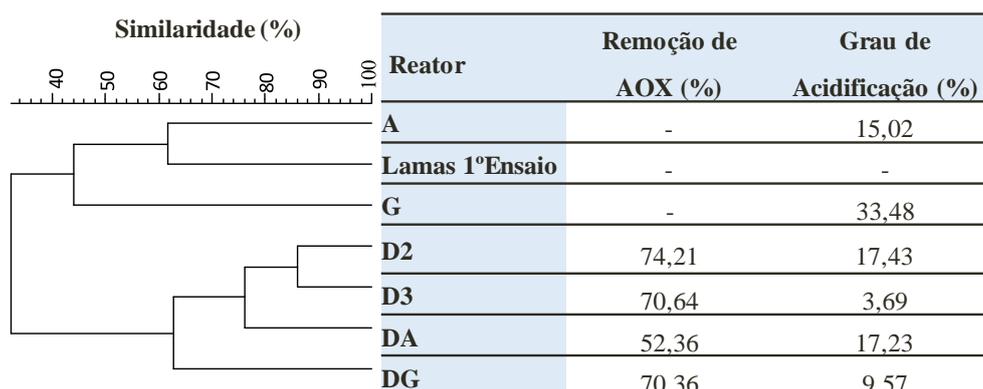


Figura 25 – Dendrograma representativo da similaridade das comunidades bacterianas dos reatores do primeiro ensaio.

Na Figura 25 é possível verificar que o D0 parece ter alterado a composição da comunidade bacteriana, uma vez que se verifica a existência de dois grupos com 68 % de dissimilitude: um dos grupos é constituído por comunidades dos reatores alimentados com D0 e o outro grupo é constituído pelas comunidades dos reatores A e G e as lamas iniciais. Desta forma, verifica-se que nos reatores alimentados apenas com glucose e acetato a comunidade bacteriana é mais semelhante à inicial do que nos reatores alimentados com D0. Também se verifica que as comunidades dos reatores D3 e D2 apresentam 86 % de similaridade.

Após as lamas iniciais serem alimentadas com acetato durante 25 dias a 36 °C verifica-se que a composição da sua comunidade bacteriana se modificou, mantendo uma similaridade com a comunidade inicial de cerca de 62 % (amostras A e 1ºEnsaio, na Figura 25). A alimentação das lamas com glucose, nas mesmas condições, conduziu a uma modificação mais evidente do consórcio bacteriano (similaridade com a comunidade inicial de cerca de 44 %; amostras G e Lamas 1ºEnsaio, na Figura 25). Diferenças mais significativas entre as comunidades das lamas iniciais e finais são observadas nos reatores D2, D3, DA e DG, ou seja, nos reatores em que pelo menos um dos substratos utilizados foi o D0. A similaridade entre a comunidade inicial e as alimentadas com D0 foi de 32 %. Desta forma, verifica-se que a utilização de D0 resulta numa maior alteração da comunidade bacteriana inicial do que a utilização de acetato ou glucose.

Pelos resultados apresentados não é possível concluir se a utilização de co-substratos pode ter sido benéfica no fortalecimento da comunidade bacteriana de forma a torná-la mais resistente aos compostos organoclorados.

A análise das comunidades com base nos perfis de *DGGE* foi realizada usando três índices, cada um descrevendo um aspecto diferente da diversidade da comunidade. Na Tabela 29 são apresentados os valores de riqueza, do índice de diversidade de Shannon e do índice de equabilidade de Pielou para a comunidade bacteriana presente nos reatores do primeiro ensaio.

Tabela 29 – Valores dos parâmetros de riqueza, índice de diversidade e índice de Pielou das comunidades microbianas presentes em cada reator do primeiro ensaio.

	Riqueza	Índice de diversidade	Índice Pielou
Lamas 1ºEnsaio	22	2,795	0,904
D3	16	2,389	0,862
D2	12	2,033	0,818
DA	15	2,296	0,848
DG	13	2,141	0,835
A	18	2,508	0,868
G	19	2,492	0,846

O índice de diversidade de Shannon, variou entre 2,141 e 2,795. Os índices de diversidade da lama inicial e das comunidades bacterianas dos reatores A e G são mais elevados do que os registados para as comunidades bacterianas dos reatores com D0. Desta forma, os resultados indicam a existência de maior número de espécies (riqueza de espécies) e maiores abundâncias relativas nos reatores sem D0. A diminuição do número de espécies nos reatores com D0 pode dever-se à presença de mais compostos tóxicos no efluente. O índice de equabilidade (índice de Pielou) pode variar entre 0 e 1, em que 0 indica a dominância pronunciada de uma espécie e 1 indica a equitabilidade completa. Os índices de equitabilidade das comunidades bacterianas variaram entre 0,818 e 0,904, o que indica uma distribuição quase uniforme.

Na Figura 26 é apresentado o dendrograma do perfil das comunidades bacterianas dos reatores do segundo e terceiro ensaios. Nas tabelas, os reatores D0+CA5, D0+CTB e D0+CAL correspondem aos reatores alimentados com D0 neutralizado com cinzas CA5, CTB e lamas de cal, respetivamente. A letra “f” indica que após a mistura do D0 com as cinzas/lamas o efluente foi filtrado. Nos reatores CTB-7-E, CA5-7-E, E-CTB-7, E-CA5-7, E-CTB-6 e E-CA5-6, a ordem indica a sequência do tratamento aplicado ao D0 antes do tratamento anaeróbio. O número indica o pH final do D0 e a letra “E” corresponde ao tratamento enzimático. A nomenclatura de cada reator é explicada na secção 3.2.

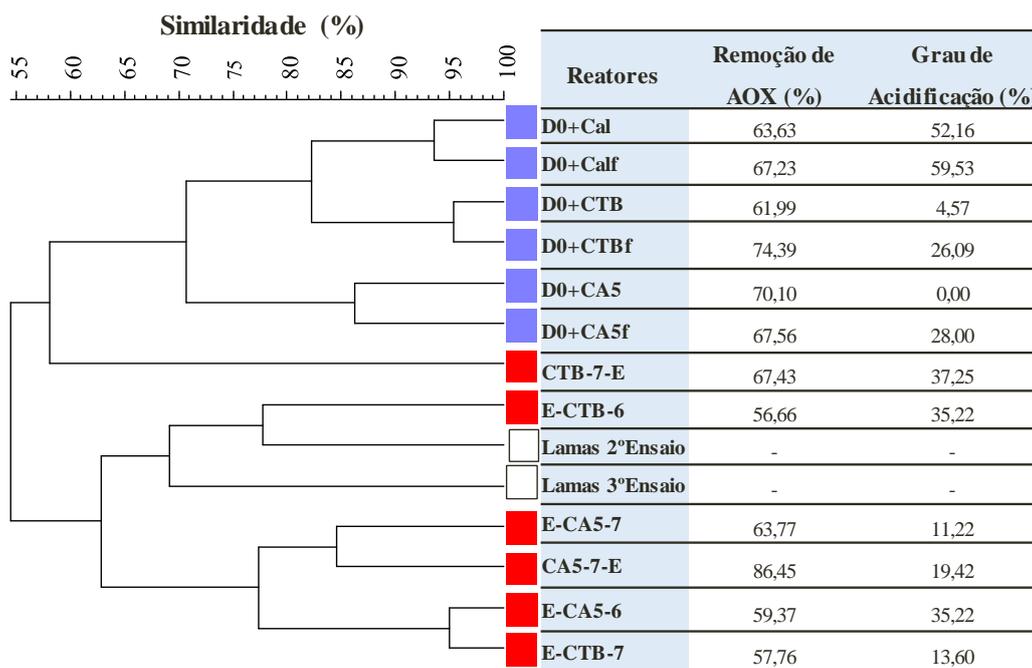


Figura 26 – Dendrograma obtido a partir do perfil de *DGGE* das comunidades bacterianas dos reatores do segundo e terceiro ensaio.

Na Figura 26, os grupos a azul, vermelho e branco correspondem aos reatores do segundo, do terceiro ensaio e às lamas iniciais de cada um dos ensaios, respectivamente. Pela análise da figura, as comunidades bacterianas presentes nas lamas iniciais de cada um dos reatores apresentam uma similaridade de cerca de 69 %. Verifica-se a presença de dois grupos com cerca de 54 % de similaridade, sendo que os reatores do mesmo ensaio pertencem ao mesmo grupo. Apenas o reator CTB-7-E, segundo o perfil obtido, tem mais semelhanças com os reatores do segundo ensaio do que com os reatores do terceiro ensaio.

O tratamento do D0 neutralizado com cinzas CA5, CTB e lamas de cal levou a que as lamas iniciais (lamas 2ºEnsaio) se diferenciasssem. No entanto, as comunidades do segundo ensaio apresentam uma similaridade entre si de cerca de 71 %.

No segundo ensaio, verifica-se que o tratamento anaeróbio do D0 neutralizado com as mesmas cinzas conduziu a comunidades bacterianas semelhantes, mostrando assim que a presença das cinzas provavelmente pode conduzir a diferenças na comunidade. Para conhecer a influência destas cinzas em termos de composição da comunidade bacteriana seria necessário identificar os grupos filogenéticos afetados, através da sequenciação dos fragmentos de DNA que correspondem a cada banda no gel de *DGGE*, para determinar, por exemplo, quais os grupos bacterianos dominantes na comunidade.

Pelo perfil de *DGGE* obtido, não se verificam tendências entre as similaridades das comunidades bacterianas e a remoção de AOX. O grau de acidificação dos reatores D0+CAL e D0+CALf foi de 52,2 e 59,5 %, respectivamente. As comunidades destes reatores apresentam similaridade de cerca de 94 %. Desta forma, a presença de lamas de cal pode estar na origem de

comunidades bacterianas promovendo a maior produção de AOV. Por outro lado, a acidificação do meio pode também ser explicada pela inibição dos microrganismos da comunidade *Archaea* provocada pelos constituintes das lamas de cal.

Na Tabela 30 são apresentados os valores de riqueza, índice de diversidade e índice de Pielou.

Tabela 30 - Valores dos parâmetros de riqueza, índice de diversidade e índice de Pielou das comunidades microbianas presentes em cada reator do 2º e 3º Ensaio.

	Riqueza	Índice de diversidade	Índice Pielou
Lamas 2º Ensaio	21	2,670	0,877
D0+CA5	20	2,494	0,833
D0+CTB	25	2,804	0,871
D0+CAL	21	2,577	0,847
D0+CA5f	23	2,616	0,834
D0+CTBf	24	2,733	0,860
D0+CALf	22	2,652	0,858
Lamas 3º Ensaio	28	2,864	0,859
CTB-7-E	24	2,705	0,851
CA5-7-E	19	2,612	0,887
E-CTB-7	23	2,761	0,880
E-CA5-7	20	2,637	0,880
E-CTB-6	18	2,452	0,848
E-CA5-6	25	2,847	0,885

O valor da riqueza indica o número de bandas obtidas no gel *DGGE*, permitindo uma estimativa do número de filotipos nas comunidades. À semelhança do primeiro ensaio, verificou-se a existência de elevada quantidade de bandas por *lane* o que indica uma diversidade de filotipos considerável nas amostras analisadas. No terceiro ensaio, verifica-se que a riqueza da comunidade bacteriana diminuiu com o tratamento anaeróbico do D0. A aplicação do tratamento enzimático (“E”) tinha como objetivo aumentar a biodisponibilidade de detritos celulósicos presentes no D0, fornecendo mais substrato à comunidade microbiana com o objetivo de a reforçar. Os resultados apresentados sugerem que a aplicação do tratamento enzimático no D0 levou à diminuição da riqueza da comunidade.

O índice de diversidade de Shannon variou de 2,452 e 2,864 e o índice de equitabilidade variou entre 0,833 e 0,880, mostrando que as amostras têm diversidades bacterianas semelhantes com distribuição bastante uniforme.

Na Figura 27 é apresentado o dendrograma do perfil das comunidades pertencentes ao reino *Archaea* dos reatores do primeiro, segundo e terceiro ensaio, bem como as remoções, produtividades em CH₄ e grau de acidificação de cada reator.

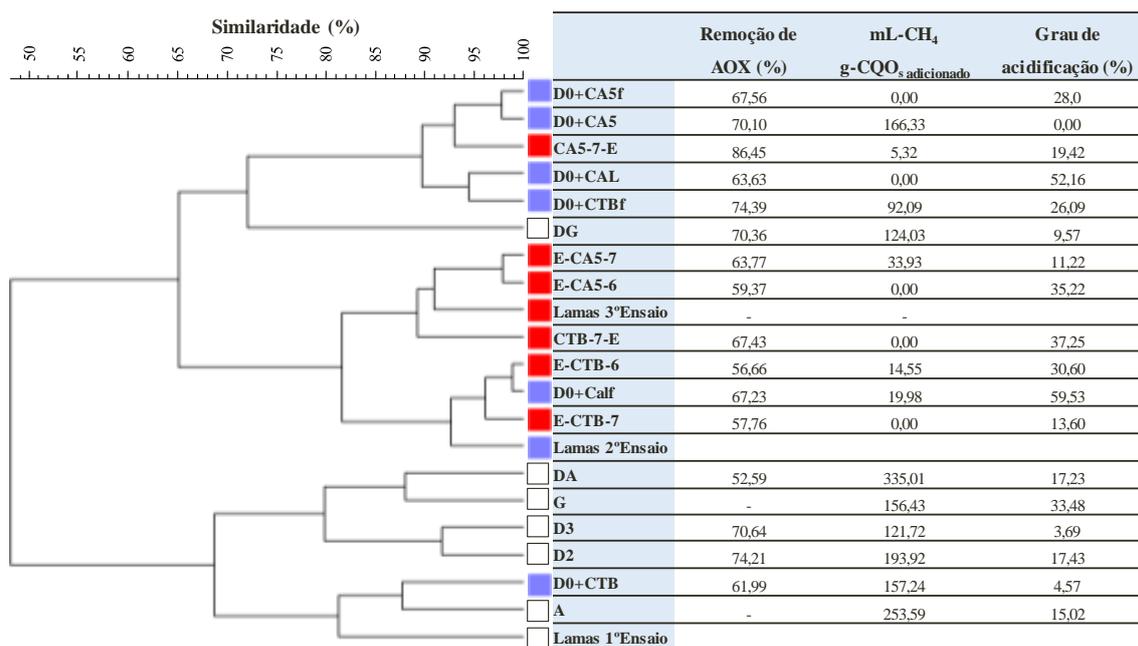


Figura 27 – Dendrograma obtido a partir do perfil de DGGE das comunidades *Archaea* dos reatores do primeiro, segundo e terceiro ensaio.

Pela análise da Figura 27 verifica-se que em termos de similaridade da comunidade *Archaea*, os reatores dividem-se em dois grupos principais com cerca de 48 % de similaridade. No dendrograma verifica-se que as lamas iniciais (biomassa anaeróbia inicial) do primeiro ensaio (Lamas 1ºEnsaio) apresentam uma similaridade de 48 % com as lamas utilizadas nos ensaios 2 e 3 (Lamas 2ºEnsaio e Lamas 3ºEnsaio). Desta forma, é razoável concluir que a grande parte da variação que se verifica entre ensaios pode dever-se às diferenças das comunidades *Archaea* e *Bacteria* nas lamas utilizadas.

As comunidades *Archaea* dos reatores DA, G, D3, D2, D0+CTB e A apresentam uma similaridade mínima de 70 % sendo que os restantes reatores apresentam uma similaridade mínima de 65 %. A produtividade em CH₄ do primeiro grupo variou entre 121,7 e 335,0 mL-CH₄·g-CQO_s inicial⁻¹ e a do segundo variou entre 0,00 e 166,33 mL-CH₄·g-CQO_s inicial⁻¹. Estas diferenças de produtividade parecem estar relacionadas com o tipo de microrganismos presente.

As remoções de AOX nos reatores variaram entre 52,59 e 86,45 %, não se verificando nenhuma tendência em termos de similaridade de comunidade *Archaea* e remoções obtidas. As remoções de AOX podem dever-se à biossorção, à degradação devido à interação com outros compostos, às alterações de pH e à biodegradação anaeróbia.

Na Tabela 31 são apresentados os valores dos parâmetros riqueza, índice de diversidade e índice de Pielou.

Tabela 31 - Valores dos parâmetros de riqueza, índice de diversidade e índice de Pielou das comunidades *Archaea* presentes em cada reator do trabalho.

	Riqueza	Índice de diversidade	Índice de equitatividade
Lamas 1ºEnsaio	4	1,00	0,72
D3	4	0,93	0,67
D2	3	0,58	0,53
DA	6	1,32	0,74
DG	5	1,21	0,75
A	5	1,23	0,77
G	1	-	-
Lamas 2ºEnsaio	4	0,98	0,71
D0+CA5	7	1,45	0,74
D0+CTB	5	1,31	0,81
D0+CAL	4	1,08	0,78
D0+CA5f	3	0,86	0,78
D0+CTBf	4	1,14	0,82
D0+CALf	3	0,82	0,75
Lamas 3ºEnsaio	6	1,31	0,73
CTB-7-E	3	1,03	0,93
CA5-7-E	5	1,41	0,87
E-CTB-7	2	0,47	0,68
E-CA5-7	4	0,95	0,68
E-CTB-6	2	0,61	0,88
E-CA5-6	3	0,80	0,73

O valor da riqueza de microrganismos pertencentes ao reino *Archaea* nas amostras variou entre 1 e 7 indicando a baixa riqueza, quando comparado com a riqueza bacteriana. Na amostra final do reator G verificou-se que apenas foi detetada uma banda. Desta forma, não foi possível determinar índices de diversidade e de Pielou visto que a amostra era muito pouco rica em termos de microrganismos *Archaea*.

A riqueza da comunidade *Archaea* do reator D0+CA5 aumentou entre o momento inicial (lamas) e o final o que indica que ocorreu a proliferação de microrganismos que inicialmente não eram representativos. Esta comunidade é também a que apresenta maior diversidade. Este foi o reator do segundo ensaio em que se obteve maior produtividade em CH₄. Desta forma, pode-se concluir que a adição das cinzas CA5 demonstrou ser benéfica para o desenvolvimento de uma comunidade *Archaea* mais abundante e diversa.

Nos reatores no terceiro ensaio, verifica-se que em todos os substratos aplicados ocorreu a diminuição da riqueza, o que se pode dever à toxicidade dos compostos presentes no efluente. Com estes resultados verifica-se que a utilização das cinzas com o tratamento enzimático parece não ter fortalecido os microrganismos da comunidade *Archaea* presentes nas lamas.

Com a análise dos perfis das comunidades *Archaea* e *Bacteria* presentes nas amostras recolhidas é possível concluir que as lamas iniciais utilizadas nos diferentes ensaios apresentam constituição diferente, o que pode justificar, por exemplo, a produtividade em CH₄ mais reduzida nos reatores do último ensaio em relação aos reatores do primeiro ensaio. Esta análise permitiu verificar que a utilização de D0 como substrato conduziu a mais modificações na comunidade inicial do que quando apenas utilizado acetato como substrato e que a utilização de cinzas CA5 parece ter fortalecido a comunidade microbiana, aumentando a sua riqueza e diversidade, conduzindo a uma maior produção de CH₄.

5. Conclusão

O presente trabalho teve como objetivo a realização de testes descontínuos de biodegradabilidade anaeróbia de efluentes provenientes da primeira etapa de branqueamento de pasta *kraft*, ricos em compostos recalcitrantes organoclorados estimados como AOX. Começou-se por estudar a biodegradabilidade do efluente sem a adição de nenhum outro composto, passando-se pela utilização de co-substratos, pela adição de cinzas e pela realização de tratamento enzimático e adição de cinzas. Na Tabela 32 são apresentados os principais resultados obtidos no tratamento anaeróbio do D0.

Tabela 32 – Resumo da performance dos reatores alimentados com D0.

	Remoção de AOX (%)	Remoção de CQO _s (%)	Metanização (%)	mL-CH ₄ · g-CQO _s inicial ⁻¹	Acidificação (%)
D3	70,64	47,53	30,72	121,72	3,69
D2	74,21	26,20	46,48	193,92	17,43
DA	52,59	76,20	74,09	335,01	17,23
DG	70,36	42,92	31,30	124,03	9,57
D0+CA5	70,10	45,49	41,99	166,33	0,00
D0+CTB	61,99	64,58	43,67	157,24	4,57
D0+CAL	63,63	8,00	0,00	0,00	52,16
D0+CA5f	67,56	13,44	0,00	0,00	28,00
D0+CTBf	74,39	40,40	23,25	92,09	26,09
D0+Calf	67,23	15,66	5,05	19,98	59,53
CTB-7-E	67,43	8,97	0,00	0,00	37,25
CA5-7-E	86,45	23,53	1,34	5,32	19,42
E-CTB-7	57,76	-	0,00	-	13,60
E-CA5-7	63,77	0,83	3,66	33,93	11,22
E-CTB-6	56,66	-	3,67	-	30,60
E-CA5-6	59,37	2,16	0,00	0,00	35,22

Nos reatores em que se utilizou 3 e 2 g-CQO_s·L⁻¹ de D0 sem aditivos, verificaram-se remoções de AOX de 70,6 e 74,2 %, remoções de CQO_s de 47,5 e 26,2 % e produções de CH₄ de 121,7 e 193,9 mL-CH₄·g-CQO_s inicial, respetivamente. A adição dos co-substratos, acetato e glucose, não conduziu a remoções de AOX mais elevadas. As remoções de AOX nos reatores suplementados com acetato e glucose foram de 52,6 e 70,4 %, respetivamente. Por outro lado, obtiveram-se remoções de CQO_s de 76,2 e 42,9 %, e eficiências de metanização de 335,0 e 124,0 mL-CH₄·g-CQO_s inicial, nos reatores alimentados com D0 e co-substrato, na razão de 1:1 em CQO. Desta forma, verifica-se que a utilização destes co-substratos (acetato e glucose) não originou remoções de AOX superiores. No entanto, a utilização de acetato parece ter reforçado a comunidade metanogénica levando a que a produção de CH₄ ocorresse mais rapidamente e em

maior quantidade. Com este ensaio verificou-se ainda que a remoção de AOX foi maximizada no reator alimentado com $2 \text{ g-CQO}_s \cdot \text{L}^{-1}$ e que este foi também o que, sem adição de co-substratos, obteve maior produção de CH_4 .

Com o intuito de aumentar a remoção de compostos organoclorados e a produção de CH_4 , foram utilizadas cinzas volantes (CA5 e CTB) e lamas de cal. Num primeiro momento estas foram adicionadas ao D0 com o intuito de o neutralizar. Verificou-se que a adição de cinzas CTB, cinzas CA5 e lamas de cal promoveu remoções de AOX de 35,4, 33,8 e 33,6 %, respetivamente, ou seja, remoções superiores às obtidas quando o D0 é neutralizado com NaOH (18 %).

Com o tratamento anaeróbio das misturas filtradas e não filtradas do D0 com cinzas, resultante da neutralização, obtiveram-se remoções de AOX entre 62,0 e 74,4 %. Nos reatores alimentados com a mistura original e filtrada do D0 neutralizado com cinzas CA5 ocorreu a remoção de 70,1 e 67,6 % do AOX, respetivamente. Os reatores alimentados com a mistura filtrada de D0 e cinzas CTB e lamas de cal apresentaram taxas de remoção de AOX superiores (74,4 e 67,2 %) às taxas dos reatores alimentados com a mesma mistura, mas não filtrada (62,0 e 63,6 %). Os resultados indicam que possivelmente a permanência das cinzas CTB e das lamas de cal nos reatores não foi benéfica para a remoção de AOX.

Nos reatores alimentados com a mistura filtrada de D0 com cinzas CA5 e a mistura original de D0 com lamas de cal não ocorreu a produção de CH_4 . Nos reatores alimentados com a mistura não filtrada de D0 neutralizado com cinzas CA5 e cinzas CTB ocorreu a produção de 166,3 e 157,2 $\text{mL-CH}_4 \cdot \text{g-CQO}_s \text{ inicial}^{-1}$, respetivamente. Nos reatores alimentados com a mistura filtrada de D0 neutralizado com cinzas CTB e lamas de cal ocorreu a produção de 92,1 e 20,0 $\text{mL-CH}_4 \cdot \text{g-CQO}_s \text{ inicial}^{-1}$, respetivamente. A permanência das cinzas no interior do reator parece ter sido benéfica para a produção de CH_4 . As produtividades em CH_4 quando as cinzas CA5 e CTB permaneceram nos reatores são inferiores à produtividade obtida no reator alimentado apenas com D0 (neutralizado com NaOH), no entanto esta diferença de produtividade pode dever-se a erros na medição dos volumes de CH_4 produzido, pelo que a diferença pode não ser significativa. Desta forma, a utilização de cinzas CA5 e CTB parece ter sido vantajosa na remoção de AOX (redução de gastos de neutralização) e não teve efeitos significativos na quantidade de CH_4 produzida.

No último ensaio pretendeu-se estudar a adição de enzimas e de cinzas CA5 e CTB com o intuito de aumentar a remoção de AOX e a produção de CH_4 . Com a adição de enzimas ao D0 verificou-se o aumento da biodegradabilidade aeróbia do mesmo, sem alterações significativas na quantidade de AOX presente. Com o tratamento enzimático e adição de cinzas verificou-se o aumento da razão $\text{CBO}_5/\text{CQO}_s$ e a diminuição da quantidade de AOX presente. Após sujeitar os diferentes efluentes ao tratamento enzimático verificou-se que no reator em que o D0 foi tratado com a sequência CA5-7-E ocorreu maior remoção de AOX do que nas restantes sequencias de tratamentos. Neste ensaio a remoção de AOX variou entre 57,8 e 86,5 %. Nos reatores CTB-7-E,

E-CTB-7 e E-CA5-6 não se verificou a produção de CH₄, sendo que a produtividade máxima nos restantes reatores foi de 33,9 mL-CH₄·g-CQO_s inicial⁻¹. Consequentemente, a remoção de CQO_s registada nestes reatores foi também bastante reduzida, sendo o máximo obtido 23,5 %. Com este ensaio conclui-se que a utilização de enzimas e cinzas parece não ter o efeito pretendido na produção CH₄ e remoção de AOX.

Com o estudo da dinâmica bacteriana verificou-se que nos reatores alimentados apenas com glucose e acetato a comunidade microbiana é mais semelhante à comunidade inicial comparativamente aos reatores alimentados com D0. Também se verifica que os reatores D3 e D2 apresentam 86 % de similaridade, sendo as comunidades mais semelhantes. Pelos resultados apresentados não é possível concluir se a utilização de co-substratos pode ser, ou não, benéfica no aumento da biodegradabilidade anaeróbia do D0, no que diz respeito ao fortalecimento da comunidade bacteriana de forma a torná-la mais resistente aos compostos organoclorados. No ensaio com a adição de cinzas concluiu-se que a utilização das mesmas cinzas conduziu a comunidades bacterianas semelhantes.

Em termos de comunidade *Archaea* verificou-se que as lamas utilizadas no primeiro ensaio apresentavam uma dissimilitude de 48 % das lamas utilizadas nos restantes ensaios, sendo que as dos dois últimos ensaios apresentaram uma similaridade de 80 %. Desta forma, é necessário ter em consideração que as diferenças verificadas em termos de remoção de AOX e de produção de CH₄ podem estar associadas às comunidades presentes e não só ao efeito do D0 com os diferentes tratamentos aplicados. Mais estudos terão de ser realizados com o intuito de determinar se as condições aplicadas nestes ensaios permitem reforçar a comunidade bacteriana com o intuito de melhorar a digestão anaeróbia do efluente.

Conclui-se ainda que a utilização do sistema Oxitop para determinação do volume de biogás não foi eficaz no decorrer deste trabalho. Para a maioria dos reatores, não foi possível obter os valores das variações de pressão correspondentes ao aumento da quantidade de biogás no interior do reator. Desta forma, em trabalhos futuros, devem de ser utilizados outros sistemas para a medição do biogás produzido dentro dos reatores.

6. Trabalho futuro

Determinar a composição da comunidade microbiana antes e após o tratamento do D0. Poder-se-á utilizar tecnologias de sequenciação massiva paralela para identificação dos grupos filogenéticos presentes nas lamas, antes e após o tratamento anaeróbio, determinando a abundância relativa destes na presença de compostos recalcitrantes. Desta forma, no futuro pode-se estimular mais essas comunidades para que ocorra o aumento da remoção de AOX e produção de CH₄.

Estudar se a adição de outros resíduos, por exemplo o soro do leite, pode ser benéfico para fortalecer a comunidade microbiana e conduzir à maior remoção de AOX e produção de CH₄.

Fazer o *scale up* dos reatores D2 e dos reatores alimentados com D0 e cinzas CA5 e CTB que foram os substratos que se mostraram mais benéficos na digestão anaeróbia do efluente. Fazer o estudo em outras condições operacionais, por exemplo, em condições termófilas e estudar a operação em contínuo.

Estudar o potencial de produção de AOV, aquando da utilização de lamas de cal, durante a digestão anaeróbia do D0.

7. Bibliografia

- [1] «Industrial pollution in Europe», *European Environment Agency*. [Em linha]. Disponível em: <https://www.eea.europa.eu/themes/industry/industrial-pollution-in-europe/industrial-pollution-in-europe>. [Acedido: 18-Dez-2018].
- [2] R. N. Bharagava e P. Chowdhary, Eds., *Emerging and Eco-Friendly Approaches for Waste Management*. Singapore: Springer Singapore, 2019.
- [3] M. Ali e T. R. Sreekrishnan, «Aquatic toxicity from pulp and paper mill effluents: a review», *Adv. Environ. Res.*, vol. 5, n. 2, pp. 175–196, Mai. 2001.
- [4] D. Savant, R. Abdulrahman, e D. Ranade, «Anaerobic degradation of adsorbable organic halides (AOX) from pulp and paper industry wastewater», *Bioresour. Technol.*, vol. 97, n. 9, pp. 1092–1104, Jun. 2006.
- [5] G. Vidal, M. Soto, J. Field, R. Méndez-Pampín, e J. M. Lema, «Anaerobic biodegradability and toxicity of wastewaters from chlorine and total chlorine-free bleaching of eucalyptus kraft pulps», *Water Res.*, vol. 31, n. 10, pp. 2487–2494, Out. 1997.
- [6] Associação da indústria papelreira, «Boletim estatístico indústria papelreira portuguesa». 2017.
- [7] D. Pokhrel e T. Viraraghavan, «Treatment of pulp and paper mill wastewater—a review», *Sci. Total Environ.*, vol. 333, n. 1–3, pp. 37–58, Out. 2004.
- [8] M. Kamali e Z. Khodaparast, «Review on recent developments on pulp and paper mill wastewater treatment», *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, vol. 114, pp. 326–342, Abr. 2015.
- [9] M. Kamali, T. Gameiro, M. E. V. Costa, e I. Capela, «Anaerobic digestion of pulp and paper mill wastes – An overview of the developments and improvement opportunities», *Chem. Eng. J.*, vol. 298, pp. 162–182, Ago. 2016.
- [10] H. Sixta, Ed., *Handbook of pulp*. Weinheim: Wiley-VCH, 2006.
- [11] E.-M. Ekstrand *et al.*, «Methane potentials of the Swedish pulp and paper industry – A screening of wastewater effluents», *Appl. Energy*, vol. 112, pp. 507–517, Dez. 2013.
- [12] C. Biermann, *Handbook of pulping and papermaking*, 2^a. Academic Press, 1996.
- [13] P. Bajpai, *Environmentally benign approaches for pulp bleaching*, 2nd ed. Amsterdam; Boston: Elsevier, 2012.
- [14] P. Bajpai, *Bleach Plant Effluents from the Pulp and Paper Industry*. Heidelberg: Springer International Publishing, 2013.
- [15] M. A. Hubbe *et al.*, «Wastewater Treatment and Reclamation: A Review of Pulp and Paper Industry Practices and Opportunities», *BioResources*, vol. 11, n. 3, Jul. 2016.
- [16] R. Fitzsimons, M. Ek, e K. E. L. Eriksson, «Anaerobic dechlorination/degradation of chlorinated organic compounds of different molecular masses in bleach plant effluents», *Environ. Sci. Technol.*, vol. 24, n. 11, pp. 1744–1748, Nov. 1990.

- [17] A. Pintar, M. Besson, P. Gallezot, J. Gibert, e D. Martin, «Toxicity to *Daphnia magna* and *Vibrio fischeri* of Kraft bleach plant effluents treated by catalytic wet-air oxidation», *Water Res.*, vol. 38, n. 2, pp. 289–300, Jan. 2004.
- [18] G. Yan e D. G. Allen, «Biosorption of high molecular weight organochlorines in pulp mill effluent», *Water Res.*, vol. 28, n. 9, pp. 1933–1941, Set. 1994.
- [19] M. Hewitt, «Effects-Directed Studies of Pulp and Paper Mill Effluents», em *Effect-Directed Analysis of Complex Environmental Contamination*, vol. 15, W. Brack, Ed. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2011, pp. 267–283.
- [20] K. Solomon e P. Hodson, «Evaluation of ecological risks associated with the use of chlorine dioxide for the bleaching of pulp», p. 112, 1997.
- [21] Associação Portuguesa dos técnicos das indústrias de celulose e papel, «Novo BREF na indústria de pasta e papel». Jun-2015.
- [22] Agência Portuguesa do ambiente, «Licença Ambiental Portucel». 2009.
- [23] Agência Portuguesa do ambiente, «Rotulagem ambiental». [Em linha]. Disponível em: <https://www.apambiente.pt/index.php?ref=17&subref=154&sub2ref=267>. [Acedido: 05-Fev-2019].
- [24] *Commission Decision (EU) 2019/70 of 11 January 2019 establishing the EU Ecolabel criteria for graphic paper and the EU Ecolabel criteria for tissue paper and tissue products (notified under document C(2019) 3) (Text with EEA relevance.)*, vol. 015. 2019.
- [25] T. Asano, *Water reuse: issues, technologies, and applications*. New York: McGraw-Hill, 2007.
- [26] A. R. Shawwa, D. W. Smith, e D. C. Seago, «Color and chlorinated organics removal from pulp mills wastewater using activated petroleum coke», *Water Res.*, vol. 35, n. 3, pp. 745–749, Fev. 2001.
- [27] X. Duan, T. Liu, W. Duan, e H. Hu, «Adsorption and Coagulation Tertiary Treatment of Pulp & Paper Mills Wastewater», em *2010 4th International Conference on Bioinformatics and Biomedical Engineering*, Chengdu, China, 2010, pp. 1–4.
- [28] C. H. Möbius e A. Helble, «Combined ozonation and biofilm treatment for reuse of papermill wastewaters», *Water Sci. Technol.*, vol. 49, n. 4, pp. 319–323, Fev. 2004.
- [29] A. Moiseev, H. Schroeder, M. Kotsaridou-Nagel, S.-U. Geissen, e A. Vogelpohl, «Photocatalytical polishing of paper-mill effluents», *Water Sci. Technol.*, vol. 49, n. 4, pp. 325–330, Fev. 2004.
- [30] M. Uğurlu e M. H. Karaoğlu, «Removal of AOX, total nitrogen and chlorinated lignin from bleached Kraft mill effluents by UV oxidation in the presence of hydrogen peroxide utilizing TiO₂ as photocatalyst», *Environ. Sci. Pollut. Res.*, vol. 16, n. 3, pp. 265–273, Mai. 2009.

- [31]W. X. Yao, K. J. Kennedy, C. M. Tam, e J. D. Hazlett, «Pre-treatment of kraft pulp bleach plant effluent by selected ultrafiltration membranes», *Can. J. Chem. Eng.*, vol. 72, n. 6, pp. 991–999, Dez. 1994.
- [32]M. Seiss, «Improved AOX degradation in UV oxidative waste water treatment by dialysis with nanofiltration membrane», *Water Res.*, vol. 35, n. 13, pp. 3242–3248, Set. 2001.
- [33]«EBA Statistical Report 2017 - European Biogas Association European Biogas Association». [Em linha]. Disponível em: <http://european-biogas.eu/2017/12/14/eba-statistical-report-2017-published-soon/>. [Acedido: 05-Jan-2019].
- [34]J. A. Teixeira, M. M. Fonseca, e A. Vicente, *Reactores Biológicos: Fundamentos e Aplicações*. 2007.
- [35]K. Anderson, P. Sallis, e S. Uyanik, «Anaerobic treatment processes», em *Handbook of Water and Wastewater Microbiology*, Elsevier, 2003, pp. 391–426.
- [36]K. F. Adekunle e J. A. Okolie, «A Review of Biochemical Process of Anaerobic Digestion», *Adv. Biosci. Biotechnol.*, vol. 06, n. 03, pp. 205–212, 2015.
- [37]P. Merlin Christy, L. R. Gopinath, e D. Divya, «A review on anaerobic decomposition and enhancement of biogas production through enzymes and microorganisms», *Renew. Sustain. Energy Rev.*, vol. 34, pp. 167–173, Jun. 2014.
- [38]R. Chandra, H. Takeuchi, e T. Hasegawa, «Methane production from lignocellulosic agricultural crop wastes: A review in context to second generation of biofuel production», *Renew. Sustain. Energy Rev.*, vol. 16, n. 3, pp. 1462–1476, Abr. 2012.
- [39]R. Montañés, M. Pérez, e R. Solera, «Anaerobic mesophilic co-digestion of sewage sludge and sugar beet pulp lixiviation in batch reactors: Effect of pH control», *Chem. Eng. J.*, vol. 255, pp. 492–499, Nov. 2014.
- [40]W. Laloui-Carpentier, T. Li, V. Vigneron, L. Mazéas, e T. Bouchez, «Methanogenic diversity and activity in municipal solid waste landfill leachates», *Antonie Van Leeuwenhoek*, vol. 89, n. 3–4, pp. 423–434, Jun. 2006.
- [41]D. Deublein e A. Steinhauser, *Biogas from waste and renewable resources. An Introduction*. WILEY-VCH, 2008.
- [42]A. J. Ward, P. J. Hobbs, P. J. Holliman, e D. L. Jones, «Optimisation of the anaerobic digestion of agricultural resources», *Bioresour. Technol.*, vol. 99, n. 17, pp. 7928–7940, Nov. 2008.
- [43]M. H. Gerardi, *The microbiology of anaerobic digesters*. Hoboken, N.J: Wiley-Interscience, 2003.
- [44]R. Leitao, A. Vanhaandel, G. Zeeman, e G. Lettinga, «The effects of operational and environmental variations on anaerobic wastewater treatment systems: A review», *Bioresour. Technol.*, vol. 97, n. 9, pp. 1105–1118, Jun. 2006.

- [45] P. Bajpai, *Anaerobic Technology in Pulp and Paper Industry*. Singapore: Springer Singapore, 2017.
- [46] D. Bolzonella, C. Cavinato, F. Fatone, P. Pavan, e F. Cecchi, «High rate mesophilic, thermophilic, and temperature phased anaerobic digestion of waste activated sludge: A pilot scale study», *Waste Manag.*, vol. 32, n. 6, pp. 1196–1201, Jun. 2012.
- [47] M. S. Romero-Güiza, J. Vila, J. Mata-Alvarez, J. M. Chimenos, e S. Astals, «The role of additives on anaerobic digestion: A review», *Renew. Sustain. Energy Rev.*, vol. 58, pp. 1486–1499, Mai. 2016.
- [48] L. E. Montañez Hernandez, M. García Lozano, Y. Peña Garcia, R. Oropeza Navarro, e N. Balagurusamy, «Microbiology and Biochemistry of Anaerobic Treatment», em *Current Developments in Biotechnology and Bioengineering*, Elsevier, 2017, pp. 231–259.
- [49] T. Meyer e E. A. Edwards, «Anaerobic digestion of pulp and paper mill wastewater and sludge», *Water Res.*, vol. 65, pp. 321–349, Nov. 2014.
- [50] A. J. Guwy, «Equipment used for testing anaerobic biodegradability and activity», *Rev. Environ. Sci. Biotechnol.*, vol. 3, n. 2, pp. 131–139, Jun. 2004.
- [51] I. Angelidaki e W. Sanders, «Assessment of the anaerobic biodegradability of macropollutants», *Rev. Environ. Sci. Biotechnol.*, vol. 3, n. 2, pp. 117–129, Jun. 2004.
- [52] M. I. Yang, E. A. Edwards, e D. G. Allen, «Anaerobic treatability and biogas production potential of selected in-mill streams», *Water Sci. Technol.*, vol. 62, n. 10, pp. 2427–2434, Nov. 2010.
- [53] T. R. Chaparro e E. C. Pires, «Anaerobic treatment of cellulose bleach plant wastewater: chlorinated organics and genotoxicity removal», *Braz. J. Chem. Eng.*, vol. 28, n. 4, pp. 625–638, Dez. 2011.
- [54] M. Larsson *et al.*, «Anaerobic digestion of alkaline bleaching wastewater from a kraft pulp and paper mill using UASB technique», *Environ. Technol.*, vol. 36, n. 12, pp. 1489–1498, Jun. 2015.
- [55] A. P. Buzzini, E. P. Gianotti, e E. C. Pires, «UASB performance for bleached and unbleached kraft pulp synthetic wastewater treatment», *Chemosphere*, vol. 59, n. 1, pp. 55–61, Mar. 2005.
- [56] R. Lepistö e J. Rintala, «The Removal of Chlorinated Phenolic Compounds from Chlorine Bleaching Effluents Using Thermophilic Anaerobic Processes», *Water Sci. Technol.*, vol. 29, n. 5–6, pp. 373–380, Mar. 1994.
- [57] M. Ali e T. R. Sreekrishnan, «Anaerobic treatment of agricultural residue based pulp and paper mill effluents for AOX and COD reduction», *Process Biochem.*, vol. 36, n. 1–2, pp. 25–29, Set. 2000.

- [58]N. S. Deshmukh *et al.*, «Upflow anaerobic filter for the degradation of adsorbable organic halides (AOX) from bleach composite wastewater of pulp and paper industry», *Chemosphere*, vol. 75, n. 9, pp. 1179–1185, Mai. 2009.
- [59]W. W. Mohn' e J. M. Tiedje, «Microbial Reductive Dehalogenation», *MICROBIOL REV*, vol. 56, p. 26, 1992.
- [60]S. El Fantroussi, H. Naveau, e S. N. Agathos, «Anaerobic Dechlorinating Bacteria», *Biotechnol. Prog.*, vol. 14, n. 2, pp. 167–188, Abr. 1998.
- [61]S. Wang *et al.*, «Electron transport chains in organohalide-respiring bacteria and bioremediation implications», *Biotechnol. Adv.*, vol. 36, n. 4, pp. 1194–1206, Jul. 2018.
- [62]S. Rasi, A. Veijanen, e J. Rintala, «Trace compounds of biogas from different biogas production plants», *Energy*, vol. 32, n. 8, pp. 1375–1380, Ago. 2007.
- [63]A. Petersson e A. Wellinger, «Biogas upgrading technologies – developments and innovations», p. 20.
- [64]Agência Portuguesa do ambiente, «Título de Emissão de Gases com Efeito de Estufa». Jun-2009.
- [65]R. Rajamma, R. J. Ball, L. A. C. Tarelho, G. C. Allen, J. A. Labrincha, e V. M. Ferreira, «Characterisation and use of biomass fly ash in cement-based materials», *J. Hazard. Mater.*, vol. 172, n. 2–3, pp. 1049–1060, Dez. 2009.
- [66]T. C. Esteves, R. Rajamma, D. Soares, A. S. Silva, V. M. Ferreira, e J. A. Labrincha, «Use of biomass fly ash for mitigation of alkali-silica reaction of cement mortars», *Constr. Build. Mater.*, vol. 26, n. 1, pp. 687–693, Jan. 2012.
- [67]O. Gonçalves, «Valorização de resíduos da indústria de celulose por geopolimerização», Universidade de Aveiro, Departamento de Engenharia de Materiais e Cerâmica, 2014.
- [68]L. H. Buruberry, M. P. Seabra, e J. A. Labrincha, «Preparation of clinker from paper pulp industry wastes», *J. Hazard. Mater.*, vol. 286, pp. 252–260, Abr. 2015.
- [69]American Public Health Association, American Water Works Association, e Water Pollution Control Federation, *Standard methods for the examination of water and wastewater*, 21.^a ed. Washington DC, 2005.
- [70]T. Gameiro, M. Lopes, R. Marinho, P. Vergine, H. Nadais, e I. Capela, «Hydrolytic-Acidogenic Fermentation of Organic Solid Waste for Volatile Fatty Acids Production at Different Solids Concentrations and Alkalinity Addition», *Water. Air. Soil Pollut.*, vol. 227, n. 10, p. 391, Out. 2016.
- [71]United States Environmental Protection Agency, «Potentiometric Determination of Chloride in Aqueous Samples with Ion-Selective Electrode». [Em linha]. Disponível em: <https://www.epa.gov/sites/production/files/2015-12/documents/9212.pdf>. [Acedido: 20-Mai-2019].

- [72]N. N. Perreault, D. T. Andersen, W. H. Pollard, C. W. Greer, e L. G. Whyte, «Characterization of the Prokaryotic Diversity in Cold Saline Perennial Springs of the Canadian High Arctic», *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 73, n. 5, pp. 1532–1543, Mar. 2007.
- [73]I. S. Henriques, A. Alves, M. Tação, A. Almeida, Â. Cunha, e A. Correia, «Seasonal and spatial variability of free-living bacterial community composition along an estuarine gradient (Ria de Aveiro, Portugal)», *Estuar. Coast. Shelf Sci.*, vol. 68, n. 1–2, pp. 139–148, Jun. 2006.
- [74]J. G. Dorica, J. Sullivan, M. Douek, D. A. Hill, G. M. Milosevich, e G. M. Milosevich, «Removal of aox form bleach plant mill effluents by pH shift using the alkalinity/acidity sources available at the mill», 5,120,448, 1992.
- [75]D. B. Ruas, T. R. Chaparro, e E. C. Pires, «Advanced oxidation process H₂O₂/UV combined with anaerobic digestion to remove chlorinated organics from bleached kraft pulp mill wastewater», p. 12, 2012.
- [76]W. Parker, E. HALL, e G. Farquhar, «Evaluation of dechlorination mechanisms during anaerobic fermentation of bleached kraft mill effluent», *Water Res.*, vol. 27, pp. 1269–1273.
- [77]E. Speece, «Anaerobic biotechnology for industrial wastewater treatment», *Env. Sci Technol.*, vol. 17, n. 9, p. 12, 1983.
- [78]R. M. Novais *et al.*, «High pH buffer capacity biomass fly ash-based geopolymer spheres to boost methane yield in anaerobic digestion», *J. Clean. Prod.*, vol. 178, pp. 258–267, Mar. 2018.
- [79]W. Gao e P. Fatehi, «Fly ash based adsorbent for treating bleaching effluent of kraft pulping process», *Sep. Purif. Technol.*, vol. 195, pp. 60–69, Abr. 2018.
- [80]N. J. Sell, J. C. Norman, e M. B. VandenBusch, «Removing color and chlorinated organics from pulp mill bleach plant effluents by use of flyash», *Resour. Conserv. Recycl.*, vol. 10, n. 4, pp. 279–299, Jun. 1994.
- [81]C. Huiliñir, S. Montalvo, e L. Guerrero, «Biodegradability and methane production from secondary paper and pulp sludge: effect of fly ash and modeling», *Water Sci. Technol.*, vol. 72, n. 2, pp. 230–237, Jul. 2015.
- [82]H. M. Lo, H. Y. Chiu, S. W. Lo, e F. C. Lo, «Effects of micro-nano and non micro-nano MSWI ashes addition on MSW anaerobic digestion», *Bioresour. Technol.*, vol. 114, pp. 90–94, Jun. 2012.
- [83]Z. Milán *et al.*, «Influence of heavy metal supplementation on specific methanogenic activity and microbial communities detected in batch anaerobic digesters», *J. Environ. Sci. Health Part A*, vol. 45, n. 11, pp. 1307–1314, Ago. 2010.
- [84]P. Bajpai, *Biotechnology for pulp and paper processing*. New York: Springer, 2012.

Anexos

Anexo A – Retas de calibração

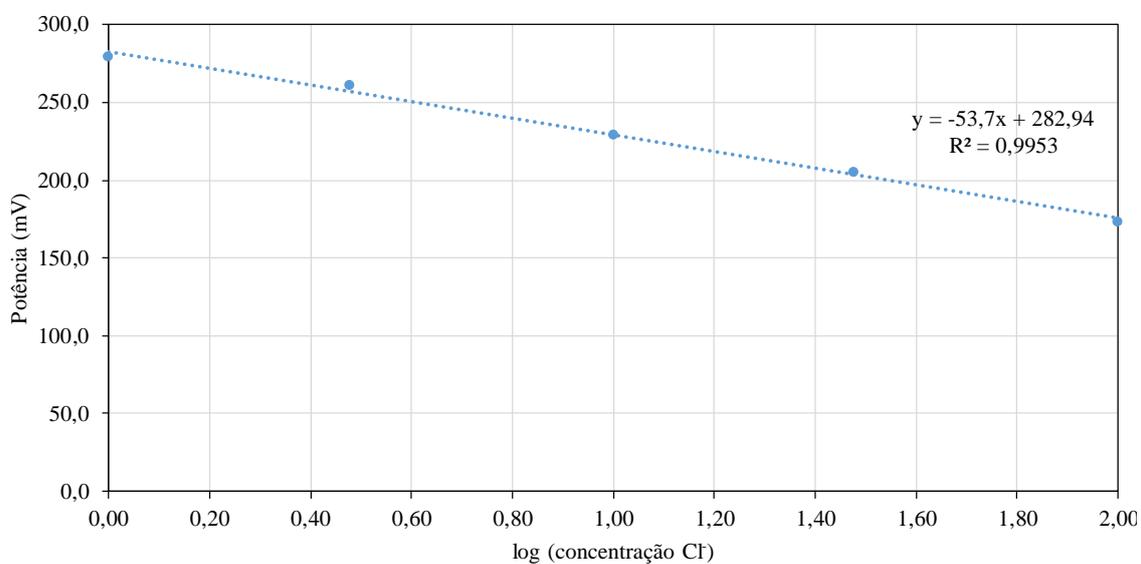
A.1. Reta de calibração de AOV

Tabela A. 1 – Equações das retas de calibração da área do pico (mV) dos cromatogramas em função da concentração dos AOV analisados num cromatógrafo. y corresponde à área do pico em $\mu\text{V}\cdot\text{seg.}$ e x corresponde à concentração do ácido em $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$.

Composto	Reta	R ²
Ácido acético	$y = 946,34 \cdot x$	0,9973
Ácido propiónico	$y = 1504,7 \cdot x$	0,9992
Ácido iso-butírico	$y = 1789,7 \cdot x$	0,9992
Ácido n-butírico	$y = 1841,0 \cdot x$	0,9959
Ácido iso-valérico	$y = 2071,8 \cdot x$	0,9988
Ácido n-valérico	$y = 1920,3 \cdot x$	0,9873
Ácido n-caproico	$y = 1744,5 \cdot x$	0,9746

A.2. Reta de calibração para quantificação de cloretos

Tabela A. 2 – Equação da reta de calibração utilizada para obter a concentração de cloretos através do método do ião seletivo.



A.3. Retas de calibração para absorção atômica

Tabela A. 3– Equações das retas de calibração para determinação das concentrações de íões, em que y corresponde à absorvância obtida na medição de cada padrão com diferentes concentrações de íões (x).

Ião	Reta	R²
Ca	$y = 0,043 \cdot x + 0,009$	0,990
Mg	$y = 1,917 \cdot x - 0,143$	0,974
Na	$y = 1788 \cdot x + 7420$	0,946
Mn	$y = 0,089 \cdot x + 0,014$	0,997
Fe	$y = 0,033 \cdot x + 0,008$	0,989
Si	$y = 0,004 \cdot x + 0,007$	0,999

Anexo B – Biogás produzido nos reatores do primeiro ensaio

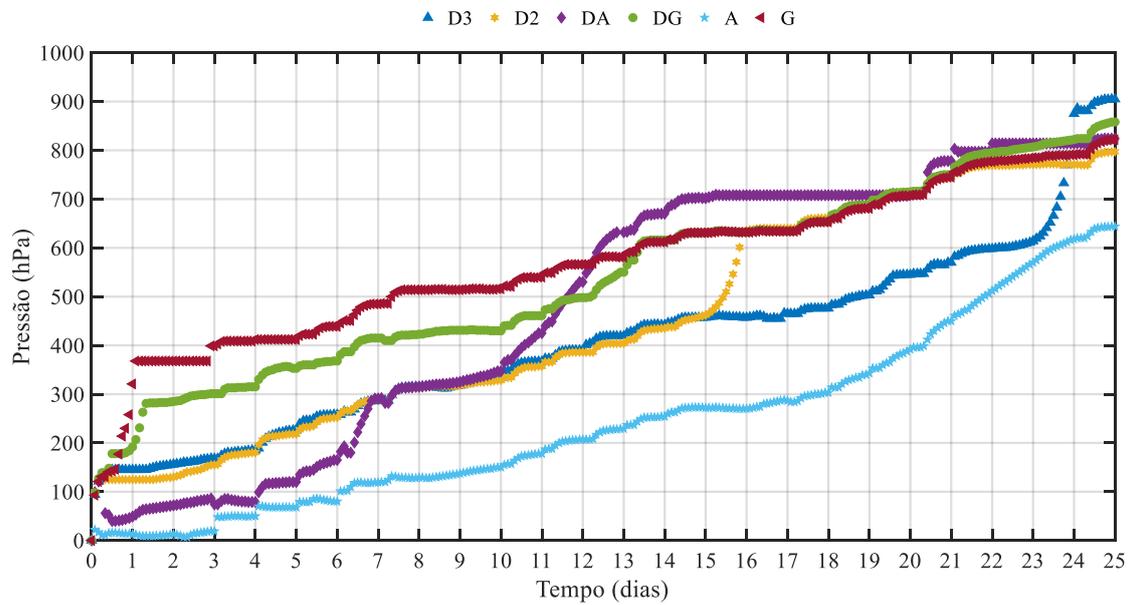


Figura B.1 – Pressões acumuladas ao longo dos 25 dias correspondentes ao primeiro ensaio.

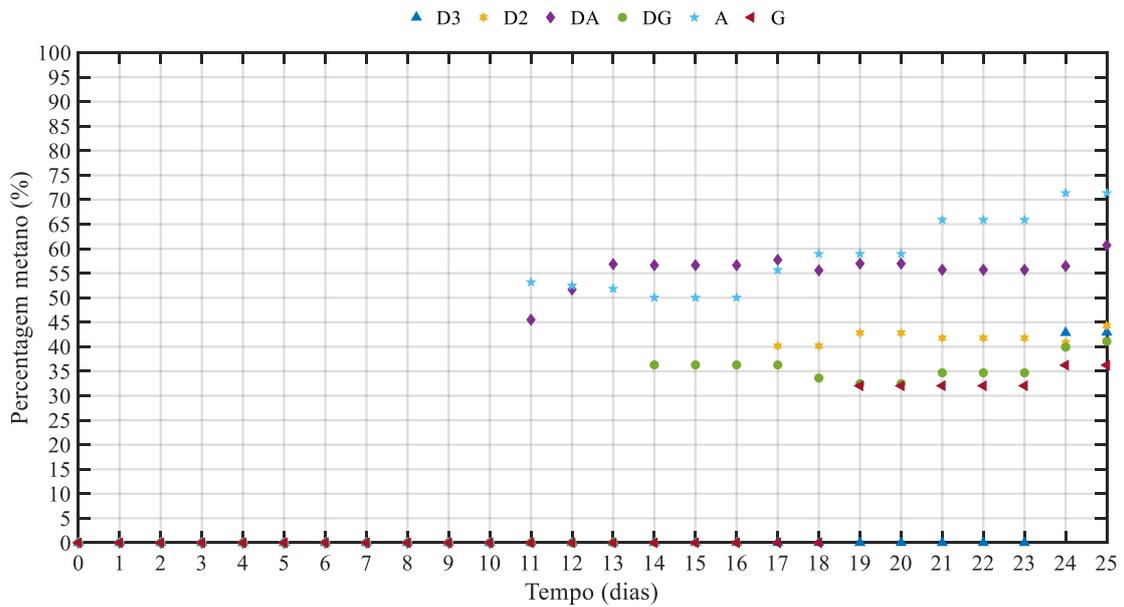


Figura B.2 – Percentagens de CH₄ do primeiro ensaio ao longo dos 25 dias.

Anexo C – Biogás produzido nos reatores do segundo ensaio

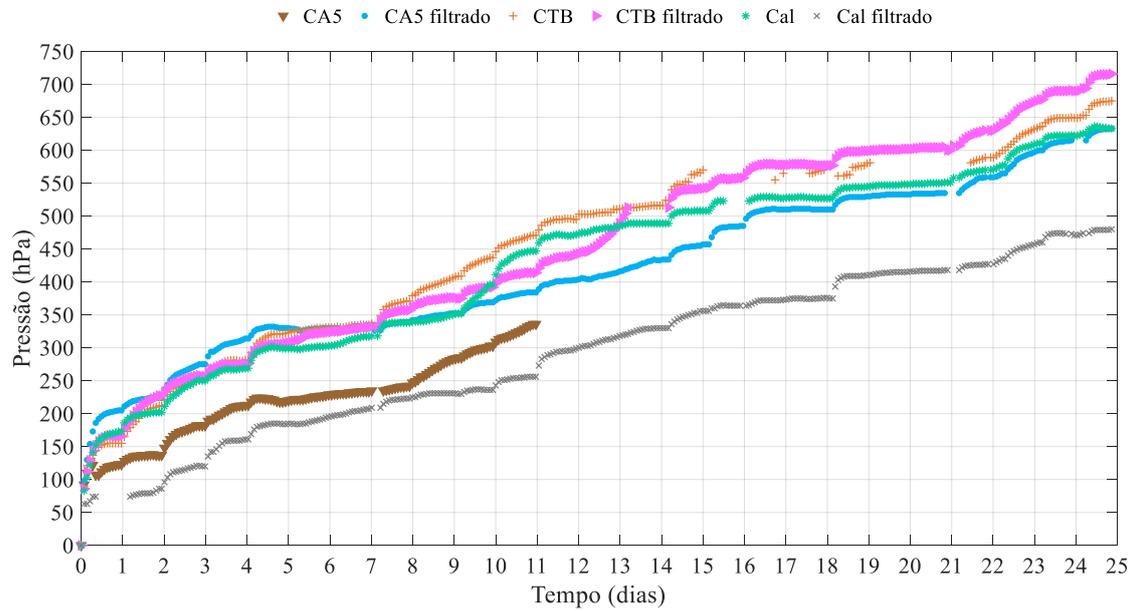


Figura C.1 – Pressões acumuladas durante 25 dias correspondentes ao segundo ensaio.

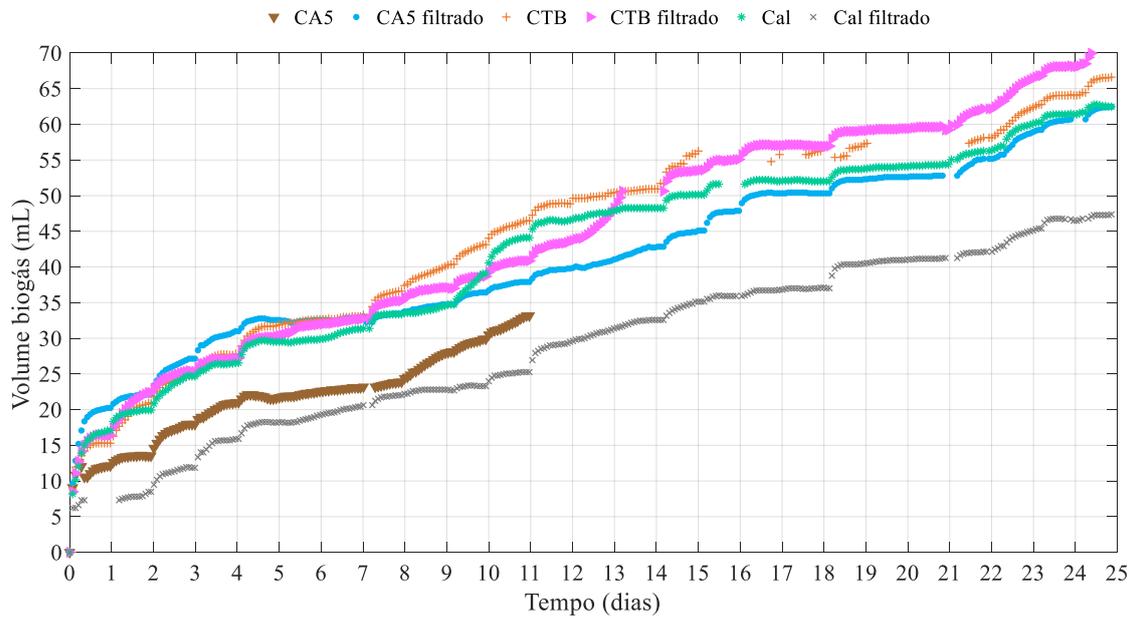


Figura C. 2 – Volume de biogás (em mL) produzido em cada um dos reatores ao longo dos 25 dias.

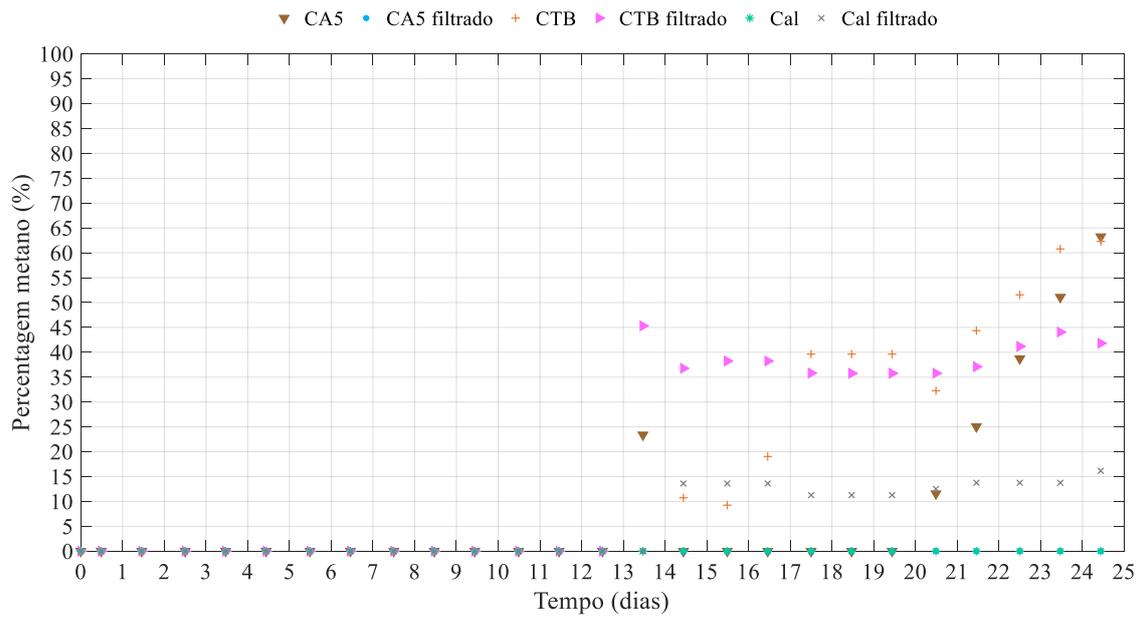


Figura C. 3 – Percentagem de CH₄ produzido em cada um dos reatores ao longo dos 25 dias.

Anexo D – Biogás produzido nos reatores do terceiro ensaio

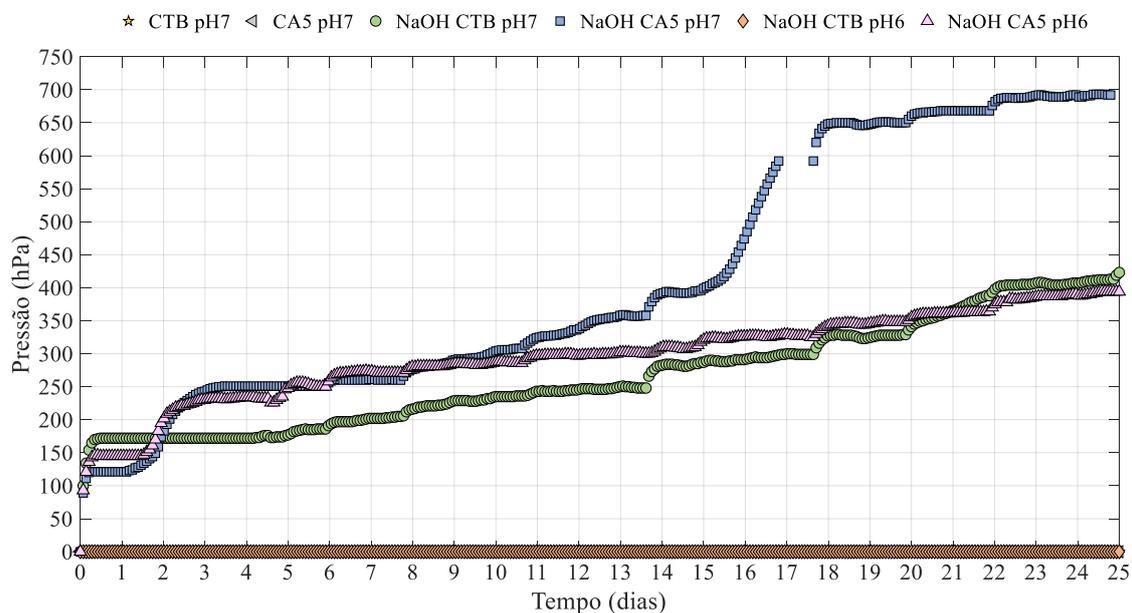


Figura D. 1 – Pressões acumuladas durante 25 dias correspondentes ao terceiro ensaio.

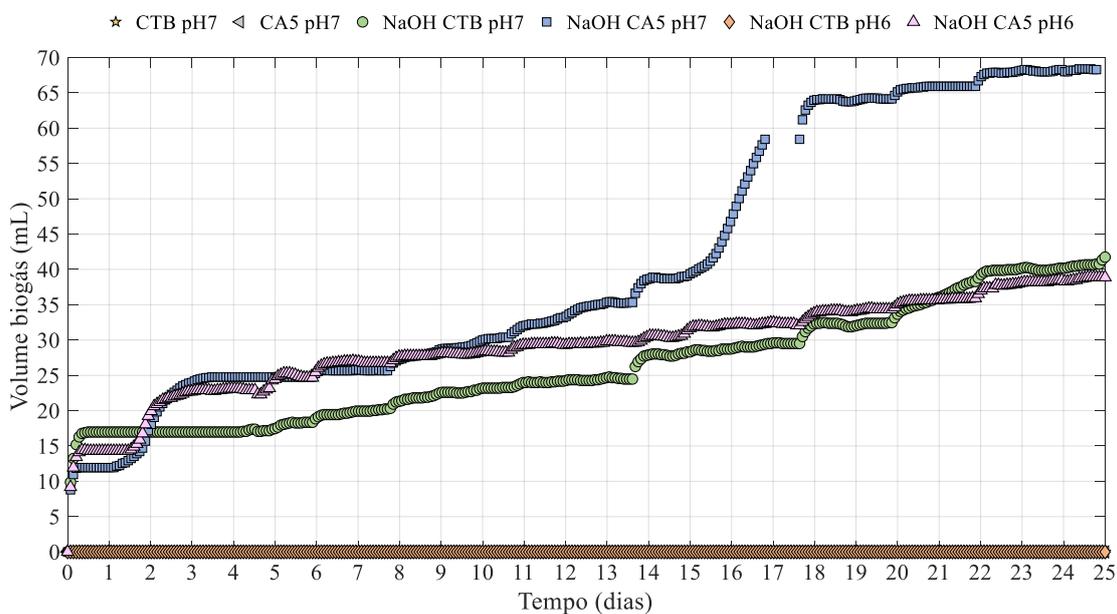


Figura D. 2 – Volume de biogás (em mL) produzido em cada um dos reatores do terceiro ensaio ao longo dos 25 dias.

Anexo E – Macro e micronutrientes presentes no D0

Tabela E. 1 – Macro e micronutrientes presentes no D0, analisados por espectrometria de emissão/absorção atômica.

Elementos	Concentração (ppm)
Ca	74,0
Mg	3,96
Na	480,1
Mn	4,78
Fe	1,15
Al	0,00