



UNIVERSIDADE DA BEIRA INTERIOR
Ciências

Valorização do Bagaço de uva: Avaliação da potencialidade de produção de Biogás

Rui Manuel Caetano Oliveira

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

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

Covilhã, Junho de 2011

Agradecimentos

Agradeço aos meus orientadores, Professor Doutor António Mendonça pela disponibilidade e apoio e à Professora Doutora Isolina Gonçalves pela ajuda ao longo do ano, disponibilidade, apoio, sem si este trabalho não seria concluído.

Aos meus pais por me terem dado a oportunidade de chegar onde estou, por me apoiarem e incentivarem.

Ao Nelson Fernandes por me ter ajudado e estar sempre disponível.

Aos meus amigos da Universidade da Beira Interior pela amizade e ajuda.

Agradeço a todas as pessoas que contribuíram, seja directa ou indirectamente para que este trabalho fosse realizado.

Resumo

O bagaço de uva, um dos subprodutos do processamento de vinho, tem sido considerado uma mais-valia em muitas aplicações biotecnológicas. O presente estudo tem por objectivo investigar a biodegradação do bagaço de uva (GP) sob regime anaeróbio mesófilo, na presença de co-substratos solúveis (glucose ou acetato). O seu potencial de produção de biogás foi também avaliado, para diferentes granulometrias.

Testes de actividade metanogénica específica (*SMA*) foram efectuados com dois tipos de inóculo diferentes e medida em dois pontos da curva cumulativa de biogás, quando a variação da pressão com o tempo alcançou um valor máximo, primeiro no início da reacção (*SMA I*) e depois de um patamar, quando uma nova fase de crescimento não linear foi observada (*SMA II*). Obtiveram-se em geral valores mais elevados de *SMA I* para populações mesofílicas incubadas com GP para um tamanho de partícula, Φ , de 0,40mm e 0,5 g de massa (entre $0,053 \pm 0,001$ e $0,074 \pm 0,011$ L biogás / gSSV·d). A presença de um co-substrato parece aumentar os valores de *SMA I* para $0,091 \pm 0,010$ L biogás / gSSV·d. Os valores de *SMA II* foram em geral mais elevados dos que os obtidos para *SMA I* (para um Φ de 0,40mm e 0,5 g e glucose *SMA II* foi de 0,319 L biogás / gSSV·d) indicando um aumento da actividade metabólica nesta etapa da reacção.

Os resultados da degradação anaeróbia do bagaço foram também seguidos por quantificação do potencial de produção de biogás, CQO, TOC, proteína, lignina polimérica precipitável em meio ácido (APPL), lignina solúvel residual e fenóis. Os valores mais elevados para a produção média de biogás foram obtidos para o bagaço com Φ de 0,40mm e 1 g suplementado com glucose (106,8 mL biogas/g SSV·d).

Dependendo da granulometria do bagaço, da massa, da adição de co-substrato ou do tipo de inóculo, a APPL no licor residual está presente em maior ou menor quantidade (entre $0,107 \pm 0,084$ e $1,311 \pm 0,549$ g/L). O teor de fenol no licor residual foi também mais baixo para o inóculo mesófilas II (variou entre 1,5 e 82,5 mg GAE/L) do que para o mesófilas I (variou entre 17 ± 9 e 350 ± 4 mg GAE/L).

Palavras-chave

Bagaço de uva, biogás, digestão anaeróbia, co-remediação

Abstract

Grape pomace, a by-product of the wine industry, has been shown to be an useful product for many biotechnological applications. This study aims to investigate the anaerobic biodegradation of grape pomace (GP) under anaerobic mesophilic regime, in the presence of a soluble co-substrate (glucose or acetate). The potential of biogas production was also evaluated for several GP granulometries.

Specific methanogenic activity (SMA) tests were performed with two different inocula and measured in two points of the cumulative biogas curve, when the variation of the pressure along the time reached a maximum value, first in the beginning of the reaction (SMA I) and then after a plateau, when a new non-linear grow-phase was observed (SMA II). Higher values of SMA I were in general attained for mesophilic populations incubated with GP and particle size, Φ , of 0,40mm and 0,5 g (ranging from $0,053 \pm 0,001$ to $0,074 \pm 0,011$ Lbiogas / gSSV·d). The presence of a co-substrate seems to enhance these SMA I results for $0,091 \pm 0,010$ Lbiogas / gSSV·d. SMA II values were in general higher than those obtained for SMA I (for Φ of 0,40mm and 0,5 g and glucose SMA II was of $0,319$ Lbiogas / gSSV.d) indicating an enhancing of the metabolic activity at that at this step of the reaction.

Results for anaerobic biodegradation of GP were also followed by quantification of potential biogas production, COD, TOC, protein, acid precipitable polymeric lignin (APPL), residual soluble lignin and phenols. The highest values for the average biogas production was achieved for GP with a Φ of 0,40mm and 1 g supplemented with glucose (106,8 mL biogas/g SSV·d).

Depending on the granulometry of GP, the mass, the addition of a co-substrate or the type of inoculum, APPL in the residual liqueur is present in bigger or smaller amounts (ranged from $0,107 \pm 0,084$ and $1,311 \pm 0,549$ g/L). The residual phenol content was also lower for inoculum mesophils II (ranged from 1,5 to 82,5 mg GAE/L) than for mesophils I (ranged from 17 ± 9 to 350 ± 4 mg GAE/L).

Keywords

Grape pomace, anaerobic digestion, biogás, co-remediation

Índice

1. Introdução	1
2. Processo de degradação anaeróbia	3
2.1 Hidrólise	5
2.2 Acidogénese	5
2.3 Acetogénese	5
2.4 Metanogénese	5
2.5 Actividade metanogénica	6
2.6 Digestão anaeróbia de resíduos de agro-indústrias	6
3. Resíduos de agro-indústria: vinificação	7
3.1 Caracterização dos produtos resultantes da vinificação	7
3.2 Aplicação dos resíduos de vinificação	9
4. Material e Métodos	12
4.1 Bagaço de uva	12
4.2 Inóculo e meio de cultura	12
4.3 Métodos analíticos	13
4.3.1 pH	13
4.3.2 Sólidos	13
4.3.3 Carência química de oxigénio (CQO)	14
4.3.4 Carbono orgânico total (TOC)	14
4.3.5 Proteína	16
4.3.6 Lignina	16
4.3.6.1 Lignina precipitada em meio ácido	17
4.3.6.2 Lignina solúvel após precipitação em meio ácido	19
4.3.7 Compostos Fenólicos Totais	20
4.4 Metodologia Experimental	22
4.4.1 Ensaio de Lixiviação	22
4.4.2 Ensaio de Biodegradação	22
5. Resultados experimentais e discussão	26
5.1 Ensaio preliminares de lixiviação	26
5.2 Biodegradação anaeróbia do bagaço de uva	33
5.3 Degradação da lignina, proteínas e compostos fenólicos	46
6. Conclusão e perspectivas de trabalho futuro	55
Bibliografia	58
Cibergrafia	62

Lista de Figuras

Figura 2.1 - Fluxograma da acção dos grupos de bactérias na digestão anaeróbia da matéria orgânica (Chernicaró,1997).

Figura 3.1 - Esquema sobre vias de valorização de grainha de uva (Nerantzis *and* Tataridis, 2006).

Figura 3.2 - Subprodutos e resíduos da vinificação e seus principais aproveitamentos (Adaptado de Larangeira, 1998).

Figura 4.1 - Esquema representativo das diferentes formas de carbono mensuráveis.

Figura 4.2 - Esquema do procedimento para determinação da lignina.

Figura 4.3 - Curva de calibração obtida pelo método de Folin-Ciocalteu para quantificação de fenóis

Figura 4.4 - Esquema da monitorização efectuada às amostras recolhidas no final dos ensaios de biodegradabilidade

Figura 5.1 - Exemplos de espectros de ultravioleta-visível para amostras de lexiviado: a) Em função do tempo; b) Para $t = 43$ dias e massa idêntica

Figura 5.2 - Evolução do TOC ao longo do tempo: a) Para diferentes granulometrias nas primeiras 2h de ensaio; b) Para diferentes massas e granulometrias idênticas

Figura 5.3 - Evolução do teor de fenóis ao longo do tempo: a) Para diferentes massas e idênticas granulometrias; b) Para diferentes granulometrias e idêntica massa

Figura 5.4 - Exemplo de uma curva experimental de actividade metanogénica, usando-se o sistema OxiTop (Tomé, 2009).

Figura 5.5 - Exemplificação da determinação da SMA em duas zonas distintas da curva de produção de biogás vs tempo obtida na biodegradação anaeróbia de bagaço de uva

Figura 5.6 - Exemplos de curvas de pressão de biogás acumulado ao longo do tempo.

Figura 5.7 - Espectros de UV-visível do sobrenadante das soluções residuais recolhidas no final dos ensaios.

Figura 5.8 - Espectros de UV-visível do sobrenadante das soluções recolhidas após a precipitação da lignina em meio ácido.

Lista de Tabelas

Tabela 1.1 - Composição dos resíduos da vinificação (Costa and Belchior, 1972).

Tabela 3.1 - Composição físico-química do folhelho (Silva, 2003).

Tabela 3.2 - Composição média da grainha (Bernardini, 1971).

Tabela 4.1 - Valores médios e respectivos desvios padrão do teor de ST, STV e proteína no bagaço da uva.

Tabela 4.2 - Comprimento de onda de absorvência máxima e constantes de absorvidade para determinação da lignina consoante o tipo de biomassa usado (adaptada Sluiter et al,2008).

Tabela 4.3 - Granulometria e massa de bagaço de uva usados nos ensaios.

Tabela 5.1 - valores médios e respectivos desvios padrão da quantificação do CQO, TOC e fenóis recolhidos no final dos ensaios de lixiviação.

Tabela 5.2 - valores médios e desvios padrão em amostras recolhidas no final dos ensaios para os seguintes parâmetros: a) SS, SSV, cinzas e proteína; b) Lignina

Tabela 5.3 - Caracterização da biomassa estudada por determinação dos sólidos suspensos totais (SST) e sólidos suspensos voláteis (SSV).

Tabela 5.4 - Valores médios da actividade metanogénica específica (*SMA* - specific methanogenic activity) e respectivos desvios utilizando os inóculos: a) Mesófilas I; b) Mesófilas II

Tabela 5.5 - Quantidade média de biogás produzido (mL biogás/g ssV*d).

Tabela 5.6 - Valores médios e respectivos desvio padrão da CQO: a)Para ensaios com mesófilas I; b) Para ensaios com mesófilas II

Tabela 5.7 - Valores médios e respectivos desvio padrão do TOC: a)Para ensaios com mesófilas I; b) Para ensaios com mesófilas II

Tabela 5.8 - Valores médios e respectivos desvio padrão dos sólidos suspensos - SS, sólidos suspensos voláteis - SSV, cinzas e teor de proteína: a)Para ensaios com mesófilas I; b)Para ensaios com mesófilas II

Tabela 5.9 - Valores médios e respectivos desvio padrão do teor de lignina: a) Para ensaios com mesófilas I; b) Para ensaios com mesófilas II

Tabela 5.10 - Valores médios e respectivos desvio padrão da concentração de fenóis.

Lista de Acrónimos

ABS	Absorvência
APPL	Lignina polimérica precipitável em meio ácido
CQO	Carência química de oxigênio
<i>COD</i>	<i>Chemical oxygen demand</i>
<i>GAE</i>	<i>Gallic acid equivalents</i>
<i>GP</i>	<i>Grape bagasse</i>
IC	Carbono inorgânico total
LPA	Lignina precipitada em meio ácido
LS	Lignina solúvel
<i>NDIR</i>	<i>Non-dispersive infrared</i>
<i>NPOC</i>	<i>Non Purgeable Organic Carbon</i>
<i>POC</i>	<i>Purgeable Organic Carbon</i>
<i>SMA</i>	<i>Specific Methanogenic Activity</i>
SS	Sólidos Suspensos
SSV	Sólidos Suspensos Voláteis
ST	Sólidos Totais
STV	Sólidos Totais Voláteis
TC	<i>Total Carbon</i>
TOC	<i>Total Organic Carbon</i>
UBI	Universidade da Beira Interior
UV	Ultravioleta

1. Introdução

A União Europeia está a promover a produção de energias renováveis. Uma das formas é usar os resíduos das agro-indústrias para produção de electricidade através de digestão anaeróbia, em que o gás formado é transformado em energia mecânica através de um motor de combustão, e em que a energia mecânica é convertida em electricidade (Gómez *et al*, 2010).

Os resíduos gerados na produção de vinho incluem bagaço de uva, borras e sarros. O bagaço de uva é o resíduo que está em maior quantidade, sendo a nível mundial gerados cerca de 7 milhões de toneladas anualmente. Estes resíduos provocam impactos negativos no meio ambiente devido aos baixos valores de pH, ao facto de conterem em substâncias fitotóxicas e substâncias fenólicas (Silva, 2003).

Portugal é um dos países onde o vinho atinge uma expressão económica considerável, com uma produção em 2008/2009 de 5,688,560 hl de vinho ([1]). Assim o aproveitamento dos resíduos vinícolas tornou-se necessário. Para os produtos se poderem reciclar é necessário conhecer a sua constituição. Por cada 100 litros de vinho branco são formados 31,17Kg de resíduos para o vinho tinto e 25Kg para o vinho tinto (Costa *and* Belchior,1972). O bagaço constitui uma elevada fracção do total de resíduos gerados, cerca de 54%, sendo necessário encontrar vias alternativas para a sua valorização.

Tabela 1.1 - Composição dos resíduos da vinificação (Costa *and* Belchior, 1972).

	Vinificação(kg/hL)		Índice médio
	Em branco	Em tinto	
Engaços	4	3	3,5
Bagaço	17	13,5	14,5
Grainha	4	4	4
Borra	6	4,4	4,6
Sarro	0,17	0,10	0,12
Total	31,17	25	26,72

Neste estudo propõe-se, a utilização do bagaço de uva como matéria-prima para a produção de biogás, para que haja uma menor dependência das energias não renováveis e um aproveitamento dos resíduos de uma forma eficaz e rentável. Além disso, esta via alternativa de valorização de resíduos contribui, para a diminuição da poluição do meio ambiente, quer

pela baixa produção de gases com efeito de estufa, quando comparado com a produção de energia através da queima de carvão, quer pela diminuição da poluição nos solos.

Como objectivos específicos analisou-se a influência da massa e da granulometria na biodegradação; anaeróbia do bagaço, tendo-se ainda estudado o efeito da adição de co-substratos solúveis (glucose e acetato) ao meio de fermentação.

2. Processo de degradação anaeróbia

O processo anaeróbio tem sido tradicionalmente utilizado na digestão de lamas purgadas nas estações de tratamento de águas residuais e no tratamento de resíduos agro-pecuários, obtendo-se um biogás para produção de energia (Fantozzi *and* Buratti, 2009)

A digestão anaeróbia é caracterizada por uma série de transformações bioquímicas efectuadas por consórcios de diferentes bactérias estabelecendo-se assim relações sintróficas entre as co-culturas envolvidas. O processo metabólico é influenciado pelo caudal de alimentação, carga orgânica, pH, temperatura, composição e concentração de compostos intermediários. (Fantozzi *et al.*, 2005)

A degradação da matéria orgânica de macromoléculas orgânicas complexas requer a intervenção de vários tipos de microrganismos. Para ocorrer a digestão anaeróbia de proteínas, hidratos de carbono e lípidos são necessárias quatro etapas diferentes: hidrólise, acidogénese, acetogénese e metanogénese (fig. 2.1).

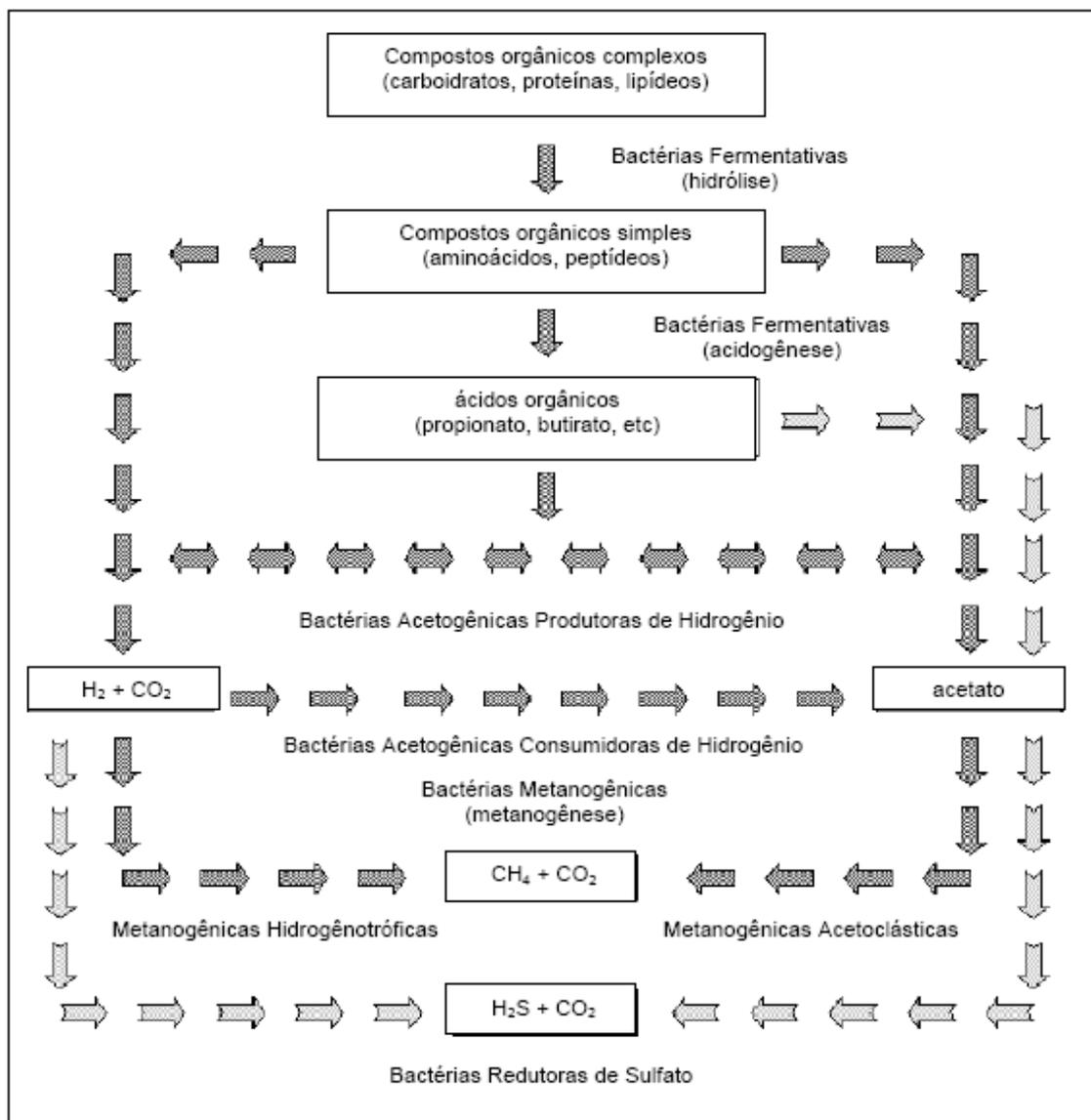


Figura 2.1 - Fluxograma da acção dos grupos de bactérias na digestão anaeróbia da matéria orgânica (Chernicaró,1997).

2.1. Hidrólise

Este processo tem por objectivo transformar a matéria orgânica complexa em compostos orgânicos mais simples, com menor peso molecular, e solúveis. Para este processo ocorrer tem de haver a libertação de exo-enzimas por bactérias hidrolíticas. As proteínas originam aminoácidos, os hidratos de carbono degradam-se em açúcares solúveis e lípidos são convertidos em ácidos gordos de cadeia longa de C (C15 a C17). Para temperaturas inferiores a 20°C a conversão de lípidos é pouco eficiente (O'Rourke, 1968).

2.2. Acidogénese

Os compostos dissolvidos, resultantes da hidrólise, são absorvidos pelas bactérias fermentativas e, após a acidogénese, vão ser excretadas como ácidos gordos voláteis, álcoois, ácido láctico e compostos minerais (CO₂, H₂, NH₃, H₂S, etc.). Um vasto grupo de bactérias consegue realizar a fermentação acidogénica, sendo na maioria bactérias facultativas.

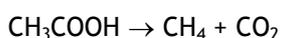
2.3. Acetogénese

Este é o processo em que os produtos da acidogénese são convertidos em acetato, hidrogénio e dióxido de carbono que são os substratos necessários para a produção de metano. Grande parte dos produtos vai ser convertido em ácido acético, enquanto que o restante vai formar hidrogénio ou dióxido de carbono (depende do estado de oxidação do material orgânico que está a ser digerido).

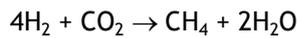
2.4. Metanogénese

Os microrganismos metanogénicos são anaeróbios restritos requerendo para o seu desenvolvimento um potencial redox entre -250 e -300 mv. Pertencem ao reino das Arqueobactérias. Possuem coenzimas e cofactores específicos e degradam apenas um pequeno número de substratos: acetato, metanol, metilaminas, formato, hidrogénio e dióxido de carbono.

A metanogénese é o passo mais lento de todo o processo. Contudo para temperaturas inferiores a 20°C a hidrólise também pode ser limitante (Gujer e Zehnder, 1983). O metano pode ser produzido por duas principais vias, via do acetato ou por via do hidrogénio, de acordo com as seguintes equações:



Por via do acetato as *arquea* metanogénicas acetotróficas reduzem o ácido acético por transferência de electrões interespecies, a metano e dióxido de carbono.



Por via do hidrogénio as *arquea* metanogénicas hidrogenotróficas consomem hidrogénio na redução do dióxido de carbono.

As *arquea* acetotróficas crescem mais lentamente do que as *arquea* hidrogenotróficas, assim limitam a formação de biogás a partir do material orgânico complexo.

Pode-se dizer que existem quatro principais grupos de microrganismos envolvidos no metabolismo num digestor anaeróbio. Três desses exercem a fermentação ácida, enquanto que apenas um grupo exerce a fermentação metanogénica. (Campos, 1999; Chernicharo, 2007)

2.5 Actividade metanogénica

A actividade metanogénica é importante nos processos anaeróbios. É medida e controlada através da *SMA* (*Specific Methanogenic Activity*). Desenvolveram-se muitas técnicas para a determinação do *SMA*. Contudo, neste trabalho experimental o *SMA* foi calculado a partir dos dados obtidos através de *OxiTop OC 110*. Este teste baseia-se em medir o metano que foi acumulado ao longo do tempo durante a incubação da biomassa. (Angelidaki *et al.*, 1990; Ince O *et al.*, 1994).

Os testes de *SMA* são uma ferramenta importante na caracterização da actividade bioquímica dos organismos anaeróbios presentes. Inicialmente era usada para verificar se o inóculo se adaptava as lamas. Actualmente servem para verificar se existem compostos potencialmente inibitórios (Harada *et al.*, 1994; Perle *et al.*, 1995), monitorizar a composição da biomassa (Mohammad and Vinod, 1999) e estabelecer a quantidade máxima que se deve usar de lamas (Sirirote and Watts, 2007).

2.6 Degradação anaeróbia de resíduos de agro-indústrias

Os resíduos das agro-indústrias são os resíduos do processamento e crescimento, tais como, árvores, frutos, entre outros. Com a produção intensiva estes resíduos, tornaram-se um problema ambiental. Por isto, saber a composição de cada resíduo tornou-se um factor importante. Esses resíduos podem conter hidratos de carbono, celulose, lignina, hemicelulose e amido (Detroy R. and Hesseltine, 1978).

Para diminuir os resíduos, escassez de recursos não-renováveis e uma grande necessidade energética, a produção de biogás através da digestão anaeróbia de resíduos agro-industriais é um processo a ter em conta, visto que, os resíduos são ricos em substâncias biodegradáveis por bactérias anaeróbias (Pompermayerl and Júnior, 2003).

3. Resíduos de agro-indústria: vinificação

Actualmente tornou-se possível aproveitar os produtos da vinificação. A partir destes resíduos podem-se obter muitos outros produtos com um potencial elevado de valorização no mercado. (Spangheroa *et al*, 2009) Simplificando, os produtos resultantes da vinificação são o bagaço, borras e sarro.

3.1 Caracterização dos produtos resultantes da vinificação

Bagaço de uva - O bagaço de uva é o resultado da prensagem das uvas. Existem dois tipos de bagaço, o que não foi fermentado no mosto que é chamado de bagaço fresco e o que foi fermentado no mosto que é chamado de bagaço fermentado. O bagaço contém uma grande quantidade de água (60 a 70%), contudo o resto dos componentes é variável devido ao tipo de uva, à localização das vinhas e até o modo de produção do próprio vinho. De uma forma geral o bagaço contém álcoois, celulose, sais minerais, proteínas, polifenóis e taninos. De todos os resíduos da vinificação o bagaço de uva é o que está presente em maior quantidade (cerca de 54%). É constituído pela casca, engaço e semente (Silva, 2003; Pato, 1988; Rice, 1976; Famuyiwa *and* Ough, 1982; Costa *and* Belchior, 1972).

Engaço - São apenas 3,5 a 4,5% dos resíduos da vinificação. De todos os resíduos estes são os mais pobres. São constituídos por 50% de água e por 30 a 40% de celulose, contêm em menor quantidade lignina e matéria tartárica em pequena quantidade (Silva, 2003)

Folhelho - O folhelho é constituído pelos restos da desidratação e após a separação dos engaços e grainhas. Cerca de 40 a 50% do bagaço fresco é folhelho. Na tabela 3.1 está indicada a composição do folhelho (Silva, 2003)

Tabela 3.1 - Composição físico-química do folhelho (Silva, 2003)

Análise (valor recomendado)	Composição
Humidade (< 13%)	2 – 10%
Matérias minerais	2,7 – 8,9%
Matérias gordas	5,2 – 7,8%
Proteínas (> 11%)	10,0 – 15,6%
Celulose (< 22%)	20,0 – 27,0%
Taninos	0,2 – 0,6%
Matérias azotadas digeríveis	3,3 – 3,9%

Grainha- Constitui cerca de 20 a 25% do bagaço húmido e cerca de 40% do bagaço prensado e desengaçado. Na sua composição apresenta uma elevada percentagem de celulose e substâncias gordas (tabela 3.2) (Silva, 2003)

Tabela 3.2 - Composição média da grainha (Bernardini, 1971)

<i>Parâmetros</i>	<i>Percentagem</i>
Humidade	7-9
Substâncias gordas	14-20
Pentoses	9-12
Tanino	4-4,5
Celulose	30-33
Substâncias azotadas	9-10
Cinzas	2,5-4

Borras- É o resíduo que fica precipitado nos recipientes que contém vinho após a fermentação ou armazenagem. A quantidade de borra formada depende do estado de maturação das uvas, do seu estado higiénico no momento da vindima, entre outros factores, como por exemplo o clima e a técnica usada na vinificação (Regulamento (CE) n.º 1493/1999).

Em termos da sua composição, podem considerar-se as borras um produto valioso. São constituídas principalmente por vinho, contêm substâncias tartáricas e podem conter vestígios de bagaço de uva (Pato, 1988).

Sarros- São resíduos de vinhos que se acumulam nas paredes dos recipientes. Normalmente, contêm principalmente bitartarato de potássio e em menor quantidade tartarato de cálcio (Silva, 2003).

3.2 Aplicação dos resíduos de vinificação

Bagaço de uva - Devido ao seu valor nutritivo ser baixo o seu uso em matérias primárias, tais como, alimentação de ruminantes ou usado como fertilizante não é muito aconselhável. Se for usado directamente como fertilizante, sem nenhum tratamento prévio, o pH do solo diminui, o que afecta a produtividade agrícola dos solos. Na alimentação, como as sementes contém compostos fenólicos e antocianinas que acarretam complicações no processo de fermentação dos ruminantes o seu uso deve ser evitado. Outra desvantagem é o facto do bagaço conter fibras (lignina) que não conseguem ser digeridas (Spanghero, 2009; Silva, 2003). Para além destas, podem apontar-se outras aplicações, nomeadamente como matéria-prima para a produção de energia ou na produção de produtos de valor acrescentado.

Casca - A casca de uva pode ser usada nas indústrias farmacêuticas na produção de antocianinas e antociadinas, que são inibidoras da lipoperoxidação e anti-mutagénicas.

Sementes/ grainhas - Contém uma grande quantidade de óleos essenciais, que podem ser usados em várias indústrias tais como químicas, cosméticas e farmacêuticas. Por exemplo: os taninos podem ser usados na indústria farmacêutica (antídotos, anti-sépticos, entre outros) (figura 3.1) (Magnier, 1991).

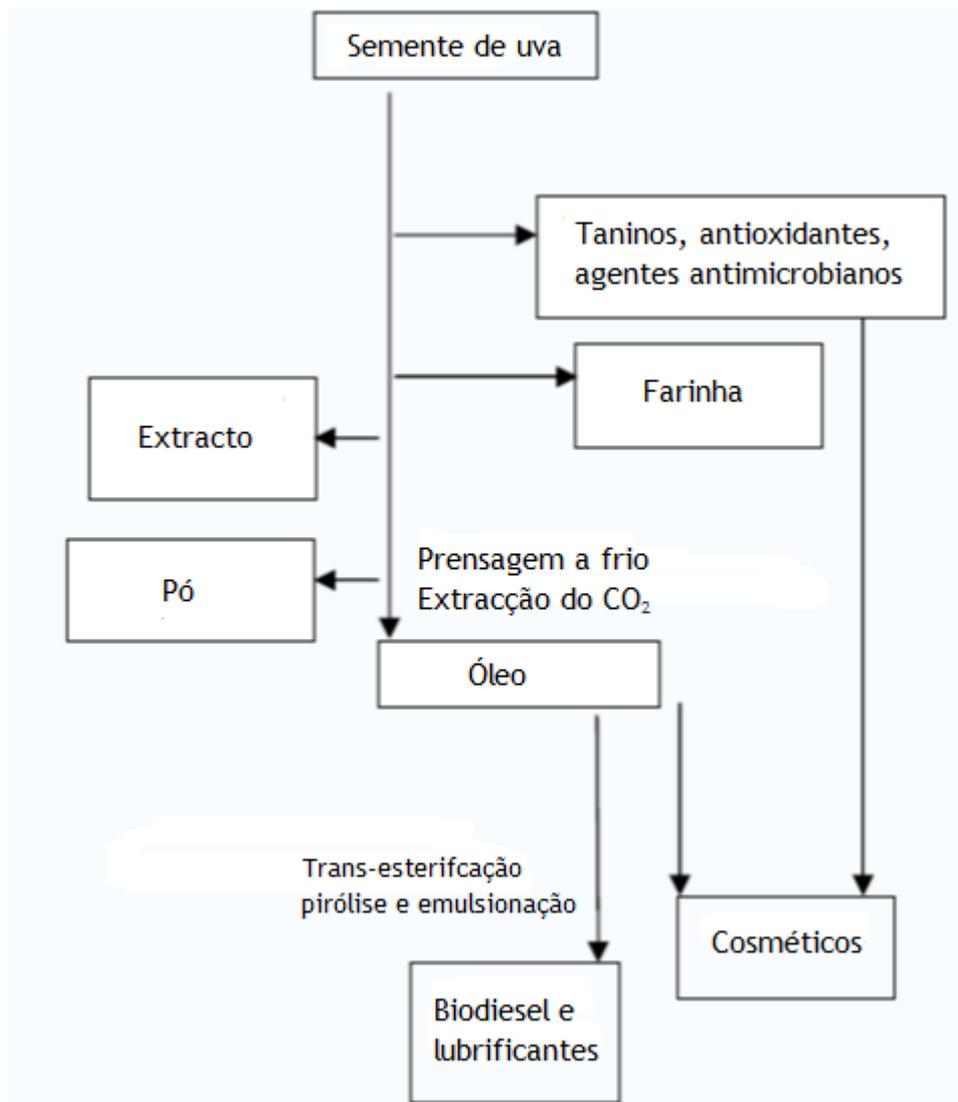


Figura 3.1 - Esquema sobre vias de valorização de grinha de uva (Nerantzis *and* Tataridis, 2006).

Engaço - Têm aplicação na indústria do papel, como combustível, ou incorporado em materiais de construção civil. Devido a ser constituído por uma grande quantidade de material celulósico, podem ser usados para a obtenção de proteínas vegetais (Silva, 2003).

Borras - podem ser usadas para a obtenção de álcool etílico, na extração de ácido tartárico de leveduras e matéria corante (Mateos *and* Narvion, 1977).

Sarros - Podem ser usados para a produção de ácido tartárico (Larangeira, 1998).

A partir das águas residuais das destilarias de álcool pode-se produzir biogás de uma forma sustentável, através da digestão anaeróbica com termófilo. (Vlissidis *and* Zouboulis, 1992).

A figura 3.2 explica de uma forma resumida como podem ser aproveitados os resíduos do bagaço (Larangeira, 1998):

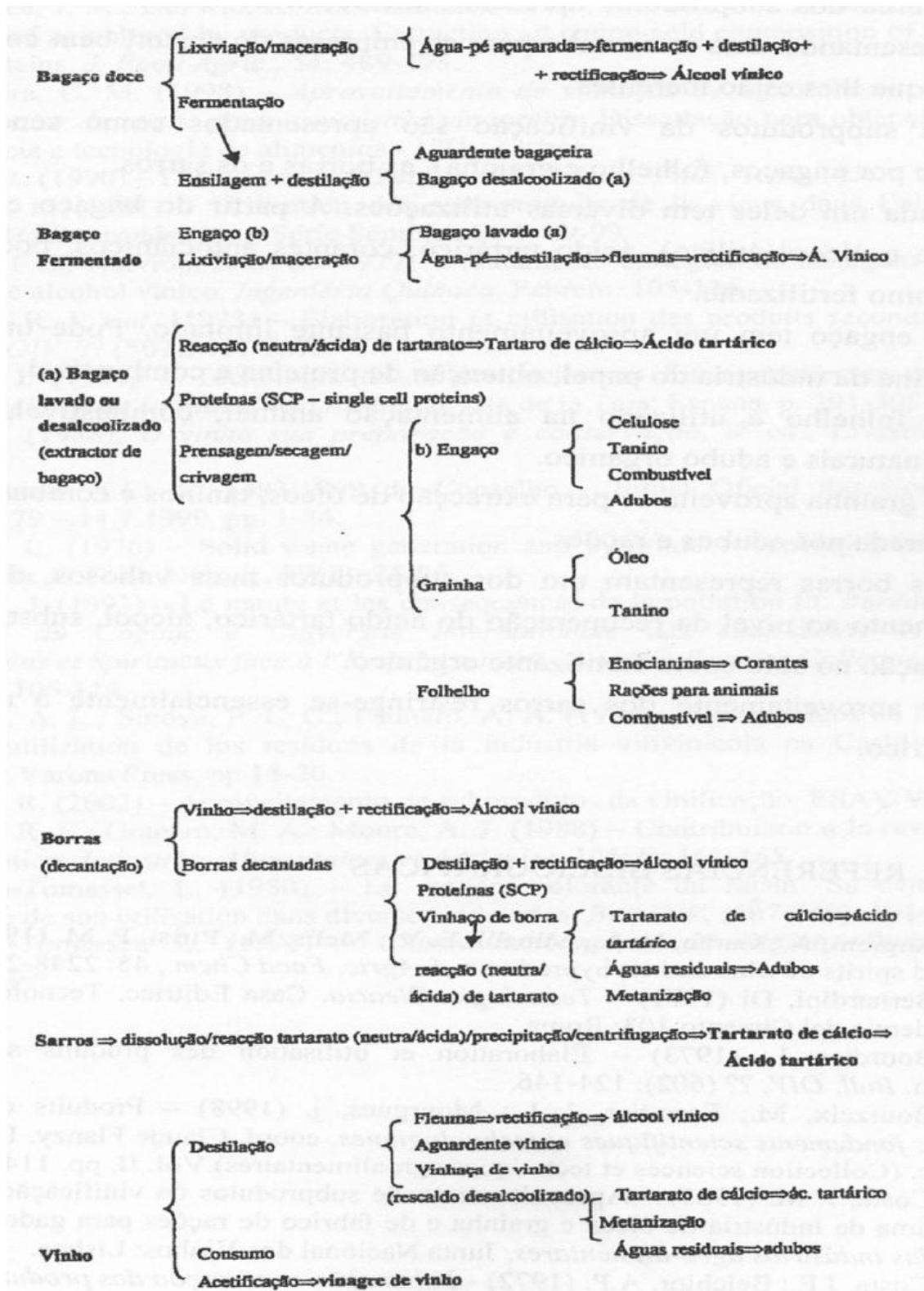


Figura 3.2 - Subprodutos e resíduos da vinificação e seus principais aproveitamentos (Adaptado de Larangeira, 1998).

4. Material e Métodos

4.1 Bagaço de uva

O bagaço utilizado nos ensaios é um subproduto da indústria vitivinícola, para produção de vinho tinto, característico de uvas de castas de Trincadeira, Rufete e Tinta Roriz da região da Beira Interior. O bagaço foi obtido após fermentação e prensagem. O bagaço de uva para poder ser usado nos ensaios, devido à humidade do produto, teve de ser seco numa estufa a 47°C durante 24h de forma a obter um peso constante. Seguidamente, foi moído num moinho RetschMühle SM1 com um molde de 2,0 mm. Foi peneirado durante 1h com crivos com uma abertura de malha de 0,25 e 0,4 mm para se obter um produto com características uniformes. Foi armazenado em sacos de plástico selados para não haver entrada de humidade.

O bagaço foi caracterizado em laboratório, estando as principais características apresentadas na tabela 4.1

Tabela 4.1 - Valores médios e respectivos desvios padrão do teor de ST, STV e proteína no bagaço da uva. Os valores entre parênteses correspondem ao número de réplicas (n).

Parâmetros Bagaço de uva (Ø vs massa)	ST (g/g bagaço)	STV (g/g bagaço)	Proteínas (mg N-NH ₃ / g)
0,40mm vs 1g	0,922 ±0,009 (3)	0,854±0,008 (3)	-
0,40mm vs 0,50g	0,880±0,050 (2)	0,869±0,050 (2)	15,2 (1)
0,25mm vs 1g	1,000 ±0,040 (3)	0,820±0,010 (3)	-
0,25mm vs 0,50g	0,934±0,006 (3)	0,845±0,006 (3)	18,4 (1)
<0,25mm vs 1g	0,937±0,005 (3)	0,800±0,030 (3)	-
<0,25mm vs 0,50g	0,950±0,005 (3)	0,810±0,010 (3)	17,1 (1)

4.2 Inóculo e meio de cultura

Os inóculos (lamas mistas), usados nos ensaios anaeróbios, foram desenvolvidos em dois reactores descontínuos sem agitação, em condições mesófilas (37 ± 3°C).

Foram alimentados, por substituição do sobrenadante por alimentação fresca, de forma descontínua em intervalos de 24h. O inóculo I foi desenvolvido em laboratório usando glucose

como fonte de carbono. O inóculo II foi recolhido numa estação de tratamento de águas residuais da região, tendo sido cultivado com glucose apenas durante dois meses.

A glucose (substrato) foi dissolvida num meio de cultura que continha nutrientes essenciais para o desenvolvimento de populações anaeróbias mistas. O meio de cultura utilizado encontra-se descrito por Tomé, 2009 e Lettinga *et al*,1997. Para neutralizar e tamponizar o meio de cultura utilizou-se um tampão de fosfato constituído por Na_2HPO_4 (1,28g/L) e NaH_2PO_4 (0,42g/L).

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

4.3 Métodos analíticos

4.3.1 pH

Para medir o pH usou-se pH Methrom 744. Verificou-se o pH dos ensaios com o objectivo de verificar a capacidade tampão da solução de fosfato. O pH foi medido antes e após dos ensaios experimentais.

4.3.2 Sólidos

A determinação dos sólidos suspensos (SS) e sólidos suspensos voláteis (SSV), foi realizada de acordo com as normas descritas no Standard Methods 2005 (APHA,AWWA 2005).

Para os SS, filtrou-se a vácuo, com membranas Whatmann GF/C de 1,0 μm , um determinado volume de amostra e os sólidos retidos na membrana foram secos numa estufa a $103\pm 2^\circ\text{C}$ aproximadamente 24h.

SS= peso da membrana com a amostra (após secar na estufa e arrefecer) - peso da membrana

Para os SSV, continuou-se o procedimento realizado para os SS em que a membrana e os sólidos contidos nela foram colocados na mufla a $500\pm 10^\circ\text{C}$ durante 24 h, arrefecido e pesado até se obter peso constante. Os SSV foram calculados pela diferença de peso depois e antes da ignição na mufla.

4.3.3 Carência química de oxigênio (CQO)

A determinação da CQO foi feita pelo método da oxidação em refluxo fechado, num digestor com dicromato, por titulação do dicromato que fica por reagir, após a digestão do material orgânico. A digestão das amostras foi feita em H_2SO_4 , durante 2 h, a $148\pm 2^\circ C$. Nestas condições, a matéria orgânica é oxidada a CO_2 e água. Usou-se sulfato de mercúrio, que é adicionado à solução padrão de dicromato (solução I), este passo serve para evitar a interferência dos cloretos. O sulfato de prata, usado como catalisador da oxidação dos álcoois e ácidos de cadeia longa, foi adicionado à solução de H_2SO_4 concentrada (solução II). Para 1,5 ml de amostra adiciona-se 1 ml de solução I e 2 ml de solução II. O excesso de dicromato foi titulado com uma solução de sulfato ferroso amoniacal, usando-se como indicador uma solução aquosa de ferroína.

A CQO foi determinada na fase solúvel das amostras. As amostras recolhidas no final dos testes foram previamente centrifugadas a 4000 rpm durante 10 minutos a fim de separar a matéria em suspensão e acidificadas para um pH de $2\pm 0,5$.

4.3.4 Carbono orgânico total (TOC)

A quantificação do carbono orgânico total foi feita através do TOC-Vcsh Shimadzer. Este aparelho permite quantificar, para além do carbono orgânico total (*OC* ou *TOC*), o carbono inorgânico total (*IC* ou *TIC*). O princípio de funcionamento consiste numa reacção catalítica, a $680^\circ C$, de oxidação e detecção em infra-vermelho.

Numa amostra podem existir dois tipos de carbono: o carbono orgânico e o carbono inorgânico. O carbono orgânico (*OC* ou *TOC*) liga-se com o hidrogénio ou com o oxigénio para formar compostos orgânicos, enquanto que, o carbono inorgânico (*IC* ou *TIC*) é a base estrutural de compostos inorgânicos como os iões carbonato.

A relação entre eles é expressa por $TOC = TC - TIC$.

Para a análise do *TC* a amostra é introduzida no tubo de combustão, que contém um catalisador de oxidação, e aquecido a $680^\circ C$. A amostra é queimada no tubo de combustão e, como resultado, os compostos do *TC* são convertidos em CO_2 . O gás transporta os produtos de combustão através de um *halogen scrubber* para remover o cloro e outros halogéneos. Finalmente, o gás transportador entrega os produtos de combustão da amostra à célula de *NDIR* (*non-dispersive infrared*), onde o CO_2 é detectado. O *NDIR* dá um sinal analógico que forma um pico. A área desse pico é proporcional à concentração da amostra. A quantificação do *TIC* por *TOC* consiste no carbono contido nos carbonatos e no dióxido de carbono dissolvido na água. Por acidificação da amostra com uma pequena quantidade de HCl, para um pH

inferior a 3, todos os carbonatos são convertidos em CO_2 . O CO_2 dissolvido na amostra é arrastado ao borbulhar N_2 é detectado por *NDIR*.

O *TOC* pode ser medido como sendo a diferença entre o *TC* e *IC*. Este método não é recomendado para amostras contendo mais *IC* do que *TOC*, ou seja, a amostra em que o *TC* é praticamente só *IC* o método *NPOC* é o mais recomendado. O valor de *TOC* usando o método *TC-IC* inclui erros associados à medida do *TC* e do *IC* o que pode resultar em um maior valor de *TOC*.

Nomenclatura e caracterização

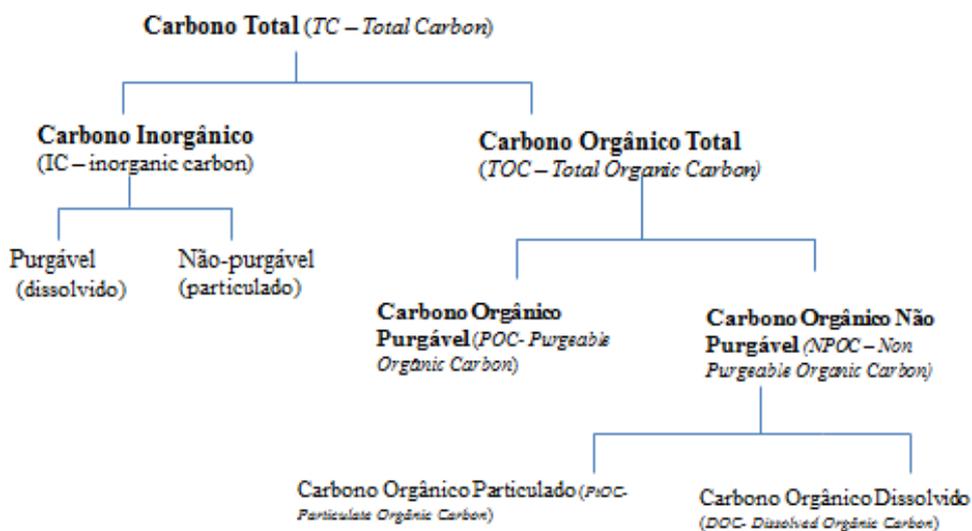


Figura 4.1 - Esquema representativo das diferentes formas de carbono mensuráveis

O método *NPOC* é o método mais usado para quantificar o *TOC*. Este método não é recomendado para amostras que tendem a formar bolhas durante o borbulhamento. A formação de bolhas leva a uma menor injeção de amostra o que se vai traduzir em erros na quantificação do *TOC*. O método mais recomendado neste caso é *TC-IC*.

O método *POC+NPOC* deve ser usado quando a quantidade de *POC* presente na amostra não pode ser desprezada (Manual do aparelho Shimadzu).

4.3.5 Proteína

O teor de proteína foi calculado a partir da determinação do azoto de Kjeldahl. Para se obter o teor de proteína deve multiplicar-se o azoto de Kjeldahl por um factor, k_p , o qual varia em função do tipo de proteína. Para as bactérias e *arquea* anaeróbias utilizou-se um factor de Kjeldahl (k_p) de 4,2 g-proteína/g-N-NH₃ (Schmidt *et al*, 1994) e para o bagaço foi de 6,25 g-proteína/g-N-NH₃ (Briggs, 1998).

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

Este método consiste numa mineralização dos compostos orgânicos contidos na amostra, com formação de sulfato de amónio NH₄HSO₄, após o que se procede à libertação de amoníaco, por destilação, sendo fixado numa solução de ácido bórico e indicadores, realizando-se então uma titulação com ácido sulfúrico que permite obter o valor de azoto presente na amostra.

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

A formação do amoníaco a partir do hidrogenossulfato de amónio consegue-se por adição de base concentrada em quantidade suficiente para elevar o pH a valores iguais ou superiores a 11, realizando-se de seguida a destilação. O destilado, contendo o amoníaco, é recolhido numa solução indicadora de ácido bórico, sendo fixado pelo ácido.

A concentração da amónia foi então determinada por titulação com ácido sulfúrico, de um modo indirecto, pois na prática o ácido mede a quantidade de ião borato presente na solução. O teor de proteína expresso em mg NH₃-N/L.

4.3.6 Lignina

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

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

$$\text{Lignina total} = \text{lignina solúvel} + \text{lignina precipitada em meio ácido} \quad (4.2)$$

4.3.6.1 Lignina precipitada em meio ácido

Para a determinação da lignina precipitada em meio ácido (LPA), inicialmente foi adicionado à H_2SO_4 concentrado até pH 2.5 para levar à precipitação da lignina, deixando-se posteriormente decantar durante 24h.

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

Para a quantificação gravimétrica (determinação de SS, SSV e cinzas) filtrou-se a solução I e procedeu-se como o já descrito na secção 4.3.2 guardando-se o filtrado para posterior análise da lignina solúvel.

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

Na figura 4.2 representa-se, numa forma esquemática, os passos seguidos para determinação da lignina.

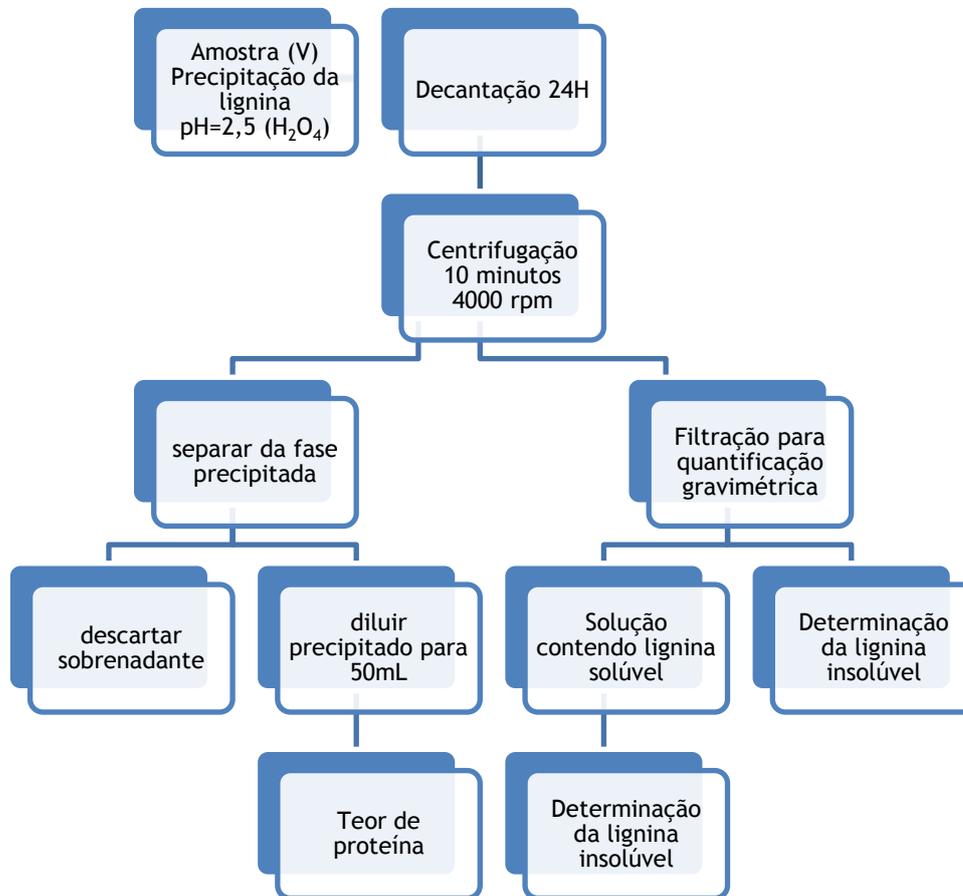


Figura 4.2: Esquema do procedimento para determinação da lignina.

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

$$\text{LPA (g/L)} = \text{Teor de SSV no precipitado da centrifugação (teor de SSV)(g/L)} - \text{teor de proteínas(g/L)} \quad (4.3)$$

A percentagem de LPA pode ser calculada da seguinte maneira:

$$\% L = \frac{\text{teor de LPA}}{\text{SS}} \times 100 \quad (4.4)$$

4.3.6.2 Lignina solúvel após precipitação em meio ácido

A determinação da lignina solúvel (LS) foi feita por espectrofotometria de UV- Visível da solução filtrada (fig. 4.2). A absorvência foi medida ao comprimento de onda de máxima absorção, seleccionado para este tipo de lignina. Usou-se água destilada como branco (tabela 4.2). Esta etapa deve ser efectuada logo após a recolha da amostra a fim de se evitar a hidrólise de compostos que poderão afectar a quantificação da lignina.

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

$$[LS](g/L) = \frac{Abs \times V_{filtrado} \times Diluição}{\epsilon} \quad (4.5)$$

em que:

LS -lignina solúvel que permanece após acidificação do meio (g/L);

Abs - absorvência da amostra para o comprimento de onda de absorção máxima

V - Volume de filtrado (ml)

ϵ - Absortividade da biomassa a um comprimento de onda específico (nm)

Tabela 4.2 :Comprimento de onda de absorvência máxima e constantes de absortividade para determinação da lignina consoante o tipo de biomassa usado (adaptada Sluiter *et al*,2008).

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

NREL - National Renewable Energy Laboratory

4.3.7 Compostos Fenólicos Totais

A quantificação de compostos fenólicos totais pelo método de Folin-Ciocalteu (FC), envolve a oxidação de fenóis em meio básico, pelo reagente de cor amarela Folin-Ciocalteu e foi efectuado pelo método descrito por Fernandes, 2010. Este reagente é a mistura dos ácidos fosfomolibdico ($H_3PMo_{12}O_{40}$) e fosfotúngstico ($H_3W_{12}O_{40}$). Da reacção de oxidação resulta um composto de cor azul (molibdotungstosfato), cuja absorção máxima é dada em função da composição quantitativa de compostos fenólicos, e do pH da solução obtido geralmente pela adição de carbonato de sódio (Cicco et al., 2009; Ikawa et al., 2003). Este método baseia-se na transferência de electrões do composto antioxidante para o agente oxidante, que neste caso é o reagente de Folin-Ciocalteu, e o aumento de absorvência é medido a 750nm (Magalhães et al., 2007).

Neste método, pode haver interferências visto que outras substâncias podem reagir com o FC. Por exemplo, aminas alifáticas terciárias, dióxido de enxofre, alguns aminoácidos, ácido ascórbico, açúcar, Fe (II) entre outros (Torre-carbot et al., 2005; Magalhães et al., 2006; Ikawa et al., 2003; Remón et al., 2009; Roginsky et al., 2005).

As variações do método são devidas à concentração de carbonato de sódio, à sequência de adição de reagentes, bem como o tempo de adição dos mesmos, o tempo e temperatura de incubação da mistura. Podem existir solventes na amostra que possam interferir com o método FC, nomeadamente na formação do composto de cor azul. Assim, a preparação de padrões e brancos com o mesmo solvente da amostra minimizam a interferência do método (Cicco et al., 2009).

Geralmente, a solução de ácido gálico dissolvido em água, é usado como solução padrão e os resultados são apresentados em equivalentes de ácido gálico (*GAE- gallic acid equivalents*) (Magalhães et al., 2007; Turkmen et al., 2006; Roginsky et al., 2005).

Uma vantagem deste método é a sua sensibilidade uma vez que existe a formação de um produto corado, e não precisa de uma padronização restrita das condições do ensaio (Roginsky et al., 2005)

Para se efectuar a curva de calibração (Figura 4.3) pipetou-se 0; 10; 20; 40; 120; 160; e 200 μ L da solução de ácido gálico (5g/L), para diferentes balões, perfazendo-se o volume final de 10mL com água destilada. De cada solução pipetou-se 400 μ L, adicionou-se 2000 μ L de reagente de Folin-Ciocalteu (1:10), passados 8 minutos adicionou-se 1600 μ L de carbonato de sódio 7,5%. Agitaram-se os tubos de ensaio e deixaram-se a incubar durante 90 minutos a temperatura ambiente até a solução adquirir uma cor azul. Leu-se a absorvência a 765nm, considerando que o branco da solução contém 0 μ L de ácido gálico.

Obteve-se a seguinte curva de calibração:

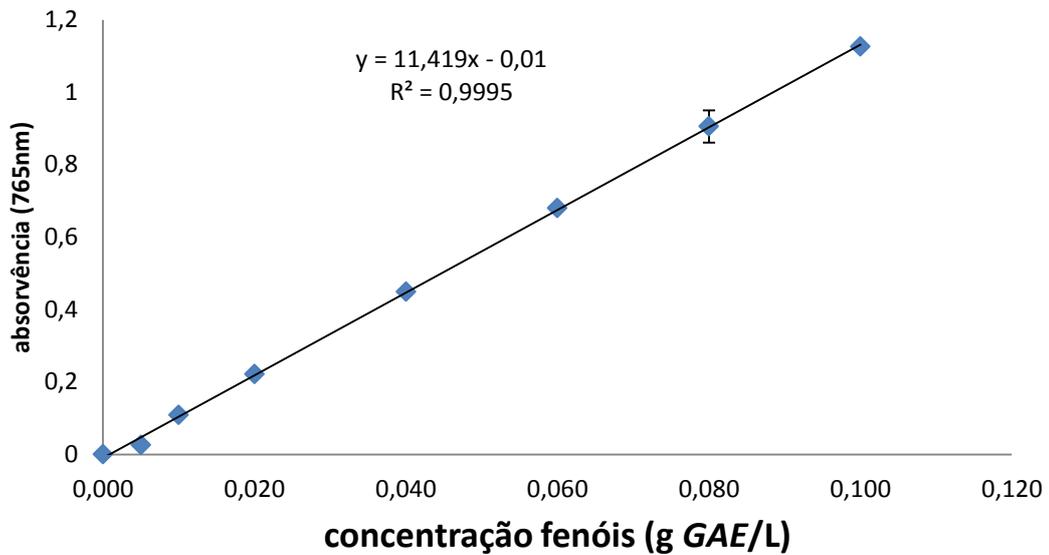


Figura 4.3: Curva de calibração obtida pelo método de Folin-Ciocalteu para quantificação de fenóis

Para a análise das amostras pipetou-se, para cada tubo de ensaio, 400 μ L de amostra, 2000 μ L de reagente de Folin-Ciocalteu (1:10) esperou-se 8 minutos, de seguida adicionou-se 1600 μ L de carbonato de sódio 7,5%. Agitaram-se os tubos e incubaram-se 90 minutos até a solução adquirir uma cor azul. Leu-se a absorvência das amostras a 765nm. Em vez da amostra usou-se como branco 400 μ L de água destilada.

4.4 Metodologia Experimental

4.4.1 Ensaio de Lixiviação

A lixiviação é um processo de dissolução ou arrastamento de uma substância solúvel presente numa fase solúvel de outra insolúvel, para uma fase aquosa.

No início do ensaio, colocou-se em cada frasco de incubação 25 ml meio base preparado com solução tampão de fosfato, em alguns ensaios foi adicionado ao meio base glucose (1,28g/L) ou acetato (1,28g/L) e bagaço de uva. Os frascos foram em seguida fechados, mantiveram-se com agitação nas estufas termostatzadas em ambiente mesófilo ($37\pm 3^{\circ}\text{C}$) durante ± 30 dias. Usou-se como branco meio base com tampão fosfato, mas sem adição de bagaço de uva. Efectuaram-se ensaios com as granulometrias indicadas na tabela 4.3.

Foram recolhidas amostras em intervalos de 7 dias. As amostras recolhidas semanalmente foram centrifugadas para determinação de fenóis, TOC e análise de espectrofotometria de UV-visível. As amostras recolhidas no final do ensaio foram usadas para a determinação de sólidos, CQO, TOC, lignina, fenóis, proteína e espectrofotometria de UV-visível.

Tabela 4.3 - Granulometria e massa de bagaço de uva usados nos ensaios

Granulometria	Peso
0.40mm	1g
	0,75g
	0,50g
	0,25g
0.25mm	1g
	0,50g
	0,25g
<0.25mm	1g
	0,50g
	0,25g

4.4.2 Ensaio de Biodegração

Os ensaios de biodegração foram utilizados com o intuito de quantificar o potencial de produção de biogás produzido pela conversão do substrato num regime mesófilo ($37\pm 3^{\circ}\text{C}$) utilizando culturas anaeróbias, durante um certo período de tempo.

Os ensaios de Actividade Metanogénica Específica (*SMA- Specific Methanogenic Activity*), e da Biodegradabilidade Anaeróbia, foram efectuados em regime mesófilo. Utilizaram-se sistemas manométricos OxiTop OC 110, da WTW que permitem registar a variação da pressão durante o período de incubação, em hPa, registado num sensor electrónico. O aumento da pressão nos

frascos de incubação depende da actividade metabólica da biomassa, o qual gera essencialmente metano e dióxido de carbono.

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

Os ensaios consistiram basicamente na incubação em contínuo, de amostras de biomassa anaeróbia mesófila em frascos de 250 ml de capacidade, com agitação magnética, mantidos em estufas termostalizadas a $37 \pm 3^\circ\text{C}$.

Para o estudo de SMA, a biomassa, usada como inóculo, foi previamente lavada duas vezes com solução tampão de fosfato, para remoção do substrato residual. A lavagem foi efectuada à temperatura de incubação das culturas. Entre cada lavagem deixou-se decantar o meio, separando-se o sobrenadante que era descartado e a seguir adicionando novo volume de solução tampão.

No início do ensaio, colocou-se em cada frasco de incubação 25 ml meio base preparado com solução tampão de fosfato, biomassa previamente lavada e sedimentada (5mL) e bagaço de uva (Tabela 4.3), em alguns ensaios foi adicionado ao meio base glucose (1,28g/L) ou acetato (1,28g/L). Os frascos foram em seguida fechados, colocaram-se os sensores OxiTop e mantiveram-se nas estufas termostalizadas em ambiente mesófilo durante ± 30 dias. Usou-se como branco uma mistura reaccional idêntica, mas sem adição de bagaço de uva e apenas com meio base.

As medições da variação de pressão foram realizadas automaticamente pelo sensor de acordo com os intervalos de tempo programados. Os ensaios foram realizados, sempre que possível, em duplicado, quer para determinação da actividade, quer para a biodegradabilidade.

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

Para o cálculo da SMA (equação 4.6), converteu-se o valor do declive (hPa/h) em volume de biogás produzido por hora, a partir da lei dos gases perfeitos e dividiu-se pela massa de biomassa contida no frasco de incubação, quantificada como sólidos suspensos voláteis (SSV). A equação geral é a seguinte (adaptado de Brás,2003):

$$SMA = \frac{P \times V_d \times V_m}{R \times T \times m} \quad (4.6)$$

em que:

SMA- actividade metanogénica específica (Lbiogás/(gSSV x d))

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

V_m- volume molar à pressão e temperatura de trabalho (m³/mol)

V_d- volume disponível para o gás (dm³)

R- constante dos gases perfeitos (8,314 J/(mol.K))

T- temperatura (K)

m- massa de biomassa (gSSV)

V_d-Volume disponível = V_{total} - V_{mistura reaccional}

O estudo da biodegradação teve uma duração de 30 dias, sendo os seus valores registados e guardados nos sensores automaticamente. No final do período de incubação, os valores foram transferidos para um controlador, e deste para um computador permitindo o tratamento de resultados e respectiva representação gráfica.

Terminados os ensaios as amostras foram recolhidas, e leu-se o respectivo pH e prosseguiu-se a monitorização. As amostras foram de seguida centrifugadas para determinação de sólidos, CQO, TOC, lignina, fenóis e proteína.

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

O esquema do tipo de monitorização efectuado às amostras está indicado na Figura 4.4

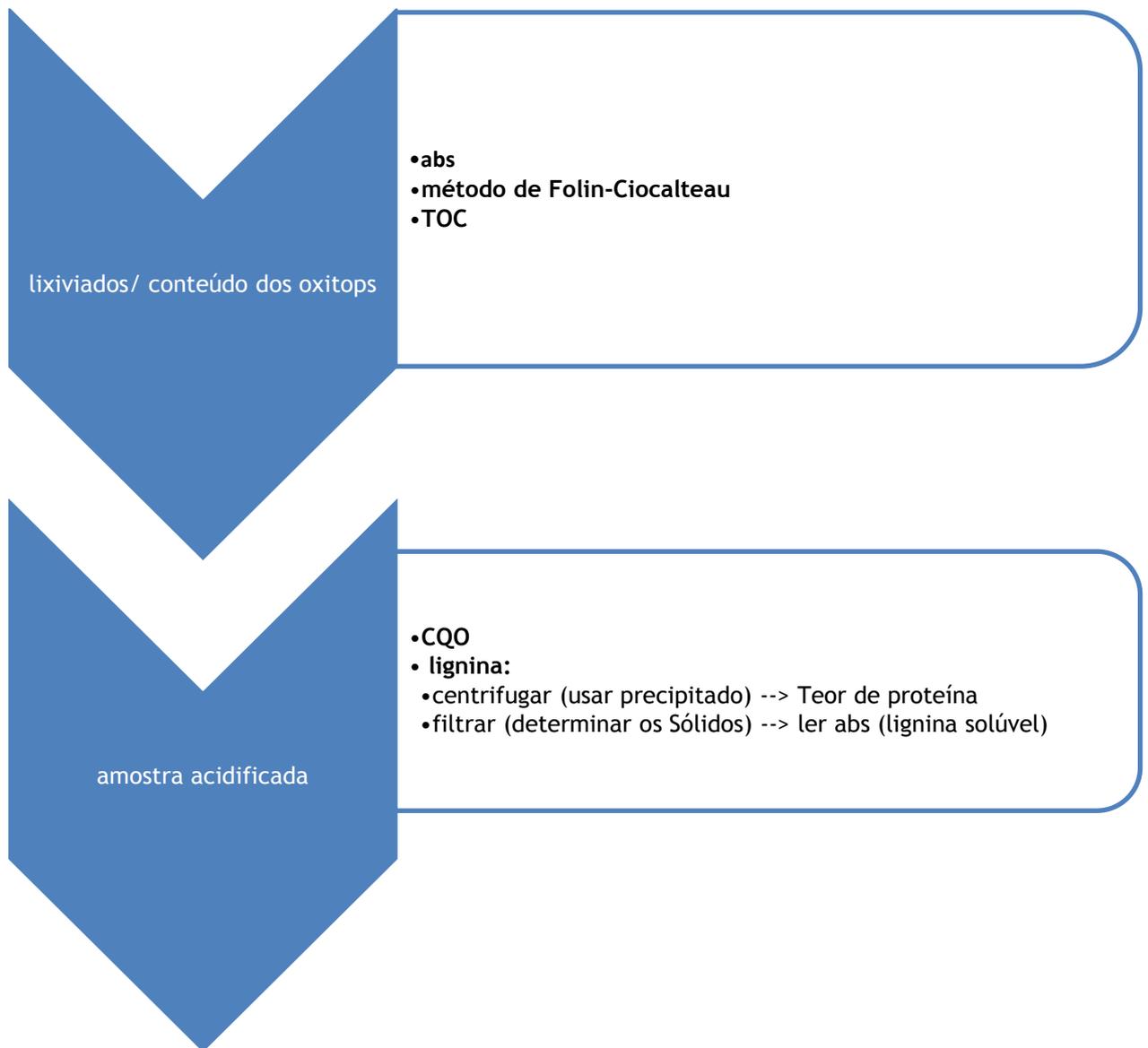
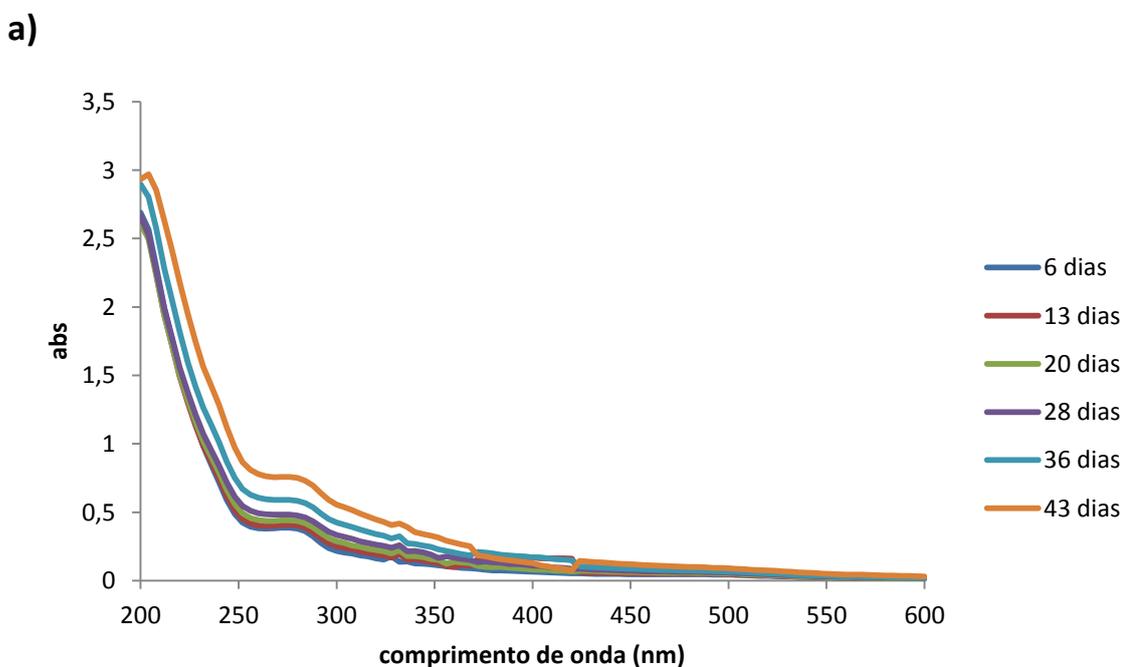


Figura 4.4 - Esquema da monitorização efectuada às amostras recolhidas no final dos ensaios de biodegradabilidade

5. Resultados e experimentais e discussão

5.1 - Ensaio preliminares de lixiviação

Com o intuito de se observar a lixiviação de compostos da fase sólida do bagaço de uva para o meio aquoso, substratos mais facilmente acessíveis ao consórcio microbiano em contacto com o bagaço de uva, efectuaram-se ensaios com diferentes massas e granulometrias, de acordo com o descrito na secção 4.2 Os ensaios decorreram durante 30 dias, tendo-se analisado a evolução ao longo do tempo dos espectros de ultravioleta-visível, quantificado o TOC e os fenóis. No final dos ensaios o licor residual foi analisado mais aprofundadamente tendo-se quantificado no licor sobrenadante a CQO, o TOC, sólidos, proteínas, lignina solúvel e fenóis. Pela evolução dos espectros ao longo do tempo pode-se salientar que ao longo dos 46 dias de ensaio foram lixiviados compostos da fase sólida (bagaço de uva) para a fase aquosa (Figura 5.1 a), observando-se a formação de um pico a cerca de 280nm, atribuído a presença de lignina solúvel. Para a mesma massa de bagaço e diferente granulometria (Figura 5.1 b) em amostras recolhidas para idêntico tempo de ensaio, verifica-se uma tendência para um aumento do teor de compostos lixiviados para a fase líquida para a granulometria de Ø 0,25mm vs 0,50g, o que se pode atribuir provavelmente a uma diferença na composição das fracções. As granulometrias de Ø 0,40mm vs 0,50g e Ø <0,25mm vs 0,50g lixiviam aproximadamente o mesmo tipo e quantidade de composto.



b)

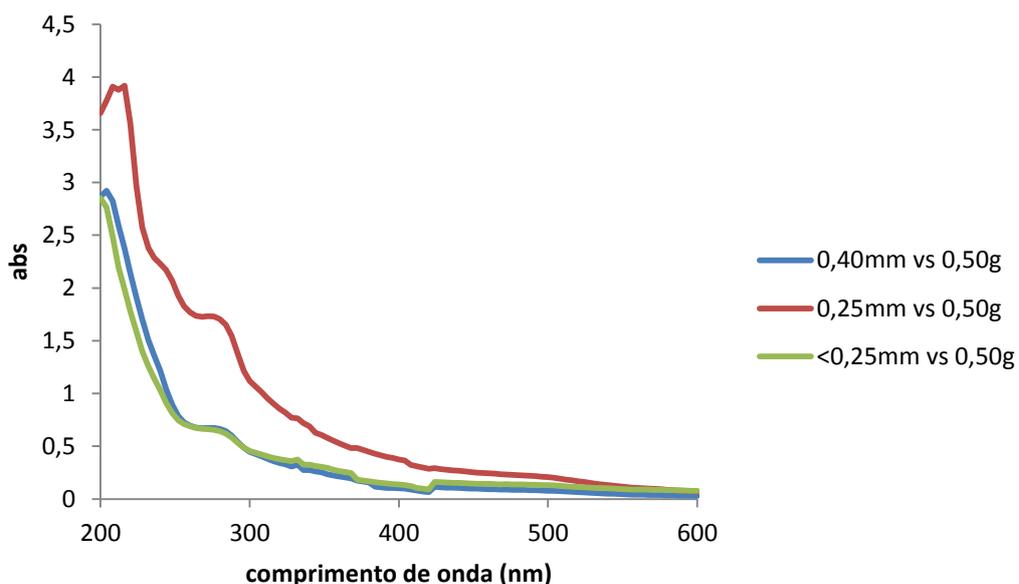
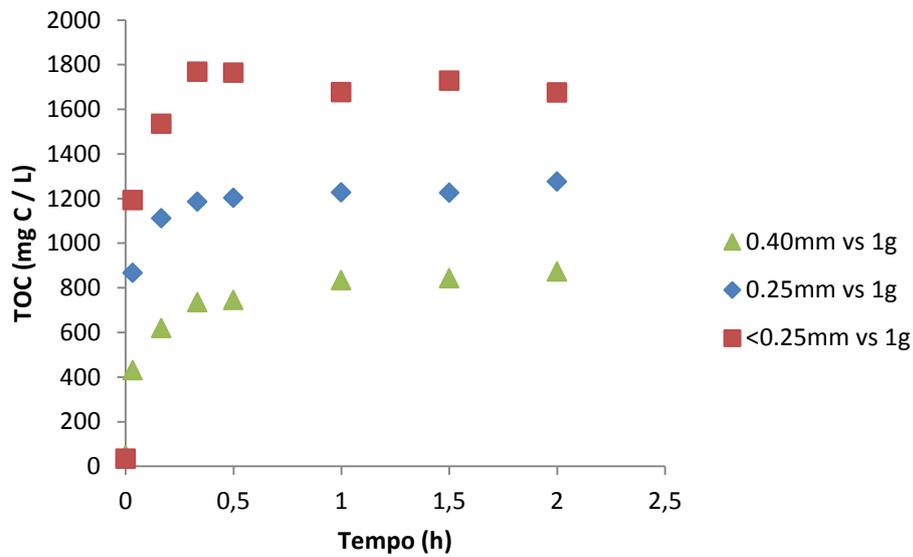


Figura 5.1 - Exemplos de espectros de ultravioleta-visível para amostras de lexiviado:

- a) Em função do tempo
- b) Para $t = 43$ dias e massa idêntica

O aumento de matéria orgânica carbonada na fase aquosa pode ser quantificado pela evolução dos valores de TOC (Figura 5.2), variando acentuadamente na primeira hora de ensaio (Figura 5.2 a), período durante o qual são lixiviados a maioria dos compostos. Para igual tempo de ensaio e igual massa, o teor de lixiviados aumenta com a diminuição da granulometria. Para idêntica granulometria verifica-se, como esperado, um aumento do TOC com o aumento da massa de bagaço adicionada à solução. Este comportamento é corroborado pelo teor de fenóis, o qual tende a aumentar com o tempo de ensaio e com o aumento da massa e com a diminuição da granulometria (Figura 5.3a). O teor de fenóis expresso em mg GAE/L variou entre 20 e 140 mg GAE/L, tendo sido mais elevado para a granulometria de $\emptyset 0,25$ mm vs 0,50g (figura 5.3b), tal como o observado para os espectros de UV-visível (figura 5.1b). Contudo, estes resultados deverão ser futuramente confirmados com a realização de um maior número de réplicas.

a)



b)

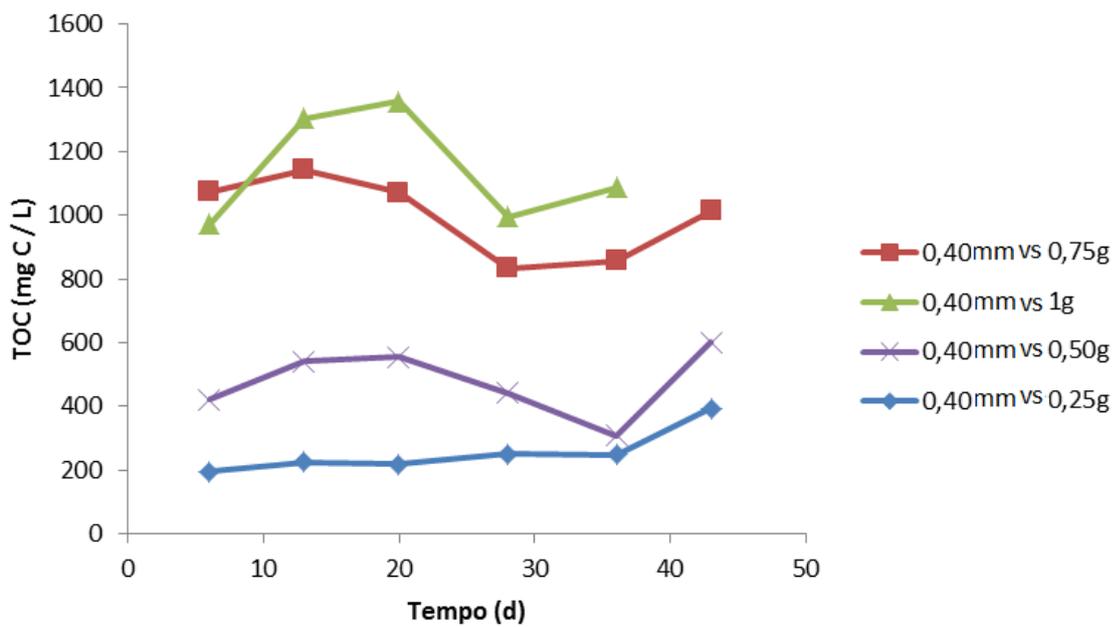
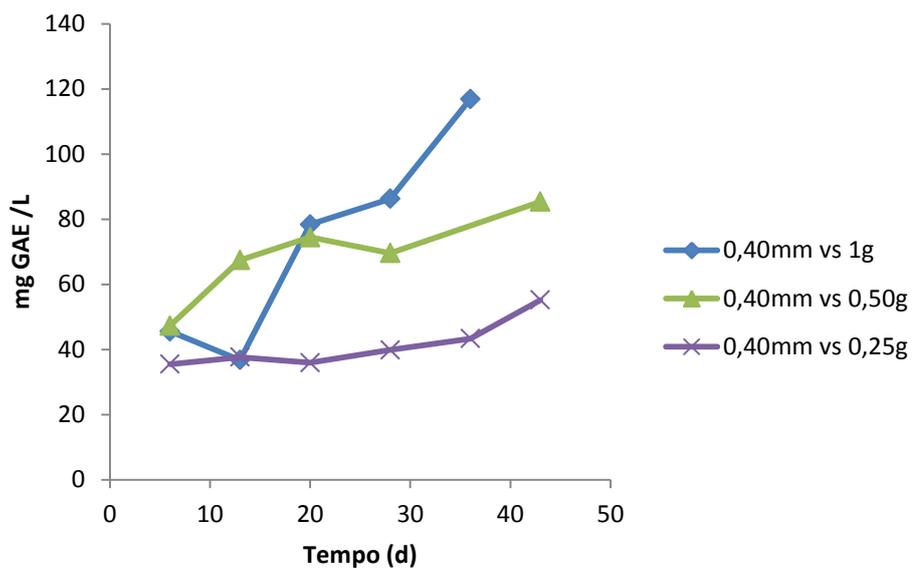


Figura 5.2 - Evolução do TOC ao longo do tempo:

- a) Para diferentes granulometrias nas primeiras 2h de ensaio
- b) Para diferentes massas e granulometrias idênticas

a)



b)

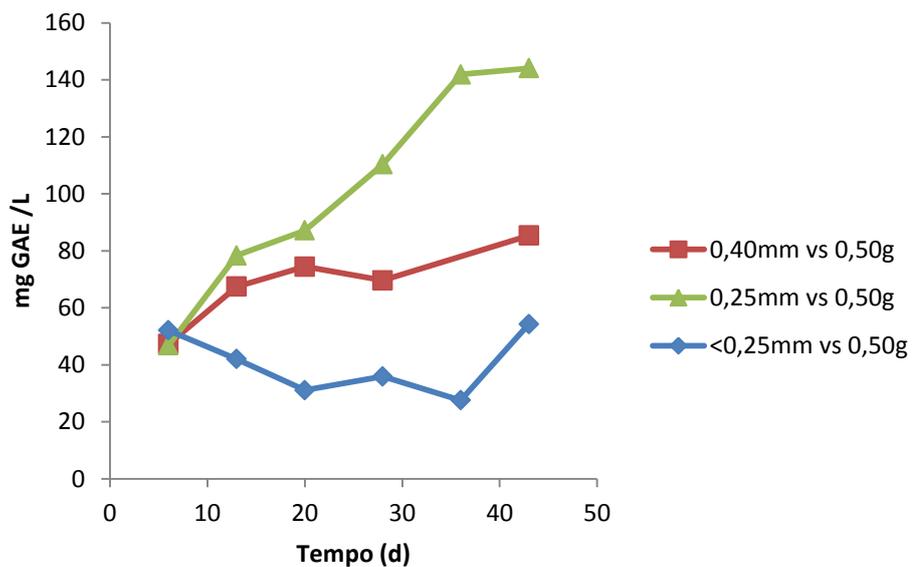


Figura 5.3 - Evolução do teor de fenóis ao longo do tempo:

- a) Para diferentes massas e idênticas granulometrias
- b) Para diferentes granulometrias e idêntica massa

Os valores de TOC e CQO no final dos ensaios (Tabela 5.1) apontam para uma tendência de aumento com a massa de bagaço, mas não se consegue concluir relativamente à granulometria. Considerando que os ensaios não decorreram em condições totalmente abióticas, as oscilações observadas ao final de 46 dias, podem atribui-se a eventuais

mecanismos de degradação que possam ocorrer. Por exemplo, a CQO no lixiviado do bagaço para um Φ de 0,40mm variou entre 1572 ± 699 mgO₂/L e 6800 mgO₂/L para 0,25g e 1 g, respectivamente. Para os mesmos ensaios obtiveram-se valores de TOC de 393 mgC/L para 0,25g e 1084 mgC/L para 1g de bagaço. Estes resultados indicam a presença de um elevado teor de matéria orgânica, a qual pode incluir lignina, proteínas e fenóis. Relativamente ao teor de SSV, proteínas, lignina e fenóis presentes no licor sobrenadante (fracção lixiviada) verifica-se uma elevada variabilidade (Tabelas 5.2 a e b). De facto, apesar de se poder apontar para uma tendência de aumento com a massa nos teores de SS, SSV e fenóis, o mesmo não se pode referir relativamente à granulometria, pois o padrão de comportamento não é coerente. O teor de proteína para a mesma granulometria variou entre 541,3 mgN-NH₃/L para um Φ de 0,40mm e 0,25g e 307,5 mgN-NH₃/L para 0,50g de bagaço. O valor mais elevado foi obtido para um Φ de 0,25mm e 0,50g (764,4 mgN-NH₃/L). Estes valores são similares aos obtidos para outro resíduo agro-industrial, a dreche cervejeira, para a qual o teor de proteína no lixiviado foi de 770 ± 370 mgN-NH₃/L para um Φ de 0,40mm e 0,6g de bagaço (Tomé, 2009). Pode admitir-se que a lignina solúvel precipitada em meio ácido (LPA) tende a aumentar com o aumento da massa e com o aumento da granulometria mas não foi registada uma tendência similar para a lignina solúvel em meio ácido (LS). Os teores de LPA variaram entre 0,48 g/L para um Φ de 0,40mm e 0,25g e 0,45 g/L para um Φ de 0,40mm e 0,5g de bagaço (Tabela 5.2 b). No lixiviado da dreche o teor de LPA foi de $0,9\pm 0,6$ g/L (Φ de 0,40mm e 0,6g de bagaço), valores significativamente mais elevados do que os obtidos no presente trabalho (Tomé, 2009).

Tabela 5.1 - valores médios e respectivos desvios padrão da quantificação do CQO, TOC e fenóis recolhidos no final dos ensaios de lixiviação. Os valores entre parêntesis representam o número de réplicas (n).

Bagaço de uva (Φ vs massa)	Lixiviados			
	Parâmetros	CQO final (mg O ₂ /L)	TOC final (mg C/L)	Fenóis (mg GAE/L)
-- mm vs 0g (branco)		25 (1)	41 (1)	0 (1)
0,40mm vs 1g		6800 (1)	1084 (1)	-
0,40mm vs 0,75g		2030 (1)	1013 (1)	31 (1)
0,40mm vs 0,50g		1205 (1)	600 (1)	58 (1)
0,40mm vs 0,25g		1572±699 (2)	393 (1)	3 (1)
0,25mm vs 1g		-	-	-
0,25mm vs 0,50g		3298 (1)	1075 (1)	117 (1)
0,25mm vs 0,25g		1865±665 (2)	461 (1)	38 (1)
<0,25mm vs 1g		3067 (1)	-	-
<0,25mm vs 0,50g		761 (1)	685 (1)	27 (1)
<0,25mm vs 0,25g		1039±55 (2)	540 (1)	50 (1)

Tabela 5.2 - valores médios e desvios padrão em amostras recolhidas no final dos ensaios para os seguintes parâmetros (Os valores entre parêntesis representam o número de réplicas (n)):

- a) SS, SSV, cinzas e proteína
- b) Lignina

a)

Parâmetros Bagaço de uva (Φ vs massa)	Lixiviados			
	SS (g/L)	SSV (g/L)	cinzas (g/L)	teor de proteínas (g/l)
0,40mm vs 1g	-	-	-	-
0,40mm vs 0,75g	1,583 (1)	1,139 (1)	0,002 (1)	0,019 (1)
0,40mm vs 0,50g	0,983 (1)	0,759 (1)	0,001 (1)	0,308 (1)
0,40mm vs 0,25g	1,326 (1)	1,022 (1)	0,001 (1)	0,541 (1)
0,25mm vs 1g	-	-	-	-
0,25mm vs 0,50g	1,846 (1)	1,577 (1)	0,001 (1)	0,764 (1)
0,25mm vs 0,25g	1,192 (1)	0,851 (1)	0,002 (1)	0,373 (1)
<0,25mm vs 1g	-	-	-	-
<0,25mm vs 0,50g	0,885 (1)	0,539 (1)	0,002 (1)	0,299 (1)
<0,25mm vs 0,25g	0,564 (1)	0,410 (1)	0,001 (1)	0,436 (1)

b)

Parâmetros bagaço de uva (Φ vs massa)	Lixiviados		
	LS (g/L)	LPA (g/L)	LT (g/L)
--mm vs 0g (Branco)	0,003 (1)	-	-
0,40mm vs 1g	-	-	-
0,40mm vs 0,75g	0,055 (1)	1,120 (1)	1,174 (1)
0,40mm vs 0,50g	0,043 (1)	0,451 (1)	0,494 (1)
0,40mm vs 0,25g	0,026 (1)	0,480 (1)	0,505 (1)
0,25mm vs 1g	-	-	-
0,25mm vs 0,50g	0,026 (1)	0,480 (1)	0,507 (1)
0,25mm vs 0,25g	0,049 (1)	0,812 (1)	0,861 (1)
<0,25mm vs 1g	-	-	-
<0,25mm vs 0,50g	0,043 (1)	0,240 (1)	0,283 (1)
<0,25mm vs 0,25g	0,055 (1)	-	-

5.2 - Biodegradação anaeróbia do bagaço de uva

A digestão anaeróbia constitui um dos métodos biológicos mais eficientes na conversão da matéria orgânica presente em resíduos, gerando produtos de valor acrescentado, nomeadamente de biogás. A estabilidade e eficiência destes processos são determinadas por parâmetros físicos-químicos e microbiológicos, sendo o potencial de produção de biogás e a actividade metanogénica específica indicadores essenciais do funcionamento equilibrado dos consórcios microbianos anaeróbios.

Os ensaios de biodegradação foram efectuados com culturas mistas anaeróbias cultivadas em regime mesófilo ($37 \pm 3^\circ\text{C}$), na presença de substratos complexos (bagaço de uva) e solúveis (glucose e acetato). Avaliou-se a actividade metanogénica específica (*SMA* - *specific methanogenic activity*), bem como a produção média de biogás, de acordo com a metodologia descrita na secção 4.4.2.

A actividade metanogénica específica (*SMA*) deve ser calculada com base no valor do declive máximo da curva, o qual representa a velocidade volumétrica máxima (taxa) de produção de biogás (hPa/h). Esta taxa pode ser convertida em volume de biogás por unidade de tempo, pela equação dos gases perfeitos. A actividade metanogénica específica deve assim ser medida no início da reacção, fase para a qual a velocidade de formação de biogás, nas condições do ensaio, é máxima (Figura 5.4)

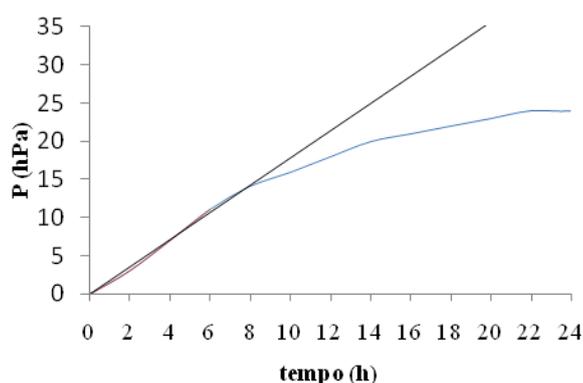


Figura 5.4 - Exemplo de uma curva experimental de actividade metanogénica, usando-se o sistema OxiTop (Tomé, 2009).

Todavia, para substratos complexos como o bagaço de uva e por análise da curva cumulativa de biogás, optou-se por medir a actividade metanogénica específica após o período de aclimatização (entre 0 e 40h), na fase de crescimento inicial mais acentuada - *SMA* I (entre 50 e 100h) e sempre que recomendável numa segunda fase, entre as 250 e 550h, quando se observou um novo e significativo aumento do valor da pressão *versus* tempo (Figura 5.5). A

SMA foi expressa em relação à massa de biomassa introduzida em cada frasco de incubação, quantificada com base no teor de SSV.

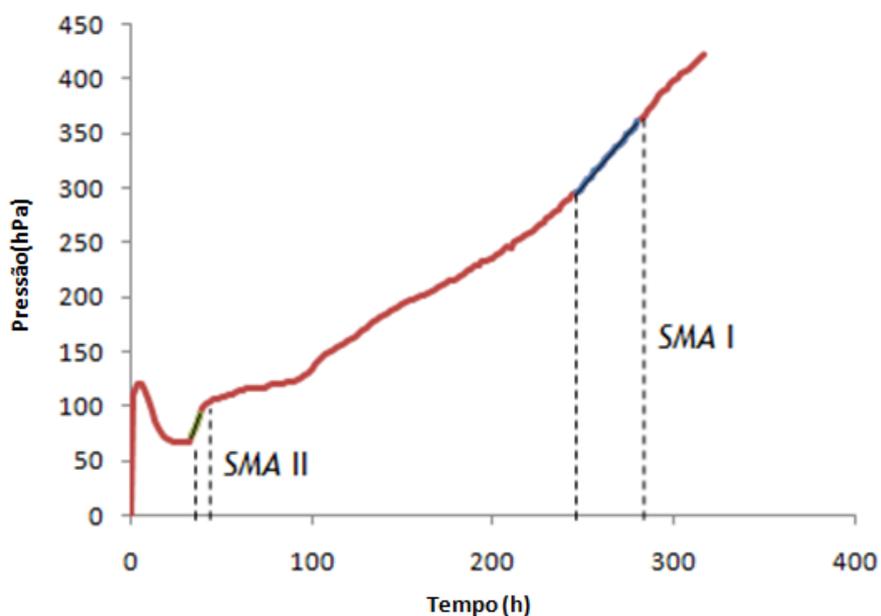


Figura 5.5 - Exemplificação da determinação da SMA em duas zonas distintas da curva de produção de biogás vs tempo obtida na biodegradação anaeróbia de bagaço de uva

Na tabela 5.3 estão representados os valores do teor de sólidos suspensos e sólidos suspensos voláteis obtidos para os inóculos usados nos ensaios de SMA e biodegradabilidade. Em cada frasco de incubação foi adicionado cerca de 16,7% (v/v) de inóculo, de modo a obter um teor de inóculo no meio reaccional de 14,4-15,5 g SSV/L.

Tabela 5.3: Caracterização da biomassa estudada por determinação dos sólidos suspensos totais (SST) e sólidos suspensos voláteis (SSV)

Inóculos	ensaio					
	1 a 3			4 e 5		
	SSV(g/L)	SS(g/L)	% inertes	SSV(g/L)	SS(g/L)	% inertes
Mesófilas I	14,4±2,3 (2)	17,7±1,3 (2)	18,4 (1)	-	-	-
Mesófilas II	-	-	-	15,5±3,5 (2)	63,2 (1)	75,4 (1)

Para os ensaios em regime mesófilo usaram-se os inóculos desenvolvidos com glucose em laboratório (mesófilas 1) e um inóculo recolhido numa ETAR da região e adaptado a glucose durante cerca de 2 meses (mesófilas 2).

Nas tabelas 5.4 a e b estão indicados os valores médios das actividades metanogénicas específicas (SMA) e os respectivos desvios padrão para as diferentes condições de ensaio.

Tabela 5.4 - Valores médios da actividade metanogénica específica (SMA - *specific methanogenic activity*) e respectivos desvios padrão (os valores entre parêntesis indicam o número de réplicas n) utilizando os inóculos:

a) Mesófilas I ; b) Mesófilas II

Fonte de carbono solúvel bagaço de uva (Φ vs massa)		Mesófilas I					
		SMA I (L biogás/(gSSV.d))			SMA II (L biogás/(g SSV.d))		
		sem fonte de carbono	glucose	acetato	sem fonte de carbono	glucose	acetato
0,40mm	1g	0,117±0,012 (4)	-	-	0,228±0,056 (4)	-	-
0,40mm	0,75g	0,076±0,014 (2)	-	-	0,172 (1)	-	-
0,40mm	0,50g	0,053±0,001 (2)	-	-	-	-	-
0,40mm	0,25g	0,026±0,007 (2)	0,022 (1)	-	-	-	-
0,25mm	1g	0,001 (1)	0,047 (1)	-	-	-	-
0,25mm	0,50g	0,056±0,014 (2)	-	-	0,062 (1)	-	-
0,25mm	0,25g	0,012±0,001 (2)	-	-	-	-	-
<0,25mm	1g	0,043 (1)	-	-	-	-	-
<0,25mm	0,50g	0,069±0,012 (2)	-	-	-	-	-
<0,25mm	0,25g	0,037±0,009 (2)	-	-	-	-	-

b)

Mesófilas II

Fonte de carbono . solúvel bagaço de uva (Φ vs massa)	SMA I (L biogás/(gSSV.d))			SMA II (L biogás/(gSSV.d))		
	sem fonte de carbono	glucose	acetato	sem fonte de carbono	glucose	acetato
0,40mm vs 1g	-	0,145 (1)	0,094 (1)	-	0,996 (1)	0,448 (1)
0,40mm 0,75g	0,104 (1)	0,108±0,007 (2)*	0,087±0,033 (2)	0,319 (1)	0,458±0,085 (2)	0,333±0,041 (2)
0,40mm 0,50g	0,074±0,011 (2)	0,091±0,010 (2)	0,065±0,006 (2)	-	0,319 (1)	0,217 (1)
0,40mm 0,25g	-	-	-	-	-	-
0,25mm 1g	-	-	-	-	-	-
0,25mm 0,50g	0,058 (1)	0,090±0,022 (2)	0,063 (1)	0,292 (1)	0,335±0,006 (2)	0,289 (1)
0,25mm 0,25g	-	-	-	-	-	-
<0,25mm 1g	-	-	-	-	-	-
<0,25mm 0,50g	-	0,121±0,031 (2)	0,110±0,028 (2)	-	0,378±0,020 (2)	0,469±0,065 (2)
<0,25mm 0,25g	-	-	-	-	-	-

Comparando os valores de SMA obtidos verifica-se um aumento destes com o aumento da massa, para a mesma granulometria, independentemente da fonte de carbono solúvel adicionada. Para igual massa de bagaço (0,50g) os valores de SMA tendem a aumentar com a diminuição da granulometria. O aumento da massa e a diminuição da granulometria do bagaço sugerem um aumento de compostos lixiviados da fase sólida para a fase aquosa, tornando estes substratos mais acessíveis aos microrganismos, os quais ao os metabolizarem, geram um aumento de produção de biogás, causando um aumento dos valores de SMA. Para granulometrias mais baixas ($\leq 0,25$ mm) e uma massa mais elevada (1g) os valores de SMA I diminuem, indicando a possível existência de inibição por acumulação excessiva de substratos na fase líquida (tabela 5.4a). A adição de um substrato solúvel (glucose ou acetato) parece implicar num aumento dos valores de SMA. Este efeito é particularmente acentuado para granulometrias mais baixas. Por exemplo para um Φ de 0,40 mm e 0,75g, verifica-se um aumento de SMA II de 0,319 L biogás/(gSSV.d) para 0,458 ± 0,08 L biogás/(gSSV.d). Para um Φ de 0,25 mm e 0,50g, SMA I aumentou de 0,058 L biogás/(gSSV.d) para 0,090 ± 0,02 L biogás/gSSV.d e 0,063 L biogás/(gSSV.d) e quando se adicionou glucose e acetato, respectivamente.

O valor máximo de *SMA I* para o bagaço de uva foi obtido para um Φ de 0,40mm e 1 g ($0,117 \pm 0,012$ L biogás/(gSSV.d)), o qual na presença de glucose subiu para 0,145 L biogás/gSSV.d. Para granulometrias mais baixas os valores máximos de *SMA I* (Tabela 5.2a) foram para $\Phi < 0,25$ mm e massa de 0,5g ($0,069 \pm 0,012$ L biogás/(gSSV.d)).

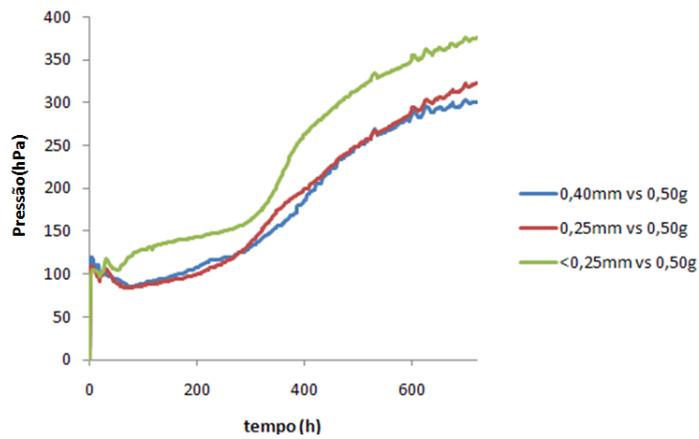
Os valores de *SMA II* foram em geral bastante superiores aos de *SMA I* (Tabelas 5.4 a e b), indicando a presença de substratos adicionais no meio de fermentação facilmente acessíveis à etapa metanogénica. Os valores máximos de *SMA II* foram obtidos para Φ de 0,40 mm e 1,0g na presença de substratos solúveis (0,996 e 0,448 L biogás/(gSSV.d)).

Os dois intervalos de elevada actividade metanogénica (*SMA I* e *SMA II*) podem ser atribuídos à presença de compostos facilmente lixiviados (da fase sólida para a fase líquida) e de rápida metabolização numa primeira etapa do processo de biorremediação (*SMA I*) e numa segunda etapa de compostos mais complexos (tipicamente substratos sólidos) que envolvam no seu processo de degradação (mais lento) as 4 principais etapas de digestão anaeróbia: hidrólise, fermentação ácida, acetogénese e metanogénese (*SMA II*). De entre este último grupo de compostos podem incluir-se a lignina, polifenóis, proteínas, celulosas e hemicelulosas, compostos comumente presentes no bagaço de uva (Detroy R. and Hesseltine, 1978). As celulosas e hemicelulosas (tabela 4.1 - caracterização do bagaço de uva), por hidrólise podem originar açúcares, nomeadamente pentoses (xilose e arabinose) e hexoses (glucose, manose e galactose), que são substratos das bactérias fermentativas (fase acidogénica). As ligninas podem ser biotransformadas em polifenóis e fenóis e estes últimos são passíveis de metabolização por microrganismos anaeróbios.

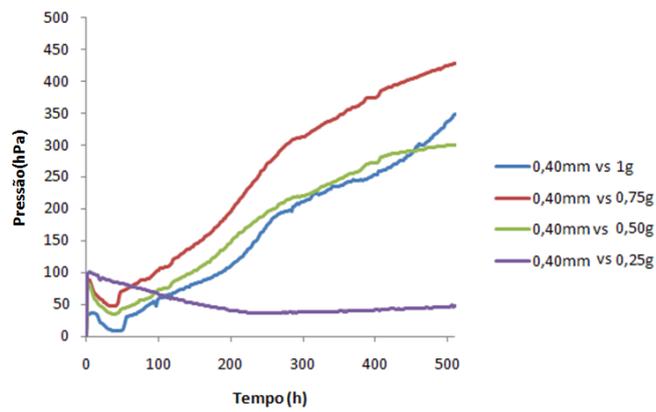
Analisando as curvas cumulativas de produção de biogás obtidas para diferentes granulometrias e massa de bagaço (Figura 5.6) podem salientar-se os seguintes aspectos:

- Para igual massa de bagaço obtêm-se pressões de biogás mais elevadas para a granulometria mais baixa. O aumento de massa até 0,75 g traduz-se num aumento do valor da pressão. Para 1 g de bagaço os resultados apontam para uma diminuição da pressão por inibição de algumas populações anaeróbias, provavelmente de *arquea* metanogénicas (Figuras 5.6 a-d).
- A adição de substratos solúveis ao meio de fermentação parece estimular o potencial de produção de biogás, tendo-se neste caso registado valores mais elevados de pressão (Figuras 5.6 e-h). Este efeito acentua-se para Φ de 0,40mm e 1 g, para os quais se observa um aumento de pressão não se observando inibição pelo substrato.

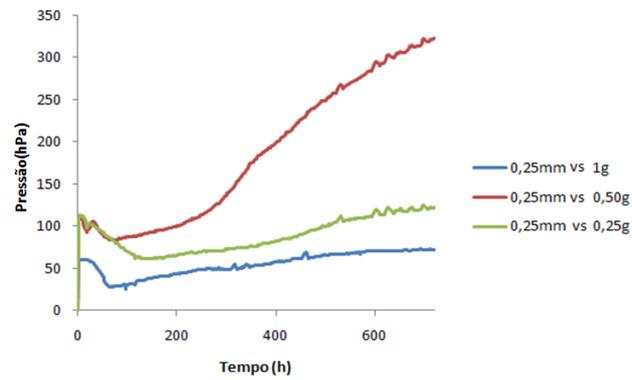
a)



b)



c)



d)

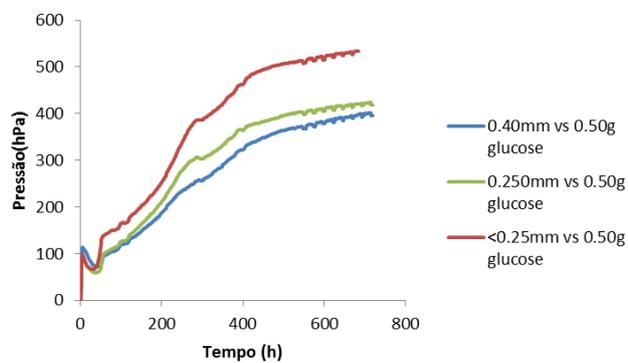
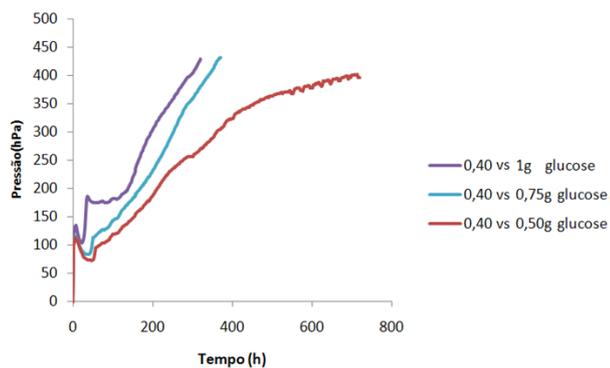
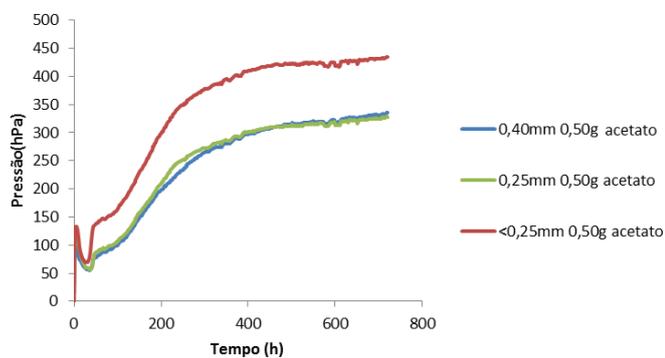


Figura 5.6 - Exemplos de curvas de pressão de biogás acumulado ao longo do tempo.

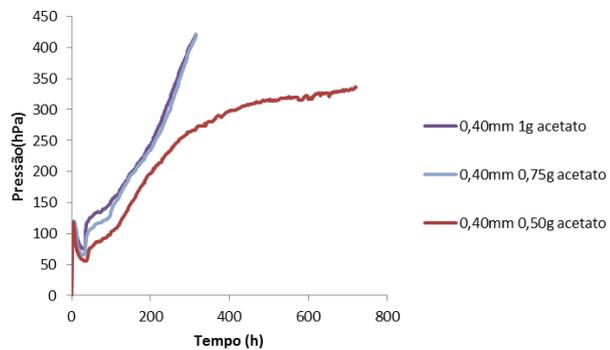
e)



f)



g)



h)

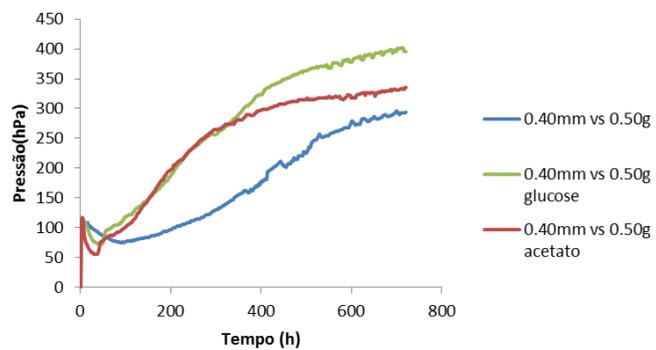


Figura 5.6 (continuação) - Exemplos de curvas de pressão de biogás acumulado ao longo do tempo.

Sendo a glucose um substrato facilmente metabolizável por populações anaeróbias e o acetato um substrato directo das *arquea* metanogénicas acetoclásticas, a sua adição ao meio de cultura parece originar um aumento da pressão de metano. Assim, a adição destes substratos solúveis contribui directa ou indirectamente para o aumento da actividade das populações acetogénicas e metanogénicas, constituindo esta última frequentemente a etapa controladora da cinética das reacções bioquímicas envolvidas.

A presença de acetato no início da reacção deve contribuir para um aumento da predominância das *arquea* metanogénicas acetoclásticas, as quais são responsáveis por cerca de 70% do metano gerado em condições mesofílicas (Lopes, 2005), obtendo-se deste modo quer um aumento da actividade, quer um aumento do biogás produzido. Tomé, 2009, num estudo similar realizado com outro resíduo de agro-indústria, dreche cervejeira, refere no entanto, que a adição de acetato em meios de fermentação com população mesófila não parece estimular o potencial de produção de biogás, explicando que em regime mesófilo o acetato ser preferencialmente utilizado pelas metanogénicas acetoclásticas, não sendo favorecidas outras vias metabólicas alternativas para a sua degradação. Porém, na presença de bagaço de uva registou-se um efeito de estimulação, o que se pode atribuir à presença, na sua composição, de compostos lenho-celulósicos, proteínas e fenóis menos susceptíveis à biodegradação na etapa metanogénica, do que os presentes na composição da dreche cervejeira. Tomé, 2009 obteve para culturas mesófilas mistas incubadas com dreche cervejeira, com ou sem adição de substrato solúvel, valores de SMA I entre $0,47 \pm 0,09$ e $0,80 \pm 0,08$ L biogás/(gSSV.d), tendo medido a actividade apenas na fase inicial da reacção, por não se observar a formação de uma segunda etapa tão definida como a que se registou para o bagaço de uva. Contudo, estes valores são similares aos obtidos no presente trabalho em idênticas condições teste para SMA II (entre $0,23 \pm 0,06$ e $1,0$ L biogás/(gSSV.d)), mas mais elevados do que os valores de SMA I (entre $0,053 \pm 0,001$ e $0,145$ L biogás/(gSSV.d)). Brás, 2003 obteve para culturas mesófilas mistas incubadas com glucose valores de actividade de $0,66 \pm 0,03$ Lbiogás/(gSSV.d). Lopes, 2005 obteve para o mesmo tipo de cultura e substrato valores de $0,27 \pm 0,09$ Lbiogás/(gSSV.d). Tomé, 2009, obteve um valor de $0,5$ Lbiogás/(gSSV.d) para culturas mistas mesófilas incubadas com glucose, relativamente similar ao obtido no presente trabalho ($0,75 \pm 0,10$ Lbiogás/(gSSV.d)). Estes valores de SMA encontram-se dentro do referido na literatura sobre resultados de actividade anaeróbia, podendo as diferenças estar associadas a diferentes fases de crescimento da biomassa mesófila bem como à composição do meio de fermentação, nomeadamente o tipo de substrato e o tipo de reactor (Frang e outros, 1994 citado por Brás, 2003).

Os valores calculados para a taxa específica média de utilização do substrato estão indicados na Tabela 5.5.

Tabela 5.5 Quantidade média de biogás produzido (mL biogás/g ssV*d). Os valores entre parêntesis representam o número de réplicas (n).

Fonte de carbono . solúvel bagaço de uva (Φ vs massa)	mesófilo I			mesófilo II		
	sem fonte de carbono	glucose	acetato	sem fonte de carbono	glucose	acetato
branco	-	312,6±60,6 (3)	-	-	-	-
0,40mm 1g	57,1±5,1 (3)	-	-	-	106,8 (1)	77,8 (1)
0,40mm 0,75g	32,0±3,2 (2)	-	-	65,3 (1)	78,9±17,8 (2)	72,8±7,0 (2)
0,40mm 0,50g	25,8±0,4 (2)	-	-	29,6 (1)	41,0±2,0 (2)	27,8±1,2 (2)
0,40mm 0,25g	6,8 (1)	10,3 (1)	-	-	-	-
0,25mm 1g	8,6 (1)	-	-	-	-	-
0,25mm 0,50g	21,6±9,0 (2)	-	-	23,4 (1)	44,9±2,03 (2)	26,4 (1)
0,25mm 0,25g	9,1±2,1 (2)	-	-	-	-	-
<0,25mm 1g	61,0 (1)	-	-	-	-	-
<0,25mm 0,50g	29,4±4,5 (2)	-	-	-	73,5±18,1 (2)	48,6±19,2 (2)
<0,25mm 0,25g	12,9 (1)	-	-	-	-	-

Estes resultados corroboram a ideia de que a adição de substratos solúveis (glucose e acetato) favorece a degradação do bagaço de uva em regime mesófilo. Os valores mais elevados para a produção média de biogás foram obtidos para a granulometria de Φ de 0,40mm e 1 g com adição de glucose (106,8 mL biogás/(g SSV.d)) . De facto, a glucose parece estimular significativamente a produção média de biogás, o que pode indicar um controlo da reacção de degradação do bagaço de uva por parte das acidogénicas fermentativas, co-culturas que ao produzirem substratos das acetogénicas e metanogénicas, estimulam indirectamente o crescimento destas populações. A adição de acetato não originou um incremento na produção média de biogás tão acentuado, possivelmente por estimular especificamente *arquea* metanogénicas. Comparando com os valores de Tomé, 2009, para a dreche cervejeira e as mesmas condições teste obtêm-se resultados similares (40 ±11 mL biogás/(g SSV.d)) para 0,42g de dreche Φ de 0,40mm e com adição de glucose) aos obtidos no presente trabalho (41±2 mL biogás/(g SSV.d)).

Os valores de CQO e TOC do sobrenadante dos caldos de fermentação nas amostras recolhidas no final dos ensaios de biodegradabilidade anaeróbia em sistemas mesófilos estão indicados nas Tabelas 5.6 e 5.7. Os resultados obtidos para a CQO estão de acordo com os da taxa específica média de produção de biogás (Tabela 5.5), sendo os valores mais elevados de biogás para os ensaios com inóculo mesófilas II, a que correspondem menores valores de CQO residual no caldo de fermentação. Para o inóculo mesófilas I os valores de CQO residual são bastante mais elevados, mas a taxa média de produção de biogás foi menor. Porém, esta ideia não pode ser corroborada pelos valores de TOC, nos quais não se observou uma resposta idêntica para os dois inóculos. Esperavam-se valores de TOC sempre inferiores aos da CQO residual, porém são similares nos ensaios com mesófilas II, o que se pode atribuir à presença de compostos aromáticos não susceptíveis de oxidação química pelo dicromato, ou em estado de oxidação mais elevado e que originem menor consumo em equivalentes em oxigénio, ou ainda, eventuais interferências na quantificação do TOC, nomeadamente gases dissolvidos no licor sobrenadante. Todavia, pode constatar-se uma evolução concordante dos valores de CQO e TOC residuais para as diferentes massas e granulometrias (Tabelas 5.6 e 5.7), verificando-se um aumento destes com o aumento da massa.

Tabela 5.6 - Valores médios e respectivos desvio padrão da CQO. Os valores entre parêntesis indicam o número de réplicas (n).

- a) Para ensaios com mesófilas I
 b) Para ensaios com mesófilas II

Fonte de carbono . solúvel bagaço de uva (Φ vs massa)	CQO final (mg O ₂ /L)					
	Mesófilo I			Mesófilo II		
	sem fonte de carbono	glucose	acetato	sem fonte de carbono	glucose	acetato
--mm vs 0g (branco)	374 (1)	-	-	184±27 (2)	190 (1)	190 (1)
0,40mm vs 1g	2665±1441 (4)	4434 (1)	-	-	654±332 (2)	1206±447 (2)
0,40mm vs 0,75g	3267±943 (2)	-	-	652±154 (4)	780±27 (2)	524±67 (2)
0,40mm vs 0,50g	1380±606 (2)	-	-	666±242 (2)	476±81 (2)	333±13 (2)
0,40mm vs 0,25g	1583±941 (4)	-	-	-	-	-
0,25mm vs 1g	5200±1131 (2)	5567±1084 (2)	-	-	-	-
0,25mm vs 0,50g	2347±448 (2)	-	-	837 (1)	742±27 (2)	358±302 (2)
0,25mm vs 0,25g	1335±383 (4)	1580 (1)	-	-	-	-
<0,25mm vs 1g	6533 (1)	3534 (1)	-	-	-	-
<0,25mm vs 0,50g	1998±404 (2)	-	-	609 (1)	247±81 (2)	276±283 (2)
<0,25mm vs 0,25g	1690±1196 (4)	-	-	-	-	-

Tabela 5.7 - Valores médios e respectivos desvio padrão do TOC. Os valores entre parêntesis indicam o número de réplicas (n).

- a) Para ensaios com mesófilas I
- b) Para ensaios com mesófilas II

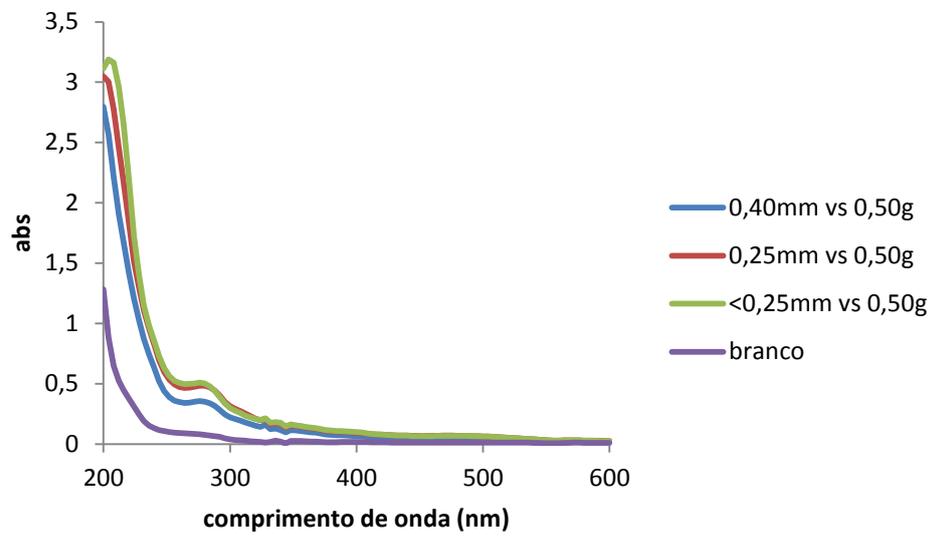
Fonte de carbono . solúvel	TOC final				
	mesófilo I		mesófilo II		
	sem fonte de carbono	glucose	sem fonte de carbono	glucose	acetato
bagaço de uva (Φ vs massa)					
--mm vs 0g (branco)	291±72 (2)	484 (1)	261 (1)	191 (1)	655,2 (1)
0,40mm vs 1g	1616±87 (4)	1928±110 (2)	-	805±56 (2)	1031±2 (2)
0,40mm vs 0,75g	526±122 (2)	-	628±22 (2)	757±46 (2)	914±4 (2)
0,40mm vs 0,50g	332±54 (2)	-	566±9 (2)	577±41 (2)	811±36 (2)
0,40mm vs 0,25g	397±109 (4)	336±95 (2)	-	-	-
0,25mm vs 1g	2451±264 (2)	1606±1038 (2)	-	-	-
0,25mm vs 0,50g	450±6 (2)	-	625±56 (2)	734±28 (2)	895±5 (2)
0,25mm vs 0,25g	330±46 (3)	366±83 (2)	-	-	-
<0,25mm vs 1g	3400 (1)	1153 (1)	-	-	-
<0,25mm vs 0,50g	573±40 (2)	-	711±9 (2)	752±57 (2)	1002±101 (2)
<0,25mm vs 0,25g	445±98 (2)	-	-	-	-

Os espectros de UV-visível do sobrenadante das soluções residuais recolhidas no final dos ensaios indicam a formação de uma banda de absorção por volta dos 280nm, sugerindo a formação de ligninas solúveis (Figura 5.7). Para igual massa de bagaço de uva obtém-se um aumento do pico de absorvência com a diminuição da granulometria, sendo o pico mais acentuado para $\Phi < 0,25\text{mm}$. Para granulometrias e massas idênticas o pico a 280nm acentua-se na presença de substratos solúveis, em particular de acetato (Figura 5.7 b).

O facto de existirem mais ligninas solúveis na presença de acetato, pode ajudar a explicar a influência menos significativa da observada pela adição de acetato na produção de biogás (Tabelas 5.4 e 5.5).

Figura 5.7

a)



b)

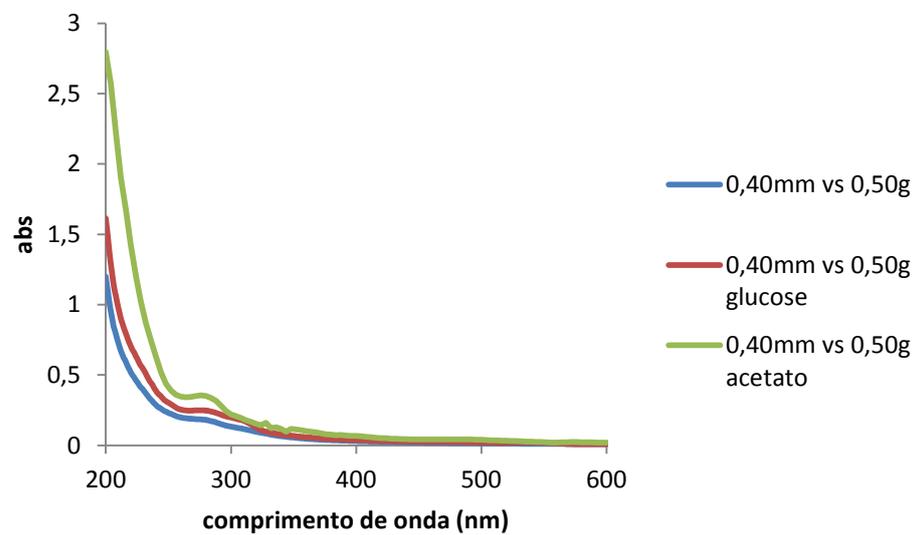


Figura 5.7 - Espectros de UV-visível do sobrenadante das soluções residuais recolhidas no final dos ensaios.

5.3 - Degradação de lignina, proteínas e compostos fenólicos

A degradação da proteína, lignina solúvel e fenóis foi monitorizada por quantificação destes compostos no final dos ensaios de biodegradação. A determinação da lignina foi feita após acidificação do meio a pH de 2,5, tendo-se obtido duas fases resultantes (como descrito no subcapítulo 4.3.6): a lignina solúvel que permaneceu no licor sobrenadante após a acidificação (LS) e a lignina precipitada em meio ácido (LPA). Da soma das duas fracções (LPA+ LS) obtém-se a lignina total da fase sobrenadante recolhida (LT). Paralelamente quantificou-se o teor de proteína que precipitou com a lignina em meio ácido, por diferença entre o teor de SSV e cinzas e ainda o teor de fenóis foi efectuado com base no método apresentado no subcapítulo 4.3.7.

Os valores obtidos pela análise gravimétrica (sólidos suspensos - SS, sólidos suspensos voláteis - SSV e cinzas) e para o teor de proteínas em regime mesófilo estão indicados nas Tabelas 5.8 a e b.

Para o inóculo mesófilas I em ensaios efectuados sem adição de substrato solúvel ao meio de fermentação do bagaço de uva a quantidade de precipitado formada após a acidificação do licor residual (teor de SS) bem como a fracção de matéria orgânica presente (SSV) e teor de proteína para as diferentes massas e granulometrias de estudadas, tendem a aumentar com o aumento da massa. A adição de um substrato solúvel (glucose) não parece afectar significativamente os valores de SSV, observando-se no entanto uma diminuição do teor de proteína nos ensaios efectuados nas mesmas condições teste sem adição de substrato (Tabela 5.8).

Tabela 5.8 - Valores médios e respectivos desvio padrão dos sólidos suspensos - SS, sólidos suspensos voláteis - SSV, cinzas e teor de proteína. Os valores entre parêntesis indicam o número de réplicas (n).

- a) Para ensaios com mesófilas I
 b) Para ensaios com mesófilas II

a)

Valores médios da quantificação gravimétrica

Fonte de carbono. solúvel bagaço de uva (Φ vs massa)	mesófila I							
	sem fonte de carbono				glucose			
	SS (g/L)	SSV (g/L)	cinzas (g/L)	teor de proteínas (g/l)	SS (g/L)	SSV (g/L)	cinzas (g/L)	teor de proteínas (g/l)
0,40mm vs 1g	3,38 ±0,85 (2)	3,07 ±1,08 (2)	0,31 ±0,23 (2)	1,38 ±0,57 (2)	1,01 ±0,33 (2)	0,86 ±0,30 (2)	0,14 ±0,03 (2)	0,35 ±0,12 (2)
0,40mm vs 0,75g	2,66 ±0,57 (2)	2,21 ±0,60 (2)	0,46 ±0,03 (2)	1,23 ±0,72 (2)	-	-	-	-
0,40mm vs 0,50g	0,79 ±0,43 (2)	0,64 ±0,31 (2)	0,13 ±0,12 (2)	0,71 ±0,08 (2)	-	-	-	-
0,40mm vs 0,25g	1,62 ±0,50 (2)	1,39 ±0,43 (2)	0,23 ±0,07 (2)	0,57 ±0,26 (2)	0,57 ±0,12 (2)	0,52 ±0,15 (2)	0,06 ±0,03 (2)	0,28 ±0,10 (2)
0,25mm vs 1g	3,38 ±0,85 (2)	3,07 ±1,08 (2)	0,3 ±0,23 (2)	1,37 ±0,57 (2)	2,19 ±1,42 (2)	1,73 ±1,09 (2)	0,46 ±0,32 (2)	0,72 ±0,60 (2)
0,25mm vs 0,50g	1,51 ±0,54 (2)	1,46 ±0,66 (2)	0,05 ±0,12 (2)	0,88 ±0,10 (2)	-	-	-	-
0,25mm vs 0,25g	1,24 ±0,54 (4)	1,03 ±0,50 (4)	0,21 ±0,23 (4)	0,76 ±0,27 (4)	1,25 ±0,37 (2)	1,03 ±0,20 (2)	0,22 ±0,19 (2)	0,53 ±0,01 (2)
<0,25mm vs 1g	1,22 (1)	0,98 (1)	0,23 (1)	0,14 (1)	1,23 (1)	0,98 (1)	0,25 (1)	0,34 (1)
<0,25mm vs 0,50g	1,1361 ±0,11 (2)	1,06 ±0,17 (2)	0,07±0,0 6 (2)	0,92 ±0,13 (2)	-	-	-	-
<0,25mm vs 0,25g	1,25 ±0,58 (2)	1,15 ±0,50 (2)	0,10 ±0,19 (2)	0,75 ±0,24 (2)	-	-	-	-

b)

Fonte de carbono . solúvel		mesófila II					
		sem fonte de carbono		glucose		acetato	
bagaço de uva (Φ vs massa)		SSV (g/L)	teor de proteínas (g/l)	SSV (g/L)	teor de proteínas (g/l)	SSV (g/L)	teor de proteínas (g/l)
bagaço de uva 0,40mm 1g						0,769±0,308 (2)	0,305±0,114 (2)
bagaço de uva 0,40mm 0,75g				0,288±0,018 (2)	0,106±0,040 (2)	0,320±0,028 (2)	0,122±0,052 (2)
bagaço de uva 0,40mm 0,50g		0,329 (1)	0,131 (1)	0,231±0,231 (2)	0,185±0,119 (2)	0,259±0,057 (2)	0,067±0,025 (2)
bagaço de uva 0,40mm 0,25g							
bagaço de uva 0,25mm 1g							
bagaço de uva 0,25mm 0,50g		0,5091 (1)	0,206 (1)	0,288 (1)	0,102 (1)	0,313±0,1396 (2)	0,100±0,122 (2)
bagaço de uva 0,25mm 0,25g							
bagaço de uva <0,25mm 1g							
bagaço de uva <0,25mm 0,50g		1,442 (1)	0,581 (1)	0,257±0,257 (2)	0,202±0,031 (2)	0,196±0,136 (2)	0,089±0,052 (2)
bagaço de uva <0,25mm 0,25g							

Estes parâmetros foram também controlados nos ensaios efectuados com o inóculo mesófilas II pelos quais se observa uma ligeira diminuição do teor de proteína no sobrenadante do meio de fermentação quando se adicionaram substratos solúveis (Tabela 5.8 b).

Para Φ de 0,40mm e 0,5g de bagaço sem adição de substrato solúvel o teor de proteína na fase líquida foi de 708,4±85,3 mgN-NH₃/L no inóculo mesófilas I e de 131,3 mgN-NH₃/L no inóculo mesófilas II. A adição de substratos solúveis influencia o teor de proteína o qual foi mais baixo quando se adicionou acetato, de 67,2±2,0 mgN-NH₃/L (Tabela 5.8 b). O teor mais elevado no inóculo mesófilo I podem indicar uma menor eficiência de degradação dos componentes lixiviados do bagaço, comparativamente ao obtido para o inóculo mesófilas II. Estes resultados indicam uma menor concentração de proteínas no licor residual dos ensaios

com mesófilas II e estão de acordo com os obtidos para a taxa específica média de produção de biogás (Tabela 5.5) e para a CQO residual (Tabela 5.6), indicando uma melhor taxa de utilização de substratos solúveis. Estes valores são em geral próximos dos obtidos em idênticas condições de ensaio com dreche (Tomé, 2009), nos quais o teor de proteína foi de 133 mgN-NH₃/L sem adição de substrato, diminuindo significativamente quando se adicionou glucose ou acetato (para 12-18 mgN-NH₃/L).

As análises ao teor de lignina (Tabelas 5.9 a e b) no licor sobrenadante e residual revelaram uma diminuição com o aumento da granulometria (de 0,390±0,040 g LPA/L para 0,090 g LPA/L para granulometrias com Φ de <0,25mm e 0,5g e Φ de 0,40mm e 0,5g de bagaço sem adição de substrato solúvel, respectivamente). O teor mais elevado para granulometrias mais baixas pode indicar uma composição diferente das fracções de bagaço, a par de um aumento da área interfacial com a diminuição do diâmetro médio da partícula. A adição de substrato solúvel implica uma diminuição do teor de lignina no licor sobrenadante, provavelmente pelo facto da adição de glucose ou acetato induzir um aumento do tipo de enzimas capazes de degradar estes compostos. O teor dos diferentes tipos de lignina (LS, LPA e LT) foi similar em ambos os inóculos mesófilos, apresentando os resultados uma elevada variabilidade, independentemente do tipo de substrato adicionado (a lignina total, LT, para Φ de 0,40mm e 0,5g de bagaço sem adição de substrato solúvel variou entre 0,126 e 0,221 g/L para o inóculo mesófilas I e II, respectivamente). Estes valores foram semelhantes aos obtidos para a dreche cervejeira para as mesmas condições teste (LT entre 0,070 e 0,200 g/L) (Tomé, 2009).

Tabela 5.9 - Valores médios e respectivos desvio padrão do teor de lignina. Os valores entre parêntesis indicam o número de réplicas (n).

a) Para ensaios com mesófilas I

b) Para ensaios com mesófilas II

a)

Fonte de carbono solúvel bagaço de uva (Φ vs massa)		mesófilo I					
		sem fonte de carbono			glucose		
		LS (g/L)	LPA (g/L)	LT (g/L)	LS (g/L)	LPA (g/L)	LT (g/L)
bagaço de uva 0,40mm 1g	0,060±0,019 (4)	1,311±0,549 (4)	1,371±0,535 (4)	0,068±0,005 (2)	0,519±0,181 (2)	0,587±0,1765 (2)	
bagaço de uva 0,40mm 0,75g	0,052±0,005 (2)	0,975±0,116 (2)	1,028±0,112 (2)	-	-	-	
bagaço de uva 0,40mm 0,50g	0,039±0,005 (2)	0,090 (1)	0,126 (1)	-	-	-	
bagaço de uva 0,40mm 0,25g	0,031±0,017 (4)	0,610±0,385 (4)	0,641±0,385 (4)	0,015±0,008 (2)	0,233±0,048 (2)	0,248±0,041 (2)	
bagaço de uva 0,25mm 1g	0,088±0,0005 (2)	0,656±0,181 (2)	0,744±0,181 (2)	0,041±0,018 (2)	1,007±0,491 (2)	1,048±0,474 (2)	
bagaço de uva 0,25mm 0,50g	0,040±0,003 (2)	0,580±0,553 (2)	0,621±0,550 (2)	-	-	-	
bagaço de uva 0,25mm 0,25g	0,029±0,003 (4)	0,817±0,1699 (2)	0,846±0,174 (2)	0,016±0,007 (2)	0,507±0,185 (2)	0,523±0,192 (2)	
bagaço de uva <0,25mm 1g	0,0259 (1)	0,845 (1)	0,870 (1)	0,068 (1)	0,648 (1)	0,716 (1)	
bagaço de uva <0,25mm 0,50g	0,085±0,000 (2)	0,390±0,0406 (2)	0,475±0,041 (2)	-	-	-	
bagaço de uva <0,25mm 0,25g	0,062±0,030 (4)	0,401±0,340 (4)	0,462±0,326 (4)	-	-	-	

b)

Fonte de carbono . solúvel		mesófilo II								
		sem fonte de carbono			glucose			acetato		
		LS (g/L)	LPA (g/L)	LT (g/L)	LS (g/L)	LPA (g/L)	LT (g/L)	LS (g/L)	LPA (g/L)	LT (g/L)
bagaço de uva(Φ vs massa)										
meio base	0,025 ±0,007 (2)	0,136 (1)	0,156 (1)	0,018 (1)	0,019 (1)	0,037 (1)	0,028 (1)	0,124 (1)	0,152 (1)	
bagaço de uva 0,40mm 1g	-	-	-	0,040 (1)	-	-	0,038 ±0,003 (2)	0,464 ±0,194 (2)	0,503 ±0,190 (2)	
bagaço de uva 0,40mm 0,75g	-	-	-	0,023 ±0,004 (2)	0,182 ±0,06 (2)	0,206 ±0,061 (2)	0,035 ±0,002 (2)	0,197 ±0,024 (2)	0,232 ±0,027 (2)	
bagaço de uva 0,40mm 0,50g	0,023 (1)	0,198 (1)	0,221 (1)	0,022 ±0,001 (2)	0,046 ±0,056 (2)	0,068 ±0,056 (2)	0,031 ±0,002 (2)	0,192 ±0,032 (2)	0,222 ±0,028 (2)	
bagaço de uva 0,40mm 0,25g	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
bagaço de uva 0,25mm 1g	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
bagaço de uva 0,25mm 0,50g	0,022 (1)	0,303 (1)	0,325 (1)	0,0203 ±0,001 (2)	0,186 (1)	0,206 (1)	0,026 ±0,002 (2)	0,213 ±0,262 (2)	0,239 ±0,260 (2)	
bagaço de uva 0,25mm 0,25g	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
bagaço de uva <0,25mm 1g	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
bagaço de uva <0,25mm 0,50g	0,067 (1)	0,861 (1)	0,928 (1)	0,021 ±0,001 (2)	-	-	0,024 ±0,003 (2)	0,107 ±0,084 (2)	0,130 ±0,081 (2)	
bagaço de uva <0,25mm 0,25g	-	-	-	-	-	-	-	-	-	

Nos ensaios com o branco (biomassa bacteriana e meio base) obtiveram-se alguns resultados positivos para a diferença entre os sólidos suspensos voláteis (SSV) e o teor de proteína, indicando provavelmente a presença de substâncias húmicas (restos de células mortas, substâncias poliméricas residuais entre outros), não sendo estes valores englobados na tabela, por não se considerarem ligninas. Para a maioria das situações estes valores deram próximo de zero. Não foram descontados os valores positivos nos ensaios de biodegradação com bagaço por se considerarem células mortas na sua maioria, pois tiveram sujeitas a elevados períodos de carência de substrato.

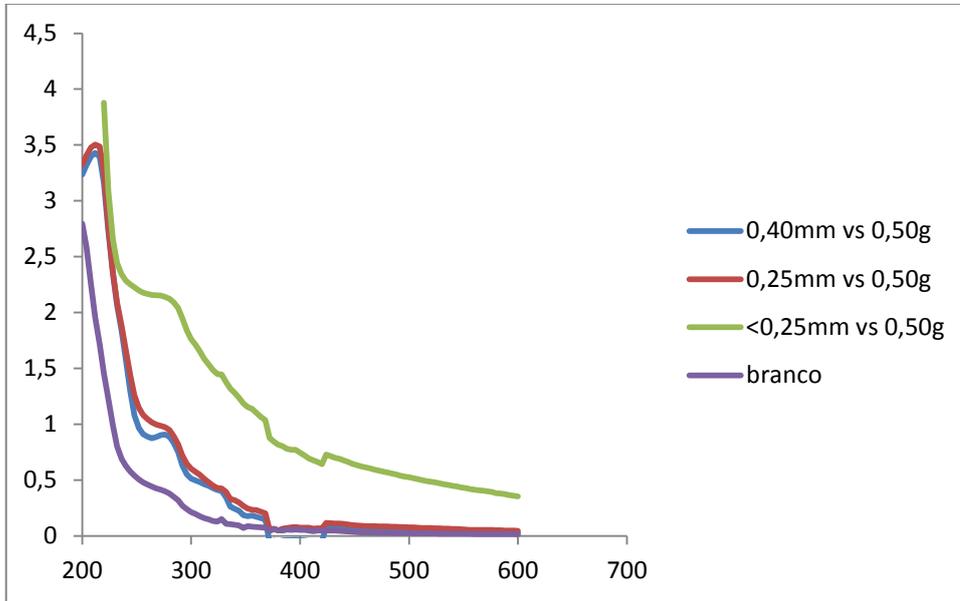
Os compostos fenólicos (Tabela 5.10) residuais no final dos ensaios de biodegradação indicam diferenças significativas entre os testes com mesófilas I e II. De acordo com obtido para o teor de proteínas (Tabela 5.8), CQO (Tabela 5.6) e taxa específica média de produção de biogás (Tabela 5.5) o teor de compostos fenólicos para o inóculo mesófilas II é mais baixo, apontando uma degradação mais eficiente dos compostos solúveis lixiviados do bagaço de uva neste caso. A diferença de inóculos usados nos testes em regime mesófilo indica uma resposta diferente em termos de degradação, sendo interessante explorar este aspecto futuramente.

Tabela 5.10 - Valores médios e respectivos desvio padrão da concentração de fenóis. Os valores entre parêntesis indicam o número de réplicas (n).

Fonte de carbono . solúvel	mesófilo I	mesófilo II		
	concentração de fenóis no final (mg GAE/L)	concentração de fenóis no final (mg GAE/L)		
bagaço de uva (Φ vs massa)	sem fonte de carbono	sem fonte de carbono	glucose	acetato
meio base	0,0 (1)	4,5±,9 (2)	0,5 (1)	0,5 (1)
bagaço de uva 0,40mm 1g	99,6±4,0 (2)	-	26,9±12,7 (2)	24,3±2,8 (2)
bagaço de uva 0,40mm 0,75g	69,8±16,4 (2)	1,5 (1)	25,4±3,1 (2)	18,8±1,2 (2)
bagaço de uva 0,40mm 0,50g	26,9±0,9 (2)	7,9±1,9 (2)	9,4±1,5 (2)	13,8±0,9 (2)
bagaço de uva 0,40mm 0,25g	17,1±9,3 (2)	-	-	-
bagaço de uva 0,25mm 1g	-	-	-	-
bagaço de uva 0,25mm 0,50g	350±4,3 (2)	9,2±0,1 (2)	82,5±0,1 (2)	10,1±1,2 (2)
bagaço de uva 0,25mm 0,25g	103±4,0 (2)	-	-	-
bagaço de uva <0,25mm 1g	-	-	-	-
bagaço de uva <0,25mm 0,50g	31,7±4,6 (2)	-	5,3 (1)	6,1±0,6 (2)
bagaço de uva <0,25mm 0,25g	14,0±7,4 (2)	-	-	-

Na Figura 5.10 estão representados os espectros traçados para as diferentes granulometrias, para a determinação da lignina solúvel. A partir destes pode-se ter uma ideia sobre o teor de lignina solúvel, através dos picos de absorção para o comprimento de onda típico para este tipo de lignina (280 nm) (Tabela 4.2). Para a mesma massa o pico a 280nm, não observado para o ensaio branco, acentua-se à medida que a granulometria diminui, indicando uma presença de lignina solúvel em meio ácido mais elevada para o bagaço Φ <0,25 mm, possivelmente devido a uma lixiviação mais acentuada.

a)



b)

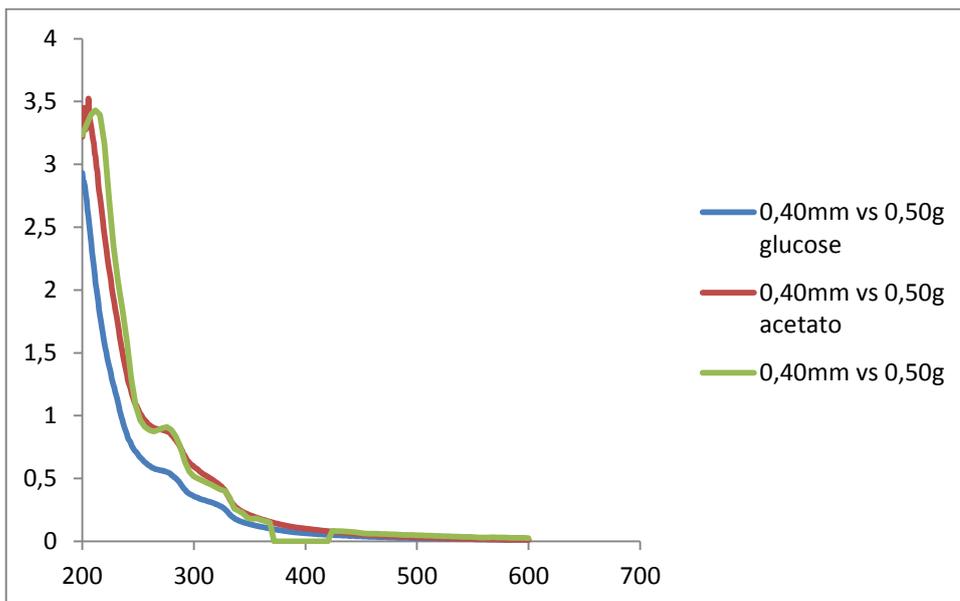


Figura 5.8 a) e b) - Espectros de UV-visível do sobrenadante das soluções recolhidas após a precipitação da lignina em meio ácido.

Em meio mesófilo, em algumas situações, após a precipitação da lignina em meio ácido observou-se a formação de bandas de absorvência na região do ultravioleta, por volta dos 320 nm (Figura 5.8). Este pico pode ser atribuído à presença de diversos compostos no meio, incluindo compostos fenólicos. Os compostos fenólicos estão naturalmente presentes no bagaço de uva. Porém, a lignina é uma macromolécula polifenólica (Mussato e outros., 2006) e o aparecimento de um novo pico a 320 nm pode dever-se à formação de compostos fenólicos originados pela degradação desta em meio ácido.

6. Conclusão e perspectivas de trabalho futuro

Atendendo à elevada quantidade de resíduos de agro-indústrias gerados a nível nacional, cerca de 175 000 ton/ano (Silva, 2003) e a nível mundial, encontrar vias alternativas para a reutilização, reciclagem ou valorização destes subprodutos é cada vez mais premente. Neste contexto, dada a relevância e actualidade do assunto em questão, procurou dar-se no presente trabalho um pequeno contributo, quer para o desenvolvimento e implementação de sistemas de reutilização de bagaço de uva como matéria-prima para a valorização orgânica e energética, quer para a diminuição dos impactos ambientais gerados pela deposição directa destes resíduos sólidos nos ecossistemas.

Como sistema de valorização energética propôs-se a digestão anaeróbia, que tem como principal vantagem a produção de biogás (essencialmente metano e dióxido de carbono), um dos subprodutos directos do metabolismo anaeróbio. Atendendo a que a produção de vinhos também pode gerar efluentes líquidos, propôs-se mais especificamente, uma co-digestão anaeróbia de resíduos sólidos (substratos complexos) e efluentes ricos em substâncias solúveis.

A co-remediação do bagaço de uva foi efectuada em sistemas anaeróbios descontínuos, em regime mesófilo, por um período de cerca de 30 dias, tendo-se avaliado a biodegradabilidade do resíduo, bem como o seu potencial de produção de biogás. Os ensaios de lixiviação dos componentes de bagaço para a fase aquosa contribuíram para entender e consolidar os mecanismos envolvidos nos ensaios de biodegradabilidade.

Após a sucinta contextualização de temática subjacente ao estudo desenvolvido no presente trabalho, salientam-se alguns dos principais aspectos apreendidos, que a seguir se descrevem:

- A lixiviação de compostos do bagaço de uva para a fase aquosa ocorre de forma acentuada nas primeiras horas de ensaio, entre 90-100% ao final de 30 minutos, dependendo da granulometria. O teor de compostos lixiviados aumenta com a massa de bagaço e com a diminuição da granulometria (para \emptyset 0,40mm e 1g de bagaço lixivia-se apenas cerca de 42% do TOC lixiviado para \emptyset <0,25 e 1g).

- Pelos ensaios de biodegradabilidade pode distinguir-se a lixiviação de dois grandes grupos de compostos, o primeiro grupo constituído por compostos rapidamente lixiviados e metabolizados, no início da reacção, que permitiu a quantificação de SMA I, e o segundo que decorre com alguns dias de ensaio (cerca de 12 - 16 dias), período no qual foi quantificado a SMA II.

- A co-remediação anaeróbia de bagaço revelou um aumento dos valores da actividade metanogénica específica (SMA) com a diminuição da granulometria, admitindo-se mesmo a existência de processos inibitórios para a granulometria mais baixa e massa elevada (SMA I para Ø 0,40mm e 1g de $0,117 \pm 0,012$ L biogás / (gSSV • d) e para Ø <0,25mm e 1g de 0,043 L biogás / (gSSV • d)). A adição de substratos solúveis directos das bactérias fermentativas e das arquea metanogénicas implicou num aumento dos valores de SMA II, em particular para granulometrias mais baixas (Tabela 5.4b).

-O potencial de produção de biogás foi em média, ao final de 28 - 30 dias de ensaio, mais elevado para a granulometria Ø 0,40mm e 1g enriquecida com glucose (106,8 mL biogás / (gSSV • d)).

- O tipo de inóculo parece ter uma influência determinante nos compostos menos facilmente biodegradáveis tendo-se obtido quer valores de CQO residual mais baixos (tabela 5.6), quer um potencial de produção de biogás em média mais elevado (tabela 5.5) para o inóculo mesófilo II.

- De facto, os resultados obtidos para os teores de lignina e fenóis no final dos ensaios corroboram a ideia referida no parágrafo anterior. Estes valores foram em geral mais baixos quando se utiliza o inóculo mesófilo II, corroborando a ideia deste inóculo ser mais eficiente na metabolização destes compostos lixiviados do bagaço de uva (tabela 5.9 e tabela 5.10). Neste caso, a biodegradação destes compostos pode ser confirmada por comparação dos valores residuais no final do ensaio (tabelas 5.1 e 5.2) com os valores característicos dos lixiviados, (tabelas 5.8b, 5.9b e 5.10), sendo geralmente significativamente mais baixos. Por exemplo, para Ø 0,40mm e 0,50g o teor de fenóis nos lixiviados foi de 58,2mg GAE / L e no resíduo dos ensaios com mesófilos II foi de apenas $7,9 \pm 1,9$ mg GAE /L.

No sentido de aprofundar a investigação neste domínio, e no seguimento do trabalho experimental desenvolvido, propõe-se alguns aspectos de trabalho futuro, que servirão não só para corroborar alguns dos resultados já obtidos, mas também para se ter uma compreensão mais completa do processo de biodegradação anaeróbia e da sua viabilidade como tecnologia de valorização.

Numa primeira análise os ensaios de lixiviação deverão ser consolidados, a fim de se poderem definir melhor o tipo de compostos lixiviados, bem como a velocidade de lixiviação. Esta caracterização mais aprofundada permitirá actuar nas condições impostas na biodegradação do bagaço de uva, optimizando-as.

Relativamente aos ensaios de biodegradação seria interessante testar culturas termófilas, para se poder estabelecer uma comparação no potencial de produção de biogás. Sugere-se ainda a realização de ensaios em condições abióticas a fim de se avaliarem os mecanismos físico-químicos dominantes no processo.

O efeito de outras co-culturas, nomeadamente de bactérias sulfato-redutoras, na degradação de compostos menos susceptíveis de degradação biológica como lignina e fenóis, será outro aspecto a aprofundar. Neste contexto, inóculos diferentes poderão aumentar a susceptibilidade dos compostos à biodegradação. Por fim, testar a co-remediação de compostos aromáticos xenobióticos presentes em efluentes descarregados em ETAR'S municipais ou ETARI'S dedicadas, poderão ser uma mais valia a acrescentar às tecnologias em desenvolvimento.

Este vasto conjunto de informação, depois de compilada, poderá ajudar na definição de estratégias a implementar, que permitam, quer o aumento da produtividade em biogás (metano), quer a remoção de compostos xenobióticos presentes nos resíduos industriais e domésticos.

Bibliografia

Angelidaki I, Petersen SP, Ahring BK (1990) Effects of lipids on thermophilic anaerobic digestion and reduction of lipid inhibition upon addition of bentonite. *Appl Microbiol Biotechnol.* 33: 469-472.

Alves M. (1998). Estudo e caracterização de digestores anaeróbios de leito fixo. Dissertação de Doutoramento, Escola de Engenharia, Departamento de Eng^a Biológica, Universidade do Minho.

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

Bernardini D. (1971). Tecnologia Olearia. Casa Editrice, Tecnologie S. R. R., Via Dell'Accademia del Cimento 103: Roma.

Brás R., Ferra M., Pinheiro H., Gonçalves I. (2001). *Batch tests for assessing decolourisation of azo dyes by methanogenic and mixed cultures.* *Journal of Biotechnology.* 89, 2-3,155-162.

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

Campos J. (1999). Tratamento de esgotos sanitários por processo anaeróbio e disposição controlada no solo. PROSAB. Rio de Janeiro.

Chernicaró C. (1997). Princípios do Tratamento Biológico de Águas Residuais, Reactores anaeróbios. Belo Horizonte, 5: 246.

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

Costa, J.E.; Belchior, A.P. (1972). Laboração e utilização dos produtos secundários da vinificação. Relatório nacional, Lisboa.

Detroy R.W., Hesseltine C.W. (1978). Availability and utilization of agricultural and agro industrial wastes. *Process biochemistry.* 13 (9): 2-8.

Dinsdale R., Hawkes F., Hawkes, D., (1996). *The mesophilic and thermophilic anaerobic digestion of coffee waste containing coffee grounds.* *Water Research.* 30: 371-377.

Famuyiwa O., Ough C. (1982). *Grape pomace: possibilities as animal feed. American Journal of Enology and Viticulture.* 39(2): 44-46.

Fantozzi F., Costarelli I., Buratti C. (2005). *Laboratory scale anaerobic digestion at the Italian Biomass Research Centre.* Biomass Research Centre - University of Perugia.

Fantozzi F., Buratti C. (2009). *Biogas production from different substrates in an experimental Continuously Stirred Tank Reactor anaerobic digester.* Bioresource Technology. 100: 5783-5789.

Fernandes N. (2010). *Actividade antioxidante das plantas medicinais Angolanas.* Dissertação de mestrado em Bioquímica, UBI, Portugal.

Gallert C., Henning A., Winter J. (2003). *Scale-up of anaerobic digestion of the biowaste fraction from domestic wastes.* Water Research 37: 1433-1441.

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

Harada H, Uemura S, Momonoi S (1994). *Interaction between sulfate-reducing bacteria and methane-producing bacteria in UASB reactors fed with low strength wastes containing different levels of sulfate[J].* 28: 355-367.

Ikawa M., Schaper T.D., Dollard C.A., Sasner J.J. (2003). *Utilization of Folin-Ciocalteu Phenol Reagent for the Detection of Certain Nitrogen Compounds”; Journal of Agricultural and Food Chemistry; 51; 1811-1815.*

Ince O., Anderson G. and Kasapgil B. (1994). *Control of organic loading rate using the specific methanogenic activity test during start-up of an anaerobic digestion system.* Water Research. 29: 349-355.

Koppar A., Pullammanappallil P. (2008). *Single-stage, batch, leach-bed, thermophilic anaerobic digestion of spent sugar beet pulp.* Bioresource Technology. 99: 2831-2839.

Larangeira C. (1998). *Aproveitamento de vinhaças de aguardentes vnicas em acetificação: um valor de opção para a indústria vinagreira.* Dissertação para obtenção do grau de mestre em ciência e tecnologia de alimentos - UTL: Lisboa.

Lettinga G., Field J., Van Lier J., Zeeman G. e Pol L.W.H. (1997), *Advanced anaerobic wastewater treatment in the near future.* Water Science Technology, 35(10): 5-12.

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

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

Magnier L. (1991). *Utilisation des sous-produits de la vigne dans l'alimentation animale. Options Méditerranéennes - Série Séminaires*, 1: 89-99.

Mateos F., Narvion J. (1977). *Tratamento biológico de las aguas residuales de las destilerías de alcohol vínico, Ingeniería Química*. 105-116.

Nerantzis E. and Tataridis P. (2006). Integrated Enology- Utilization of winery by-products into high added value products. *Journal of Science & Technology*. 1: 1-12.

O'Rourke J. (1968). *Kinetics of anaerobic waste treatment at reduced temperatures*. Ph. D. thesis, Stanford University, California.

Pato O. (1988). *O vinho sua preparação e conservação*, 8ª ed., Livraria Clássica Editora: Lisboa.

Perle M, Kimchie S, Shelef G (1995). Some biochemical aspects of the anaerobic degradation of dairy wastewater. *WaterRes*, 29: 1549-1554.

Pompermayerl R., Júnior D. (2003). Estimativa do potencial brasileiro de produção de biogás através da biodigestão da vinhaça e comparação com outros energéticos. ENCONTRO DE ENERGIA NO MEIO RURAL, 3, Campinas.

Regulamento (CE) n.º 1493/1999 do Conselho - *Jornal Oficial das Comunidades Europeias (PT)* L179 - 14.7.1999, 1-84

Remóna M.A., González B.A., Rosa Z.R., Lacueva A.C., Estruch R., González M.A.M., Espino J.D., Raventosa R.M.L. (2009). Rapid Folin-Ciocalteu method using microtiter 96-well plate cartridges for solid phase extraction to assess urinary total phenolic compounds, as a biomarker of total polyphenols intake; *Analytica Chimica Acta*; 634: 54-60.

Rice A. (1976). *Solid waste generation and by-product recovery potential from winery residues*. Copyright © 1976 by the American Society for Enology and Viticulture. 27:1:21-26

Roginsky V., Lissi E.A. (2005). Review of methods to determine chain-breaking antioxidant activity in food; *Food Chemistry*; 92: 235-254.

Schmidt J., Ahring B. (1994). Extracellular polymers in granular sludge from different upflow anaerobic sludge blanket (USAB) reactors. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 42, 2-3: 457-462.

Silva L. (2003). Caracterização dos subprodutos da vinificação. *Millenium*. Volume 28.

Sirirote P., Watts D. (2007). Effect of sulfate on the methanogenic activity of a bacterial culture from a brewery wastewater during glucose degradation. *Journal of Environmental Sciences*. 19(9):1025-1027.

Sorensen A., Ahring B.(1993). Measurements of the specific methanogenic activity of anaerobic digester biomass. *Applied Microbiology and Biotechnology*. Volume 40.

Spangheroa M., Salemb A., Robinsond P. (2009). *Chemical composition, including secondary metabolites, and rumen fermentability of seeds and pulp of Californian (USA) and Italian grape pomaces*. 152(3): 243-255.

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

Torre-Carbot K., Jauregui O., Gimeno E., Castellote A.I., Raventós R., Sabater M.C.P. (2005). Characterization and Quantification of Phenolic Compounds in Olive Oils by Solid-Phase Extraction, HPLC-DAD, and HPLC-MS/MS; *Journal of Agricultural and Food Chemistry*; 53: 4331- 4340.

Turkmen N., Sari F., Velioglu Y.S. (2006). Effects of extraction solvents on concentration and antioxidant activity of black and black mate tea polyphenols determined by ferrous tartrate and Folin- Ciocalteu methods *Food Chemistry*; 99: 835-841.

Van Haandel A. (1994). *Influence of the digested cod concentration on the alkalinity requirement in anaerobic digesters*, *Water Science Tech.*, 30: 23-24.

Cibergrafia

[@1]<http://www.ivv.min-agricultura.pt/np4/163.html> (15/06/2011)