



**INSTITUTO LATINO-AMERICANO DE CIÊNCIAS
DA VIDA E DA NATUREZA**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
BIOCIÊNCIAS**

**DETERMINAÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS VOLÁTEIS EM LODO ANAERÓBIO POR
EXTRAÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO E CROMATOGRÁFIA GASOSA ACOPLADA A
DETECTOR DE IONIZAÇÃO POR CHAMA**

CAMILA JONSSON OLIVEIRA

Foz do Iguaçu, Estado do Paraná

2023



**INSTITUTO LATINO-AMERICANO DE CIÊNCIAS
DA VIDA E DA NATUREZA**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
BIOCIÊNCIAS**

**DETERMINAÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS VOLÁTEIS EM LODO ANAERÓBIO POR
EXTRAÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO E CROMATOGRÁFIA GASOSA ACOPLADA A
DETECTOR DE IONIZAÇÃO POR CHAMA**

CAMILA JONSSON OLIVEIRA

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências, do Instituto Latino-Americano de Ciências da Vida e da Natureza, da Universidade Federal da Integração Latino-Americana, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Aline Theodoro Toci

Coorientadora: Prof^a. Dr^a. Marcela Boroski

Foz do Iguaçu, Estado do Paraná

2023

CAMILA JONSSON OLIVEIRA

**DETERMINAÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS VOLÁTEIS EM LODO ANAERÓBIO POR
EXTRAÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO E CROMATOGRAFIA GASOSA ACOPLADA A
DETECTOR DE IONIZAÇÃO POR CHAMA**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências, do Instituto Latino-Americano de Ciências da Vida e da Natureza, da Universidade Federal da Integração Latino-Americana, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências.

BANCA EXAMINADORA

Dr(a). Aline Theodoro Toci
Orientador(a)
UNILA

Dr(a). Daniella Rodrigues Fernandes Noronha
Examinador(a)
UFRJ

Dr(a). Márcia Regina Becker
Examinador(a)
UNILA

Foz do Iguaçu, Estado do Paraná, 06 de junho de 2023.

Catálogo elaborado pelo Setor de Tratamento da Informação
Catálogo de Publicação na Fonte. UNILA - BIBLIOTECA LATINO-AMERICANA - PTI

O48

Oliveira, Camila Jonsson.

Determinação de ácidos graxos voláteis em lodo anaeróbio por extração líquido-líquido e cromatografia gasosa acoplada a detector de ionização por chama / Camila Jonsson Oliveira. - Foz do Iguaçu-PR, 2023.

81 f.: il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal da Integração Latino-Americana. Instituto Latino-Americano de Ciências da Vida e da Natureza. Programa de Pós-Graduação em Biociências. Foz do Iguaçu-PR, 2023.

Orientador: Dra. Aline Theodoro Toci.

Coorientador: Dra. Marcela Boroski.

1. Biogás. 2. Ácidos graxos voláteis. 3. Biodigestor de lagoa coberta. 4. Cromatografia em fase gasosa. 5. Validação de método. I. Toci, Aline Theodoro. II. Boroski, Marcela. III. Título.

CDU 620.956

AGRADECIMENTOS

À Deus, meu libertador, o rochedo em que me refugio, a Ele toda a glória.

À toda a minha família, sobretudo meus pais Edison e Doralina. Meus irmãos Raphael e Vanessa, sobrinhos e cunhada. Agradeço ao S. Luís, D. Íris e à Ana que me acolheram na sua casa como filha. Obrigada por tudo.

Agradeço à Prof^a Aline e à Prof^a Marcela, pela orientação, incentivo, correções, seminários de pesquisa e momentos de descontração. O que aprendi com vocês vou levar pra sempre. Muito obrigada pelo acolhimento e confiança!

À Emilene, que não só contribuiu na validação e análise de amostras, mas enfrentou comigo jornadas de 14 horas de trabalho no laboratório, em plena pandemia. Você me ensinou sobre pesquisa, estatística, química. Tenho certeza que aprendemos muito. Obrigada pelas conversas, caronas e puxões de orelha.

À Priscila, pela paciência, e auxílio em muitos momentos no laboratório.

Aos colegas do Laboratório de Estudos Interdisciplinares do Meio Ambiente e Alimentos (LEIMAA), Aldo, Ana Paula, Christian, Martha, Emilene, pelos momentos de descontração, apoio, incentivo e ensinamentos. Também aos colegas do Laboratório Multiusuário Engenheira Enedina Alves Marques (LEAM), Natalie, Bianca, Mariana, Betânia.

Ao Erwin, secretário do Programa de Pós-Graduação em Biociências (PPG-BC), sempre tão disposto em me ajudar e aos colegas do mestrado.

Aos colegas e amigos que fiz durante o mestrado, Bruno, Renata, Laura, Elizandra, Gabriela, Daniela. Obrigada por tantos momentos bons!

À Taynara, colega de mestrado e que me auxiliou na organização da rotina e na escrita da dissertação. Obrigada por tanta paciência e disposição!

Mais uma vez, agradeço à Daniela, por todo o apoio e incentivo.

À Luana, pelos conhecimentos compartilhados sobre biodigestores.

Aos psicólogos da Seção de Psicologia (SEPSICO) da Unila, em especial à Vanessa e o Rodrigo. Também às pedagogas da Pró-Reitoria de Graduação (PROGRAD/UNILA).

Ao Centro Internacional de Energias Renováveis (Cibiogás-ER), pela e parceria nesse projeto, fornecimento dos materiais e reagentes para essa pesquisa. Também por disponibilizar as amostras dos biodigestores e as dependências do laboratório de

biogás. Agradeço principalmente à Franciele, Juliana, Thiago, por todo apoio e disposição.

Aos outros bolsistas do projeto de reatores semicontínuos. À Sara bolsista da UNILA, Paula e João da UTFPR campus Medianeira, Paula da UNIOESTE campus Cascavel. Muito obrigada pelas explicações e toda colaboração.

À UNIOESTE campus Cascavel, sobretudo o laboratório de Resíduos Agroindustriais, onde operavam os biodigestores que são objeto deste estudo.

À UTFPR campus Medianeira, em especial o Profº Thiago Edwiges, por todo o apoio e por disponibilizar os padrões analíticos utilizados neste estudo.

À Universidade Federal da Integração Latino-Americana (UNILA), sobretudo ao Programa de Pós-Graduação em Biociências (PPG-BC), bem como aos professores, pela oportunidade de estudo, também pela infraestrutura e suporte.

O presente trabalho conta com o apoio da Fundação Parque Tecnológico Itaipu - Brasil (FPTI-BR). Sendo assim, agradeço ao PTI, pela oportunidade e pelo financiamento da bolsa de pesquisa.

OLIVEIRA, Camila Jonsson. 2023. **Determinação de ácidos graxos voláteis em lodo anaeróbio por extração líquido-líquido e cromatografia gasosa acoplada a detector de ionização por chama**. Orientadores: TOCI, Aline Theodoro (orientadora); BOROSKI, Marcela (co-orientadora). 81 f. Dissertação (Mestrado) – PPG-BC (Programa de Pós-Graduação em Biociências), UNILA (Universidade Federal da Integração Latino-Americana), Foz do Iguaçu.

RESUMO

O Brasil é um grande produtor de carne suína. Entretanto, o efluente de suinocultura pode causar diversos prejuízos ambientais. Portanto, para viabilizar o aproveitamento de dejetos animais deve-se diminuir a carga poluente desses resíduos. A digestão anaeróbia é uma tecnologia que permite a estabilização do efluente, além de produzir biogás. Os ácidos graxos voláteis (AGVs) são compostos orgânicos originados durante a produção de biogás, e sua concentração pode prever desequilíbrios do processo, pois o acúmulo de AGVs favorece a redução do pH, diminuindo o rendimento de metano no biogás. Este estudo teve como objetivo desenvolver e validar uma metodologia analítica para determinar a concentração de ácido acético, ácido propiônico, ácido isobutírico, ácido butírico, ácido isovalérico e ácido valérico em amostras de biodigestores do tipo BLC (biodigestor de lagoa coberta), a fim de relacionar os AGVs a outros parâmetros de monitoramento da produção de biogás, e auxiliar na tomada de decisões para garantir a eficiência destes reatores. O planejamento fatorial completo foi empregado para otimização da metodologia de extração líquido-líquido dos AGVs, seguido de análise por cromatografia em fase gasosa com detector de ionização em chama (CG-DIC). Utilizou-se os seguintes parâmetros: solvente extrator (3 níveis), pH (2 níveis) e força iônica (2 níveis). Como resultados foram selecionados a acetona como solvente extrator em pH 3 e a solução saturada do sal bissulfato de potássio, para efeito de *salting out*. A metodologia foi validada, através dos parâmetros linearidade, homocedasticidade, limite de detecção (LD), limite de quantificação (LQ), repetibilidade e recuperação. Os parâmetros de validação atenderam aos critérios do Inmetro. No que se refere ao desempenho dos biodigestores, a produtividade e rendimento de biogás, produtividade e rendimento de metano, se apresentaram inferiores à literatura. Porém, estes parâmetros dependem da composição do substrato e carga orgânica volumétrica (COV). Por outro lado, o teor de metano, razão de FOS/TAC, concentração de AGVs, demonstraram-se de acordo com a literatura.

Palavras-chave: biogás; ácidos graxos voláteis; biodigestor de lagoa coberta; cromatografia em fase gasosa; validação de método.

OLIVEIRA, Camila Jonsson. 2023. **Determinación de ácidos grasos volátiles en lodo anaeróbico por extracción líquido-líquido y cromatografía de gases acoplada a un detector de ionización por llama**. Acesores: TOCI, Aline Theodoro (asesor); BOROSKI, Marcela (co-asesor). 81 h. *Disertación (Maestría) – PPG-BC (Programa de Postgrado en Biociencias), UNILA (Universidad Federal de la Integración Latinoamericana), Foz do Iguaçu.*

RESUMEN

Brasil es un importante productor de carne de cerdo. Sin embargo, los efluentes porcinos pueden causar varios tipos de daños ambientales. Por tanto, para viabilizar el uso de estiércol animal, se debe reducir la carga contaminante de estos residuos. La digestión anaeróbica es una tecnología que permite la estabilización del efluente, además de producir biogás. Sin embargo, el desarrollo de microorganismos anaerobios y, en consecuencia, la producción de biogás, depende del seguimiento de algunos parámetros. Entre estos destacan los ácidos grasos volátiles (AGVs), que son compuestos orgánicos originados durante la segunda etapa de las reacciones para la producción de metano. La concentración de estos compuestos puede predecir el desequilibrio del proceso, ya que la acumulación de AGVs favorece la reducción del pH, reduciendo el rendimiento de metano en el biogás. Por lo tanto, en este estudio se determinó la concentración de ácidos grasos volátiles en muestras de biodigestores tipo BLC (biodigestor de laguna cubierta), con el fin de relacionar los AGV con otros parámetros para monitorear la producción de biogás, y ayudar en la toma de decisiones. para asegurar la eficiencia de estos reactores. Se utilizó el diseño factorial completo para optimizar la metodología de extracción líquido-líquido de los AGVs. Se utilizaron los siguientes parámetros: solvente extractor (3 niveles), pH (2 niveles) y fuerza iónica (2 niveles). Como resultados, se seleccionó acetona como solvente extractor a pH 3 y la solución saturada de sal de bisulfato de potasio, por efecto de salinización. La metodología fue validada a través de los parámetros linealidad, homocedasticidad, límite de detección (LD), límite de cuantificación (LQ), repetibilidad y recuperación. Los parámetros de validación cumplieron con los criterios de Inmetro. Los AGVs se analizaron mediante cromatografía de gases con detector de ionización de llama (GC-DIL). Con respecto al desempeño de los biodigestores, la productividad y rendimiento de biogás, la productividad y rendimiento de metano, fueron inferiores a la literatura. Sin embargo, estos parámetros dependen de la composición del sustrato y la carga orgánica volumétrica (COV). Por otro lado, el contenido de metano, la relación FOS/TAC, la concentración de AGVs, mostraron estar de acuerdo con la literatura.

Palabras clave: *biogás; ácidos grasos volátiles; biodigestor de laguna cubierta; cromatografía de gases; validación del método.*

OLIVEIRA, Camila Jonsson. 2023. ***Determination of volatile fatty acids in anaerobic sludge by liquid-liquid extraction and gas chromatography coupled to flame ionization detector***. Advisors: TOCI, Aline Theodoro (advisor); BOROSKI, Marcela (co-advisor). 81 s. *Master's thesis (Master's degree)* – PPG-BC (Graduate Program in Biosciences), UNILA (Federal University of Latin American Integration), Foz do Iguaçu.

ABSTRACT

Brazil is a great producer of swine meat. However, swine manure can cause several types of environmental damage. Therefore, to make the reuse of animal manure viable, the pollutant load of these residues must be reduced. Anaerobic digestion is a technology that allows the stabilization of this effluent, in addition to producing biogas. However, the development of anaerobic microorganisms and, consequently, the production of biogas, depends on the monitoring of some parameters. Among these, volatile fatty acids (VFAs) stand out, which are organic compounds originated during the second stage of reactions for methane production. The concentration of these compounds can predict the imbalance of the process, since the accumulation of VFAs favors the reduction of the pH, reducing the yield of methane in the biogas. Therefore, in this study, the concentration of volatile fatty acids in samples of BLC type biodigesters (covered lagoon biodigester) was determined, in order to relate the VFAs to other parameters for monitoring the production of biogas, and to assist in decision-making for ensure the efficiency of these reactors. The full factorial design was used to optimize the liquid-liquid extraction methodology of the VFAs. The following parameters were used: extractor solvent (3 levels), pH (2 levels) and ionic strength (2 levels). As results, acetone was selected as extractor solvent at pH 3 and the saturated solution of potassium bisulfate salt, for salting out effect. The methodology was validated through the parameters linearity, homoscedasticity, limit of detection (LOD), limit of quantification (LOQ), repeatability and recovery. Validation parameters met Inmetro criteria. The VFAs were analyzed by gas chromatography with flame ionization detector (GC-FID). With regard to the performance of biodigesters, productivity and yield of biogas, productivity and yield of methane, were lower than the literature. However, these parameters depend on substrate composition and organic load rate (OLR). On the other hand, the methane content, FOS/TAC ratio, VFA concentration, were shown to be in agreement with the literature.

Keywords: *biogas; volatile fatty acids; covered lagoon digester; gas phase chromatography; validation method.*

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Etapas das reações bioquímicas envolvidas na digestão anaeróbia.....	19
Figura 2. Ilustração da determinação do limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ) através dos parâmetros da curva analítica.....	41
Figura 3. Cromatograma dos padrões de ácidos graxos voláteis (100 mg L ⁻¹) na coluna TR-Fame, marca Thermo Scientific™.....	44
Figura 4. Cromatograma dos padrões de ácidos graxos voláteis (175 mg L ⁻¹), coluna SPB®-1000, marca SUPELCO.....	45
Figura 5. Gráfico de efeitos do planejamento experimental fatorial completo para o ácido acético.....	47
Figura 6. Gráfico de dispersão dos resíduos para o ácido acético.....	48
Figura 7. Gráfico da concentração de AGV no biodigestor BLC1 (com recirculação) em função do tempo.....	52
Figura 8. Gráfico da concentração de AGV no biodigestor BLC2 (com recirculação) em função do tempo.....	53
Figura 9. Produção volumétrica de biogás e rendimento volumétrico de metano, dos reatores BLC1 e BLC2.....	56

ÍNDICE DE QUADROS

Quadro 1. Principais microrganismos envolvidos na digestão anaeróbia.....	20
Quadro 2. Principais contaminantes do biogás e suas implicações.....	23
Quadro 3. Propriedades físico-químicas dos ácidos graxos voláteis.....	24
Quadro 4. Métodos de titulação para a determinação de AGVs.....	26
Quadro 5. Métodos de espectroscopia para a determinação de AGVs.....	26
Quadro 6. Métodos cromatográficos utilizados para a determinação de AGV.....	28
Quadro 7. Solventes utilizados na extração de AGV e analitos semelhantes.....	29
Quadro 8. Parâmetros de caracterização físico-química dos substratos.....	34
Quadro 9. Parâmetros de monitoramento e frequência de coleta de amostras.....	35
Quadro 10. Experimentos de triagem dos fatores interferentes na extração.....	37
Quadro 11. Variáveis utilizadas para otimização da extração.....	38
Quadro 12. Tempos de retenção dos padrões de AGVs na coluna SPB®-1000.....	45

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Resultados do planejamento fatorial completo.....	46
Tabela 2. Parâmetros de validação metodológica para análise de ácidos graxos voláteis em efluentes de biodigestores.....	49
Tabela 3. Dados da repetibilidade do método para determinação de AGVs.....	49
Tabela 4. Recuperação do método para os AGVs em porcentagem (%).....	50
Tabela 5. Concentração e desvio padrão de AGV no biodigestor BLC1 (com recirculação) (mg L ⁻¹).....	51
Tabela 6. Concentração e desvio padrão de AGV no biodigestor BLC2 (sem recirculação) (mg L ⁻¹).....	52
Tabela 7. Média e desvio padrão dos parâmetros ácido-base dos biodigestores BLC registrados durante a fase de operação.....	54
Tabela 8. Dados de produção e composição de biogás dos reatores BLC.....	55

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A ₀	Coeficiente Linear
A ₁	Coeficiente Angular
ABPA	Associação Brasileira de Proteína Animal
Ac	Ácido acético
AGV	Ácido Graxo Volátil
ANOVA	Análise da Variância
APHA	Associação Americana de Saúde Pública, <i>American Public Health Association</i>
ASBR	Reator Anaeróbio em Batelada
AI	Alcalinidade Intermediária
AT	Alcalinidade Total
B	Intercepto
BLC	Biodigestor de Lagoa Coberta
BRAnMD	Biorreator Anaeróbio De Membrana Dinâmica
Bu	Ácido butírico
Cibiogás-ER	Centro Internacional de Energias Renováveis
CG-DIC	Cromatografia Gasosa Acoplada a Detector de Ionização em Chama
CG-EM/EM	Cromatografia Gasosa com Espectrometria de Massas em Tandem
CLAE-UV-DAD	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência Detector Ultravioleta com Arranjo de Diodos
CLAE-UV	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com Detector Ultravioleta
CNTP	Condições Normais de Temperatura e Pressão
COV	Carga Orgânica Volumétrica
CSTR	Reator Anaeróbio de Tanque Agitado
DA	Digestão Anaeróbia
DAC	Digestor Anaeróbio Convencional
DCM	Diclorometano
DMC	Dimetilcarbonato
DQO	Demanda Química de Oxigênio
ETE	Estação de Tratamento de Esgoto
F	Teste F de <i>Snedecor</i>
FOS/TAC	Razão entre Acidez Total e Alcalinidade Total
GEE	Gases do Efeito Estufa
HUASB	Reator Anaeróbio Híbrido de Manta de Lodo
I-bu	Ácido isobutírico
In-syringe-MSA-DLLME	Microextração Líquido-Líquido Dispersiva Assistida por Agitação Magnética
INMETRO	Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia
IR	Espectroscopia de Infravermelho
I-val	Ácido isovalérico
LD	Limite de Detecção
LLE	Extração Líquido-Líquido
LQ	Limite de Quantificação
Mbar	Milibar, unidade de pressão atmosférica
MEK	Metil etil cetona
MeOH	Metanol
MIBK	Metil isobutil cetona
MIR	Espectroscopia no Infravermelho Médio
mL	Mililitro
MTBE	Éter-butil-terc-butílico
N	Normalidade

N	Número de pontos da curva
Nº CAS	Número do reagente na divisão da Associação Americana de Química, <i>Chemical Abstracts Service</i>
NIR	Espectroscopia no Infravermelho Próximo
OEI	Injeção por Extração Orgânica
P.A.	Para Análise
PE	Ponto de Ebulição
PF	Ponto de Fusão
PFR	Reator de Fluxo Pistonado
pH	Potencial Hidrogeniônico
PI	Padrão Interno
PLS	Regressão Parcial de Mínimos Quadrados
p/p	Peso por peso
Pro	Ácido propiônico
PrVB	Produção Volumétrica de Biogás
PTI	Parque Tecnológico de Itaipu
R ²	Coefficiente de correlação
rpm	Rotações por minuto
RVCA	Rendimento Volumétrico de Metano
SI-LME	Microextração Líquida Seguida de Injeção Sequencial
SO-PLS	Equação de Mínimos Quadrados Parciais Ortogonais e Sequenciais
SPAC	Sistema de Produção de Animais Confinados
SPME	Microextração em Fase Sólida
ST	Sólidos Totais
SV	Sólidos Voláteis
s _y	Desvio padrão
t	Valor da distribuição de t <i>Student</i>
TBP	Tributilfosfato
TOA	Tri-n-octilamina
TRH	Tempo de Retenção Hidráulica
UASB	Reator Anaeróbio de Manta de Lodo
UD	Unidade de Demonstração
UNILA	Universidade Federal da Integração Latino-Americana
UNIOESTE	Universidade Estadual do Oeste do Paraná
USDA	Departamento de Agricultura dos Estados Unidos, do inglês - United States Department of Agriculture
UV-vis	Espectroscopia Ultravioleta-visível
Val	Ácido valérico
v/v	Volume por volume
VOC	Composto Orgânico Volátil
Y _c	y crítico
Y _h	Valor da intensidade de y
x	Valor médio das concentrações
\bar{x}	Valor médio do sinal analítico
X _c	Valor da concentração (mg L ⁻¹)

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	IV
RESUMO	VI
RESUMEN	VII
ABSTRACT	VIII
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	XII
SUMÁRIO	XIV
1 INTRODUÇÃO	17
1.1 Referencial teórico	19
1.1.1 Digestão anaeróbia.....	19
1.1.2 Microrganismos da digestão anaeróbia (DA).....	20
1.1.3 Biodigestores anaeróbios.....	21
1.1.4 Biodigestor de lagoa coberta (BLC).....	22
1.1.5 Composição de biogás.....	22
1.1.6 Ácidos graxos voláteis.....	23
1.1.7 Métodos analíticos para quantificação de AGV.....	25
1.1.7.1 Titulação volumétrica.....	25
1.1.7.2 Espectroscopia.....	26
1.1.7.3 Métodos cromatográficos.....	27
1.1.7.4 Extração líquido-líquido (<i>Liquid-liquid extraction, LLE</i>).....	29
1.2 Justificativa	31
1.3 Hipótese	31
2. OBJETIVO	32
2.1 Objetivo geral	32
2.2 Específicos	32
3. MATERIAL E MÉTODOS	33
3.1 Padrões analíticos, reagentes e materiais	33
3.2 Biodigestores	33
3.3 Inoculação	33
3.4 Substrato	34
3.5 Monitoramento dos reatores	35
3.5.1 Coleta de amostras para análise de AGVs.....	36
3.5.2 Planejamento experimental.....	37
3.5.3 Método de extração líquido-líquido (<i>LLE</i>).....	38

3.6 Análise por Cromatografia Gasosa com detector por ionização por chama (CG-DIC)	38
3.7 Validação da metodologia	39
3.7.1 Preparo de soluções.....	39
3.7.2 Linearidade e homocedasticidade.....	40
3.7.3 Limite de detecção (LD).....	41
3.7.4 Limite de quantificação (LQ).....	41
3.7.5 Repetibilidade (precisão).....	42
3.7.6 Recuperação.....	42
3.7.7 Análise de variância de um fator (<i>One Way ANOVA</i>).....	42
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	44
4.1 Análise cromatográfica	44
4.2 Planejamento experimental	45
4.3 Validação da metodologia	47
4.3.1 Linearidade, LD e LQ.....	47
4.3.2 Repetibilidade.....	49
4.3.3 Recuperação.....	50
4.4 Parâmetros de monitoramento dos biodigestores	50
4.4.1 Concentração e perfil dos ácidos graxos voláteis.....	50
4.4.2 pH, amônio e razão FOS/TAC.....	53
4.4.3 Produção de biogás e metano.....	55
5. CONCLUSÃO	57
6. REFERÊNCIAS	58
APÊNDICES	72
Apêndice A – Gráfico de efeitos das variáveis empregadas no planejamento experimental para ácido propiônico	72
Apêndice B – Gráficos de efeitos das variáveis empregadas no planejamento experimental para ácido isobutírico	72
Apêndice C – Gráficos de efeitos das variáveis empregadas no planejamento experimental para ácido butírico	73
Apêndice D – Gráficos de efeitos das variáveis empregadas no planejamento experimental para ácido isovalérico	73
Apêndice E – Gráficos de efeitos das variáveis empregadas no planejamento experimental para ácido valérico	74

Apêndice F – Gráficos de efeitos das variáveis empregadas no planejamento experimental para ácido octanoico.....	74
Apêndice G – Gráfico de dispersão dos resíduos para o ácido propiônico.....	75
Apêndice H – Gráfico de dispersão dos resíduos para o ácido isobutírico.....	75
Apêndice I – Gráficos dispersão dos resíduos para o ácido butírico.....	76
Apêndice J – Gráficos dispersão dos resíduos para o ácido isovalérico.....	76
Apêndice K – Gráficos dispersão dos resíduos para o ácido valérico.....	77
Apêndice L – Dados da curva analítica para o ácido acético.....	78
Apêndice M – Dados da curva analítica para o ácido propiônico.....	78
Apêndice N – Dados da curva analítica para o ácido isobutírico.....	79
Apêndice O – Dados da curva analítica para o ácido butírico.....	79
Apêndice P – Dados da curva analítica para o ácido isovalérico.....	80
Apêndice Q – Dados da curva analítica para o ácido valérico.....	80
Apêndice R – Ajustes da curva dos ácidos graxos voláteis.....	81

1 INTRODUÇÃO

O Brasil é o quarto maior produtor de carne suína no mundo. Somente em 2021, o país produziu 4.365 mil toneladas deste commodity (USDA, 2022). No mesmo período, o estado do Paraná foi o terceiro maior exportador do país, com participação de 13,9% neste cenário (ABPA, 2022). Sendo assim, o manejo de dejetos animal em Sistemas de Produção de Animais Confinados (SPACs) é fundamental para evitar danos ambientais. Pois o efluente gerado na suinocultura contribui na emissão de gases do efeito estufa (GEE), como metano (CH₄), dióxido de carbono (CO₂) e óxido nitroso (N₂O) e o acúmulo de nutrientes como nitrogênio e fósforo no solo e recursos hídricos (GLIBERT, 2020).

O efluente de suinocultura é a mistura de resíduos produzidos no sistema de criação, como excreta de animais, água de lavagem e outros resíduos (LEITE *et al.*, 2020). O sistema digestivo suíno não digere completamente materiais crus, como grãos de soja ou milho. Portanto, a excreta de suínos possui alto teor de nutrientes que estão presentes nas rações destes animais (MORETTI *et al.*, 2021). As características físico-químicas do dejetos suíno bruto variam conforme fatores como: idade, dieta e estágio da produção (crescimento ou terminação) (TÁPPARO *et al.*, 2020). Desta forma, estima-se que o suíno em fase de terminação (fase adulta) produza, por dia, 4,3 kg de efluentes, com 89% de água (VARMA *et al.*, 2021). Que por sua vez, costumam apresentar Demanda Química de Oxigênio (DQO) de 54.500 mg L⁻¹ e teores de: nitrogênio total de 1.670 mg L⁻¹; fósforo de 415 mg L⁻¹; potássio de 1.070 mg L⁻¹; sólidos totais de 43.559 mg L⁻¹; e sólidos voláteis de 32.235 mg L⁻¹ (MORETTI *et al.*, 2021).

As tecnologias disponíveis para o manejo de dejetos suíno atendem a diferentes propósitos. Dentre elas, há a produção de biofertilizante, digestão anaeróbia, compostagem, etc. No Brasil, a forma mais comum de disposição final dos dejetos pecuários é o seu uso como fertilizante (PALHARES, 2021). Entretanto, o volume de dejetos produzido por criações intensivas de suínos excede a capacidade do solo reaproveitar os nutrientes contidos no biofertilizante (SEGANFREDO *et al.*, 2020). Portanto, o ponto de partida para viabilizar sistemas agrícolas adubados com dejetos animal reside na diminuição da carga poluente desses resíduos (SEGANFREDO, 1999).

Neste cenário, o biodigestor é o sistema de maior viabilidade econômico-financeira para propriedades produtoras de suínos em ciclo completo de médio (650 matrizes) e grande (1.000 matrizes) portes. Além disso, há possibilidade de renda extra da venda de energia elétrica e desta forma, reduzir despesas (AFONSO *et al.*, 2019). O

biodigestor emprega a digestão anaeróbia, processo que ocorre na ausência de oxigênio, no qual a matéria orgânica é convertida em biogás e digestato (FAN *et al.*, 2018). Esta tecnologia é conhecida há muitos séculos, porém só foi descrita nos meados do século XVII (ABBASI *et al.*, 2012).

Normalmente, o biogás bruto é composto de metano (CH₄) (35-75%) e dióxido de carbono (CO₂) (25-55%), além de outros componentes em menor quantidade, como nitrogênio (N₂), oxigênio (O₂) e hidrogênio (H₂) (GAO *et al.*, 2018). Deste modo, a formação do biogás ocorre após quatro etapas de degradação. E a eficiência deste processo depende da ação sinérgica de microrganismos envolvidos (CREMONEZ *et al.*, 2021). Ainda, a literatura aponta que uma das causas de instabilidade em biodigestores é o acúmulo de compostos inibitórios (ácidos graxos voláteis, amônia, sulfeto de hidrogênio, etc) (CRUZ *et al.*, 2021). O excesso de ácidos graxos voláteis (AGV) no processo de digestão anaeróbia (DA), por exemplo, não apenas pode interromper a metanogênese, mas também pode perturbar as demais fases da DA (ALAVI-BORAZJANI *et al.*, 2020). Assim, o rendimento de biogás, especialmente de metano, está relacionado com a concentração de AGV, e estes rendimentos diminuem consideravelmente com o aumento da concentração destes ácidos (MAURUS *et al.*, 2021). Desta forma, o monitoramento da digestão anaeróbia é essencial para obter estabilidade e eficiência na produção de biogás (SUN *et al.*, 2019).

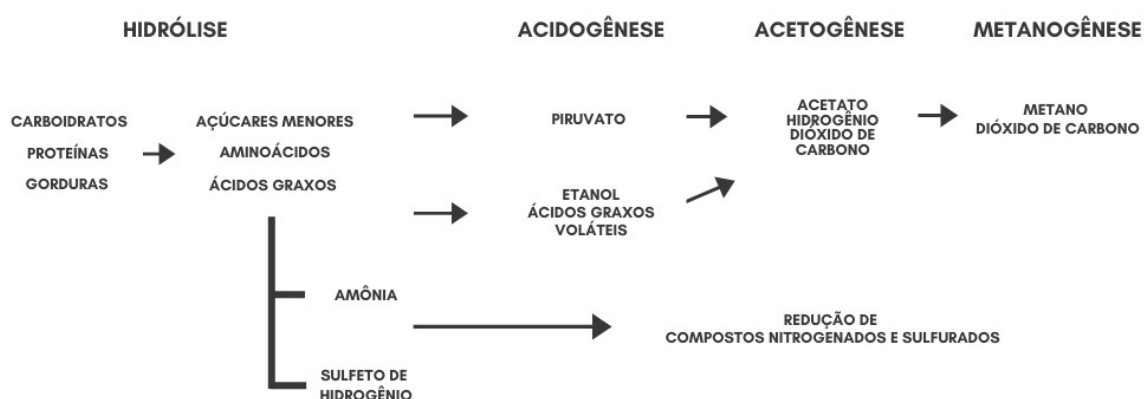
As metodologias de rotina são baseadas em titulação, que quantifica a concentração total dos AGVs. Porém, cada AGV pode influenciar de forma diferente no biodigestor. A literatura relata que o ácido propiônico tende a inibir com mais facilidade o processo do que os demais ácidos (ALAVI-BORAZJANI *et al.*, 2020). Portanto, a quantificação individual dos AGVs traz informações detalhadas do biodigestor, e esta análise pode ser realizada por técnicas cromatográficas (VARGAS-MUÑOZ *et al.*, 2021). Entretanto, há um grande número de variáveis que afetam a determinação analítica de AGV por cromatografia. Assim, se faz necessária a validação de metodologias em análises de AGV (RAPOSO *et al.*, 2015). Bem como, estudos comparativos em amostras reais de biodigestores são escassos (GHIDOTTI *et al.*, 2018). Nesse sentido, este trabalho buscou validar uma metodologia de análise cromatográfica de ácidos graxos voláteis em amostras de substrato de dois biodigestores de lagoa coberta (BLC) alimentados com efluente de suinocultura. Também foram discutidos os dados físico-químicos destes biodigestores.

1.1 Referencial teórico

1.1.1 Digestão anaeróbia

A digestão anaeróbia (DA) é um fenômeno natural, em que microrganismos degradam a matéria orgânica na ausência de oxigênio até produzir um gás denominado como biogás, que contém metano (CH_4) (O'CONNOR *et al.*, 2021). Este processo envolve quatro etapas bioquímicas de degradação: hidrólise, acidogênese, acetogênese e metanogênese (Figura 1). Portanto, a eficiência da DA depende da atividade enzimática e da cooperação metabólica balanceada entre a comunidade microbiana (PASALARI *et al.*, 2021).

Figura 1. Etapas das reações bioquímicas envolvidas na digestão anaeróbia



Fonte: adaptado de DEUBLEIN; STEINHAUSER (2011).

Na fase da hidrólise, polímeros (carboidratos, proteínas e lipídios) são convertidos em moléculas solúveis (açúcares, aminoácidos e ácidos graxos). Na etapa de acidogênese, essas moléculas são transformadas em ácidos graxos voláteis (AGVs). Nesta etapa também são produzidos compostos nitrogenados e sulfurados (KORRES *et al.*, 2013). Na fase seguinte, os microrganismos acetogênicos consomem os AGVs e produzem acetato, hidrogênio (H_2) e dióxido de carbono (CO_2). Por fim, as arqueas metanogênicas utilizam acetato, dióxido de carbono (CO_2), ou compostos metilados para produzir metano (CH_4) e dióxido de carbono (CO_2) (MOESTEDT *et al.*, 2019).

A pressão parcial de hidrogênio interfere na formação dos produtos da acidogênese. Assim, quanto maior a pressão parcial de hidrogênio, menor é a quantidade

produzida de compostos reduzidos, como o acetato (DEUBLEIN; STEINHEUSER, 2011). Sendo assim, em um processo equilibrado, os principais produtos são acetato, dióxido de carbono e hidrogênio. Por outro lado, se houver maior pressão parcial de hidrogênio, ocorre maior formação de ácidos graxos voláteis e etanol. Estes compostos são mais reduzidos do que os produtos convencionais desta fase, e assim, necessitam ser modificados para serem convertidos em biogás (TABATABAEI; GHANAVATI, 2018).

1.1.2 Microrganismos da digestão anaeróbia (DA)

As comunidades microbianas presentes na DA são grupos complexos que variam em sua composição e são altamente dependentes entre si (Quadro 1). Essa dependência é evidente devido à frequência de comensalismo e mutualismo. De maneira geral, compostos orgânicos são degradados com maior eficiência em inóculos que contêm diversos microrganismos do que uma cultura pura. Como também, esta diversidade proporciona maior resistência a compostos tóxicos da biodigestão, devido à maior chance destes membros degradar tais compostos (GLAZER; NIKAIDO, 2007).

Quadro 1. Principais microrganismos envolvidos na digestão anaeróbia

Fase	Domínio	Gênero	Característica comum
Hidrólise e acidogênese	Bacteria	<i>Butyrivibrio, Clostridium, Bacillus, Rhodopseudomonas, Streptococcus, Peptococcus, Campylobacter, Actinomycetes</i> ⁽¹⁾	Bactérias produtoras de hidrogênio: também podem produzir ácido acético, ácido butírico ou etanol.
		<i>Syntrophobacter, Bacteroides, Syntrophomonas, Methylobacterium, Streptosporangium</i> ⁽²⁾	
	Eukarya	<i>Rhodopseudomonas, Pseudomonas, Mycobacterium, Streptomyces</i> ⁽²⁾	Bactérias fermentadoras de hidrogênio: podem sintetizar ácido acético, ácido propiônico ou ácido láctico
Acetogênese	Bacteria	<i>Firmicutes</i> ⁽¹⁾	Filo mais abundante ⁽¹⁾
		<i>Acetobacterium e Sporomusa</i> ⁽¹⁾	Acetogênicas estritas ⁽¹⁾
		<i>Clostridium, Ruminococcus, Eubacterium, Thermoanaerobacter, Treponema</i> ⁽¹⁾	Gêneros com espécies acetogênicas e não-acetogênicas ⁽¹⁾ . As acetogênicas sobrevivem apenas em simbiose com bactérias que consomem hidrogênio ⁽³⁾ .
Metanogênese	Archea	<i>Euryarchaeota</i> ⁽¹⁾	Arqueas anaeróbias e produtoras de metano estritas. Compõem 6 ordens e 31 gêneros ⁽¹⁾

Fonte: 1 - KORRES *et al.*, (2013); 2 - LUO *et al.*, (2019); 3 – DEUBLEIN; STEINHAUSER (2011).

Os gêneros bacterianos *Syntrophobacter*, *Smithella*, *Pelotomaculum* e *Syntrophomonas* são os principais envolvidos na degradação de ácidos graxos voláteis sob condições mesofílicas (MATHAI *et al.*, 2020), e o ácido propiônico é o mais desfavorecido termodinamicamente de ser degradado (LI *et al.*, 2017).

As bactérias que degradam AGVs se multiplicam em velocidades diferentes. Por isso, algo semelhante ocorre em seu metabolismo. O gênero *Pelotomaculum*, por exemplo, possui maior taxa de crescimento, enquanto o *Syntrophobacter* apresenta maior afinidade ao ácido propiônico (MATHAI *et al.*, 2020). A sobrecarga orgânica também pode inibir a proliferação das bactérias envolvidas na degradação do ácido propiônico, butírico, e também do grupo das metanogênicas acetoclásticas (*Methanosaeta*). Do mesmo modo, a sobrecarga também favorece o aumento da população de oxidantes de acetato (*Tepidanaerobacter acetatoxydans*) e arqueas metanogênicas hidrogenotróficas (*Methanoculleus*) (MATHAI *et al.*, 2020).

O domínio *Archea* é constituído por microrganismos estritamente anaeróbios. As arqueas metanogênicas pertencem ao filo *Euryarchaeota*. É classificado conforme o metabolismo em dois grupos principais, as arqueas acetoclásticas produzem metano a partir de acetato, enquanto as hidrogenotróficas produzem metano e consomem hidrogênio e dióxido de carbono (DEUBLEIN; STEINHAUSER, 2011).

1.1.3 Biodigestores anaeróbios

Há algumas décadas, o baixo rendimento e a instabilidade do processo limitavam a digestão anaeróbia. Porém, com o desenvolvimento desta tecnologia, estas desvantagens foram atenuadas. Para tanto, utiliza-se sistemas denominados de reatores de alto rendimento, reatores anaeróbios ou biodigestores. O principal objetivo destes reatores biológicos é tratar efluentes com eficiência, economia, e secundariamente, produzir energia (ABBASI *et al.*, 2012). Os biodigestores são caracterizados pelo regime de alimentação (batelada ou contínuo), forma de alimentação (ascendente ou laminar), concentração de sólidos no reator (digestão sólida >20 %, semissólida 10 a 15 % e úmida <10 %) e sistema de agitação (mistura completa, parcial ou sem mistura) (KUNZ *et al.*, 2019).

Dentre os modelos de digestores existentes, há desde sistemas simples, até reatores sofisticados. O reator anaeróbio operado em batelada sequencial (*ASBR* -

Anaerobic Sequencing Batch Reactor) é um sistema simples utilizado no tratamento de efluentes. Trata-se de um cilindro que, ao fim da operação, tem o seu conteúdo drenado e preenchido novamente até o seu volume inicial. Entretanto, apesar da sua simplicidade, quando o substrato é inserido no reator, pode ocorrer oxidação do inóculo e do substrato (TABATABAEI; GHANAVATI, 2018). Outro modelo de digestor é o reator anaeróbio de fluxo ascendente com manta de lodo (*UASB, Upflow Anaerobic Sludge Blanket*). O substrato é inserido na parte de baixo do digestor, e a parte sólida do substrato permanece no fundo. A degradação ocorre, e o biogás acumula no topo do digestor. Entretanto, este sistema depende de limpeza constante, pois há depósitos de sólidos no fundo do digestor (TABATABAEI; GHANAVATI, 2018).

Neste projeto, serão utilizados biodigestores em escala de bancada, os quais têm a função de simular a operação de biodigestores em grande escala. Os reatores serão operados de forma semi-contínua, ou seja, o substrato alimentará o sistema uma vez por dia (DEUBLEIN; STEINHAUSER, 2011).

1.1.4 Biodigestor de lagoa coberta (BLC)

Este reator em escala real, é um tanque escavado no solo, impermeabilizado e coberto com material geossintético caracterizado pela baixa permeabilidade a fluídos e gases, e suficientemente flexível para acumular biogás (KUNZ *et al.*, 2019). Tem sido utilizado para tratar muitos substratos, mas especialmente dejetos animais (BATSTONE *et al.*, 2015). Este reator possui algumas vantagens como baixo custo de instalação e operação, o que permite a sua utilização em pequenas propriedades rurais (DONG *et al.*, 2019a). Porém, apresenta certas desvantagens como a possível perda de calor e formação de sedimento, além de demandar certo espaço e tempo de operação (DEUBLEIN; STEINHAUSER, 2011).

1.1.5 Composição de biogás

Normalmente, o biogás bruto é composto de metano (CH₄) (35-75%) e dióxido de carbono (CO₂) (25-55%), além de outros componentes em menor quantidade, como nitrogênio (N₂) (8%), oxigênio (O₂) (1%) e hidrogênio (H₂) (GAO *et al.*, 2018) (Quadro 2). De todos os componentes, o de maior importância é o metano, pois ele representa a parte combustível do biogás e, portanto, seu teor influencia diretamente o poder calorífico

inferior (PROBIOGÁS, 2010). O biogás é inflamável quando contém mais de 45% de metano (DEUBLEIN; STEINHAUSER, 2011).

Quadro 2. Principais contaminantes do biogás e suas implicações

Contaminante	Efeito
Sujeira, espuma, partículas sólidas	Entupimento de canos, compressores e tanques para armazenamento de biogás
Água	Corrosão nos dutos, compressores, tanques para armazenamento, devido à reação com H ₂ S e CO ₂ e formação de ácidos. Também pode causar condensação/congelamento devido à alta pressão
H ₂ S	Corrosão nos dutos, compressores e tanques para armazenamento. Concentrações acima de > 5 cm ³ m ⁻³ causam combustão e há formação de SO ₂ e SO ₃ , que também causam corrosão
CO ₂	Baixo poder calorífico
Siloxanos	Formação de SiO ₂ e microcristais de quartzo devido à combustão. Corrosão de velas de ignição, válvulas, cabeças de cilindro e demais superfícies
Hidrocarbonetos	Corrosão de componentes, devido às suas combustões
NH ₃	Corrosão quando dissolvido em água
O ₂	Pode gerar produtos explosivos devido ao alto teor de átomos de oxigênio no biogás
Compostos halogenados	Corrosão de componentes como canos, compressores e tanques

Fonte: KORRES *et al.*, (2013).

1.1.6 Ácidos graxos voláteis

Os ácidos graxos voláteis (AGVs) são compostos orgânicos originados durante a produção de metano (AQUINO; CHERNICHARO, 2005) (Quadro 3). A sua estabilidade indica equilíbrio entre as fases da digestão anaeróbia (DONG *et al.*, 2017). Porém, fatores como mudança de temperatura, sobrecarga orgânica, compostos inibidores no substrato (amônia, antibióticos, etc) podem acarretar o acúmulo de AGVs (GONZÁLEZ-FERNÁNDEZ; GARCÍA-ENCINA, 2009; MECHICHI; SAYADI, 2005). Desta forma, o aumento da concentração desses ácidos pode levar à diminuição do pH, redução de atividade enzimática e/ou metanogênese e aumento da produção de CO₂, prejudicando o rendimento de produção de metano (SIEGERT; BANKS, 2005; WANG *et al.*, 2009).

A concentração de AGVs varia conforme o tipo de biodigestor e substrato (AL SEADI *et al.*, 2008). Recentemente, a literatura indica o monitoramento da concentração de AGVs como “indicadores de alerta precoce”, pois intervenções podem ser adotadas antes da inibição do processo (LI *et al.*, 2014).

Quadro 3. Propriedades físico-químicas dos ácidos graxos voláteis

AGV	Fórmula molecular	Massa molecular (g mol ⁻¹)	Densidade (g mL ⁻¹ a 25 °C)	Solubilidade em água (g L ⁻¹ a 25 °C)	Nº CAS ⁽¹⁾
Ácido acético	C ₂ H ₄ O ₂	60,05	1,049	1000	64-19-7
Ácido propiônico	C ₃ H ₆ O ₂	74,08	0,993	1000	79-09-4
Ácido isobutírico	C ₄ H ₈ O ₂	88,11	0,950	167	79-31-2
Ácido butírico	C ₄ H ₈ O ₂	88,11	0,964	60	107-92-6
Ácido isovalérico	C ₅ H ₁₀ O ₂	102,13	0,925	40,7 ⁽²⁾	503-74-2
Ácido valérico	C ₅ H ₁₀ O ₂	102,13	0,939	24	109-52-4

Legenda: 1 - Associação Americana de Química; 2 - Solubilidade do ácido isovalérico a 20 °C.

Fonte: Pubchem, 2023.

Os mesmos autores também indicam que a relação de ácido propiônico/ácido acético maior que 1,4 pode indicar falha iminente, visto que o ácido propiônico é termodinamicamente mais desfavorável para ser consumido (LI *et al.*, 2017). Marchaim & Krause (1993) também afirmaram que essa relação é um indicador satisfatório para o início da sobrecarga orgânica. WANG *et al.*, (2009) relataram que as concentrações ideais de ácido acético, propiônico e butírico são de 1600, 300 e 1800 mg mL⁻¹, respectivamente. Os níveis de ácidos isobutírico e isovalérico (HILL; HOLMBERG, 1988), bem como de ácido butírico (AHRING *et al.*, 1995) também foram descritos como possíveis indicadores para monitorar o processo de digestão anaeróbia.

A proporção de substrato e inóculo também deve ser considerada. Conforme González-Fernández & García-Encina, (2009), um estudo com dejetos suíno, sob a razão substrato/inóculo de 1:3, a concentração de ácido acético foi de 2.400 mg L⁻¹ e ocorreu o início de inibição na produção do metano. As concentrações de ácido propiônico e butírico encontradas variaram por volta de 320 a 1.100 mg L⁻¹ e 100 a 400 mg L⁻¹, respectivamente. Deste modo, alguns autores defendem que o monitoramento de AGVs não deve ser realizado de maneira isolada e sim, considerando outros fatores, como os níveis de alcalinidade e amônio. Segundo LI *et al.*, (2017), a razão FOS/TAC (acidez total e alcalinidade total) se mostrou útil, mostrando-se preocupante quando atinge valores superiores a 0,3.

1.1.7 Métodos analíticos para quantificação de AGV

1.1.7.1 Titulação volumétrica

A maioria dos ensaios de rotina de AGV são baseados em titulação, devido à simplicidade do método e dos equipamentos, além da possibilidade de mensurar a alcalinidade no mesmo ensaio (CRUZ *et al.*, 2021). Deste modo, o método de *Nordmann* é a metodologia de titulação mais empregada para quantificar acidez volátil e alcalinidade (FOS/TAC) em amostras de biodigestores (PURSER *et al.*, 2014). Porém, esse ensaio apresenta limitações, pois a fórmula do cálculo é aceitável em uma faixa de trabalho limitada. Além disso, a determinação de AGV e alcalinidade são dependentes entre si. De forma que, a precisão do resultado de alcalinidade diminui, conforme aumenta a concentração de AGV (LIU *et al.*, 2021). Ainda, a amostra possui interferentes, como íons (bicarbonato, fosfato, amônio, carboxilatos provenientes do AGV, etc) e sólidos (carbonato de cálcio, fosfato de cálcio, etc). Esses compostos reagem com o ácido da titulação e aumentam o gasto do titulante, o que causa um resultado superestimado (SUN *et al.*, 2016). Outra limitação dessa metodologia é que a titulação apenas determina a concentração total de AGV, impossibilitando monitorar certos índices importantes provenientes da caracterização individual dos tipos de AGVs. Assim sendo, otimizar a precisão e exatidão da metodologia e simplificar o preparo de amostra são dois aspectos significantes do monitoramento de AGV por titulação (SUN *et al.*, 2016).

A metodologia de titulação foi adaptada diversas vezes na literatura (Quadro 4). O método de *Nordmann* relaciona o volume consumido do titulante desde o pH inicial até o pH 5,0 e o volume utilizado na reação para atingir o pH 4,4, para quantificar a alcalinidade total e o total de ácidos, respectivamente (SUN *et al.*, 2016). Por outro lado, a concentração de interferentes ionizados é menor na faixa de pH de 4,70 a 4,20. Dessa forma, MU *et al.*, (2018) realizaram a titulação nesse intervalo de pH. De acordo com os autores, houve interferência de íons e sólidos da amostra. Porém, os autores relataram que a variação da concentração individual dos ácidos entre uma amostra e outra afeta o resultado da titulação, pois o método quantifica o total dos AGVs. Do mesmo modo, LIU *et al.*, (2021) propuseram corrigir as fórmulas do cálculo desses parâmetros, o que permitiu resultados precisos em biodigestores em condições moderadas.

Quadro 4. Métodos de titulação para a determinação de AGVs

Reator	Escala	Substrato	Faixa de trabalho (mg HAc L ⁻¹) ⁽¹⁾	Referência
Reator anaeróbio	Industrial	Lodo de estação de tratamento de esgoto (ETE)	<400	LIN, <i>et al.</i> , 2022
Reator anaeróbio	Industrial	Resíduos agrícolas	<31.000	LIU, <i>et al.</i> , 2021
Não relatado	Não relatado	Amostras de restos de comida	<500	ZAN, <i>et al.</i> , 2020
CSTR ⁽²⁾	Laboratório	Dejeto de frango	<30.000	SUN, <i>et al.</i> , 2016

Legenda: 1 - Acidez total dada como concentração de ácido acético por litro; 2 - Reator contínuo de tanque agitado, do inglês - *continuously stirring tank reactor*.

Fonte: da autora, 2023.

1.1.7.2 Espectroscopia

A espectroscopia de infravermelho (IR) possui muitas aplicações no monitoramento de biodigestores (CRUZ *et al.* 2021), especialmente a espectroscopia de infravermelho próximo (NIR), por apresentar agilidade, sensibilidade e precisão em suas análises. Entretanto, a espectrometria necessita do desenvolvimento de modelos de correlação para prever a composição da amostra (WU *et al.*, 2019). Stockl & Licht (2018) utilizaram regressão parcial de mínimos quadrados (PLS) para prever a concentração do total de AGV e de ácido propiônico. AWHANGBO *et al.*, (2020) otimizaram um método de regressão ao utilizar equação de mínimos quadrados parciais ortogonais e sequenciais (SO-PLS). Todavia, a metodologia ainda apresenta desvantagens como utilizar complexos modelos de calibração, equipamento especializado, manutenção frequente e análise multivariada (WU *et al.*, 2019). Por consequência, a análise de AGV através do uso da espectroscopia também foi adaptada conforme a literatura (Quadro 5).

Quadro 5. Métodos de espectroscopia para a determinação de AGVs

Reator	Escala	Substrato	Método	Faixa de trabalho (mg HAc L ⁻¹)	Referência
Reator anaeróbio	Laboratório	Resíduos vegetais	UV-vis ⁽¹⁾	250-5.000	ARAMRUEANG, <i>et al.</i> , 2022
UASB ⁽²⁾	Laboratório	Não relatado	MIR ⁽³⁾	19-922	LI, <i>et al.</i> , 2022
CSTR ⁽⁴⁾	Laboratório	Dejeto animal e resíduos vegetais	NIR ⁽⁵⁾	<10.096	AWHANGBO <i>et al.</i> , (2020)
PFR ⁽⁶⁾	Laboratório	Silagem	NIR ⁽⁵⁾	200-5.800	STOCKL & LICHTI, (2018)
HUASB ⁽⁷⁾ e reator indiano	Laboratório	Resíduos animais, vegetais e restos de comida	Espectrofotometria	10-1.400	CHATTERJEE, <i>et al.</i> , 2018

Legenda: 1 – Espectroscopia Ultravioleta-visível; 2 - *Upflow anaerobic sludge blanket*, reator anaeróbio de manta de lodo; 3 – *Mid infrared spectroscopy*, espectroscopia de infravermelho médio; 4 - *Continuous stirring tank reactor*, reator contínuo de tanque agitado; 5 – *Near infrared spectroscopy*, espectroscopia de infravermelho próximo; 6 – *Plug flow reactor*, reator de fluxo pistonado; 7 – *Hybrid up flow anaerobic sludge blanket reactor*, reator anaeróbio de manta de lodo híbrido.

Fonte: da autora, 2023.

1.1.7.3 Métodos cromatográficos

Deste modo, as metodologias apresentadas anteriormente possuem diferentes propósitos. Bem como, vantagens e limitações. As técnicas de titulação possuem facilidade de execução, porém, menor precisão. Por outro lado, as técnicas que determinam os parâmetros de ácidos graxos e alcalinidade separadamente, apresentam maior precisão. Entretanto, essas técnicas são mais sofisticadas, empregam equipamento adicional ou protocolos complexos (LIU *et al.*, 2021). Contudo, a determinação individual dos AGVs fornece mais informações sobre o processo da digestão anaeróbia (VARGAS-MUÑOZ *et al.*, 2021).

Dois tipos de técnicas cromatográficas são utilizados na determinação de ácidos graxos voláteis, sendo elas a cromatografia gasosa (CG) e a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). A cromatografia em fase gasosa é comumente utilizada para este fim, devido à sua linearidade e sensibilidade (GHIDOTTI *et al.*, 2018). Esta capacidade se deve aos detectores empregados, cuja sensibilidade permitem quantificar os analitos em baixas concentrações (mg L^{-1}). Por outro lado, os métodos existentes em cromatografia líquida, exigem menos preparo de amostra, e separam os compostos em temperatura mais baixa, porém, os consumíveis como coluna e pré-coluna empregados nesta técnica são mais caros (FERNÁNDEZ *et al.*, 2015). O Quadro 6 apresenta um resumo dos métodos cromatográficos para análise de AGV.

Quadro 6. Métodos cromatográficos utilizados para a determinação de AGV

AGV	Substrato	Reator	Extração	Ajuste de pH	Efeito <i>salting-out</i>	Solvente extrator	Método	LD (mg L ⁻¹) ⁽¹⁾	Referência
C ₆ ⁽²⁾	Efluente de biodigestor	Reator de fermentação	SPME ⁽³⁾	2 com H ₂ SO ₄	Não utilizou	Não utilizou	CG-EM/ EM ⁽⁴⁾	23	TINTROP <i>et al.</i> , 2022
C ₂ -C ₅ ⁽²⁾	Lodo de estação de tratamento de esgoto (ETE) e resíduo de peixe	Reator de fermentação	<i>In-syringe-MSA-DLLME</i> ⁽⁵⁾	1 com H ₃ PO ₄ (85% p/p)	NaCl 0,5 M	Éter-butil-terc-butílico (MTBE)	CG-DIC ⁽⁶⁾	0,1 – 1,3	VARGAS-MUÑOS <i>et al.</i> , 2021
C ₁ -C ₆ ⁽²⁾	Esgoto de hospital	Reator de batelada	LLE ⁽⁷⁾	2 com HCl 1,2 N	Não utilizou	Éter-butil-terc-butílico (MTBE)	CG-EM ⁽⁸⁾	0,1 – 1,0	GUÉRETTE <i>et al.</i> , 2021
C ₂ -C ₄ ⁽²⁾	Resíduo de produção de papel	Reator de batelada	LLE ⁽⁷⁾	4,5 com HCl 0,2 N	NaCl	Diclorometano (DCM)	CG-EM ⁽⁸⁾	Não relatou	CURTOIS <i>et al.</i> , 2021
C ₁ -C ₅ ⁽²⁾	Lixiviado de aterro sanitário	Não utilizou	LLE ⁽⁷⁾	2,5 com HCl 1 N	Não utilizou	Tri-n-octilamina (TOA) e tributilfosfato (TBP)	CLAE-UV ⁽⁹⁾	Não relatou	BEGUM <i>et al.</i> , 2020
C ₂ -C ₃ ⁽²⁾	Dejeto suíno	CSTR ⁽¹⁰⁾	LLE ⁽⁷⁾	2 com ácido fórmico	Não utilizou	Não utilizou	CG-DIC ⁽⁶⁾	Não relatou	SUN <i>et al.</i> , 2019
C ₂ -C ₅ ⁽²⁾	Lodo e permeado de estação de tratamento de esgoto (ETE)	BRAnMD,e DAC ⁽¹¹⁾	LLE ⁽⁷⁾	Não utilizou	Não utilizou	Metanol (MeOH)	CG-EM ⁽⁸⁾	0,03 – 0,8	RODRIGUES <i>et al.</i> , 2019
C ₂ -C ₅ ⁽²⁾	Resíduos animal e vegetal	Reator de escala industrial	OEI ⁽¹²⁾	4 a 5 com solução de KHSO ₄	KHSO ₄	Dimetil carbonato (DMC)	CG-EM ⁽⁸⁾	0,3 – 3,8	GUIDOTTI <i>et al.</i> , 2018
C ₂ -C ₅ ⁽²⁾	Resíduo da produção de óleo de palma	Lagoa anaeróbia	SI-LME ⁽¹³⁾	2 com HCl	Não utilizou	Éter-butil-terc-butílico (MTBE)	CG-DIC ⁽⁶⁾	1,0 – 3,6	PRUKSATRAK UL <i>et al.</i> , 2017
C ₂ -C ₄ ⁽²⁾	Soluções-padrão de AGV	Não utilizou	LLE ⁽⁷⁾ e derivatização	3,5 não relatou o ácido	Não utilizou	Tri-n-octilamina (TOA) e 1-decanol	CLAE-UV ⁽⁹⁾	Não relatou	EDA <i>et al.</i> , 2017

Legenda: 1 - Limite de detecção; 2 - C₁: ácido fórmico; C₂: ácido acético, C₃: ácido propiônico, C₄: ácido isobutírico e butírico; C₅: ácido isovalérico e valérico; C₆: ácido hexanoico; 3 - *Solid-phase microextraction*; 4 - Cromatografia gasosa com espectrometria de massas em *tandem*; 5 - *Magnetic stirring assisted dispersive liquid-liquid microextraction*; 6 - Cromatografia gasosa com detector de ionização em chama; 7 - *Liquid-liquid extraction*; 8 - Cromatografia gasosa com espectrometria de massas; 9 - Cromatografia líquida de alta eficiência com detector de ultravioleta; 10 - *Continuously stirred tank reactor*; 11 - Biorreator anaeróbio de membrana dinâmica, digestor anaeróbio convencional; 12 - *Organic extract injection*, adaptação da LLE; 13 - *Sequential injection-liquid microextraction*.

1.1.7.4 Extração líquido-líquido (*Liquid-liquid extraction, LLE*)

Alguns estudos utilizaram a injeção direta em cromatógrafo gasoso de amostras filtradas de lodo anaeróbio (RAPOSO *et al.*, 2015; GHIDOTTI *et al.*, 2018). Porém, a injeção direta pode ser prejudicial, pois pode causar o acúmulo de espécies inorgânicas no cromatógrafo (GHIDOTTI *et al.*, 2018). Como também, outros estudos empregaram injeção de amostras filtradas e soluções diluídas em água ultra pura (GHIDOTTI *et al.*, 2018; SUN *et al.*, 2019). Porém, solventes com função hidroxila como água ou metanol, podem danificar a fase estacionária da coluna cromatográfica (Al *et al.*, 2014). Deste modo, diversos métodos de extração foram adaptados na literatura. A extração líquido-líquido (*Liquid-liquid extraction, LLE*) é a separação seletiva do analito de um líquido, usando solventes parcialmente miscíveis ou imiscíveis. Esse método possui alto rendimento, simplicidade de operação, estabilidade térmica e seletividade dos ácidos conforme o extrator (BEGUM *et al.*, 2020).

Os solventes empregados na LLE são classificados conforme a interação com o analito. Álcoois, cetonas, ésteres têm baixo coeficiente de distribuição, pois não induzem forte interação (EDA *et al.*, 2017; REYHANITASH *et al.*, 2018). Por outro lado, aminas e compostos organofosforados formam complexos com os ácidos carboxílicos. Dessa forma, são comuns nesse tipo de extração (REYHANITASH *et al.*, 2018). O desempenho do processo de extração LLE de AGVs de amostras aquosas é influenciado pelo solvente utilizado (EDA *et al.*, 2017). Dessa forma, as propriedades importantes são o baixo ponto de fusão (PF), alto ponto de ebulição (PE) e densidade na faixa de 0,5-1,3 g mL⁻¹ (BEGUM *et al.*, 2020) (Quadro 7).

Quadro 7. Solventes utilizados na extração de AGV e analitos semelhantes

Solvente extrator	Ponto de fusão (°C)	Ponto de ebulição (°C)	Densidade (g/mL a 25° C)	Solubilidade em água (g L ⁻¹) a 25 °C	Referência
MTBE ⁽¹⁾	-110	55-55	0.740	51	a, b, g
DCM ⁽²⁾	-97	38,9-40	1.325	13	c
TOA ⁽³⁾	-34,6	164-168	0.809	5 x 10 ⁻⁵	d, h
TBP ⁽⁴⁾	-80	289	0.978	0,28	d
MeOH ⁽⁵⁾	-97.8	65	0.787	1	e
DMC ⁽⁶⁾	0,5	90,5	1.063	139	f
Acetona	-94	56	0.784 ⁽⁷⁾	1	*

Legenda: 1 – Éter-butil-terc-butílico; 2 – Diclorometano; 3 – Tri-n-octilamina; 4 – Tributílfosfato; 5 –Metanol; 6 – Dimetilcarbonato; 7 – Densidade a 20 °C, conforme a fonte.

Fonte: Dados físico-químicos: PubChem, 2023; a - VARGAS-MUÑOS *et al.*, (2021); b - GUÉRETTE *et al.*, (2021); c - CURTOIS *et al.*, (2021); d -BEGUM *et al.*, (2020); e - RODRIGUES *et al.*, (2019); f – GUIDOTTI *et al.*, (2018); g - PRUKSATRAKUL *et al.*, (2017); h - EDA *et al.*, (2017). * Não há registros de estudos que utilizaram a acetona em LLE de AGVs em lodo anaeróbio.

O MTBE e o DCM possuem baixo ponto de ebulição, o que possibilita a formação de compostos orgânicos voláteis (VOCs). Ainda, o MTBE acumula carga eletrostática. O DCM, TOA, TBP são agentes carcinogênicos, mutagênicos ou reprotóxicos. E por tais motivos, são classificados como perigosos (PRAT *et al.*, 2016). Solventes voláteis podem particionar na atmosfera. E em altas concentrações, podem promover o aumento da demanda química de oxigênio, o que pode ser prejudicial ao meio ambiente. Deste modo, as normativas relativas a esses solventes determinam que os mesmos sejam substituídos. Por outro lado, a acetona forma VOCs, mas não é tóxica, e é facilmente biodegradável (PRAT *et al.*, 2016).

Além disso, utilizar solvente de polaridade fraca tem a vantagem de não solubilizar com a água presente na amostra. Por outro lado, há menor afinidade com os analitos mais polares. Deste modo, o dimetilcarbonato é mais polar que os éteres, e menos tóxico que solventes clorados (GHIDOTTI *et al.*, 2018). Os solventes carbonatos possuem diversas polaridades. Deste modo, o dimetil carbonato demonstra grande potencial em ser empregado na substituição de solventes como metil etil cetona (MEK), metil isobutil cetona (MIBK), acetato de etila, e acetato de butila, outras cetonas e éteres glicólicos (PRAT *et al.*, 2016).

Diante do exposto acima, os artigos citados e que trabalharam a extração líquido-líquido de lodo anaeróbio de biodigestores para análise cromatográfica, utilizaram solventes perigosos para a saúde humana e o meio ambiente, ou água ultra pura, que por sua vez, pode danificar a coluna cromatográfica (Al *et al.*, 2014). Por outro lado, Okeleye & Betiku (2019) realizaram um estudo de otimização da extração por *soxhlet* do óleo da semente da *Hildegardia barteri*. O óleo desta planta possui os ácidos mirístico, linoleico, palmítico, oleico e andlinolenico, que são ácidos graxos com estrutura semelhante aos do presente estudo. E neste estudo, a acetona foi o solvente extrator que apresentou melhor rendimento, quando comparada ao n-hexano e o acetato de etila. Sendo assim, a acetona costuma ser utilizada como solvente extrator em estudos de outras matrizes, como alimentos e óleos. Porém, devido às suas propriedades físico-químicas, acredita-se que esta possa ser utilizada na extração líquido-líquido de ácidos graxos voláteis presentes em lodo anaeróbio.

1.2 Justificativa

Compreender todas as etapas da digestão anaeróbia é essencial para o aprimoramento da produção de biogás e aproveitamento de rejeitos. Contudo, isto não é uma tarefa fácil, visto que a produção de biogás está associada a diferentes tipos de matrizes e biodigestores. Desta forma, o presente projeto não visa solucionar todos os aspectos envolvidos nesta temática e sim, apresentar uma metodologia analítica para o monitoramento de biodigestores do tipo BLC através dos níveis de ácidos graxos voláteis (AGVs) em conjunto com outras variáveis físico-químicas.

1.3 Hipótese

Devido à relação do acúmulo de ácidos graxos voláteis com a interrupção no processo de biodigestão, acredita-se que o monitoramento dos AGVs possa auxiliar no monitoramento da digestão anaeróbia, contribuindo para o bom funcionamento dos biodigestores.

2. OBJETIVO

2.1 Objetivo geral

- desenvolver e validar uma metodologia analítica para determinar a concentração de ácido acético, ácido propiônico, ácido isobutírico, ácido butírico, ácido isovalérico e ácido valérico em amostras de biodigestores do tipo BLC (biodigestor de lagoa coberta), a fim de relacionar os AGVs a outros parâmetros de monitoramento da produção de biogás, e auxiliar na tomada de decisões para garantir a eficiência destes reatores.

2.2 Específicos

- otimizar e validar o método de extração e análise dos ácidos graxos voláteis por extração líquido-líquido e análise por cromatografia em fase gasosa acoplada ao detector de ionização em chama (CG-DIC) para análise de amostras de dois biodigestores BLC operados na mono-digestão de efluente de suinocultura; e

- monitorar e avaliar a eficiência de produção de biogás, os níveis de ácidos graxos voláteis durante a operação dos biodigestores BLC.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Padrões analíticos, reagentes e materiais

Os padrões analíticos utilizados foram o de ácido acético (Sigma-Aldrich, grau de pureza $\geq 99\%$), ácido propiônico (Sigma-Aldrich, grau de pureza $\geq 99\%$), ácido isobutírico (Sigma-Aldrich, grau de pureza $\geq 99,5\%$), ácido butírico (Sigma-Aldrich, grau de pureza $\geq 99\%$), ácido isovalérico (Sigma-Aldrich, grau de pureza $\geq 99\%$), ácido valérico (Sigma-Aldrich, grau de pureza $\geq 99\%$) e ácido octanoico como padrão interno (Sigma-Aldrich, grau de pureza $\geq 99,5\%$).

Os solventes utilizados foram acetona (Merck, grau HPLC $\geq 99,8\%$), água ultra pura, acetato de etila (Merck, grau HPLC $\geq 99,8\%$), etanol (36, grau HPLC $\geq 99,8\%$), dimetil carbonato (Sigma-Aldrich, grau HPLC $\geq 99\%$). Os gases utilizados nas análises cromatográficas foram: nitrogênio 5.0 (Air liquid, pureza 99,999%), hidrogênio 5.0 (Air liquid, pureza 99,999%) e ar sintético (Air liquid, pureza 99,999%). Também foram utilizados os seguintes reagentes e materiais: ácido fosfórico (Sigma-Aldrich, P.A. 85%), bissulfato de potássio (Merck, grau de pureza $\geq 99\%$), cloreto de sódio (Dinâmica, P.A. 99%), sulfato de magnésio heptahidratado (Vetec, P.A. 98 - 102%), filtro hidrofílico de seringa Millex® GN (Merck, membrana de nylon, poro de 0,22 μm) e filtro hidrofóbico Millex® (Merck, membrana PTFE, poro de 0,22 μm).

3.2 Biodigestores

Foram estudados dois reatores de modelo BLC, denominados BLC1 (com recirculação) e BLC2 (sem recirculação), com 70 litros de volume total, e 60 litros de volume útil. Os quais, estavam localizados nas dependências do Laboratório de Tratamento de Resíduos Agroindustriais da Unioeste em Cascavel, Paraná. Ambos reatores operaram em modo semicontínuo e em escala mesofílica ($37 \pm 1^\circ \text{C}$).

3.3 Inoculação

O inóculo utilizado na partida dos reatores foi coletado do reator anaeróbico de produção de inóculo do Laboratório de Biogás do CIBIOGÁS-ER., localizado no Parque Tecnológico de Itaipu (PTI), em Foz do Iguaçu (PR). Este inóculo possui, em média, teor de sólidos totais de 25 a 30 gST L^{-1} , de sólidos voláteis de 16 a 20 gSV L^{-1} e pH 7,5. O inóculo foi adaptado ao substrato e aclimatado às condições experimentais. Para a

inoculação, foi inserido um volume de substrato com massa de sólidos voláteis equivalente a 1% da massa de sólidos voláteis do inóculo. Desta forma, esta mistura foi adicionada lentamente no reator até atingir o volume de trabalho, de 60 litros (CIBIOGÁS, 2019).

Após o fechamento do reator, foi injetado gás nitrogênio no fundo da mistura por um período de 15 minutos, para dar condições anaeróbias ao reator (NUALSRI *et al.*, 2016). A seguir, o reator foi operado em batelada, até que a produtividade volumétrica de biogás alcançou estabilidade. Em seguida, um volume de substrato com 5% dos sólidos voláteis do inóculo foi adicionado no reator, em mais um ciclo de aclimatação com duração de dez dias. Após este período de aclimatação, foi dada a partida do reator em modo semi-contínuo, com carga orgânica volumétrica de 0,5 g SV L⁻¹d⁻¹ (concentração de sólidos voláteis por litro do reator, por dia).

3.4 Substrato

Posteriormente a inoculação, os reatores BLC foram alimentados com dejetos suínos. O substrato foi coletado na Unidade de Demonstração Granja Colombari na cidade de São Miguel do Iguaçu (PR), e transportados para o laboratório do CibioGás em Foz do Iguaçu (PR) para caracterização. Após a caracterização, foram definidos os volumes de alimentação e as condições operacionais do reator, a partir dos parâmetros de COV, TRH e concentração de sólidos. Após as coletas, as amostras de substrato foram homogeneizadas e foi realizada a caracterização de acordo com as análises listadas no Quadro 8 (CIBIOGÁS, 2019).

Quadro 8. Parâmetros de caracterização físico-química dos substratos

Parâmetros	Referência
pH	APHA (2017)
Alcalinidade Total	APHA (2017)
Sólidos totais	APHA (2017)
Sólidos voláteis	APHA (2017)
Nitrogênio total Kjeldahl	Malavolta et al. (1997)
Nitrogênio Amoniacal	APHA (2017)

Fonte: da autora, 2023.

3.5 Monitoramento dos reatores

O monitoramento dos reatores foi realizado por coleta de amostras líquidas e gasosas. As amostras foram submetidas às análises físico-químicas e cromatográficas, cujos métodos são apresentados no item 3.5.1, conforme adotado por CIBIOGÁS, (2019). O quadro 9 resume os parâmetros analíticos, o volume de amostra e a frequência de amostragem.

Quadro 9. Parâmetros de monitoramento e frequência de coleta de amostras

Parâmetros	Volume de amostra (mL) ⁽¹⁾	Frequência
pH	-	Diariamente
Série de Sólidos	30	3 vezes por semana
Ácidos Graxos Voláteis	20	3 vezes por semana
DQO	2,5	3 vezes por semana
Produção de biogás	-	Diariamente
Composição do biogás	0,5	3 vezes por semana

Legenda: 1 - Esse volume foi posteriormente multiplicado pelo número de replicatas.

Fonte: da autora, 2023.

O pH foi medido diariamente, utilizando-se de um pHmetro de bancada, como forma de checagem rápida da estabilidade do processo (APHA, 2012). Para a análise de Demanda Química de Oxigênio (DQO), o procedimento adotado foi o de refluxo fechado (Método 5220D, APHA, 2017). Já a determinação de sólidos totais, fixos e voláteis das amostras foi adaptada da literatura (APHA, 2017; INMETRO, 2020). Os ensaios foram realizados em triplicata, e foi calculada a média das repetições. O resultado foi expresso em porcentagem (%).

A produção de biogás foi determinada por dispositivo de quantificação de gás ligado ao reator, em mL. No momento da quantificação da produção de biogás, foi registrada a temperatura ambiente e a pressão atmosférica, para a normalizar o volume de biogás nas condições normais de temperatura e pressão (CNTP), a partir da Equação 1.

$$V_0 = V \cdot \frac{(P_L - P_W) \cdot T_0}{P_0 \cdot T} \quad \text{Equação 1}$$

Em que:

V_0 = volume de biogás padronizado (mL);

V = volume de biogás registrado no dispositivo de quantificação do biogás (mL);

P_L = pressão atmosférica no momento do registro (mbar);

P_W = pressão de vapor da água (mbar);

T_0 = temperatura normalizada (273 K);

P_0 = pressão normalizada (1,013 mbar);

T = temperatura ambiente (K).

Sendo P_w obtida pela Equação 2.

$$P_w = 10^{8,1962 - \frac{1.730,63}{T - 39,724}} \quad \text{Equação 2}$$

Em que:

P_w = pressão de vapor (mbar);

T = temperatura ambiente (K).

A análise da composição do biogás foi realizada em analisador de gases portátil (GA 5000), e a amostragem do gás foi por meio de sonda específica (*Geotech, Ltd. England*). Assim, a medição dos gases metano e dióxido de carbono utilizou espectroscopia de infravermelho, sendo utilizado comprimento de onda específico para estes compostos. Por fim, o cálculo da concentração de metano e outros componentes foi obtido a partir de curvas analíticas preparadas com padrões comerciais de biogás padrão (*Geotech, 2016*).

3.5.1 Coleta de amostras para análise de AGVs

Foram coletados cerca de 20 mL de substrato de cada biodigestor em um tubo cônico de centrífuga de 50 mL. As amostras foram mantidas a -18 °C em freezer do laboratório onde foram coletadas. As mesmas foram transportadas em caixa isopor acompanhada de gelo artificial até o Laboratório de Cromatografia da UNILA, localizado no Parque Tecnológico de Itaipu (PTI), em Foz do Iguaçu (PR). onde permaneceram em -18 °C até a extração dos analitos. As amostras corresponderam a 29 dias de operação, sendo 14 amostras de cada reator, e 28 amostras no total.

Os reatores anaeróbios do projeto (biodigestores do tipo Biodigestor de Lagoa Coberta, BLC) estavam em fase de adaptação. Por essa razão, durante a fase de desenvolvimento de metodologia de extração dos AGVs foram coletadas amostras de outro reator para a execução dos experimentos. Assim, para o desenvolvimento da metodologia empregou-se amostras provenientes do reator de mistura completa da Unidade de Demonstração - UD, localizada nas dependências da Itaipu Binacional em Foz do Iguaçu (PR), com características de inóculo e de substrato similares aos reatores monitorados neste estudo.

3.5.2 Planejamento experimental

Em um planejamento fatorial completo são investigadas as influências de todos os fatores e os efeitos de interação (sinergismo) entre os mesmos (TEÓFILO, 2013). Se a combinação de k fatores é investigada em 2 níveis destes fatores, ele consiste de 2k experimentos. Sendo assim, os níveis dos fatores quantitativos (ex.: ajuste de pH, etc) são nomeados por sinais: negativo (-) para o nível mais baixo, positivo (+) para o nível mais alto (TEÓFILO; FERREIRA, 2006).

Para a otimização da extração dos AGVs foi empregado o planejamento fatorial completo com três variáveis (2^3): solvente orgânico, pH e sal inorgânico. A escolha dos solventes dimetilcarbonato e acetona foi baseada na literatura (GHIDOTTI *et al.*, 2018; OKELEYE; BETIKU, 2019). Por outro lado, a água ultra pura foi incluída no planejamento experimental por que alguns estudos produzem a curva analítica solubilizada em água ultra pura (GHIDOTTI *et al.*, 2018; SUN *et al.*, 2019; APHA, 2012). O planejamento foi elaborado por meio do *software Action Stat Pro* versão 3.2.2 (2016). Os Quadros 10 e 11 apresentam os níveis do planejamento utilizados para otimização do processo de extração da amostra. No planejamento experimental, foi produzido um gráfico de efeitos na extração de cada analito.

Quadro 10. Experimentos de triagem dos fatores interferentes na extração

Experimento	Solvente extrator	Ajuste de pH	Força iônica
1	Água (1)	2,5 (-1)	NaCl (1)
2	Água (1)	2,5 (-1)	KHSO ₄ (-1)
3	Acetona (0)	7 (1)	KHSO ₄ (-1)
4	Acetona (0)	2,5 (-1)	NaCl (1)
5	Acetona (0)	7 (1)	KHSO ₄ (-1)
6	DMC (-1)	7 (1)	KHSO ₄ (-1)
7	DMC (-1)	7 (1)	NaCl (1)
8	DMC (-1)	2,5 (-1)	KHSO ₄ (-1)
9	Acetona (0)	2,5 (-1)	NaCl (1)
10	Acetona (0)	2,5 (-1)	KHSO ₄ (-1)
11	Água (1)	7 (1)	KHSO ₄ (-1)
12	Acetona (0)	7 (1)	NaCl (1)
13	DMC (-1)	7 (1)	KHSO ₄ (-1)
14	DMC (-1)	2,5 (-1)	KHSO ₄ (-1)
15	Acetona (0)	7 (1)	NaCl (1)
16	Água (1)	7 (1)	KHSO ₄ (-1)
17	Água (1)	7 (1)	NaCl (1)
18	DMC (-1)	7 (1)	NaCl (1)
19	DMC (-1)	2,5 (-1)	NaCl (1)
20	Água (1)	7 (1)	NaCl (1)
21	DMC (-1)	2,5 (-1)	NaCl (1)
22	Acetona (0)	2,5 (-1)	KHSO ₄ (-1)
23	Água (1)	2,5 (-1)	NaCl (1)
24	Água (1)	2,5 (-1)	KHSO ₄ (-1)

Fonte: da autora, 2023.

Quadro 11. Variáveis utilizadas para otimização da extração

Variável	Níveis das variáveis		
	-1	0	1
Solvente extrator	dimetilcarbonato	acetona	água ultra pura
Ajuste de pH	2,5	-	7
Força iônica	KHSO ₄	-	NaCl

Fonte: da autora, 2023.

3.5.3 Método de extração líquido-líquido (*LLE*)

A extração e análise dos AGVs foi adaptada do método descrito em APHA (2012), no qual utiliza extração líquido-líquido e análise por cromatografia em fase gasosa acoplada ao detector de ionização em chama (CG-DIC).

Em um tubo cônico de centrífuga de 15,0 mL, pesou-se 0,50 g de amostra. A esta alíquota, adicionou-se solução de ácido fosfórico a 85 % (v/v) até atingir o pH próximo a 3, sendo este monitorado com papel indicador. Para o experimento realizado com pH 7, empregou-se a amostra diretamente, sem ajuste de pH. Adicionou-se 0,10 mL de solução saturada do sal inorgânico e 1,0 mL do solvente orgânico. Em seguida, a solução foi homogeneizada em agitador do tipo vórtex por 2 minutos, e centrifugada a 4.000 rpm (rotações por minuto) por 30 minutos. Após a centrifugação, ocorreu a separação de fases, sendo coletada a fase superior que contém o solvente orgânico e os analitos. Retirou-se a fase orgânica com auxílio de micropipeta. A amostra foi filtrada em um filtro hidrofóbico de PTFE com poro de 0,22 µm, o extrato foi acondicionado em *vial* de 2 mL, refrigerado a -18 °C para posterior análise cromatográfica.

3.6 Análise por Cromatografia Gasosa com detector por ionização por chama (CG-DIC)

Para o desenvolvimento da metodologia, inicialmente duas colunas cromatográficas foram testadas, uma que separa ácidos graxos de cadeia carbônica mais longa, TR-Fame PN 260-M166L (*Thermo Scientific*TM), cuja composição da fase estacionária é de 70% *Cyanopropyl Polysilphenylene-siloxane* (polaridade intermediária). Na outra coluna, os analitos foram separados em uma coluna capilar de fase ligada de sílica da marca Supelco, modelo SPB®-1000 (30 m x 0,53 mm x 0,5 µm), cuja fase

estacionária de alta polaridade é composta de polietilenoglicol modificado com ácido nitrotereftálico.

A análise dos AGVs foi realizada em um cromatógrafo em fase gasosa da marca *Agilent Technologies*, modelo 7890 B, equipado com detector de ionização em chama (CG-DIC). O volume de injeção de amostra foi de 1 μL , em modo *split*, cuja razão foi 1:20. Foi utilizado como gás de arraste o hidrogênio com fluxo de 18 mL min^{-1} , o gás nitrogênio foi utilizado como *make-up* com fluxo de 12 mL min^{-1} . A rampa de eluição foi de: 95 °C (2 min) até 140 °C a 10 °C min^{-1} , até 200 °C a 40 °C min^{-1} . Para o detector utilizou-se os gases hidrogênio e ar sintético para a composição da chama, num fluxo de hidrogênio 30 mL min^{-1} , e de ar sintético 300 mL min^{-1} . A temperatura do detector foi de 240 °C. A identificação dos AGVs baseou-se na comparação com os tempos de retenção dos padrões com as amostras.

3.7 Validação da metodologia

O método foi validado seguindo o DOQ-CGCRE-008 do INMETRO (INMETRO, 2020). Nesse estudo, foram avaliados os seguintes parâmetros de validação: linearidade, homocedasticidade, limite de detecção (LD), limite de quantificação (LQ), repetibilidade e recuperação. Sendo assim, os parâmetros de validação foram calculados na planilha desenvolvida por Ribeiro et al. (2008).

3.7.1 Preparo de soluções

Foram preparadas soluções estoque dos AGVs separadamente na concentração de 5,0 g mL^{-1} . Posteriormente, a solução de trabalho foi preparada a partir das soluções estoque. A esta, foram adicionados os seis padrões com concentração final de 175 mg mL^{-1} e o padrão interno na concentração final de 50 mg L^{-1} . Para as diluições, utilizou-se o solvente acetona. A escolha do padrão interno deve seguir alguns critérios. De acordo com DOLAN (2012), este não deve estar disponível na amostra. Deve ainda, ter composição de alta pureza, conhecida, estrutura semelhante aos analitos em estudo, além de estabilidade analítica. De preferência, deverá ser eluído após os analitos de interesse e apresentar resposta compatível ao detector. Entretanto, normalmente utiliza-se como padrão interno o ácido 2-etil butírico. Porém, este composto é eluído entre os analitos de interesse (BOE *et al.*, 2006; RAPOSO *et al.*, 2015; GHIDOTTI *et al.*, 2018).

Sendo assim, foi adicionado às amostras e soluções padrão o volume de 100 µL da solução de padrão interno (ácido octanoico em acetona 50 mg L⁻¹), de acordo com artigos semelhantes (RAPOSO *et al.*, 2015; GHIDOTTI *et al.*, 2018).

Também foram preparadas soluções saturadas dos sais inorgânicos: bissulfato de potássio (0,49 g mL⁻¹), cloreto de sódio (0,36 g mL⁻¹) e sulfato de magnésio (0,7 g mL⁻¹), preparados em água ultra pura.

3.7.2 Linearidade e homocedasticidade

Um número de concentrações do analito foi escolhido a fim de cobrir uma faixa entre 50 e 150% do valor esperado na amostra em estudo (LANÇAS, 2004). Sendo assim, e conforme INMETRO (2020), foram preparadas sete concentrações (10, 20, 30, 50, 65, 85 e 100 mg L⁻¹) dos padrões de ácidos graxos voláteis. Estes, foram adicionados à matriz em triplicata, além do padrão interno ácido octanoico (50 mg L⁻¹), e refrigerados a - 18 °C para posterior análise. A homocedasticidade dos dados obtidos foi avaliada através do teste de *Cochran*. Este teorema, indica a igualdade de variâncias, estatisticamente significativa com base em um limiar α de significância (geralmente definido em 10%) (PEREIRA *et al.*, 2010).

A partir de dados homocedásticos, o INMETRO (2020) indica que seja calculada uma regressão linear simples pelo método dos mínimos quadrados não ponderados, conforme equação 3, a qual relaciona a resposta medida e a concentração do analito.

$$y = a + bx \quad \text{Equação 3}$$

y = resposta medida (área do pico)

x = concentração

a = coeficiente linear (intersecção com o eixo y, quando x = 0)

b = coeficiente angular (inclinação da curva analítica)

Dessa forma, foram obtidos os coeficientes da equação, os resíduos, e o coeficiente de correlação (R²). Este último é um bom indicativo do desempenho da reta como modelo matemático, pois demonstra a relação entre as duas variáveis. Porém, não é conclusivo. Sendo assim, o gráfico de resíduos é empregado para avaliar a dispersão dos dados. Caso apresentem uma tendência, é possível de que o modelo linear seja inadequado (INMETRO, 2020).

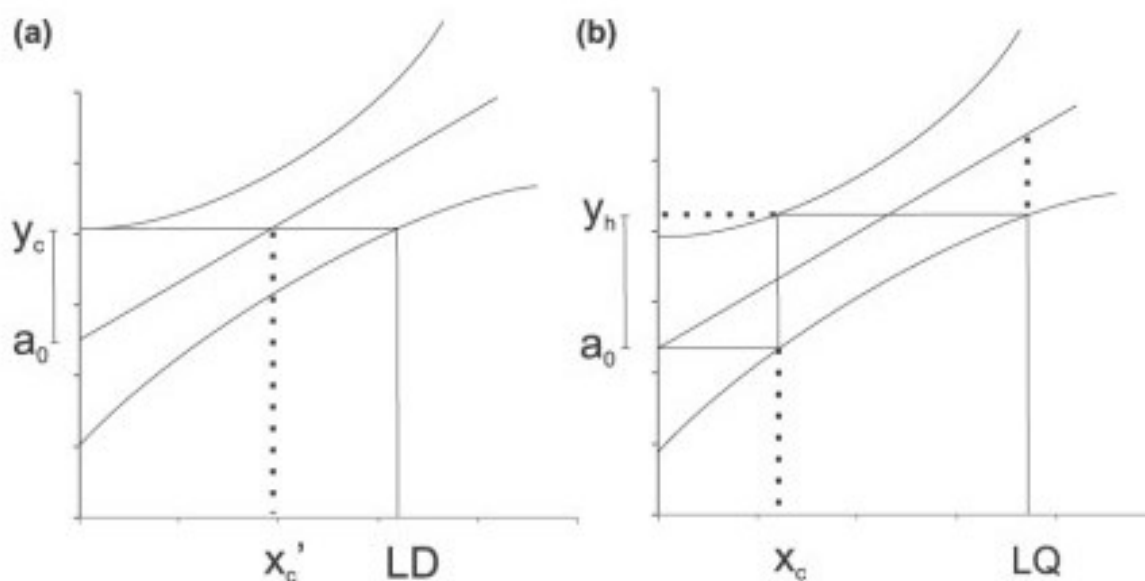
3.7.3 Limite de detecção (LD)

Para determinar os limites de detecção e de quantificação foi utilizado o método baseado nos parâmetros da curva analítica (RIBEIRO *et al.*, 2008). Esse método calcula a concentração mínima de uma substância com 99% ou 95% de confiança. A equação de regressão, apresenta um erro padrão, e o produto deste erro pelo valor da distribuição t de *Student* permite calcular o intervalo de confiança da curva analítica, o qual tem a forma de duas linhas hiperbólicas ao redor da curva (Figura 2a). O intercepto do limite superior do intervalo de confiança é conhecido por y_c e a sua projeção no limite inferior é a estimativa do limite de detecção do método (RIBEIRO *et al.*, 2008).

3.7.4 Limite de quantificação (LQ)

Assim como no cálculo da LD, o LQ é calculado a partir do intervalo de confiança da curva analítica (Figura 2b). Nesse caso, X_c é o valor da concentração (mg L^{-1}) por onde a_0 cruza a reta da regressão até a hipérbole inferior, Y_h é valor da intensidade de y , projetando-se desde X_c até a hipérbole superior. Com os valores de Y_h e X_c é possível estimar o LQ (RIBEIRO *et al.*, 2008).

Figura 2. Ilustração da determinação do limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ) através dos parâmetros da curva analítica



3.7.5 Repetibilidade (precisão)

Para a este parâmetro, foram preparadas soluções fortificadas em concentração baixa, média e alta (10, 50 e 100 mg L⁻¹), dos padrões analíticos que foram adicionados à amostra real, e foram extraídos no mesmo dia e em sete replicatas. O critério de aceitação do desvio padrão relativo foi de 5,3 a 7,3% para a concentração do analito utilizado na curva analítica, sendo 10 a 100 mg L⁻¹, respectivamente (INMETRO, 2020).

3.7.6 Recuperação

Este parâmetro é uma medida da eficiência do processo de extração do analito de interesse da matriz na qual se encontra (LANÇAS, 2004). Os ensaios de recuperação foram realizados na matriz, preparando soluções fortificadas em concentração conhecida do analito. O padrão interno foi adicionado com a concentração previamente determinada. E o valor aceitável para recuperação está entre 90 e 110 % para o analito que se encontra em 10 mg L⁻¹ (INMETRO, 2020). A recuperação para cada solução foi determinada pela equação 4.

$$\text{Recuperação (\%)} = \left(\frac{C_1 - C_2}{C_3} \right) \times 100 \quad \text{Equação 4}$$

Onde:

C₁: Concentração da amostra fortificada;

C₂: Concentração da amostra não fortificada;

C₃: Concentração do analito adicionado à amostra fortificada.

3.7.7 Análise de variância de um fator (*One Way ANOVA*)

A ANOVA é um método estatístico utilizado para avaliar a dispersão de valores dentro de um grupo de dados, ou entre vários grupos. Porém, os valores precisam cumprir alguns requisitos. Primeiramente, os dados devem apresentar distribuição normal, ou seja, devem situar-se em torno da média. Uma vez que a ANOVA informa se há diferença entre os grupos, espera-se que a média seja representativa para o grupo. Também se espera que haja homogeneidade das variâncias, de forma que os erros

cometidos não causem tendência nos resultados. Ainda, a independência estatística também é requerida, pois os grupos não devem interferir entre si (HÄRDLE; SIMAR, 2015).

Neste projeto, foi utilizado o modelo estatístico ANOVA para um fator (*ANOVA One Way*). O qual assume que os valores médios da variável de resposta y são induzidos por um único fator, denominado fator de controle. Por exemplo, o solvente extrator (fator de controle) foi testado em três níveis ($p = 3$), denominados níveis do fator controlável (acetona, dimetil carbonato e água ultra pura). A partir deste experimento, um grupo de valores é gerado por cada nível. Estes dados são denominados de variáveis de resposta. Dessa forma, deve-se determinar se esses fatores produzem o mesmo efeito na observação. Se houver o mesmo efeito, a média dos grupos (μ_1) terá o mesmo valor (μ). Portanto, as hipóteses $H_0: \mu_1 = \mu$ e $H_1: \mu_1 \neq \mu$ devem ser testadas (HÄRDLE; SIMAR, 2015).

Para tanto, é calculado a distribuição F, que indica o tamanho da diferença entre tais grupos, em função da variação presente em cada grupo. Portanto, se o F calculado for maior do que o F tabelado, rejeita-se a H_0 , e admite-se a diferença entre os tratamentos. Assim, para avaliar se tal diferença é significativa, calcula-se o p-valor. Este é comparado ao seu nível de significância (0,05). Sendo: $p\text{-valor} \leq \alpha$, a diferença entre as médias é estatisticamente significativa. Por outro lado, se $p\text{-valor} > \alpha$, as diferenças não são significativas (HÄRDLE; SIMAR, 2015).

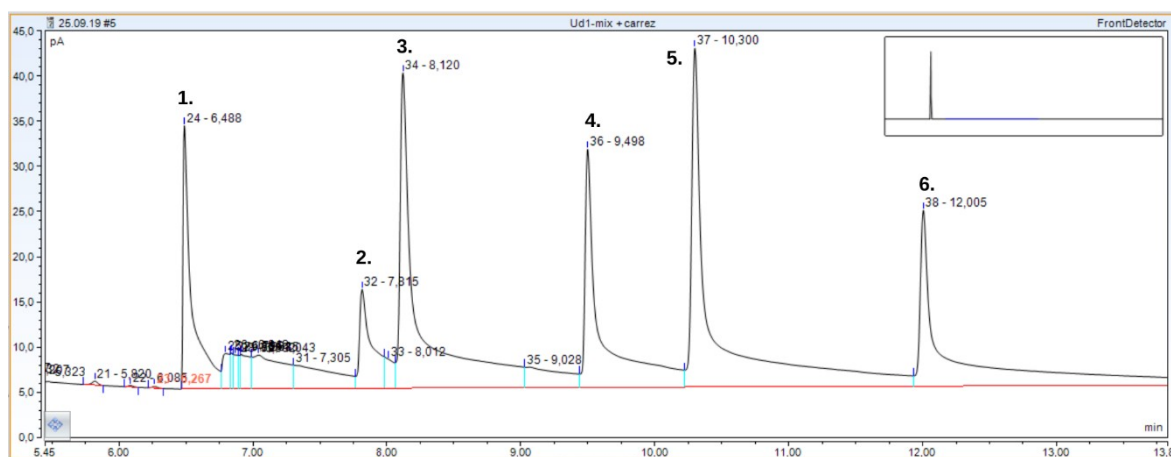
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Análise cromatográfica

Duas colunas cromatográficas foram testadas como método de separação, uma citada no método oficial (SPB®-1000) e outra disponível no laboratório (TR-FAME PN 260-M166L), que é utilizada para separação de ácidos graxos de cadeia carbônica longa. A motivação para o teste da coluna TR-FAME foi sua disponibilidade no laboratório e o longo prazo de entrega, estipulado pelo fornecedor, da coluna SPB®-1000.

No cromatograma obtido com a coluna TR-FAME PN 260-M166L, cuja composição da fase estacionária é de 70% *Cyanopropyl Polysilphenylene-siloxane* (polaridade intermediária), observa-se a separação dos analitos (Figura 3). Todavia, os picos obtidos apresentaram cauda, provavelmente devido à composição da fase estacionária não apresentar a polaridade adequada para separar ácidos graxos de cadeia pequena.

Figura 3. Cromatograma dos padrões de ácidos graxos voláteis (100 mg L⁻¹) na coluna TR-Fame, marca Thermo Scientific™

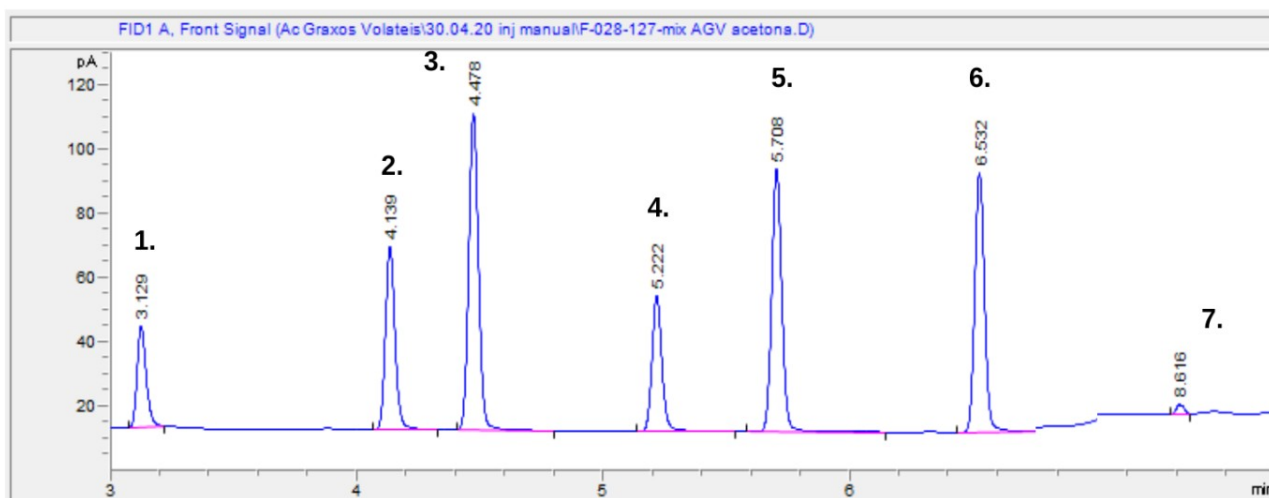


Legenda: 1 – ácido acético; 2 – ácido propiônico; 3 – ácido isobutírico; 4 – ácido butírico; 5 – ácido isovalérico; 6 – ácido valérico.

Fonte: da autora, 2023.

Por outro lado, ao utilizar a coluna SPB®-1000, recomendada pelo método oficial, os picos dos analitos foram simétricos e com boa separação (Figura 4). O tempo total de análise foi de 14 minutos e os tempos de retenção dos analitos são elencados no Quadro 12 (p. 37).

Figura 4. Cromatograma dos padrões de ácidos graxos voláteis (175 mg L⁻¹), coluna SPB®-1000, marca SUPELCO



Legenda: 1 – ácido acético; 2 – ácido propiônico; 3 – ácido isobutírico; 4 – ácido butírico; 5 – ácido isovalérico; 6 – ácido valérico; 7 – ácido octanoico, como padrão interno.

Fonte: da autora, 2023.

Quadro 12. Tempos de retenção dos padrões de AGVs na coluna SPB®-1000

AGV padrão	Tempo de retenção (min)
Ácido acético	3,2
Ácido propiônico	4,2
Ácido isobutírico	4,5
Ácido butírico	5,2
Ácido isovalérico	5,7
Ácido valérico	6,5
Ácido octanoico	8,5

Fonte: da autora, 2023.

4.2 Planejamento experimental

Definidas as condições cromatográficas, procedeu-se com o planejamento experimental para se estabelecer as melhores condições de extração dos analitos. Foram avaliados, em um planejamento experimental completo com réplicas, os parâmetros: solvente extrator (3 níveis), pH de extração (2 níveis) e efeito da força iônica do sal (2 níveis) (Quadro 11, página 37). Os níveis foram selecionados através de metodologias encontradas na literatura (EDA *et al.*, 2017; PRUKSATRAKUL *et al.*, 2017; GHIDOTTI *et al.*, 2018; RODRIGUES *et al.*, 2019; SUN *et al.*, 2019; BEGUM *et al.*, 2020; VARGAS-MUÑOS *et al.*, 2021; GUÉRETTE *et al.*, 2021; CURTOIS *et al.*, 2021; TINTROP *et al.*, 2022).

Como resposta analítica ao planejamento fatorial completo, utilizou-se a razão da área do pico cromatográfico de cada analito pela área do pico do padrão interno, o ácido

octanoico. Para a decisão das condições ótimas de extração, os ácidos foram analisados separadamente pelo teste de ANOVA, resultando no p valor para cada efeito. O valor de $p < 0,05$ indica que a variável é significativa (Tabela 1).

Tabela 1. Resultados do planejamento fatorial completo

Ácido graxo	Solvente	pH	Sal
Ácido acético	não significativa ($9,5 \times 10^{-1}$)	não significativa ($9,7 \times 10^{-1}$)	KHSO₄ ($6,8 \times 10^{-2}$)
Ácido propiônico	Acetona ($9,1 \times 10^{-13}$)	não significativa ($3,9 \times 10^{-1}$)	não significativa ($5,3 \times 10^{-1}$)
Ácido isobutírico	Acetona ($1,6 \times 10^{-14}$)	não significativa ($8,9 \times 10^{-1}$)	não significativa ($4,1 \times 10^{-1}$)
Ácido butírico	Acetona ($8,6 \times 10^{-16}$)	não significativa ($8,8 \times 10^{-1}$)	não significativa ($4,9 \times 10^{-1}$)
Ácido isovalérico	Acetona (7×10^{-13})	não significativa ($4,42 \times 10^{-1}$)	não significativa ($1,5 \times 10^{-1}$)
Ácido valérico	Acetona ($7,2 \times 10^{-12}$)	não significativa ($3,9 \times 10^{-1}$)	não significativa ($2,4 \times 10^{-1}$)
Ácido octanoico	Acetona ($2,2 \times 10^{-3}$)	não significativa (5,6 $\times 10^{-1}$)	NaCl ($8,79 \times 10^{-2}$)

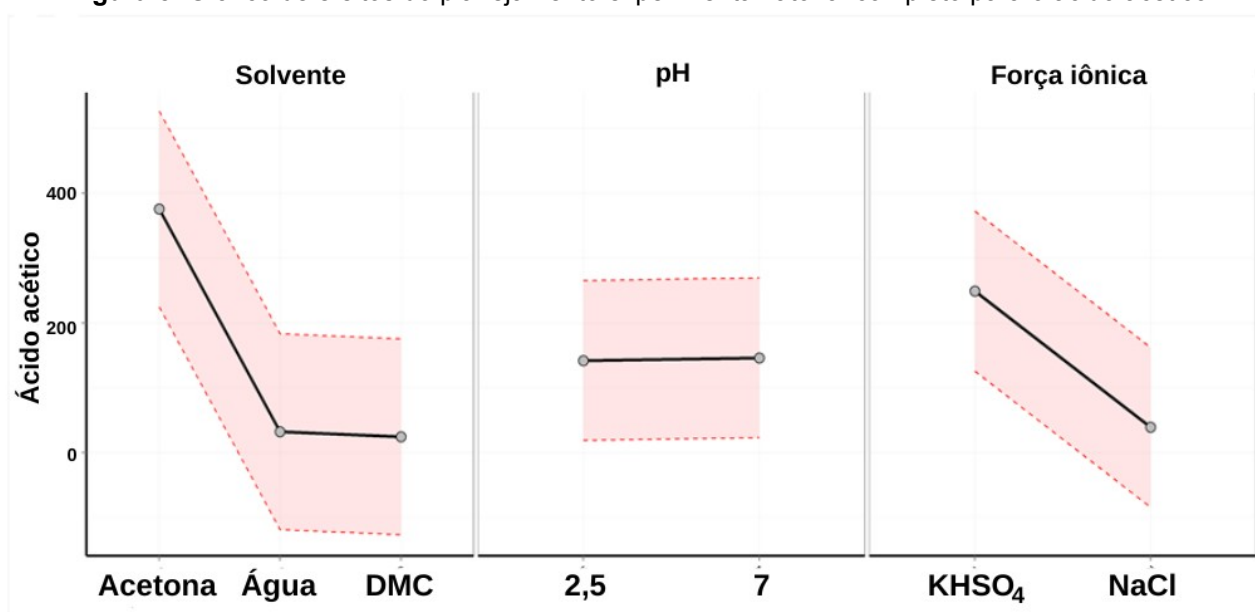
Legenda: p valor $< 0,05$ é significativo (negrito).

Fonte: da autora, 2023.

O planejamento revelou comportamento diferenciado para cada ácido, sendo que o pH não influenciou na extração de nenhum dos ácidos e que o sal só teve influência para o ácido acético e o octanoico (PI). A figura 5 representa o gráfico de efeitos obtido após os resultados da análise de extração do ácido acético. Os gráficos de efeitos dos demais analitos encontram-se nos apêndices A a F. Os segmentos de reta que apresentam inclinação mais notável, representam os efeitos mais significativos. Podemos perceber que o solvente acetona apresenta melhor resultado sobre os demais, pois é capaz de extrair maiores quantidades. Os dois sais inorgânicos não apresentaram diferença significativa ($p > 0,05$) para a maioria dos ácidos. Porém, para a continuidade dos estudos optou-se pelo sal bissulfato de potássio (KHSO₄), pois de acordo com a inclinação do segmento de reta para esse ácido, este foi mais eficiente no processo de extração do ácido acético, um dos principais ácidos produzidos nos biodigestores. A variação de pH da extração não foi significativa para a extração dos analitos, porém, a ionização dos analitos tende a favorecer a transferência dos mesmos para a fase orgânica. Assim, optou-se por realizar as extrações em pH 3, e assim facilitar a medição do pH na fita reativa.

Sendo assim, através do planejamento experimental, foi possível escolher os níveis das variáveis da extração das amostras: solvente acetona, pH 3 e sal inorgânico bissulfato de potássio (KHSO_4).

Figura 5. Gráfico de efeitos do planejamento experimental fatorial completo para o ácido acético



Fonte: da autora, 2023.

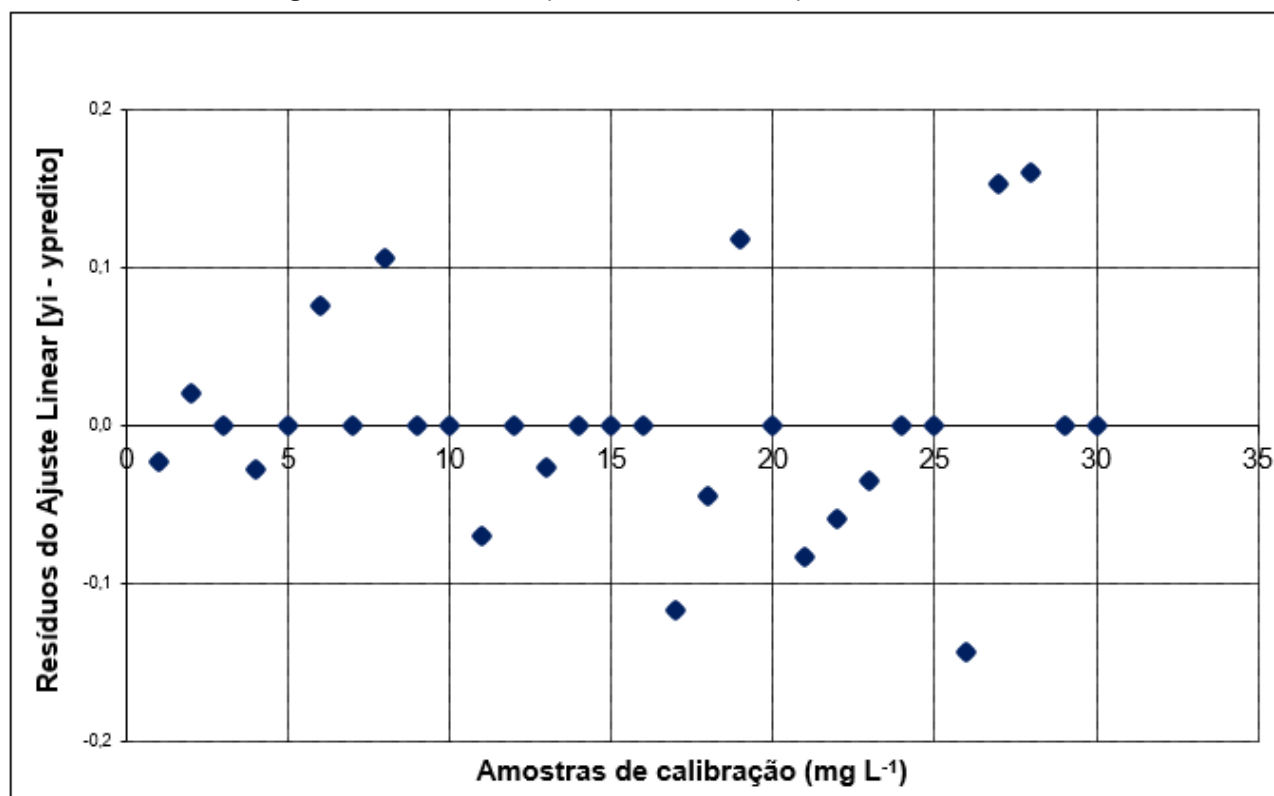
4.3 Validação da metodologia

4.3.1 Linearidade, LD e LQ

As curvas analíticas foram preparadas diretamente na matriz, a qual foi previamente analisada (Apêndices G a R). A faixa de concentração utilizada para o preparo das curvas baseou-se na concentração usual de AGV em biodigestores do tipo BLC e CSTR de bancada conforme o relatado na literatura (10 a 100 mg L⁻¹) (GHIDOTTI *et al.*, 2018; GÓMEZ *et al.*, 2019; DONG *et al.*, 2020; ARIAS *et al.*, 2021).

Antes de realizar a regressão linear, foram verificados a ausência de valores anômalos pelo teste de *Grubbs* e a homocedasticidade pelo teste de *Cochran*, sendo que para todos os analitos não houve valores aberrantes e os dados foram homocedásticos (Figura 6, Apêndices G a K). Sendo assim, pôde-se calcular a linearidade pelo método dos mínimos quadrados.

Figura 6. Gráfico de dispersão dos resíduos para o ácido acético



Fonte: da autora, 2023.

Os parâmetros das curvas analíticas dos AGVs estão apresentados na Tabela 2. Segundo o Inmetro (INMETRO, 2020), o valor de coeficiente de correlação linear (R^2) é um bom indicativo do quanto a reta pode ser considerada adequada como modelo matemático, porém não é conclusivo. Desse modo, além da correlação linear, que possuiu mínimo de 0,997 para o ácido butírico, também foram avaliados os resíduos para verificar essa adequação, sendo que para todos os AGVs observou-se a distribuição aleatória dos dados em torno da reta, confirmando a linearidade do método.

O ácido acético e o ácido isobutírico foram os analitos que apresentaram os menores limites de detecção e quantificação, com valores de: 7,07 e 7,60; e 10,5 e 11,2 mg L⁻¹ para LD e LQ, respectivamente (Tabela 2). Por outro lado, o ácido butírico apresentou valores de 12,5 mg L⁻¹ para o LD e 18,4 mg L⁻¹ para LQ. Estes resultados foram equivalentes aos obtidos por MESQUITA *et al.*, (2013), que utilizaram a técnica de CLAE-UV-DAD (Cromatografia líquida de alta eficiência com detector UV-Vis com arranjo de diodos), apresentando valores de LD entre 5,0 e 10,0 mg L⁻¹, e entre 15,0 e 30,0 mg L⁻¹ para o LQ. Por outro lado, RAPOSO *et al.*, (2015) utilizaram a técnica de CG-DIC, tendo o valor de LD entre 1,90 e 3,0 mg L⁻¹, sendo o menor valor o obtido para o ácido valérico. E o valor de LQ foi de 5,40 a 10,0 mg L⁻¹, sendo o valor de 5,4 obtido para o ácido

isobutírico. Comparado aos demais autores nossos resultados são um pouco mais homogêneos entre os analitos, não sendo encontrado nenhum resultado de LD e LQ muito discrepante.

Tabela 2. Parâmetros de validação metodológica para análise de ácidos graxos voláteis em efluentes de biodigestores

AGV	Faixa linear (mg L ⁻¹)	Equação da reta	R ²	LD (mg L ⁻¹)	LQ (mg L ⁻¹)
Ácido acético	10,0 - 100,0	y = 0,0567x - 0,1465	0,9989	7,60	11,2
Ácido propiônico	10,0 - 100,0	y = 0,0866x - 0,2019	0,9987	8,46	12,5
Ácido isobutírico	10,0 - 100,0	y = 0,1712x - 0,5387	0,9991	7,08	10,5
Ácido butírico	10,0 - 100,0	y = 0,0592x - 0,4040	0,9966	12,5	18,4
Ácido isovalérico	10,0 - 100,0	y = 0,1505x - 0,7617	0,9974	10,8	16,0
Ácido valérico	10,0 - 100,0	y = 0,1509x + 1,0707	0,9980	9,48	14,1

Legenda: R²: coeficiente de correlação; LD: limite de detecção; LQ: limite de quantificação.

Fonte: da autora, 2023.

4.3.2 Repetibilidade

A repetibilidade foi avaliada em três níveis de concentração (mínimo, intermediário e máximo). Como o esperado, os maiores valores de coeficiente de variância foram obtidos nos níveis mínimos de concentração (10 mg L⁻¹) (Tabela 3). Os ácidos acético, propiônico, isovalérico e valérico ficaram com os valores acima do estipulado pelo INMETRO, de 7,3% no nível de 10 mg L⁻¹. No nível máximo testado (100 mg L⁻¹), somente o ácido valérico ficou com CV% superior (7,0%) ao estabelecido de 5,3%. Excetuando o ácido valérico, todos os níveis foram marginalmente superiores.

Tabela 3. Dados da repetibilidade do método para determinação de AGVs

AGV	(mg L ⁻¹)	CV (%)
Ácido acético	10	11,2
	50	7,2
	100	5,2
Ácido propiônico	10	12,1
	50	5,4
	100	4,7
Ácido isobutírico	10	4,2
	50	5,9
	100	4,8
Ácido butírico	10	5,4
	50	6,6
	100	5,1
Ácido isovalérico	10	20,7

	50	5,4
	100	5,3
Ácido valérico	10	13,3
	50	5,2
	100	7,0

Legenda: cada analito foi testado em três níveis de concentração (10, 50 e 100 mg L⁻¹)

Fonte: da autora, 2023.

4.3.3 Recuperação

A recuperação dos AGVs ficou entre 87,2 e 124,4%, sendo os valores máximo e mínimo obtidos para o ácido valérico. A normativa do Inmetro estipula valores de aceitabilidade de recuperação de acordo com o nível de concentração, sendo de 90 a 107 % para 100 mg L⁻¹, e de 80 a 110 para 10 mg L⁻¹.

Para o nível de 10 mg L⁻¹ observou-se que os ácidos valérico, isovalérico e butírico apresentaram níveis superior a 110%, ficando fora do recomendado de 110%. Porém, nos níveis de concentração de 20 a 85 mg L⁻¹ (mesma ordem de grandeza do nível 10 mg L⁻¹), todos os analitos ficaram dentro da faixa de recuperação recomendada, variando de 87,2 a 108%. No nível de concentração de 100 mg L⁻¹ todos os analitos também ficaram dentro do recomendado, com variações de 99 a 101% (Tabela 4).

Tabela 4. Recuperação do método para os AGVs em porcentagem (%)

Concentração (mg L ⁻¹)	Ac	Pro	I-bu	Bu	I-va	Va
10	98,2	104,0	109,2	116,0	116,6	124,4
20	108,0	96,5	100,0	90,9	97,0	98,4
30	97,2	101,8	97,1	92,4	91,8	90,5
50	99,5	92,0	92,9	100,3	99,1	97,8
65	94,7	93,8	94,5	99,5	98,5	99,7
85	98,9	101,0	101,1	86,3	87,2	87,2
100	99,3	100,4	101,0	100,6	100,9	100,8

Legenda: Ac: ácido acético; Pro: ácido propiônico; I-bu: ácido isobutírico; Bu: ácido butírico; I-va: ácido isovalérico; Va: ácido valérico.

Fonte: da autora, 2023.

4.4 Parâmetros de monitoramento dos biodigestores

4.4.1 Concentração e perfil dos ácidos graxos voláteis

Os valores do total de AGV dos reatores BLC variaram de 226 ± 8.2 a 1.554 ± 88.4 mg L⁻¹ para o BLC1. No BLC2, de 213 ± 10.3 a 1.542 ± 82.5 mg L⁻¹ (Tabela 5 e 6). O total de AGV permaneceu próximo ao apresentado pela literatura: 1.000 mg L⁻¹ (GÓMEZ

et al., 2019); 1.094 mg L⁻¹ (DONG *et al.*, 2020); 1.000 mg L⁻¹ (ARIAS *et al.*, 2021). Os ácidos acético e o propiônico foram os AGVs que estavam presentes em todas as amostras, em maior abundância (Tabelas 5 e 6), enquanto os demais ácidos foram detectados em menor concentração. Esse perfil ocorre em razão da temperatura mesofílica favorecer a produção dos ácidos acético e propiônico (JIANG *et al.*, 2013). Adicionalmente, o ácido propiônico e os AGVs de cadeia maior tendem a acumular quando há inibição das bactérias sintróficas responsáveis pela oxidação dos AGVs (WU *et al.*, 2021).

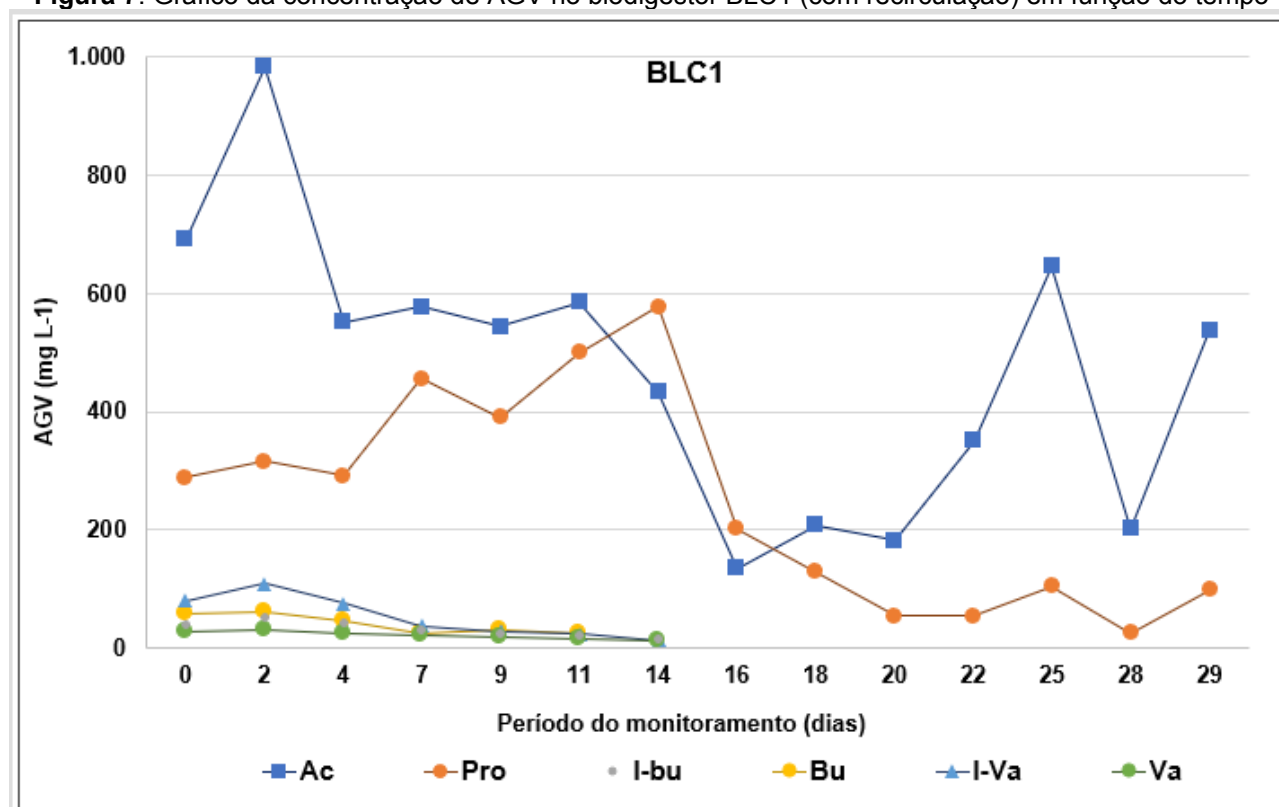
Tabela 5. Concentração e desvio padrão de AGV no biodigestor BLC1 (com recirculação) (mg L⁻¹)

Dia	Ac	Pro	I-bu	Bu	I-va	Va	Total
0	692,2 ± 47,0	288,0 ± 18,1	40,7 ± 1,1	57,9 ± 2,5	80,0 ± 3,7	28,1 ± 1,3	1186,9 ± 73,7
2	983,7 ± 65,9	316,4 ± 11,7	53,0 ± 1,6	60,2 ± 3,3	109,3 ± 4,2	31,5 ± 1,7	1554,2 ± 88,4
4	551,0 ± 32,9	291,6 ± 4,0	42,4 ± 0,3	45,2 ± 0,7	76,0 ± 0,7	25,8 ± 1,0	1032,1 ± 39,6
7	577,8 ± 11,3	456,2 ± 8,3	31,4 ± 1,0	25,8 ± 0,4	38,1 ± 1,7	20,6 ± 0,9	1149,9 ± 23,6
9	544,5 ± 41,1	390,3 ± 3,8	24,0 ± 2,2	30,7 ± 1,7	28,3 ± 2,1	19,0 ± 1,2	1036,8 ± 52,1
11	585,5 ± 2,7	500,4 ± 1,3	22,1 ± 0,2	23,2 ± 0,5	24,1 ± 0,4	16,3 ± 1,3	1171,6 ± 6,4
14	433,5 ± 21,2	577,8 ± 29,6	14,7 ± 1,0	13,9 ± 1,0	13,8 ± 1,2	13,3 ± 0,2	1053,2 ± 54,2
16	134,9 ± 3,0	201,9 ± 9,3	0,0	0,0	0,0	0,0	336,8 ± 12,3
18	207,4 ± 14,5	128,6 ± 8,1	0,0	0,0	0,0	0,0	336,0 ± 22,6
20	181,6 ± 14,3	54,1 ± 3,0	0,0	0,0	0,0	0,0	235,7 ± 17,3
22	350,2 ± 21,5	54,9 ± 4,0	0,0	0,0	0,0	0,0	405,1 ± 25,5
25	645,1 ± 21,6	104,9 ± 0,7	16,0 ± 0,7	0,0	18,0 ± 0,8	0,0	784,0 ± 23,8
28	201,4 ± 7,5	24,7 ± 0,7	0,0	0,0	0,0	0,0	226,1 ± 8,2
29	538,5 ± 31,3	98,7 ± 0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	637,2 ± 31,3

Legenda: Ac: ácido acético; Pro: ácido propiônico; I-bu: ácido isobutírico; I-va: ácido isovalérico; Va: ácido valérico.

Fonte: da autora, 2023.

Na segunda semana de operação, a partir do 16º dia, houve diminuição considerável na concentração individual dos AGVs, com estabilidade nos dias posteriores (Figuras 7 e 8). O rápido consumo do ácido acético indica que o acúmulo de AGV é reversível dependendo da concentração, e como se encontram os demais parâmetros do reator (WU *et al.*, 2021).

Figura 7. Gráfico da concentração de AGV no biodigestor BLC1 (com recirculação) em função do tempo

Legenda: Ac: ácido acético; Pro: ácido propiônico; I-bu: ácido isobutírico; I-va: ácido isovalérico; Val: ácido valérico.

Fonte: da autora, 2023.

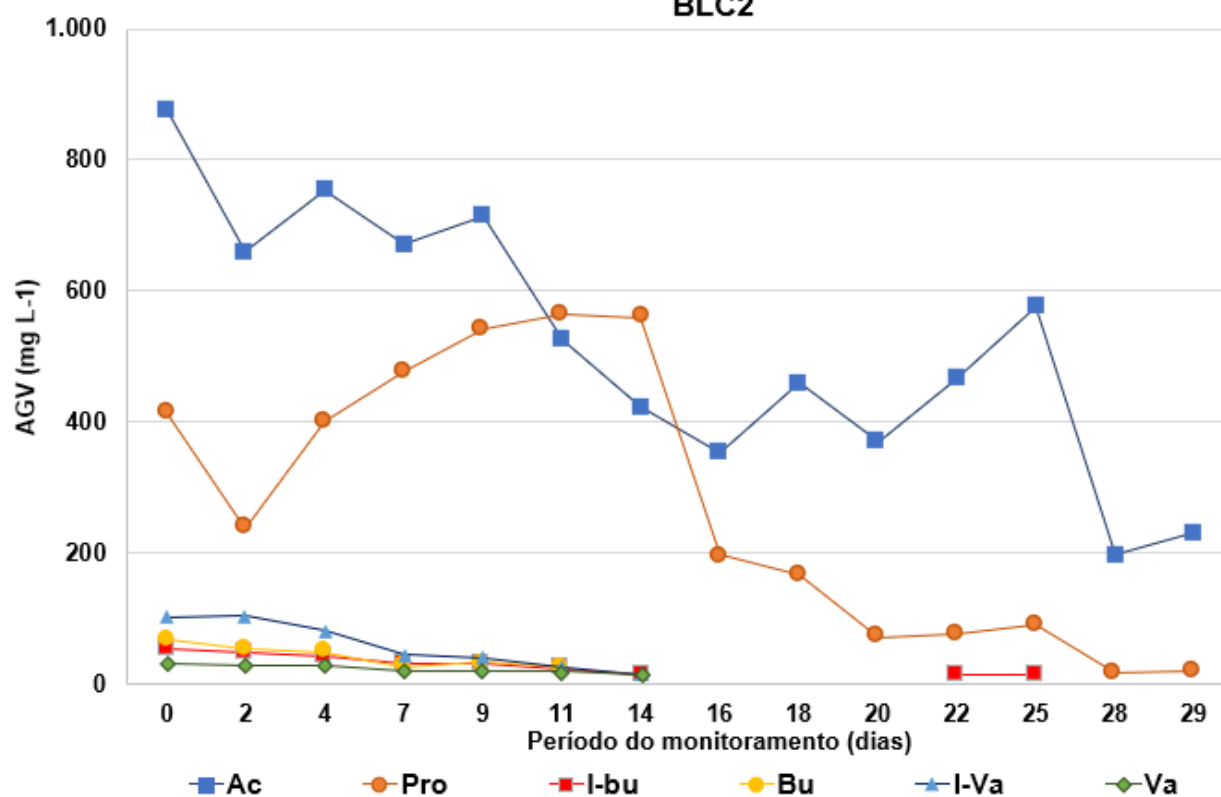
Tabela 6. Concentração e desvio padrão de AGV no biodigestor BLC2 (sem recirculação) (mg L^{-1})

Dia	Ac	Pro	I-bu	Bu	I-va	Va	Total
0	874,0 ± 57,9	413,1 ± 10,3	53,4 ± 3,0	68,8 ± 3,4	102,3 ± 7,6	30,4 ± 0,3	1541,9 ± 82,5
2	661,2 ± 8,8	2381 ± 4,1	48,0 ± 0,2	55,2 ± 3,3	104,5 ± 8,2	29,6 ± 1,7	1136,7 ± 26,3
4	754,1 ± 85,8	401,3 ± 39,3	41,9 ± 3,7	48,9 ± 32	81,1 ± 7,2	27,9 ± 0,0	1355,3 ± 139,2
7	671,1 ± 29,3	477,9 ± 23,4	32,6 ± 0,6	27,2 ± 1,4	46,6 ± 2,2	19,8 ± 1,2	1275,3 ± 58,1
9	713,1 ± 14,6	540,6 ± 12,1	32,7 ± 0,5	33,4 ± 1,6	40,8 ± 0,2	20,7 ± 0,6	1381,3 ± 29,6
11	524,8 ± 22,0	564,3 ± 35,8	23,3 ± 1,5	24,4 ± 0,9	25,6 ± 1,6	18,8 ± 0,5	1181,2 ± 62,3
14	424,2 ± 13,6	559,4 ± 19,8	14,7 ± 0,5	0,0	14,1 ± 0,4	14,8 ± 0,3	1027,1 ± 34,6
16	353,4 ± 6,8	197,6 ± 2,2	0,0	0,0	0,0	0,0	551,0 ± 9,0
18	459,2 ± 19,6	168,0 ± 4,8	0,0	0,0	15,2 ± 0,6	0,0	642,3 ± 25,0
20	371,0 ± 20,4	71,8 ± 8,4	0,0	0,0	0,0	0,0	442,8 ± 28,8
22	465,7 ± 11,6	77,6 ± 3,7	14,4 ± 8,0	0,0	14,3 ± 0,3	0,0	571,9 ± 23,6
25	575,8 ± 37,2	89,7 ± 5,1	14,3 ± 0,2	0,0	15,3 ± 0,7	0,0	695,8 ± 43,2
28	197,4 ± 9,0	16,0 ± 0,8	15,1 ± 0,5	0,0	0,0	0,0	213,4 ± 10,3
29	231,3 ± 16,3	20,7 ± 0,9	0,0	0,0	0,0	0,0	252,0 ± 17,8

Legenda: Ac: ácido acético; Pro: ácido propiônico; I-bu: ácido isobutírico; Bu: ácido butírico; I-va: ácido isovalérico; Val: ácido valérico.

Fonte: da autora, 2023.

Figura 8. Gráfico da concentração de AGV no biodigestor BLC2 (com recirculação) em função do tempo



Legenda: Ac: ácido acético; Pro: ácido propiônico; I-bu: ácido isobutírico; I-va: ácido isovalérico; Val: ácido valérico.

Fonte: da autora, 2023.

De acordo com a Tabela 5 e a Figura 7, o BLC1 produziu no 25º dia de operação, uma pequena concentração de ácido butírico ($16,0 \pm 0,7 \text{ mg L}^{-1}$) e ácido valérico ($18,0 \pm 0,8 \text{ mg L}^{-1}$). Por outro lado, conforme a Tabela 6 e a Figura 8, O BLC2 produziu a praticamente a mesma concentração de ácido isobutírico e isovalérico. Porém, ainda que esta baixíssima concentração de AGVs não é prejudicial ao reator, nota-se que o biodigestor que não utilizou recirculação (BLC2), produziu AGV por mais tempo. Algo semelhante foi observado por DONG et al. 2019b. Nesse estudo, o refluxo do lodo acidificado contribuiu no sistema tampão do biodigestor. Dessa forma, mesmo que por uma diferença mínima, a recirculação do substrato indica uma vantagem ao biodigestor, pois no BLC1, a concentração de AGVs foi razoavelmente mais estável do que no BLC2.

4.4.2 pH, amônio e razão FOS/TAC

A Tabela 7 apresenta os resultados das leituras de pH, amônio e FOS/TAC dos reatores. As medidas de pH para ambos os reatores foi de 7,8. Este valor coincide com o

recomendado para arqueas metanogênicas, que é de 6,5 a 8,0 (TABATABAEI; GHANAVATI, 2018). Substratos ricos em nitrogênio permitem a formação de amônio e inibição da DA com o aumento do pH (DEUBLEIN; STEINHEUSER, 2011). Bem como, o mesmo foi relatado por outros autores sobre mono-digestão de dejetos animais (GÓMEZ *et al.*, 2019; DONG *et al.*, 2019b; DONG *et al.*, 2020).

Com relação ao teor de amônio e alcalinidade total (TAC), observa-se que estes estão acima do recomendado. Entretanto, a razão FOS/TAC apresenta resposta mais rápida e sensível diante de perturbações do sistema, quando comparada ao valor de alcalinidade e outras razões (SUN *et al.*, 2019). Desse modo, a razão FOS/TAC (GÓMEZ *et al.*, 2019; DONG *et al.*, 2019b; DONG *et al.*, 2020) estava dentro do esperado, apresentando valores estáveis (MÉZES *et al.*, 2011). E a curto prazo, recomenda-se observar também as flutuações dos parâmetros, pois esses também podem atuar como indicadores confiáveis (WU *et al.*, 2021).

Tabela 7. Média e desvio padrão dos parâmetros ácido-base dos biodigestores BLC registrados durante a fase de operação

Parâmetro	BLC1	BLC2	Valor recomendado
pH	7,8 ±0,08	7,8 ±0,08	6,5 a 8,0 ⁽¹⁾
Amônio (mg L ⁻¹)	1.986 ±78	2.000 ±71	<1.500 ⁽²⁾
FOS/TAC	0,2 ±0,06	0,2 ±0,08	0,3 a 0,4 ⁽³⁾
Total de AGV (mg L ⁻¹)	226,1 – 1554,2	213,4 – 1541,9	1,000-4,000 ⁽⁴⁾

Fonte: 1, 2 -TABATABAEI; GHANAVATI (2018); 3, 4 - KORRES *et al.*, (2013).

Desse modo, os valores de pH e amônio se encontram conforme o esperado. E como eles se apresentam num caráter básico, isso influenciou os valores de FOS/TAC e na concentração de AGV, que se encontram marginalmente abaixo do recomendado pela literatura. Entretanto, como já foi mencionado, não existe um valor universal nestes parâmetros.

4.4.3 Produção de biogás e metano

A Tabela 8 apresenta os valores de produtividade de biogás e rendimento de metano. A produção volumétrica de biogás representa o volume normalizado de biogás. Já o rendimento de metano indica o desempenho do biodigestor considerando o volume. A produtividade de biogás foi menor do que o obtido por outros estudos ($0.09 \pm 0.05 \text{ L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ no BLC1, e 0.09 ± 0.04 no BLC2) (Tabela 8 e Figura 9). O rendimento de biogás obtido ($0.11 \pm 0.06 \text{ L gSV}^{-1}$ no BLC1, 0.11 ± 0.05 no BLC2) é inferior ao descrito na literatura de 1.08 L gSV^{-1} (DONG *et al.*, 2019b). A composição de biogás é mais adequada para indicar desequilíbrio no processo caso ocorra variação na produtividade de biogás. Além disso, o rendimento do biogás depende da COV e das características do substrato (WU *et al.*, 2021).

Tabela 8. Dados de produção e composição de biogás dos reatores BLC

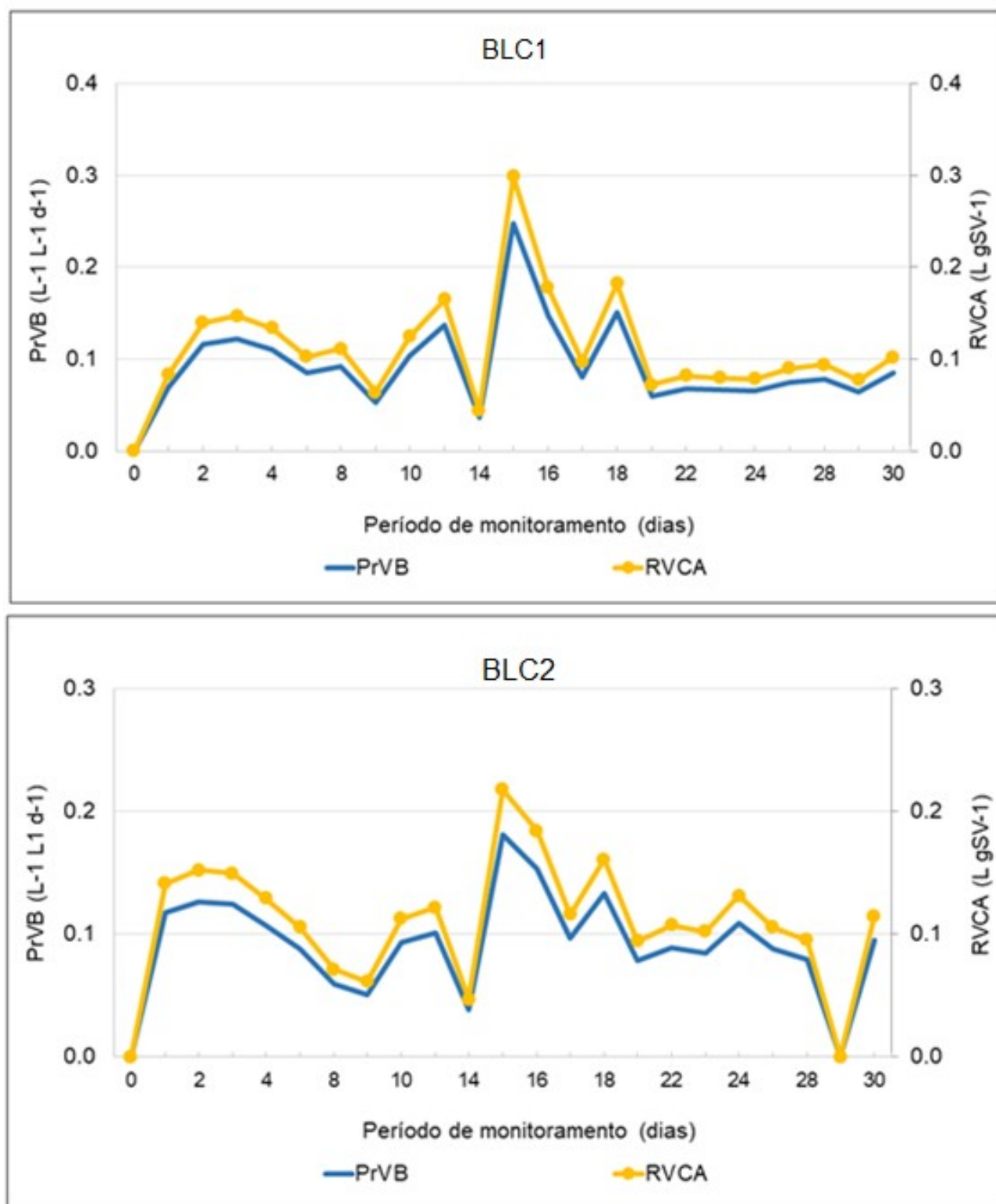
Substrato	Reator	COV (gSV L ⁻¹ d ⁻¹) ⁽¹⁾	PrVB (L ⁻¹ L ⁻¹ d ⁻¹) ⁽²⁾	RVCA (L g SV ⁻¹) ⁽³⁾	CH ₄ (%)	CO ₂ (%)	Referência
DS ⁽⁴⁾	BLC ⁽⁵⁾	0.83	0.09 ± 0.1	0.11 ± 0.1	68.1 ± 13.0	32.0 ± 0.1	Este estudo (BLC1)
DS	BLC	0.83	0.09 ± 0.0	0.11 ± 0.1	57.0 ± 0.2	43.0 ± 0.2	Este estudo (BLC2)
RSO	BLC	12.7	$5,11 \pm 0.25$	-(⁹)	65.32 ± 3.61	34.68 ± 0.55	ROSSI et al. 2022
RC + EM ⁽⁶⁾	RFP ⁽⁷⁾	4.2	0.27 ± 55	0.64 ± 26	85.9 ± 1.3	-(⁹)	KHALIL et al. 2021
DB ⁽⁶⁾	RFP	2.67 ⁽⁸⁾	1.08	0.204	62,5	-(⁹)	DONG et al. 2019b
DS	RFP	1610	-(⁹)	0.37 ± 0.05	$62,5 \pm 2.33$	-(⁹)	GÓMEZ et al. 2019

Legenda: 1 – Carga orgânica volumétrica; 2 - Produtividade de Biogás; 3 - Rendimento de Metano; 4 – DS: dejetos suínos; 5 – Biodigestor de Lagoa Coberta; 6 – Resíduo de comida e esgoto municipal; Silagem de milho; 7 - Dejetos bovinos; 7 – Reator de fluxo pistonado; 8 – COV expressa em gST L⁻¹ d⁻¹; 9 – Dado não divulgado.

Fonte: da autora, 2023.

No que se refere à composição de biogás, a concentração de CH₄ (68,1% no BLC1, 57,0% no SR) se aproxima aos valores descritos na literatura de 62,5% (GÓMEZ *et al.*, 2019; DONG *et al.*, 2019b). Porém, deve-se observar os teores de metano no reator BLC1 que é 19,5% superior ao BLC2. Como mencionado no item 4.4.1, o BLC1 obteve mais estabilidade na concentração de AGVs. Sendo assim, a estabilidade de AGVs no BLC1 apresentada pelo biodigestor com recirculação de substrato pode ter contribuído no teor de metano do BLC1 conforme já observado na literatura (DONG *et al.*, 2019b). Quanto ao teor de CO₂ encontrado (32,0% no BLC1, 43,0% no BLC2) foram aproximados aos relatados na literatura de 32,75 e 34,68% (VELUCHAMI *et al.*, 2021; ROSSI *et al.*, 2022).

Figura 9. Produção volumétrica de biogás e rendimento volumétrico de metano, dos reatores BLC1 e BLC2



Legenda: PrVB – Produtividade de biogás, ou Produção Volumétrica de Biogás; RVCA - Rendimento de Metano; BLC1: Biodigestor de lagoa coberta, com recirculação; BLC2: Biodigestor de lagoa, sem recirculação.

Fonte: da autora, 2023.

5. CONCLUSÃO

Nesse estudo, a metodologia de extração líquido (LLE) foi validada e otimizada – através de adaptação da metodologia oficial, ao utilizar acetona, bissulfato de potássio (KHSO_4) e análise por cromatografia gasosa acoplada a detector de ionização por chama (CG-DIC) para a determinação dos ácidos acético, propiônico, isobutírico, butírico, isovalérico e valérico presentes no lodo anaeróbio de biodigestores. O limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ) obtidos foram de $1,2 - 2,5 \text{ mg L}^{-1}$ e $1,9 - 3,7 \text{ mg L}^{-1}$, respectivamente, para todos os analitos. Obter baixos valores de LQ e LD é essencial, porque a presença dos ácidos isobutírico e isovalérico em baixas concentrações, como $5,0 \text{ mg}$ podem indicar desequilíbrio na DA. A metodologia proposta, a qual apresentou resultados satisfatórios com boa repetibilidade ($4,2 - 20,7\%$) e recuperação ($90,9 - 104,0\%$) foi empregada para análise do lodo anaeróbio de dois biodigestores de lagoa coberta (BLC).

Os biodigestores monitorados neste estudo operaram em condições semelhantes à alguns estudos. Entretanto, foi utilizada uma menor carga volumétrica, e menor teor de sólidos voláteis. Por consequência, parâmetros como a produção e rendimento de biogás e a produção e rendimento de metano foram menores do que o relatado na literatura. Porém, nota-se que estes parâmetros apresentaram estabilidade no processo.

6. REFERÊNCIAS

ABBASI, T.; TAUSEEF, S. M.; ABBASI, S. A.. *Biogas energy*. New York: Springer Science & Business Media, 169 p. 2012.

AFONSO, E.; NASCIMENTO, R.; ALVES, L. K.; PALHARES, J.; GAMEIRO, A.. Viabilidade econômica na construção e implantação de biodigestor e esterqueira na suinocultura. *Pubvet*. v. 13, p. 01-16, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.31533/pubvet.v13n12a470.1-16>>. Acesso em: 23 mai. 2023.

AI, G.; SUN, T.; & DONG, X.. *Evaluation of hydrolysis and alcoholysis reactions in gas chromatography/mass spectrometry inlets*. *Journal of Chromatography A*, v. 1356, p. 283-288, 2014. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.chroma.2014.06.036>>. Acesso em: 25 mai. 2023.

ALAVI-BORAZJANI, S. A.; CAPELA, I.; TARELHO, L. A.. *Over-acidification control strategies for enhanced biogas production from anaerobic digestion: a review*. *Biomass and bioenergy*, v. 143, 105833, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2020.105833>>. Acesso em: 23 mai. 2023.

ABPA (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE PROTEÍNA ANIMAL). *Relatório Anual*. p. 74. 2022. Disponível em: <<https://abpa-br.org/wp-content/uploads/2023/01/abpa-relatorio-anual-2022.pdf>>. Acesso em: 10 jan. 2023.

AHRING B. K.; SANDBERG M.; ANGELIDAKI I.. *Volatile fatty acids as indicators of process imbalance in anaerobic digesters*. *Applied Microbiology Biotechnology*, v. 43, 559-565, 1995.

AL SEADI, T.; RUTZ, D.; PRASSL, H.; KÖTTNER, M.; FINSTERWALDER, T.; VOLK, S.; JANSSEN, R.. *Biogas Handbook*. Esbjerg: Denmark, University of Southern Denmark, p.126, 2008.

APHA. AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. **Standard methods for the examination of water and wastewater**. Method 5560B Volatile Organic Acids, 22. ed. Washington: American Water Works Association; AWWA; WPCF, 2012.

APHA. AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. **Standard methods for the examination of water and wastewater**. Method 5220B Open Reflux Method, 23. ed. Washington: American Water Works Association; AWWA; WPCF, 2017.

APHA. AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. **Standard methods for the examination of water and wastewater**. Method 5220D Closed Reflux Method, 23. ed. Washington: American Water Works Association; AWWA; WPCF, 2017.

APHA. AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. **Standard methods for the examination of water and wastewater**. Method 2540 Solids Method, 23. ed. Washington: American Water Works Association; AWWA; WPCF, 2017.

AQUINO, S. F. de; CHERNICHARO, C. A. L.. *Build up of volatile fatty acids (VFA) in anaerobic reactors under stress conditions: causes and control strategies*. **Engenharia Sanitária e Ambiental**, v. 10, n. 2, p. 152-161, 2005.

ARAMRUEANG, N.; LOMWONGSOPON, P.; BOONSONG, S.; KINGKLAO, P.. *Improved Spectrophotometric Method for Determination of High-Range Volatile Fatty Acids in Mixed Acid Fermentation of Organic Residues*. **Fermentation**, v. 8, n. 5, p. 202, 2022. Disponível em: <<https://doi.org/10.3390/fermentation8050202>>. Acesso em: 24 mai. 2023.

ARIAS, D. E.; VELUCHAMY, C.; HABASH, M. B.; GILROYED, B. H.. *Biogas production, waste stabilization efficiency, and hygienization potential of a mesophilic anaerobic plug flow reactor processing swine manure and corn stover*. **Journal of Environmental Management**, v. 284, p. 112027, 2021. Disponível em: <<https://doi-org./10.1016/j.jenvman.2021.112027>>. Acesso em: 25 mai. 2023.

AWHANGBO, L.; BENDOULA, R.; ROGER, J. M.; BÉLINE, F. FAULT.. *Detection with moving window PCA using NIRS spectra for monitoring the anaerobic digestion process*. **Water Science and Technology**, v. 81 n. 02, p. 367-382, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.2166/wst.2020.117>>. Acesso em: 13 out. 2022.

BATSTONE, D. J.; PUYOL, D.; FLORES-ALSINA, X.; RODRÍGUEZ, J.. *Mathematical modelling of anaerobic digestion processes: applications and future needs. Environmental Sciences and Biotechnology*, v. 14, p. 595-613, 2015.

BEGUM, S.; ARELLI, V.; ANUPOJU, G. R.; SRIDHAR, S.; BHARGAVA, S. K.; ESHTIAGHI, N.. *Optimization of feed and extractant concentration for the liquid–liquid extraction of volatile fatty acids from synthetic solution and landfill leachate. Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, v. 90, p. 190-202, 2022. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jiec.2020.07.011>>. Acesso em: 24 mai. 2023.

BOE, K.; BATSTONE, D. J.; ANGELIDAKI, I.. *An innovative online VFA monitoring system for the anerobic process, based on headspace gas chromatography. Biotechnology and Bioengineering*, v. 96, n. 4, 2007.

CIBIOGÁS-ER. (CENTRO INTERNACIONAL DE ENERGIAS RENOVÁVEIS - Biogás). **Plano de operação dos reatores**. Foz do Iguaçu/PR: CIBiogás-ER - PR, 2019.

COURTOIS, N.; POCHARD, I.; REMERY, M.; HIHN, J. Y.; TOURNERET, L.. *Influence of the characteristics of paper mill sludges on their anaerobic digestion. Waste Management & Research*, v. 40 n. 08, p. 1256-1266, 2022. Disponível em: <<https://doi.org/10.1177/0734242X211065698>>. Acesso em: 24 mai. 2023.

CHATTERJEE, B.; RADHAKRISHNAN, L.; MAZUMDER, D.. *New approach for determination of volatile fatty acid in anaerobic digester sample. Environmental Engineering Science*, v. 35, n. 04, p. 333-351, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1089/ees.2017.0190>>. Acesso em: 24 mai. 2023.

CREMONEZ, P. A.; TELEKEN, J. G.; MEIER, T. R. W.; ALVES, H. J.. *Two-stage anaerobic digestion in agroindustrial waste treatment: a review. Journal of Environmental Management*, v. 281, 111854, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2020.111854>>. Acesso em: 23 mai. 2023.

CRUZ, I. A.; ANDRADE, L. R.; BHARAGAVA, R. N.; NADDA, A. K.; BILAL, M.; FIGUEIREDO, R. T., FERREIRA, L. F.. *An overview of process monitoring for anaerobic*

digestion. **Biosystems Engineering**, v. 207, p. 106-119, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.biosystemseng.2021.04.008>>. Acesso em: 23 mai. 2023.

DEUBLEIN, D; STEINHAUSER, A.. **Biogas from waste and renewable resources: An introduction**. Ed. Wiley-VCH, 2011.

DOLAN, J. W.. *When should an internal standard be used?*. **LC-GC North America**, v. 30, n. 6, p. 474-480, 2012.

DONG, L.; CAO, G.; GUO, X.; LIU, T.; WU, J.; REN, N.. *Efficient biogas production from cattle manure in a plug flow reactor: a large scale long term study*. **Bioresource technology**, 278, p. 450-455, 2019a. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.01.100>>. Acesso em: 23 mai. 2023.

DONG, L.; CAO, G.; WU, J.; YANG, S.; REN, N.. *Reflux of acidizing fluid for enhancing biomethane production from cattle manure in plug flow reactor*. **Bioresource technology**, v.284, 248-255, 2019b. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.03.092>>. Acesso em: 24 mai. 2023.

DONG, L.; CAO, G.; TIAN, Y.; WU, J.; ZHOU, C.; LIU, B.; ZHAO, L.; FAN, J.; REN, N.. *Improvement of biogas production in plug flow reactor using biogas slurry pretreated cornstalk*. **Bioresource Technology Reports**, v. 9, p. 100378, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.biteb.2019.100378>>. Acesso em: 25 mai. 2023.

EDA, S.; KUMARI, A.; THELLA, P. K.; SATYAVATHI, B; RAJARATHINAM, P.. *Recovery of volatile fatty acids by reactive extraction using tri-n-octylamine and tri-butyl phosphate in different solvents: Equilibrium studies, pH and temperature effect, and optimization using multivariate taguchi approach*. **The Canadian Journal of Chemical Engineering**, v. 95, n. 7, p. 1373-1387, 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1002/cjce.22803>>. Acesso em: 24 mai. 2023.

FAN, Y. V.; KLEMEŠ, J. J.; LEE, C. T.; PERRY, S.. *Anaerobic digestion of municipal solid waste: Energy and carbon emission footprint*. **Journal of environmental management**, v. 223, p. 888-897, 2018 Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2018.07.005>> Acesso em: 23 mai. 2023.

FERNÁNDEZ, R.; DINSDALE, R. M.; GUWY, A. J.; PREMIER, G. C.. *Critical analysis of methods for the measurement of volatile fatty acids*. **Critical Reviews in Environmental Science and Technology**, v. 0, n. 0, p. 1-26, 2016.

GAO, Y.; JIANG, J.; MENG, Y.; YAN, F.; & AIHEMAITI, A.. *A review of recent developments in hydrogen production via biogas dry reforming*. **Energy Conversion and Management**, v. 171, p. 133-155, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.enconman.2018.05.083>>. Acesso em: 23 mai. 2023.

Geotech Instruments UK Ltd. **Manual de Instruções do Biogas 5000 Gas Analyser**, versão 00, 107 p. Disponível em: <<http://www.geotechuk.com/site/wp-content/uploads/2016/01/BIOGAS-5000-Operating-Manual.pdf>>. Acesso em: 14 jun. 2020.

GHIDOTTI, M.; FABBRI, D.; TORRI, C.; PICCININI, S.. *Determination of volatile fatty acids in digestate by solvent extraction with dimethyl carbonate and gas chromatography-mass spectrometry*. **Analytica Chimica Acta**, v. 1034, p. 92-101, 2018.

GLAZER, A. N.; NIKAIDO, H.. **Microbial Biotechnology: fundamentals of applied microbiology**. 2. ed. Cambridge University Press, New York, USA, 2007.

GLIBERT, P. M.. *From hogs to HABs: impacts of industrial farming in the US on nitrogen and phosphorus and greenhouse gas pollution*. **Biochemistry**, v. 150, p. 139-180, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s10533-020-00691-6>>. Acesso em 22 mai. 2023.

GÓMEZ, D.; RAMOS-SUÁREZ, J. L.; FERNÁNDEZ, B.; MUÑOZ, E.; TEY, L., ROMERO-GÜIZA, M.; HANSEN, F.. *Development of a modified plug-flow anaerobic digester for biogas production from animal manures*. **Energies**, v. 12, n. 13, p. 2628, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.3390/en12132628>>. Acesso em: 24 mai. 2023.

GONZÁLEZ-FERNÁNDEZ, C.; GARCÍA-ENCINA, P. A.. *Impact of substrate to inoculum ratio in anaerobic digestion of swine slurry*. **Biomass Bioenergy**, v. 33, n. 8, p. 1065-1069, 2009.

GUÉRETTE, C.; LEMOINE, P.; RAMIREZ, P.; SEGURA, P. A.. *Determination of short-chain carboxylic acids and non-targeted analysis of water samples treated by wet air oxidation using gas chromatography-mass spectrometry*. **Journal of Chromatography Analysis**, v. 1652, 462352, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.chroma.2021.462352>>. Acesso em: 24 mai. 2023.

HÄRDLE W. K.; SIMAR, L. **Applied Multivariate Statistical Analysis**. 4. ed., Springer, 580 p. 2015.

HILL D. T.; HOLMBERG, R. D.. *Long chain volatile fatty acid relationships in anaerobic digestion of swine waste*. **Biological Wastes**, v. 23, p. 195-214, 1988.

INMETRO (Instituto Nacional de Metrologia). **Orientação sobre validação de métodos analíticos**. DOQ-CGCRE-008: revisão 09. Brasília: INMETRO, 2020. Disponível em: <http://www.inmetro.gov.br/Sidoq/Arquivos/Cgcre/DOQ/DOQ-Cgcre-8_08.pdf>. Acesso em: 17 mai. 2023.

JIANG, J.; ZHANG, Y.; LI, K.; WANG, Q.; GONG, C.; LI, M.. *Volatile fatty acids production from food waste: effects of pH, temperature, and organic loading rate*. **Bioresource technology**, v. 143, p. 525-530, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2013.06.025>>. Acesso em: 25 mai. 2023.

KHALIL, C. A.; ERAKY, M. T.; GHANIMEH, S.. *Localized mixing of anaerobic plug flow reactors*. **Water Research**, v. 204, p. 117588, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.watres.2021.117588>>. Acesso em: 25 mai. 2023.

KORRES, N. E.; NIZAMI, A. S.; VARIATION IN ANAEROBIC DIGESTION: NEED FOR PROCESS MONITORING. In: KORRES, N. E.; O'KIELY, P.; BENZIE, J. A H.; WEST, J. S.. **Bioenergy production by anaerobic digestion: using agricultural biomass and organic wastes**. 2^a. ed. Abingdon, England: Routledge, 442 p. 2013.

KUNZ, A.; STEINMETZ, R. L. R. DO AMARAL, A. C. do.. **Fundamentos da digestão anaeróbia, purificação do biogás, uso e tratamento do digestato**. Concórdia: Sbera: Embrapa Suínos e Aves, 209 p. 2019.

LANÇAS, F. M.. **Validação de métodos cromatográficos de análise**. São Carlos: RiMa. 62 p. 2004.

LEITE, P. F. A. F.; VICH, D. V.; CALLADO, N. H.. Tratamento de dejetos de suinocultura em reator anaeróbio com pós-tratamento aeróbio/anóxico. **Engenharia Sanitária Ambiental**, v. 26, n. 03, p. 567-576, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/S1413-415220200009>>. Acesso em: 23 mai. 2023.

LI, L.; HE, Q.; WEI, Y.; HE, Q.; PENG, X.. *Early warning indicators for monitoring the process failure of anaerobic digestion system of food waste*. **Bioresource technology**, v. 171, p. 491-494, 2014.

LI, D.; CHEN, L.; LIU, X.; MEI, Z.; REN, H.; CAO, H.; YAN, Z.. *Instability mechanisms and early warning indicators for mesophilic anaerobic digestion of vegetable waste*, **Bioresource Technology**, v. 245, parte A, p. 90-97, 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.07.098>>. Acesso em: 23 mai. 2023.

LI, X. Y.; FENG, Y.; DUAN, J. L.; FENG, L. J.; WANG, Q.; MA, J. Y.; LIU, W. Z.; YUAN, X. Z.. *Model-based mid-infrared spectroscopy for on-line monitoring of volatile fatty acids in the anaerobic digester*. **Environmental Research**, v. 206, p. 11260, 2022. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.envres.2021.112607>>. Acesso em: 24 mai. 2023.

LIN, Q.; YUAN, Y.; ZAN, F.; LU, H.; WANG, Z.; GUO, G.. *A novel online analyzer for accurate and rapid measurement of volatile fatty acids in anaerobic wastewater treatment*. **Journal of Environmental Sciences**, v. 122, p. 72-82, 2022. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jes.2021.10.001>>. Acesso em: 24 mai. 2023.

LIU, X.; ANDRÉ, L.; MERCIER-HUAT, M.; GROSMÂÎTRE, J. M.; PAUSS, A.; RIBEIRO, T.. *Accurate estimation of bicarbonate and acetic acid concentrations with wider ranges in anaerobic media using classica; I fos/tac titration method*. **Applied Sciences**, v. 11, n. 24,

11843, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.3390/app112411843>>. Disponível em: 23 mai. 2023.

LUO, L.; KAUR, G.; WONG, J. W. C.. *A mini-review on the metabolic pathways of food waste two-phase anaerobic digestion system. Waste Management & Research*, v. 37, n. 04, p. 333-346, 2019.

MALAVOLTA, E.; VITTI, G. C.; OLIVEIRA, S. A.. Avaliação do estado nutricional das plantas: princípios e aplicações. [S.l: s.n.], Piracicaba: **Potafos**, v. 319, 1997.

MARCHAIM U.; KRAUSE C.. *Propionic to acetic acid ratios in overloaded anaerobic digestion. Bioresource Technology*, v. 43, p. 195-203, 1993.

MATHAI, P. P.; NICHOLAS, M. S.; VENKITESHWARAN, K.; BROWN, C. M., MORRIS, R. L.; ZITOMER, D. H.; MAKI, J. S.. *Dynamic shifts within volatile fatty acid-degrading microbial communities indicate process imbalance in anaerobic digesters. Applied Microbiology and Biotechnology*, p. 01-13, 2020.

MAURUS, K.; KREMMETER, N.; AHMED, S.; KAZDA, M.. *High-resolution monitoring of VFA dynamics reveals process failure and exponential decrease of biogas production. Biomass Conversion and Biorefinery*, p. 01-11, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s13399-021-02043-2>> . Acesso em: 23 mai. 2023.

MECHICHI T.; SAYADI, S.. *Evaluating process imbalance of anaerobic digestion of olive mill wastewaters. Process Biochemistry*, v. 40, p. 139-145, 2005.

MÉZES, L.; BIRÓ, G.; SÜLYÖK, E.; PETIS, M.; BORBÉLY, J.; TAMÁS, J.. *Novel approach on the basis of FOS/TAC method. International Symposia "Risk Factors for Environment and Food Safety" & "Natural Resources and Sustainable Development*, v. 17, p. 802-807, 2011.

MESQUITA, P. L.; AFONSO, R. J. C. F.; AQUINO, S. F.; LEITE, G. S. *Validation of a liquid chromatography methodology for the analysis of seven volatile fatty acids*

intermediates of anaerobic digestion. Engenharia Sanitária Ambiental, v. 18, n. 4, p. 295-302, 2013.

MOESTEDT, J.; WESTERHOLM, M.; ISAKSSON, S.; & SCHNÜRER, A.. *Inoculum source determines acetate and lactate production during anaerobic digestion of sewage sludge and food waste. Bioengineering*, v. 07, n. 01, 03 p, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.3390/bioengineering7010003>>. Acesso em: 23 maio 2023.

MORETTI, S. M. L.; BERTONCINI, E. I.; ABREU-JÚNIOR, C. A.. *Characterization of raw swine waste and efuents treated anaerobically: parameters for Brazilian environmental regulation construction aiming agricultural use. Journal of Material Cycles and Waste Management*, v. 23, p. 165-176, 2021.

MU, Z. X.; HE, C. S.; JIANG, J. K.; ZHANG, J.; YANG, H. Y.; MU, Y.. *A modified two-point titration method for the determination of volatile fatty acids in anaerobic systems. Chemosphere*, v. 204, p. 251-256, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.04.038>>. Acesso em: 24 mai. 2023.

National Center for Biotechnology Information. **PubChem Database**. *Acetic acid*, CID=176. Disponível em: <<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Acetic-acid>>. Acesso em: 17 abr. 2020.

National Center for Biotechnology Information. **PubChem Database**. *Butyric acid*, CID=264. Disponível em: <<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Butyric-acid>>. Acesso em: 17 abr. 2020.

National Center for Biotechnology Information. **PubChem Database**. *Isobutyric acid*, CID=6590. Disponível em: <<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Isobutyric-acid>>. Acesso em: 17 abr. 2020.

National Center for Biotechnology Information. **PubChem Database**. *Isovaleric acid*, CID=10430. Disponível em: <<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Isovaleric-acid>>. Acesso em: 17 abr. 2020.

National Center for Biotechnology Information. **PubChem Database**. Propionic acid, CID=1032. Disponível em: <<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Propionic-acid>>. Acesso em: 17 abr. 2020.

National Center for Biotechnology Information. **PubChem Database**. Valeric acid, CID=7991. Disponível em: <<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Valeric-acid>>. Acesso em: 17 abr. 2020.

NUALSRI, C.; KONGJAN, P.; REUNSANG, A.. *Direct integration of CSTR-UASB reactors for two-stage hydrogen and methane production from sugarcane syrup*. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 41, 2016.

O'CONNOR, S.; EHIMEN, E.; PILLAI, S. C.; BLACK, A.; TORMEY, D.; BARTLETT, J.. *Biogas production from small-scale anaerobic digestion plants on European farms*. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, n. 139, p. 110580, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.rser.2020.110580>>. Acesso em: 23 mai. 2023.

OKELEYE, A. A.; BETIKU, E.. *KARIYA (Hildegardia barteri) seed oil extraction: comparative evaluation of solvents, modeling, and optimization techniques*. **Chemical Engineering Communications**, v. 206 n. 09, p. 1181-1198, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1080/00986445.2018.1550397>>. Acesso em: 24 mai. 2023.

PALHARES, J. C. P. (Ed.). **Produção animal e recursos hídricos: uso da água nas dimensões quantitativa e qualitativa e assuntos regulatórios. e de consumo**. Brasília, DF: Embrapa, 2021. 323 p.. Disponível em: <<https://www.alice.cnptia.embrapa.br/alice/handle/doc/1137256>>. Acesso em: 23 set. 2022.

PASALARI, H.; GHOLAMI, M.; REZAEI, A.; ESRAFILI, A.; & FARZADKIA, M.. *Perspectives on microbial community in anaerobic digestion with emphasis on environmental parameters: a systematic review*. **Chemosphere**, v. 270, p. 128618, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.128618>>. Acesso em: 23 mai. 2023.

PEREIRA, T. V.; PATSOPOULOS, N. A.; SALANTIC, G.; IOANNIDISC, J. P. A.. *Critical interpretation of Cochran's Q test depends on power and prior assumptions about heterogeneity*. **Research Synthesis Methods**, v. 149-161, 2010.

PRAT, D.; WELLS, A.; HAYLER, J.; SNEDDON, H.; MCELROY, C. R.; ABOU-SHEHADA, S.; DUNN, P. J.. *CHEM21: selection guide of classical-and less classical-solvents*. **Green Chemistry**, v. 18, n. 01, p. 288-296. 2016. Disponível em: <<https://doi.org/10.1039/C5GC01008J>>. Acesso em: 25 mai. 2023.

PROBIOGÁS. **Guia prático de biogás: geração e utilização**. Brasília, DF: Ministério das Cidades, 2010. Disponível em: <http://web-resol.org/cartilhas/giz_-_guia_pratico_do_biogas_final.pdf> Acesso em: 10 abr. 2020.

PRUKSATRAKUL, T. PHOOPRAINTRA, P.; WILAIRAT, P.; CHAIYEN, P; CHANTIWAS, R.. *Development of a sequential injection-liquid microextraction procedure with GC-FID for analysis of short-chain fatty acids in palm oil mill effluent*. **Talanta**, v. 165, p. 612-618, 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.talanta.2017.01.010>>. Acesso em: 24 mai. 2023.

PURSER, B. J. J.; THAI, S.-M.; FRITZ, T.; ESTEVES, S.R.; DINSDALE, R.M. GUWY, A. J.. *An improved titration model reducing over estimation of total volatile fatty acids in anaerobic digestion of energy crop, animal slurry and food waste*. **Water Research**, v. 61, p. 162-170, 2014. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.watres.2014.05.020>> Acesso em: 23 mai. 2023.

RAPOSO, F.; BORJA, R.; CACHO, J.A.; MUMME, J.; MOHEDANO, A. F.; BATTIMELLI, A.; BOLZONELLAF, D.; SCHUIT, A. D.; NOGUEROL-ARIAS, J.; FRIGONI, J. C.; PENUELA, G. A.; MUEHLENBERG, J.; SAMBUSITI, C.. *Harmonization of the quantitative determination of volatile fatty acids profile in aqueous matrix samples by direct injection using gas chromatography and high-performance liquid chromatography techniques: Multi-laboratory validation study*. **Journal of Chromatography Acta**, v. 1413, p. 94-106, 2015.

REYHANITASH, E.; BROUWER, T.; KERSTEN, S. R.; VAN DER HAM, A. G. J.; SCHUUR, B.. *Liquid–liquid extraction-based process concepts for recovery of carboxylic acids from aqueous streams evaluated for dilute streams*. **Chemical Engineering Research and Design**, v. 137, p. 510-533, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.cherd.2018.07.038>>. Acesso em: 25 mai. 2023.

RIBEIRO, F. A. de L.; FERREIRA, M. M. C.; MORANO, S. C.; SILVA, L. R. da.; SCHNEIDER, RENÉ PETER.. Planilha de validação: uma nova ferramenta para estimar figuras de mérito na validação de métodos analíticos univariados. **Química Nova**, São Paulo, v. 31, n. 1, p. 164-171, 2008.

RODRIGUES, R.; CEBALLOS, B.; LOPES, W.. Validação de método para determinação de ácidos graxos voláteis em efluentes de biorreatores anaeróbios por meio de cromatografia gasosa. **Revista DAE**, v. 67. n. 110-126. 2019. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.4322/dae.2019.009>>. Acesso em: 24 mai. 2023.

ROSSI, E.; PECORINI, I.; PAOLI, P.; IANNELLI, R.. *Plug-flow reactor for volatile fatty acid production from the organic fraction of municipal solid waste: Influence of organic loading rate*. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 10 n. 1, p. 106963, 2022. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jece.2021.106963>>. Acesso em: 25 mai. 2023.

SEGANDREDO, M. A.. Os dejetos suínos são um fertilizante ou um poluente do solo?. **Cadernos de Ciência & Tecnologia**, Brasília, v. 16, n. 03, p.129-141, 1999.

SEGANFREDO, M. A.; MIRANDA, C. R. de; GUARESI, L.. **O balanço de nutrientes como indicador de riscos ambientais no uso de dejetos animais como fertilizante do solo**. In: MIRANDA, C. R. de; MONTICELLI, C. J.; MATTHIENSEN, A.; SEGANFREDO, M. A. (Ed.). *Produção intensiva de animais e serviços ambientais: estratégias e indicadores*. Concórdia: Embrapa Suínos e Aves, 2020a (Embrapa Suínos e Aves. Documentos, 211). p. 141-162. Disponível em: <<https://www.alice.cnptia.embrapa.br/alice/handle/doc/1128024>>. Acesso em: 23 mai. 2023.

SIEGERT, I.; BANKS, C.. *The effect of volatile fatty acid additions on the anaerobic digestion of cellulose and glucose in batch reactors. **Process biochemistry***, v. 40, p. 3412-3418, 2005.

STOCKL, A.; LICHTI, F.. *Near-infrared spectroscopy (NIRS) for a real time monitoring of the biogas process. **Bioresource technology***, v. 247, p. 1249-1252., 2018.

SUN, H.; WU, S.; DONG, R.. *Monitoring volatile fatty acids and carbonate alkalinity in anaerobic digestion: titration methodologies. **Chemical engineering technology***, v. 39, p. 599-610, 2016.

SUN, H.; NI, P.; ANGELIDAKI, I.; DONG, R.; WU, S.. *Exploring stability indicators for efficient monitoring of anaerobic digestion of pig manure under perturbations. **Waste Management***, v. 91, p. 139-146, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.wasman.2019.05.008>>. Acesso em: 24 mai. 2023.

TABATABAEI, M.; GHANAVATI, H.. ***Biogas: fundamentals, process, and operation. Springer***, v. 6, 472 p. 2018.

TÁPPARO, D. C.; ROGOVSKI, P.; CADAMURO, R. D.; SOUZA, D. S. M.; BONATTO, C.; FRUMI CAMARGO, A.; SCAPINI, T.; STEFANSKI, F.; AMARAL, A.; KUNZ, A.; HERNÁNDEZ, M.; TREICHEL, H.; RODRÍGUEZ-LÁZARO, D.; FONGARO, G.. *Nutritional, Energy and Sanitary Aspects of Swine Manure and Carcass Co-digestion. **Frontiers in bioengineering and biotechnology***, v. 08, n. 333, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.00333>>. Acesso em: 23 mai. 2023.

TEÓFILO, R. F.. ***Métodos quimiométricos: uma visão geral - conceitos básicos de quimiometria***, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, v. 01, 2013.

TEÓFILO, R. F. FERREIRA, M. M. C.. *Quimiometria II: planilhas eletrônicas para cálculos de planejamentos experimentais, um tutorial. **Química Nova***, v. 29, n. 2, p. 338-350, 2006.

TINTROP, L. K.; JOCHMANN, M. A.; BEESLEY, T.; KÜPPERS, M.; BRUNSTERMANN, R.; SCHMIDT, T. C.. *Optimization and automation of rapid and selective analysis of fatty*

*acid methyl esters from aqueous samples by headspace SPME arrow extraction followed by GC–MS/MS analysis. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 414, n. 22, p. 6473-6483, 2022. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s00216-022-04204-2>>. Acesso em: 24 mai. 2023.*

VARGAS-MUÑOZ, M. A.; CERDÀ, V.; CADAVID-RODRÍGUEZ, L. S.; PALACIO, E.. *Automated method for volatile fatty acids determination in anaerobic processes using in-syringe magnetic stirring assisted dispersive liquid-liquid microextraction and gas chromatography with flame ionization detector. **Journal of Chromatography Acta**, v. 1643, 462034, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.chroma.2021.462034>>. Acesso em: 23 mai. 2023.*

VARMA, V. S.; PARAJULI, R.; SCOTT, E.; CANTER, T.; LIM, T. T.; POPP, J.; THOMA, G.. *Dairy and swine manure management: challenges and perspectives for sustainable treatment technology. **Science of The Total Environment**, n. 778, p. 146319, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.146319>>. Acesso em: 23 mai. 2023.*

VELUCHAMY, C.; KALAMDHAD, A. S.; GILROYED, B. H.. *Evaluating and modelling of plug flow reactor digesting lignocellulosic corn silage. **Fuel**, v. 287, p. 119498, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.fuel.2020.119498>>. Acesso em: 25 mai. 2023.*

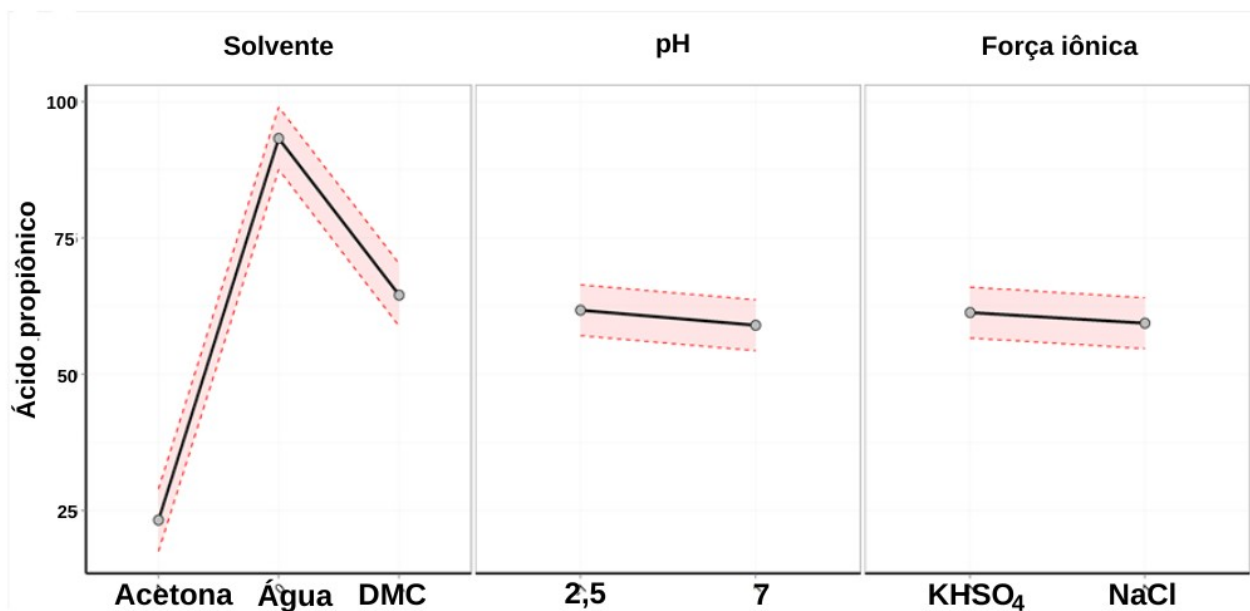
WANG, Y.; ZHANG, Y.; WANG, J.; MENG, L.. *Effects of volatile fatty acid concentrations on methane yield and methanogenic bacteria. **Biomass and Bioenergy**, v. 33, p. 848-853, 2009.*

WU, D.; LI, L.; ZHAO, X.; PENG, Y.; YANG, P.; & PENG, X.. *Anaerobic digestion: a review on process monitoring. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 103, p. 01-12, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.rser.2018.12.039>>. Acesso em: 24 mai. 2023.*

ZAN, F.; ZENG, Q.; HI, K.; HAO, T.; EKAMA, G. A.. *A novel approach for rapidly measuring volatile fatty acids in anaerobic process. **Water Research**, v. 182, 115960, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.watres.2020.115960>> Acesso em: 24 mai. 2023.*

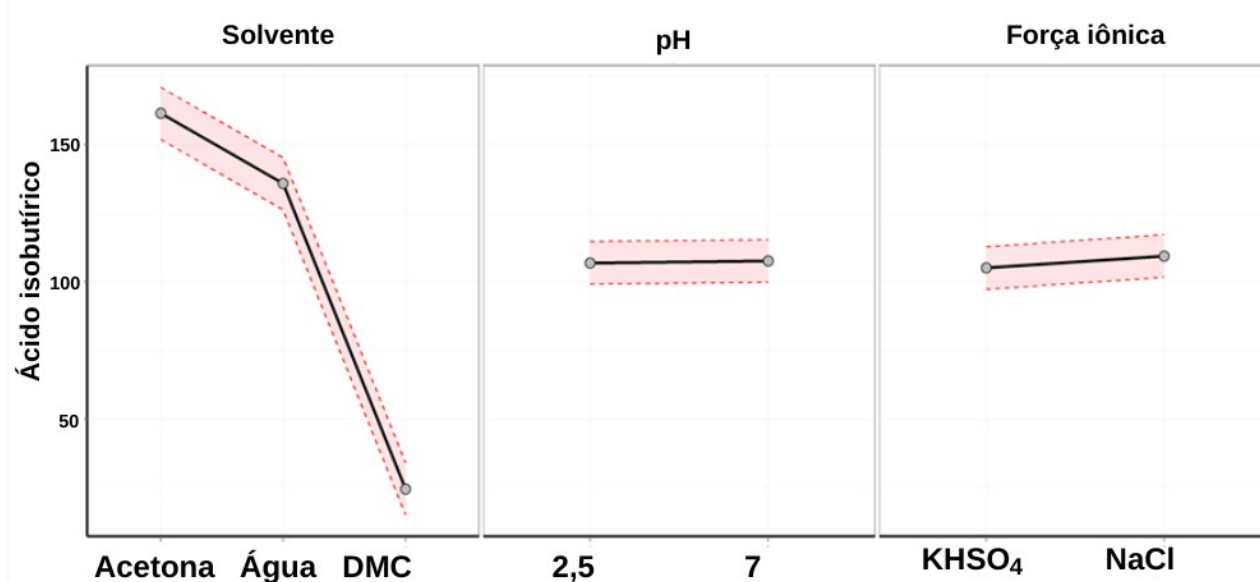
APÊNDICES

Apêndice A – Gráfico de efeitos das variáveis empregadas no planejamento experimental para ácido propiônico



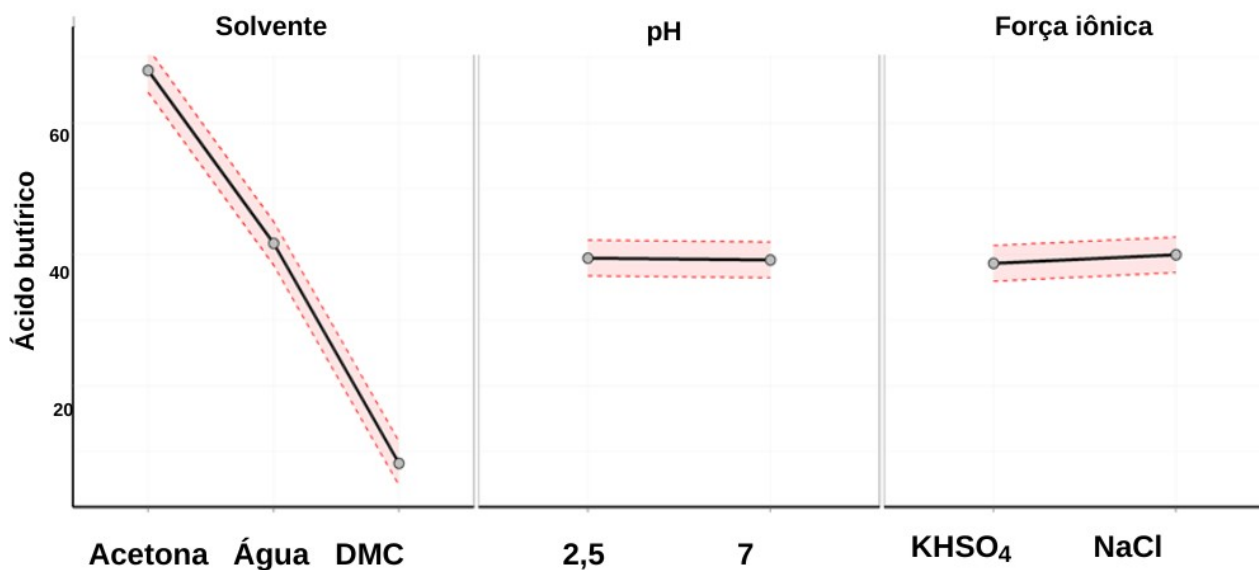
Fonte: da autora, 2023.

Apêndice B – Gráficos de efeitos das variáveis empregadas no planejamento experimental para ácido isobutírico



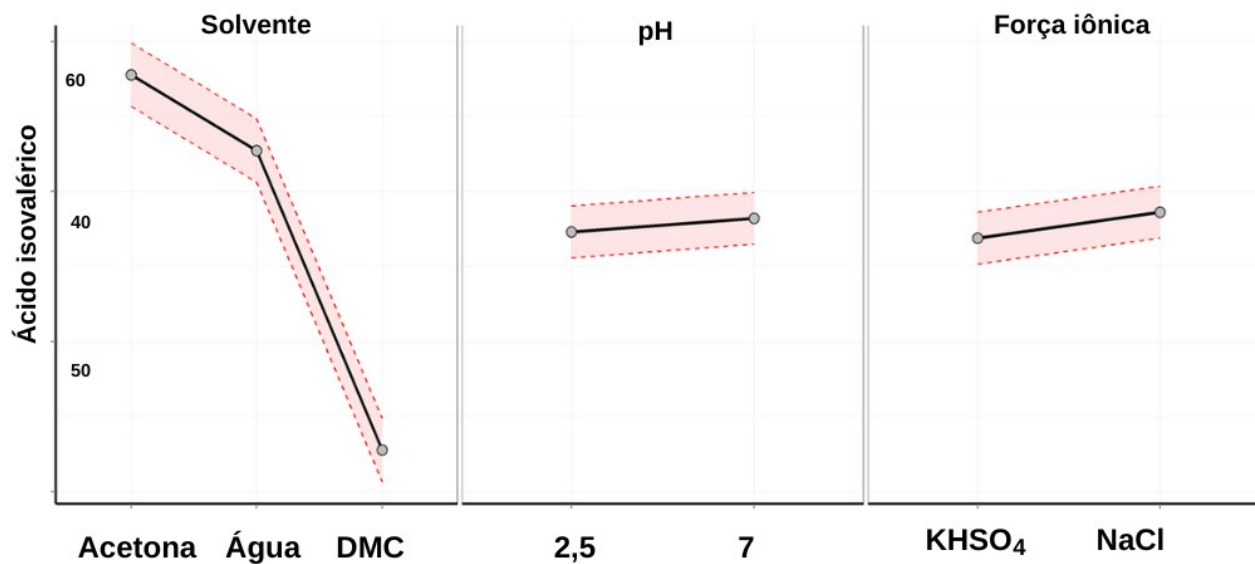
Fonte: da autora, 2023.

Apêndice C – Gráficos de efeitos das variáveis empregadas no planejamento experimental para ácido butírico



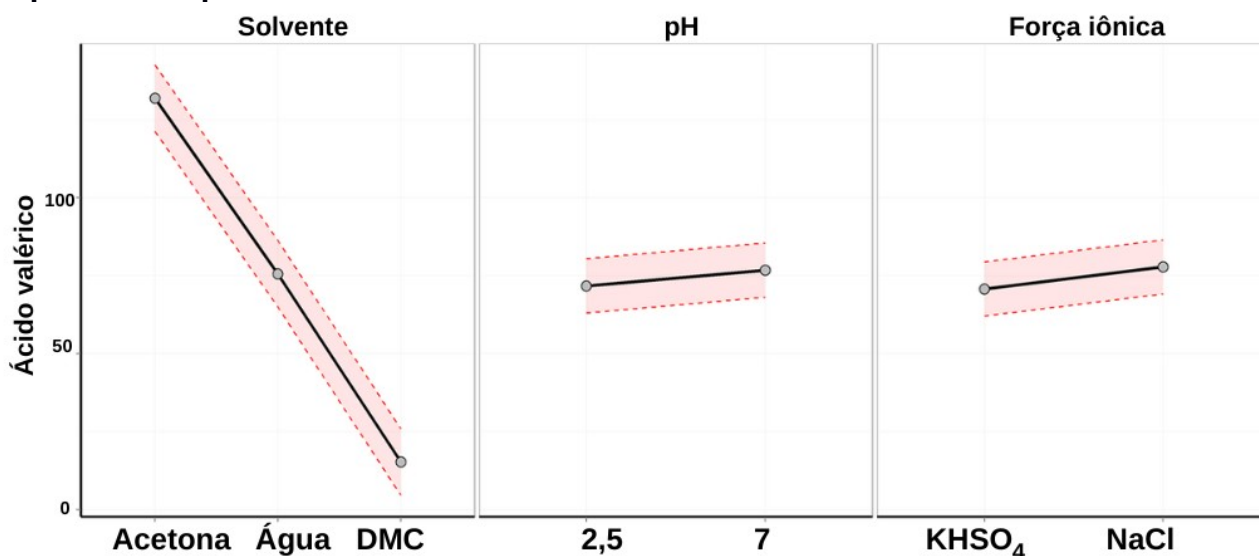
Fonte: da autora, 2023.

Apêndice D – Gráficos de efeitos das variáveis empregadas no planejamento experimental para ácido isovalérico



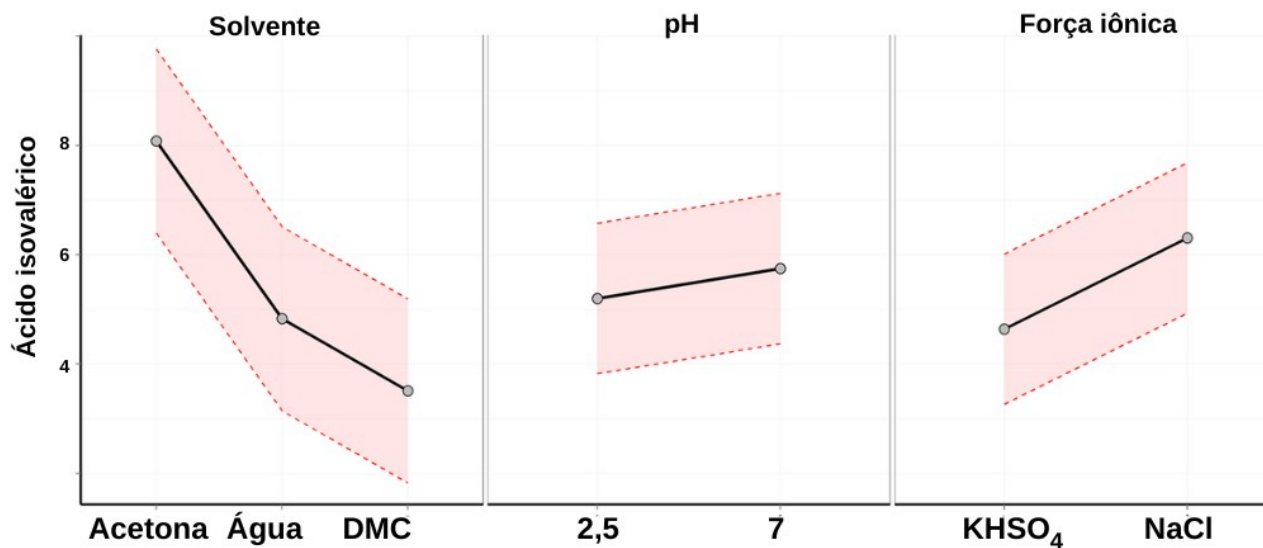
Fonte: da autora, 2023.

Apêndice E – Gráficos de efeitos das variáveis empregadas no planejamento experimental para ácido valérico

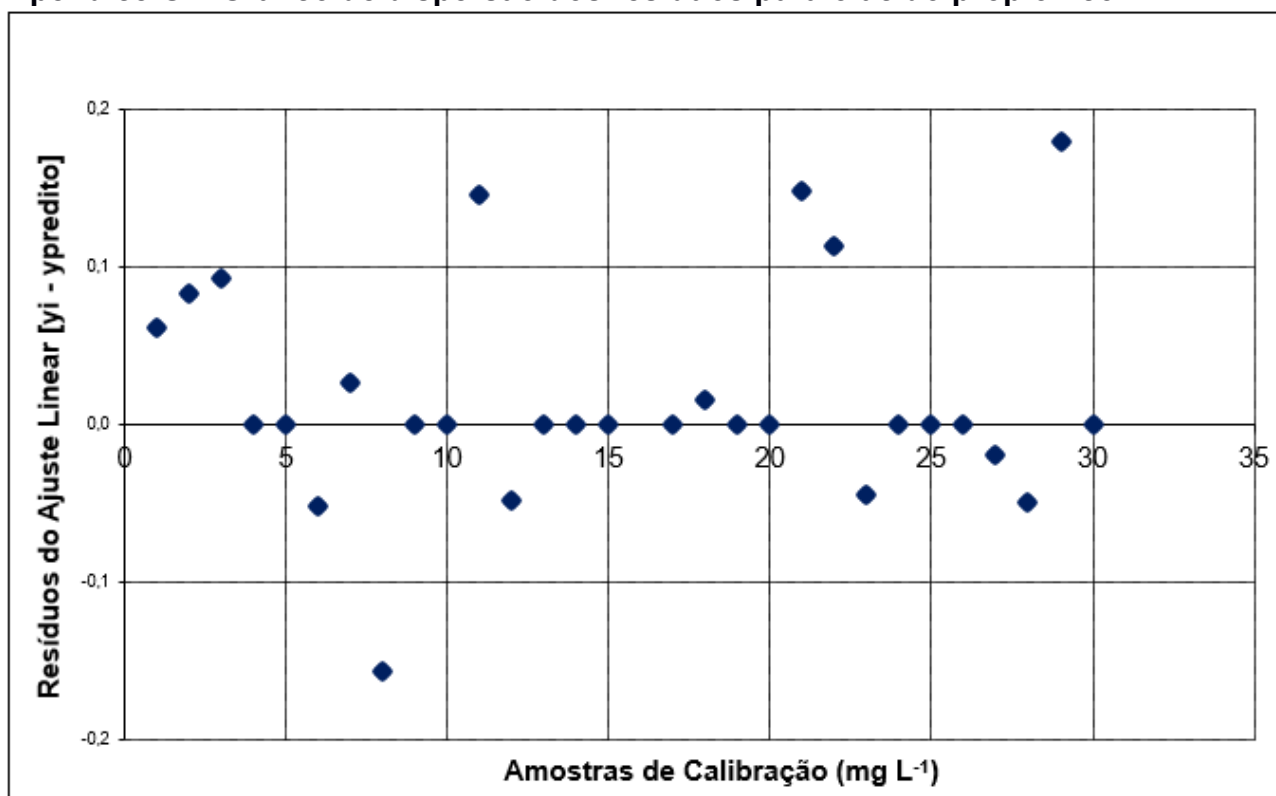


Fonte: da autora, 2023.

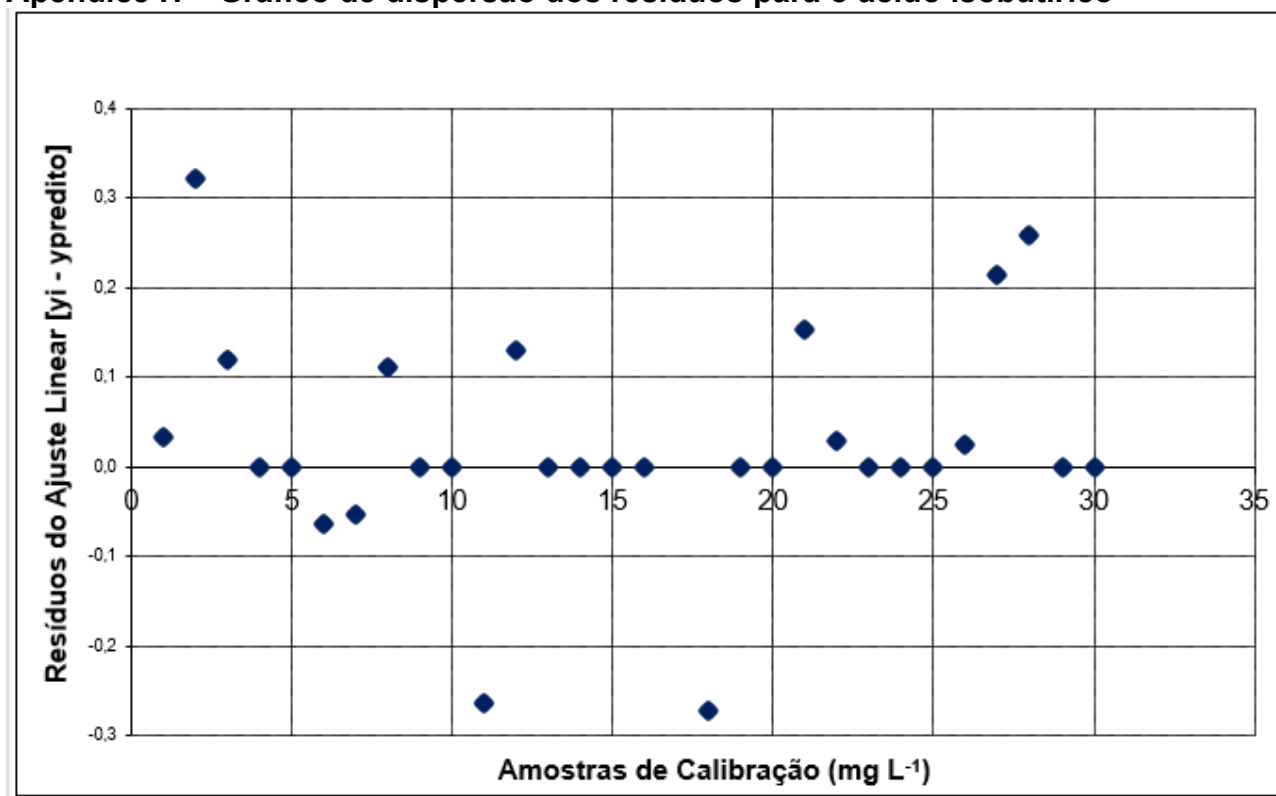
Apêndice F – Gráficos de efeitos das variáveis empregadas no planejamento experimental para ácido octanoico



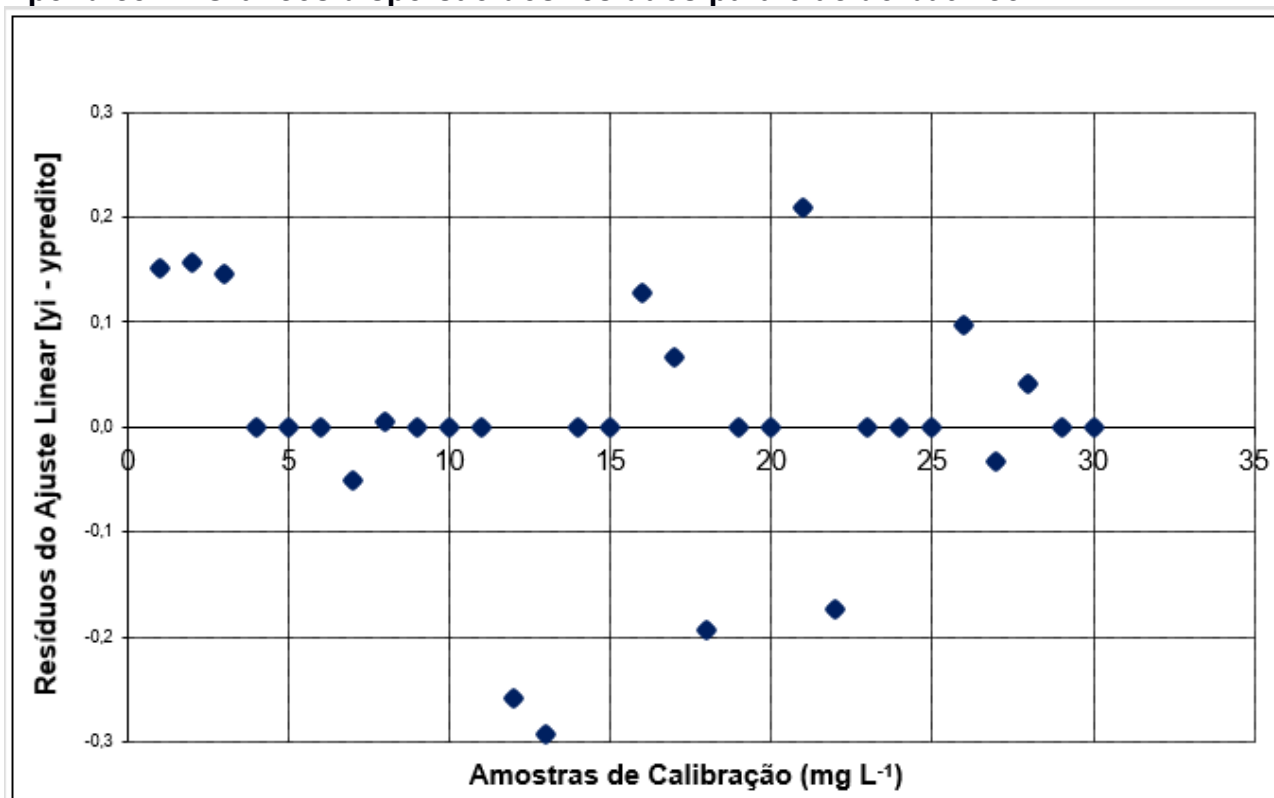
Fonte: da autora, 2023.

Apêndice G – Gráfico de dispersão dos resíduos para o ácido propiônico

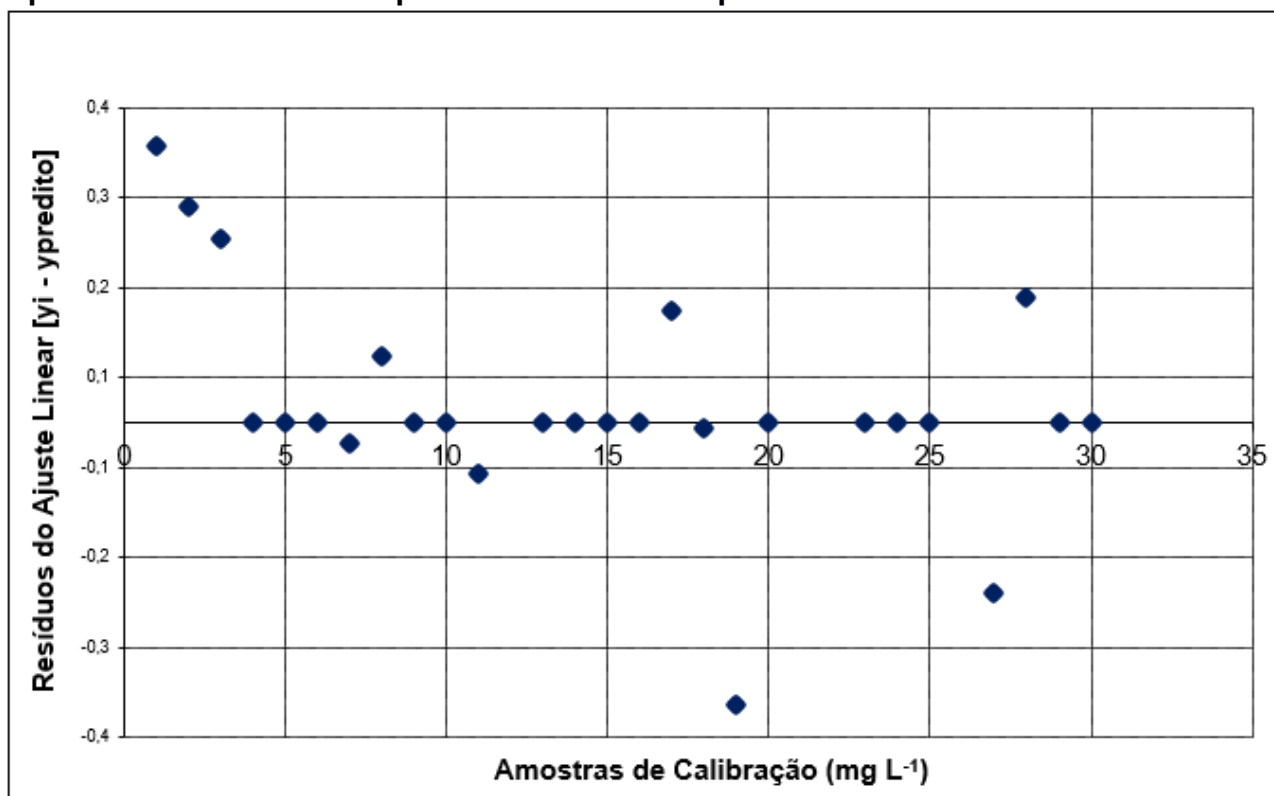
Fonte: da autora, 2023.

Apêndice H – Gráfico de dispersão dos resíduos para o ácido isobutírico

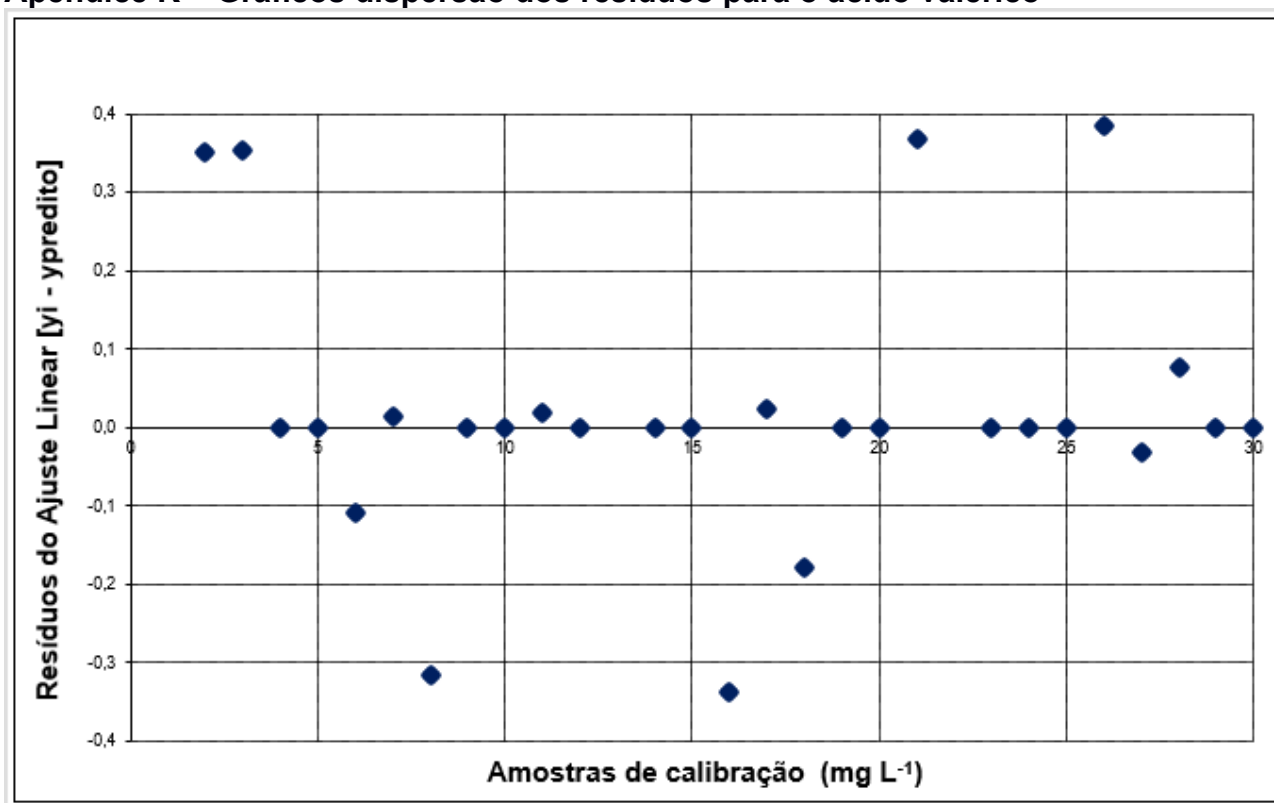
Fonte: da autora, 2023.

Apêndice I – Gráficos dispersão dos resíduos para o ácido butírico

Fonte: da autora, 2023.

Apêndice J – Gráficos dispersão dos resíduos para o ácido isovalérico

Fonte: da autora, 2023.

Apêndice K – Gráficos dispersão dos resíduos para o ácido valérico

Fonte: da autora, 2023.

Apêndice L – Dados da curva analítica para o ácido acético

		Concentração	Sinal Analítico	Erro Experimental no Sinal Analítico			
				Média	no.	Desvio Padrão	DPR(%)
Nível 1	1A	10,0000	0,39518115				
	1B	10,0000	0,43766799				
	1C	10,0000	0,39001859	0,4076	3,00	0,0261	6,41
Nível 2	2A	20,0000	1,06058211				
	2B	20,0000	1,0913125	1,0759	2,00	0,0217	2,02
	2C	20,0000	1,52649165	1,5045	2,00	0,0310	2,06
Nível 4	4B	50,0000	2,5710102				
	4C	50,0000	2,6428141				
	4D	50,0000	2,80513409	2,6730	3,00	0,1199	4,49
Nível 5	5A	85,0000	4,59042				
	5B	85,0000	4,6153				
	5C	85,0000	4,63932	4,6150	3,00	0,0244	0,53
Nível 6	6A	100,0000	5,38243262				
	6B	100,0000	5,67796				
	6C	100,0000	5,68469817	5,5817	3,00	0,1726	3,09

Fonte: da autora, 2023.

Apêndice M – Dados da curva analítica para o ácido propiônico

		Concentração	Sinal Analítico	Erro Experimental no Sinal Analítico			
				Média	no.	Desvio Padrão	DPR(%)
Nível 1	1A	10,0000	0,724693				
	1B	10,0000	0,746868				
	1C	10,0000	0,756462	0,7427	3,00	0,0163	2,19
Nível 2	2A	20,0000	1,477684				
	2B	20,0000	1,55592				
	2C	20,0000	1,373662	1,4691	3,00	0,0914	6,22
Nível 3	3A	30,0000	2,541394				
	3B	30,0000	2,346811	2,4441	2,00	0,1376	5,63
	3C	30,0000	2,541394	2,4441	2,00	0,1376	5,63
Nível 4	4A	65,0000	4,934549				
	4B	65,0000	5,441177	5,1879	2,00	0,3582	6,91
	4C	65,0000	5,441177	5,1879	2,00	0,3582	6,91
Nível 5	5A	85,0000	7,305444				
	5B	85,0000	7,27087				
	5C	85,0000	7,113049	7,2298	3,00	0,1026	1,42
Nível 6	6A	100,0000	8,437456				
	6B	100,0000	8,407432				
	6C	100,0000	8,635528	8,4935	3,00	0,1239	1,46

Fonte: da autora, 2023.

Apêndice N – Dados da curva analítica para o ácido isobutírico

		Concentração	Sinal Analítico	Erro Experimental no Sinal Analítico			
				Média	no.	Desvio Padrão	DPR(%)
Nível 1	1A	10,0000	1,20523				
	1B	10,0000	1,494865				
	1C	10,0000	1,292333	1,3308	3,00	0,1486	11,17
Nível 2	2A	20,0000	2,821841				
	2B	20,0000	2,83296				
	2C	20,0000	2,996713	2,8838	3,00	0,0979	3,40
Nível 3	3A	30,0000	4,33337				
	3B	30,0000	4,72707	4,5302	2,00	0,2784	6,15
Nível 4	4A	65,0000	9,853777				
	4B	65,0000	10,31768	10,0857	2,00	0,3280	3,25
Nível 5	5A	85,0000	14,16826				
	5B	85,0000	14,04419	14,1062	2,00	0,0877	0,62
Nível 6	6A	100,0000	16,60709				
	6B	100,0000	16,79599				
	6C	100,0000	16,84039	16,7478	3,00	0,1239	0,74

Fonte: da autora, 2023.

Apêndice O – Dados da curva analítica para o ácido butírico

		Concentração	Sinal Analítico	Erro Experimental no Sinal Analítico			
				Média	no.	Desvio Padrão	DPR(%)
Nível 1	1A	10,0000	1,20523				
	1B	10,0000	1,494865				
	1C	10,0000	1,292333	1,3308	3,00	0,1486	11,17
Nível 2	2A	20,0000	2,821841				
	2B	20,0000	2,83296				
	2C	20,0000	2,996713	2,8838	3,00	0,0979	3,40
Nível 3	3A	30,0000	4,33337				
	3B	30,0000	4,72707				
	3C	30,0000		4,5302	2,00	0,2784	6,15
Nível 4	4A	65,0000					
	4B	65,0000	9,853777				
	4C	65,0000	10,31768	10,0857	2,00	0,3280	3,25
Nível 5	5A	85,0000	14,16826				
	5B	85,0000	14,04419				
	5C	85,0000		14,1062	2,00	0,0877	0,62
Nível 6	6A	100,0000	16,60709				
	6B	100,0000	16,79599				
	6C	100,0000	16,84039	16,7478	3,00	0,1239	0,74

Fonte: da autora, 2023.

Apêndice P – Dados da curva analítica para o ácido isovalérico

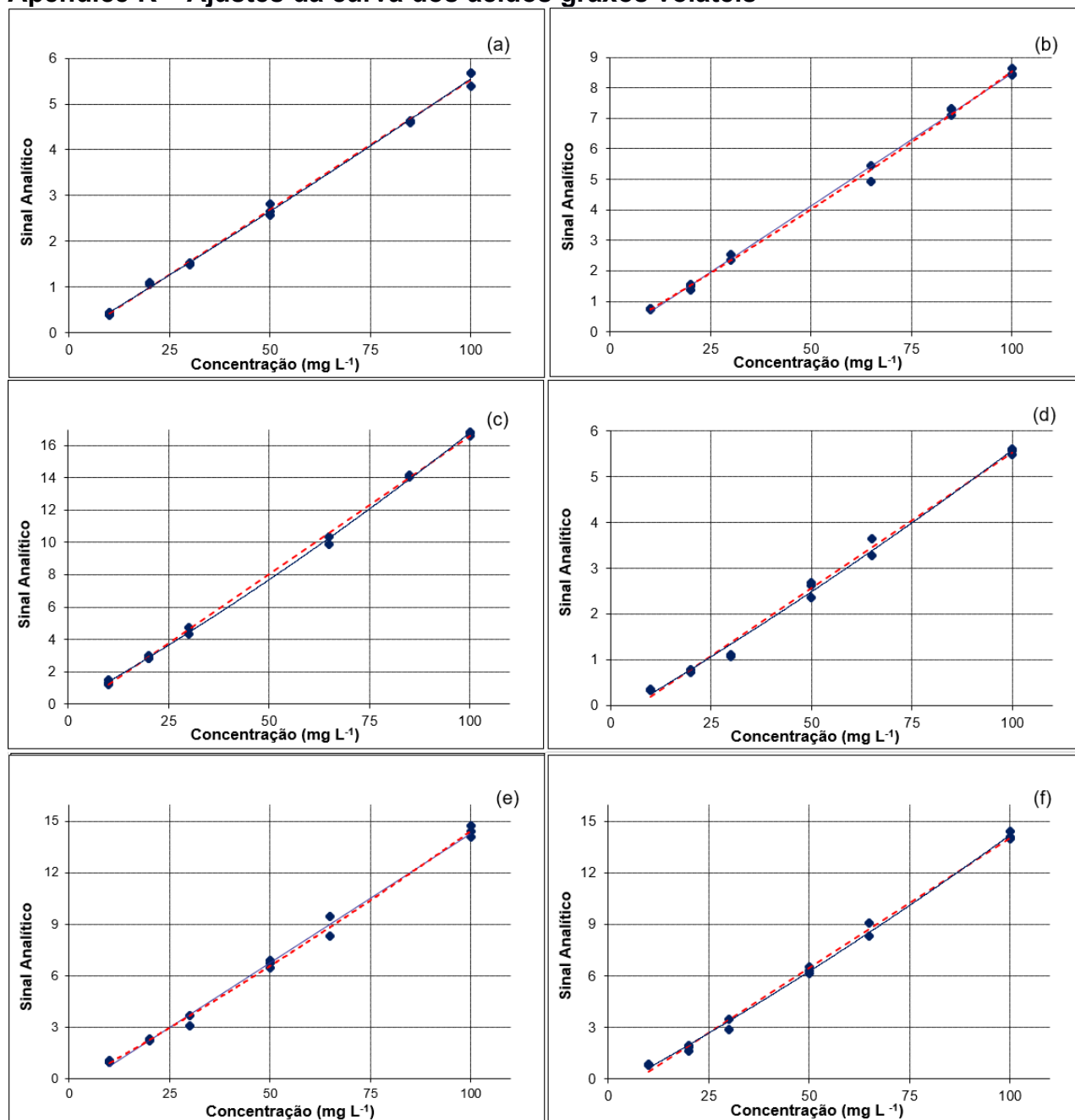
		Concentração	Sinal Analítico	Erro Experimental no Sinal Analítico		
				Média	no.	Desvio Padrão
Nível 1	1A	10,0000	1,05058			
	1B	10,0000	0,98269			
	1C	10,0000	0,94637	0,9932	3,00	0,0529
Nível 2	2A	20,0000				
	2B	20,0000	2,22458			
	2C	20,0000	2,32163	2,2731	2,00	0,0686
Nível 3	3A	30,0000	3,69491			
	3B	30,0000	3,06767			
	3C	30,0000		3,3813	2,00	0,4435
Nível 4	4A	50,0000	6,88437			
	4B	50,0000	6,75468			
	4C	50,0000	6,44597	6,6950	3,00	0,2252
Nível 5	5A	65,0000	9,45445			
	5B	65,0000	8,2991			
	5C	65,0000		8,8768	2,00	0,8170
Nível 6	6A	100,0000	14,7538			
	6B	100,0000	14,0945			
	6C	100,0000	14,4233	14,4239	3,00	0,3297

Fonte: da autora, 2023.

Apêndice Q – Dados da curva analítica para o ácido valérico

		Concentração	Sinal Analítico	Erro Experimental no Sinal Analítico		
				Média	no.	Desvio Padrão
Nível 1	1A	10,0000	0,841			
	1B	10,0000	0,78787			
	1C	10,0000	0,79227	0,8070	3,00	0,0295
Nível 2	2A	20,0000	1,83691			
	2B	20,0000	1,96073			
	2C	20,0000	1,63059	1,8094	3,00	0,1668
Nível 3	3A	30,0000	3,47333			
	3B	30,0000				
	3C	30,0000	2,8706	3,1720	2,00	0,4262
Nível 4	4A	50,0000	6,13596			
	4B	50,0000	6,49605			
	4C	50,0000	6,29371	6,3086	3,00	0,1805
Nível 5	5A	65,0000	9,10296			
	5B	65,0000	8,30533			
	5C	65,0000		8,7041	2,00	0,5640
Nível 6	6A	100,0000	14,4008			
	6B	100,0000	13,9861			
	6C	100,0000	14,0945	14,1605	3,00	0,2151

Fonte: da autora, 2023.

Apêndice R – Ajustes da curva dos ácidos graxos voláteis

Legenda: a – ácido acético; b – ácido propiônico; c – ácido isobutírico; d – ácido butírico; e – ácido isovalérico; f – ácido valérico.

Fonte: da autora, 2023.