

UNIVERSIDADE DE LISBOA  
FACULDADE DE CIÊNCIAS  
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA GEOGRÁFICA, GEOFÍSICA E ENERGIA



# **Produção biológica integrada de Hidrogénio e Metano a partir de resíduos da Indústria do Biodiesel**

Margarida Alexandra Ferreira Nunes

Trabalho realizado sob a supervisão de

Doutora Paula Alexandra Soares Marques (LNEG)

Santino Eugénio Di Berardino (FCUL)

**Mestrado Integrado em Engenharia da Energia e do Ambiente**

**Dissertação**

**2015**

## AGRADECIMENTOS

O desenvolvimento desta dissertação de mestrado exigiu um percurso longo e, por vezes, atribulado que só foi finalizado graças à presença e ao apoio de pessoas extraordinárias.

Em primeiro lugar quero agradecer aos meus Pais e aos meus Avós pelo amor e pela educação com que me presentearam ao longo destes 23 anos e pela enorme compreensão e paciência que demonstraram, especialmente nesta fase. São os meus grandes exemplos de vida e os verdadeiros responsáveis por tudo o que alcancei.

Um agradecimento enorme à minha orientadora, a Doutora Paula Marques, por ter aceite o grande desafio de me ensinar e guiar, pelos conhecimentos que partilhou comigo e, em particular, pela amizade desenvolvida no decorrer deste trabalho.

Ao meu coorientador, o Doutor Santino Di Berardino, deixo também um obrigada dado o papel que desempenhou na realização desta tese, disponibilizando conhecimentos e prestando apoio sempre que necessário.

Agradeço também à Doutora Paula Passarinho, à Doutora Cristina Oliveira e ao Doutor Luís Ramalho a ajuda que me forneceram.

À Dona Natércia Santos e à Dona Graça Gomes um enorme obrigada por tudo o que fizeram ao longo da prática laboratorial, seja na procura de materiais ou no desenvolvimento das experiências, mas, acima de tudo, um obrigada por todas as palavras de incentivo e momentos de diversão que me proporcionaram.

Aos meus amigos e companheiros de faculdade, Ana, Tiago e Raquel, obrigada pela vossa amizade e por todo o vosso apoio incondicional. A força que me deram neste período foi excecional e, em muitos momentos, foi o que me deu ânimo para seguir em frente.

Para os meus colegas e amigos do laboratório, Joana, Lucas, Guilherme, Catarina Marques, Vera, Catarina Viegas, Bruno, Diana e restantes bolseiros e estagiários, não há palavras que consigam descrever o que vivemos no LNEG. Aprendi, ri e desabafei com cada um de vós e, por isto, muito obrigada.

Quero agradecer igualmente às minhas amigas de longa data, da ESLFB, Sara Pinto, Luísa, Erica e Sara Ramalhete. Apesar de, por vezes, distantes, a vossa amizade, preocupação e força esteve sempre presente.

Para finalizar, deixo um agradecimento muito especial ao João Bidarra. A tua amizade e carinho, o teu interesse e preocupação constantes e os teus conselhos valiosos ajudaram-me a completar esta etapa da minha vida. Obrigada por tudo “chavalo”.

## Abstract

The search for alternatives able to sustain the energy needs of society and simultaneously reduce dependence on fossil fuels led to the development of renewable energy sources. In this context, the biofuels production has been widely studied, with biohydrogen ( $\text{bioH}_2$ ) and biomethane ( $\text{bioCH}_4$ ) showing great potential. On the other hand, biological processes as dark fermentation (DF) and anaerobic digestion (AD) can use industrial wastes, as substrate, contributing to its valorisation, which is an advantage from the economic and environmental point of view.

In this work, it was developed an anaerobic fermentative integrated system for the valorisation of crude glycerol, a by-product from the biodiesel industry (substrate), through  $\text{bioH}_2$  and  $\text{bioCH}_4$  production, by DF and AD, respectively.

Initially, the  $\text{bioH}_2$  production by a bacteria strain of *Enterobacter aerogenes* (inoculum) was optimized, by the growing concentrations of substrate ( $\approx 10, 20, 30 \text{ g}_{\text{glycerol}}/\text{L}_{\text{FM}}$ ) and inoculum (1 and 10%, v/v). In sequence, the most suitable fermentative medium to be used as a substrate in the AD process, was selected based on their chemical characterization, for  $\text{bioCH}_4$  production by a bacterial consortium (inoculum), in a mesophilic conditions. The results obtained showed that both *E. aerogenes* and bacterial consortium were efficient to the biological degradation of the industrial by-product.

The maximum biohydrogen production achieved was 1014.54 mL, from an initial substrate concentration of  $20 \text{ g}_{\text{glycerol}}/\text{L}_{\text{FM}}$  and an inoculum of 1% (v/v), although the higher specific  $\text{bioH}_2$  production yield attained ( $99.06 \text{ mL H}_2/\text{g}_{\text{consumed glycerol}}$ ) have been registered for the experimental condition of  $10 \text{ g}_{\text{glycerol}}/\text{L}_{\text{FM}}$  and an inoculum of 1% (v/v), suggesting substrate inhibition.

The use of the fermentation broth as substrate in an AD process, lead to the production of a biogas composed by about 50% in methane and a maximum production yield of  $291.92 \text{ mL CH}_4/\text{gVS}_{\text{initial}}$ .

**Keywords:** Crude glycerol, dark fermentation, anaerobic digestion, biohydrogen, biomethane

## Resumo

A procura de alternativas capazes de sustentar as necessidades energéticas da sociedade e reduzir simultaneamente a dependência dos combustíveis fósseis conduziu ao desenvolvimento de fontes de energia renovável. Neste contexto, a produção de biocombustíveis tem sido bastante estudada, com o biohidrogénio ( $\text{bioH}_2$ ) e o biometano ( $\text{bioCH}_4$ ) a demonstrarem grande potencial. Por outro lado, processos biológicos como a por *dark fermentation* (DF) e a digestão anaeróbia (DA) podem utilizar resíduos industriais como substratos, contribuindo para a sua valorização, o que é uma enorme vantagem a nível económico e ambiental.

Nesta dissertação, desenvolveu-se um sistema integrado fermentativo anaeróbio, para valorização de glicerina semi-refinada, um subproduto da indústria de biodiesel (substrato), por produção de  $\text{bioH}_2$ , por DF e de  $\text{bioCH}_4$ , por DA.

Inicialmente otimizou-se a produção de  $\text{bioH}_2$ , por uma estirpe da bactéria *Enterobacter aerogenes* (inóculo), a partir de concentrações crescentes de substrato ( $\approx 10$ , 20 e 30  $\text{g}_{\text{glicerol}}/\text{L}_{\text{MF}}$ ) e de inóculo (1 e 10%, v/v). Em sequência, selecionou-se o meio fermentado mais adequado a utilizar como substrato no processo de DA, com base na sua caracterização química, para produção de  $\text{bioCH}_4$  por um consócio bacteriano (inóculo), em regime mesófilo. Os resultados obtidos revelaram que ambos os inóculos foram eficientes na degradação biológica do subproduto industrial.

A produção máxima atingida de  $\text{bioH}_2$  foi de 1014,6 mL, a partir de uma concentração inicial de substrato de  $\approx 20 \text{ g}_{\text{glicerol}}/\text{L}_{\text{MF}}$  e um inóculo de 1% (v/v), apesar de o rendimento específico mais elevado (99,06 mL  $\text{H}_2/\text{g}_{\text{glicerol consumido}}$ ), ter sido registado para  $\approx 10 \text{ g}_{\text{glicerol}}/\text{L}_{\text{MF}}$  e um inóculo de 1% (v/v), sugerindo alguma inibição por substrato. A utilização do meio fermentado, como substrato num processo de DA, resultou na produção de um biogás com cerca de 50% de  $\text{CH}_4$  e num rendimento máximo de produção 291,9 mL  $\text{CH}_4/\text{g SV}_{\text{inicial}}$ .

**Palavras-chave:** glicerina semi-refinada, *dark fermentation*, digestão anaeróbia, biohidrogénio, biometano,

## Índice

Abstract .....	iii
Resumo .....	iv
Índice de figuras .....	viii
Índice de tabelas .....	xi
SIGLAS E ABREVIATURAS .....	xiii
1. Introdução.....	1
1.1 Estrutura da dissertação .....	1
1.2 Enquadramento.....	1
1.3 Objetivos .....	2
2. Revisão da literatura.....	3
2.1 Panorama Energético.....	3
2.2 Hidrogénio (H <sub>2</sub> ).....	5
2.2.1 Produção de hidrogénio por processos biológicos (bioH <sub>2</sub> ) .....	6
2.2.1.1 Biofotólise da água.....	7
2.2.1.2 Fotofermentação.....	8
2.2.1.3 Fermentação anaeróbia no escuro ( <i>dark fermentation</i> ).....	8
2.2.1.4 Processos híbridos ou integrados .....	15
a) Processo de <i>dark fermentation</i> conjugado com um processo de fotofermentação .....	15
b) Processo de <i>dark fermentation</i> conjugado com o processo de electrohídrolise .....	16
c) Processo de <i>dark fermentation</i> conjugado com um processo de digestão anaeróbia.....	16
2.3 Aplicações .....	19
2.3.1 Células de combustível.....	19
2.3.2 Motor de combustão interna (MCI) .....	21
3. Materiais e Métodos .....	23
3.1 Materiais.....	23
3.1.1 <i>Dark fermentation</i> (produção de bioH <sub>2</sub> ).....	23
3.1.1.1 Microrganismo .....	23
3.1.1.2 Meio de crescimento .....	23
3.1.1.3 Meio de fermentação (MF) .....	23

3.1.1.4	Reagentes .....	24
3.1.1.5	Substrato.....	24
3.1.1.6	Equipamento.....	25
3.1.1.7	Montagem experimental.....	25
3.1.2	Digestão Anaeróbia (produção de bioCH <sub>4</sub> ).....	26
3.1.2.1	Consórcio .....	26
3.1.2.2	Reagentes .....	26
3.1.2.3	Substrato.....	26
3.1.2.4	Equipamento.....	26
3.1.2.5	Montagem experimental.....	27
3.2	Métodos .....	27
3.2.1	<i>Dark fermentation</i> (produção de bioH <sub>2</sub> ).....	27
3.2.1.1	Obtenção das células de <i>Enterobacter aerogenes</i> .....	27
3.2.1.2	Caracterização do substrato.....	28
3.2.1.3	Produção de biohidrogénio.....	28
3.2.1.4	Recolha e caracterização da fase gasosa .....	30
3.2.2	Digestão Anaeróbia (produção de bioCH <sub>4</sub> ).....	30
3.2.2.1	Caracterização do consórcio de bactérias (Inóculo).....	30
3.2.2.2	Conservação e inoculação do consórcio de bactérias (Inóculo).....	30
3.2.2.3	Caracterização do substrato.....	30
3.2.2.4	Produção de biometano .....	31
3.3	Métodos Analíticos .....	31
3.3.1	Determinação da reta peso seco (p.s.) vs densidade ótica (D.O.) .....	31
3.3.2	Determinação da composição do biogás .....	32
3.3.3	Caracterização das fases líquidas .....	32
3.3.3.1	Determinação do teor em Sólidos Totais (ST) e Sólidos Voláteis (SV).....	33
3.3.3.2	Determinação da Carência Química de Oxigénio (CQO) .....	33
3.3.3.3	Determinação do Azoto Total e Amoniacal .....	34
3.3.3.4	Determinação do teor em Sólidos Suspensos Totais (SST) e em Sólidos Suspensos Voláteis (SSV) .....	35
3.3.4	Determinação do conteúdo em AGV's, glicerol, etanol e açúcares na fase líquida .....	36
4.	Resultados e discussão .....	37
4.1	<i>Dark Fermentation</i> .....	37
4.1.1	Obtenção das células de <i>Enterobacter aerogenes</i> .....	37

---

4.1.1.1	Curva de crescimento da biomassa .....	37
4.1.1.2	Reta de calibração – Densidade Ótica (D.O.) vs peso seco (p.s.) .....	38
4.1.2	Caracterização dos resíduos de produção de biodiesel .....	39
4.1.3	Produção de biohidrogénio.....	39
4.1.3.1	Efeito da concentração de inicial do inóculo e do substrato .....	39
4.1.3.2	Cinética do processo de <i>dark fermentation</i> .....	45
4.1.3.3	Comparação dos resultados obtidos utilizando um saco de recolha da fase gasosa .	47
4.1.3.4	Análise energética .....	48
4.2	Digestão Anaeróbia .....	50
4.2.1	Caracterização do consórcio de bactérias .....	50
4.2.2	Produção de biometano .....	50
4.2.2.1	Perfil de produção de biogás-DA e composição da fase gasosa .....	51
4.2.2.2	Caracterização do efluente .....	53
4.2.2.3	Rendimentos do processo .....	54
5.	Conclusões e sugestões para trabalho futuro .....	55
6.	Referências .....	58
7.	Anexos.....	63
7.1	Caracterização do meio de fermentação com e sem glicerina semi-refinada.....	63
7.2	Equação de Gompertz .....	64

## Índice de figuras

Fig. 2.1 - Mapa mundial da variação de emissões de GEE no período de 1990-2012 (Adaptado de United Nations, 2015) .....	4
Fig. 2.2 - Evolução da penetração das energias renováveis em Portugal no período de 2005 a 2014 (Direcção Geral de Energia e Geologia, 2014) .....	4
Fig. 2.3 - Potencial de aquecimento global para o processo de eletrólise recorrendo a diferentes fontes de energia (Adaptado de Bhandari et al., 2013).....	6
Fig. 2.4 - Representação esquemática da via metabólica de degradação de hidratos de carbono, por <i>dark fermentation</i> (Adaptado de Cai et al., 2011).....	9
Fig. 2.5 - Representação esquemática do processo de transesterificação (Adaptado de IBEROL, 2011) .....	11
Fig. 2.6 - Representação da via metabólica de bactérias fermentativas anaeróbias facultativas e estritas (Adaptado de Zhang et al., 2011).....	13
Fig. 2.7 - Representação esquemática do processo de <i>dark fermentation</i> agregado a um CEM (Adaptado de MSH Energy, 2015).....	16
Fig. 2.8 - Representação esquemática das diferentes fases do processo de digestão anaeróbia. (Adaptado de J. L. Chen et al., 2014; Madsen et al., 2011).....	18
Fig. 2.9 - Representação esquemática do funcionamento de uma PEM (Sem et al., 2013).....	20
Fig. 2.10 - Modelo esquemático de um veículo cuja fonte de energia é uma pilha de células de combustível (Adaptado de “Toyota Global Site   Fuel Cell Vehicle,” 2015). .....	21
Fig. 3.1 – Montagem experimental para produção de bioH <sub>2</sub> por <i>Dark Fermentation</i> (DF). .....	26
Fig. 3.2 – Montagem experimental para produção de bioCH <sub>4</sub> por Digestão Anaeróbia (DA). .....	27
Fig. 3.3 – Recolha do bioH <sub>2</sub> produzido no processo de <i>dark fermentation</i> , para determinação da composição do biogás-DF ao longo do tempo (a) e armazenamento em sacos de recolha de gases de baixo peso molecular (b).....	30
Fig. 3.4 – Equipamentos utilizados na caracterização química das fases líquidas de ambos os processos: Mufla (a), Aparelho de Digestão (b) e Aparelho de Destilação (c). .....	33
Fig. 4.1 - Curvas de crescimento das células <i>Enterobacter aerogenes</i> , em meio líquido, para três diferentes temperaturas de incubação, nomeadamente, 30, 35 e 37°C e agitação orbital de ~150 rpm. ....	37

Fig. 4.2 - Representação da reta de calibração D.O. vs p.s. associada ao crescimento da bactéria *Enterobacter aerogenes*, em meio líquido, em condições de  $T_{Inc}=30^{\circ}C$  e agitação orbital de  $\sim 150$  rpm.

..... 38

Fig. 4.3 – Produção total de biogás-DF (a) e de  $bioH_2$  (b) e  $bioCO_2$  (c), produzidos por ensaios de *dark fermentation* a partir de diferentes concentrações iniciais de glicerol e de células de *E. aerogenes*. Condições experimentais: Razão  $V_{fase\ líquida}/V_{Total\ do\ reator}=2/3$ , Volume de PI adicionado = 1 (■) e 10 (■) % (v/v),  $[Glicerol]_{inicial} \approx 10, 20$  e  $30\ g_{glicerol}/L_{MF}$ ,  $T(processo)=37^{\circ}C$  e Agitação magnética  $\sim 150$  rpm .....

40

Fig. 4.4 - Perfil de produção de  $bioH_2$  para ensaios de *dark fermentation* a partir de diferentes concentrações iniciais de glicerol e de células de *E. aerogenes* inoculadas. Condições experimentais: Razão  $V_{fase\ líquida}/V_{Total\ do\ reator}=2/3$ , Volume de PI adicionado = 1 e 10 % (v/v) (a e b, respetivamente),  $[Glicerol]_{inicial} \approx 10$  (◆), 20 (■) e  $30$  (▲)  $g_{glicerol}/L_{MF}$ ,  $T(processo)=37^{\circ}C$  e Agitação magnética  $\sim 150$  rpm .....

41

Fig. 4.5 - Perfil do grau de pureza em  $H_2$  ( $mL\ H_2/mL\ CO_2$ ) da fase gasosa produzida ao longo dos ensaios de *dark fermentation*, para diferentes concentrações iniciais de glicerol e de células de *E. aerogenes* inoculadas (a e b). Condições experimentais: Razão  $V_{fase\ líquida}/V_{Total\ do\ reator}=2/3$ , Volume de PI adicionado=1 e 10% (v/v) (a e b), respetivamente),  $[Glicerol]_{inicial} \approx 10$  (◆), 20 (■) e  $30$  (▲)  $g_{glicerol}/L_{MF}$ ,  $T(processo)=37^{\circ}C$  e Agitação magnética  $\sim 150$  rpm.....

43

Fig. 4.6 - Perfis de produção de  $bioH_2$  para os ensaios de *dark fermentation* realizados a partir de diferentes concentrações iniciais de glicerol e de células de *E. aerogenes* inoculadas (◆). Ajuste dos resultados experimentais à equação de Gompertz modificada (■). Condições experimentais: Razão  $V_{fase\ líquida}/V_{Total\ do\ reator}=2/3$ ,  $T(processo)=37^{\circ}C$  e Agitação magnética  $\sim 150$  rpm; Perfis a) e b)  $[Glicerol]_{inicial} \approx 10\ g_{glicerol}/L_{MF}$  com Inoculação de 1% e 10% (v/v) de PI, respetivamente; Perfis c) e d)  $[Glicerol]_{inicial} \approx 20\ g_{glicerol}/L_{MF}$  com Inoculação de 1% e 10% (v/v) de PI, respetivamente; e) e f)  $[Glicerol]_{inicial} \approx 30\ g_{glicerol}/L_{MF}$  com Inoculação de 1% e 10% (v/v) de PI, respetivamente.....

46

Fig. 4.7 - Perfil de produção de biogás- DA para os dois ensaios de digestão anaeróbia realizados (Ensaio 1 (◆) e Ensaio 2 (■)). Condições experimentais: Razão  $V_{fase\ líquida}/V_{Total\ do\ reator}=0,8$ , Volume de inóculo =  $384,65\ mL$ ,  $[Substrato]_{inicial}=2,71\ gCQO/L_{fase\ líquida}$ ,  $T(processo)=37^{\circ}C$  e Agitação manual (2 vezes/dia). .....

51

Fig. 4.8 - Composição do biogás-DA produzido em  $CH_4$  (■) e  $CO_2$  (■), para os ensaios de digestão anaeróbia realizados. Condições experimentais: Razão  $V_{fase\ líquida}/V_{Total\ do\ reator}=0,8$ , Volume de inóculo =  $384,65\ mL$ ,  $[Substrato]_{inicial}=2,71\ gCQO/L_{fase\ líquida}$ ,  $T(processo)=37^{\circ}C$ , Agitação manual (2 vezes/dia) .....

52

Fig. 7.1 - Perfil de produção de bioH <sub>2</sub> para ensaios de <i>dark fermentation</i> realizados a partir de uma concentração de substrato de $\approx 10 \text{ g}_{\text{glicero}}/\text{L}_{\text{MF}}$ e de um volume de PI de 1% (v/v) (◆). Comparação com os resultados calculados por meio da equação de Gompertz modificada (■). .....	64
Fig. 7.2 - Perfil de produção de bioH <sub>2</sub> para ensaios de <i>dark fermentation</i> realizados a partir de uma concentração de substrato de $\approx 10 \text{ g}_{\text{glicero}}/\text{L}_{\text{MF}}$ e de um volume de PI de 10% (v/v) (◆). Comparação com os resultados calculados por meio da equação de Gompertz modificada (■). .....	64
Fig. 7.3 - Perfil de produção de bioH <sub>2</sub> para ensaios de <i>dark fermentation</i> realizados a partir de uma concentração de substrato de $\approx 20 \text{ g}_{\text{glicero}}/\text{L}_{\text{MF}}$ e de um volume de PI de 1% (v/v) (◆). Comparação com os resultados calculados por meio da equação de Gompertz modificada (■). .....	64
Fig. 7.4 - Perfil de produção de bioH <sub>2</sub> para ensaios de <i>dark fermentation</i> realizados a partir de uma concentração de substrato de $\approx 20 \text{ g}_{\text{glicero}}/\text{L}_{\text{MF}}$ e de um volume de PI de 10% (v/v) (◆). Comparação com os resultados calculados por meio da equação de Gompertz modificada (■). .....	65
Fig. 7.5 - Perfil de produção de bioH <sub>2</sub> para ensaios de <i>dark fermentation</i> realizados a partir de uma concentração de substrato de $\approx 30 \text{ g}_{\text{glicero}}/\text{L}_{\text{MF}}$ e de um volume de PI de 1% (v/v) (◆). Comparação com os resultados calculados por meio da equação de Gompertz modificada (■). .....	65
Fig. 7.6 - Perfil de produção de bioH <sub>2</sub> para ensaios de <i>dark fermentation</i> realizados a partir de uma concentração de substrato de $\approx 30 \text{ g}_{\text{glicero}}/\text{L}_{\text{MF}}$ e de um volume de PI de 10% (v/v) (◆). Comparação com os resultados calculados por meio da equação de Gompertz modificada (■). .....	65

## Índice de tabelas

Tabela 2.1 - Propriedades físico-químicas do hidrogénio (Adaptado de Najjar, 2013). ....	5
Tabela 2.2 - Comparação das diversas propriedades de combustão do hidrogénio em relação a outros combustíveis (Adaptado de Najjar, 2013).....	21
Tabela 3.1 - Composição do meio de crescimento da bactéria <i>Enterobacter aerogenes</i> . ....	23
Tabela 3.2 - Composição do meio de fermentação complexo utilizado para produção de bioH <sub>2</sub> por <i>dark fermentation</i> . ....	24
Tabela 3.3 – Reagentes utilizados na análise da glicerina semi-refinada, do meio de fermentação - contendo ou não o substrato - e dos meio fermentados. ....	24
Tabela 4.1- Caracterização dos resíduos resultantes da produção de biodiesel.....	39
Tabela 4.2 - Velocidade inicial de produção de bioH <sub>2</sub> e produtividade do processo de <i>dark fermentation</i> para diferentes concentrações iniciais de glicerol e de células de <i>E. aerogenes</i> inoculadas. Condições experimentais: Razão $V_{\text{fase líquida}}/V_{\text{Total do reator}}=2/3$ , Volume de PI adicionado = 1 e 10% (v/v), $[\text{Glicerol}]_{\text{inicial}} \simeq 10, 20 \text{ e } 30 \text{ g}_{\text{glicerol}}/\text{L}_{\text{MF}}$ , $T(\text{processo})=37^{\circ}\text{C}$ , Agitação magnética ~150 rpm. ....	42
Tabela 4.3 - Caracterização das fases líquidas resultantes dos ensaios de <i>dark fermentation</i> , realizados a partir de diferentes concentrações iniciais de glicerol e de células <i>E. aerogenes</i> inoculadas. Condições experimentais: Razão $V_{\text{fase líquida}}/V_{\text{Total do reator}}=2/3$ , Volume de PI adicionado = 1 e 10% (v/v), $[\text{Glicerol}]_{\text{inicial}} \simeq 10, 20 \text{ e } 30 \text{ g}_{\text{glicerol}}/\text{L}_{\text{MF}}$ , $T(\text{processo})=37^{\circ}\text{C}$ e Agitação magnética ~150rpm. ....	44
Tabela 4.4 - Rendimento de produção de H <sub>2</sub> nos diversos ensaios de <i>dark fermentation</i> , realizados a partir de diferentes concentrações iniciais de glicerol e de células de <i>E. aerogenes</i> inoculadas. Condições experimentais: Razão $V_{\text{fase líquida}}/V_{\text{Total do reator}}=2/3$ , Volume de PI adicionado = 1 e 10% (v/v), $[\text{Glicerol}]_{\text{inicial}} \simeq 10, 20 \text{ e } 30 \text{ g}_{\text{glicerol}}/\text{L}_{\text{MF}}$ , $T(\text{processo})=37^{\circ}\text{C}$ e Agitação magnética ~150 rpm. ....	45
Tabela 4.5 – Parâmetros determinados com base na aplicação da equação de Gompertz aos resultados experimentais obtidos nos ensaios de <i>dark fermentation</i> realizados a partir de diferentes concentrações iniciais de glicerol e de células de <i>E. aerogenes</i> . Condições experimentais: Razão $V_{\text{fase líquida}}/V_{\text{Total do reator}}=2/3$ , Volume de PI adicionado = 1 e 10% (v/v), $[\text{Glicerol}]_{\text{inicial}} \simeq 10, 20 \text{ e } 30 \text{ g}_{\text{glicerol}}/\text{L}_{\text{MF}}$ , $T(\text{processo})=37^{\circ}\text{C}$ e Agitação magnética ~150 rpm.....	47
Tabela 4.6 – Grau de pureza obtido no decorrer do processo e no saco de recolha para ensaios de <i>dark fermentation</i> realizados a partir de diferentes concentrações iniciais de glicerol e de células de <i>E. aerogenes</i> inoculadas. Condições experimentais: Razão $V_{\text{fase líquida}}/V_{\text{Total do reator}}=2/3$ , Volume de PI	

adicionado = 1 e 10% (v/v), [Glicerol] <sub>inicial</sub> $\simeq$ 10, 20 e 30 g <sub>glicerol</sub> /L <sub>MF</sub> , T(processo)=37°C e Agitação magnética ~150 rpm. ....	48
Tabela 4.7 – Energia (kWh) referente aos volumes de bioH <sub>2</sub> produzidos nos ensaios de <i>dark fermentation</i> , realizados a partir de diferentes concentrações iniciais de glicerol e de células de <i>E. aerogenes</i> inoculadas. ....	49
Tabela 4.8 – Parâmetros de caracterização do consórcio de bactérias. ....	50
Tabela 4.9 – Atividade metanogénica do inóculo utilizado, para os dois digestores em estudo. ....	53
Tabela 4.10 - Caracterização das fases líquidas resultantes dos dois ensaios de digestão anaeróbia. Condições experimentais: Razão $V_{\text{fase líquida}}/V_{\text{Total do reator}}=0,8$ , Volume de inóculo = 384,65 mL, [Substrato] <sub>inicial</sub> =2,71 gCQO/L <sub>fase líquida</sub> , T(processo)=37°C e Agitação manual (2 vezes/dia). ....	53
Tabela 4.11- Produção específica de biogás-DA e de CH <sub>4</sub> . Condições experimentais: Razão $V_{\text{fase líquida}}/V_{\text{Total do reator}}=0,8$ , Volume de inóculo = 384,65 mL, [Substrato] <sub>inicial</sub> =2,71 gCQO/L <sub>fase líquida</sub> , T(processo)=37°C e Agitação manual (2 vezes/dia). ....	54
Tabela 5.1- Parâmetros avaliados na caracterização do sistema biológico de <i>dark fermentation</i> , para produção de bioH <sub>2</sub> a partir de diferentes concentrações iniciais de glicerina semi-refinada e de um inóculo de células de <i>E. aerogenes</i> . ....	55
Tabela 7.1 - Composição do meio de fermentação após esterilização (T=120°C, P=2bar e t=20min) contendo a glicerina semi-refinada. ....	63

## SIGLAS E ABREVIATURAS

ABSR – Reactor Anaeróbio Sequencial Descontínuo (*Anaerobic Sequencing Batch Reactor*)

APA – Agência Portuguesa do Ambiente

AGV – Ácidos Gordos Voláteis

BioCH<sub>4</sub> – Metano produzido por digestão anaeróbia

Biogás-DF – Biogás produzido por *dark fermentation*

Biogás-DA – Biogás produzido por digestão anaeróbia

BioH<sub>2</sub> – Hidrogénio produzido por *dark fermentation*

C.d.o. – Comprimento de onda

CEM – Células de Electrólise Microbiana

CQO – Carência Química de Oxigénio

CSTR – Reactor Perfeitamente Agitado (*Continuous Stirred Tank Reactor*)

DA – Digestão Anaeróbia

DF – Fermentação no escuro (*Dark Fermentation*)

D.O. – Densidade óptica

ETAR – Estação de Tratamento de Águas Residuais

EUA – Estados Unidos da América

GC – Cromatografia Gasosa (*Gas Chromatography*)

GEE – Gases com Efeito de Estufa

GWP – Potencial de Aquecimento Global (*Global Warming Potencial*)

MCI – Motor de Combustão Interna

MF – Meio de Fermentação

MONG – Material Orgânico Não Glicerol

PEM – Membrana de permuta protónica (*Polymer electrolyte membrane*)

PI – Pré-Inóculo

p.s. – Peso seco

PNS – *Purple non-sulfur*

rpm – rotações por minuto

SST – Sólidos Suspensos Totais

SSV – Sólidos Suspensos Voláteis

ST – Sólidos Totais

SV – Sólidos Voláteis

T<sub>Inc</sub> – Temperatura de incubação

UE – União Europeia

VLE – Valores Limite de Emissão

## 1. Introdução

### 1.1 Estrutura da dissertação

Esta dissertação encontra-se dividida em cinco capítulos com conteúdos distintos:

- ✓ Capítulo 1 - Introdução: Delineação da estrutura da tese, enquadramento e justificação da escolha do tema a estudar e definição dos objetivos a alcançar.
- ✓ Capítulo 2 - Revisão da literatura: Breve referência ao panorama energético a nível mundial e nacional; Apresentação e comparação entre vários processos de produção de hidrogénio, incluindo os convencionais (atualmente mais utilizados) e os biológicos (biohidrogénio,  $\text{bioH}_2$ ). Nestes últimos, com foco sobre a produção de  $\text{bioH}_2$  por fermentação no escuro (*dark fermentation*), em sistema simples ou integrado com outros processos biológicos, como a digestão anaeróbia, para aumento do rendimento de degradação do substrato e de produção de  $\text{bioH}_2$  e/outras biocombustíveis gasosos, como o biometano ( $\text{bioCH}_4$ ).
- ✓ Capítulo 3 - Materiais e Métodos: Descrição detalhada dos materiais, equipamentos e procedimentos experimentais aplicados neste trabalho.
- ✓ Capítulo 4 - Resultados e discussão: Apresentação, interpretação e comparação dos resultados experimentais com os obtidos por outros autores em estudos similares. Assim, de acordo com os objetivos a alcançar, inicialmente procedeu-se à otimização de parâmetros de influência no processo de produção de  $\text{bioH}_2$ , por *dark fermentation*, a partir de glicerina semi-refinada (substrato) e, em sequência, estudou-se a viabilidade de integração deste com um processo de digestão anaeróbia, com vista a melhorar o rendimento de degradação do substrato, diminuindo a sua carga poluente, e produzir outro biocombustível gasoso ( $\text{bioCH}_4$ ).
- ✓ Capítulo 5 - Conclusões e sugestões para trabalho futuro: Síntese das conclusões alcançadas ao longo das diferentes etapas da dissertação e proposta de estudos posteriores com interesse para dar continuidade e aprofundar os resultados apresentados.

### 1.2 Enquadramento

As alterações climáticas causadas pela utilização excessiva dos combustíveis fósseis, como forma de sustentar as exigências da sociedade atual, conduziram à procura de soluções que possibilitassem um equilíbrio entre as vertentes social, económica e ambiental.

Nesse contexto, a diminuição das reservas globais de combustíveis fósseis impulsionou a pesquisa de alternativas que, de alguma forma, reduzissem a dependência dos recursos fósseis. Exemplo disso é a investigação que conduziu à produção de biodiesel, um combustível (biocombustível) líquido obtido a partir de recursos maioritariamente renováveis e que pode ser utilizado em veículos automóveis, tal como o vulgar gasóleo. Porém, durante o seu processo de produção industrial é formado, em simultâneo, um resíduo denominado glicerina bruta. Por cada unidade de volume de biodiesel produzido, origina-se um volume de glicerina bruta correspondente a cerca de 10% desse valor. Ainda antes de sair da fábrica essa glicerina bruta é sujeita a processos de destilação, neutralização e centrifugação, que a convertem na chamada *glicerina semi-refinada*. Esta glicerina pode depois ser vendida pela fábrica para, quando sujeita a posteriores processos de purificação, ser utilizada num vasto leque de aplicações em sectores como o farmacêutico e o alimentar. Contudo, estes tratamentos implicam custos adicionais bastante elevados e dada a atual saturação do mercado do glicerol, já não se trata de uma opção atraente.

A questão do momento é então tentar avaliar possíveis utilizações para as quantidades industriais de glicerina semi-refinada geradas, para a sua valorização, mas também para aumentar a eficiência global do processo de produção de biodiesel e a viabilidade económica da sua aplicação.

Uma alternativa viável e sem custos é a utilização desse efluente industrial, como substrato, em processos fermentativos, por microrganismos anaeróbios capazes de degradá-lo, em condições ambientais definidas. Uma mais-valia da aplicação desses processos biológicos é que deles resulta a produção de biocombustíveis gasosos como o hidrogénio ( $\text{bioH}_2$ ) e o metano ( $\text{bioCH}_4$ ), aliada a um abaixamento da carga poluente dos detritos industriais. (Ayoub & Abdullah, 2012; Quispe et al., 2013; Sarma et al., 2012). Tendo em conta esse interesse, há várias décadas têm vindo desenvolver-se estudos no sentido de otimizar os parâmetros físico-químicos e operacionais que conduzam aos melhores rendimentos de processo (De Gioannis et al.; Fradler et al., 2014; Guwy et al., 2011).

Com base neste enquadramento, estabeleceram-se os objetivos desta tese.

### 1.3 Objetivos

Esta dissertação teve como propósito estudar a viabilidade de aplicação de um sistema integrado anaeróbio fermentativo, para a produção de biocombustíveis gasosos ( $\text{BioH}_2$  e  $\text{BioCH}_4$ ) e para o simultâneo abaixamento da carga poluente de um subproduto da indústria de produção de biodiesel contendo glicerol (glicerina semi-refinada). Neste âmbito, inicialmente levaram-se a cabo ensaios de *Dark fermentation*, para otimização da produção de  $\text{bioH}_2$  com recurso a uma estirpe da bactéria *Enterobacter aerogenes*, a partir da glicerina semi-refinada. Sequencialmente, e com vista a atingir os objetivos propostos, estudou-se a viabilidade da aplicação do meio fermentado obtido como substrato num processo de Digestão Anaeróbia, para produção de  $\text{bioCH}_4$  e utilizando-se um consórcio de bactérias fermentativas para o efeito. Ambos os processos biológicos decorreram em condições ambientais mesófilas, para diminuição dos gastos energéticos envolvidos.

## 2. Revisão da literatura

### 2.1 Panorama Energético

Nas últimas décadas, a procura energética tem apresentado um crescimento contínuo como resultado de um aumento populacional cada vez mais acentuado. Contudo, a inexistência de um plano energético capaz de suprir as necessidades energéticas globais sem comprometer o desenvolvimento sustentável do planeta, está a incentivar a um panorama cada vez mais direccionado para a escassez de recursos e incompatível com a preservação ambiental.

A principal fonte de toda esta dependência energética são os combustíveis fósseis, o petróleo, o carvão e o gás natural, considerados os motivadores centrais da poluição atmosférica. Os gases produzidos ao longo do seu processo de combustão, os chamados GEE (Gases com efeito de estufa), nomeadamente, o dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ), o dióxido de azoto ( $\text{NO}_2$ ), o dióxido de enxofre ( $\text{SO}_2$ ), entre outros, quando libertados para a atmosfera tendem a causar o aumento da temperatura média global, levando a fenómenos climáticos com efeitos nefastos para o ambiente.

Perante este cenário inquietante, começou a desenvolver-se uma forte tendência, a nível mundial, de redução da dependência dos combustíveis fósseis, motivada essencialmente pela necessidade de controlar as emissões de GEE. Neste contexto, as Instituições Governamentais definiram como prioridade a implementação de metas e políticas energéticas que se baseassem em trajetórias de baixo carbono, associadas a uma gestão racional dos recursos disponíveis e a uma crescente eletrificação proveniente de fontes de energia alternativas. De facto, a exploração de novas fontes de energia - as chamadas energias renováveis - que tenham por base a minimização dos impactos ambientais e o incremento da segurança de abastecimento energética, diminuindo a elevada pressão associada à exploração dos combustíveis fósseis, tem sido a abordagem adotada com vista a melhorar o panorama energético atual (Lavado, 2009; Verhelst, 2014).

Para tal, a 23 de Abril de 2009 entrou em vigor a Diretiva 2009/28/CE que dita uma quota obrigatória a ser produzida recorrendo a fontes renováveis, sendo estabelecido que até 2020, 20% da energia consumida pela UE (União Europeia) deve provir de energias renováveis. Relativamente ao sector dos transportes, foi implementado que, até 2020, os Estados-Membros devem produzir 10% dos seus combustíveis a partir de fontes renováveis. Outra das metas estipuladas a nível europeu diz respeito às emissões de GEE. Assim, até 2050, a UE deverá reduzir em 80% as emissões de GEE (relativamente aos valores alcançados em 1990), sendo previstas reduções de 25%, 40% e 60% até 2020, 2030 e 2040, respetivamente (APA, 2015)

Na Fig. 2.1 estão representadas as variações das emissões de GEE, a nível mundial, no período de 1990 a 2012. Países Europeus como a Alemanha (-23,53%) e o Reino Unido (-26,22%) conseguiram uma redução bastante significativa das emissões de GEE enquanto outros como a Malta (57,67%) e a Espanha (17,98%) apresentaram um aumento bastante acentuado. Portugal, por sua vez, também foi responsável por uma redução na libertação de compostos poluentes (-4,46%) apesar dos valores serem menos significativos (United Nations, 2015).

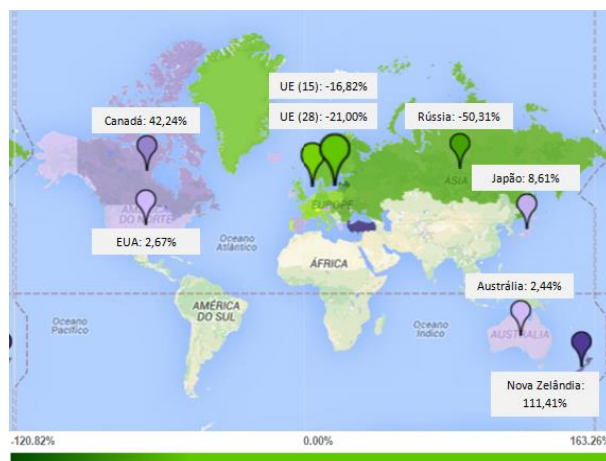


Fig. 2.1 - Mapa mundial da variação de emissões de GEE no período de 1990-2012 (Adaptado de United Nations, 2015)

Segundo dados apresentados pela APA (2015), os sectores que mais interferem com a redução das emissões de GEE no nosso país, são os sectores da indústria, para fins energéticos, dos transportes e, por fim, da agricultura. Caracterizado por uma rede hidrográfica relativamente densa, uma elevada exposição solar média anual e uma vasta costa marítima, Portugal apresenta um elevado potencial para um acréscimo contínuo da percentagem de produção renovável no seu panorama energético. São várias as fontes primárias disponíveis, sendo que as tecnologias mais desenvolvidas são a nível da energia solar, da eólica, da hídrica, da biomassa e da geotérmica. De facto, a implementação destas tecnologias é vantajosa não só a nível ambiental, mas pela perspectiva de redução da dependência externa relativamente a recursos não renováveis. A Fig. 2.2 ilustra a crescente penetração das fontes renováveis no panorama energético português, no período entre 2005 e 2014.

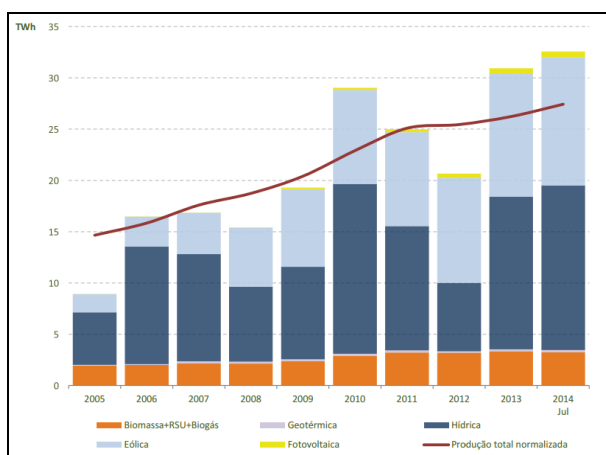


Fig. 2.2 - Evolução da penetração das energias renováveis em Portugal no período de 2005 a 2014 (Direcção Geral de Energia e Geologia, 2014)

É claro o aumento da produção renovável ao longo dos últimos anos, apresentando um total de 8616 GWh para 2005 enquanto em 2014, foi aproximadamente quatro vezes superior, com um total de 32316 GWh (Direcção Geral de Energia e Geologia, 2014). Contudo, o facto das energias renováveis estarem diretamente dependentes das condições meteorológicas, o que provoca intermitência nos sistemas elétricos, interfere diretamente com o seu crescimento no mercado energético. Recorrer ao armazenamento de energia pode ser a solução mais adequada. Por exemplo, as baterias, “flywheels”, capacitores, etc., são tecnologias adequadas a curto prazo, mas a longo prazo o armazenamento de

energia por meio de  $H_2$  seria a solução ideal, dada a possibilidade de utilização deste gás como vetor energético (Gahleitner, 2013).

No âmbito das energias renováveis, o interesse na utilização de biomassa de baixo custo para a produção de combustíveis alternativos como o bioetanol, o biodiesel e o biohidrogénio, tem aumentado substancialmente. De facto, trata-se de uma área bastante promissora pois possibilita o reaproveitamento de materiais residuais que de outro modo seriam desperdiçados, diminuindo a quantidade de subprodutos originados pela indústria (Bičáková & Straka, 2012). Apesar de as tecnologias mais estudadas e desenvolvidas serem a nível do bioetanol e do biodiesel, o biohidrogénio tem adquirido bastante atenção por apresentar um poder calorífico superior comparativamente aos vulgares hidrocarbonetos e pela inexistência de emissões de gases poluentes durante a sua produção (Argun & Kargi, 2011).

## 2.2 Hidrogénio ( $H_2$ )

O hidrogénio ( $H_2$ ) é o elemento mais abundante da natureza, encontrando-se presente em cerca de 75% da matéria existente no Universo. Contudo, não é possível encontrá-lo na natureza no seu estado livre, estando, em grande parte, quimicamente ligado a átomos de oxigénio ou carbono (Najjar, 2013). De facto, a sua concentração na atmosfera é bastante reduzida (cerca de 1ppm), o que leva a que não seja considerado um recurso de energia primária, como é o caso do petróleo ou do gás natural, mas sim uma fonte intermédia, mais concretamente, um vetor energético (Estevão, 2008).

A utilização do  $H_2$  requer a sua extração de recursos que o contenham na sua composição. A água, a biomassa, o gás natural e o carvão são as fontes mais abundantes de  $H_2$  na Natureza e, portanto, as mais indicadas para serem utilizadas em processos de produção (Sangeeta et al., 2014).

Em termos físico-químicos, o  $H_2$  apresenta o peso molecular mais baixo da tabela periódica, com características que o distinguem dos restantes elementos, nomeadamente, a sua grande condutividade e baixa viscosidade (Najjar, 2013). Sob uma temperatura e pressão normais ( $-0^\circ\text{C}$  e 1atm), é um gás extremamente inflamável, inodoro, incolor e tem uma densidade (aproximadamente  $0,09\text{ kg/m}^3$ ) que o leva a ser 14 vezes mais leve do que ar. A sua existência no estado líquido depende do seu armazenamento a uma temperatura de  $-253^\circ\text{C}$ , nos chamados sistemas criogénicos. Acima desta temperatura, o seu armazenamento pode ser efetuado em cilindros de alta pressão sob a forma de gás comprimido. Outros pontos importantes a considerar são o seu poder calorífico elevado e a sua baixa energia de ignição, os quais se tornam relevantes quando se objetiva a utilização do  $H_2$  como um combustível (Estevão, 2008; Sangeeta et al., 2014). A Tabela 2.1 enumera algumas das propriedades físico-químicas do  $H_2$ .

Tabela 2.1 - Propriedades físico-químicas do hidrogénio (Adaptado de Najjar, 2013).

Propriedade	Valor
Peso molecular	2,01594
Densidade do gás a $0^\circ\text{C}$ e 1 atm	$0,08987\text{ kg/m}^3$
Densidade do sólido a $-259^\circ\text{C}$	$858\text{ kg/m}^3$
Densidade do líquido a $-253^\circ\text{C}$	$708\text{ kg/m}^3$
Temperatura de fusão	$-259^\circ\text{C}$
Temperatura de ebulição a 1 atm	$-253^\circ\text{C}$
Temperatura crítica	$-240^\circ\text{C}$
Pressão crítica	12,8atm
Densidade crítica	$31,2\text{ kg/m}^3$
Calor de fusão a $-259^\circ\text{C}$	58 kJ/kg
Calor de vaporização a $-253^\circ\text{C}$	447 kJ/kg
Condutividade térmica a $25^\circ\text{C}$	0,019 kJ/kg
Calor específico do gás a $25^\circ\text{C}$ ( $C_p$ )	$14,3\text{ kJ/(kg }^\circ\text{C)}$
Calor específico do líquido a $-256^\circ\text{C}$ ( $C_p$ )	$8,1\text{ kJ/(kg }^\circ\text{C)}$
Calor específico do sólido a $-259,8^\circ\text{C}$ ( $C_p$ )	$2,63\text{ kJ/(kg }^\circ\text{C)}$

As tecnologias que dominam o atual mercado do  $H_2$  encontram-se associadas aos combustíveis fósseis destacando-se o processo de *steam reforming* do gás natural como o mais aplicado, sendo responsável por cerca de 50% do  $H_2$  existente (Cecere et al., 2014). Apesar de ser um método que implica libertação de  $CO_2$  para a atmosfera, a sua alta eficiência e os seus baixos custos, tanto a nível operacional como de produção, são características que o tornam bastante relevante no mercado do  $H_2$ . (Bičáková & Straka, 2012).

Existem outras tecnologias em que esse efeito é nulo, não havendo libertação de compostos poluentes para a atmosfera. A eletrólise da água é um desses exemplos. Esta tecnologia é bastante simples e o  $H_2$  obtido apresenta um elevado grau de pureza, sendo por isso considerada como uma via de produção extremamente eficiente (M. Wang et al., 2014). Porém, o gasto energético associado é demasiado elevado o que se traduz num custo elétrico excessivo, influenciando o preço do próprio  $H_2$  (Bičáková & Straka, 2012). De facto, a sua taxa de aplicação, em relação à totalidade dos métodos utilizados, é de apenas 4% (Bhandari et al., 2013). Assim, apesar de não haver libertação de compostos poluentes ao longo deste processo, há um claro impacto negativo dado que a eletricidade utilizada provém essencialmente de fontes fósseis. Uma forma de minimizar esta desvantagem seria alimentar o eletrolisador com eletricidade proveniente de fontes renováveis, c (Bhandari et al., 2013).

Na Fig. 2.3 está representado o potencial de aquecimento global quando associamos a eletrólise a diversas fontes de energia. A diferença entre a realização da eletrólise com energia proveniente da rede e utilizando fontes renováveis é bastante significativa, com o potencial de aquecimento global a atingir o mínimo quando se recorre à energia eólica.

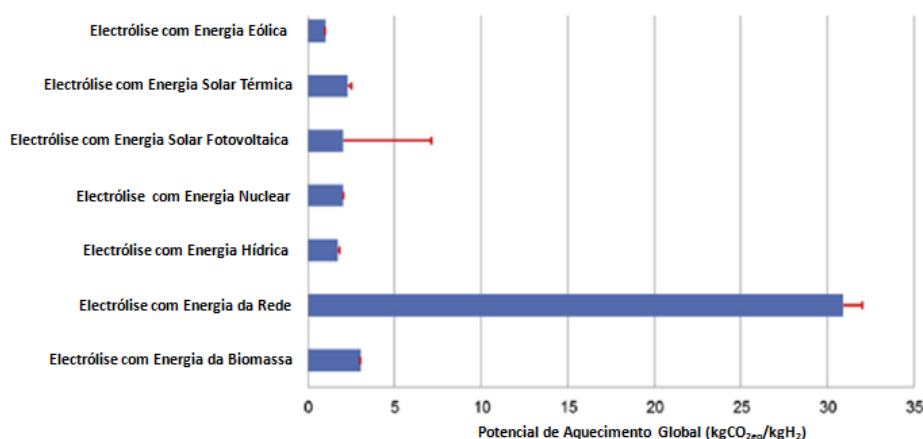


Fig. 2.3 - Potencial de aquecimento global para o processo de eletrólise recorrendo a diferentes fontes de energia (Adaptado de Bhandari et al., 2013).

De um modo geral, todos estes processos de produção de  $H_2$  exigem grandes quantidades de energia para operarem tornando-os pouco atrativos do ponto vista ambiental. Os processos de produção biológica de  $H_2$ , pelo contrário, necessitam de menos energia para o seu funcionamento, possibilitando uma redução global das emissões de gases poluentes.

### 2.2.1 Produção de hidrogénio por processos biológicos (bioH<sub>2</sub>)

A produção excessiva de resíduos por parte das indústrias e por parte do sector agrícola fomentou a investigação em novas áreas que permitisse o reaproveitamento desses desperdícios de forma adequada, direcionando as atenções para a produção de  $H_2$  por via biológica. De facto, a utilização de biomassa de baixo valor, como substrato, contribui para a possibilidade de este tipo de tecnologias se tornarem competitivas, a nível monetário, no mercado do  $H_2$ . A seleção dos resíduos mais adequados,

como substratos, tem em conta critérios como o seu preço, o conteúdo em hidratos de carbono e grau de biodegradabilidade e a sua disponibilidade. (Bičáková & Straka, 2012).

A base destes processos é representada pela utilização de microrganismos como catalisadores de reações, que podem ser autotróficos ou heterotróficos, sob condições de temperatura e pressão próximas das ambientais, conduzindo a um decréscimo no consumo energético global e, portanto, nos custos totais do processo (Reith et al., 2003).

Os métodos de produção biológica de hidrogénio podem ser diferenciados em:

- Biofotólise da água (realizada por algas ou cianobactérias);
- Fotofermentação de compostos orgânicos (realizada por bactérias fotossintéticas);
- Fermentação anaeróbia no escuro (realizada por bactérias anaeróbias estritas ou facultativas);
- Processo híbrido (realizado por bactérias fotossintéticas e fermentativas).

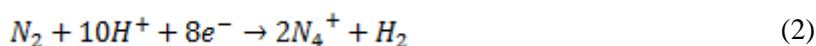
A ocorrência dos processos biológicos depende da presença das enzimas hidrogenase e/ou nitrogenase, as quais controlam o fluxo metabólico de eletrões e catalisam a redução dos prótons  $H^+$ .

As hidrogenases podem ser diferenciadas em três tipos, de acordo com os metais presentes no seu centro ativo, nomeadamente, [FeFe] hidrogenases, [NiFe] hidrogenases e as hidrogenases livres de metais. As hidrogenases são responsáveis pela seguinte reação de conversão (Equação 1):



Para além disto ainda desempenham um importante papel nos mecanismos de balanço redox (Cai et al., 2011).

A nitrogenase é a enzima responsável pela redução do  $N_2$  em amónia, contribuindo significativamente para a manutenção do ciclo de azoto. Enquanto realiza a fixação do  $N_2$ , esta enzima ainda possui a capacidade de produzir  $H_2$ . As nitrogenases podem ser diferenciadas em três tipos: Mo-nitrogenase, V-nitrogenase e Fe-nitrogenase (Kim & Kim, 2011). A produção de hidrogénio por parte desta enzima é representada pela Equação 2:

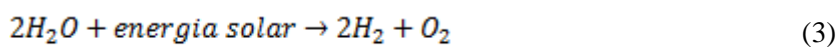


De seguida apresenta-se uma breve descrição de cada um dos processos referidos acima.

### 2.2.1.1 Biofotólise da água

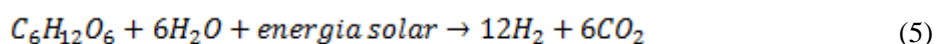
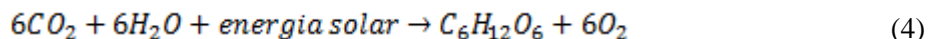
#### a) Direta

A biofotólise direta da água é um processo biológico que ocorre associado ao sistema fotossintético das algas, geralmente algas verdes autotróficas, como por exemplo, a *Scenedesmus obliquus*, a *Chlorococcum littorale*, a *Platymonas subcordiformis* e a *Chlorella fusca*. Neste processo ocorre a transformação da energia solar em energia química, imprescindível para quebrar as ligações da molécula de água (Bičáková & Straka, 2012) e produzir  $O_2$  e  $H_2$ , por ação da enzima hidrogenase (Equação 3).



### b) Indirecta

A decomposição da água por biofotólise indireta, em  $H_2$  e  $O_2$ , por sua vez, é levada a cabo por cianobactérias, algas autotróficas verde azuladas (ex: *Anabaena sp.*, *Calothrix sp.*, *Oscillatoria sp.*, *Synechococcus sp.* e *Gloeobacter sp.*), e ocorre por ação da enzima nitrogenase. O processo desenvolve-se de acordo com as reações 4 e 5 (Bičáková & Straka, 2012):

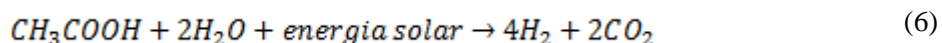


A vantagem da biofotólise reside no facto da fonte primária ser uma fonte renovável – a água - não tendo custos associados. Contudo, dada a inibição da atividade da enzima hidrogenase em presença de oxigénio, para que este processo seja bem-sucedido é fundamental que a concentração de oxigénio seja inferior a 0,1%, o que constitui uma desvantagem quando à aplicação deste processo (Bičáková & Straka, 2012).

#### 2.2.1.2 Fotofermentação

A fotofermentação é um processo biológico no qual bactérias fotossintéticas exercem o seu metabolismo na presença de luz solar, com recurso a compostos orgânicos como substrato (hidratos de carbono, ácidos gordos, álcoois, resíduos orgânicos). Um dos grupos de microrganismos que apresenta as características adequadas para participar neste processo e também o mais estudado presentemente refere-se à bactéria *purple non-sulfur* (PNS). As espécies de PNS mais conhecidas e utilizadas referem-se à *Rhodobacter sphaeroides* O.U001, à *Rhodobacter capsulatus*, à *R. sphaeroides*-RV, à *Rhodobacter sulfidophilus*, à *Rhodospseudomonas palustris* e à *Rhodospirillum rubrum*.

A conversão dos compostos orgânicos em  $H_2$  ocorre essencialmente devido à presença da enzima nitrogenase, sob condições de ausência de azoto. Para que seja realizado com sucesso, este processo requer condições anaeróbias, uma temperatura ótima entre 31 e 36°C e um pH cujo valor esteja dentro do intervalo de 6,8 a 7,5. A intensidade luminosa, por sua vez, deve ser mantida entre 6 e 10 klux. A equação 6 representa a reação envolvida no processo de fotofermentação (Argun & Kargi, 2011; Bičáková & Straka, 2012).



Porém, estes sistemas fotofermentativos apresentam algumas limitações que incluem uma elevada demanda energética por parte da enzima nitrogenase, baixas eficiências de conversão da radiação incidente e, pelo facto dos fotobioreactores exigirem áreas de grande dimensão, também originam questões a nível económico (Ghimire et al., 2015).

#### 2.2.1.3 Fermentação anaeróbia no escuro (*dark fermentation*)

A fermentação anaeróbia no escuro é o processo biológico mais estudado na atualidade. Apresentando um funcionamento relativamente simples, este processo desenvolve-se sob condições de ausência de oxigénio e sem depender da disponibilidade de fontes luminosas para o decorrer das reações. Contudo, o seu enorme potencial para aplicabilidade futura, comparativamente aos outros processos mencionados, deriva essencialmente da elevada taxa e velocidade de produção e da possibilidade de utilização de um extenso espectro de compostos orgânicos, como substratos, incluindo resíduos industriais (Das & Veziroglu, 2008; Ghimire et al., 2015).

Já vários estudos foram desenvolvidos com aplicação do processo de *dark fermentation* a diversos resíduos agroindustriais, nomeadamente, a biomassa microalgal (Lourenço, 2012; Mira, 2012), a hidrolisados obtidos pelo tratamento enzimático da pasta de papel (Mira, 2012), a resíduos resultantes da produção de biodiesel contendo glicerol (Correia, 2009; Mira, 2012), entre outros.

A produção de  $H_2$  é realizada por bactérias anaeróbias que efetuam a degradação dos substratos orgânicos por meio de oxidação, com vista a fornecer a energia necessária para o seu crescimento metabólico. Isto só é possível em condições anóxicas, ou seja, na ausência de  $O_2$  para atuar como aceitador de eletrões. A explicação reside no facto de, quando se trata de um ambiente aeróbio, o  $O_2$  é reduzido à molécula de água mas, pelo contrário, em condições anaeróbias, são os iões  $H^+$  que atuam como aceptores de eletrões, sendo reduzidos ao hidrogénio molecular. Os eletrões, produzidos na reação de oxidação, são libertados através da atividade da enzima hidrogenase e devem ser distribuídos de modo a manter-se a neutralidade eletrónica (Fig. 2.4). Para além da formação de  $H_2$  e  $CO_2$ , ocorre a produção simultânea de outros compostos, nomeadamente, ácido acético, butírico, entre outros, que interferem com o decorrer da reação e diminuem o rendimento do processo (Das & Veziroglu, 2008; Ghimire et al., 2015).

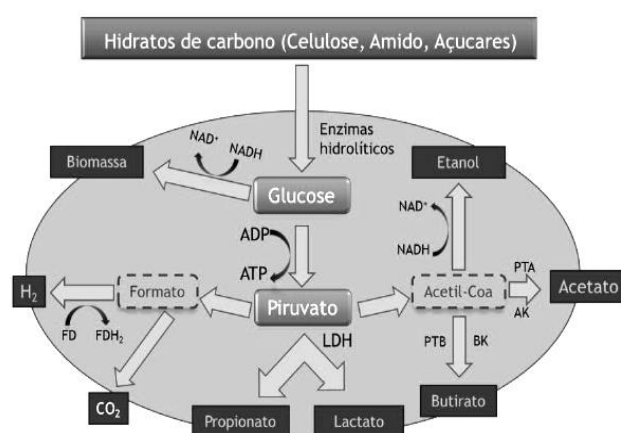
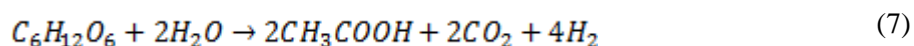


Fig. 2.4 - Representação esquemática da via metabólica de degradação de hidratos de carbono, por *dark fermentation* (Adaptado de Cai et al., 2011).

O processo de *dark fermentation* utilizando, por exemplo, a glucose como substrato, pode alcançar um rendimento máximo de cerca de 33%, de acordo com a equação 7 (Bičáková & Straka, 2012).



Contudo, a aplicação deste processo à escala industrial ainda se encontra bastante limitada e para que seja considerada viável, a taxa de produção e o rendimento do processo devem ser incrementados mantendo, simultaneamente, custos globais reduzidos. Assim, é de extrema importância uma análise apropriada dos diversos parâmetros intervenientes no processo e que influenciam o decorrer das reações, tais como: o tipo de substrato, o tipo de inóculo, a configuração do reator, a temperatura, o pH, os nutrientes e iões metálicos e, por fim, a pressão parcial do  $H_2$  (Argun & Kargi, 2011; Ghimire et al., 2015).

#### a) Tipo de substrato

Os açúcares simples, a glucose, a sacarose e a lactose, são os substratos mais utilizados devido às suas características físico-químicas, nomeadamente, por exibirem estruturas relativamente simples, fazendo prever fácil biodegradabilidade, e por se encontrarem presentes em efluentes industriais. Além disso, pelo facto de apresentarem tempos de fermentação relativamente curtos, são considerados

como *substratos modelo* para a realização de estudos que permitam uma avaliação e definição de parâmetros de influência para a produção biológica de  $H_2$ . Neste contexto, proporcionam a análise da cinética bacteriana, do conteúdo nutricional e de outros parâmetros operacionais fundamentais ao processo.

Outra alternativa também bastante utilizada corresponde a matérias-primas sustentáveis. A biomassa é um recurso renovável que possibilita um incremento na segurança de abastecimento energética, sendo uma hipótese viável cada vez mais estudada. Os resíduos agrícolas e industriais, culturas energéticas, são exemplos de substratos enquadrados nesta categoria. Apesar de uma reação pública nada favorável à utilização de alimentos para a produção de biocombustíveis, o uso de culturas energéticas, como o trigo ou a mandioca, são cada vez mais aceites pela comunidade científica.

Por fim, existem ainda certos substratos cujo potencial ainda é incerto, nomeadamente, as águas residuais, os resíduos de biodiesel contendo glicerol e as microalgas. Apesar de serem considerados promissores, os estudos realizados até ao momento apresentam eficiências bastante inferiores aos substratos renováveis tradicionais (Elsharnouby et al., 2013).

Para além do tipo de substrato, há que ter em conta a sua concentração. Se um dado substrato não apresentar a concentração certa no processo fermentativo, pode provocar uma inibição da atividade da bactéria produtora de  $H_2$  e limitar a sua produção. Assim, quando se constata uma concentração inferior à exigida, o crescimento da biomassa é impossibilitado. Porém, a presença de quantidades excessivas de substrato não corresponde necessariamente a uma produção superior, dado que pode provocar a inibição do crescimento da bactéria, através do incremento da pressão osmótica, e, em determinados casos, causar uma mudança da via fermentativa para a via de produção de ácido láctico (Wong et al., 2014).

#### ✓ Glicerina

A glicerina ou glicerol ( $C_3H_8O_3$ ), também conhecida por propano-1,2,3-triol, pode ter várias proveniências, de entre as quais, o processo de produção de biodiesel, um dos biocombustíveis mais investigados na atualidade. Os principais produtores de biodiesel, a nível mundial, são a Alemanha, os EUA, a França, a Argentina e o Brasil. Ao longo do processo, a glicerina é produzida em simultâneo com o biodiesel segundo uma relação de 1:10, ou seja, por cada 10 litros de biodiesel, é produzido um litro de glicerina. (Quispe et al., 2013; Sarma et al., 2012).

A produção de biodiesel é efetuada através da reação de transesterificação de triglicéridos contidos em óleos vegetais, óleos alimentares usados e gorduras animais. O processo de transesterificação consiste numa reação entre os glicéridos e um álcool (geralmente metanol ou etanol) na presença de um catalisador (de origem ácida, básica ou enzimática), originando ésteres de ácidos gordos e glicerina. Com a reação finalizada é possível a observação de duas fases distintas na mistura: a fase do biodiesel, composta por ésteres de ácidos gordos e a fase da glicerina bruta, contendo, para além do glicerol, diversas impurezas, nomeadamente, álcool que não reagiu, sabão, sais e materiais sólidos orgânicos (Carrapato, 2010; Sarma et al., 2012)

Na Fig. 2.5 encontra-se uma representação esquemática do processo de produção de biodiesel, recorrendo à reação de transesterificação.

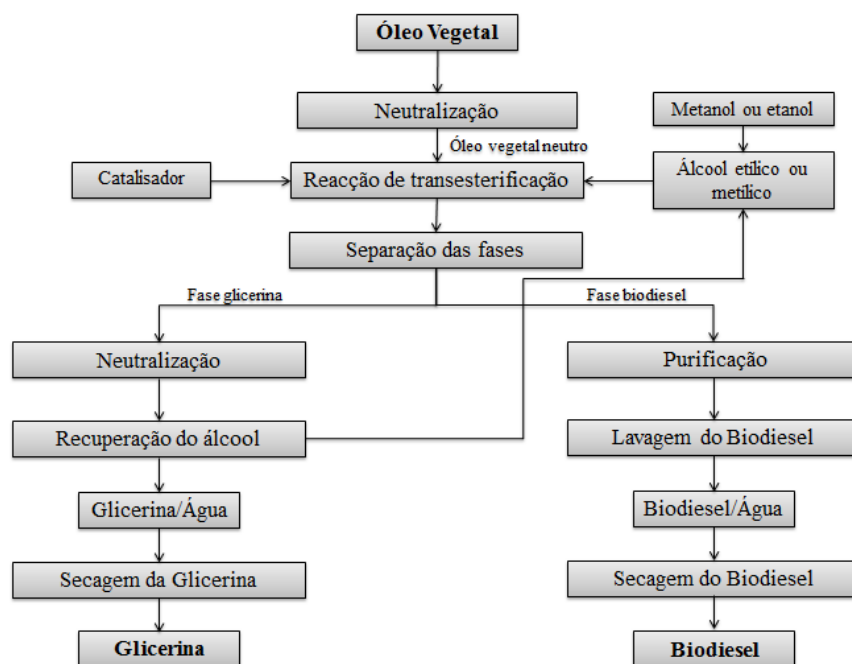


Fig. 2.5 - Representação esquemática do processo de transesterificação (Adaptado de IBEROL, 2011)

A concentração de glicerol nos resíduos de produção de biodiesel (fase da glicerina) difere consoante a fonte produtora mas, de um modo geral, pode apresentar valores entre 1% e 85% (v/v) e, em certos casos, valores superiores. Porém, a maioria das aplicações disponíveis para a glicerina implicam um grau de pureza bastante superior ao intervalo proporcionado pela reação de transesterificação. De facto, este composto pode ser diferenciado em três categorias, de acordo com a sua concentração: glicerina bruta (44-88%), resultante do processo de transesterificação e utilizada, por exemplo, na alimentação animal; glicerina técnica (máximo de 98%), geralmente utilizada a nível industrial para a formação de produtos químicos; glicerina refinada (a partir de 99,7%), direccionada para aplicações nas áreas da cosmética, farmacêutica e alimentar (Quispe et al., 2013; Sarma et al., 2012).

Existem inúmeros processos que possibilitam a purificação da glicerina bruta, por exemplo, por meio de filtração, pela junção de aditivos químicos, através de destilação em vácuo e recorrendo à filtração por troca iónica em resina. Porém, todos eles acarretam custos adicionais bastante elevados, acabando por reduzir o valor comercial do próprio resíduo (Quispe et al., 2013; Tan et al., 2013). A libertação da glicerina bruta para o meio ambiente também não constitui uma opção viável dado que o seu excessivo conteúdo em metanol e o seu elevado pH provocariam a contaminação das águas subterrâneas, colocando em risco a biodiversidade existente na zona (Sarma et al., 2012).

Neste contexto, a utilização deste resíduo, como substrato, para a produção biológica de  $H_2$  é uma alternativa bastante atrativa. De realçar que, em termos de conteúdo energético, a glicerina bruta (25,30MJ/kg) apresenta um valor superior ao valor da glicerina pura (19/kg), algo que acaba por favorecer a potencialidade desta aplicação. Esta discrepância poderá ser explicada pela presença de álcool, utilizado na reação de transesterificação, e de alguns traços de biodiesel (Sarma et al., 2012).

### b) Tipo de inóculo

Existem diversos tipos de culturas microbianas anaeróbias que podem ser utilizadas num processo de *dark fermentation*, as quais podem ser diferenciadas em culturas puras, culturas mistas (consórcios microbianos), co-culturas (combinação de culturas puras) e microrganismos geneticamente modificados. Atualmente, as mais estudadas são as culturas puras e as mistas (Jianlong Wang & Wan, 2011).

Particularizando o caso das culturas puras, a sua utilização em processos fermentativos tem a vantagem de proporcionar, com maior facilidade, a deteção de possíveis mudanças na via metabólica da reação. Neste contexto, a maioria dos estudos desenvolvidos com vista a otimizar parâmetros no processo fermentativo e, deste modo, incrementar os rendimentos e as taxas de produção de  $H_2$ , tendem a recorrer a culturas puras para o efeito. (Elsharnouby et al., 2013).

A gama de microrganismos mesófilos que pode intervir neste processo é vasta, havendo uma diferenciação entre as bactérias anaeróbias facultativas e estritas. Os microrganismos anaeróbios estritos são extremamente sensíveis à presença de  $O_2$ , sofrendo uma inibição metabólica na sua presença, o que impossibilita a produção de  $H_2$ . Entre esses, encontram-se os microrganismos pertencentes ao género *Clostridium*, que produzem  $H_2$  durante a sua fase exponencial de crescimento mas que ao atingir a fase estacionária, o seu metabolismo altera-se passando a produzir outros compostos, como é o caso da acetona. Em relação às diferentes espécies de microrganismos anaeróbios facultativos capazes de produzir  $H_2$ , as mais utilizadas pertencem ao género *Enterobacteriaceae* e *Escherichia*. (Elsharnouby et al., 2013; Kapdan & Kargi, 2006). A *Enterobacter* tem recebido um maior destaque derivado das particularidades que a caracterizam, nomeadamente, a sua taxa de crescimento elevada, a sua facilidade a nível de cultura e o facto de ser adequada para um largo espectro de substratos. Dentro desta estirpe, as bactérias que apresentam uma análise mais aprofundada para efeitos de produção de  $H_2$  são a *Enterobacter asburiae*, a *Enterobacter cloacae* e a *Enterobacter aerogenes* (Zhang et al., 2011).

Das mencionadas, a *Enterobacter aerogenes* é normalmente selecionada pelas várias vantagens que possui, nomeadamente: por se tratar de uma bactéria anaeróbia facultativa, isto é, o seu crescimento pode decorrer na presença de oxigénio, o que possibilita uma maior facilidade a nível de manipulação, comparativamente às bactérias estritamente anaeróbias; Por apresentar uma taxa de crescimento e de produção de  $H_2$  elevadas, sugerindo o seu potencial para aplicações em larga escala; Por não sofrer inibição de crescimento numa atmosfera cuja composição é de 100% de  $H_2$  (Zhang et al., 2011).

As diferentes vias metabólicas que podem ser adotadas, no decorrer do processo fermentativo, podem promover ou inibir a produção de  $H_2$ , dependendo das condições operacionais estabelecidas, levando ou não à produção de ácidos gordos voláteis (acético, propiónico, butírico e láctico) e de etanol. Deste modo, a diferença mais relevante entre elas corresponde à energia que é gerada, o que afeta o crescimento celular e os produtos finais acumulados. Sendo assim, o processo pode seguir duas vias metabólicas distintas após a conversão da glucose em piruvato, nomeadamente, a via do formato e a via do NADH, representadas na Fig. 2.6. Na via do formato, característica das bactérias anaeróbias facultativas, o piruvato é convertido em formato e acetil-coa, sendo a reação catalisada pela enzima piruvato-formato-liase (PFL). O formato originado é depois convertido em  $H_2$  e  $CO_2$ , por ação da enzima formato-hidrogénio-liase (FHL). As bactérias anaeróbias estritas, por sua vez, seguem uma via mais complexa, a via do NADH. Nesta situação, o  $H_2$  é originado pela conversão do piruvato em ferredoxina pela enzima piruvato ferredoxina oxidoreductase (PFOR). Alguns microrganismos ainda possuem a enzima NADH ferredoxina oxidoreductase (NFOR) proporcionando a conversão do NADH em ferredoxina. Finalmente, na presença da enzima hidrogenase, ocorre a formação de  $H_2$  pela conversão da ferredoxina originada anteriormente. (Cai et al., 2011; Zhang et al., 2011).

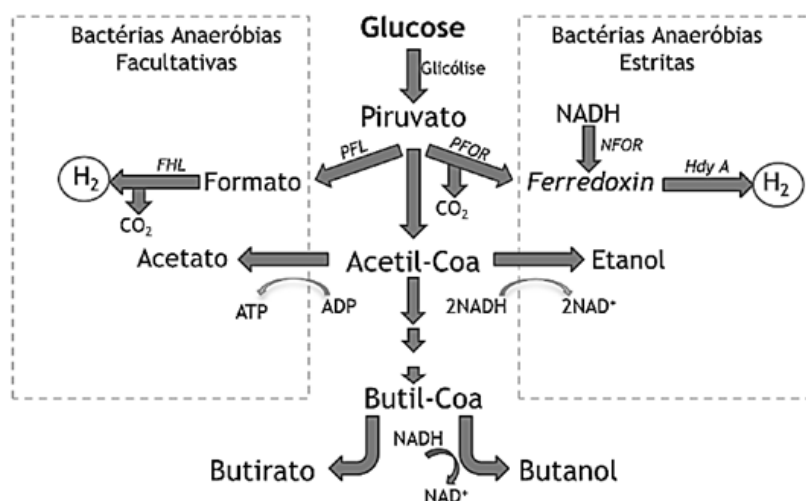


Fig. 2.6 - Representação da via metabólica de bactérias fermentativas anaeróbias facultativas e estritas (Adaptado de Zhang et al., 2011)

Muitos estudos utilizam a combinação de bactérias anaeróbicas estritas e facultativas - as chamadas co-culturas - para promover a produção de  $H_2$ . O que se pretende com esta técnica é que o  $O_2$  seja eliminado do meio sem a necessidade de adição de um agente redutor (L-cisteína, por exemplo), algo que acarreta custos adicionais bastante elevados. A finalidade das bactérias facultativas seria, portanto, de consumir o  $O_2$  existente e estabelecer as condições anaeróbias necessárias para maximizar a produção de  $H_2$ . (Elsharnouby et al., 2013).

### c) Parâmetros operacionais e físico-químicos

✓ **Temperatura**

A temperatura é um parâmetro que interfere em diversos mecanismos num processo fermentativo, nomeadamente, na taxa de crescimento do microrganismo, de hidrólise do substrato e de produção de  $H_2$ . A seleção de uma temperatura adequada é particularmente importante para a enzima hidrogenase, dado que esta só se encontra ativa perante um intervalo de temperaturas muito restrito. As gamas de temperaturas nas quais as reações biológicas podem decorrer podem ser diferenciadas em: mesófilas (25 a 40°C), termófilas (40 e 65°C) ou hipertermófilas (> 80°C) (Elsharnouby et al., 2013).

Foi constatado que segundo determinadas condições, o aumento da temperatura pode aumentar a capacidade da bactéria de produzir  $H_2$ . Contudo, um aumento demasiado elevado poderá ter o efeito contrário, se não tiver em conta a gama de funcionamento do microrganismo, levando a uma diminuição da produção de  $H_2$  assim como a uma diminuição do rendimento do processo. (Elsharnouby et al., 2013). Na maioria dos estudos, a temperatura para a produção de  $H_2$  foi estabelecida entre os 30 e os 37°C (Won & Lau, 2011). Porém, de acordo com J Wang & Wan (2009), nos inúmeros estudos realizados, utilizando essencialmente glucose e sacarose como substrato, a temperatura considerada como mais adequada, dentro da gama mesófila, correspondeu a 37°C (J Wang & Wan, 2009).

Relativamente à taxa de hidrólise, esta é afetada de acordo com a fração biodegradável que consta na composição da biomassa utilizada. Resíduos agrícolas, por exemplo, necessitam de uma hidrólise mais eficiente para se obterem rendimentos mais elevados e, neste contexto, as temperaturas termófilas são mais adequadas. Pelo contrário, substratos de fácil degradação, geralmente, possibilitam bons rendimentos sob temperaturas mesófilas (Ghimire et al., 2015).

### ✓ Tipo de reator

Os reatores biológicos utilizados em laboratório podem possuir diferentes configurações, sendo diferenciados em reatores cujo funcionamento decorre em regime contínuo e aqueles cuja operação decorre em modo descontínuo (*batch*). Pela facilidade e flexibilidade em termos operacionais, os reatores descontínuos são os mais utilizados nos estudos de produção de  $H_2$  a partir de substratos orgânicos.

Um dos reatores mais utilizados para este propósito corresponde ao CSTR (*Continuous Stirred Tank Reactor*), cuja utilização também é realizada à escala industrial. Estes reatores possuem uma configuração relativamente simples e proporcionam o crescimento das células bacterianas com grandes densidades. Porém, devido à remoção contínua do efluente, a concentração de biomassa também é reduzida o que compromete a produção de  $H_2$ . Inúmeros estudos comprovaram que há uma relação direta entre a taxa de produção de  $H_2$  e a densidade microbiana presente no bioreactor. Neste sentido, várias estratégias de retenção das células têm sido investigadas. As mais recentes metodologias consistem na imobilização da biomassa, no reator, através de sistemas de grânulos e de biofilmes.

Outro reator também bastante utilizado em inúmeros estudos associados à produção biológica de  $H_2$  é o ASBR (*Anaerobic Sequencing Batch Reactor*), cuja operação é realizada em modo descontínuo. Este reator apresenta uma configuração distinta do CSTR e tem como vantagens uma retenção de biomassa elevada e a necessidade de um capital de investimento relativamente baixo (Ghimire et al., 2015; Markov et al., 2011; Won & Lau, 2011).

### ✓ pH

O pH é um fator ambiental bastante relevante num processo fermentativo, capaz de afetar a atividade da bactéria, alterando o funcionamento da enzima hidrogenase e a via metabólica adotada ao longo do processo. De facto, uma mudança no pH influencia diretamente a composição do efluente resultante do processo fermentativo, sendo, portanto, de extrema importância a determinação do valor mais adequado com vista à maximização da produção de  $H_2$  (Won & Lau, 2011).

Segundo Singh et al. (2010), o pH ótimo para a produção de  $H_2$  encontra-se no intervalo entre 5,5-7,0. Em diversos estudos foi constatado que dentro de uma determinada gama, um aumento do pH tem um efeito positivo na bactéria, estimulando a sua capacidade de produção de  $H_2$ . Contudo, um aumento excessivo pode provocar o efeito inverso, contribuindo para a inibição do processo fermentativo e, portanto, para o cessar da produção. (Azwar et al., 2014; J Wang & Wan, 2009). O mesmo acontece quando o pH apresenta um valor demasiado baixo. Esta situação provoca a acumulação de ácidos orgânicos e a diminuição da capacidade tampão do sistema, originando, igualmente, uma inibição da produção de  $H_2$  (Singh et al., 2010).

### ✓ Nutrientes e iões metálicos

Os macronutrientes essenciais para um processo fermentativo ocorrer são o carbono (C), o azoto (N) e o fósforo (P). O carbono é obtido a partir do substrato selecionado. O azoto é um composto que se encontra presente nas proteínas, nos ácidos nucleicos e nas enzimas, sendo a sua existência de extrema importância para fomentar o crescimento das células e minimizar a produção de ácidos orgânicos, pelo que uma concentração apropriada de azoto beneficia o rendimento global do processo (J Wang & Wan, 2009; Wong et al., 2014). O fósforo aparece na forma de fosfato e é fulcral pela sua particularidade de funcionar como tampão, além do seu valor nutricional. Desta forma, o estabelecimento das razões C/N e C/P de forma apropriada é elementar para proporcionar uma boa produção de  $H_2$  (J Wang & Wan, 2009).

Em relação aos iões metálicos, estes têm a particularidade de poder afetar o crescimento das células, por interferirem com os processos de transporte a nível celular e, portanto, com o desempenho das

enzimas desidrogenases. Os iões metálicos com mais relevância na produção biológica de  $H_2$  são o magnésio (Mg), o sódio (Na), o zinco (Zn) e o ferro (Fe), sendo o  $Mg^{2+}$  o mais relevante. O ferro também apresenta características essenciais para o sucesso do processo dado que contribuiu para a formação de ferredoxina (Chong et al., 2009).

#### ✓ Pressão parcial do $H_2$

A pressão parcial do  $H_2$  sobre a fase líquida é outro dos parâmetros que devem ser considerados num processo de *dark fermentation*, dado que pode afetar negativamente a atividade da enzima hidrogenase e tornar a reação pouco favorável do ponto de vista termodinâmico (Jung et al., 2011). Manter a pressão parcial do  $H_2$  baixa, na *headspace*, facilita a transferência de massa da fase líquida para a fase gasosa, promovendo a produção de  $H_2$ . Perante um aumento da concentração de  $H_2$  na fase líquida, a oxidação da ferredoxina torna-se menos favorável, passando a ocorrer a redução da ferredoxina e consequentemente a diminuição da produção de  $H_2$  (Ghimire et al., 2015).

Uma forma de reduzir a concentração de  $H_2$  na fase líquida é através do borbulhamento com azoto, o que pode levar a um aumento de rendimento de cerca de 68%. O aumento da agitação no decorrer do processo também é considerado um método eficaz de redução da pressão parcial do  $H_2$  (Chong et al., 2009).

#### 2.2.1.4 Processos híbridos ou integrados

Outra possibilidade para a produção biológica de  $H_2$  reside na combinação de dois processos, em que o segundo processo utiliza, como substrato, os produtos finais originados por meio de *dark fermentation*, nomeadamente, os ácidos gordos voláteis (AGV's) e, em certos casos, a fração de substrato que não foi consumida na reação.

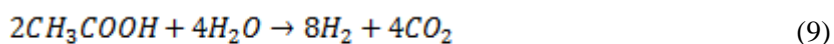
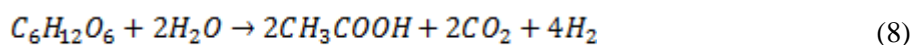
A aplicação de sistemas híbridos visa incrementar o rendimento global da produção de  $H_2$ , uma vez que a sinergia entre os processos permite uma maior utilização do substrato, por diminuição das limitações biológicas. Como referido anteriormente, alguns dos subprodutos da produção do  $H_2$  por *dark fermentation* são os ácidos gordos voláteis, os quais são nefastos para o meio ambiente. Assim, com vista ao tratamento do meio resultante da fermentação e ao aumento do rendimento global de produção, vários outros processos podem ser utilizados em sequência, com produção de mais  $H_2$  ou até de outros gases com valor energético, como o metano.

Entre vários processos, os três mais estudados até à data, que podem ser integrados com o processo de *dark fermentation* são a fotofermentação, as células de eletrólise microbiana (CEM), por fim, a digestão anaeróbia (Hallenbeck et al., 2012).

De seguida apresenta-se, de forma fundamentada, cada um desses processos integrados.

##### a) Processo de *dark fermentation* conjugado com um processo de fotofermentação

Neste sistema integrado, os ácidos orgânicos de baixo peso molecular produzidos por *dark fermentation* são, numa segunda fase, convertidos em mais  $H_2$ , por bactérias fotofermentativas, num fotobioreactor (Ghimire et al., 2015). A reação global do processo pode ser representada pelas equações 8 e 9.



O sucesso para a integração deste sistema reside, em parte, na composição do efluente resultante do processo de *dark fermentation*, especialmente no que se refere à presença de azoto. Dependendo da biomassa utilizada na 1ª etapa, esta pode conter elevados níveis de azoto que ao serem convertidos em amónia podem causar a inibição da atividade da enzima nitrogenase. Uma forma de reduzir ou eliminar esta limitação, já investigada por vários autores, consiste na diluição do efluente resultante do processo de *dark fermentation* (Guwy et al., 2011).

### b) Processo de *dark fermentation* conjugado com o processo de electrohídrolise

Neste processo integrado, os ácidos orgânicos de cadeia curta, produzidos durante a *dark fermentation* são convertidos em hidrogénio molecular, em células de eletrólise microbiana (CEM), também denominadas por reatores microbianos assistidos electroquimicamente. Uma CEM é basicamente uma célula de combustível microbiana modificada que permite a oxidação de compostos orgânicos simples, por bactérias, sob condições anaeróbias estabelecidas no ânodo (Fig. 2.7).

O seu funcionamento é semelhante ao de uma célula de combustível, em que os prótons são transferidos do ânodo para o cátodo, atravessando a membrana protónica. Os eletrões, por sua vez, criam um caminho alternativo pelo exterior da célula, originando-se corrente elétrica. No cátodo ocorre a combinação dos eletrões e dos prótons com a água. Para a formação de  $H_2$  é necessária a remoção do oxigénio, aplicando-se uma pequena voltagem que permita a redução do  $H_2O$  a  $H_2$  (Bičáková & Straka, 2012; Lee et al., 2010).

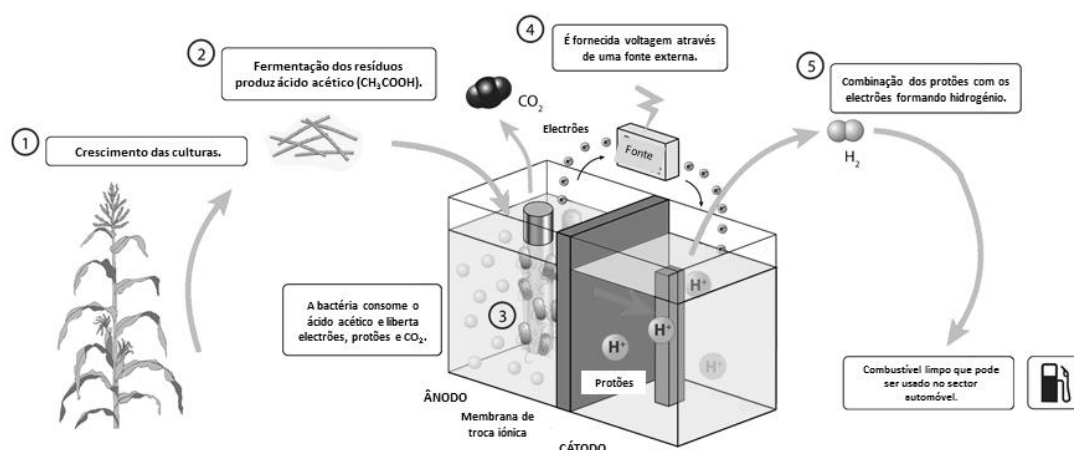


Fig. 2.7 - Representação esquemática do processo de *dark fermentation* agregado a um CEM (Adaptado de MSH Energy, 2015).

### c) Processo de *dark fermentation* conjugado com um processo de digestão anaeróbia

A metodologia aplicada neste sistema integrado, tal como nos anteriores, reside no aproveitamento dos AGV's presentes no efluente resultante do processo de *dark fermentation* (fase da acidogénese), como substrato, para a 2ª etapa que corresponde, neste caso, à digestão anaeróbia (fase da metanogénese). A conjugação destes dois processos proporciona uma eficiência global superior pelo facto da otimização de cada fase ocorrer separadamente, havendo, simultaneamente, uma redução da carência química de oxigénio (CQO) e do conteúdo em sólidos do efluente. Para além destes benefícios, a combinação do biohidrogénio e do biometano origina um combustível com propriedades superiores a nível de combustão mas cujas emissões de gases poluentes são bastante inferiores (Guwy et al., 2011).

Com vista a uma melhor perceção do funcionamento deste sistema integrado, segue-se uma pequena explicação do conceito de digestão anaeróbia e de alguns dos parâmetros relevantes para a sua realização.

#### ✓ Digestão anaeróbia

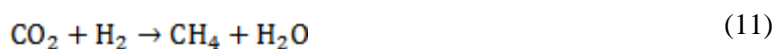
O processo de digestão anaeróbia corresponde à degradação biológica de matéria orgânica levada a cabo por um consórcio de microrganismos, na ausência de oxigénio. Esta reação leva à produção de um biogás, constituído essencialmente por metano e dióxido de carbono. Trata-se de uma tecnologia bastante eficiente no tratamento de lixo e de águas residuais, permitindo uma redução significativa da poluição orgânica associada a zonas habitacionais, à indústria e à agricultura. Porém, a pouca estabilidade em termos operacionais, constitui um grande obstáculo para a sua comercialização (J. L. Chen et al., 2014; Y. Chen et al., 2008).

No caso dos processos de tratamento de águas residuais, por exemplo, são originadas grandes quantidades de lamas que acarretam custos bastante elevados quando se opta pela sua deposição ou incineração. A aplicação da digestão anaeróbia é, portanto, uma abordagem bastante apelativa dado que, para além de reduzir o volume de lamas, ainda possibilita a produção de biogás, reduzindo significativamente os custos de todo o processo de tratamento (Madsen et. al, 2011).

#### ✓ Biodegradação anaeróbia

A digestão anaeróbia pode ser decomposta em 4 etapas fundamentais (J. L. Chen et al., 2014; Madsen et al., 2011):

- **Hidrólise:** Fase em que ocorre a degradação dos compostos orgânicos complexos (proteínas, glícidos, lípidos), presentes no efluente, em moléculas mais simples (açúcares, ácidos gordos ou aminoácidos), que serão utilizadas como fonte de energia e de carbono. A reação é catalisada por enzimas hidrolíticas extracelulares (celulases, proteases e lípases), segregadas para o meio pelos diferentes microrganismos existentes.
- **Fermentação:** Esta etapa da digestão anaeróbia é composta por duas fases intermédias, nomeadamente, a acidogénese e a acetogénese. Na **acidogénese**, os produtos precedentes da hidrólise são convertidos no interior das células bacterianas em compostos como os ácidos orgânicos (o acético, o propiónico, o láctico, o butírico e o succínico), os álcoois, as cetonas (o etanol, o metanol, etc.), e o acetato; e em intermediários inorgânicos como o dióxido de carbono, o hidrogénio, o ião amónio (azoto amoniacal), etc. Na **acetogénese**, por sua vez, ocorre a oxidação anaeróbia levada a cabo por bactérias acetogénicas, transformando os produtos anteriores em ácido acético, hidrogénio e dióxido de carbono.
- **Metanogénese:** As bactérias metanogénicas são as responsáveis pela última etapa da digestão anaeróbia, convertendo os compostos resultantes da fermentação em metano, sob condições estritamente anaeróbias. A metanogénese pode ser diferenciada em metanogénese acetotrófica, que corresponde à reação de conversão do ácido acético em metano, e metanogénese hidrotrófica, onde o metano é originado através da conversão do dióxido de carbono e do hidrogénio (Equações 10 e 11). O biogás formado é essencialmente composto por cerca de 50-75% de metano e 25-50% de dióxido de carbono (Alonso, 2014).



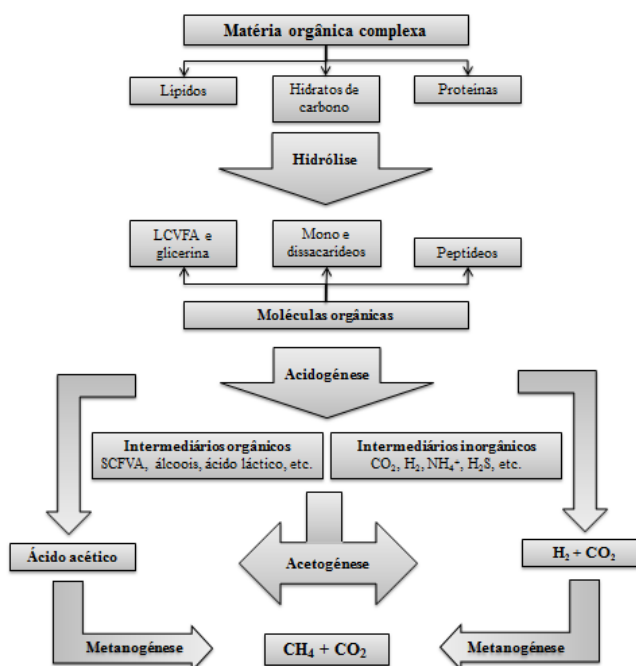


Fig. 2.8 - Representação esquemática das diferentes fases do processo de digestão anaeróbia. (Adaptado de J. L. Chen et al., 2014; Madsen et al., 2011).

### ✓ Parâmetros de influência

Existem determinados parâmetros cuja análise é fundamental para que o processo decorra no sentido de promover a produção de biometano. Entre os mais relevantes encontram-se:

- **Temperatura:** A digestão anaeróbia pode realizada sob condições psicrofílicas ( $< 20^{\circ}\text{C}$ ), mesófilas ( $25\text{-}40^{\circ}\text{C}$ ) e termófilas ( $50\text{-}65^{\circ}\text{C}$ ) (J. L. Chen et al., 2014). As temperaturas mesófilas são de utilização mais comum mas de uma digestão termófila advêm certos benefícios, como uma velocidade de degradação mais elevada, produtividades mais elevadas, uma destruição mais completa dos agentes patogénicos (de natureza viral ou bacteriana) e uma maior estabilização dos resíduos (Y. Chen et al., 2008). Contudo, a operação de um digester a temperaturas mais elevadas requer uma maior quantidade de energia, o que constitui uma limitação para a utilização desta gama de temperaturas (Mao et al., 2015).
- **pH:** O crescimento dos microrganismos, assim como o decorrer da reação e a composição do efluente resultante, são afetados por uma alteração deste parâmetro. Segundo diversos estudos, a digestão anaeróbia mostrou-se mais eficiente quando o pH estava definido entre 6,8 e 7,4. No caso particular da metanogénese constatou-se que a reação deveria ocorrer com o pH de acordo com o intervalo 6,5-8,2, sendo que 7 foi o valor considerado como ótimo (Mao et al., 2015).
- **Substâncias inibidoras:** Geralmente, a principal razão para que o processo de digestão não decorra como previsto reside na presença de substâncias inibidoras. Estas substâncias são bastante vulgares na composição das águas residuais e das lamas. Um composto é definido como inibidor quando é responsável por uma mudança na população microbiana ou quando interfere com o crescimento microbiano, impedindo-o. Os indicadores para a presença de uma substância inibidora referem-se à diminuição da produção de metano e a respetiva acumulação de ácidos orgânicos. De destacar que algumas das substâncias caracterizadas como inibidoras referem-se: à amónia, ao sulfureto, aos iões metálicos leves (Na, K, Mg, Ca e Al), aos metais pesados (cobre, zinco, ferro, níquel, etc.) e aos compostos orgânicos (éteres, ácidos gordos de cadeia longa, etc.) (Y. Chen et al., 2008).

## 2.3 Aplicações

Tendo em conta as propriedades químicas do  $H_2$  existe um extenso leque de aplicações a ele associadas, sendo que 95% do  $H_2$  produzido mundialmente é utilizado para fins não energéticos. A utilização do  $H_2$  está relacionada, por exemplo, à conversão de óleo líquido em margarina, à fabricação de fertilizantes, à indústria petrolífera, tanto na refinação do próprio petróleo como no processamento dos seus derivados, e à produção de ferro e aço. Porém, o maior consumidor de  $H_2$ , a nível mundial, é representado pela indústria produtora de amónia, apresentando um consumo de cerca 62,4% (Bhandari et al., 2013; Estevão, 2008). A NASA também recorre ao  $H_2$  para os seus projetos espaciais a nível de propulsão de foguetes, com a sua utilização a ter sido iniciada em 1963. A aplicação deste combustível reside no facto do seu poder calorífico ser superior ao dos combustíveis mais comuns (cerca de 119,96 MJ/kg), o que possibilita um maior armazenamento de energia. Para além desta particularidade, o seu impulso específico ( $I_{sp}$ ) é igualmente superior (cerca de 450 segundos), derivado do seu baixo peso molecular. Na prática, esta característica possibilita uma poupança a nível de consumo de combustível e, portanto, uma redução dos custos globais do processo (Cecere et al., 2014; Frischauf et al., 2013).

O metano, por sua vez, possui características muito semelhantes ao gás natural e, como tal, pode ser utilizado nas mesmas aplicações, nomeadamente, na indústria química, na produção de calor e em centrais de cogeração, com produção simultânea de energia e calor (Bioenergy, 2014).

Dado que, atualmente, um dos sectores que mais contribui para as emissões de compostos poluentes é o sector automóvel, as aplicações do  $H_2$  e  $CH_4$  nesta área são as que apresentam um maior destaque. Perante as diversas aplicações, a célula de combustível e o motor de combustão interna originam um maior interesse a nível de resultados futuros, como se verificará em seguida.

### 2.3.1 Células de combustível

As células de combustível são uma aplicação revolucionária que proporciona a produção de energia ao converter diretamente a energia química de um determinado combustível em eletricidade. As células de combustível não armazenam energia e não consomem combustível durante a reação, ou seja, realizam a decomposição do combustível e não a sua combustão, o que se traduz num processo mais eficiente e sem libertação de compostos poluentes.

Existem diversos tipos de células de combustível, classificadas, geralmente, de acordo com o tipo de combustível utilizado, com a constituição das membranas e com a respetiva temperatura de operação. A distinção entre elas é realizada através do material de composição do eletrólito, nomeadamente: células de combustível alcalina; células de combustível com membrana de permuta protónica, que podem ser alimentadas a hidrogénio ou a metanol; células de combustível de ácido fosfórico; células de combustível de carbonato fundido; e células de combustível de óxido sólido (Nunes, 2010).

Atualmente, a célula considerada como mais promissora é a “*polymer electrolyte membrane (PEM)*”- célula de combustível com membrana de permuta protónica - cuja eficiência encontra-se na ordem dos 40%. Comparativamente às mencionadas anteriormente, as PEM apresentam valores de densidade de corrente mais elevados permitindo que a nível estrutural sejam mais compactas e leves. O facto de a temperatura de operação destas células ser inferior a 100°C constitui outra grande vantagem, proporcionando um arranque rápido e, consequentemente, um desempenho mais elevado. Para além destas características, ainda apresentam uma alta durabilidade e um nível de ruído baixo. Este conjunto de particularidades permite que as PEM sejam bastante atrativas, tornando-as as melhores candidatas ao abastecimento de energia no sector automóvel e em aplicações móveis ou de pequena escala (residenciais) (Alves et al., 2013; Nunes, 2010).

No caso específico de uma PEM contendo  $H_2$ , como combustível, essa é constituída por uma membrana eletrolítica posicionada entre o eletrodo positivo (cátodo), onde se procede à introdução do

oxigénio, e o eléctrodo negativo (ânodo), onde é inserido o hidrogénio, possuindo placas bipolares e catalisadores de ambos os lados.

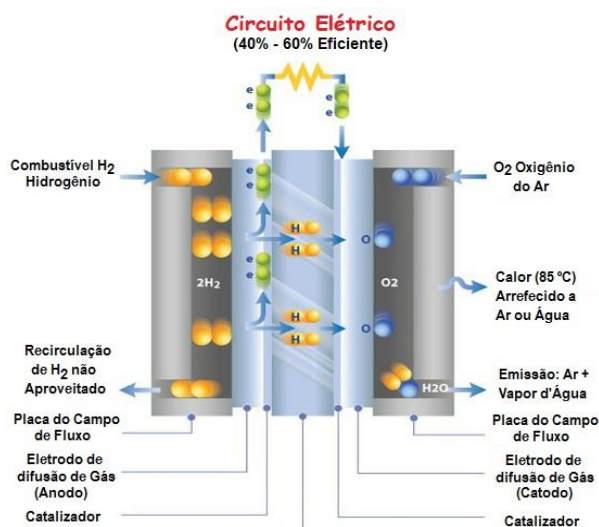


Fig. 2.9 - Representação esquemática do funcionamento de uma PEM (Sem et al., 2013).

O seu funcionamento é iniciado pela introdução de um fluxo de átomos de hidrogénio no ânodo seguido da sua oxidação. O catalisador de platina é o responsável por promover a separação da molécula de hidrogénio em dois prótons e dois eletrões. Para que o funcionamento da PEM seja efetuado com sucesso a membrana só deve permitir a condução de iões e não de protões, evitando assim a existência de curto-circuitos. Por este facto, o transporte dos eletrões recém-formados para o cátodo é realizado através de um circuito externo, o que leva à formação de uma corrente elétrica. Segue-se a introdução do oxigénio no cátodo, extraído geralmente do ar exterior, para efeitos de arrefecimento da célula. Por fim, os prótons que chegam ao cátodo combinam-se, simultaneamente, com os eletrões que retornam do circuito elétrico e com os átomos de oxigénio fornecidos ao cátodo, formando água que é libertada na forma de vapor (Nunes, 2010).

Abordando especificamente a combinação de processos biológicos com as células de combustível, trata-se de facto de um conceito ainda recente, com a investigação direcionada para a produção de  $H_2$  com recurso tanto a bactérias como a algas. No caso particular das bactérias, estudos envolvendo as estirpes *Rhodobacter sphaeroides*, *Rhodobacter capsulatus* e *Enterobacter asburiae*, foram desenvolvidos com vista à produção de eletricidade a partir de uma PEM. O maior obstáculo deste sistema reside no elevado grau de pureza em  $H_2$  exigido por esta tecnologia, algo que não é verificado no gás originado por processos biológicos. A presença de  $CO_2$  interfere com o desempenho da célula, atuando como um composto contaminante. É necessário, portanto, um processo prévio de purificação para que o biogás aumente o seu grau de pureza e, assim, possa ser utilizado pela célula de forma eficaz (Oncel & Vardar-Sukan, 2011).

Em relação ao metano, este gás não pode ser utilizado diretamente em nenhuma das células de combustível mencionadas. Contudo, há a possibilidade de converter este gás noutros compostos que já podem servir este propósito. Um exemplo disso é a conversão do metano em metanol através de uma reação de oxidação parcial. Neste contexto, as células de combustível de metanol direto já seriam uma opção viável (Queirós, 2009).

De realçar que, quando se pretende implementar as células de combustível no sector automóvel (Fig. 2.10), é fulcral a combinação destas em série, com vista a produzirem energia elétrica suficiente para alimentar o motor de um determinado automóvel. Este conjunto de células denomina-se *Fuel Cell Stack*, isto é, pilha de células de combustível (Nunes, 2010).

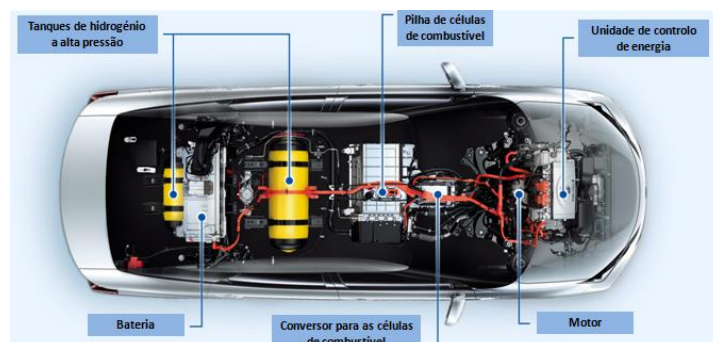


Fig. 2.10 - Modelo esquemático de um veículo cuja fonte de energia é uma pilha de células de combustível (Adaptado de "Toyota Global Site | Fuel Cell Vehicle," 2015).

### 2.3.2 Motor de combustão interna (MCI)

Os motores de combustão interna alimentados a  $H_2$  também constituem uma inovação no sector automóvel. Este tipo de motores apresenta a mesma configuração dos motores tradicionais mas com a particularidade de utilizarem o  $H_2$  líquido como combustível, com benefícios ambientais bastante significativos dado que as emissões de GEE são praticamente nulas. Contudo, o processo de combustão só funcionará com sucesso se toda a estrutura do motor estiver adequada às várias propriedades do  $H_2$  (Cipriani et al., 2014).

A aposta nos motores de combustão interna prende-se ao facto de pertencerem a uma indústria completamente desenvolvida e com inúmeras infraestruturas de produção, minimizando as dificuldades associadas à implementação do  $H_2$  como combustível. Estabelecendo uma comparação com as células de combustível constata-se que o nível de pureza exigido em relação ao  $H_2$  utilizado é bastante menor, influenciando positivamente o custo do próprio combustível. Outra vantagem que deve ser realçada é o facto de esta tecnologia não estar dependente de materiais raros, não causando qualquer tipo de limitações para o seu fabrico (Verhelst, 2014). A Tabela 2.2 especifica algumas das propriedades de combustão do hidrogénio comparativamente ao metano e aos outros combustíveis convencionais.

Tabela 2.2 - Comparação das diversas propriedades de combustão do hidrogénio em relação a outros combustíveis (Adaptado de Najjar, 2013).

Combustível	Poder calorífico inferior (MJ/kg)	Poder calorífico superior (MJ/kg)	Relação estequiométrica ar/combustível (kg)	Limites de inflamabilidade (%)	Temperatura da chama °C	Energia mínima de ignição (MJ)	Temperatura de auto-ignição °C
Metano	50,0	55,5	17,2	5-15	1914	0,30	54-630
Hidrogénio	119,9	141,6	34,3	6,7-36,0	2207	0,017	585
Gasolina	44,5	47,3	14,6	1,3-7,1	2307	0,29	260-460
Gasóleo	42,5	44,8	14,5	0,6-5,5	2327	-	180-320

Uma das marcas que mais apostou nesta tecnologia foi a BMW, apresentando automóveis equipados com protótipos híbridos, ou seja, cujo motor é alimentado com dois combustíveis. O modelo Hydrogen 7, criado em 2006, é um exemplo de um veículo com estas características, contendo um motor capaz de realizar a combustão tanto da gasolina como do  $H_2$ . Com o mercado do  $H_2$  a dar os primeiros passos, os postos de abastecimento são bastante escassos levando a que a abordagem mais inteligente passe por este tipo de motores (BMW, 2006).

O problema principal associado ao  $H_2$  como combustível reside na segurança, tanto a nível de instalações industriais, como a nível do sector automóvel ou habitacional. Os acidentes ocorridos Houston (1989) e Frankfurt (1991), que causaram grandes custos económicos e sociais, contribuíram para que a popularidade deste elemento, enquanto combustível, sofresse um decréscimo acentuado (Najjar, 2013).

A produção, o armazenamento, o transporte e a distribuição deste combustível devem ser assim realizados com o máximo de cuidado e de acordo com as vastas propriedades por ele apresentadas (Najjar, 2013). A inflamabilidade, por exemplo, é uma das propriedades a ter em conta. A inflamabilidade de um determinado combustível dita a proporção ar/combustível em que a mistura é inflamável, encontrando-se num intervalo delimitado pelo limite superior e inferior de inflamabilidade. No caso do  $H_2$ , este torna-se inflamável entre os 4 e os 75%, um intervalo bastante extenso comparativamente aos outros combustíveis. Esta característica associada à rápida velocidade de combustão do hidrogénio e à sua baixa energia de ignição aumentam a instabilidade deste elemento enquanto combustível, possibilitando a ocorrência de uma combustão anormal, nomeadamente, pré-ignição, *backfire* e *knock* (Fayaz et al., 2012).

Também o biometano já se encontra implementado em motores de combustão interna, com uma utilização bastante significativa a nível europeu. De facto, no final de 2013, o biometano já se encontrava disponível, enquanto combustível para o sector automóvel, em 13 países europeus. Isto deve-se, em parte, ao facto de as infraestruturas de transmissão, armazenamento e distribuição, referentes à rede de gás natural também se demonstrarem adequadas ao abastecimento de biometano. Nos locais onde se verifica a inexistência de um sistema implementado, o biometano pode ser transportado em *pipelines* locais ou através de garrafas pressurizadas em camiões. A liquefação do metano também surge como uma alternativa dado que incrementa a sua densidade energética e simplifica o seu transporte. Porém, nestas condições o seu armazenamento só é possível durante alguns dias, sob o risco de se iniciar a sua evaporação (Åhman, 2010; IEA Bioenergy, 2014).

Porém, a produção de metano por métodos biológicos não possibilita o seu uso direto em MCI. A presença de determinadas substâncias corrosivas na sua composição pode causar danos significativos no motor. Para que cumpra as especificações estipuladas que possibilitem a sua introdução nas *pipelines* e, posteriormente, nos MCI, o biogás deve ser desumidificado, limpo e sujeito a um processo de upgrade. Isto significa que o  $CO_2$  presente no biogás é removido com vista a aumentar a concentração de metano (<97%) e, consequentemente, a sua densidade energética. (Åhman, 2010; Bordelanne et al., 2011).

### 3. Materiais e Métodos

Com base nos objetivos deste estudo realizaram-se, de forma sequencial e integrada, ensaios de produção de  $\text{bioH}_2$  e de  $\text{bioCH}_4$  por fermentação anaeróbia no escuro (*dark fermentation*) e Digestão Anaeróbia (DA), respetivamente.

De seguida, apresentam-se todos os materiais, equipamentos e metodologias utilizados para levar a cabo cada um dos processos.

#### 3.1 Materiais

##### 3.1.1 *Dark fermentation* (produção de $\text{bioH}_2$ )

###### 3.1.1.1 Microrganismo

Nesta primeira fase do processo integrado, utilizou-se como microrganismo fermentativo uma estirpe da bactéria anaeróbia facultativa *Enterobacter aerogenes* (ATCC 13048 *Sputum*). A sua conservação e manutenção em laboratório foram realizadas em tubos de ensaio contendo um meio de repicagem sólido inclinado (*slant*). O meio de manutenção da bactéria foi preparado por dissolução, a quente, da mistura caso-Agar (Merck) em água *Millipore*, numa concentração de 40 g/L.

No decorrer do trabalho, as culturas foram mantidas a 4°C e repicadas, sempre antes de se proceder a um novo ensaio.

###### 3.1.1.2 Meio de crescimento

O crescimento das bactérias fermentativas foi realizado antes de cada ensaio, num meio líquido (Tabela 3.1) em condições de agitação orbital de ~150 rpm e a diferentes temperaturas operacionais (30°C, 35°C e 37°C), com o intuito de avaliar o seu efeito sobre o crescimento da cultura. Ao longo da dissertação, a designação atribuída a esta cultura será de pré-inóculo (PI).

Tabela 3.1 - Composição do meio de crescimento da bactéria *Enterobacter aerogenes*.

Reagentes	Concentração (g/L)	Pureza (%)	Marca
Peptona	20	-	Panreac
NaCl	5	99,5	Absolve

###### 3.1.1.3 Meio de fermentação (MF)

A produção de  $\text{bioH}_2$  foi propiciada pela adição de um determinado volume de PI ao meio líquido complexo (Tabela 3.2) ao qual, em cada ensaio, foi também adicionado o substrato (glicerina semi-refinada proveniente de uma Indústria Portuguesa de produção de biodiesel). A composição do meio complexo foi estudada e aplicada por outros autores, para a mesma bactéria e com o mesmo propósito, ou seja, a produção de  $\text{bioH}_2$  (Ito et al., 2005).

Tabela 3.2 - Composição do meio de fermentação complexo utilizado para produção de  $\text{bioH}_2$  por *dark fermentation*.

Reagentes	Concentração (g/L)	Grau de Pureza (%)	Marca
$\text{K}_2\text{HPO}_4$	7,0	99	Panreac
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	5,5	99	Panreac
Extrato de levedura	5,0	-	Difco laboratories
Tryptona	5,0	-	Becton, Dickinson and Company
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	1,0	99	Riedel-de Haën
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,25	99,5	MERCK
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,12	97	MERCK
$\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0,021	99	Riedel-de Haën
Ácido Nicotínico	0,002	98	MERCK
$\text{Na}_2\text{SeO}_3$	0,000172	99,5	Riedel-de Haën
$\text{NiCl}_2$	0,00002	98	MERCK
$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0,5	99	Riedel-de Haën
$\text{H}_3\text{BO}_3$	0,1	99,8	MERCK
$\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,5	99	Panreac
$\text{AlK}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$	0,01	99	MERCK
$\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,01	-	MERCK

### 3.1.1.4 Reagentes

Os reagentes utilizados para caracterização da glicerina semi-refinada, do meio de fermentação - contendo ou não o substrato - e dos meios fermentados, resultantes do processo de *dark fermentation*, após centrifugação ( $T=4^\circ\text{C}$ , 10000 rpm,  $t=10$  min), encontram-se representados na Tabela 3.3.

Tabela 3.3 – Reagentes utilizados na análise da glicerina semi-refinada, do meio de fermentação - contendo ou não o substrato - e dos meio fermentados.

Reagente	Grau de Pureza (%)	Marca
$\text{AgSO}_4$	99,5	Panreac
$\text{H}_2\text{SO}_4$	96	CARLO ERBA
$\text{FeSO}_4 \cdot (\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	99	Riedel-de Haën
$\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$	99,5	Panreac
Fenantrolina	99,5	MERCK
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	99	Riedel-de Haën
$\text{K}_2\text{SO}_4$	99	Panreac
$\text{HgO}$	99	MERCK
$\text{NaOH}$	98	Absolve
Fenolftaleína	-	Panreac
$\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	99,5	MERC
$\text{EtOH}$	99,8	Panreac
Vermelho de metilo	-	Panreac
Azul de metileno	-	Panreac
$\text{H}_3\text{BO}_3$	99,8	MERCK
$\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$	99,5	Ricolel

### 3.1.1.5 Substrato

A produção de  $\text{bioH}_2$  foi levada a cabo utilizando, como substrato, glicerina semi-refinada com um conteúdo em glicerol de 84% (m/m).

Em todos os ensaios, a adição da glicerina semi-refinada ao meio de fermentação foi realizada sem autoclavagem prévia.

### 3.1.1.6 Equipamento

Os equipamentos que possibilitaram a realização do trabalho laboratorial referente à produção de  $\text{bioH}_2$  foram os seguintes:

- Autoclave UNICLAVE, modelo 88 AJC;
- Balança analítica de bancada Metter Toledo, modelo AB204-S;
- Balança de bancada KERN, modelo 572;
- Balança de bancada Metter, modelo PC 4000;
- Centrífuga Heraeus, modelo MULTIFUGE 3SR;
- Cromatógrafo (HPLC) Agilente, série 1100;
- Cromatógrafo gasoso Varian, modelo 430-GC;
- Digestor BLOC DIGEST, modelo 20;
- Digestor BUCHI, modelo K-424;
- Espectrofotómetro de varrimento UV-Visível HITACHI, modelo U2000;
- Estufa Heraeus, modelo T5028;
- Hotte Cruma, modelo Captair;
- HPLC Agilent série 1100;
- Incubadora orbital NEW BRUNSWICK SCIENTIFIC;
- Máquina de destilação BUCHI, modelo K-350;
- Medidor de pH WTW, modelo 720;
- Mufla Heraeus;
- Placa de agitação MULTIMATIC, modelo 9N;
- Termostato de imersão Termotronic 3000389

### 3.1.1.7 Montagem experimental

A produção biológica de  $\text{H}_2$  (primeira etapa do processo integrado) ocorreu num banho termostático com temperatura controlada a  $37^\circ\text{C}$  e agitação magnética ( $\sim 150$  rpm).

O processo foi desenvolvido em reatores ( $V_{\text{Total}} = 549,5$  mL) ligados a colunas de *Mariotte* (com capacidade de 500 mL), para determinação do volume de Biogás-DF ( $\text{H}_2 + \text{CO}_2$ ) produzido ao longo do tempo. Durante a montagem procedeu-se ao isolamento do sistema em todos os locais onde poderia haver possibilidade de trocas gasosas, com braçadeiras e fita de alumínio apropriada para o efeito. O sistema descrito encontra-se representado na Fig. 3.1.



Fig. 3.1 – Montagem experimental para produção de  $\text{bioH}_2$  por *Dark Fermentation* (DF).

### 3.1.2 Digestão Anaeróbia (produção de $\text{bioCH}_4$ )

#### 3.1.2.1 Consórcio

Os ensaios de Digestão Anaeróbia (DA) foram realizados utilizando, como inóculo, um consórcio de bactérias fermentativas mesofílicas recolhido num digestor primário da ETAR de Beirolas, situada no Parque das Nações. As lamas que alimentam a digestão são mistas, ou seja originadas pela mistura de lamas primárias, originadas pela decantação primária, com as lamas secundárias, resultantes do tratamento biológico ou secundário.

Após recolha, o inóculo foi mantido numa estufa com temperatura controlada a  $35^\circ\text{C}$ , após remover todo o oxigénio eventualmente presente por meio de injeção de azoto, durante um período de 5 minutos.

#### 3.1.2.2 Reagentes

Os reagentes utilizados para a caracterização do meio fermentado do processo de *dark fermentation* (substrato), do consórcio de bactérias (inóculo) e do efluente resultante do processo de DA são iguais aos apresentados na Tabela 3.3.

#### 3.1.2.3 Substrato

Para a produção de  $\text{bioCH}_4$  foi utilizado, como substrato, o meio de fermentação resultante do processo de *dark fermentation*, após centrifugação ( $T=4^\circ\text{C}$ , 10000 rpm,  $t=10$  min).

#### 3.1.2.4 Equipamento

Com a exceção do Espectrofotómetro de varrimento UV-Visível HITACHI e da Incubadora orbital NEW BRUNSWICK SCIENTIFIC, todos os equipamentos listados na secção 3.1.1.6 foram utilizados na prática laboratorial associada ao processo de produção de  $\text{bioCH}_4$ .

### 3.1.2.5 Montagem experimental

As condições operacionais e ambientais que possibilitaram a produção de  $\text{bioCH}_4$ , por DA, foram semelhantes às utilizadas para o processo DF. Isto é, a montagem experimental inclui reatores ( $V_{\text{total}}=549,5 \text{ mL}$ ) ligados a tubos eudiómetros (com capacidade de 1000 mL) num banho com temperatura controlada a  $37^\circ\text{C}$ . A única alteração foi o tipo de agitação dos reatores que, no processo DA, foi manual (efetuada 2 vezes/dia). Pelos motivos já referidos, procedeu-se ao isolamento prévio do sistema em todos os locais que apresentavam a possibilidade de existência de trocas gasosas, através de braçadeiras, fita de alumínio e rolhas *rabattable* (Fig. 3.2).



Fig. 3.2 – Montagem experimental para produção de  $\text{bioCH}_4$  por Digestão Anaeróbia (DA).

## 3.2 Métodos

### 3.2.1 *Dark fermentation* (produção de $\text{bioH}_2$ )

#### 3.2.1.1 Obtenção das células de *Enterobacter aerogenes*

O crescimento das células de *Enterobacter aerogenes* em meio líquido (Tabela 3.1) teve como intuito alcançar dois propósitos distintos: a sua caracterização como cultura pura, em termos de perfil de crescimento e da relação entre a densidade ótica (D.O.) e o peso seco (p.s) correspondente em suspensão celular; e a obtenção do PI para inocular o meio de fermentação complexo (Tabela 3.2) contendo o substrato, e dar início ao processo de fermentação.

Antes da adição das células, ao meio de crescimento, esse foi esterilizado em autoclave ( $t=20$  minutos,  $T=120^\circ\text{C}$ ) com vista a preservar a cultura a inocular.

#### ✓ Determinação da curva de crescimento da bactéria e da relação p.s/D.O

Com o propósito de avaliar o efeito da temperatura sobre o perfil de crescimento da bactéria foram realizados ensaios em condições de  $T = 30, 35$  e  $37^\circ\text{C}$ .

Assim, para cada uma das temperaturas, inocularam-se 2 frascos *Erlenmeyer* de 1000 mL, contendo cada um 500 mL de meio de crescimento esterilizado com uma ansada de bactérias retirada de uma rampa de conservação, em condições de assepsia. Seguiu-se a incubação dos mesmos, sob agitação orbital de 150 rpm e a cada uma das temperaturas em estudo.

De um dos frascos *Erlenmeyer* foram retiradas amostras de suspensão celular, ao longo do tempo, para a leitura da sua D.O., a um comprimento de onda ( $\lambda$ ) de 640 nm. Este estudo permitiu acompanhar o crescimento da bactéria ao longo das diferentes fases de estado de crescimento da *E. aerogenes*, nomeadamente, o estado de fase de latência, exponencial e estacionário.

Em relação ao outro frasco *Erlenmeyer*, após incubação de 24 horas, nas condições de agitação e temperatura já referidas, procedeu-se à recolha da biomassa produzida, por centrifugação ( $T=4^{\circ}\text{C}$ , 10000 rpm e  $t=10$  min), seguida da sua ressuspensão num volume igual de água *Millipore* (solução *stock*). Este procedimento permitiu a determinação da reta D.O. vs p.s., de acordo com os procedimentos descritos na secção 3.3.1.

#### ✓ Obtenção do pré-inóculo (PI) para o processo de *dark fermentation*

O procedimento para a obtenção do PI consistiu na inoculação do meio de crescimento com células *E. aerogenes* seguido da sua incubação a  $T=30, 35$  e  $37^{\circ}\text{C}$ , sob agitação orbital de  $\sim 150\text{rpm}$ . O perfil da curva de crescimento da bactéria, determinado previamente, foi útil nesta fase para determinar o número de horas de incubação necessário, até a fase exponencial de crescimento da bactéria ser atingida, pois é nesta fase que a bactéria se encontra no seu melhor estado de viabilidade.

Desta forma, em todos os ensaios realizados, a recolha do PI para inocular o meio de fermentação ocorreu durante a fase exponencial de crescimento das bactérias (cerca de 15h). De acordo com a concentração de biomassa pretendida, recolheu-se um determinado volume de suspensão celular (PI) correspondente a 1 ou 10% do volume de fase líquida, do reator.

Independentemente da temperatura à qual o PI foi obtido, a inoculação ocorreu sempre segundo o mesmo procedimento, isto é, numa *hotte* com aspiração, em condições de assepsia e mantendo-se a fase líquida sob borbulhamento com azoto, durante cerca de 2 min, para se estabelecer uma atmosfera anaeróbia.

#### 3.2.1.2 Caracterização do substrato

A caracterização química da glicerina semi-refinada foi efetuada por avaliação de parâmetros como o seu conteúdo em cinzas, água, glicerol e MONG (material orgânico não glicerol) de acordo com as normas europeias, NP 1688, NF EN ISO 12937, AOCS Ea 6-5,1 e NFT 60-368, respetivamente. O substrato foi caracterizado, igualmente, em termos do seu teor em matéria orgânica e inorgânica oxidável (Carência química de oxigénio – CQO) de acordo com as normas descritas no *Standart Methods for the Examination of Water and Wastewater* (A.P.H Association et al.,1999).

#### 3.2.1.3 Produção de biohidrogénio

Os ensaios de produção de  $\text{bioH}_2$  foram desenvolvidos em reatores ligados a colunas de *Mariotte* contendo um líquido corado ( $\text{NaCl}$  20 % v/v, 2-3 gotas de  $\text{HCl}$  comercial e alaranjando de metilo). De acordo com os objetivos a atingir, as experiências ocorreram em condições físico-químicas diferentes. Contudo, mantiveram-se as condições operacionais referentes à temperatura de incubação ( $37^{\circ}\text{C}$ , em banho termostático) e à agitação magnética ( $\sim 150\text{rpm}$ ). Em relação à inoculação do meio de fermentação contendo o substrato, esta foi sempre efetuada de acordo com a metodologia descrita na secção 3.2.1.1.

Em cada ensaio, contabilizou-se o volume da fase gasosa produzida (biogás-DF,  $\text{H}_2+\text{CO}_2$ ) ao longo do tempo, pelo volume de líquido corado deslocado no interior da coluna de *Mariotte*. Contudo, tendo em conta a montagem experimental (secção 3.1.1.7), o volume total de fase gasosa produzida foi calculado pelo somatório entre o volume de líquido deslocado na coluna de *Mariotte* até estabilização (*tempo de equilíbrio do processo*), o volume da *headspace* (HS) do reator e o volume dos restantes

espaços vazios do sistema. Este procedimento permitiu traçar o perfil de produção de  $\text{bioH}_2$  para as diferentes condições em que se realizou o processo fermentativo.

Adicionalmente procedeu-se à recolha de amostras de biogás-DF, ao longo do tempo, para análise do seu conteúdo em  $\text{H}_2$  ( $\text{bioH}_2$ ) e  $\text{CO}_2$  ( $\text{bioCO}_2$ ), por cromatografia gasosa (GC).

Em cada conjunto de ensaios introduziu-se um reator sem resíduos, nas mesmas condições operacionais, para controlo (ensaio em branco).

Após cada ensaio de DF a fase líquida resultante foi sempre centrifugada, para separação da biomassa e o meio centrifugado foi caracterizado em termos do seu teor em SV, ST, CQO, azoto total e azoto amoniacal, com vista a seleccionar o meio fermentado a utilizar como substrato no processo de DA (secção 3.3.3).

#### ✓ **Análise do efeito da concentração inicial de bactérias**

Para avaliação do efeito da concentração do inóculo bacteriano, sobre os rendimentos do processo fermentativo, foram levados a cabo ensaios com volumes diferentes de biomassa (PI) inoculada, correspondentes a concentrações iniciais de 1 e 10 % ( $V_{PI}/V_{MF}$ ). Para comparação de resultados, após inocular o meio de fermentação, todos os ensaios decorreram a uma  $T=37^\circ\text{C}$  e agitação magnética de  $\sim 150\text{rpm}$ .

#### ✓ **Análise do efeito da concentração inicial de substrato**

Com o intuito de avaliar o desempenho da bactéria em função da concentração inicial de substrato (glicerol contido em glicerina semi-refinada, proveniente de uma Indústria Portuguesa de produção de biodiesel), foram realizados ensaios partindo de três concentrações distintas de glicerol, nomeadamente, 10, 20 e  $30 \text{ g}_{\text{glicerol}}/\text{L}_{\text{MF}}$ .

Para comparação de resultados e associação de efeitos, este estudo foi realizado partindo de diferentes inoculações, 1 e 10% (v/v) de PI (como acima descrito).

Em cada ensaio, as concentrações iniciais e residuais de glicerol na fase líquida foram determinadas por Cromatografia Líquida (HPLC).

#### ✓ **Reutilização da bactérias fermentativa**

Este estudo teve por objetivo avaliar a possibilidade de reutilização da estirpe da bactéria *E. aerogenes* (ATCC 13048 *Sputum*), em sucessivas fermentações, cruzando o efeito do número de reutilizações do microrganismo sobre o seu desempenho para produzir  $\text{bioH}_2$ .

Assim, após um ensaio de produção de  $\text{bioH}_2$  a partir de uma concentração inicial de  $10 \text{ g}_{\text{glicerol}}/\text{L}_{\text{MF}}$ , em condições otimizadas, procedeu-se à recolha de toda a biomassa suspensa por centrifugação ( $T=4^\circ\text{C}$ ; 10000 rpm;  $t=10 \text{ min}$ ) em tubos previamente esterilizados, a qual foi de seguida ressuspensa num novo meio de fermentação (reinoculada; ver secção 3.2.1.1), esterilizado e contendo igual concentração inicial de substrato. O meio inoculado foi depois incubado nas condições descritas em 3.2.1.1.

Devido a problemas inesperados durante a fase de montagem, os quais conduziram à ocorrência de trocas gasosas, este ensaio teve de ser interrompido.

Dado o carácter preliminar deste estudo, e por esse não fazer parte dos objetivos iniciais do trabalho, optou-se por não repetir este ensaio.

### 3.2.1.4 Recolha e caracterização da fase gasosa

Em todos os ensaios de produção de bioH<sub>2</sub> recolheram-se amostras ao longo do tempo, no topo da coluna *Mariotte*, para determinação da composição em H<sub>2</sub> e CO<sub>2</sub> por GC. Para cada amostragem, o volume de bioH<sub>2</sub> recolhido foi sempre de 0,5 mL.

Simultaneamente, o bioH<sub>2</sub> produzido durante o processo foi sendo armazenado num saco adequado para recolha/armazenamento de gases de baixo peso molecular (SKC com a referência 245-05) para caracterização da mistura gasosa final (Fig. 3.3).



Fig. 3.3 – Recolha do bioH<sub>2</sub> produzido no processo de *dark fermentation*, para determinação da composição do biogás-DF ao longo do tempo (a) e armazenamento em sacos de recolha de gases de baixo peso molecular (b).

## 3.2.2 Digestão Anaeróbia (produção de bioCH<sub>4</sub>)

### 3.2.2.1 Caracterização do consórcio de bactérias (Inóculo)

O consórcio utilizado, neste trabalho, como inóculo para a produção de bioCH<sub>4</sub> por DA, foi caracterizado em termos do seu teor em Sólidos Totais (ST), Sólidos Voláteis (SV), Sólidos Suspensos Totais (SST), Sólidos Suspensos Voláteis (SSV) e Carência Química de Oxigénio (CQO), de acordo com as normas descritas no *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* (Secção 3.3.3) (A.P.H Association et al.,1999).

### 3.2.2.2 Conservação e inoculação do consórcio de bactérias (Inóculo)

O consórcio bacteriano utilizado como inóculo logo após recolha na ETAR, foi sujeito a um processo de desarejamento com azoto (5 min) e colocado numa estufa com uma temperatura controlada de 35°C, para preservação das suas características.

### 3.2.2.3 Caracterização do substrato

Nos ensaios de DA (segunda fase do processo integrado) utilizou-se como substrato o meio fermentado resultante da DF para o qual foi realizada uma caracterização segundo as normas descritas no *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* (Secção 3.3.3).

### 3.2.2.4 Produção de biometano

A produção de bioCH<sub>4</sub> foi realizada utilizando, como substrato, o meio de fermentação resultante do processo de *dark fermentation*, após devida centrifugação (T=4°C, 10000rpm, t=10min), de modo a proporcionar a separação das bactérias de *E. aerogenes*.

Os ensaios foram realizados em reatores ligados a colunas de *Mariotte* (ver secção 3.1.2.5), em regime mesófilo, num banho termostático com temperatura a 37°C. Ao longo da experiência foi aplicada uma agitação manual (efetuada 2 vezes/dia).

A adição do inóculo foi planeada de forma que, com base na caracterização química prévia do substrato e do inóculo, a razão  $CQO_{\text{substrato}}/SSV_{\text{inóculo}} \leq 1$ . Esta premissa foi estabelecida com base em normas que estabelecem as condições impostas para que a ocorrência de produção de biometano tenha viabilidade (INGENIEURE, 2006).

Após a mistura do consórcio com o substrato, antes de se iniciar a DA, foi medido o valor do pH para confirmar que encontrava no intervalo de 7 – 7.5.

Inicialmente, o ensaio foi montado em duplicado para que comprovar a veracidade dos resultados obtidos. Contudo, devido a problemas inesperados durante a fase inicial de produção, nomeadamente, a libertação de um tubo que conduziu a trocas gasosas indesejadas num dos reatores, o processo teve de ser interrompido. Os resultados alcançados estão associados, deste modo, a dois ensaios independentes, realizados a partir de uma mesma concentração de substrato e segundo as mesmas condições operacionais.

No final do processo, após 11 dias, o volume de biogás-DA produzido foi contabilizado segundo a metodologia mencionada na secção 3.2.1.3. Além disso, determinou-se também a sua composição por GC, por recolha de uma amostra do biogás ( $V_{\text{recolhido}}=0, 5\text{mL}$ ), no topo da coluna de *Mariotte*.

Na experiência realizada introduziu-se um reator sem substrato (ensaio em branco), nas mesmas condições operacionais, para no final se poder subtrair o biogás-DA produzido a partir da matéria orgânica presente no inóculo.

## 3.3 Métodos Analíticos

### 3.3.1 Determinação da reta peso seco (p.s.) vs densidade ótica (D.O.)

A estirpe bacteriana a utilizar como inóculo no processo de *dark fermentation*, foi previamente caracterizada em termos de correlação entre a D.O. de uma suspensão celular e o p.s. correspondente em  $g_{\text{biomassa seca}}/L_{\text{suspensão}}$ , para soluções com diferentes concentrações de bactérias.

Partindo da solução *stock*, obtida pelo procedimento descrito na secção 3.2.1.1, foram preparadas 6 diluições (1/2, 1/5, 1/10, 1/20, 1/40 e 1/50). Para cada uma das soluções foi feita a leitura da sua D.O. a um c.d.o. ( $\lambda$ ) de 640 nm e retirada uma amostra para ser filtrada para efeitos de determinação do peso seco correspondente.

De cada diluição retiraram-se 10 mL de suspensão celular e procedeu-se à sua filtração, sob vácuo. A biomassa retida foi depois lavada com igual volume de água *Millipore* e as membranas de acetato de celulose (porosidade e diâmetro de 0,45  $\mu\text{m}$  e 47 mm, respetivamente) colocadas na estufa a 80°C, durante 15 horas, para os devidos efeitos. Após pesagem das membranas com a biomassa seca efetuaram-se os cálculos para a determinação dos respetivos pesos secos (p.s.), segundo a equação 12:

$$p.s. (g_{\text{biomassa seca}}/L_{\text{suspensão}}) = \frac{P_f - P_i}{V} \quad (12)$$

Em que:

- ✓  $P_f$  corresponde ao peso da membrana contendo a biomassa seca (g).
- ✓  $P_i$  corresponde ao peso da membrana (g).
- ✓  $V$  corresponde ao volume de suspensão filtrada (V).

Os valores apresentados neste trabalho correspondem à média dos resultados obtidos para um triplicado, com um desvio padrão inferior a 10%.

### 3.3.2 Determinação da composição do biogás

No final de cada ensaio de DF e DA, recolheram-se amostras do biogás-DF ( $H_2+CO_2$ ) e do biogás-DA ( $CH_4+CO_2$ ), para determinação da sua composição, num cromatógrafo gasoso, com detetor de condutividade térmica TCD e uma coluna *Varian Select Permanent Gases/ CO<sub>2</sub> HR, Molecular Sieve 5 Å/Parabond O Tandem*. O gás de arrasto foi o hélio e as temperaturas definidas para o injetor e coluna foram de 80°C e para o detetor de 120°C.

A determinação da percentagem de cada um dos componentes foi realizada numa reta de calibração, construída previamente, utilizando padrões com concentração adequada de cada um dos gases, consoante a mistura a analisar.

### 3.3.3 Caracterização das fases líquidas

Em todos os ensaios de DF e de DA realizados, as fases líquidas de fermentação foram sempre caracterizadas quimicamente, antes e após os processos biológicos para determinação de parâmetros de influência e avaliação dos rendimentos.

No caso da produção de  $bioH_2$  (processo de DF), procedeu-se à determinação dos teores em ST SV, CQO e azoto total e amoniacal, de acordo com as normas descritas no *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* (A.P.H Association et al.,1999). Esta caracterização teve por base dois propósitos, nomeadamente, a avaliação do rendimento global e a seleção do meio fermentado a ser utilizado como substrato, para a produção de  $bioCH_4$ .

No que respeita à digestão anaeróbia (produção de  $bioCH_4$ ), além dos parâmetros mencionados acima procedeu-se também à determinação do teor em SST e SSV, seguindo a mesma fonte de normas. Neste caso, a caracterização química da fase líquida teve por objetivo avaliar não só o rendimento global de conversão do substrato em  $bioCH_4$ , como a redução da carga orgânica poluente (CQO) e do conteúdo em sólidos voláteis (SV e SSV), tendo em vista a possibilidade de descarga no ambiente de acordo com os VLE estabelecidos no Decreto-Lei nº236/98 (Anexo XVIII).

Na Fig. 3.4 encontram-se representados alguns dos equipamentos utilizados para análise dos parâmetros de influência referidos, nomeadamente, uma mufla (Fig. 3.4 a), para determinação do teor em ST, SV, SST e SSV, um aparelho de digestão (Fig. 3.4 b) para determinação do teor em CQO e, por fim, um aparelho de destilação (Fig. 3.4 c) para determinação do teor em azoto total e amoniacal.



Fig. 3.4 – Equipamentos utilizados na caracterização química das fases líquidas de ambos os processos: Mufla (a), Aparelho de Digestão (b) e Aparelho de Destilação (c).

### 3.3.3.1 Determinação do teor em Sólidos Totais (ST) e Sólidos Voláteis (SV)

A determinação dos ST foi efetuada com base na evaporação total da água contida na amostra até peso constante, numa estufa a 105°C durante 24 horas. O aumento de peso em relação ao cadinho vazio (que foi seco e pesado previamente) representa os sólidos totais na amostra (Equação 13).

Para a determinação do teor em SV (Equação 14), o resíduo resultante da secagem foi calcinado numa mufla a 550°C, até peso constante. Após calcinação e arrefecimento até à temperatura ambiente num exsiccador, os cadinhos contendo os resíduos foram pesados, para a determinação do seu teor em SV. Este parâmetro funciona como um indicador do conteúdo em matéria orgânica presente na amostra, pelo que a sua remoção ao longo de um processo biológico indica um bom desempenho dos microrganismos fermentativos (Álvarez, 2014).

$$ST \text{ (g/L)} = \frac{M_3 - M_1}{V} \times 1000 \quad (13)$$

$$SV \text{ (g/L)} = \frac{M_3 - M_4}{M_2} \times 1000 \quad (14)$$

Em que:

- $M_1$  corresponde ao peso do cadinho vazio (g).
- $M_2$  corresponde ao peso da amostra (g).
- $M_3$  corresponde ao peso do cadinho contendo a amostra, após a permanência na estufa (g).
- $M_4$  corresponde ao peso do cadinho contendo a amostra, após a permanência na mufla (g).
- $V$  corresponde ao volume de amostra introduzida no cadinho (mL).

### 3.3.3.2 Determinação da Carência Química de Oxigénio (CQO)

A carência química de oxigénio é um parâmetro utilizado para quantificar a matéria orgânica suscetível de ser oxidada quimicamente, numa dada amostra. O conhecimento deste parâmetro é fundamental para efeitos de descarga do efluente no ambiente, dado que valores fora da gama de

referência podem causar, por exemplo, a desoxigenação do meio recetor (Lemos, 2011; Miguel, 2012).

Para este efeito, o oxigénio equivalente à matéria orgânica é medido pela utilização de um agente oxidante químico forte como o dicromato de potássio ( $K_2Cr_2O_7$ ). A reação de oxidação ocorre em meio ácido e na presença de sulfato de prata, que atua como catalisador da mesma. Geralmente, para que este parâmetro possa ser avaliado com sucesso, é necessário efetuar uma diluição da amostra, algo que deve ser tido em conta na obtenção do valor final do CQO. O cálculo deste parâmetro foi realizado segundo a equação 15.

$$CQO \text{ (g/L, ppm)} = \frac{8000(V_0 - V_1) \times Tit}{V} \times 10^{-3} \quad (15)$$

Em que:

- $V_1$  corresponde ao volume da solução de sulfato de ferro e amónio utilizado na titulação da amostra (mL).
- $V_0$  corresponde ao volume da solução de sulfato de ferro e amónio utilizado na titulação do ensaio em branco (mL).
- Tit corresponde ao título da solução de sulfato de ferro e amónio (N).
- V corresponde ao volume de amostra diluída (mL).

### 3.3.3.3 Determinação do Azoto Total e Amoniacal

O azoto pode ser encontrado nos efluentes e resíduos sob várias formas, sendo diferenciado em azoto orgânico e azoto amoniacal que, em conjunto, formam o chamado azoto total. O conhecimento da quantidade de azoto orgânico presente numa dada amostra fornece a indicação sobre o teor de proteínas e, quando aplicado ao inóculo, pode ser utilizado para estimar a população microbiana presente. Para o desenvolvimento dos processos é necessário que exista uma quantidade mínima adequada de azoto no resíduo a biodegradar, sendo a razão C/N de 100:5, para os processos aeróbios e 300:1, para os anaeróbios em que existe menor crescimento bacteriano. Por outro lado o azoto em excesso pode ser tóxico para o processo anaeróbio, havendo limites recomendados. O azoto nos efluentes que descarregam em meio hídrico superficial é regulado pelos regulamentos para valores muito baixos: 15 mg/l (Decreto-Lei nº236/98) devido à possibilidade de eutrofização do meio recetor.

Na determinação do azoto total é efetuada, inicialmente, uma mineralização dos compostos orgânicos presentes na amostra, por ebulição, convertendo todo o azoto existente em sulfato de amónia. Para o efeito, recorre-se a uma solução composta por ácido sulfúrico, sulfato de potássio e óxido de mercúrio. Segue-se a fase de destilação, em presença de tiosulfato de sódio, cujo destilado, a amónia, é recolhido numa solução indicadora de ácido bórico e titulado com uma solução de ácido sulfúrico.

O azoto amoniacal, por sua vez, encontra-se presente no meio sob a forma de amoníaco ( $NH_3$ ) e de ião amónio ( $NH_4^+$ ), que constituem um equilíbrio tampão. O método utilizado para a determinação do azoto amoniacal baseia-se na destilação de um volume de amostra conhecido, contendo uma quantidade definida de solução de tampão borato e caracterizado por um pH de cerca de 9,5. A recolha do destilado e a sua titulação, tal como no caso anterior, realizam-se na presença de uma solução indicadora de ácido bórico e de uma solução de ácido sulfúrico, respetivamente.

Para a contabilização do azoto total e amoniacal, em cada ensaio, recorreu-se à equação 16:

$$\text{Azoto (g/L)} = \frac{(V_1 - V_0) \times N \times 14 \times 1000}{V} \times 10^{-3} \quad (16)$$

Em que:

- $V_1$  corresponde ao volume da solução de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  utilizado na titulação da amostra (mL).
- $V_0$  corresponde ao volume da solução de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  utilizado na titulação do ensaio em branco (mL).
- $N$  corresponde à normalidade da solução de  $\text{H}_2\text{SO}_4$
- $V$  corresponde ao volume de amostra utilizado (mL).
- O valor 14 corresponde ao peso do miliequivalente de azoto (mg).

De realçar que a normalidade da solução de ácido sulfúrico foi determinada através da equação 17:

$$N = \frac{M/53}{V} \quad (17)$$

Em que:

- $M$  corresponde ao peso da amostra de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  utilizado (g).
- $V$  corresponde ao volume de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  utilizado na padronização de  $M$ .
- O valor 53 corresponde ao peso do equivalente grama de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (g).

#### 3.3.3.4 Determinação do teor em Sólidos Suspensos Totais (SST) e em Sólidos Suspensos Voláteis (SSV)

O método adotado para a determinação destes parâmetros tem por base a filtração sob vácuo de um volume de amostra conhecido. A pesagem da fração de sólidos retida no filtro, após secagem na estufa a  $105^\circ\text{C}$ , possibilita o cálculo do valor dos SST. O resíduo resultante é ainda sujeito à incineração na mufla a  $550^\circ\text{C}$ , levando por subtração à obtenção do valor para os SSV. Este parâmetro é particularmente importante, servindo como indicador genérico da biomassa que se encontra no inóculo.

As equações 18 e 19 foram utilizadas no cálculo dos SST e SSV:

$$\text{SST (g/L)} = \frac{M_1 - T_1}{V} \times 1000 \quad (18)$$

$$\text{SSV(g/L)} = \frac{[(M_1 - T_1) - (M_2 - T_2)]}{V} \times 1000 \quad (19)$$

Em que:

- $M_1$  corresponde ao peso do cadinho contendo a amostra, após a permanência na estufa (g).

- $M_2$  corresponde ao peso do cadinho contendo a amostra, após a permanência na mufla (g).
- $T_1$  corresponde ao peso do cadinho contendo o filtro vazio, após a tara na estufa (g).
- $T_2$  corresponde ao peso do cadinho contendo o filtro vazio, após a tara na mufla (g).
- $V$  corresponde ao volume de amostra filtrado (mL).

### **3.3.4 Determinação do conteúdo em AGV's, glicerol, etanol e açúcares na fase líquida**

A caracterização da fase líquida em termos do seu teor em ácidos gordos voláteis (AGV's), glicerol, etanol e açúcares, foi levada a cabo com base em análises por cromatografia líquida num aparelho de HPLC Agilent série 1100 equipado com um injetor automático L7200, uma bomba L7100, um forno L7350, um detetor de índice de refração L7490 e uma coluna Aminex HPX87H. As análises decorreram a 50°C e as amostras foram eluídas com uma solução de  $H_2SO_4$  5 mM, filtrado (filtros *Supock 200 Pall Life Sciences* – polietersulfona hidrofílica - com 47 mm de diâmetro e 0,2  $\mu m$  de tamanho de poro), a um fluxo de 0,5 mL/min.

Esta caracterização foi realizada antes e após o processo de produção de  $bioH_2$ , ou seja, sobre o meio de fermentação autoclavado contendo, ou não, glicerina semi-refinada (substrato) e sobre o meio fermentado, a fim de avaliar as alterações ocorridas na sua composição, em termos de conteúdo em ácidos orgânicos (AGV's), açúcares, glicerol e etanol. A mesma análise foi efetuada para o efluente originado pelo processo de digestão anaeróbia.

Todas as amostras foram previamente centrifugadas e filtradas (filtros *Sartorius GmbH* – acetato de celulose – com 13 mm de diâmetro e 0,2  $\mu m$  de tamanho de poro), antes da sua injeção no HPLC.

## 4. Resultados e discussão

### 4.1 Dark Fermentation

#### 4.1.1 Obtenção das células de *Enterobacter aerogenes*

Inicialmente pretendeu-se estudar as melhores condições ambientais para crescimento, em meio líquido, da estirpe bacteriana a utilizar como microrganismo fermentativo neste trabalho.

Esta avaliação visou caracterizar o perfil de crescimento das células, tendo como foco não apenas os valores da D.O. atingidos, como a identificação da fase exponencial de produção da biomassa. Esta última corresponde ao período em que as células se encontram nas suas melhores condições de viabilidade, isto é, quando os seus mecanismos de transporte estão mais ativos, favorecendo a boa utilização de nutrientes e, portanto, o seu bom desempenho em processos biológicos. O conhecimento desta fase é de facto fundamental pois é nela que, a partir do PI, se deve proceder à recolha da biomassa a inocular para dar início a um processo fermentativo.

##### 4.1.1.1 Curva de crescimento da biomassa

No âmbito acima referido, realizaram-se ensaios para avaliação do efeito da temperatura de incubação ( $T_{inc}$ ) sobre o perfil de crescimento das células de *E. aerogenes*, tendo sido recolhidas amostras de suspensão celular, ao longo do tempo, e, simultaneamente, registada a variação da D.O. do meio, como descrito na secção 3.2.1.1. Foram avaliadas três temperaturas: 30, 35 e 37°C. A Fig. 4.1 apresenta as curvas de crescimento das bactérias para as temperaturas testadas.

A  $T_{inc}$  foi selecionada por ser um parâmetro físico-químico que, de algum modo, pode influenciar a produção laboratorial das células de *Enterobacter aerogenes*.

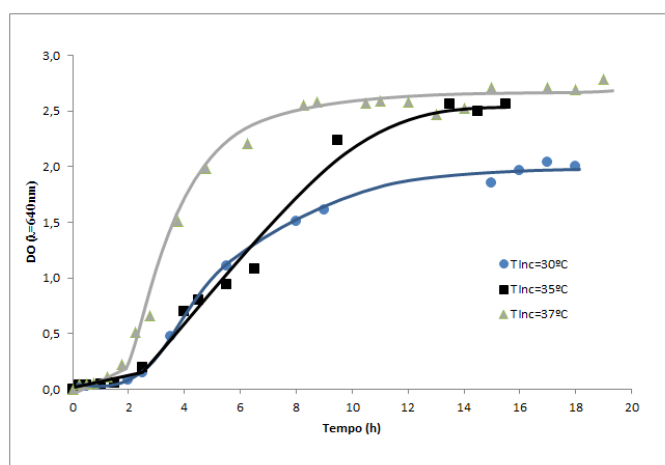


Fig. 4.1 - Curvas de crescimento das células *Enterobacter aerogenes*, em meio líquido, para três diferentes temperaturas de incubação, nomeadamente, 30, 35 e 37°C e agitação orbital de ~150 rpm.

Observando a figura, verifica-se claramente que, independentemente da  $T_{inc}$ , todas as curvas de crescimento seguem um perfil *sigmoidal*, constatando-se a presença de três fases distintas: fase de latência, fase exponencial e fase estacionária.

Em relação à influência da temperatura sobre o perfil de crescimento das bactérias, verifica-se que é na fase exponencial que as alterações são mais significativas, constatando-se que a uma temperatura de 37°C a curva de crescimento apresenta um declive bastante superior aos observados a  $T_{\text{Inc}}=35$  e 30°C (0,62, 0,31 e 0,30, respetivamente), para um período de incubação aproximadamente entre as 2-5h (Fig. 4.1).

Além disso, e de acordo com o que seria esperado, verificou-se que a produção total de células em condições de  $T_{\text{Inc}}=35$  e 37°C foi bastante semelhante (D.O. a 35°C=2,56 e D.O. a 37°C=2,79) e superior à ocorrida a 30°C (D.O.=2). De facto, esta temperatura já tinha sido considerada, em inúmeros estudos, como a mais adequada para promover uma produção de bioH<sub>2</sub> eficiente quando se trata de uma gama mesófila (J Wang & Wan, 2009). Com base nestas observações, todos os ensaios de produção de bioH<sub>2</sub> foram realizados a  $T_{\text{Inc}}=37^\circ\text{C}$  (Secção 3.2.1.3).

Contudo, a obtenção do PI decorreu sempre a 30°C, tendo por objetivo um consumo energético inferior. A recolha da biomassa do PI para incubação do meio de fermentação foi, em todos os ensaios, realizada o mais perto possível do período da fase exponencial de crescimento (cerca de 14 h após incubação).

#### 4.1.1.2 Reta de calibração – Densidade Ótica (D.O.) vs peso seco (p.s.)

O conhecimento da concentração de biomassa com que se inicia cada ensaio fermentativo é fundamental para poder estabelecer uma comparação entre os resultados obtidos ao longo do estudo. Para isso, recorreu-se a um modelo de regressão linear que relaciona a D.O. e o p.s. da biomassa, ao longo do tempo, para obtenção de uma reta de calibração (Secção 3.3.1). Tendo em conta as conclusões descritas acima, este procedimento foi apenas levado a cabo para as condições de crescimento do PI ( $T_{\text{Inc}}=30^\circ\text{C}$ ).

A reta obtida (Fig. 4.2) pode ser representada pela equação  $y=3,5654x-0,0179$  à qual corresponde um coeficiente de correlação de 0,9962. Este valor, muito próximo de 1, indica uma boa correlação entre as duas variáveis em análise e demonstra que a reta é adequada para realização de cálculos e determinação da concentração inicial de células de *E. aerogenes* inoculada, em todos os ensaios.

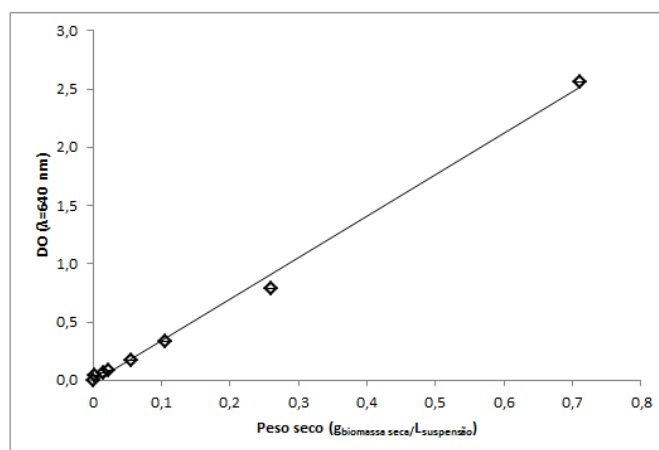


Fig. 4.2 - Representação da reta de calibração D.O. vs p.s. associada ao crescimento da bactéria *Enterobacter aerogenes*, em meio líquido, em condições de  $T_{\text{Inc}}=30^\circ\text{C}$  e agitação orbital de ~150 rpm.

#### 4.1.2 Caracterização dos resíduos de produção de biodiesel

Antes da sua utilização como substrato para a produção de  $\text{bioH}_2$ , a glicerina semi-refinada foi caracterizada, avaliando-se a sua composição em cinzas, água, glicerol, MONG (Equação 20) e CQO. Os resultados obtidos encontram-se expostos na Tabela 4.1.

$$\text{MONG } (\%(\text{m/m})) = 100 - [\%(\text{m/m})\text{Glicerol} + \%(\text{m/m})\text{Água} + \%(\text{m/m})\text{Cinzas}] \quad (20)$$

Tabela 4.1- Caracterização dos resíduos resultantes da produção de biodiesel.

Cinzas (%)	4,46
Água (%)	8,45
Glicerol (%)	83,84
MONG (%)	3,24
CQO (g/L)	1233,66

Os valores obtidos indicam um elevado grau de purificação do substrato, dado o seu considerável conteúdo em glicerol (~84%) e baixo teor em água e cinzas e, consequentemente, reduzido valor de MONG.

No que respeita ao teor em CQO determinado, esse é bastante elevado em relação ao permitido por Lei (VLE =150 mg/L, Decreto-Lei nº236/98), o que confere a estes resíduos uma elevada carga poluente.

#### 4.1.3 Produção de biohidrogénio

Esta etapa do trabalho experimental centrou-se no estudo do efeito de parâmetros com influência sobre o processo de produção de  $\text{H}_2$ , a partir de glicerina semi-refinada (substrato), por *dark fermentation* e pela bactéria *Enterobacter aerogenes*. Para o efeito, levaram-se a cabo ensaios laboratoriais procedendo-se a uma variação das concentrações iniciais de inóculo e de substrato, para comparação de resultados. Os parâmetros avaliados foram o rendimento de produção de  $\text{bioH}_2$  e grau de pureza do biogás-DF produzido.

De um modo geral, os resultados apresentados correspondem à média de pelo menos três experiências independentes, com um desvio padrão inferior a 10%.

Os resultados obtidos e a respetiva discussão são apresentados de seguida.

##### 4.1.3.1 Efeito da concentração de inicial do inóculo e do substrato

O primeiro cenário abordado, no âmbito deste estudo, foi a influência da concentração de bactérias inoculadas sobre o seu desempenho em presença de concentrações crescentes de glicerina semi-refinada. Para isso, realizaram-se ensaios de produção de  $\text{bioH}_2$  a partir de 3 concentrações de glicerol – aproximadamente 10, 20 e 30  $\text{g}_{\text{glicerol}}/\text{L}_{\text{MF}}$  – com adição de dois volumes de PI - 1% e 10% (v/v) – para comparação de resultados.

Todos os ensaios foram realizados a 37°C, num banho termostático, sob agitação magnética (~150rpm) (Secção 3.2.1.3).

Neste estudo, a discussão dos resultados obtidos foi realizada tendo por base parâmetros como o volume de biogás-DF,  $\text{bioH}_2$  e  $\text{bioCO}_2$  produzidos, o grau de pureza da fase gasosa, o rendimento do processo de *dark fermentation* e a eficiência de remoção de compostos poluentes da fase líquida. Esta análise de respostas e, nomeadamente, da composição da fase líquida resultante da aplicação do

sistema fermentativo é muito importante para o planeamento da segunda etapa do processo integrado, proposta nos objetivos do trabalho.

✓ **Análise dos resultados tendo em conta a produção total de fase gasosa**

O primeiro indicador considerado foi o volume de fase gasosa produzida (biogás-DF) para diferentes condições experimentais, complementando essa informação com as respetivas composições em termos do seu conteúdo em bioH<sub>2</sub> e bioCO<sub>2</sub> (Fig. 4.3 a, b, c).

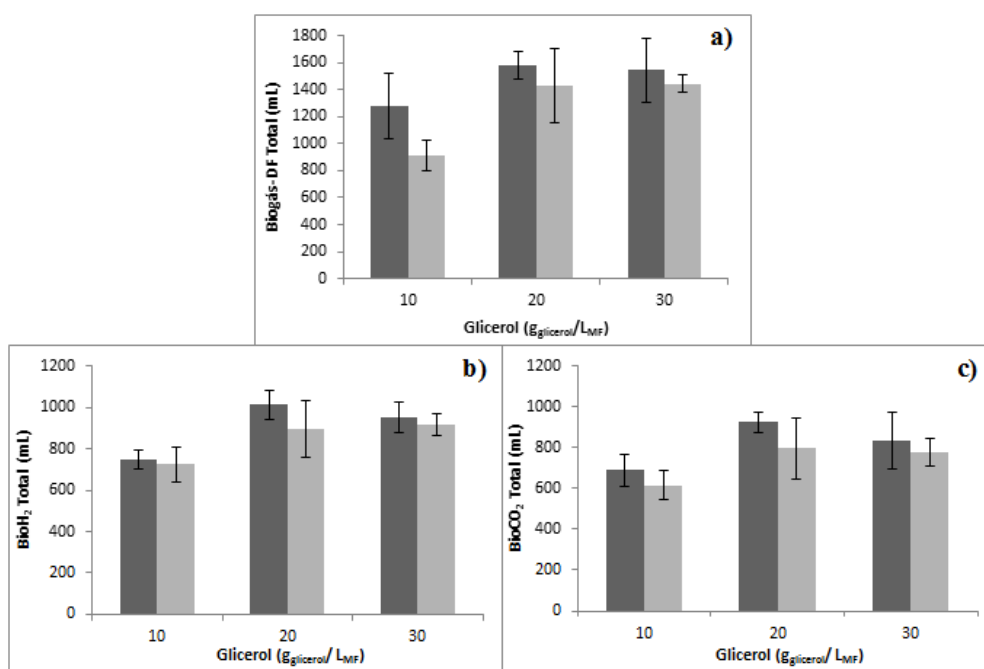


Fig. 4.3 – Produção total de biogás-DF (a) e de bioH<sub>2</sub> (b) e bioCO<sub>2</sub> (c), produzidos por ensaios de *dark fermentation* a partir de diferentes concentrações iniciais de glicerol e de células de *E. aerogenes*. Condições experimentais: Razão  $V_{\text{fase líquida}}/V_{\text{Total do reator}} = 2/3$ , Volume de PI adicionado = 1 (■) e 10 (▒) % (v/v), [Glicerol]<sub>inicial</sub> ≈ 10, 20 e 30 g<sub>glicerol</sub>/L<sub>MF</sub>, T(processo)=37°C e Agitação magnética ~150 rpm

Numa primeira abordagem e de acordo com a a), pode concluir-se que para todas as concentrações iniciais de substrato estudadas, o volume de biogás-DF foi sempre superior quando a concentração de bactérias inoculada foi de 1% (v/v). Este comportamento foi igualmente observado quando se consideraram os teores em bioH<sub>2</sub> (b) e em bioCO<sub>2</sub> (c) alcançados.

Além disso, pode também ser constatado que a produção de biogás-DF, bioH<sub>2</sub> e bioCO<sub>2</sub> não só não foi proporcional ao aumento da concentração de substrato, como apresentou um máximo para a concentração inicial de glicerol de ≈ 20 g<sub>glicerol</sub>/L<sub>MF</sub> (a, b e c). Este comportamento sugere inibição pelo substrato para concentrações superiores a 20 g<sub>glicerol</sub>/L<sub>MF</sub>, a qual poderá estar associada ao facto do substrato em estudo ser um resíduo industrial. De facto, estudos realizados anteriormente revelaram que o desempenho das bactérias de *E. aerogenes*, num processo de *dark fermentation*, foi bastante similar, para concentrações de glicerol puro ou contido em glicerina semi-refinada até 20 g<sub>glicerol</sub>/L<sub>MF</sub> (Marques, P.A.S.S. et al., 2009). Estes resultados revelam, deste modo, que a presença de outros compostos na glicerina semi-refinada não impediu o desenvolvimento do processo fermentativo, possibilitando a sua utilização sem a necessidade de tratamentos prévios, além do que efetuado pela própria fábrica. O facto de a sua conversão biológica, em condições ambientais próximas da temperatura e pressão atmosfera, originar uma fonte energética limpa (H<sub>2</sub>) e, em

simultâneo, proporcionar um abaixamento da sua carga orgânica, constituem outros aspetos igualmente importantes.

Analisando agora a composição do biogás-DF na fase estacionária ( b e c) verificou-se que, para todas as condições físico-químicas analisadas, a concentração de bioH<sub>2</sub> originado foi sempre superior à de bioCO<sub>2</sub>, o que é uma vantagem, se se pretender purificar o biogás-DF, para aplicações industriais de hidrogenação ou até mesmo para utilização numa PEM.

Em termos de variações percentuais na produção de bioH<sub>2</sub> verificou-se que, para uma inoculação de 1% (v/v) de PI, ocorreu um acréscimo de cerca de 26,4% quando a concentração inicial de glicerol aumentou de  $\approx 10$  para  $20 \text{ g}_{\text{glicerol}}/\text{L}_{\text{MF}}$  e um decréscimo de 6,2% quando esta passou para  $\approx 30 \text{ g}_{\text{glicerol}}/\text{L}_{\text{MF}}$ . Em comparação, quando a inoculação foi de 10% (v/v) de PI, verificou-se um aumento menos acentuado de volume de bioH<sub>2</sub> produzido ( $\approx 19,0\%$ ), quando se duplicou a concentração inicial do glicerol não se registando, igualmente, uma variação significativa (- 2,6 %) quando se aumentou a concentração inicial do substrato de  $\approx 20$  para  $30 \text{ g}_{\text{glicerol}}/\text{L}_{\text{MF}}$ .

De forma a caracterizar o desempenho do microrganismo fermentativo, em presença de concentrações crescentes de substrato, a apresenta os perfis de produção de bioH<sub>2</sub>, ao longo do processo, para as duas concentrações de inóculo testadas neste estudo – 1 e 10% (v/v) de PI.

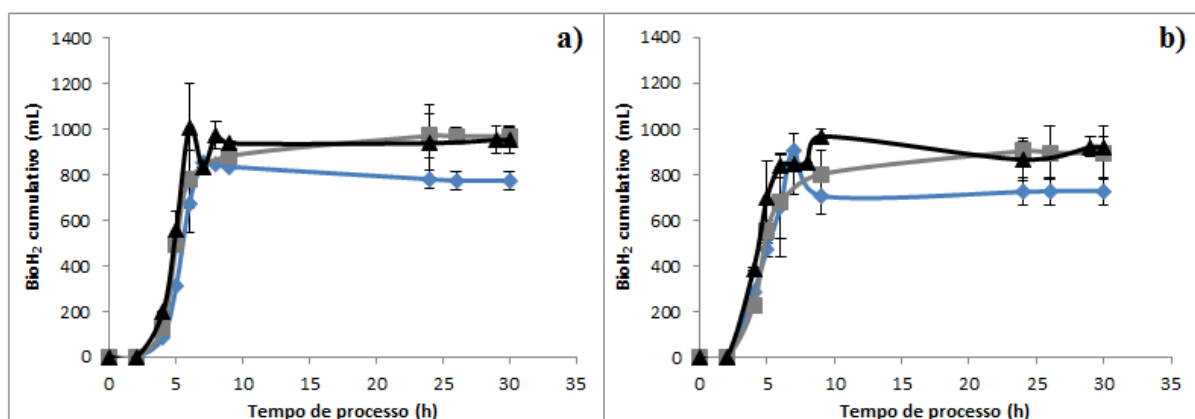


Fig. 4.4 - Perfil de produção de bioH<sub>2</sub> para ensaios de *dark fermentation* a partir de diferentes concentrações iniciais de glicerol e de células de *E. aerogenes* inoculadas. Condições experimentais: Razão  $V_{\text{fase líquida}}/V_{\text{Total do reator}} = 2/3$ , Volume de PI adicionado = 1 e 10 % (v/v) (a e b, respetivamente),  $[\text{Glicerol}]_{\text{inicial}} \approx 10$  (◆), 20 (■) e 30 (▲)  $\text{g}_{\text{glicerol}}/\text{L}_{\text{MF}}$ ,  $T(\text{processo}) = 37^\circ\text{C}$  e Agitação magnética  $\sim 150 \text{ rpm}$

A mostra também que a produção de bioH<sub>2</sub> foi mais rápida quando os ensaios experimentais foram levados a cabo com uma concentração inicial de biomassa superior ( b, adição de 10%, v/v de PI), para todas as concentrações iniciais de glicerol. Essa observação é fundamentada na Tabela 4.2, na qual se pode verificar que a velocidade inicial de produção de bioH<sub>2</sub> aumentou com o aumento da concentração inicial de substrato, para ambas as concentrações de bactérias inoculadas, embora esse aumento não tenha sido proporcional. Este facto indica uma boa eficiência do microrganismo fermentativo, mesmo em condições nas quais quer a concentração de glicerol quer a dos outros compostos que não-glicerol, presentes na glicerina semi-refinada, poderiam interferir no processo biológico, de forma significativa. Por outro lado, é também evidente que os valores alcançados, para esse parâmetro, na presença de maior concentração de inóculo foram sempre superiores (Tabela 4.2).

Tabela 4.2 - Velocidade inicial de produção de bioH<sub>2</sub> e produtividade do processo de *dark fermentation* para diferentes concentrações iniciais de glicerol e de células de *E. aerogenes* inoculadas. Condições experimentais: Razão  $V_{\text{fase líquida}}/V_{\text{Total do reator}}=2/3$ , Volume de PI adicionado = 1 e 10% (v/v),  $[\text{Glicerol}]_{\text{inicial}} \approx 10, 20 \text{ e } 30 \text{ g}_{\text{glicerol}}/\text{L}_{\text{MF}}$ ,  $T(\text{processo})=37^{\circ}\text{C}$ , Agitação magnética  $\sim 150 \text{ rpm}$ .

Glicerol ( $\text{g}_{\text{glicerol}}/\text{L}_{\text{MF}}$ )	Velocidade inicial de produção de bioH <sub>2</sub> (mL H <sub>2</sub> /h)		Produtividade (mL H <sub>2</sub> /L.h)	
	Inoculação 1% (v/v)	Inoculação 10% (v/v)	Inoculação 1% (v/v)	Inoculação 10% (v/v)
$\approx 10$	94,80 $\pm$ 4,61	156,26 $\pm$ 29,00	307,29 $\pm$ 43,29	301,39 $\pm$ 116,09
$\approx 20$	148,94 $\pm$ 7,51	173,63 $\pm$ 12,18	353,72 $\pm$ 69,99	308,80 $\pm$ 86,96
$\approx 30$	173,47 $\pm$ 27,60	227,02 $\pm$ 56,86	457,83 $\pm$ 114,06	381,17 $\pm$ 29,80

De facto, o aumento da velocidade inicial de produção de bioH<sub>2</sub> com a concentração inicial de substrato ocorreu sempre, para as condições estudadas neste trabalho. No entanto, verificou-se quando essa aumentou de  $\approx 20$  para  $\approx 30 \text{ g}_{\text{glicerol}}/\text{L}_{\text{MF}}$ , o incremento registado foi apenas de 14%, quando o volume de PI adicionado foi de 1% (v/v), enquanto para um inóculo 10 vezes superior o aumento foi de 24% (de 173,47 para 227,02 mL H<sub>2</sub>/h). Este comportamento sugere, como primeira análise, que uma maior quantidade de bactérias mostrou ser mais eficiente em condições de inibição pelo substrato, na fase inicial do processo.

Considerando agora o processo global verifica-se que, não obstante as conclusões anteriores, a produtividade do sistema (mL H<sub>2</sub>/L.h) foi sempre mais elevada quando a concentração de biomassa inoculada correspondeu a 1% (v/v) do volume da fase líquida.

O cruzamento destas observações sugere, por um lado, a eficiência da estirpe de *E. aerogenes* utilizada, mesmo em situação de inibição por aumento da concentração de substrato e/ou compostos não-glicerol, mas também a possibilidade de, após o período inicial do processo, uma maior quantidade de bactérias poder metabolizar parte do substrato para crescimento celular (energia) e não para produção de biogás-DF, conduzindo a valores de produtividade inferiores (Tabela 4.2).

Com base nos perfis de produção de bioH<sub>2</sub> () foi também possível determinar o tempo necessário para a ocorrência do processo (*tempo de equilíbrio*), ou seja, o tempo necessário para atingir e manter a produção máxima de bioH<sub>2</sub>, nas condições operacionais e físico-químicas estabelecidas. Nesse âmbito, e observando a , constatou-se que o *tempo de equilíbrio* não sofreu nenhuma alteração significativa em nenhuma das condições experimentais testadas, atingindo um máximo após cerca de 15h de fermentação e mantendo-se mais ou menos constante até  $\approx 26\text{h}$ .

#### ✓ Análise dos resultados tendo em conta o grau de pureza

O grau de pureza do biogás-DF produzido (definido como o valor da razão volumétrica mL H<sub>2</sub>/mL CO<sub>2</sub>) é um parâmetro especialmente relevante quando se pretende purificá-lo em termos da sua concentração em H<sub>2</sub>, para posterior aplicação industrial, em processos de hidrogenação. De facto, um grau de pureza elevado conduz a um maior rendimento na aplicação de processos para obtenção do H<sub>2</sub> puro, proporcionando um leque mais alargado de utilizações pela indústria. Contudo, esses processos de purificação conduzem normalmente a custos elevados.

Neste trabalho, as variações do grau de pureza em bioH<sub>2</sub>, ao longo do tempo, para os diferentes ensaios de *dark fermentation* realizados, com diferentes concentrações iniciais de inóculo e de substrato, encontram-se representadas na , para comparação. Com base em estudos anteriores (Mira, 2012), optou-se por representar os valores do grau de pureza apenas a partir das 4h de processo (valor mais elevado atingido).

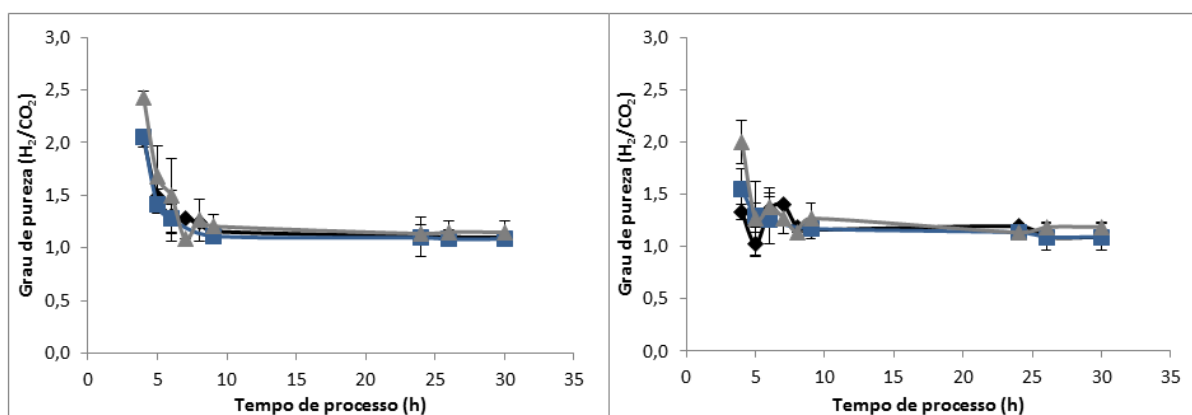


Fig. 4.5 - Perfil do grau de pureza em  $H_2$  (mL  $H_2$ /mL  $CO_2$ ) da fase gasosa produzida ao longo dos ensaios de *dark fermentation*, para diferentes concentrações iniciais de glicerol e de células de *E. aerogenes* inoculadas (a e b). Condições experimentais: Razão  $V_{\text{fase líquida}}/V_{\text{Total do reator}}=2/3$ , Volume de PI adicionado=1 e 10% (v/v) (a e b), respetivamente),  $[Glicerol]_{\text{inicial}} \approx 10$  (◆), 20 (■) e 30 (▲)  $g_{\text{glicerol}}/L_{MF}$ ,  $T(\text{processo})=37^\circ C$  e Agitação magnética  $\sim 150$  rpm.

A demonstra que todos os ensaios apresentaram um comportamento semelhante em termos do perfil da razão volumétrica ( $H_2/CO_2$ ), ao longo do processo, e que com um valor máximo observado após cerca de 4h de fermentação, diminuindo a partir daí até atingir um patamar às 7-8h, para todos os ensaios levados a cabo. Não obstante este facto, verificou-se que os volumes mais elevados de bio $H_2$  só foram alcançados numa fase mais avançada, geralmente, após  $\approx 15$ h de processo, como referido acima (a e b).

Este perfil mostrou que, independentemente da concentração inicial de substrato e de inóculo, o desempenho da estirpe bacteriana utilizada neste estudo foi consistente, o que é uma vantagem sugerindo no entanto que, de acordo com os objetivos a atingir, deverão estabelecer-se as condições físico-químicas do sistema biológico a operar, tendo em atenção um compromisso entre o volume de biogás-DF produzido e o seu grau de pureza.

Outro aspeto a notar, é o facto de o valor mais elevado do grau de pureza registado ter sido semelhante (para um inóculo correspondente a 1%, v/v) ou até ter aumentado (para um inóculo correspondente a 10%, v/v) com o aumento da concentração inicial de substrato, o que revela, mais uma vez, o bom desempenho do microrganismo fermentativo utilizado neste estudo. Contudo, cruzando estes dados com os da Tabela 4.2, não se pode deixar de notar que uma maior quantidade de células inoculadas (10%, v/v) não conduziu a valores mais elevados de grau de pureza do biogás-DF, na fase inicial do processo, apesar do aumento mais acentuado da velocidade inicial de produção com a concentração de substrato.

Em conclusão, todos os comentários acima sugerem que, uma maior quantidade de bactérias inoculada pode ter conduzido a um desvio do metabolismo celular no sentido do crescimento da biomassa e não da produção de biogás-DF, refletindo-se esse efeito quer sobre o volume total produzido quer sobre o seu grau de pureza. No entanto, essa discrepância de valores foi atenuada com o aumento da concentração inicial do substrato de  $\approx 20$  para  $30 g_{\text{glicerol}}/L_{MF}$ , possivelmente devido ao facto de uma maior concentração de biomassa diminuir os efeitos inibitórios causados, nessas condições.

#### ✓ Caracterização das fases líquidas

A caracterização das fases líquidas de fermentação antes e após DF foi fundamental para avaliar a eficiência da 1ª etapa do processo integrado, em estudo, e para selecionar o meio fermentado mais adequado a ser utilizado no processo de digestão anaeróbia (2ª etapa do processo integrado), como substrato.

Assim, após fermentação todos os meios fermentados foram centrifugados ( $T=4^{\circ}\text{C}$ , 10000 rpm e  $t=10$  min) para caracterização das fases líquidas resultantes em termos dos seguintes parâmetros físico-químicos: pH e teores em ST, SV, CQO, Azoto total, Azoto amoniacal, ácidos gordos de cadeia curta (ácido succínico, láctico, fórmico, acético e propiónico), glicerol e etanol.

A Tabela 4.3 apresenta, em resumo, todos os valores obtidos para cada um dos parâmetros analisados.

Tabela 4.3 - Caracterização das fases líquidas resultantes dos ensaios de *dark fermentation*, realizados a partir de diferentes concentrações iniciais de glicerol e de células *E. aerogenes* inoculadas. Condições experimentais: Razão  $V_{\text{fase líquida}}/V_{\text{Total do reator}}=2/3$ , Volume de PI adicionado = 1 e 10% (v/v),  $[\text{Glicerol}]_{\text{inicial}} \simeq 10, 20 \text{ e } 30 \text{ g}_{\text{glicerol}}/\text{L}_{\text{MF}}$ ,  $T(\text{processo})=37^{\circ}\text{C}$  e Agitação magnética  $\sim 150\text{rpm}$ .

Inoculação (%,v/v)	Parâmetros	Concentração inicial de substrato ( $\text{g}_{\text{glicerol}}/\text{L}_{\text{MF}}$ )		
		$\simeq 10$	$\simeq 20$	$\simeq 30$
1	pH	$6,31 \pm 0,08$	$6,21 \pm 0,09$	$6,34 \pm 0,01$
	ST (g/L)	$21,75 \pm 1,99$	$28,89 \pm 3,45$	$24,75 \pm 12,26$
	SV (g/L)	$8,01 \pm 0,92$	$14,61 \pm 3,81$	$13,38 \pm 8,95$
	CQO (g/L)	$21,64 \pm 4,37$	$26,50 \pm 1,84$	$20,65 \pm 12,78$
	Azoto total (g/L)	$1,38 \pm 0,02$	$1,24 \pm 0,03$	$0,59 \pm 0,14$
	Azoto amoniacal (g/L)	$0,28 \pm 0,02$	$0,29 \pm 0,01$	$0,16 \pm 0,00$
	Ácido Succínico (g/L)	$0,29 \pm 0,10$	$0,44 \pm 0,02$	$0,23 \pm 0,05$
	Ácido Láctico (g/L)	$0,64 \pm 0,16$	$1,30 \pm 0,43$	$0,66 \pm 0,45$
	Ácido Fórmico (g/L)	$0,47 \pm 0,67$	$0,69 \pm 0,11$	$0,06 \pm 0,09$
	Ácido Acético (g/L)	$0,34 \pm 0,01$	$0,06 \pm 0,08$	$0,10 \pm 0,04$
	Ácido Propiónico (g/L)	$0,56 \pm 0,80$	$0,52 \pm 0,03$	$0,24 \pm 0,15$
	Glicerol (g/L)	$0,20 \pm 0,28$	$4,21 \pm 3,46$	$7,88 \pm 4,50$
	Etanol (g/L)	$4,52 \pm 1,13$	$6,67 \pm 0,79$	$6,64 \pm 4,07$
10	pH	$6,31 \pm 0,07$	$6,22 \pm 0,05$	$6,33 \pm 0,01$
	ST (g/L)	$22,46 \pm 1,66$	$30,02 \pm 2,27$	$34,35 \pm 3,44$
	SV (g/L)	$8,93 \pm 1,08$	$15,93 \pm 2,22$	$20,74 \pm 1,22$
	CQO (g/L)	$20,54 \pm 2,48$	$27,00 \pm 1,42$	$26,87 \pm 13,29$
	Azoto total	$1,52 \pm 0,00$	$1,45 \pm 0,07$	$1,28 \pm 0,11$
	Azoto Amoniacal (g/L)	$0,30 \pm 0,02$	$0,32 \pm 0,00$	$0,34 \pm 0,05$
	Ácido Succínico (g/L)	$0,08 \pm 0,11$	$0,42 \pm 0,01$	$0,32 \pm 0,11$
	Ácido Láctico (g/L)	$0,52 \pm 0,07$	$0,98 \pm 0,25$	$0,52 \pm 0,02$
	Ácido Fórmico (g/L)	$0,41 \pm 0,57$	$0,61 \pm 0,07$	0,00
	Ácido Acético (g/L)	$0,08 \pm 0,11$	$0,06 \pm 0,08$	$0,14 \pm 0,03$
	Ácido Propiónico (g/L)	$0,24 \pm 0,34$	$0,55 \pm 0,03$	$0,25 \pm 0,15$
	Glicerol (g/L)	$0,08 \pm 0,11$	$3,96 \pm 3,46$	$11,17 \pm 4,50$
	Etanol (g/L)	$3,31 \pm 0,25$	$5,98 \pm 0,90$	$5,12 \pm 0,03$

Com o objetivo de perceber o efeito da concentração inicial de glicerol sobre o desempenho metabólico das bactérias e, consequentemente, sobre a composição do meio fermentado, procedeu-se à análise cruzada dos resultados acima referidos. Assim, verificou-se que a conversão total do substrato, em biogás-DF, só ocorreu quando a sua concentração inicial foi de  $\simeq 10 \text{ g}_{\text{glicerol}}/\text{L}_{\text{MF}}$ , independentemente do volume de PI adicionado (Tabela 4.3), o que sugere que o aumento do teor em CQO registado, em relação ao meio inicial, (Tabela 7.1) possa ser atribuído em grande parte à concentração em AGV's, dado que a sua produção ao longo do processo ocorre em simultâneo com a do biogás-DF (Ghimire et al., 2015). Pelo mesmo motivo, quando a concentração inicial de substrato duplicou ( $20 \text{ g}_{\text{glicerol}}/\text{L}_{\text{MF}}$ ), a CQO no meio fermentado aumentou, levando a crer que esse aumento possa estar associado não só à concentração de glicerol que não foi consumido, como também à concentração de AGV's produzidos durante o processo. Até porque esta concentração inicial de glicerol foi a que conduziu à maior produção de biogás-DF/bioH<sub>2</sub> (Fig. 4.3 a e b) e, em concordância, ao aumento mais significativo do teor em SV, para ambas as concentrações de inóculo.

A fermentação de  $\approx 30 \text{ g}_{\text{glicerol}}/\text{L}_{\text{MF}}$  conduziu a pequenas alterações nos valores das concentrações de CQO e de SV e, como seria de esperar, à ocorrência de inibição pelo substrato. Por isso considera-se que, nestas condições, o teor em CQO estará associado a uma maior concentração residual de substrato, além do conteúdo em AGV's, pelos motivos já referidos.

De realçar que, apesar de se ter produzido um biocombustível limpo e se ter verificado um decréscimo da carga poluente na maioria dos ensaios, este processo originou um meio fermentado que ainda não cumpre a legislação em vigor descrita no Decreto-Lei nº236/98 (Anexo XVIII). Como tal, a integração deste com um processo de digestão anaeróbia, pode contribuir para atenuar essa questão.

#### ✓ **Análise dos resultados tendo em conta o rendimento específico do processo**

O rendimento específico de produção de  $\text{H}_2$  ( $\text{mL H}_2/\text{g}_{\text{glicerol}} \text{ consumido}$ ) foi outro fator considerado fundamental para a avaliação dos diversos ensaios fermentativos. Os resultados obtidos, de acordo com as concentrações iniciais de biomassa inoculada e de substrato, em cada ensaio, podem ser observados na Tabela 4.4.

Tabela 4.4 - Rendimento de produção de  $\text{H}_2$  nos diversos ensaios de *dark fermentation*, realizados a partir de diferentes concentrações iniciais de glicerol e de células de *E. aerogenes* inoculadas. Condições experimentais: Razão  $V_{\text{fase líquida}}/V_{\text{Total do reator}}=2/3$ , Volume de PI adicionado = 1 e 10% (v/v),  $[\text{Glicerol}]_{\text{inicial}} \approx 10, 20 \text{ e } 30 \text{ g}_{\text{glicerol}}/\text{L}_{\text{MF}}$ ,  $T(\text{processo})=37^\circ\text{C}$  e Agitação magnética  $\sim 150 \text{ rpm}$ .

[Glicerol] <sub>inicial</sub> ( $\text{g}_{\text{glicerol}}/\text{L}_{\text{MF}}$ )	$\eta$ ( $\text{mL H}_2/\text{g}_{\text{glicerol}} \text{ consumido}$ )	
	Inoculação – 1% (v/v)	Inoculação – 10% (v/v)
$\approx 10$	$99,06 \pm 6,19$	$94,76 \pm 11,20$
$\approx 20$	$82,51 \pm 5,70$	$71,39 \pm 10,19$
$\approx 30$	$50,91 \pm 3,88$	$59,72 \pm 3,41$

Observando a Tabela 4.4 constata-se que a variação da concentração inicial de substrato conduziu a discrepâncias bastante significativas nos resultados, verificando-se uma superioridade de rendimentos quando a concentração de bactérias inoculadas foi menor. Por outro lado, verificou-se que o aumento da concentração inicial de glicerol levou a uma diminuição dos rendimentos específicos, para ambos os volumes de PI testados. Assim, para uma inoculação de 1% (v/v), a duplicação da concentração inicial de substrato conduziu a um decréscimo no rendimento específico de cerca de 16,71%, seguido de outro de 38,29% quando se aumentou novamente a concentração. Para uma concentração de bactérias inoculadas mais elevada (10%, v/v), por sua vez, ocorreram decréscimos de 26,67 e 16,35%, respetivamente.

Esta análise comprova o que já foi mencionado anteriormente, ou seja, que ocorreu uma inibição pelo substrato, quando a concentração de bactérias inoculadas foi maior. De facto, apesar da velocidade inicial de produção de  $\text{bioH}_2$  apresentar valores superiores para uma inoculação de 10% (v/v), pelo contrário, a produtividade foi mais elevada para uma concentração de biomassa 10 vezes menor (Tabela 4.2), algo que se reflete no abaixamento do rendimento específico.

#### **4.1.3.2 Cinética do processo de *dark fermentation***

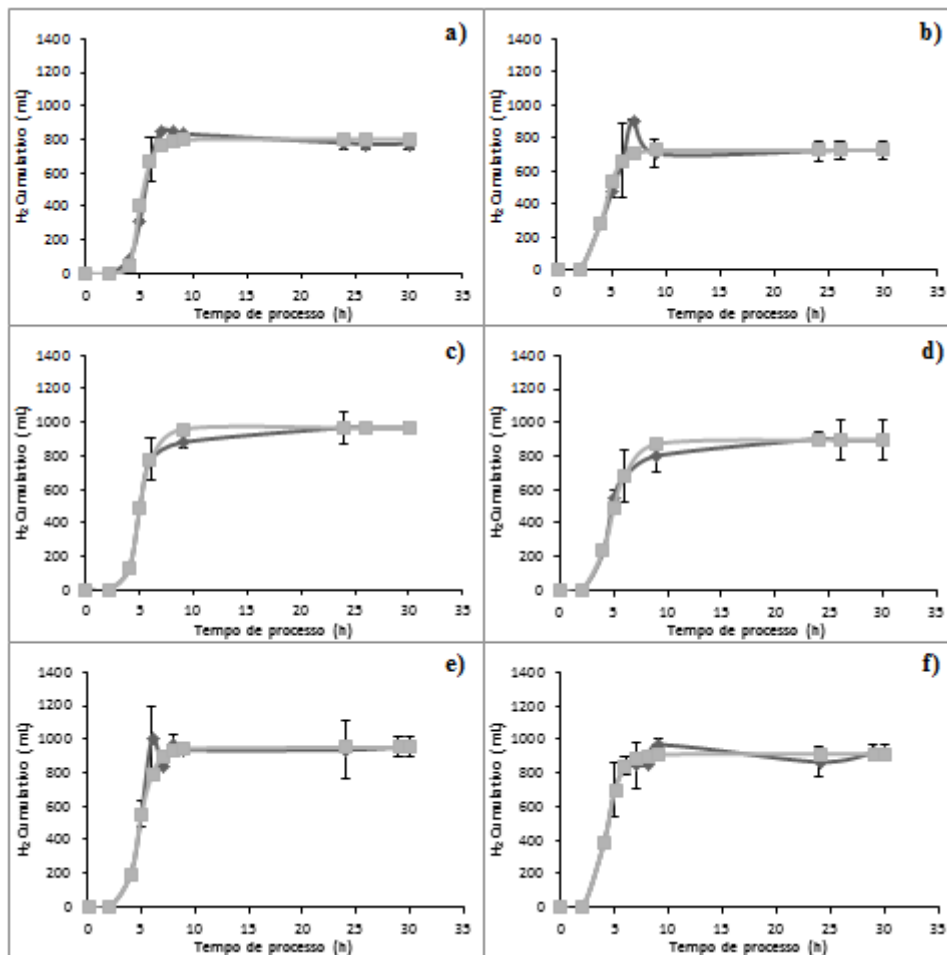
No seguimento do estudo realizado analisou-se a cinética do processo biológico, para determinação de parâmetros com influência na caracterização do processo de DF, apresentado neste estudo.

Assim, com o intuito de se apurar a legitimidade dos resultados experimentais, recorreu-se a um modelo matemático desenvolvido para caracterizar curvas de crescimento celular, o qual pode ser representado pela equação de Gompertz modificada (Equação 22).

$$H(t) = H_{\max} \exp \left\{ -\exp \left[ \frac{R_{\max}}{H_{\max}} (\lambda - t) + 1 \right] \right\} \quad (22)$$

Efetivamente, a equação 28 descreve a degradação do substrato e correspondente formação de produto, ao longo do processo fermentativo em que:  $H(t)$  corresponde ao volume de  $H_2$  acumulado ao longo do tempo (mL),  $H_{\max}$  corresponde ao potencial de produção máxima de  $H_2$  (mL),  $R_{\max}$  corresponde à taxa de produção máxima (mL/h) e  $\lambda$  (h) corresponde ao tempo de latência (B. Wang et al., 2008; J Wang & Wan, 2008). Para aplicar esta equação aos resultados experimentais, com vista a estudar o perfil de produção de bio $H_2$  e determinar parâmetros cinéticos, foi utilizada uma ferramenta matemática, o Solver, através da folha de cálculo Excel.

A Fig. 4.6 apresenta os perfis de produção de bio $H_2$  por DF, registados para as diferentes condições físico-químicas estudadas neste trabalho. Os valores representados correspondem à média dos valores obtidos em pelo menos 3 ensaios independentes, com um desvio-padrão inferior a 10% (Secção 7.2).



Pela observação da Fig. 4.6 é evidente que, de um modo geral, os perfis de produção de bioH<sub>2</sub> traçados com base nos dados experimentais se ajustaram muito bem ao modelo teórico traçado por meio da equação de Gompertz ( $R^2 > 0,98$ ). Outro aspeto a considerar é que as curvas de produção de bioH<sub>2</sub> estão de acordo com o perfil proposto por outros autores (J. Wang & Wan, 2009).

Por aplicação da equação de Gompertz aos dados experimentais calcularam-se vários parâmetros como, o potencial ( $H_{\text{máx}}$ ) e a taxa de produção máxima ( $R_{\text{máx}}$ ) de bioH<sub>2</sub> e o tempo de latência ( $\lambda$ ) no processo de fermentação (Tabela 4.5).

Tabela 4.5 – Parâmetros determinados com base na aplicação da equação de Gompertz aos resultados experimentais obtidos nos ensaios de *dark fermentation* realizados a partir de diferentes concentrações iniciais de glicerol e de células de *E. aerogenes*. Condições experimentais: Razão  $V_{\text{fase líquida}}/V_{\text{Total do reator}}=2/3$ , Volume de PI adicionado = 1 e 10% (v/v),  $[\text{Glicerol}]_{\text{inicial}} \approx 10, 20 \text{ e } 30 \text{ g}_{\text{glicerol}}/\text{L}_{\text{MF}}$ ,  $T(\text{processo})=37^\circ\text{C}$  e Agitação magnética  $\sim 150 \text{ rpm}$ .

Inoculação (%,v/v)	$[\text{Glicerol}]_{\text{inicial}}$ ( $\text{g}_{\text{glicerol}}/\text{L}_{\text{MF}}$ )	$H_{\text{máx}}$ (mL)	$R_{\text{máx}}$ (mL/h)	$\lambda$ (h)	$R^2$
1	$\approx 10$	$807,28 \pm 48,49$	$399,95 \pm 94,56$	$4,03 \pm 0,21$	0,99
	$\approx 20$	$967,72 \pm 36,44$	$394,39 \pm 57,87$	$3,74 \pm 0,06$	0,99
	$\approx 30$	$951,48 \pm 58,51$	$379,38 \pm 89,67$	$3,50 \pm 0,11$	0,99
10	$\approx 10$	$727,58 \pm 58,44$	$303,98 \pm 94,73$	$3,06 \pm 0,45$	0,98
	$\approx 20$	$895,22 \pm 114,31$	$260,88 \pm 99,86$	$3,11 \pm 0,66$	0,99
	$\approx 30$	$912,80 \pm 39,48$	$383,99 \pm 78,95$	$3,01 \pm 0,27$	0,99

De acordo com os resultados obtidos e tendo em conta as conclusões já apresentadas (Secção 4.1.3.1), como era expectável, o potencial de produção máxima de bioH<sub>2</sub> foi registado para as condições de concentração inicial de substrato de  $\approx 20 \text{ g}_{\text{glicerol}}/\text{L}_{\text{MF}}$  e inóculo correspondente a 1% (v/v). A taxa de produção máxima, no entanto, foi superior quando os ensaios foram realizados com metade da concentração de substrato ( $\approx 10 \text{ g}_{\text{glicerol}}/\text{L}_{\text{MF}}$ ), para a mesma quantidade de biomassa, o que pode ser atribuído à ausência de inibição, nestas condições.

Em relação aos tempos de latência calculados, é visível que esses foram menores sempre que o inóculo foi de 10% (v/v), o que reflete uma adaptação mais rápida das bactérias às condições experimentais, quando se encontram em maior concentração. Este comportamento pode ser fundamentado com os valores crescentes de velocidade inicial, levando a que produção de bioH<sub>2</sub> fosse iniciada mais rapidamente. Tendo por base este facto, o tempo de latência mínimo foi então obtido nos ensaios que partiram de uma inoculação de 10% (v/v) e uma concentração de  $10 \text{ g}_{\text{glicerol}}/\text{L}_{\text{MF}}$ .

#### 4.1.3.3 Comparação dos resultados obtidos utilizando um saco de recolha da fase gasosa

Em última análise dos dados experimentais procedeu-se à comparação dos valores registados para o grau de pureza ( $\gamma$ ), ao longo do processo de DF, com o determinado a partir de um saco de recolha de gases de baixo peso molecular, contendo todo o volume de biogás-DF produzido. A determinação dos teores em bioH<sub>2</sub> e bioCH<sub>4</sub> no saco foi levada a cabo por GC. O objetivo deste estudo assentou em determinar o valor da razão mL H<sub>2</sub>/mL CO<sub>2</sub> no volume total do biogás-DF produzido e recolhido, tendo em conta que essa razão altera ao longo do tempo, como se verificou na . Esta informação torna-se interessante se se pretender desenvolver este sistema a nível industrial, visto que nessa situação, o biogás-DF produzido no biorreactor é normalmente recolhido apenas no final do processo. A comparação estabelecida neste trabalho pode também ser fundamentada pela importância do conteúdo em bioH<sub>2</sub> ser o mais elevado possível, de modo a facilitar o processo de purificação, para posterior utilização.

Tabela 4.6 – Grau de pureza obtido no decorrer do processo e no saco de recolha para ensaios de *dark fermentation* realizados a partir de diferentes concentrações iniciais de glicerol e de células de *E. aerogenes* inoculadas. Condições experimentais: Razão  $V_{\text{fase líquida}}/V_{\text{Total do reator}}=2/3$ , Volume de PI adicionado = 1 e 10% (v/v),  $[\text{Glicerol}]_{\text{inicial}} \approx 10, 20$  e  $30 \text{ g}_{\text{glicerol}}/\text{L}_{\text{MF}}$ ,  $T(\text{processo})=37^{\circ}\text{C}$  e Agitação magnética  $\sim 150 \text{ rpm}$ .

Inoculação (%, v/v)	[Glicerol] <sub>inicial</sub> (g <sub>glicerol</sub> /L <sub>MF</sub> )	Ao longo do processo		Saco
		Grau de pureza máximo atingido (H <sub>2</sub> /CO <sub>2</sub> )	Grau de pureza no final do processo (H <sub>2</sub> /CO <sub>2</sub> )	Grau de pureza (H <sub>2</sub> /CO <sub>2</sub> )
1	$\approx 10$	2,03	1,10	1,29
	$\approx 20$	2,06	1,08	1,13
	$\approx 30$	2,43	1,15	1,14
10	$\approx 10$	1,33	1,09	1,19
	$\approx 20$	1,54	1,09	1,14
	$\approx 30$	2,00	1,19	1,22

Com base nos valores apresentados na Tabela 4.6 é claro que o grau de pureza determinado no saco de recolha foi inferior ao registado após  $\approx 4\text{h}$  de processo fermentativo (máximo atingido) por recolha da fase gasosa diretamente a partir da *headspace* do biorreator, o que se compreende considerando que a composição do biogás-DF no saco de recolha corresponde à mistura dos valores atribuídos ao longo do tempo. Porém, quando comparado com os valores registados na fase estacionária, constatou-se que a diferença não foi muito significativa.

Neste contexto e tendo em conta que a partir de  $\approx 6\text{h}$  de DF o grau de pureza não sofreu grandes alterações (), a possibilidade de recolha do bioH<sub>2</sub> no final do processo, sem comprometer a qualidade da produção, é ainda uma opção viável. Além disso, existem processos de hidrogenação, como a hidrogenação em condições supercríticas, em que o H<sub>2</sub> deve estar em presença de CO<sub>2</sub>, para que o processo ocorra com eficiência, tornando a aplicação do biogás produzido por *dark fermentation*, como descrito nesta dissertação, uma hipótese viável em indústria.

#### 4.1.3.4 Análise energética

Este estudo teve como propósito a determinação do conteúdo energético do volume de bioH<sub>2</sub> produzido, em todos os ensaios fermentativos, para assim proceder-se a uma comparação com a energia necessária para a realização do próprio processo. Dado o carácter preliminar desta análise, a medição do consumo energético foi efetuada apenas para alguns dos equipamentos utilizados, nomeadamente, a incubadora (9,25 kWh), a placa de agitação (0,59 kWh) e o termostato (2 kWh).

Assim, como primeira etapa, recorreu-se à lei dos gases ideais (Equação 23) para o cálculo do número de moles correspondente:

$$PV = nRT \quad (23)$$

Onde P é o valor da pressão atmosférica (Pa), V é o volume de bioH<sub>2</sub> produzido (m<sup>3</sup>), R é a constante dos gases perfeitos (J/mol.K) e T é a temperatura a que decorreu o processo fermentativo (K).

Neste seguimento e sabendo o peso molecular de uma mole de H<sub>2</sub> (2,02 g/mol) e o seu PCS (141,2 MJ/Kg) rapidamente se alcançou o objetivo pretendido. Os resultados encontram-se expressos na Tabela 4.7.

Tabela 4.7 – Energia (kWh) referente aos volumes de bioH<sub>2</sub> produzidos nos ensaios de *dark fermentation*, realizados a partir de diferentes concentrações iniciais de glicerol e de células de *E. aerogenes* inoculadas.

[Glicerol] <sub>inicial</sub> (g <sub>glicerol</sub> /L <sub>MF</sub> )	Inoculação (% v/v)	
	1	10
≈10	0,0023	0,0023
≈20	0,0032	0,0028
≈30	0,0030	0,0029

A Tabela 4.7 indica que, como era expectável, a energia produzida por este processo biológico à escala laboratorial, apresentou valores bastante inferiores comparativamente aos valores registados para o consumo energético dos equipamentos associados. Contudo, há que ter em conta que os equipamentos em destaque, geralmente, não são utilizados da forma mais eficiente. Por exemplo, a incubadora é utilizada para o crescimento celular da *Enterobacter aerogenes*, algo que foi realizado, em todos os ensaios, através de um volume de apenas 100 mL. Porém, este equipamento tem capacidade para conter volumes muito superiores, algo que poderia ser feito com a mesma quantidade de energia. Outro aspeto a ter em conta é a capacidade dos próprios reatores, com volumes adequados para trabalhar à escala laboratorial, o que conduz a também volumes de H<sub>2</sub> mais baixos e, portanto, a uma energia mais reduzida.

Após toda esta análise, referente ao processo de *dark fermentation* (1ª etapa do sistema integrado) e fazendo um cruzamento de todos os resultados obtidos, conclui-se que as condições ótimas que proporcionaram uma produção de bioH<sub>2</sub> mais elevada foram as que corresponderam a uma concentração de biomassa de 1% (v/v) e uma concentração inicial de substrato de ≈20 g<sub>glicerol</sub>/L<sub>MF</sub>. Porém, não foi este o meio fermentado que apresentou as características químicas mais adequadas para utilização, como substrato, no processo de digestão anaeróbia. De facto, considerando a ação inibidora do glicerol sobre o processo de digestão anaeróbia, optou-se por testar o meio fermentado que resultou da fermentação de 10g<sub>glicerol</sub>/L<sub>MF</sub> com o inóculo de 1% (v/v), dado que neste meio a concentração de glicerol foi menor (0,20 g/L) (Viana et al., 2012).

## 4.2 Digestão Anaeróbia

### 4.2.1 Caracterização do consórcio de bactérias

Um inóculo adequado deve conter microrganismos em quantidade suficiente para poder assegurar a capacidade de degradação da matéria orgânica disponível. Neste contexto, foi realizada uma caracterização físico-química do consórcio em termos de teores em ST, SV, SST, SSV e CQO (Secção 3.3.3).

Dado que os microrganismos se encontram em suspensão, o conteúdo em SSV é o parâmetro usado para exprimir genericamente a matéria orgânica, embora este parâmetro seja incapaz de distinguir entre os sólidos suspensos inertes e os microbianos, microrganismos vivos ou inativos. Geralmente nos ensaios de degradação procura-se verificar se a razão entre substrato e o inóculo cumpre a premissa que condiciona a produção de biometano ( $CQO_{\text{substrato}}/SSV_{\text{inóculo}} \leq 1$ ) (INGENIEURE, 2006). Assim, ao conhecer-se os SSV, é possível definir a carga orgânica que deve ser introduzida no reator, sem comprometer o processo pela ocorrência de possíveis inibições

Tabela 4.8 – Parâmetros de caracterização do consórcio de bactérias.

ST (g/L)	SV (g/L)	SST (g/L)	SSV (g/L)	CQO (g/L)
6,5	3,9	4,7	2,8	11,43

Pela observação da Tabela 4.8 constata-se que o inóculo em questão era bastante diluído, com uma concentração de SSV bastante aquém do habitual, devendo-se este facto ao método e ao local de recolha. Contudo, a relação  $SSV/SST = 0,59$  indica uma percentagem de material orgânico suspenso normal para este tipo de inóculo.

### 4.2.2 Produção de biometano

Nesta fase do trabalho experimental foram desenvolvidos ensaios laboratoriais com o propósito de produzir outro biocombustível gasoso, o metano, a partir do efluente resultante do processo de *dark fermentation*, usando o consórcio de bactérias mesófilas. O meio fermentado foi selecionado com base na sua concentração em glicerol pelo facto deste composto, em certas concentrações, atuar como um inibidor do processo, afetando a produção de biogás-DA. Assim, o substrato utilizado resultou de ensaios de *dark fermentation* desenvolvidos com uma concentração inicial de glicerol de  $\approx 10 \text{ g}_{\text{glicerol}}/\text{L}_{\text{MF}}$  e de uma inoculação de 1% (v/v).

Para a produção de biogás-DA, foram realizados dois ensaios independentes, partindo de uma concentração de  $2,71 \text{ gCQO}/\text{L}_{\text{fase líquida}}$  e de um volume de inóculo de 384,65 mL, segundo as mesmas condições operacionais. Para comparação de resultados, procedeu-se a uma análise da composição da fase gasosa e da fase líquida, de modo a avaliar a eficiência do processo em termos de produção de  $\text{bioCH}_4$ , de remoção de compostos poluentes e de capacidade de degradação dos compostos orgânicos pelo consórcio bacteriano.

Os resultados obtidos e a respetiva discussão são apresentados de seguida.

#### 4.2.2.1 Perfil de produção de biogás-DA e composição da fase gasosa

A análise do perfil de produção de biogás-DA possibilitou não só a avaliação do comportamento do consórcio bacteriano perante o substrato utilizado, como também permitiu a determinação da atividade das bactérias metanogénicas presentes no inóculo.

As curvas de biogás-DA acumulado, ao longo do tempo, para os dois digestores encontram-se representadas na Fig. 4.7.

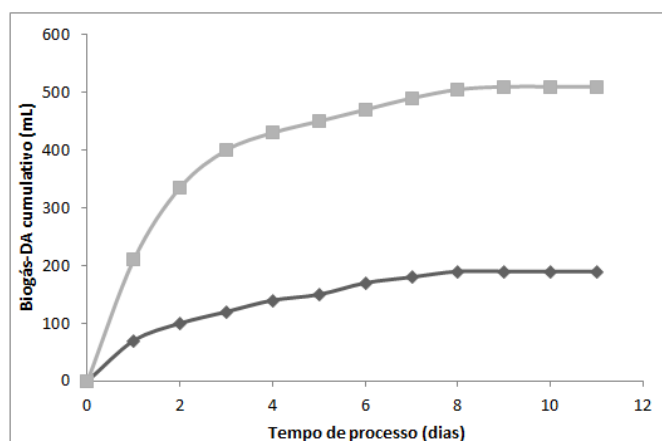


Fig. 4.7 - Perfil de produção de biogás-DA para os dois ensaios de digestão anaeróbia realizados (Ensaio 1 (◆) e Ensaio 2 (■)). Condições experimentais: Razão  $V_{\text{fase líquida}}/V_{\text{Total do reator}}=0,8$ , Volume de inóculo =384,65 mL,  $[\text{Substrato}]_{\text{inicial}}=2,71 \text{ gCQO/L}_{\text{fase líquida}}$ ,  $T(\text{processo})=37^{\circ}\text{C}$  e Agitação manual (2 vezes/dia).

Com base na Fig. 4.7 é visível que as curvas de produção de biogás-DA apresentaram uma discrepância bastante acentuada, com o segundo ensaio a apresentar um declive superior, apesar de os dois reatores apresentarem a mesma composição a nível de fase líquida. A justificação para esta diferença pode incidir no facto do sistema, no primeiro ensaio, não ter sido bem isolado conduzindo a fugas de biogás-DA e, portanto, a um volume deslocado na coluna graduada inferior.

Contudo, em ambos os digestores, a degradação do substrato foi iniciada de forma rápida, dado que o primeiro registo de biogás-DA foi feito logo após o primeiro dia de processo (cerca 24 horas depois), revelando uma boa adaptação do consórcio bacteriano ao meio nutritivo. O inóculo utilizado estava, portanto, bastante ativo em boas condições para conduzir a biodegradação, como comprovado pela clara ausência de uma fase de latência no perfil de produção.

Pela observação da Fig. 4.7 também se constatou que nos últimos 2/3 dias de processo já não havia produção de biogás-DA e que, portanto, o processo já se encontrava esgotado, com a maioria do substrato disponível degradado.

A Fig. 4.8 apresenta a composição do biogás-DA produzido, em relação ao seu conteúdo em  $\text{CH}_4$  e  $\text{CO}_2$ , para os dois ensaios efetuados.

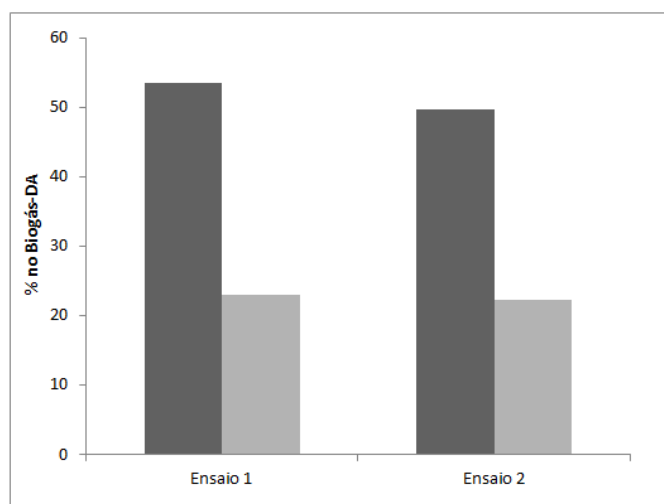


Fig. 4.8 - Composição do biogás-DA produzido em CH<sub>4</sub> (■) e CO<sub>2</sub> (□), para os ensaios de digestão anaeróbia realizados. Condições experimentais: Razão  $V_{\text{fase líquida}}/V_{\text{Total do reator}}=0,8$ , Volume de inóculo =384,65 mL, [Substrato]<sub>inicial</sub>=2,71 gCQO/L<sub>fase líquida</sub>, T(processo)=37°C, Agitação manual (2 vezes/dia)

Os dois reatores foram purgados inicialmente com azoto e a produção de biogás não foi suficientemente elevada para permitir a lavagem completa deste gás, o que explica o seu aparecimento na mistura final. Assim, após a realização dos ensaios foi obtida uma mistura com três gases principais: azoto, metano e dióxido de carbono. Por observação da Fig. 4.8, o primeiro aspeto que deve ser tido em conta é que ambos os ensaios conduziram à produção de um biogás-DA rico em CH<sub>4</sub>, verificando-se uma percentagem de CH<sub>4</sub> ligeiramente maior no primeiro digestor, cerca de 53,39%, face ao segundo onde se registou 49,69%. Estes valores estão concordantes com a composição do biogás referida na secção 2.2.1.4 c). A razão CH<sub>4</sub>/CO<sub>2</sub> apresentou a mesma tendência, com valores de 2,32 e 2,28, respetivamente, o que indica a solubilização duma parte de CO<sub>2</sub> na fase líquida na forma de ácido carbónico.

Contudo, a valorização deste biocombustível poderia aumentar se todo o CO<sub>2</sub> fosse removido, algo benéfico não só porque alargaria o espectro de aplicações possíveis, como também levaria, no caso de combustão do biogás, a uma redução significativa do monóxido de carbono libertado para a atmosfera. Existem inúmeras técnicas que possibilitam a purificação do biogás-DA, com destaque para a absorção e a adsorção como sendo as mais utilizadas (Carvalho, 2010).

Para efeitos de comparação, determinou-se o volume teórico máximo de CH<sub>4</sub> que se poderia obter partindo da quantidade de substrato utilizada para a realização dos ensaios. Para isso, recorreu-se à lei dos gases ideais (Equação 23) para calcular o volume ocupado por uma mole de CH<sub>4</sub>, à temperatura dos processos (37°C). Neste seguimento e sabendo que uma mole de CH<sub>4</sub> corresponde a 64g de CQO e que foram introduzidas 1,19 g de CQO nos digestores, o volume teórico máximo calculado foi de 470 mL. Relacionando este valor com os resultados obtidos, verificou-se uma proximidade de valores para o segundo digestor (435 mL de CH<sub>4</sub>), confirmando que o substrato disponível foi maioritariamente degradado ao longo do processo.

A atividade metanogénica (Equação 24) também foi calculada, para cada um dos digestores, recorrendo ao modelo de Monod e tendo por base o perfil de produção de biogás-DA (Fig. 4.7) e a percentagem de CH<sub>4</sub> (Fig. 4.8).

$$\text{Actividade Metanogénica} = \frac{V_{\text{CH}_4}}{f \times C_0} \quad (24)$$

O  $V_{\text{CH}_4}$  corresponde ao volume de metano produzido por dia e foi obtido pelo produto entre declive máximo das curvas de biogás-DA cumulativo e a percentagem de CH<sub>4</sub> obtida por GC.  $C_0$  representa a

concentração de inóculo introduzido nos reatores (2,63 gSSV/L<sub>fase líquida</sub>).  $f$  é o fator de conversão correspondente ao valor de CQO (g/mL), de acordo com a temperatura a que foi feita a recolha do biogás-DA (25°C e base seca), valor que se encontra tabelado em Field, et al. (1988). Os resultados encontram-se expressos na Tabela 4.9.

Tabela 4.9 – Atividade metanogénica do inóculo utilizado, para os dois digestores em estudo.

	Atividade Metanogénica (gCQO <sub>(CH<sub>4</sub>)</sub> ·g <sup>-1</sup> SSV.d <sup>-1</sup> )
Ensaio 1	0,06
Ensaio 2	0,19

De acordo com a Tabela 4.9, como seria de esperar, a atividade calculada no segundo ensaio é inferior, devido ao menor volume de metano. Sendo os ensaios realizados nas mesmas condições não existem razões para que tenha havido uma alteração significativa no comportamento do inóculo, pelo que a menor atividade aparente é consequência das referidas fugas de gás.

#### 4.2.2.2 Caracterização do efluente

Os valores obtidos para a caracterização das fases líquidas (Secção 3.3.3) resultantes do processo de digestão anaeróbica encontram-se expostos na Tabela 4.10. Para efeitos de avaliação de alterações a nível de compostos poluentes e ter uma perceção da importância da matéria em suspensão, caracterizou-se o efluente no estado natural e após submetido a uma centrifugação.

Tabela 4.10 - Caracterização das fases líquidas resultantes dos dois ensaios de digestão anaeróbia. Condições experimentais: Razão  $V_{\text{fase líquida}}/V_{\text{Total do reator}}=0,8$ , Volume de inóculo = 384,65 mL, [Substrato]<sub>inicial</sub> = 2,71 gCQO/L<sub>fase líquida</sub>, T(processo)=37°C e Agitação manual (2 vezes/dia).

Parâmetros	Ensaio 1		Ensaio 2	
	Com centrifugação	Sem centrifugação	Com centrifugação	Sem centrifugação
pH	7,47		7,30	
ST (g/L)	2,58	2,67	3,32	13,80
SV (g/L)	0,38	0,44	0,42	7,30
CQO (g/L)	0,31	0,97	0,33	3,56
Azoto total (g/L)	0,60	0,69	0,71	1,56
Azoto amoniacal (g/L)	0,59	0,58	0,25	0,80
SST (g/L)	0,30	0,70	0,25	3,62
SSV (g/L)	1,70	0,90	0,50	3,68
AGV's (g/L)	0,16	-	0,12	-

Os valores de pH registados, observando a Tabela 4.10, indicam que os ácidos formados no meio, ao longo do processo, foram metabolizados e convertidos em CH<sub>4</sub> pelo processo de digestão anaeróbia. Pode-se concluir que o ensaio decorreu de forma equilibrada, sem inibição da atividade das bactérias metanogénicas (Mao et al., 2015). Existe uma ligeira diferença entre os valores do pH que pode ser justificada por uma absorção mais acentuada de CO<sub>2</sub> pelo meio, no segundo ensaio (que produziu mais volume de CO<sub>2</sub>), provocando alguma diferença no ponto de equilíbrio da fase líquida com a fase gasosa.

Os resultados, das amostras da centrifugação, exprimem uma diferença mais significativamente no segundo digestor. De facto, em todos os parâmetros, os valores são sempre superiores quando o

efluente não foi centrifugado, algo facilmente explicado pela presença de bactérias metanogénicas. O primeiro digestor, por sua vez, também apresentou valores mais elevados quando o efluente não foi submetido a centrifugação, apesar de a diferença ser menos notória. Contudo, analisando o teor em SSV, os valores não estão concordantes pois é com o efluente centrifugado que o seu valor é maior. A obtenção destes resultados inconsistentes, pode ser justificada pela quantidade de matéria solubilizada no meio, após o processo, o que dificulta a amostragem e interfere com a caracterização do efluente.

Em termos de degradação do substrato, comparando com os valores obtidos para o meio fermentado utilizado como substrato (Tabela 4.3), verificou-se um decréscimo do valor da maioria dos parâmetros referentes à matéria orgânica, o que confirma que o processo de digestão anaeróbia decorreu com sucesso, produzindo o biogás a partir dos compostos poluentes do efluente. A redução no teor em CQO, ST e SV para o primeiro ensaio, com e sem centrifugação, e para o segundo ensaio, com centrifugação, foi bastante acentuada, na ordem dos 90%. O segundo ensaio, sem a centrifugação, também apresentou uma redução no teor em ST e CQO apesar de menos significativos, com o teor em SV a ter sofrido um ligeiro aumento.

Porém, apesar do efluente obtido conter uma menor concentração de compostos poluentes, o abaixamento ainda não foi suficiente para cumprir com os VLE definidos no Decreto-Lei nº296-98 (Anexo XVIII). Contudo, o seu conteúdo ao azoto, composto que não é praticamente removido ao longo do processo mas sim transformado numa forma química mais reduzida (azoto amoniacal), leva-o a ter uma grande aptidão agrícola. Assim, após um tratamento adicional de nitrificação/desnitrificação ou outro equivalente, este efluente pode ser libertado para o meio ambiente, sendo facilmente assimilável pelas plantas.

#### 4.2.2.3 Rendimentos do processo

Na Tabela 4.11 são apresentados os valores de produção biogás e de CH<sub>4</sub> em relação à massa de matéria orgânica (SV), para cada um dos ensaios realizados.

Tabela 4.11- Produção específica de biogás-DA e de CH<sub>4</sub>. Condições experimentais: Razão  $V_{\text{fase líquida}}/V_{\text{Total do reator}}=0,8$ , Volume de inóculo = 384,65 mL, [Substrato]<sub>inicial</sub> = 2,71 gCQO/L<sub>fase líquida</sub>, T(processo)=37°C e Agitação manual (2 vezes/dia).

	Ensaio 1	Ensaio 2
Biogás-DA produzido (mL/gSV <sub>inicial</sub> )	199,90	291,92
CH <sub>4</sub> produzido (mL/gSV <sub>inicial</sub> )	106,72	148,47

Estes valores estão concordantes com os resultados discutidos anteriormente, dado que foi no segundo ensaio que os volumes obtidos foram superiores, tanto para o biogás-DA como para o CH<sub>4</sub>, levando, por isso, a uma produção específica igualmente superior.

Contudo, os resultados obtidos são significativamente baixos quando comparados por, exemplo, com a produção específica obtida para substratos agrícolas como a batata (376-400 mL CH<sub>4</sub>/gSV), a colza (240-340 mL CH<sub>4</sub>/gSV), a cevada (353-658 mL CH<sub>4</sub>/gSV), entre outros (Braun et al., 2009).

## 5. Conclusões e sugestões para trabalho futuro

O objetivo desta dissertação centrou-se no estudo da aplicação de um sistema fermentativo anaeróbio integrado, para valorização de um subproduto da indústria de produção de biodiesel – glicerina semi-refinada – por produção de dois biocombustíveis gasosos, o bioH<sub>2</sub> e o bioCH<sub>4</sub>, por DF e DA, respetivamente, e resultando num efluente com menor carga poluente (< CQO), cumprindo com êxito os objetivos estabelecidos inicialmente.

Inicialmente, procedeu-se à otimização das condições operacionais e físico químicas para degradar concentrações crescentes de glicerina semi-refinada ( $\approx 10, 20$  e  $30 \text{ g}_{\text{glicerol}}/\text{L}_{\text{MF}}$ ) e de inóculo (1 e 10%, v/v), utilizando como microrganismo fermentativo uma estirpe da bactéria *Enterobacter aerogenes*. O biogás-DF produzido foi analisado em termos da sua composição, grau de pureza e rendimento específico e o perfil de produção de bioH<sub>2</sub> foi ajustado ao modelo teórico de Gompertz, para determinação de parâmetros cinéticos. A caracterização dos meios líquidos fermentados proporcionou a seleção do efluente mais adequado para posterior utilização, como substrato, no processo de digestão anaeróbia.

A Tabela 5.1 sintetiza os parâmetros considerados como mais relevantes na avaliação da primeira etapa deste processo integrado.

Tabela 5.1- Parâmetros avaliados na caracterização do sistema biológico de *dark fermentation*, para produção de bioH<sub>2</sub> a partir de diferentes concentrações iniciais de glicerina semi-refinada e de um inóculo de células de *E. aerogenes*.

Inoculação % (v/v)	Parâmetros	Concentração inicial de substrato ( $\text{g}_{\text{glicerol}}/\text{L}_{\text{MF}}$ )		
		10	20	30
1	H <sub>2</sub> final (mL)	746,60	1014,56	951,48
	Velocidade de produção inicial (mL H <sub>2</sub> /h)	94,80	148,44	173,47
	Produtividade (mL H <sub>2</sub> /L.h)	307,29	353,72	457,83
	(H <sub>2</sub> /CO <sub>2</sub> ) <sub>máx</sub> – 4h de processo	2,03	2,06	2,43
	$\eta$ (mL H <sub>2</sub> /g glicerol consumido)	99,06	82,51	50,91
10	H <sub>2</sub> final (mL)	725,37	895,63	919,56
	Velocidade de produção inicial (mL H <sub>2</sub> /h)	156,26	173,69	227,02
	Produtividade (mL H <sub>2</sub> /L.h)	301,39	308,80	381,17
	(H <sub>2</sub> /CO <sub>2</sub> ) <sub>máx</sub> – 4h de processo	1,33	1,54	2,00
	$\eta$ (mL H <sub>2</sub> /g glicerol consumido)	94,76	71,39	59,72

O primeiro aspeto que deve realçado é que, tal como verificado por outros autores (Markov et al., 2011; Mira, 2012), as células de *Enterobacter aerogenes* mostraram um desempenho eficiente na conversão de um subproduto industrial num biocombustível gasoso com elevado potencial energético (bioH<sub>2</sub>), mesmo para concentrações iniciais de substrato consideradas inibitórias ( $> 20 \text{ g}_{\text{glicerol}}/\text{L}_{\text{MF}}$ ). De facto, apesar de na composição da glicerina semi-refinada haver presença de outros compostos, além do glicerol, o microrganismo fermentativo mostrou eficiência para as concentrações iniciais de subproduto industrial estudadas. Estes resultados favorecem a hipótese de aplicação deste processo biológico como um método de tratamento de resíduos com o acréscimo de não haver produção de compostos poluentes mas sim, de um combustível renovável.

Conclui-se também, a partir da Tabela 5.1, que foi a concentração de células inoculadas correspondente a de 1% (v/v) que conduziu à produção mais elevada de bioH<sub>2</sub>, a partir de uma concentração inicial de  $\approx 20 \text{ g}_{\text{glicerol}}/\text{L}_{\text{MF}}$ . Contudo, a velocidade inicial de produção de bioH<sub>2</sub> foi sempre mais elevada quando a fase líquida de fermentação foi inoculada com a concentração de biomassa 10 vezes superior (10%, v/v). Por outro lado, verificou-se que a velocidade inicial de

produção de  $\text{bioH}_2$  aumentou com o aumento da concentração inicial de substrato adicionada, para duas as concentrações de inóculo, o que indicia um bom desempenho das bactérias, mesmo em presença de concentrações de glicerina semi-refinada tão elevadas quanto  $\approx 30 \text{ g}_{\text{glicerol}}/\text{L}_{\text{MF}}$ , apesar de esse aumento não ter sido proporcional, devido com certeza a efeitos de inibição por substrato.

Quanto à variação da produtividade do processo com as condições estudadas, essa apresentou valores crescentes com o aumento da concentração inicial de substrato (glicerina semi-refinada), o que demonstra, mais uma vez, o bom desempenho do inóculo puro utilizado neste estudo (Tabela 5.1), para ambas as concentrações inoculadas (1 e 10%, v/v). Por outro lado, verificou-se que a produtividade alcançada no sistema foi sempre mais elevada para a menor percentagem de células inoculadas (1%, v/v), em presença de todas as concentrações iniciais de substrato estudadas. Acresce que essa diferença de valores aumentou com o aumento da concentração em glicerol, tornando-se mais evidente quando se avaliou o desempenho da bactéria em presença de  $30 \text{ g}_{\text{glicerol}}/\text{L}_{\text{MF}}$ , para um inóculo de 1 ( $457,83 \text{ mLH}_2/\text{L.h}$ ) e 10% (v/v) ( $381,17 \text{ mLH}_2/\text{L.h}$ ).

Este comportamento cruzado com o que foi referido para a velocidade inicial de produção de  $\text{bioH}_2$  (Tabela 5.1) sugere que, se por um lado uma maior concentração de inóculo (10%, v/v) contribuiu para o maior incremento da velocidade inicial de produção de  $\text{bioH}_2$  de  $167,17 \text{ mL H}_2/\text{h}$  para  $227,74 \text{ mL H}_2/\text{h}$ , quando se fermentaram  $\approx 10 \text{ g}_{\text{glicerol}}/\text{L}_{\text{MF}}$  e  $\approx 30 \text{ g}_{\text{glicerol}}/\text{L}_{\text{MF}}$ , respetivamente, por outro lado, a diferença de valores discutida acima, para a variação das produtividades do processo, reflete a possibilidade de um inóculo mais concentrado ter “desviado” uma parte mais significativa do substrato consumido para crescimento celular e não para produzir  $\text{bioH}_2$ , em comparação o inóculo de 1% (v/v).

Resta acrescentar que a variação dos parâmetros que caracterizaram as fases gasosas produzidas nas diferentes condições operacionais e físico-químicas e que estão apresentados na Tabela 5.1, está coerente com a variação observada para as correspondentes fases líquidas resultantes do processo, particularmente em termos dos seus conteúdos em CQO, SV e ST (Secção 4.1.3.1).

Em suma, da otimização de parâmetros levada a cabo para o processo de DF (primeira fase do sistema integrado), concluiu-se que as condições que conduziram à maior produção de  $\text{bioH}_2$  corresponderam a uma concentração de biomassa de 1% (v/v) e uma concentração inicial de substrato de  $\approx 20 \text{ g}_{\text{glicerol}}/\text{L}_{\text{MF}}$ . Contudo, não foi meio resultante destas condições que foi selecionado, como substrato, para o processo de digestão anaeróbia. Efetivamente, devido à ação inibidora do glicerol sobre o processo de digestão anaeróbia, optou-se por testar o meio fermentado que resultou da fermentação de  $10 \text{ g}_{\text{glicerol}}/\text{L}_{\text{MF}}$  com o inóculo de 1% (v/v), por ser neste meio que a concentração de glicerol foi menor ( $0,20 \text{ g/L}$ ). Aliás, neste trabalho o objetivo de integração do processo de DF foi também conduzir à diminuição da concentração em glicerol no meio fermentado, contribuindo para a sua conversão por DA, com produção de outro importante vetor energético (biogás-AD;  $\text{CH}_4 + \text{CO}_2$ ).

Relativamente à digestão anaeróbia (segunda fase do processo integrado), os resultados obtidos, revelam que o consórcio de bactérias mesófilas utilizado neste trabalho demonstrou um bom desempenho de conversão do meio resultante da primeira fase do processo (DF) em biogás-DA. A atividade metabólica iniciou imediatamente (logo a partir do primeiro dia do processamento) indicando uma ótima adaptação ao substrato. O rendimento máximo obtido, por sua vez, apresentou um valor de  $148,47 \text{ mL CH}_4/\text{gSV}_{\text{Inicial}}$ .

A utilização de lamas biológicas (consórcio bacteriano) como inóculo para a produção de  $\text{bioCH}_4$  foi outro dos aspetos positivos deste trabalho experimental. Isto porque existem muitos digestores de lamas disponíveis no país que poderão acolher e tratar em codigestão o meio fermentado pelo primeiro processo.

O processo fermentativo anaeróbio integrado estudados neste trabalho é inovador, quer em termos da sequência de processos aplicados quer na seleção do subproduto industrial utilizado como substrato (Ghimire et al., 2015). Nesse aspeto, considera-se que este processo constitui um promissor ponto de

partida para a valorização de resíduos industriais, com abaixamento da sua carga poluente e produção de vetores energéticos que possam contribuir para uma menor dependência dos combustíveis fósseis, conforme os objetivos criados no plano de atividades definido para esta dissertação.

Por fim, conclui-se que, de facto, a aplicação futura deste sistema integrado é uma opção viável e que o desenvolvimento de estudos posteriores que possibilitem melhores rendimentos de produção de  $\text{bioH}_2$  e de  $\text{bioCH}_4$ , e de grau de pureza e abaixamento da carga orgânica é algo a considerar. Neste sentido, as sugestões propostas para trabalho futuro são:

- ✓ Estudar a aplicação deste processo para degradar concentrações superiores de glicerina semi-refinada, considerando a hipótese de alterar a concentração de inóculo, recorrendo à metodologia do DCC (desenho composto central) para seleção do sistema mais eficiente.
- ✓ Avaliação da diminuição da concentração do glicerol, ao longo do tempo de processo e determinação de parâmetros cinéticos;
- ✓ Realização da digestão anaeróbia com outro regime de temperatura, nomeadamente, o termófilo;
- ✓ Avaliação da possibilidade de aplicação dos biocombustíveis gasosos resultantes do processo integrado, para fins energéticos;
- ✓ Substituição do termostato por um coletor solar térmico, para efeitos de controlo de temperatura, com o objetivo de diminuição dos gastos energéticos envolvidos no processo.

## 6. Referências

- Åhman, M. (2010). Biomethane in the transport sector-An appraisal of the forgotten option. *Energy Policy*, 38(1), 208–217. doi:10.1016/j.enpol.2009.09.007
- Alonso, R. (2014). *Codigestión Anaerobia de lodos de depuradora y residuos vegetales de cultivos energéticos. Estrategias para mejorar la producción de biogás*. Universidade de Cádiz.
- Álvarez, G. Q. (2014). *Codigestion Anaerobia de Residuos Ganaderos con Residuos Urbanos e Industriales*. Universidade de Oviedo.
- Alves, H. J., Bley Junior, C., Niklevicz, R. R., Frigo, E. P., Frigo, M. S., & Coimbra-Araújo, C. H. (2013). Overview of hydrogen production technologies from biogas and the applications in fuel cells. *International Journal of Hydrogen Energy*, 38(13), 5215–5225. doi:10.1016/j.ijhydene.2013.02.057
- APA. (2015). Agência Portuguesa do Ambiente. Retrieved June 18, 2015, from <http://www.apambiente.pt/>
- Argun, H., & Kargi, F. (2011). Bio-hydrogen production by different operational modes of dark and photo-fermentation: An overview. *International Journal of Hydrogen Energy*, 36(13), 7443–7459. doi:10.1016/j.ijhydene.2011.03.116
- Association, A. P. H., Association, A. W. W., e Federation, W. E. (1999). “Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater.”
- Ayoub, M., & Abdullah, A. Z. (2012). Critical review on the current scenario and significance of crude glycerol resulting from biodiesel industry towards more sustainable renewable energy industry. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 16(5), 2671–2686. doi:10.1016/j.rser.2012.01.054
- Azwar, M. Y., Hussain, M. a., & Abdul-Wahab, a. K. (2014). Development of biohydrogen production by photobiological, fermentation and electrochemical processes: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 31, 158–173. doi:10.1016/j.rser.2013.11.022
- Bhandari, R., Trudewind, C. a., & Zapp, P. (2013). Life cycle assessment of hydrogen production via electrolysis - a review. *Journal of Cleaner Production*, XXX, 1–13. doi:10.1016/j.jclepro.2013.07.048
- Bičáková, O., & Straka, P. (2012). Production of hydrogen from renewable resources and its effectiveness. *International Journal of Hydrogen Energy*, 37(16), 11563–11578. doi:10.1016/j.ijhydene.2012.05.047
- Bioenergy, I. (2014). *Biomethane. Status and Factors Affecting Market Development and Trade* (pp. 1–92).
- BMW. (2006). *BMW Hydrogen 7*. (p. 76).
- Bordelanne, O., Montero, M., Bravin, F., Prieur-Vernat, A., Oliveti-Selmi, O., Pierre, H., ... Muller, T. (2011). Biomethane CNG hybrid: A reduction by more than 80% of the greenhouse gases emissions compared to gasoline. *Journal of Natural Gas Science and Engineering*, 3(5), 617–624. doi:10.1016/j.jngse.2011.07.007

- Braun, R., Holm-nielsen, J. B., Commission, E., Baxter, D., & Marchais, C. (2009). *Biogas from Energy Crop Digestion* (p. 20).
- Cai, G., Jin, B., Monis, P., & Saint, C. (2011). Metabolic flux network and analysis of fermentative hydrogen production. *Biotechnology Advances*, 29(4), 375–387. doi:10.1016/j.biotechadv.2011.02.001
- Carrapato, R. M. G. (2010). *Produção de biodiesel a partir de óleos alimentares usados por via alcalina : o caso de estudo da FCT-UNL*. Universidade Nova de Lisboa.
- Carvalho, L. J. I. da C. L. (2010). *Avaliação do Potencial de Produção de Biogás a partir de Biomassa proveniente de Culturas dedicadas e de Lamas de ETARI*. Universidade Técnica de Lisboa.
- Cecere, D., Giacomazzi, E., & Ingenito, a. (2014). A review on hydrogen industrial aerospace applications. *International Journal of Hydrogen Energy*, 39(20), 10731–10747. doi:10.1016/j.ijhydene.2014.04.126
- Chen, J. L., Ortiz, R., Steele, T. W. J., & Stuckey, D. C. (2014). Toxicants inhibiting anaerobic digestion: A review. *Biotechnology Advances*, 32(8), 1523–1534. doi:10.1016/j.biotechadv.2014.10.005
- Chen, Y., Cheng, J. J., & Creamer, K. S. (2008). Inhibition of anaerobic digestion process: a review. *Bioresource Technology*, 99(10), 4044–4064. doi:10.1016/j.biortech.2007.01.057
- Chong, M. L., Sabaratnam, V., Shirai, Y., & Hassan, M. A. (2009). Biohydrogen production from biomass and industrial wastes by dark fermentation. *International Journal of Hydrogen Energy*, 34(8), 3277–3287. doi:10.1016/j.ijhydene.2009.02.010
- Cipriani, G., Di Dio, V., Genduso, F., La Cascia, D., Liga, R., Miceli, R., & Ricco Galluzzo, G. (2014). Perspective on hydrogen energy carrier and its automotive applications. *International Journal of Hydrogen Energy*, 39(16), 8482–8494. doi:10.1016/j.ijhydene.2014.03.174
- Correia, R. M. de S. C. (2009). *Produção de biohidrogénio por fermentação anaeróbia , an a partir de resíduos fermentescíveis*. Universidade de Lisboa.
- Das, D., & Veziroglu, T. (2008). Advances in biological hydrogen production processes. *International Journal of Hydrogen Energy*, 33(21), 6046–6057. doi:10.1016/j.ijhydene.2008.07.098
- De Gioannis, G., Muntoni, a., Poletti, a., & Pomi, R. (2013). A review of dark fermentative hydrogen production from biodegradable municipal waste fractions. *Waste Management*, 33(6), 1345–1361.
- Direcção Geral de Energia e Geologia. (2014). *Renováveis - Estatísticas rápidas* (Vol. 117, p. 22).
- Elsharnouby, O., Hafez, H., Nakhla, G., & El Naggar, M. H. (2013). A critical literature review on biohydrogen production by pure cultures. *International Journal of Hydrogen Energy*, 38(12), 4945–4966. doi:10.1016/j.ijhydene.2013.02.032
- Energy, M. (2015). MSH Energy. Retrieved February 01, 2015, from <http://mshenergi.co.id/bio.php>
- Estevão, T. E. R. (2008). *O Hidrogénio como combustível*. Universidade do Porto.

- Fayaz, H., Saidur, R., Razali, N., Anuar, F. S., Saleman, a. R., & Islam, M. R. (2012). An overview of hydrogen as a vehicle fuel. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 16(8), 5511–5528. doi:10.1016/j.rser.2012.06.012
- Field, J., Alvarez, R., & Lettinga, G. (1988). *Ensayos Anaerobios, Actas 4º Seminário de Depuración Anaerobia de Aguas Residuales*. Secretariado de Publicaciones de la Universidad de Valladolid.
- Fradler, K. R., Kim, J. R., Shipley, G., Massanet-Nicolau, J., Dinsdale, R. M., Guwy, A. J., & Premier, G. C. (2014). Operation of a bioelectrochemical system as a polishing stage for the effluent from a two-stage biohydrogen and biomethane production process. *Biochemical Engineering Journal*, 85, 125–131. doi:10.1016/j.bej.2014.02.008
- Frischauf, N., Acosta-Iborra, B., Harskamp, F., Moretto, P., Malkow, T., Honselaar, M., ... Soucek, A. (2013). The hydrogen value chain: applying the automotive role model of the hydrogen economy in the aerospace sector to increase performance and reduce costs. *Acta Astronautica*, 88, 8–24. doi:10.1016/j.actaastro.2013.01.002
- Gahleitner, G. (2013). Hydrogen from renewable electricity: An international review of power-to-gas pilot plants for stationary applications. *International Journal of Hydrogen Energy*, 38(5), 2039–2061. doi:10.1016/j.ijhydene.2012.12.010
- Ghimire, A., Frunzo, L., Pirozzi, F., Trably, E., Escudie, R., Lens, P. N. L., & Esposito, G. (2015). A review on dark fermentative biohydrogen production from organic biomass: Process parameters and use of by-products. *Applied Energy*, 144, 73–95. doi:10.1016/j.apenergy.2015.01.045
- Guwy, A. J., Dinsdale, R. M., Kim, J. ., Massanet-Nicolau, J., & Premier, G. (2011). Fermentative biohydrogen production systems integration. *Bioresource Technology*, 102(18), 8534–8542. doi:10.1016/j.biortech.2011.04.051
- Hallenbeck, P. C., Abo-Hashesh, M., & Ghosh, D. (2012). Strategies for improving biological hydrogen production. *Bioresource Technology*, 110, 1–9. doi:10.1016/j.biortech.2012.01.103
- IBEROL. (2011). *IBEROL - Sociedade Ibérica de Oleaginosas, SARL* (pp. 1–17). Lisboa.
- INGENIEURE, V. D. (2006). *Fermentation of organic materials. Characterisation of the substrate, sampling, collection of material data, fermentation tests* (p. 92).
- Ito, T., Nakashimada, Y., Senba, K., Matsui, T., & Nishio, N. (2005). Hydrogen and ethanol production from glycerol-containing wastes discharged after biodiesel manufacturing process. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 100(3), 260–265. doi:10.1263/jbb.100.260
- Jung, K.-W., Kim, D.-H., Kim, S.-H., & Shin, H.-S. (2011). Bioreactor design for continuous dark fermentative hydrogen production. *Bioresource Technology*, 102(18), 8612–8620. doi:10.1016/j.biortech.2011.03.056
- Kapdan, I. K., & Kargi, F. (2006). Bio-hydrogen production from waste materials. *Enzyme and Microbial Technology*, 38(5), 569–582. doi:10.1016/j.enzmictec.2005.09.015
- Kim, D., & Kim, M. (2011). Hydrogenases for biological hydrogen production. *Bioresource Technology*, 102(18), 8423–8431. doi:10.1016/j.biortech.2011.02.113
- Lavado, A. L. C. (2009). *Os Actuais Desafios da Energia. Implementação e Utilização das Energias Renováveis*. Universidade de Lisboa.

- Lee, H.-S., Vermaas, W. F. J., & Rittmann, B. E. (2010). Biological hydrogen production: prospects and challenges. *Trends in Biotechnology*, 28(5), 262–271. doi:10.1016/j.tibtech.2010.01.007
- Lemos, S. F. C. (2011). *Análise ao Sistema de Efluentes da Celbi. Avaliação da Actividade Microbiológica*. Universidade de Coimbra.
- Lourenço, R. D. F. (2012). *Valorização de resíduos agro-industriais para a produção biológica de hidrogénio*. Universidade de Lisboa.
- Madsen, M., Holm-Nielsen, J. B., & Esbensen, K. H. (2011). Monitoring of anaerobic digestion processes: A review perspective. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 15(6), 3141–3155. doi:10.1016/j.rser.2011.04.026
- Mao, C., Feng, Y., Wang, X., & Ren, G. (2015). Review on research achievements of biogas from anaerobic digestion. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 45, 540–555. doi:10.1016/j.rser.2015.02.032
- Markov, S. a., Averitt, J., & Waldron, B. (2011). Bioreactor for glycerol conversion into H<sub>2</sub> by bacterium *Enterobacter aerogenes*. *International Journal of Hydrogen Energy*, 36(1), 262–266. doi:10.1016/j.ijhydene.2010.09.090
- Marques, P.A.S.S., Bartolomeu, M.L., Tomé, M.M., Neves, L. M. (2009). Bio-hydrogen production from glycerol by a strain of *Enterobacter aerogenes*. In *Livro de procedings do Congresso HYPOTHESIS VIII* (pp. 1–5). Lisboa.
- Miguel, A. L. R. (2012). *Tratamento de Águas Residuais Urbanas com recurso a processos em série de precipitação química e neutralização natural*. Instituto Politécnico de Beja.
- Mira, M. M. P. (2012). *Produção de biohidrogénio a partir de diferentes fontes de carbono , por fermentação anaeróbia*. Universidade Nova de Lisboa.
- Najjar, Y. S. H. (2013). Hydrogen safety: The road toward green technology. *International Journal of Hydrogen Energy*, 38(25), 10716–10728. doi:10.1016/j.ijhydene.2013.05.126
- Nations, U. (2015). Framework Convention on Climate change. Retrieved June 18, 2015, from <http://maps.unfccc.int/di/map/>
- Nunes, G. (2010). *Caracterização de pilha de combustível de hidrogénio e monitorização de célula individual*.
- Oncel, S., & Vardar-Sukan, F. (2011). Application of proton exchange membrane fuel cells for the monitoring and direct usage of biohydrogen produced by *Chlamydomonas reinhardtii*. *Journal of Power Sources*, 196(1), 46–53. doi:10.1016/j.jpowsour.2010.07.042
- Queirós, A. I. da S. B. M. (2009). *Produção de Metanol a partir de Biomassa Vegetal : Um novo processo integrado Tese de Mestrado*. Universidade do Porto.
- Quispe, C. a. G., Coronado, C. J. R., & Carvalho Jr., J. a. (2013). Glycerol: Production, consumption, prices, characterization and new trends in combustion. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 27, 475–493. doi:10.1016/j.rser.2013.06.017
- Reith, J. ., Wijffels, R. H., & Bartee, H. (Eds.). (2003). *Bio-methane & Bio-hydrogen. Status and perspectives of biological methane and hydrogen production* (p. 167). Dutch Biological Hydrogen Foundation.

- Sangeeta, Moka, S., Pande, M., Rani, M., Gakhar, R., Sharma, M., ... Bhaskarwar, A. N. (2014). Alternative fuels: An overview of current trends and scope for future. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 32, 697–712. doi:10.1016/j.rser.2014.01.023
- Sarma, S. J., Brar, S. K., Sydney, E. B., Le Bihan, Y., Buelna, G., & Soccol, C. R. (2012). Microbial hydrogen production by bioconversion of crude glycerol: A review. *International Journal of Hydrogen Energy*, 37(8), 6473–6490. doi:10.1016/j.ijhydene.2012.01.050
- Sen, S., Koley, I., & Chowdhury, P. (2013). MODELLING , SIMULATION AND CONTROL OF A NON CONVENTIONAL FUEL CELL POWER GENERATION SYSTEM BY VARYING OXYGEN. *Internacional Journal of Advanced Research in Electrical, Electronics and Instrumentation Engineering*, 2(4), 1231–1239.
- Singh, S., Sudhakaran, A. K., Sarma, P. M., Subudhi, S., Mandal, A. K., Gandham, G., & Lal, B. (2010). Dark fermentative biohydrogen production by mesophilic bacterial consortia isolated from riverbed sediments. *International Journal of Hydrogen Energy*, 35(19), 10645–10652. doi:10.1016/j.ijhydene.2010.03.010
- Tan, H. W., Abdul Aziz, a. R., & Aroua, M. K. (2013). Glycerol production and its applications as a raw material: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 27, 118–127. doi:10.1016/j.rser.2013.06.035
- Toyota Global Site | Fuel Cell Vehicle. (n.d.). Retrieved January 31, 2015, from [http://www.toyota-global.com/innovation/environmental\\_technology/fuelcell\\_vehicle/](http://www.toyota-global.com/innovation/environmental_technology/fuelcell_vehicle/)
- Verhelst, S. (2014). Recent progress in the use of hydrogen as a fuel for internal combustion engines. *International Journal of Hydrogen Energy*, 39(2), 1071–1085. doi:10.1016/j.ijhydene.2013.10.102
- Viana, M. B., Freitas, a. V., Leitão, R. C., Pinto, G. a. S., & Santaella, S. T. (2012). Anaerobic digestion of crude glycerol: a review. *Environmental Technology Reviews*, 1(1), 81–92. doi:10.1080/09593330.2012.692723
- Wang, B., Wan, W., & Wang, J. (2008). Inhibitory effect of ethanol, acetic acid, propionic acid and butyric acid on fermentative hydrogen production. *International Journal of Hydrogen Energy*, 33(23), 7013–7019. doi:10.1016/j.ijhydene.2008.09.027
- Wang, J., & Wan, W. (2008). Optimization of fermentative hydrogen production process by response surface methodology. *International Journal of Hydrogen Energy*, 33(23), 6976–6984. doi:10.1016/j.ijhydene.2008.08.051
- Wang, J., & Wan, W. (2009). Factors influencing fermentative hydrogen production: A review. *International Journal of Hydrogen Energy*, 34(2), 799–811. doi:10.1016/j.ijhydene.2008.11.015
- Wang, J., & Wan, W. (2009). Kinetic models for fermentative hydrogen production : A review. *International Journal of Hydrogen Energy*, 34(8), 3313–3323. doi:10.1016/j.ijhydene.2009.02.031
- Wang, J., & Wan, W. (2011). Combined effects of temperature and pH on biohydrogen production by anaerobic digested sludge. *Biomass and Bioenergy*, 35(9), 3896–3901. doi:10.1016/j.biombioe.2011.06.016
- Wang, M., Wang, Z., Gong, X., & Guo, Z. (2014). The intensification technologies to water electrolysis for hydrogen production - A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 29, 573–588. doi:10.1016/j.rser.2013.08.090

- Won, S. G., & Lau, A. K. (2011). Effects of key operational parameters on biohydrogen production via anaerobic fermentation in a sequencing batch reactor. *Bioresource Technology*, 102(13), 6876–6883. doi:10.1016/j.biortech.2011.03.078
- Wong, Y. M., Wu, T. Y., & Juan, J. C. (2014). A review of sustainable hydrogen production using seed sludge via dark fermentation. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 34, 471–482. doi:10.1016/j.rser.2014.03.008
- Zhang, C., Lv, F. X., & Xing, X. H. (2011). Bioengineering of the *Enterobacter aerogenes* strain for biohydrogen production. *Bioresource Technology*, 102(18), 8344–8349. doi:10.1016/j.biortech.2011.06.018

## 7. Anexos

### 7.1 Caracterização do meio de fermentação com e sem glicerina semi-refinada

Tabela 7.1 - Composição do meio de fermentação após esterilização (T=120°C, P=2bar e t=20min) contendo a glicerina semi-refinada.

Composto (g/L)	Concentração inicial de substrato (g <sub>glicerol</sub> /L <sub>MF</sub> )		
	≈10	≈20	≈30
ST	20,04 ± 0,27	39,11 ± 2,39	51,35 ± 3,07
SV	8,59 ± 0,39	24,83 ± 2,38	36,20 ± 2,87
CQO	19,84 ± 1,10	27,79 ± 2,69	46,38 ± 0,18
Azoto total	1,37 ± 0,11	1,40	1,36
Azoto Amoniacal	0,26 ± 0,26	0,23 ± 0,23	0,24
Ácido Succínico	0,09 ± 0,01	0,14 ± 0,00	0,14 ± 0,00
Ácido Láctico	0,24	0,02	-
Ácido Fórmico	0,40 ± 0,06	0,10 ± 0,01	-
Ácido Acético	0,26 ± 0,04	0,18 ± 0,01	0,26 ± 0,14
Ácido Propiónico	0,49 ± 0,10	0,44 ± 0,02	0,36 ± 0,01
Glicerol	7,73 ± 0,60	25,57 ± 0,54	20,27 ± 1,55
Etanol	1,01 ± 0,04	0,12 ± 0,04	0,10 ± 0,02

## 7.2 Equação de Gompertz

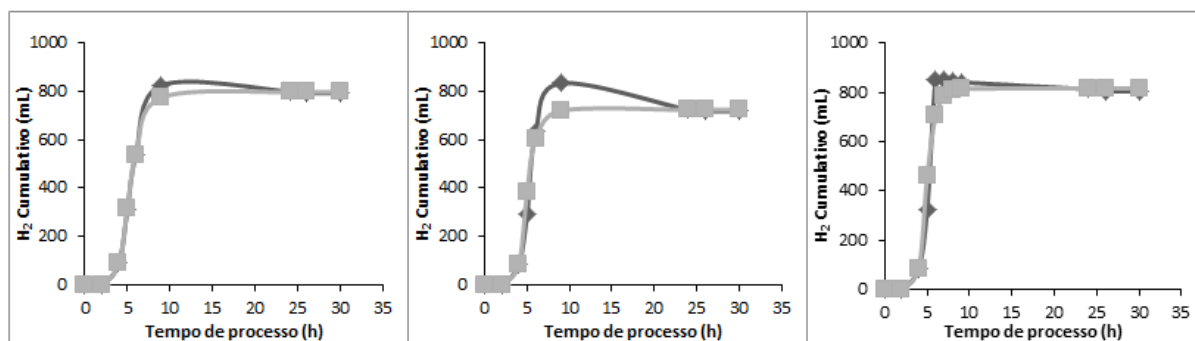


Fig. 7.1 - Perfil de produção de bioH<sub>2</sub> para ensaios de *dark fermentation* realizados a partir de uma concentração de substrato de  $\approx 10$  g<sub>glicerol</sub>/L<sub>MF</sub> e de um volume de PI de 1% (v/v) (◆). Comparação com os resultados calculados por meio da equação de Gompertz modificada (■).

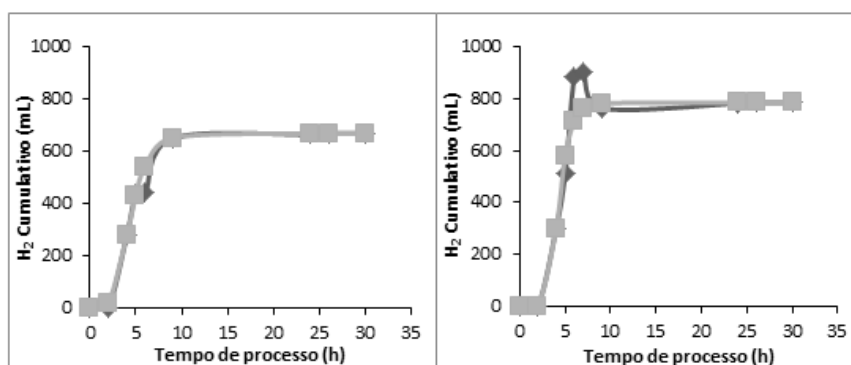


Fig. 7.2 - Perfil de produção de bioH<sub>2</sub> para ensaios de *dark fermentation* realizados a partir de uma concentração de substrato de  $\approx 10$  g<sub>glicerol</sub>/L<sub>MF</sub> e de um volume de PI de 10% (v/v) (◆). Comparação com os resultados calculados por meio da equação de Gompertz modificada (■).

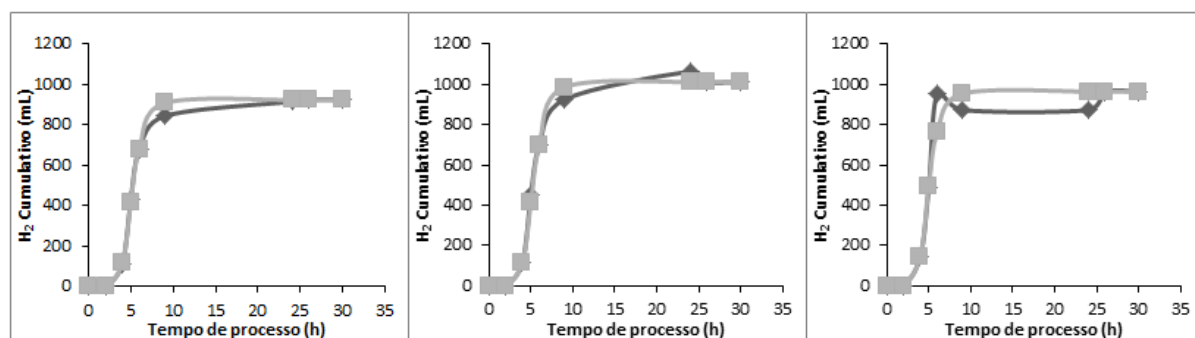


Fig. 7.3 - Perfil de produção de bioH<sub>2</sub> para ensaios de *dark fermentation* realizados a partir de uma concentração de substrato de  $\approx 20$  g<sub>glicerol</sub>/L<sub>MF</sub> e de um volume de PI de 1% (v/v) (◆). Comparação com os resultados calculados por meio da equação de Gompertz modificada (■).

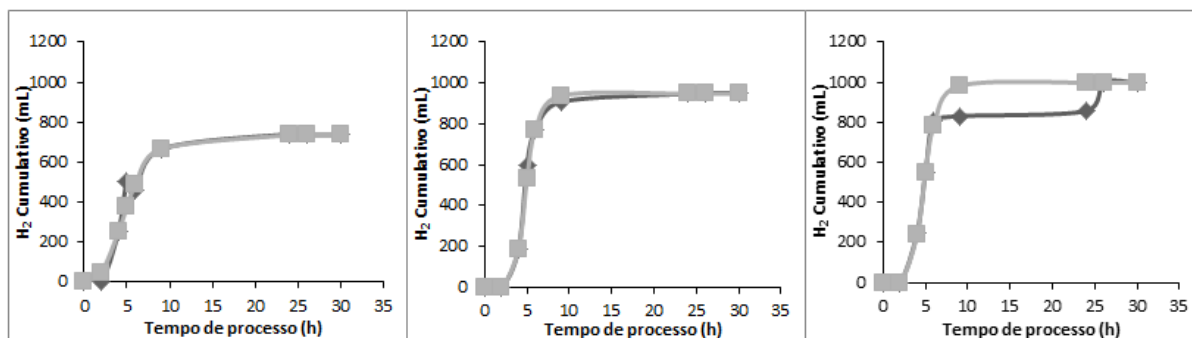


Fig. 7.4 - Perfil de produção de bioH<sub>2</sub> para ensaios de *dark fermentation* realizados a partir de uma concentração de substrato de  $\approx 20 \text{ g}_{\text{glicerol}}/\text{L}_{\text{MF}}$  e de um volume de PI de 10% (v/v) (♦). Comparação com os resultados calculados por meio da equação de Gompertz modificada (■).

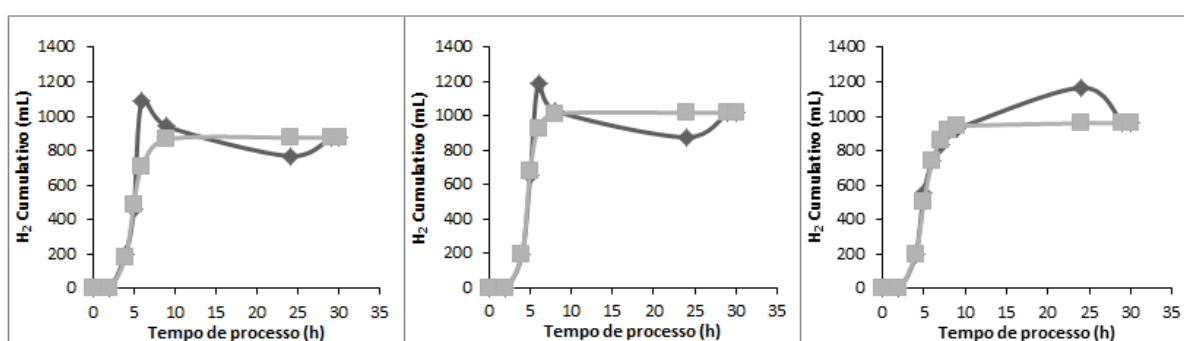


Fig. 7.5 - Perfil de produção de bioH<sub>2</sub> para ensaios de *dark fermentation* realizados a partir de uma concentração de substrato de  $\approx 30 \text{ g}_{\text{glicerol}}/\text{L}_{\text{MF}}$  e de um volume de PI de 1% (v/v) (♦). Comparação com os resultados calculados por meio da equação de Gompertz modificada (■).

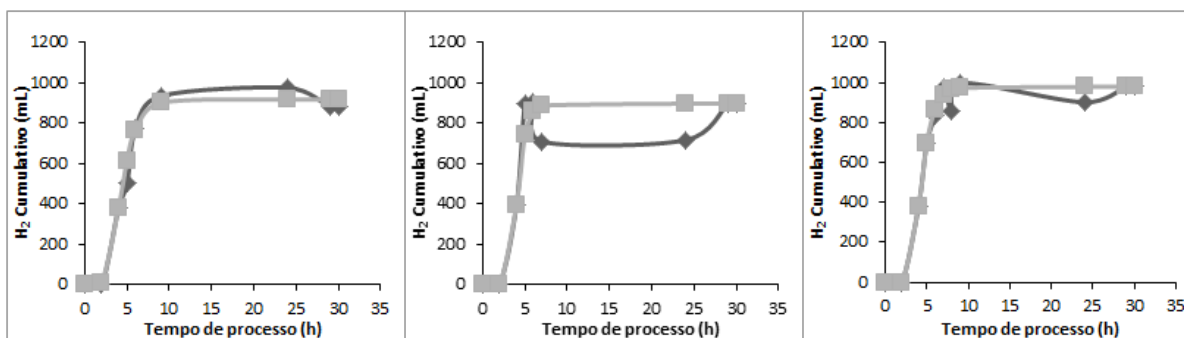


Fig. 7.6 - Perfil de produção de bioH<sub>2</sub> para ensaios de *dark fermentation* realizados a partir de uma concentração de substrato de  $\approx 30 \text{ g}_{\text{glicerol}}/\text{L}_{\text{MF}}$  e de um volume de PI de 10% (v/v) (♦). Comparação com os resultados calculados por meio da equação de Gompertz modificada (■).