

Mestrado Integrado em Engenharia do Ambiente 2014/2015

**Digestão Anaeróbia de resíduos gerados na FEUP:  
Relva e Glicerol**

Helder Tiago Alves Amorim

Dissertação para obtenção do grau de Mestre em  
**Engenharia do Ambiente**

---

**Orientador:** Doutor Manuel Fernando Ribeiro Pereira

Diretor de Curso de Mestrado Integrado em Engenharia do Ambiente

Membro Integrado do Laboratório de Processos de Separação e Reação – Laboratório de Catálise e  
Materiais

**Co-orientador:** Doutor Rui Alfredo da Rocha Boaventura

Investigador Principal Convidado - FEUP

**Co-orientador:** Doutora Tatiana Andréevna Pozdniakova

Investigadora do Laboratório de Processos de Separação e Reação – Laboratório de Catálise e Materiais

Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto

**Porto, Outubro de 2015**

---



*“The environment is everything that isn’t me”*

Albert Einstein

---



## Agradecimentos

Em primeiro lugar, queria agradecer profundamente aos meus orientadores por me permitirem o embarque tardio neste projeto. Ao meu orientador professor Fernando Pereira, por toda a disponibilidade e apoio sempre que requisitado, mas sobretudo pela motivação e positividade transmitidas que foram fulcrais durante este projeto. Além da cedência dos equipamentos para análise do biogás queria agradecer ao meu co-orientador professor Rui Boaventura, que após uma longa carreira académica demonstra que a idade é apenas um número, encontrando-se sempre disponível em transmitir a sua vasta experiência e sabedoria, fatores que foram determinantes em certas etapas do projeto. À minha co-orientadora, Tatiana Pozdniakova por fornecer todas as instruções necessárias durante o arranque e decorrer de todo o trabalho experimental, mas não fica por aqui, estou profunda e eternamente grato por toda a compreensão, disponibilidade mesmo quando sobrecarregada e já em regime de “horas extra”, paciência e motivação nas alturas em que o tempo e o trabalho são inversamente proporcionais. Um sincero e enorme obrigado aos três.

Não menos importante foi todo o apoio técnico garantido pela Dona Maria do Céu, pela Eng.<sup>a</sup> Cristina Nunes e em especial pela Eng.<sup>a</sup> Liliana Pereira e pelo Eng. Luís Martins por disponibilizarem tudo o que necessitei ao longo deste trabalho. Podem ter a certeza que o tempo, paciência e disponibilidade perdida comigo, aliada à boa disposição “sem conta, peso e medida” valeram ouro. À Eng.<sup>a</sup> Assunção Abreu, responsável pela ETAR de Parada, pela simpatia e disponibilidade aquando das recolhas do inóculo necessário a todo o processo. Ao Sr. Júlio Novo e restante companhia dos Serviços Técnicos de Manutenção pelo corte de relva necessária e por aquela mão adicional quando cheguei à conclusão que as minhas “habilitações musculares” não me permitiam manobrar sozinho certos equipamentos que utilizei.

Luís Barros, conterrâneo, finalista do MIEC na FEUP o qual tive o prazer de partilhar o mesmo tecto durante 3 anos e a esta fase académica final. Começamos como “conhecidos da terra” e acabamos com cumplicidade suficiente para dizer que fiz um AMIGO. Pessoa com valores bem vinculados, rigor laboral máximo e bastante parvoíce de parte a parte que foram mutuamente úteis para atenuar os dias de mais *stress*.

Levar amigos para a vida? Sem sombra de dúvida! Ao pessoal de 2009, que deu comigo o primeiro passo nesta nobre casa, em especial a André Cordeiro, António Vilanova, Rafael Nunes, Rodrigo Póvoas e Rui Ramos, por todos os bons momentos que partilhamos de 2009 até 2000 e muitos espero eu! No entanto, seria injusto não evidenciar o altruísmo, amizade e singularidade em doses que ainda hoje me surpreendem de António Vilanova! Foste quem mais me marcou em todos estes anos de MIEA, pela pessoa ímpar que és, a qual antevejo uma futura carreira brilhante. Muito, mas muito obrigado por tudo.

Aos amigos conterrâneos de longa data que tiveram sempre uma palavra e aquele abraço de força e motivação.

Aos meus pais Maria de Jesus Pinheiro Alves e José Manuel Gomes Amorim, irmão Diogo José Alves Amorim, avós e Lurdes! As pessoas mais importantes que tenho na vida e porque sem vocês nada disto teria sido possível!

---



## Sumário

O atual cenário de elevado consumo energético a nível mundial, bem como as diretivas mundiais e europeias que apontam no sentido de um desenvolvimento sustentável fazem com que a valorização energética de resíduos orgânicos, através de Digestão Anaeróbia, ganhe importância no contexto do mix energético e numa perspetiva de otimização do destino final da fração orgânica dos resíduos gerados pela sociedade atual.

Esta dissertação teve como principal objetivo a definição das condições experimentais adequadas para efetuar o arranque da unidade piloto de digestão anaeróbia de resíduos sólidos do LabEA (ETAR) através de resíduos provenientes dos espaços verdes da FEUP e glicerol como sub-produto da unidade piloto de produção de biodiesel da FEUP.

A primeira fase, com duração de 34 dias, consistiu em ensaios de biodegradabilidade, na gama mesofílica, tendo operado com um volume de trabalho de 100 mL, onde foram testadas diferentes razões de relva com glicerol, numa abordagem de mono-digestão (ensaios R e G (15,5% v/v)) e co-digestão (ensaios VGO (15,5% v/v), VGI (7,8% v/v) e VGS (23,2% v/v)), com 5% de sólidos totais (ST) de substrato, e  $5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$   $\text{NaHCO}_3$ . Verificou-se inibição ao processo de DA nos ensaios G, VGO e VGS por sobrecarga orgânica. Foram obtidas produções cumulativas de metano de  $28,7 \text{ mL CH}_4\cdot\text{g CQO}^{-1}$  no ensaio R e  $2,6 \text{ mL CH}_4\cdot\text{g CQO}^{-1}$  no ensaio VGI. Verificaram-se reduções de ST e sólidos voláteis (SV) de 43% e 51% no ensaio R e 31% e 36% no ensaio VGI e valores finais de pH neutros. Foi possível concluir que a mono-digestão é a melhor opção disponível para a digestão anaeróbia da relva colhida na FEUP.

Na segunda fase foram realizados dois ciclos de alimentação consecutivos, em modo *batch*, na gama mesofílica, com um volume de trabalho de 4 L. O primeiro ciclo teve uma duração de 30 dias, executado em mono-digestão com 5% ST de relva como substrato, uma concentração de  $\text{NaHCO}_3$  de  $5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  para o reator R1 e  $4 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  para o reator R2. Registaram-se produções cumulativas de metano de  $57,9 \text{ mL CH}_4\cdot\text{g SV}^{-1}$  em R1 e  $59,6 \text{ mL CH}_4\cdot\text{g SV}^{-1}$  em R2. Foram verificadas reduções de ST e SV de 29% e 36% para R1 e 32% e 38% para R2, respetivamente, com acumulações de  $\text{CQO}_{\text{Solúvel}}$  na ordem dos 27% em R1 e 25% em R2. Os valores finais de pH nos dois reatores permaneceram próximos da neutralidade, concluindo-se assim que a adição de  $4 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  de  $\text{NaHCO}_3$  foi suficiente para assegurar a alcalinidade do meio. O segundo ciclo da segunda fase, com 32 dias de duração, foi planeado de modo a assegurar a manutenção da concentração de 5% ST no conteúdo do reator R1 enquanto que no reator R2 foram adicionados 5% ST de substrato. Utilizou-se, uma concentração de  $4 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  de  $\text{NaHCO}_3$  em ambos os reatores. Registaram-se produções cumulativas de metano de  $142,5 \text{ mL CH}_4\cdot\text{g SV}^{-1}$  em R1 e  $17,6 \text{ mL CH}_4\cdot\text{g SV}^{-1}$  em R2. As reduções de ST e SV foram de 27% e 38% para R1 e 24% e 28% para R2, respetivamente. As acumulações de  $\text{CQO}_{\text{Solúvel}}$  fixaram-se nos 9% em R1 e 34% em R2. Registou-se um valor de pH final neutro no reator R1 e de 5,8 no reator R2, verificando-se assim a acidificação do meio em R2.

**Palavras-Chave:** Digestão Anaeróbia, Biomassa, Substratos Lignocelulósicos, Relva, Glicerol, Metano, Biometano, Ensaios de Biodegradabilidade, Batch, Reator, Digestor.

---





## Abstract

The current global energy high consumption scenario, as well as global and European directives pointing towards a sustainable development mean that energy recovery from organic waste, through anaerobic digestion, has gained importance in the energy mix context and a perspective of optimization considering the final destination of the organic fraction from the waste generated by our society.

This work aimed at defining the appropriate experimental conditions to start the anaerobic digestion pilot plant for solid waste from LabEA (WWTP) with waste from the green spaces of FEUP and glycerol as a by-product of the production of biodiesel pilot plant from FEUP.

Experiment 1, carried out for 34 days, consisted of mesophilic biodegradability tests operating with a work volume of 100 mL, in which different rations of grass with glycerol were tested, with a mono-digestion approach (R and G assays (15,5% v/v)) and a co-digestion (VGO tests (15,5% v/v), VGI (7,8% v/v) and VGS (23,2% v/v)), 5% ST of substrate, and 5 g·L<sup>-1</sup> of NaHCO<sub>3</sub>. Inhibition of the process occurred in the tests G, VGO and VGS possibly due to organic overload. This study allowed obtaining cumulative methane yields of 28,7 mL CH<sub>4</sub>·g COD<sup>-1</sup> on R1 test and 2,6 mL CH<sub>4</sub> · g COD<sup>-1</sup> in VGI test. TS and VS reductions were 43% and 51% in the R test and 31% and 36% in the VGI test. The final pH values were neutral. It was concluded that the mono-digestion was the best available option.

In experiment 2 two consecutive loading cycles were performed in batch and mesophilic conditions with a working volume of 4 L. The first cycle lasted for 30 days and was performed in mono-digestion with 5% TS with grass as substrate, with a NaHCO<sub>3</sub> · concentration of 5 g·L<sup>-1</sup> for R1 and 4 g·L<sup>-1</sup> in R2 reactor. The cumulative methane production was 57,9 mL CH<sub>4</sub>·g VS<sup>-1</sup> in reactor R1 and 59,6 mL CH<sub>4</sub> · g VS<sup>-1</sup> in R2. TS and VS reductions were 29% and 36% for R1 and 32% and 38% for R2, respectively. SCOD accumulations remained in the range of 27% for R1 and 25% to R2. The final pH values in the two reactors remained close to neutrality, which allows concluding that the addition of 4 g·L<sup>-1</sup> NaHCO<sub>3</sub> was enough to assure the alkalinity of the environment. The second cycle of experience 2, carried out for 32 days, was planned to ensure the maintenance a 5% TS concentration inside R1 content and 5% ST of substrate in reactor R2. A NaHCO<sub>3</sub> concentration of 4 g·L<sup>-1</sup> was applied in both reactors. The methane cumulative production was 142,5 mL CH<sub>4</sub>·g VS<sup>-1</sup> in reactor R1 and 17,6 mL CH<sub>4</sub> · g VS<sup>-1</sup> in reactor R2. TS and VS reductions were 27% and 38% for R1 and 24% and 28% for R2, respectively. Accumulations of SCOD were limited to 9% and to 34% in R1 and R2, respectively. The final pH value was neutral in R1 and was 5,8 in reactor R2, which allowed verifying the acidification inside R2.

**Keywords:** Anaerobic Digestion, Biomass, Lignocellulosic Substrates, Grass, Glycerol, Methane, Biomethane, Biodegradability assays, Batch, Reactor, Digester.

---



# Índice Geral

<b>1</b>	<b>Introdução .....</b>	<b>1</b>
1.1	Enquadramento e Apresentação do Projecto.....	1
1.2	Objetivos do Trabalho .....	4
1.3	Organização da Tese .....	5
<b>2</b>	<b>Estado da Arte.....</b>	<b>7</b>
2.1	Princípios da Digestão Anaeróbia .....	7
2.1.1	Hidrólise e Acidogénese .....	7
2.1.2	Acetogénese .....	8
2.1.3	Metanogénese .....	8
2.1.4	Redução do sulfato .....	9
2.2	Tipos de matéria orgânica.....	10
2.3	Requisitos ambientais/operatórios .....	11
2.3.1	Nutrientes.....	11
2.3.2	Temperatura.....	13
2.3.3	pH e alcalinidade.....	14
2.3.4	Agitação .....	15
2.4	Toxicidade .....	15
2.4.1	Sais .....	16
2.4.2	Amónia.....	16
2.4.3	Sulfureto.....	16
2.4.4	Metais.....	17
2.5	Inóculo .....	17
2.5.1	Tipo de Inóculo.....	17
2.5.2	Quantidade de inóculo .....	17
2.5.3	Considerações e tratamento do inóculo.....	18
2.6	Biomassa .....	18
2.6.1	Biomassa como substrato em processos de digestão anaeróbia.....	18
2.6.2	Características dos substratos lignocelulósicos.....	20

2.6.3	Pré-tratamento .....	23
<b>2.7</b>	<b>Glicerol.....</b>	<b>25</b>
2.7.1	Glicerol como substrato em processos de digestão anaeróbia .....	25
2.7.2	Características e propriedades do glicerol.....	25
<b>2.8</b>	<b>Co-digestão .....</b>	<b>26</b>
<b>2.9</b>	<b>Digestores Anaeróbios.....</b>	<b>27</b>
<b>2.10</b>	<b>Modelo de Gompertz Modificado.....</b>	<b>30</b>
<b>3</b>	<b>Materiais e Métodos.....</b>	<b>33</b>
<b>3.1</b>	<b>Substratos e inóculo.....</b>	<b>33</b>
3.1.1	Substrato.....	33
3.1.2	Co-substrato.....	33
3.1.3	Inóculo.....	34
<b>3.2</b>	<b>Métodos Analíticos .....</b>	<b>34</b>
3.2.1	Fósforo Total (FT) .....	34
3.2.2	Carência Química de Oxigénio (CQO).....	35
3.2.3	Azoto Kjeldahl Total (AKT).....	35
3.2.4	Azoto Amoniacal Total (AAT).....	36
3.2.5	Determinação do pH.....	36
3.2.6	Sólidos Totais (ST) e Sólidos Voláteis (SV).....	36
3.2.7	Sólidos Suspensos Totais (SST) e Sólidos Suspensos Voláteis (SSV) .....	37
3.2.8	Massa volúmica ( $\rho$ ).....	37
3.2.9	Análise granulométrica.....	37
3.2.10	Metano – CH <sub>4</sub> .....	37
<b>3.3</b>	<b>Planeamento das experiências .....</b>	<b>38</b>
3.3.1	Experiência 1 – Ensaios de Biodegradabilidade – Co-digestão .....	38
3.3.2	Ensaios de Biodegradabilidade – Diferentes concentrações de ST .....	40
3.3.3	Experiência 2 – Reactores Anaeróbios <i>Batch</i> .....	41
<b>3.4</b>	<b>Produção teórica de metano.....</b>	<b>44</b>
<b>3.5</b>	<b>Modelo de Gompertz.....</b>	<b>45</b>
<b>3.6</b>	<b>Monitorização dos EB e RAB.....</b>	<b>46</b>

<b>4</b>	<b>Resultados e Discussão.....</b>	<b>47</b>
<b>4.1</b>	<b>Caracterização dos substratos e inóculo .....</b>	<b>47</b>
4.1.1	Resultados .....	47
4.1.2	Razão CQO:N:P.....	48
4.1.3	Granulometria .....	49
<b>4.2</b>	<b>Experiência 1 – Ensaio de Biodegradabilidade (EB).....</b>	<b>50</b>
4.2.1	Arranque dos EB.....	50
4.2.2	Resultados iniciais .....	51
4.2.3	Resultados finais.....	51
<b>4.3</b>	<b>Experiência 2 – Reactores Anaeróbios <i>Batch</i> (RAB).....</b>	<b>57</b>
4.3.1	Arranque dos RAB – 1º Ciclo.....	57
4.3.2	Resultados RAB – 1º Ciclo .....	57
4.3.3	Arranque dos RAB – 2º Ciclo.....	62
4.3.4	Resultados RAB – 2º Ciclo .....	63
<b>5</b>	<b>Conclusões.....</b>	<b>67</b>
<b>6</b>	<b>Perspetivas para trabalho futuro.....</b>	<b>69</b>
<b>6.1</b>	<b>Reator piloto do LabEA .....</b>	<b>69</b>
6.1.1	Dimensionamento .....	69
6.1.2	Dimensões .....	70
6.1.3	Alimentação, agitação e amostragem.....	70
6.1.4	Sugestões para arranque.....	71
<b>6.2</b>	<b>Novos estudos .....</b>	<b>73</b>
<b>6.3</b>	<b>Dificuldades e sugestões técnicas.....</b>	<b>74</b>
<b>7</b>	<b>Referências.....</b>	<b>75</b>
<b>Anexo 1</b>	<b>Possíveis configurações de reatores anaeróbios .....</b>	<b>81</b>
<b>Anexo 2</b>	<b>Unidade piloto de digestão anaeróbia de resíduos do LabEA (ETAR) da FEUP .....</b>	<b>85</b>

# Índice de Figuras

<b>Figura 1.1</b> – Descrição esquemática da relação tripartida do desenvolvimento sustentável (adaptado de <a href="http://www.worldbank.org">http://www.worldbank.org</a> (Group 2015)).	2
<b>Figura 1.2</b> – Exemplo esquemático da configuração de uma instalação de DA para produzir energia e biofertilizante através de resíduos biológicos como substrato (adaptado de: (Change et al. 2011)).	4
<b>Figura 2.1</b> – Diagrama circular dos principais fatores que determinam a eficácia produtiva metanogénica através de substratos lignocelulósicos em processos de DA (Nizami, Korres, and Murphy 2009).	19
<b>Figura 2.2</b> – Estrutura da biomassa lignocelulósica nas paredes das células vegetais (fonte:(Yang et al. 2015)).	21
<b>Figura 2.3</b> – Combinações possíveis entre os vários tipos de digestores (adaptado de (Nizami and Murphy 2010)).	27
<b>Figura 2.4</b> – Curva de crescimento do modelo de Gompertz modificado (Zwietering et al. 1990).	30
<b>Figura 3.1</b> – Fotografia do substrato base.	33
<b>Figura 3.2</b> – Fotografia do inóculo utilizado ao longo do trabalho.	34
<b>Figura 3.3</b> – Fotografias de alguns elementos da instalação experimental utilizada: (a) sensores óticos BCP-CH4; (b) MilliGascounter® MGC-1; (c) caixa de conexão BACCom 12 em modo de funcionamento.	38
<b>Figura 3.4</b> – Fotografias de algumas perspetivas instalação dos EB em funcionamento.	40
<b>Figura 3.5</b> – Esquema e instalação do W8 ANAEROBIC DIGESTER (Armfield, England) (adaptado de <a href="http://discoverarmfield.com">http://discoverarmfield.com</a> ).	42
<b>Figura 3.6</b> – Fotografia da instalação em operação (R1 à esquerda e R2 à direita).	43
<b>Figura 4.1</b> – Produção cumulativa de metano (PTN: 0°C e 1atm) por grama de CQO adicionado de substrato no ensaio R e evolução do teor de metano no biogás produzido.	53
<b>Figura 4.2</b> – Produção cumulativa de metano (PTN: 0°C e 1atm) por grama de CQO adicionada de substrato no ensaio VGI e evolução do teor de metano no biogás produzido.	54
<b>Figura 4.3</b> – Produção cumulativa de metano (PTN: 0 °C e 1atm) por grama de SV adicionada de substrato nos reatores R1 e R2 e respectivas evoluções periódicas de pH.	58
<b>Figura 4.4</b> – Produção cumulativa de metano (PTN: 0 °C e 1atm) por grama de SV adicionada de substrato nos reatores R1 e R2.	64
<b>Figura 7.1</b> – Variações de design em reatores de estágio único e duplo.	81
<b>Figura 7.2</b> – Vários tipos de digestores de único estágio por via seca.	81
<b>Figura 7.3</b> – Digestor anaeróbio batch, de estágio único por via seca.	82
<b>Figura 7.4</b> - Digestores anaeróbios batch, de estágio duplo por via seca.	82
<b>Figura 7.5</b> - Digestores sequenciais com leach bed acoplada com UASB.	82
<b>Figura 7.6</b> – Sistemas de pré-processamento para substratos com alto teor de sólidos.	83

<b>Figura 7.7</b> – Corte transversal do digestor. 1-Tubo de entrada. 2-Reservatório de entrada. 3-Válvula de entrada de azoto/êmbolo de entrada. 4-Tubos de ligação entre os reservatórios e o digestor. 5-Digestor. 6-Válvula de saída de biogás. 7-Tubo de saída de biogás para queima e recirculação. 8-Reservatório de saída. ....	85
<b>Figura 7.8</b> - Vista superior do digestor. Pode-se observar o tubo de saída do biogás com uma pequena abertura para amostragem do gás, e ligação para os tubos de recirculação do gás à volta do digestor. ....	86
<b>Figura 7.9</b> – Vista lateral do digestor, perpendicular ao septo. Desta forma observam-se os tubos de recirculação do gás e os furos de amostragem na parede do digestor. ....	86
<b>Figura 7.10</b> - Vistas laterais do digestor paralelamente ao septo. A imagem da esquerda corresponde à vista do lado de entrada, e a da direita à do lado de saída. As aberturas na parede do digestor correspondem aos postos de amostragem e medição de parâmetros, sendo que as aberturas mais largas são os postos de amostragem de biomassa. ....	87
<b>Figura 7.11</b> - Vista geral do reactor. ....	87
<b>Figura 7.12</b> – Reservatório de entrada (A) e reservatório de saída (B). ....	88
<b>Figura 7.13</b> – Septo (A) e Tampa (B). ....	88
<b>Figura 7.14</b> - Bomba peristáltica adquirida. ....	88
<b>Figura 7.15</b> - Dimensões da bomba peristáltica. ....	89

# Índice de Tabelas

<b>Tabela 2.1</b> – Composição química dos microrganismos metanogénicos.....	11
<b>Tabela 2.2</b> – Efeitos da amónia livre em processos anaeróbios.....	16
<b>Tabela 2.3</b> – Composição química da relva.....	20
<b>Tabela 2.4</b> – Performance de diferentes digestores anaeróbios aplicando substratos lignocelulósicos ((Prochnow et al. 2009).....	23
<b>Tabela 2.5</b> – Efeito do pré-tratamento na composição e alteração estrutural da biomassa lignocelulósica (adaptado de (Nizami, Korres, and Murphy 2009, Zheng et al. 2014, Yang et al. 2015).....	24
<b>Tabela 2.6</b> – Propriedades físicas e químicas de diferentes categorias de glicerol (adaptado de (Ayoub and Abdullah 2012). ...	26
<b>Tabela 2.7</b> – Comparação de diferentes configurações de digestores em função de alguns parâmetros operacionais (Nizami and Murphy 2010).....	28
<b>Tabela 2.8</b> – Comparação das vantagens e desvantagens de vários tipos de reactores (Nizami and Murphy 2010).....	29
<b>Tabela 3.1</b> - Organização técnica dos EB.....	39
<b>Tabela 3.2</b> – Organização técnica dos EB – 2º Ciclo.....	41
<b>Tabela 3.3</b> - Organização técnica dos RAB.....	41
<b>Tabela 4.1</b> – Caracterização dos substratos utilizados durante o projeto.....	47
<b>Tabela 4.2</b> – Caracterização do inóculo utilizado durante o projeto.....	47
<b>Tabela 4.3</b> – Determinação dos requisitos nutricionais e dosagens de co-substrato a adicionar na experiência 1.....	49
<b>Tabela 4.4</b> – Resultados da análise granulométrica da relva.....	50
<b>Tabela 4.5</b> – Valores médios obtidos para os ensaios no início da experiência.....	51
<b>Tabela 4.6</b> - Valores médios obtidos para os ensaios no início (t = 0) e no final (t = 34 dias) da experiência1.....	52
<b>Tabela 4.7</b> – Parâmetros do ajuste do modelo de Gompertz modificado aplicado aos EB.....	55
<b>Tabela 4.8</b> – Valores médios obtidos para os reatores no início e final da experiência.....	57
<b>Tabela 4.9</b> - Parâmetros do ajuste do modelo de Gompertz modificado aplicado ao 1º ciclo dos RAB (este estudo) e aplicado a outros substratos.....	60
<b>Tabela 4.10</b> – Comparação entre a produção experimental e a produção teórica total.....	61
<b>Tabela 4.11</b> – Valores da percentagem de ST do Substrato e do conteúdo no início de cada ciclo.....	63
<b>Tabela 4.12</b> – Valores médios obtidos para os reatores no início e final da experiência.....	63
<b>Tabela 4.13</b> – Comparação entre a produção experimental e a produção teórica total.....	66



## Notação e Glossário

### *Lista de Siglas*

<b>Sigla</b>	<b>Definição</b>
<b>AAT</b>	azoto amoniacal total
<b>AGV</b>	ácidos gordos voláteis
<b>AKT</b>	azoto Kjeldahl total
<b>APHA</b>	American Public Health Association
<b>ASTM</b>	American Society for Testing and Materials
<b>CBO</b>	carência biológica de oxigénio
<b>CE</b>	comunidade europeia
<b>CQO</b>	carência química de oxigénio
<b>CSTR</b>	continuously stirred tank reactor
<b>DA</b>	digestão anaeróbia
<b>EB</b>	ensaios de biodegradabilidade
<b>ETAR</b>	estação de tratamento de águas residuais
<b>FEUP</b>	Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto
<b>FT</b>	fósforo total
<b>G</b>	Glicerol
<b>GEE</b>	Gases com efeito de estufa
<b>LabEA</b>	laboratório de engenharia do ambiente
<b>PBM</b>	potencial de biometanização
<b>PERSU</b>	Plano Estratégico para os Resíduos Sólidos Urbanos
<b>PTM</b>	produção teórica de metano
<b>R</b>	Relva
<b>RAB</b>	reatores anaerobios batch
<b>RIS</b>	razão inóculo substrato
<b>RPA</b>	reator perfeitamente agitado
<b>RSI</b>	razão substrato inóculo
<b>RSU</b>	resíduos sólidos urbanos
<b>SCOD</b>	soluble chemical oxygen demand
<b>SST</b>	sólidos suspensos totais
<b>SSV</b>	solidos voláteis totais
<b>ST</b>	sólidos totais
<b>SV</b>	sólidos voláteis
<b>TAO</b>	taxa de alimentação orgânica

<b>TRH</b>	tempo de retenção hidráulico
<b>TS</b>	total solids
<b>UASB</b>	upflow anaerobic sludge blanket
<b>UE</b>	União Europeia
<b>VGI</b>	volume de glicerol inferior
<b>VGO</b>	volume de glicerol ótimo
<b>VGS</b>	volume de glicerol superior
<b>VS</b>	volatile solids
<b>WWTP</b>	waste water treatment plant

***Letras gregas***

<b>Letra</b>	<b>Definição</b>
$\lambda$ (dia)	Período de adaptação

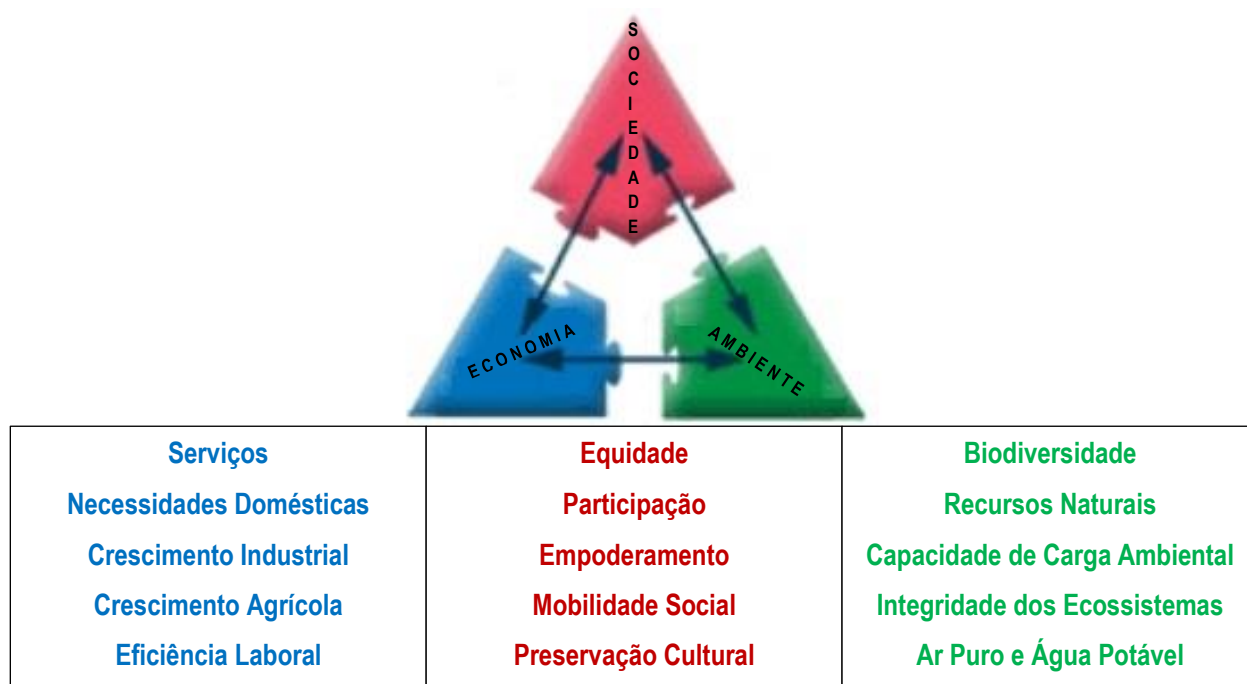
---

# 1 Introdução

## 1.1 Enquadramento e Apresentação do Projecto

O conceito de desenvolvimento sustentável recebeu o seu primeiro grande reconhecimento internacional em 1972 na Conferência das Nações Unidas sobre o Meio Ambiente Humano, realizada em Estocolmo. Embora o termo não tenha sido referido explicitamente, a comunidade internacional concordou com a ideia de que tanto o desenvolvimento como o meio ambiente, até então abordadas como questões distintas, poderiam ser geridos de uma forma mutuamente benéfica. Todas as definições encontradas para desenvolvimento sustentável requerem que vejamos o mundo como um sistema, um sistema que interligue o espaço, o tempo e a qualidade de vida. No entanto, no ano de 1987 em Brundtland, no relatório *Our Common Future* da Comissão Mundial das Nações Unidas para o Meio Ambiente e Desenvolvimento definiu desenvolvimento sustentável como desenvolvimento que satisfaz as necessidades do presente sem comprometer a capacidade das gerações futuras de suprir suas próprias necessidades (Comission 2015, Group 2015). Este conceito é focado, sobretudo, no melhoramento da qualidade de vida para todos os habitantes do planeta Terra sem aumentar o consumo de recursos naturais para além da capacidade de reposição dos mesmos. Para tal é necessária a percepção de que a apatia terá consequências e que devemos procurar soluções inovadoras que mudem as estruturas, políticas, pilares ideológicos e comportamentos práticos em todos os níveis, desde o simples indivíduo às grandes instituições internacionais. Não estamos perante um novo conceito, pois várias culturas ao longo da história da humanidade reconheciam a necessidade da harmonia entre ambiente, sociedade/política e economia. A novidade surge sim na articulação destes conceitos num contexto de industrialização global e de uma sociedade cada vez mais tecnológica (Development 2015).

A problemática populacional não é apenas uma questão de número de habitantes. As pessoas consomem alimentos, água potável, madeira, minerais e energia (na sua diversificada disponibilidade) no desenrolar do quotidiano. A conjugação de produção alimentar, exploração de água subterrânea, exploração de biomassa, exploração mineira e queima combustíveis fósseis resulta num esgotamento dos recursos naturais disponíveis e aumenta os níveis de poluição (Group 2015).



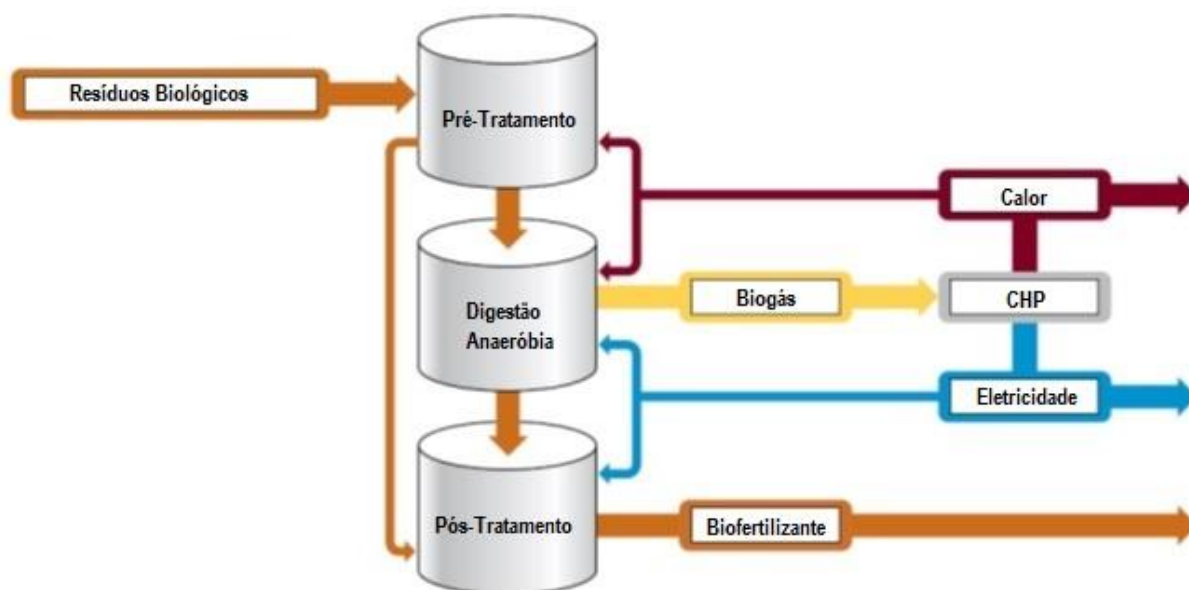
**Figura 1.1** – Descrição esquemática da relação tripartida do desenvolvimento sustentável (adaptado de <http://www.worldbank.org> (Group 2015)).

Um indicador crítico que traduz na perfeição o nosso impacto ambiental é o consumo energético. Segundo os dados de Junho de 2015 da revisão Energética Mundial fornecida pela BP (BP 2015b), o consumo mundial de energia primária ultrapassou os 17 TW e é esperado que alcance cerca de 24 TW em 2035 (BP 2015a). Atualmente, a origem deste consumo desmedido de energia primária ainda prevalece em cerca de 80% proveniente de combustíveis fósseis. O petróleo constitui um recurso energético não renovável e as suas reservas globais estão a diminuir rapidamente, contribuindo o seu consumo para a libertação de emissões de gases com efeito de estufa (GEE), o que acarreta inúmeros efeitos negativos incluindo alterações climáticas, regressão dos glaciares com consequente aumento do nível médio das águas do mar, perda de biodiversidade, etc. Esta crise petrolífera, globalmente disseminada, causada pelo consumo excessivo e aumento do preço do crude, possui uma relação tangencial com a atividade económica global. O esgotamento progressivo de combustíveis fósseis, com a consequente escalada do seu valor de mercado, associado à emissão de grandes quantidades de GEE, gerou a procura de fontes de energia alternativas, renováveis, sustentáveis, eficientes e de baixo custo com efeitos menos nefastos para o ambiente (Nigam and Singh 2011, Ayoub and Abdullah 2012, Xu, Wang, and Cheng 2011).

Outra problemática abraçada pelo planeta Terra diz respeito à gestão dos resíduos sólidos gerados pela sociedade. Os resíduos sólidos, nas suas variadas formas e tipologias, têm sido tradicionalmente depositados em aterros, o que levanta sérias questões ao nível da toxicidade, geração de lixiviados, emissões de GEE e limitações de espaços para esta prática, o que levou à busca de estratégias alternativas para este flagelo (Nair, Kuang, and Pullammanappallil 2005). Por outro lado, a União Europeia (UE) encontra-se empenhada na produção sustentável de energia. De facto, a Comissão Europeia (CE) introduziu a Diretiva nº2009/28/CE para Fontes de Energias Renováveis, a qual reclama 20% de contribuição de fontes renováveis de energia na totalidade do mix energético de

cada estado membro até 2020 (Goulding and Power 2013). A mesma diretiva concede a cada estado membro, individualmente, a decisão de como irá alcançar as metas energéticas propostas. Deste modo, uma das metas que figura no Plano Estratégico para os Resíduos Urbanos (PERSU) estabelece a redução de 63% para 35% a deposição, em aterro, dos resíduos urbanos biodegradáveis, relativamente ao ano de referência 1995 para Portugal Continental (Ministério do Ambiente et al. 2014). Embora existam inúmeras opções, está altamente comprovado que o futuro da produção energética global será tecnologicamente mais variado, combinado com um armazenamento eficiente (Abu-Dahrieh et al. 2011).

Uma alternativa renovável ao uso de combustíveis fósseis é o bio-combustível, rico em metano, produzido através da digestão anaeróbia (DA) (Zhen et al. 2015). A DA é uma das mais antigas e bem estudadas tecnologias de estabilização de resíduos orgânicos, que experienciou um importante crescimento após a primeira crise energética nos anos 70 do século passado (Ariunbaatar et al. 2014, Mata-Alvarez et al. 2014). A DA consiste na aplicação de tratamento biológico, onde os microrganismos trabalham sinergeticamente, na ausência de oxigénio, para converter resíduos orgânicos em biogás, uma mistura formada principalmente por metano e dióxido de carbono e um produto final estabilizado (Jagadish et al. 2012). Esta fonte de energia renovável poder ser utilizada para a geração de electricidade, calor e combustível automóvel (GPL) (Angelidaki et al. 2006). Apesar da sua aplicação mais antiga e globalmente disseminada consistir no tratamento de lamas ativadas, provenientes de águas residuais, esta tecnologia de valorização energética é igualmente aplicável a resíduos sólidos urbanos (RSU), resíduos agrícolas, resíduos industriais, mas, sobretudo resíduos sólidos orgânicos tais como resíduos biológicos, lamas, esterco de gado e biomassa. A produção de biometano através da DA é uma tecnologia bastante versátil, pois proporciona um leque mais alargado de materiais orgânicos que podem ser utilizados como substrato no processo, em comparação com outros biocombustíveis como o bioetanol ou o biodiesel (Schievano et al. 2009). Relativamente a balanços energéticos (rácio output/input), quando comparada com outras tecnologias, a DA é o método mais eficiente para a geração energética através de biomassa (Zheng et al. 2014).



**Figura 1.2** – Exemplo esquemático da configuração de uma instalação de DA para produzir energia e biofertilizante através de resíduos biológicos como substrato (adaptado de: (Change et al. 2011)).

Esta tecnologia torna-se bastante apelativa graças aos seus reduzidos impactos ambientais e alto potencial de recuperação energética. Além disso, a DA permite uma redução de 30 – 50 % do volume de resíduos para posterior deposição em aterro, reduz agentes patogénicos, o produto final estabilizado pode ser usado como fertilizante na agricultura, o biometano (97% CH<sub>4</sub>, 3% CO<sub>2</sub> e outros constituintes minoritários) pode ser introduzido nas redes de gás natural pré-estabelecidas, para além de reduzir as emissões naturais de metano provenientes da auto-decomposição de resíduos orgânicos em aterros ou outros locais de deposição, uma vez que se estima que o potencial de efeito de estufa do metano é cerca de 20 vezes superior ao do dióxido de carbono (Ismail and Talib 2014, Smyth, Smyth, and Murphy 2010, Goulding and Power 2013, Nizami and Murphy 2010, Zheng et al. 2014, Brown, Shi, and Li 2012).

Tais aspetos positivos associados às recentes preocupações alusivas ao rápido crescimento populacional, consequente aumento do consumo energético mundial e aquecimento global têm promovido a pesquisa, o desenvolvimento e o aperfeiçoamento de processos de DA, de modo a alcançar taxas de degradação superiores e reduzir a quantidade de resíduo final a ser eliminado, estabelecendo as melhores condições de projeto, gestão e económicas para implementação desta tecnologia a grande escala.

## 1.2 Objetivos do Trabalho

Esta dissertação teve como principal objetivo a definição das condições experimentais adequadas para efetuar o arranque da unidade piloto de digestão anaeróbia de resíduos sólidos do LabEA (ETAR). O presente trabalho incluiu a seleção do tipo de substratos a alimentar, tendo como ponto de partida resíduos verdes e glicerol como sub-

produto da unidade piloto de produção de biodiesel da FEUP. Foi estudada a influência da razão substrato/co-substrato através de ensaios de biodegradabilidade. Testou-se igualmente a aplicação de diferentes concentrações de  $\text{NaHCO}_3$  e diferentes teores de sólidos através de reatores anaeróbios batch de 5 L, usando como condições base as obtidas nos ensaios de biodegradabilidade.

## **1.3 Organização da Tese**

### **Capítulo 1 – Introdução**

É feita uma breve introdução ao tópico da DA. Contextualização da atual procura de soluções às necessidades energéticas globais e a importância da DA para alcançar o desenvolvimento sustentável. Os objectivos deste trabalho são também apresentados neste capítulo.

### **Capítulo 2 – Estado da Arte**

São apresentados os princípios dos processos de DA, os respetivos requisitos ambientais, bem como os compostos inibidores ao processo. São também indicadas e discutidas considerações relativas ao inóculo e aos diferentes substratos utilizados neste estudo, para além de um resumo dos tipos de tecnologias de DA aplicáveis. É descrito o modelo de ajuste aplicado aos resultados experimentais obtidos.

### **Capítulo 3 – Materiais e Métodos**

São descritas as metodologias aplicadas na caracterização dos diferentes substratos utilizados neste trabalho, do inóculo e de todos os ensaios executados nas diferentes experiências. É igualmente contemplado o planeamento experimental, as descrições das diferentes instalações usadas e estimada a produção teórica de metano.

### **Capítulo 4 – Resultados e Discussão**

Os resultados obtidos neste trabalho são apresentados neste capítulo relativamente à caracterização dos substratos e inóculo e às experiências 1 e 2 (1º e 2º ciclo).





## 2 Estado da Arte

### 2.1 Princípios da Digestão Anaeróbia

A DA consiste na conversão biológica de compostos orgânicos, na ausência de qualquer recetor de eletrões externo, como o oxigénio (processos aeróbios) ou nitratos/sulfatos (processos anóxicos), até à forma mais reduzida e oxidada de carbono, o metano ( $\text{CH}_4$ ) e o dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ), respectivamente. Em meios onde se registre a disponibilidade de recetores de eletrões como o oxigénio, nitratos ou sulfatos não existe formação de metano. A produção de metano ocorre em diversos ambientes naturais como pântanos, solo, sedimentos fluviais, lagos, oceanos, assim como em aparelhos digestivos de ruminantes. A DA é um processo ecológico, altamente complexo, que envolve um alargado consórcio de diversos grupos de microrganismos com funções especializadas e interrelacionadas para a conversão de matéria orgânica complexa em produtos como metano e dióxido de carbono e outros produtos em quantidades minoritárias (geralmente menos de 1% do volume total dos produtos gasosos). A degradação de compostos orgânicos é dividida, geralmente, em duas etapas simbióticas. Na primeira etapa, os grupos de bactérias anaeróbias e anaeróbias facultativas convertem os compostos orgânicos complexos (hidratos de carbono, proteínas e lípidos) em materiais orgânicos simples, principalmente em ácidos gordos voláteis (AGV), como também em  $\text{CO}_2$  e gases hidrogenados. Na segunda etapa, os ácidos orgânicos e hidrogénio são convertidos em  $\text{CH}_4$  e  $\text{CO}_2$  através do metabolismo de microrganismos metanogénicos (procariontes estritamente anaeróbios). Em alguns casos, não ocorre a mineralização completa e o substrato é apenas transformado em compostos intermediários sem que ocorra a conversão total nos compostos finais supracitados (McInerney and Bryant 1980, Angelidaki and Sanders 2004, Angelidaki et al. 2006, Chernicharo 2007).

#### 2.1.1 Hidrólise e Acidogénese

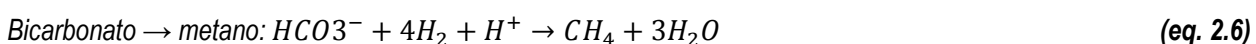
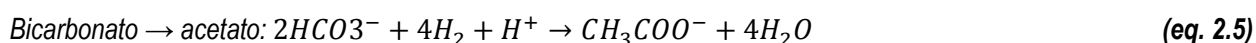
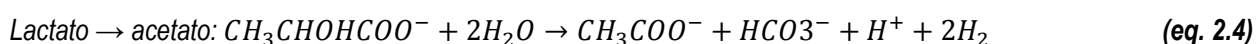
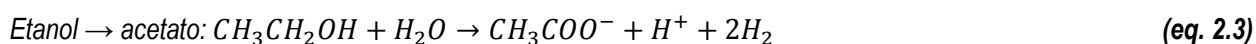
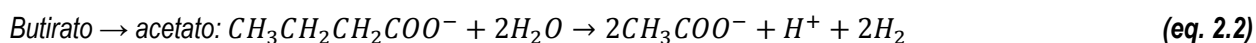
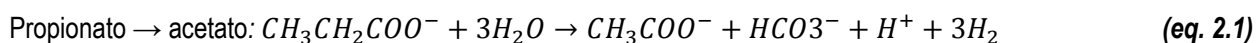
Devido à incapacidade de assimilação de matéria orgânica particulada por parte dos microrganismos, a primeira etapa do processo de DA consiste na hidrólise de material complexo particulado (polímeros) em materiais simples e dissolvidos, através da ação de exoenzimas excretadas pelas bactérias hidrolíticas fermentativas. Esta solubilização ocorre no interior das células bacterianas sendo excretadas de seguida na forma de AGV, álcoois, ácido láctico, dióxido de carbono, hidrogénio, amónia e sulfureto de hidrogénio com a formação adicional de novas células bacterianas. Este processo ocorre lentamente em condições anaeróbias, sendo o grau e taxas de degradação influenciados pela temperatura de operação, tempo de retenção hidráulico (TRH), composição do substrato, tamanho das partículas, pH do meio, concentração de amónia e pela própria concentração dos produtos formados nesta etapa (ex. AGV).

Geralmente, a acidogénese é executada através do metabolismo de um vasto grupo de bactérias fermentativas pertencentes à classe *clostridia*. Esta classe de microrganismos possui a particularidade da formação de esporos, que lhes permite a sobrevivência nos ambientes mais adversos. No entanto, a família de microrganismos

*Bacteroidaceae* também contribui para esta etapa através da degradação de açúcares e aminoácidos, sendo estes microrganismos frequentemente encontrados nos sistemas digestivos (Lettinga, Pol, and Zeeman 1996, Chernicharo 2007).

### 2.1.2 Acetonogénese

As bactérias acetogénicas são responsáveis pela oxidação dos produtos intermédios formados na etapa acidogénica em substrato apropriado para os microrganismos metanogénicos, consistindo estes em ácido acético e ácido propiónico, sendo igualmente formadas grandes quantidades de hidrogénio e dióxido de carbono dissolvidos na fase aquosa, diminuindo deste modo o pH do meio. Porém, existem duas formas para o consumo do hidrogénio dissolvido no meio: através dos microrganismos metanogénicos que produzem metano recorrendo ao hidrogénio e ao dióxido de carbono; e pela reação entre o hidrogénio, dióxido de carbono e ácido acético que dá origem à formação de ácidos orgânicos, tais como ácido propiónico e ácido butírico. Apesar do facto de que pelo menos 50% de toda a matéria orgânica biodegradável é metabolizada a ácido butírico e ácido propiónico, apenas o hidrogénio e o acetato podem ser usados diretamente pelos microrganismos metanogénicos. No entanto, esses compostos intermédios são posteriormente decompostos em ácido acético e hidrogénio. De seguida são descritas algumas reacções oxidação-redução decorrentes durante esta etapa (Foresti 1994, Lettinga, Pol, and Zeeman 1996, Chernicharo 2007).



### 2.1.3 Metanogénese

A fase final relativa à degradação anaeróbia de compostos orgânicos em metano e dióxido de carbono é posta em prática pelos microrganismos metanogénicos archaea. No entanto, estes microrganismos dividem-se em dois grandes grupos em função da sua afinidade com determinados substratos. Os microrganismos utilizadores de acetato, denominados de metanogénicas acetoclásticas, são responsáveis por cerca de 60 – 70% da totalidade produtiva de metano. Todavia, apenas algumas espécies metanogénicas são capazes de formar metano através de acetato, onde se distinguem os dois géneros, *Methanosarcina* e *Methanosaeta*. O género *Methanosarcina* possui taxas produtivas e de crescimento superiores ao género *Methanosaeta*, necessitando este último género de TRH superiores. Relativamente à sua morfologia, o género *Methanosarcina* desenvolve-se através da formação de

cocos, enquanto que o género *Methanosaeta* desenvolve uma estrutura filamentosa. Por outro lado, este último género restringe-se à utilização de ácido acético como substrato, sendo igualmente capazes de operar com concentrações mais reduzidas desse composto. Deste modo, o género *Methanosarcina* é considerado o mais versátil, pois, para além de ácido acético, é capaz de consumir hidrogénio e metilaminas (Zinder 1993, Soubes 1994, Schmidt and Ahring 1996). Na ausência de hidrogénio, a clivagem do ácido acético origina a formação de metano através da redução do grupo metilo, enquanto o grupo carboxilo é oxidado a dióxido de carbono segundo a seguinte equação:



Ao contrário dos microrganismos acetilásticos, praticamente todas as espécies metanogénicas são capazes de produzir metano recorrendo ao hidrogénio e ao dióxido de carbono. Os géneros de microrganismos utilizadores de hidrogénio, conhecidos como metanogénicas hidrogenotróficas, frequentemente encontrados em reatores anaeróbios são os *Methanobacterium*, *Methanospirillum* e *Methanobrevibacter*. Quando o hidrogénio se encontra disponível, grande parte do restante metano produzido provém da redução do dióxido de carbono, que se encontra sempre presente em excesso em sistemas de DA, não constituindo deste modo um fator limitante ao processo. A formação de metano através da redução do dióxido de carbono é descrita na seguinte equação:

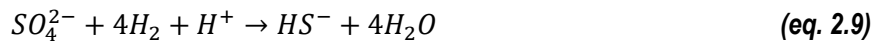


Ambas as tipologias de metanogénicas são extremamente importantes na manutenção simbiótica de todo o processo de DA, uma vez que a função primordial do consumo de hidrogénio, produzido nas etapas iniciais, provoca uma diminuição da pressão parcial do hidrogénio no meio, permitindo a ação das bactérias acidogénicas e acetogénicas. Devido à baixa solubilidade na fase aquosa, o metano é rapidamente libertado, ao contrário do dióxido de carbono, muito mais solúvel em água, tornando possível a sua libertação através da fase gasosa e através da aquosa na forma de efluente (Chernicharo 2007).

#### 2.1.4 Redução do sulfato

Por vezes, a constituição do conteúdo dos reatores anaeróbios pode conter sulfatos ou sulfitos, que são utilizados pelas bactérias redutores de sulfato (BRS) como recetores de eletrões libertados durante a oxidação dos compostos orgânicos (Lettinga, Pol, and Zeeman 1996). O metabolismo destes microrganismos é importante em qualquer processo de DA, principalmente devido à formação de sulfureto de hidrogénio, sendo igualmente considerados um grupo de microrganismos bastante versátil graças ao alargado leque de componentes capazes de consumir, incluindo toda a cadeia de AGV, alguns ácido aromáticos, hidrogénio, metanol, etanol, glicerol, açúcares aminoácidos e alguns compostos fenólicos. Esta etapa possui a similaridade da distinção de dois grupos maioritários de BRS, um grupo de espécies dos géneros *Desulfobulbus sp.*, *Desulfomonas sp.*, *Desulfotomaculum* e *Desulfovibrio* capazes de oxidar incompletamente os seus substratos em acetato, e outro grupo formado pelos géneros *Desulfobacter*, *Desulfococcus*, *Desulfosarcina*, *Desulfobacterium* e *Desulfonema*, responsáveis pela oxidação de compostos orgânicos em dióxido de carbono.

Quando o meio se encontra ausente de sulfato na sua constituição, o metabolismo do processo de DA ocorre de acordo com as equações 2.1, 2.2, 2.3, 2.4, 2.5 e 2.6. Caso o reator anaeróbio possua sulfato na constituição do seu conteúdo, o processo decorre segundo a seguinte equação:



No entanto, na presença de sulfato, são alteradas as vias metabólicas do processo, uma vez que as BRS competem com os microrganismos acidogénicos, acetogénicos e metanogénicos pela biodisponibilidade de substrato, resultando em diminuições da concentração de metano no biogás produzido (Chernicharo 2007).

## 2.2 Tipos de matéria orgânica

A matéria orgânica, que se traduz analiticamente por CQO ou CBO, presente no conteúdo de reatores anaeróbios, pode ser vulgarmente classificada como de fácil, difícil ou impossível degradação. A CQO facilmente degradável é aquela que se encontra imediatamente fermentada por qualquer tipo de inóculo (adaptado ou não ao tipo de substrato). Os compostos orgânicos de difícil degradação, conhecidos como substratos complexos, são apenas fermentados após adaptação do consórcio microbiano ao respetivo substrato. Este período de adaptação corresponde ao tempo de crescimento dos microrganismos especializados na hidrólise e fermentação deste tipo de substratos. Por último, existem substratos que contêm matéria orgânica que é absolutamente impossível de biodegradar em ambientes anaeróbios, sendo conhecidos por compostos orgânicos inertes (Chernicharo 2007).

Por outro lado, a matéria orgânica, contida na infinidade da constituição de conteúdos de processos de DA, pode ser igualmente classificada segundo diferentes designações, sendo estas:

- CQO Total (CQO<sub>Total</sub>): totalidade de matéria orgânica constituinte de determinado substrato, sendo independente do nível de degradação da matriz elementar;
- CQO Biodegradável (CQO<sub>Biod</sub>): porção da CQO<sub>Total</sub> biologicamente degradável em condições anaeróbias;
- CQO Recalcitrante (CQO<sub>Rec</sub>): porção de matéria orgânica que é impossível de degradar em condições anaeróbias devido à complexidade da sua matriz que a constitui;
- CQO Solúvel (CQO<sub>Solúvel</sub>): porção correspondente às partículas de matéria orgânica dissolvida e partículas coloides, responsáveis pela turbação das amostras centrifugadas e filtradas após determinação deste parâmetro;
- CQO Particulada (CQO<sub>Part</sub>): fração correspondente à matéria orgânica de maiores dimensões presente no substrato. Pode ser determinada pela diferença entre CQO<sub>Total</sub> e CQO<sub>Sol</sub>;
- CQO Celular (CQO<sub>Cél</sub>): matéria orgânica correspondente ao consórcio microbiano presente no conteúdo do reator bem como das novas células formadas ao longo do processo;
- CQO Hidrolisável (CQO<sub>Hidro</sub>): fração da CQO<sub>Biod</sub> que estará verdadeiramente disponível, na forma de monómeros (substrato simples), para posterior consumo por parte dos microrganismos metanogénicos após ter sido hidrolisada e fermentada pelas bactérias responsáveis pelas respetivas funções biológicas;

A  $CQO_{\text{Solúvel}}$  é o parâmetro que melhor traduz a classificação do estado do processo de DA, pois corresponde à fração usada pelos microrganismos para a produção de metano e para a formação de novas células.

## 2.3 Requisitos ambientais/operatórios

A DA é particularmente suscetível a um controlo restrito das condições do meio uma vez que o todo o processo exige uma interação simbiótica entre diferentes microrganismos e entre as próprias condições ambientais. Tanto as condições físicas como químicas do meio influenciam o crescimento e metabolismo microbiano, selecionando os organismos melhor adaptados ao ambiente em que estão inseridos, que pode variar rapidamente em função da sua constituição nutricional ou condições fisiológicas. Os fatores físicos atuam normalmente como agentes seletivos, enquanto que os fatores químicos podem ou não ser seletivos. Os nutrientes elementares, necessários ao processo, ou a própria temperatura de operação são extremamente importantes na seleção das espécies microbianas predominantes. Comparativamente, os micronutrientes não possuem grande influência no processo. A eficiência de todo o processo de DA está assim dependente de um balanço ecológico do sistema (Speece 1986, Chernicharo 2007).

### 2.3.1 Nutrientes

Os requisitos nutricionais das populações microbianas envolvidas em processos de tratamento biológico são geralmente estabelecidos através da composição química das células microbianas. No entanto, a sua composição química exata é raramente determinável, sendo os requisitos nutricionais determinados com base na composição empírica das células microbianas (Chernicharo 2007). A tabela 2.1 apresenta a composição química dos microrganismos metanogénicos.

**Tabela 2.1** - Composição química dos microrganismos metanogénicos.

Macronutrientes		Micronutrientes	
Elemento	Concentração (g·kg <sup>-1</sup> ST)	Elemento	Concentração (mg·kg <sup>-1</sup> ST)
Azoto (N)	65	Ferro (Fe)	1800
Fósforo (P)	15	Níquel (Ni)	100
Potássio (K)	10	Cobalto (Co)	75
Enxofre (S)	10	Molibdénio (Mo)	60
Cálcio (Ca)	4	Zinco (Zn)	60
Magnésio (Mg)	3	Manganês (Mn)	20
-	-	Cobre (Cu)	10

Adaptado de (Lettinga, Pol, and Zeeman 1996)

De forma a alcançar o sucesso em processos de tratamento biológico devem ser fornecidas quantidades suficientes de nutrientes inorgânicos, necessárias ao crescimento e metabolismo microbiano. Em casos de fornecimento de escassas concentrações nutricionais, deverá existir algum mecanismo de compensação, quer seja pela redução das taxas de alimentação do sistema, quer pela permissão de redução da eficiência do sistema. Relativamente à escassez por parte do substrato em micronutrientes, estes poderão ser garantidos pelo inóculo que irá compor o conteúdo do reator, além de que lamas provenientes de estações de tratamento de águas residuais (ETAR) possuem todo o tipo de nutrientes em concentrações adequadas para processos de DA. O mesmo não acontece com efluentes industriais, que possuem uma composição mais específica e poderão exigir suplementação nutricional adicional para alcançar taxas produtivas equiparáveis.

#### **2.3.1.1 Azoto**

Este nutriente inorgânico possui um papel preponderante para o crescimento microbiano, sendo necessárias altas concentrações deste elemento. Apenas a amónia e a fração orgânica deste elemento (disponível após degradação) constituem substrato biodisponível para os microrganismos, uma vez que azoto na forma de nitratos ou nitritos não é assimilável para o crescimento bacteriano sendo (sob condições anaeróbias) libertado para a atmosfera na forma de  $N_2$ . Graças à preferência bacteriana em substratos ricos de hidratos de carbono em prol de substratos contendo altos teores proteicos e ácidos voláteis, o primeiro tipo de substrato mencionado requer cerca de seis vezes mais azoto de forma a garantir o equilíbrio ecológico e simbiótico de todo o sistema (Lettinga, Pol, and Zeeman 1996, Chernicharo 2007).

#### **2.3.1.2 Fósforo**

Devido à mediação enzimática, mais concretamente de fosfatases, a maioria dos microrganismos é capaz de utilizar ortofosfato inorgânico durante o crescimento celular. De acordo com a literatura, a incorporação microbiana de fósforo na DA é aproximadamente 1/5 a 1/7 das necessidades estabelecidas para o azoto (Chernicharo 2007).

#### **2.3.1.3 Enxofre**

O sulfureto é o composto mais utilizado como fonte de enxofre pelos microrganismos microbianos, apesar da utilização de cisteína por algumas espécies. Este elemento é necessário à síntese proteica e inóculos provenientes de ETAR proporcionam concentrações suficientes de enxofre para suprir os requisitos nutricionais ao crescimento microbiano dado a sua necessidade reduzida, equiparável ao fósforo (Chernicharo 2007).

#### **2.3.1.4 Micronutrientes**

Para além dos macronutrientes mencionados, um leque variado de outros elementos, denominados de micronutrientes, são necessários para qualquer processo de DA, embora a determinação exata destes requisitos

micronutricionais seja bastante complexa. Dentro desta categoria destacam-se os metais ferro, cobalto, níquel e molibdénio necessários aos microrganismos metanogénicos, acidogénicos e acetogénicos (Chernicharo 2007).

### 2.3.2 Temperatura

A temperatura é um dos parâmetros físicos mais importantes para o crescimento selectivo microbiano. Devido à incapacidade de termoregulação por parte dos microrganismos, a temperatura interna celular é estabelecida pela temperatura do meio externo (Batstone et al. 2002). Este parâmetro afeta os processos biológicos de duas maneiras: (i) influenciando as velocidades das reações enzimáticas; (ii) influenciando as velocidades difusivas do substrato a biodegradar.

Na maioria dos processos biológicos são estabelecidas três gamas de temperatura ao crescimento microbiano. Embora exista na literatura alguma variância relativamente aos limites que caracterizam cada uma das gamas térmicas, segundo (Batstone et al. 2002), estas podem ser distinguidas como: (i) *gama psicrófila*, entre 4 e aproximadamente 15 °C; (ii) *gama mesófila*, entre 20 e aproximadamente 40 °C; (iii) *gama termófila*, entre 45 e 70 °C e por vezes superior;

Por outro lado, cada gama térmica pode ser singularmente classificada em função do crescimento microbiano que proporciona, como: (i) *temperatura mínima*, abaixo da qual não é registado crescimento microbiano; (ii) *temperatura ótima*, no qual se registam velocidades de crescimento máximas; (iii) *temperatura máxima*, acima da qual não é registado crescimento microbiano;

Deste modo, as temperaturas máximas e mínimas definem os limites das três gamas térmicas mencionadas e a temperatura ótima estabelece o valor onde se registam velocidades de crescimento máximas. A variação da temperatura não estabelece uma relação linear com o crescimento microbiano, uma vez que o crescimento microbiano quando próximo da temperatura mínima é tipicamente baixo e aumenta exponencialmente à medida que se aproxima da temperatura ótima. Muitas vezes, após ultrapassar a temperatura ideal em alguns graus, pode ocorrer uma queda abrupta nas velocidades de crescimento microbiano até ao colapso completo.

Relativamente aos processos anaeróbios, são registadas produções de metano numa gama de temperaturas bastante alargada, desde os 0 até aos 97 °C. Porém, são associados a este tipo de processos dois níveis ideais de temperatura, um na gama mesófila (30 °C a 40 °C) e outro na gama termófila (45 °C a 55 °C). Em condições de operação mesofílicas prevalecem os microrganismos do género *Methanobacterium*, *Methanobrevibacter*, *Methanospirillum*, *Methanosarcina* e *Methanosaeta* (Chernicharo 2007).

De forma a obter rendimentos energéticos/económicos alusivos a qualquer processo de DA são necessárias várias considerações relativamente à definição deste parâmetro. Apesar de maioria dos reatores anaeróbios operar em condições mesofílicas e considerando que certos substratos obtêm produções de metano similares quando comparadas as gamas térmicas operatórias, o mesmo não acontece com certas tipologias de substratos de mais difícil degradação. De facto, altas temperaturas favorecem o potencial produtivo de certos substratos, registando-se a prosperidade dos microrganismos, com a conseqüente diminuição dos TRH, velocidades de degradação de

substrato superiores e redução de agentes patogénicos. Porém, esta superioridade térmica torna os processos de DA mais instáveis o que pode causar desequilíbrios nas diversas tipologias microbianas. Devido às melhorias registadas relativamente às primeiras etapas do processo, a rápida acumulação de AGV associada ao reduzido pH característico destas etapas pode levar ao colapso do processo. Altas temperaturas favorecem igualmente a acumulação de amónia para concentrações consideradas inibitórias.

Embora, em muitas ocasiões, não se alcancem rendimentos produtivos máximos, a gama mesofílica permite obter produções bastante satisfatórias, não exigindo um *input* energético tão elevado (Yang et al. 2015).

### 2.3.3 pH e alcalinidade

Os microrganismos metanogénicos possuem um pH de crescimento ótimo entre 6,6 – 7,4, embora se consiga garantir a estabilidade produtiva alargando a gama desde os 6,0 até 8,0. Nestes processos, valores inferiores a 6,0 e superiores a 8,3 podem inibir a ação destes microrganismos e diminuir significativamente a produção de metano.

Por outro lado, a velocidade de crescimento ótima das bactérias acidogénicas está situada na gama pH entre 5,0 e 6,0, podendo estes microrganismos continuar bastante ativos com valores de pH de 4,5. A menor sensibilidade ao pH deste tipo de microrganismos traduz-se, na prática, à possível continuidade de produção ácida, diminuindo o pH do meio e conseqüente diminuição, ou até mesmo cessar da produtividade metanogénica (Lettinga, Pol, and Zeeman 1996, Chernicharo 2007).

No entanto, o pH ótimo depende não apenas do tipo de microrganismos envolvidos no processo, bem como do tipo de substrato que é alimentado, afetando processos de DA de duas maneiras distintas: (i) diretamente, através da influência na atividade enzimática por alteração da sua estrutura proteica; (ii) indiretamente: através da toxicidade de um vasto grupo de compostos.

A monitorização e controlo deste parâmetro garante uma melhor estabilidade do processo. O controlo pode ser executado através da adição de uma solução tampão, capaz de evitar grandes flutuações no pH. Os dois grandes fatores que influenciam o pH em processos de DA são o ácido carbónico e os ácidos voláteis. Com valores de pH entre 6,0 e 7,5, a capacidade tampão de um sistema de DA depende quase exclusivamente da relação dióxido de carbono/alcalinidade. A quantidade de ácido carbónico na fase aquosa está diretamente relacionada com a quantidade de dióxido de carbono na fase gasosa (traduzida pela *Lei de Henry*) e em situações de equilíbrio operatório, a dissociação de ácido carbónico regula a concentração de iões  $H^+$ . Por outro lado, a interação entre a alcalinidade e ácidos voláteis é baseada na capacidade do sistema em neutralizar os ácidos formados nas etapas iniciais do processo e tamponizar o pH em caso de acumulação de ácidos voláteis. A degradação de hidratos de carbono e álcoois não permite a formação de catiões como produtos finais, impossibilitando deste modo a produção de alcalinidade. Este fato é particularmente importante, pois graças à preferência microbiana na degradação deste tipo de substratos, poderá ocorrer um decréscimo acentuado de alcalinidade que é conseqüentemente canalizada para a neutralização destes compostos, impossibilitando a neutralização necessária aos compostos carbónicos. Conseqüentemente, o sistema deverá ser suplementado com alcalinidade associada ao bicarbonato. Do ponto de



vista operatório, são desejáveis altos teores de alcalinidade no inóculo fornecido ao sistema, de modo a que possam tornar possível a auto-neutralização do processo, ou seja, tamponizando altas concentrações de AGV sem causar graves decréscimos no pH. Porém, em casos onde é necessária uma suplementação alcalina, a escolha dos compostos químicos em questão deverá ser equacionada em termos económicos e de aplicabilidade. De entre os vários produtos químicos usados no controlo do pH em processos de DA destacam-se a cal hidratada ( $\text{Ca}(\text{OH})_2$ ), cal viva ( $\text{CaO}$ ), carbonato de sódio ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ), bicarbonato de sódio ( $\text{NaHCO}_3$ ), hidróxido de sódio ( $\text{NaOH}$ ) e bicarbonato de amónia ( $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ ). Apesar da cal ser a fonte de alcalinidade mais barata, a sua insolubilidade pode causar sérios problemas operacionais. O bicarbonato de amónia é igualmente bastante atrativo do ponto de vista económico, mas a sua aplicação associada às concentrações de amónia proporcionadas pelo inóculo poderá ser proibitiva devido à toxicidade deste composto. O bicarbonato de sódio é o composto mais usado neste tipo de processos, uma vez que é de fácil manuseamento, altamente solúvel e não aumenta substancialmente o pH quando doseado excessivamente (Foresti 1994, Haandel and Lettinga 1994, Lettinga, Pol, and Zeeman 1996, Chernicharo 2007).

### 2.3.4 Agitação

A agitação ou pré-agitação suave garante a otimização da distribuição dos microrganismos e nutrientes, garantindo igualmente mais eficiências do processo de DA. Agitação em excesso reduz a oxidação de ácidos gordos devido à rutura dos granulos formados pelos polímeros extracelulares e promove a formação de espuma. A pré-agitação completa do substrato com o inóculo é comum em estudos à escala laboratorial, enquanto que estudos recentes demonstram que a pré-agitação permite a redução da quantidade de inóculo e do input energético em operações em grande escala. Este parâmetro poderá ser assegurado através de dispositivos de agitação mecânica e/ou recorrendo à recirculação da fração aquosa (Nizami, Korres, and Murphy 2009, Yang et al. 2015).

## 2.4 Toxicidade

A toxicidade é considerada uma das maiores razões para o ceticismo da utilização deste tipo de processos, uma vez que existe atualmente um conhecimento generalizado que os processos de DA são suscetíveis à toxicidade. De facto, apesar de os microrganismos metanogénicos possuírem uma certa capacidade de adaptação a determinadas concentrações inibitórias, estes podem ser facilmente inibidos através de determinadas toxinas até taxas produtivas nulas. Uma vez que qualquer composto orgânico e inorgânico pode ser considerado tóxico quando as suas concentrações em determinados meios são elevadas, a toxicidade deve ser discutida em função de níveis de toxicidade em vez de materiais tóxicos (Chernicharo 2007).

### 2.4.1 Sais

A toxicidade proporcionada por sais é normalmente associada aos catiões ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{Mg}^{2+}$ ) e não aos aniões do sal. Quando determinado inóculo apresenta concentrações de sais inibitórias, esta inibição poderá ser atenuada através da adição de determinado ião antagonista, normalmente doseados na forma de sais clorídricos (Lettinga, Pol, and Zeeman 1996, Chernicharo 2007).

### 2.4.2 Amónia

Embora benéficas ao funcionamento de qualquer digestor anaeróbio, ambas as formas deste composto, tanto na forma iónica ( $\text{NH}_4^+$ ), como na sua forma livre ( $\text{NH}_3$ ), podem ser inibitórias na presença de concentrações elevadas (Chernicharo 2007). A concentração destas duas formas de amónia é regulada pelo pH do meio segundo a seguinte equação:



Na tabela 2.2 são apresentadas as concentrações relativas aos efeitos benéficos ou adversos da amónia livre em processos de DA.

**Tabela 2.2** – Efeitos da amónia livre em processos anaeróbios.

Concentração (mg N·L <sup>-1</sup> )	Efeito
50 a 200	Benéfico
200 a 1000	Nenhum efeito adverso
1500 a 3000	Inibidor para pH > 7,4 a 7,6
Acima de 3000	Tóxico

Adaptado de (McCarty 1964).

### 2.4.3 Sulfureto

A toxicidade deste composto, brevemente discutida em capítulos anteriores, constitui um problema para processos de DA. A dissociação do  $\text{H}_2\text{S}$  na fase aquosa é coordenada pela temperatura e pH do meio segundo as seguintes equações:



A inibição proporcionada pelo sulfureto está dependente da sua concentração na forma não dissociada de sulfureto de hidrogénio ( $\text{H}_2\text{S}$ ) no meio, uma vez que se trata da espécie mais tóxica para os microrganismos. Por outro lado, o  $\text{H}_2\text{S}$  apresenta-se nas fases gasosa e aquosa, estando a sua distribuição na fase gasosa dependente da produção de biogás, uma vez que quanto mais elevada for a produção de metano, mais  $\text{H}_2\text{S}$  será transferido da fase aquosa

para a fase gasosa. A sua toxicidade poderá ser atenuada pelo aumento da concentração de CQO no meio, sendo genericamente assumido um rácio CQO/SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> superior a 10 de forma a não comprometer o funcionamento de um reator anaeróbio (Chernicharo 2007).

#### 2.4.4 Metais

Elementos ou compostos como o crómio, níquel, zinco, cobre, arsénio, cianetos entre outros, são classificados como altamente tóxicos, mesmo apresentando concentrações baixas, como é o caso do Cu<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup> e Ni<sup>2+</sup>. Apesar de igualmente tóxico em processos de tratamento anaeróbio, as concentrações de sulfureto no meio aquoso combinam com os metais formando sais de sulfureto insolúveis que não apresenta efeitos adversos ao processo (Chernicharo 2007).

## 2.5 Inóculo

A DA consiste num processo complexo que exige a presença de diferentes espécies microbianas. Deste modo, torna-se imperativo descobrir o inóculo apropriado, que contenha os microrganismos necessários para que o processo de degradação possa ser estabelecido (Angelidaki and Sanders 2004). O inóculo não só proporciona um consórcio microbiano variado, como também macro e micro nutrientes e capacidade de neutralização (Yang et al. 2015).

#### 2.5.1 Tipo de Inóculo

O inóculo deve possuir uma ampla composição trófica de modo a garantir a biodegradação de qualquer tipo de substrato (Angelidaki et al. 2006, Angelidaki et al. 2009). Frequentemente, as lamas digeridas constituem o tipo de inóculo mais usado em processos de DA. No entanto, a utilização do material digerido (produto final resultante do processo) é preferível relativamente a outras fontes de inóculo, como lamas ativadas (suspensas ou granulares), esterco de gado e fluidos de ruminantes, pois possuem populações microbianas metanogénicas já perfeitamente desenvolvidas e adaptadas ao ambiente anaeróbio, reduzindo assim o risco de inibição (Yang et al. 2015, Angelidaki et al. 2006). Inóculos provenientes de reatores com composições de alimentação específicas deverão ser misturados com diferentes tipos de inóculo, inclusivamente inóculos mesofílicos e termofílicos (Angelidaki et al. 2006).

#### 2.5.2 Quantidade de inóculo

A quantidade de inóculo a adicionar constitui outro fator importante a este tipo de processos. Numa perspectiva de determinação do potencial de biometanização (PBM) são desejáveis pequenas quantidades de inóculo, uma vez que esta fração constituinte de um meio anaeróbio contribui igualmente para a formação de biogás e poderá

comprometer os resultados relativos ao substrato sob investigação. A aplicação de pequenas quantidades de inóculo poderá originar acidificação do processo por incapacidade neutralizante, que é garantida pelas altas concentrações proteicas características de diferentes tipos de inóculo (Angelidaki and Sanders 2004). Deste modo, dependendo da atividade microbiana e da sua concentração, o volume correspondente ao inóculo varia entre 10 a 80% do volume total de operação, sendo tipicamente aplicadas frações de 70 a 80% para inóculos de reduzida atividade microbiana (lamas suspensas activadas ou esterco de gado) e frações de 10 a 20% para inóculos com alta atividade microbiológica (lamas granulares) (Angelidaki et al. 2006, Angelidaki et al. 2009). Por outro lado, a inoculação poderá ser efetuada em função do rácio entre substrato e inóculo (RSI), descrito igualmente na literatura como *feedstock-to-inoculum (F/I) ratio*, *feedstock-to-microbe (F/M) ratio*, or *substrate-to-inoculum (S/I) ratio*, podendo ser calculado em função de ST, SV, massa total ou volume total (Angelidaki et al. 2006, Yang et al. 2015).

### 2.5.3 Considerações e tratamento do inóculo

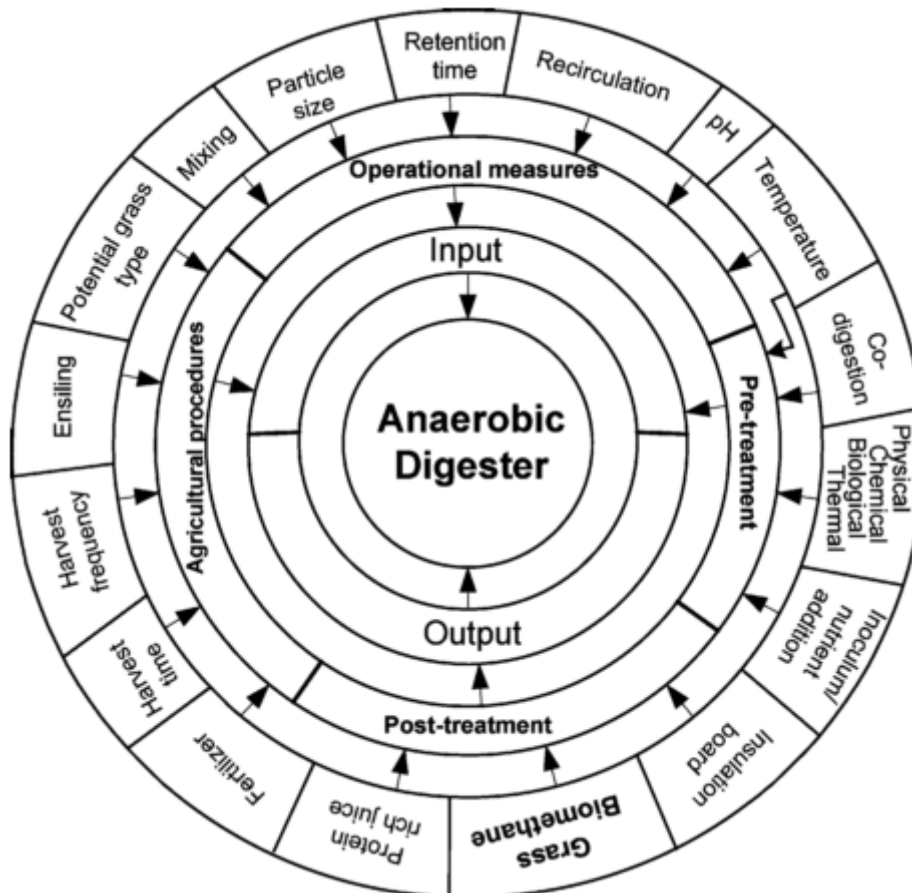
Independentemente da sua proveniência, o inóculo deve ser fresco e representativo e não deverá ser armazenado por períodos que ultrapassem alguns dias. Este deve também ser “desgasificado”, ou seja, deverá ser pré-incubado, permitindo deste modo o consumo da matéria orgânica remanescente até não se registarem produções de biogás significativas. Esta incubação é normalmente executada durante 2 a 5 dias à mesma temperatura em que o processo de DA será estabelecido. Por outro lado, deverão ser removidos materiais de grandes dimensões, como sedimentos entre outras partículas de tamanho considerável (Angelidaki et al. 2006, Angelidaki et al. 2009).

## 2.6 Biomassa

### 2.6.1 Biomassa como substrato em processos de digestão anaeróbia

A biomassa consiste no método de armazenamento de energia solar preferido pela Natureza, encontrando-se disponível como fonte de energia renovável, na forma de distintos materiais como madeira, resíduos alimentares, colheitas diversas e relva/erva (Abu-Dahrieh et al. 2011). As pastagens possuem um papel importantíssimo na agricultura global, cobrindo grande parte da superfície do planeta. Atualmente as pastagens são predominantemente usadas como recurso alimentar à pecuária de ruminantes. Para além dos propósitos agro-pecuários, as pastagens proporcionam inúmeras funções ecológicas que incluem o armazenamento/sequestro de carbono, previnem a erosão do solo, asseguram a recarga de aquíferos, garantindo igualmente habitat para várias espécies, formam parte essencial da diversidade de paisagens culturais e servem como base para atividades recreativas e turísticas, contribuindo para o desenvolvimento rural e económico. A biomassa das pastagens permite uma produção energética variada, sendo usualmente utilizada como substrato para a produção de biogás e biocombustíveis sólidos para combustão. O interesse em usar substratos lignocelulósicos como matéria-prima em sistemas bioenergéticos e de biorefinaria é relativo ao seu alto potencial em termos de produção de metano por hectare (Nizami and Murphy 2010). Por outro lado, esta fonte de energia permite uma redução substancial de emissões de GEE comparativamente aos combustíveis fósseis (Navickas et al. 2012). Graças ao seu notável potencial

energético, nos últimos 10 – 15 anos registou-se um aumento bastante significativo da consideração deste recurso para biometanização principalmente na Europa e América do Norte (Prochnow et al. 2009). De facto, apenas na Alemanha, o número de digestores anaeróbios, utilizando biomassa, aumentou de cerca de 100 instalações em 1990 até aproximadamente 4000 em 2008 (Braun, Weiland, and Wellinger 2010), sendo a silagem de erva o substrato mais utilizado depois da silagem de milho (Nizami and Murphy 2010). Para além das novas oportunidades proporcionáveis ao sector agrícola, a DA deste tipo de substratos é igualmente favorável do ponto de vista da gestão de resíduos, pois permite o encaminhamento de resíduos agro-florestais, fração orgânica de RSU e resíduos da indústria alimentar. O produto final digerido, muitas vezes tratado como resíduo, garante mais uma vantagem excepcional deste tipo de tecnologia, pois poderá ser utilizado como fertilizante/corretor agrícola, pois é normalmente rico em nutrientes como azoto e fósforo (Gatta et al. 2013, Yang et al. 2015). Na seguinte figura é ilustrado um diagrama circular com os principais fatores que determinam a eficácia produtiva metanogénica através de substratos lignocelulósicos em processos de DA.



**Figura 2.1** – Diagrama circular dos principais fatores que determinam a eficácia produtiva metanogénica através de substratos lignocelulósicos em processos de DA (Nizami, Korres, and Murphy 2009).

### 2.6.2 Características dos substratos lignocelulósicos

O aumento substancial registado nos últimos anos no uso de relva como substrato aos processos de DA deve-se à sua alta biodegradabilidade associada às taxas de produção de biogás quando comparada com a fracção orgânica dos RSU. Porém, apesar da abundância deste material orgânico e do bom PBM, parte da matéria orgânica da biomassa lignocelulósica é recalcitrante (Nizami, Korres, and Murphy 2009, Yang et al. 2015).

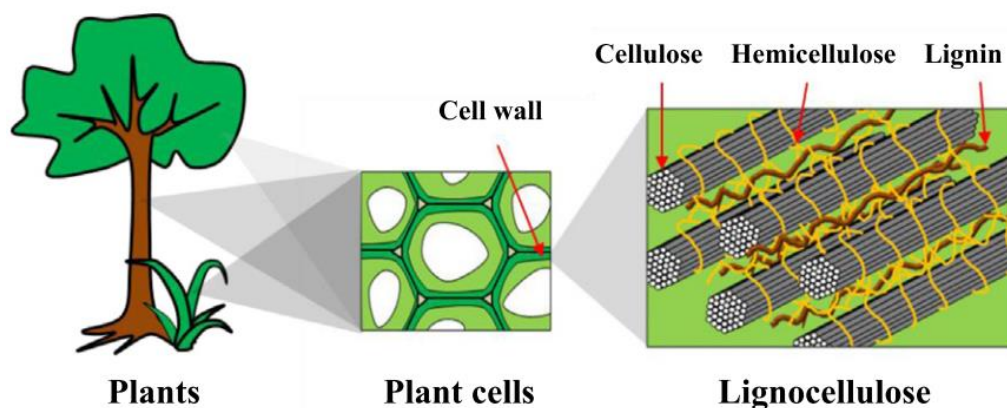
A celulose, hemicelulose e lenhina constituem os três principais polímeros de materiais lignocelulósicos como a relva/erva. O conteúdo da relva depende de vários fatores que irão influenciar a produção de metano, como a sua espécie, estado de maturação, localização, variações sazonais, práticas de cultivo, tipo de solo e pré-tratamento. Apesar da heterogeneidade proporcionada por todos estes fatores, na tabela 2.3 é apresentada a composição química da relva.

**Tabela 2.3** – Composição química da relva.

Composto/Elemento		Relva
Celulose	%	25 – 40
Hemicelulose	%	15 – 50
Lenhina	%	10 – 30
Cinza	%	1,5
C	%	49,93
N	%	2,05
K	%	1,51
Ca	mg·kg <sup>-1</sup>	1,91
Mg	mg·kg <sup>-1</sup>	0,26
B	mg·kg <sup>-1</sup>	23
Cu	mg·kg <sup>-1</sup>	13
Fe	mg·kg <sup>-1</sup>	0,29
Zn	mg·kg <sup>-1</sup>	72
Na	mg·kg <sup>-1</sup>	915

Adaptado de (Nizami, Korres, and Murphy 2009).

A forte interligação entre os três polímeros mencionados com forças não covalentes e transversais covalentes (ligações de hidrogénio e forças de van der Waals) garante a estabilidade estrutural da planta (figura 2.2). A celulose (polissacarídeo de glicose) e hemicelulose são macromoléculas que podem ou não conter as mesmas unidades de hidratos de carbono, enquanto que a lenhina é um polímero aromático constituído por precursores fenilpropanoide. Este tipo de substrato possui igualmente compostos proteicos, extratos lipídicos, pectina e hidratos de carbono não estruturais.



**Figura 2.2** – Estrutura da biomassa lignocelulósica nas paredes das células vegetais (fonte:(Yang et al. 2015))

As estruturas celulósicas apresentam-se nas formas amorfa, que é facilmente digerível e na forma cristalina que constitui uma barreira à ação microbológica. Apesar da celulose ser resistente à hidrólise, o mesmo não acontece com a hemicelulose, que devido à sua estrutura amorfa é facilmente hidrolisável. A lenhina representa a parte mais recalcitrante dos hidratos de carbono estruturais graças à sua insolubilidade aquosa, resistência à ação microbiana e a forças oxidativas. Por outro lado, a percentagem deste composto no conteúdo das células vegetais aumenta com a maturidade da planta.

De facto, é preferível colher a biomassa em estados de maturação iniciais, na perspetiva de obtenção de substrato com conteúdos fermentáveis mais elevados e baixos conteúdos em fibras. Deste modo, a biodegradabilidade dos substratos lignocelulósicos em digestores anaeróbios é limitada pelo seu conteúdo em celulose cristalina e lenhina, reforçada ainda pelo alto conteúdo em fibras, que diminuem a solubilização que se traduz em baixas conversões de sólidos voláteis em CQO biodegradável. Porém, é possível alcançar melhorias nas taxas de solubilização e consequente degradação destes compostos mais recalcitrantes através da aplicação de pré-tratamentos aos processos de DA, removendo e/ou eliminando assim ligações, barreiras, cristalinidade e graus de polimerização, proporcionando produções de metano mais eficientes (Nizami, Korres, and Murphy 2009, Yang et al. 2015).

Residem assim duas questões fundamentais para alcançar uma produção sustentável de biogás através de substratos lignocelulósicos (Tsapekos, Kougias, and Angelidaki 2015): (i) um método de pré-tratamento que seja custo-eficiente para aumentar o PBM da biomassa; (ii) Um método de conservação adequado que garanta um fornecimento de relva contínuo ao longo do ano.

Uma vez que a relva é produzida sazonalmente, embora as instalações de produção de biogás necessitem de alimentação contínua, torna-se necessária a conservação de substrato de modo a que garanta equidade qualitativa e de fornecimento. A silagem é a forma de conservação mais utilizada globalmente, permitindo a preservação energética do substrato, com perdas pouco significativas quando executada devidamente. As circunstâncias de recolha da biomassa para posterior silagem (processamento mecânico) permite igualmente a poupança energética em processamentos adicionais à DA e na etapa de armazenamento a biomassa é sujeita a vários tratamentos que

melhoram a sua digestibilidade. No entanto, a pesquisa da aplicação desta técnica de armazenamento de substrato para a DA ainda é muito precoce. Com a silagem alteram-se as propriedades físicas e químicas da biomassa que irão afetar direta ou indiretamente a biometanização, desde o tamanho das partículas, através da adição de aditivos e da duração do próprio processo de silagem. A aplicação desta técnica é preferível à secagem e posterior conversação (palha/feno), pois garante perdas de matéria orgânica inferiores e evita a exposição do substrato a condições climáticas adversas que poderão comprometer a sua posterior utilização. No entanto, durante a silagem perdem-se nutrientes devido à respiração das plantas, fermentação e armazenamento. A respiração aeróbia envolve a ação de enzimas que degradam os hidratos de carbono e promove a formação de água, dióxido de carbono e calor. O calor produzido poderá originar temperaturas acima dos 40 °C, reduzindo assim a digestibilidade proteica significativamente. Porém, a silagem garante maiores produções de metano por tonelada de matéria orgânica seca que a relva. Outra vantagem adicional em instalações de biogás é a operação com matéria fresca (relva) no verão, quando existe maior disponibilidade deste substrato, e a utilização de silagem nos meses de inverno. Também, a rotação aplicada ao cultivo de diferentes espécies de substratos lignocelulósicos garante maior produtividade agrícola, que se reflete num aumento da produção de metano por hectare (Nizami, Korres, and Murphy 2009, Prochnow et al. 2009). Na tabela 2.4 apresentam-se algumas produções de biogás e metano de substratos lignocelulósicos de diferentes características, para além de outras particularidades técnicas que serão abordadas posteriormente.



**Tabela 2.4** – Performance de diferentes digestores anaeróbios aplicando substratos lignocelulósicos ((Prochnow et al. 2009).

Sistema	Escala	Temperatura (°C)	Regime	TRH (d)	Características do substrato	Produção de Biogás (m <sup>3</sup> ·kg SV <sup>-1</sup> )	Produção de CH <sub>4</sub> (m <sup>3</sup> ·kg SV <sup>-1</sup> )
Batch	Laboratorial	35	Co-digestão	25	Erva de pastagens (junho) e silagem	0,7 - 0,72	n.r.
					Erva de pastagens (agosto), silagem e feno	0,54 - 0,58	n.r.
					Erva de pastagens, silagem e feno	0,5 - 0,6	n.r.
		37 - 39	Mono-digestão	28	3 espécies de erva (1º corte; maio) e silagem	0,65 - 0,86	0,31 - 0,36
					3 espécies de erva (2º corte; maio) e silagem	0,56 - 0,61	0,30 - 0,32
					Mistura de erva de pastagens, trevo e silagem (meados de maio)	0,53	0,37
		37 - 39	Mono-digestão	59	Mistura de erva de pastagens, trevo e silagem (fim de maio)	0,47	0,32
Mistura de erva de pastagens, trevo e silagem (meados de junho)	0,42				0,29		
Contínuo	Agrícola	35	Co-digestão	20	Erva de pastagens e silagem	0,5 - 0,55	n.r.
Contínuo	Laboratorial			18 - 36	Erva de pastagens, silagem e feno	0,5 - 0,55	n.r.

Adaptado de (Nizami and Murphy 2010).

### 2.6.3 Pré-tratamento

As propriedades dos substratos lignocelulósicos tornam-os recalcitrantes à biodegradação, incluindo a cristalinidade celulósica, área superficial acessível, grau de polimerização da celulose e presença de lenhina e hemicelulose. O objetivo do pré-tratamento consiste no melhoramento da digestibilidade enzimática/microbiana da biomassa relativamente às propriedades mencionadas. Os pré-tratamentos podem ser divididos em físicos, químicos e biológicos e não só devem melhorar a acessibilidade à biomassa durante a hidrólise, como também devem evitar a perda significativa de hidratos de carbono durante a sua aplicação, permitindo uma maior produção de biogás. O pré-tratamento físico é o mais desenvolvido e recorre a métodos ausentes de químicos ou microrganismos como a fragmentação (ex. moagem, trituração), auto-hidrólise (*steam explosion*), hidrotermólise (liquid hot water), extrusão e irradiação (ultra-sons e/ou microondas). O pré-tratamento químico sugere a utilização de compostos químicos, como ácidos, bases e líquidos iónicos para alterar a composição física e química dos substratos lignocelulósicos e das três categorias de pré-tratamento abordadas constitui o alvo preferencial da investigação. O pré-tratamento biológico

aplicado aos processos de DA tem sido principalmente focado em pré-tratamento fúngico, pré-tratamento através de consórcios microbianos e pré-tratamentos enzimáticos. Comparado com as outras categorias, o pré-tratamento biológico exige um *input* energético inferior e dispensa a aplicação de compostos químicos, que podem inibir a posterior atividade microbiana durante o processo de DA. Por outro lado, a aplicação de um único método de pré-tratamento poderá não se revelar eficiente devido à sua especificidade funcional e desvantagens intrínsecas, pelo que a aplicação de dois ou mais métodos dentro ou não da mesma categoria é comum e recomendável. Porém, esta pluralidade, poderá aumentar os custos relativos ao pré-tratamento. Os efeitos na composição física e química da biomassa lignocelulósica através da aplicação das diferentes técnicas de pré-tratamento encontram-se sumariadas na tabela 2.5. Apesar de existir um reconhecimento generalizado dos benefícios alusivos às técnicas de pré-tratamento será necessária uma avaliação custo-benefício para determinar a viabilidade da sua aplicação.

**Tabela 2.5** – Efeito do pré-tratamento na composição e alteração estrutural da biomassa lignocelulósica (adaptado de (Nizami, Korres, and Murphy 2009, Zheng et al. 2014, Yang et al. 2015).

Solubilização						
Pré-tratamento	Aumento da acessibilidade à área superficial	Decristalização da Celulose	Hemicelulose	Lenhina	Alteração da estrutura da Lenhina	Aumento Produtivo médio (%)
Mecânico	●	●	-	-	-	n.d.
Irradiação	●	○	○	-	○	n.d.
Steam explosion	Auto-hidrólise	-	●	○	●	33
	catalítica	●	n.d.	●	○	
Hidrotermólise (LHW)	●	-	●	●/○	●	75
Ácido	●	-	●	○	●	85
Alcalino	●	-	○	●/○	○	160
Oxidativo	●	n.d.	-	●/○	○	71
Líquidos iónicos	●	●	○	-	-	n.d.
Térmico	Ácido	●	n.d.	●	-	n.d.
	Alcalino	●	n.d.	○	●/○	n.d.
	Oxidativo	●	n.d.	○	●/○	n.d.
AFEX	●	●	○	●	○	n.d.
Biológico	●	n.d.	●	●	-	132

“●” – maior efeito; “○” – menor efeito; “n.d.” – não determinado; “-” – nenhum efeito significativo

LHW – Liquid Hot Water

AFEX – Ammonia Fiber Explosion

## 2.7 Glicerol

### 2.7.1 Glicerol como substrato em processos de digestão anaeróbia

A produção europeia de biodiesel teve início desde 1992 através de processos de transesterificação de óleo vegetal, gordura animal ou alimentar. Atualmente são produzidas mais de 9 000 000 de toneladas de biodiesel por ano, através de cerca de 120 instalações, que juntas possuem uma capacidade produtiva anual de mais de 20 000 000 toneladas de biodiesel. O glicerol bruto apresenta-se como o principal sub-produto resultante da aplicação desta tecnologia, constituindo cerca de 10% em massa da matéria-prima inicial e possui mais de 2000 possíveis aplicações (Astals, Nolla-Ardèvol, and Mata-Alvarez 2012, Baba et al. 2013). Hoje em dia, em algumas regiões, o glicerol é rejeitado como resíduo devido a vários fatores, como a falta de escoamento deste produto nos mercados, os custos elevados associados ao tratamento e refinamento do glicerol bruto e o facto do glicerol bruto possuir limitadas aplicações diretas devido à quantidade de impurezas. Perante este cenário, têm sido investigadas aplicações economicamente viáveis para o encaminhamento deste sub-produto orgânico, facilmente digerível e armazenável durante longos períodos. Tais vantagens tornam o glicerol ideal como co-substrato na valorização energética através de processos de DA (Fountoulakis, Petousi, and Manios 2010). De facto, têm surgido na literatura diversos estudos referindo os benefícios da adição de glicerol no melhoramento da DA de diversas tipologias de resíduos, como resíduos agrícolas, resíduos industriais, esterco de gado, resíduos frutícolas e vegetais, fração orgânica dos RSU, esterco suíno, lamas ativadas, óleos de peixe, gorduras animais, etc... No entanto, a sua aplicação poderá originar sobrecarga em matéria orgânica rapidamente biodegradável, resultando em condições de desequilíbrios e inibição, chegando, inclusivamente, à interrupção completa do processo de DA. Estudos recentes na aplicação de glicerol na DA de esterco suíno, silagem de milho e colza revelam que a sua dosagem não deverá ultrapassar os 6% (v/v). No entanto, as instalações de biogás possuem mecanismos de controlo que permitem reduzir o risco de sobrecargas orgânicas. Por outro lado, a mistura entre glicerol e esterco possui um ótimo potencial, pois o elevado conteúdo aquoso nos esterco atua como solvente do glicerol e a alta alcalinidade característica dos esterco garante a neutralização temporária em AGV imediatamente disponíveis pela adição de glicerol (Holm-Nielsen et al. 2008, Astals, Nolla-Ardèvol, and Mata-Alvarez 2012).

O glicerol poderá igualmente constituir o elo de ligação sinérgico entre a produção de biodiesel e de biogás como um conceito de biorefinaria integrado. De facto, o sub-produto sólido digerido da DA pode ser aplicado como fertilizante às plantações necessárias como matéria-prima à produção de biodiesel e ao mesmo tempo o glicerol proporcionará uma adição extra em carbono aos processos de DA, aumento assim a produção metanogénica. (Holm-Nielsen et al. 2008).

### 2.7.2 Características e propriedades do glicerol

O glicerol, comumente conhecido como glicerina é o maior sub-produto da indústria do biodiesel, onde sensivelmente 100 kg de matéria-prima geram 10 kg de glicerol bruto (Baba et al. 2013). Apesar de dispendiosa, a purificação de glicerol bruto numa substância química pura resulta num produto com alto valor industrial, possuindo

uma excelente utilidade nas mais diversas áreas de aplicação. Graças à combinação única de propriedades físicas e químicas, o glicerol representa um produto tecnicamente versátil e facilmente compatível com muitas outras substâncias, não apresentando qualquer tipo de toxicidade para saúde humana e para o ambiente. O glicerol pode ser caracterizado como glicerol bruto, glicerol purificado/refinado e glicerol comercial. Fisicamente, o glicerol é solúvel em água, claro ou quase transparente, sem odor, viscoso, higroscópico e com alto ponto de ebulição. Quimicamente, é um álcool trihídrico estável em diversas condições, com uma composição elementar maioritária de C, H, e O que realça o seu alto teor orgânico. Na tabela 2.6 estão sumariadas algumas propriedades físicas e químicas das diferentes categorias de glicerol.

**Tabela 2.6** – Propriedades físicas e químicas de diferentes categorias de glicerol (adaptado de (Ayoub and Abdullah 2012)).

Parâmetro/Elemento		Glicerol (CH <sub>2</sub> OH-CHOH-CH <sub>2</sub> OH)		
		Bruto	Purificado	Refinado/Comercial
Massa molecular	g·mol <sup>-1</sup>	-		92,09
Massa volúmica	g·mol <sup>-1</sup>	-		1,26
Ponto de Fusão	°C	-		17,9
Ponto de Ebulição	°C	-		290
Conteúdo em Glicerol	%	60 – 80	99,1 – 99,8	99,2 – 99,98
Humidade	%	1,5 – 6,5	0,11 – 0,8	0,14 – 0,29
Cinza	%	1,5 – 2,5	0,054	<0,002
Sabão	%	3,0 – 5,0	0,56	-
pH	-	0,7 – 1,3	0,10 – 0,16	0,04 – 0,07
Cloreto	ppm	n.d.	1,0	0,6 – 9,5
Cor	(APHA)	Escura	34 – 45	1,8 – 10,3
C	%	52,8	-	-
H	%	11,1	-	-
N	%	<0,0001	-	-
S	%	-	-	-
P	%	-	-	-
O	%	36,2	-	-

Os seus altos teores em carbono e oxigénio fazem do glicerol uma fonte de energia renovável para várias aplicações, tornando-o ambientalmente favorável face à actual tentativa de redução do uso de combustíveis fósseis.

## 2.8 Co-digestão

A co-digestão anaeróbia consiste na DA de uma mistura de dois ou mais substratos simultaneamente com características complementares, na tentativa de reduzir os inconvenientes da mono-digestão em termos de viabilidade económica, alcançando remoções de matéria orgânica e produções metanogénicas superiores (Astals,

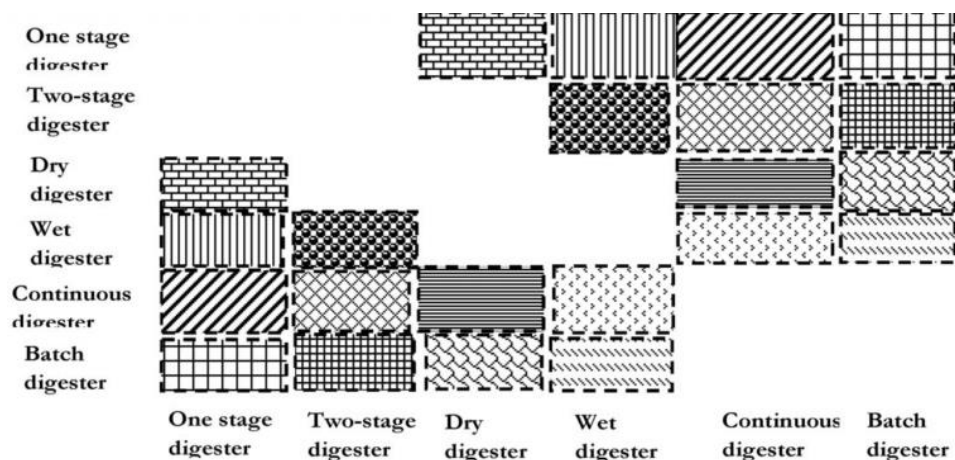
Nolla-Ardèvol, and Mata-Alvarez 2012, Yang et al. 2015, Mata-Alvarez et al. 2014). Esta abordagem permite uma maior diversidade nutricional e microbiológica, permitindo igualmente um balanceamento na razão C/N, um melhoramento na capacidade neutralizante e a diluição de compostos inibidores. Em algumas circunstâncias é aplicável o conceito de  $1 + 1 > 2$ , ou seja, a co-digestão de dois substratos poderá obter produções metanogénicas superiores comparativamente à mono-digestão de cada um deles. Segundo (Mata-Alvarez et al. 2014) a investigação desta abordagem técnica tem incidido sobretudo no uso de esterco de animais, lamas ativadas e resíduos biológicos, com poucas referências à co-digestão de substratos lignocelulósicos. A biomassa lignocelulósica geralmente possui um rácio C/N superior a 50:1, enquanto que outros resíduos, como os resultantes da indústria de processamento animal, possuem rácios inferiores devido ao seu alto teor proteico (Yang et al. 2015).

Torna-se assim necessária a escolha do melhor co-substrato que proporcione um ótimo rácio C/N, favorecendo as sinergias, diluindo compostos indesejáveis, otimizando a produção metanogénica e não comprometendo a qualidade do digerido (Mata-Alvarez et al. 2014).

## 2.9 Digestores Anaeróbios

Comparativamente a procedimentos/técnicas operacionais e processuais, os procedimentos adotados à escala laboratorial/piloto diferem dos procedimentos adotados à escala industrial, por razões maioritariamente económicas. De facto, a investigação à escala laboratorial ignora muitas vezes o potencial à escala industrial, pelo que esta vertente académica deveria focar-se na incorporação a grande escala das melhores técnicas alcançadas laboratorialmente (Nizami, Korres, and Murphy 2009).

Globalmente existem diversas configurações de digestores anaeróbios, utilizando abordagens diferentes relativamente ao número de etapas/estágios (único ou duplo), à via (seca ou húmida), alimentação (batch ou contínuo), bioreatores de alta carga e combinações entre diferentes sistemas como é demonstrado na figura 2.3.



**Figura 2.3** – Combinações possíveis entre os vários tipos de digestores (adaptado de (Nizami and Murphy 2010)).

A otimização do *design* de um digestor foca-se sobretudo na obtenção de taxas de alimentação orgânicas superiores (TAO), TRH reduzidos e produções metanogénicas elevadas, através do melhoramento de parâmetros operacionais como a agitação, número de tanques, temperatura e pelas propriedades do substrato. Na tabela 2.7 são distinguidos os vários sistemas de DA em função de alguns parâmetros operacionais.

**Tabela 2.7** – Comparação de diferentes configurações de digestores em função de alguns parâmetros operacionais (Nizami and Murphy 2010).

Sistema		Produção de Biogás	Teor de Sólidos (%)	Custo	Destruição SV	TRH (d)	TAO (kg SV·(m <sup>3</sup> ·d) <sup>-1</sup> )
Estágio	Único	Irregular e descontínua	10 - 400	Menor	Inconclusiva	10 – 60	0,7 – 15
	Duplo	Alta e estável	2 - 400	Maior	Alta	10 – 15	10 – 15 para a 2 <sup>a</sup> etapa
Via	Seca	Alta	20 - 50	Menor	40 – 70 %	14 – 60	12 – 150
	Húmida	Menor e irregular	2 - 120	Maior	40 – 75 %	25 – 60	< 5
Alimentação	Batch	Irregular e descontínua	25 - 40	Menor	40 – 70 %	30 – 60	12 – 150
	Contínua	Contínua	2 - 150	Maior	40 – 75 %	30 – 60	0,7 - 1,4
Bioreatores de alta carga		Contínua e elevada	<4 - 15	Maior	75 – 98 %	0,5 – 12	10 – 150

Relativamente a número de estágios, os sistemas de único estágio concentram a totalidade das etapas do processo de DA num único reator, ao contrário dos sistemas de estágio duplo, que permitem a separação das fases microbiológicas. Esta separação de fases microbiológicas permite que a hidrólise e a acidogénese ocorram no primeiro reator e a acetogénese e metanogénese no segundo reator, incorporando este último o armazenamento do digerido e o sistema de recolha de biogás. Embora os limites que definem a determinação deste tipo de sistemas não apresente a devida coerência na literatura, (Vandevivere, Baere, and Verstraete 2003) definem sistemas de DA por via seca quando o teor de matéria seca da sua alimentação consiste em 20 – 40 % e teores em matéria seca inferiores a 20% são classificados como sistemas húmidos, no entanto, (Yang et al. 2015) estabelecem 15% ST para a diferenciação entre os dois sistemas. Quanto à alimentação, em digestores batch o reator é alimentado uma vez com conteúdo fresco durante um certo período de tempo, sendo fechado de seguida até degradação completa do substrato adicionado. Já nos digestores contínuos, o substrato é alimentado continuamente por via mecânica ou forçado pela entrada de substrato fresco. Os digestores de alta carga, como *UASB* (*Upflow anaerobic sludge blanket*), apresentam TRH elevados devido à fixação da biomassa aos suportes de alta densidade e consequente formação de grânulos altamente sedimentáveis. A tabela 2.8 resume algumas vantagens e desvantagens dos vários tipos de digestores anaeróbios mencionados.

**Tabela 2.8** – Comparação das vantagens e desvantagens de vários tipos de reactores (Nizami and Murphy 2010).

Sistema		Vantagens	Desvantagens
Estágio	Único	Design simples	TRH elevados
		Risco reduzido de falha técnica	Formação de espuma
	Duplo	Baixo custo	-
		Degradação do substrato eficiente devido à recirculação do digerido	Complexo e dispendioso durante a instalação e operação
		Alimentação constante à 2ª etapa	Remoção de partículas necessária à 2ª etapa
Via	Seca	Processo mais robusto	-
		Risco reduzido de falha técnica	-
		Menores requerimentos energéticos	-
	Húmida	Menores requerimentos energéticos	-
		Alimentação controlada	Dificuldade no manuseamento e agitação do conteúdo
Alimentação	Batch	Pré-tratamento mais simples	-
		Maior retenção de Biomassa	Manuseamento complexo do substrato
	Contínua	Maior aplicabilidade global	Formação de espuma
		Grau de monitorização do processo superior	Elevados consumos de água e energia
		-	Sensível a sobrecargas orgânicas
Bioreatores de alta carga	Batch	Ausência de agitação ou bombagem	Suscetível ao entupimento
		Menores requerimentos mecânicos e energéticos	Ocorrência de zonas de degradação preferenciais
	Contínua	Custo-eficiente	Instalações de volumes elevados
		-	Baixa produtividade
		Simplicidade no design e operação	Rápida Acidificação
Bioreatores de alta carga	Batch	Baixo investimento de capital	Maior produção de AGV
		Maior retenção de Biomassa	Arranque lento
	Contínua	Alimentação controlada	Ocorrência de zonas de degradação preferenciais em baixa taxa de alimentação
		Baixo custo de investimento	-
		Não é necessário material de suporte	-

No século XXI surgiu a necessidade de examinar qual seria a configuração ideal de um digestor anaeróbio aplicado a substratos lignocelulósicos, pois o seu teor de sólidos, taxa de solubilização e hidrólise representam fatores críticos ao processo. Segundo (Bouallagui et al. 2005), cerca de 90% das instalações à escala industrial a operar na Europa possuem diferentes sistemas contínuos como digestores contínuos de único estágio utilizados para DA da fração orgânica de RSU, RSU e resíduos biológicos. No entanto, os sistemas batch adequam-se à digestão de silagem de relva, devido ao teor em sólidos e às características fibrosas da silagem. Por outro lado, outros sistemas de DA podem ser aplicados a substratos lignocelulósicos, como os digestores contínuos por via húmida ou seca, digestores de alta carga conectados a um leito de lixiviação e sistemas e digestores RPA (reator perfeitamente agitado) em duplo estágio (Nizami and Murphy 2010).

No anexo 1 algumas representações esquemáticas de possíveis configurações de reatores anaérobios que permitem uma melhor compreensão do seu funcionamento e *layout*.

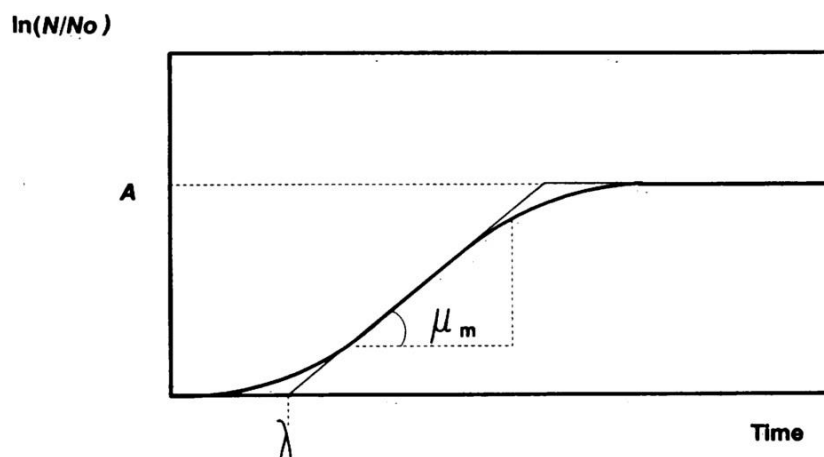
## 2.10 Modelo de Gompertz Modificado

A curva de Gompertz (Kirkwood 2015), embora tenha sido aplicada originalmente em cálculos estatísticos e matemáticos para transações financeiras, rapidamente passou a ser usada como curva de crescimento para fenómenos económicos e biológicos (Winsor 1932).

A equação de Gompertz aplicada à modelação da curva de crescimento bacteriano pode ser escrita como (Lay, Li, and Noike 1998):

$$N(t) = \int_0^t r_g dt = A \cdot \exp \left\{ -\exp \left[ \frac{\mu_{m\acute{a}x} \cdot e}{A} (\lambda - t) + 1 \right] \right\} \quad (\text{eq. 2.13})$$

Onde  $N(t)$  é a quantidade de biomassa no tempo  $t$ ,  $r_g$  é a taxa de crescimento bacteriano,  $\mu_{m\acute{a}x}$  corresponde à taxa específica de crescimento máxima,  $\lambda$  o *lag phase* definido pela intercepção ao eixo XX da tangente do ponto de inflexão da curva de crescimento e  $e$  corresponde ao número de Nepper.  $A = \ln(N_\infty/N_0)$ , onde  $N_0$  e  $N_\infty$  são a quantidade inicial de inóculo e o seu valor limite ( $N_0 \rightarrow N_\infty$  quando  $t \rightarrow \infty$ ) respectivamente. O significado físico de  $A$ ,  $\lambda$  e  $\mu_{m\acute{a}x}$  pode ser consultado na seguinte figura:



**Figura 2.4** – Curva de crescimento do modelo de Gompertz modificado (Zwietering et al. 1990).

A relação entre a taxa de crescimento bacteriano ( $r_g$ ) e a taxa de utilização do substrato ( $-r_s$ ) pode ser descrita de acordo com a expressão seguinte:

$$r_g = Y_1(-r_s) \quad (\text{eq. 2.14})$$

Onde  $Y_1$  é a produção biológica (biomassa sintetizada por unidade de substrato utilizado).

Por outro lado, a relação entre a taxa de utilização de substrato ( $-r_s$ ) e a taxa de produção de metano ( $r_m$ ) pode ser escrita como:



$$-r_s = Y_2 r_m \quad (\text{eq. 2.15})$$

Onde  $1/Y_2$  é a produção de metano (metano produzido por unidade de substrato utilizado).

Combinando as equações 2.14 e 2.15 temos:

$$r_m = \frac{r_g}{Y_1 Y_2} \quad (\text{eq. 2.16})$$

A produção cumulativa de metano ( $M$ ) pode ser calculada segundo:

$$M(t) = \frac{A}{Y_1 Y_2} \exp \left\{ -\exp \left[ \frac{(\mu_{\max}/Y_1 Y_2)e}{(A/Y_1 Y_2)} (\lambda - t) + 1 \right] \right\} \quad (\text{eq. 2.17})$$

O termo  $A/Y_1 Y_2$  pode ser substituído por  $P$  e pode ser interpretado como o potencial para a produção de metano e o termo  $\mu_{\max}/Y_1 Y_2$  significa a taxa de produção máxima de metano ( $R_{\max}$ ).

Portanto, a expressão final derivada da equação de Gompertz modificada e usada no cálculo da produção cumulativa de metano é:

$$M(t) = P \cdot \exp \left\{ -\exp \left[ \frac{R_{\max} \cdot e}{P} (\lambda - t) + 1 \right] \right\} \quad (\text{eq. 2.18})$$

Onde:

$P = \text{mL CH}_4/\text{g CQO}_{\text{substrato}}$  ou  $\text{mL CH}_4/\text{g SV}_{\text{substrato}}$ ;

$R_{\max} = \text{mL CH}_4/\text{g CQO}_{\text{substrato}} \cdot \text{dia}$  ou  $\text{mL CH}_4/\text{g SV}_{\text{substrato}} \cdot \text{dia}$

$\lambda = \text{dia}$

O modelo de Gompertz modificado tem sido usado por diversos autores para descrever a produção de metano em sistemas batch, para diferentes substratos orgânicos (Behera et al. 2010, Budiyono et al. 2010, Gadhamshetty et al. 2010, Lay, Li, and Noike 1997, Li et al. 2010, Nopharatana, Pullammanappallil, and Clarke 2007, Shin et al. 2008, Wu, Yang, and Tian 2011, Jagadish et al. 2012, Abu-Reesh 2013, Lu et al. 2013, Bakhov, Korzabekova, and Lakhanova 2014, Ghatak and Mahanta 2014, Zhen et al. 2015).



## 3 Materiais e Métodos

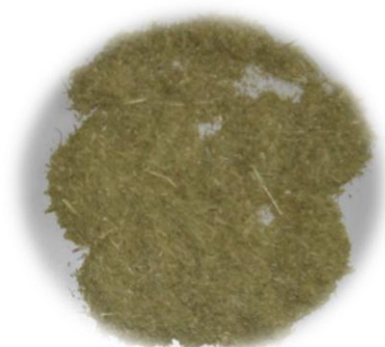
Neste capítulo são descritos os materiais e métodos utilizados para caracterizar o substrato em estudo e o inóculo, assim como a monitorização das experiências realizadas. A descrição dos procedimentos experimentais e das instalações utilizadas neste trabalho é também incluída neste trabalho.

O trabalho experimental consistiu essencialmente em dois tipos de experiências. Na experiência 1 foram realizados ensaios de biodegradabilidade (EB) para determinação do potencial de biometanização (PBM) em co-digestão anaeróbia de relva (5% ST) cortada no campus FEUP, com diferentes concentrações de glicerol. Na experiência 2 foram realizados dois ciclos de alimentação consecutivos, em modo *batch* (RAB), usando as melhores condições obtidas na 1ª experiência. Usaram-se dois reatores de 5 L, tendo sido possível testar dois valores de concentração de  $\text{NaHCO}_3$  (4 e 5  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ). A alimentação no 2º ciclo assegurou a manutenção da concentração de 5% ST no interior do primeiro reator (R1) enquanto no segundo reator (R2) foram adicionados ao substrato 5% de ST.

### 3.1 Substratos e inóculo

#### 3.1.1 Substrato

O substrato/resíduo em estudo consistiu essencialmente em relva proveniente do campus da FEUP. Depois de recolhida, a relva foi lavada com água (para remover material inerte) e colocada a secar ao sol durante cerca de 24 h. De seguida, foi levada à estufa a 50 °C durante mais 24 h. Feita a secagem, procedeu-se à moagem da relva num moinho (*Retsch ZM100*) com crivo de 1 mm. No final, a relva foi transferida para um recipiente hermeticamente fechado até ao seu manuseamento. Neste trabalho, a referência “substrato relva” deverá ser entendida como relva moída (<1 mm) e seca a 50 °C (figura 3.1).



**Figura 3.1** - Fotografia do substrato base.

#### 3.1.2 Co-substrato

Nos ensaios de co-digestão foi utilizado glicerol puro (99,5 %, *Fluka*) como co-substrato.

### 3.1.3 Inóculo

O inóculo usado neste trabalho consistiu em lama digerida proveniente de um reator/digestor anaeróbio, fornecido pela Estação de Tratamento de Águas Residuais de Parada, Águas Santas, Porto, Portugal a operar à temperatura média de 33 °C, com um tempo de retenção hidráulica de 23 dias. Efetuaram-se duas recolhas de inóculo, a primeira no dia 21 de Abril e a segunda no dia 5 de Junho. Após cada recolha, o inóculo foi deixado a sedimentar durante cerca de 24 horas e após este período foi removido o sobrenadante. O inóculo mais concentrado foi equitativamente transferido para frascos de vidro, os quais foram colocados em banho-maria a 35 °C (para consumir a matéria orgânica remanescente) até que a produção de biogás parasse ou deixasse de ser significativa. No final, o conteúdo dos frascos foi transferido para um único garrafão e guardado no frigorífico até ser utilizado.



**Figura 3.2** – Fotografia do inóculo utilizado ao longo do trabalho.

## 3.2 Métodos Analíticos

Os substratos foram caracterizados em termos de fósforo total (FT), carência química de oxigénio (CQO), azoto Kjeldahl total (AKT), sólidos totais (ST) e voláteis (SV), massa volúmica ( $\rho$ ), granulometria e pH. O inóculo foi apenas caracterizado em termos de sólidos totais (ST) e voláteis (SV) e sólidos suspensos totais (SST) e voláteis (SSV). A monitorização das experiências teve por base a análise da carência química de oxigénio (CQO<sub>Total</sub> e CQO<sub>Solúvel</sub>), azoto amoniacal total (AAT), sólidos totais (ST) e voláteis (SV) e pH.

### 3.2.1 Fósforo Total (FT)

A análise ao Fósforo Total (FT) foi efetuada em 2 etapas: (1) preparação da amostra segundo o procedimento do *Standard Methods 4500-P B. Sample Preparation – Persulfate Digestion Method (APHA 1998)*; (2) determinação do FT de acordo com o *Standard Methods 4500-P B. Sample Preparation – Persulfate Digestion Method (APHA 1998)*.

### 3.2.2 Carência Química de Oxigénio (CQO)

#### 3.2.2.1 CQO<sub>Total</sub>

A CQO<sub>Total</sub> foi inicialmente determinada por refluxo fechado através do método colorimétrico que consta no *Standard Methods 5220 D. Closed Reflux, Colorimetric Method (APHA 1998)* (Método A). Devido à elevada concentração de matéria orgânica nas amostras em análise, foi necessário efetuar diluições de fator elevado. Para tal, preparou-se uma suspensão de 0,03% (m/v) de relva em água destilada, o glicerol foi diluído 1700x e o inóculo 250x. Para a monitorização seria necessário recorrer a uma diluição de 500x para a determinação da CQO<sub>Total</sub>. Devido ao facto de as amostras serem heterogéneas, obrigando a diluições muito elevadas, nas análises de monitorização recorreu-se ao uso de *Merk test kits* (500 – 10000 mg O<sub>2</sub>·L<sup>-1</sup>; Método B), onde o limite máximo da concentração de CQO é maior (10 g O<sub>2</sub>·L<sup>-1</sup>), não tendo sido necessário efetuar diluições de fator tão elevado.

Na aplicação do método A 2,5 mL de suspensão de relva, de glicerol e de inóculo já diluídos foram pipetados para tubos de digestão aos quais foram adicionados os respetivos reagentes. Cada tubo foi agitado energeticamente e colocado no digestor *Thermoreaktor TR300, MERCK* a 148 °C durante 2 h. Terminada a digestão e após os tubos se aclimatarem à temperatura ambiente, mediu-se a concentração de CQO no espectrofotómetro *Spectroquant NOVA 60, MERCK*. As pipetagens da relva e inóculo foram realizadas com uma micropipeta com as pontas ligeiramente cortadas para permitir a pipetagem dos sólidos em suspensão na amostra.

Na aplicação do Método B, 1mL de cada amostra já diluída foi pipetado para o tubo do kit. O tubo foi fechado, agitado energeticamente e colocado no digestor *Thermoreaktor TR300, MERCK* a 148 °C durante 2 h. Terminada a digestão e após os tubos se aclimatarem à temperatura ambiente, mediu-se a concentração de CQO no espectrofotómetro *Spectroquant NOVA 60, MERCK*. As pipetagens foram realizadas do mesmo modo que no método A.

#### 3.2.2.2 CQO<sub>Solúvel</sub>

Para a determinação da CQO<sub>Solúvel</sub> as amostras foram centrifugadas (*Thermo Scientific, Heraeus – Multiple X1R - centrifuge*) a 14500 rpm durante 30 minutos e posteriormente filtradas sob vácuo através de um filtro de nylon (*Filtres Fioroi, PA Membranes filter 0,45 µm, Ref. 0464A00023, Dim 47 mm*). A amostra filtrada foi posteriormente diluída e a determinação da CQO foi feita pela aplicação do Método B.

### 3.2.3 Azoto Kjeldahl Total (AKT)

O procedimento para quantificação do AKT da relva foi executado em 3 etapas: digestão, destilação e titulação. Na etapa de digestão diferentes massas de relva (2, 3 e 4 g) foram digeridas com ácido sulfúrico concentrado (96 %) na presença de um catalizador (*Kjeldahl Catalyst tablets, J. P. Selecta SE4428.1211, Panreac Quimica SA*) no digestor *J.P Selecta Bloc Digest 6* e sistema de controlo *RAT2*. Foram seguidas as recomendações do fabricante para o processo de digestão de cereais: (1) 15 min a 125 °C; (2) 15 min a 300 °C; (3) 90 min a 400 °C. Após a digestão,

deixou-se as amostras arrefecerem até à temperatura ambiente e iniciou-se a etapa de destilação. Foram adicionados 300 mL de água destilada aos tubos de digestão e fez-se subir o pH da amostra digerida com hidróxido de sódio - tiosulfato em excesso (usou-se o indicador de fenolftaleína para garantir um pH acima de 10 – cor carmim). A amónia libertada foi recolhida em 50 mL de ácido bórico (4% v/v). Seguidamente, aplicou-se o restante procedimento segundo o *Standard Methods 4500-N<sub>org</sub> B. Macro-Kjeldahl Method (APHA 1998)*. Por fim, procedeu-se à etapa de titulação. Utilizou-se ácido sulfúrico (1 N) como titulante e o indicador misto para a mudança da cor (0,1 g de vermelho de metilo com 0,5 g de verde de bromocresol em 100 mL de etanol). Nesta etapa, o ácido sulfúrico (0,02 N) e a fenolftaleína não permitiram a obtenção de qualquer tipo de resultado. A restante parte do procedimento foi feita de acordo com o *Standard Methods 4500-NH<sub>3</sub> C. Titrimetric Method (APHA 1998)*.

### 3.2.4 Azoto Amoniacal Total (AAT)

Para a determinação do AAT ( $\text{NH}_4^+ + \text{NH}_3$ ) as amostras foram centrifugadas a 14500 rpm durante 10 minutos (*Thermo Scientific, Heraeus – Multiple X1R - centrifuge*) e filtradas sob vácuo através de um filtro de nylon de 0,45  $\mu\text{m}$ , 47 mm ID da *Filters Fioroni*. O AAT foi medido através do eléctrodo selectivo de amónia (Orion™ High-Performance Ammonia Electrode) e o medidor pH/ORP/Ion (*Hanna Instruments, HI 253, pH/ORP/Ion Meter*). Pipetaram-se 10 ml de cada solução para um gobelé de 10 ml. O eléctrodo foi colocado em contacto com a solução e promoveu-se a agitação com um agitador magnético. De modo a elevar o pH da solução acima de 11 adicionou-se 0,01 mL de NaOH (10N). Deixou-se o eléctrodo imerso na solução durante 5 minutos até se obter um valor estável. Importa referir que a calibração do equipamento foi efetuada com volumes de 10 mL de solução padrão.

### 3.2.5 Determinação do pH

O pH foi analisado com um medidor de pH (*Hanna Instruments model HI 8424*) e determinado segundo a EN 13037:1999 – *Determination of pH*.

### 3.2.6 Sólidos Totais (ST) e Sólidos Voláteis (SV)

Os ST e SV foram determinados segundo o *Standard Methods 2540 B. Total Solids Dried at 103-105 °C* e *2540 E. Fixed and Volatile Solids Ignited at 550 °C (APHA 1998)*.

Resumidamente, cerca de 2 g de relva foram pesados para cadinhos previamente calcinados e colocados na estufa a 105 °C durante cerca de 24 h. Após arrefecerem, as amostras foram transferidas para a mufla a 550 °C durante 2 h. Depois de arrefecerem, determinaram-se as suas massas secas e calculados os ST e SV, respetivamente.

Para o inóculo e monitorização das experiências, as amostras foram colocadas a agitar sobre uma placa de agitação magnética e foram transferidos 50 e 10 mL de inóculo e amostra respetivamente, para os cadinhos previamente calcinados e pesados. Os cadinhos foram colocados em banho-maria para remover o excesso de água, tendo-se aplicado de seguida o procedimento supracitado.

### 3.2.7 Sólidos Suspensos Totais (SST) e Sólidos Suspensos Voláteis (SSV)

Os sólidos suspensos totais (SST) e sólidos suspensos voláteis (SSV) do inóculo utilizado foram determinados segundo o *Standard Methods 2540 D. Total Suspended Solids Dried at 103-105 °C* e *2540 E. Fixed and Volatile Solids Ignited at 550 °C (APHA 1998)*, respetivamente, com ligeiras modificações.

Na primeira recolha, colocou-se uma amostra de inóculo a agitar sobre uma placa de agitação. Após a calcinação dos papéis de filtro a utilizar (*reeve angel, FILTER PAPER, grade 403, size 4,7 cm*) e registadas as suas massas, foram transferidos 2,5 mL de inóculo através de uma pipeta graduada de 5 mL e filtradas as amostras sob vácuo. De seguida, os papéis de filtro foram introduzidos na estufa a 105 °C durante 24 h; após arrefecer e pesar foram transferidos para uma mufla a 550 °C durante 2h; após retirar os papéis de filtro e deixar arrefecer, foram registadas as suas massas e calculados os SST e SSV respetivamente.

Relativamente à segunda recolha, e após se ter verificado que não era possível efetuar a pipetagem, filtraram-se 2 mL de amostra medidos através de uma proveta de 10 mL. O restante procedimento foi executado conforme descrito anteriormente. Esta pequena modificação no procedimento experimental foi implementada para solucionar a impossibilidade de aplicação das condições utilizadas na primeira recolha devido à maior concentração de sólidos neste inóculo.

### 3.2.8 Massa volúmica ( $\rho$ )

A determinação da massa volúmica da relva foi executada por picnometria. Esta é uma técnica laboratorial utilizada para determinar a massa volúmica de líquidos. No entanto, pode ser adaptada para sólidos. Para a realização destes ensaios recorreu-se ao procedimento presente na *ASTM D792, ISO 1183 - Density and Specific Gravity*. No caso do glicerol, a massa volúmica foi fonecida pelo fabricante.

### 3.2.9 Análise granulométrica

A análise granulométrica da relva foi executada através de uma peneiradora vibratória (*Retsch AS 200 digit*) com 8 crivos incorporados, com as seguintes gamas de medição: 2000, 1000, 850, 500, 300, 150, 63 e 38  $\mu\text{m}$ . Foram pesados 100 g de relva e introduzidos no crivo superior. Após 5 minutos de vibração, os crivos foram cuidadosamente retirados da peneiradora e pesadas as massas de relva distribuídas por cada um. A massa de relva no crivo inferior de recolha (< 38  $\mu\text{m}$ ) foi igualmente registada.

### 3.2.10 Metano – CH<sub>4</sub>

O metano produzido foi determinado através de sensores ópticos. A instalação experimental utilizada é apresentada na figura 3.3. Este método consiste na medição do volume de biogás produzido através de *MilliGascounter® MGC-1* (*Ritter, Germany* - figura 3.3 b) e a concentração de CH<sub>4</sub> no biogás através de sensores ópticos *BCP-CH4*

(BlueSens, Germany – figura 3.3, a) acoplados às cabeças dos frascos. A aquisição de dados foi garantida por uma caixa de conexão BACCom 12 (figura 3.3 c) associada a um computador com o software BACVis.



**Figura 3.3** – Fotografias de alguns elementos da instalação experimental utilizada: (a) sensores óticos BCP-CH4; (b) MilliGascounter® MGC-1; (c) caixa de conexão BACCom 12 em modo de funcionamento.

### 3.3 Planeamento das experiências

#### 3.3.1 Experiência 1 – Ensaios de Biodegradabilidade – Co-digestão

Nesta experiência pretendeu-se determinar o potencial de biometanização da relva colhida no campus FEUP (após o pré-tratamento citado em 3.1.1) em co-digestão com glicerol puro. Foi definida uma concentração de 5% ST de relva para todos os ensaios, com exceção dos ensaios que apenas continham glicerol. O volume de glicerol ótimo (VGO) consiste na quantidade de glicerol adicionado a 5% ST de relva que permite obter a razão CQO:N:P ótima para o crescimento microbiano. Para além do volume de glicerol ótimo foi também testado um volume de glicerol inferior (VGI), correspondente a 50% do VGO, e ainda um volume de glicerol superior (VGS), suplementada com 50% do VGO. O principal objetivo desta experiência foi a determinação do ensaio com maior PBM para dar sequência à experiência 2. Esta experiência teve a duração de 34 dias. Foram definidos 2 ensaios para comparação, um contendo apenas relva e outro contendo apenas glicerol. Todos os ensaios foram executados em duplicado. Na tabela 3.1 encontra-se a organização técnica dos EB.



Tabela 3.1 - Organização técnica dos EB.

Ensaio	V <sub>trabalho</sub> (mL)	m <sub>substrato</sub> (g)	m <sub>ST</sub> (g)	V <sub>co-substrato</sub> (mL)	V <sub>inóculo</sub> (mL)	V <sub>H<sub>2</sub>O</sub> (mL)	m <sub>NaHCO<sub>3</sub></sub> (g)	m <sub>KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub></sub> (g)	CQO (g·L <sup>-1</sup> )	CQO (g)	Prod <sub>CH<sub>4</sub></sub> <sup>máx teórica</sup> (mL)
R	100	5,23	5,0	0,0	70	26,0	0,5	0,108	62,9	6,3	2200
R'	100	5,23	5,0	0,0	70	26,0	0,5	0,108	62,9	6,3	2200
G	100	0,00	0,0	15,5	70	14,5	0,5	0,108	78,4	7,8	2744
G'	100	0,00	0,0	15,5	70	14,5	0,5	0,108	78,4	7,8	2744
VGO	100	5,23	5,0	15,5	70	10,5	0,5	0,108	141,3	14,1	4945
VGO'	100	5,23	5,0	15,5	70	10,5	0,5	0,108	141,3	14,1	4945
VGI	100	5,23	5,0	7,8	70	18,3	0,5	0,108	102,1	10,2	3572
VGI'	100	5,23	5,0	7,8	70	18,3	0,5	0,108	102,1	10,2	3572
VGS	100	5,23	5,0	23,2	70	2,8	0,5	0,108	180,4	18,0	6315
VGS'	100	5,23	5,0	23,2	70	2,8	0,5	0,108	180,4	18,0	6315

R – Relva

G – Glicerol

VGO – Volume de Glicerol Ótimo

VGI – Volume de Glicerol Inferior

VGS - Volume de Glicerol Superior

Definiu-se um volume de trabalho de 100 mL contendo 70% de inóculo (70 mL) e 30% de substrato e restante fração aquosa (glicerol e água). Devido à natureza sólida do substrato utilizado, foi determinada a sua massa volúmica de modo a determinar o volume ocupado pelo mesmo. Os EB incluíram uma percentagem de 5% ST de relva para todos os ensaios à exceção dos ensaios que apenas continham co-substrato (G e G'). À exceção do inóculo, a fração líquida/aquosa das amostras foi ajustada a pH 7 antes da mistura final. Este ajuste foi garantido pela adição de HCl ou NaOH até o pH ter estabilizado na gama 6,8 – 7,2 (Angelidaki et al. 2006). Estes EB foram suplementados com KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> de acordo com as necessidades de fósforo apuradas na razão CQO:N:P e uma concentração de 5 g·L<sup>-1</sup> de NaHCO<sub>3</sub> (Alves et al. 2001) para assegurar a alcalinidade do meio.

Finalmente, com os valores das massas de substrato e volumes de co-substrato, a quantidade de água destilada adicionada de modo a perfazer o volume de trabalho definido foi calculada de acordo com a seguinte expressão:

$$V_{H_2O} = V_{Trab} - V_{Inoc} - \frac{m_{subs}}{\rho_{subs}} - V_{co-subs} \quad (\text{eq. 3.1})$$

onde  $V_{H_2O}$  é o volume de água destilada a adicionar (mL),  $V_{trab}$  é o volume de trabalho (mL),  $V_{Inoc}$  é o volume de inóculo (mL),  $m_{subs}$  é a massa de substrato (g),  $\rho_{subs}$  é a massa volúmica do substrato (g/mL) e  $V_{co-subs}$  é o volume de co-substrato (mL).

### 3.3.1.1 Procedimento experimental

Inicialmente adicionou-se aos frascos as respetivas quantidades de inóculo, substrato, co-substrato, água destilada,  $\text{NaHCO}_3$  e  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  de acordo com o volume de trabalho estabelecido (tabela 3.1). Em todos os ensaios que continham glicerol, devido à natureza física deste co-substrato, o mesmo foi adicionado aos frascos juntamente com a água destilada em solução, nas respetivas proporções, de modo a garantir as condições operatórias definidas. Após a adição de todos os componentes, colocaram-se os frascos na estufa adaptada para os EB (35 °C), distribuídos equitativamente sobre duas placas de agitação (Multistirrer, VELP). De seguida, os sensores óticos *BGP-CH4* (*BlueSens*, Germany) foram calibrados e adaptados, podendo assim ser conectados ao restante sistema de aquisição de dados. Os respetivos adaptadores e tubagens (de silicone ou cristal) foram colocados nas saídas laterais dos frascos e conectou-se a ponta oposta das tubagens ao orifício de entrada do *MilliGascounter® MGC-1* (*Ritter*, Germany) correspondente a cada frasco. A tubagem (silicone ou cristal) foi adaptada ao orifício de saída do *MilliGascounter® MGC-1* (*Ritter*, Germany) e todas as tubagens de exaustão foram ligadas a uma única tubagem de saída da estufa. Terminadas todas as conexões, a partir do software *BACVis* foi possível definir a temperatura de trabalho (35 °C) e o intervalo de aquisição de dados para se iniciar a “Task” definida. No final do tempo de operação, todos os componentes do sistema de aquisição de dados foram cuidadosamente desconectados e perfez-se o volume inicial de trabalho com a adição de água destilada antes de serem feitas as análises de monitorização. Alguma da água é perdida sob a forma de vapor juntamente com o biogás, o que influencia a concentração das amostras (Angelidaki et al. 2006). Na figura 3.4 é apresentada a instalação utilizada em modo de operação.



**Figura 3.4** – Fotografias de algumas perspetivas instalação dos EB em funcionamento.

### 3.3.2 Ensaio de Biodegradabilidade – Diferentes concentrações de ST

O trabalho realizado ao longo da dissertação não permitiu a aplicação da planificação experimental definida inicialmente. Inicialmente estava prevista a execução de um segundo ciclo de EB que iria coincidir temporalmente

com o segundo ciclo dos RAB. Neste segundo ciclo de EB, após apurado o ensaio com maior PBM do primeiro ciclo, dever-se-ia alterar o teor de sólidos do substrato presente nas amostras. O principal objetivo deste segundo ciclo seria a determinação do teor de sólidos ótimo para operar no segundo ciclo dos RAB. Porém, o cumprimento desta sequência de etapas ficou comprometido devido a uma quebra de corrente nas instalações LabEA (ETAR). Na tabela 3.2 podemos verificar como seria a organização técnica deste 2º ciclo de EB.

**Tabela 3.2 – Organização técnica dos EB – 2º Ciclo.**

Ensaio	V <sub>trabalho</sub> (mL)	m <sub>substrato</sub> (g)	m <sub>ST</sub> (g)	V <sub>inóculo</sub> (mL)	V <sub>H2O</sub> (mL)	m <sub>NaHCO3</sub> (g)	m <sub>KH2PO4</sub> (g)	CQO (g·L <sup>-1</sup> )	CQO (g)	Prod <sub>máx teórica</sub> CH <sub>4</sub> (mL)
R.5.0	100	5,2	5,0	70	26	0,5	0,1	62,9	6,3	2200
R.7.5	100	7,8	7,5	70	24	0,5	0,1	94,3	9,4	3300
R.7.5'	100	7,8	7,5	70	24	0,5	0,1	94,3	9,4	3300
R.2.5	100	2,6	2,5	70	28	0,5	0,1	31,4	3,1	1100
R.2.5'	100	2,6	2,5	70	28	0,5	0,1	31,4	3,1	1100

### 3.3.3 Experiência 2 – Reactores Anaeróbios *Batch*

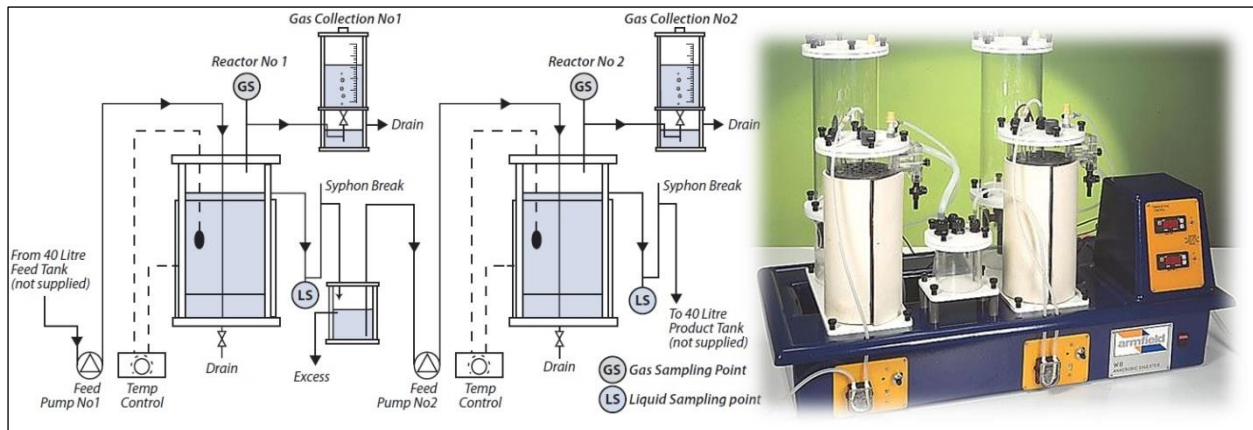
A segunda experiência consistiu numa amplificação de escala do ensaio com maior PBM obtido na primeira experiência. Deste modo, o processo de digestão anaeróbia decorreu novamente em modo *batch*, com alimentação descontínua, que marca o início do segundo ciclo desta experiência. Nenhum dos reatores foi operado em duplicado. Na tabela 3.3 esquematiza-se tecnicamente os RAB no primeiro e segundo ciclo da experiência.

**Tabela 3.3 - Organização técnica dos RAB.**

Reactor	V <sub>trabalho</sub> (mL)	m <sub>substrato</sub> (g)	m <sub>ST</sub> (g)	V <sub>inóculo</sub> (mL)	V <sub>H2O</sub> (mL)	m <sub>NaHCO3</sub> (g)	m <sub>KH2PO4</sub> (g)	CQO (g·L <sup>-1</sup> )	CQO (g)	Prod <sub>máx teórica</sub> CH <sub>4</sub> (mL)	
1º Ciclo	R1	4000	209,2	200	2800	1041	20,0	4,3	62,9	251,5	88031
	R2	4000	209,2	200	2800	1041	16,0	4,3	62,9	251,5	88031
2º Ciclo	R1	4000	142,0	136	-	892	16,0	2,9	42,7	170,7	59755
	R2	4000	209,2	200	-	841	16,0	4,3	62,9	251,5	88031

#### 3.3.3.1 Descrição da instalação

A instalação utilizada basicamente consistiu num digestor anaeróbio piloto W8 ANAEROBIC DIGESTER (*Armfield, England*), constituído por dois reatores de 5 L com algumas modificações. Na figura 3.5 é apresentada uma representação esquemática da instalação com uma fotografia após montagem, de acordo com o fabricante.



**Figura 3.5** – Esquema e instalação do W8 ANAEROBIC DIGESTER (Armfield, England) (adaptado de <http://discoverarmfield.com>).

O controlo de temperatura é garantido por mantas de aquecimento elétricas que envolvem a parede externa de ambos os reatores. A distribuição de temperatura no interior de cada reator foi mantida a  $\pm 0,5$  °C. As temperaturas de operação podem ser definidas separadamente para qualquer valor desejado até 55 °C. As tampas originais dos reatores foram substituídas por outras em acrílico com as mesmas dimensões, com sistema de agitação incorporado (eixo e pás de agitação metálicas com dimensões adaptadas em função da integridade dos reatores), orifício de entrada de termopar, orifício para amostragem, orifício para saída de gases e orifício para adaptar os sensores óticos *BCP-CH4* (*BlueSens*, Germany). A agitação fez-se com recurso a agitadores mecânicos *VWR VOS 16* (*VWR*, USA) e foi programada com recurso a temporizadores. Deste modo, foram definidos 20 intervalos de agitação diária de 10 minutos de duração. O sistema de recolha de gases consistiu na adaptação de tubagens (silicone ou cristal) ao orifício de saída de gases, envolvidas em material termicamente isolante até uma estufa anexa à instalação (possuindo uma cavidade na sua parte superior), onde se encontravam os *MilliGascounter® MGC-1* (*Ritter*, Germany) correspondentes a cada reator. As tubagens de saída de ambos os *MilliGascounter® MGC-1* acoplaram-se a uma única tubagem de saída da estufa. Deste modo, os coletores de gases originais (*Gas Collection No1* e *Gas Collection No2*), bem como o recipiente de armazenamento temporário (*Syphon Break*), foram removidos de forma a facilitar a operacionalidade em torno do equipamento. Na figura 3.6 apresenta-se uma fotografia da instalação que esteve em operação neste projeto.



**Figura 3.6** – Fotografia da instalação em operação (R1 à esquerda e R2 à direita).

### 3.3.3.2 Procedimento experimental – 1º Ciclo

Inicialmente adicionou-se aos reatores as respetivas quantidades de inóculo, substrato, água destilada, e restante meio de acordo com o estabelecido na tabela 3.3. À exceção do inóculo, a fração líquida das amostras foi ajustada a pH 7 antes da mistura final. Após a adição de todos os componentes, os reatores foram fechados e certificou-se que todos os vedantes, roscas e parafusos se encontravam devidamente colocados e apertados. Este passo é particularmente importante uma vez a existência de fugas poderia comprometer todo o ensaio. A ausência de fugas foi testada com a aplicação de espuma de deteção de fugas. De seguida, os reatores foram envolvidos com as mantas de aquecimento e definiu-se a temperatura de operação (35 °C). Os sensores óticos *BPC-CH4* (*BlueSens*, Germany) foram previamente calibrados, adaptados e depois conectados ao restante sistema de aquisição de dados. Seguidamente, foram colocados os respetivos adaptadores, tubagens (silicone ou cristal) e válvulas anti-retorno nas saídas para gases. A ponta oposta das tubagens foi conectada ao orifício de entrada do *MilliGascounter® MGC-1* (*Ritter*, Germany) correspondente a cada reator. A tubagem (silicone ou cristal) foi adaptada ao orifício de saída do *MilliGascounter® MGC-1* (*Ritter*, Germany) e ambas as tubagens de exaustão foram associadas a uma única tubagem de saída da estufa. Terminadas todas as conexões, a partir do *software BACVis*, foi possível definir a temperatura de trabalho (35 °C), o intervalo de aquisição de dados e iniciar a “Task” definida.

### 3.3.3.3 Monitorização do pH – 1º Ciclo

Dada a importância para o controlo e ajustamento do processo anaeróbio (Chernicharo 2007), o pH foi monitorizado nesta fase do projeto. A exclusividade da monitorização deste parâmetro apenas nesta fase deveu-se às

características operatórias da experiência 1 e à calendarização do segundo ciclo da experiência 2 (30 de julho a 01 de setembro) que impossibilitou a amostragem por interrupção laboral para férias.

No procedimento de amostragem começou-se por introduzir o adaptador metálico para no orifício de amostragem na tampa dos reatores (com engate rápido para fluidos). De seguida, introduziu-se a seringa de plástico de 100 mL e procedeu-se à sucção de cerca de 2 a 3 mL de amostra. Devido às características físicas das amostras, a sua extração apresentou alguma resistência. A amostra foi depois transferida para tubo *Falcon* para posterior registo de pH. Por fim, através da mesma seringa, injetaram-se entre 5 a 10 mL de água destilada com o objetivo de limpar e desimpedir o tubo de amostragem para recolhas futuras.

### 3.3.3.4 Procedimento experimental – 2º Ciclo

Concluído o 1º ciclo dos RAB foi necessário proceder à recolha de 1L de amostra de cada reator para as posteriores análises de monitorização. Procedeu-se também à alimentação do mesmo volume retirado conforme as características presentes na tabela 3.3. Nesta fase do trabalho começou-se por verificar se o volume no interior dos reatores correspondia ao inicial. No entanto, devido à injeção de água destilada após amostragem do pH no primeiro ciclo, não foi necessário perfazer o volume de trabalho inicial. Antes de abrir os reatores, agitou-se vigorosamente o seu conteúdo de modo a recolher uma amostra o mais homogénea possível. Todos os componentes do sistema de monitorização do CH<sub>4</sub> foram desconectados e pôde-se abrir os reatores para recolher 1L de amostra de cada. As amostras foram recolhidas para balões volumétricos de 1000 mL. Após preparação da alimentação a introduzir em cada reator, procedeu-se à sua adição aos 3 L remanescentes em cada reator. Fechou-se tampa e promoveu-se novamente agitação vigorosa do seu conteúdo. O restante procedimento foi executado de acordo com o definido para o primeiro ciclo.

## 3.4 Produção teórica de metano

A estimativa de produção teórica de metano (PTM) pode ser determinada de múltiplas formas: (1) através da composição química elementar do substrato ((Angelidaki and Sanders 2004);(Chernicharo 2007)); (2) baseada na composição em hidratos de carbono, proteínas e lípidos (Angelidaki and Sanders 2004); (Gray 2004)); (3) com base na composição da CQO do substrato ((Angelidaki and Sanders 2004);(Chernicharo 2007)); e (4) através do teste de CBO em 20 horas (Schievano et al. 2009).

Neste estudo a PTM foi estimada segundo (Angelidaki and Sanders 2004, Chernicharo 2007), ou seja, segundo a CQO do substrato adicionado aos ensaios/reatores, tendo por base as equações 3.2 e 3.3.



Como é possível observar na equação 3.2, 1 mol de CH<sub>4</sub> consome 2 mol de O<sub>2</sub> para ser totalmente oxidada a CO<sub>2</sub> e H<sub>2</sub>O. Assim, por cada 16 g de CH<sub>4</sub> produzido são consumidos 64 g de CQO provenientes do substrato, tal como se mostra abaixo.

$$\frac{2 \times 32 (O_2)}{16 (CH_4)} = \frac{64}{16} = 4 g O_2 / g CH_4 \quad (\text{eq. 3.4})$$

Em condições de pressão e temperatura normais (PTN: 0 °C e 1 atm), esta razão corresponde a 350 mL CH<sub>4</sub> por cada g CQO de substrato.

$$\frac{1 \text{ mol } CH_4}{64 \text{ g CQO}} \times \frac{22,4 \text{ L}}{1 \text{ mol } CH_4} = 0,35 \text{ L } CH_4 / \text{g CQO} = 350 \text{ mL } CH_4 / \text{g CQO} \quad (\text{eq. 3.5})$$

Assim, a produção de metano (mL CH<sub>4</sub>) através da concentração de CQO do substrato adicionado é calculada através da expressão que se apresenta abaixo.

$$mL_{CH_4} = g \text{ CQO} \times 350 \text{ mL } CH_4 / \text{g CQO} \quad (\text{eq. 3.6})$$

### 3.5 Modelo de Gompertz

Os resultados experimentais da produção cumulativa de metano no tempo  $t$  (mL CH<sub>4</sub> por grama de substrato (CQO/SV) adicionado ao frasco/reator) foram ajustados segundo a expressão final derivada da equação de Gompertz modificada (equação 3.7).

$$M(t) = P \cdot \exp \left\{ -\exp \left[ \frac{R_{\text{máx}} \cdot e}{P} (\lambda - t) + 1 \right] \right\} \quad (\text{eq. 3.7})$$

Os parâmetros  $P$  (mL CH<sub>4</sub>/g CQO<sub>substrato</sub> ou mL CH<sub>4</sub>/g SV<sub>substrato</sub>),  $R_{\text{máx}}$  (mL CH<sub>4</sub>/g CQO<sub>substrato</sub>.dia ou mL CH<sub>4</sub>/g SV<sub>substrato</sub>.dia) e  $\lambda$  (dia) são estimados por regressão não-linear usando a função *Solver* do *software Microsoft Excel*, minimizando o somatório residual do quadrado dos erros entre os valores médios dos dados experimentais e a curva modelo.

### 3.6 Monitorização dos EB e RAB

De modo a perceber e controlar a dinâmica dos processos anaeróbios, monitorizaram-se cuidadosamente os diferentes parâmetros relativos aos tempos inicial e final dos ensaios de biodegradabilidade e finalmente aos mesmos parâmetros, mas aplicados aos reatores anaeróbios em *batch* (RAB), através da CQO (Total e Solúvel), AAT, ST, SV e pH. Em ambas as experiências, apenas o biogás formado foi monitorizado ao longo do tempo, com exceção do primeiro ciclo dos RAB, onde se monitorizou o pH periodicamente.



## 4 Resultados e Discussão

Neste capítulo são apresentados os resultados da caracterização dos substratos e inóculo e das experiências 1 e 2, com base na metodologia apresentada no capítulo 3.

### 4.1 Caracterização dos substratos e inóculo

#### 4.1.1 Resultados

O substrato e o co-substrato exigiram uma caracterização detalhada e rigorosa dada a sua importância para este trabalho. A determinação da CQO para substratos sólidos e heterogêneos é normalmente difícil e suscetível de apresentar alguma incerteza (Angelidaki et al. 2009), tal como se pôde verificar no substrato utilizado. Este substrato consistiu essencialmente em relva recolhida no campus da FEUP, a qual não apresenta apenas uma espécie de cobertura vegetal na totalidade da sua área verde. A caracterização dos substratos e inóculo é apresentada nas tabelas 4.1 e 4.2, respetivamente. A tabela 4.1 inclui também a comparação do teor de sólidos do substrato utilizado com e sem o pré-tratamento aplicado.

*Tabela 4.1 – Caracterização dos substratos utilizados durante o projeto.*

Parâmetro	Relva (base seca)		Relva (base húmida)		Glicerol	
	Valor	Unidades	Valor	Unidades	Valor	Unidades
ST	952 ± 2	mg·g <sup>-1</sup>	290 ± 3	mg/g	-	-
SV	874 ± 1	mg·g <sup>-1</sup>	259 ± 3	mg/g	-	-
Fósforo Total	2,24 ± 0,03	mg·g <sup>-1</sup>	-	-	-	-
CQO	1202 ± 18	mg·g <sup>-1</sup>	-	-	506 ± 11	g·L <sup>-1</sup>
Azoto Kjeldahl	27,7 ± 0,7	g·kg <sup>-1</sup>	-	-	-	-
pH	5,55	-	-	-	1,64	-
Massa Volúmica	1,26	g·L <sup>-1</sup>	-	-	1,26	g·mL <sup>-1</sup>

*Tabela 4.2 – Caracterização do inóculo utilizado durante o projeto.*

Parâmetro	Inóculo	
	1ª Recolha - 21/04	2ª Recolha - 05/06
ST (g·L <sup>-1</sup> )	27 ± 1	31 ± 1
SV (g·L <sup>-1</sup> )	18,7 ± 0,7	20,4 ± 0,9
SST (g·L <sup>-1</sup> )	25,5 ± 0,6	28,5 ± 0,8
SSV (g·L <sup>-1</sup> )	17,5 ± 0,4	19,2 ± 0,5
CQO (g·L <sup>-1</sup> )	37 ± 2	42 ± 1

A diversidade de espécies do coberto vegetal do campus FEUP não permite uma comparação eficaz dos valores obtidos para a relva em parâmetros como CQO, FT ou AKT presentes na literatura. Os ST e SV foram determinados para a relva previamente seca a 50 °C (relva utilizada neste estudo) e a relva fresca. As análises da relva fresca serviram para comparar os resultados obtidos neste estudo com os resultados por outros autores que usaram diretamente relva húmida nos ensaios. Os valores de ST obtidos para a relva fresca encontram-se dentro do esperado para este tipo de substrato (Goulding and Power 2013, McEniry and O’Kiely 2013). Porém, segundo a metodologia aplicada pela maioria dos autores citados neste estudo, que consideraram este tipo de substrato, a determinação dos SV é executada com base nos ST obtidos e não com base na massa de substrato utilizado na determinação destes dois parâmetros. Deste modo, aplicando à relva fresca a metodologia de cálculo para a determinação dos SV presente na literatura obtém-se uma concentração de 892 mg·g<sup>-1</sup>, apenas 2% superior à obtida para a relva seca. Este resultado era já expectável devido ao pré-tratamento aplicado (secagem em estufa a 50 °C durante 24 h) que removeu, quase na totalidade, a humidade presente no substrato.

O inóculo proveniente da segunda coleta é bastante mais concentrado que o recolhido da primeira vez, o que poderá ser justificado por uma remoção da fração sobrenadante mais eficiente após a segunda recolha.

#### 4.1.2 Razão CQO:N:P

Terminada a caracterização dos substratos e inóculo, foi imperativo estabelecer a razão CQO:N:P para definir a quantidade de co-substrato a aplicar no arranque de todo o processo (experiência 1). Por outro lado, esta análise permitiu igualmente determinar a carência de fósforo das amostras, tendo esta sido colmatada através da adição de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.

De acordo com (Lettinga, Pol, and Zeeman 1996), os requisitos nutricionais mínimos podem ser calculados segundo a seguinte expressão:

$$N_r = S_0 \cdot Y \cdot N_{bac} \cdot \frac{ST}{SV} \quad (\text{eq. 4.1})$$

Onde:

$N_r$  = requisito nutricional (g·L<sup>-1</sup>)

$S_0$  = concentração de CQO do substrato

$Y$  = coeficiente de rendimento

$N_{bac}$  = concentração de nutriente nas células bacterianas (g·g<sup>-1</sup> VSS)

$ST \cdot SV^{-1}$  = rácio entre sólidos totais e voláteis para as células bacterianas

De acordo com o mesmo autor, assumindo que os nutrientes presentes no inóculo estão disponíveis para os microrganismos, e adaptando a metodologia ao tipo de substrato utilizado neste projeto, foram adoptados os seguintes valores:

$$S_0 = 1202 \text{ mg} \cdot \text{g ST}^{-1}$$

$$Y = 0,15 \text{ g SV} \cdot \text{g CQO}^{-1}$$

$$N_N = 0,065 \text{ g N} \cdot \text{g ST}^{-1}$$

$$N_P = 0,015 \text{ g P} \cdot \text{g ST}^{-1}$$

$$ST/SV = 1,14$$

Aplicando a equação 4.1 para o azoto (N) e fósforo (P), e dividindo os valores obtidos em função do macronutriente em menor concentração (P), obteve-se uma razão nutricional teórica de 390:4:1. Na tabela 4.3 encontra-se resumida a determinação das diferentes quantidades de glicerol a aplicar na experiência 1, de acordo com as respetivas condições de operação: volume de trabalho de 100 mL e 5% ST de substrato.

**Tabela 4.3** – Determinação dos requisitos nutricionais e dosagens de co-substrato a adicionar na experiência 1.

Substrato / Co-substrato	Parâmetro	CQO	N	P
Relva	Concentração (mg·g <sup>-1</sup> )	1202,4	27,7	2,2
	Massa existente na amostra (mg)	6288,5	144,9	11,7
	Requisitos Nutricionais (mg·L <sup>-1</sup> )	141249,2	1448,7	362,2
	Razão	390	4	1
	Requisitos Nutricionais (mg·L <sup>-1</sup> )	141249,2	1448,7	362,2
	Défice (mg)	7836,4	0,0	24,5
Glicerol	Concentração (mg·L <sup>-1</sup> )	505856,7	0	0
	Volume ótimo (mL)	15,5	-	-
	Volume inferior (-50%) (mL)	7,7	-	-
	Volume superior (+50%) (mL)	23,2	-	-

#### 4.1.3 Granulometria

A moagem da relva seca suscitou o interesse na determinação da sua granulometria na tentativa de relacionar a redução do tamanho das partículas de relva com a produção de metano. Os resultados desta análise encontram-se na tabela seguinte.

**Tabela 4.4 – Resultados da análise granulométrica da relva**

Crivo ( $\mu\text{m}$ )	Massa (g)	Peso Acumulado (%)
> 2000	0,0000	0,00
2000 – 1000	0,0097	0,01
1000 – 850	0,0720	0,07
850 – 500	8,7755	8,71
500 – 300	29,9713	29,73
300 – 150	35,7939	35,51
150 – 63	17,9183	17,78
63 – 38	5,6500	5,61
< 38	2,6093	2,59
<b>Total</b>	<b>100,8</b>	<b>100</b>

Apesar do crivo do moinho utilizado ser de 1 mm, os resultados desta análise revelam que 99,92% da relva utilizada possui uma granulometria inferior a 0,85 mm dos quais 83,02% correspondem à gama granulométrica 0,500 – 0,063 mm. Métodos de pré-tratamento como a secagem causam o colapso irreversível dos capilares celulósicos, levando à redução da área interna superficial das células celulósicas. Porém, a moagem promove a redução do tamanho das partículas da biomassa, aumentando assim a área superficial e a produção de metano (Yang et al. 2015).

## 4.2 Experiência 1 – Ensaios de Biodegradabilidade (EB)

### 4.2.1 Arranque dos EB

Colocados todos os frascos na estufa adaptada para estes testes, conectados os sensores óticos e restante sistema de aquisição de dados, iniciou-se a experiência 1 no dia 13 de maio. No entanto, aquando da verificação e calibração do equipamento, nomeadamente dos sensores óticos *BCP-CH4* (*BlueSens*, Germany), testou-se a funcionalidade de apenas 8 sensores óticos. Assim, uma vez que se prepararam 10 frascos, correspondentes aos 5 ensaios duplicados, foram rejeitados os duplicados controlo R' e G' na expectativa de obtenção do melhor PBM entre os ensaios VGO, VGI ou VGS. Deste modo, a experiência foi feita apenas com 8 frascos ficando os ensaios R e G sem os correspondentes duplicados.

Por outro lado, já com a experiência em curso, constatou-se a ineficácia dos agitadores magnéticos. A agitação é um parâmetro muito importante na determinação do PBM (Vavilin et al. 2008), pois facilita o contacto entre microrganismos/enzimas e substratos, garantindo condições homogêneas nos frascos dos ensaios (Angelidaki et al. 2009). Porém, dado o reduzido volume de trabalho (100 mL) conjugado com esta lacuna experimental, procedeu-se à agitação manual dos ensaios duas vezes ao dia, excetuando ao fim-de-semana.

#### 4.2.2 Resultados iniciais

Tal como referido no capítulo 3.6, nesta experiência apenas foi monitorizado o biogás produzido ao longo do tempo. As análises aos restantes parâmetros dizem respeito ao início e fim da experiência 1. Na tabela 4.5, encontram-se resumidos os valores obtidos na fase inicial dos EB.

**Tabela 4.5** – Valores médios obtidos para os ensaios no início da experiência.

Ensaio	pH	CQO <sub>Total</sub> (g·L <sup>-1</sup> )	CQO <sub>Solúvel</sub> (g·L <sup>-1</sup> )	AAT (mg N·L <sup>-1</sup> )	ST (g·L <sup>-1</sup> )	SV (g·L <sup>-1</sup> )
R	7,2	79 ± 3	16 ± 1	735 ± 92	70,8 ± 1,0	57,5 ± 0,5
G	7,6	106 ± 4	52 ± 1	776 ± 103	22,9 ± 0,3	13,6 ± 0,2
VGO	7,3	149 ± 2	51 ± 1	816 ± 35	73,1 ± 0,5	59,5 ± 0,6
VGI	7,2	127 ± 5	38 ± 1	793 ± 38	71,9 ± 1,0	58,3 ± 1,0
VGS	7,3	202 ± 2	64 ± 1	822 ± 51	72,7 ± 0,2	59,3 ± 0,2

Inicialmente, o pH da fração líquida/aquosa (água ou água + glicerol puro) foi ajustado na gama 6,8 – 7,2, tal como se pode confirmar nos valores obtidos para este parâmetro, sendo que as ligeiras diferenças verificadas se devem à contribuição do inóculo que não sofreu qualquer tipo de ajuste. A CQO<sub>Total</sub> apresenta valores ligeiramente superiores aos teoricamente estimados (tabela 3.1), uma vez que estes apenas se referem à contribuição em matéria orgânica dos respetivos substratos, devendo-se esta diferença ao remanescente de matéria orgânica do inóculo. No entanto, a ordem das concentrações teóricas é concordante com a ordem das concentrações experimentais. Relativamente à CQO<sub>Solúvel</sub> inicial, devido às características físico-químicas dos substrato e co-substrato utilizados nos ensaios apenas a fração aquosa das amostras irá contribuir para este parâmetro pois, nesta fase, os microrganismos responsáveis pela degradação dos compostos particulados mais complexos em compostos simples dissolvidos ainda não iniciaram os seus mecanismos hidrolíticos e acidogénicos. Por conseguinte, os ensaios doseados com mais glicerol possuem concentrações em matéria orgânica dissolvida mais elevadas, ou seja, uma biodisponibilização inicial superior em matéria orgânica. Os parâmetros AAT, ST e SV apresentam valores idênticos para todos os ensaios. De facto, a semelhança na concentração de AAT dos ensaios permite concluir que o volume de inóculo é a fração que mais influencia este parâmetro visto que a relva não apresenta valores elevados de azoto e este elemento está ausente da composição elementar do glicerol puro. A partir dos valores das concentrações de ST e SV de todos os ensaios verifica-se que apenas a relva e o inóculo têm influência significativa nestes parâmetros, devido à grande diferença registada no ensaio G, que apenas possui glicerol e inóculo.

#### 4.2.3 Resultados finais

Os medidores de biogás utilizados na medição do biogás acumulado possuem um líquido de operação no seu interior responsável pela operacionalidade deste tipo de equipamento. Este líquido, devido a diferenças de pressão e/ou temperatura no interior dos frascos, poder-se-á deslocar em sentido inverso ao do biogás que chega ao equipamento, ou seja, ocorre o retorno do líquido de operação para as amostras através das tubagens entre as

saídas laterais dos frascos e os orifícios de entrada dos medidores de biogás. Antes de iniciar esta experiência, foi sugerida a encomenda de válvulas anti-retorno para evitar a ocorrência do fenómeno supracitado. No entanto, devido à demora na entrega das mesmas deu-se início à experiência de modo a cumprir com a calendarização inicialmente definida. Todavia, verificou-se o retorno do líquido operacional. Dos 8 frascos presentes no início da experiência, apenas 3 se mantiveram em operação até ao final da experiência, especificamente o ensaio R (sem duplicado) e os 2 frascos relativos ao ensaio VGI, ficando os ensaios G, VGO e VGS comprometidos. Provavelmente a produção de biogás nos ensaios comprometidos foi demasiado baixa, o que impossibilitou que a pressão do biogás produzido no seu interior compensasse o abaixamento de pressão interna, originando assim o retorno do líquido de operação. Embora não tenha sido efetuada nenhuma análise ao conteúdo dos ensaios relativamente aos ácidos gordos voláteis (AGV), a adição de quantidades elevadas de glicerol poderá ter levado os microrganismos a produzir demasiados AGV, diminuindo o pH para valores demasiado baixos e que os microrganismos metanogénicos não conseguem tolerar (Nizami, Korres, and Murphy 2009). Por outro lado, em geral, é difícil recuperar a atividade metanogénica de reatores quando estes são interrompidos pela acumulação de AGV (McMahon et al. 2001). O conteúdo dos ensaios comprometidos foi imediatamente rejeitado, pois encontrava-se contaminado com o líquido de operação dos respetivos medidores de biogás, comprometendo igualmente um registo fidedigno do pH.

Apesar de tudo, a experiência foi concluída apenas com 2 ensaios (R e VGI), sendo apresentados na tabela 4.6 os valores médios dos parâmetros analisados aos frascos remanescentes no início e no final da experiência.

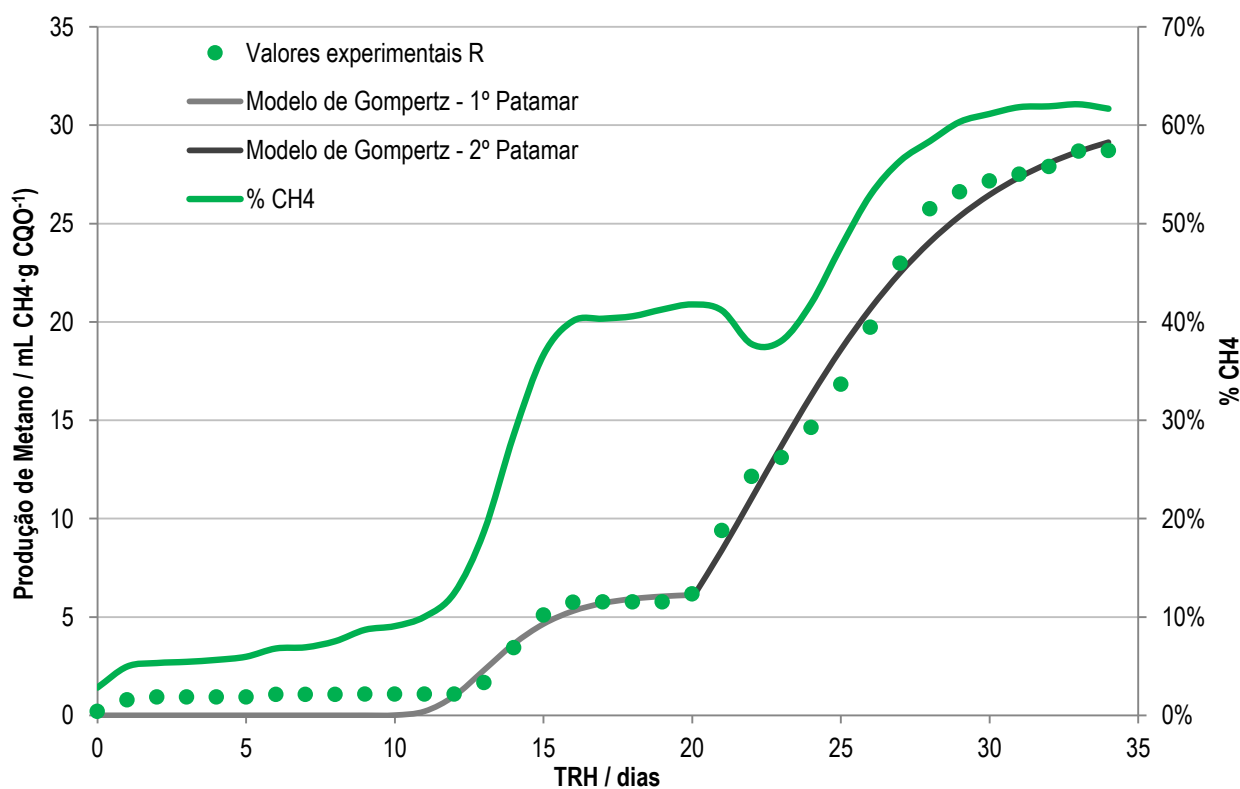
**Tabela 4.6** - Valores médios obtidos para os ensaios no início ( $t = 0$ ) e no final ( $t = 34$  dias) da experiência<sup>1</sup>.

Parâmetro	pH	AAT (mg N·L <sup>-1</sup> )	CQO <sub>Total</sub> (g·L <sup>-1</sup> )	CQO <sub>Solúvel</sub> (g·L <sup>-1</sup> )	ST (g·L <sup>-1</sup> )	SV (g·L <sup>-1</sup> )	
R	Início	7,2	735 ± 92	79 ± 3	16 ± 1	71 ± 1	58 ± 1
	Fim	7,9	1648 ± 56	47 ± 1	11 ± 1	40 ± 1	28 ± 1
DGI	Início	7,2	793 ± 38	127 ± 5	38 ± 1	72 ± 1	58 ± 1
	Fim	7,5	1572 ± 69	88 ± 1	35 ± 3	49 ± 1	37 ± 2

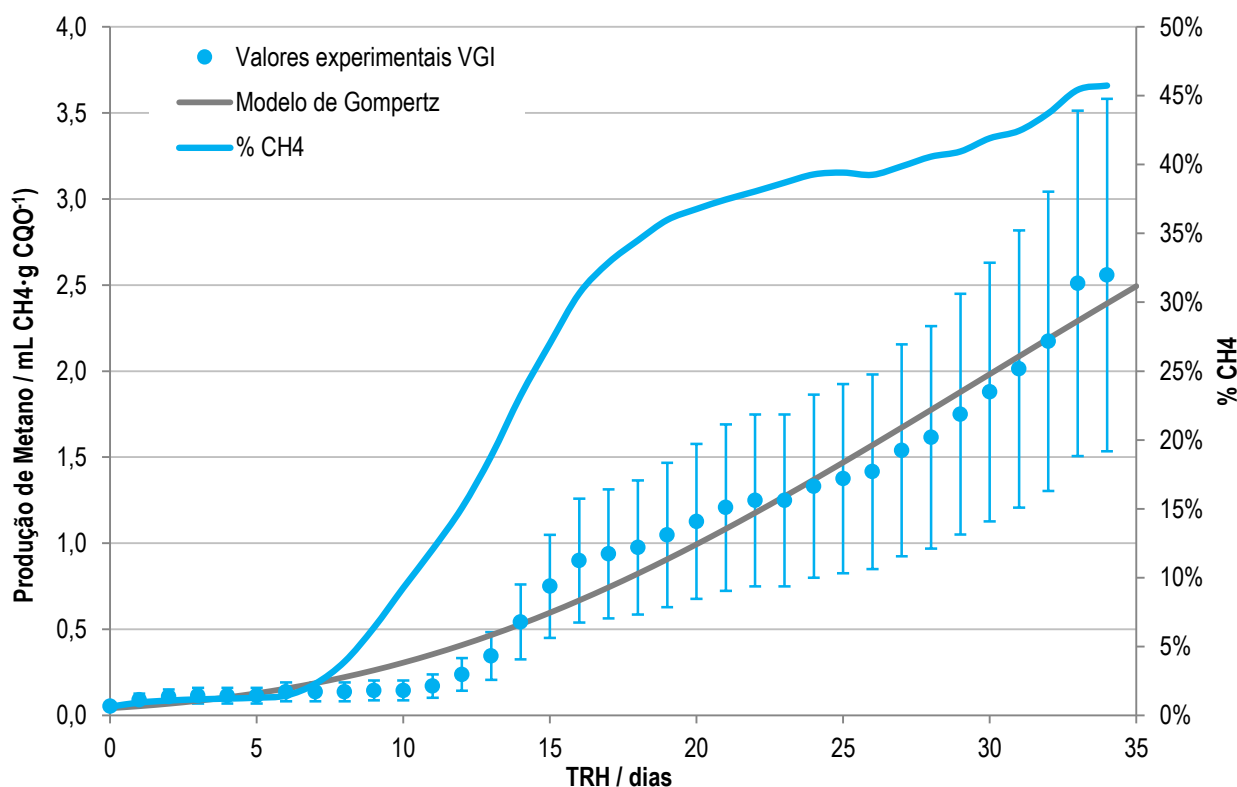
Através da análise da tabela 4.6, verifica-se que o pH de ambos os ensaios aumentou ligeiramente, permanecendo no entanto perto da neutralidade, o que demonstra que a alcalinidade fornecida pelo NaHCO<sub>3</sub> adicionado ao meio era suficiente. Relativamente à concentração de AAT, verifica-se um aumento de mais de 100% em ambos os ensaios. Uma vez que o inóculo utilizado era proveniente de uma ETAR, e embora não se tenha efetuado esta análise ao inóculo separadamente, partiu-se do princípio que este seria rico em ureia ou compostos proteicos, o que se torna benéfico para o processo de DA (concentrações não excessivas), permitindo uma melhor tamponização do pH. Por outro lado, sendo o NH<sub>3</sub> uma base fraca, este poderá ter proporcionado um ligeiro aumento do pH. No entanto, ambos os compostos, tanto na forma iónica (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) como na sua forma livre (NH<sub>3</sub>) podem tornar-se inibidores quando registadas concentrações elevadas (Chernicharo 2007). Segundo (McCarty 1964), existe inibição do processo anaeróbio para concentrações de AAT entre 1500 a 3000 mg N·L<sup>-1</sup>, aliado a um pH superior a 7,4 – 7,6.

Este facto é constatado ao fim dos 34 dias de operação onde se verifica a proximidade ao limite inferior de inibição. Para a  $CQO_{Total}$  registaram-se reduções na ordem dos 41% para o ensaio R e 31% para o ensaio VGI e para a  $CQO_{Solúvel}$  34% e 9%, respetivamente. Verificou-se igualmente uma redução equitativa de ST em relação à  $CQO_{Total}$ , com 43% para o ensaio R e 31% para o ensaio VGI. Consequentemente, os SV registaram reduções de 51% e 36%, respetivamente. Este último parâmetro adequa-se aos valores expectáveis da literatura que rondam a gama de 40 a 45% para os processos anaeróbios (Angelidaki et al. 2006) apesar de (Braun, Weiland, and Wellinger 2010) sugerir uma degradação de SV na ordem dos 80 a 90% para uma utilização completa e rentável do substrato em termos económicos e ecológicos.

Em relação à produção de metano, nas figuras 4.1 e 4.2 encontram-se representados graficamente os volumes do metano produzido por unidade de CQO adicionada e a respetiva evolução do teor de metano no biogás produzido aos ensaios R e VGI.



**Figura 4.1** – Produção cumulativa de metano (PTN: 0°C e 1atm) por grama de CQO adicionado de substrato no ensaio R e evolução do teor de metano no biogás produzido.



**Figura 4.2** – Produção cumulativa de metano (PTN: 0°C e 1atm) por grama de CQO adicionada de substrato no ensaio VGI e evolução do teor de metano no biogás produzido.

Tal como referido anteriormente, uma vez que o ensaio R não possui duplicado, apenas se representaram barras de erro para o ensaio VGI.

Assim, através da análise de ambas as figuras, é facilmente observável o contraste entre os 2 ensaios, tendo o ensaio R permitido obter uma produção de metano final de 28,7 mL CH<sub>4</sub>-g CQO<sub>adicionada</sub><sup>-1</sup> e o ensaio VGI com 2,6 mL CH<sub>4</sub>-g CQO<sub>adicionada</sub><sup>-1</sup>, o que se traduz numa produção volumétrica total de 180,9 mL e 26,1 mL de CH<sub>4</sub>, respetivamente. Isto significa que o ensaio R obteve uma produção 86% superior ao ensaio VGI. Quanto à evolução do teor percentual de CH<sub>4</sub> no biogás produzido nos ensaios, este acompanha rigorosamente as respetivas produções cumulativas de metano, tendo-se registado máximos de 62% no ensaio R e 46% no ensaio VGI. Apesar de ser expectável a obtenção de uma produção ótima num dos ensaios em regime de co-digestão, os resultados obtidos apontam no mesmo sentido de (Barr, Roberts, and Milke 2010), onde os ensaios com diferentes razões de glicerol como co-substrato (rácio C:N da mistura relva + glicerol: 30:1, 50:1 e 20:1) obtiveram valores inferiores aos ensaios alimentados apenas com relva e a sua composição gasosa apresentou valores de concentração superiores para outros gases que não o metano. Por outro lado, (Fountoulakis, Petousi, and Manios 2010) obteve uma maior produção de biogás apenas com 1% (v/v) de glicerol e (Castrillón et al. 2011) com 4% de glicerol como co-substrato. Este facto é fortemente suportado por (Holm-Nielsen et al. 2008) que descobriu que para concentrações de glicerol superiores a 5 g·L<sup>-1</sup> existe uma tendência clara para a sobrecarga orgânica. Na tabela seguinte figuram os valores relativos aos parâmetros do ajuste do modelo de Gompertz modificado aplicado aos resultados experimentais.



**Tabela 4.7** – Parâmetros do ajuste do modelo de Gompertz modificado aplicado aos EB.

Ensaio	P (mL CH <sub>4</sub> PTN·g CQO <sub>substrato</sub> <sup>-1</sup> )	R <sub>máx</sub> (mL CH <sub>4</sub> PTN·(g CQO <sub>substrato</sub> ·dia) <sup>-1</sup> )	λ (dia)	R <sup>2</sup>	
R	1º Patamar	6,2 ± 0,6	1,4 ± 0,2	11,4 ± 0,5	0,882
	2º Patamar	31 ± 2	2,7 ± 0,1	17,9 ± 0,3	0,983
VGI	5 ± 13	0,1 ± 0,0	11 ± 22	0,974	

Segundo o ajuste, ambos os ensaios possuem um período de adaptação semelhante, onde foram necessários cerca de 11 dias para que a produção começasse a ser significativa, o que se adequa aos estudos de (Kacprzak et al. 2011) onde foram necessários cerca de 14 dias e (Bakhov, Korazbekova, and Lakhanova 2014) que avaliou a biodegradabilidade de resíduos vitivinícolas, alimentares e biológicos, sendo necessários 11,6, 11,8 e 14,6 dias, respetivamente. No entanto, as taxas produtivas em nada se assemelham assim como os valores relativos à produção, onde o ensaio R possui uma produção estimada 83% superior à do ensaio VGI. Contudo, os valores ajustados para a produção cumulativa apresentados foram apenas alcançados ao fim de 50 para o ensaio R e ao fim de 125 dias para o ensaio VGI, pois ao fim de 34 dias o modelo estabelece uma produção de 29,1 mL CH<sub>4</sub> PTN·g CQO<sub>adicionada</sub><sup>-1</sup> para o ensaio R (1,4% superior à produção experimental) e 2,4 mL CH<sub>4</sub> PTN·g CQO<sub>adicionada</sub><sup>-1</sup> para o ensaio VGI (14,3% inferior à produção experimental).

Por outro lado, a evolução da produção cumulativa de metano para o ensaio R não permitiu um ajuste adequado ao modelo de Gompertz que envolvesse a totalidade dos dias de operação. Assim, o modelo foi ajustado por dois patamares: o primeiro até aos 20 dias de operação iniciais e o segundo desde o 21º até ao 34º dia de operação. Esta particularidade foi igualmente obtida por (Neves et al. 2008) que estudou a biodegradabilidade de resíduos provenientes da restauração, usando lama granular proveniente de um reator anaeróbio de tratamento de efluentes da indústria cervejeira como inóculo na gama mesofílica onde todas as curvas de produção de metano tiveram, em geral, um comportamento exibido em dois patamares. O primeiro patamar foi atingido ao fim de 3,8 dias para um ensaio com excesso de celulose e ao fim de 5,8 a 5,9 dias para os restantes ensaios. Porém, no ensaio R desta experiência, o primeiro patamar produtivo ocorreu entre os 12 e 19 dias e o segundo patamar perto do final do tempo de duração do ensaio. Verifica-se assim um período de adaptação da biomassa de cerca de 11 a 12 dias, onde a produção de metano foi pouco significativa, garantida apenas pela CQO inicial disponível na fase solúvel. Dadas as características lignocelulósicas do substrato, este período de adaptação correspondeu às fases hidrolítica e acidogénica onde os microrganismos, incapazes de assimilar matéria orgânica particulada e degradando-na em polímeros mais simples. A presença de dois patamares de produção metanogénica cimenta ainda mais a difícil degradação deste tipo de substratos, pois durante cerca de uma semana (dia 12 a 19), a produção de metano estabilizou, o que sugere uma regressão nas fases sequenciais do processo anaeróbio para uma nova fase de hidrólise e acidogénese, disponibilizando assim matéria orgânica hidrolisada para a segunda fase produtiva.

Por outro lado, de modo a comparar os resultados obtidos com os registados na literatura para esta tipologia de resíduo, a produção de metano relativa a este ensaio foi convertida a volume de metano produzido por unidade de

SV de substrato adicionado. Assim, obteve-se uma produção de 40 mL·g SV<sup>-1</sup>, bastante inferior à gama produtiva 127 – 361 mL·g SV<sup>-1</sup> obtida por (Barr, Roberts, and Milke 2010), a 220-490 mL·g SV<sup>-1</sup> alcançadas por (Koch et al. 2010) e 295 mL·g SV<sup>-1</sup> por (Nizami, Korres, and Murphy 2009) para sistemas *batch*. Apesar da ausência de pelo menos um ensaio duplicado de maneira a garantir a reprodutibilidade do ensaio R, dada a produção superior relativamente aos restantes ensaios e a urgência temporal para iniciar a experiência 2 foram suficientes para o determinar como o ensaio ótimo desta experiência.

## 4.3 Experiência 2 – Reactores Anaeróbios *Batch* (RAB)

### 4.3.1 Arranque dos RAB – 1º Ciclo

As características experimentais das instalações utilizadas nesta nova experiência e o menor número de ensaios permitiram um arranque experimental menos problemático que nos EB. À exceção da estufa onde se colocaram 2 medidores de biogás e a garantia imperativa da estanqueidade dos reatores não se registaram problemas operacionais com relevância. Relativamente à estufa, esta não efetuou um controlo eficaz da temperatura de operação (35 °C), tendo-se registado algumas flutuações. A razão pela qual se decidiu operar os 2 reatores com concentrações de NaHCO<sub>3</sub> distintas teve que ver com a hipotética inibição discutida no capítulo 4.2.3, onde se relaciona o pH com as concentrações de AAT finais obtidas.

### 4.3.2 Resultados RAB – 1º Ciclo

Nesta experiência, para além de se monitorizar o biogás produzido ao longo do tempo, foram ainda efetuadas análises ao pH do conteúdo de cada reator duas vezes por semana. Paralelamente às medições de pH, foram executadas algumas tentativas de análise periódica ao conteúdo em CQO<sub>Total</sub> dos RAB. No entanto, o método de amostragem não permitiu a recolha de um volume qualitativamente representativo para a análise deste parâmetro. As análises aos restantes parâmetros dizem respeito ao início e fim deste ciclo da experiência 2. Na tabela 4.8, encontram-se resumidos os valores obtidos no 1º ciclo dos RAB.

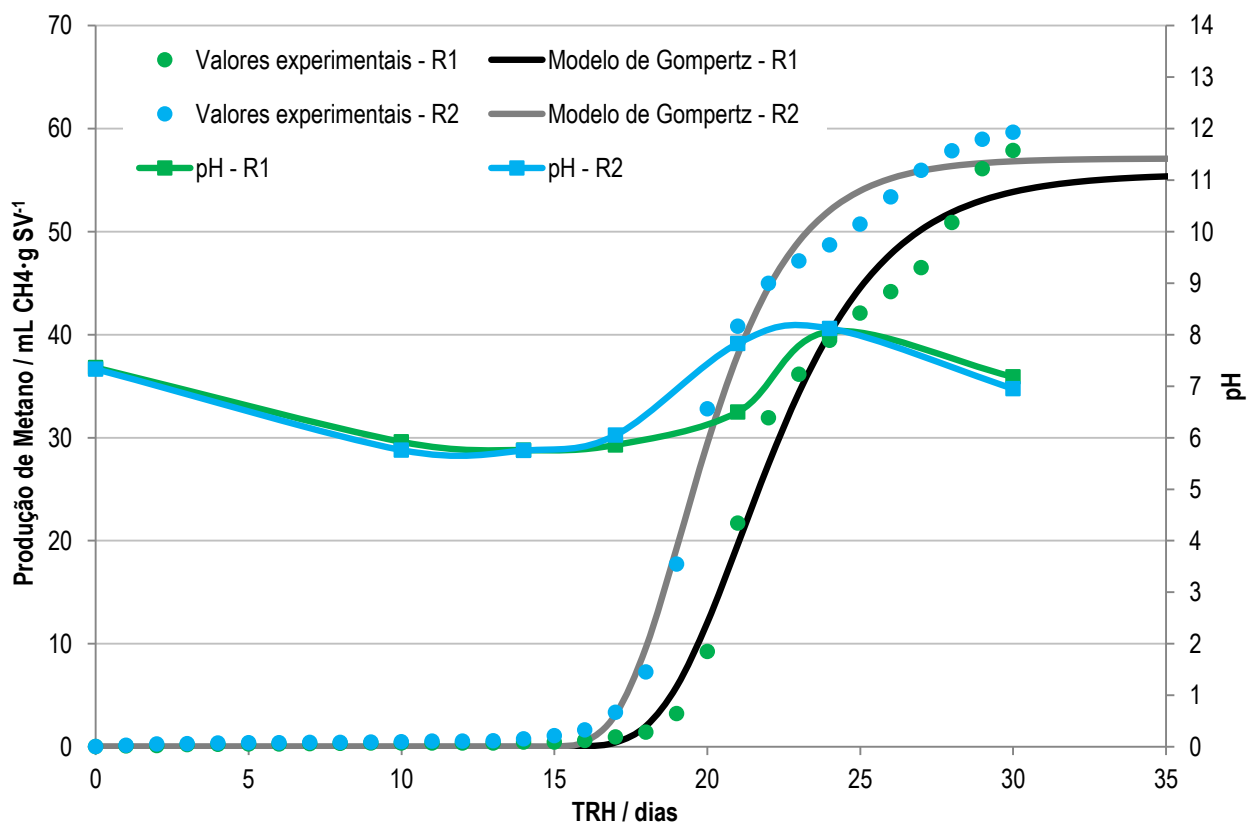
**Tabela 4.8** – Valores médios obtidos para os reatores no início e final da experiência.

Parâmetro	pH	AAT (mg N·L <sup>-1</sup> )	CQO <sub>Total</sub> (g·L <sup>-1</sup> )	CQO <sub>Solúvel</sub> (g·L <sup>-1</sup> )	ST (g·L <sup>-1</sup> )	SV (g·L <sup>-1</sup> )	
R1	Início	7,4	893 ± 54	90 ± 1	12,9 ± 0,1	73 ± 1	58 ± 2
	Fim	7,2	2652 ± 47	73 ± 3	16,4 ± 0,2	52 ± 1	38 ± 1
R2	Início	7,3	855 ± 61	89 ± 1	12,9 ± 0,1	74 ± 2	59 ± 2
	Fim	7,0	2481 ± 39	74 ± 2	16,2 ± 0,1	50 ± 1	37 ± 1

A partir dos resultados da tabela 4.8 pode facilmente observar-se a semelhança dos valores experimentais obtidos entre os 2 reatores. Este facto era expectável inicialmente, uma vez que ambos os reatores possuíam exatamente as mesmas quantidades de inóculo e substrato, diferindo apenas a concentração de NaHCO<sub>3</sub>. Nesta experiência, apesar de ambas as concentrações finais de AAT serem elevadas, o pH dos reatores encontra-se entre 6,6 e 7,4 (figura 4.3) que constitui a gama ótima de crescimento dos microrganismos metanogénicos (Chernicharo 2007). Por outro lado, tendo em conta apenas os valores iniciais e finais registados para o pH, pode concluir-se que não existe vantagem em adicionar a concentração de 5 g·L<sup>-1</sup> de NaHCO<sub>3</sub> ao R1 em detrimento dos 4 g·L<sup>-1</sup> adicionados ao R2. Relativamente aos restantes parâmetros, registaram-se reduções de 19% e 17% para CQO<sub>Total</sub>, 29% e 32% para os ST e 36% e 38% para os SV respetivamente para R1 e R2. Quanto à CQO<sub>Solúvel</sub>, observaram-se acumulações na ordem dos 27% e 25%. Sendo este parâmetro indicativo da matéria orgânica formada nas etapas de hidrólise e

fermentação, terá ocorrido uma sobreposição destas etapas relativamente à metanogénese. No entanto, seria útil uma monitorização contínua deste parâmetro para uma análise mais eficaz do processo.

Tal como referido anteriormente, para além do registo contínuo do biogás formado e da sua percentagem em  $\text{CH}_4$ , foi possível analisar periodicamente o pH deste ciclo dos RAB, com o objetivo de obter uma perceção faseada do processo. Na figura seguinte encontram-se representadas as produções cumulativas de metano normalizadas pelo conteúdo em SV do substrato adicionado bem como o registo periódico do pH de ambos os reactores.



**Figura 4.3** – Produção cumulativa de metano (PTN:  $0^\circ\text{C}$  e  $1\text{atm}$ ) por grama de SV adicionada de substrato nos reatores R1 e R2 e respectivas evoluções periódicas de pH.

Inicialmente, o pH desceu gradual e continuamente até entre o 14º e 18º dia de operação, que correspondeu ao cessar das fases iniciais do processo anaeróbio (hidrólise, acidogénese e acetogénese) e ao início da fase metanogénica, com as percentagens de  $\text{CH}_4$  nos RAB a terem um crescimento quase exponencial desde o 18º até 25º dia. Aqui, registou-se um valor máximo de pH ao 24º dia de operação de 8,1 em R1 e R2. O valor mínimo foi registado ao 14º dia com um valor de 5,8 nos 2 reatores. Em concordância, as percentagens máximas registadas foram de 75,9% para R1 e 78,4% para R2 atingidas ao 25º e 22º dia de operação respetivamente. O comportamento destes dois parâmetros para ambos os reatores adequa-se ao previsto na literatura, pois numa fase inicial o material complexo particulado (polímeros) é convertido em materiais mais simples e dissolvidos através da ação de exoenzimas excretadas pelas bactérias hidrolítico-fermentativas. No entanto, sob condições anaeróbias, devido às

características lignocelulósicas do substrato este processo é lento (Lettinga, Pol, and Zeeman 1996, Chernicharo 2007). As bactérias responsáveis por estes mecanismos são muito menos sensíveis ao pH que os microrganismos metanogénicos, pois estas continuam bastante activas mesmo para valores de pH na ordem dos 4,5. Posteriormente, os compostos produzidos são oxidados em substratos apropriados para a ação dos microrganismos metanogénicos, tais como ácido acético, hidrogénio e dióxido de carbono, o que causa um decréscimo no pH do meio. Porém, o hidrogénio e o acetato formados são usados diretamente pelos microrganismos metanogénicos, ocorrendo um aumento do pH (Chernicharo 2007). Os decréscimos simultâneos registados para o pH perto do final do ensaio, dizem respeito provavelmente à ausência de substrato adequado aos microrganismos metanogénicos naquele período, que originou o decréscimo das suas populações. Por outro lado, poderá igualmente existir inibição devido à toxicidade proporcionada pelo  $\text{NH}_3$  devido às reduzidas percentagens de metano registadas perto do final do TRH, aliadas ao pH (superior a 8) e às concentrações finais de AAT (que já deveriam ser elevadas ao 24º dia de operação). Os produtos provenientes do próprio metabolismo microbiológico, tal como o  $\text{CO}_2$ , quando dissolvido na fase aquosa forma  $\text{HCO}_3^-$ , promovem a acidificação do meio. Este facto é suportado pela evolução produtiva de biogás registada perto do final deste ciclo com as percentagens de metano a terem reduções graduais desde o 25º e 22º dia de operação respetivamente para R1 e R2. Deste modo registou-se um aumento nas percentagens em  $\text{CO}_2$  no conteúdo do biogás produzido.

Analisando as produções cumulativas de metano obtidas experimentalmente é clara a sua semelhança, onde o R1 obteve uma produção de metano final de 57,9 mL  $\text{CH}_4 \cdot \text{g SV}^{-1}$  e o R2 com 59,6 mL  $\text{CH}_4 \cdot \text{g SV}^{-1}$ , o que se traduziu numa produção volumétrica total de 10,6 L e 10,9 L de  $\text{CH}_4$  (PTN: 0 °C e 1 atm) respetivamente, ou seja, o ensaio R2 obteve um acréscimo na produção experimental de apenas 3%. Estas produções cumulativas de metano obtidas experimentalmente, embora sejam superiores em mais de 30% relativamente ao melhor ensaio obtido na experiência 1, voltaram a apresentar um desempenho inferior quando comparadas com outros autores usando o mesmo tipo de substrato (Barr, Roberts, and Milke 2010). Tendo em conta a baixa taxa de remoção de SV relativamente à encontrada na literatura para a degradação completa deste tipo de substrato e a ocorrência de 2 patamares produtivos na experiência anterior (também reportados por (Neves et al. 2008)) talvez fosse benéfico o prolongamento deste 1º ciclo a fim de se obter uma melhoria produtiva que fosse equiparável aos resultados presentes na literatura (0,295  $\text{m}^3 \cdot \text{kg SV}^{-1}$  por (Nizami, Korres, and Murphy 2009)) para sistemas *batch*. Relativamente ao TRH, (Demirbas and Ozturk 2004) obteve 80 a 85% de biogás produzido nos primeiros 18 dias dos 30 dias de operação. (Qi et al. 2005) propõe um TRH óptimo de 2 a 3 semanas para substratos lignocelulósicos, o que vai de encontro aos cerca de 30 dias propostos por (Lehtomaki and Bjornsson 2006) para sistemas *batch* de fase dupla. Porém, (Lehtomaki et al. 2008) obteve cerca de 95% da sua produção total de metano ao fim de 55 dias a operar com um digestor de lixiviação acoplado a um reator anaeróbio de fluxo ascendente.

Apesar das diferentes concentrações de  $\text{NaHCO}_3$  aplicadas permitirem uma manutenção das condições operatórias desejáveis, a cinética de todo o processo de biometanização foi ligeiramente distinta entre reatores. Na tabela que se segue são apresentados os valores relativos ao ajuste do modelo de Gompertz modificado aos resultados experimentais.

**Tabela 4.9** - Parâmetros do ajuste do modelo de Gompertz modificado aplicado ao 1º ciclo dos RAB (este estudo) e aplicado a outros substratos.

Substrato	P (mL CH <sub>4</sub> PTN·g SV <sub>substrato</sub> <sup>-1</sup> )	R <sub>máx</sub> (mL CH <sub>4</sub> PTN·(g SV <sub>substrato</sub> · dia) <sup>-1</sup> )	λ (dia)	R <sup>2</sup>	Referência
Relva seca (R1 – 1º ciclo)	55,6 ± 2,7	7,9 ± 0,3	18,5 ± 0,1	0,992	Este estudo
Relva seca (R2 – 1º ciclo)	57,1 ± 0,7	10,3 ± 0,4	17,0 ± 0,1	0,996	Este estudo
Relva seca (R1 – 2º ciclo)	138,6 ± 1,4	14,6 ± 0,4	2,8 ± 0,1	0,993	Este estudo
Relva seca (R2 – 2º ciclo)	14,9 ± 0,1	7,6 ± 4,7	0,1 ± 0,1	0,756	Este estudo
Relva - <i>Pennisetum hybrid</i> (RIS = 1,48)	184,2	14,0	0,0	0,990	(Li et al. 2012)
Relva Canário	648,4	15,6	14,7	0,993	(Kacprzak et al. 2011)
Esterco de gado líquido + resíduo vitivinícola	338,0 ± 13,0	14,0 ± 2,0	11,6 ± 3,0	-	(Bakhov, Korazbekova, and Lakhanova 2014)
Esterco de gado líquido + resíduos alimentares	288,0 ± 15,0	6,0 ± 0,4	11,8 ± 1,2	-	(Bakhov, Korazbekova, and Lakhanova 2014)
Esterco de gado líquido + chorume	387,0 ± 11,0	13,0 ± 2,0	14,6 ± 0,8	-	(Bakhov, Korazbekova, and Lakhanova 2014)
Lamas activadas + <i>Egeria densa</i> (SV <sub>LA</sub> :SV <sub>ED</sub> = 0,7:0,3)	189,6	18,0	0,0	0,953	(Zhen et al. 2015)
Resíduos de Vinagre	183,5	8,4	18,4	0,999	(Lu et al. 2013)

RIS – razão inóculo substrato

 SV<sub>LA</sub>:SV<sub>ED</sub> – SV Lamas Activadas: SV *Egeria densa*

Tal como referido anteriormente, a cinética de todo o processo anaeróbio foi ligeiramente distinta entre reatores e o modelo de Gompertz modificado veio suportar esta constatação, pois de acordo com o ajuste o reactor R2 iniciou a sua produção ao 17º dia de operação quando o R1 apenas arrancou cerca de 2 dias depois. Além disso, a taxa de produção máxima de R2 foi igualmente superior à obtida para R1. Por outro lado, os valores relativos à produção estimada foram apenas alcançados ao fim de 39 e 34 dias, respetivamente, onde, em termos produtivos, R2 foi cerca de 3% superior a R1. Quando comparados com outros autores, os resultados obtidos neste estudo apenas se assemelham à taxa produtiva e ao período de adaptação obtidas por (Lu et al. 2013) que utilizou resíduos da indústria vinagreira. Embora as correlações obtidas (R<sup>2</sup>) para o modelo de Gompertz modificado traduzam a sua ótima aplicabilidade, os valores relativos à produção experimental superam os previstos em 4%. Esta ligeira diferença, associada aos baixos rendimentos reportados ao fim dos 30 dias de operação podem ser indicativos da ocorrência de um novo patamar produtivo em ambos os reatores. Porém a continuidade do ensaio não foi exequível devido à planificação e urgência temporal do 2º ciclo previsto para esta experiência. Por outro lado, foi também

calculado o rendimento experimental obtido para cada reator bem como a razão substrato inóculo (RSI) do conteúdo de cada reator. Estes resultados encontram-se na seguinte tabela.

**Tabela 4.10** – Comparação entre a produção experimental e a produção teórica total

Ciclo	Reator	Produção experimental (mL CH <sub>4</sub> )	Produção Teórica Total (mL CH <sub>4</sub> )	Rendimento experimental (%)	RSI (g SV <sub>relva</sub> · g SV <sub>inóculo</sub> <sup>-1</sup> )
1º	R1	10578	88031	12,0	3,2
	R2	10903	88031	12,4	3,2

RSI – razão substrato inóculo

É importante referir que a RSI não foi um parâmetro pré-estabelecido para a organização técnica dos reatores deste estudo, mas sim calculada de modo a ser possível fazer uma interpretação dos resultados obtidos tendo em consideração a restante literatura.

As produções de metano de biomassa lignocelulósica são relativamente baixas devido à recalcitrância da parede das células vegetais à digestão (Yang et al. 2015). Segundo (Bhatnagar and Sain 2005) a parede celular das plantas é maioritariamente constituída por 9 a 80% de celulose, 10 a 50% de hemicelulose e 5 a 35% de lenhina. Genericamente existem 2 tipos de celulose: a celulose amorfa, que é facilmente digerível, e a celulose cristalina, que é resistente à hidrólise. Por outro lado, a hemicelulose por si só é facilmente digerível devido às suas propriedades amorfas. Porém, esta aumenta a recalcitrância da parede celular das plantas construindo uma rede de microfibras lignocelulósicas. A lenhina é insolúvel em água, resistente à acção microbiana e a forças oxidativas, tornando-se assim no componente mais recalcitrante da parede celular das plantas. A conjugação destes três componentes resulta numa rígida matriz tridimensional, que constitui uma barreira para a acção enzimática, impedindo deste modo a digestão de biomassa lignocelulósica (Yang et al. 2015). Existe assim um consenso geral de que a presença de lenhina aumenta a resistência da biomassa lignocelulósica à biodegradação, resultando em rendimentos de metano inferiores. O conteúdo de lenhina, a cristalinidade da celulose e o tamanho de partículas limitam a digestibilidade de celulose e hemicelulose. A lenhina retarda a acessibilidade de enzimas e ataques microbianos à celulose devido ao seu invólucro de protecção e natureza hidrofóbica (Brown, Shi, and Li 2012). Para sistemas de digestão anaeróbia por via seca, a produção média reportada para biomassa lenhosa é de 50 mL CH<sub>4</sub>·g SV<sup>-1</sup>, o que representa apenas 10% da produção teórica de metano (Jerger, Dolenc, and Chynoweth 1982). Neste estudo, apesar do teor de sólidos do conteúdo dos reactores ainda se enquadrar na gama de sistemas de DA por via húmida, o rendimento obtido é semelhante ao supracitado. No entanto, apesar da constituição da matriz lignocelulósica não ser uniforme na literatura e variar de acordo com as várias espécies de relva utilizadas nestes processos, se se assumir que cerca de 50% da matéria orgânica da relva utilizada é recalcitrante, os rendimentos experimentais seriam 24% e 25% respetivamente. Todavia, estes resultados ainda se encontram demasiado inferiores a (Lehtomaki et al. 2008) que reportou um rendimento de 66%, com uma redução de 39% de CQO<sub>Total</sub> depois de um TRH de 49 dias.

Relativamente à RSI, vários estudos sugerem RSI baixas (em condições mesofílicas) de modo a obter produções metanogénicas superiores. (Neves, Oliveira, and Alves 2004) que testaram a biodegradabilidade de resíduos alimentares com diferentes RSI, desde 0,5 a 2,3 g SV·g SV<sup>-1</sup>, obtiveram a biodegradabilidade máxima nos ensaios com 0,5 de RSI. O mesmo comportamento foi obtido por (Lu et al. 2013) que testaram a biodegradabilidade de resíduos de vinagre com RSI de 1 a 6, onde a maior produção de metano foi de 242,69 mL·g SV<sup>-1</sup> alcançada no ensaio RSI = 1 e a inferior foi de 182,4 mL·g SV<sup>-1</sup> obtida no ensaio RSI = 6 ao fim de 60 dias. Por outro lado, são normalmente selecionadas RSI de 2-3 (SV) para sistemas de DA de via seca com substratos lignocelulósicos sob temperaturas mesofílicas (Yang et al. 2015, Brown, Shi, and Li 2012). Nesse mesmo estudo, (Brown, Shi, and Li 2012), testaram igualmente a biodegradabilidade de relva por via húmida a 37°C, com 5% ST do conteúdo, RSI de 0,5 e um TRH de 30 dias, onde obtiveram uma produção cumulativa de metano de 111 mL CH<sub>4</sub>·g SV<sup>-1</sup>. De acordo com este autor, uma vez que estamos perante um sistema de DA por via húmida, a RSI deste estudo deveria ser inferior em prol da obtenção de melhorias produtivas.

Ambas as concentrações de NaHCO<sub>3</sub> aplicadas revelaram-se eficazes na tamponização do processo anaeróbio ao fim dos dias de operação estabelecidos, uma vez que os valores de pH registados foram apenas ligeiramente inferiores a 6 e ligeiramente superiores a 8. Deste modo, conclui-se que a adição de 4 g·L<sup>-1</sup> de NaHCO<sub>3</sub> foram suficientes para assegurar a alcalinidade do meio.

#### 4.3.3 Arranque dos RAB – 2º Ciclo

Terminados os 30 dias de operação definidos para o 1º ciclo desta experiência, foi retirado 1L do volume de trabalho em cada reator e procedeu-se à alimentação de acordo com as características técnicas descritas na tabela 3.3 restabelecendo o volume de trabalho do 1º ciclo. Uma vez que ambas as concentrações de NaHCO<sub>3</sub> analisadas no 1º ciclo foram eficazes a garantir a neutralidade no final do TRH definido, garantindo igualmente produções de cumulativas de metano semelhantes, optou-se por aplicar na alimentação deste ciclo a concentração de 4 g·L<sup>-1</sup> de NaHCO<sub>3</sub> em função do volume de trabalho operado de modo a tornar o processo menos dispendioso no que concerne ao gasto de reagentes no processo. À escala laboratorial este facto não é muito relevante uma vez que se operam volumes reduzidos. Porém, à escala comercial/industrial, os volumes operacionais requerem quantidades elevadas de reagentes.

Por outro lado, para a alimentação que marca a transição do 1º para o 2º ciclo foi definido que a concentração de ST no interior do R1 seria de 5% enquanto para R2 seriam alimentados 5% ST de substrato, tal como o arranque do 1º ciclo. Assim, para R1, a percentagem de ST do substrato é inferior a 5% para assegurar a equidade da percentagem de ST do conteúdo. Em R2 a percentagem de ST do conteúdo foi superior de modo a assegurar uma percentagem de 5% de ST de substrato. Na tabela 4.11 estão resumidos os dados relativos os teores de ST em ambos os ciclos.



**Tabela 4.11** – Valores da percentagem de ST do Substrato e do conteúdo no início de cada ciclo

Experiência	Ciclo	Reator	% ST de Substrato	% ST conteúdo
2	1º	R1	5,0	7,3
		R2	5,0	7,4
	2º	R1	3,4	7,5
		R2	5,0	9,1

As diferenças registadas entre a % ST de substrato e ST conteúdo ocorrem em parte devido ao modo de funcionamento em descontínuo dos reatores (*batch*), que faz com que parte do conteúdo não removido, que se traduz em substrato recalcitrante, contribua para aumentar a fração sólida aquando da alimentação. O cálculo do teor de sólidos é assim discutível, não existindo uma definição globalmente aceite. Em geral, em reatores contínuos, a percentagem de sólidos diz respeito ao resíduo que está a ser alimentado ao reator, sendo o teor de sólidos no interior do reator significativamente mais baixo, devido não só à remoção por degradação, mas também devido à recirculação da fração aquosa (procedimento operativo recorrente neste tipo de reatores à escala industrial/comercial).

Embora existam discrepâncias na literatura quanto aos limites de teor de sólidos na definição de sistemas de DA por via húmida e via seca, segundo (Yang et al. 2015) os sistemas por via húmida operam com teores de sólidos no conteúdo normalmente inferiores a 15%.

#### 4.3.4 Resultados RAB – 2º Ciclo

Para este 2º ciclo foi apenas possível monitorizar o biogás em contínuo, devido ao encerramento laboral durante o período de operação estabelecido. Porém, as restantes análises alusivas ao início e fim deste ciclo resumem-se na seguinte tabela.

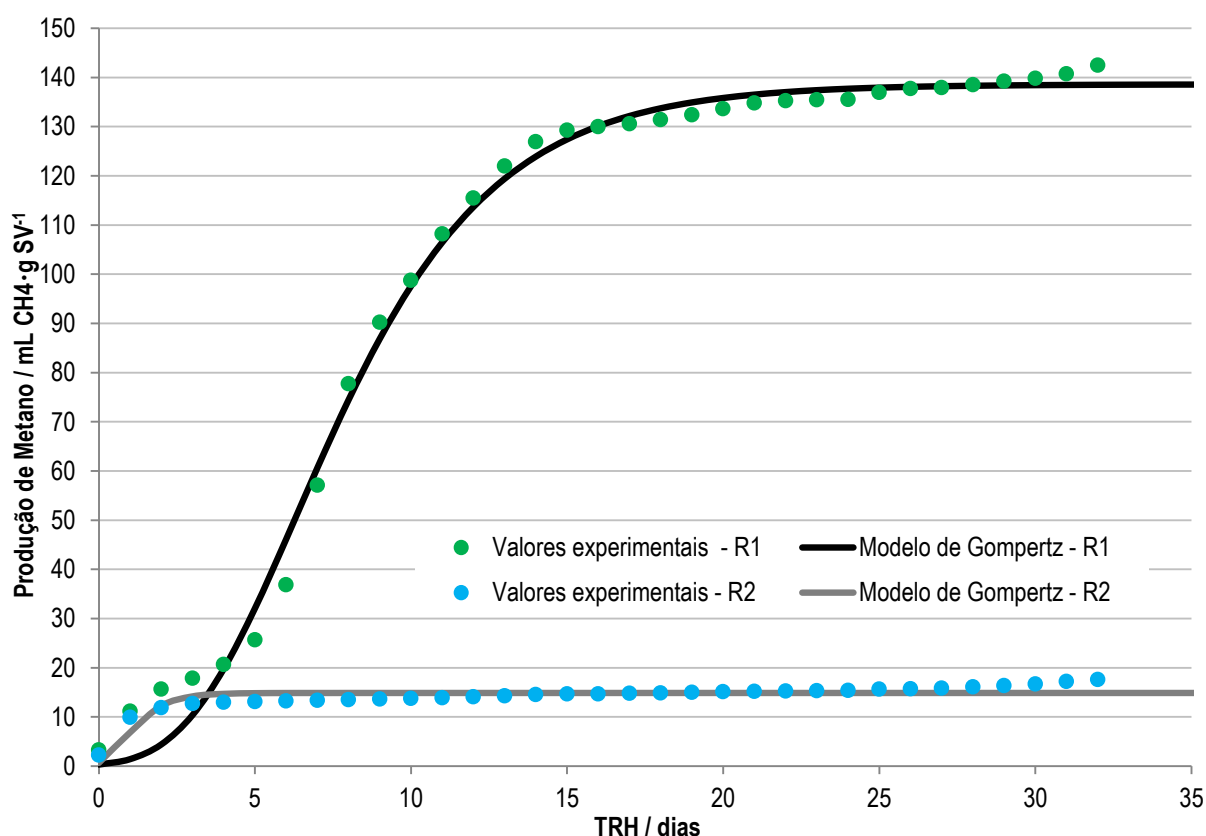
**Tabela 4.12** – Valores médios obtidos para os reatores no início e final da experiência.

Parâmetro	pH	AAT (mg N·L <sup>-1</sup> )	CQO <sub>Total</sub> (g·L <sup>-1</sup> )	CQO <sub>Solúvel</sub> (g·L <sup>-1</sup> )	ST (g·L <sup>-1</sup> )	SV (g·L <sup>-1</sup> )	
R1	Início	7,2	2074 ± 61	97 ± 1	17,5 ± 0,1	75 ± 1	59 ± 1
	Fim	7,3	2261 ± 49	79 ± 2	19,3 ± 0,3	55 ± 2	37 ± 1
R2	Início	7,0	2390 ± 56	113 ± 1	21,5 ± 0,1	91 ± 3	73 ± 2
	Fim	5,8	3035 ± 48	104 ± 1	32,4 ± 0,2	69 ± 2	52 ± 1

Neste ciclo foram registadas acumulações de 8% e 21% relativamente às concentrações finais de AAT, embora estes não constituam por si só alguma inibição. Quanto à CQO<sub>Total</sub> registaram-se reduções de 19% para R1, repetindo-se assim a mesma redução de matéria orgânica registada no 1º ciclo. Porém, em R2 obteve-se apenas uma redução de 8%, bastante inferior aos 17% registados no 1º ciclo. Esta discordância entre ciclos para o reator R2 será detalhadamente discutida de seguida após demonstração dos resultados das produções cumulativas de

metano. Relativamente à  $CQO_{\text{Solúvel}}$ , R1 apresentou um valor final apenas 9% superior ao inicial enquanto para R2 o aumento foi de 34%. As reduções registadas para os ST e SV no R1 voltaram a ser equiparáveis ao ciclo anterior com percentagens de remoção de 27% e 38%, respetivamente. O mesmo não aconteceu com R2, onde se registaram reduções inferiores ao 1º ciclo, sendo estas de 24% para os ST e 28% para os SV.

Na figura seguinte encontram-se representadas as diferentes produções cumulativas de metano normalizadas pelo conteúdo em SV do substrato adicionado, as quais foram obtidas neste 2º ciclo, o que permitirá uma melhor perceção dos resultados dos parâmetros exibidos na tabela 4.12.



**Figura 4.4** – Produção cumulativa de metano (PTN: 0 °C e 1atm) por grama de SV adicionada de substrato nos reatores R1 e R2.

Tal como referido anteriormente, para este ciclo apenas se efectuou o registo inicial e final do pH do conteúdo dos reatores, onde os valores finais obtidos justificam a diferença das produções cumulativas de metano obtidas para este ciclo. O pH registado para R1 demonstrou uma vez mais que a concentração de  $\text{NaHCO}_3$  aplicada garantiu suficiente alcalinidade ao meio durante os 32 dias de TRH. O mesmo não aconteceu em R2, onde se obteve um pH final de 5,8. As acumulações registadas no ciclo anterior para a  $CQO_{\text{Solúvel}}$  (27% e 25% respetivamente) garantiram um arranque bastante similar entre reatores, uma vez que ainda permaneceu matéria orgânica disponível para os microrganismos metanogénicos poderem consumir nos primeiros dias de operação deste 2º ciclo, estimulados pela neutralidade do meio, tendo em conta os valores finais registados no 1º ciclo e o ajuste a pH 7 da fração líquida de

ambas as alimentações efetuadas. No entanto, as distintas condições praticadas na alimentação efetuada entre ciclos foram determinantes para a acidificação do conteúdo de R2 devido à sobrecarga orgânica. No início, o consórcio microbiano metanogénico, perfeitamente adaptado ao substrato do 1º ciclo, terá consumido a remanescente matéria orgânica disponível na fase solúvel. Porém, terminada esta biodisponibilidade em matéria orgânica solubilizada, juntamente com a adição de mais matéria orgânica, o rácio entre a metanogénese e a hidrólise/acidogénese terá sido invertido. Isto significa que os microrganismos responsáveis pela degradação da matéria orgânica complexa e particulada em materiais mais simples e dissolvidos (AGV) possuem uma cinética superior à dos microrganismos metanogénicos, levando à acumulação de AGV e consequentemente abaixamento do pH tornando o meio inibitório à metanogénese (Brown, Shi, and Li 2012) sendo esta etapa bastante difícil de recuperar quando é interrompida pela acumulação de AGV (McMahon et al. 2001). Uma vez que os AGV contribuem para a fração da  $CQO_{\text{Solúvel}}$  (Chernicharo 2007), é compreensível a diferença registada nas acumulações registadas para este parâmetro entre reatores.

Relativamente às produções cumulativas de metano obtidas experimentalmente, estas foram de 142,5 mL  $CH_4 \cdot g$   $SV^{-1}$  para R1 e 17,6 mL  $CH_4 \cdot g$   $SV^{-1}$  para R2, o que se traduziu numa produção volumétrica de 17,7 L e 3,2 L  $CH_4$  (PTN: 0 °C e 1 atm). Esta diferença produtiva experimental de 88% permite esclarecer as diferenças registadas entre reatores para as reduções de  $CQO_{\text{Total}}$  bem como para os valores de ST e SV. Por outro lado, a baixa produção registada em R2 (a mais baixa em todos os ensaios deste estudo contendo apenas relva como substrato) justifica igualmente as percentagens de redução inferiores entre ciclos para este reator. Comparativamente ao 1º ciclo produtivo, a produção obtida no R1 foi superior em quase 60% e superior em 72% quando comparada ao ensaio R da experiência 1. Tendo em conta as condições operatórias deste 2º ciclo, os aumentos produtivos registados poderão ser justificados pela “pré-adaptação” do consórcio microbiano presente no inóculo ao tipo de substrato utilizado, proporcionado no 1º ciclo.

O ajuste do modelo de Gompertz modificado aos valores experimentais (tabela 4.9) revelou-se bastante eficaz no reator R1 ( $r^2 = 0,993$ ), apesar do período de adaptação ( $\lambda$ ) não traduzir o comportamento dos acontecimentos experimentais, pois existiu produção de metano ainda no primeiro dia de operação, ao contrário do início aos 2,8 dias previsto pelo modelo. Por outro lado, R1 obteve um  $R_{\text{máx}}$  de 14,6 mL  $CH_4 \cdot (g \text{ SV} \cdot \text{dia})^{-1}$  equiparável aos 15,6 mL  $CH_4 \cdot (g \text{ SV} \cdot \text{dia})^{-1}$  registados por (Kacprzak et al. 2011) a digerir “relva canário” e 14 mL  $CH_4 \cdot (g \text{ SV} \cdot \text{dia})^{-1}$  reportados por (Li et al. 2012) com relva (*Pennisetum hybrid*; RIS = 1,48). No entanto, ambos os autores citados obtiveram produções de metano superiores. Para o reator R2, o ajuste foi apenas conseguido através da imposição de restrições aos parâmetros do modelo devido à precoce produção experimental registada, onde 75% da produção total de metano foi conseguida ao fim de 5 dias de operação, o que dificultou a aplicabilidade do modelo para este reator ( $r^2 = 0,756$ ).

De modo a ser possível fazer uma melhor interpretação dos resultados obtidos com os presentes na literatura, voltou-se a comparar as produções experimentais e teóricas esperadas para este ciclo bem como a RSI de cada reator, presentes na seguinte tabela.

**Tabela 4.13** – Comparação entre a produção experimental e a produção teórica total.

Ciclo	Reator	Produção experimental (mL CH <sub>4</sub> )	Produção Teórica Total (mL CH <sub>4</sub> )	Rendimento experimental (%)	RSI (g SV <sub>relva</sub> ·(g SV <sub>inóculo</sub> ) <sup>-1</sup> )
2º	R1	17691	59755	29,6	2,9
	R2	3219	88031	3,7	4,3

RSI – razão substrato inóculo

A RSI calculada para o 1º ciclo, desprezando erros experimentais, traduzia efetivamente a relação em massa de SV do substrato e do inóculo no interior dos reatores. Isto não se verificou neste ciclo devido às circunstâncias da alimentação efetuada. Após interrupção do 1º ciclo foi retirado 1 L do conteúdo de cada reator após homogeneização contínua entre 20 a 30 minutos. Partindo do princípio que a fração volumétrica retirada foi igualmente constituída por 70% de inóculo, restavam 2100 mL de inóculo no interior dos reatores para o arranque deste novo ciclo. No entanto, não foi possível efetuar o mesmo procedimento de cálculo para o substrato adicionado no 1º ciclo e que permaneceu como conteúdo nos reatores durante o 2º ciclo, sendo apenas considerada a massa de ST de substrato adicionado na alimentação para o cálculo da RSI no 2º ciclo. Deste modo, os valores apresentados para este parâmetro servem apenas para a comparação entre reatores, uma vez que o procedimento de cálculo foi igual entre reatores.

Reconhecidas as dificuldades na DA de substratos lignocelulósicos os rendimentos experimentais obtidos permanecem bastante inferiores aos 66% reportados por (Lehtomaki et al. 2008) ao fim de um TRH de 49 dias. Nesse mesmo estudo, (Lehtomaki et al. 2008), reporta uma remoção de 39% para a CQO<sub>Total</sub>. Tendo em conta as baixas remoções de CQO<sub>Total</sub> e SV obtidas em R1, talvez fosse benéfica a extensão do TRH para uma melhoria dos resultados produtivos. O visível aumento dos resultados experimentais em relação à produção máxima estabelecida pelo modelo ao aproximar do final do TRH para R1, poderá também sugerir a ocorrência de um novo patamar produtivo, conforme registado no ensaio R da experiência 1, igualmente registado por (Neves et al. 2008) em resíduos alimentares.

Tendo em conta as circunstâncias de cálculo da RSI, explicadas anteriormente e assumindo que os valores reais superam os apresentados na tabela 4.13, pode inferir-se que se os valores obtidos são demasiado elevados para sistemas de DA por via húmida sob condições mesofílicas (Brown, Shi, and Li 2012), principalmente no reator R2, que apresenta um valor de RSI já enquadrado na gama 4 a 6 para condições de operação termofílicas (Yang et al. 2015).

Porém, apesar dos resultados registados no reator R1 se enquadrarem na gama de resultados obtidos por (Barr, Roberts, and Milke 2010) entre 127 e 361 mL CH<sub>4</sub>·g SV<sup>-1</sup>, chegando inclusive a superar os 111 mL CH<sub>4</sub>·g SV<sup>-1</sup> obtidos por (Brown, Shi, and Li 2012), os melhores resultados obtidos neste estudo permaneceram abaixo do valor esperado de 300 mL CH<sub>4</sub>·g SV<sub>adicionado</sub><sup>-1</sup> para a DA em condições de referência de substratos lignocelulósicos (Nizami, Korres, and Murphy 2009).

## 5 Conclusões

A primeira fase do trabalho consistiu em ensaios de biodegradabilidade, na gama mesofílica, com um volume de trabalho de 100 mL, onde foram testadas diferentes razões de relva com glicerol, numa abordagem de mono-digestão (ensaios R e G (15,5% v/v)) e co-digestão (ensaios VGO (15,5% v/v), VGI (7,8% v/v) e VGS (23,2% v/v)), com 5% ST de substrato, e  $5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$   $\text{NaHCO}_3$ . A partir dos resultados obtidos foi possível concluir que a mono-digestão da relva colhida na FEUP é a melhor opção de digestão anaeróbia. Neste estudo verificou-se inibição ao processo de DA nos ensaios G, VGO e VGS por suspeita de sobrecarga orgânica. Foram obtidas produções cumulativas de metano de  $28,7 \text{ mL CH}_4\cdot\text{g CQO}^{-1}$  no ensaio R e  $2,6 \text{ mL CH}_4\cdot\text{g CQO}^{-1}$  no ensaio VGI ao fim de 34 dias de operação. Verificaram-se reduções de ST e SV de 43% e 51% no ensaio R e 31% e 36% no ensaio VGI e os valores finais obtidos para o pH, em torno da neutralidade, confirmaram a eficácia da alcalinidade fornecida pela adição de  $\text{NaHCO}_3$ .

Na segunda fase do trabalho foram realizados dois ciclos de alimentação consecutivos em modo *batch*, na gama mesofílica, com um volume de trabalho de 4 L, onde no primeiro ciclo foram incorporadas as melhores condições obtidas na experiência anterior (mono-digestão de relva), com 5% ST de substrato, diferindo apenas a concentração de  $\text{NaHCO}_3$  entre reatores, com  $5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$   $\text{NaHCO}_3$  para o reator R1 e  $4 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  para R2. Ao fim de 30 dias de operação, registaram-se produções cumulativas de metano de  $57,9 \text{ mL CH}_4\cdot\text{g SV}^{-1}$  em R1 e  $59,6 \text{ mL CH}_4\cdot\text{g SV}^{-1}$  para R2, começando a produção a ser significativa ao fim de 18 dias em R1 e 17 dias em R2. Estas produções traduziram-se em 10,6 L em R1 e 10,9 L em R2, medidos em condições PTN, como produções totais efetivas de  $\text{CH}_4$ . Foram verificadas reduções de ST e SV de 29% e 36% para R1 e 32% e 38% para R2, respetivamente, bem como acumulações de  $\text{CQO}_{\text{Solúvel}}$  na ordem dos 27% em R1 e 25% em R2. Os rendimentos experimentais obtidos foram de apenas 12,0% em R1 e 12,4% para R2. Estes resultados associados às acumulações de  $\text{CQO}_{\text{Solúvel}}$  registadas, às baixas reduções de sólidos e produções cumulativas quando comparados com a literatura sugerem um prolongamento deste 1º ciclo, permitindo um melhoramento produtivo equiparável a outros autores utilizando o mesmo substrato e o mesmo modo de sistema operativo. Apesar das diferentes concentrações de  $\text{NaHCO}_3$  aplicadas, registaram-se valores finais de pH em torno da neutralidade, o que revela a eficácia na tamponização do processo anaeróbio ao fim do TRH estabelecido. Isto permite concluir que a adição de  $4 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  de  $\text{NaHCO}_3$  foi suficiente para assegurar a alcalinidade do meio.

O 2º ciclo da segunda fase foi planeado de modo a assegurar a manutenção da concentração de 5% ST do conteúdo no reator R1 enquanto no reator R2 foram adicionados 5% ST de substrato, tendo-se utilizado uma concentração de  $4 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  de  $\text{NaHCO}_3$  em ambos os reatores. Terminado o TRH de 32 dias registaram-se produções cumulativas de metano de  $142,5 \text{ mL CH}_4\cdot\text{g SV}^{-1}$  em R1 e  $17,6 \text{ mL CH}_4\cdot\text{g SV}^{-1}$  em R2, traduzindo-se em produções totais efetivas de  $\text{CH}_4$  (PTN: 0 °C e 1 atm) de 17,7 L em R1 e 3,2 L em R2. Por outro lado, registou-se um arranque produtivo após cerca de 1 dia posteriormente à transição entre ciclos em ambos os reatores, o que demonstra a adaptação do consórcio microbiano ao substrato lignocelulósico, proporcionada pelo ciclo anterior. Verificaram-se reduções de ST e SV de 27% e 38% para R1 e 24% e 28% para R2. As acumulações de  $\text{CQO}_{\text{Solúvel}}$  fixaram-se nos

9% em R1 e 34% em R2 e os rendimentos experimentais foram de 29,6% e 3,7%, respetivamente. Registou-se um valor de pH final neutro no reator R1 e 5,8 em R2, que juntamente com respetiva acumulação de  $CQO_{\text{Solúvel}}$  e rendimento registado indica a acidificação do meio, causada pelo sobreposição das etapas de hidrólise e acidogénese sobre a etapa metanogénica e conseqüente inibição ao processo de DA. Por outro lado, apesar da significativa melhoria produtiva registada entre ciclos no reator R1, a produção cumulativa de metano e reduções de sólidos permanecem inferiores ao valor de referência presente na literatura para substratos lignocelulósicos de  $mL\ CH_4 \cdot g\ SV^{-1}$ . Deste modo, a ausência de um pré-tratamento que se revelasse mais eficaz no melhoramento da digestibilidade enzimática/microbiana dos compostos mais recalcitrantes da biomassa foi determinante para justificar a baixa produtividade.

## 6 Perspetivas para trabalho futuro

Esta secção de perspetivas para trabalhos futuros foi direccionada essencialmente para a identificação do digestor anaeróbio piloto do LabEA e propostas para o seu arranque e posterior funcionamento em condições ótimas. Serão também abordadas possíveis estratégias/soluções para contornar alguns problemas encontrados ao longo deste estudo. Dividiu-se a análise em três pontos distintos: identificação do reator piloto do LabEA (circunstâncias do seu dimensionamento e identificação de lacunas técnicas para o seu arranque), sugestões para novos estudos e por último, identificação de dificuldades encontradas ao longo do estudo e sugestões para a sua resolução.

### 6.1 Reator piloto do LabEA

Na sequência do trabalho realizado por antigos alunos do Mestrado Integrado em Engenharia do Ambiente no âmbito do Projeto Transversal, realizado desde o 2º semestre do 1º ano até ao final do ciclo de estudos, relativo à Compostagem e Digestão Anaeróbia de resíduos provenientes dos espaços verdes da FEUP foi projetado um compostor e um digestor anaeróbio, tendo a sua construção ficado a cargo da empresa de metalomecânica *Neves & Neves*.

No anexo 2 é completada a descrição da unidade piloto de digestão de resíduos do LabEA (ETAR) da FEUP através da apresentação de diferentes vistas e fotografias dos diversos componentes da instalação. São ainda apresentadas as bombas peristálticas adquiridas com as respetivas dimensões.

#### 6.1.1 Dimensionamento

O dimensionamento de ambos os equipamentos foi executado em função da quantidade de relva cortada nas áreas ajardinadas da FEUP. De modo a apurar a quantidade de substrato disponível diariamente, perspetivando um funcionamento contínuo do reator, foram contactados os jardineiros responsáveis pela manutenção das áreas verdes da faculdade e realizou-se uma estimativa da quantidade de substrato correspondente à área de 1 m<sup>2</sup>.

Foi assim determinado que cada m<sup>2</sup> de área ajardinada representa 0,316 kg de relva. Foi igualmente determinada a massa volúmica da relva, de forma a determinar o volume correspondente à unidade de área, tendo-se obtido um valor de 701 kg/m<sup>3</sup>. Posteriormente, foi apurado que os jardineiros efetuam o corte da relva em todas as zonas ajardinadas mensalmente. Tendo em conta que a FEUP possui uma área verde total de 23010 m<sup>2</sup>, são cortados mensalmente 7271 kg de relva. Desta quantidade de substrato recolhida mensalmente foi apenas contabilizada metade para o dimensionamento individual de cada equipamento, uma vez que 50% seria para degradar por via aeróbia (compostagem) e os restantes 50% por via anaeróbia (digestão anaeróbia). Assim, ao fim de 30 dias obtém-se um caudal mássico de substrato de 121 kg/dia, o que corresponde em termos volumétricos 0,173 m<sup>3</sup>/dia. Por outro lado, foram também considerados para o dimensionamento deste equipamento a temperatura de operação e o

tempo de retenção hidráulico (TRH), sendo o primeiro parâmetro fixado na gama termofílica (entre 55°C e 60°C) e admitindo 15 dias de TRH.

### 6.1.2 Dimensões

Após dimensionamento, tendo em conta a quantidade de substrato disponível, bem como as características do local onde o reator iria ficar instalado, estabeleceu-se um volume final cilíndrico de 2,595 m<sup>3</sup>, com 2 m de altura e 1,285 m de diâmetro, construído em aço INOX. Este digestor anaeróbio possui igualmente um septo interior com 1,70 m de altura, seccionando desta forma o reator em dois compartimentos volumetricamente iguais. Possui também um reservatório de entrada com 0,48 m de diâmetro e 0,96 m de altura e um reservatório de saída com o mesmo diâmetro e 0,29 m de altura. O reservatório de entrada foi dimensionado em função do caudal volumétrico disponível e o reservatório de saída contabilizando 30% desse mesmo valor.

### 6.1.3 Alimentação, agitação e amostragem

Para alimentar o digestor foi definida uma tubagem com 15 cm de diâmetro, minimizando desta forma hipotéticos entupimentos e facilitando igualmente a sua manutenção. Esta tubagem faz a ligação entre o reservatório de alimentação e o reator. Do lado oposto, a tubagem comunicante entre o reator e o reservatório de saída possui o mesmo diâmetro. Ambas as tubagens foram construídas em aço INOX.

Dadas as características do substrato considerado para o dimensionamento, foram encomendadas à empresa *SECO Centrifugação, Lda.*, duas bombas para lamas/sólidos, tipo parafuso excêntrico. Estas bombas foram instaladas nas tubagens comunicantes entre os reservatórios de alimentação e saída com o reator, respetivamente. O principal objetivo da instalação deste tipo de equipamento consistiu na obtenção de uma agitação eficaz, uma vez que os antigos alunos responsáveis pelo dimensionamento do reator chegaram à conclusão que a recirculação de biogás não era uma alternativa viável, devido ao elevado caudal que seria necessário bombear em contínuo. Por outro lado, a agitação mecânica foi igualmente posta de lado (através de agitadores mecânicos internos), pois seria difícil a sua operação com o material sólido que se planeia ter no interior do digestor. Assim, no lado da entrada a recirculação será feita de cima para baixo, enquanto do lado da saída será de forma inversa. Por outro lado, estas bombas permitem ainda acionar a alimentação do reator e a recolha do digerido. Através da ação de válvulas, instaladas nas várias ligações comunicantes entre o reservatório de alimentação, bomba e o compartimento de alimentação do reator, será possível executar a sucção do substrato a alimentar, sendo interrompido o ciclo de recirculação e aberto o percurso de tubagem correspondente à alimentação. Do lado oposto do reator é aplicado o procedimento inverso.

Foram definidos vários postos de amostragem ao longo do diâmetro e da altura do digestor de maneira a cobrir as diferentes fases do processo de DA. Para tal, o digestor foi perfurado com diâmetros que se ajustassem aos sensores de pH, temperatura e amostrador de biomassa.



Para amostragem do conteúdo foi definida a utilização de um tubo em aço INOX com 3 cm de diâmetro e um comprimento entre 30 e 50 cm. Este amostrador de biomassa possui um pistão que, uma vez aberto, recolhe a amostra de biomassa pretendida e quando fechado permite o seu transporte para posterior análise em laboratório.

A exaustão para posterior queima do biogás produzido será executada através da tampa do reator, que possui um orifício de saída na sua superfície externa e um anteparo central na sua superfície interna, de modo a evitar a saída de sólidos juntamente com o biogás. Devido à sua massa e dimensões, a tampa do reator possui também uma argola que permite o seu manuseamento, conseguido apenas por um guindaste hidráulico adquirido para o efeito.

#### 6.1.4 Sugestões para arranque

Apesar de o reator já se encontrar construído e devidamente instalado numa das divisões do LabEA, este ainda não se encontra 100% concluído e funcional. É ainda necessário dimensionar o sistema de recolha de biogás, o sistema de aquecimento, o sistema de injeção de azoto no reservatório de entrada e o sistema de aquisição de dados.

A existência do septo a seccionar o reator em dois compartimentos, estabelece um funcionamento de dupla fase num único reator. Esta configuração irá permitir a separação das diferentes fases microbianas, com o compartimento de entrada a suportar as fases hidrolítica e acidogénica e as fases da acetogénese e metanogénese a ocorrer no compartimento de saída. Este modo de funcionamento garante uma maior eficácia na biodegradação do substrato, com produções de biogás mais elevadas e torna o processo menos suscetível ao fracasso (Nizami and Murphy 2010). A transição entre compartimentos será garantida pela alimentação do reator de modo a que a altura do conteúdo do compartimento de entrada supere a altura do septo e transite sobre o mesmo para o compartimento de saída. Torna-se assim imperativo estabelecer com rigor os TRH ótimos para cada compartimento isoladamente, bem como recalcular as taxas de alimentação de substrato e recolha do digerido.

Apesar do reator já possuir as furações necessárias para a incorporação dos sensores de pH, temperatura e amostrador de biomassa, seriam úteis pelo menos mais duas perfurações para possíveis ajustes de pH através da adição de reagentes (ácidos, bases ou nutrientes necessários) de acordo com as necessidades do conteúdo presente em cada compartimento. Estas perfurações poderiam ser executadas nas tubagens de recirculação que conectam ambos os compartimentos às respetivas bombas, satisfazendo assim qualquer necessidade do conteúdo aquando da recirculação.

O controlo da temperatura, um dos pontos mais importantes de todo o processo de DA, ainda não se encontra definido. De facto foram perspetivadas várias alternativas para o controlo deste parâmetro por parte dos alunos responsáveis pelo projeto do equipamento, e embora tenha ficado estabelecido que o reator iria operar a uma gama termofílica, não se apurou uma solução definitiva. Estas soluções passaram essencialmente pelo aquecimento por resistências elétricas, camisas/mantas de aquecimento com água quente e isolamento térmico (lã de rocha, lã de vidro e espuma elastomérica ou espuma de poliuretano). Porém, dada a finalidade educativa/investigativa do reator,

a sua operacionalidade deveria ser fixada na gama mesofílica (35°C a 45°C) de modo a permitir um funcionamento contínuo menos dispendioso. Deste modo, seria preferível a adoção de uma solução mista entre a utilização de uma manta de aquecimento que envolvesse a totalidade da superfície lateral do reator e um bom isolamento térmico nas restantes superfícies expostas do equipamento. Será igualmente importante não estabelecer a temperatura de operação pelo limite mínimo da gama mesofílica. Uma vez que o aquecimento será exclusivamente garantido ao compartimento seccionado do reator, ficando os restantes componentes/constituintes periféricos apenas termicamente isolados, convém estabelecer uma temperatura de operação superior a 35°C no compartimento do reator para evitar que as inevitáveis perdas de calor nos componentes periféricos coloquem os seus níveis de temperatura inferiores a esse valor.

Previamente ao enchimento do reator com qualquer tipo de substrato, o ar aí existente deveria ser purgado com uma mistura gasosa de N<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> (80/20% v/v) (esta mistura gasosa resulta em pH neutro) (Angelidaki et al. 2006). A tampa do reservatório de alimentação possui um pequeno orifício central que irá permitir a injeção dessa mistura gasosa previamente ao arranque operativo e aquando qualquer alimentação realizada, garantindo assim percentagens apenas residuais de O<sub>2</sub> nas sucessivas alimentações do reator.

O sistema de aquisição de dados deverá possuir um *software* que contemple um registo contínuo e cumulativo do biogás produzido e das percentagens do conteúdo dos seus constituintes, temperatura e pH. Relativamente ao sistema de aquecimento, este deverá apenas ser ativado quando a temperatura no interior dos compartimentos do reator diminuir para valores inferiores à temperatura de operação estabelecida. Deste modo, torna-se o processo mais económico e energeticamente mais eficiente. Por outro lado, será necessária a aquisição de uma tubagem que faça o escape do biogás produzido para o exterior do LabEA e que permita a incorporação de um sensor para determinação da percentagem de CH<sub>4</sub> no biogás e um contador de biogás, que permita a medição do volume/caudal de biogás produzido. Esta tubagem de escape deverá também possuir na sua extremidade de saída para o exterior um sistema de queima do biogás, que permita a combustão da mistura CH<sub>4</sub>/CO<sub>2</sub> com uma chama. Consequentemente, será apenas libertado o CO<sub>2</sub> inicial e os gases da combustão do metano, evitando assim a libertação de CH<sub>4</sub> para a atmosfera que possui um potencial de efeito de estufa bastante superior ao CO<sub>2</sub>. Será igualmente útil a introdução de um *trap* no interior da tubagem de escape, que consistirá, basicamente, numa rede metálica utilizada para impedir que a chama se propague para dentro do reator. Este último componente periférico ao reator recomendado obrigará a obras nas instalações do LabEA para abertura e construção de uma chaminé que permita o arranque em definitivo do reator anaeróbio.

Quanto ao substrato a biodegradar, será igualmente importante definir um modo de armazenamento que permita uma alimentação semi-contínua do reator, tendo em consideração a frequência de corte da relva nas áreas ajardinadas da FEUP. A secagem e moagem aplicadas neste estudo tornam-se inviáveis quando se consideram 121 kg de relva diários. É assim recomendada a rejeição de grande parte deste caudal mássico de substrato, uma vez que no dimensionamento do digestor foi apenas contemplado o volume de substrato, ficando os volumes da fração líquida (inóculo e água) necessária ao processo excluídos do projeto de dimensionamento. Seria duplamente útil e interessante a construção de um compartimento anexo ao LabEA para a prática da silagem da relva produzida na

FEUP. A silagem é uma das técnicas mais utilizadas globalmente no armazenamento de vários tipos de materiais lignocelulósicos, tanto para fins agro-pecuários como energéticos. Esta prática permitiria o armazenamento de maiores quantidades de substrato para posterior alimentação do digestor anaeróbio bem como do compostor igualmente presente no LabEA.

No entanto, enquanto esta instalação piloto permanecer inativa na FEUP, poderão ser realizadas várias dissertações à escala laboratorial no âmbito da digestão anaeróbia com o objetivo intrínseco da determinação das melhores condições operatórias desta instalação piloto.

## 6.2 Novos estudos

Os trabalhos/estudos futuros à escala laboratorial deverão sempre ter em vista a operacionalidade do reator piloto do LabEA com relva como substrato. Deste modo, seria essencial testar a diferença entre sistemas de via húmida e via seca, ou seja, testar diferentes concentrações de sólidos dentro de cada uma destas tipologias operativas. Um parâmetro negligenciado no arranque deste estudo, mas extremamente importante para a ótima operacionalidade de um processo de DA é a RSI. Cada substrato possui a sua RSI adequada devido à quantidade de AGV e à capacidade para tamponizar a formação destes compostos durante o processo anaeróbio (Lu et al. 2013). Este parâmetro varia em função do tipo de inóculo a utilizar, do teor de sólidos e da gama de temperatura operacional, pelo que é sugerida a adequação conjugada destas variáveis. O estudo da utilização de diferentes tipos de inóculo seria igualmente interessante. Segundo (Neves, Oliveira, and Alves 2004), a utilização de lamas granulares como inóculo a degradar resíduos alimentares previne de forma mais eficiente a acidificação do meio. Por outro lado, um bom *design* de um digestor usando relva como substrato é alcançado através da “imitação” de um aparelho digestivo de um ruminante, uma vez que os fluidos gástricos deste género animal possui um enorme potencial hidrolítico. Por exemplo, são alcançáveis níveis de degradação de celulose superiores a 80% em algumas instalações de produção de biogás, com TRH entre 30 a 80 dias, enquanto os ruminantes conseguem uma degradação de 40 a 60% em apenas dois dias. Fluidos gástricos/saliva de ruminantes proporcionam uma maior produção de AGV o que estimula a biodegradação, o que torna a sua utilização como fonte de inóculo bastante promissora em reatores contínuos bi-fásicos usando este inóculo na primeira fase deste tipo de reatores e esterco bovino como inóculo na segunda fase (metanogénese) (Nizami, Korres, and Murphy 2009). Embora os vários tipos de inóculos utilizados neste tipo de processos garanta a maioria das necessidades nutricionais microbiológicas, a adição de nutrientes/micronutrientes/vitaminas ajudará a garantir uma performance ótima do processo (Angelidaki et al. 2006). Outra boa alternativa seria a utilização da instalação usada na experiência 2 deste estudo a funcionar em série, uma vez que, segundo o fabricante, é permitido esse modo de operação. Deste modo seria possível testar a divisão das diferentes fases microbiológicas, conforme o pretendido para o reator piloto do LabEA. Poderá igualmente voltar a ser testada a adição de co-substrato, tais como diferentes concentrações de glicerol aquelas utilizadas neste estudo, bem como outro tipo de materiais. A aplicação de diferentes métodos de pré-tratamento será igualmente preciosa na obtenção de melhores produções cumulativas de metano para este tipo de substrato.

### 6.3 Dificuldades e sugestões técnicas

Ao longo deste estudo foram encontradas algumas dificuldades técnicas que exigiram alguma perseverança para as ultrapassar. Na etapa inicial de caracterização dos substratos, a estrutura lignocelulósica da relva dificultou a determinação de alguns parâmetros como a CQO e AKT, obrigando a uma alargada repetibilidade destes ensaios até obtenção de valores coerentes com a literatura. Esta sucessão de repetições analíticas acarretou um consumo excessivo de reagentes e atrasou a planificação temporal inicialmente definida. Deste modo, seria futuramente recomendada a determinação da razão C/N através de análise elementar, que permite obter diretamente a percentagem de cada um dos seguintes elementos: carbono (C), azoto (N), hidrogénio (H) e enxofre (S) através da combustão dinâmica da amostra. Não menos importante, a avaliação do conteúdo dos reatores em AGV permitirá igualmente uma melhor perceção das fases microbiológicas do processo.

Por outro lado, é recomendado o retorno periódico (uma vez por ano) dos equipamentos utilizados neste estudo para a determinação do metano produzido para posterior calibração por parte do fabricante. Aquando do arranque da experiência 2, ficou claro que a estufa utilizada nesta etapa, onde ficaram alojados os medidores de biogás, não permite um controlo eficaz da temperatura de operação definida, pelo que é imperativa a sua reparação e/ou substituição de modo a não comprometer estudos futuros.

## 7 Referências

- Abu-Dahrieh, Jehad, Angela Orozco, Elaine Groom, and David Rooney. 2011. "Batch and continuous biogas production from grass silage liquor." *Bioresource Technology* 102 (23):10922-10928.
- Abu-Reesh, Ibrahim M. 2013. "Kinetics of anaerobic digestion of labaneh whey in a batch reactor." *African Journal of Biotechnology* 13 (16).
- Alves, M. M., J. A. Mota Vieira, R. M. Pereira, and M. Mota. 2001. "Effect of lipids and oleic acid on biomass development in anaerobic fixed bed reactors. Part I: Biofilm growth and activity." *Water Resource* 35 (1).
- Angelidaki, I., M. Alves, D. Bolzonella, L. Borzacconi, J.L. Campos, A.J. Guwy, S. Kalyuzhnyi, P. Jenicek, and J. B. van Lier. 2009. "Defining the biomethane potential (BMP) of solid organic wastes and energy crops: a proposed protocol for batch assays." *Water Science & Technology* 59.5:927-934.
- Angelidaki, I., M. Alves, L. Campos, D. Bolzonella, L. Borzacconi, A.J. Guwy, S. Kalyuzhnyi, P. Jenicek, and J.B. van Lier. 2006. Anaerobic Biodegradation, Activity and Inhibition (ABAI). In *Task Group Meeting 9th to 10th October 2006, in Prague*. Bygningstorvet, Building 115  
DK-2800 Kgs. Lyngby: Institute of Environment & Resources  
Technical University of Denmark.
- Angelidaki, Irini, and Wendy Sanders. 2004. "Assessment of the anaerobic biodegradability of macropollutants." *Reviews in Environmental Science and Biotechnology* 3:117-129.
- APHA. 1998. *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*. 20th ed. Washington, D.C., EUA.
- Ariunbaatar, Javkhlan, Antonio Panico, Giovanni Esposito, Francesco Pirozzi, and Piet N. L. Lens. 2014. "Pretreatment methods to enhance anaerobic digestion of organic solid waste." *Applied Energy* 123:143-156. doi: 10.1016/j.apenergy.2014.02.035.
- Astals, S., V. Nolla-Ardévol, and J. Mata-Alvarez. 2012. "Anaerobic co-digestion of pig manure and crude glycerol at mesophilic conditions: Biogas and digestate." *Bioresource Technology* 110:63-70.
- Ayoub, Muhammad, and Ahmad Zuhairi Abdullah. 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.
- Baba, Yasunori, Chika Tada, Ryoya Watanabe, Yasuhiro Fukuda, Nobuyoshi Chida, and Yutaka Nakai. 2013. "Anaerobic digestion of crude glycerol from biodiesel manufacturing using a large-scale pilot plant: Methane production and application of digested sludge as fertilizer." *Bioresource Technology* 140 (0):342-348.
- Bakhov, Zh. K., K. U. Korazbekova, and K. M. Lakhanova. 2014. "The Kinetics of Methane Production from Co-digestion of Cattle Manure." *Pakistan Journal of Biological Sciences* 17 (8):1023-1029.
- Barr, S. P., M. J. Roberts, and M. Milke. 2010. *Creating Biogas from Urban Grass Clippings*. Dept. of Civil and Natural Resources Engineering  
University of Canterbury.
- Batstone, D. J., J. Keller, I. Angelidaki, S.V. Kalyuzhnyi, S. G. Pavlostasthis, A. Rozzi, W. T. M. Sanders, H. Siegrist, and V. A. Vavilin. 2002. Anaerobic Digestion Model No. 1 (ADM1). In *IWA Scientific and Technical Report No. 13*, edited by IWA Publishing. London.
- Behera, Shishir Kumar, Jun Mo Park, Kyeong Ho Kim, and Hung-Suck Park. 2010. "Methane production from food waste leachate in laboratory-scale simulated landfill." *Waste management* 30 (8):1502-1508.
- Bhatnagar, A., and M. Sain. 2005. "Processing of Cellulose Nanofiber-reinforced Composites." *Processing of Cellulose Nanofiber-reinforced Composites* 24 (12):1259-1268.
- Bouallagui, H., Y. Touhami, R. B. Cheikh, and M. Hamdi. 2005. "Bioreactor performance in anaerobic digestion of fruit and vegetable wastes." *Process Biochemistry* 40:989-995.
- BP. 2015a. "BP Energy Outlook 2035."

- BP. 2015b. BP Statistical Review of World Energy - June 2015. BP.
- Braun, Rudolf, Peter Weiland, and Arthur Wellinger. 2010. Biogas from Energy Crop Digestion. In *Task 37 - Energy from Biogas and Landfill Gas*, edited by IEA Bioenergy. Austria: Institute for Agrobiotechnology.
- Brown, Dan, Jian Shi, and Yebo Li. 2012. "Comparison of solid-state to liquid anaerobic digestion of lignocellulosic feedstocks for biogas production." *Bioresource Technology* 124 (0):379-386.
- Budiyono, I Nyoman Widiasta, Seno Johari, and Sunarso. 2010. "The Kinetic of Biogas Production Rate from Cattle Manure in Batch Mode." *International Journal of Chemical and Biological Engineering* 3 (1):39-44.
- Castrillón, L., Y. Fernández-Nava, P. Ormaechea, and E. Marañón. 2011. "Optimization of biogas production from cattle manure by pre-treatment with ultrasound and co-digestion with crude glycerin." *Biosource Technology* 102 (7845-7849).
- Change, Department of Energy and Climate, Food and Rural Affairs Department for Environment, Anaerobic Digestion and Biogas Association, Cabinet Office, Chartered Institution of Wastes Management, Country Land and Business Association, Innovation and Skills Department for Business, Department for Communities and Local Government, Department for Transport, Environmental Services Association, National Grid, Renewable Energy Association, Her Majesty's Treasury, and Water UK. 2011. Anaerobic Digestion Strategy Action Plan. edited by Food and Rural Affairs Department for Environment. UK: Crown.
- Chernicharo, Carlos Augusto de Lemos. 2007. *Biological Wastewater Treatment in Warm Climate Regions*. 6 vols. Vol. Anaerobic Reactors, *Biological Wastewater Treatment*. Alliance House, 12 Caxton Street, London: IWA Publishing. Textbook.
- Comission, European. 2015. "Sustainable Development." Last Modified 08/06/2015 Accessed 07/09/2015. <http://ec.europa.eu/environment/eussd/>.
- Demirbas, A., and T. Ozturk. 2004. "Anaerobic digestion of agricultural solid residues." *Int. J. Green Energy* 1 (4):483-494.
- Development, International Institute of Sustainable. 2015. "What is Sustainable Development? Environmental, economic and social well-being for today and tomorrow." Last Modified 2013 Accessed 07/09/2015. <https://www.iisd.org/sd/#one>.
- Foresti, E. 1994. "Fundamentos do Processo de digestão anaeróbia." Anais III Taller y Seminario Latinoamericano: Tratamiento Anaerobio de Aguas Residuales Montevideo, Uruguay.
- Fountoulakis, M.S., I. Petousi, and T. Manios. 2010. "Co-digestion of sewage sludge with glycerol to boost biogas production." *Waste Management* 30:1849-1853.
- Gadhamshetty, Venkataramana, Yalini Arudchelvam, Nagamany Nirmalakhandan, and David C Johnson. 2010. "Modeling dark fermentation for biohydrogen production: ADM1-based model vs. Gompertz model." *international journal of hydrogen energy* 35 (2):479-490.
- Gatta, G., A. Gagliardi, P. Soldo, and M. Monteleone. 2013. "Grasses and legumes in mixture: An energy intercropping system intended for anaerobic digestion." *Italian Journal of Agronomy* 8 (1):47-57. doi: 10.4081/ija.2013.e7.
- Ghatak, Manjula Das, and P. Mahanta. 2014. "Comparison of Kinetic Models for Biogas Production Rate from Saw Dust." *International Journal of Research in Engineering and Technology* 3 (7):248-254.
- Goulding, D., and N. Power. 2013. "Which is the preferable biogas utilisation technology for anaerobic digestion of agricultural crops in Ireland: Biogas to CHP or biomethane as a transport fuel?" *Renewable Energy* 53 (0):121-131.
- Gray, N. F. 2004. *Biology of Wastewater Treatment*. Edited by Professor J.N.B. Bell and Imperial College Center for Environmental Technology. 2nd ed. 4 vols. Vol. 4, *Environmental Science and Management*. London: Imperial College Press.
- Group, The World Bank. 2015. "Sustainable Development Home." Accessed 07/09/2015. <http://www.worldbank.org/en/topic/sustainabledevelopment/overview#1>.

- Haandel, A. C. van, and G. Lettinga. 1994. *Anaerobic Sewage Treatment: A Practical Guide for Regions with a Hot Climate*: John Wiley and Sons.
- Holm-Nielsen, Jens Bo, Carina Juel Lomborg, Piotr Oleskowicz-Popiel, and Kim H. Esbensen. 2008. "On-line near infrared monitoring of glycerol-boosted anaerobic digestion processes: Evaluation of process analytical technologies." *Biotechnology and Bioengineering* 99 (2):302-313. doi: 10.1002/bit.21571.
- Ismail, Zainab Ziad, and Ali Raad Talib. 2014. "Assessment of anaerobic co-digestion of agro wastes for biogas recovery: A bench scale application to date palm wastes." *International Journal of Energy and Environment* 5 (5):591-600.
- Jagadish, H. Patil, Antony Raj Malourdu, P. L. Muralidhara, S. M. Desai, and G. K. Mahadeva Raju. 2012. "Kinetics of Anaerobic Digestion of Water Hyacinth Using Poultry Litter as Inoculum." *International Journal of Environmental Science and Development* 3 (2).
- Jerger, Douglas E., Dan A. Dolenc, and David P. Chynoweth. 1982. "BIOCONVERSION OF WOODY BIOMASS AS A RENEWABLE SOURCE OF ENERGY." 4th Symposium on Biotechnology in Energy Production and Conservation, Gatlinburg, TN, USA.
- Kacprzak, Anna, Liliana Krzystek, Katarzyna Pazdzior, and Stanislaw Ledakowicz. 2011. "Investigation of kinetics of anaerobic digestion of Canary grass." *Chemical Papers*.
- Kirkwood, Thomas B. L. 2015. "Deciphering death: a commentary on Gompertz (1825) 'On the nature of the function expressive of the law of human mortality, and on a new mode of determining the value of life contingencies'." *Philosophical Transactions B*.
- Koch, Konrad, Manfred Lübken, Tito Gehring, Marc Wichern, and Harald Horn. 2010. "Biogas from grass silage—measurements and modeling with ADM1." *Bioresource Technology* 101 (21):8158-8165.
- Lay, J.J., Y.Y. Li, and T. Noike. 1997. "Influences of pH and moisture content on the methane production in high-solids sludge digestion." *Water Research* 31:1518-1524.
- Lay, J.J., Y.Y. Li, and T. Noike. 1998. "Mathematical model for methane production from landfill bioreactor." *Journal of Environmental Engineering* 124:730-736.
- Lehtomaki, A., and L. Bjornsson. 2006. "Two-stage anaerobic digestion of energy crops: Methane production, nitrogen mineralization and heavy metal mobilisation." *Environmental Technology* 27 (2):209-218.
- Lehtomaki, A., S. Huttunen, T. M. Lehtinen, and J. A. Rintala. 2008. "Anaerobic digestion of grass silage in batch leachbed processes for methane production." *Biosource Technology* 99 (8):3267-3278.
- Lettinga, G., L.W. Hulshoff Pol, and G. Zeeman. 1996. *Biological Wastewater Treatment*. Vol. Part I: Anaerobic Wastewater Treatment. Wageningen Agricultural University.
- Li, D., Y. Sun, Y. Guo, Z. Yuan, L. Ma, and X. Kong. 2010. "Methane production for three total solids anaerobic digestion of water sorted organic fraction of municipal solid waste." *Taiyangneng Xuebao/Acta Energiæ Solaris Sinica* 31:1391-1396.
- Li, L., X. Kong, F. Yang, D. Li, Z. Yuan, and Y. Sun. 2012. "Biogas production potential and kinetics of microwave and conventional thermal pretreatment of grass." *Biochemical Biotechnology* 166 (5):1183-1191.
- Lu, Feng, Li Yeqing, Chen Chang, Liu Xiaoying, Xiao Xiao, Ma Xinxin, Zhang Ruihong, He Yanfeng, and Liu Guangqing. 2013. "Biochemical Methane Potencial (BMP) of Vinegar Residue and the Influence of Feed Inoculum Ratios on Biogas Prodction." *BioResources* 8 (2):2487-2498.
- Mata-Alvarez, J., J. Dosta, M. S. Romero-Güiza, X. Fonoll, M. Peces, and S. Astals. 2014. "A critical review on anaerobic co-digestion achievements between 2010 and 2013." *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 36 (0):412-427.
- McCarty, P. L. 1964. *Anaerobic Waste Treatment Fundamentals*. Edited by Public Works.
- McEniry, Joseph, and Pdraig O'Kiely. 2013. "Anaerobic methane production from five common grassland species at sequential stages of maturity." *Bioresource Technology* 127 (0):143-150.

- McInerney, M.J., and M.P. Bryant. 1980. *Anaerobic Digestion*. Edited by D.A. Stafford, B.I. Wheatley and D.E. Huges, *Metabolic Stages and Energetics of Microbial Anaerobic Digestion*. London: Applied Science Ltd.
- McMahon, Katherine D., Peter G. Stroot, Roderick I. Mackie, and Lutgarde Raskin. 2001. "Anaerobic codigestion of municipal solid waste and biosolids under various mixing conditions—II: microbial population dynamics." *Water Research* 35 (7):1817-1827.
- Ministério do Ambiente, Ordenamento do Território e Energia (MAOTE), Agência Portuguesa do Ambiente (APA), Instituto Superior Técnico (IST), and Emprega Geral do Fomento (EGF). 2014. Plano Estratégico para os Resíduos Urbanos (PERSU 2020). In 179, edited by ORDENAMENTO DO TERRITÓRIO E ENERGIA MINISTÉRIO DO AMBIENTE. Portugal: Diário da República.
- Nair, S., Y. Kuang, and P. Pullammanappallil. 2005. "Enhanced degradation of waste grass clippings in one and two stage anaerobic systems." *Environmental Technology* 26 (9):1003-1011.
- Navickas, K., K. Venslauskas, V. Zuperka, A. Nekrosius, and T. Kulikauskas. 2012. "Influence of different biomass treatment technologies on efficiency of biogas production." *Engineering for Rural Development*.
- Neves, L., E. Gonçalo, R. Oliveira, and M. M. Alves. 2008. "Influence of composition on the biomethanation potential of restaurant waste at mesophilic temperatures." *Waste Management* 28:965-972.
- Neves, L., R. Oliveira, and M. M. Alves. 2004. "Influence of inoculum activity on the bio-methanization of a kitchen waste under different waste/inoculum ratios." *Process Biochemistry* 39 (12):2019-2024.
- Nigam, Poonam Singh, and Anoop Singh. 2011. "Production of liquid biofuels from renewable resources." *Progress in Energy and Combustion Science* 37 (1):52-68.
- Nizami, A. S., N. E. Korres, and J. D. Murphy. 2009. "Review of the integrated process for the production of grass biomethane." *Environmental Science and Technology* 43 (22):8496-8508.
- Nizami, Abdul-Sattar, and Jerry D. Murphy. 2010. "What type of digester configurations should be employed to produce biomethane from grass silage?" *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 14 (6):1558-1568. doi: 10.1016/j.rser.2010.02.006.
- Nopharatana, A., P. C. Pullammanappallil, and W. P. Clarke. 2007. "Kinetics and dynamic modelling of batch anaerobic digestion of municipal solid waste in a stirred reactor." *Waste Manag* 27 (5):595-603. doi: 10.1016/j.wasman.2006.04.010.
- Prochnow, A., M. Heiermann, M. Plöchl, B. Linke, C. Idler, T. Amon, and P. J. Hobbs. 2009. "Bioenergy from permanent grassland – A review: 1. Biogas." *Bioresource Technology* 100 (21):4931-4944.
- Qi, B. C., C. Aldrich, L. Lorenzen, and G. W. Wolfaardt. 2005. "Acidogenic fermentation of lignocellulosic substrate with activated sludge." *Chem. Eng. Commun.* 192 ((7-9)):1221-1242.
- Schievano, Andrea, Barbara Scaglia, Giuliana D'Imporzano, Luca Malagutti, Annalisa Gozzi, and Fabrizio Adani. 2009. "Prediction of biogas potentials using quick laboratory analyses: Upgrading previous models for application to heterogeneous organic matrices." *Bioresource Technology* 100 (23):5777-5782.
- Schmidt, J.E., and B.K. Ahring. 1996. "Granular sludge formation in upflow anaerobic sludge blanket (UASB) reactors." *Biotech. Bioeng.* 4:229-246.
- Shin, J. D., S.S. Han, K.C. Eom, S. Sung, S.W. Park, and H. Kim. 2008. "Predicting methane production potential of anaerobic co-digestion of swine manure and food waste." *Environmental Engineering Research* 13:37-93.
- Smyth, B. M., H. Smyth, and J. D. Murphy. 2010. "Can grass biomethane be an economically viable biofuel for the farmer and the consumer?" *Biofuels, Bioproducts and Biorefining* 4 (5):519-537. doi: 10.1002/bbb.238.
- Soubes, M. 1994. "Microbiología de la digestión anaerobia." Anais III Taller y Seminario Latinoamericano: Tratamiento Anaerobio de Aguas Residuales, Montevideo, Uruguay.
- Speece, R. E. 1986. "Anaerobic Treatment, a Grown-up Technology." Proc. EWPCA Conf., Amsterdam, September 1986.
- Tsapekos, P., P. G. Kougiyas, and I. Angelidaki. 2015. "Biogas production from ensiled meadow grass; effect of mechanical pretreatments and rapid determination of substrate biodegradability via physicochemical methods." *Bioresour Technol* 182:329-35. doi: 10.1016/j.biortech.2015.02.025.



- Vandevivere, P., L. De Baere, and W. Verstraete. 2003. "Types of anaerobic digester for solid wastes." In *Biomethanization of the organic fraction of municipal solid wastes*, edited by J. Mata-Alvarez, 40-112. London: IWA Press.
- Vavilin, V. A., B. Fernandez, J. Palatsi, and X. Flotats. 2008. "Hydrolysis kinetics in anaerobic degradation of particulate organic material: An overview." *Waste Management* 28 (6):939-951.
- Winsor, Charles P. 1932. "The Gompertz Curve as a Growth Curve." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 18.
- Wu, Donglei, Zhizhong Yang, and Guangming Tian. 2011. "Inhibitory effects of Cu (II) on fermentative methane production using bamboo wastewater as substrate." *Journal of hazardous materials* 195:170-174. doi: 10.1016/j.jhazmat.2011.08.021.
- Xu, Jiele, Ziyu Wang, and Jay J. Cheng. 2011. "Bermuda grass as feedstock for biofuel production: A review." *Bioresource Technology* 102 (17):7613-7620.
- Yang, Liangcheng, Fuqing Xu, Xumeng Ge, and Yebo Li. 2015. "Challenges and strategies for solid-state anaerobic digestion of lignocellulosic biomass." *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 44 (0):824-834.
- Zhen, Guangyin, Xueqin Lu, Takuro Kobayashi, Yu-You Li, Kaiqin Xu, and Youcai Zhao. 2015. "Mesophilic anaerobic co-digestion of waste activated sludge and *Egeria densa*: Performance assessment and kinetic analysis." *Applied Energy* 148:78-86.
- Zheng, Yi, Jia Zhao, Fuqing Xu, and Yebo Li. 2014. "Pretreatment of lignocellulosic biomass for enhanced biogas production." *Progress in Energy and Combustion Science* 42:35-53.
- Zinder, S. H. 1993. "Physiological ecology of methanogens." In *Methanogenesis, Ecology, Physiology, Biochemistry and Genetics*, edited by J. G. Ferry. New York: Chapman and Hall.
- Zwietering, M. H., I. Jongenburger, F. M. Rowbouts, and K. van'T Riet. 1990. "Modeling of the Bacterial Growth Curve." *Applied and Environmental Microbiology* 56:1875-1881.



## Anexo 1 Possíveis configurações de reatores anaeróbios

No desenvolvimento deste trabalho foi essencial estudar as diferentes combinações técnicas de digestores anaeróbios, os quais foram descritos ao longo do capítulo 2.9. Apresentam-se abaixo algumas representações esquemáticas de possíveis configurações de reatores anaeróbios que permitem uma melhor compreensão do seu funcionamento e *layout*.

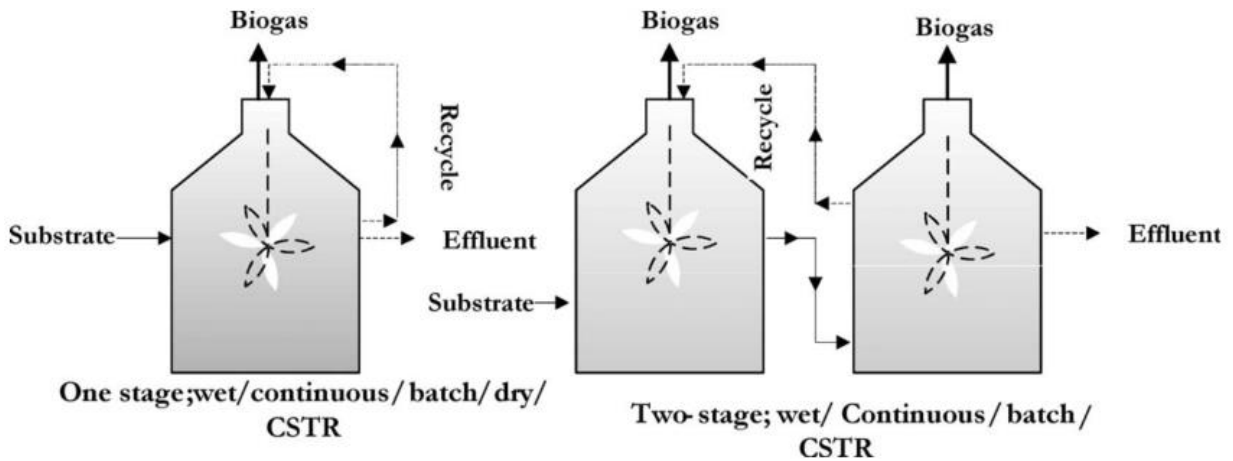


Figura 7.1 – Variações de design em reatores de estágio único e duplo.

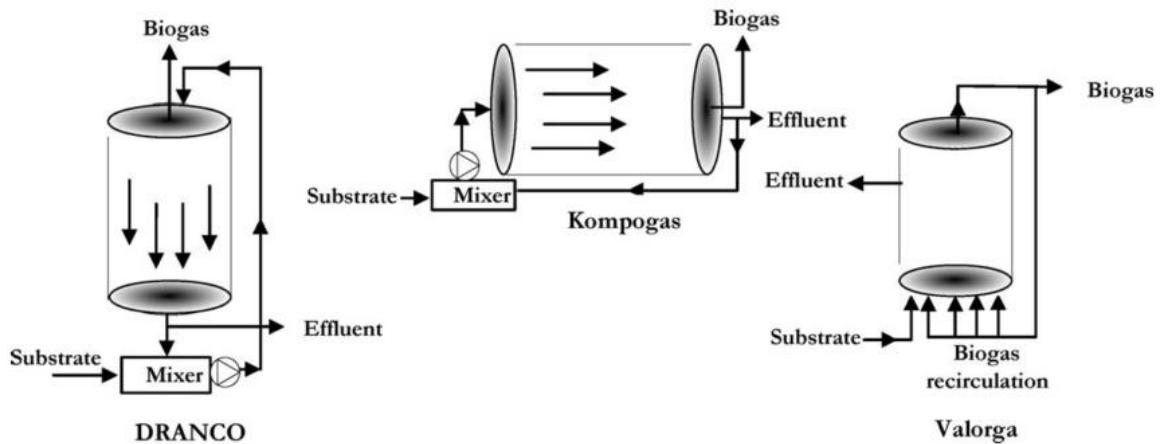


Figura 7.2 – Vários tipos de digestores de estágio único por via seca.

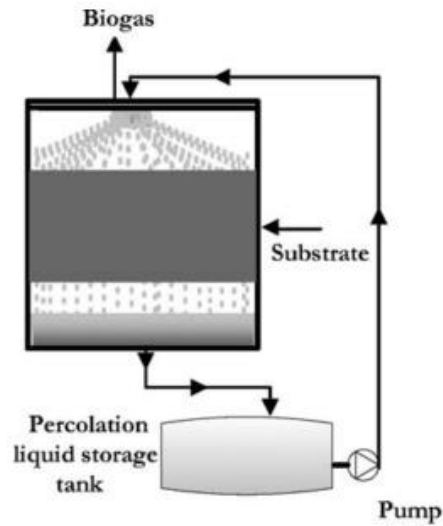


Figura 7.3 – Digestor anaeróbio batch, de estágio único por via seca.

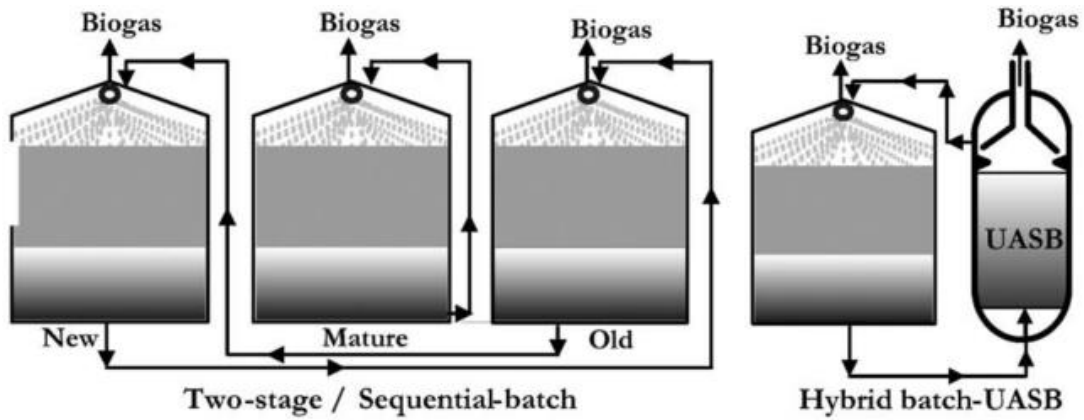


Figura 7.4 - Digestores anaeróbios batch, de estágio duplo por via seca.

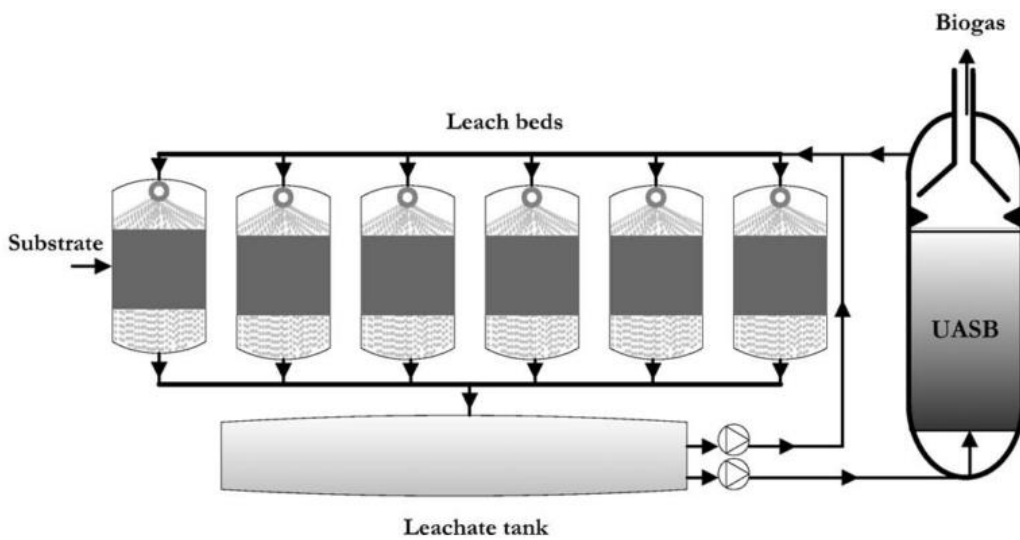
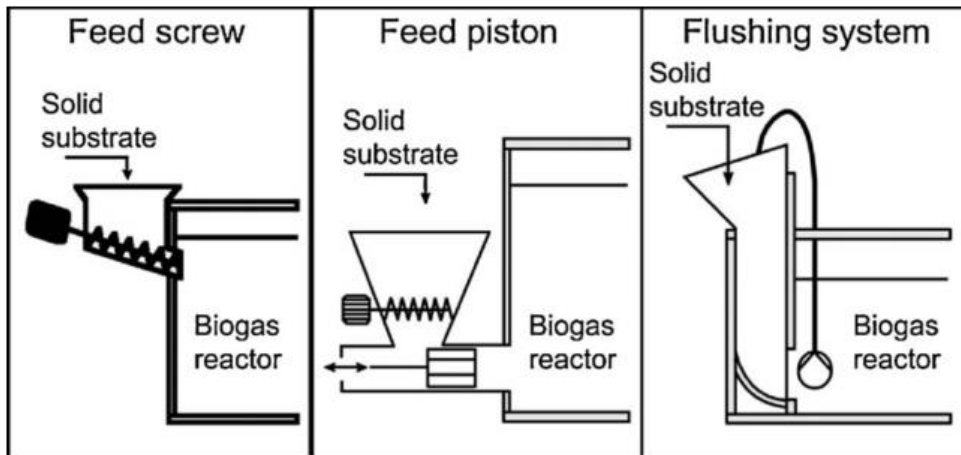


Figura 7.5 - Digestores sequenciais com leach bed acoplada com UASB.

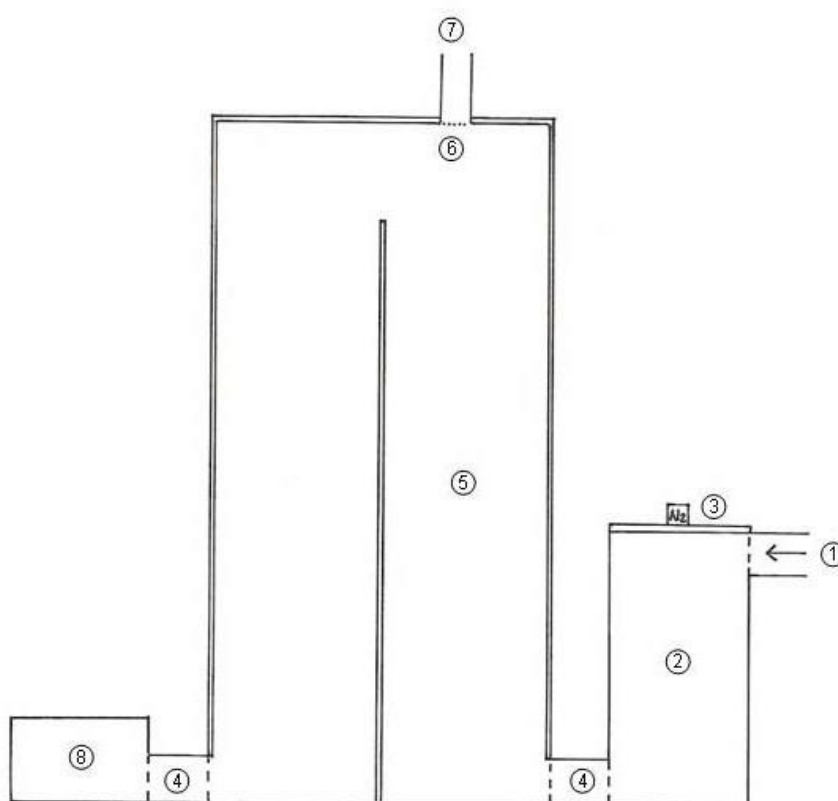


*Figura 7.6 – Sistemas de pré-processamento para substratos com alto teor de sólidos.*

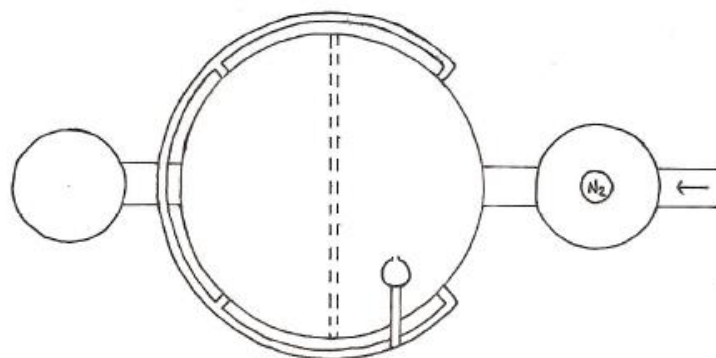


## Anexo 2 Unidade piloto de digestão anaeróbia de resíduos do LabEA (ETAR) da FEUP

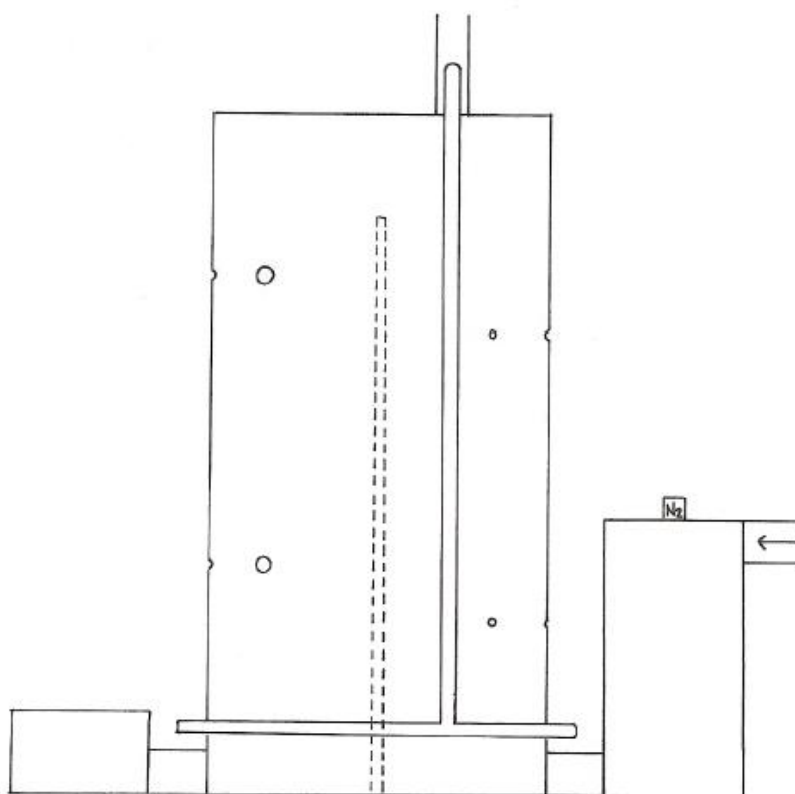
Em concordância com o principal objetivo deste trabalho foi crucial a descrição da unidade piloto de digestão de resíduos do LabEA (ETAR) da FEUP desenvolvida ao longo do capítulo 6. São apresentadas abaixo diferentes vistas e fotografias dos diversos componentes da instalação. São ainda apresentadas as bombas peristálticas adquiridas com as respetivas dimensões.



**Figura 7.7** – Corte transversal do digester. 1-Tubo de entrada. 2-Reservatório de entrada. 3-Válvula de entrada de azoto/êmbolo de entrada. 4-Tubos de ligação entre os reservatórios e o digester. 5-Digester. 6-Válvula de saída de biogás. 7-Tubo de saída de biogás para queima e recirculação. 8-Reservatório de saída.

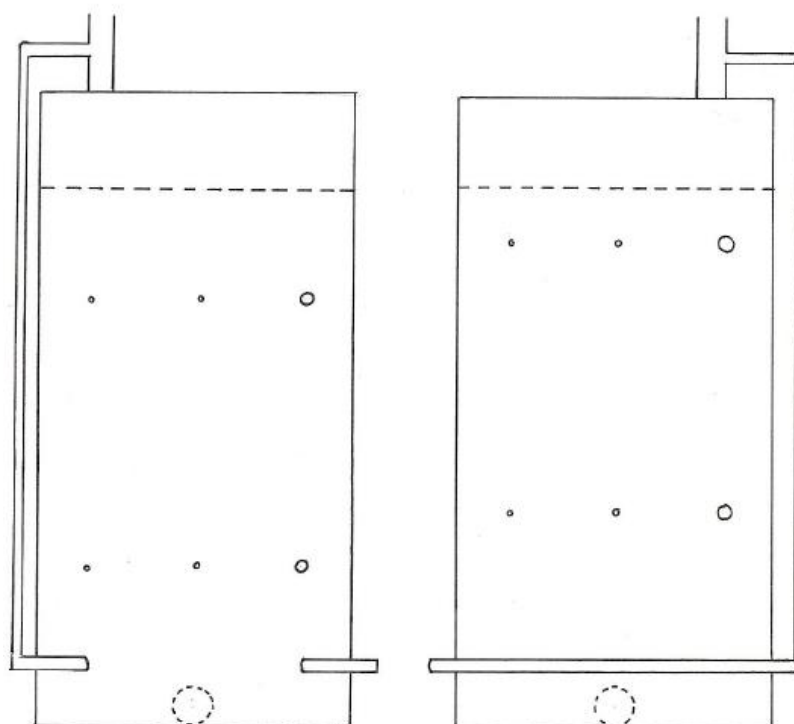


**Figura 7.8** - Vista superior do digestor. Pode-se observar o tubo de saída do biogás com uma pequena abertura para amostragem do gás, e ligação para os tubos de recirculação do gás à volta do digestor.



**Figura 7.9** – Vista lateral do digestor, perpendicular ao septo. Desta forma observam-se os tubos de recirculação do gás e os furos de amostragem na parede do digestor.





**Figura 7.10** - Vistas laterais do digester paralelamente ao septo. A imagem da esquerda corresponde à vista do lado de entrada, e a da direita à do lado de saída. As aberturas na parede do digester correspondem aos postos de amostragem e medição de parâmetros, sendo que as aberturas mais largas são os postos de amostragem de biomassa.



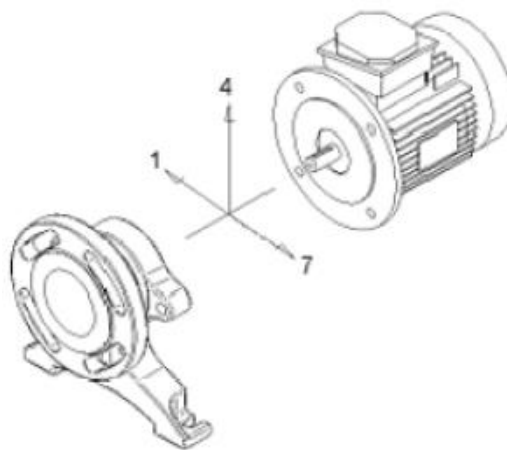
**Figura 7.11** - Vista geral do reactor.



**Figura 7.12** – Reservatório de entrada (A) e reservatório de saída (B).



**Figura 7.13** – Septo (A) e Tampa (B).



**Figura 7.14** - Bomba peristáltica adquirida.

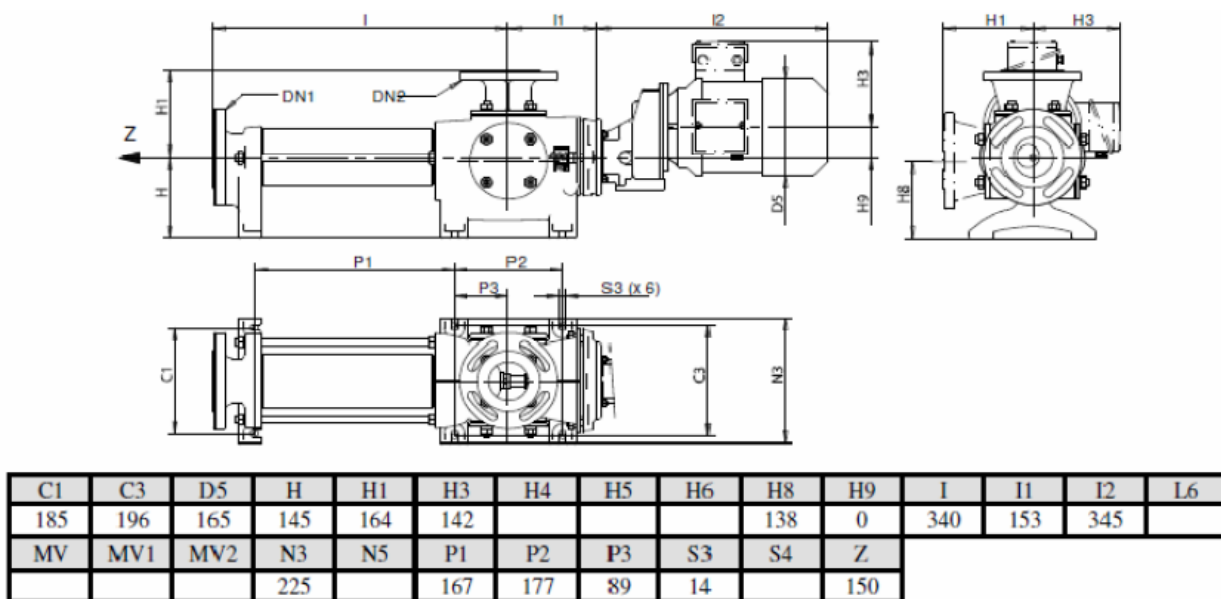


Figura 7.15 - Dimensões da bomba peristáltica.