

Universidade Nova de Lisboa
Faculdade de Ciências e Tecnologia
Grupo de Disciplinas Ecologia da Hidrosfera

Digestão Anaeróbia de Biomassa utilizando como substrato
Cynara cardunculus L.

Por
Ivo Miguel Delgado Bandeira Oliveira

Dissertação apresentada na Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova
Lisboa para a obtenção de grau de Mestre em Bioenergia

Orientadores: Benilde Mendes/Elizabeth Almeida Duarte/Jorge Gominho

Lisboa

2009

À Alicia por todo o apoio, carinho e paciência especialmente nos momentos mais difíceis.

Agradecimentos

A realização deste trabalho só foi possível mediante a colaboração e apoio de diversas pessoas pertencentes a Faculdade de Ciências e Tecnologia (FCT-UNL), Instituto Superior de Agronomia (ISA) e Laboratório Nacional de Energia e Geologia (LNEG).

Devo agradecer acima de tudo aos professores co-orientadores Elisabeth Duarte e Jorge Gominho por me terem recebido como mestrando no ISA. Agradeço a Professora Benilde Mendes pelo apoio demonstrado na fase final do trabalho escrito e ao Departamento de disciplinas da Ecologia da Hidrosfera por ter disponibilizado o kit de amostragem de gás.

Durante a realização do trabalho devo agradecer a todas as pessoas que trabalham nos laboratórios de Química e de Engenharia Florestal do ISA especialmente aqueles que durante a primeira fase do trabalho me ajudaram a aprender e a aperfeiçoar métodos e técnicas de laboratório tais, o Domingos Figueiredo e a Joaquina. Outras pessoas também presentes, não tão participativas no trabalho mas que contribuíram pelo seu conhecimento, experiência e colaboração em pontos cruciais como o Carlos Fonseca e a Lurdes Moreira.

Durante a realização do trabalho prático houve uma particular colaboração da parte do LNEG. Esta colaboração deveu-se sobretudo a pessoas de grande experiência e disponibilidade a quem devo agradecer, o Professor Santino Berardino e a Engenheira Lurdes Barbosa, e que permitiram a realização das análises em cromatografia gasosa e a Engenheira Manuela Lageiro pela sua disponibilidade e conhecimento necessários para a realização do pré-tratamento enzimático e análises em HPLC.

I. Resumo

A digestão anaeróbia é um processo industrial associado ao tratamento de resíduos e efluentes orgânicos com diversas vantagens ambientais e energéticas face a outras formas de tratamento. Esta tecnologia tem vindo a adquirir outra finalidade que não visa somente o tratamento desses resíduos mas sobretudo o interesse na produção de biometano como biocombustível. É com esta finalidade que surge a digestão anaeróbia de biomassa e/ou culturas energéticas.

A *Cynara cardunculus* L. é uma cultura de elevada produtividade biomássica actualmente utilizada na produção de bioenergia - as sementes na produção de biodiesel e o restante da biomassa aérea como combustível sólido em centrais de biomassa. Contudo, o interesse da sua utilização na produção de biometano nunca foi investigado.

Este trabalho tem o objectivo de apresentar os primeiros resultados de produtividade específica de biogás e metano obtidos com os caules desta cultura. Com este objectivo foram realizados diversos ensaios de digestão anaeróbia em regime descontínuo de modo a estudar a influência da razão inóculo/substrato (I/S) expressa em (ml I/ gSV S) e de diversos tipos de pré-tratamentos (mecânicos, térmicos, químicos e enzimáticos) na produtividade de biogás e metano. Verificou-se que a produtividade mínima de metano é de aproximadamente 0,3 l/g SV, contudo é possível de aumentar esta produtividade dependendo do pré-tratamento seleccionado.

II. Abstract

Anaerobic digestion is an industrial process applied to organic wastes treatment with several environmental and energetic advantages over other forms of treatment. In addition to the organic wastes treatment there is an emerging interest in the production of biomethane as a biocombustible through anaerobic digestion of biomass and / or energy crops.

Cynara cardunculus L. is a crop with high biomass yields used in the production of bioenergy- seeds for biodiesel production and the remaining biomass as a solid fuel in biomass plants. However, the interest in their use in the production of biomethane has never been investigated. This work aims to present the first results of specific biogas and methane yield of *Cynara* stalks. For this purpose several *batch* anaerobic digestion experiments were performed to study the influence of the ratio inoculum/substrate (I/S) expressed in (I ml / g SV S) and different pre-treatments (mechanical, thermal, chemical and enzymatic) on specific biogas and methane yields. It was found that the minimum of methane yield achieved is at least 0,3 l / g SV but it is possible to increase this productivity depending on the pretreatment selected.

AFEX- Explosão da Fibra com Amónio

AGV/Alk – Relação entre Ácidos Gordos Voláteis e Alcalinidade

AGVs – Ácidos Gordos Voláteis

ARP- Recirculação com Amónio

ATP – Adenosina Trifosfato

C/N – Relação entre Carbono (C) e Azoto (N)

C/P – Relação entre Carbono (C) e Fósforo (P)

CBM- Centro activo de ligação ao Hidratos de carbono

CBO – Carência Biológica em Oxigénio

CQO – Carência Química em Oxigénio

CSTR – Reactor Continuo de Mistura completa

DA – Digestão Anaeróbia

DDGS- Grãos secos de destilaria com solúveis

ETAR- Estação de Tratamento de Aguas Residuais

GEE- Gases de Efeito de Estufa

I/S- Razão entre Inóculo (em unidades de volume) e Substrato (em unidades de massa relativo ao conteúdo em Sólidos Voláteis)

ISA- Instituto Superior de Agronomia

LCC- Complexo Lenhina-Hidratos de carbono

LNEG- Laboratório Nacional de Energia e Geologia

MF- Matéria Fresca

MS- Matéria Seca

NAD⁺ e NADH – Dinucleótido de nicotinamida-adenina (estado oxidado e reduzido respectivamente)

ST- Sólidos Totais

SV- Sólidos Voláteis

TRH – Tempo de Retenção Hidráulico

TRS – Tempo de Retenção de Sólidos

Índice de conteúdos

I. Resumo	7
II. Abstract	9
1 Introdução	23
1.1 Digestão Anaeróbia.....	23
1.1.1 Processo biológico.....	28
1.1.1.1 Hidrólise e Fermentação	29
1.1.1.2 Oxidação de compostos orgânicos intermédios	32
1.1.1.3 Metanogénese.....	33
1.1.1.4 Importância do hidrogénio no equilíbrio da digestão anaeróbia.....	35
1.1.2 Factores de inibição <i>versus</i> optimização do processo biológico da digestão anaeróbia	36
1.1.2.1 Macro e micro-nutrientes.....	38
1.1.2.2 Relação C/N.....	40
1.1.2.3 Concentração de AGVs <i>versus</i> Alcalinidade	42
1.1.2.4 Concentração de Azoto Amoniacal	44
1.1.2.5 Temperatura do processo	46
1.1.2.6 Metais alcalinos e alcalino terrosos	47
1.2 Digestão Anaeróbia de Biomassa	49
1.2.1 Produção de Biomassa (Fase I).....	52
1.2.1.1 Efeito do período e frequência de colheita.....	53
1.2.2 Armazenamento e conservação após colheita (Fase II)	55
1.2.3 Composição do substrato <i>versus</i> fermentação (Fase III)	56
1.2.3.1 Composição da biomassa lenhocelulosica.....	58
1.2.3.2 Formas de solubilizar os hidratos de carbono estruturais	66
1.2.3.3 Tecnologia do reactor utilizado para a digestão de biomassa	74
1.3 Características da cultura <i>Cynara cardunculus</i> L. e sua utilização	79
1.3.1 Pratica cultural e custos associados	81
1.3.2 Utilizações da cultura e sua importância.....	83

1.4	Objectivos do trabalho.....	87
2	Material e Métodos	89
2.1	Fase A.....	89
2.1.1	Processamento e preparação dos caules de <i>Cynara</i>	89
2.1.2	Inóculos.....	91
2.2	Fase B.....	93
2.2.1	Origem do Inóculo.....	93
2.2.2	Ensaio Exploratórios de Digestão Anaeróbia	93
2.3	Fase C.....	97
2.3.1	Ensaio Final	98
2.3.2	Ensaio em paralelo.....	98
2.4	Métodos	101
2.4.1	Descrição dos Métodos Utilizados	104
2.4.1.1	Determinação da celulose e hemiceluloses	104
2.4.1.2	Lenhina	104
2.4.1.3	Hidratos de carbono	105
2.4.1.4	Extractivos.....	105
2.4.1.5	Determinação dos Ácidos Gordos Voláteis e Alcalinidade.....	106
2.4.1.6	Determinação do conteúdo em Azoto	106
2.4.1.7	Determinação do conteúdo em carbono	107
2.4.1.8	Reactores utilizados para os ensaios de Digestão Anaeróbia ...	108
3	Análise dos Resultados e Discussão	115
3.1	Fase A.....	115
3.1.1	Processamento e preparação dos caules.....	115
3.1.2	Caracterização Química dos caules de <i>Cynara</i>	115
3.2	Fase B.....	119
3.2.1	Origem do Inóculo.....	119
3.2.2	Ensaio exploratórios de DA	121
3.2.2.1	Ensaio A	121

3.2.2.2	Ensaio B.....	123
3.3	Fase C.....	127
3.3.1	Ensaio I.....	127
3.3.2	Ensaio II.....	133
3.3.3	Ensaio III.....	137
3.3.4	Ensaio Final.....	141
3.3.5	Ensaio em Paralelo	146
3.3.5.1	Tratamento mecânico	146
3.3.5.2	Tratamento enzimático.....	147
4	Conclusões.....	153
5	Futuros trabalhos de investigação	157
6	Bibliografia	159
6.1	Referências electrónicas	168
7	Anexos	171

Índice de Figuras

Figura 1.1-	Esquema genérico do ciclo do carbono (Adaptado de Chynoweth, 1987).....	23
Figura 1.2-	Evolução do consumo dos combustíveis gasosos na rede de transportes da Suécia (adaptado de IEA, 2007).....	27
Figura 1.3-	Esquema genérico da degradação da Matéria Orgânica por digestão anaeróbia (adaptado de Santino, 2006; Duarte, 1991; Chynoweth, 1987)	29
Figura 1.4-	Efeito da adição de micro-nutrientes na degradação dos AGVs provenientes da fermentação do Pasto (<i>Napiergrass</i>) (Adaptado de Boone, 1993)	39
Figura 1.5-	Efeito do pH e a alcalinidade do meio na concentração de CO ₂ (Lue-Hing, 1998)	44
Figura 1.6-	Fases do processo e variáveis associadas a produção de biogás utilizando biomassa como substrato (adaptado de Amon, 2006)	51
Figura 1.7-	Unidades básicas da molécula de celulose (adaptado de SIGMA, 2009).....	60
Figura 1.8-	Estrutura simplificada de uma fibra vegetal: a) Parede celular; b)Macro-Fibrilas, c)Micro-fibrilas, d)micelas (adaptado de Magenta, 2009).....	60

Figura 1.9- Parede celular (Magenta, 2009)	61
Figura 1.10- Unidades de Xilose constituindo o Xilano (adaptado de SIGMA, 2009).....	63
Figura 1.11- Cadeia parcial da hemicelulose denominada por 4-O-Metil-Glucuronoxilano (Adaptado de Rowell, 2005).....	63
Figura 1.12- Estrutura de um monolignol: 1) <i>p</i> -coumaril, 2) coniferil e 3)álcoois sinapil (Buranov, 2008)	64
Figura 1.13- Complexo formado entre as unidades de Lenhina e os Hidratos de Carbono (Adaptado de Buranov, 2008).....	64
Figura 1.14- Exemplo de uma cadeia parcial de Pectina de α -1,4- acido D-galacturonico com um grupo oxido de Metil (KJEMI, 2009).....	65
Figura 1.15- Estrutura parcial da amilopectina (adaptado de NREL, 2009).....	65
Figura 1.16- Sistema de duas fases: na direita reactor anaeróbio ascensional (<i>Leach-bed</i>) com circulação do lixiviado para um reactor de alta carga (Esquerda) (adaptado de ATB, 2009)	76
Figura 2.1- Sequência do processamento e preparação das amostras	89
Figura 2.2- Caules <i>Cynara</i> durante o ciclo (direita) no campo BioEnergISA e caules recolhidos no final do ciclo (esquerda)	90
Figura 2.3- Corte inicial dos caules em fracções de 2 cm de largura	90
Figura 2.4- 1ª Moagem (utilizando o moinho referenciado e a malha 10,0 mm) 90	
Figura 2.5- 2ª Moagem (utilizando o moinho referenciado e a malha 1,10 mm) 91	
Figura 2.6- Crivagem do material proveniente da 2ª moagem (obtenção das fracções na figura da esquerda: 40, 40-60, 60-80 e 80 Mesh)	91
Figura 2.7- Monitorização em continuo do pH e temperatura dos digestores anaeróbios (A e B)	92
Figura 2.8- Sequência de passos adoptada na realização dos ensaios exploratórios.....	94
Figura 2.9- Sequência de passos adoptada para a realização da Fase C	97
Figura 2.10- Granulometrias utilizadas no ensaio (da esquerda para a direita:2mm, 40 Mesh, 40-60 Mesh, 60-80 Mesh e 80 Mesh).....	99
Figura 2.11- Esquema de montagem utilizado no Ensaio A (A- garrafas de vidro de 400 ml, B- provetas de 500 ml, C- tampas (de balões volumétricos) previamente perfuradas, D- banho maria à temperatura entre 37-42 °C (banho termostaticado de um rotavapor), E- recipiente com água como base das provetas, F- tubos flexíveis constituídos por polietileno, G- elásticos como fixação das provetas a base).....	109

Figura 2.12- Montagem do sistema descontínuo de 300 ml adoptado para a realização dos ensaios durante a Fase C (A- garrafas de vidro de 500 ml, B- provetas de 500 ml, C- tampas de “borracha” perfuradas, D- ponto de amostragem de gás, E- fixação do tubo no interior da proveta, F-tubos de polietileno de 1m e 1,6 m, G-6 sacos TEDLAR de 500 ml, H- fixação e suporte das provetas, I- recipiente com água como base para a colocação das Provetas, J- banho maria a temperatura 35-37 °C)	111
Figura 2.13- Esquema geral da montagem utilizada no ensaio B (Z - manta eléctrica de aquecimento e regulador da temperatura)	112
Figura 2.14- Montagem base para cada reactor: 1 - agitador; 2 - válvula para retirar amostras de biogás; 3 - veio vertical de agitação; 4 - saída de biogás; 5 - proveta para contabilização do volume de biogás.....	113
Figura 3.1- Volume diário e acumulado de biogás para o ensaio referente ao inóculo de ETAR (A₁ reactor controlo; A₂ reactor com substrato)	119
Figura 3.2- Volume diário e acumulado de biogás referente ao ensaio com o inóculo de chorume (B₁ reactor controlo; B₂ reactor com substrato)	120
Figura 3.3- Volume acumulado e diário de biogás para o Ensaio A (razões I/S : Reactor 1 igual a 116,1 ml I/g SV S ; Reactor 2 igual a 58,2 ml I/g SV S ; Reactor 3 igual a 38,9 ml I/g SV S).....	122
Figura 3.4- Produção acumulada e diária de biogás (Reactor 1 - Substrato pré-tratado; Reactor 2 - Substrato não tratado)	125
Figura 3.5- Volume acumulado de biogás durante o Ensaio I (Razões I/S : reactor 1- 349,8 ml I/g SV S ; reactor 2- 174,2 ml I/g SV S ; reactor 3- 116,1 ml I/g SV S ; reactor 4- 87,5 ml I/g SV S ; reactor 5- 69,7 ml I/g SV S)	129
Figura 3.6- Volume diário de biogás durante o Ensaio I (Razões I/S : reactor 1- 349,8 ml I/g SV S ; reactor 2- 174,2 ml I/g SV S ; reactor 3- 116,1 ml I/g SV S ; reactor 4- 87,5 ml I/g SV S ; reactor 5- 69,7 ml I/g SV S).....	129
Figura 3.7- Volume acumulado de biogás durante o ensaio Y (Razões I/S : reactor 1- 58,2 ml I/g SV S ; reactor 2- 50,0 ml I/g SV S ; reactor 3- 43,7 ml I/g SV S ; reactor 4- 38,9 ml I/g SV S ; reactor 5- 69,7 ml I/g SV S).....	130
Figura 3.8- Volume diário de biogás durante o ensaio Y (Razões I/S : reactor 1- 58,2 ml I/g SV S ; reactor 2- 50,0 ml I/g SV S ; reactor 3- 43,7 ml I/g SV S ; reactor 4- 38,9 ml I/g SV S ; reactor 5- 69,7 ml I/g SV S).....	130
Figura 3.9- Volume diário e acumulado de biogás durante o Ensaio Z (Razões I/S : reactor 4- 35,0 ml I/g SV S ; reactor 5- 69,7 ml I/g SV S)	131

Figura 3.10- Efeito do tempo de reacção da hidrólise térmica na solubilização de carbono	134
Figura 3.11- Efeito do tempo de reacção de hidrólise térmica na relação de C/N e CQO/N.....	134
Figura 3.12- Efeito do tempo de reacção da hidrólise térmica na libertação de azoto.....	135
Figura 3.13- Volume diário de biogás produzido para o Ensaio II (Reactor 1- substrato pré-tratado 10 min; Reactor 2- Substrato pré-tratado 15 min; Reactor 3- Substrato pré-tratado 20 min; Reactor 4 Subsatrato pré-tratado 30 min; Reactor 5- Substrato sem pré-tratamento).....	135
Figura 3.14- Volume acumulado de biogás produzido para o Ensaio II (Reactor 1- substrato pré-tratado 10 min; Reactor 2- Substrato pré-tratado 15 min; Reactor 3- Substrato pré-tratado 20 min; Reactor 4 Subsatrato pré-tratado 30 min; Reactor 5- Substrato sem pré-tratamento).....	136
Figura 3.15- Solubilização do carbono para diferentes reagentes químicos após pré-tratamento termo químico.....	137
Figura 3.16- Volume diário produzido durante o ensaio III (Reactor 1- substrato pré-tratado com NaOH; Reactor 2- Substrato pré-tratado com $\text{NH}_{3(\text{aq})}$; Reactor 3- Substrato pré-tratado com HNO_3^- ; Reactor 4- Subsatrato pré-tratado com CH_3COOH ; Reactor 5- Substrato sem pré-tratamento).....	138
Figura 3.17- Volume acumulado de biogás durante o ensaio III (Reactor 1- substrato pré-tratado com NaOH; Reactor 2- Substrato pré-tratado com $\text{NH}_{3(\text{aq})}$; Reactor 3- Substrato pré-tratado com HNO_3^- ; Reactor 4- Subsatrato pré-tratado com CH_3COOH ; Reactor 5- Substrato sem pré-tratamento).....	138
Figura 3.18- Carbono solubilizado não degradado (Reactor 1- substrato pré-tratado com NaOH; Reactor 2- Substrato pré-tratado com $\text{NH}_{3(\text{aq})}$; Reactor 3- Substrato pré-tratado com HNO_3^- ; Reactor 4- Subsatrato pré-tratado com CH_3COOH ; Reactor 5- Substrato sem pré-tratamento).....	140
Figura 3.19- Aspecto da mistura no interior do reactor 1 no final do ensaio (Substrato sujeito a pré-tratamento).....	142
Figura 3.20- Aspecto da mistura no interior do reactor 2 no final do ensaio (Substrato sem pré-tratamento).....	143
Figura 3.21- Volume de biogás diário e acumulado para o ensaio final (Reactor 1- Substrato pré-tratado; Reactor 2- Substrato não tratado).....	143
Figura 3.22- Conteúdo em metano e dióxido de carbono para o reactor 1	145

Figura 3.23- Volume diário de biogás (Reactor 1- partículas de 2mm; Reactor 2- partículas de 40 Mesh; Reactor 3- partículas de 40-60 Mesh; Reactor 4- partículas de 60-80 Mesh; Reactor 5- partículas de 80 Mesh).....	146
Figura 3.24- Volume acumulado de biogás (Reactor 1- partículas de 2mm; Reactor 2- partículas de 40 Mesh; Reactor 3- partículas de 40-60 Mesh; Reactor 4- partículas de 60-80 Mesh; Reactor 5- partículas de 80 Mesh).....	146
Figura 3.25- Efeito do pré-tratamento enzimático na disponibilização de Glucose e xilose	148
Figura 3.26- Volume diário para o ensaio de digestão anaeróbia (Reactor 1- substrato com pré-tratamento enzimático a 48h; Reactor 2- substrato com pré-tratamento enzimático a 60h; Reactor 3- substrato sem pré-tratamento enzimático apenas adição de enzimas ao reactor; Reactor 5- Substrato sem pré-tratamento enzimático e sem adição de enzimas)	149
Figura 3.27- Volume acumulado para o ensaio de digestão anaeróbia (Reactor 1- substrato com pré-tratamento enzimático a 48h; Reactor 2- substrato com pré-tratamento enzimático a 60h; Reactor 3- substrato sem pré-tratamento enzimático apenas adição de enzimas ao reactor; Reactor 5- Substrato sem pré-tratamento enzimático e sem adição de enzimas)	149

Índice de Tabelas

Tabela 1-1-Número de instalações de digestores e energia produzida em alguns países da Europa, adaptado (IEA, 2007; Baromètre du biogaz, 2006; add-nett, 2005).....	26
Tabela 1-2- Energia libertada versus hidrogénio produzido (adaptado de Santino, 2006).....	31
Tabela 1-3- Razões de nutrientes presentes em vários substratos orgânicos (Adaptado de Chynoweth, 1987)	41
Tabela 1-4- Efeito da concentração de azoto amoniacal (Santino, 2006).....	46
Tabela 1-5- Efeito da concentração dos catiões metálicos na digestão anaeróbia (Santino, 2006).....	47
Tabela 1-6- Potencial de metano e energético para diferentes culturas energéticas e resíduos de culturas (adaptado de: Lehtomäki, 2006; Gunaseelan, 1997 e 2008; Chynoweth, 1985; Amon, 2007).....	52
Tabela 1-7- Exemplo do efeito do período de colheita na produtividade de metano (Adaptado de: Lehtomäki, 2006 e Amon, 2007).....	54
Tabela 1-8- Efeito da redução das partículas de várias culturas lenhocelulosicas no potencial de metano (adaptado de Lehtomäki, 2006; Mshandete, 2005b)....	66

Tabela 1-9- Exemplo do efeito da remoção de hemiceluloses e sua comparação entre tratamentos térmicos com água (200 °C; 10 min) em sistemas descontínuos e contínuos (Adaptado de Yang, 2008)	70
Tabela 1-10- Exemplo do efeito de vários pré-tratamentos no material lenhocelulosico (adaptado de Hendriks, 2009)	71
Tabela 1-11- Composição química dos componentes lenhocelulosicos de <i>Cynara cardunculus</i> L. em % de MS (adaptado de 1- Gominho, 2001;2- Gominho, 2008, 3- Pereira, 1994, 4- Ballesteros, 2008).....	80
Tabela 1-12- Composição da forragem verde de <i>Cynara cardunculus</i> L. durante o inverno e o efeito do corte durante o Inverno na redução da produtividade final (adaptado de Jesús Fernández, 2006)	83
Tabela 2-1- Procedimento adoptado para preparação do ensaio.....	93
Tabela 2-2- Procedimento utilizado no ensaio A de 300 ml e B de 2000 ml (adaptado de Gunaseelan 1995)	93
Tabela 2-3- Metodologia utilizada em cada ensaio.....	97
Tabela 2-4- Procedimento utilizado na realização do pré-tratamento enzimático	99
Tabela 2-5- Parâmetros e respectivos Métodos utilizados durante o trabalho prático.....	101
Tabela 2-6 Equipamentos utilizados ao longo do trabalho prático	102
Tabela 3-1- Caracterização física do material processado	115
Tabela 3-2- Composição química dos caules de <i>Cynara</i>	116
Tabela 3-3- Composição mineral e conteúdo em carbono e azoto dos caules de <i>Cynara</i>	117
Tabela 3-4- Caracterização dos inóculos de ETAR e chorume (valores arredondados).....	119
Tabela 3-5- Caracterização do novo inóculo de chorumes.....	121
Tabela 3-6- Características do Inóculo para o Ensaio A	122
Tabela 3-7- Produtividade especifica de biogás, pH, AGVs e alcalinidade no final do Ensaio A	123
Tabela 3-8- Caracterização dos constituintes antes e depois do ensaio	124
Tabela 3-9- Produtividades especificas de biogás e CH ₄ e conteúdo em metano e dióxido de carbono durante o ensaio B	126
Tabela 3-10- Razões de I/S utilizadas em três diferentes ensaios: Ensaio I, Ensaio Y e Ensaio Z.....	127
Tabela 3-11- Características dos Ensaios em termos de ST e SV	128

Tabela 3-12- Características do inóculo (pH e temperatura) no momento de dos digestores (A-B)	128
Tabela 3-13- Valor de pH final para os Ensaios Y e Z.....	131
Tabela 3-14- Produtividade específica de biogás e conteúdo em CH ₄ e CO ₂ para as várias razões de I/S.....	132
Tabela 3-15- Razão de C/N e CQO _{bruto} /N para diferentes razões de I/S (Ensaio I)	133
Tabela 3-16- Observações finais do Ensaio II	136
Tabela 3-17- Características do conteúdo de cada reactor no início e final do ensaio III.....	139
Tabela 3-18- Conteúdo em nitratos antes e depois do ensaio	140
Tabela 3-19- Conteúdo em AGVs utilizando cromatografia gasosa.....	141
Tabela 3-20- Comparação da determinação de ST e SV utilizando pipeta e copo (Reactor 1- substrato pré-tratado; Reactor 2- substrato não tratado).....	142
Tabela 3-21- Resultados obtidos para o Ensaio Final	144
Tabela 3-22- Produtividade específica de biogás e conteúdo em metano e dióxido de carbono.....	147
Tabela 3-23- Parâmetros determinados no início e final do ensaio de DA	150

1 Introdução

Este capítulo encontra-se dividido em 3 subcapítulos principais: 1.1- Digestão Anaeróbia, 1.2- Digestão Anaeróbia de Biomassa e 1.3- Características da cultura *Cynara cardunculus* L.

O objectivo desta primeira parte do trabalho é apresentar o estado da arte relacionado com cada um dos subcapítulos referidos e realçar os conhecimentos teóricos subjacentes à realização do trabalho prático. Como se indica pelo título do trabalho este baseia-se na utilização da biomassa do cardo como substrato da digestão anaeróbia (DA) para a produção de biogás. Este capítulo permite resumir a maioria dos conceitos teóricos em que se baseia o processo da digestão anaeróbia e, em particular, o estado da arte no que se refere à utilização deste processo como fonte de energia utilizando biomassa lenhocelulosica como substrato. No último capítulo é dada ênfase à cultura de *Cynara cardunculus* L. nomeadamente no que se refere a suas características como cultura e importância na região do Mediterrâneo.

1.1 Digestão Anaeróbia

Normalmente a tecnologia da digestão anaeróbia, com a subsequente produção de biogás, está associada ao tratamento de resíduos apresentando diversas vantagens relativamente a outro tipo de tecnologias de tratamentos como é o caso do tratamento aeróbio, Figura 1.1 (Chynoweth, 1987).

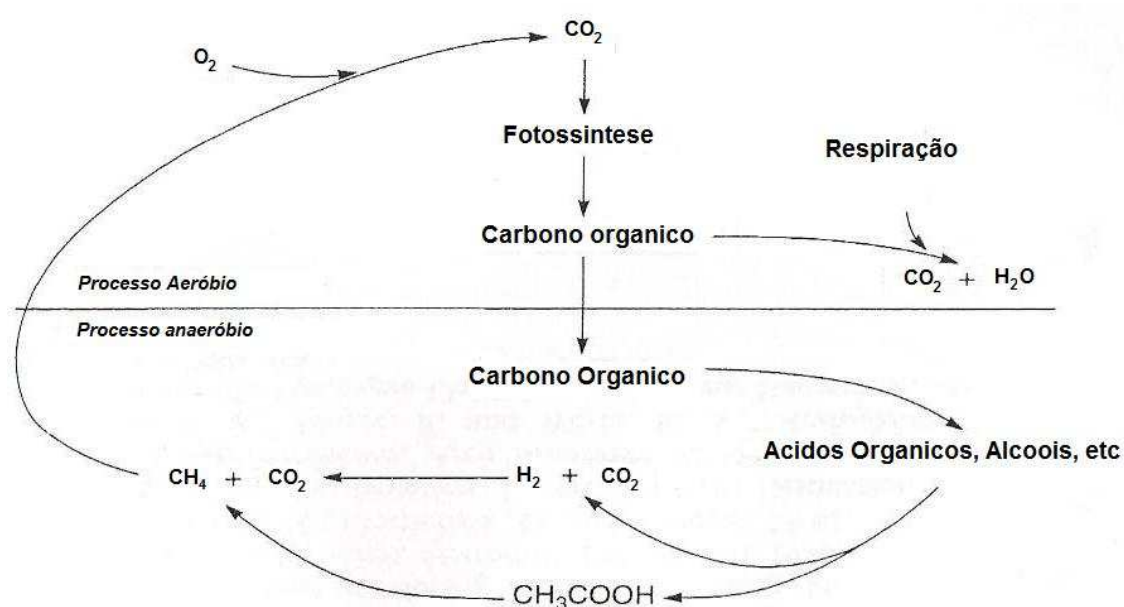


Figura 1.1- Esquema genérico do ciclo do carbono (Adaptado de Chynoweth, 1987)

Durante o metabolismo das bactérias anaeróbias a maior parte da energia química contida nos substratos é convertida em metano e dióxido de carbono, pelo contrário no metabolismo das bactérias e organismos aeróbios a maior parte da energia contida nestes substratos é perdida na respiração através da oxidação formando dióxido de carbono e água, verificando-se igualmente uma maior produção de células de bactérias ou seja maior produção de biomassa (lama) (Chynoweth, 1987).

Como complemento ao ciclo de carbono a digestão anaeróbia surge também como uma tecnologia bastante importante na regulação e equilíbrio do ciclo de outros nutrientes nomeadamente o ciclo do azoto (N). O ciclo do azoto que aparece também interligado com o ciclo do carbono, por exemplo, de modo a aumentar a capacidade de fotossíntese das plantas e conseqüente captura ou sequestro de carbono (CO₂) é necessária uma maior quantidade de azoto. No entanto apesar de o azoto ser o principal elemento na atmosfera este apenas é assimilado pelas plantas sob a forma de nitratos (NO₃⁻) ou ião amónia (NH₄⁺), formas que apenas são produzidas a partir de processos como: a fixação e a nitrificação.

Na agricultura, dependendo da qualidade do solo, diversos métodos são utilizados de modo a aumentar esta disponibilidade de N para as plantas tais como a incorporação de matéria orgânica, como chorumes, ureia e fertilizantes sintéticos. Contudo não havendo um balanço prévio das características do solo em termos de capacidade de fixação de azoto e qual o seu limite, na maior parte das situações ocorre uma incorporação de matéria orgânica/fertilizantes em excesso que leva conseqüentemente a uma maior perda por lixiviação, volatilização e desnitrificação. A volatilização e lixiviação contribuem para a contaminação das águas subterrâneas podendo levar a fenómenos de eutrofização (em lagos, rios e zonas costeiras), a desnitrificação contribui para a contaminação da atmosfera por N₂O (gás de efeito de estufa - GEE). Por exemplo, na Alemanha verificou-se que a agricultura contribui com cerca de 67,4 % de N₂O e 95,4% de NH₄⁺ em termos de carga poluente (Möller, 2009).

De acordo com Möller (2009) e Prochnow (2009) verifica-se que a tecnologia da digestão anaeróbia, com a aplicação do digerido como fertilizante dos solos, tem o potencial de influenciar directamente ou indirectamente os processos de desnitrificação, volatilização do amoníaco e lixiviação de nitratos e amónia,

conduzindo a um maior equilíbrio e maior disponibilização de azoto para a planta, face à aplicação de chorume e de outros fertilizantes.

A digestão anaeróbia apresenta assim algumas vantagens ambientais quando se associa esta tecnologia a outras actividades como é o caso da Agricultura. Os subprodutos do processo da digestão anaeróbia (lama e efluentes digeridos) podem substituir os fertilizantes de síntese com vantagens económicas e energéticas e ambientais (Yiridoe, 2009).

Verifica-se que o investimento nesta tecnologia tem crescido consideravelmente em alguns países devido a sua versatilidade, como é o caso de sistemas aplicados em países subdesenvolvidos como a Índia e China ou mais recentemente de sistemas utilizados por países desenvolvidos como a Alemanha e Suécia.

Mais de metade da população mundial vive em países subdesenvolvidos e pelo menos metade vive em zonas rurais onde o PIB (Produto Interno Bruto) pode alcançar os 100\$ EUA por ano (Seiffert, 2008). A importância e o interesse da tecnologia de biogás neste tipo de países é claro em diversas publicações. Por exemplo Seiffert (2008) salienta a importância da substituição das importações de gás natural no Chile, proveniente da Argentina, pela produção de biometano. A perspectiva de Jingura (2009) e Misi (2001) é a da utilização da digestão anaeróbia e produção de biogás através da co-digestão de diferentes resíduos no Zimbabwe.

A utilização do biogás é uma realidade bastante presente na Índia, contabilizando-se cerca de 4 milhões de digestores familiares de biogás (Chanakya, 2009). Prevê-se que este número venha a aumentar consideravelmente, por exemplo Yadvika (2004) refere a possibilidade de construção de mais de 12 milhões de plantas de biogás se se utilizar apenas 1/3 do chorume proveniente da criação de gado, ou recentemente Urban (2009) que analisa diferentes cenários para o sistema de electrificação rural na Índia para o período 2005-2030, e conclui que os sistemas de electrificação rural, com base na adopção de sistemas de energia renovável (forno de biogás, forno solar, etc.) podem reduzir cerca de 99% das emissões totais de CO₂ das habitações que utilizam a lenha normalmente como combustível. Katuwal (2009) dá ênfase ao benefício na saúde humana e os impactes económicos com essa mesma substituição. Situações idênticas verificam-se também pelo continente africano

em particular na África do Sul onde aproximadamente 310 mil casas rurais entre 2007 e 2008 começaram a utilizar energia proveniente do biogás (Austin, 2007).

Na Europa a produção de biogás está localizada sobretudo em 4 países: Alemanha, Suécia, Dinamarca e Áustria, contudo verifica-se a sua produção um pouco por toda a Europa. Na Tabela 1-1 é apresentado o número de instalações e a energia produzida e contabilizada no final do ano de 2006, nos principais países Europeus.

Tabela 1-1–Número de instalações de digestores e energia produzida em alguns países da Europa, adaptado (IEA, 2007; Baromètre du biogaz, 2006; add-nett, 2005)

Países	Nº de Instalações em operação	Energia produzida (GWh)
Alemanha	3500	> 5564
Reino Unido	1052	> 4783
Itália	>67	> 1313
Dinamarca	80	> 911
Áustria	524	> 1706
Suécia	163	> 1300
França	203	≈ 657
Holanda	40	> 281

No caso da Alemanha a digestão anaeróbia ocupa de momento 10,9 % da produção de energia renovável, contra 4,2 % da fotovoltaica e 11,5 % relativa as centrais de biomassa, sendo que a maior quota provem de energia eólica 45,2% (Weiland, 2009). Em 2009, contabilizam-se 4000 instalações de biogás com uma capacidade eléctrica de 1400 MW (Weiland, 2009). Entre os anos de 2005 -2006 foram construídas 1450 instalações de biogás, contudo de momento verifica-se um forte investimento no tratamento do biogás e a respectiva injeção na rede de gás natural. Weiland (2009) refere que em 2009 cerca de 16 estações de tratamento do biogás estão em operação existindo ainda em fase de projecto ou em fase de construção mais 20 instalações.

Outro caso interessante de utilização da digestão anaeróbia na produção de metano ocorre na Suécia, onde a produção de biometano como combustível para veículos tem vindo a crescer (Figura 1.2). Em 2005 a Suécia produzia cerca de 160 GWh (20000 Nm³) de biogás como biocombustível para veículos e em 2006 alcançou os 230 GWh (próximo dos 25000 Nm³) ultrapassando a utilização de gás natural como combustível para veículos, permitindo substituir cerca de 25 milhões de litros de petróleo em unidades equivalentes (Persson, 2007).

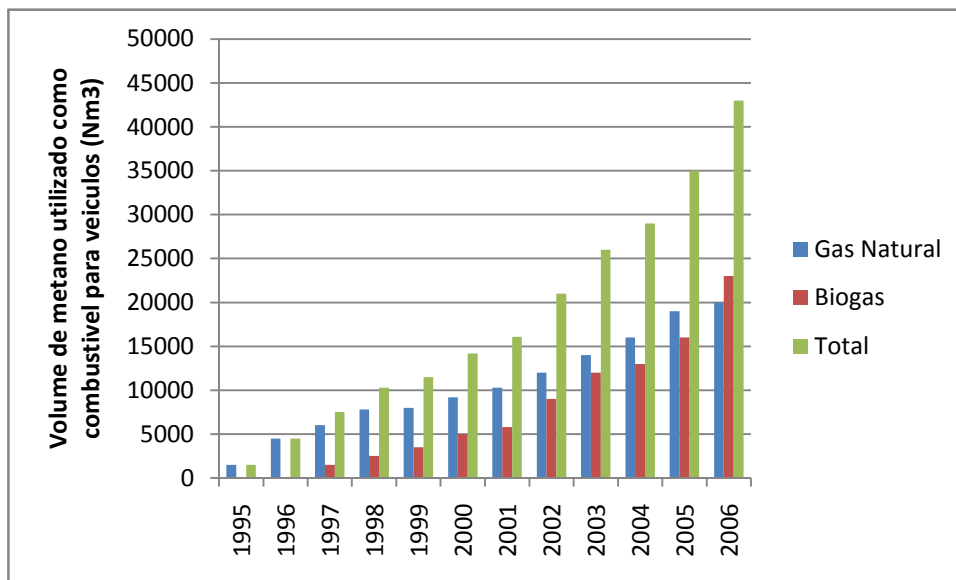


Figura 1.2- Evolução do consumo dos combustíveis gasosos na rede de transportes da Suécia (adaptado de IEA, 2007)

Na Suécia o biogás é utilizado na sua maioria em aquecimento (56%) e combustível para veículos (19%) e o restante é utilizado nas necessidades energéticas das centrais. Em 2009 totalizam-se cerca de 120 estações de combustível com biometano e um pouco mais de 16 mil veículos movidos a biometano na sua maioria (mais de 15 mil) veículos particulares. Prevê-se um investimento entre 2009-2013 para a produção descentralizada (em centrais agrícolas) utilizando pelo menos 50 % de chorume como substrato (Pettersson, 2009).

Outro exemplo em França, na cidade de Lille foi construída a maior central de biogás como biocombustível de veículos. Baseada no tratamento da fracção orgânica dos resíduos sólidos urbanos permite produzir cerca de 4 milhões de Nm³ de biogás por ano que são convertidos em biometano. A central com capacidade para tratar os resíduos orgânicos gerados pela cidade de Lille com 1,1 milhões de habitantes produz um combustível para veículos utilizado na rede de autocarros e de camiões associados a recolha do lixo, totalizando-se cerca de 150 veículos (Tilche, 2008).

Verifica-se pois que a digestão anaeróbia, a par da importância no tratamento de resíduos orgânicos, tem vindo a ganhar relevo no sector energético nomeadamente na produção de biometano como substituto do gás natural. Apesar de ser considerado um dos biocombustíveis mais caros, considerando a substituição da infra-estrutura existente de veículos, o biometano apresenta-se contudo como o menos poluente e mais eficiente (CONCAWE, 2007; CONCAWE

2008) podendo igualmente ser considerado como uma forte alternativa à substituição de combustíveis fósseis para veículos, especialmente em veículos pesados associados a recolha de resíduos bem como veículos pertencentes a rede de transportes rodoviários (Tilche, 2008).

1.1.1 Processo biológico

Em meios onde outros receptores de electrões tais como o oxigénio, ou sulfatos e nitratos não estejam facilmente disponíveis e onde comparativamente a concentração de Matéria orgânica e nutrientes é elevada, menor será o potencial redox desse meio. Considera-se um valor adequado de potencial redox menor ou igual a -300 mV para que ocorra a digestão anaeróbia com a consequente produção de metano (Duarte, 1991).

Em 1776 o físico Italiano Alessandro Volta verificou que o gás gerado da decomposição de material biológico, existente nos sedimentos aquíferos constituídos essencialmente por ervas e plantas, era um gás combustível. Desde então surgirão diversas constatações e desenvolvimentos tecnológicos que têm permitido, desde os finais do séc. XIX até aos dias de hoje, despertar o interesse científico sobre o processo propriamente dito (Santino, 2006). Contudo apenas em 1981 surgiu o primeiro esquema quantificado da digestão anaeróbia em termos de percentagem do fluxo de Carência Química em Oxigénio (CQO) e de energia consumida em cada uma das fases elaborado por Mc Carty (Santino, 2006). Ainda que apresentado numa forma simplificada o esquema permite em traços gerais resumir o processo em 3 fases sequenciais:

- Hidrólise e fermentação originando compostos mais simples tais como ácidos gordos voláteis (AGV), açúcares, hidrogénio e CO₂;
- Oxidação dos compostos a ácido acético e hidrogénio;
- Metanogénese.

A digestão anaeróbia metanogénica resulta do crescimento equilibrado e simbiótico dos microrganismos intervenientes nestas fases. As bactérias anaeróbias e as facultativas, que intervêm na fermentação ácida, tornam os substratos orgânicos quimicamente disponíveis para a etapa seguinte, eliminando ao mesmo tempo, todo o oxigénio, presente que é tóxico para as bactérias metanogénicas (Santino, 2006; Chynoweth, 1977). Em contrapartida, durante a metanogénese os ácidos voláteis e o hidrogénio são convertidos em

subprodutos gasosos (CH_4 e CO_2) evitando assim o aumento da acidez do meio, por parte do CO_2 , e reduzindo a pressão parcial do hidrogénio permitindo a continuidade do processo de degradação.

A relação de simbiose e sintropia (Santino, 2006; Duarte, 1991; Chynoweth, 1987) pode ser esquematizada de um modo simples através da Figura 1.3:

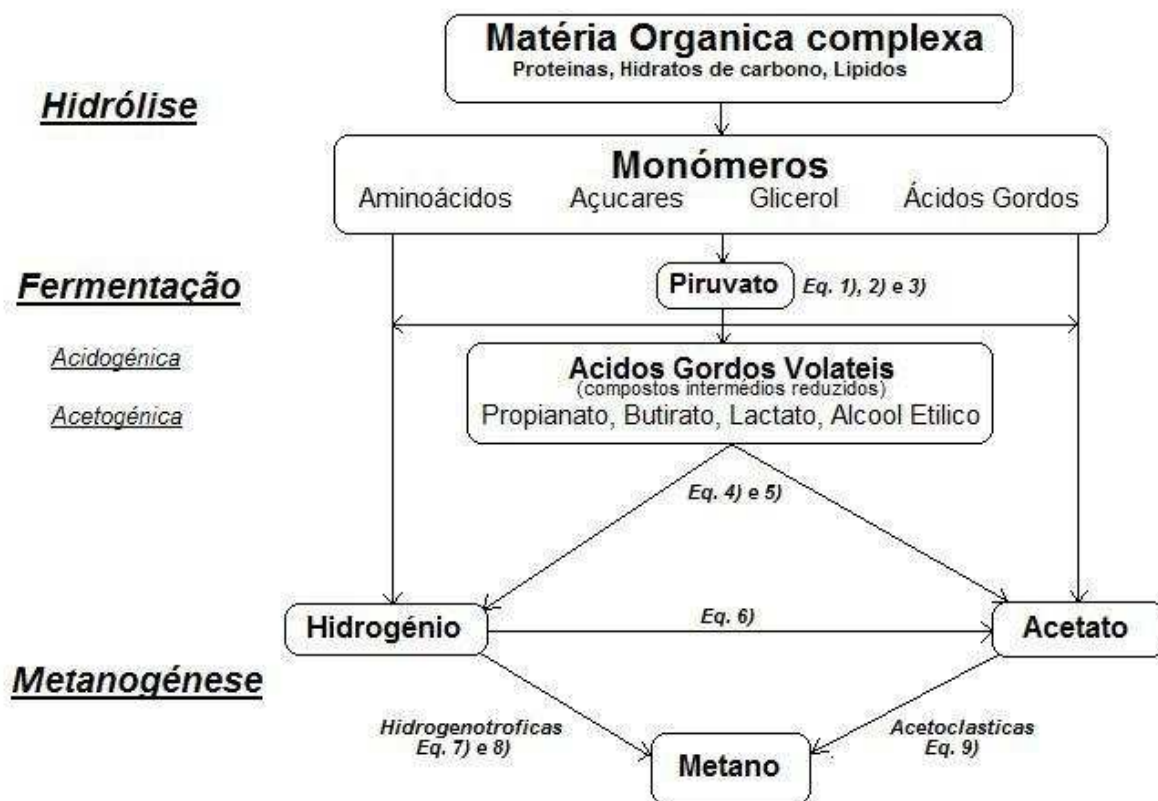


Figura 1.3- Esquema genérico da degradação da Matéria Orgânica por digestão anaeróbia (adaptado de Santino, 2006; Duarte, 1991; Chynoweth, 1987)¹

1.1.1.1 Hidrólise e Fermentação

A hidrólise da matéria orgânica complexa a monómeros é uma fase levada a cabo por microrganismos anaeróbios que degradam as moléculas principais tais como: proteínas, glúcidos e lípidos a monómeros ou compostos mais simples.

Para muitos autores (Hendriks, 2009; Ward, 2008; Lehtomäki, 2006; Santino, 2006; Mladenovska, 2006; Siegert, 2005; Wyman, 2005; Mosier, 2005b; Alvarez, 2000; Palmowski, 2000; Boone, 1993; Mata-Alvarez, 1987; Chynoweth, 1987) é esta a fase limitante de todo o processo de digestão anaeróbia uma vez que não ocorrendo a hidrólise destes compostos a monómeros ou a compostos

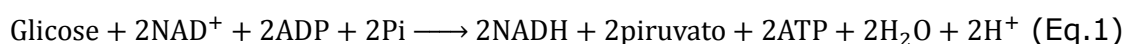
¹ As equações apresentadas estão descritas no ponto 1.1.1.1, 1.1.1.2 e 1.1.1.3.

de cadeias mais simples o processo fica bloqueado não ocorrendo produção de biogás. Sendo esta a situação quando se utilizam substratos lenhocelulosicos como é caso da fracção fibrosa dos chorumes de vaca ou suínos, resíduos florestais ou culturas energéticas.

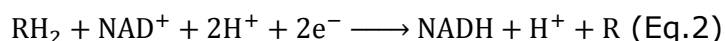
A hidrólise é levada a cabo por organismos estritamente anaeróbios e bactérias facultativas pertencentes aos grupos *Clostridium*, *Bacillus* e *Peptococcus* no caso da degradação das proteínas, *Clostridium*, *Staphilococcus* e *Proteus* no caso da degradação de glúcidos e *Clostridium*, *Micrococcus* e *Staphilococcus* no caso da degradação de lípidos (Santino, 2006; Chynoweth, 1987).

Da fase da hidrólise originam-se compostos de cadeia mais curta que serão degradados através do caminho mais conhecido designado por Glicólise ou via Embden Meyerhoff caminho este característico dos eucariotas e de muitas eubacterias anaeróbias.

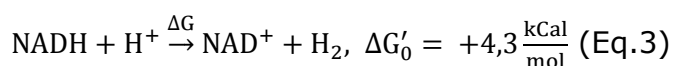
A glicólise é um processo de degradação que envolve 9 reacções intermédias, a seguinte equação permite simplificar o processo apenas numa reacção:



Neste processo apesar de serem investidos 2 mol de ATP (adenosina trifosfato) durante a conversão da glicose (gliceraldeido-3-fosfato) a piruvato ocorre a formação de 4 mol de ATP pelo que no balanço final produzem-se 2 mol de ATP. A co-enzima do tipo NAD^+ é o transportador de electrões (e^-) utilizado durante a glicólise na conversão do gliceraldeido-3-fosfato a piruvato (Voet, 1999). Neste caso a molécula orgânica é oxidada e a molécula NAD^+ é reduzida a NADH.



Para que o processo degradativo se mantenha indefinitivamente é necessário que ocorra uma continua reoxidação do NADH formado para que o NAD^+ seja regenerado. Esta regeneração é efectuada através da oxidação do NADH:



Trata-se pois de uma reacção pouco favorável energeticamente e que depende de uma remoção constante de H_2 (Duarte, 1991).

Em condições anaeróbias e na ausência de oxigénio o piruvato tem de ser convertido em compostos reduzidos tais como ácidos orgânicos ou álcoois (Voet, 1999). Neste caso formam-se uma série de moléculas no estado reduzido e de

acordo com o tipo de molécula formada a fermentação assume um caminho específico (Santino, 2006).

Dentro das mais citadas destacam-se a fermentação acidogénica, em que se forma propionato e butirato, e a fermentação acetogénica em que o piruvato forma o acetil CoA, a qual é depois degradada em acetato, dióxido de carbono e H₂ com formação adicional de ATP a partir do acetil fosfato (Santino, 2006).

A fermentação acetogénica que leva apenas à formação de acetato não contribui para a regeneração do NADH devido ao acumular de hidrogénio (Tabela 1-2), pelo que com o acumular do hidrogénio a fermentação normalmente assume a via acidogénica formando-se sobretudo propionato e butirato (Duarte, 1991).

Tabela 1-2- Energia libertada versus hidrogénio produzido (adaptado de Santino, 2006)

Produto final	Nº de ATP/mole de glicose geradas	hidrogénio produzido (moles)
Acetato	4	4
Propionato	1	1
Butirato	2	2
Etanol	2	2
Lactato	2	2

Outra razão pela qual a fermentação normalmente segue a via acidogénica está relacionada com o facto de as bactérias acidogénicas possuírem maior taxa de crescimento e catalisarem reacções do ponto de vista energético mais favoráveis (Santino, 2006).

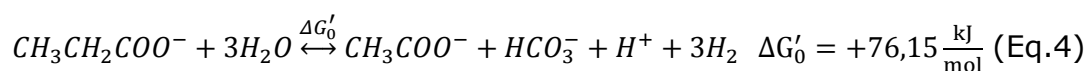
Verifica-se que a fermentação das proteínas, glúcidos e lípidos leva à produção de acetato por via da fermentação acetogénica (cerca de 30%) (Duarte, 1991) e propionato e butirato por via acidogénica (praticamente 100 %) (Duarte, 1991). A produção de biogás e neste caso de metano depende da produção de hidrogénio, formiato e sobretudo de acetato, compostos estes que apenas são formados inicialmente pela fermentação acetogénica e posteriormente pela degradação do propionato e butirato (Santino, 2006).

Surge portanto um outro grupo de bactérias bastante importantes no desenrolar do processo, designadas por bactérias hidrogenogénicas (Duarte, 1991) ou também designadas por bactérias acetogénicas produtoras obrigatórias de hidrogénio (Santino, 2006).

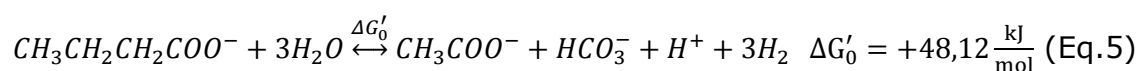
1.1.1.2 Oxidação de compostos orgânicos intermédios

A oxidação de compostos orgânicos intermédios de cadeia comprida tais como propionato e butirato é levada a cabo pelas bactérias hidrogenogénicas. Estas bactérias degradam os ácidos orgânicos voláteis com mais do que dois átomos de carbono (em número par) em acetato e hidrogénio e, no caso destes compostos apresentarem número ímpar de átomos de carbono ocorre a produção também de dióxido de carbono (Santino, 2006). Estas bactérias podem contribuir para a produção de cerca de 60% de acetato (Duarte, 1991).

Do ponto de vista energético estas reacções são muito desfavoráveis em condições padrão, verificando-se a necessidade significativa da existência de relações de sintropia, como é possível verificar pelas seguintes reacções de degradação do propionato e butirato respectivamente (Duarte, 1991):



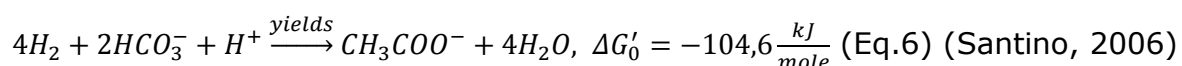
(Adaptado de Duarte, 1991)



(Adaptado de Duarte, 1991)

O desenrolar destas reacções depende pois da simbiose entre estas bactérias e as bactérias metanogénicas consumidoras de hidrogénio e formiato (*archea*-hidrogenotróficas) e consumidoras de acetato (*archea*-acetoclásticas). Contudo o papel do hidrogénio no desenrolar destas reacções parece revelar-se mais importante, sendo que muitos autores referenciam que, para estas reacções serem exotérmicas e portanto favoráveis é necessário que a pressão parcial do H_2 seja mantida entre $1,6 \times 10^{-6}$ e $5,8 \times 10^{-5}$ atm (Santino, 2006; Duarte, 1991; Chynoweth, 1987). Os microrganismos responsáveis por esta degradação são pertencentes aos grupos *Bacillus*, *Streptococcus*, *Pseudomonas*, *Clostridium*, *Syntrophomonas wofei*, *Syntrophobacter wolinii* (Santino, 2006).

Durante a fermentação intervêm ainda outro tipo de bactérias anaeróbias designadas por homoacetogénicas que competem com as bactérias metanogénicas na utilização do hidrogénio. Estas bactérias utilizam o hidrogénio de modo a reduzir o dióxido de carbono e formiato gerando essencialmente acetato (Santino, 2006).

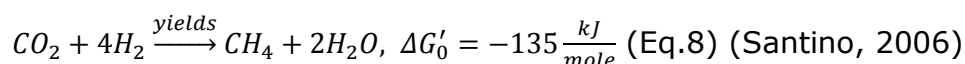
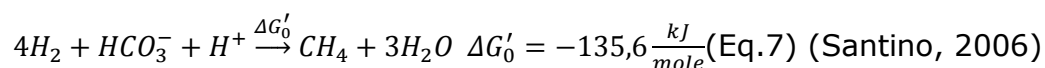


É referido que pequenas quantidades de acetato podem ainda ser utilizadas para sintetizar propionato e butirato (Chynoweth, 1987). Estas reacções levadas a cabo por estes microrganismos não são mais do que o inverso das reacções catalisadas pelas bactérias acetogénicas e hidrogenogénicas (Chynoweth, 1991). Aparentemente, estas reacções não podem ser levadas a cabo ao mesmo tempo, ou seja, não podem ser exotérmicas no mesmo instante. Contudo, devido ao facto de o hidrogénio possuir uma constante de difusão elevada é possível que a sua concentração varie significativamente a escala microbiobiológica. Nestas condições é possível que as duas reacções possam ser exotérmicas para a mesma vizinhança microespacial (Chynoweth, 1987). Apesar de este processo nunca ter sido demonstrado e o seu papel ainda não ser suficientemente conhecido (Santino, 2006; Chynoweth, 1987), é referido que estas colaboram na manutenção de valores baixos de pressão parcial de hidrogénio (Santino, 2006) contribuindo para a produção de 10 % da totalidade do acetato (Duarte, 1991).

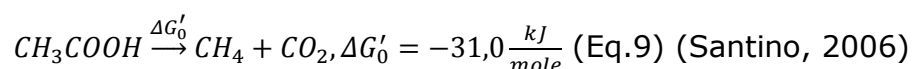
Os organismos responsáveis pela síntese de ácidos orgânicos tais como propionato e butirato a partir de compostos C1 são *Peptostreptococcus productus* e *Acetobacterium woodii* e *Desulfobulbus propionicus* (Chynoweth, 1987). Outros organismos que sintetizam o acetato a partir do hidrogénio são *Clostridium aceticum* e *Acetobacterium sp.* (Santino, 2006).

1.1.1.3 Metanogénese

Como foi referido nos pontos anteriores o desenrolar da degradação dos compostos orgânicos, designadamente propionato e butirato, depende sobretudo da remoção constante de hidrogénio. Os organismos responsáveis pela remoção do hidrogénio são designados por bactérias metanogénicas hidrogenotróficas ou *archea*-hidrogenotróficas (Santino, 2006).



Dentro deste grupo de bactérias surgem as bactérias mais importantes no que se refere a produção de metano, designadas por bactérias metanogénicas acetoclásticas ou *archea*-acetoclásticas (Santino, 2006).



Estas bactérias obtêm energia a partir da reacção de descarboxilação do acetato formando metano e dióxido de carbono, este último por sua vez em fase aquosa forma bicarbonato contribuindo para o equilíbrio do pH do meio. Estima-se que cerca de 70 % do metano provem da descarboxilação do acetato e 30 % provenham da remoção de hidrogénio por parte das bactérias *archea*-hidrogenotróficas (Santino, 2006).

As bactérias *archea*-acetoclásticas comumente referenciadas são *Methanotherix soehngenii*, *Methanosarcina barkeri*, *Methanococcus mazei*, *Methanotherix concilii* e *Methanosarcina acetivorans* (Santino, 2006; Chynoweth, 1987).

No caso das bactérias *archea*-hidrogenotróficas normalmente as mais citadas são *Methanobrevibacter arboriphilus*, *Methanosarcina barkeri*, *Methanobacterium formicum*, *Methanothermus fervidus*, *Methanobacterium bryantii*, *Methanobacterium alcaliphilum*, *Methanogenium cariaci*, *Methanogenium marisnigri* e *Methanogenium bourgense* (Santino, 2006; Chynoweth, 1987).

Em termos de representatividade as bactérias pertencentes ao grupo *Methanosarcinas* encontram-se na maior parte dos substratos e efluentes devido ao facto de possuírem elevadas velocidades de crescimento e por serem muito versáteis relativamente à utilização de substratos: acetato, hidrogénio, dióxido de carbono e metanol. No caso das *Methanotherix* estas são bactérias que crescem muito lentamente (Santino, 2006; Chynoweth, 1987).

As *Methanotherix soehngenii* têm um pH óptimo de actividade entre 7,4 e 7,8 sendo pouco activas abaixo de 6,8. As *Methanosarcinas* possuem um campo de variação mais amplo, por exemplo (Boone, 1993) verificou-se que certas estirpes são geralmente acidófilas com um pH óptimo próximo de 5 durante o seu crescimento em determinados meios. Contudo todas as bactérias são sensíveis à temperatura aumentando a velocidade de crescimento de um factor de aproximadamente igual a 2 por cada 10° C de variação de temperatura na gama de valores mesofilicos (15-35° C).

A metanogénese pode ainda ser levada a cabo na presença de metanol, trimetilaminas, dimetilaminas e metilaminas (Chynoweth, 1992). Contudo a produção de metano a partir de acetato, formiato e hidrogénio são as reacções mais importantes na natureza.

1.1.1.4 Importância do hidrogénio no equilíbrio da digestão anaeróbia

Parece ser claro para a maioria dos autores que o controlo da pressão parcial de hidrogénio é preponderante na prevenção de uma eventual inibição do processo de digestão anaeróbia devido ao desequilíbrio do potencial redox (Chynoweth, 1987). No primeiro caso devido ao facto da não remoção de hidrogénio poder desestabilizar a regeneração do NAD^+ e portanto impedir a degradação via piruvato que permite originar ácidos gordos voláteis (acetato ou propionato e butirato) que serão importantes para os organismos seguintes. No segundo caso devido ao facto da não remoção do hidrogénio contribuir para um acumular de ácidos gordos voláteis (AGVs) uma vez que as reacções catalisadas pelas bactérias hidrogenogénicas apenas são favoráveis quando ocorre a remoção de hidrogénio.

Contudo outros autores (Boone, 1993) verificaram que, para culturas suspensas de microrganismos acidogénicos produtores de propionato e butirato, o gradiente existente de hidrogénio e a sua difusão pela membrana das bactérias metanogénicas não é suficientemente rápido pelo que as bactérias utilizam outro componente, o formiato. Os mesmos autores referem ainda a presença de bactérias acetogénicas que em vez de produzirem consomem hidrogénio.

Outros autores (Voolapalli, 2000) referem inclusive que a monitorização do H_2 tem sido tomada em conta, erroneamente, como um método de controlo do início de uma inibição e falha do sistema.

Apesar de na bibliografia ser referenciado um valor limite de pressão parcial de hidrogénio igual a $6,5 \times 10^{-5}$ atm (Voolapalli, 2000) ou $5,8 \times 10^{-5}$ atm (Chynoweth, 1987) a partir do qual a digestão anaeróbia deixa de ocorrer em equilíbrio, a verdade é que na prática se observam no espaço gasoso pressões parciais que podem variar entre $1,50 \times 10^{-5}$ a $19,96 \times 10^{-4}$ atm (Voolapalli, 2000).

Verifica-se por outro lado que durante choques de carga a produção de formiato é mais importante, uma vez que a solubilidade do H_2 é baixa na fase líquida difundindo-se muito rapidamente (Voolapalli, 2000). Têm sido também sugerido como um transportador de electrões alternativo durante as reacções de sintropia e ainda mais importante que o H_2 em meios suspensos (Boone, 1993).

Zoetemeyer referiu em 1982 uma elevada produção de formiato para pHs elevados durante a fermentação dos hidratos de carbono (Voolapalli, 2000).

Verifica-se que em reactores que tratam efluentes provenientes do fabrico de queijo (soro do leite) o formiato é o principal transportador de electrões (Bok, 2003). Foi calculado que para as culturas em suspensão, que degradam o propionato e butirato, o formiato é o principal transportador de electrões sendo 100 vezes mais importante que o hidrogénio (Bok, 2003).

Verifica-se que a razão entre formiato e hidrogénio varia exponencialmente com o pH e linearmente com a concentração do CO₂. Deste modo, para pHs ácidos a produção de H₂ é predominante enquanto para pHs neutros a produção do formiato é predominante (Voolapalli, 2000).

Em resumo, o transportador de electrões pode não ser preferencialmente o hidrogénio e, portanto, o seu papel como regulador da digestão anaeróbia deixa de ser tão importante como tem sido referenciado. Verifica-se pois que outros factores tais como a distância entre consumidores e produtores (Bok, 2003), actividade metanogénica do inóculo e a alcalinidade *versus* concentração de AGVs (Voolapalli, 2000) são parâmetros preponderantes na avaliação e manutenção do equilíbrio sintrófico na DA.

Estes factores podem ser controlados ou minimizados pela tecnologia do reactor. De um modo geral, em biomassa agregada (UASB ou filtros), a alta conversão destes sistemas é devida sobretudo à pequena distância entre as bactérias permitindo uma maior transferência de electrões entre espécies através de hidrogénio e formiato (Bok, 2003).

1.1.2 Factores de inibição *versus* optimização do processo biológico da digestão anaeróbia

A digestão anaeróbica é um processo simbiótico e sintrófico em que as bactérias dependem de outras e vice-versa na produção constante de determinados compostos que garantam a sua subsistência, pelo que a variação de alguns parâmetros, como a qualidade e a quantidade do substrato, pH, temperatura e a presença de outros receptores de electrões podem provocar o desequilíbrio do sistema levando à inibição de todo o processo.

Diversos autores (Wang, 2009; Ward, 2008; Mladenovska, 2006; Siegert, 2005; Alvarez, 2000; Boone, 1993; Chynoweth, 1987; Chynoweth, 1977) confirmam e reforçam a tese de que a produtividade da DA é condicionada por duas fases limitantes, a hidrólise e a metanogénese.

A hidrólise, como foi já referido, limita a globalidade do processo pelo simples facto de ser nesta fase que ocorre a solubilização da matéria orgânica complexa disponibilizando carbono, azoto e outros nutrientes na forma de monómeros que são importantes para o arranque e desencadear das restantes fases degradativas. E no caso da metanogénese a limitação está directamente relacionada com o facto das bactérias metanogénicas normalmente apresentarem taxas de crescimento menores que as restantes bactérias fermentativas. Neste caso, em condições favoráveis de hidrólise verifica-se um aumento da actividade das bactérias fermentativas que por sua vez disponibilizam rapidamente acetato e outros ácidos orgânicos, contudo no caso de não existirem bactérias metanogénicas suficientes para degradar rapidamente o acetato pode ocorrer a inibição do processo.

Deste modo, garantindo condições ideais de hidrólise e metanogénese, maior será a produtividade específica de biogás e eficiência de degradação da digestão anaeróbia.

Contudo as fases de hidrólise e fermentação possuem condições óptimas distintas da metanogénese. Garantir as condições óptimas para todas as bactérias num único reactor torna-se praticamente impossível, pelo que alguns autores consideram este processo demasiado lento e instável (Jegannathan, 2009).

Considerando factores abióticos como o pH verifica-se que o intervalo óptimo é muito limitado (pH entre 6.8 e 7.2), no caso das bactérias metanogénicas (Ward, 2008), outros autores consideram ainda outro intervalo referindo que a produção de metano apenas se efectua para pH entre 7,5 a 8,5 (Gunaseelan, 1995). Contrariamente, no caso da hidrólise e fermentação estas fases processam-se a pH ácido entre 5,5 a 6,5.

A parte do pH, existem outros factores que são necessários considerar de forma a otimizar o processo, seja em reactores a escala de laboratório, piloto ou industrial, tais como: presença e disponibilidade de macro e micro-nutrientes para as bactérias de crescimento lento (bactérias metanogénicas), temperatura

do processo, concentração de AGVs, relação C/N, concentração do azoto amoniacal e conteúdo em metais pesados (Siegert, 2005; Chynoweth, 1987).

Todos estes factores poderão ser controlados de diversas maneiras, dependendo do tipo de substrato utilizado, através da tecnologia e desenho do reactor, volume de inóculo ou utilizando determinadas proporções de diferentes substratos como é o caso da co-digestão (Ward, 2008; Yadvika, 2004; Chynoweth, 1987).

1.1.2.1 Macro e micro-nutrientes

A presença de micro e macro nutrientes, necessários para o desenvolvimento das bactérias de crescimento lento, neste caso bactérias metanogénicas, como é o caso de níquel (Ni) e Ferro (Fe) parecem ser essenciais devido à incorporação no factor 420 que é responsável pelo transporte de electrões e metabolismo do hidrogénio durante a produção de metano (Chynoweth, 1987). Por outro lado, dependendo da espécie e género das bactérias metanogénicas presentes verifica-se a necessidade de incorporar determinados macro-nutrientes em quantidades vestigiais: azoto, enxofre, fósforo, cobalto, molibdénio, selénio, coenzima M, ácidos gordos do tipo 2-metil butirato e acetato, aminoácidos, vitaminas (tiamina, piridoxina e *p*-aminobenzoico) (Chynoweth, 1987). Um exemplo do efeito da adição de micro-nutrientes é referido por (Boone, 1993) na digestão anaeróbia de pasto (*Napiergrass*), onde se verifica que a eficiência da degradação dos AGVs (principalmente de acetato) aumenta consideravelmente num curto espaço de tempo com a adição de micro-nutrientes (Figura 1.4.).

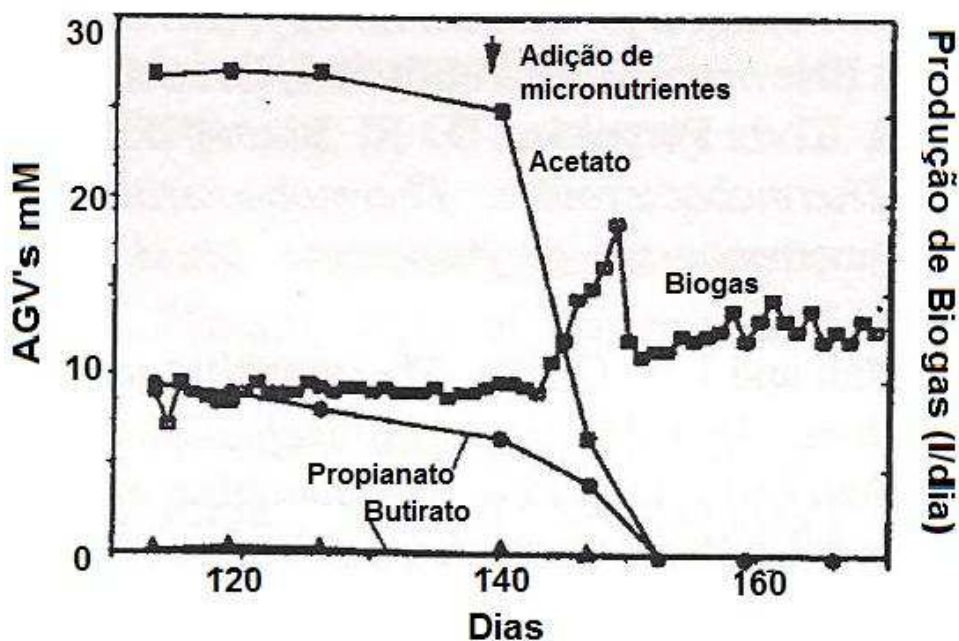


Figura 1.4- Efeito da adição de micro-nutrientes na degradação dos AGVs provenientes da fermentação do Pasto (*Napiergrass*) (Adaptado de Boone, 1993)

Em sistemas contínuos verifica-se que normalmente 20% dos hidratos de carbono e 7% das proteínas são necessários para a manutenção celular das bactérias. É também referido que cerca de 10% dos SV presentes são necessários para as necessidades celulares (Chynoweth, 1987).

O efeito dos micro-nutrientes e macro-nutrientes normalmente é referido como sendo necessário em ensaios à escala de laboratório, utilizando os métodos para avaliar a biodegradabilidade de um dado substrato, como é o caso do método desenvolvido por Owen designado por BMP (*biochemical methane potential test*) (Chynoweth, 1987) ou como referido nas normas internacionais para a avaliação da biodegradabilidade de compostos orgânicos em lamas digeridas (ISO 11734:1995).

Contudo apesar de se verificar um estímulo no desenvolvimento de culturas puras quando se utilizam culturas mistas que é o caso das culturas existentes na generalidade dos digestores anaeróbios o mesmo efeito pode não ocorrer (Chynoweth, 1987).

Na generalidade dos métodos utilizados para avaliar a biodegradabilidade de um substrato o inóculo é diluído a concentrações inferiores a 20% (v/v) (Gunaseelan, 2009) ou 1 a 3 g/l de ST (Sólidos Totais) (ISO 11734:1995) pelo que faz todo o sentido a utilização de soluções contendo micro e macro-nutrientes. É também referido que o volume de inóculo tem variado entre 2-72%

do volume útil de reactor, provavelmente dependendo das necessidades de micro e macro nutrientes (Gunaseelan, 1995).

Ao nível de digestores contínuos é referido que as carências de nutrientes podem ser superadas através da tecnologia do reactor (Chynoweth, 1987), tendo em conta que as bactérias metanogénicas são as mais afectadas pelo facto de possuírem taxas de crescimento inferiores as outras bactérias. Para assegurar uma maior colonização por parte das bactérias metanogénicas maior terá que ser o tempo de retenção hidráulico e tempo de retenção de sólidos em sistemas contínuos. A adopção de sistemas de biomassa ou biofilme fixo possibilita assegurar e garantir uma fixação da biomassa a um meio de suporte (Duarte, 1991) (Chynoweth, 1987) (Yadvika, 2004) (Ward, 2008) garantindo maior tempo de retenção e conseqüentemente de colonização das bactérias, melhorando a eficiência do processo. Por sua vez Yadvika (2004) e Ward (2008) referem ainda que o meio de suporte, dependendo do material, pode aumentar a eficiência do processo, como é o caso por exemplo da utilização de materiais de suporte com maior porosidade. Revelam que utilizando meios de suporte como o vidro (com 75 % de porosidade) e PVC (com 90 % de porosidade) obtêm-se eficiências de remoção de CQO de 77% contra 57% para a utilização de PVC com porosidade de 75%. É ainda referido que se obtêm eficiências de remoção de CQO superiores quando se utiliza argila como meio de suporte (Yadvika, 2004), sugere-se que este resultado deva-se ao facto de a argila libertar para o meio minerais de Fe^{3+} , Ni^{2+} e Co^{2+} (Ward, 2008).

1.1.2.2 Relação C/N

A adição de nutrientes, referido no ponto anterior, pode ser também efectuada com o objectivo de acertar a razão C/N de determinados substratos. Normalmente referem-se razões de C/N entre 25 a 30 como sendo ideais (Santino, 2006) contudo esta razão pode ser diferente consoante o substrato utilizado (Ward, 2008). Para substratos dificilmente degradáveis, tendo em conta o conteúdo em lenhina, são referidas como ideais razões de C/N situadas entre 16-19 (Mshandete, 2004). Gunaseelan (1995) refere razões de 11 para *Parthenium* e, por exemplo, outros autores registam razões de 6:1 e 9:1 para efluentes de avicultura, bovinicultura e suinicultura (Mshandete, 2004) ou de lamas de ETAR urbanas de 9:1 (Ward, 2008).

No caso da digestão da alga *Kelp*, pertencente ao grupo das algas castanhas, verificou-se uma produtividade de metano de 0,31-0,34 m³/kg SV utilizando uma razão C/N de 15 e uma razão C/P (carbono/fósforo) igual a 70 para reactores CSTR (reactores de mistura completa) com 18 dias de tempo de retenção de sólidos (TRS) (Chynoweth, 1987). Contudo outros investigadores referem como razões ideais as C/N e C/P próximas de 23 e 123 respectivamente, para reactores de filme fixo (Gunaseelan, 1997).

O conteúdo de nutrientes varia consideravelmente entre substratos orgânicos (Tabela 1-3) pelo que determinados reactores podem ser afectados mais que outros (Chynoweth, 1987).

Tabela 1-3- Razões de nutrientes presentes em vários substratos orgânicos (Adaptado de Chynoweth, 1987)

Substrato	Carbono/Azoto (C/N)	Carbono/Fósforo (C/P)
Aquáticos		
Kelp	15	84
Água-pé (<i>Eichhornia crassipes</i>)	10	94
Culturas herbáceas		
Gramma-bermudas (<i>Cynodon dactylon</i>)	40	194
Capim-Elefante (<i>Pennisetum purpureum</i>)	41	527
<i>Typha</i>	41	278
Lenhosos		
Eucalipto	490	446
<i>Sycamore</i>	178	2480
<i>Pinus taeda</i>	432	2600
Resíduos		
Lamas primárias	8	50
FORSU ²	76	204

No caso da *Kelp* este substrato parece apresentar uma razão C/N ideal para a sua degradação, no entanto outros substratos como culturas herbáceas ou culturas com maior conteúdo de lenhina (lenhosos) apresentam razões demasiado elevadas, pelo que a sua degradação se revela difícil. Nestes casos, a

² FORSU- Fracção Orgânica dos Resíduos Sólidos Urbanos

utilização de outros substratos com razões de C/N inferiores resulta num aumento considerável da produtividade específica de metano, processo designado por co-digestão (Mshandete, 2004; Ward, 2008; Wang, 2009a). Mshandete (2004) refere aumentos da produtividade de metano entre 59-94% na co-digestão de dois substratos com razões C/N de 40 e de 9 individualmente. Contudo verifica-se neste caso que a razão C/N obtida como ideal, na mistura dos dois substratos, é igual a 16 e portanto inferior a razão constantemente referida como ideal e igual a 25-30. Pressupõe-se neste caso que razões de C/N entre 10-30 são ideais para a digestão anaeróbia (Amon, 2006).

1.1.2.3 Concentração de AGVs versus Alcalinidade

O acerto da relação C/N de um dado substrato bem como a adição de micro-nutrientes e macro-nutrientes são efectuados de modo a garantir á partida condições ideais e de equilíbrio na digestão anaeróbia de determinados substratos. Para muitos autores (Ward, 2008; Siegert, 2005) uma forma de avaliar este equilíbrio é a medição da capacidade tampão do meio que pode ser medida através da alcalinidade e/ou concentração de AGVs. O pH pode também ser utilizado como indicador do desequilíbrio contudo o aumento da concentração de AGVs pode levar à diminuição da capacidade tampão do meio mesmo antes de ocorrer a diminuição do pH (Ward, 2008; Voolapalli, 2000).

O aumento dos AGVs tem diferentes efeitos em cada uma das etapas hidrólise, acidogenese e metanogénese (Siegert, 2005). Independentemente do pH os AGVs causam a inibição da actividade das celulasas para concentrações superiores a 2 g/l e na taxa de hidrólise da celulose, para concentrações superiores a 4 g/l inibem a degradação da glucose e para concentrações superiores a 6 g/l verifica-se uma diminuição considerável na produção de biogás e na razão obtida entre CH₄/CO₂ (Siegert, 2005). Wang (2009) analisou a influência do ácido acético, etanol, ácido propiónico e ácido butírico no processo. Refere que concentrações de ácido propiónico iguais ou superiores a 900 mg/l a actividade das bactérias fermentativas hidrogénicas³ é afectada resultando numa degradação ineficiente e respectiva acumulação de AGVs. Por outro lado mostra que para concentrações de ácido acético, etanol, ácido propiónico e ácido

³ Os autores referem-se a bactérias Acidogénicas ou fermentativas separando o processo em 3 fases: hidrólise, acidogenese e metanogénese. Contudo para manter a coerência da introdução e divisão teórica do trabalho optou-se por designar mais especificamente as bactérias hidrogenogénicas.

butírico iguais a 1600, 1600, 300 e 1800 mg/l respectivamente, quanto maior é produção de metano acumulado maior é a concentração de bactérias metanogénicas. De modo geral, assim que a concentração dos AGVs atinge uma concentração a partir da qual a actividade das bactérias fermentativas hidrogénicas é afectada ocorre a acumulação de AGVs e dependendo da alcalinidade do meio pode ocorrer um abaixamento do pH repentino. Consequentemente verifica-se uma diminuição da produtividade específica de metano e uma acumulação de ácido acético levando a completa cessação da actividade metanogénica. (Wang, 2009; Santino, 2006). Relativamente ao seu limite verifica-se que a concentração de ácido acético deverá ser mantida abaixo dos 2g/l para que a digestão seja eficiente, contudo se o sistema possuir alcalinidade suficiente para manter o pH na gama de 6.6 a 7.4 a inibição provocada pelos AGVs só se verifica para concentrações acima de 6 g/l de AGVs (Yadvika, 2004, Siegert, 2005; Santino, 2006; Wang, 2009).

A rápida acumulação de AGVs pode também ser explicada por testes de actividade biológica a diferentes substratos orgânicos: acetato, propionato, butirato formiato e hidrogénio (Mladenovska, 2006). Pelo que para maior actividade, ou seja, maior produtividade específica de metano maior é a concentração das bactérias metanogénicas no inóculo (Wang, 2009).

A capacidade tampão em testes e biodegradabilidade (BMP) (Chynoweth, 1987) (Shelton, 1984) (ISO 11734:1995) é controlada com a injeção de uma mistura de gasosa contendo 70 % de azoto e 30% de dióxido de carbono e também com a adição de uma solução tampão (NH_4Cl) que permite também equilibrar a razão C/N. Contudo Gunaseelan (1995) demonstra que a razão entre inóculo e substrato pode ser alterada de modo a manter constante o pH do meio e portanto neste caso determinadas quantidades de inóculo podem garantir capacidade tampão suficiente para o processo.

A composição de biogás permite acompanhar o aumento da concentração de AGVs e de alcalinidade (Lue-Hing, 1998) pela maior ou menor concentração de CO_2 no biogás produzido (Figura 3.5.).

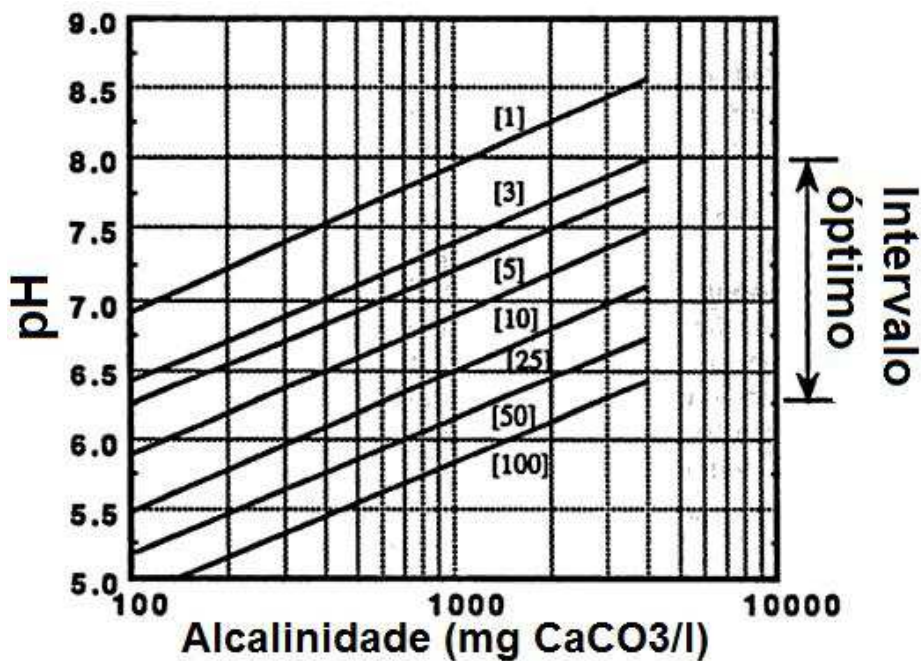


Figura 1.5- Efeito do pH e a alcalinidade do meio na concentração de CO₂ ⁴(Lue-Hing, 1998)

A concentração de CO₂ no biogás (valores entre parêntesis) aumenta com a diminuição do pH e alcalinidade. A produção de CO₂ resulta da reacção entre o bicarbonato e os AGVs (Lue-Hing, 1998). Quando a concentração de AGVs é mínima a alcalinidade por bicarbonatos é igual à alcalinidade total contudo quando a concentração de AGVs aumenta ocorre a reacção com os bicarbonatos originando sais de ácidos gordos voláteis levando à libertação de CO₂. Consequentemente a alcalinidade por bicarbonatos diminui levando à diminuição do pH e desestabilização do processo biológico.

De modo geral sem adição de suplementos sugere-se uma razão de AGVs/Alcalinidade (AGV/Alk) igual ou inferior a 0,2, contudo a alcalinidade deverá situar-se entre 2580 a 3347 mg/l (Demirel, 2009). Outros autores sugerem que a alcalinidade deverá situar-se entre 2000-4000 mg CaCO₃/l para a operação de digestores (Mshandete, 2004) e em Gunaseelan (1997) é referido que deverá ser garantido uma alcalinidade (em mg/l) igual a 0,7 x AGVs (em mg/l) não devendo esta ser inferior a 1500 mg/l.

1.1.2.4 Concentração de Azoto Amoniacal

O amoníaco (NH₃) encontra-se na água em equilíbrio com o ião amónio (NH₄⁺) e ambos inibem a DA. Contudo o amoníaco é tóxico para concentrações muito mais

⁴ Os valores entre [] representam a concentração de CO₂

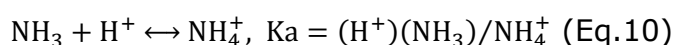
baixas do que se verifica no caso do ião amónio (Santino, 2006) sendo que para pH superiores a 7 a forma iónica apresenta um efeito tóxico (Ward, 2008).

Outros autores verificaram que para valores de pH elevados (superiores a 7) o amoníaco prevalece, e esta forma é mais inibidora do que a forma iónica (NH_4^+), contudo **o teor de a** NH_4^+ e NH_3 são medidos em conjunto e muitos dos artigos referem esta quantidade total como sendo a concentração de amoníaco que é responsável pela inibição (Alvarez, 2000). Verificou-se que a inibição na digestão anaeróbia ocorre para valores iguais ou superiores de azoto amoniacal superiores a 1200 mg/l (Alvarez, 2000).

Lay (1997) estudou a influência da concentração de NH_4^+ na actividade metanogénica para uma gama de valores de pH entre 6,5-9. Verificou-se para todos os casos que a actividade metanogénica diminui para valores crescentes de concentrações de NH_4^+ -N.

Em Alvarez (2000) são referidos ainda alguns resultados relativos ao efeito da concentração da amónia na degradação da glucose obtidos por Fujishima, Miyahara e Noike em 1999. Estes autores investigaram o efeito da concentração do ião amónio na degradação da glucose e na actividade acetoclástica das bactérias metanogénicas previamente incubadas num meio com concentração de amoníaco igual a 3100 mgN/l. Concluíram que quando a concentração aumenta de 740 a 3100 mgN/l a degradação da glucose é significativamente afectada. É sugerido que a acumulação de amoníaco inibe a glicólise.

De modo geral na água ocorre um equilíbrio entre o ião amónio e o amoníaco através da seguinte equação:



Onde K_a é constante de ionização ($K_a=1,13 \times 10^{-9}$, $T=35^\circ\text{C}$).

Com base na equação, para pH ácido o equilíbrio desloca-se para a direita e o ião amónio pode provocar inibição da reacção. Para valores de pH elevado o equilíbrio desloca-se para a esquerda e a inibição pode ser originada pelo amoníaco (Santino, 2006).

Contudo, segundo valores obtidos por McCarty, referidos em Santino (2006), o efeito do amoníaco *versus* ião amónio referido através da concentração de azoto amoniacal tem os seguintes efeitos na DA (Tabela 1-4).

Tabela 1-4- Efeito da concentração de azoto amoniacal (Santino, 2006)

Concentração de azoto amoniacal em excesso, em termos de N (mg/l)	Efeito
50-200	Benéfico
200-1000	Efeito nulo
1500-3000	Inibição, se o valor de pH for superior a 7.4-7.6
>3000	Tóxico

1.1.2.5 Temperatura do processo

A digestão anaeróbia pode desenvolver-se a temperaturas psicrófilas inferiores a 20°C. Contudo na generalidade dos reactores anaeróbios normalmente são utilizadas temperaturas mesófilas (35°C) ou termófilas (55°C) (Ward, 2008). A estrutura da população microbiana é bem diferente para cada uma destas temperaturas verificando-se que uma mudança entre temperaturas mesófilas e temperaturas termófilas (ou vice-versa) pode resultar numa redução brusca da produção de biogás até que a população melhor adaptada se desenvolva (Ward, 2008).

Em Alvarez (2008), por exemplo, verificou-se que a temperatura teve influência sobre a produtividade de biogás. A alteração brusca de 35 °C para 25°C resultou numa redução de aproximadamente 30% da taxa de produção de biogás enquanto para uma redução entre os 25°C – 18°C resultou numa redução de 51%. Contudo verificam que o conteúdo de metano no biogás aumentava para baixas temperaturas, uma variação entre 35°C para 18°C o conteúdo de metano variou de 49% para 61%.

O mesmo estudo mostra que ocorrem efeitos positivos ao nível da produtividade de biogás quando os digestores são operados com variações cíclicas de temperatura. Por exemplo, quando ocorrem choques de temperatura entre 19-32°C ou 15-29°C a diferença de produtividade específica comparativamente ao reactor operado à temperatura constante e igual a 35°C não é muito diferente. A subida repentina de temperatura aumenta drasticamente a actividade metanogénica pelo que o volume de biogás produzido para um mesmo período (de 12h) é superior ao do reactor operado com temperaturas constantes. Estes resultados são interessantes no que se refere à gestão económica e energética associada à operacionalidade das plantas de biogás.

1.1.2.6 Metais alcalinos e alcalino terrosos

A inibição por metais alcalinos e alcalinos terrosos é causada por concentrações muito elevadas, dependendo do catião associado, em contrapartida também se podem destacar efeitos estimuladores para concentrações menores. De modo geral poder-se-á definir os seguintes efeitos (Tabela 3-5) dependendo da concentração (Santino, 2006):

Tabela 1-5- Efeito da concentração dos catiões metálicos na digestão anaeróbia (Santino, 2006)

Catião	Efeito Estimulador (mg/l)	Inibição moderada (mg/l)	Inibição forte (mg/l)
Sódio	100-200	3500-5500	8000
Potássio	200-400	2500-4500	12000
Cálcio	100-200	2500-4500	8000
Magnésio	75-150	1000-1500	3000

Outros autores referem, por exemplo, no caso do cálcio que com o aumento da sua concentração o desempenho da DA melhora, sendo que a concentração ideal é de 3g/l. Para concentrações de 5-7 g/l o desempenho diminui ocorrendo inibição do processo (Ahn, 2006). Contudo estes resultados foram obtidos no tratamento de efluentes de suinicultura e provavelmente consoante o efluente esta concentração óptima poderá variar.

1.2 Digestão Anaeróbia de Biomassa

A utilização de biomassa como substrato da DA para a produção de biogás tem vindo a crescer um pouco por todo mundo e em especial na Europa.

Na Alemanha, onde tradicionalmente os digestores funcionavam apenas com chorume de vacaria ou suinicultura, neste momento, devido aos subsídios aplicados para a produção de electricidade proveniente de biogás verifica-se que cerca de 90% do substrato utilizado são culturas energéticas, sobretudo com o objectivo de aumentar o rendimento de produção de gás (Bohn, 2007).

A utilização de substratos lenhocelulosicos é de facto referida como sendo uma das técnicas para o aumento da produção de biogás e de metano. A utilização de folhas de algumas plantas e legumes (ex: *Gulmohar*, *Leucena leucocephala*, *Acacia auriculiformis*, *Dalbergia sisoo* e *Eucalyptus tereticonius*) aumentou a produção de biogás entre 18-40%. Resíduos de culturas tais como os caules do milho, palha de arroz, caules de algodão, caules de trigo e de água-pé com a adição de chorume de vaca parcialmente digerido, melhorou a produção de gás entre 10-80%. Este aumento de biogás parece estar relacionado com a adsorção do substrato na superfície destes aditivos, favorecendo localmente uma concentração do substrato e melhores condições para o crescimento microbiano (Yadvika, 2004; Chanakya, 2009).

Como já foi referido pelo menos metade da população mundial reside em meios rurais onde é maior a disponibilidade e acessibilidade de resíduos agro-pecuários ou culturas energéticas. No caso da Europa estima-se que cerca de 91% do seu território é ocupado por zonas rurais onde reside 56% da população total (EC, 2009). Tendo em conta a nova directiva UE (2008/98/EC) é referido que a contribuição dos biocombustíveis provenientes de resíduos e material lenhocelulosicos, provenientes de culturas não alimentícias, deverá duplicar em relação aos biocombustíveis provenientes de outras matérias-primas, também designados combustíveis de 2ª geração (Baxter, 2009).

Contudo a digestão anaeróbia de biomassa não esta directamente ligada à utilização de culturas energéticas. Neste caso um conjunto de substratos de biomassa poderão ser considerados, desde terrestres (fracção orgânica dos resíduos sólidos urbanos, resíduos sólidos de fruta e vegetais, folhas, pastos, madeira e culturas herbáceas) a aquáticos (algas e plantas aquáticas de água doce) (Gunaseelan, 1997).

A produção de metano a partir da digestão anaeróbia de biomassa apresenta algumas vantagens, relativamente a outros combustíveis que poderão igualmente ser produzidos, como é o caso do metanol e hidrogénio cuja tecnologia de produção e utilização não se encontra suficientemente desenvolvida e, por outro lado, a produção a partir de biomassa é mais difícil. A par do biometano surge o bioetanol, que apresenta a vantagem de ser facilmente transportado e armazenado, existindo também um mercado maior, em termos do número de veículos que possam utilizar etanol como combustível, mas apresenta a desvantagem de ter uma eficiência global do processo menor (Chynoweth, 2001). A produção de bioetanol é usualmente derivada de fontes que contenham um elevado conteúdo de açúcares com polímeros de 6 carbonos. Contudo a digestão anaeróbia aparece como uma boa alternativa pois permite a utilização completa dos açúcares incluindo os que são constituídos por polímeros de 5 átomos de carbono (Bauer, 2009).

A produção de bioetanol a partir de biomassa requer um pré-tratamento mais eficiente, uma maior manutenção da cultura, necessidades energéticas superiores associadas ao processamento da biomassa e na separação dos produtos (Hendriks, 2009; Chynoweth, 2001). Verifica-se que a produção de biometano proveniente de culturas energéticas (trigo, sorgo e beterraba) é mais eficiente em termos de energia produzida (17% mais energia produzida), energia consumida (menos 34% de energia consumida) e custo (menos 24 % do custo final) em comparação com a produção de etanol (Murphy, 2009).

Por outro lado, a digestão anaeróbia pode mesmo ser considerado como um processo complementar de outras biorefinarias, por exemplo no tratamento do destilado proveniente da produção de bioetanol (DDGS- *Distillers Dried Grains with Solubles*) ou do tratamento da glicerina proveniente da produção de biodiesel (Amon, 2007). O aproveitamento do DDGS na produção de biogás pode reduzir a dependência energética do etanol, redução que pode atingir os 60% (Cassidy, 2008). Outro caso similar é a produção de biodiesel (Gunaseelan, 2008) que comparou a produção de energia (biometano e biodiesel) obtida com a utilização das sementes de *Jatropha curcas*. Neste caso são estudados dois cenários. *Cenário 1* onde se produz biodiesel utilizando as sementes de *Jatropha* e biometano a partir do bolo de extracção resultante da produção de biodiesel e *cenário 2* onde as sementes são utilizadas apenas para a produção de biometano. Ainda que sejam ensaios preliminares à escala laboratorial, como é referido pelo autor, verifica-se que no *cenário 1* a produção de energia associada

aos dois processos é menor, e igual a 72 GJ/ha/ano, do que a produção de biometano utilizando apenas as sementes, igual a 79 GJ/ha/ano. Contudo, verifica-se que utilizando toda a cultura, sementes, caules, folhas e bolo de extracção para a produção de biodiesel e biometano produz-se em conjunto 90 GJ/ha/ano. Apesar de ser ainda um estudo preliminar verifica-se que a utilização de toda uma cultura para a produção de biometano apresenta um maior valor acrescentado no que se refere apenas à produção de energia. Para além do factor de eficiência na conversão e aproveitamento da energia contida numa cultura, outros factores deverão ainda ser considerados tais como a utilização do digerido como fertilizante da própria cultura e o balanço final de carbono e azoto que daí advém e que poderá aumentar significativamente o interesse da tecnologia de digestão anaeróbia e produção de biometano utilizando culturas que normalmente são utilizadas para a produção de biocombustíveis líquidos.

De uma maneira geral a cadeia do processo de produção de biogás, proveniente de biomassa e/ou culturas energéticas, pode ser dividida em 4 fases (Amon, 2006) que por sua vez dependem de diversos factores esquematizados na Figura 1.6:

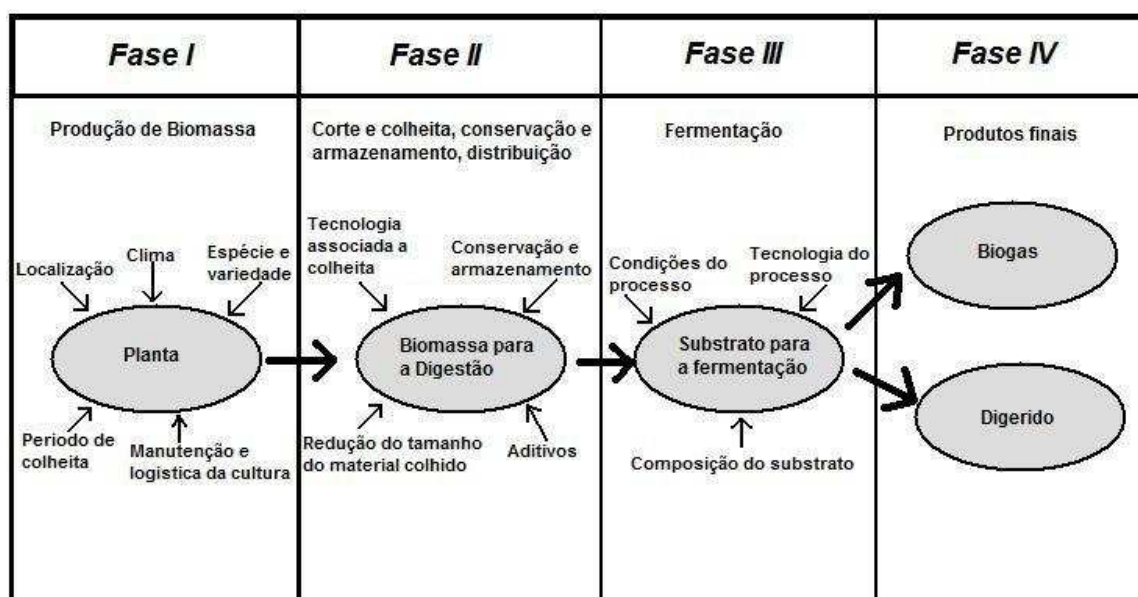


Figura 1.6- Fases do processo e variáveis associadas a produção de biogás utilizando biomassa como substrato (adaptado de Amon, 2006)

Diversos factores, desde a produção e corte da biomassa, passando pela conservação e armazenamento, até a sua utilização como substrato da digestão anaeróbia poderão influenciar quantitativamente e/ou qualitativamente a composição dos produtos finais biogás e digerido (biofertilizante).

1.2.1 Produção de Biomassa (Fase I)

A selecção da melhor cultura energética para a produção de metano é realizada com base no rendimento energético por hectare que é definido sobretudo pela produtividade da biomassa alcançada durante os anos de exploração da cultura e da sua conversão em metano, bem como entradas (energéticos e nutricionais) necessários (Lehtomäki, 2006). Este factor é expresso em volume de metano (m³) por área (ha) ou volume de metano (m³) por massa de biomassa.

De modo geral as culturas energéticas deverão ser fáceis de cultivar, colher e armazenar, tolerantes a pestes ou ervas daninhas e doenças, secas e geadas, e possuir capacidade para crescer em solos pouco férteis (Lehtomäki, 2006).

Diferentes culturas têm sido avaliadas quanto ao seu potencial em metano (Gunaseelan 1997), e por outro lado têm sido estudadas em várias regiões específicas na Europa Central e do Norte (Murphy, 2009; Prochnow, 2009; Amon, 2007; Gerin, 2007; Lehtomäki, 2006), nos Estados Unidos da América (Florida) (Turick, 1991; Chynoweth, 1987 e 1985; Jerger, 1982 e 1987) e Índia (Gunaseelan, 2009; Gunaseelan, 2008). Na Tabela 1-6 apresentam-se alguns exemplos do potencial de metano e do potencial energético de várias culturas:

Tabela 1-6- Potencial de metano e energético para diferentes culturas energéticas e resíduos de culturas (adaptado de: Lehtomäki, 2006; Gunaseelan, 1997 e 2008; Chynoweth, 1985; Amon, 2007)

Substrato	Potencial de metano			Potencial energético (MWh/ha/a)
	m ³ CH ₄ /kg SV	m ³ CH ₄ /t MF	m ³ CH ₄ /ha/a	
Forragem da Beterraba	0,46	NA	5800	56
"	0,36	55	3240	34
Alfalfa (<i>Medicago sativa</i>)	0,41	NA	3965	38
"	0,32	56	2304	24
Batata	0,28	NA	2280	22
Milho	0,41	NA	5780	56
Milho	0,27-0,37	NA	6700-7200	NA
Trigo	0,39	NA	2960	28
Cevada	0,36	NA	2030	20
Colza	0,34	NA	1190	12
Pasto	0,41	NA	4060	39
Pasto	0,27	46	1908	20
Pasto	0,27-0,35	64-83	NA	NA
Sorgo	0,28-0,40	NA	NA	NA
Trevo	0,35	NA	2530	25
Trevo	0,14-0,21	24-36	NA	NA
Jerusalem artichoke	0,27	49	1680	16
Couve-flôr ou couve-portuguesa	0,32	42	2862	30
Beterraba	0,23	0,19	2304	24
Palha	0,25-0,26	NA	NA	NA
Palha	0,30	139-145	NA	NA
Madeira de Algodão	0,22		NA	NA

Eucalipto	0,014	NA	NA	NA
Choupo (Híbrido de <i>P. alba</i> x <i>P. tremula</i>)	0,32	NA	NA	NA
Sicômoro (<i>Ficus sycomorus</i>)	0,32	NA	NA	NA
Algas (Kelp, <i>Ulva</i> , <i>Cladophora</i>)	0,31-0,48	NA	NA	NA
<i>Parthenium hysterophorus</i>	0,15	NA	NA	NA
<i>Jatropha curcus</i> (folhas)	0,22-0,34	NA	NA	NA
<i>Jatropha curcus</i> (sementes)	0,97	NA	NA	21,9

1.2.1.1 Efeito do período e frequência de colheita

A produção de metano pode ser afectada pela composição química da planta que se altera ao longo do estado de maturação, pelo que factores como o período de colheita, frequência de colheita e selectividade da colheita (se engloba todos os componentes da cultura: sementes, caules e folhas ou não) (Amon, 2006) (Chynoweth, 1987 e 1985) (Gunaseelan, 1997), são parâmetros críticos para a optimização do potencial de metano de uma determinada cultura.

Diversos estudos têm referido a influência do período de colheita na produtividade específica de metano (Tabela 1-7). Contudo por vezes os resultados apresentam pouca consistência para determinadas culturas, por exemplo são referidos para o trevo aumentos de 50% quando colhido no estado vegetativo em comparação com a época de floração, mas em outros estudos é referida uma redução de 32 % para o mesmo período (Lehtomäki, 2006). Para o trigo não se verificou nenhuma influência, no entanto utilizando outras culturas cerealíferas como a cevada e o centeio verificou-se que ocorre um aumento de 11-14% quando a colheita é efectuada no estado intermédio de maturação das culturas (Lehtomäki, 2006). Verifica-se que, para as variedades de milho estudadas, o rendimento da biomassa e a produtividade específica de metano desenvolvem-se em sentidos opostos. Por outro lado a produtividade de metano por hectare é predominantemente influenciada pela variedade da cultura que por sua vez possui um período óptimo para colheita (Amon, 2006).

Em espécies pertencentes a pastagens como *Lolium* (*RyeGrass*), capim (napier grass – *Pennisetum purpureum*) ou ainda *Alopecurus pratensis* (ou Meadow foxtail), apesar dos resultados não serem totalmente consistentes, verifica-se que na generalidade das pastagens analisadas em (Lehtomäki, 2006; Prochnow, 2009) ocorre um aumento da produtividade específica de metano quando as culturas são colhidas na época de floração ou início desta (inflorescência) em comparação com a época vegetativa. Verificam-se algumas excepções como é o caso do *Alopecurus pratensis* e do *Pennisetum purpureum* que podem estar

relacionadas com a frequência de colheita, pouca exactidão do grau de maturação no momento do corte e/ou a variedade utilizada (Prochnow, 2009). Por exemplo verifica-se que a produtividade específica de metano variou entre 0,28 e 0,40 l CH₄/g SV para diferentes variedades de *Sorghum* (Jerger, 1987).

Tabela 1-7- Exemplo do efeito do período de colheita na produtividade de metano (Adaptado de: Lehtomäki, 2006 e Amon, 2007)

Substratos	Período de colheita/estado de maturação da cultura	Produtividade específica de metano (m ³ CH ₄ /kg SV ou m ³ /kg MO)	Produtividade de metano por área (m ³ /ha)
Trevo	Menor grau de maturação (Vegetativo)	0,14-0,21	NA
	Maior grau de maturação (Floração)		NA
Trevo	Menor grau de maturação (Vegetativo)	0,38	NA
	Grau intermédio de maturação	0,55	NA
	Maior grau de maturação (Floração)	0,56	NA
<i>Lolium</i> (França-pirineus)	Menor grau de maturação (Vegetativo)	0,42	NA
	Grau intermédio de maturação	0,62	NA
	Maior grau de maturação (Floração)	0,63	NA
<i>Alopecurus pratensis</i> (Alemanha-Nordeste)	Junho de 2002	0,30	NA
	Setembro de 2003	0,22	NA
	Fevereiro de 2004	0,15	NA
Pastagem (feno)	3 cortes por ano (durante o período de inflorescência)	0,22-0,36	NA
	2 cortes por ano (durante o período de floração)	0,17	NA
	1 corte por ano (após a floração)	0,15	NA
Trigo	Menor grau de maturação (Vegetativo)	0,38	NA
	Grau intermédio de maturação	0,39	NA
	Maior grau de maturação (Floração)	0,42	NA
Milho	Menor grau de maturação (Vegetativo)	0,37	6700
	Grau intermédio de maturação	0,30	7200
	Maior grau de maturação (Floração)	0,27	7200
Cevada	Menor grau de maturação (Vegetativo)	0,35	NA
	Grau intermédio de maturação	0,50	NA
	Maior grau de maturação (Floração)	0,44	NA
Centeio	Menor grau de maturação (Vegetativo)	0,28	NA
	Grau intermédio de maturação	0,41	NA
	Maior grau de maturação (Floração)	0,37	NA

Apesar do efeito do período de colheita na produtividade de metano ser bem visível para algumas culturas, outros factores parecem estar relacionados como é o caso das espécies e variedade de espécies utilizadas nos ensaios de biodegradação, as condições de cultivo (clima e nutrientes) a que foram sujeitas as culturas e a idade da cultura.

Amon (2007) desenvolveu um modelo de previsão da produtividade teórica de metano com base na composição nutritiva de uma dada cultura (proteína, gordura, celulose e hemiceluloses) concluindo que a produção total de metano é dependente essencialmente do conteúdo em proteína e gordura. Derenzo (2000) verificou que o conteúdo de proteína para o Capim Elefante diminui consideravelmente com a idade da cultura.

Resumidamente, o período de colheita e o grau de maturação de uma cultura bem como a sua composição no momento do corte parecem influenciar directamente a produtividade específica de metano. Verifica-se que, de um modo geral a produtividade de metano de uma cultura é menor com o aumento do seu grau de maturação (Amon, 2007; Prochnow, 2009). Contudo podem existir outros factores que poderão determinar o melhor período de colheita como a espécie/variedade da cultura e condições de cultivo.

1.2.2 Armazenamento e conservação após colheita (Fase II)

De modo geral a biomassa apresenta um conteúdo em hidratos de carbono não estruturais que podem ser degradados facilmente em condições subóptimas de armazenamento, ocorrendo a diminuição do conteúdo nutritivo do material e por sua vez diminuindo a produtividade específica de metano (Lehtomäki, 2006; Kamm, 2007; Amon, 2007; Pakarinen, 2008). Outro aspecto relacionado com a conservação da qualidade do material colhido é o de garantir a continuidade da alimentação do digestor durante o período em que decorre o ciclo da cultura que pode demorar de 3 meses a 1 ano dependendo da cultura.

A adopção de técnicas rudimentares normalmente utilizadas na agricultura, como a ensilagem, favorece a conservação do material colhido. Esta técnica recentemente estudada (Pakarinen, 2008) permite concluir que, em condições apropriadas de ensilagem, o material poderá ser armazenado durante 11 meses permitindo conservar cerca de 90% do conteúdo energético das culturas e pelo

contrário em condições não ótimas de armazenamento, 50% do potencial de metano da cultura é perdido. O conteúdo energético de uma cultura que influencia a produtividade final de metano é determinado de um modo simples pelo conteúdo em SV, pelo que para reduções maiores de SV, durante o armazenamento de uma cultura, menor é a produtividade específica de metano (Pakarinen, 2008).

De modo geral verifica-se um efeito positivo na utilização da ensilagem como método de armazenamento e conservação da biomassa colhida. A produtividade de metano obtida para uma cultura após ensilagem é quase sempre superior quando esta não é armazenada por esta via (Pakarinen, 2008; Prochnow, 2009). A ensilagem favorece a solubilização dos açúcares provenientes da hemiceluloses (Pakarinen, 2008), contudo após abertura do silo é necessário manter as condições anaeróbias para que não ocorra a degradação desses açúcares (Prochnow, 2009). Determinados factores como um maior conteúdo em sólidos *versus* menor humidade, menor dimensão das partículas, adição de aditivos e o controlo do pH do meio (ácido) de ensilagem parece serem preponderantes na eficiência da ensilagem (Pakarinen, 2008; Prochnow, 2009). Dependendo da composição da cultura colocada no silo, verifica-se que estes factores proporcionam um maior desenvolvimento das bactérias lácticas em comparação com outras bactérias do grupo *clostridia* *Clostridium proteolitica* que provocam a degradação e conseqüente perda da energia contida na biomassa (Pakarinen, 2008; Prochnow, 2009).

1.2.3 Composição do substrato *versus* fermentação (Fase III)

Como já foi referido a etapa limitante da digestão anaeróbia de substratos orgânicos insolúveis é a hidrólise e a conseqüente solubilização dos compostos orgânicos.

De modo geral esta dificuldade esta associada a presença de lenhina. A lenhina é refractária (não é digerida) à DA mesmo para longos períodos de tempo, devido a falta de enzimas capazes de a degradar ou à necessidade de oxigénio por outras enzimas para levar a cabo a degradação da lenhina (Chynoweth, 1987).

Alguns modelos matemáticos têm sido desenvolvidos para estimar a biodegradabilidade de um dado substrato com base na sua composição (Amon,

2007). Por exemplo, Chandler referido em Chynoweth (1987) e Amon (2007) aplicou estes modelos de modo a prever a biodegradabilidade utilizando diversas análises químicas e físicas de um grande número de substratos, chegando à equação que prevê a biodegradabilidade de um dado substrato com base no seu conteúdo em lenhina (Amon, 2007; Chynoweth, 1987):

$$B = 0,83 - 0,028x \text{ (Eq. 11)}$$

Onde B é fracção biodegradável dum substrato dependendo do seu conteúdo em lenhina (x, em % SV).

Conclui-se que quanto maior é o seu conteúdo em lenhina menor é a sua biodegradabilidade. Por outro lado a presença de lenhina afecta ou impede a degradação da celulose e das hemiceluloses (Mosier, 2005b).

Alguns autores referem que a dificuldade de degradação da celulose e das hemiceluloses pode ser superada mediante a utilização de um inóculo contendo celulasas e a utilização de um volume elevado de inóculo (Sullivan, 2008; Sullivan, 2005; Hu, 2005; Hu, 2004; Mosier, 2005b; Gunaseelan, 1997; Gunaseelan, 1995; Chynoweth, 1987). De certo modo, aumentando a presença de celulasas no inóculo e utilizando volumes elevados de inóculo, maior será a especificidade da degradação e maior é a superfície de contacto, levando a um aumento da cinética da degradação.

O consórcio de organismos existentes no rúmen é referido como sendo altamente eficiente na degradação de substratos celulíticos, como pasto e grãos que são a maioria dos alimentos dos ruminantes. Em termos operacionais verifica-se que o inóculo do rúmen hidrolisa a celulose presente em substratos orgânicos a taxas não atingidas por organismos presentes nos efluentes domésticos e resíduos orgânicos (Sullivan, 2008; Ward, 2008; Hu, 2005; Hu, 2004).

Hu (2005) verificou que 55-70% dos resíduos da cultura do milho (caules e folhas) foram convertidos durante a digestão anaeróbia quando se utilizou rúmen como inóculo. Ward (2008) referiu uma solubilização de 90% das fibras existentes numa mistura de resíduos, contendo 70% de resíduos alimentares, 20% de fezes e 10% de algas verdes, quando se utilizam bactérias celulolíticas existentes no rúmen como a *Fibrobacter succinogenes*.

Contudo é também referido que as bactérias celulolíticas podem potencialmente entrar no digestor municipal devido às águas pluviais ou através das fezes dos

seres humanos ou animais. Estas bactérias são conhecidas por se encontrarem presentes no cólon humano e no ceco dos ratos, nos intestinos dos cavalos e nos sedimentos estuarinos, etc. Por exemplo, o GTI (Gas Technology Institute of Chicago) efectuou diversos estudos utilizando inóculo proveniente de sedimentos estuarinos para digerir a alga *Kelp*. Verificaram que não ocorria uma degradação tão acentuada como a que se verifica com a utilização de inóculo proveniente das lamas de ETAR (Chynoweth, 1987).

De modo geral, é possível que existam bactérias celulolíticas nos digestores municipais, contudo a eficiência de degradação parece ser superior quando se utilizam as bactérias presentes no rúmen. Esta diferença parece estar associada á comunidade microbiana existente. No caso do rúmen os microrganismos mais importantes e que degradam a celulose são *Fibrobacter succinogenes*, *R. albus* e *Ruminococcus flavifaciens*. Enquanto nos aterros sanitários e digestores anaeróbios municipais encontram-se presentes outras espécies de microrganismos tais como as pertencentes aos grupos *Firmicutes* e *Clostridia* (Sullivan, 2008).

1.2.3.1 Composição da biomassa lenhocelulósica

A composição da biomassa lenhocelulósica pode variar consideravelmente entre grupos (lenhosas, herbáceas, algas) mas pode também variar entre espécies e dentro da própria espécie dependendo das condições de cultivo e crescimento (Prochnow, 2009; Amon, 2007; Chynoweth, 1987). A composição do substrato é pois o principal factor a afectar o rendimento específico de metano. Chynoweth (1987) refere por exemplo que, no caso de culturas como o sorgo/cana-de-açúcar ou kelp a biodegradabilidade elevada se deve ao conteúdo em sacarose e manitol respectivamente. Por exemplo tem-se vindo a utilizar determinados aditivos inorgânicos como aumento da produtividade específica de biogás de determinados substratos, como por exemplo a pectina, que é um dos elementos presentes na biomassa lenhocelulósica. Verificou-se que a adição de 10g/l de pectina na digestão de estrume de vaca contribuía para um aumento na produção específica de biogás em cerca de 150% com conteúdo de metano igual a 65% (Yadvika, 2004).

Apesar da lenhina ser refractária a DA outros factores deverão ser também considerados na degradação de uma planta, como o material celular não

associado à matriz lenhocelulósica: hidratos de carbono solúveis e não estruturais bem como compostos azotados como as proteínas e ácidos nucleicos.

De modo geral a biomassa lenhocelulósica pode ser visualizada como um organismo vivo constituído por ramos, caules, folhas, etc. Trata-se de um organismo constituído por um conjunto de tecidos com diferentes funções e que formam as folhas, caules, ramos, raízes, flores e frutos. A biomassa apresenta 3 tipos de tecidos:

- Tecido de revestimento (epiderme) - células que formam a camada superficial das folhas e caules;
- Tecidos vasculares (xilema e floema) que têm a função de transportar os fluidos e nutrientes internamente;
- Tecido de sustentação e preenchimento (clorênquima, esclerênquima e parênquima) - células que produzem os nutrientes através da fotossíntese e armazenam os nutrientes no interior das células e conferem suporte.

Em geral a celulose ocupa cerca de 90% em peso seco da parede celular das células que constituem estes tecidos, sendo o biopolímero mais abundante na natureza compreendendo cerca de 45% do peso seco da madeira podendo chegar a 98 % do peso seco de determinadas grupos como por exemplo na juta, linho e algodão. O interesse de utilizar a biomassa como substrato da DA advém deste facto. Contudo a celulose é um polímero bastante cristalino e com um elevado grau de polimerização o que torna difícil a sua solubilização (Rowell, 2005; Chynoweth, 1987).

A unidade repetitiva da celulose é designada por celobiose e é formada por duas unidades de glucose, unidas por ligações β -(1-4), conhecidas por ligações glicosídicas (Figura 1.7). O grau de polimerização da celulose é devido ao número de moléculas de glucose. Goring e Timell (1962) determinaram a média do grau de polimerização (DP) para a celulose de várias espécies utilizando um processo de nitração. Verificando-se que a celulose da madeira apresenta um grau de polimerização entre 9000-10000 unidades podendo possivelmente atingir as 15000 unidades. Um grau de polimerização igual a 10000 corresponde a uma cadeia linear de aproximadamente igual a 5 μ m correspondente a um peso molecular entre 10000 a 150000 (Rowell, 2005).

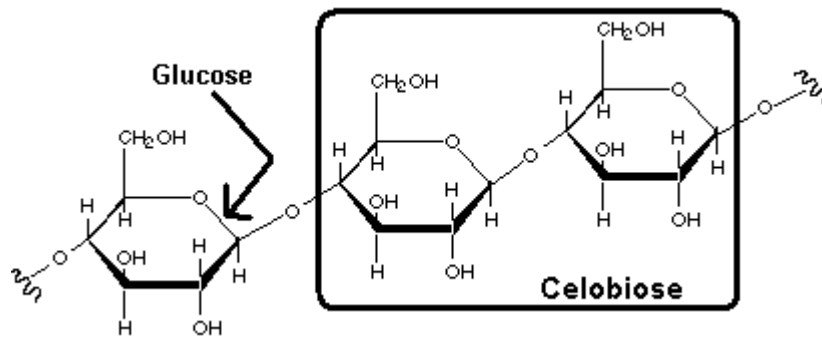


Figura 1.7- Unidades básicas da molécula de celulose (adaptado de SIGMA, 2009)

A estrutura linear que lhe é característica permite que este polímero estabeleça ligações por pontes de hidrogénio intra e intermoleculares, resultando na agregação das cadeias poliméricas e formando uma estrutura cristalina ou microfibrila constituída por 36 cadeias de celulose ou micelas (Figura 1.8) e posteriormente em macrofibrilas (Jørgensen, 2007; Magenta, 2009). A celulose está associada a outros polissacarídeos, principalmente hemiceluloses (xiloglucanas e xilanas) e compostos pécnicos (galacturonanos).

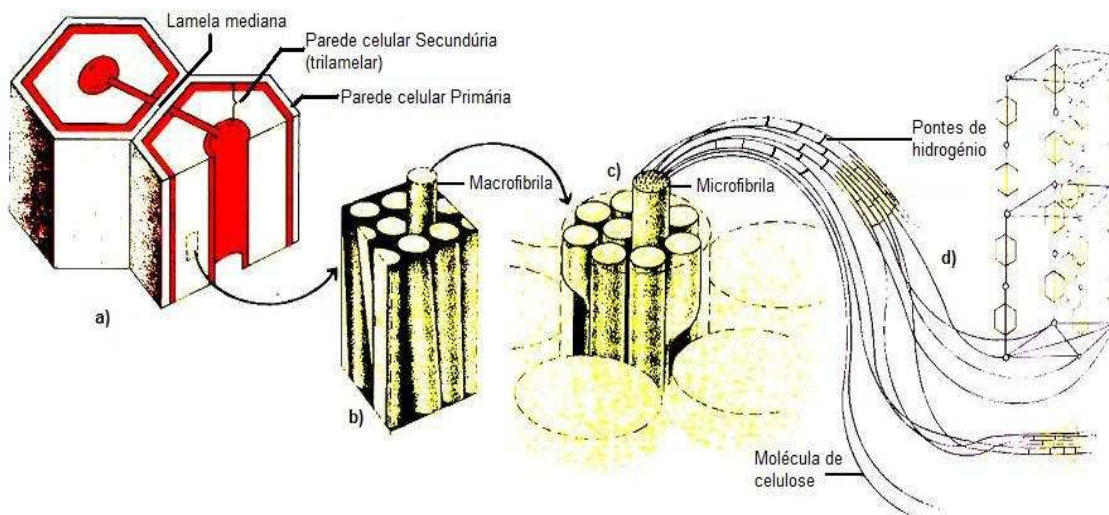


Figura 1.8- Estrutura simplificada de uma fibra vegetal: a) Parede celular; b) Macro-Fibrilas, c) Micro-fibrilas, d) micelas (adaptado de Magenta, 2009)

Existem diferentes tipos de celulose na madeira: cristalina (não acessível) e não cristalina ou amorfa (acessível). A celulose acessível e não acessível refere-se à disponibilidade da celulose em relação à água, microrganismos, etc. Por outro lado, a celulose não cristalina apesar de se encontrar acessível pode tornar-se não acessível devido ao facto de estar "coberta" com cadeias de hemiceluloses e lenhina que dificultam o acesso por parte da água e microrganismos. Esta celulose é designada por celulose I ou celulose original e é o único tipo de celulose que ocorre na natureza (Rowell, 2005). Alguns autores indicam que

apesar da estrutura elementar da fibrila ser cristalina defendem que a sua superfície é amorfa. A superfície hidrofóbica da celulose forma uma camada densa de água em seu redor, que impossibilita a difusão das enzimas e consequente degradação (Jørgensen, 2007).

A estrutura da celulose em conjunto com as ligações intermoleculares por pontes de hidrogénio confere a este polímero uma considerável força à tensão pelo que torna este polímero insolúvel para a maioridade dos solventes sendo por conseguinte dificilmente degradável.

A celulose original é insolúvel na maior parte dos solventes inclusive em bases fortes. O tratamento com bases fortes causa a dilatação da celulose mas não causa a solubilização ou dissolução. Pelo contrário, a celulose dissolve-se em ácidos fortes tais como 72% de ácido sulfúrico, 41% de ácido hidrocloreídrico e 85% de ácido fosfórico. Posto isto é muito difícil de isolar a celulose da madeira numa forma pura uma vez que esta está intimamente associada à lenhina e hemicelulose formando uma matriz celular lenhocelulosica (Magenta, 2009).

Em termos gerais a matriz celular de uma planta apresenta a seguinte configuração dependendo do grau de maturação (Figura 1.9):

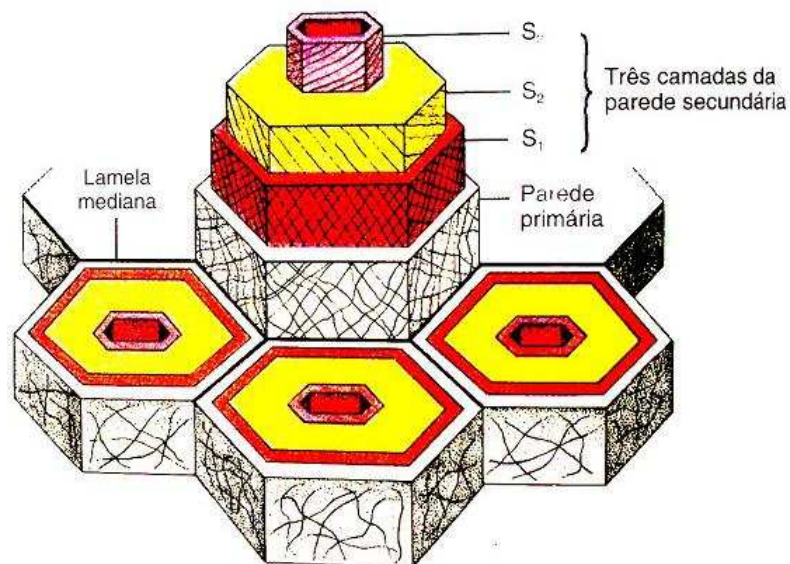


Figura 1.9- Parede celular (Magenta, 2009)

A celulose é o constituinte principal da parede celular e em redor desta encontram-se a hemiceluloses e lenhina. Na parede celular é possível distinguir 4 camadas concêntricas. A camada mais externa é designada por parede primária e possui cerca de 0,1 mm de espessura e contém cerca de 1/3 de celulose (Chynoweth, 1987). Esta camada é constituída essencialmente por microfibrilas que apresentam uma disposição intercalar. Consoante o grau de maturação da

planta vai ocorrendo a deposição interna à parede primária de camadas adicionais, formando a parede secundária. Estas camadas são denominadas por S1, S2 e S3, respectivamente, sendo que a última pode estar ausente. Na parede secundária as microfibrilas das camadas exteriores (S1) estão enroladas em hélice de forma alternada entre cada uma, formando uma espiral. Na camada intermédia (S2) as fibras de celulose encontram-se muito juntas e paralelas entre si de modo helicoidal. A camada mais interna (S3) consiste de microfibrilas em espiral sendo que a sua estrutura não é ainda muito bem definida (Chynoweth, 1987). A lamela média é a linha de união entre as paredes primárias de duas células contíguas.

As hemiceluloses consistem num conjunto diversificado e complexo de polissacarídeos com um baixo grau de polimerização em média de 100-200 unidades. As hemiceluloses estão associadas a celulose e lenhina e fornecem à parede celular rigidez e flexibilidade. As hemiceluloses são constituídas por uma família de polímeros altamente ramificados e que quando hidrolisados torna possível distinguir as várias unidades: pentoses (D-xilose e L-arabinose), hexoses (D-manose, D-glucose, D-galactose) e ácidos urónicos (ácido D-glucurónico, ácido 4-O-metil-D-glucurónico e ácido D-galacturónico). As hemiceluloses contêm uma estrutura ramificada que consiste na repetição destas unidades de açúcar que estão ligadas por β -1,4 linearmente, apresentando ramificações nos átomos 1-2; 1-3 e 1-6.

As hemiceluloses consistem usualmente em diferentes tipos de monómeros de açúcares e na generalidade das situações as hemiceluloses são referidas pelo açúcar estrutural como é o caso do Xilana (ligações β -1,4-D-xilose) ou o Manana (ligações β -1,4-D-Manose) (SIGMA, 2009) (Figura 1.10). Contudo na generalidade das situações ocorrem ramificações com outros açúcares, pelo que as hemiceluloses normalmente são referidas pelos açúcares que contêm, como por exemplo: galactoglucomanana, arabinoglucuronoxilana, arabinogalactana, glucuronoxilana, glucomanana, etc. (Rowell, 2005) (Figura 1.11).

As hemiceluloses contêm ainda grupos acetil e metil (por exemplo nas *folhosas* por cada 10 unidades de xilose ocorrem 7 grupos de acetil). As hemiceluloses são solúveis em bases fortes e são facilmente hidrolisadas por ácidos. Contudo pode ocorrer que cerca de 10% das hemiceluloses manifestem resistência à hidrólise por se apresentarem em forma de polímero linear (maior cristalinidade) como é o caso do Xilana. Verifica-se que de modo geral as culturas pertencentes

a categoria de angiospérmicas bem como resíduos agrícolas (pasto e palha de trigo) são ricos em pentoses (xilose) pelo que as hemiceluloses são constituídas sobretudo por Xilanas (4-*O*-metil-glucuronoxilanas, glucuroarabinoxilanas). No caso das gimnospérmicas (pinheiro, picea) apresentam hemiceluloses constituídas por unidades de manose pelo que possuem polímeros de mananas (arabinoglucomanas) (Jørgensen, 2007).

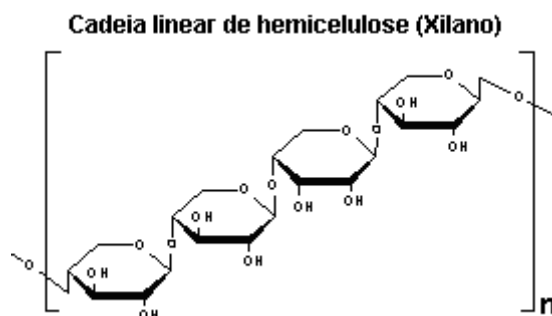


Figura 1.10- Unidades de Xilose constituindo o Xilano (adaptado de SIGMA, 2009)

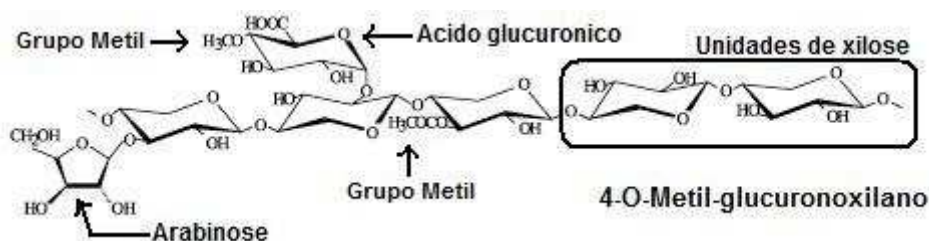


Figura 1.11- Cadeia parcial da hemicelulose denominada por 4-*O*-Metil-Glucuronoxilano (Adaptado de Rowell, 2005)

Relativamente à lenhina este polímero compreende cerca de 20-30% em peso seco dos tecidos vasculares das plantas e tem um papel importante na fixação dos açúcares na parede celular das plantas em termos físicos e químicos (Chynoweth, 1987). É um polímero amorfo constituído por unidades fenilpropanoicas designadas por ácidos hidroxicinâmicos (*p*-cumárico e ácido ferúlico) cujos precursores são álcoois aromáticos denominados por monolignóis: *p*-coumaril, coniferil e álcoois sinapil (Figura 1.12), constituídos respectivamente pelos grupos aromáticos: *p*-hidroxifenil (H), guaiacil (G) e Siringil (S). Durante o processo de lenhificação os monolignóis agrupam-se formando um complexo polímero tridimensional através das ligações β -*O*-4, α -*O*-4, β -5, β -1, 5-5, 4-*O*-5 e ligações β - β . Deste modo ocorre a formação de uma estrutura amorfa e mais desorganizada que a encontrada nos polímeros da celulose e hemiceluloses (Buranov, 2008).

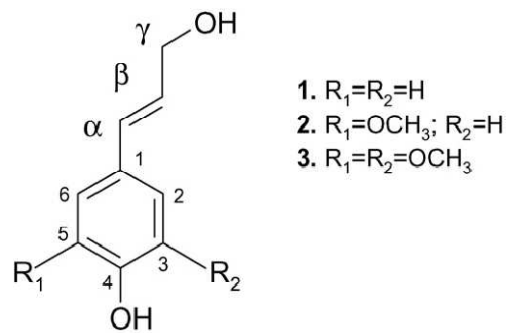


Figura 1.12- Estrutura de um monolignol: 1) *p*-coumaril, 2) coniferil e 3) álcoois sinapil (Buranov, 2008)

Devido a este processo de síntese de ligações de radicais existem 3 grupos de lenhinas: as lenhinas provenientes das *resinosas* (gimnospérmicas), as lenhinas provenientes das *folhosas* (angiospérmicas) e as lenhinas provenientes das culturas herbáceas. Nas lenhinas existentes nas madeiras (*resinosas* e *folhosas*) as subunidades G e S ocorrem em maior proporção enquanto as lenhinas existentes em culturas herbáceas as três subunidades (G, S e H) ocorrem em proporções significativas com diferentes razões (Buranov. 2008).

A lenhina esta normalmente associada aos hidratos de carbono ou açúcares (hemiceluloses e celulose) através das ligações α -carbono e C-4 do anel benzénico. Esta associação é designada por complexo lenhina-hidratos de carbono (Figura 1.13) ou *Lignin-Carbohydrate complexes* (LCC).

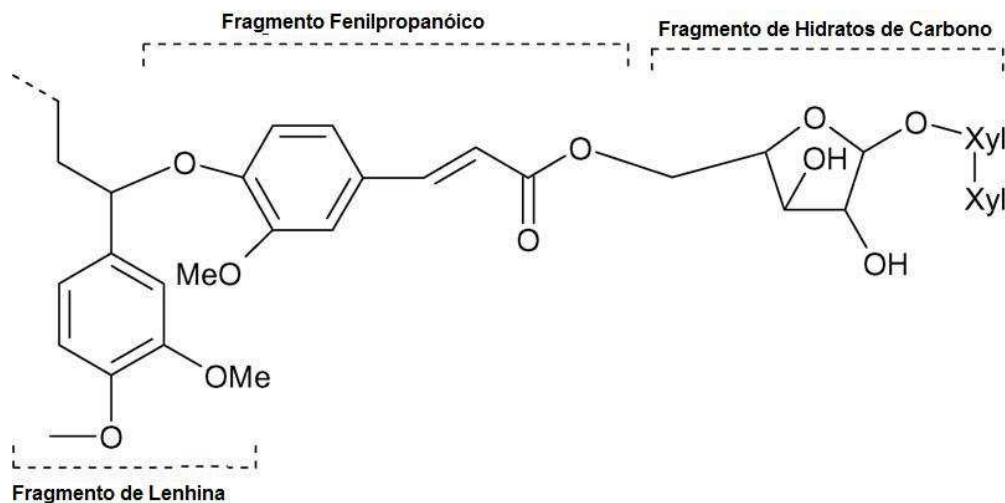


Figura 1.13- Complexo formado entre as unidades de Lenhina e os Hidratos de Carbono (Adaptado de Buranov, 2008)

A grande barreira para a utilização dos açúcares da biomassa é devido a esta associação de compostos fenólicos com os mesmos açúcares. No entanto a

acessibilidade depende da espécie da planta, da órgão da planta e do grau de maturação da planta (Buranov, 2008).

Na biomassa lenhocelulósica, como já foi referido, ocorrem ainda açúcares não estruturais como a pectina e o amido cuja solubilização é bastante mais fácil. A pectina é um polissacarídeo ramificado constituído principalmente de polímeros de ácido galacturónico, ramanose, arabinose e galactose. Encontra-se nas paredes da célula primária e nas camadas intercelulares (lamela média) das plantas. É um polímero abundante em frutos que ocorre em menores quantidades nos tecidos das plantas e árvores. A pectina (Figura 1.14) é um ácido linear de ligações α -1,4 de ácido D-galacturónico com grupos de metoxila ou óxidos de metil (Chynoweth, 1987; KJEMI, 2009).

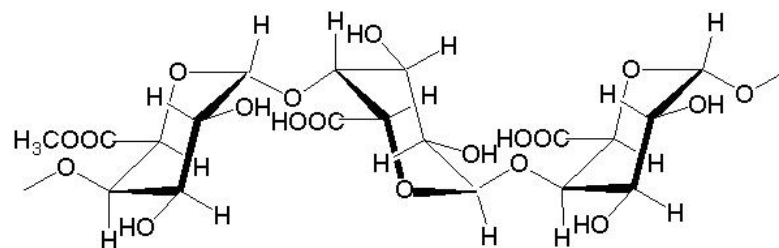


Figura 1.14- Exemplo de uma cadeia parcial de Pectina de α -1,4- ácido D-galacturónico com um grupo oxido de Metil (KJEMI, 2009)

O amido é um polissacarídeo sintetizado pelas plantas para ser utilizado como reserva energética e ocorre em forma de grãos. O grão de amido é uma mistura de dois polissacarídeos, amilose e amilopectina, polímeros de glicose formados através de síntese por desidratação. A amilose é um homopolissacarídeo linear menos solúvel que a amilose e contém ligações α -1,4-D-Glucose. A amilopectina (Figura 1.15) é um homopolissacarídeo altamente ramificado composto por α -1,4-D-glucose com ramificações via α -1,6 por ligações D-glicosídicas (Chynoweth, 1987; NREL, 2009).

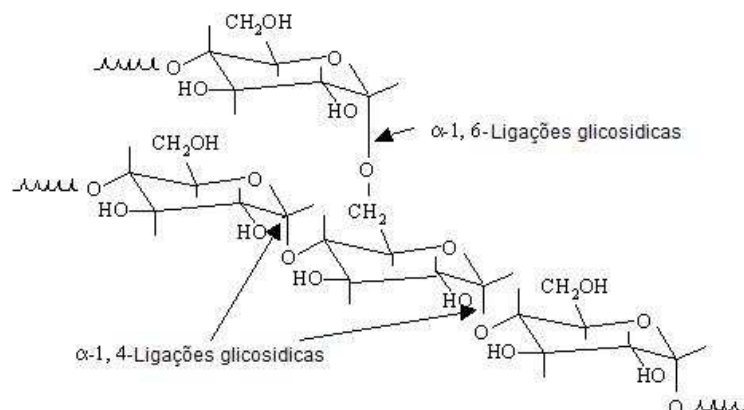


Figura 1.15- Estrutura parcial da amilopectina (adaptado de NREL, 2009)

1.2.3.2 Formas de solubilizar os hidratos de carbono estruturais

De modo a maximizar a produção de metano, através da digestão anaeróbia de uma planta, verifica-se a necessidade de proporcionar a máxima solubilização dos hidratos de carbono estruturais e/ou aumentar a acessibilidade das bactérias anaeróbias através da utilização de pré-tratamentos. Considera-se que o pré-tratamento ideal deverá aumentar a superfície de contacto, reduzir o conteúdo em lenhina e a cristalinidade da celulose (Lehtomäki, 2006). Por vezes verifica-se a necessidade de utilizar diferentes pré-tratamentos em simultâneo de modo a otimizar essas condições. De modo geral, os pré-tratamentos podem ser divididos em mecânicos, térmicos, químicos e biológicos.

Os tratamentos mecânicos estão associados à redução da dimensão do material de uma planta em partículas de menor dimensão. Esta redução pode ser realizada mediante corte do material original em pequenas fracções através de moagem, utilizando um moinho de facas, moinho de esferas ou moagem húmida. O tratamento mecânico permite a redução da dimensão das partículas e da cristalinidade da celulose permitindo uma redução do grau de polimerização, que contribui para um aumento do rendimento da hidrólise em cerca de 5-25 % dependendo do tipo de biomassa, tipo de moagem, e duração da moagem. Em consequência reduz-se o tempo técnico de digestão em cerca de 23-59 %, bem como um aumento na produtividade específica de metano em cerca de 5-25%. A redução das partículas abaixo dos 40 Mesh (0,4 mm) parece não ter influência no rendimento da hidrólise bem como na taxa de hidrólise (Hendriks, 2009; Angelidaki, 2000; Palmowski, 2000; Hartmann, 2000).

A Tabela 1-8 apresenta alguns dos resultados para diferentes substratos lenhocelulósicos (Lehtomäki, 2006; Mshandete, 2005b):

Tabela 1-8- Efeito da redução das partículas de várias culturas lenhocelulosicas no potencial de metano (adaptado de Lehtomäki, 2006; Mshandete, 2005b)

Substratos	Dimensão da partícula (mm)	Potencial de metano (m ³ CH ₄ /kg VS)
<i>Cynodon dactylon</i> (Gramma Bermuda)	0,088	0,226
	0,4	0,228
	1,0	0,214
	6,0	0,205
	30,0	0,137
Palha de Trigo	0,088	0,249
	0,4	0,248
	1,0	0,241
	6,0	0,227
	30,0	0,162
Palha de Cogumelo (espécies de cogumelos secos ex: <i>Volvaria volvacea</i>)	0,088	0,365
	0,4	0,367

	1,0	0,358
	6,0	0,347
	30,0	0,241
Fibra de Sisal (<i>Agave sisalana</i>)	2	0,216
	5	0,205
	10	0,203
	30	0,202
	50	0,192
	70	0,190
	100	0,178
Trevo	5	0,200
	10	0,140
	20	0,210
Pasto (feno)	5	0,320
	10	0,350
	20	0,270
Cana-de-açúcar	Moagem por esferas	0,320
	0,8	0,240
	8,0	0,290
Sorgo	1,6	0,420
	8.0	0,410

Na generalidade dos substratos a produtividade específica de metano aumenta com a redução das partículas, verificando-se que a partir dos 0,4 mm não ocorre nenhum aumento significativo na produtividade específica de metano. Ocorre contudo uma variação no que se refere ao pasto e ao trevo.

Como já foi referido o efeito da dimensão das partículas em conjunto com a ensilagem podem actuar em conjunto proporcionando uma fase de pré-tratamento. Verifica-se que para o pasto a redução da dimensão das partículas antes da sua colocação no silo aumenta a produção específica de metano, método que é utilizado em muitas plantas na Alemanha (Prochnow, 2009).

Os pré-tratamentos térmicos e químicos ou ainda a junção dos dois baseiam-se na solubilidade dos açúcares estruturais e lenhina para diferentes condições. A hemicelulose é um polímero facilmente hidrolisável por apresentar um peso molecular e grau de polimerização inferior ao da celulose e por apresentar ramificações com cadeias curtas (açúcares) que por sua vez formam os LCC com a lenhina. As hemiceluloses possibilitam a ligação entre a lenhina e as fibras de celulose favorecendo uma maior rigidez a toda a estrutura lenhocelulósica, pelo que aumentando a sua solubilização maior será a acessibilidade das bactérias à celulose. A solubilidade das hemiceluloses aumenta com a temperatura na seguinte forma descendente: manose, xilose, glucose, arabinose, e galactose (Hendriks, 2009).

Dentro dos tratamentos térmicos existem os tratamentos com solventes líquidos utilizando a água (autohidrólise) e com vapor de água designado por "*Steam explosion*".

De modo geral a solubilidade das hemiceluloses tem início entre as temperaturas 150-180°C e a temperaturas superiores a 160 °C ocorre também a solubilização da lenhina. Neste caso os compostos libertados são na sua maioria compostos fenólicos que poderão ter efeitos inibidores e tóxicos nas bactérias metanogénicas (Hendriks, 2009). Contudo verifica-se que para quantidades não muito elevadas estes compostos podem ser convertidos a metano o que não se verifica na produção de etanol (Hendriks, 2009; Chynoweth, 1987).

Ao nível dos tratamentos térmicos podem existir diversos factores que contribuem para uma maior solubilização dos açúcares de hemiceluloses e remoção de lenhina e, ao mesmo tempo, poderão contribuir para a inibição das bactérias. No caso da hidrólise térmica com água os produtos derivados da solubilização das hemiceluloses e lenhina são menores e em menor concentração devido à maior quantidade de água em comparação com o *Steam Explosion*. Devido às baixas concentrações os riscos de inibição e da degradação de compostos como o furfural e a condensação e precipitação de compostos derivados da lenhina é menor (Hendriks, 2009).

Dentro da hidrólise térmica com água outros factores poderão contribuir para uma maior solubilização da hemiceluloses e remoção da lenhina tais como: a concentração de sólidos no reactor (em sistemas descontínuo), temperatura utilizada *versus* tempo de reacção e se ocorre ou não controlo do pH (Hendriks, 2009). Durante a hidrólise térmica ocorre uma solubilização gradual dos açúcares das hemiceluloses, inicialmente açúcares de cadeia longa (oligossacarídeos), e também de grupos acetil e ácidos que estão presentes na hemiceluloses. Com o prolongar do tempo de reacção (no caso dos sistemas descontínuos) a existência destes grupos promove a quebra das ligações éter na biomassa promovendo a remoção e hidrólise dos oligossacarídeos a monossacarídeos ocorrendo a formação de ácidos orgânicos como o ácido acético. Durante esta solubilização ocorre um abaixamento do pH derivado dos ácidos orgânicos formados (Yang, 2008; Caparrós, 2007; Garrote, 2007; Donghai, 2006; Liu, 2005; Wyman, 2005). Donghai (2006) refere que materiais diferentes da mesma planta (folhas e caules de milho) possuem reduções de pH diferentes atingindo-se valores mais baixos de pH para o caule do que para as folhas, evidenciando, mais uma vez, a

diferença da constituição dos tecidos de uma planta, sendo que neste caso as folhas parecem apresentar um efeito tampão superior ao caule.

Na hidrólise térmica com água da palha de arroz e resíduos da cultura de milho distinguem-se 4 grupos: compostos derivados de açúcar, compostos derivados de lenhina, compostos derivados de azoto e ácidos gordos. Por vezes, neste tipo de tratamentos térmicos a água é substituída por ácidos de modo a diminuir o tempo de reacção e a aumentar os produtos solubilizados, contudo a degradação dos oligossacarídeos é mais severa formando rapidamente monossacarídeos e posteriormente aldeídos principalmente furfural (das pentoses) e 5-hidroximetil furfural (das hexoses) que provocam inibição nos organismos fermentativos (Mosier, 2005a).

Analisando os sistemas de tratamento térmico com água verifica-se que ocorrem diferenças acentuadas de remoção de hemiceluloses e lenhina entre sistemas contínuo/parcial e sistemas descontínuos. Liu (2005) verificou que os sistemas contínuo/parcial (1-10 ml/min) removem mais hemiceluloses, entre 93,8% - 98,6% do que os sistemas descontínuos com remoções inferiores a 80%. Contudo a principal diferença refere-se à remoção da lenhina: nos sistemas descontínuos a remoção apenas alcançou os 12% aos 20 minutos diminuindo em seguida e nos sistemas contínuo/parcial verificou-se a remoção de 60 % de lenhina aos 24 minutos para a mesma temperatura (200°C). Outros autores referem ainda que nos sistemas descontínuos as remoções de hemiceluloses são inferiores a 65% e que nos sistemas contínuos é possível alcançar 75% de remoção de lenhina (Yang, 2008; Mosier, 2005a).

Esta diferença de eficiência entre os dois sistemas parece dever-se ao facto de que nos sistemas descontínuos os tempos de reacção/retenção são mais elevados possibilitando a degradação dos oligossacarídeos a monossacarídeos e ao reagrupamento dos compostos de lenhina (Yang, 2008; Liu, 2005). Liu (2005) refere ainda que após arrefecimento a lenhina precipita ligando-se novamente às fibras impedindo a degradação da celulose. Contudo as eficiências de remoção de hemiceluloses e lenhina dependem do substrato lenhocelulósico utilizado (Yang, 2008). A Tabela 1-9 permite evidenciar o efeito da hidrólise térmica na remoção das hemiceluloses em sistemas contínuos e descontínuo (Yang, 2008):

Tabela 1-9- Exemplo do efeito da remoção de hemiceluloses e sua comparação entre tratamentos térmicos com água (200 °C; 10 min) em sistemas descontínuos e contínuos (Adaptado de Yang, 2008)

Substrato	Fluxo de água (ml/min)	Rendimento (%)			Açúcares de cadeia curta / Açúcares de cadeia comprida
		Remoção total de Xilanas	Grau de Polimerização 1-30	Oligômeros de cadeia comprida	
Resíduos de cultura do milho	0 (descontínuo)	38,1	28,1	10,0	2,8
	2	48,2	20,3	27,9	0,7
	25	73,3	9,1	64,2	0,1
Xilana de cereal de aveia	0 (descontínuo)	73,1	30,1	43,0	0,7
	2	92,1	0,3	91,8	0,003
	25	91,1	0,4	90,8	0,004

Recentemente tem-se verificado que os métodos mais eficazes de destruir os complexos LCC são, para além da hidrólise térmica com água, os tratamentos alcalinos. Contudo a eficiência destes tratamentos depende da constituição da biomassa em termos da disponibilidade de ácidos hidroxicinâmicos como pontes de ligação entre as hemiceluloses e a lenhina (LCC) e a constituição em termos das subunidades da lenhina (Buranov, 2008).

Verifica-se contudo, na generalidade dos substratos lenhocelulósicos, que o tratamento alcalino e o tratamento termo-alcalino são mais eficientes na remoção da lenhina (Buranov, 2008; Wyman, 2005; Mosier, 2005b) e consequentemente verificam-se melhores resultados ao nível da produtividade específica de metano (Zheng, 2009; Hendriks, 2009; Ward, 2008; Angelidaki, 2000; Gunaseelan, 1995; Chynoweth, 1987; Chynoweth, 1985).

Outros autores referem ainda que, dependendo da cultura e da concentração de reagente alcalino ou ácido utilizada, pode verificar-se uma degradação da celulose (Buranov, 2009), pelo que se tem verificado o surgimento de outros pré-tratamentos químicos utilizando hidróxido de amónio e ureia.

O hidróxido de amónio aparece como um dos reagentes mais eficientes no aumento da digestibilidade da celulose possuindo a vantagem de poder ser recuperado devido a sua grande volatilidade (Wyman, 2005). O tratamento utilizando o hidróxido de amónio destrói a estrutura cristalina da celulose e as ligações acetil melhorando a degradação enzimática da celulose. Destacam-se dois métodos AFEX (Ammonia Fiber Explosion) e ARP (Ammonia Recycle Percolation) que resultam em rendimentos elevados de degradação da celulose e remoção mínima da lenhina e hemiceluloses. O hidróxido de amónio a temperaturas elevadas dilata a biomassa, despolimeriza a lenhina e quebra os

complexos LCC não ocorrendo a degradação dos açúcares (Buranov, 2008). É referido por outros autores que a amónia (AFEX) não degrada ou remove a lenhina, mas que aparentemente altera ou modifica a sua estrutura diminuindo a interferência da lenhina na degradação da celulose, e por outro lado despolimeriza as hemiceluloses através da catálise básica (NH_3OH) abrindo mais a estrutura da biomassa, e os açúcares removidos são na sua maioria na forma oligomérica (Wyman, 2005). Verificou-se por exemplo que utilizando o sistema de recirculação da amónia (ARP) que consiste em passar amónia aquosa (10-15% Wt) através da biomassa a temperaturas elevadas (150-170°C) que é possível alcançar 90% da digestibilidade dos resíduos de cultura do milho (Wyman, 2005). Existe ainda um outro sistema (SAA: Soaking Aqueous Ammonia) que consiste em tratar a biomassa com amónia aquosa em reactores descontínuos a temperaturas moderadas (20-60°C) sob pressões atmosféricas, atingindo resultados similares ao ARP (Wyman, 2005).

A Tabela 1-10 resume o efeito de cada pré-tratamento nas propriedades físicas e químicas da matriz lenhocelulosica (Hendriks, 2009):

Tabela 1-10- Exemplo do efeito de vários pré-tratamentos no material lenhocelulosico (adaptado de Hendriks, 2009)

Pré-tratamento	Aumento da superfície específica	Destruição da estrutura cristalina	Solubilização da hemiceluloses	Solubilização da Lenhina	Alteração da estrutura da lenhina	Formação de Furfural(HMF)
Mecânicos	+ ⁵	+				
Hidrolise térmica com água (descontínuo)	+	ND	+	-	-	-
Hidrolise térmica com água (contínuo)	+	ND	+	+/-	-	-
Ácido	+	ND	+	-	+	+
Alcalino	+	ND	-	+/-	+	-
Térmico + ácido	+	ND	+	+/-	+	+
Térmico +alcalino	+	ND	-	+/-	+	-
Amónia (AFEX)	+	+	-	+	+	-
Steam explosion (CO_2)	+		+			

⁵ +Apresenta um efeito elevado; - presente um efeito reduzidos; ND - efeito Não Determinado

Verifica-se que os tratamentos com maior destaque devido à economia e eficiência do processo são o "steam explosion", tratamento com cal, sistemas de hidrólise térmica e o tratamento com hidróxido de amónio. Bauer (2009) refere um aumento da produtividade específica de metano entre 14-44 % utilizando o processo *steam explosion* com temperaturas entre 160-180 °C, para a palha do trigo.

Verifica-se também que a utilização de pré-tratamentos biológicos e/ou aeróbios, onde se destaca a utilização de celulases, do fungo da podridão branca (White rot fungi-*Phanerochaete chrysosporium*) e a utilização de lamas activadas permitem solubilizar os hidratos de carbono estruturais e/ou aumentar a acessibilidade das bactérias anaeróbias (Gerhardt, 2007; Lehtomäki, 2006; Mshandete 2005a; Kohlmann, 1995).

Os pré tratamentos biológicos têm a vantagem de ser simples nem requerem grandes investimentos mas, até ao momento não se verificou um aumento significativo da produção específica de biogás (Lehtomäki, 2006). Contudo, mostrou-se que a aplicação de enzimas hidrolíticas em biomassa lenhocelulósica permite obter mais 19,7 % de biogás acumulado (Gerhardt, 2007).

As enzimas hidrolíticas normalmente utilizadas na produção de etanol são enzimas que degradam as ligações da celulose e das hemiceluloses, extraídas de um organismo conhecido (o mais comum designa-se por *Trichoderma reesei*).

As celulases são enzimas que podem ser classificadas em três grupos distintos consoante as ligações que quebram: exo-1,4- β -D-glucanase também designadas por celobiohidrolase e que libertam os dímeros de celobiose dos terminais da molécula de celulose; endo-1,4- β -D-Glucanase que quebram as ligações glicosídicas internas β -1,4 de modo aleatório ao longo da cadeia de celulose; 1,4- β -D-glucosidase que hidrolisa os dímeros de celobiose a glucose e também hidrolisa a glucose existente nos oligossacaridos. Estas enzimas actuam sinergeticamente na hidrólise da celulose criando espaços de maior acessibilidade para cada enzima dentro do material lenhocelulósico (Jørgensen, 2007).

As hemicelulases apresentam uma maior diversidade devido a complexidade do polímero das hemiceluloses, contudo destacam-se as endo-1,4- β -D-xilanases, que hidrolisam as ligações internas na cadeia dos xilanos, 1,4- β -D-xilosidades que atacam os xilooligossacarideos das extremidades não reduzidas libertando xilose, endo-1,4- β -D-manases que quebram as ligações internas dos mananos, 1,4- β -D-manosidase que atacam os manooligossacarideos e os convertem em

unidades de manose. Por outro lado os grupos terminais são removidos por outro grupo de enzimas as α -D-galactosidase, α -L-arabinofuranosidase, α -glucuronidase, acetil xilano esterase e ácido ferúlico e *p*-cumárico esterases (Jørgensen, 2007).

As enzimas associadas a degradação dos hidratos de carbono são proteínas modulares com um módulo ou centro activo específico de ligação ao açúcar designado por (CBM- carbohydrate-binding module). Estes CBM são divididos em famílias de enzimas e actualmente existem 49 famílias. A função de um CBM é a de orientar e estabelecer contacto directo entre o centro catalítico ou módulo catalítico com o substrato. Em alguns CBM verificou-se que estes possuem também a particularidade de romper as fibras de celulose. A existência de outras enzimas, mesmo que não envolvidas na hidrólise da celulose, podem melhorar o desempenho da preparação enzimática (Jørgensen, 2007).

Devido à complexidade do material lenhocelulósico normalmente utilizam-se dois tratamentos de modo a aumentar a acessibilidade das enzimas à celulose. Verificou-se um aumento na conversão da celulose a glucose de um pouco mais de 80-60% utilizando a junção de tratamento térmico (180°C) com o biológico utilizando o fungo *Pluerotus ostreatus* em substratos de ramos de colza e ramos de feijão-frade. Contabiliza-se contudo um tempo total de pré-tratamento de 40-50 dias (Kohlmann, 1995).

Diversos autores (Zhang, 2007; Lehtomäki, 2006; Martins, 2003; Kohlmann, 1995) referem o interesse da utilização dos fungos comumente designados por *da podridão branca* como pré-tratamento biológico, pois são os únicos organismos capazes de degradar completamente a lenhina devido a produção de enzimas extracelulares. Contudo até ao momento não se verificou a sua utilização em conjunto com a digestão anaeróbia.

Um pré-tratamento aeróbio parcial (compostagem parcial) tem sido também sugerido como pré-tratamento, referindo-se que na fase termofílica do processo de compostagem ocorre ou pode ocorrer a degradação da lenhina mas os resultados até ao momento não foram relevantes (Lehtomäki, 2006). Mshandete (2005a) verificou que utilizando as lamas activadas como inóculo do tratamento aeróbio antes da digestão anaeróbia provoca um efeito bastante positivo na digestão do substrato contendo material lenhocelulósico. Obteve-se 26% mais metano após 9h de tratamento com lamas activadas em comparação com o substrato não tratado. Conclui que as lamas activadas possuem um consórcio de

microrganismos que produzem enzimas capazes de hidrolisar material lenhocelulósico e que a mistura de polímeros presentes no substrato estimula a sua produção.

1.2.3.3 Tecnologia do reactor utilizado para a digestão de biomassa

De modo geral, verifica-se que as culturas energéticas ou resíduos agrícolas podem ser digeridos como substratos principais ou como substratos conjuntos em co-digestão, utilizando-se três tipos de sistemas de digestão mediante o seu conteúdo em sólidos. Sistemas húmidos cujo conteúdo em sólidos não ultrapasse os 8% de ST, semi-seco cujo conteúdo não ultrapasse os 16-22% de ST e os sistemas secos cuja concentração de sólidos normalmente é sempre superior a 25% (Gunaseelan, 1997). Nos dois primeiros casos geralmente utiliza-se o reactor CSTR (reactor contínuo de mistura completa) no último caso utilizam-se reactores específicos cuja tecnologia foi desenvolvida por diversas entidades: RefCOM, SOLCON, DRANCO (compostagem anaeróbia em), KWU-Fresenius, BIOCEL, SEBAC (compostagem anaeróbia em reactores sequências descontínuos) (Gunaseelan, 1997).

Estes sistemas podem ainda ser repartidos em duas fases de digestão devido ao facto de ser difícil alcançar condições óptimas de pH para a fermentação e metanogénese, sistema que tem sido defendido por alguns autores (Wang, 2009; Ward, 2008; Klocke, 2007; Lehtomäki, 2006; Siegert, 2005; Gunaseelan, 1997; Chynoweth, 1987).

No caso de um sistema húmido a duas fases utilizam-se dois reactores com agitação (CSTR), com tempos de retenção e carga distintos de modo a propiciar condições de acidogénese num reactor e de metanogénese noutro. Deste modo favorecem-se as condições para a hidrólise do material num primeiro reactor e num segundo reactor propicia-se a redução completa do material levando a produção de metano (Gunaseelan, 1997). Contudo, têm-se verificado alguns inconvenientes na utilização dos reactores convencionais CSTR na digestão de biomassa. A particularidade da biomassa tender a flutuar ao nível da superfície do líquido do digestor obriga a que seja necessário aplicar mais agitação. Dependendo da dimensão das partículas utilizadas forma-se um novelo em redor das pás e veios de agitação o que obriga a uma manutenção e limpeza constante. Por outro lado, devido às condições de campo e solo, a biomassa

muitas vezes vem contaminada com terra havendo a necessidade de remover o sedimento do digestor com maior frequência (Prochnow, 2009).

Soluções para otimização do processo que têm sido propostas, tais como: intensificar e aumentar a redução das partículas, a agitação hidráulica ou pneumática em vez de mecânica ou a adopção de outros sistemas de digestão como por exemplo digestão em seco. Contudo não houve ainda nenhum estudo até ao momento no sentido de avaliar a eficiência destas mesmas soluções e o seu impacte económico (Prochnow, 2009; Lehtomäki, 2007a).

A elevada concentração de sólidos, característicos dos substratos lenhocelulosicos ou da biomassa em geral, dependendo da carga orgânica utilizada, afecta os custos de investimento e de operação do processo de DA associado. Os substratos com baixas concentrações de sólidos requerem volumes de reactor elevados e maiores temperaturas de processo do que os substratos com maior concentração de sólidos (Jerger, 1982). Num sistema contínuo o tipo de alimentação, nomeadamente as necessidades de bombagem ou de processamento (pré-tratamento) do substrato, irá depender do conteúdo de sólidos e da carga orgânica associada ao substrato utilizado.

O conteúdo em sólidos de diferentes substratos afecta o tempo de retenção hidráulico do sistema (HRT) e as necessidades de calor do processo. Para maior tempo de retenção de sólidos e tempo de retenção de microrganismos maior a degradação de substratos, que são dificilmente degradáveis, aumentando a estabilidade do processo e reduzindo as necessidades nutritivas (Chynoweth, 1987). É possível de aumentar estes tempos de retenção (de sólidos e de microrganismos) para diversos tipos de tecnologias de reactores sem aumentar o tempo de retenção hidráulico. Para substratos facilmente biodegradáveis com baixo conteúdo em sólidos são utilizados reactores com biomassa fixa ou UASB (reactor anaeróbio de fluxo ascendente com manta de lodo). Para substratos com elevado conteúdo em sólidos e dificilmente biodegradáveis este tipo de reactores não é aconselhável, devido a problemas operacionais e mecânicos. tais como entupimento e colmatação do meio de suporte e do sistema hidráulico de bombagem. Neste caso são utilizados reactores que promovam maiores tempos de retenção de sólidos e de microrganismos tais como USR (reactor de fluxo ascendente de sólidos) (Chynoweth, 1987). Contudo, aparte dos resultados referidos por Srivastava (1988) em que a eficiência da degradação da alga kelp (*Macrocytis pyrifera*) é sempre superior para os reactores USR em comparação

com CSTR para todas as cargas orgânicas (1,6-9,6 kg/m³d), não se tem verificado uma maior utilização deste tipo de reactores na digestão de biomassa. Klocke (2007) e Lehtomäki (2007b e 2006) referem que os sistemas descontínuos têm sido recentemente adoptados na digestão de biomassa com base num sistema de recirculação do lixiviado numa cama com o material sólido. O processo foi desenvolvido em laboratório à escala piloto na Universidade ATB na Alemanha (Leibniz - Institut für Agrartechnik Potsdam – Bornim) e posteriormente aplicado numa instalação descentralizada em Sachsen (Alemanha). Este sistema, conhecido por sistema a duas fases "*leach-bed*" (Figura 1.16) permite manter as condições óptimas para cada um dos organismos intervenientes na DA e é um sistema operado com menor consumo de energia. Neste sistema realiza-se numa primeira fase a hidrólise do material lenhocelulósico em reactores "*leach-bed*" em condições óptimas de pH e temperatura, resultando na formação de um lixiviado com elevada carga orgânica e baixo teor em sólidos. Posteriormente este sistema é combinado com reactores de alta carga como UASB ou por filtros. Num reactor por filtros (normalmente utilizado) permite a fixação das bactérias metanogénicas aumentando a degradação (Klocke, 2007; ATB, 2009).

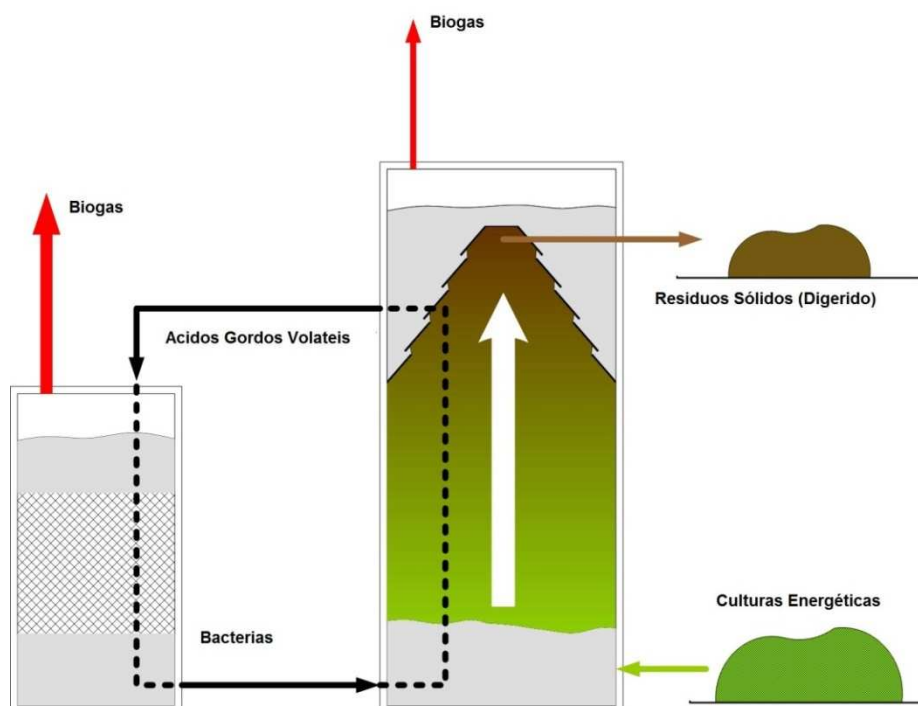


Figura 1.16- Sistema de duas fases: na direita reactor anaeróbio ascensional (*Leach-bed*) com circulação do lixiviado para um reactor de alta carga (Esquerda) (adaptado de ATB, 2009)

Chanakya (2009) propõe uma tecnologia de reactor convencional (fluxo pistão em 3 fases) onde se conseguem garantir condições óptimas de hidrólise/fermentação e de metanogénese no mesmo reactor, sem grandes consumos energéticos. Trata-se dum sistema que tem ganho aceitação na Índia sobretudo no meio rural. É um reactor que é operado ao longo do ano com dois tipos de substratos sólido:liquido consoante os fluxos de resíduos agrícolas existentes durante o ano. Normalmente estes reactores funcionam durante os meses de Verão utilizando biomassa (culturas herbáceas e ervas) ocorrendo uma colonização elevada da população metanogénica e, durante os meses de Inverno a alimentação de biomassa é interrompida dando-se inicio à alimentação de efluentes líquidos com elevado conteúdo orgânico como por exemplo efluentes do processamento do café. Neste caso a biomassa herbácea funciona como biofilme de suporte para as bactérias metanogénicas. Dado o desenho do reactor é possível obter 3 fases distintas de digestão minimizando a acumulação de AGVs. À entrada do reactor é possível acumular os AGVs proporcionando condições óptimas de hidrólise e fermentação e ao mesmo tempo permite dispersar estes compostos orgânicos lentamente ao longo do reactor sem que ocorra a inibição do processo. Reportam-se remoções de CBO (Carência Bioquímica em Oxigénio) de 90%.

1.3 Características da cultura *Cynara cardunculus* L. e sua utilização

A *Cynara* é uma cultura herbácea (ou *Weedy*) da família das *Asteraceae Compositae* onde se englobam 8 espécies nativas da zona do Mediterrâneo: *C. humilis*, *C. cyrenaica*, *C. algarbiensis*, *C. cornigera*, *C. baetica*, *C. syriaca*, *C. aurantica* e finalmente a espécie mais selvagem, que se encontra por todo o Mediterrâneo apresentando uma distribuição idêntica à oliveira (*Olea europaea* L.), que se designa por *C. cardunculus* L. (Ortega, 2007).

Actualmente a *Cynara cardunculus* é subdividida em 3 variedades botânicas:

- *Cynara cardunculus* L. var. *sylvestris* (englobando todas as espécies selvagens);
- *Cynara cardunculus* L. var *altilis* (variedade cultivável);
- *Cynara cardunculus* L. var. *scolymus* (a alcachofra).

A *Cynara cardunculus* L., é uma cultura cujo ciclo de crescimento se encontra perfeitamente adaptado ao regime de precipitação existente na região do Mediterrâneo: chuvas intensas no Outono e Primavera e períodos extensos de seca durante o verão. A *Cynara* ultrapassa esta dificuldade de seca canalizando toda a humidade e água existente na planta para o seu rizoma secando a parte aérea (Fernández, 1994), pelo que a biomassa colhida no final do ciclo se encontra praticamente seca apresentando aproximadamente 11% de humidade. Trata-se de uma cultura que tem sido objecto de estudo de vários programas de I&D, com o suporte da EU, de modo a avaliar a sua aptidão para a produção de biomassa e utilização à escala industrial. Destacam-se os projectos ECAS (Energy Crops in the Atlantic space) em que cerca de 400 ha foram instalados em Portugal. A sua produção anual pode alcançar entre 15 a 20 ton/ha dependendo do solo e da precipitação (Gominho, 2001 e 2008; Fernández, 1994 e 2004) verificando-se contudo produções em anos específicos superiores e iguais a 23-35 ton MS/ha (Pereira, 1994). Mais recentemente foi realizado um estudo em Itália (Raccuia, 2007) que compara a produtividade para 14 diferentes génotipos de *C. cardunculus* L. durante 3 anos. Utilizando 5 génotipos específicos para cultivo e 9 génotipos naturais verificaram que, em média a partir do segundo ano, as culturas apresentam uma produtividade de 20 t/ha e que determinados génotipos apresentam produtividades superiores. *C. cardunculus* L. var. *altilis* DC (genotipo E438) apresentou produtividades de 17,2, 33,3 e 39,3 t/ha no primeiro segundo e terceiro ano respectivamente. Um caso bastante

curioso foi o do genótipo silvestre *C. cardunculus* L. var. *sylvestris* lam. (Genótipo Belpasso 2) que apresentou produtividades de 6, 27,9 e 34 t/ha nos três primeiros anos respectivamente. Neste estudo, para todos os genótipos, apenas foi efectuado regadio uma vez por ano no mês de Maio (50 mm de água) com a excepção de no primeiro ano ser efectuado um regadio no mês de Agosto, de 50 mm de água, para garantir o estabelecimento da cultura. A precipitação teve um máximo de 692 mm e um mínimo de 234 mm verificando-se uma média anual entre os 3 anos de 411 mm. Em termos de fertilização apenas foi utilizado 50 kg/ha de N no mês de Outubro. A experiência foi levada a cabo em Sicília no Sul de Itália entre os anos 1998-2001 e as características do solo são de: 32 % de areia, 31% de silte, 32% de argila, 5% de calcário, o pH de 7,6, apresentado 1,3% de MO e 1,3% de N. O estudo evidencia o facto de a cultura estar perfeitamente adaptada ao clima semi-árido característico da região do mediterrânica verificando-se produtividades bastante elevadas tendo em conta a qualidade do solo e as entradas (fertilizantes) efectuadas.

Gominho (2008 e 2001) e Pereira (1994) efectuaram uma caracterização química da biomassa produzida e que se encontra resumida na Tabela 1-11 (Gominho, 2001; Gominho, 2008; Pereira, 1994; Ballesteros, 2008):

Tabela 1-11- Composição química dos componentes lenhocelulosicos de *Cynara cardunculus* L. em % de MS (adaptado de 1- Gominho, 2001; 2- Gominho, 2008, 3- Pereira, 1994, 4- Ballesteros, 2008)

Componentes	Extractivos (%)	Lenhina total ⁶ (%)	Hidratos de carbono estruturais (%)					Ref.
			Glucose ⁷	Xilose ⁸	Manose	Arabinose	Ramnose	
Caules	20,0,9-14,6-14,3	17,1-17,0-14,3	31,8-65,5-33,8	12,1-26,0-14,7	2,3-3,7-0,6	1,8-2,5-1,2	0,7-0,9	(3)-(1)-(4)
Folhas	46,4	10,2	13,5	9,7	1,2	2,4	0,5	3
Medula	13,2	20,3	23,9-63,4	14,6-28,5	1,4-3,3	1,5-2,4	0,3-0,7	(3)-(1)
Capitula ⁹	5,7	14,2	44,7	26,8	1,0	1,3	0,7	2

Analisando os dados verifica-se que ocorre uma certa variação da composição química dos vários componentes da planta. Relativamente ao caule verifica-se

⁶ Lenhina total igual ao somatório da lenhina Klason e lenhina soluvel

⁷ A % de glucose corresponde a % de cellulose;

⁸ A % de xilose, manose, arabinose e ramanose corresponde a % de hemicelulose;

⁹ A composição do capitula corresponde a media da composição dos seus constituintes que são os cabelos e os *pappi*

que ocorre uma elevada variabilidade da composição química no que se refere à composição de celulose, hemiceluloses e extractivos entre os trabalhos de Ballesteros (2008), Gominho (2001) e Pereira (1994), provavelmente devido à origem do material. Em Pereira (1994) o material é proveniente do centro e sul de Portugal e em Gominho (2001) e Ballesteros (2008) o material é proveniente de Madrid (Escuela Tecnica Superior de Ingenieros Agronomos de Madrid). Analisando a composição química dos caules verifica-se que o conteúdo em hidratos de carbono estruturais é bastante diferente. Considerando ainda Fernández (2006) verifica-se que a composição dos caules apresenta um conteúdo em MS (em %) de celulose, hemiceluloses e lenhina igual a 47,8, 22,8 e 10,3 respectivamente, valores que quando comparados aos apresentados na Tabela 1-11 evidenciam uma elevada variabilidade.

Provavelmente a variabilidade da composição da biomassa da *Cynara* deve-se às condições climáticas, ao tipo de solo, ao período de colheita, idade da cultura e as condições de armazenamento após corte mas, até ao momento não se verificou nenhum estudo que permita concluir qual dos factores é mais importante e qual a variabilidade de cada um dos constituintes.

Em geral, no final de cada ciclo cultura, verifica-se uma produção de biomassa repartida por diferentes componentes principais: caules, folhas e capitula nas proporções de 40%, 25% e 35% (7% de vilanos e pelos, 11% de sementes e 17% do restante material do capitulo) respectivamente (Gominho, 2008; Dalianis, 1996).

1.3.1 Pratica cultural e custos associados

A *Cynara* apresenta um ciclo de produção de biomassa que pode ser dividido em duas fases: germinação e estabelecimento da cultura cuja duração é de 1 ano, e uma segunda fase correspondente ao crescimento ou fase de produção de biomassa. A fase de crescimento tem inicio no Outono dando origem rapidamente a uma flor em forma de roseta que se desenvolve constantemente durante o inverno e inicio da primavera. Em climas amenos a planta desenvolve um escape floral e de diversos ramos surgem diversos capítulos de flores. Em Julho o fruto (onde se encontram as sementes) ou seja a flor atinge o ponto máximo de maturação. Neste momento inicia-se o verão e a biomassa aérea começa a secar devido à falta de água no solo, enquanto a parte subterrânea

entra em dormência. É pois no verão que se efectua o corte ou colheita desta cultura. O novo ciclo inicia-se novamente com as primeiras chuvas de Setembro e Outubro. Tendo em conta este ciclo a *Cynara* pode ser cultivada como cultura energética com cortes anuais podendo atingir um tempo de vida útil superior a 12 anos. Contudo o tempo de vida útil máximo possível de atingir é ainda desconhecido (Fernández, 2004).

No primeiro ano verifica-se a necessidade de uma fertilização que depende das características do solo. Esta necessidade é superior à dos anos seguintes e igual a 700 kg/ha de fertilizante 9:18:27 (N:P:K). Verifica-se também a necessidade de preparação do solo antes da fase de sementeira. Na fase de sementeira são aconselhadas distâncias entre 70-80 cm e a densidade de plantas deverá ser de 10 000-15 000 plantas/ha em condições não muito extremas de escassez de água e, em situações extremas deverá ocorrer uma densidade de 7500 plantas/ha. Normalmente são necessárias cerca de 3-4 kg de sementes/ha (Fernández, 2004).

Durante o ano de estabelecimento da cultura é necessário um controlo de infestantes e a sua remoção mecânica principalmente antes do desenvolvimento da copa da planta. Nos anos seguintes normalmente as primeiras folhas de roseta desenvolvem-se primeiro que as infestantes pelo que nos ciclos seguintes esta necessidade deixa de existir. Em termos de pestes e doenças são referidas as espécies de afideos (*Aphis ssp.*), broca do caule (*Gortyna xantenes* Germ.), broca das folhas (*Apion carduorum* Kirby) e a mineira das folhas (*Sphaeroderma rubidum* Graells), roscas (*Agrotis segetum* e *Spodoptera litoralis*), diversas moscas (*Agromyza ssp.*, *Terellia ssp.*) e traças (*Pyrameis cardui* L.). Durante os meses de primavera e Outono é necessário verificar periodicamente a presença de afideos e da broca das folhas uma vez que são as pestes que se desenvolvem mais rapidamente. Normalmente a aplicação do pesticida Dimetoato garante a eliminação e controlo das pestes referidas. Neste primeiro ano verifica-se um custo aproximado de 368.74 €/ha (Fernández, 2004).

Do segundo ano para os seguintes é necessária a aplicação de fertilizante para restaurar os nutrientes que foram retirados do solo pelo desenvolvimento da cultura. Dos estudos efectuados em Espanha verificou-se que a cultura tem uma taxa de remoção do solo de 12,6 kg de N, 3,5 kg de P₂O₅ e 20,8 kg K₂O/t de biomassa seca. Verifica-se a necessidade de 400 kg de fertilizante/ha 15:15:15

(N:P:K) mais 130 kg/ha de ureia. Durante os anos de produção, aparte a fertilização, apenas ocorre a necessidade de controlo de pestes e do corte ou colheita do material produzido, pelo que os custos do ano de estabelecimento são normalmente incorporados nos anos seguintes. Tendo em conta uma incorporação de 47,75 €/ha verifica-se que o custo anual para a produção da *Cynara cardunculus* L. é igual a 476,05 €/ha (Fernández, 2004).

As produtividades obtidas podem variar entre 10-20 t/ha/a no caso de a cultura já se encontrar bem estabelecida e a precipitação for de 500 mm/a, pelo que o custo de produção da cultura pode variar entre 47,6-23,8 €/t. Contudo foram atingidas outras produtividades nas mesmas condições de 30 tMS/ha (Pereira, 1994; Raccuia, 2007; Danialis, 1996). Fernández (2006) para um ensaio realizado durante 10 anos verificou uma produtividade média de 14tMS/ha/a para uma precipitação de 470 mm/a.

Também é referida a possibilidade de serem efectuados dois cortes anuais (Fernández, 2006) com o intuito da produção de forragem para alimento dos animais. Verifica-se que o valor nutritivo se altera durante o inverno ocorrendo uma redução da produtividade da biomassa produzida e variável consoante o período de colheita (Tabela 1-12):

Tabela 1-12- Composição da forragem verde de *Cynara cardunculus* L. durante o inverno e o efeito do corte durante o Inverno na redução da produtividade final (adaptado de Jesús Fernández, 2006)

Composição da forragem (% em Peso Seco)	Novembro	Dezembro	Janeiro	Fevereiro
Conteúdo em Proteína	16,7	16,0	18,4	16,6
Celulose	14,1	15,6	15,6	13,7
Hemiceluloses	7,9	7,7	7,4	8,3
Lenhina	16,3	13,3	13,3	12,6
Redução da produtividade final da biomassa (% em Peso Seco)	40,0	60,4	40,7	32,0

1.3.2 Utilizações da cultura e sua importância

O cardo tem sido utilizado tradicionalmente na alimentação humana sendo cultivado como vegetal e é conhecido como o cardo Espanhol "Spanish cardoon". A utilização tradicional do cardo na alimentação humana está relacionada com o componente capítulo. Por um lado é nos petíolos que se concentram as enzimas

coagulantes que são utilizadas na produção de queijo de cabra e por outro as folhas jovens, devido a sua suavidade e sabor que lhe são característicos, são colhidas e utilizados na elaboração de diversos pratos de diversas regiões do Mediterrâneo. Em Espanha estima-se, em 2003, uma produção aproximada de 29 122 t MF de cardo (Fernández, 2006).

Os primeiros estudos referindo a utilização da *Cynara* como cultura para a produção de biomassa e o seu uso à escala industrial situam-se na década de 80. Contudo apenas e mais recentemente têm surgido inúmeros estudos que demonstram o seu potencial como cultura industrial na produção biomassa para pasta de papel (Gominho, 2008; Gominho, 2001), para combustível sólido (Fernández, 1994; Franco, 2007), produção de óleo proveniente das sementes (Fernández, 2004; Curt, 2002), forragem verde para alimentar os animais (Fernández, 2006) e indústria de produtos farmacêuticos (Fernández, 2006).

Como já foi anteriormente referido verificou-se que a produtividade se situa entre os 10-20 tMS/ha/a. Contudo em alguns casos, dependendo do local e das condições climáticas, verificam-se produções superiores que podem rondar em média 30 tMS/ha/a. Em termos de produtividade de sementes verifica-se uma produção de 8-11% e um conteúdo de 25-32,5% de óleo em média (Gominho, 2008; Fernández, 2006; Curt, 2002). Verificou-se que se produz cerca de 75% de bolo de extracção como resultado da produção de biodiesel (Curt, 2002). O bolo de extracção apresenta os quantitativos em MS de 50,1% de C, 3,8%N, 0,8%P e 0,9%K e 5,1% em cinzas (Curt, 2002).

A sua produção como combustível sólido deve-se sobretudo à elevada produção de biomassa nas condições edafoclimáticas do Mediterrâneo com reduzidas entradas (energéticas e nutritivas), reduzida humidade do material colhido e à constituição da biomassa, sobretudo celulose, hemiceluloses e lenhina e a um elevado calor específico (Fernández, 1994). Contudo a sua utilização como combustível sólido tem diversos inconvenientes nomeadamente devido à logística de colheita que pode aumentar o conteúdo em cinzas pela contaminação com componentes do solo (problemas de aumento do conteúdo de cinzas). Por outro lado o tipo de fertilização pode aumentar os níveis de K ou Cl na biomassa que posteriormente causam problemas de incrustações ou depósitos nas caldeiras de biomassa (Fernández, 2006).

Na produção de pasta de papel o seu potencial foi avaliado num estudo europeu pertencente ao plano quadro onde estiveram diversas entidades envolvidas:

“Instituto Papelero de España” (Espanha), “Ordinariat für Holztechnologie” (Universidade de Hamburgo, Alemanha), o “Departamento florestal do Instituto Superior de Agronomia de Lisboa” (Portugal) e o “Institut National Polytechnique de Toulouse” (França). Verificou-se que as propriedades da pasta produzida são bastante similares à pasta produzida pelo eucalipto (Fernández, 2006).

Outras das utilizações do cardo estão relacionadas com o seu conteúdo em cinarina e silimarina. Estes compostos actuam como anti-oxidantes, hepatoprotectores e inibidores da síntese de colesterol, pelo que são utilizados na produção de medicamentos para o tratamento do fígado ou de doenças hepáticas (Fernández, 2006).

Falleh (2008) verificou actividade bacteriana dos extractos provenientes das folhas. Os extractos provenientes das folhas do cardo foram testados em bactérias patogénicas para os humanos, sendo efectivos contra as bactérias Gram (+) e Gram (-) com particular efeito contra a actividade de *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis*, *Micrococcus luteus* e *Escherichia coli*. Verificou-se que as folhas apresentam um conteúdo elevado em flavonóides, ácido *p*-cumárico, ácido siríngico, ácido vanílico e ácido cinâmico. Os vários constituintes do cardo (folha, semente e flor) mostraram diferentes níveis de polifenóis totais, flavonóides totais e de condensados de taninos. Até ao momento não se verificou nenhum estudo relativo à análise da composição dos caules para os mesmos constituintes.

Com base na bibliografia consultada verifica-se que não existe nenhuma publicação referente a potencialidade de produção de biogás.

1.4 Objectivos do trabalho

Tendo em conta a bibliografia citada verifica-se que existe um elevado interesse na utilização da digestão anaeróbia não só como sistema de tratamento de resíduos orgânicos mas também da utilização de culturas energéticas para a produção de metano. O interesse por diversos países europeus foi demonstrado contudo a bibliografia citada centra-se sobretudo na utilização de biomassa específica para países nórdicos da Europa. No entanto, as condições climatéricas do Mediterrâneo, região do Sul da Europa a que pertence Portugal, são bastante diferentes no que se refere á temperatura média anual e à precipitação média anual. Conforme referido surge um interesse pela utilização da *Cynara cardunculus* L. como cultura energética na produção de biocombustíveis sólido e líquido (biodiesel), contudo verifica-se que não existe nenhuma referência relativa ao interesse pela produção de biometano.

O presente trabalho tem o objectivo de dar um primeiro passo no estudo da utilização desta cultura na produção de biometano. O objectivo deste trabalho centra-se sobretudo na realização de ensaios de digestão anaeróbia à escala laboratorial utilizando *Cynara cardunculus* L. como substrato e lama digerida de ETAR como inóculo. O objectivo principal é o de averiguar qual a produtividade específica de biogás e metano e qual o efeito de diferentes pré-tratamentos na digestão deste substrato. A metodologia e os métodos adoptados encontram-se descritos no capítulo seguinte.

2 Material e Métodos

O trabalho prático foi desenvolvido durante os meses de Novembro de 2008 a Agosto de 2009 e foi dividido em 3 fases:

- A. Caracterização do substrato (caules de *Cynara cardunculus* L.) e inóculos;
- B. Ensaios exploratórios de digestão anaeróbia;
- C. Utilização de diferentes pré-tratamentos como forma de aumentar a produção específica de biogás e metano.

A descrição da metodologia adoptada em cada ensaio bem como os parâmetros determinados e os materiais utilizados nas análises laboratoriais em cada uma das fases encontra-se descrito nos pontos seguintes.

2.1 Fase A

2.1.1 Processamento e preparação dos caules de *Cynara*

Esta fase é caracterizada pela sequência de etapas conforme esquematizada na Figura 2.1.

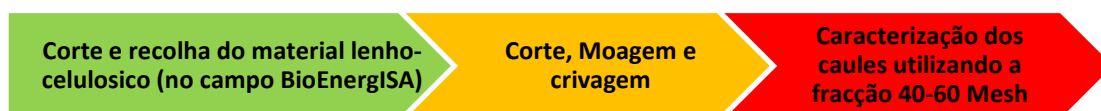


Figura 2.1- Sequência do processamento e preparação das amostras

Os caules de *Cynara cardunculus* foram recolhidos no campo pedagógico experimental BioEnergISA (Figura 2.2) em Novembro de 2009. Posteriormente, através de trabalhos de corte (Figura 2.3), moagem (Figura 2.4 e Figura 2.5) e crivagem (Figura 2.6) obteve-se a fracção desejada de 40-60 Mesh para posterior caracterização do material e que serviu de substrato nos ensaios de digestão anaeróbia (com excepção do ensaio final descrito na Fase C em que foi utilizada a fracção resultante da 1ª moagem de 10 mm).



Figura 2.2- Caules *Cynara* durante o ciclo (direita) no campo BioEnergISA e caules recolhidos no final do ciclo (esquerda)



Figura 2.3- Corte inicial dos caules em fracções de 2 cm de largura



Figura 2.4- 1ª Moagem (utilizando o moinho referenciado e a malha 10,0 mm)



Figura 2.5- 2ª Moagem (utilizando o moinho referenciado e a malha 1,10 mm)



Figura 2.6- Crivagem do material proveniente da 2ª moagem (obtenção das fracções na figura da esquerda: 40, 40-60, 60-80 e 80 Mesh)

Após estas operações através da utilização de recipientes de volumes conhecidos ($1638,63$ e $66,73 \text{ cm}^3$) foi determinada a densidade aparente de cada fracção obtida.

2.1.2 Inóculos

A origem do inóculo é um factor importante a ter em conta nos ensaios de digestão anaeróbia em reactor descontínuo.

Os inóculos utilizados foram provenientes:

- Digestor anaeróbio da ETAR de Chelas (lama digerida);
- Digestor continuo (CSTR) alimentado com chorumes de suinicultura.

O inóculo ou lama digerida proveniente da ETAR de Chelas foi retirado de dois digestores e colocado em proporções iguais (50:50) directamente em garrações (5l) e selado pelas respectivas tampas, sendo transportado à temperatura ambiente até ao laboratório do ISA. Após a recolha registou-se o valor do pH e a temperatura da amostra proveniente de cada digestor em funcionamento. No próprio local encontram-se dois monitores (Figura 2.7) que registam em contínuo os valores de pH e temperatura de cada digestor (A e B).



Figura 2.7- Monitorização em contínuo do pH e temperatura dos digestores anaeróbios (A e B)

No caso do inóculo proveniente do reactor CSTR do ISA, utilizando chorume de suinicultura, retirou-se 500 ml de lama digerida para um balão. O balão foi selado com parafilme e colocado num banho de água quente termostaticado à temperatura de 35°C.

Após a recolha dos dois inóculos foi realizada a sua caracterização com base no teor em ST, SV, pH, condutividade, CQO_{bruto} e $CQO_{filtrado}$. Devido à impossibilidade de efectuar testes de actividade metanogénica foram realizados, durante os ensaios exploratórios, ensaios de biodegradabilidade com cardo. Estes ensaios permitiram seleccionar o inóculo mais adequado.

2.2 Fase B

O interesse do trabalho, como já foi referido deve-se ao facto de existir algum desconhecimento e falta de dados relativamente à digestão anaeróbia e respectiva biodegradabilidade de *Cynara cardunculus*. O trabalho prático inicia-se com a realização de alguns ensaios exploratórios de modo a averiguar qual a produtividade específica de biogás.

2.2.1 Origem do Inóculo

Inicialmente houve a necessidade de seleccionar um dos inóculos disponíveis de modo a poder utilizar sempre o mesmo inóculo. Optou-se por realizar um ensaio de biodegradabilidade segundo o procedimento descrito na Tabela 2-1. A selecção do inóculo foi realizada segundo o melhor resultado de produtividade específica de biogás alcançada para um tempo de retenção de 10 dias.

Tabela 2-1- Procedimento adoptado para preparação do ensaio

Parâmetros do ensaio	Reactor A ₁ (controlo)	Reactor A ₂	Reactor B ₁ (controlo)	Reactor B ₂
SV introduzidos (g/l)	1,53	2,09	2,05	2,60
Volume de Inóculo (ml)	120	120	120	120
Volume de água	180	180	180	180
Substrato (g)	0	0,58	0	0,58
pH	6,9	6,8	7,9	7,7

2.2.2 Ensaio Exploratórios de Digestão Anaeróbia

Após a selecção do inóculo, e devido ao desconhecimento inicial de qual o procedimento mais adequado para avaliar a degradação anaeróbia de *Cynara cardunculus*, optou-se por adoptar o mesmo método (Tabela 2-2) em todos os ensaios resultante de uma adaptação do procedimento utilizado por Gunaseelan (1995).

Tabela 2-2- Procedimento utilizado no ensaio A de 300 ml e B de 2000 ml (adaptado de Gunaseelan 1995)

ENSAIO A				
Reactores	Substrato (S) (ml)	Concentração do substrato (g SV/l)	Inóculo (I) (ml)	Razão I/S (ml I/g SV S)
Controlo	0	NA	231	NA
Reactor 1	69	2,871	231	116,1
Reactor 2	69	5,742	231	58,2
Reactor 3	69	8,613	231	38,9
ENSAIO B				
Controlo	0	NA	1538	NA
Reactor 1*	462	28,71	1538	116,1
Reactor 2*	462	28,71	1538	116,1

*Reactor 1-substrato sujeito a pré-tratamento térmico; Reactor 2-substrato sem pré-tratamento térmico

A metodologia seguida nestes ensaios teve início com a realização do ensaio seleccionando a melhor razão entre inóculo (I)(ml)/Substrato (S)(g SV), Ensaio A, e posteriormente realizou-se um segundo ensaio com esta razão I/S utilizando substrato pré-tratado, Ensaio B (Figura 2.8).

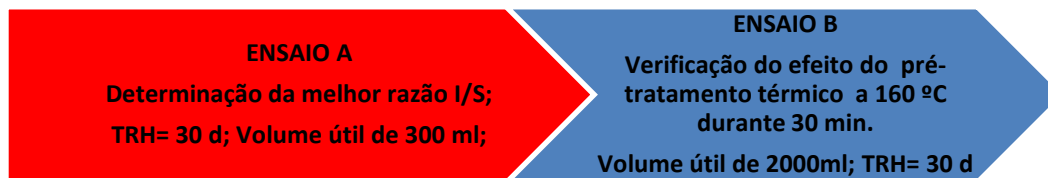


Figura 2.8- Sequência de passos adoptada na realização dos ensaios exploratórios

Conforme é descrito em Gunaseelan(1995) o volume de inóculo é mantido constante fazendo-se variar a concentração de substrato. O autor utilizou um volume útil de 1300 ml, contudo no presente estudo utilizaram-se reactores que permitiam garantir um volume útil de 300 ml e de 2000 ml. Deste modo, para garantir o melhor volume de inóculo, adoptou-se uma razão entre volume de inóculo e volume útil de reactor igual a 0,8. Os volumes obtidos para cada uma das situações são apresentados na Tabela 2-2.

Por outro lado a concentração do substrato foi igualmente adaptada às condições laboratoriais, pelo que não havendo quantidades elevadas de substrato utilizaram-se concentrações 10 vezes menores do que as descritas em Gunaseelan (1995). Para garantir uma concentração de 28,71 g SV/l são necessários 30 g de substrato. Contudo tendo em conta as dimensões do reactor e o volume de inóculo adicionaram-se 3 g. Posto isto, as concentrações de substrato iguais a 2,871, 5,742 e 8,613 g SV /l correspondem a exactamente 3, 6 e 9 g de substrato, sendo que o volume de substrato corresponde simplesmente a 69 ml de água.

No que se refere ao pré-tratamento térmico com água (destilada) foi utilizada uma temperatura de 160 °C, um tempo de tratamento igual a 30 minutos e uma concentração de sólidos no reactor igual a 12,5 % (para garantir esta percentagem de sólidos adicionou-se água destilada na razão 1/8). Os critérios para a selecção das condições do pré-tratamento térmico foram baseados nas referências de Hendriks *et al.* (2009), de Ballesteros (2008) e de Liu (2005).

A sequência dos ensaios exploratórios teve como objectivo perceber inicialmente a influência da razão entre inóculo e substrato na produtividade específica de biogás e, posteriormente, para essa mesma razão verificar qual o efeito do pré-

tratamento térmico com água (ou autohidrólise) na produtividade específica de biogás e metano.

2.3 Fase C

Esta fase surge como resultado das observações e dúvidas sentidas durante os ensaios exploratórios, nomeadamente no que se refere ao efeito da razão de I/S e do pré-tratamento na produtividade final de biogás e metano. Com este propósito, e tendo em conta as dificuldades encontradas na Fase B relativamente a fugas e colmatção dos tubos de recolha do biogás, procedeu-se à montagem de um sistema descontínuo à escala de 300 ml (Figura 2.12).

Utilizando este sistema descontínuo e com base no mesmo procedimento utilizado na Fase B (Tabela 2-2), procedeu-se a realização de 3 ensaios sequenciais (Figura 2.9 e Tabela 2-3).



Figura 2.9- Sequência de passos adoptada para a realização da Fase C

Em cada ensaio seleccionou-se a melhor variável, com base na produtividade específica de biogás e de metano, alcançada em 11 dias de tempo de retenção hidráulico. Deste modo, do Ensaio I seleccionou-se a melhor razão I/S, no Ensaio II, utilizando a melhor razão I/S obtida, seleccionou-se o melhor tempo de reacção para o pré-tratamento térmico e no Ensaio III seleccionou-se o melhor reagente químico.

Tabela 2-3- Metodologia utilizada em cada ensaio

Ensaio	Variável	Reactores ¹⁰					Controlo
		Reactor 1	Reactor 2	Reactor 3	Reactor 4	Reactor 5	
I	Razão I/S (ml I/g SV Substrato)	349,8	174,2	116,1	87,5	69,7	NA
II	Tempo de reacção (minutos)	10	15	20	30	NA	NA
III	Reagente para o pré-tratamento termo químico	NaOH	NH ₃ (aq)	HNO ₃	CH ₃ COOH	NA	NA

O procedimento laboratorial para cada um dos ensaios teve diferenças inerentes ao seu procedimento, contudo o volume de inóculo bem como o volume de substrato mantiveram-se sempre constantes e iguais a 231 ml e 69 ml

¹⁰ Para cada reactor existe um replicado com o objectivo de recolher o Biogás em sacos para posterior análise do conteúdo em metano.

respectivamente. Relativamente ao pré-tratamento as condições de temperatura e concentração de sólidos nos reactores são as referidas em 2.2.2.

No ensaio II fez-se variar o tempo de reacção para o pré-tratamento utilizando água como reagente solubilizante e no ensaio III fez-se variar apenas o reagente solubilizante. Neste último utilizaram-se como reagentes solubilizantes: NaOH (14,0% p/p), NH_3 (aq) (1,5% p/p), HNO_3 (1,0% p/p) e CH_3COOH (1,0% p/p).

2.3.1 Ensaio Final

Após os Ensaio I, II e III e com base nos seus resultados realizou-se um ensaio final utilizando 3 reactores descontínuos de 2000 ml (Figura 2.13). O objectivo foi o de verificar o efeito do tratamento térmico com a adição de um reagente químico solubilizante na produtividade final de biogás e metano após 30 dias de tempo de retenção hidráulico.

O procedimento é o referido na Tabela 2-2 para o Ensaio B, com a excepção de que neste caso se utilizou um substrato que possui uma granulometria superior á utilizada nos ensaios anteriores e resultante da 1ª moagem referida na Fase A (Figura 2.4). As condições do pré-tratamento utilizadas neste ensaio têm por base o melhor resultado em termos de volume acumulado de biogás, produtividade específica de biogás e metano obtido nos ensaios I, II e III.

2.3.2 Ensaio em paralelo

Também foi estudado o efeito do pré-tratamento biológico por via enzimática e o pré-tratamento mecânico.

No caso do pré-tratamento mecânico foram utilizadas cinco diferentes granulometrias: 2mm, 40 Mesh, 40-60 Mesh, 60-80 Mesh e 80 Mesh (Figura 2.10). As condições do ensaio foram idênticas a dos ensaios II, III e final no que se refere a razão I/S igual a 69,7 ml I/g SV S.

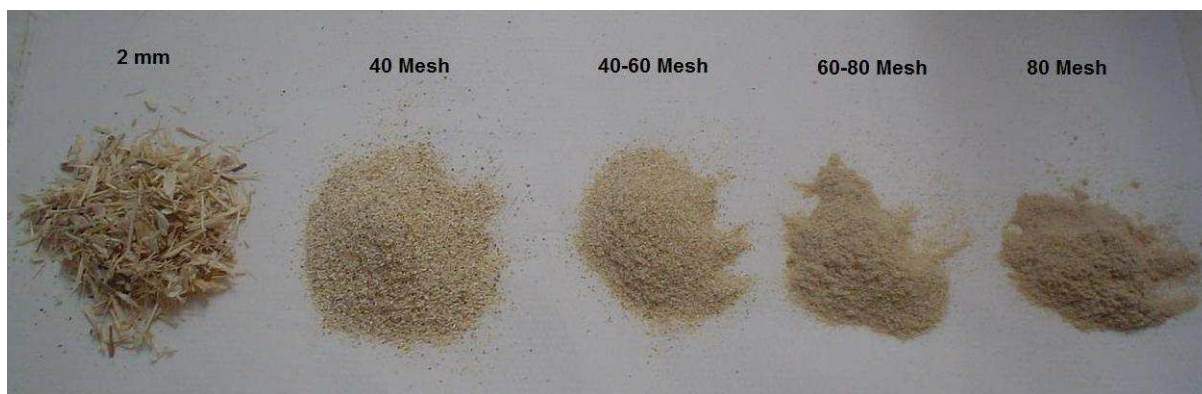


Figura 2.10- Granulometrias utilizadas no ensaio (da esquerda para a direita: 2mm, 40 Mesh, 40-60 Mesh, 60-80 Mesh e 80 Mesh)

Relativamente ao pré-tratamento enzimático foi realizado utilizando 2 tipos de celulases responsáveis pela quebra das ligações: exo-1,4- β -D-glucanase e endo-1,4- β -D-glucanase no caso da *Celluclast 1.5 L* (nome comercial) e 1,4- β -D-glucosidases no caso da *Novozymes 188*. Para este ensaio é necessário considerar duas fases: fase de pré-tratamento enzimático e o ensaio de digestão anaeróbia propriamente dito. A Tabela 2-4 resume as condições e o procedimento utilizado para o pré-tratamento enzimático:

Tabela 2-4-Procedimento utilizado na realização do pré-tratamento enzimático

Requisitos

Enzimas *Celluclast 1.5L* e *Novozyme 188*

Substrato com dimensões inferiores a 1 mm (neste caso utilizou-se a granulometria igual 40-60 Mesh)

Solução tampão de acetato 0,2 M (pH=4,8)

Procedimento

Foram adicionadas 5g de substrato a um frasco com tampa de enroscar e foram adicionados a este 76 ml de solução tampão com diluição 1:10.

Em seguida utilizando uma micropipeta são adicionadas as enzimas: 1,4 ml de *Celluclast* e 0,4 ml de *Novozymes*. Para este ensaio utilizaram-se 8 frascos de 100 ml, 3 dizem respeito ao tratamento enzimático durante 24h e os outros 3 dizem respeito às 48 h, e os restantes 2 frascos foram utilizados com o intuito de analisar o conteúdo de açúcares solubilizados quando decorridas as 24h e 48h. Decorrido o tempo de tratamento enzimático as amostras foram guardadas numa arca frigorífica (-37°C) para posterior análise em HPLC.

Relativamente aos outros frascos, após decorridas as 24 horas, são retirados 3 frascos e colocados num frigorífico e os restantes 3 frascos permanecem a 50°C. Após decorridas as 48 h os frascos são retirados do banho a 50°C e colocados à temperatura ambiente e os frascos que estão no frigorífico são retirados e colocados à temperatura ambiente. Após este procedimento dá-se início a preparação do ensaio de digestão anaeróbia.

As condições do ensaio de digestão anaeróbia são exactamente as mesmas dos ensaios anteriores, excepto o volume de substrato que é de 76 ml devido às condições do pré-tratamento enzimático. Antes de efectuar a adição dos substratos e inóculo a cada um dos reactores é efectuada a correcção do pH do substrato sujeito ao pré-tratamento enzimático. O pH para estes casos é corrigido próximo de 5,8, uma vez que se verificou que esta correcção era suficiente para garantir um pH na mistura com o inóculo igual ou superior a 6,4-6,5 (próximo das condições ideais para as bactérias metanogénicas).

Para este ensaio, utilizando uma razão de I/S igual a 69,7 ml I/g SV S, utilizou-se diferentes substratos:

- Substratos pré-tratados por via enzimática às 24 h e 48 h;
- Substrato sem pré-tratamento adicionando no início do ensaio as enzimas;
- Substrato sem pré-tratamento.

Em todos os ensaios referidos nesta Fase C foi realizado um replicado para posterior análises de CQO (bruto e filtrado), SV/ST e do conteúdo em azoto (N_k e $N-NH_4^+$).

2.4 Métodos

Neste capítulo são apresentados os parâmetros determinados e os métodos que levaram à sua determinação. Durante todo o trabalho prático a determinação de alguns parâmetros bem como os materiais utilizados foi repartida por 3 laboratórios: Departamento de Química Agrícola e Ambiental do ISA - Departamento de Engenharia Florestal do ISA e Departamento de Energias Renováveis do actual LNEG. Contudo, a maioria de todo o trabalho prático foi desenvolvido nos laboratórios do ISA. No que se refere à caracterização do material lenhocelulósico, pré-tratamentos e os ensaios descontínuos de 300 ml referentes à Fase C foram realizados no laboratório do Departamento de Engenharia Florestal do ISA. A determinação de todos os outros parâmetros químicos, a realização da Fase B e os ensaios descontínuos de 2000 ml foram realizados nos laboratórios do Departamento de Química do ISA. Apresentam-se os parâmetros determinados ao longo de todo o trabalho experimental e os respectivos métodos (Tabela 2-5) bem como os equipamentos utilizados de maior importância (Tabela 2-6):

Tabela 2-5- Parâmetros e respectivos Métodos utilizados durante o trabalho prático

Parâmetros	Métodos
Celulose Hemiceluloses	Conforme descrito no livro <i>Handbook of Wood Chemistry and Wood Composites</i> (Rowell <i>et. al</i> , 2005) para a determinação da holocelulose e α -celulose
Lenhina	
Klason	TAPPI 13m – 54
Solúvel	TAPPI: UM 250
Total	Somando o teor em lenhina klason e lenhina solúvel
Extractivos	Método de Soxtec
Hidratos de Carbono	Adaptado da TAPPI 249 pm – 75
Humidade	Através da diferença entre peso seco (Ps) e peso húmido (PH) mediante a utilização de uma estufa (100-105 °C) medindo o peso antes (PH) e depois (Ps)
Cinzas	TAPPI 15 os – 58
ST	Standard Methods for the examination of Water and Wastewater, 1998
SV	Standard Methods for the examination of Water and Wastewater, 1998
pH	Conforme NP EN 12176 de 2000

Condutividade	Standard Methods for the examination of Water and Wastewater, 1998
Carbono Orgânico Total	Através da diferença entre carbono total e carbono inorgânico.
N _{total}	Conforme ISSO 11261:1995 (E)
N _k	Standard Methods for the examination of Water and Wastewater, 1998
N-NH ₄ ⁺	Standard Methods for the examination of Water and Wastewater, 1998
N-NO ₃ ⁻	Standard Methods for the examination of Water and Wastewater, 1998
Minerais (P, Ca, Na, K, Cu, Zn)	Standard Methods for the examination of Water and Wastewater, 1998
ST	Standard Methods for the examination of Water and Wastewater, 1998
SV	Standard Methods for the examination of Water and Wastewater, 1998
pH	Standard Methods for the examination of Water and Wastewater, 1998
Condutividade	Standard Methods for the examination of Water and Wastewater, 1998
CQO (bruto e filtrado)	Standard Methods for the examination of Water and Wastewater, 1998
Análise do conteúdo do biogás (% CH ₄ , CO ₂ e O ₂)	Cromatografia gasosa utilizando o cromatografo Varian-3800, detecção por condutividade térmica, coluna a 50 °C, injector a 60 °C e detector a 150 °C sendo hélio o gás de arrastamento a 99,9995 %.
Ácidos Gordos Voláteis (mg/l)	Por titulação: <i>5 pH point titration</i> (com este método a alcalinidade é determinada em simultâneo) (Moosbrugger, 2009); Por cromatografia gasosa utilizando um cromatografo Hewlett Packard – 5890, detecção por ionização de chama à temperatura de 250 °C, injector 175°C e forno a 170 °C sendo hélio o gás de arrastamento a 99.9995 %.
Volume de biogás	Por deslocamento de liquido (água da torneira) numa proveta

Tabela 2-6 Equipamentos utilizados ao longo do trabalho prático

Laboratórios	Aparelhos	Características
Departamento de Eng. Florestal	Balanças	KERN & SOHN GMBH ITB 60 K2LIP
		METTLER H31AR
		METTLER PM200
		SARTORIUS RESEARCH RC 210 P
	Moinhos	RETSCH MÜHLE Gmbh SM1 (1500 W; 50 Hz; 220V)
		RETSCH SM2000 (1500 W; 50 HZ; 400 V)

		THOMAS (50 HZ; 110-230 V)
	Crivador	RETSCH AS 200BASIC (230 v; 430 VA; 50 Hz)
	Crivos	40 Mesch (425 µm) 60 Mesch (250 µm) 80 Mesch (180 µm) 1mm 2mm
	Espectofotômetro	SHIMADZU UV-160A
	Cromatógrafo	HP 5890
	Medidor de pH	PICCOLO PLUS HI 1295
	Mufla	550°C
	Estufas	60 °C e 100-105°C
	Centrifuga	3000 rpm
	Reactores de 300 ml	Ver Figura 2.12
	Banho maria	35-37 °C (no caso dos ensaios de digestão anaeróbia) e 50°C (no caso do pré-tratamento enzimático)
Departamento de Química Agrícola e ambiental	Balanças	METTLER AE200 SHIMADZU BK-2200H
	Mufla	550°C
	Estufa	100-105 °C
	Centrifufa	3000 rpm
	COT aparelho	SKALAR PRIMES ^{SC} TOC ANALYSER
	Medidor de pH	HACH SENSION 4 MODEL 51910 (Platinum series)
	Potenciômetro com eléctrodo de NO ₃ ⁻	Crison Micro pH2001
	Medidor da Condutividade	HACH SENSION 7 MODEL 51975
	Reactores de 2000 ml e de 300 ml	Ver Figura 2.11 Figura 2.13 Figura 2.14
	Banho-maria ou termostatzado	No caso dos reactores 2000 ml a temperatura foi igual a 37 °C no caso dos reactores de 300 ml foi de 35-37°C.
Espectofotômetro de absorção	SP9 (para os minerais: Ca ²⁺ , Na ⁺ , Mg ²⁺ , K ⁺ , Mn ²⁺ , Cu ⁺ , Zn ²⁺ , Fe ²⁺)	

	atómica	HITACHI U2000 (apenas para o fósforo, P ⁵⁺)
Departamento de Energias Renováveis (LNEG)	Cromatógrafos gasosos	Varian 3800 (análises de CH ₄ , CO ₂ e O ₂) HP 5890 (análises de ácidos gordos voláteis: ácido acético, propiónico, isobutírico, butírico, valérico)
Departamento de Biotecnologia (LNEG)		HPLC

2.4.1 Descrição dos Métodos Utilizados

2.4.1.1 **Determinação da celulose e hemiceluloses**

A determinação destes dois polímeros é efectuada após a preparação da holocelulose. A holocelulose, que não é mais do que o somatório dos polímeros de celulose (ou α -Celulose) e hemiceluloses, é preparada utilizando uma amostra em peso seco livre de extractivos. A holocelulose é definida como a fracção de hidratos de carbono insolúveis em água e a sua obtenção é efectuada mediante a remoção da lenhina. Posteriormente à obtenção da holocelulose é possível efectuar a determinação das hemiceluloses e da celulose. As hemiceluloses são constituídas por componentes que são rapidamente hidrolisados com a utilização de ácidos diluídos ou bases diluídas a temperaturas quentes ou com a adição de NaOH a 5% a frio (Roswell *et al.*, 2005). Por conseguinte o princípio do método utilizado baseia-se na adição de hidróxido de sódio e ácido acético obtendo-se um resíduo designado por α -celulose e uma fracção solubilizada designada por hemiceluloses.

2.4.1.2 **Lenhina**

O cálculo do conteúdo de lenhina presente nos caules de *Cynara cardunculus* é efectuado utilizando amostras previamente extratadas. Com a adição de ácido sulfúrico a 72% todos os componentes presentes são solubilizados incluindo uma pequena fracção da lenhina designado por lenhina solúvel. O conteúdo de lenhina resulta do somatório da determinação da lenhina presente na fracção solubilizada (lenhina solúvel) após análise num espectrofotómetro e da lenhina Klason que não é mais do que a fracção sólida que não foi solubilizada. A quantificação da lenhina Klason resulta da determinação do peso deste resíduo sólido e a quantificação da lenhina Solúvel é realizada mediante a seguinte expressão:

$$\% \text{ Lenhina soluvel} = \frac{A_{205} \times \text{Volume inicial (ml)} \times \text{Factor de diluição}}{E \times \text{Pesos seco (mg)}} \times 100$$

Onde E é o factor de conversão para concentração igual a 110 g/l, A_{205} é o valor medido da amostra no espectrofotómetro utilizando uma absorvância igual 205 nm e o volume inicial corresponde ao volume da solução resultante da solubilização com ácido sulfúrico e filtração que foi sempre constante e igual a 250 ml. Para todas as amostras foi realizado um duplicado.

2.4.1.3 Hidratos de carbono

Utilizando 100 ml do filtrado resultante da determinação da lenhina Klason procedeu-se à determinação dos açucares. Três passos fundamentais são levados a cabo com a adição de diversos reagentes:

- Neutralização e concentração (inositol a 1%, azul de bromofenol e hidróxido de bário);
- Redução (boro hidreto de sódio, ácido acético glacial e metanol);
- Acetilação (anidrido acético, ácido sulfúrico a 72% e diclorometano).

O procedimento é levado a cabo com base nos métodos TAPPI, a solução final obtida é concentrada num rotavapor e, após leitura num cromatografo gasoso, é efectuada a quantificação dos hidratos de carbono estruturais (glucose, xilose, manose, galactose, arabinose e ramanose). Em todas as amostras foi realizado um duplicado.

2.4.1.4 Extractivos

A determinação dos extractivos, como foi referido anteriormente, é uma determinação a efectuar antes de qualquer análise e quantificação das várias fracções lenhocelulósicas. O método utilizado neste trabalho designa-se por método de Soxtec utilizando diferentes solventes (diclorometano, etanol e água) de modo a proporcionar a extracção dos componentes não estruturais. Após cada extracção é efectuada a quantificação do peso do extracto expresso em %, conforme a seguinte expressão:

$$\% \text{ de extracto} = \frac{\text{Peso do residuo}}{\text{Peso seco da amostra}} \times 100$$

Para todas as amostras foi realizado pelo menos um duplicado

2.4.1.5 Determinação dos Ácidos Gordos Voláteis e Alcalinidade

A determinação dos ácidos gordos voláteis foi efectuada utilizando o método por titulação a cinco pH também conhecido por "5 pH point titration". É um método que tem sido utilizado no acompanhamento de algumas centrais de biogás na Europa devido á sua simplicidade e morosidade (Moosbrugger, 2009). Este método tem em conta o pH inicial da amostra (pH_0) e a partir deste pH desenvolvem-se titulações a diferentes valores de pH registando-se o volume do titulante utilizado a cada ponto de equivalência. Após este procedimento colocam-se os valores obtidos para pH ($pH_0, pH_1, pH_2, pH_3, pH_4$) e o volume de titulante (v_1, v_2, v_3, v_4) num programa macro elaborado para o efeito em Excel. Deste programa é possível extrair os valores de AGV (mg/l) e alcalinidade (mg $CaCO_3/l$). Para todas as amostras foi realizado um duplicado.

2.4.1.6 Determinação do conteúdo em Azoto

A determinação do conteúdo em azoto é expressa em termos de azoto total e azoto orgânico (diferença entre azoto Kjeldahl e azoto amoniacal). Posteriormente é possível determinar o conteúdo em proteína multiplicando o valor de Norg por 6,25. A determinação de N_{total} e N_K consiste em três operações fundamentais:

- Mineralização da amostra (em meio ácido H_2SO_4 concentrado na presença do catalisador no caso de N_K);
- Destilação (alcalinização do meio com adição de NaOH, destilação para um meio ácido contendo H_3BO_3 e indicador misto);
- Titulação (com HCl);

No caso da determinação de $N-NH_4^+$ não existe fase de mineralização, sendo efectuada directamente a destilação. Em amostras sólidas como é caso dos caules de cardo a determinação de azoto amoniacal é efectuada após extracção prévia com KCl 2 M esta fase é realizada durante 24 h.

A quantificação destes elementos (N_{total} , N_K e $N-NH_4^+$) é efectuada com base na seguinte expressão:

$$N_K \text{ ou } N_{total} \text{ ou } N - NH_4^+ (mg/l) = \frac{f \times 14 \times V_{acido} \times 1000}{V^*_{amostra}}$$

Onde f corresponde ao título da solução de HCl utilizada (em N), V_{acido} corresponde ao volume de ácido gasto na titulação e $V_{amostra}$ é o volume amostra

utilizado (no caso de amostras sólidas deixa de existir volume passando a existir peso e neste caso o valor de N_K ou N_{total} vem expresso em mg/kg). Para todas as amostras foi realizado um duplicado.

Foi ainda efectuado a título excepcional a determinação do azoto nítrico ou nitratos ($N-NO_3^-$). Esta determinação apenas serviu para verificar qual a concentração de nitratos presentes durante o ensaio II Fase C aquando da adição de ácido nítrico. O método baseia-se na medição do potencial (em mV) de uma solução através de um eléctrodo específico e com base numa recta de calibração de equação linear na forma $y=mx+b$ onde y corresponde ao potencial medido em mV e o x corresponde ao $\log(mg\ N-NO_3^-)$. Deste modo, o valor medido do potencial (y em mV) corresponde a um valor específico da concentração de nitratos (em mg/l). Em todas as amostras foi realizado um duplicado.

2.4.1.7 Determinação do conteúdo em carbono

Para a determinação do conteúdo em carbono foram utilizados 3 diferentes métodos consoante o tipo de amostra. No caso da caracterização dos caules de *Cynara cardunculus* foi utilizado a determinação do carbono orgânico total. Neste caso, a amostra em peso seco é submetida a altas temperaturas entre 650 a 1000 °C e o CO_2 libertado é lido através de infravermelho. O aparelho efectua duas leituras, uma correspondendo ao carbono total (CT) efectuada a 1000 °C e outra leitura efectuada a temperaturas inferiores 650°C correspondendo ao carbono inorgânico (CI). A diferença entre CT e CI designa-se por carbono orgânico total (COT). No presente caso admitindo-se que o CI é praticamente inexistente assumiu-se que o CT é igual ao COT. Um método mais simples e menos dispendioso de determinar o COT resulta da divisão do conteúdo de sólidos voláteis da amostra por 2 (sugerido por Zucconi e de Bertoldi, 1987). No caso das amostras provenientes dos ensaios de digestão anaeróbia apenas se efectuou o balanço do carbono em termos de análises de carência química em oxigénio e de SV (ou SVT-Sólidos Voláteis Totais).

No que se refere a determinação dos SV ou SVT foi um parâmetro analisado em todos os ensaios exceptuando alguns ensaios exploratórios. É uma determinação simples e idêntica à dos sólidos totais (ST) e é realizada após esta determinação, utilizando uma mufla a 550°C. A perda de peso referida em função do peso seco

é considerada SV ou SVT. Em todas as determinações foi realizado um duplicado ou triplicado.

Relativamente à determinação da CQO_{bruto} e CQO_{soluvel} foram realizadas com base no método de oxidação com dicromato de potássio ($K_2Cr_2O_7$). Após titulação com sal de Mohr é efectuada a quantificação da CQO:

$$CQO \text{ (mg } O_2/l) = \frac{8000 \times (V_0 - V_1) \times c}{V}$$

Onde 8000 é a massa, em mg, de $\frac{1}{2}$ equivalente grama de O_2 , V_0 é o volume, em ml, da solução de sulfato de ferro (II) e amónio (sal de Mhor) gasto na titulação do ensaio em branco, V_1 é o volume, em ml, de sal de Mohr gasto na titulação da amostra, V é o volume, em ml, da toma da amostra e c é o título, expresso em normalidade, da solução de sal de Mohr.

2.4.1.8 Reactores utilizados para os ensaios de Digestão Anaeróbia

A montagem dos ensaios à escala de 300 ml foi realizada com materiais acessíveis e de baixo custo que permitissem de um modo simples averiguar a biodegradabilidade da *Cynara cardunculus*.

Durante os ensaios exploratórios foi utilizado o esquema representado na Figura 2.11.



Figura 2.11- Esquema de montagem utilizado no Ensaio A (**A**- garrafas de vidro de 400 ml, **B**- provetas de 500 ml, **C**- tampas (de balões volumétricos) previamente perfuradas, **D**- banho maria à temperatura entre 37-42 °C (banho termostatizado de um rotavapor), **E**- recipiente com água como base das provetas, **F**- tubos flexíveis constituídos por polietileno, **G**- elásticos como fixação das provetas a base)

Foi ainda construído outro sistema a mesma escala de 300 ml (Figura 2.12) para a realização dos ensaios descontínuos durante a Fase C.



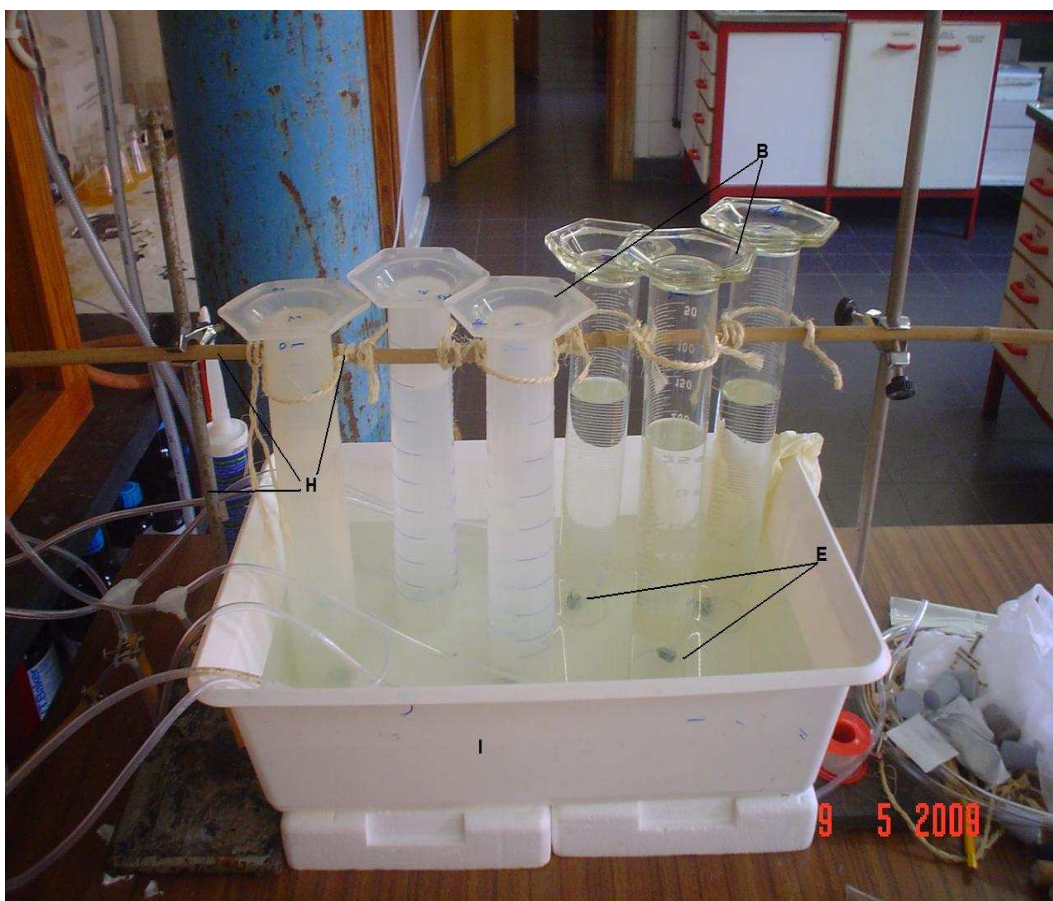


Figura 2.12- Montagem do sistema descontínuo de 300 ml adoptado para a realização dos ensaios durante a Fase C (**A**- garrafas de vidro de 500 ml, **B**- provetas de 500 ml, **C**- tampas de “borracha” perfuradas, **D**- ponto de amostragem de gás, **E**- fixação do tubo no interior da proveta, **F**-tubos de polietileno de 1m e 1,6 m, **G**-6 sacos TEDLAR de 500 ml, **H**- fixação e suporte das provetas, **I**- recipiente com água como base para a colocação das Provetas, **J**- banho maria a temperatura 35-37 °C)

Neste esquema (Figura 2.12) as 12 garrafas estão repartidas por conjuntos de 2. Cada conjunto de garrafas apresenta uma mistura idêntica, no entanto uma das garrafas está ligada a uma proveta permitindo a contabilização do volume de biogás produzido e a segunda garrafa está ligada a um saco TEDLAR que permite o armazenamento do biogás produzido para posterior quantificação do conteúdo em metano.

No caso dos ensaios à escala de 2000 ml foram utilizados os reactores (Figura 2.13), existentes no Departamento de Química Agrícola e Ambiental do ISA. Os reactores são dotados de um aparelho externo que regula a temperatura interna dos reactores igual a 37°C. Em cada reactor existe um agitador vertical, uma proveta (1l e 2l e foi ainda construído um garrafão de 5l para permitir a contabilização de volumes superiores a 2 l diários) e ainda uma válvula que permite retirar amostras de gás durante o ensaio (Figura 2.14). Para a recolha

das amostras foi utilizado um sistema próprio desenhado pela SGE (GAV-200 MK II) (Anexos Figura A 1).

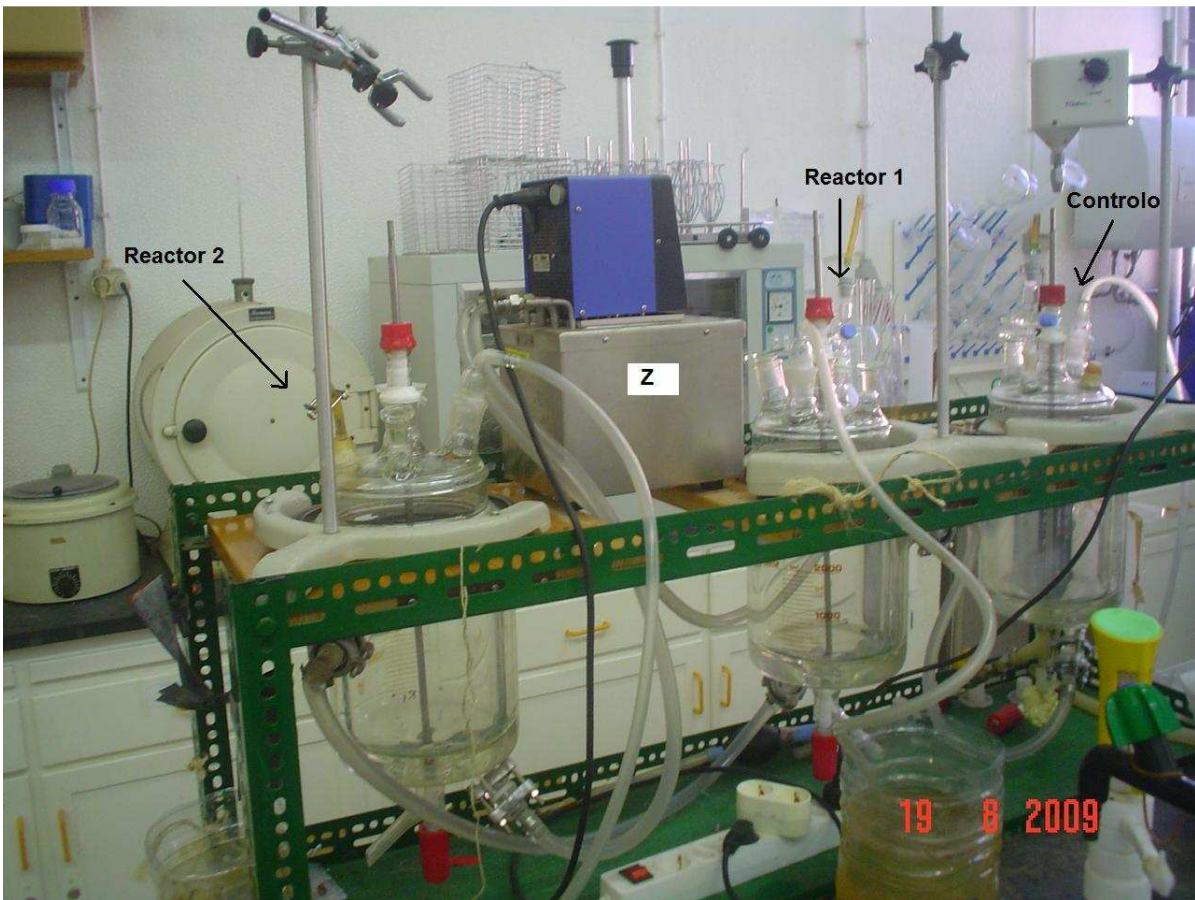


Figura 2.13- Esquema geral da montagem utilizada no ensaio B (**Z**- manta eléctrica de aquecimento e regulador da temperatura)



Figura 2.14- Montagem base para cada reactor: **1-** agitador; **2-** válvula para retirar amostras de biogás; **3-** veio vertical de agitação; **4-** saída de biogás; **5-** proveta para contabilização do volume de biogás

3 Análise dos Resultados e Discussão

Os resultados e a sua discussão estão repartidos consoante a fase a que se referem.

3.1 Fase A

3.1.1 Processamento e preparação dos caules

As operações unitárias, que antecederam a caracterização química do substrato, permitiram retirar algumas observações relativamente a densidade aparente das várias fracções obtidas durante o processamento dos caules de *Cynara* e o peso das várias fracções obtidas após 2ª moagem (Tabela 3-1). Na realização destas medições não foi realizado nenhum duplicado.

Tabela 3-1- Caracterização física do material processado

Fracções	Densidade aparente (kg/m³)	Peso da fracção (%)
Corte inicial	104	NA
1ª moagem	101	NA
2ª moagem	192	NA
40 Mesh	173	69
40-60 Mesh	177	18
60-80 Mesh	159	6
80 Mesh	133	7

Verifica-se que existe no caule de *Cynara* um maior peso da fracção 40 Mesh (ou aproximadamente 0,4 mm) relativamente às outras fracções. Por outro lado verifica-se um aumento da densidade com o aumento do processamento do material para partículas de menor dimensão, contudo a densidade diminui entre as fracções 40 e 80 Mesh evidenciando que as partículas de menor dimensão igual a 80 Mesh são consideravelmente menos pesadas que todas as outras.

3.1.2 Caracterização Química dos caules de *Cynara*

A caracterização química foi realizada no início e final da componente prática devido ao conteúdo de extractivos ser bastante diferente do referido na bibliografia (Tabela 3-2).

Tabela 3-2- Composição química dos caules de *Cynara*

Componente Químico	Conteúdo (% MS)*
Humidade	10,91
Cinzas	4,26
Extractivos	6,44
Lenhina Total	20,39
Lenhina klason	16,65
Lenhina Solúvel	3,74
Hidratos de Carbono Estruturais	56,62
Glucose	35,15
Xilose	16,67
Manose	1,40
Arabinose	1,32
Galactose	1,43
Ramanose	0,64
TOTAL	87,75

*Análises realizadas em quadruplicado

A caracterização inicial levantou algumas questões relativamente ao conteúdo de extractivos uma vez que na bibliografia consultada este conteúdo se situa entre os 21% no caso dos caules colhidos no centro e Sul de Portugal (Pereira, 1994) e 14% para os caules colhidos em Madrid (Ballesteros, 2008; Gominho, 2001).

Verificou-se nas duas determinações efectuadas que os caules colhidos no campo do ISA apresentam um conteúdo de extractivos entre 6-7%, verificando-se uma grande variabilidade deste parâmetro face aos resultados obtidos por outros autores (Pereira, 1994) (Gominho, 2001; Ballesteros, 2008). Os extractivos são componentes químicos da parede celular que podem ser extraídos por solventes. Estes componentes podem ser gorduras, ácidos gordos, álcoois alifáticos, fenóis, esteróides, resinas, e outros compostos clorados, etc. (Rowell, 2005). No caso dos caules de *Cynara* o conteúdo destes componentes varia consideravelmente entre 7% e 14% referidos em Gominho (2001) e Ballesteros (2008) e 21% como referido em Pereira (1994). Esta variação pode dever-se ao facto de após o corte dos caules estes permaneceram no campo BioEnergISA durante algum tempo antes de serem levados para as oficinas do Departamento Eng. Florestal. Os caules ficaram sujeitos as condições climatéricas dos meses de Setembro e Outubro pelo que poderá ter ocorrido alguma degradação ou extracção dos extractivos. Contudo, o factor responsável por esta variação não foi aferido, pelo que seria interessante verificar qual o motivo desta variação, nomeadamente se

depende das condições climáticas, do tipo de solo, da idade da cultura e das condições de armazenamento após colheita.

Foi ainda efectuada uma caracterização em termos de minerais e conteúdo em carbono e azoto, apresentados na Tabela 3-3.

Tabela 3-3- Composição mineral e conteúdo em carbono e azoto dos caules de *Cynara*

Parâmetro químico	Conteúdo (% MS)
Minerais	
Ca ²⁺	2,70
Na ⁺	1,68
Mg ²⁺	0,30
K ⁺	0,48
Cu ²⁺	0,00
Zn ²⁺	0,01
P ⁵⁺	0,12
<hr/>	
SV	95,72
COT	36,64
N _{total}	0,29
N _k	0,27
N-NH ₄ ⁺	0,02
N _{org}	0,26
C/N	126,90
C/P	300,16

Verifica-se que os caules de *Cynara* apresentam um maior conteúdo em cálcio e sódio, contudo verifica-se que apresentam quantitativos vestigiais pelo que não deverão influenciar negativamente o processo de digestão anaeróbia. Com base nos conteúdos de azoto orgânico, carbono orgânico e fósforo é possível determinar a razão de C/N e C/P. Verifica-se que este substrato apresenta valores demasiado elevados para as condições ideais de digestão anaeróbia conforme anteriormente referido.

3.2 Fase B

3.2.1 Origem do Inóculo

Nesta fase foi efectuado um ensaio com dois inóculos diferentes: um proveniente da ETAR de Chelas (lamas digeridas provenientes do digester anaeróbio) e outro proveniente de um reactor contínuo no ISA utilizando chorumes de suinicultura (que se encontrava em fase de arranque ou estabilização). Deste modo verificou-se qual o comportamento dos inóculos à adição do substrato (*Cynara cardunculus L.*). A caracterização dos inóculos utilizados no referido ensaio é apresentada na Tabela 3-4.

Tabela 3-4- Caracterização dos inóculos de ETAR e chorume (valores arredondados)

Parâmetros	Inóculo ETAR	Inóculo chorume
pH	6,6	8,0
ST (g/l)	19,0	120,6
SV (g/l)	12,8	85,3
CQO _{bruto} (mg/l)	22102,7	112297,7
CQO _{filtrado} (mg/l)	334,2	8668,2

Verificou-se que em termos de volumes de biogás (acumulado e diário) existe uma considerável diferença entre os dois inóculos (Figura 3.1 e Figura 3.2).

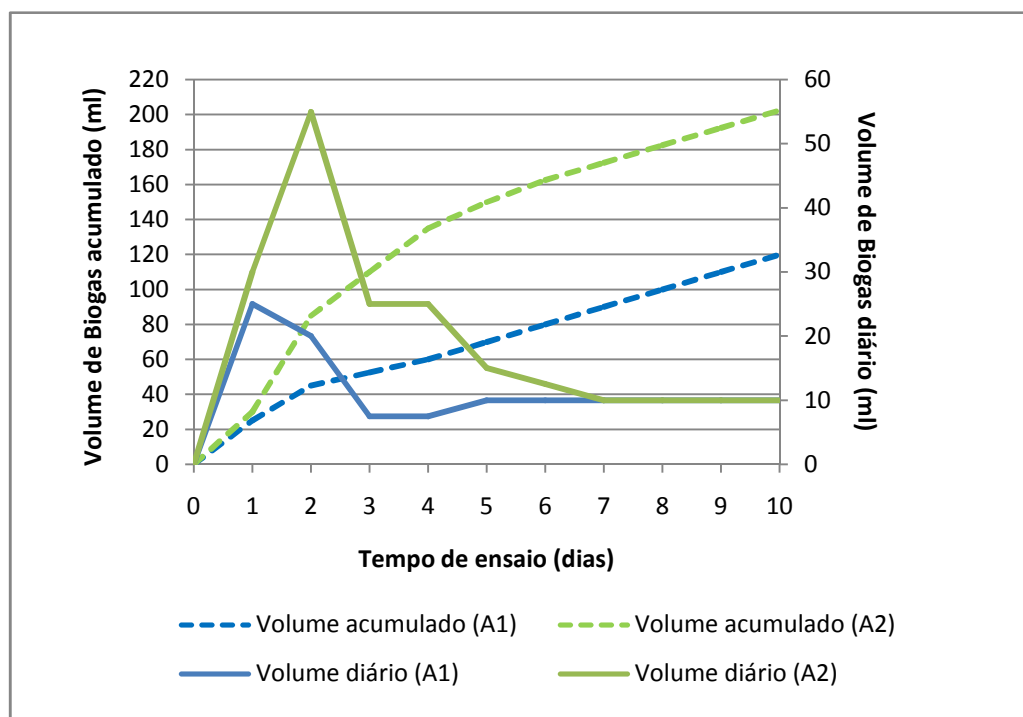


Figura 3.1- Volume diário e acumulado de biogás para o ensaio referente ao inóculo de ETAR (**A₁** reactor controlo; **A₂** reactor com substrato)

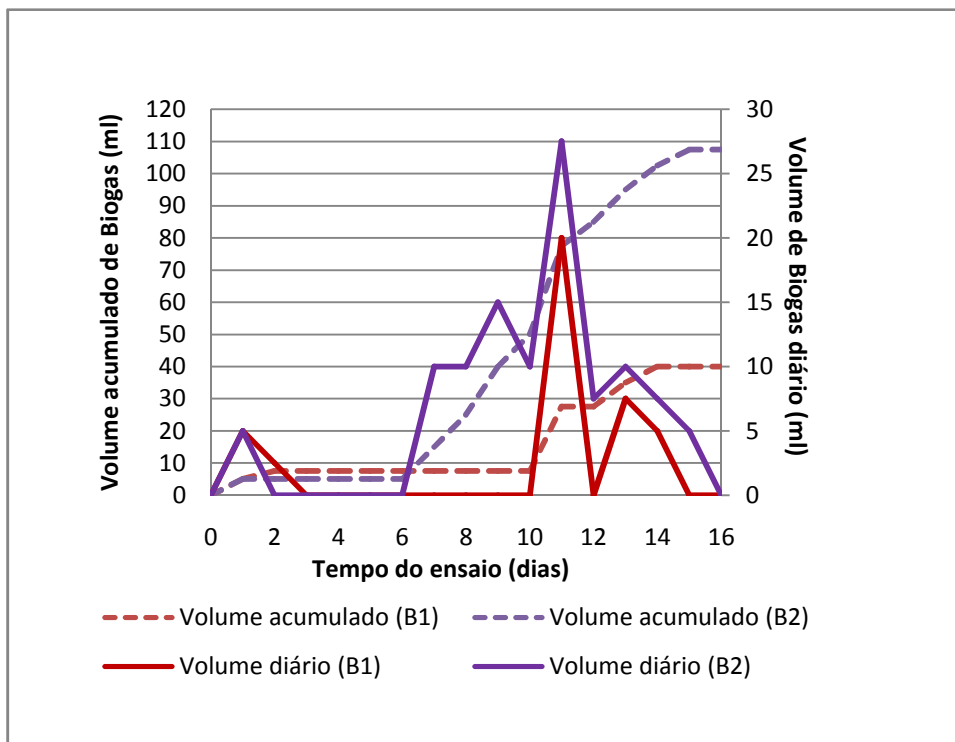


Figura 3.2- Volume diário e acumulado de biogás referente ao ensaio com o inóculo de chorume (**B₁** reactor controlo; **B₂** reactor com substrato)

Verifica-se um acréscimo de 85 ml de volume acumulado de biogás para o reactor A_2 ao fim de 10 dias em comparação com o reactor contendo apenas inóculo (A_1) e para o ensaio contendo inóculo de chorume verifica-se ao fim de 16 dias um acréscimo de 67,5 ml de volume acumulado de biogás para o reactor B_2 em comparação com o reactor contendo apenas inóculo (B_1). Os resultados obtidos indicam que a produção de biogás utilizando o mesmo substrato é superior para o ensaio contendo inóculo de ETAR.

Ao nível da produção diária, verifica-se que o reactor contendo inóculo de ETAR (A_2) apresenta uma taxa de produção de biogás muito superior ao do reactor contendo inóculo de chorume (B_2). Para o reactor A_2 verifica-se uma produção de biogás considerável a partir do 1º dia enquanto no reactor B_2 apenas se verifica uma produção de biogás a partir do 7º dia, evidenciando que o inóculo de ETAR apresenta maior adaptabilidade ao substrato que o inóculo de chorume.

Relativamente ao inóculo de chorumes pensou-se que, devido ao facto de este ter sido retirado antes da agitação e por apresentar um grande conteúdo em sólidos, poderia de certo modo possuir uma actividade reduzida e por conseguinte menor conteúdo em bactérias. Pelo que se procedeu novamente à recolha deste inóculo após agitação. A sua caracterização encontra-se descrita na Tabela 3-5.

Tabela 3-5- Caracterização do novo inóculo de chorumes

Parâmetros	Inóculo de chorume
pH	7,96
Condutividade (mS/cm)	10,10
ST(g/l)	6,25
SV (g/l)	3,17
CQObruto (mg/l)	5269,6
CQOfiltrado (mg/l)	3209,6

O conteúdo em matéria orgânica (ST x SV) do novo inóculo de chorume apresenta valores inferiores de 0,19 %. Tendo em conta que normalmente se recomendam valores entre 1 a 2% de conteúdo em matéria orgânica (Shelton, 1984) e tendo conta os resultados obtidos do ensaio anterior (Tabela 3-1) tomou-se a decisão de utilizar apenas o inóculo proveniente da ETAR de Chelas em todos os ensaios de digestão anaeróbia.

Outro ponto também importante relacionado com a origem do inóculo é a sua conservação e utilização. Inicialmente pensou-se conservar o inóculo congelado à temperatura de -37 °C de modo a que seja possível de utilizar sempre o mesmo inóculo em cada ensaio. No entanto verificou-se que após descongelamento ocorria uma diminuição da CQO_{bruto}. Antes do descongelamento o inóculo de ETAR apresentava um valor (Tabela 3-4) de 22102,07 mg/l e após 10 dias de congelamento apresentou um valor de 12000 mg/l. Segundo determinados autores (Shelton, 1984; Colleran, 1992) as lamas digeridas podem ser conservadas até 4 semanas a 4°C ou congeladas a seco na presença de N₂. Contudo verifica-se que dependendo da origem do inóculo (digestor primário ou secundário) pode ocorrer uma certa diminuição de actividade metanogénica pelo que aconselham a utilizar inóculo fresco sempre que possível. Com base nestes dados e na impossibilidade de realizar testes de actividade metanogénica optou-se por utilizar em cada ensaio um inóculo fresco proveniente da ETAR de Chelas.

3.2.2 Ensaio exploratórios de DA

3.2.2.1 *Ensaio A*

Neste ensaio foi efectuada a determinação dos SV de cada um dos constituintes da mistura. A caracterização do inóculo encontra-se na Tabela 3-6.

Tabela 3-6- Características do Inóculo para o Ensaio A

Parâmetro	Quantitativos
pH	6,94
Condutividade (mS/cm)	3,01
ST (g/l)	13,09
SV (g/l)	8,64

Este primeiro ensaio designado por Ensaio A teve como objectivo verificar qual a produtividade de biogás possível de alcançar utilizando 3 diferentes razões I/S consoante a concentração do substrato igual a 2,87, 5,74, 8,61 gSV/l respectivamente pelos reactores 1, 2 e 3. O ensaio terminou ao fim de 25 dias em vez de 30 dias como indicado na metodologia. Verificou-se, no final do ensaio, que o reactor 1 apresentava um volume acumulado superior a todos os outros reactores Figura 3.3.

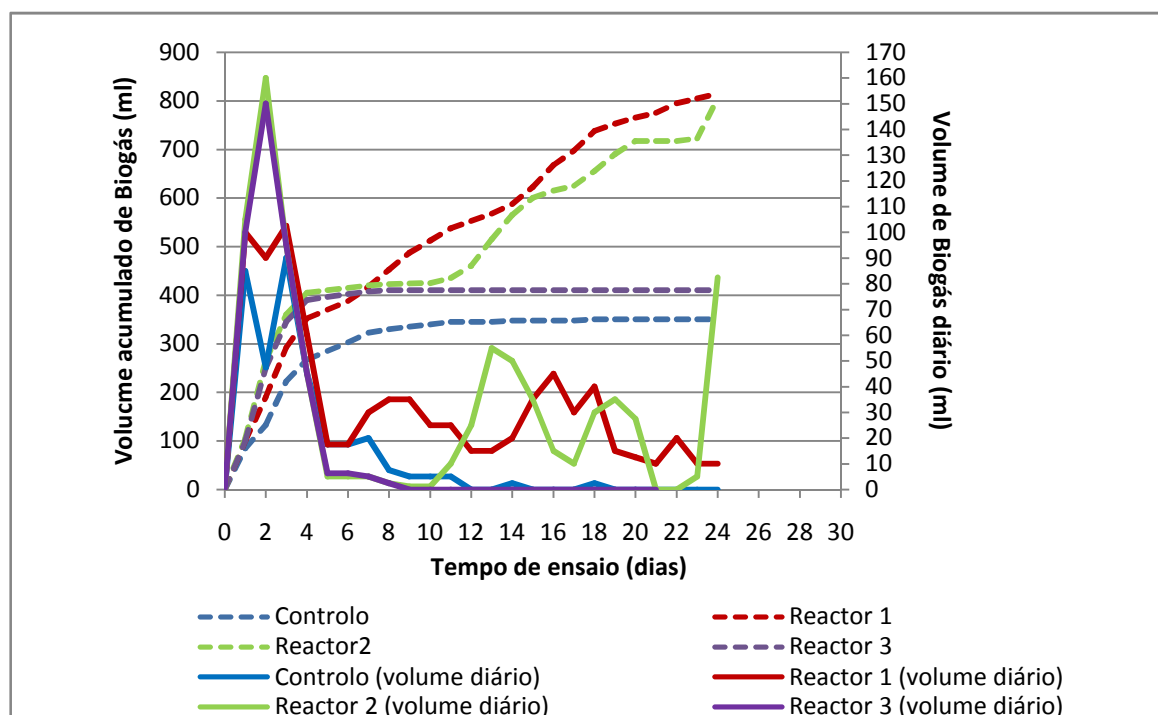


Figura 3.3- Volume acumulado e diário de biogás para o Ensaio A (razões **I/S**: Reactor 1 igual a 116,1 ml **I/g SV S**; Reactor 2 igual a 58,2 ml **I/g SV S**; Reactor 3 igual a 38,9 ml **I/g SV S**)

Como é possível observar a produção diária de biogás ou volume diário apresenta uma curva bastante irregular para o reactor 2. Verificou-se ao fim de 22 dias de tempo de ensaio que existia uma fuga entre a tampa e o bocal da garrafa devido ao facto de a silicone existente se encontrar solta. Pressionou-se a tampa de modo a isolar e verificou-se um acréscimo de volume nos dias seguintes (dias 23, 24 e 25), como é possível constatar pelo desenvolvimento da

curva. Contudo no dia 25 após agitação deixou de ocorrer libertação de biogás verificando-se que após retirar a tampa existia pressão interna devido ao acumular de biogás dentro do reactor. Verificou-se posteriormente que devido à produção de biogás e à agitação manual começou a existir acumulação das partículas sólidas do substrato na extremidade do tubo levando a um bloqueamento da passagem do biogás. Apesar do reactor 1 apresentar um maior volume de biogás acumulado, devido ao problema de colmatação não foi possível contabilizar todo o biogás produzido pelo reactor 2 (ver Figura A 3 em Anexos), pelo que o volume acumulado no reactor 2 poderia ser superior ao do reactor 1.

Em relação ao reactor 3 pensou-se que também tinha ocorrido um problema de colmatação devido ao facto de a produção de biogás ter parado ao fim de 8 dias, como é possível verificar nas curvas de volume acumulado e diário. Contudo após medição do pH e dos AGVs verificou-se que a razão I/S existente neste reactor conduziu provavelmente a um desequilíbrio no sistema. A Tabela 3-7 resume as produtividades específicas de biogás obtidas para cada um dos reactores bem como os AGVs e alcalinidade medidos no final do ensaio:

Tabela 3-7- Produtividade específica de biogás, pH, AGVs e alcalinidade no final do Ensaio A

Reactores	Produtividade específicas de biogás (l/g SV)	pH	AGVs (mg/l)	Alcalinidade (mg CaCO₃/l)
Controlo	0,18	7,97	677	826
1	0,16	7,79	9	1570
2	0,08	7,53	123	1550
3	0,01	5,38	2654	20

Efectuou-se ainda outro ensaio utilizando as mesmas razões I/S dos reactores 1 e 2 e uma terceira razão I/S intermédia. Verificou-se novamente que o reactor 1 apresentava uma produtividade superior em relação aos restantes contudo verificou-se novamente os mesmo problemas de colmatação nos tubos de recolha do biogás.

3.2.2.2 Ensaio B

Apesar das dúvidas existentes relativamente à melhor razão de I/S em termos de produtividade de biogás devido aos problemas de colmatação, admitiu-se para a realização deste ensaio que a razão mais adequada em termos de produção de biogás seria igual a 116,1 ml I/g SV S.

O objectivo deste ensaio é o de verificar qual a produtividade específica de biogás e metano obtida para esta razão de I/S. Por outro lado pretende-se averiguar se ocorre alguma variação dessa mesma produtividade quando o substrato é submetido a um pré-tratamento ou hidrólise térmica. A Tabela 3-8 apresenta a caracterização dos constituintes em cada um dos reactores antes e após o ensaio.

Tabela 3-8- Caracterização dos constituintes antes e depois do ensaio

Reactores	Início do ensaio				Final do ensaio			Remoção de SV (% MS)
	pH ₀	pH _i	ST (g/l)	SV (g/l)	pH _f	ST (g/l)	SV (g/l)	
Controlo	6,88	6,88	23,51	16,82	7,28	14,39	9,46	NA
1	4,44	6,91	34,06	28,67	7,25	20,01	14,65	56,15
2	6,25	7,09	34,15	28,56	7,30	21,69	16,30	41,69

Como é possível verificar existe uma diferença considerável no pH do substrato pré-tratado (**reactor 1**) para o substrato não tratado (**reactor 2**). Após o pré-tratamento dos caules de *Cynara* com água (160°C, 30 min) ocorreu uma diminuição do pH provavelmente devido a solubilização dos grupos acetil e da formação de ácidos orgânicos, resultantes da solubilização da hemiceluloses. Após determinação da Holocelulose do material pré-tratado (igual a 69%) e do material original (80%) verificou-se que ocorreu uma solubilização de aproximadamente 11% dos açúcares. Contudo não foram realizadas análises de AGVs antes do ensaio pelo que não se pode referir o conteúdo dos mesmos. Após adição do inóculo verifica-se que o pH da mistura sobe rapidamente atingindo valores adequados para a DA igual a 6,91. Verifica-se que ocorreu uma maior redução dos SV no reactor 1 que no reactor 2 igual a 14%. Verifica-se pois que a hidrólise térmica como pré-tratamento permite uma maior disponibilização do carbono existente e neste caso muito próximo do valor correspondente à solubilização dos açúcares igual a 11%.

A Figura 3.4 permite evidenciar a produção diária e a produção acumulada de biogás durante os 30 dias de tempo de ensaio para cada um dos reactores:

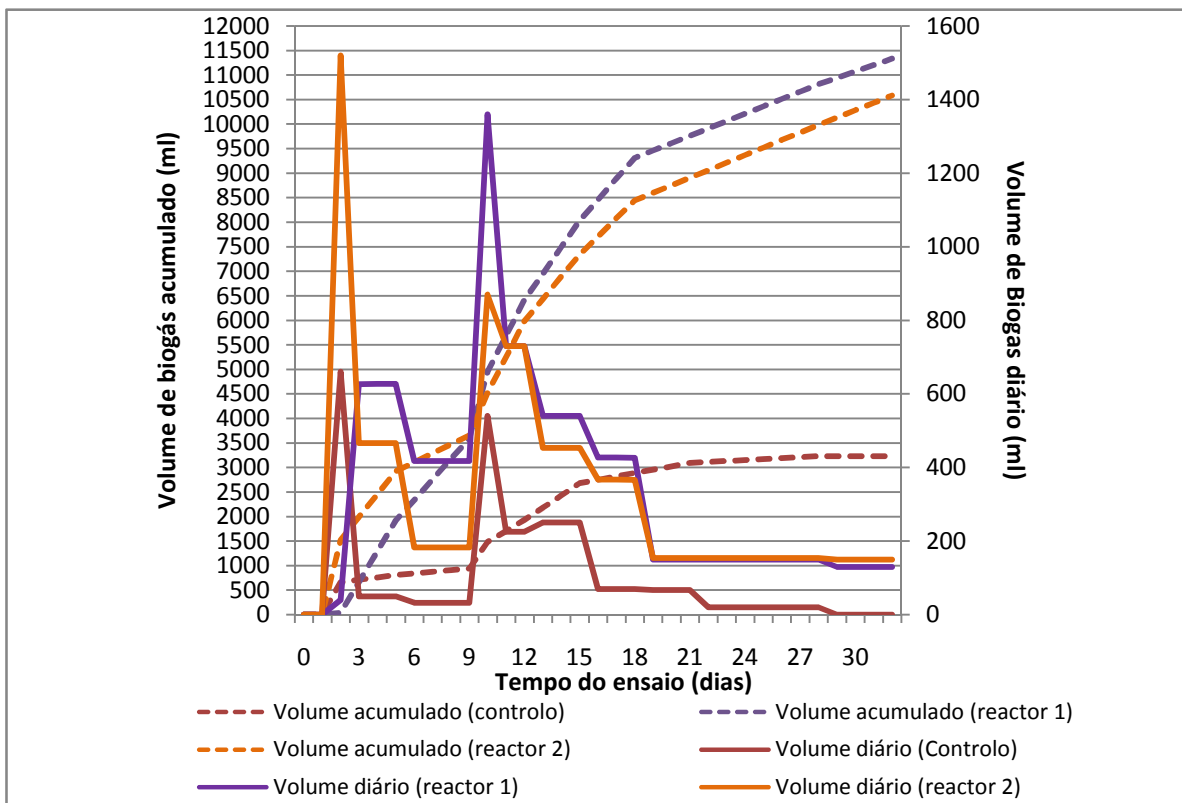


Figura 3.4- Produção acumulada e diária de biogás (**Reactor 1**- Substrato pré-tratado; **Reactor 2**- Substrato não tratado)

Antes da realização deste ensaio verificou-se que havia necessidade de contabilizar os volumes diários que poderiam ser superiores a 2l nos primeiros dias. Para isso adaptou-se um sistema de armazenamento e contagem do volume do biogás utilizando dois garrafões de 5l. Contudo devido ao facto de os garrafões não estarem completamente isolados não houve contagem do biogás no primeiro dia, situação que é possível verificar analisando as curvas de volume diário. Colocaram-se provetas de 2l e procedeu-se apenas à contagem do volume de biogás produzido nos três reactores após o 1º dia.

Verificou-se também que durante os primeiros 7 dias de ensaio ocorreram fugas ligeiras devido ao abrir e fechar da válvula de recolha de amostra de biogás, quer no reactor 1 quer no reactor 2. A fuga do reactor 1 ocorreu no 2º dia e foi reparada no 3º dia e a fuga do reactor 2 ocorreu no 6º dia e foi reparada no 7º dia. Verificou-se também que o aparelho que regula a temperatura se encontrava desligado, situação que é possível verificar ao analisar as curvas de volume diário de biogás. A existência de dois picos é devida a essa situação. Na passagem do 9º para o 10º dia ligou-se novamente o aparelho e após a temperatura subir de 20-22°C (temperatura ambiente do laboratório) para 37°C verificou-se uma produção de biogás bastante elevada resultando no 2º pico das

curvas relativas ao volume diário de biogás. Posto isto, verifica-se que as conclusões deste ensaio ficam limitadas pelas condições a que este foi sujeito durante os primeiros 10 dias.

No final do ensaio, apesar das fugas nos reaktor 1 e 2, verifica-se uma produtividade específica de biogás para o reaktor 1 igual a 0,68 l de biogás/g SV de substrato adicionado e para o reaktor 2 igual a 0,63 l de biogás/g SV de substrato adicionado. Dada a situação inicial de fugas e de variação da temperatura apenas é possível referir que a produtividade específica de biogás, utilizando uma razão I/S de 116,1 com a fracção 40-60 Mesh dos caules de *Cynara*, é no mínimo de 0,63-0,68 l/gSV adicionados. Esta produtividade específica de biogás está de acordo com alguns dos valores obtidos para outras culturas herbáceas (Prochnow, 2009). No caso do inóculo a produtividade de biogás foi igual a 0,19 l/gSV.

Relativamente ao conteúdo de metano verificou-se que este era em média igual a 53% para os reactores 1 e 2 e de 63% para o reaktor de controlo e o conteúdo em dióxido de carbono era igual em média a 47% para os reactores 1 e 2 e 37% para o controlo, conforme indicado na Tabela 3-9.

Tabela 3-9- Produtividades específicas de biogás e CH₄ e conteúdo em metano e dióxido de carbono durante o ensaio B

Reactores	Conteúdo em CH ₄ * (%)	Conteúdo em CO ₂ (%)	Produtividade específica de biogás (l/g SV)	Produtividade específica de CH ₄ (l/gSV)
Controlo	63,19	36,81	0,19	0,19
Reactor 1	53,15	46,85	0,68	0,34
Reactor 2	53,21	46,79	0,63	0,31

*O conteúdo de CH₄ e CO₂ de cada reaktor resulta da média das análises efectuadas de 5 amostras.

Com base no conteúdo em metano calculou-se a produtividade específica de metano para cada um dos reactores verificando-se que esta é igual a 0,34 e 0,31 l CH₄/gSV para o reaktor 1 e 2 respectivamente. Devido aos problemas referidos durante o ensaio apenas se pode referir que a produtividade específica de metano para os caules de *Cynara* é no mínimo de 0,31-0,34 l/gSV. Estes valores estão de acordo com a bibliografia consultada. Contudo devido á situação de fugas é possível referir que muito provavelmente estes valores podem ser superiores para as condições do ensaio em termos da razão I/S utilizada. Novos ensaios poderão ser realizados de modo a determinar com maior exactidão estes valores.

3.3 Fase C

3.3.1 Ensaio I

Neste ensaio designado por ensaio I analisaram-se 5 diferentes razões de I/S. Contudo ao longo do trabalho prático mediante a disponibilidade de reactores houve a possibilidade de testar outras razões de I/S em dois diferentes ensaios. Os resultados obtidos para todas as razões serão apresentados juntamente apenas para efeitos de comparação com os resultados obtidos inicialmente e discussão do efeito da razão I/S na digestão anaeróbia de *Cynara*. Serão apresentados resultados de 3 ensaios: o Ensaio I descrito em 2.3, e dois outros ensaios designados por Y e Z seguidamente indicados na Tabela 3-10.

Tabela 3-10- Razões de I/S utilizadas em três diferentes ensaios: Ensaio I, Ensaio Y e Ensaio Z

Ensaios	I/S
Ensaio I	
Reactor 1	349,8
Reactor 2	174,2
Reactor 3	116,1
Reactor 4	87,5
Reactor 5	69,7
Controlo	NA
Ensaio Y	
Reactor 1	58,2
Reactor 2	50,0
Reactor 3	43,7
Reactor 4	38,9
Reactor 5	69,7
Controlo	NA
Ensaio Z	
Reactor 4	35,0
Reactor 5	69,7
Controlo	NA

Como é possível verificar utilizou-se em cada ensaio a mesma razão I/S para o reactor 5 para efeitos de comparação. Na Tabela 3-11 são apresentadas as características de cada Ensaio em termos de SV e ST.

Tabela 3-11- Características dos Ensaios em termos de ST e SV

Ensaio	ST (g/l)	SV (g/l)
Ensaio I		
Reactor 1	20,38	15,55
Reactor 2	23,08	18,47
Reactor 3	28,34	23,11
Reactor 4	29,25	24,50
Reactor 5	30,48	25,88
Controlo	15,30	11,01
Ensaio Y		
Reactor 1	45,55	27,69
Reactor 2	48,63	30,61
Reactor 3	50,60	32,99
Reactor 4	53,36	35,57
Reactor 5	42,29	24,30
Controlo	27,64	9,95
Ensaio Z		
Reactor 4	58,05	45,96
Reactor 5	35,68	25,58
Controlo	21,08	10,63

Verifica-se que as características do inóculo utilizado em termos de ST variam consideravelmente de ensaio para ensaio, pelo que afectam o conteúdo de ST em cada reactor. Por outro lado, verificou-se também que as condições de operação dos digestores da ETAR de Chelas no momento de recolha da lama digerida eram diferentes em termos de pH e temperatura Tabela 3-12.

Tabela 3-12- Características do inóculo (pH e temperatura) no momento de dos digestores (A-B)

Ensaio	pH (A-B)	Temperatura dos digestores (°C)
Ensaio I	6.0-6.3	26
Ensaio Y	6.0-6.3	30
Ensaio Z	6.24-6.15	30,5-36,8

Nas Figuras Figura 3.5, Figura 3.6, Figura 3.7, Figura 3.8 e Figura 3.9 são apresentados os volumes diários e acumulados registados ao longo do tempo de ensaio para os três diferentes ensaios.

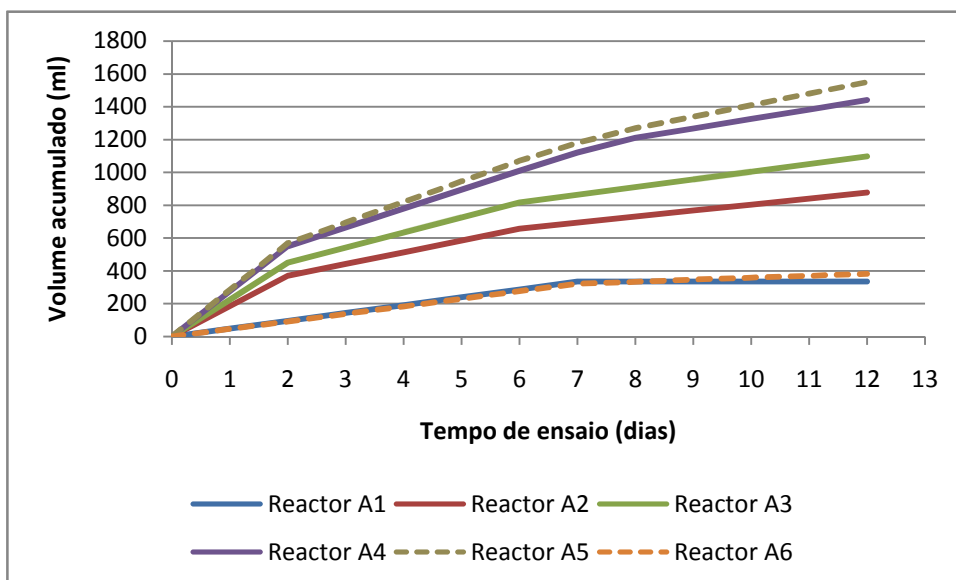


Figura 3.5- Volume acumulado de biogás durante o Ensaio I (Razões **I/S**: reactor 1- 349,8 ml **I/g SV S**; reactor 2- 174,2 ml **I/g SV S**; reactor 3- 116,1 ml **I/g SV S**; reactor 4- 87,5 ml **I/g SV S**; reactor 5- 69,7 ml **I/g SV S**)

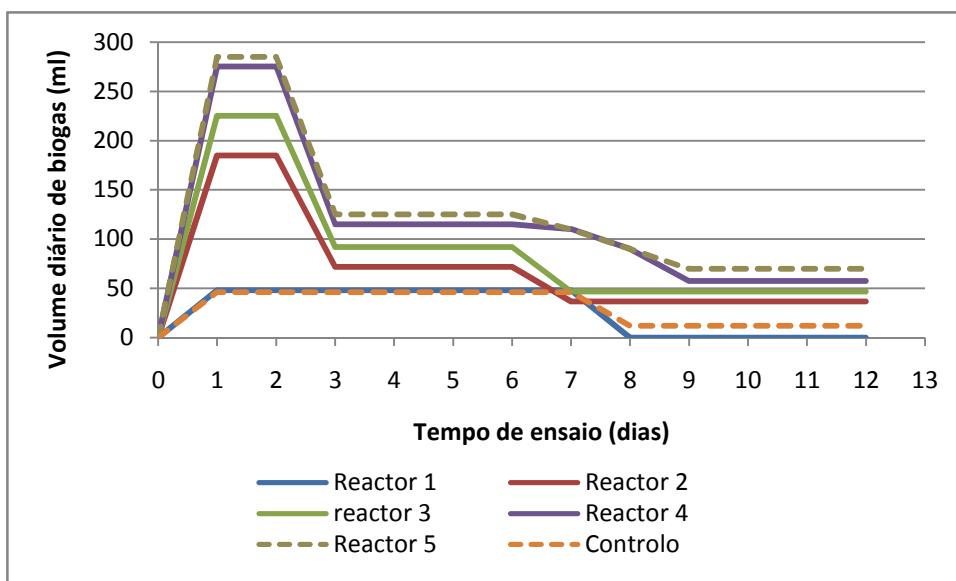


Figura 3.6- Volume diário de biogás durante o Ensaio I (Razões **I/S**: reactor 1- 349,8 ml **I/g SV S**; reactor 2- 174,2 ml **I/g SV S**; reactor 3- 116,1 ml **I/g SV S**; reactor 4- 87,5 ml **I/g SV S**; reactor 5- 69,7 ml **I/g SV S**)

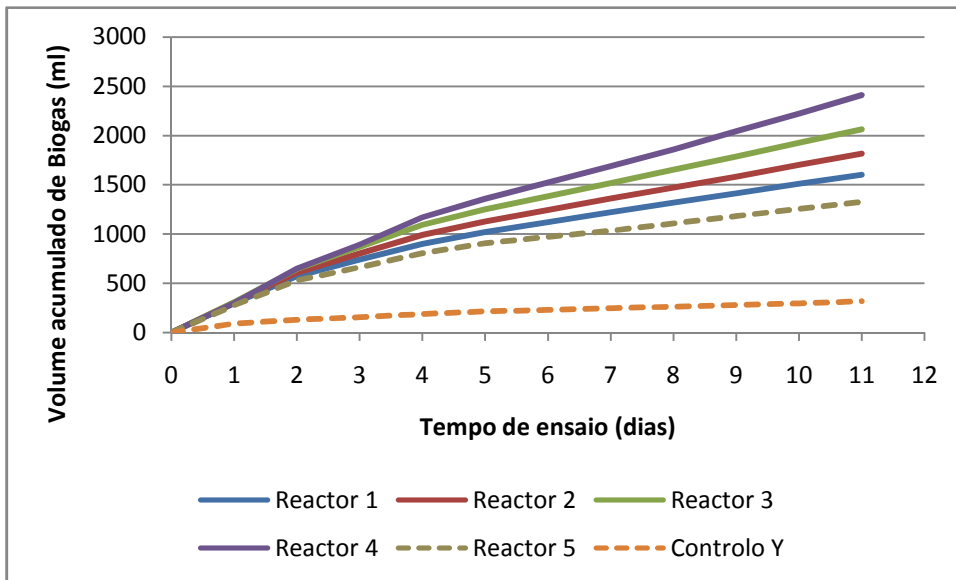


Figura 3.7- Volume acumulado de biogás durante o ensaio Y (Razões **I/S**: reactor 1- 58,2 ml **I/g SV S**; reactor 2- 50,0 ml **I/g SV S**; reactor 3- 43,7 ml **I/g SV S**; reactor 4- 38,9 ml **I/g SV S**; reactor 5- 69,7 ml **I/g SV S**)

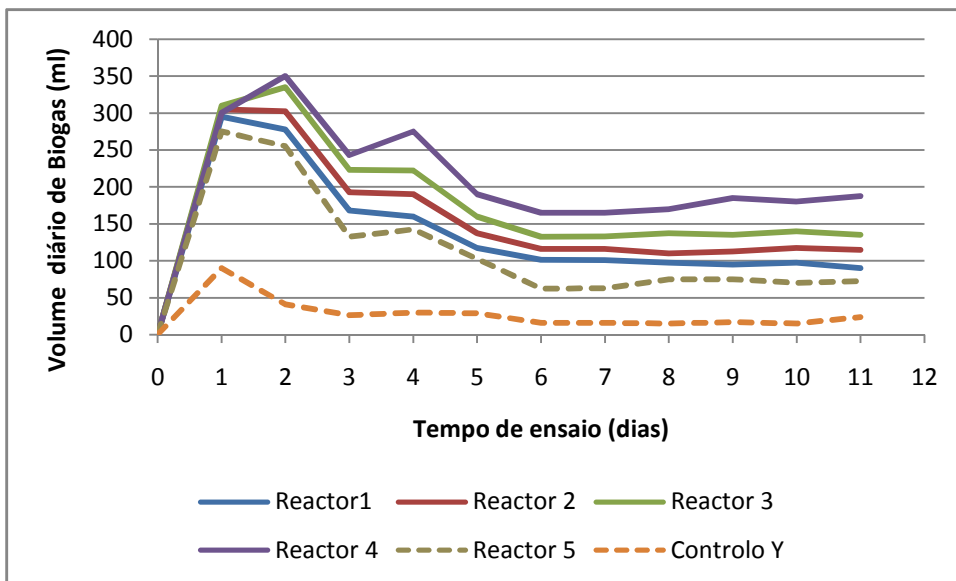


Figura 3.8- Volume diário de biogás durante o ensaio Y (Razões **I/S**: reactor 1- 58,2 ml **I/g SV S**; reactor 2- 50,0 ml **I/g SV S**; reactor 3- 43,7 ml **I/g SV S**; reactor 4- 38,9 ml **I/g SV S**; reactor 5- 69,7 ml **I/g SV S**)

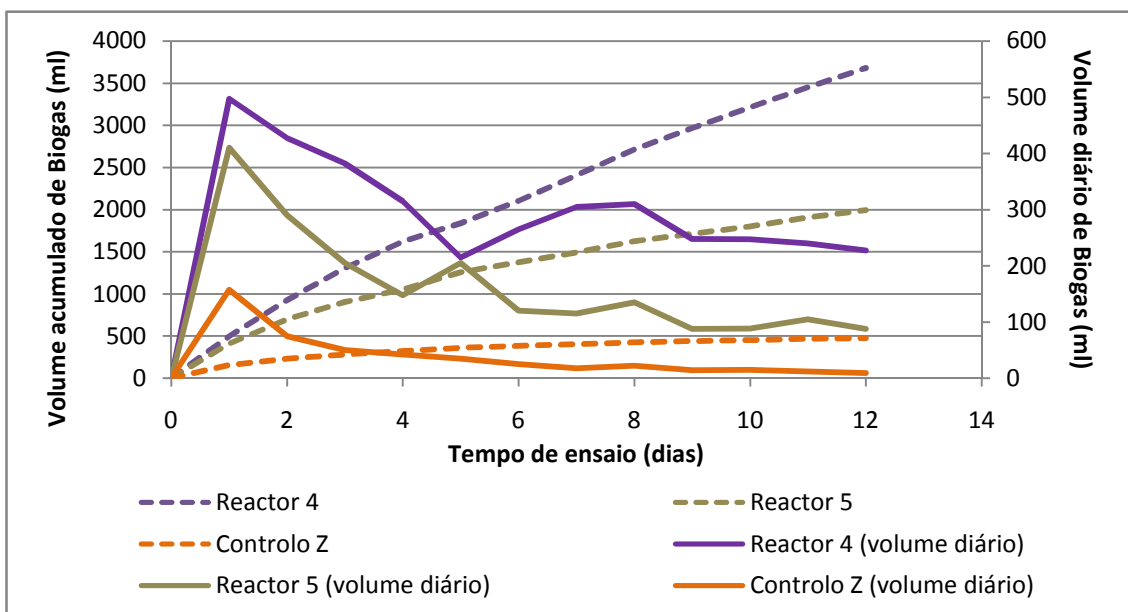


Figura 3.9- Volume diário e acumulado de biogás durante o Ensaio Z (Razões **I/S**: reactor 4- 35,0 ml **I/g SV S**; reactor 5- 69,7 ml **I/g SV S**)

Como é possível verificar o efeito da variação da razão de I/S na produção de biogás não teve o mesmo impacto do Ensaio apresentado no ponto 3.2.2.1. Neste ponto tinha-se verificado que uma razão I/S igual a 38,9 ml I/g SV S conduziu a uma maior produção de AGVs que levou a um desequilíbrio e diminuição do pH. No Ensaio Y e Z utilizou-se para o reactor 4 uma razão de I/S igual ou superior a esta, no entanto não se verificou uma diminuição da produção de biogás antes pelo contrário a produção de biogás em termos de volume acumulado e diário foi sempre superior em relação às outras razões I/S utilizadas. Por outro lado os pH no final do ensaio situavam-se próximo do neutro, demonstrando que o mesmo efeito de acumulação de AGVs e consequente acidificação não ocorreu (Tabela 3-13):

Tabela 3-13- Valor de pH final para os Ensaio Y e Z

	Reactores	I/S (ml I/g SV S)	pH
Ensaio Y	Reactor 1	58,3	7,21
	Reactor 2	50,0	7,31
	Reactor 3	43,7	7,43
	Reactor 4	38,9	7,44
	Reactor 5	69,7	7,39
Ensaio Z	Reactor 4	35,0	6,62
	Reactor 5	69,7	6,76

Comparando os inóculos utilizados nos Ensaio Y e Z com o inóculo utilizado no ensaio descrito no ponto 3.2.2.1 verifica-se que existe uma grande diferença no

que se refere ao conteúdo de ST, constatação que não foi investigada neste trabalho contudo deverá ser considerada em futuros ensaios.

Na Tabela 3-14 é indicada a produtividade específica de biogás de cada reactor, conteúdo de metano e dióxido de carbono:

Tabela 3-14- Produtividade específica de biogás e conteúdo em CH₄ e CO₂ para as várias razões de I/S

Ensaio		I/S (ml I/g SV S)	Produtividade específica de biogás (l/g SV)	CH₄ (%)	CO₂ (%)
Ensaio I	Reactor 1	349,8	ND ¹¹	67,24	32,76
	Reactor 2	174,2	0,066	62,35	37,65
	Reactor 3	116,1	0,059	57,44	42,56
	Reactor 4	87,5	0,078	56,63	43,37
	Reactor 5	69,7	0,079	56,19	43,81
Ensaio Y	Reactor 1	58,3	0,072	54,25	45,75
	Reactor 2	50,0	0,072	56,43	43,57
	Reactor 3	43,7	0,076	52,45	47,55
	Reactor 4	38,9	0,082	50,89	49,11
	Reactor 5	69,7	0,070	55,91	44,09
Ensaio Z	Reactor 4	35,0	0,091	55,47	44,53
	Reactor 5	69,7	0,102	56,15	43,85

A produtividade específica de biogás ao final de 11-12 dias de tempo de ensaio é bastante similar para todas as razões, contudo verifica-se que para os ensaios I e Z a razão I/S igual 69,7 apresentou a produtividade mais elevada e, no caso do ensaio Y a razão que antes tinha sido considerada inadequada para a digestão anaeróbia dos caules de *Cynara*, igual a 38,9, apresentou a produtividade específica mais elevada. Verifica-se que a produtividade específica de biogás

¹¹ ND- Não determinado devido a problemas de fuga

aumenta com a diminuição da razão I/S e tende a diminuir para razões inferiores a 38,9. Contudo, tendo em conta a variabilidade do inóculo deverão ser efectuadas ensaios idênticos com o mesmo inóculo para tempos de ensaio de no mínimo 30 dias de modo a contabilizar aproximadamente todo o volume de biogás produzido.

Verifica-se também que o conteúdo de metano tende a diminuir com a diminuição da razão de I/S. Em geral verifica-se que a digestão anaeróbia de *Cynara* produz um gás constituído por $56,8 \pm 4,3$ % de metano e $43,2 \pm 4,3$ % de dióxido de carbono.

Verificou-se, no caso do Ensaio I, que a razão de C/N e CQO_{bruto}/N aumenta com a diminuição da razão I/S, ou seja, com o aumento da concentração do substrato (Tabela 3-15).

Tabela 3-15- Razão de C/N e CQO_{bruto}/N para diferentes razões de I/S (Ensaio I)

	Reactores	I/S (ml I/g SV S)	C/N*	CQO_{bruto}/N
Ensaio I	Reactor 1	349,8	10,50	27,70
	Reactor 2	174,2	11,37	29,88
	Reactor 3	116,1	13,79	36,31
	Reactor 4	87,5	14,03	36,97
	Reactor 5	69,7	15,03	39,18
	Controlo	NA	7,31	19,54

*O valor de Carbono foir estimado com base no teor de SV dividindo este conteúdo por 2

Conforme anteriormente descrito considera-se, para substratos lenhocelulosicos, razões de C/N próximas de 15-16 como as ideais para o processo de DA. Com base nesta referência e considerando o volume de biogás acumulado bem como a produtividade específica de biogás e metano medidos para o Ensaio I, decidiu-se utilizar a razão I/S igual a 69,7 ml I/g SV S nos ensaios seguintes.

3.3.2 Ensaio II

Este ensaio serviu para verificar o efeito do tempo de reacção da hidrólise térmica dos caules de *Cynara* na produtividade específica de biogás e metano para a razão I/S de 69,7 ml I/g SV S. As Figuras Figura 3.10 e Figura 3.11 permitem evidenciar o efeito da solubilização da matéria orgânica e o efeito na razão C/N e de CQO/N .

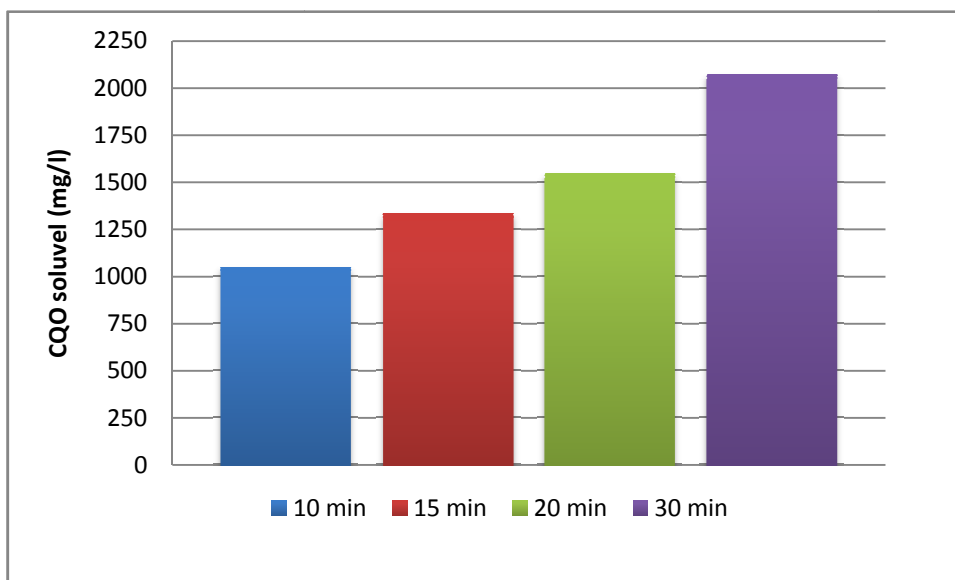


Figura 3.10- Efeito do tempo de reacção da hidrólise térmica na solubilização de carbono

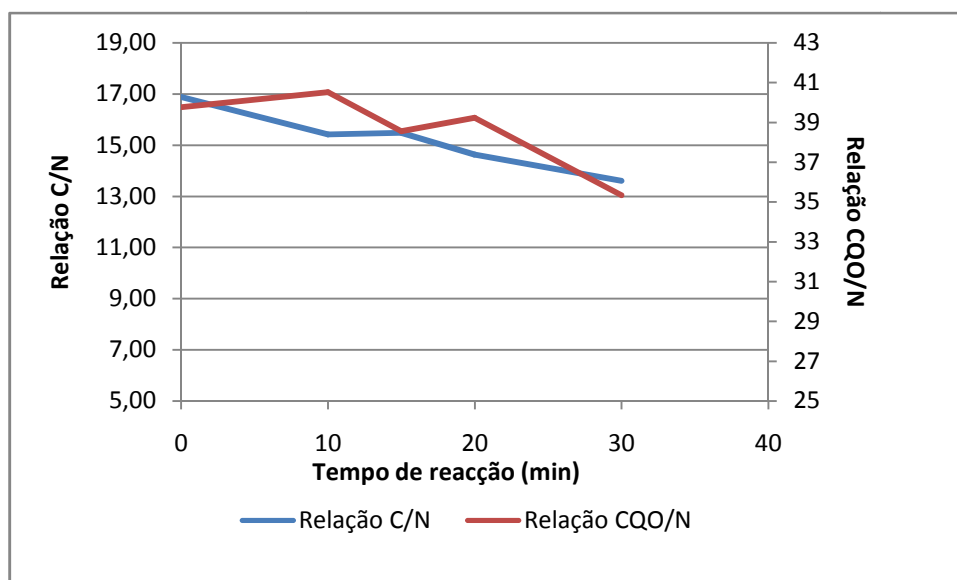


Figura 3.11- Efeito do tempo de reacção de hidrólise térmica na relação de C/N e CQO/N

Verifica-se que o efeito da hidrólise térmica aumenta a solubilização dos açúcares estruturais e lenhina. Apesar de não terem sido realizadas análises do conteúdo em hidratos de carbono e lenhina do substrato após hidrólise térmica verifica-se que ocorre um aumento gradual da solubilização do carbono com o tempo de reacção. Por outro lado verifica-se que o conteúdo em azoto tende a aumentar ligeiramente contribuindo para a diminuição da relação de C/N e CQO/N (Figura 3.12).

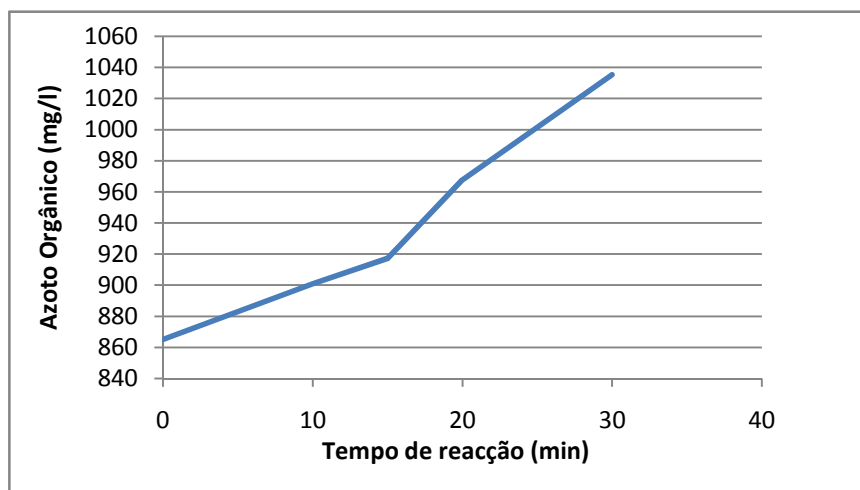


Figura 3.12- Efeito do tempo de reacção da hidrólise térmica na libertação de azoto

As Figura 3.13 e Figura 3.14 apresentam a digestão anaeróbia dos substratos pré-tratados e não tratados durante o tempo de ensaio bem como o volume acumulado e produtividade específica no final do ensaio.

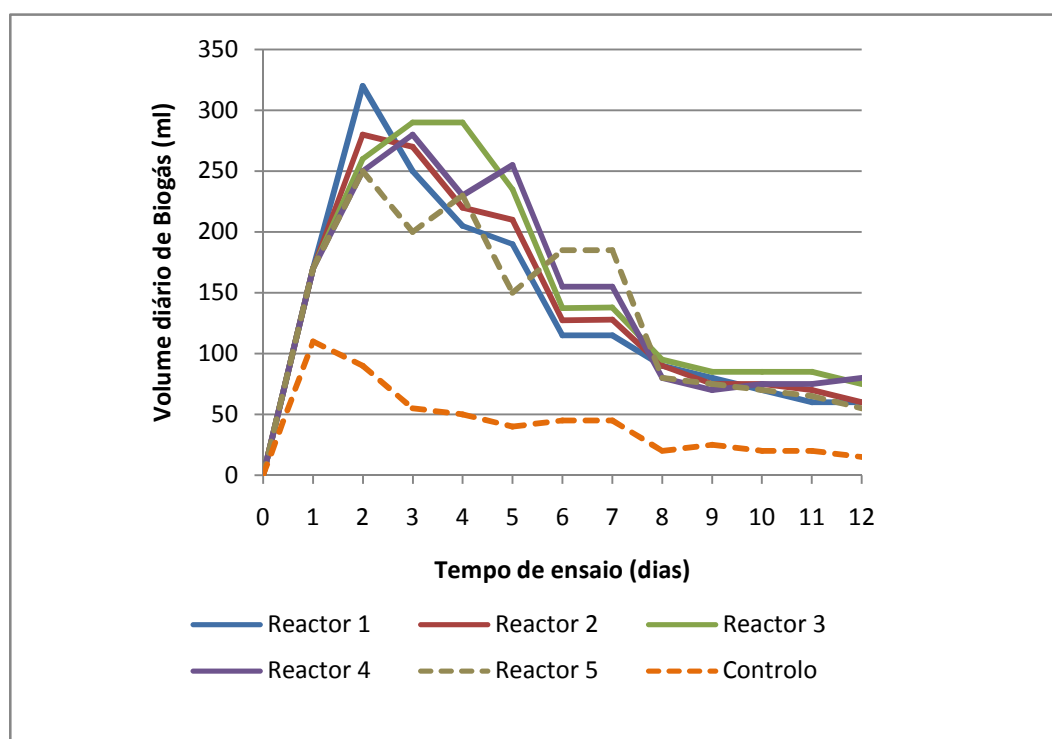


Figura 3.13- Volume diário de biogás produzido para o Ensaio II (Reactor 1- substrato pré-tratado 10 min; Reactor 2- Substrato pré-tratado 15 min; Reactor 3- Substrato pré-tratado 20 min; Reactor 4 Substrato pré-tratado 30 min; Reactor 5- Substrato sem pré-tratamento)

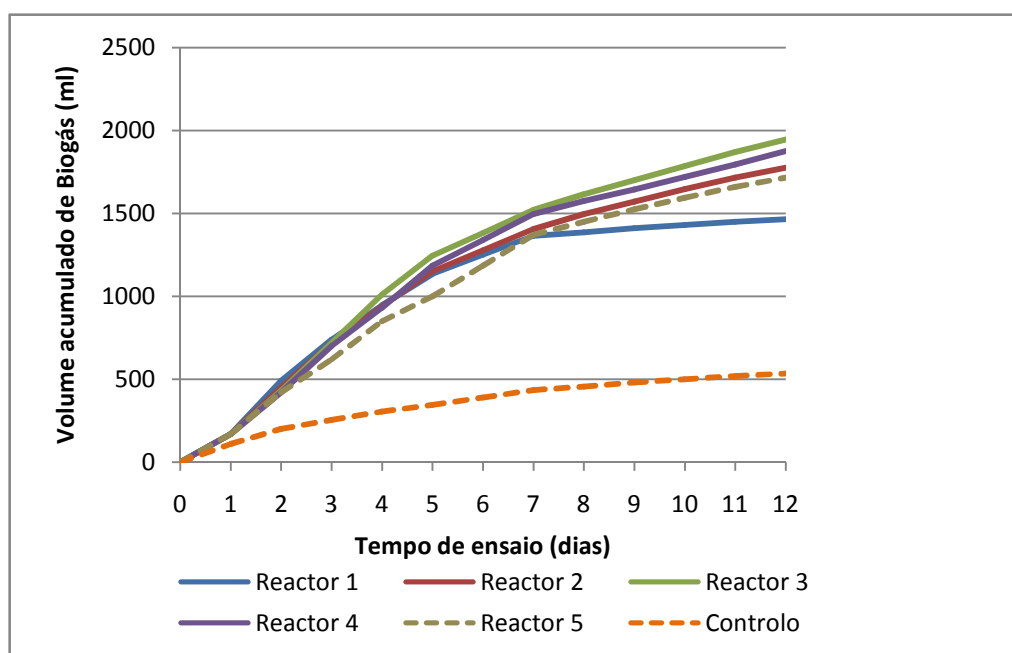


Figura 3.14- Volume acumulado de biogás produzido para o Ensaio II (Reactor 1- substrato pré-tratado 10 min; Reactor 2- Substrato pré-tratado 15 min; Reactor 3- Substrato pré-tratado 20 min; Reactor 4 Substrato pré-tratado 30 min; Reactor 5- Substrato sem pré-tratamento)

Verifica-se que o reactor 3 apresentou ao fim de 12 dias de tempo de ensaio o maior volume acumulado de biogás produzido, resultando igualmente numa maior produtividade específica de biogás Tabela 3-16.

Tabela 3-16- Observações finais do Ensaio II

Reactores	Volume de biogás acumulado (ml)	Produtividade específica de biogás (l/gSV)	CH ₄ (%)	CO ₂ (%)
Reactor 1	1465	0,061	60,12	39,88
Reactor 2	1776	0,078	62,69	37,31
Reactor 3	1946	0,089	61,77	38,23
Reactor 4	1875	0,085	64,81	35,19
Reactor 5	1715	0,070	64,89	35,11
Controlo	535	0,043	NA ¹²	NA

Verifica-se uma ligeira variação do conteúdo de metano, superior para o substrato não tratado e diminuindo para o substrato tratado com 10 minutos e aumentando novamente para substratos submetidos a tempos de reacção superiores. Apesar desta variação e tendo em conta o volume acumulado e a produtividade específica de biogás optou-se por utilizar um tempo de reacção de hidrólise térmica de 20 minutos para o Ensaio III.

¹² Não Atribuído (NA) devido ao facto de o volume da amostra ser muito reduzido não permitindo uma correcta medição do conteúdo em metano e dióxido de carbono.

3.3.3 Ensaio III

Este ensaio permitirá seleccionar o reagente químico que possui maior impacto na solubilização do carbono existente no substrato e, conseqüentemente, melhor resultado em termos de volume acumulado de biogás e produtividade específica (Figura 3.15).

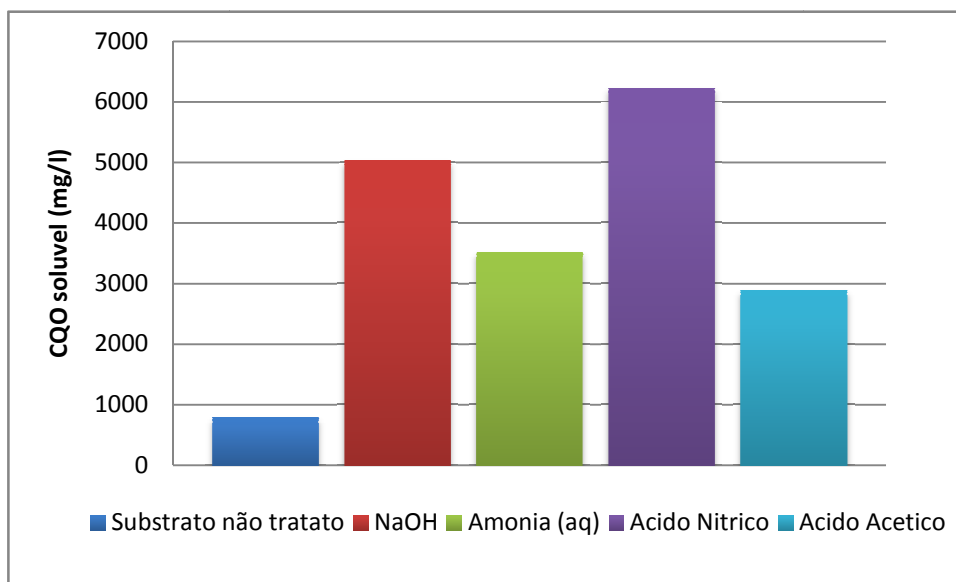


Figura 3.15- Solubilização do carbono para diferentes reagentes químicos após pré-tratamento termo químico

Verifica-se que os reagentes hidróxido de sódio e ácido nítrico, uma base forte e um ácido forte, apresentam um melhor resultado na solubilização do carbono do substrato e que o ácido nítrico é o que apresenta melhor resultado. Verifica-se que o efeito de solubilização é maior para: ácido nítrico > NaOH > amônia (Aq) > ácido acético respectivamente.

A Figuras Figura 3.16 e Figura 3.17 apresentam os gráficos relativos à produção de biogás diário e acumulado, respectivamente, para o Ensaio III.

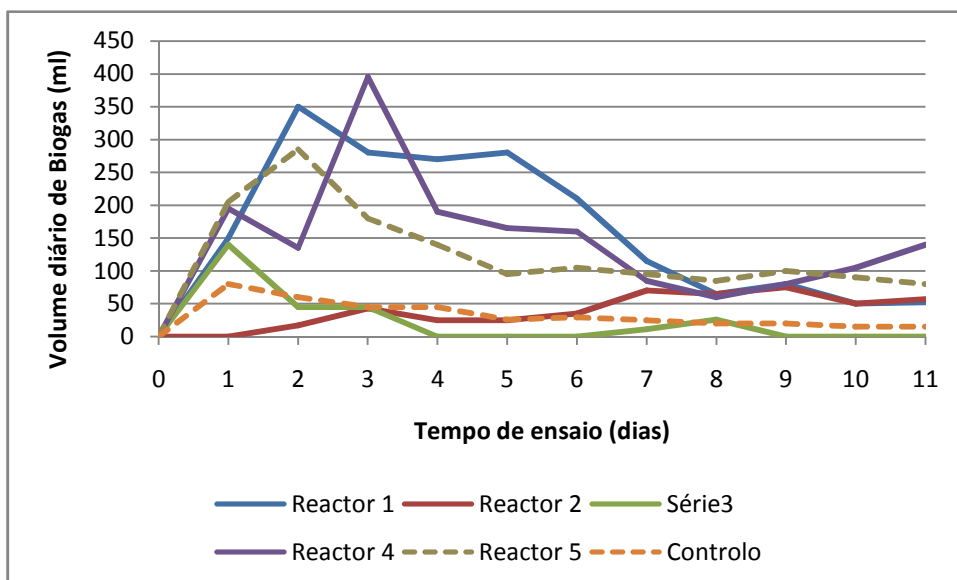


Figura 3.16- Volume diário produzido durante o ensaio III (Reactor 1- substrato pré-tratado com NaOH; Reactor 2- Substrato pré-tratado com $\text{NH}_3(\text{aq})$; Reactor 3- Substrato pré-tratado com HNO_3^- ; Reactor 4- Subsatrato pré-tratado com CH_3COOH ; Reactor 5- Substrato sem pré-tratamento)

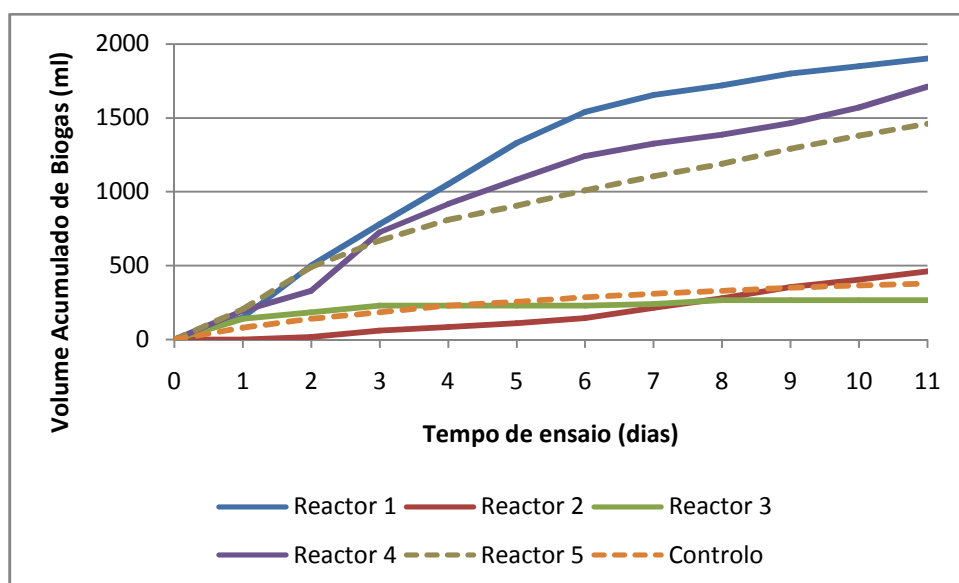


Figura 3.17- Volume acumulado de biogás durante o ensaio III (Reactor 1- substrato pré-tratado com NaOH; Reactor 2- Substrato pré-tratado com $\text{NH}_3(\text{aq})$; Reactor 3- Substrato pré-tratado com HNO_3^- ; Reactor 4- Subsatrato pré-tratado com CH_3COOH ; Reactor 5- Substrato sem pré-tratamento)

De modo a completar a análise dos gráficos a Tabela 3-17 apresenta as características da mistura dos substratos pré-tratados com inóculo no início e no final do ensaio. O conteúdo em AGVs e alcalinidade foi medido no final do ensaio.

Tabela 3-17- Características do conteúdo de cada reactor no início e final do ensaio III

Reactores	pH		SV (g/l)		N-NH ₄ ⁺ (mg/l)		AGV (mg/l)	Alcalinidade (mg CaCO ₃ /l)	CH ₄ (%)	CO ₂ (%)
	pH _{inicial}	pH _{final}	SV _{inicial}	SV _{final}	Inicial	Final				
Reactor 1	8,38	7,75	25	19	370	518	106	3845	71	29
Reactor 2	8,75*	6,64	28	21	1321	1488	4201	236	45	55
Reactor 3	5,87	3,85	25	19	518	502	2465	0,5	45	55
Reactor 4	5,84	7,32	27	20	435	535	0	1446	65	35
Reactor 5	6,87	7,29	27	24	435	502	0	1547	60	40

*Inicialmente após o pré-tratamento obteve-se pH igual a 9.18 e depois corrigiu-se o pH a 8.75

Os reactores 2 e 3 apresentam os piores resultados, em termos de volume acumulado de biogás, evidenciando sinais de inibição desde o primeiro dia de ensaio. Analisando a Tabela 3-17 verifica-se que a inibição do processo no reactor 2 pode estar relacionada com o pH e o conteúdo de azoto amoniacal. Verifica-se que, devido a estas condições, apenas as bactérias fermentativas permaneceram com maior actividade proporcionando um acumular de AGVs e levando à diminuição da alcalinidade do meio e ao desequilíbrio do sistema, inibindo as bactérias metanogénicas, efeito que se traduz numa menor produção de biogás e menor conteúdo de metano. Contudo regista-se um elevado conteúdo de AGVs e de SV indicando que o pré-tratamento com amónia é bastante eficiente na solubilização do substrato, contudo a concentração utilizada deste reagente conduziu a uma subida elevada do pH e de azoto amoniacal que inibiu a actividade das bactérias, situação que também pode ser evidenciada pela CQO_{solúvel} das amostras no final do ensaio (Figura 3.18).

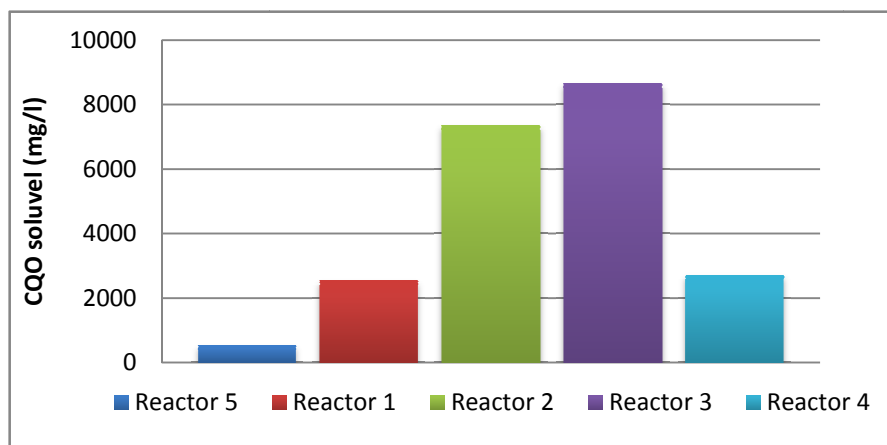


Figura 3.18- Carbono solubilizado não degradado (Reactor 1- substrato pré-tratado com NaOH; Reactor 2- Substrato pré-tratado com $\text{NH}_3(\text{aq})$; Reactor 3- Substrato pré-tratado com HNO_3^- ; Reactor 4- Substrato pré-tratado com CH_3COOH ; Reactor 5- Substrato sem pré-tratamento)

Comparando os valores de $\text{CQO}_{\text{solúvel}}$ no início (Figura 3.15) e final do ensaio (Figura 3.18) verifica-se que, para o reactor contendo substrato tratado com amónia (reactor 2), a solubilização do carbono foi superior durante o ensaio de digestão anaeróbia do que durante o pré-tratamento. O efeito do tratamento da amónia parece facilitar a acessibilidade das bactérias hidrolíticas e fermentativas.

No caso do reactor 3 verifica-se que a inibição foi devida a outros factores que podem estar relacionados com a presença de nitratos como aceitador de electrões (Tabela 3-18).

Tabela 3-18- Conteúdo em nitratos antes e depois do ensaio

Reactores	Conteúdo em NO_3^-	
	Antes (mg/l)	Depois (mg/l)
Reactor 1	-102,1	-94,3
Reactor 2	-78,9	-19,8
Reactor 3	126,7	-12,1
Reactor 4	-73,8	-94,3
Reactor 5	-104,6	-114,9

As análises foram realizadas algum tempo depois da recolha das amostras, pelo que o conteúdo em nitratos apresenta um valor negativo, com excepção da amostra proveniente do reactor 3. A presença deste aceitador de electrões pode ter levado à inibição da degradação levada a cabo pelas bactérias anaeróbias. Por outro lado o pH do meio, no final do ensaio, é bastante inferior ao valor normalmente referido como óptimo para a metanogénese e igualmente para a fermentação, pelo que não se registou praticamente nenhuma produção de biogás após o 4º dia.

Analisando o conteúdo de AGVs por cromatografia gasosa verifica-se que o ácido acético apresenta uma maior quantitativo, seguido do ácido propiónico e do ácido butírico. Verifica-se que para valores superiores a 2 g/l de ácido acético ocorre a inibição do processo, na eventualidade de não existir alcalinidade suficiente para manter o pH dentro do limite considerado óptimo (Tabela 3-19). Verifica-se também que não ocorrem muitas diferenças entre os dois métodos utilizados para determinar o conteúdo de AGVs (cromatografia gasosa e titulação).

Tabela 3-19- Conteúdo em AGVs utilizando cromatografia gasosa

AGV	Reactor 1	Reactor 2	Reactor 3	Reactor 4	Reactor 5
	Concentração de AGVs (mg/l)				
Ácido acético	0	3552	1687	0	0
Ácido propiónico	0	694	90	0	0
Ácido iso butírico	0	42	156	0	0
Ácido butirico	0	193	0	0	0
Ácido valérico	0	88	0	0	0
TOTAL	0	4569	1933	0	0

Verifica-se que os únicos reagentes químicos que proporcionaram melhores condições para a digestão anaeróbia foram respectivamente o hidróxido de sódio e o ácido acético. Em termos de volume acumulado, produtividade específica de biogás e conteúdo em metano verifica-se que o reactor 1 apresentou os melhores resultados. Verifica-se que o ácido acético apresentou também uma boa produtividade registando-se no final do ensaio, na passagem para o 11º dia, uma subida da produção de biogás. Contudo, a duração do ensaio poderá limitar as conclusões relativamente a produção de biogás pelo que dever-se-á realizar o mesmo ensaio para uma duração de aproximadamente 30 dias de modo a permitir uma correcta contabilização do volume total produzido.

Com base nestas observações optou-se por utilizar o hidróxido de sódio no tratamento térmico do substrato utilizado no Ensaio Final.

3.3.4 Ensaio Final

Este ensaio foi realizado com o objectivo de verificar qual o efeito do pré-tratamento térmicoquímico (160º, 20 min, 12,5%, 14% NaOH) na produtividade específica de biogás e metano dos caules de *Cynara* utilizando uma razão I/S igual 69,7 ml I/S. A dimensão das partículas do substrato foi a principal diferença

relativamente aos outros ensaios, dificultando a determinação de ST e SV. As partículas do substrato não tratado possuem dimensões elevadas (Anexos Figura A 4). Utilizou-se um copo para a amostragem, recolhendo-se 80 ml de amostra de cada reactor e agitando manualmente. O mesmo sistema de recolha foi realizado antes e depois do ensaio. No final do ensaio devido à degradação dos substratos as partículas apresentavam menores dimensões, especialmente no reactor 1 (substrato pré-tratado), utilizaram-se pipetas o que permitiu comparar os dois sistemas de amostragem (Tabela 3-20). Relativamente à determinação de ST e SV finais verifica-se que utilizando pipeta a determinação não é muito diferente de quando se utiliza o copo, no caso do reactor 1. Contrariamente, no caso do reactor 2 (substrato não tratado), verifica-se que a determinação utilizando pipeta é afectada, devido às partículas apresentarem ainda dimensões elevadas (Figura 3.19 e Figura 3.20).

Tabela 3-20- Comparação da determinação de ST e SV utilizando pipeta e copo (Reactor 1- substrato pré-tratado; Reactor 2- substrato não tratado)

Reactores	ST _{iniciais} (%)	SV _{iniciais} (%)	Utilizando Copo		Utilizando Pipeta	
			ST _{finais} (%)	SV _{finais} (%)	ST _{finais} (%)	SV _{finais} (%)
Controlo	2,37	1,00	2,04	0,71	2,05	0,75
Reactor 1	4,48	2,76	3,40	1,70	3,61	1,68
Reactor 2	4,51	3,12	3,78	2,40	2,59	1,22



Figura 3.19- Aspecto da mistura no interior do reactor 1 no final do ensaio (Substrato sujeito a pré-tratamento)



Figura 3.20- Aspecto da mistura no interior do reactor 2 no final do ensaio (Substrato sem pré-tratamento)

Na Figura 3.21 e na Tabela 3-21 apresentam-se os resultados relativos ao ensaio final propriamente dito.

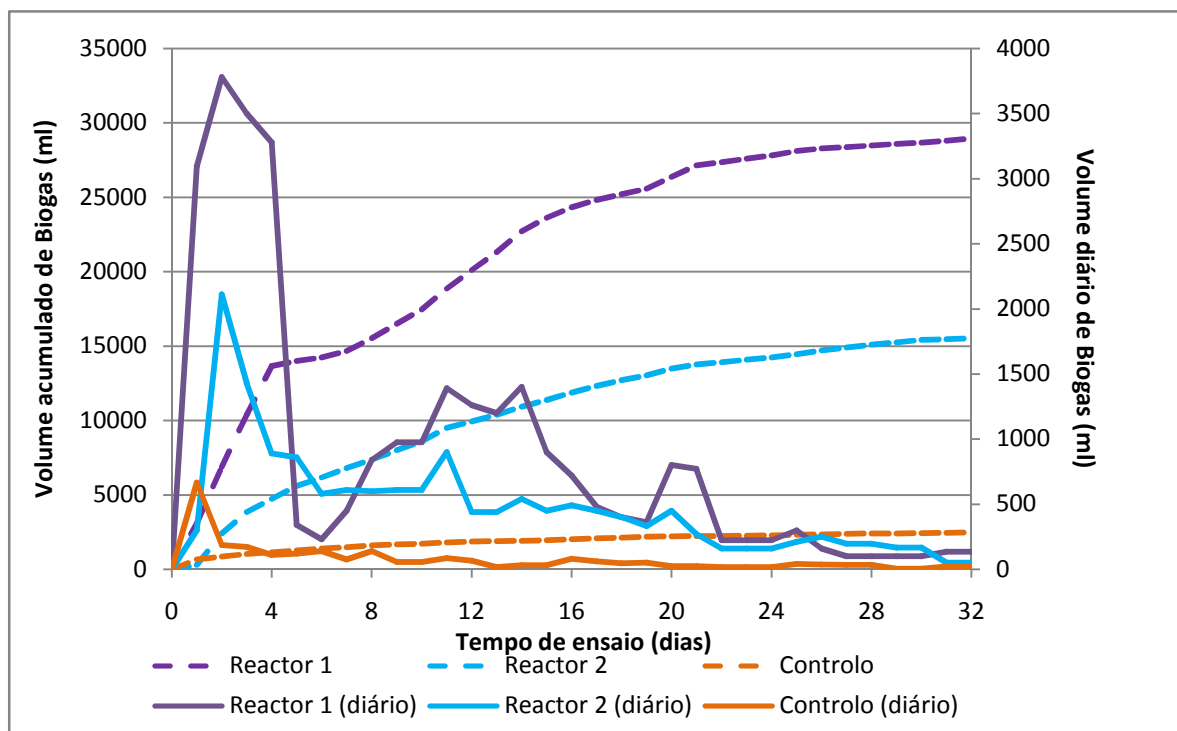


Figura 3.21- Volume de biogás diário e acumulado para o ensaio final (Reactor 1- Substrato pré-tratado; Reactor 2- Substrato não tratado)

Tabela 3-21-Resultados obtidos para o Ensaio Final

Reactores	pH		Remoção de SV após ensaio (% ST)	Produtividade específica de biogás (l/gSV)	Produtividade específica de metano (l/gSV)	CH ₄ * (%)	CO ₂ (%)
	pH _{inicial}	pH _{final}					
Controlo	6,8	7,15	NA	0,22	0,14	65	35
Reactor 1	8,7	7,54	44	1,33	0,86	65	35
Reactor 2	6,8	6,78	21	0,61	0,29	50	50

*Medição do conteúdo de metano e dióxido de carbono decorridos 20 dias

Verifica-se que o substrato submetido a pré-tratamento termoquímico apresenta os melhores resultados em termos de produtividade específica de biogás e metano. Contudo a contagem do volume de biogás produzido pode estar sujeita a erros que não estão incorporados nas medições. Nos primeiros 4 dias utilizou-se um garrafão de 5 litros (Anexos Figura A 2) que permitiu contabilizar volumes superiores a 2l diários, e após o 4^o dia utilizou-se uma proveta de 2l. Walker (2009) refere que a contabilização do volume de biogás, utilizando sistemas de deslocamento de líquido, está sujeita a erros relacionadas com a dissipação de CO₂ e CH₄ na solução de líquido utilizada, com a produção de vapor de água que pode conduzir a uma sobrestimação do volume medido, e com a pressão hidrostática que por sua vez depende da configuração do gasómetro utilizado. A elevada produtividade específica de biogás e metano registadas neste ensaio podem dever-se por um lado ao método utilizado para determinar os SV e por outro lado ao facto de poder existir um erro associado na contabilização do volume de biogás.

Outro aspecto interessante é o facto de o conteúdo de metano e dióxido de carbono variar consideravelmente nos primeiros dias de ensaio para o reactor 1 (Figura 3.22).

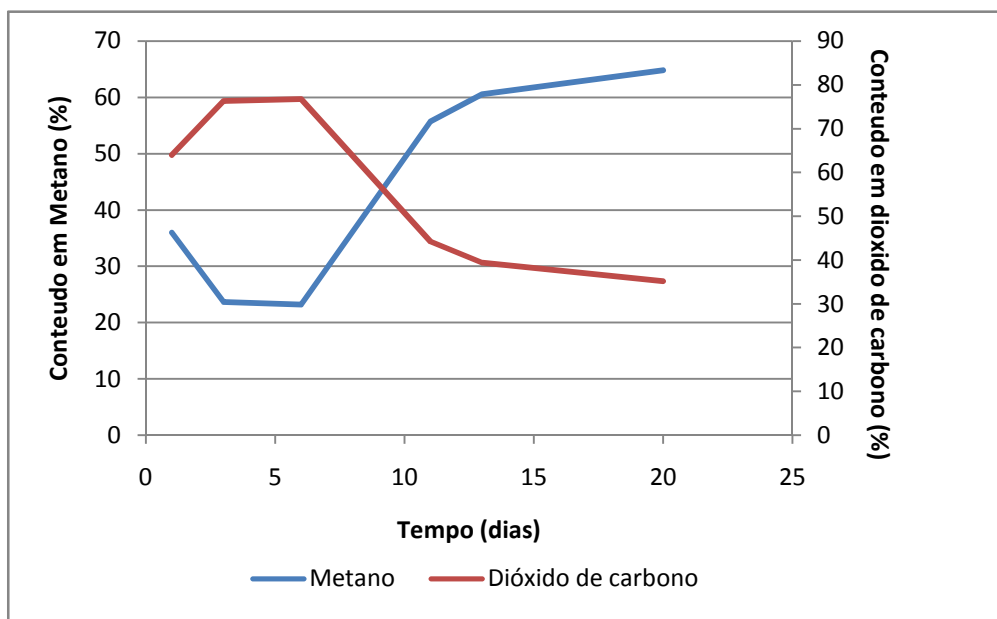


Figura 3.22- Conteúdo em metano e dióxido de carbono para o reator 1

Verificou-se que o conteúdo em metano aumentou ao longo do ensaio, pelo que a produtividade específica de metano, indicada na Tabela 3-21 poderá não ser a mais correcta. Nos primeiros dias verificou-se uma elevada produção de biogás contudo o conteúdo em dióxido de carbono era superior ao do metano. Calculando as produtividades específicas de metano diárias e acumuladas com base no conteúdo de metano obtêm-se produtividades de metano entre 0,59-0,61 l/g SV, valores que estão mais próximos da bibliografia consultada.

O ensaio permite verificar que a utilização de um pré-tratamento termoquímico permite aumentar a biodegradabilidade de um substrato. Contudo outros factores, tais como solubilização de compostos fenólicos provenientes na lenhina em elevada quantidade, podem ter inibido momentaneamente as bactérias metanogénicas que se adaptaram ao substrato, verificando-se que a partir do 10º dia a produção de metano aumentou. É possível também verificar ao longo do ensaio uma alteração da cor do líquido da mistura no reator 1. Nos primeiros dias a cor era castanha avermelhada e ao longo do ensaio verificava-se uma diminuição da intensidade da cor, evidenciando que possivelmente compostos presentes na lenhina poderão ter sido degradados (Anexos ver Figura A 5 e Figura A 6). Contudo, deverão ser realizados outros ensaios de modo a concluir-se qual a causa deste desequilíbrio na composição do biogás e verificar se é possível alcançar estas mesmas produtividades de biogás.

3.3.5 Ensaios em Paralelo

3.3.5.1 Tratamento mecânico

O tratamento mecânico é considerado por muitos autores como suficiente e eficiente na libertação e disponibilização de carbono. As Figura 3.23 e Figura 3.24 apresentam o volume acumulado e diário durante 11 dias de tempo de ensaio utilizando um substrato com partículas de diferentes dimensões: 2mm, 40 Mesh, 40-60 Mesh, 60-80 Mesh e 80 Mesh.

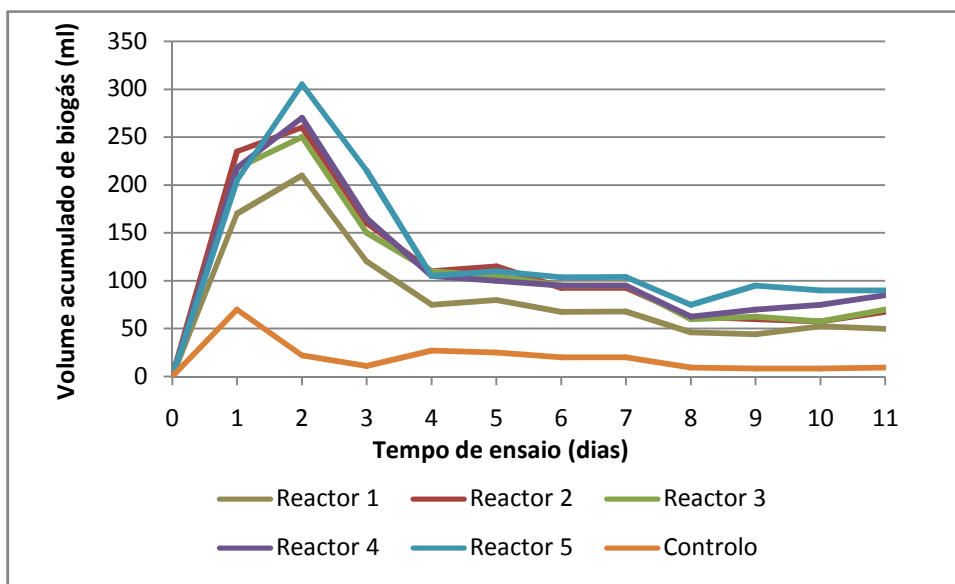


Figura 3.23- Volume diário de biogás (Reactor 1- partículas de 2mm; Reactor 2- partículas de 40 Mesh; Reactor 3- partículas de 40-60 Mesh; Reactor 4- partículas de 60-80 Mesh; Reactor 5- partículas de 80 Mesh)

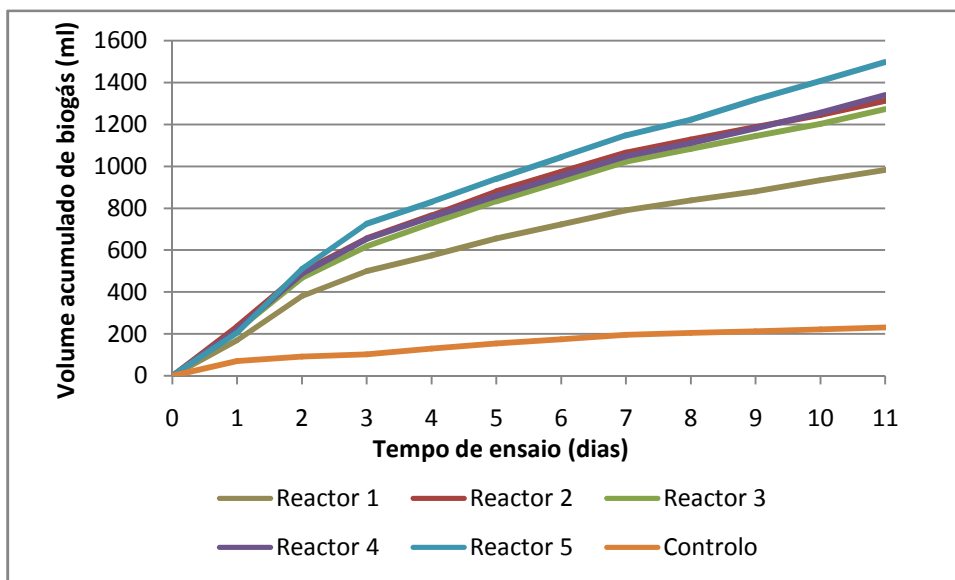


Figura 3.24- Volume acumulado de biogás (Reactor 1- partículas de 2mm; Reactor 2- partículas de 40 Mesh; Reactor 3- partículas de 40-60 Mesh; Reactor 4- partículas de 60-80 Mesh; Reactor 5- partículas de 80 Mesh)

Como é possível verificar ocorre um aumento da produção de biogás com a diminuição da dimensão das partículas do substrato. Verifica-se para todas as fracções um aumento da produção nos primeiros dias do ensaio diminuindo consideravelmente ao longo do ensaio. Sendo que a fracção contendo partículas de menor dimensão apresenta uma produtividade específica de biogás mais elevada que todas as outras fracções. Verifica-se também que entre as fracções 40 e 60-80 Mesh a produtividade específica de biogás não é muito diferente (Figura 3.23).

Tabela 3-22- Produtividade específica de biogás e conteúdo em metano e dióxido de carbono

Reactores	Fracções	Produtividade específica de biogás (l/gSV)	CH₄ (%)	CO₂ (%)
Reactor 1	2 mm	0,046	59,9	40,1
Reactor 2	40 Mesh	0,074	56,6	43,4
Reactor 3	40-60 Mesh	0,073	56,6	43,4
Reactor 4	60-80 Mesh	0,079	59,0	41,0
Reactor 5	80 Mesh	0,087	55,5	44,5

A eficiência do tratamento mecânico contudo deverá ser avaliada para um tempo de ensaio superior a 11dias.

3.3.5.2 Tratamento enzimático

O pré-tratamento enzimático foi avaliado através da determinação do conteúdo em glucose e xilose durante a fase de pré-tratamento. O tempo máximo para o pré-tratamento foi alterado para 60 h devido ao facto de se ter retirado as primeiras amostras para o ensaio de digestão anaeróbia decorridos 40h e não 24h. A análise do conteúdo em glucose e xilose foi analisado ao longo do pré-tratamento decorridas 24h, 48h e 60h (Figura 3.25).

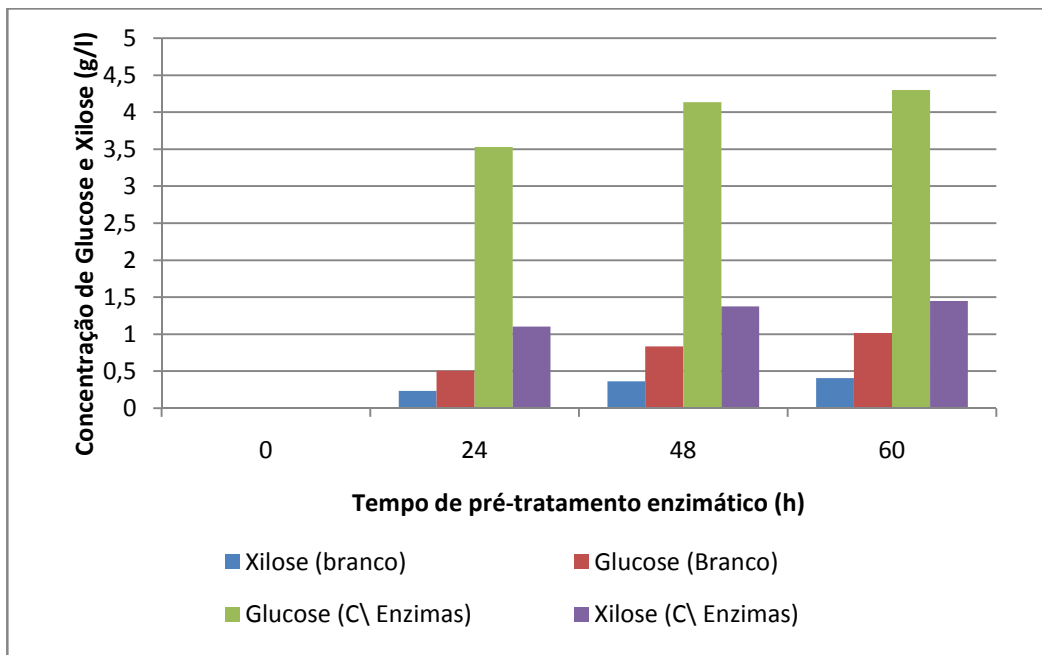


Figura 3.25- Efeito do pré-tratamento enzimático na disponibilização de Glucose e xilose

Verifica-se que a acção enzimática contribui para uma maior disponibilização de açúcares estruturais conduzindo à libertação de 4,3 g/l e 1,4 g/l de glucose e xilose, respectivamente, decorridas 60h. Verifica-se que o efeito de solubilização tende a ser menor ao longo do tempo. Entre as 24h e as 48h apenas existiu um acréscimo de 0,6 g/l e 0,3 g/l de glucose e xilose e entre as 48h e as 60 h o acréscimo foi ainda menor e igual a 0,16 g/l e 0,07 g/l de glucose e xilose respectivamente. Como é referido em Jørgensen (2007) a operação de hidrólise com grandes concentrações de substrato pode causar a inibição do sistema enzimático responsável pela hidrólise da celulose. As enzimas β -glucosidades são até um certo ponto inibidas pela concentração da glucose. A sua inibição causa por sua vez a acumulação de celobiose que é inibidora em certas concentrações da celobiohidrolase. Por outro lado a presença de lenhina parece interferir de diversos modos na acção enzimática que por um lado afecta a acessibilidade das celulasas à celulose e por outro lado as celulasas podem inclusive ficar adsorvidas a lenhina.

No presente caso utilizou-se aproximadamente 5g de cardo nos quais existem aproximadamente 2 g de glucose e 0,8 g de xilose. Tendo em conta o volume utilizado de solução tampão igual a 76 ml e admitindo a máxima hidrólise dos açúcares estruturais deveriam existir cerca de 26 g/l de glucose e 11 g/l de xilose. No entanto essa situação não se verificou evidenciando que outros factores tais como: actividade enzimática, concentração de enzima *versus*

concentração de substrato e a existência de lenhina, podem ter afectado a solubilização completa da glucose (Figura 3.26 e Figura 3.27).

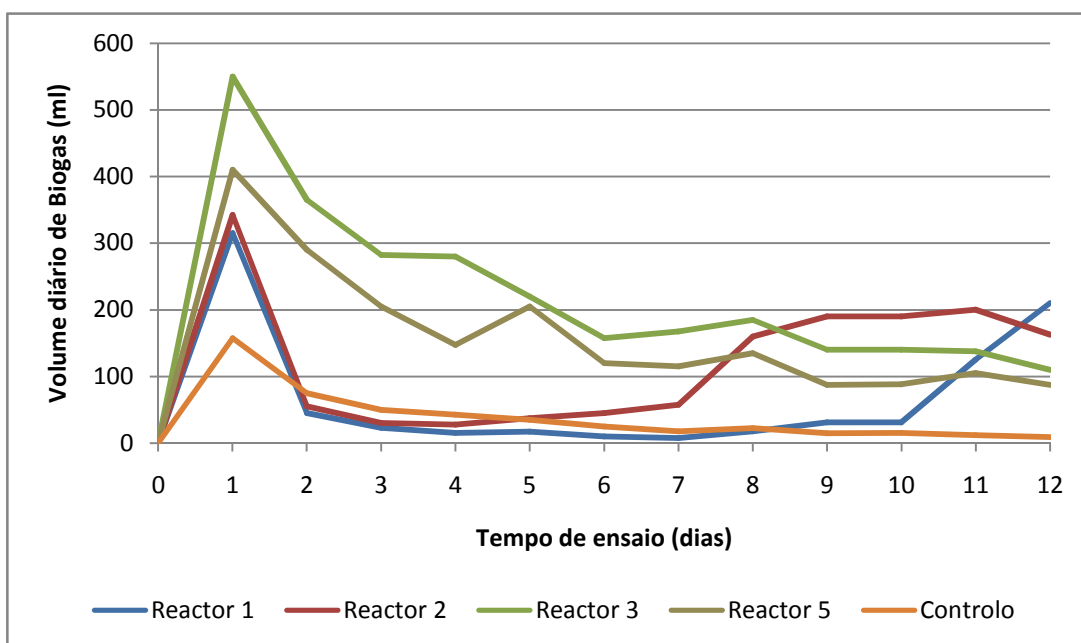


Figura 3.26- Volume diário para o ensaio de digestão anaeróbia (Reactor 1- substrato com pré-tratamento enzimático a 48h; Reactor 2- substrato com pré-tratamento enzimático a 60h; Reactor 3- substrato sem pré-tratamento enzimático apenas adição de enzimas ao reactor; Reactor 5- Substrato sem pré-tratamento enzimático e sem adição de enzimas)

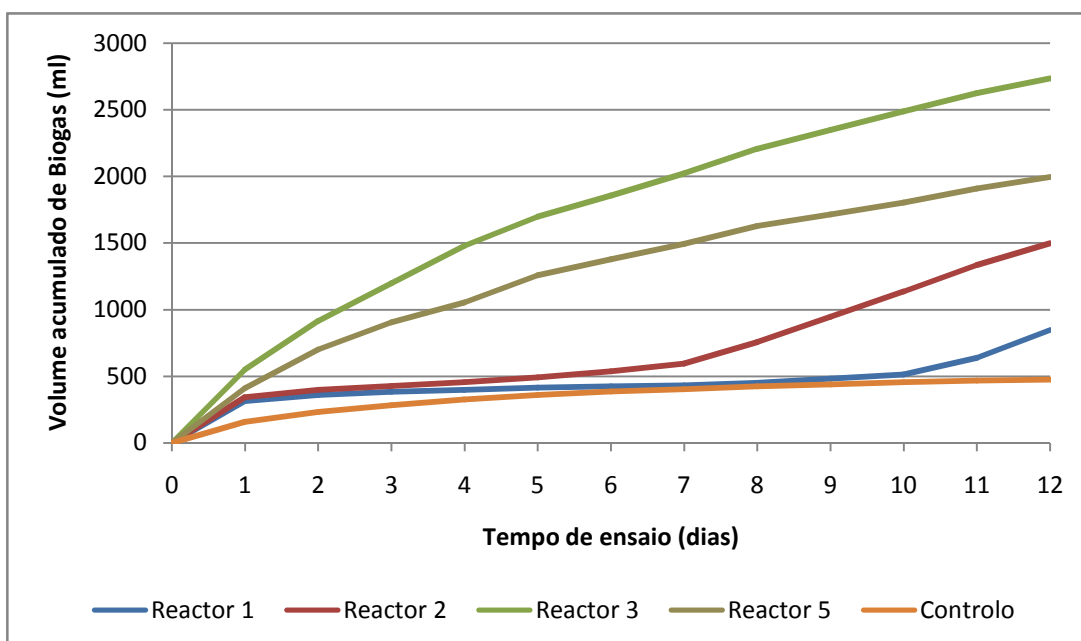


Figura 3.27- Volume acumulado para o ensaio de digestão anaeróbia (Reactor 1- substrato com pré-tratamento enzimático a 48h; Reactor 2- substrato com pré-tratamento enzimático a 60h; Reactor 3- substrato sem pré-tratamento enzimático apenas adição de enzimas ao reactor; Reactor 5- Substrato sem pré-tratamento enzimático e sem adição de enzimas)

Verifica-se que os reactores 3 e 5 apresentaram os melhores resultados em termos de volume diário, volume acumulado e de produtividade específica de biogás. Sendo que o reactor 3 contendo substrato com adição de enzima foi o reactor que apresentou os melhores resultados (Tabela 3-23).

Tabela 3-23- Parâmetros determinados no início e final do ensaio de DA

Reactores	pH_{Inicial}	pH_{Final}	AGVs (g/l)	Alcalinidade (gCaCO ₃ /l)	Produtividade específica de biogás (l/gSV)	CH₄ (%)	CO₂ (%)
Reactor 1	6,45	6,63	4,4	0,9	0,02	36,7	63,3
Reactor 2	6,65	7,48	2,8	2,5	0,05	38,6	61,4
Reactor 3	6,98	6,80	0,2	1,6	0,12	63,4	36,6
Reactor 5	6,98	6,76	0,1	1,4	0,10	56,2	43,85

Verifica-se que os reactores 1 e 2, contendo os substratos sujeitos ao pré-tratamento enzimático (40h e 60h), apresentaram no final do ensaio um conteúdo em AGVs bastante elevado principalmente no reactor 1. Com base nos resultados obtidos em HPLC a concentração de glucose e xilose não deverá ser muito diferente entre os substratos sujeitos a pré-tratamento por 40 h e 60 h, pelo que a concentração de AGVs não deveria ser muito diferente entre os dois reactores. A explicação pela elevada concentração de AGVs no reactor 1 em comparação com o reactor 2 pode dever-se ao facto de no reactor 1 o pH inicial ser ligeiramente inferior ao do reactor 2. O mesmo efeito de inibição também se verificou no reactor 2 contudo a sua recuperação verificou-se a partir do dia 6-7 e no caso do reactor 1 apenas a partir do dia 10-11, pelo que a concentração de AGVs é ainda bastante elevada no reactor 1. O efeito da inibição é verificado também pelo conteúdo de CH₄ e CO₂ que evidencia uma maior libertação de CO₂ devido ao pH do meio ser ácido e menor alcalinidade. No entanto, os resultados da composição do biogás provêm de amostras retiradas no 7º dia e portando não acompanham a subida da produção de biogás verificada nos reactores 1 e 2. Pelo que seria interessante verificar também o conteúdo de CH₄ e CO₂ durante estes últimos dias.

Apesar disto, analisando o conteúdo em AGVs e alcalinidade para os dois reactores, verifica-se que a razão AGVs/Alcalinidade é bastante superior à considerada como adequada para o processo que deverá ser igual ou inferior a 0,2. Estes resultados indicam que provavelmente a correcção do pH no início do

ensaio não foi eficiente e por outro lado a concentração inicial de AGVs era bastante elevada, factor que pode estar relacionado com a concentração da solução tampão utilizada no pré-tratamento enzimático.

No caso dos outros reactores, verifica-se que a adição de enzimas contribuiu para uma maior produtividade específica de biogás e conteúdo de metano do biogás. O efeito de adição de celulasas no aumento da produtividade específica de biogás vem comprovar uma vez mais que a fase limitante do processo degradativo de substratos lenhocelulosicos é a hidrólise. Esta limitação parece também dever-se não só à estrutura do material lenhocelulósico mas também devido aos microrganismos presentes no inóculo que tenham a capacidade de produzir celulasas. A adição de celulasas ao inóculo aumentou a produtividade específica de biogás do substrato quando comparado com o reactor que apenas continha inóculo de ETAR. Os microrganismos existentes no inóculo de ETAR apresentam um défice na produção de celulasas ou os microrganismos existentes não possuem a capacidade para produzir este tipo de enzimas. Contudo dever-se-á efectuar em conjunto análises ao inóculo de ETAR utilizado, de modo a verificar quais os organismos hidrolíticos existentes. Por outro lado dever-se-á efectuar ensaios utilizando diferentes concentrações das duas enzimas utilizadas, bem como efectuar um branco, inóculo e celulose, como substrato com e sem adição de enzimas. Deste modo é possível apresentar resultados que permitam evidenciar a carência de microrganismos hidrolíticos no inóculo utilizado e da produção de celulasas.

No entanto, dever-se-á realçar um efeito bastante positivo com a simples adição de enzimas à mistura contendo inóculo de ETAR e cardo e, contrariamente um efeito bastante negativo com a realização de um pré-tratamento enzimático. A realização de um pré-tratamento enzimático segundo as condições utilizadas não contribuiu para a melhoria do processo de digestão anaeróbia.

4 Conclusões

O trabalho apresentado permitiu analisar em termos gerais o processo de digestão anaeróbia de biomassa. O trabalho está dividido em duas partes, uma primeira parte com o objectivo de apresentar o estado da arte, focando com algum detalhe determinados parâmetros associados directamente ou indirectamente com o processo de digestão anaeróbia, e com o trabalho experimental propriamente dito. A segunda parte do trabalho refere-se aos ensaios desenvolvidos em laboratório referentes à digestão anaeróbia de *Cynara cardunculus* L.

O trabalho experimental permitiu analisar o efeito na produtividade de biogás e composição do biogás utilizando diferentes razões I/S, diferentes pré-tratamentos (térmico, termoquímico, mecânico e enzimático) e adição de celulasas ao inóculo.

O trabalho experimental realizado permitiu concluir que a digestão anaeróbia dos caules de *Cynara cardunculus* L., como processo de produção de metano, revela-se apenas interessante quando ocorre uma fase de pré-tratamento. A realização de um pré-tratamento mecânico, térmico, termoquímico e adição de enzimas, conduz a uma maior conversão dos caules de *Cynara* a metano. Contudo o efeito do pré-tratamento e da adição de enzimas deverá ser analisado em outros ensaios com mais detalhe, de modo a construir uma matriz que permita escolher o melhor pré-tratamento.

A análise do ensaio B e do ensaio final, realizados para um tempo experimental de 32 dias permite concluir que a produtividade específica de metano para a *Cynara cardunculus* L. sem qualquer pré-tratamento é no mínimo igual a 0,3 l/g SV. Os problemas verificados durante o ensaio B não permitiram contabilizar todo o volume de biogás produzido pelo que muito provavelmente a produtividade específica de metano para os caules de *Cynara cardunculus* L. seria superior a 0,3 l/g SV.

No entanto, analisando a redução de SV para os dois ensaios verifica-se que a remoção de SV é superior no ensaio B em relação ao ensaio final. No ensaio B obteve-se uma remoção de SV igual a 42% e no ensaio final igual a 21%, facto que está directamente relacionado com a dimensão das partículas utilizadas. No ensaio B utilizaram-se partículas com dimensões de 40-60 Mesh e no ensaio final utilizou-se uma fracção grosseira cuja dimensão é de aproximadamente 10 mm.

O pré-tratamento mecânico, inerente a estes dois ensaios, permite concluir que a redução da dimensão das partículas dos caules de *Cynara cardunculus* L. de 10 mm para 40-60 Mesh poderá ter contribuído para um aumento de aproximadamente o dobro da conversão do carbono existente nos caules de *Cynara cardunculus* L.

Verificou-se ainda que a conversão dos caules de *Cynara cardunculus* L. era bastante superior quando sujeitos a um pré-tratamento térmico com água e termoquímico com NaOH. Verificou-se uma remoção de SV igual a 56% quando os caules, com partículas de dimensões de 40-60 Mesh, foram submetidos a um pré-tratamento térmico com água. Verificou-se uma remoção de SV superior e igual a 23% quando os caules, com partículas de dimensões aproximadamente iguais a 10 mm, foram submetidos a um pré-tratamento termoquímico com NaOH. Analisando a remoção final SV de cada um dos ensaios verifica-se que esta é superior quando os caules *Cynara* são submetidos a um pré-tratamento mecânico reduzindo a dimensão das partículas a 40-60 Mesh e pré-tratamento térmico com água. Ao comparar este resultado com o obtido no ensaio final verifica-se que os problemas sentidos durante o ensaio B contribuíram para subestimar a produtividade específica de metano dos caules de *Cynara*. Conclui-se que a produtividade de metano dos caules de *Cynara* deverá ser superior a 0,3 l/g SV para as condições do ensaio.

Conclui-se que a adição de reagentes alcalinos contribui para uma melhor digestibilidade dos caules de *Cynara*. O NaOH contribuiu para um melhor conteúdo em metano e uma melhor produtividade específica de biogás e metano. No entanto, para o ensaio final descrito no ponto (3.3.4), apesar da elevada produtividade de biogás e metano verificados nos primeiros dias de ensaio, o conteúdo de metano era bastante reduzido. O pré-tratamento térmico efectuado com NaOH poderá ter contribuído para uma inibição das bactérias metanogénicas, contudo o conteúdo de metano voltou a subir ao longo do ensaio pelo que poderá ter ocorrido uma adaptação do inóculo.

No caso do ião amónio verificou-se uma maior acessibilidade das bactérias hidrolíticas e fermentativas que conduziu a uma maior disponibilidade de carbono. Os resultados com o ião amónio são interessantes, contudo a concentração utilizada conduziu a condições de inibição devido à concentração de AGVs e de azoto amoniacal medidos no final no ensaio.

Os ensaios laboratoriais permitiram ainda concluir que o inóculo utilizado pode apresentar um défice de microrganismos hidrolíticos e/ou organismos hidrolíticos produtores de celulasas. Verificou-se que a adição de celulasas contribui para um aumento do volume de biogás acumulado e conteúdo de metano.

Outros pré-tratamentos deverão também ser incluídos como, por exemplo, um pré-tratamento aeróbio utilizando lamas activadas, pré-tratamento utilizando fungo da podridão branca e ainda ensilagem. A análise dos custos associados a esta fase de pré-tratamento deverá também ser analisada.

Conclui-se também que a razão de I/S afecta a produtividade específica de biogás e metano. Verifica-se que a produtividade específica de biogás e metano aumenta com a diminuição da razão I/S. Ocorre um máximo de produtividade específica de biogás quando a razão de I/S é igual a 38.9 ml I/ g SV S. No entanto deverão efectuar-se outros ensaios para tempos de digestão iguais ou superiores a 30 dias. O efeito da razão de I/S parece estar associado a razão de C/N. A lama digerida de ETAR apesar de ser referida como inóculo ao longo de todo o trabalho prático pode ser também considerada como um co-substrato. O trabalho experimental permite também realçar a importância da co-digestão de lamas de ETAR com substratos lenhocelulósicos como os caules de *Cynara cardunculus* L. A baixa razão de C/N, característica das lamas de ETAR (primárias, secundárias ou mistas), e a elevada razão de C/N, característica de substratos lenhocelulosicos, favorecem a utilização dos mesmos como um substrato de valor acrescentado para a optimização do processo da DA. Tendo em conta este factor a *Cynara cardunculus* L. pode ainda ser considerada como um co-substrato ou aditivo na digestão anaeróbia de lamas de ETAR contribuindo para um aumento da produtividade específica de biogás e metano dos digestores primários ou secundários das ETAR. Em consequência o digerido resultante do processo poderá ser utilizado como fertilizante dos solos que são utilizados para o cultivo de *Cynara cardunculus* L.

5 Futuros trabalhos de investigação

A *Cynara cardunculus* L. é uma cultura com diversas vantagens tendo em conta as características edafoclimáticas existentes no centro, interior e sul de Portugal. Considerando a sua utilização, por exemplo, como aditivo ou co-substrato em ETAR e a consequente utilização do digerido sólido como biofertilizante e a fracção líquida como substituto de água na irrigação de solos é possível garantir uma maior sustentabilidade de todo o processo de produção de biometano a partir da DA desta cultura. Outros factores ambientais tais como diminuição da erosão dos solos, diminuição dos GEE relacionados com a utilização de fertilizantes, redução do consumo de água na irrigação, redução da dependência energética em combustíveis fósseis e redução dos respectivos GEE, deverão ser também analisados de modo a determinar o benefício global de todo o processo industrial da DA de *Cynara cardunculus* L. Contudo com base no trabalho realizado foi possível perspectivar-se a realização de outros trabalhos que deverão merecer uma maior prioridade tais como:

- Optimizar o pré-tratamento alcalino com hidróxido de sódio, hidróxido de amónio e hidróxido de cálcio. Testando o pré-tratamento alcalino à temperatura ambiente e a diferentes temperaturas com diferentes tempos de reacção e fazendo variar igualmente a concentração do reagente. Deste modo, construindo uma matriz que permita seleccionar um ponto ideal para este pré-tratamento, seleccionando as condições ideais de temperatura, concentração do reagente e tempo de reacção em função da disponibilização dos açúcares estruturais.
- Testar outros pré-tratamentos como fungo da podridão branca e o tratamento aeróbio com adição de lamas activadas.
- Testar a ensilagem dos caules secos e verdes com e sem pré-tratamento mecânico antes da incorporação do material no silo.
- Efectuar um estudo que relacione todos estes pré-tratamentos e o seu efeito na produção de biometano. Comparando a sua eficiência na disponibilização dos açúcares estruturais e consequente produção de biometano. Efectuar ainda uma análise económica e financeira para cada uma das situações.
- Testar outras razões de I/S utilizando lamas primárias de ETAR, efluentes de suinicultura, etc.

- Testar outras razões de I/S utilizando substrato verde proveniente do 1º e 2º cortes.
- Construir à escala piloto ou laboratorial reactores e avaliar o seu funcionamento utilizando partículas de cardo com diferentes dimensões.

6 Bibliografía

Ahn, J.; Do, T.; Kim, S.; Hwang, S. (2006) The effect of calcium on the anaerobic digestion treating swine wastewater, *Biochemical Engineering Journal*, 30, pp. 33-38.

Alvarez, J., Macé, S., Llabrés, P. (2000), Anaerobic digestión of organic solid wastes. An overview of research achievements and perspectives, *Bioresource Technology*, 74, pp. 3-16.

Alvarez, R., Lidén, G. (2008), The effect of temperature variation on biomethanation at high altitude, *Bioresource Technology*, 99, pp. 7278-7284.

Amon, T., Amon, B., Kryvoruchko, V., Zollitsch, Mayer, K., Gruber, L. (2006), Biogas production from maize and dairy cattle manure - Influence of biomass composition on the methane yield, *Agriculture Ecosystems & Environment*, Elsevier, 118, pp. 173-182.

Amon, T. (2007) Potential of Biogas Production from Sustainable Biorefinery Concepts, In: *Biomass Conference*, Berlin, Germany.

Angelidaki, I., Ahring, B. (2000), Methods for increasing the biogas potential from the recalcitrant organic matter contained in manure, *Water Science and Technology*, Vol. 14 No3, pp. 189-194.

Austin, G., Blignaut, J., South African National Rural Domestic Biogas Feasibility Assessment, AGAMA Energy (Pty) Ltd, Prepared for Minister for Development Co-Operation The State of Netherlands, 8 November 2007.

Ballesteros, I., Ballesteros, M., Manzanares, P., Negro, M., Oliva, J., Sáez, F. (2008), Dilute sulfuric acid pretreatment of cardoon for ethanol production, *Biochemical Engineering Journal*, 42, pp. 84-91.

Bauer, A., Bösch, P., Friedl, A., Amon, T. (2009), Analysis of methane potentials of steam-exploded wheat straw and estimation of energy yields of combined ethanol and methane production, *Journal of Biotechnology*, doi:10.1016/j.jbiotec.2009.01.017.

Bohn, I., Björnsson, Mattiasson, B. (2007), The energy balance in farm scale anaerobic digestion of crop residues at 11-37 °C, *Process Biochemistry*, 42, pp.57-64.

- Bok, F., Plugge, C., Stams, A. (2003), Interspecies electron transfer in methanogenic propionate degrading consortia, *Water Research*, 38, pp 1368-1375.
- Boone, D., Chynoweth, D., Mah, R., Smith, P., Wilkie, C. (1993), Ecology and Microbiology of Biogasification, *Biomass and Bioenergy*, 5, pp. 191-202.
- Buranov, A., Mazza, G. (2008), Review: Lignin in straw of herbaceous crops, *Industrial Crops and Products*, 28, pp. 237-259.
- Caparrós, S., Ariza, J., López, F., Nacimiento, J., Garrote, G., Jiménez, L. (2007), Hydrothermal treatment and ethanol pulping of sunflower stalks, *Bioresource Technology*, 99, pp. 1368-1372.
- Cassidy, D., Hirl, P., Belia, E. (2008), Methane production from ethanol co-products in anaerobic SBRs, *Water Science and Technology*, 789, pp. 5.
- Chanakya, H., Reddy, B., Modak, J. (2009), Biomethanation of herbaceous biomass residues using 3-zone plug flow like digesters - A case study from India, *Renewable Energy*, 34, pp. 416-420.
- Chen, Y., Cheng, J., Creamer, K. (2007), Inhibition of anaerobic digestion process: A review, *Bioresource Technology*, doi:10.1016/j.biortech.2007.01.057.
- Chynoweth, D. (1992) Global Significance of Biomethanogenesis. In: *Global Environmental Chemistry*, Dunnette D and O'Brien (Eds.), ACS Symposium, Series, 483, pp. 338-351.
- Chynoweth, D. P., Isaacson, R. (1987), Anaerobic digestion of biomass, Elsevier Applied Science (Ed.lit.), London, pp 279 (ISBN 1-85166-069-0).
- Chynoweth, D., Jerger, D. (1985), Anaerobic Digestion of Woody Biomass, *Developments in Industrial Microbiology*, 26, pp. 235-246, Publication of the Society for Industrial Microbiology, 1985.
- Chynoweth, D., Mah, R. (1977), Bacterial populations and end products during anaerobic sludge fermentation of glucose, *Journal Water Pollution Control Federation*, Part 1, pp. 405-412.
- Chynoweth, D., Owens, J., Legrand, R. (2001), Renewable methane from anaerobic digestion of biomass, *Renewable Energy*, 22, pp. 1-8.

Colleran, E., Concannon, F., Golden, T., Geoghegan, F., Crumlsh, B., Killilea, E., Henry, M., Coates, J. (1992), Use of Methanogeni activity testes to characterize anaerobic sludges, screen for anaerobic biodegradability and determine toxicity threshols against individual anaerobic trophic groups and species, *Water Science Technology*, 25, pp. 31-40.

Curt, M., Sánchez, G., Fernández, J. (2002), The Potential of *Cynara cardunculus* L. for seed oil production in a perennial cultivation system, *Biomass and Bioenergy*, 23, pp. 33-46.

Dalianis, C., Panoutsou, P., Dercas, N. (1996), Spanish Thistle Artichoke: *Cynara cardunculus* L., under Greek conditions. In: Chartier, P., Ferrero, G.L., Henius, U.M., Hultberg, S., Sachau, J., Wiinblad, M. (Eds.), *Biomass for Energy and Environment*. Elsevier Sci. Ltd, Oxford, pp. 663-668.

Demirel, B. (2009), Laboratory investigations on continuous bio-methanization of energy crops as mono-substrate without supplementation, *Biomass and Bioenergy*, 33, pp. 988-993.

Donghai, S., Junshe, S., Ping, L., Yanping, L. (2006). Effects of Different Pretreatment Modes on the Enzymatic Digestibility of Corn Leaf and Corn Stalk. *Chinese Journal Chemical Eng.*, 14, pp. 796-801.

Duarte, E., Digestão anaeróbia e valorização de efluentes de suinicultura, dissertação apresentada à Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa para obtenção do grau de Doutor em Engenharia do Ambiente, na especialidade de Sistemas Naturais e suas Tensões Lisboa, E.C.N.F.A.D., 1991.

Falleh, H., Ksouri, R., Chaieb, K., Karray-Bouraoui, N., Trabelsi, N., Boulaaba, M., Abdelly, C. (2008), Phenolic composition of *Cynara cardunculus* L. organs, and their biological activities, *Comptes Rendus Biologies*, 331, pp. 372-379.

Fernández, J., Curt, M. (1994) Estimate cost of thermal power from *Cynara cardunculus* L. biomass in Spanish conditions. Application to electricity production. In: *Biomass for Energy, Environment Agriculture and Industry*, Ph. Chartier, A. A. C. M. Beenackers and G. Grassi (Eds) Elsevier Sci. Limited (Publ, Oxford, pp. 342-350 (ISBN 0-08-042135)

Fernández, J., Curt, M., Aguado, P. (2006), Industrial applications of *Cynara cardunculus* L. for energy and other uses, *Industrial crops and Products*, 24, pp. 222-229.

Fernández, J., Curt, M., Low-Cost Biodiesel from Cynara oil, 2nd World Conference and Exhibition on Biomass for Energy, *Industry and Climate Protection*, 10-14 May 2004, Roma, Italy.

Franco, C., Gulyurtlu, I., Abelha, P., Monsanto, M., Dias, M., Lopes, H., André, R. (2007), Resultados da gasificação e combustão do cardo em leito fluidizado, Culturas energéticas no espaço atlântico: Oportunidades de implementação em larga escala, Seminário "Culturas energéticas, Biomassa e Biocombustíveis", 7 de Dezembro, 2007, Évora.

Garrote, G., Falqué, E., Domínguez, H., Parajó, J. (2007), Autohydrolysis of Agricultural residues: Study of reaction byproducts, *Bioresource Technology*, 98, pp. 1951-1957.

Gerhardt, M., Pelenc, V., Ringpfeil, M., Bäuml, M., Optimisation of Agricultural Biogas Production Plants By Application of Hydrolytic enzymes, Biopract GmbH, papel commercial, *European Biomass Conference*, Berlin, 2007.

Gerin, P., Vliegen, F., Jossart, J. (2007), Energy and CO₂ balance of maize and grass as energy crops for anaerobic digestion, *Bioresource Technology*, pp. 1-8.

Gominho, J., Fernandez, J., Pereira, H. (2001), Cynara cardunculus L. - a new fibre crop for pulp and paper production, *Industrial Crops and products*, 13, pp. 1-10.

Gominho, J., Lourenço, A., Curt, M., Fernández, J., Pereira, H. (2008), Characterization of hairs and pappi from Cynara cardunculus capitula and their suitability for paper production, *Industrial crops and Products*, pp. 1-10.

Gunaseelan, V. N. (1995), Effect of Inoculum/substrate ratio and pretreatments on Methane yield from Parthenium, *Biomass and Bioenergy*, 8, pp.39-44.

Gunaseelan, V. (1997), Anaerobic digestion of Biomass for methane production: a Review, *Biomass and Bioenergy*, 13, pp. 83-114.

Gunaseelan, V. (2008), Biomass estimates, characteristics, biochemical methane potential, kinetics and energy flow from *Jatropha curcus* on dry lands, *Biomass and Bioenergy*, doi:10.1016/j.biombioe.2008.09.002.

Gunaseelan, V. (2009), Predicting ultimate methane yields of *Jatropha curcus* and *Morus indica* from their chemical composition, *Bioresource Technology*, 100, pp. 3426-3429

- Hartmann, H., Angelidaki, I., Ahring, B. (2000), Increase of anaerobic degradation of particulate organic matter in full-scale biogas plants by mechanical maceration, *Water Science and Technology*, Vol 41, N°3, pp. 145-153.
- Hendriks, A., Zeeman, G. (2009), Review: Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass, *Bioresource Technology*, 100, pp. 10-18.
- Hu, Z., Wang, G., Yu, H. (2004), Anaerobic degradation of cellulose by rumen microorganisms at various pH values, *Biochemical Engineering Journal*, 21, pp. 59-62.
- Hu, Z., Yo, H. (2005), Application of rumen microorganism for enhanced anaerobic fermentation of corn stover, *Process Biochemistry*, 40, pp. 2371-2377.
- Jegannathan, K., Chan, E., Ravindra, P. (2009), Harnessing Biofuels: A global Renaissance in energy production?, *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, doi:10.1016/j.rser.2009.01.012.
- Jerger, D., Chynoweth, D., Isaacson, H. (1987), Anaerobic Digestion of Sorghum Biomass, *Biomass*, 14, pp. 99-113.
- Jingura, R., Matengaifa, R. (2009), Optimization of biogas production by anaerobic digestion for sustainable energy development in Zimbabwe, *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 13, pp. 116-1120.
- Jørgensen, H., Kristensen, J. B., Felby, C. (2007), Enzymatic conversion of lignocelluloses into fermentable sugars: challenges and opportunities, *Biofuels Bioproducts & Biorefining*, 1, pp. 119-134.
- Kamm, B., Kamm, M. (2007), International biorefinery systems, *Pure Applied Chemistry*, 79, N° 11, pp. 1983-1997.
- Katuwal, H., Bohara, A. (2009), Biogas: A promising renewable technology and its impact on rural households in Nepal, *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 13, pp. 2668-2674.
- Klocke, M., Nettmann, E., Bergmann, I., Mundt, K., Souidi, K., Mumme, J., Linke, B. (2007), Characterization of the methanogenic Archaea within two-phase biogas reactor systems operated with plant biomass, *Systematic and Applied Microbiology*, 31, pp. 190-205.

Kohlmann, K., Westgate, P., Velayudhan, A., Weil, J., Sarikaya, A., Brewer, M., Hendrickson, R., Ladish, M. (1995), Enzyme conversion of lignocellulosic plant materials for resource recovery in a controlled ecological life support system, *Advances in Space Resource*, Vol. 18, Nº ½, pp. 251-265.

Lehtomäki, A., Huttunen, S., Rintala, J.A. (2007a), Laboratory investigations on co-digestion of energy crops residues with cow manure for methane production: Effect of crop to manure ratio, *Resources, Conservation and Recycling*, 51, pp. 591-609.

Lehtomäki, A., Huttunen, S., Lehtinen, T. (2007b), Anaerobic digestion of grass silage in batch leach bed processes for methane production, *Bioresource Technology*, 99, pp. 3267-3278.

Liu, C., Wyman, C. (2005), Partial flow of compressed-hot water through corn stover to enhance hemicellulose sugar recovery and enzymatic digestibility cellulose, *Bioresource Technology*, 96, pp. 1978-1985.

Lue-Hing, C., Zenz, D., Tata, P., Kuchenrither, R., Malina, J., Sawyer, B. (1998), Municipal Sewage Sludge Management: A reference text on processing, utilization and disposal, Water Quality Management Library, 2nd ed., v. 4, U.S.A , pp. 790. (ISBN: 1-56676-621-4).

Martins, M., Lima, N., Silvestre, A., Queiroz, M. (2003), Comparative studies of fungal degradation of single or mixed bioaccessible reactive azo dyes, *Chemosphere*, 52, pp. 967-973.

Mata-Alvarez, J. (1987), A dynamic simulation of a two-phase anaerobic digestion system for solid wastes, *Biotechnol & Bioengineer*, 30, pp. 189-199.

Misi, S., Forster, C. (2001), Batch co-digestion of multi-component agro-wastes, *Bioresource Technology*, 80, pp. 19-28.

Mladenovska, Z., Hastmann, H., Kvist, T., Sales-Cruz, M., Gani, R., Ahring, B. (2006), Thermal pretreatment of the solid fraction of manure: impact on the biogas reactor performance and microbial community, *Water Science & Technology*, 53, Nº8, pp. 59-67.

Moosbrugger, R. (2009), Method to determine the Volatile Fatty Acids and Alkalinity: 5 pH point titration, Veolia Water Solutions & Technologies. Método cedido pelo próprio investigador apenas para fins de investigação.

- Mosier, N., Hendrickson, R., Ho, N., Sedlak, M., Ladisch, M. (2005a). Optimization of pH controlled liquid hot water pretreatment of corn stover. *Bioresource Technology*, 96, pp. 1986-1993.
- Mosier, N., Wymacn, C., Dale, B., Elander, R., Lee, Y., Holtzapple, M., Ladish, M. (2005b). Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. *Bioresource Technology*, 96, pp. 673-686.
- Mshandete, A., Björnsson, L., Kivaisi, A., Rubindamayugi, S., Mattiasson, B. (2005a), Enhancement of anaerobic batch digestion of sisal pulp waste by mesophilic aerobic pre-treatment, *Water Research*, 39, pp. 1569-1575.
- Mshandete, A., Björnsson, L., Kivaisi, A., Rubindamayugi, M., Mattiasson (2005b), B., Effect of particle size on biogas yield from sisal fibre waste, *Renewable Energy*, 31, pp. 2385-2392.
- Mshandete, A., Kivaisi, A., Rubindamayugi, M., Mattiasson, B. (2004), Anaerobic batch co-digestion of sisal pulp and fish wastes, *Bioresource Technology*, 95, pp. 19-24.
- Murphy, J., Power, N. (2009), Technical and economic analysis of Biogas production in Ireland utilising three different crop rotations, *Applied Energy*, 86, pp. 25-36.
- Ortega, G., *Cynara cardunculus* L. Plant Resources, Proceedings of the sixth international symposium on artichoke, cardoon and their wild relatives, 2007.
- Pakarinen, O., Lehtomäki, A., Rissanen, S., Rintala, J. (2008), Storing Energy crops for methane production: Effects of solids content and biological additive, *Bioresource Technology*, 99, pp. 7074-7082.
- Palmowski, L., Müller, J. (2000), Influence of the size reduction of organic waste on their anaerobic digestion, *Water Science and Technology*, Vol 41, N° 3, pp. 155-162.
- Pereira, H., Gominho, J., Miranda, I., Paes, S. (1994), The chemical composition and Raw-material quality of *Cynara Cardunculus* L. biomass as a pulp fibre source, In: Hall, D.O., Grassi, G. Scheer, H. (Eds.), *Biomass for Energy and Industry*. Ponte Press. Bochum, pp. 1133-1137.
- Prochnow, A., Heiermann, M., Plöchl, M., Linke, B., Idler, C., Amon, T., Hobbs, P. (2009), Bioenergy from permanent grassland - A review: 1. Biogas, *Bioresource Technology*, 100, pp. 4931-4944.

Raccuia, S., Melilli, M. (2007), Biomass and grain oil yield in *Cynara cardunculus* L. genotypes grown in a Mediterranean environment, *Field Crops Research*, 101, pp. 187-197.

Rowell, R. M., Pettersen, R., Han, J. S., Rowell, J. S., Tshabalala, M. A., Handbook of Wood Chemistry and Wood Composites: Chapter 3, CRC Press LLC, 2005.

Santino, B., Desenvolvimento de um processo tecnológico inovador para o tratamento dos efluentes do processamento de sementes de alfarroba, Lisboa, S.D.B., 2006.

Seiffert, M., Kaltschmitt, M., Miranda, J. (2008), The biomethane potential in Chile, *Biomass & Bioenergy*, doi:10.1016/j.biombioe.2008.09.005.

Shelton, D., Tiedje, J. (1984), General method for determining Anaerobic Biodegradation Potential, *Applied and Environmental Microbiology*, 47, pp.850-857.

Siegert, I., Banks, C. (2005), The effect of volatile fatty acid additions on the anaerobic digestion of cellulose and glucose in batch reactors, *Process Biochemistry*, 40, pp. 3412-3418.

Standard Methods for the examination of Water and Wastewater (1998). 20th Edition. APHA, AWWA, WEF.

Sullivan, C., Burrel, P., Clarke, W., Blackall, L. (2005), Comparison of cellulose solubilization rates in rumen and landfill leachate inoculated reactors, *Bioresource Technology*, 97, pp. 2356-2363.

Sullivan, C., Burrel, P., Clarke, W., Blackall, L. (2008), The effect of Biomass density on cellulose solubilization rates, *Bioresource Technology*, pp. 4723-4731.

Tilche, A., Galatola, M. (2008), The potential of bio-methane as bio-fuel/bio-energy for reducing greenhouse gas emissions: a qualitative assessment for Europe in a life cycle perspective, *Water Science and Technology*, 53, pp. 10.

Turick, C., Peck, M., Chynoweth, D., Jerger, D., White, E., Zsuffa, L., Kenney, W. (1991), Methane fermentation of Woody Biomass, *Bioresource Technology*, 37, pp. 141-147.

Urban, F., Benders, R., Moll, H. (2009), Energy for Rural India, *Applied Energy*, doi:10.1016/j.apenergy.2009.02.018.

- Voolapalli, R., Stuckey, D. (2000), Hydrogen production in anaerobic reactors during shock loads - Influence of formate production and H₂ Kinetics, *Water research*, 35, pp. 1831-1841.
- Walker, M., Zhang, Y., Heaven, S., Banks, C. (2009), Potential errors in the quantitative evaluation of biogas production in anaerobic digestion processes, *Bioresource Technology*, doi:10.1016/j.biortech.2009.07.018.
- Wang, G., Gavala, H., Skiadas, I., Ahring, B. (2009a), Wet explosion of wheat straw and codigestion with swine manure: Effect on the methane productivity, *Waste Management*, doi:10.1016/j.wasman.2009.07.004.
- Wang, Y., Zhang, Y., Wang, J., Meng, L. (2009), Effects of volatile fatty acid concentrations on the methane yield and methanogenic bacteria, *Biomass and Bioenergy*, doi:10.1016/j.biombioe.2009.01.007.
- Ward, A., Hobbs, P., Holliman, P., Jones, D. (2008), Optimisation of the anaerobic digestion of agricultural resources, *Bioresource Technology*, 99, pp. 7928-7940.
- Wyman, C., Dale, B., Elander, R., Holtzapple, M., Ladisch, M., Lee, Y. (2005), Coordinated development of leading biomass pretreatment technologies, *Bioresource Technology*, 96, 1959-1966.
- Yadvika, Santosh, Sreekrishnan, T., Kohli, S, Rana, V. (2004), Enhancement of Biogas production from solid substrates using different techniques - a review, *Bioresource Technology*, 95, pp. 1-10.
- Yang, B., Wyman, C. (2008), Characterization of the degree of polymerization of xylooligomers produced by flowthrough hydrolysis of pure xylan and corn stover with water, *Bioresource Technology*, 99, pp. 5756-5762, Elsevier.
- Yiridoe, E., Gordon, R., Brown, B. (2009), Nonmarket cobenefits and economic feasibility of on-farm biogas energy production, *Energy Policy*, 37, pp. 1170-1179.
- Zhang, X., Hongbo, Y., Huang, H., Liu, Y. (2007), Evaluation of biological pretreatment with rot fungi for the enzymatic hydrolysis of bamboo culms, *International Biodeterioration & Biodegradation*, 60, pp. 159-164.
- Zheng, M., Li, X., Li, L., Yang, X., He, Y. (2009), Enhancing anaerobic biogasification of corn stover through wet state NaOH pretreatment, *Bioresource Technology*, 100, pp. 5140-5145.

6.1 Referências electrónicas

Add-net (The European Anaerobic Digestion Network) - EU-Statistics – 2005:

— <http://www.adnett.org>.

ATB (Institut für Agrartechnik Potsdam), Novel high rate system for biogas production from energy crops, Innovations at the Leibniz Institute for Agricultural Engineering Potsdam-Bornim (ATB), 2009:

— <http://www.atb-potsdam.de>.

Baxter, D., European Commission (Joint Research Centre), IEA Task 37 Presentation, 2009:

— <http://www.iea-biogas.net/publicationsreports.htm>.

CONCAWE (Well-to-Wheels analysis of future automotive fuels and powertrains in the European context), 2007:

— <http://ies.jrc.ec.europa.eu/WTW>.

CONCAWE (Well-to-Wheels analysis of future automotive fuels and powertrains in the European context), WELL-TO-TANK Report Version 3.0, 2008:

— <http://ies.jrc.ec.europa.eu/WTW>.

Derenzo, S., Aldeia, W., Estudo das condições operacionais da etapa de extração de proteína do capim elefante (*pennisetum purpureum schum*), utilizado como fonte energetica, Encontro de Energia no Meio Rural, 2000, Brasil, 2000:

— http://www.proceedings.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=MSC000000022000000100033&lng=en&nrm=iso.

EC (European Comission), Agriculture and rural development, 2009:

— <http://ec.europa.eu>.

IEA Bioenergy (International Energy Agency)- Publications reports: Country reports of member countries in 2007 and 2006, 2007:

— <http://www.iea-biogas.net> (pdf's).

ISO 11734:1995 (International Standard), EC (European Comission), Agriculture and rural development, 2009:

— <http://ec.europa.eu>.

KJEMI(KJEMISK INSTITUTT-Universitetet I Oslo), Publications on Pectin, 2009:

— www.kjemi.uio.no/Polymerkjemi/Research/Pectin.htm.

Jerger, D., Conrad, J., Fannin, K., Chynoweth, D., Biogasification of Woody Biomass, Institute of Gas Technology publication, Chicago, 1982:

— <http://www.agen.ufl.edu/~chyn/index.htm>.

Le Baromètre du biogaz- 5 MTEO Produits en 2005 -EurObserv'er , 2006:

— <http://www.energies-renouvelables.org> (pdf).

Lehtomäki, A.2006, Biogas Production from Energy Crops and Crop residues, Dissertation, Jyväskylä Studies in Biological and Environmental Science, 163, pp. 9, 2006:

— <http://dissertations.jyu.fi/studbiol/9513925595.pdf>.

Magenta, M., Morfologia e Anatomia dos vegetais, Universidade de Santa Cecilia, 2009:

— <http://professores.unisanta.br/maramagenta/celulavegetal.asp>.

Mathieu, D., Biogas in the Netherlands experiences and visions, SenterNovem, IEA Task 37 Presentation, 2009:

— <http://www.iea-biogas.net/publicationsreports.htm>.

NREL (National Renewable Energy Laboratory), Biomass Research Center, Images, 2009:

— <http://www.nrel.gov>.

Persson, M. - Evaluation of upgrading techniques for biogas - Report SGC 142, Swedish Gas Centre, 2003:

— <http://www.sgc.se>.

Petersson, A., Country Report: Sweden by SGC (Swedish Gas Centre), IEA Task 37 Presentation, 2009:

— <http://www.iea-biogas.net/publicationsreports.htm>.

SIGMA (SIGMA-ALDRICH), Carbohydrate Analysis, 2009:

— <http://www.sigmaaldrich.com>.

Srivastava, V., Fannin, K., Chynoweth, D., Frank, J., Improved Efficiency and Stable Digestion of Biomass in Nonmixed UpFlow Solids Reactors, Institute of Gas Technology, Chicago, 1988:

— http://www.agen.ufl.edu/~chyn/Webpagecurrent/publications_dc.htm.

Weiland, P., Country Report: Germany, IEA Task 37 Presentation, 2009:

— <http://www.iea-biogas.net/publicationsreports.htm>.

Anexos



Figura A 1- Recolha de amostras durante os ensaios de 2000 ml (**A**- ponto de amostragem; **B**- Válvula; **C**- Sistema SGE)



Figura A 2- Garrafão de 5l utilizado como gasómetro (**A**- Entrada do biogás; **B**- Saída da água)

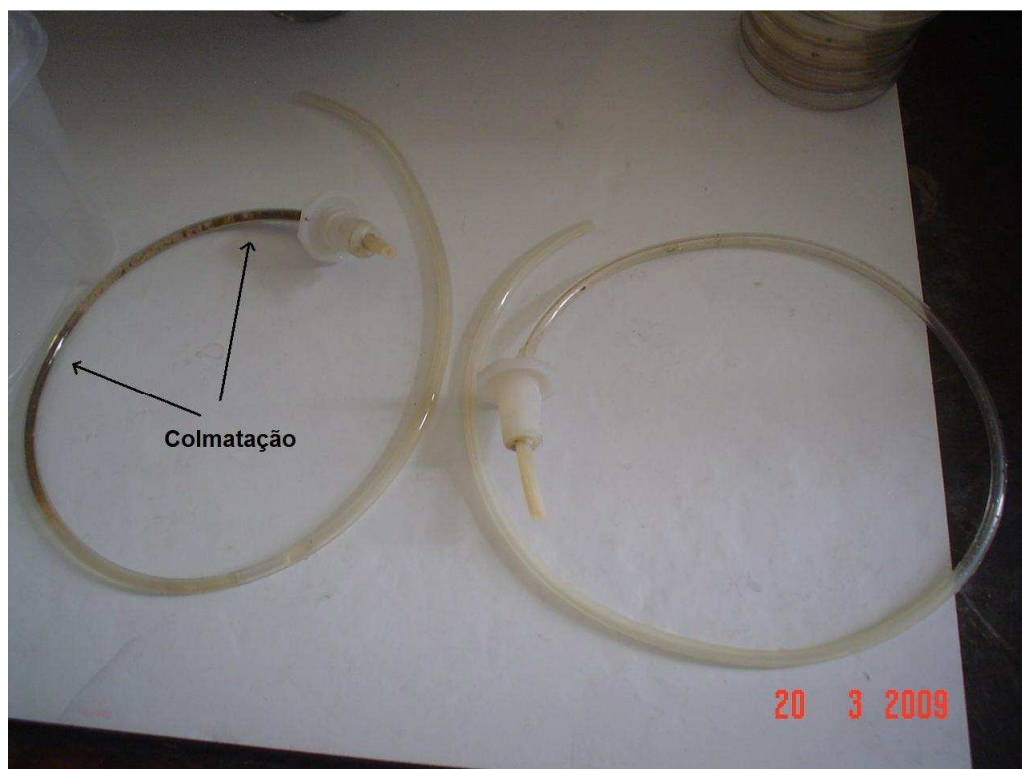


Figura A 3- Comparação da colmatação nos Tubos de recolha de biogás dos reactores 1 (esquerda) e 2 (direita) no ensaio A



Figura A 4- Dimensão das partículas do substrato utilizado pré-tratado (esquerda) e não tratado (direita)



Figura A 5- Cor do líquido da mistura no reactor 1 decorridos dois dias de ensaio



Figura A 6- Cor do liquido da mistura no reactor 1 decorridos dez dias de ensaio