NOVA SCHOOL OF SCIENCE & TECHNOLOGY

DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA ELETRO-TÉCNICA E DE COMPUTADORES

ANA MARGARIDA ROLEIRA GRAÇA

Licenciada em Engenharia do Ambiente

Digestão anaeróbia de bioplásticos: Efeito de pré-tratamentos

MESTRADO EM ENGENHARIA DE ENERGIAS RENOVÁVEIS

Universidade NOVA de Lisboa

Março, 2024

DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA ELETRO-TÉCNICA E DE COMPUTADORES

Digestão anaeróbia de bioplásticos: Efeito de pré-tratamentos

ANA MARGARIDA ROLEIRA GRAÇA

Licenciada em Engenharia do Ambiente

Orientador: Professor Doutor Nuno Lapa,
Professor Auxiliar, Universidade NOVA de Lisboa

Coorientador: Doutor Luís Ferreira,
Investigador Auxiliar, Instituto Superior Técnico, Universidade de Lisboa

Júri:

Presidente: Professor Doutor Pedro Miguel Ribeiro Pereira - FCT/UNL

Arguente: Doutora Mónica Isabel Gonçalves Carvalheira - FCT/UNL

Vogal: Professor Doutor Nuno Carlos Lapa dos Santos Nunes - FCT/UNL

MESTRADO EM ENGENHARIA DE ENERGIAS RENOVÁVEIS
Universidade NOVA de Lisboa
Março, 2024

Digestão anaeróbia de bioplásticos: Efeito de pré-tratamentos

Copyright © Ana Margarida Roleira Graça, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade NOVA de Lisboa.

A Faculdade de Ciências e Tecnologia e a Universidade NOVA de Lisboa têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

AGRADECIMENTOS

Concluído este trabalho, é com enorme prazer e satisfação que manifesto a minha gratidão e o meu reconhecimento a todos os que, direta ou indiretamente, tornaram possível a sua realização.

Em primeiro lugar gostaria de agradecer aos meus orientadores, Doutor Nuno Lapa e Doutor Luís Ferreira, pela oportunidade que me concederam em desenvolver este projeto, por toda a orientação e transmissão valiosa de conhecimentos ao longo deste trabalho.

À Doutora Márcia, pela sua ajuda incansável e imprescindível no trabalho laboratorial e pelo auxílio, disponibilidade, dedicação e motivação dada ao longo desta dissertação.

À Doutora Filomena Freitas e à aluna Beatriz Almeida pela produção das membranas de PHB. Sem elas não seria possível a realização deste trabalho.

A todos os investigadores do Centro de Ciências e Tecnologias Nucleares, do Instituto Superior Técnico, que sem qualquer obrigação, se dispuseram a ajudar a realizar este trabalho. Em especial, ao Doutor Pedro Santos pelas inúmeras amostras irradiadas.

Ao Nuno Costa pela análise das amostras de biogás.

À Valorsul, Estação de Tratamento e Valorização Orgânica (ETVO), Amadora, pelo fornecimento do inóculo anaeróbio.

Ao António Casimiro, pelas análises PALS (espectroscopia de tempo de vida de aniquilação do positrão).

À Sr$^{a.}$ Rosa Pinto e à Sr$^{a.}$ Lurdes Carvalho, pela ajuda com material laboratorial e com questões de logística.

Aos meus colegas de laboratório pela amizade, ajuda e convívio, tornando este período de laboratório mais fácil e divertido.

Agradeço também a todos os meus amigos por toda a preocupação, força e incentivo, em especial à Ana Cruz, à Ângela Robalo, à Joana Oliveira, à Ana Correia, à Natália Vilarinho e ao meu namorado.

Por fim, mas não menos importante, pois sem elas nada teria sido possível, um muito obrigada à minha mãe, irmã e à minha avó Nola. Espero um dia poder recompensar tudo o que fizeram por mim.

"Happiness is only real when shared." (Christopher McCandles)

RESUMO

Devido ao crescimento exponencial da população humana, os plásticos estão presentes, cada vez mais, no quotidiano da Humanidade. Os bioplásticos, nomeadamente o polihidroxibutirato (PHB), que pertence à grande família dos polihidroxialcanoatos (PHAS), são considerados como uma alternativa viável aos plásticos (poliésteres) convencionais de origem fóssil. O PHB é, por definição, um homopolímero com propriedades idênticas a vários poliésteres convencionais de origem petroquímica, contudo de origem biológica, biodegradável e biocompatível. Para que esta substituição seja exequível, é necessário conhecer-se e perceber-se o comportamento deste homopolímero quando sujeito a determinadas condições ambientais, em particular, para este trabalho, em condições de digestão anaeróbia (DA). Deste modo, esta dissertação teve como objetivo avaliar a eficiência da biodegradação do homopolímero PHB em condições de DA, não submetidos e submetidos a pré-tratamentos, nomeadamente pré-tratamento mecânico, corte, e físico, com radiação ionizante (radiação gama e feixe de eletrões (e-beam) em acelerador de eletrões (AE)).

Foram realizados sete ensaios, dos quais seis continham diferentes tipos de membrana de PHB. Nos ensaios com a membrana fragmentada e com a membrana porosa, verificou-se uma produção acumulada de biogás inferior relativamente ao ensaio com a membrana inteira (não fragmentada). O mesmo não era esperado, visto que a fragmentação e porosidade originam novos possíveis pontos de ataque para os microrganismos. O pré-tratamento com a radiação ionizante foi aplicado com o objetivo de provocar a fragmentação das cadeias poliméricas que constituem a membrana de PHB. Foram testadas várias doses de radiação e atmosferas de acondicionamento durante a irradiação. O tipo de irradiação que provocou maior alteração na entalpia e temperatura de degradação da membrana foi a de 50 kGy no AE, irradiada em atmosfera com oxigénio (atmosfera normal). Apesar de se ter verificado a diminuição destes parâmetros, devido à fragmentação das cadeias da matriz polimérica da membrana PHB, a produção acumulada de biogás foi inferior comparativamente a todos os outros ensaios, o que pode indicar um aumento da complexidade da estrutura polimérica por efeito da irradiação, dificultando a atividade das bactérias anaeróbias.

Palavras chave: Bioplásticos, Digestão Anaeróbia, Resíduos Alimentares, Bioplásticos, PHB, Radiação Ionizante, Tratamento físico, Tratamento mecânico.

ABSTRACT

Due to the exponential growth of the human population, plastics are increasingly present in everyday human life. Bioplastics, especially polyhydroxybutyrate, which belongs to the large family oh polyhydroxyalkanoates (PHAs), are considered a viable alternative to conventional fossil-based plastics (polyesters). PHB is, by definition, a homopolymer with properties identical to various conventional petrochemical polyesters, but of biological origin, biodegradable and biocompatible. To make this substitution feasible, it is necessary to understand the behaviour of these polymers under certain environmental conditions, particularly, under anaerobic digestion (AD) conditions, for these case study. The aim of this dissertation was to evaluate the efficiency of the homopolymer PHB biodegradation under AD conditions, with and without pre-treatments, specifically mechanical pre-treatment by fragmentation and physical pre-treatment with ionizing radiation (gamma radiation and electron beam (e-beam) from an electron accelerator (AE)).

Seven experiments were conducted, of which six involved different types of PHB membranes. In experiments with fragmented membrane and the porous membrane, it presented a lower cumulative biogas production compared to the experiment with the unfragmented membrane. This was unexpected since fragmentation and porosity create new potential zones of attack for microorganisms. A pre-treatment with ionizing radiation was applied with the goal of causing fragmentation of the polymeric chains that make up the PHB membrane. Various doses of radiation and storage atmospheres during irradiation were tested. The type of irradiation that caused the greatest alteration in enthalpy and degradation temperature of the membrane was 50 kGy irradiation in the electron beam irradiation, irradiated in an atmosphere with oxygen (normal atmosphere). Although a decrease in parameters was observed due to the fragmentation of the polymeric matrix chains of the PHB membrane, the cumulative biogas production was lower compared to all other experiments, which may indicate an increase in the complexity of the polymer structure after irradiation, making it more challenging for anaerobic bacteria activity.

Keywords: Bioplastics, Anaerobic Digestion, Food Waste, PHB, Ionizing Radiation, Physical Treatment, Mechanical Treatment.

Índice

AGRADECIMENTOS ..... **VII**

RESUMO ..... **XI**

ABSTRACT ..... **XIII**

ÍNDICE DE FIGURAS ..... **XIX**

ÍNDICE DE TABELAS ..... **XXIII**

ACRÓNIMOS ..... **XXV**

1. INTRODUÇÃO **1**

1.1. Objetivos da dissertação 1

1.2. Carácter inovador da dissertação 1

1.3. Enquadramento e motivação 1

2. ESTADO DA ARTE **5**

2.1. Digestão anaeróbia (DA) 5

2.1.1. Etapas da DA 7

2.1.2. Parâmetros e fatores que influenciam o processo da DA 11

2.2. Bioplásticos 19

2.2.1. Classificação dos bioplásticos 20

2.2.2. Tipos de bioplásticos 21

2.2.3. Caracterização de bioplásticos 23

2.2.4. Polihidroxialcanoatos (PHAs) 24

2.3. Radiação ionizante 30

2.3.1. Radiação gama (raios-γ) 33

2.3.2. Feixe de eletrões 35

3. MATERIAIS E MÉTODOS **37**

3.1. Materiais 37

3.1.1. Substrato orgânico 37

3.1.2. Polihidroxibutirato, PHB 39

3.1.3. Inóculo anaeróbio 43

3.2. Ensaios de Digestão Anaeróbia (DA) 44

3.2.1. Condições experimentais dos ensaios de DA 44
3.2.2. Configuração dos Biorreatores de DA 45
3.3. Caracterização do inóculo, substrato, misturas de partida e digeridos 46
3.3.1. Quantificação dos teores de sólidos totais, fixos e voláteis e da eficiência de remoção de sólidos voláteis 47
3.3.2. Quantificação da Carência Química de Oxigénio total e solúvel 48
3.4. Caracterização das membranas de PHB 50
3.4.1. Análise termogravimétrica, TGA 50
3.4.2. Calorimetria Diferencial de Varrimento, DSC 51
3.4.3. Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier, FTIR 52
3.4.4. Espectroscopia de aniquilação de positrões, PALS 53
3.4.5. Análise de microscopia eletrónica de varrimento 55
3.5. Caracterização do Biogás 56
3.6. Cálculos dos Rendimentos em Biogás e Biometano 57
3.7. Modelação da Cinética de Produção de Biogás (modelo modificado de Gompertz) 58
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO 59
4.1. Caracterização dos materiais de partida 59
4.1.1. Caracterização dos inóculos 59
4.1.2. Caracterização do substrato 59
4.1.3. Caracterização das membranas PHB 60
4.2. Caracterização de sólidos e CQO da mistura colocada nos biorreatores no início do ensaio de DA e dos digeridos obtidos no final dos ensaios de DA 70
4.2.1. Ensaio B (EB) 73
4.2.2. Ensaio MI (EMI) 75
4.2.3. Ensaio MP_{NaCl} e ensaio MP_{H2O} (EMP_{NaCl} e MP_{H2O}) 78
4.2.4. Ensaio MF (EMF) 82
4.2.5. Ensaio IMF (EIMF) 84
4.2.6. Ensaio MI_{50} (EMI_{50}) 86

4.3. Parâmetros cinéticos do modelo modificado de Gompertz e coeficiente de correlação dos ensaios 88

4.4. Caracterização das membranas, após a DA 89

5. CONCLUSÕES E TRABALHOS FUTUROS 95

5.1. Conclusões 95

5.2. Sugestões de Trabalho Futuros 97

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 99

7. ANEXOS 107

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 2.1 - Etapas da DA, bactérias envolvidas e compostos produzidos. 6
Figura 2.2 - Separação de fases do sistema de DA. 7
Figura 2.3 - Relação entre a taxa de degradação e o tempo de retenção, consoante os vários tipos de compostos orgânicos. 12
Figura 2.4- Variação da taxa de biodegradação em função da temperatura, durante a DA. 15
Figura 2.5- Sistema de coordenadas para classificação de bioplásticos. 22
Figura 2.6 - Síntese de PHB. 25
Figura 2.7 - Estrutura geral de polihidroxialcanoatos. 26
Figura 2.8 - Estrutura de poli(3-hidroxibutirato). 29
Figura 2.9- Espectro eletromagnético. 31
Figura 2.10- Comparação das radiações UV e feixe de eletrões 31
Figura 2.11- Poder de penetração dos diferentes tipos de radiação ionizante 32
Figura 2.12- Processo de Excitação e Ionização de um átomo. 32
Figura 2.13- Equação de decaimento do elemento cobalto 60 34
Figura 2.14- Esquema de decaimento radioativo do ^{60}Co 34
Figura 2.15- Secção transversal de um canhão de feixe de eletrões. 35

Figura 3.1- [A] Mistura de resíduos alimentares; [B] Mistura homogénea do resíduo alimentar congelado; [C] Substrato de resíduo alimentar diluído. 39
Figura 3.2- Membranas inteiras de PHB (não porosa). 40
Figura 3.3- Câmara de irradiação (*PRECISA 22*, Gravner), fechada [A] e aberta [B], vendo-se o suporte de irradiação com a amostra e o dosímetro 41
Figura 3.4- Dosímetro Amber Perspex 3042. 42
Figura 3.5- Imagem do acelerador de eletrões (LINAC); [A] - câmara de irradiação; [B]- canhão de eletrões do acelerador. 42
Figura 3.6- [A] Suporte para o material irradiado [B] Membrana de PHB devidamente dobrada e colocada no saco zip e [C] Dosímetro. 43
Figura 3.7-[A] Reatores anaeróbios na ETVO- Amadora [B] Mistura de efluentes dos reatores anaeróbios (inóculo). 43
Figura 3.8- [A] Biorreator com conexões e saco Tedlar; [B] Banho de água termostatizado com biorreatores imersos; [C] Coluna de medição do volume de biogás. 46
Figura 3.9- Equipamento de análise termogravimétrica. 51

Figura 3.10- Equipamento de calorimetria diferencial de varrimento. 52
Figura 3.11- Equipamento de análise de Espectrometria de Infravermelho 53
Figura 3.12- Decaimento do isótopo de sódio, ^{22}Na. 54
Figura 3.13- Equipamento de análise Espectroscopia de Aniquilação de Positrões. 55
Figura 3.14- Equipamento de Microscópica Eletrónica de Varrimento. 56

Figura 4.1- Termogramas de TGA da membrana de PHB não irradiadas e sem porosidade induzida (três réplicas). 61
Figura 4.2- Termogramas de DSC da membrana de PHB, não irradiada e sem porosidade induzida (três réplicas). 62
Figura 4.3-Imagem SEM da membrana de PHB, não irradiada e sem porosidade ([A] ampliação de 1000×; [B] ampliação de 500×) 63
Figura 4.4- Espectro de transmitância (FTIR) da membrana de PHB, não irradiada e sem porosidade induzida. 64
Figura 4.5- Imagens SEM da membrana inteira irradiada com radiação gama a 1 kGy numa atmosfera inerte, com uma [A] ampliação de 500 x e [B] ampliação de 1000 x. 66
Figura 4.6- Imagens SEM da membrana inteira irradiada com radiação gama a 12 kGy numa atmosfera inerte, com [A] ampliação de 500 x e [B] ampliação de 1000 x. 67
Figura 4.7- Evolução do tamanho dos poros de PHB em função da dose de radiação γ, em atmosfera inerte e numa atmosfera contendo oxigénio, até uma dose máxima de 12 kGy. 67
Figura 4.8- Imagens SEM da membrana inteira irradiada no AE a 12 kGy, numa atmosfera na presença contendo oxigénio, com [A] ampliação de 500 x e [B] ampliação de 1000 x. 69
Figura 4.9- Imagens SEM da membrana inteira irradiada no AE a 50 kGy, numa atmosfera contendo de oxigénio, com [A] ampliação de 500 x e [B] ampliação de 1000 x. 69
Figura 4.10- Evolução do tamanho dos poros de PHB em função da dose do AE, numa atmosfera contendo oxigénio, até uma dose máxima de 50kGy. 70
Figura 4.11- RA_B produzido ao longo do EB, com ajustamento do modelo modificado de Gompertz. 74
Figura 4.12- Composição do biogás ao longo do EB. 75
Figura 4.13- RA_B produzido ao longo do EMI, com o ajustamento do modelo modificado de Gompertz. 77
Figura 4.14- Composição do biogás ao longo do EMI. 78
Figura 4.15- RA_B produzido ao longo do EMP_{NaCl}, com o ajustamento do modelo modificado de Gompertz. 79
Figura 4.16- Composição do biogás ao longo do EMP_{NaCl}. 80

Figura 4.17- RA_B produzido ao longo do EMP_{H2O}, com o ajustamento do modelo modificado de Gompertz. 81
Figura 4.18- Composição do biogás ao longo do EMP_{H2O}. 82
Figura 4.19- RA_B produzido ao longo do EMF, com o ajustamento do modelo modificado de Gompertz. 83
Figura 4.20- Composição do biogás ao longo do EMF da DA. 84
Figura 4.21- RA_B produzido ao longo do EIMF, com o ajustamento do modelo modificado de Gompertz. 85
Figura 4.22- Composição do biogás ao longo do EIMF da DA. 86
Figura 4.23- RAB produzido ao longo do EIM_{50}, com o ajustamento do modelo modificado de Gompertz. 87
Figura 4.24- Composição do biogás ao longo do EIM_{50}. 88
Figura 4.25- Fragmentos de PHB presentes no DDA do EMI. 90
Figura 4.26- Termogramas de TGA dos fragmentos de membrana de PHB presentes no D_{DA} do EMI e da membrana inteira não irradiada e antes de ser inserida nos biorreatores da DA, TGA. 90
Figura 4.27- Termogramas de DSC dos fragmentos de membrana de PHB presentes no D_{DA} do EMI e da membrana inteira não irradiada e antes de ser inserida nos biorreatores da DA, DSC. 91
Figura 4.28- Espectro de transmitância (FTIR) do fragmento PHB digerido (-). 92
Figura 4.29- Espectro de transmitância (FTIR) do fragmento IM (+). 93
Figura 4.30- Termograma de TGA do fragmentos de membrana de PHB sujeita a 50 kGy presentes no DDA do EMI50 e da membrana de PHB sujeita a 50 kGy antes de ser inserida nos biorreatores da DA, TGA. 93
Figura 4.31- Termograma de DSC do fragmento de membrana de PHB presentes no DDA do EMI_{50} e da membrana de PHB sujeita a 50 kGy antes de ser inserida nos biorreatores da DA, DSC. 94

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 2.1- Quantidade e composição do biogás produzido a partir de glúcidos, proteínas e lípidos 13
Tabela 2.2- Descrição das técnicas de caracterização dos bioplásticos. 23
Tabela 2.3- Propriedades típicas de alguns PHAs. 28

Tabela 3.1- Composição do substrato orgânico preparado em laboratório 37
Tabela 3.2-Condições dos ensaios de DA 45

Tabela 4.1- Concentração de sólidos, CQO_T, CQO_S e valores de pH dos inóculos utilizados nos ensaios de DA ($x \pm \sigma$). 59
Tabela 4.2- Valores padrão para resíduos alimentares europeus (Banks et al., 2018) 60
Tabela 4.3 Concentração de sólidos, CQO_T, CQO_S e valores de pH do substrato utilizado nos ensaios ($x \pm \sigma$). 60
Tabela 4.4- Teor de sólidos e CQO_T da membrana inteira de PHB, não irradiada e sem porosidade induzida, utilizada nos ensaios de DA ($x \pm \sigma$). 60
Tabela 4.5- T_{Deg}, $\Delta_{Deg}H$, T_f, $\Delta_f H$ e X_c das membranas de PHB submetidas a diferentes doses de radiação gama e atmosferas ($x \pm \sigma$) 65
Tabela 4.6- T_{Deg}, $\Delta_{Deg}H$, T_f, $\Delta_f H$ e X_c submetidas a diferentes doses de radiação no AE e numa atmosfera contendo oxigénio ($x \pm \sigma$). 68
Tabela 4.7- Concentração de sólidos, CQO_T, CQO_S, ER de SV e CQO_T e valores de pH do EB, EMI, EMP_{NaCl}, EMP_{H2O}, EMF, EIMF e EMI_{50} ($x \pm \sigma$) 71
Tabela 4.8- Parâmetros cinéticos do modelo modificado de Gompertz e coeficiente de correlação. 89

ACRÓNIMOS

AE	Acelerador de eletrões;
AGV	Ácidos gordos voláteis;
CG	Cromatografia gasosa;
CQO	Carência química de oxigénio;
CQO_S	Carência química de oxigénio solúvel;
CQO_T	Carência química de oxigénio total;
DA	Digestão anaeróbia;
D_{DA}	Digerido obtido no final do ensaio de DA;
DSC	Análise calorimétrica diferencial;
EB	Ensaio constituído por inóculo e substrato (Branco);
EIMF	Ensaio constituído por inóculo e membrana fragmentada;
EMF	Ensaio constituído por inóculo, substrato e membrana fragmentada;
EMI	Ensaio constituído por inóculo, substrato e membrana inteira;
EMI_{50}	Ensaio constituído por inóculo, substrato e membrana irradiada a 50 kGy no AE;
EMP_{H2O}	Ensaio constituído por inóculo, substrato e membrana porosa produzida através da técnica de emulsão;
EMP_{NaCl}	Ensaio constituído pelo inóculo, substrato e membrana porosa produzida através de NaCl;
ER	Eficiência de remoção;
ETVO	Estação de tratamento e valorização orgânica;
GEE	Gases de Efeito de Estufa;
IM (+)	Membrana inteira, aparentemente mais biodegradada;
IM (-)	Membrana inteira, aparentemente menos biodegradada;
Lcl-PHAs	PHAs de cadeia longa;

Mcl-PHAs PHAs de cadeia média;

MF Membrana fragmentada;

MI Membrana inteira;

MI_{DA} Mistura colocada nos biorreatores no início do ensaio da DA;

MI_{50} Membrana irradiada a 50 kGy no AE;

MO Matéria orgânica;

MP_{H2O} Membrana porosa produzida através da técnica de emulsão;

MP_{H2O} Membrana porosa produzida através de sais de NaCl;

ODS Objetivos de Desenvolvimento Sustentável;

PAb Poliamidas de base biológica;

PBAT Polibutileno adipato tereftalato;

PEb Polietileno de base biológica;

PETb Polietileno de base biológica;

pH_0 pH registado no início do ensaio, dia 0;

pH_1 pH registado no primeiro dia de ensaio;

pH_F pH registado no fim do ensaio;

PHAs Polihidroxialcanoatos;

PHB Polihidrobutirato;

PLA Ácido poliláctico;

PPb Polipropileno de base biológica;

RA_B Rendimento acumulado de biogás;

R-IV Radiação infravermelho;

Scl-PHAs PHAs com cadeia curta;

SF Sólidos fixos;

ST Sólidos totais;

SV Sólidos voláteis;

S/I	Razão substrato/inóculo;
T_{Deg}	Temperatura de degradação;
T_f	Temperatura de fusão;
T_g	Temperatura de transição vítrea;
TGA	Análise Termogravimétrica;
TRH	Tempo de retenção hidráulica;
X_C	Grau de cristalinidade;
$\Delta_{Deg}H$	Variação de entalpia de degradação
$\Delta_f H$	Variação de entalpia de fusão
λ	*Lagphase*;

1. INTRODUÇÃO

1.1. Objetivos da dissertação

Esta dissertação teve como objetivo a avaliação do efeito de pré-tratamentos mecânicos, por fragmentação, e físicos, por radiação ionizante (radiação gama e feixe de eletrões) em bioplásticos, nomeadamente em filmes de polihidroxibutirato (PHB), submetidos ao processo da digestão anaeróbia (DA).

Foram realizados sete ensaios, seis dos quais continham membranas de PHB. Utilizou-se dois tipos diferentes de membranas de PHB, nomeadamente, membranas porosas e não porosas, e com dois tipos de pré-tratamentos: mecânico e físico. Foi analisada a biodegradação dos filmes de PHB, submetidos e não submetidos a estes pré-tratamentos, tendo sido avaliada a produção e composição do biogás.

1.2. Carácter inovador da dissertação

Embora existam já alguns estudos realizados sobre a DA de bioplásticos, a aplicação de pré-tratamentos mecânicos (fragmentação) e físicos (radiação ionizante) em bioplásticos ainda é um tópico muito pouco estudado. O mercado dos bioplásticos está em crescimento, contudo representou, em 2021, menos de 1% da produção anual de plásticos de origem fóssil (Grossule et al., 2023). A substituição destes poliésteres de origem fóssil por bioplásticos é considerada uma estratégia valiosa e viável, porém é necessário analisar a biodegradação destes polímeros e quais as condições ótimas para que ocorra a sua decomposição anaeróbia.

1.3. Enquadramento e motivação

O crescimento exponencial da população mundial, durante o último século, tem colocado o planeta sob diferentes tensões, nomeadamente ambientais, alimentares, saúde pública, económicas, políticas, religiosas e militares. As alterações climáticas e, consequentemente, o aquecimento global, a perda de biodiversidade e a sobre-exploração de recursos naturais são alguns dos problemas emergentes dos últimos anos. A humanidade enfrenta o desafio de

minimizar os impactes negativos do crescimento exponencial populacional e, consequentemente, as alterações climáticas.

O Acordo de Paris, em 2015, foi estabelecido com o objetivo de alcançar a descarbonização das economias mundiais e estabelecer um limite do aumento da temperatura média global a níveis abaixo de 2 °C (Silva & Fernandes, 2020). Neste mesmo ano, foi estabelecido, na Agenda para 2030, os dezassete Objetivos de Desenvolvimento Sustentável (ODS), que se estruturaram em torno de cinco princípios: Planeta, Pessoas, Prosperidade, Paz e Parcerias (Oliveira & Navega, 2017). A neutralidade carbónica é uma prioridade nestas propostas e, por conseguinte, o aumento da participação das energias renováveis na matriz energética global.

Em 2019, em Portugal, a percentagem de participação das energias renováveis no consumo final de energia foi apenas de 28,2 %. Em 2021, os municípios portugueses, através da valorização orgânica dos seus resíduos, tiveram uma produção de energia total de 342,0 GWh (IEA-Portugal, 2023), contudo apenas 2 % dos resíduos urbanos seguiram para valorização orgânica (Agência Portuguesa do Ambiente, 2022). Neste mesmo ano, apenas 33 % dos resíduos urbanos seguiram para triagem e reciclagem (Agência Portuguesa do Ambiente, 2022).

A digestão anaeróbia (DA) pode desempenhar um papel fundamental na produção de energia a partir de resíduos orgânicos. Consiste num processo microbiológico complexo que transforma matéria orgânica (MO) em biogás e num digerido anaeróbio, que pode ser utilizado como fertilizante orgânico. O biogás é constituído fundamentalmente por metano (CH_4) e dióxido de carbono (CO_2), mas também por outros gases em menor volume, como o sulfureto de hidrogénio, o monóxido de carbono, entre outros (Adekunle & Okolie, 2015).

Para se realizar este tipo de valorização é necessário proceder-se, previamente, a uma triagem e a um tratamento mecânico para retirar poliésteres de origem fóssil, metais, papéis, vidros, entre outros contaminantes que possam, eventualmente, estar misturados com os resíduos orgânicos. A presença destes materiais durante o processo de DA contamina o digerido anaeróbio produzido.

Em 2015, a produção mundial de poliésteres, à base de petróleo, ultrapassou 300 milhões de toneladas, sendo que 93 % destes resíduos foram descartados em aterros sanitários ou em oceanos (Emadian et al., 2017).

Os bioplásticos surgem no mercado global como uma alternativa mais sustentável e ecológica, comparativamente aos poliésteres convencionais de origem fóssil. Um bioplástico pode ser caracterizado por ser de origem biológica, ou por ser biodegradável, ou por ter ambas as propriedades (Ali et al., 2022; Bioplastics, 2022; Niaounakis, 2016). Segundo Ali et al. (2022), a substituição dos poliésteres convencionais de origem fóssil por bioplásticos pode apresentar inúmeras vantagens, nomeadamente:

- Permitir reduzir a pegada de carbono;
- Economizar recursos fósseis;
- Diminuir as importações de combustíveis fósseis;
- E contribuir para a independência dos países ao nível dos recursos fósseis.

Em 2014, foram produzidos 1,7 milhões de toneladas de bioplásticos em todo o mundo (Emadian et al., 2017) e prevê-se que, em 2026, sejam produzidos cerca de 7,5 milhões de toneladas (Grossule et al., 2023).

A DA pode ser uma opção viável para um fim de vida mais eficiente dos bioplásticos, com produção de biogás e energia, em oposição à sua deposição em aterros.

Contudo, a biodegradação dos bioplásticos, nomeadamente as membranas de PHB, requer condições especificas durante o processo de DA. Submeter estes polímeros a pré-tratamentos, como por exemplo pré-tratamento mecânico, fragmentação da membrana, e/ou um tratamento físico, exposição a radiação ionizante, pode ou não acelerar o processo de biodegradação. Adicionalmente, a presença de porosidade nas membranas pode também contribuir para acelerar o processo de decomposição biológica. Isto resulta do facto destes pré-tratamentos e da estrutura porosa da membrana aumentarem a área de superfície de contacto da membrana com os microrganismos presentes na DA.

A radiação ionizante corresponde a um pré-tratamento com a capacidade de provocar, de forma direta ou indireta, a ionização de átomos e moléculas, alterando propriedades físicas, químicas e biológicas do material irradiado (Drobny, 2013). Este tipo de radiação altera ou destrói ligações químicas, provoca alterações estruturais nas moléculas, interfere em reações químicas e processos metabólicos, entre outros. É caracterizada por possuir energia suficiente para libertar eletrões da nuvem eletrónica de um átomo, dando origem à formação de iões, ou, caso a energia não seja suficiente para ionizar um átomo, ao aparecimento de espécies em estado de excitação elétrica (Bhattacharya, 2000; Chmielewski et al., 2005). Existem cinco tipos de radiação ionizante: Alfa (α), Beta (ß), Raios-X, feixe de eletrões e radiação gama (raios-γ) (Chmielewski et al., 2005; Drobny, 2013).

É necessário compreender o comportamento dos bioplásticos, mais especificamente o PHB, quando expostos a este tipo de radiação. A radiação ionizante pode apresentar vantagens para o processo de biodegradação anaeróbia de filmes de PHB ou, pelo contrário, pode aumentar o tempo de vida destes homopolímeros, modificando as suas propriedades biodegradáveis para dificilmente biodegradáveis ou mesmo não biodegradáveis.

Neste contexto, o presente Plano de Dissertação de Mestrado teve como principal motivação o estudo do comportamento do homopolímero PHB, quando submetido à DA, bem como o efeito da submissão deste bioplástico a pré-tratamentos, mecânico ou físico,

previamente ao processo de DA. Pretende-se saber se este tipo de bioplástico pode seguir diretamente para DA, sem qualquer pré-tratamento e misturado com resíduos orgânicos ou se a sua submissão a pré-tratamentos altera o seu comportamento durante o processo da DA, resultando numa maior eficiência na produção de biogás.

2. ESTADO DA ARTE

2.1. Digestão anaeróbia (DA)

A DA consiste num processo metabólico complexo e, à escala industrial, teve início nos anos 90. Neste processo ocorre a decomposição da matéria orgânica (MO) por uma variedade de microrganismos facultativos e outros estritamente anaeróbios (Akunna, 2019; Jain et al., 2015; Khalid et al., 2011; Lapa et al., 2018).

Por definição, a MO consiste numa substância que contém carbono e hidrogénio na sua constituição e é de origem biológica, podendo ser de origem vegetal ou animal (Huang & Hardie, 2009).

A DA é um processo biológico que ocorre na ausência de oxigénio molecular, no qual resíduos orgânicos complexos são transformados em biogás. O biogás é um gás de origem biológica composto essencialmente por metano (CH_4) (50-75 % $v.v^{-1}$), dióxido de carbono (CO_2) (25-50 % $v.v^{-1}$) e por gases em menor quantidade, também designados por gases contaminantes (sulfureto de hidrogénio, H_2S, <2000 ppmv; monóxido de carbono, CO, <500 ppmv; amónia, NH_3, <1000 ppmv; vapor de água, H_2O, em saturação e hidrogénio molecular, H_2, <1 ppmv) (Adekunle & Okolie, 2015; Akunna, 2019; Jain et al., 2015; Lapa et al., 2018).

A DA divide-se em quatro fases diferentes:

- Hidrólise;
- Acidogénese;
- Acetogénese;
- Metanogénese.

Na Figura 2.1 é possível visualizar-se as diferentes etapas e as respetivas bactérias envolvidas no processo da DA (Rabii et al., 2019).

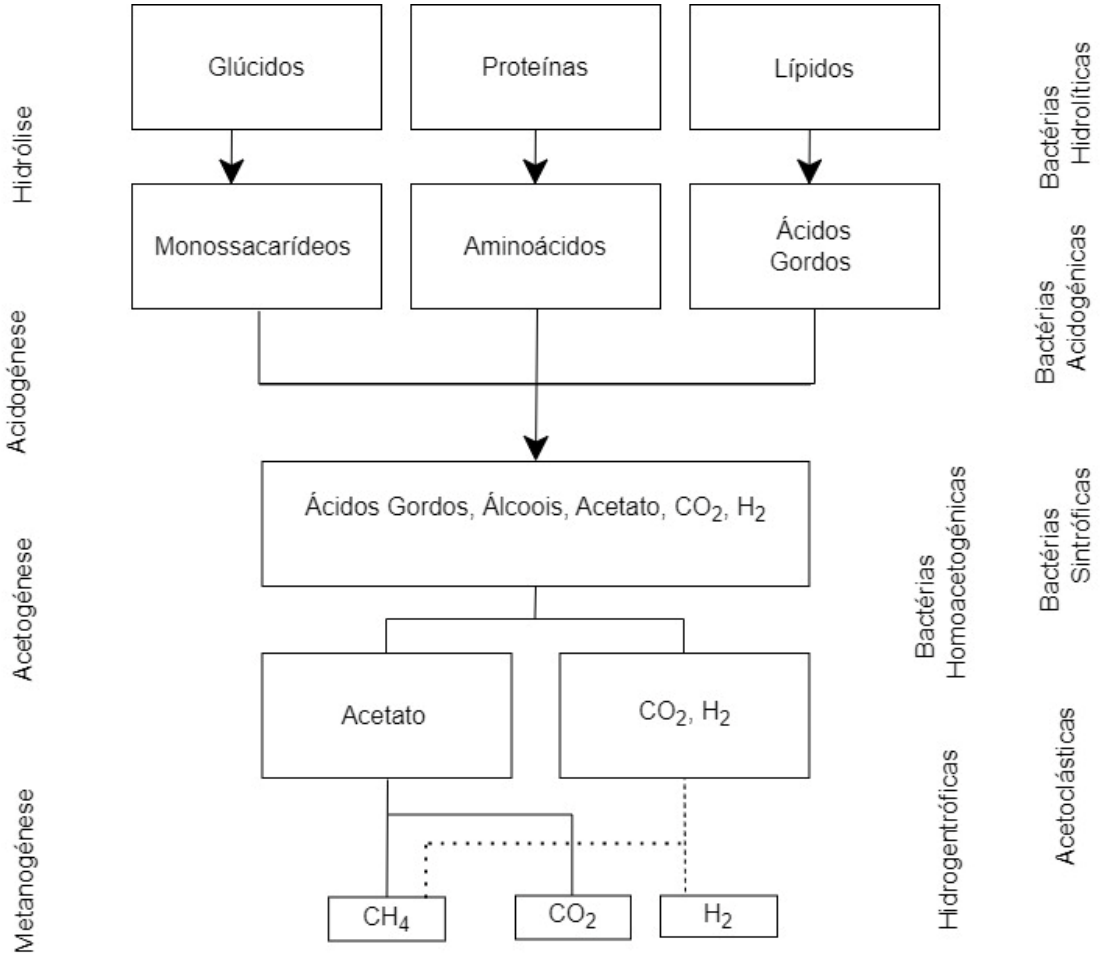


Figura 2.1 - Etapas da DA, bactérias envolvidas e compostos produzidos (Adaptado de Rabii et al. 2019).

Como referido anteriormente, como produtos finais da DA obtém-se biogás e um digerido anaeróbio (Horan & J., 2018; Jain et al., 2015). O biogás pode ser utilizado para produção de eletricidade e calor, ou, após *up-grading,* injetado em redes de gás natural e utilizado como combustível no setor dos transportes (Chandra et al., 2012). Isto deve-se ao facto de o biogás apresentar um poder calorífico elevado devido à elevada concentração de metano, CH_4. Porém, antes da sua utilização, deve ser assegurado que o biogás não contém contaminantes. Caso apresente alguma contaminação é necessário submetê-lo a alguns tratamentos, como a remoção de enxofre, vapor de água e siloxanos.

A fração sólida do digerido anaeróbio, após estabilização, pode ser utilizada como fertilizante orgânico dos solos. Esta operação pode ser realizada através de um processo aeróbio,

como por exemplo a compostagem, caso apresente elevadas concentrações de N e P, bem como de C na forma de ácidos húmicos e fúlvicos.

Segundo Adekunle & Okolie (2015) e Lapa et al. (2018), o processo da DA pode dividir-se em duas fases: a fase ácida, que compreende a hidrólise e a acidogénese, e a fase de produção de biogás, que compreende a acetogénese e a metanogénese. Os microrganismos envolvidos nestas duas fases de degradação da MO diferem amplamente em relação à fisiologia, necessidade de nutrientes, cinética de crescimento e sensibilidade às condições do ambiente no interior do digestor anaeróbio. Verifica-se uma dificuldade em estabelecer um equilíbrio entre estes dois grupos: os microrganismos produtores de ácidos orgânicos e os produtores de metano (Adekunle & Okolie, 2015; Lapa et al., 2018). Na Figura 2.2 é possível visualizar-se as duas fases da DA.

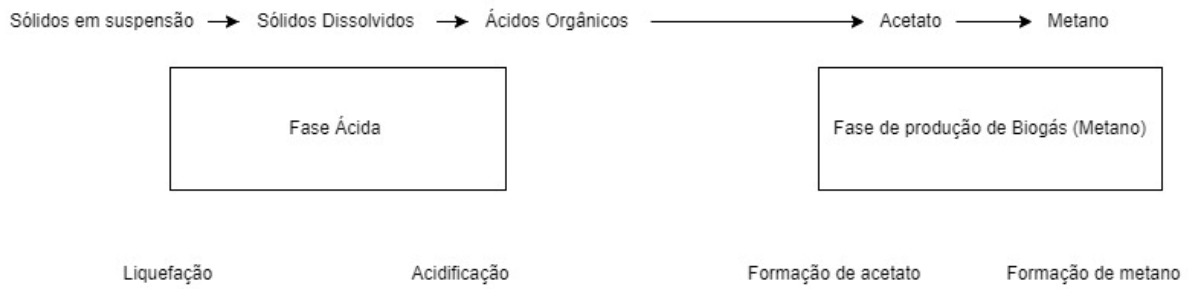


Figura 2.2 - Separação de fases do sistema de DA (Adekunle nad Okolie 2015).

Este processo, DA, apresenta várias vantagens ambientais e sociais, tais como: redução e valorização de resíduos orgânicos, redução das emissões de Gases de Efeito de Estufa (GEE), mitigação do aquecimento global, diminuição da dependência energética dos combustíveis fósseis e contribuição para atingir as metas do Acordo de Paris (Banks et al., 2018; Khalid et al., 2011; Shaah et al., 2017). Pode também ser aplicado no tratamento de resíduos agrícolas, resíduos alimentares e de lamas resultantes do tratamento de águas residuais (Jain et al., 2015; Khalid et al., 2011; Li et al., 2011).

Contudo, para que decorra em condições otimizadas, a DA requer condições específicas, como por exemplo pH, temperatura, nutrientes, agitação.

2.1.1. Etapas da DA

2.1.1.1. Hidrólise

Durante a fase da hidrólise, verifica-se a solubilização de partículas orgânicas insolúveis e a decomposição biológica da MO complexa, nomeadamente proteínas, lípidos e glúcidos, em moléculas simples (monómeros ou dímeros). Estas moléculas, como por exemplo os

aminoácidos, os ácidos orgânicos, os monossacarídeos e outros compostos orgânicos simples, podem ser utilizadas como fontes de energia e carbono celular (Akunna, 2019; Horan & J., 2018; Jain et al., 2015; Li et al., 2011).

As reações hidrolíticas ocorrem em duas fases. Na primeira fase ocorre a colonização bacteriana, onde as bactérias hidrolíticas cobrem as superfícies dos sólidos. Estas bactérias, nas superfícies das partículas, libertam enzimas e produzem monómeros que podem ser utilizados pelas próprias bactérias hidrolíticas. Na segunda fase, as superfícies das partículas são degradadas por bactérias de forma constante (Adekunle & Okolie, 2015; Li et al., 2011; Merlin Christy et al., 2014). Um exemplo de uma reação de hidrólise em que os resíduos orgânicos dão origem a um açúcar simples, a glucose, é apresentada na equação 2.1 (Lapa et al., 2018; Li et al., 2011; Merlin Christy et al., 2014):

$$C_6H_{10}O_4 + 2H_2O \rightarrow C_6H_{12}O_6 + 2H_2 \quad (2.1)$$

A degradação de hemicelulose dá origem a monossacarídeos como, por exemplo, a glucose (Horan & J., 2018). Segundo Adekunle & Okolie (2015), a taxa de utilização de glúcidos, ácidos orgânicos e polissacarídeos, pelos microrganismos, diminui da seguinte forma: glucose > amido solúvel > ácido acético > celulose.

Os microrganismos hidrolíticos envolvidos neste processo, como por exemplo *Clostridium, Micrococci, Bacteroides, Butyrivibrio, Fusobacterium, Selenomonas, Streptococcus,* entre outros, produzem e libertam diferentes enzimas hidrolíticas que são responsáveis por hidrolisar moléculas de maior dimensão, nomeadamente polímeros, em moléculas de menor dimensão (Cirne et al., 2007; Jain et al., 2015; Li et al., 2011).

Estas bactérias hidrolíticas são, geralmente, caracterizadas por apresentarem uma taxa de crescimento reduzida. A velocidade de decomposição do substrato orgânico depende da sua composição e pode limitar a fase da hidrólise da DA (Chandra et al., 2012; Jain et al., 2015). Por exemplo, a hidrólise de glúcidos pode ocorrer em poucas horas, enquanto a hidrólise de proteínas e lípidos pode ser mais demorada e durar alguns dias ou até semanas (Merlin Christy et al., 2014).

Durante esta fase, os microrganismos anaeróbios facultativos utilizam o oxigénio residual dissolvido na mistura colocada nos biorreatores no início da DA (D_{DA}), causando uma diminuição no potencial redox e criando condições redutoras para as bactérias estritamente anaeróbias (Chandra et al., 2012).

Deste modo, de forma que a hidrólise seja um processo mais rápido e eficaz, por vezes é recomendado um pré-tratamento do substrato colocado nos biorreatores no início do ensaio

de DA, como por exemplo, químico, térmico, termoquímico, enzimático, radiação UV, radiação micro-ondas, radiação ionizante, entre outros (Li et al., 2011).

2.1.1.2. Acidogénese

Nesta fase, os produtos resultantes da hidrólise são degradados por bactérias acidogénicas facultativas e estritamente anaeróbias (Adekunle & Okolie, 2015; Merlin Christy et al., 2014). As bactérias mais frequentemente encontradas são bactérias fermentativas, como por exemplo *Streptococcus* sp., *Lactobacillus* sp., *Bacillus* sp., *Escherichia coli* e *Salmonella* sp. (Merlin Christy et al., 2014).

Estas bactérias utilizam os produtos resultantes da fase anterior para o seu próprio crescimento, produzindo ácidos gordos de cadeia longa, ácidos orgânicos de cadeia curta (como por exemplo o ácido butírico, o ácido propanóico e o ácido acético), álcoois, hidrogénio e dióxido de carbono (Lapa et al., 2018). Algumas das reações acidogénicas são apresentadas nas equações 2.2, 2.3 e 2.4 (Adekunle & Okolie, 2015; Jain et al., 2015; Li et al., 2011; Merlin Christy et al., 2014):

$$C_6H_{12}O_6 \rightarrow 2CH_3CH_2OH + 2CO_2 \quad (2.2)$$

$$C_6H_{12}O_6 + 2H_2 \rightarrow 2CH_3CH_2COOH + 2H_2O \quad (2.3)$$

$$C_6H_{12}O_6 \rightarrow 3CH_3COOH \quad (2.4)$$

Na equação (2.2), a glucose é convertida a etanol, na equação (2.3) é convertida a propionato e, na equação (2.4) dá origem a ácido acético (Adekunle & Okolie, 2015; Merlin Christy et al., 2014).

A transformação da MO em ácidos orgânicos provoca a diminuição do pH do meio onde decorre a DA, o que beneficia as bactérias acidogénicas e acetonogénicas que preferem pH compreendidos entre 4,5 e 5,5 (Adekunle & Okolie, 2015; Merlin Christy et al., 2014). Contudo, as *archaea* metanogénicas preferem condições neutras a ligeiramente alcalinas, pelo que este pH ácido prejudica o seu crescimento e, consequentemente, a produção de metano (Lapa et al., 2018).

A maior parte das bactérias acidogénicas são caracterizadas por terem um tempo de multiplicação muito curto (Lapa et al., 2018; Li et al., 2011), pelo que esta fase ocorre de modo muito rápido, não restringindo o processo de DA.

2.1.1.3. Acetogénese

Os principais produtos resultantes da acidogénese não são diretamente fermentáveis por *archaea* metanogénicas e devem ser transformados num substrato metabolizável por estes microrganismos. Na fase da acetogénese é realizada a oxidação anaeróbia do substrato proveniente da acidogénese (Jain et al., 2015; Lapa et al., 2018). O pH ótimo desta fase é de 6 (Adekunle & Okolie, 2015; Merlin Christy et al., 2014).

As bactérias acetonogénicas apresentam um crescimento lento, são sensíveis a flutuações de carga orgânica e a mudanças ambientais no interior do biorreator (Merlin Christy et al., 2014).

Os produtos da fase acidogénica servem de substrato para as bactérias da fase acetogénica, formando-se hidrogénio, ião acetato, dióxido de carbono e metanol (Adekunle & Okolie, 2015; Jain et al., 2015). Os protões H^+ são usados como recetores finais de eletrões, dando origem à formação de H_2. No entanto, estas reações só ocorrem se a pressão parcial de hidrogénio for baixa (Adekunle & Okolie, 2015; Jain et al., 2015).

Algumas das reações envolvidas nesta fase são ilustradas nas equações 2.5, 2.6 e 2.7 (Adekunle & Okolie, 2015):

$$H_3CH_2COO^- + 3H_2O \rightarrow CH_3COO^- + H^+ + HCO_3^- + 3H_2 \quad (2.5)$$

$$C_6H_{12}O_6 + 2H_2O \rightarrow 2CH_3COOH + 2CO_2 + 4H_2 \quad (2.6)$$

$$CH_3CH_2OH + 2H_2O \rightarrow CH_3COO^- + 2H_2 + H^+ \quad (2.7)$$

Na equação (2.5), o ião propionato é convertido a ião acetato, mas apenas se a pressão parcial de hidrogénio for baixa. Na equação (2.6), a glucose é transformada em ácido acético. Na equação (2.7), o etanol é transformado no ião acetato (Adekunle & Okolie, 2015).

Os microrganismos acetonogénicos não conseguem converter diretamente o etanol em metano e dióxido de carbono (Adekunle & Okolie, 2015; Merlin Christy et al., 2014). O etanol deve ser convertido primeiro a ácido acético e, consequentemente, verifica-se a libertação de hidrogénio molecular.

2.1.1.4. Metanogénese

Quando a fase hidrolítica decorre sem limitações degradativas, a fase metanogénica é considerada a etapa restritiva do processo de DA. As reações bioquímicas são muito lentas

porque a taxa de crescimento das *archaea* metanogénicas também é lenta (Adekunle & Okolie, 2015; Akunna, 2019; Horan & J., 2018).

As *archaea* metanogénicas dependem dos microrganismos acetogénicos para produzir ácido acético, hidrogénio e dióxido de carbono, enquanto os acetogénicos dependem dos metanogénicos para remover o hidrogénio do meio onde decorre a DA (Horan & J., 2018; Jain et al., 2015). As *archaea* metanogénicas são agrupados em acetoclásticos e hidrogenotróficos (Horan & J., 2018). Estes têm a capacidade de produzir, respetivamente 70-75 % $v.v^{-1}$ e 25-30 % $v.v^{-1}$ de metano (Horan & J., 2018; Jain et al., 2015). Consoante o substrato utilizado, a capacidade de produzirem metano varia. A equação (2.8) representa a degradação do substrato, caso o substrato seja ácido acético (Horan & J., 2018). Na equação (2.9), o dióxido de carbono e o hidrogénio são convertidos a metano (Adekunle & Okolie, 2015; Jain et al., 2015; Merlin Christy et al., 2014).

$$CH_3COOH \rightarrow CH_4 + CO_2 \quad (2.8)$$

$$CO_2 + 4H_2 \rightarrow CH_4 + 2H_2O \quad (2.9)$$

Na equação (2.8), o ácido acético é diretamente convertido em metano. O grupo carboxilo do acido acético é oxidado em CO_2, enquanto o grupo metilo é reduzido a metano (Adekunle & Okolie, 2015; Merlin Christy et al., 2014).

A metanogénese pode ser restringida devido à concentração e à acumulação de ácidos gordos voláteis (AGV), diminuído o pH e criando um ambiente ácido que não é favorável às *archaea* metanogénicas (Adekunle & Okolie, 2015; Jain et al., 2015). O pH, nesta fase, deve estar compreendido entre 6,5 e 8 (Jain et al., 2015). Para além do pH, as *archaea* metanogénicas são também extremamente sensíveis a flutuações de carga orgânica, temperatura, entre outros fatores de operação dos biorreatores (Horan & J., 2018).

2.1.2. Parâmetros e fatores que influenciam o processo da DA

2.1.2.1. Composição do substrato

O processo da DA é condicionado pelo tipo, disponibilidade e complexidade do substrato (Ghaniyari-Benis et al., 2009). Este constitui uma fonte de carbono e energia, contudo diferentes estruturas químicas de carbono necessitam de diferentes grupos de bactérias e microrganismos para que ocorra a sua biodegradação (Khalid et al., 2011).

Antes de se usar um substrato num processo de DA, este deve ser caracterizado relativamente ao seu teor em lípidos, proteínas, glúcidos e fibras (Lesteur et al., 2010). Os glúcidos

são considerados os compostos orgânicos mais importantes para a produção de biogás (Dong et al., 2009). Contudo a sua rápida degradação pode provocar uma produção excessiva de ácidos orgânicos, CO_2 e H_2 e, consequentemente, diminuir a qualidade do biogás produzido, devido ao excesso de CO_2 e à reduzida concentração de CH_4.

De acordo com Fernández et al. (2008), o desempenho da DA e a respetiva produção de biogás é condicionada pelo teor total de sólidos do substrato, nomeadamente os sólidos voláteis (SV), pelo que este parâmetro também deve ser analisado.

A biodegradação pode ser limitada pela estrutura química de compostos como a lenhina, celulose e hemiceluloses (Akunna, 2019). Estes compostos podem exigir um pré-tratamento para promover a sua remoção, no caso da lenhina, ou para facilitar a sua biodegradação, no caso da celulose e hemiceluloses. Na Figura 2.3 é possível visualizar-se que compostos como glúcidos e proteínas apresentam maior biodegradabilidade do que compostos como as hemiceluloses e lenhina.

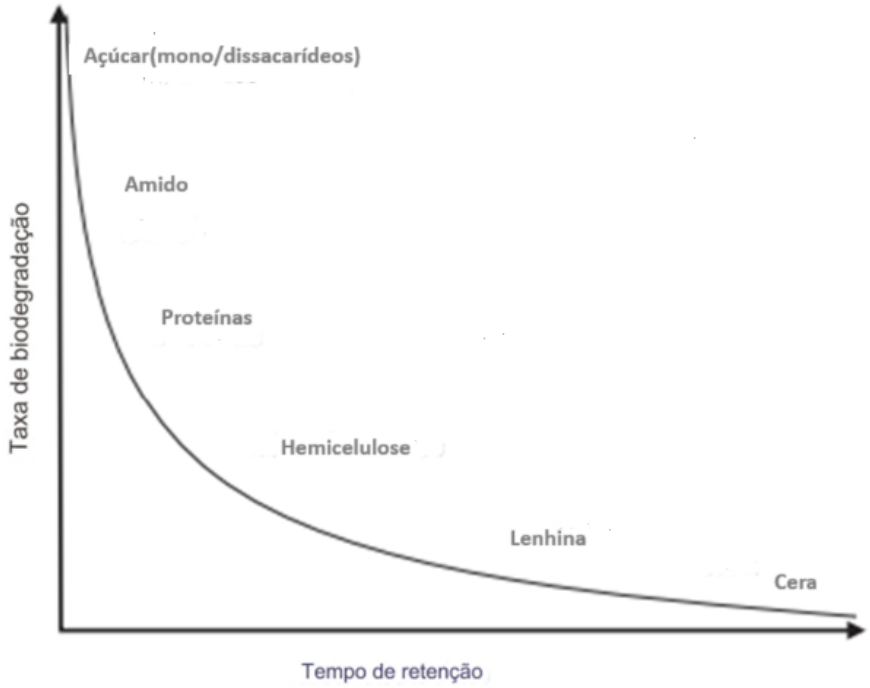


Figura 2.3 - Relação entre a taxa de degradação e o tempo de retenção, consoante os vários tipos de compostos orgânicos (Adaptado de Akunna, 2019).

A composição do substrato está relacionada com o rendimento e composição do biogás (Akunna, 2019). Na Tabela 2.1 estão apresentados os valores do rendimento de metano e da composição aproximada do biogás para glúcidos, lípidos e proteínas (Schnürer & Jarvis, 2010). É possível observar que, para um substrato com um elevado teor de lípidos, obtêm-se um

rendimento de metano mais elevado, contudo também requer um tempo de retenção hidráulico (TRH) mais elevado (>30 dias). A biodegradação de lípidos é inferior à das proteínas (TRH de cerca de 1 a 2 semanas) e à dos glúcidos (TRH de poucas horas).

Tabela 2.1- Quantidade e composição do biogás produzido a partir de glúcidos, proteínas e lípidos (adaptado Schnürer & Jarvis, 2010).

Substrato	Biogás $m^3.kg_{SV}^{-1}$	Composição de Biogás (CH_4:CO_2 em % $v.v^{-1}$)
Glúcidos	0,38	50:50
Proteínas	0,53	60:40
Lípidos	1	70:30

2.1.2.2. Alimentação do biorreator

Os biorreatores utilizados na DA devem ter a capacidade de suportar uma elevada taxa de carga orgânica, apresentar um curto tempo de retenção hidráulica (TRH) e possibilitar a otimização da produção de biogás (Náthia-Neves et al., 2018).

Os biorreatores podem ser classificados como monofásicos ou multifásicos, em função do número de biorreatores onde ocorrem as distintas fases da DA. Estes podem operar em processo contínuo, semi-contínuo ou descontínuo, em função da frequência com que é inserida nova MO no biorreator (Jain et al., 2015).

No processo monofásico, a acidogénese e a metanogénese ocorrem no mesmo biorreator, enquanto que nos biorreatores multifásicos são necessários, pelo menos, dois biorreatores, para que a acidogénese e a metanogénese ocorram em biorreatores separados, sob condições diferentes de pH (condições ácidas no biorreator acidogénico e condições neutras a ligeiramente alcalinas no biorreator metanogénico) (Fezzani & Cheikh, 2010; Náthia-Neves et al., 2018).

Nos biorreatores em fluxo descontínuo, a alimentação é feita apenas no início do processo da DA (Náthia-Neves et al., 2018). Estes biorreatores apresentam algumas vantagens, nomeadamente o baixo custo de investimento e maior eficiência no processo de DA. Contudo, também apresentam algumas limitações relativamente à qualidade do biogás, às flutuações na produção de biogás e às perdas de biogás que ocorrem quando se esvazia os biorreatores (Náthia-Neves et al., 2018).

Os biorreatores de fluxo contínuo são alimentados de forma constante com MO ao longo do tempo, e, na mesma proporção, é retirado o digerido do biorreator. Nestes biorreatores, as reações bioquímicas acontecem de uma forma constante e, consequentemente, a produção de biogás é contínua (Akunna, 2019).

Nos biorreatores semi-contínuos a alimentação é fornecida de modo intermitente ao longo do tempo, sendo esta designada por alimentação por impulsos.

Existem vários tipos de biorreatores de leitos internos que podem ser utilizados no processo de DA, tais como, o biorreator de leito fixo, o biorreator de leito de lamas de fluxo ascendente, o biorreator de leito fluidizado, entre outros (Náthia-Neves et al., 2018).

Os biorreatores de leito fixo contêm um material de suporte microbiano que pode ser inerte ou biodegradável, constituído por diferentes materiais, nomeadamente carvão ativado, cerâmica, entre outros (Show et al., 2011). A porosidade deste material determina a dinâmica do fluido do reator. Estes reatores são caracterizados por apresentarem baixa turbulência hidráulica, causando uma baixa interação entre a MO e os microrganismos e, consequentemente, baixa produção de hidrogénio (Náthia-Neves et al., 2018; Show et al., 2011).

Os biorreatores de leito de lamas de fluxo ascendente possuem no fundo uma camada densa de lodo que favorece o contacto da água residual com a biomassa, mantendo constantes as reações da biomassa com os microrganismos (Show et al., 2011). É caracterizado por ser uma tecnologia simples, de baixo custo e amplamente utilizada no tratamento de águas residuais.

Nos biorreatores de leito fluidizado são utilizadas pequenas partículas, como por exemplo areia ou alumina, para manter os microrganismos em suspensão, permitindo o crescimento dos mesmos e um rápido fluxo ascendente da água residual (Mao et al., 2015; Show et al., 2011). Esta configuração permite um alto tempo de retenção de sólidos, uma boa mistura dentro do reator e uma boa agitação, aumentando o contacto entre os microrganismos e a biomassa (Náthia-Neves et al., 2018).

2.1.2.3. Temperatura

A variação da temperatura do digestor anaeróbio pode influenciar a atividade biológica, nomeadamente algumas bactérias anaeróbias. Segundo Bouallagui et al. (2009), De La Rubia et al. (2002), Jain et al. (2015) e Riau et al., (2010), a temperatura pode influenciar a comunidade microbiana, a cinética de degradação dos substratos orgânicos, a estabilidade do processo e a produção de biogás.

Temperaturas baixas (<20 ^{o}C) têm tendência para causar a diminuição do crescimento microbiano e, consequentemente, diminuir a produção de biogás (Khalid et al., 2011). Em contrapartida, temperaturas elevadas (>45 ^{o}C) podem reduzir a produção de biogás, devido à produção excessiva de gases voláteis, como por exemplo, o amoníaco, que pode inibir a fase

metanogénica (Fezzani & Cheikh, 2010). A produção excessiva de gases voláteis pode ocorrer quando se verifica temperaturas e cargas orgânicas elevadas.

Temperaturas compreendidas entre 35-37 ºC são consideradas as mais adequadas para a produção de metano. Os microrganismos que se desenvolvem neste intervalo de temperatura são mais tolerantes às alterações de carga, pH e temperatura (Khalid et al., 2011). Segundo Briški et al. (2007), para que ocorra a biodegradação da MO é necessário que a temperatura se encontre abaixo dos 65ºC, dado que para temperaturas acima dos 65ºC ocorre a desnaturação das enzimas.

Porém, temperaturas termófilas (45-55 ºC) podem apresentar algumas vantagens, nomeadamente um tempo de degradação da MO menor, maior produção de biogás, maior destruição de patogénicos e redução da viscosidade do digerido obtido no final do ensaio de DA (D_{DA}) (Jain et al., 2015; Zhu et al., 2009). Contudo, a taxa de carga orgânica aplicada deve ser rigorosamente controlada, uma vez que as *archaea* metanogénicas termófilas são mais sensíveis a variações de carga orgânica do que as *archaea* metanogénicas mesófilas.

Na Figura 2.4 é possível visualizar-se a relação entre a temperatura e a taxa de biodegradação anaeróbia, segundo Akunna (2019). Apesar da digestão poder ocorrer em temperaturas psicrófilas (<20º), mesófilas (25ºC-40ºC) ou termófilas (45ºC-60ºC), como referido anteriormente, o intervalo de temperatura ótimo para o processo de DA são as temperaturas mesófilas e termófilas. Em condições psicrófilas, a taxa de biodegradação da MO é muito reduzida (Akunna, 2019; Jain et al., 2015).

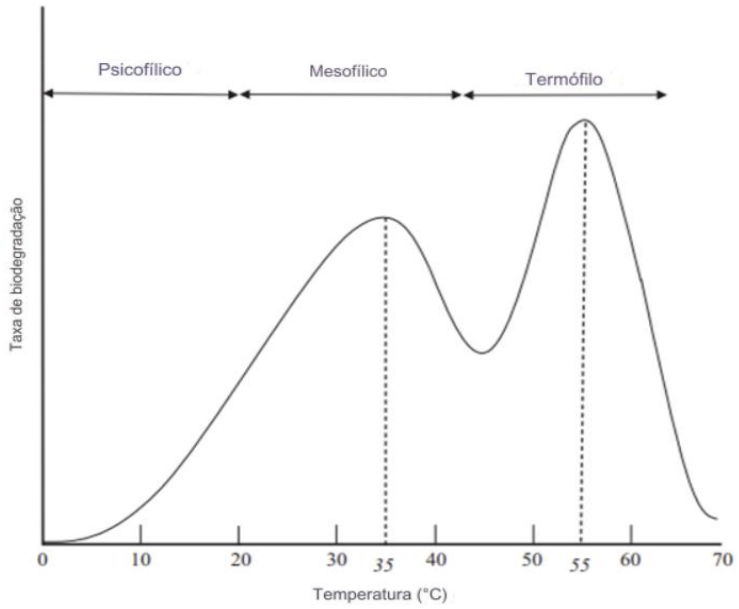


Figura 2.4- Variação da taxa de biodegradação em função da temperatura, durante a DA (Akunna, 2019).

2.1.2.4. pH

O pH, também designado por valor de Potencial de Hidrogénio, é um parâmetro crucial no processo da DA. Tem a capacidade de influenciar o crescimento de microrganismos e, consequentemente, a produção de biogás (Hussain, 2022). A gama de valores ótimos do pH varia entre 6,5 e 8,5 (Hussain, 2022), contudo cada fase da DA requer uma gama de valores específicos (Horan & J., 2018).

Jain et al. (2015) e Khalid et al. (2011) defendem que o pH adequado para a metanogénese deve estar compreendido entre 6,5 e 8,2, enquanto que para a hidrólise e para a acidogénese, o pH deve ser, respetivamente, 5,5 e 6,5. Segundo Conant et al. (2008), a gama de valores ótimos de pH para a produção de biogás está compreendida entre 6,5 e 7,5.

Caso a acidez do biorreator ocorra devido à acumulação de AGV, a fase metanogénica tornar-se muito lenta e a produção de biogás diminui. Esta situação pode ocorrer quando se adiciona MO em excesso no biorreator (Akunna, 2019; Jain et al., 2015). Por outro lado, o aumento do pH, tornando o meio alcalino, pode ocorrer quando se adiciona MO em excesso, rica em compostos azotados, como por exemplo proteínas. Os compostos azotados hidrolisam-se e produzem amoníaco, provocando o aumento do pH (Akunna, 2019).

2.1.2.5. Agitação

O controlo da agitação do conteúdo do biorreator é um dos parâmetros que permite aumentar a eficiência da DA. Este facilita e favorece o contacto dos microrganismos com o substrato e proporciona uma temperatura homogénea em todo o biorreator (Baredar et al., 2020; Schnürer & Jarvis, 2010).

Segundo Schnürer & Jarvis (2010), a agitação é essencial e fundamental durante a fase da hidrólise, pois é crucial que durante esta fase os microrganismos hidrolíticos estabeleçam contacto com uma maior área de superfície do substrato.

A agitação regular ajuda a reduzir a sedimentação e melhora a homogeneidade dentro do biorreator, permitindo aumentar a estabilidade do processo (Baredar et al., 2020). Segundo Schnürer & Jarvis (2010), a agitação também permite a transferência entre os produtores e os consumidores de H_2.

Contudo, os microrganismos são extremamente sensíveis ao *stress* causado por uma forte agitação e podem ser destruídos caso a agitação seja excessiva (Deublein & Steinhauser, 2011). Uma agitação muito forte pode provocar o aumento das forças de cisalhamento, diminuindo o contacto entre as bactérias e o substrato (Baredar et al., 2020).

2.1.2.6. Disponibilidade de nutrientes

O fornecimento de macro e micronutrientes é essencial para que ocorra a formação de metano. Os principais macronutrientes envolvidos na DA são C, N, P, K, S e Mg (Akunna, 2019; Jain et al., 2015; Lapa et al., 2018). Estes elementos são essenciais para muitos processos biológicos e têm a capacidade de funcionar como agentes-tampão (Lapa et al., 2018). Durante o processo da DA, o C tem como função principal permitir e manter a construção das estruturas celulares, enquanto o N é essencial para a biossíntese de proteínas. O S é necessário para a síntese dos aminoácidos e o P é crucial no metabolismo energético das células, pois é usado nas moléculas e no ATP (Jain et al., 2015; Lapa et al., 2018).

Micronutrientes, como Fe, Ni, Mo, Co, W e Se são essenciais em muitas reações enzimáticas da DA (Jain et al., 2015; Lapa et al., 2018).

A proporção ideal na DA de C:N:P:S é de 600:15:5:1, contudo a proporção de C:N:P, para maximizar a produção de metano, é de 200:5:1 (Lapa et al., 2018). Akunna (2019) considera que a proporção ideal de C:N:P:S para a hidrólise e acidogénese é de 500:15:5:3 e para a metanogénese de 600:15:5:3.

Razões elevadas de C/N (>30) podem levar à diminuição do crescimento bacteriano devido ao défice de azoto, enquanto razões baixas de C/N (<20) podem provocar excesso de amoníaco, e, consequentemente, aumentar o pH e toxicidade causada pelo amoníaco (Akunna, 2019).

A faixa de temperaturas em que a DA decorre condiciona os requisitos mínimos de micronutrientes. Segundo Uemura (2010) verifica-se uma maior exigência de nutrientes em condições termófilas do que em condições mesófilas.

É também importante referir que a concentração excessiva de alguns macro e micronutrientes podem inibir a DA, devido ao seu efeito inibidor ou tóxico (Akunna, 2019; Lapa et al., 2018).

2.1.2.7. Inibidores

O processo da DA pode ser inibido por substâncias que estão presentes nos resíduos orgânicos, sendo tóxicas para os microrganismos, como, por exemplo, o amoníaco, os sulfuretos, os ácidos gordos de cadeia longa, sais, metais pesados, entre outros (Akunna, 2019; Carlsson et al., 2012; Chen et al., 2008). Os dois inibidores microbianos mais comuns na DA são o amoníaco e o sulfureto de hidrogénio (Akunna, 2019).

O amoníaco é produzido através da biodegradação de proteínas e ureia em condições anaeróbias (Chen et al., 2008; Hartmann & Ahring, 2005). Segundo Akunna (2019) a proporção de amoníaco aumenta diretamente com o aumento do pH e temperatura, e,

consequentemente, a sua toxicidade. O limite de toxicidade para o amoníaco está compreendido entre 1500-3000 mg NH_4-N.L^{-1}, embora também tenha sido observada uma tolerância a valores superiores devido à aclimatização microbiana (Akunna, 2019).

Os sulfuretos de hidrogénio são produzidos durante a fase da hidrólise de compostos que contenham enxofre, sulfatos, sulfitos, entre outros compostos de enxofre (Akunna, 2019; Chen et al., 2008). Em concentrações de sulfureto de 200 mg S.L^{-1}, verifica-se a inibição do processo de DA (Akunna, 2019).

Em geral, o nível de toxicidade de uma substância ou elemento depende da sua natureza, concentração e do grau de aclimatização dos microrganismos à substância (Chen et al., 2008).

2.1.2.8. Razão Substrato/inóculo

A razão substrato/inóculo (S/I) desempenha um papel crucial no processo de DA (Ali Shah et al., 2014; Ma et al., 2019). Segundo Shaah et al. (2017), a S/I pode afetar a cinética da DA, o rendimento de produção de biogás e a respetiva taxa de produção de metano.

A proporção ótima de S/I depende da fonte do inóculo, uma vez que cada inóculo apresenta diferentes atividades metabólicas (Shaah et al., 2017). A proporção ideal de S/I deve garantir a presença de um grupo de microrganismos variados e necessários a todas as fases da DA.

No estudo realizado por Ma et al. (2019) verificou-se uma maior produção de biogás numa proporção S/I de 2:3 (m.m^{-1}). Contudo, em proporções como 1:2, 1:1, 2:1 verificou-se uma produção de biogás mais constante ao longo do tempo. Em proporções mais elevadas, como 3:1 e 4:1, observou-se uma diminuição da produção de biogás devido à produção e acumulação excessiva de AGV. Uma proporção menor de inóculo pode induzir a produção e acumulação excessiva de AGV, provocando a diminuição do pH e diminuindo a atividade das *archaea* metanogénicas (Ma et al., 2019; Shaah et al., 2017). Para Ali Shah et al. (2014) a proporção ideal na qual se verificou maior produção de biogás foi 1:3.

A razão S/I é considerada um fator importante da DA pois tem a capacidade influenciar a produção de metano, a *lag-phase* e a estabilidade do biodigestor (Ali Shah et al., 2014; Ma et al., 2019).

2.2. Bioplásticos

Os poliésteres convencionais de origem fóssil estão difundidos em inúmeros produtos do dia-a-dia. Apresentam propriedades e características únicas, tais como resistência mecânica, flexibilidade, durabilidade, estabilidade química, estabilidade biológica, entre outras. Estão presentes em diversos setores e aplicações, nomeadamente embalagens de alimentos, tecidos e produtos têxteis, aparelhos, utensílios e componentes elétricos (suporte de circuitos, isoladores, etc), equipamento biomédico (luvas, tubos, máscaras, curativos, seringas, etc), produtos automóveis, entre outros (Barzic, 2023).

Em 2019, a produção mundial de poliésteres de origem fóssil foi aproximadamente 370 milhões de toneladas (Singh et al., 2023) e prevê-se que a produção global continue em crescimento nas próximas décadas (Grossule et al., 2023). Contudo, a utilização excessiva destes poliésteres ao longo de várias décadas provocou a acumulação destes resíduos, frequentemente descartados em conjunto com os resíduos sólidos domésticos (Barzic, 2023).

A maioria destes poliésteres derivam de matérias-primas com origem no petróleo, um recurso não renovável, finito e não biodegradável (Cucina et al., 2022; Singh et al., 2023). A crescente preocupação pela proteção dos organismos aquáticos, pela sustentabilidade e pelas alterações climáticas tem impulsionado a comunidade científica e industrial para procurar e desenvolver alternativas mais sustentáveis e ecológicas.

Os bioplásticos surgem no mercado mundial como um substituto viável aos poliésteres convencionais. São, na generalidade, polímeros com propriedades semelhantes aos poliésteres convencionais, contudo de origem biológica, total ou parcialmente, e/ou biodegradáveis (Barzic, 2023; Bioplastics, 2022; Cucina et al., 2022; Emadian et al., 2017). A realização desta substituição apresenta inúmeras vantagens, nomeadamente (Bugnicourt et al., 2014; Francis & Parayil, 2023; Singh et al., 2023):

- A biodegradação é considerada um processo neutro em carbono. O CO_2 libertado durante a biodegradação dos bioplásticos tem origem no C que constituía a biomassa utilizada para a produção do mesmo. Durante o processo de fotossíntese há fixação do C atmosférico pela biomassa. Deste modo, não há um aumento líquido do C emitido para a atmosfera;
- Permite economizar recursos fósseis devido à substituição dos poliésteres convencionais de origem fóssil. Os recursos fósseis são limitados e finitos;
- Diminui a dependência de cada país relativamente a combustíveis fósseis;
- Permite reduzir a pegada de carbono e as emissões de GEE. O processo de produção de poliésteres convencionais de origem fóssil emite quantidades significativas de GEE;

- O processo de produção de bioplásticos através da fermentação é energeticamente mais viável e pode decorrer a temperaturas baixas.

Contudo, os bioplásticos apresentam algumas desvantagens devido ao custo elevado de produção, às fontes de carbono usadas, às propriedades que os bioplásticos apresentam, entre outros fatores.

Estima-se que até 2025, a produção anual de bioplásticos cresça 30 % (Francis & Parayil, 2023). Atualmente, o bioplástico mais produzido e comercializado é o PHB, que pertence à grande família dos PHAs (Bugnicourt et al., 2014; Francis & Parayil, 2023).

2.2.1. Classificação dos bioplásticos

Segundo a Bioplastics (2022) e Grossule et al. (2023), um material plástico é considerado como bioplástico quando a sua origem é de base biológica e/ou biodegradável.

- **De base biológica**: O termo de base biológica significa que o produto é, total ou parcialmente, derivado de biomassa (Barzic, 2023; Bioplastics, 2022). Alguns exemplos destas matérias-primas são o milho, a cana-de-açúcar, madeira, entre outras. Contudo, o facto de ser de base biológica não implica que este seja biodegradável (Bioplastics, 2022).
- **Biodegradável:** A biodegradação é um processo bioquímico no qual os microrganismos, como fungos, bactérias ou até mesmo enzimas, têm capacidade de converter o material em dióxido de carbono e vapor de água, no caso dos processos aeróbios, e em metano e dióxido de carbono, no caso dos processos anaeróbios (Barzic, 2023; Bioplastics, 2022; Singh et al., 2023). A biodegradação de um polímero envolve as seguintes etapas:
    - Biodeterioração: em determinadas condições ambientais, como temperatura, humidade, luz, oxigénio, nutrientes orgânicos e minerais, certos microrganismos têm a capacidade de proliferar. Alguns destes microrganismos utilizam pequenos fragmentos superficiais oxidados das moléculas para se alimentarem, acabando por acelerar o processo de deterioração do polímero devido à exposição ao *stress* oxidativo;
    - Biofragmentação: corresponde à conversão de polímeros em oligómeros e monómeros pela ação dos microrganismos;
    - Assimilação: na qual os microrganismos se alimentam de carbono e nutrientes resultantes da fragmentação dos bioplásticos e convertem o

carbono do bioplástico em dióxido de carbono e vapor de água (Emadian et al., 2017).

A biodegradação depende de vários fatores, nomeadamente condições ambientais, como por exemplo temperatura, pH, humidade, inóculo, teor de oxigénio, entre outros (Bioplastics, 2022; Emadian et al., 2017).

2.2.2. Tipos de bioplásticos

Os bioplásticos podem dividir-se em três grupos principais (Singh et al., 2023):

1. **Plásticos não biodegradáveis de base biológica**, total ou parcial, como, por exemplo, o polietileno de base biológica (PEb), o polipropileno de base biológica (PPb) ou o tereftalato de polietileno de base biológica (PETb), poliamidas de base biológica (PAb), entre outros (Bioplastics, 2022). São utilizados em algumas aplicações técnicas, como fibras têxteis, aplicações em automóveis, entre outras. Apresentam uma vida útil longa e têm um desempenho superior comparativamente aos poliésteres convencionais de origem fóssil.
2. **Plásticos biodegradáveis de base biológica**, como o ácido poliláctico (PLA) e polihidroxialcanoatos (PHAs), entre outros. Alguns destes bioplásticos já são comercializados em embalagens de alimentos (fruta ou vegetais), itens técnicos, fibras têxteis, entre outros. São utilizados em produtos de vida curta.
3. **Plásticos biodegradáveis baseados em recursos fósseis**, como por exemplo o polibutileno adipato tereftalato (PBAT), entre outros.

Na Figura 2.5 é possível visualizar-se os bioplásticos mais comuns, bem como a sua classificação, de acordo com a sua biodegradabilidade e origem biológica.

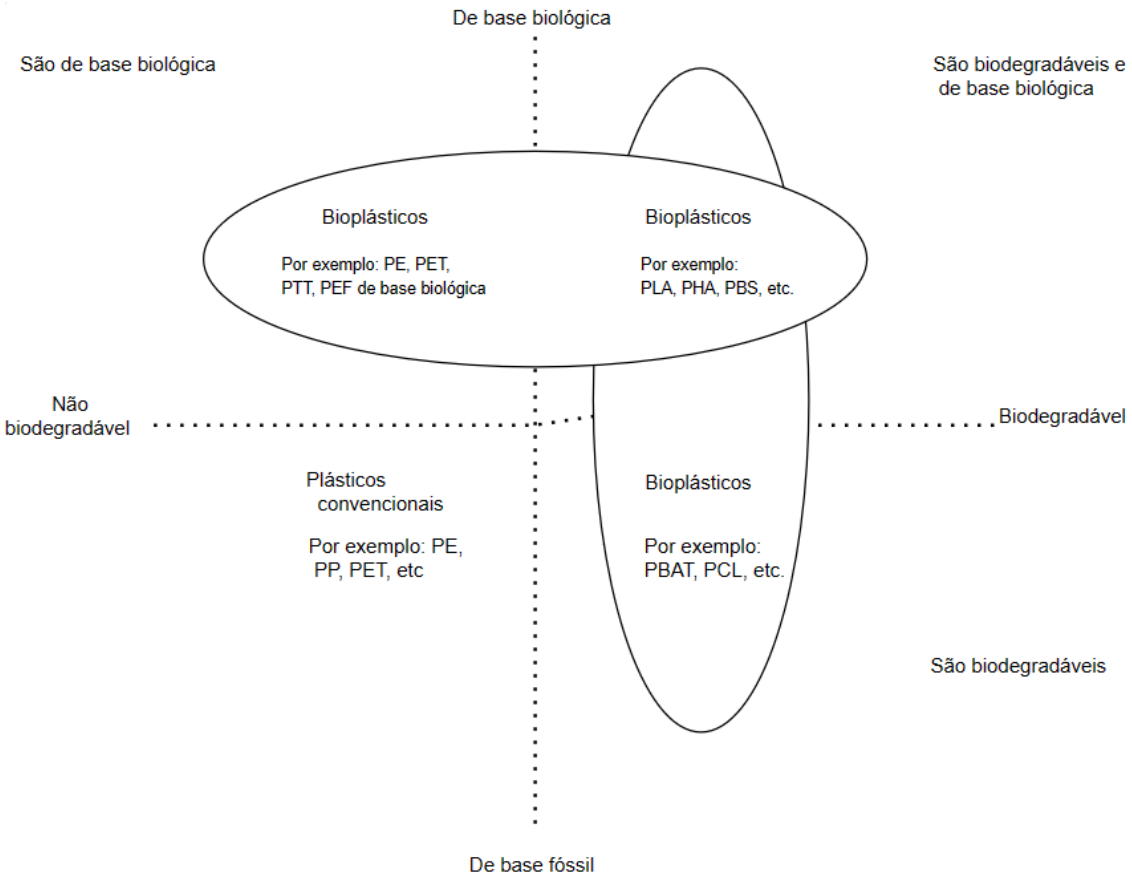


Figura 2.5- Sistema de coordenadas para classificação de bioplásticos (Adaptado Singh et al., 2023).

Cada categoria de bioplástico possui diferentes combinações de propriedades térmicas, mecânicas, óticas e morfológicas em função da matéria-prima e tecnologia utilizada na produção (Singh et al., 2023).

Contudo, atualmente, a comunidade científica tem enfrentado alguns problemas relacionados com as características mecânicas destes polímeros, nomeadamente, devido à sua baixa resistência mecânica. Para que seja possível substituir os poliésteres convencionais de origem fóssil pelos bioplásticos é necessário que estes apresentem características mais semelhantes aos mesmos. Como tal, tem sido adicionado à matriz destes biopolímeros celulose microcristalina, glicerol, palha de cevada, resíduos de uva, biocarvão, entre outros, com o objetivo de aumentar a resistência mecânica dos mesmos (Barzic, 2023).

É, portanto, necessário estudar e conhecer as propriedades de cada bioplástico, através de técnicas de caracterização, para que a sua aplicação seja o mais eficiente possível.

2.2.3. Caracterização de bioplásticos

A caracterização dos bioplásticos é realizada através da avaliação da estrutura química, funcionalidade, morfologia e estabilidade térmica e mecânica (Singh et al., 2023). Existem diversas técnicas para realizar esta caracterização, nomeadamente: espectroscopia infravermelha, microscopia, técnicas analíticas térmicas e instrumentos para avaliação das propriedades mecânicas (Singh et al., 2023). Na Tabela 2.2. é possível visualizar-se uma breve descrição sobre as técnicas utilizadas para caracterizar polímeros, nomeadamente os bioplásticos.

Tabela 2.2- Descrição das técnicas de caracterização dos bioplásticos.

Técnicas	**Descrição**
Análise térmica	Estabilidade térmica, transição térmica e cinética de degradação térmica
Espectroscopia infravermelha	Funcionalidade química, ligação, estrutura molecular e insaturação
Microscopia	Tamanho, morfologia e homogeneidade
Técnicas de raio-x	Cristalinidade, tamanho, composição e estrutura reticular
Técnicas eletroanalíticas	Estados de oxidação
Máquina universal de ensaios	Resistência mecânica, plasticidade, capacidade de suporte de carga e estabilidade dimensional

Os bioplásticos também podem ser caracterizados por serem biocompatíveis e compostáveis. A biocompatibilidade permite que os mesmos sejam utilizados em dispositivos biomédicos específicos, com propriedades funcionais adequadas, sem que haja qualquer efeito prejudicial para o órgão recetor/paciente. Por sua vez, quando um bioplástico se caracteriza por ser compostável, significa que o processo de degradação do mesmo é completamente biológico, sendo realizado por microrganismos. Obtém-se deste processo um composto com propriedades idênticas ao solo, rico em nutrientes (Singh et al., 2023).

Como mencionado anteriormente, entre a vasta gama de bioplásticos, o poli(3-hidroxibutirato), que pertence à família dos polihidroxialcanoatos, foi o bioplástico selecionado para a realização desta dissertação.

2.2.4. Polihidroxialcanoatos (PHAs)

Os PHAs são macromoléculas, renováveis, biodegradáveis e biocompatíveis (Raza et al., 2018; Singh et al., 2023). Foi em 1923, que o cientista Lemoigne descobriu pela primeira vez um PHA em bactérias *Bacillus megaterium*, na forma de poli(3-hidroxibutirato) (PHB) (Francis & Parayil, 2023; Raza et al., 2018). Contudo, foi apenas na década de 1970, após a crise de petróleo, que os PHAs começaram a ser considerados como uma alternativa viável aos poliésteres convencionais de origem fóssil (Francis & Parayil, 2023).

Caracterizam-se por serem poliésteres naturais de ácidos 3-, 4-, 5- e 6-hidroxialcanóicos, saturados e insaturados, designados por termoplásticos (Bugnicourt et al., 2014; Niaounakis, 2016; Raza et al., 2018). São metabolitos secundários produzidos por microrganismos num meio com excesso de carbono, mas com carência de determinados nutrientes, como N, P e o S (Singh et al., 2023). A taxa de formação de PHAs depende da fonte de carbono, da concentração de nutrientes e das respetivas vias de fermentação, sendo que a sua produção é potenciada pelo excesso de carbono presente no meio (Singh et al., 2023).

Podem ser classificados como homo-, co- e terpolímeros, dependendo do tipo e número de monómeros que têm na sua constituição (Niaounakis, 2016). Os homopolímeros resultam da polimerização de um único tipo de monómero enquanto os copolímeros resultam da polimerização de dois monómeros diferentes. Os terpolímeros caracterizam-se por possuírem especificamente apenas três ou mais monómeros diferentes na sua cadeia (Báez, 2016).

Os polihidroxialcanoatos podem são produzidos por cultivo microbiano (Brodin et al., 2017; Niaounakis, 2016; Singh et al., 2023). Os microrganismos acumulam os PHAs como polímeros amorfos em grânulos intracelulares envolvidos por uma monocamada lipídica (Francis & Parayil, 2023). Estes poliésteres funcionam como uma reserva de energia e carbono para os microrganismos durante períodos de maior carência de nutrientes, nomeadamente de fonte de carbono externa (Salleh et al., 2023; Singh et al., 2023).

De acordo com Francis & Parayil (2023), a biossíntese de PHAs envolve a produção de intermediários monoméricos, como os R-enantiómeros de 3-hidroxibutiril coenzima A (R-enantiómeros de 3-hidroxibutiril-CoA) e 3-hidroxiacil coenzima A (3-hidroxiacil-CoA), por meio de diversas vias metabólicas que utilizam diferentes fontes de carbono e enzimas específicas. As enzimas são codificadas por genes presentes no processo de biossíntese. Os monómeros ligam-se para formar polímeros de PHAs com a ajuda das PHA polimerases. O tipo de PHA produzido por um microrganismo depende da PHA polimerase presente no meio.

Os PHAs acumulados no interior das células podem ser extraídos com recurso a solventes orgânicos, como por exemplo o clorofórmio (Francis & Parayil, 2023; Sangwan et al., 2023).

Na biossíntese de alguns PHAs, como por exemplo o poli(3-hidroxibutirato) (PHB), são utilizados intermediários derivados em processos metabólicos, nomeadamente a oxidação de alcanos, quebra da glicose, biossíntese de ácidos gordos, degradação de ácidos gordos (ß-oxidação), em conjunto com outras vias metabólicas. Na Figura 2.6 é possível visualizar-se uma via metabólica de síntese de PHB.

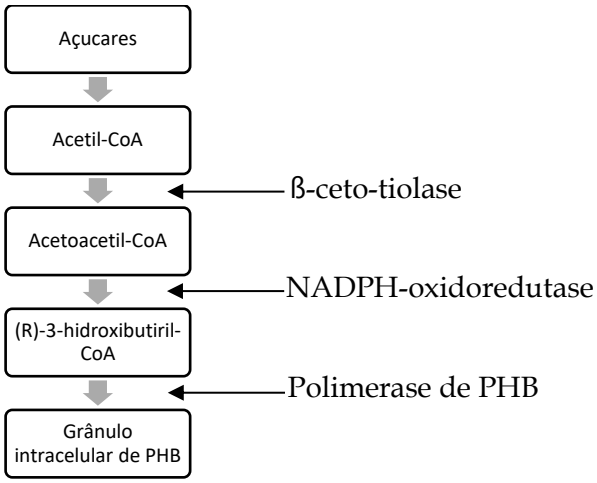


Figura 2.6 - Síntese de PHB (Adaptado de Francis & Parayil, 2023).

A sua produção pode ser realizada por microrganismos eucariontes e procariontes. Até ao momento, são conhecidos mais de 90 géneros de bactérias Gram-negativas e Gram-positivas, que, em condições aeróbias e anaeróbias, são capazes de produzir PHAs (Raza et al., 2018). Estas bactérias podem ser divididas em dois grupos. No primeiro grupo, as bactérias requerem limitações de determinados nutrientes, como por exemplo o P, N, Mg ou O, para acumular PHAs. Alguns exemplos destas bactérias são: *Ralstonia eutropha*, *Pseudomonas oleovorans* e *Pseudomonas putida* (Raza et al., 2018). No segundo grupo, as bactérias acumulam PHAs durante a fase de crescimento e não requerem limitações de nutrientes. Um exemplo destas bactérias é a *Escherichia coli* (Raza et al., 2018).

A produção de PHAs pode ocorrer por culturas microbianas puras ou mistas (Salleh et al., 2023; Singh et al., 2023). Os PHAs são a maior classe de poliésteres naturais e, até ao momento, são conhecidos mais de 150 monómeros de PHAs (Singh et al., 2023). Verifica-se uma notável variabilidade de monómeros de PHAs, sendo que estes apresentam propriedades físico-químicas, térmicas e mecânicas semelhantes aos poliésteres convencionais obtidos a partir do petróleo. A estrutura dos PHAs é isotática com configuração (R) nas cadeias principais e a polimerização ocorre quando o grupo carboxilo de um monómero estabelece ligação com o

grupo hidroxilo de outro monómero (Francis & Parayil, 2023). Na Figura 2.7 é possível visualizar-se a estrutura geral dos PHAs.

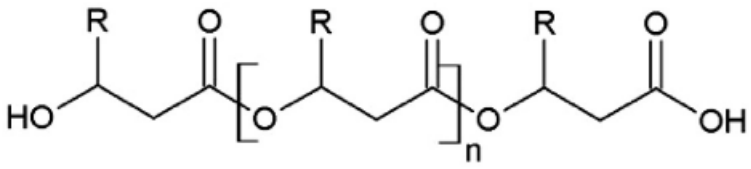


Figura 2.7 - Estrutura geral de polihidroxialcanoatos (Niaounakis, 2016).

As cadeias laterais R podem ser lineares, ramificadas, saturadas, insaturadas ou aromáticas (Francis & Parayil, 2023).

Os PHAs são classificados em três classes de comprimento, de acordo com o número de carbonos nas cadeias laterais, nomeadamente (Mai et al., 2024; Raza et al., 2018; Salleh et al., 2023; Sangwan et al., 2023; Singh et al., 2023):

1. **Cadeia curta** - designados por *scl-PHAs*, possuem entre três a cinco monómeros de carbono (C3-C5) e são produzidos por organismos como *Cupriavidus necator e Alcaligenes latus*. Apresentam um elevado grau de cristalinidade (55-80 %), alta temperatura de fusão (173-180 ^{o}C) e têm propriedades semelhantes ao polipropileno, apresentando um comportamento característico de um termoplástico. Alguns exemplos destes PHAs são o poli(3-hidroxibutirato), PHB, poli(4-hidroxibutirato), P4HB, e poli(3-hidroxivalerato), PHV, ou o copolímero, 3-Hidroxibutirato-co-3-hidroxivalerato, PHBV.
2. **Cadeia média** - designados por *mcl-PHAs*, possuem entre seis a catorze monómeros de carbono (C6-C14) na unidade de 3-hidroxialcanoato. São sintetizados principalmente por bactérias do género *Pseudomonas*. Apresentam baixo grau de cristalinidade, baixa resistência mecânica, baixa temperatura de fusão (39-61^{o}C) e alta temperatura de transição vítrea. Contudo, apresentam uma flexibilidade e elasticidade idêntica à da borracha. Estes apresentam características semelhantes a um polímero elastómero. Alguns exemplos são o poli(3-hidroxioctanoato), PHO, e poli(3-hidroxino-nanoato), PHN, constituídos essencialmente pelo copolímeros hidroxihexanoato, HHx, ou 3-hidroxiheptanoato, HH, ou 3-hidroxidecanoato, HD.
3. **Cadeia longa** - designados por *lcl-PHAs*, têm mais de catorze monómeros de carbono. São sintetizados por bactérias como a *Shewanella oneidensis* e *Aureispira*

marina. Os *lcl-PHAs* são materiais mais flexíveis e elásticos, com baixo grau de cristalinidade (25 %). Alguns exemplos são o poli(3-hidroxipentadecanoato), PHPD, e o poli(3-hidroxihexadecanoato), PHHA.

O elevado grau de cristalinidade dos bioplásticos, mais especificamente dos *scl-PHAs*, representa um obstáculo quando estes são utilizados em embalagens e em aplicações biomédicas, devido ao facto de se tornarem mais frágeis e quebradiços (Salleh et al., 2023; Singh et al., 2023).

Algumas das características gerais dos PHAs incluem (Niaounakis, 2016; Raza et al., 2018):

- Insolúveis em água;
- Apresentam uma boa resistência a ataques hidrolíticos, contudo têm baixa resistência a ácidos e bases;
- Solúveis em clorofórmio e outros hidrocarbonetos clorados;
- Biocompatíveis;
- Elevada resistência a raios UV;
- Afundam em água, facilitando a biodegradação na DA;
- Não apresentam toxicidade;
- Apresentam boas propriedades de barreira contra o oxigénio e contra o vapor de água.

A biodegradação dos PHAs depende essencialmente da sua estrutura, composição, condições ambientais e do tipo de microrganismos envolvidos no processo (Raza et al., 2018).

Segundo Raza et al. (2018), a temperatura de transição vítrea (T_g) dos PHAs variam entre -50 ^{o}C e 4 ^{o}C, a de fusão (T_f) entre 40 ^{o}C e 180 ^{o}C e a temperatura de degradação (T_{Deg}), o módulo Young, a resistência à tração, o vapor de água e a taxa de permeabilidade de oxigénio variam de acordo com o tipo de polímero de PHAs e respetiva composição (Raza et al., 2018). Niaounakis (2016) resumiu as propriedades típicas de alguns PHAs conforme apresentado na Tabela 2.3.

Tabela 2.3- Propriedades típicas de alguns PHAs (Niaounakis, 2016).

Propriedades e unidades	**Valores**
Temperatura de transição vítrea, Tg (°C)	2
Temperatura de fusão, T_f (°C)	160-175
Grau de cristalinidade, X_{cr} (%)	40-60
Modulo de Young, E (GPa)	1-2
Resistência à tração, σ (MPa)	15-40
Alongamento na rutura, ε (%)	1-15
Taxa de transmissão de vapor de água, WVTR (g mm.(m^2.dia) $^{-1}$)	2,36
Taxa de permeação de oxigénio, OTR (cc mm.(m^2.dia) $^{-1}$)	55,12

Para melhorar as propriedades físicas dos PHAs, estes podem ser misturados com matéria-prima renovável, como por exemplo lenhina, derivados de celulose ou amido (Salleh et al., 2023).

Os PHAs têm sido amplamente utilizados, quer seja na indústria, na saúde, na agricultura e, principalmente, em embalagens para acondicionamento de alimentos (Emadian et al., 2017; Raza et al., 2018; Salleh et al., 2023). Contudo, o processo de produção de PHAs apresenta uma desvantagem relativamente aos plásticos convencionais à base de petróleo. O custo elevado de produção, associado ao tipo de fonte de carbono, custo operacional da fermentação, produtividade do processo, rentabilidade das fontes de carbono selecionadas e o processamento a jusante, são algumas das desvantagens na produção de PHAs (Raza et al., 2018; Singh et al., 2023). Este custo de produção de PHAs pode ser 5 a 10 vezes superior ao custo de produção de plásticos petroquímicos convencionais (Raza et al., 2018). A fonte de carbono é o principal fator de custo (Raza et al., 2018).

De forma a tornar a produção de PHAs economicamente viável, estão a ser realizados estudos utilizando diferentes materiais residuais como fontes de carbono, como por exemplo amido, soro de leite, farelo de trigo e arroz, melaço de cana-de-açúcar, entre outros (Raza et al., 2018).

Entre a extensa variedade de PHAs descobertos até ao momento, o poli(3-hidroxibutirato), PHB, é o homopolímero mais amplamente estudado e comercializado.

2.2.4.1. Polihidroxibutirato (PHB)

O poli(3-hidroxibutirato) é um homopolímero de 3-hidroxibutirato e é o membro mais difundido e bem caracterizado da família dos polihidroxialcanoatos (Bugnicourt et al., 2014).

Este biopolímero apresenta propriedades semelhantes a outros termoplásticos sintéticos, nomeadamente o polipropileno (PP) (Getachew & Woldesenbet, 2016; Niaounakis, 2016). Caracteriza-se por ser biodegradável, biocompatível e não ser tóxico para o meio ambiente e para o ser humano (Rivera-Briso & Serrano-Aroca, 2018).

O PHB foi sintetizado pela bactéria *Bacillus magaterium* e reportado pelo cientista francês Lemoigne, em 1923 (Francis & Parayil, 2023). A estrutura química geral do PHB é apresentada na Figura 2.8.

$$-\{\,O-CH(CH_3)-CH_2-(C=O)\,\}_n-$$

Figura 2.8 - Estrutura de poli(3-hidroxibutirato).

O PHB é designado como *scl-PHAs*, pois contém apenas quatro carbonos na sua cadeia linear (Raza et al., 2018; Salleh et al., 2023; Sangwan et al., 2023). Tem uma estrutura linear de ácido D (-) -3-hidroxibutírico (Bugnicourt et al., 2014). Caracteriza-se por apresentar um elevado grau de cristalinidade (55-80 %), uma temperatura de fusão elevada (173-180 ºC), uma temperatura de transição vítrea de 5 ºC e tem um alto peso molecular (Niaounakis, 2016; Raza et al., 2018; Rivera-Briso & Serrano-Aroca, 2018; Salleh et al., 2023).

Segundo Niaounakis (2016), os PHAs, incluindo o PHB, são processados facilmente, uma vez que não possuem nenhuma ramificação da cadeia principal de carbono e são isotáticos (Niaounakis, 2016).

Segundo Bugnicourt et al. (2014) e Niaounakis (2016), os PHAs, incluindo o PHB, apresentam as seguintes características:

- Insolúveis em água;
- Não contêm resíduos catalisadores, devido à sua origem natural;
- São 100 % biodegradáveis;
- Resistentes à hidrólise;
- Apresentam baixa permeabilidade para oxigénio, água e dióxido de carbono;
- São resistentes à oxidação;

Segundo Bugnicourt et al. (2014), o PHB é acumulado no interior de grânulos por uma grande variedade de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, sob condições restritas de nutrientes.

O PHB pode ser produzido por microrganismos, como por exemplo *Ralstonia eutrophus* ou *Bacillus mega-terium,* em condições de *stress* fisiológico (Bugnicourt et al., 2014). A produção pode ocorrer em culturas puras e em culturas mistas.

A biossíntese microbiana de PHB começa com a condensação de duas moléculas de acetil-coenzima A (acetil-CoA) para originar acetoacetil-coenzima A (acetoacetil-CoA), que é, posteriormente, reduzida a hidroxibutiril-coenzima A (hidroxibutiril-CoA). Este último composto é, então, utilizado como um monómero para polimerizar o PHB, como se pode visualizar na Figura 2.6 (Bugnicourt et al., 2014).

Segundo Bugnicourt et al. (2014), o PHB é um polímero estereoregular, isotático, semicristalino, com configuração 100 % em R e apresenta alto nível de degradação.

O PHB é um material versátil e é utilizado em diversas aplicações, nomeadamente em embalagens para alimentos e aplicações biomédicas, como implantes cirúrgicos, costura de feridas, entre outros (Niaounakis, 2016; Zhao et al., 2021). Contudo, o PHB puro tem tido algumas limitações relativamente à sua aplicação devido à sua fragilidade intrínseca (Bugnicourt et al., 2014; Zhao et al., 2021). Com o intuíto de melhorar as propriedades do PHB, alguns cientistas começaram a incorporar monómeros secundários na cadeia polimérica, formando copolímeros (Rivera-Briso & Serrano-Aroca, 2018).

O poli(3-hidroxibutirato-co-3-hidroxivalerato copolímero) (PHBV ou PHBHV), foi o copolímero do PHB que, até ao momento, apresentou melhores propriedades mecânicas devido ao aumento da tensão superficial e à maior flexibilidade (Wang et al., 2012; Zhao et al., 2021).

2.3. Radiação ionizante

A radiação ionizante tem a capacidade de modificar propriedades físicas, químicas e/ou biológicas do material irradiado (Drobny, 2013; Shayanfar & D. Pillai, 2022). É constituída pelas seguintes radiações: partículas α e β, feixes de eletrões, radiação X (Raios-X) e radiação gama (γ) (Shayanfar & D. Pillai, 2022). Na Figura 2.9 é possível visualizar-se o espectro eletromagnético, com as respetivas radiações.

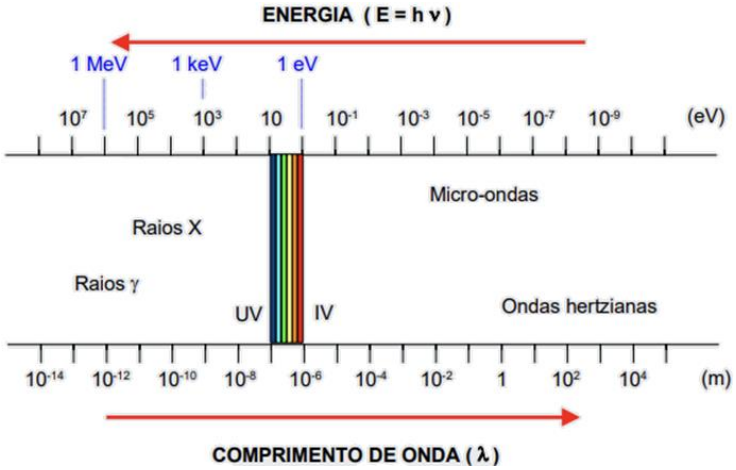


Figura 2.9- Espectro eletromagnético (Silva, 2015).

O espectro eletromagnético corresponde a um intervalo de frequências da radiação eletromagnética. A radiação ionizante apresenta um comprimento de onda (λ) menor e uma frequência mais elevada comparativamente às outras formas de radiações.

A radiação ionizante é caracterizada por ter a capacidade de penetrar mais profundamente a matéria comparativamente com outras radiações, como por exemplo a radiação Ultravioleta (UV) e a Visível (Vis) (Drobny, 2013).

A radiação ionizante é caracterizada por ser mais energética do que as restantes radiações que constituem o espectro eletromagnético. Na Figura 2.10 é possível visualizar-se esquematicamente a diferença de penetração na matéria entre a radiação UV e o feixe de eletrões.

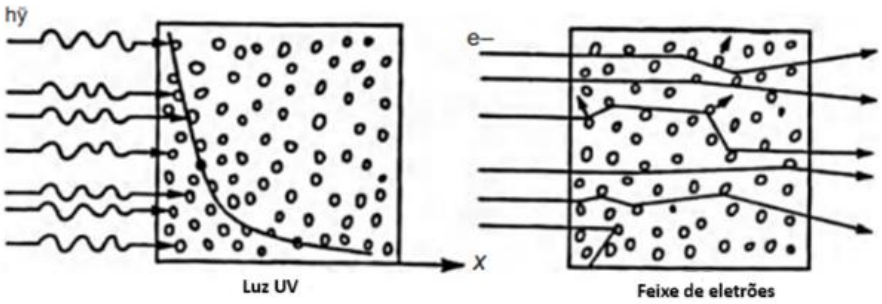


Figura 2.10- Comparação das radiações UV e feixe de eletrões (Drobny, 2013).

Os diferentes tipos de radiação ionizante apresentam diferentes graus de penetração, como é possível visualizar-se na Figura 2.11.

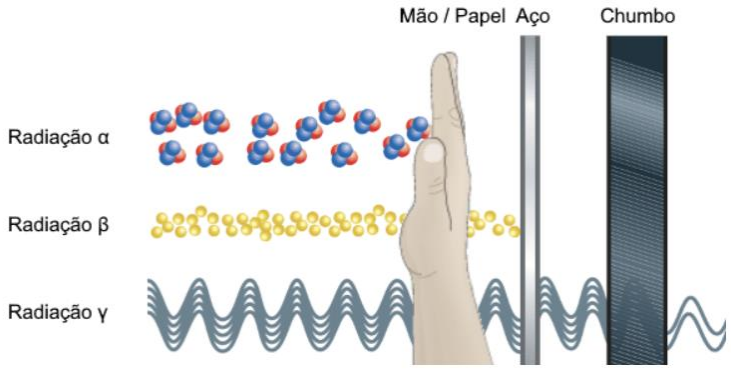


Figura 2.11- Poder de penetração dos diferentes tipos de radiação ionizante (Neta, A Física e a Química , 2023).

A radiação γ apresenta um maior grau de penetração comparativamente com a radiação alfa (α) e beta (β).

Quando um determinado material é submetido a uma fonte de energia, como por exemplo a radiação ionizante, pode ocorrer a excitação ou a ionização de um átomo ou de uma molécula. Caso a energia transferida seja superior à energia que um eletrão de uma órbita exterior específica possui, ocorre a ionização do átomo ou da molécula. A excitação, por sua vez, ocorre quando a energia absorvida não é suficiente para retirar o eletrão da orbital, contudo obriga o eletrão a transitar para um estado ou orbital mais energética, excitando o eletrão (Barzilov et al., 2012; Drobny, 2013). A Figura 2.12 ilustra o processo de ionização e excitação de um átomo.

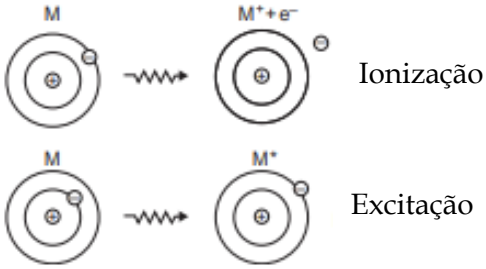


Figura 2.12- Processo de Excitação e Ionização de um átomo (Drobny, 2013).

Verifica-se o início de novas reações, como por exemplo reações de polimerização, reticulação e/ou a degradação (Barzilov et al., 2012)

Segundo Drobny (2013) e Shayanfar & D. Pillai (2022) atualmente as principais aplicações industriais da radiação ionizante incluem:

- Esterilização de produtos, como por exemplo produtos farmacêuticos;

- Irradiação de alimentos e produtos agrícolas, com diversos objetivos, nomeadamente: desinfestação, extensão do prazo de validade, inibição de brotos, controlo de pragas e esterilização;
- Modificação das propriedades dos materiais, como por exemplo polimerização, reticulação de polímeros e coloração de gemas;
- Descontaminação de efluentes domésticos e industriais;

Algumas das unidades do Sistema Internacional (SI) relacionadas com radiação incluem (Stalter and Howarth 2012):

- Dose absorvida: Um Gray (Gy) é equivalente a um Joule de energia absorvida por quilograma de matéria ($J.kg^{-1}$);
- Dose equivalente: Um Sievert (Sv) é equivalente a um joule de dose equivalente absorvida por quilograma de matéria;
- Atividade: Um Becquerel (Bq) é equivalente a uma desintegração por segundo;

A taxa de dose de irradiação (*Dose Rate*) a que um material é exposto, corresponde à quantidade de radiação recebida por unidade de tempo; a intensidade de uma fonte de radiação gama é designada de radioatividade (Drobny 2013).

Com o objetivo de provocar uma maior alteração no material irradiado foi selecionada a radiação gama e o feixe de eletrões para a realização desta dissertação.

2.3.1. Radiação gama (raios-γ)

A radiação gama (γ) foi descoberta por Villard há mais de cem anos (Adrovic, 2012). Corresponde à fração mais energética, compreendida entre 104 e 107 eV (1 eV=1,6×10^{-19} J), com menor comprimento de onda do espectro eletromagnético e com frequências a partir de 3×10^{19} Hz. (Barzilov et al., 2012; Stalter & Howarth, 2012).

Os fotões que constituem a radiação γ viajam à velocidade da luz e têm a capacidade de penetrar mais facilmente os materiais, como está ilustrado na Figura 2.11 (Drobny, 2013; Shayanfar & D. Pillai, 2022).

Os fotões resultam do processo de decaimento de um isótopo radioativo. Os radiosótopos mais utilizados para irradiações gama são o ^{60}Co, o ^{137}Cs e o ^{192}Ir (Drobny, 2013). O isótopo ^{60}Co tem uma meia vida de 5,3 anos, o ^{137}Cs de 30 anos e o ^{192}Ir de 74 dias (Drobny, 2013). O ^{60}Co é a principal fonte de radiação γ utilizada, atualmente, na indústria (Stalter & Howarth, 2012). Na Figura 2.13 é possível visualizar-se a equação de decaimento do ^{60}Co.

$$^{60}Co_{27} \rightarrow \quad ^{60}Ni^{*}_{28} \rightarrow \quad ^{60}Ni_{28}$$

Figura 2.13- Equação de decaimento do elemento cobalto 60 (Drobny, 2013).

O decaimento do ^{60}Co ocorre da seguinte forma (Drobny, 2013):

1. Primeiro o $^{60}Co_{27}$ decai para $^{60}Ni_{28}$, devido à excitação provocada pelo decaimento beta, com emissão de um eletrão com uma energia de 0,31MeV;
2. Seguidamente, o $^{60}Ni_{28}$, excitado, volta ao seu estado fundamental, emitindo dois raios γ sucessivos, a 1,17 MeV e depois a 1,33 MeV.

Este processo pode ser visualizado na Figura 2.14.

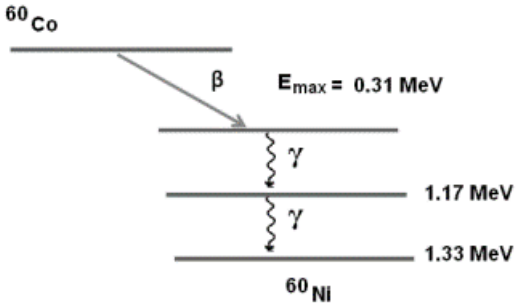


Figura 2.14- Esquema de decaimento radioativo do ^{60}Co (Aquino, 2012).

Os raios-γ não criam resíduos e nem conferem radioatividade aos materiais expostos aos mesmos (Adrovic, 2012). Por sua vez, ao contrário dos feixe de eletrões ou dos raios-X, a emissão dos raios gamas é contínua e permanente. Após se iniciar o decaimento radioativo, a emissão de raios gama só termina quando todos os átomos atingirem o estado estável (Drobny, 2013).

A ionização do material irradiado pode ocorrer através de três processos: efeito fotoelétrico, efeito Compton e produção de pares (Barzilov et al., 2012; Shayanfar & D. Pillai, 2022).

O efeito dos raios gamas depende: da intensidade; da distância à fonte; e do tempo de exposição. A intensidade da radiação diminui exponencialmente com o aumento da distância à fonte (Stalter & Howarth, 2012).

A radiação gama apresenta diversas vantagens, nomeadamente (Drobny, 2013):

1. O produto irradiado pode ser utilizado logo após a irradiação;
2. O material irradiado não aumenta significativamente a sua temperatura;
3. Alta penetração;

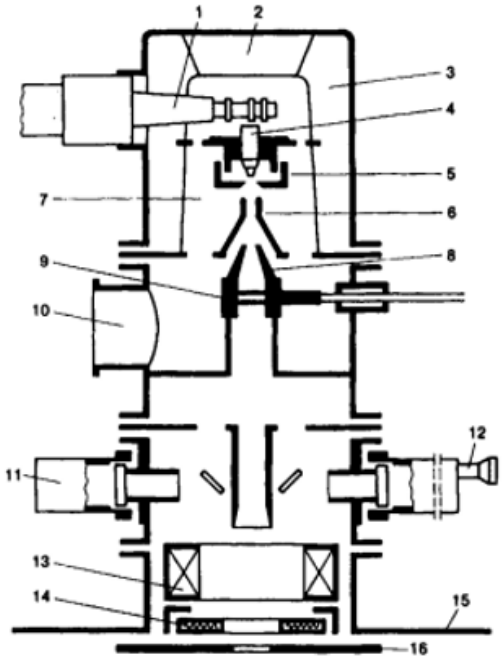
4. Processo preciso e reprodutivo;
5. Processo facilmente controlável.

Contudo, quando expostas à radiação γ, as células vivas podem sofrer danos no DNA e provocar a morte do respetivo organismo (Drobny, 2013).

2.3.2. Feixe de eletrões

A irradiação por feixe de eletrões, ao contrário da radiação gama, é uma radiação que contém partículas com massa (Drobny, 2013). São produzidas num acelerador de eletrões (AE) e, comparativamente à radiação gama, provocam uma maior alteração à superfície do material irradiado. Estas alterações (p.e. danos estruturais), são provocadas por partículas com massa eletricamente carregadas, os eletrões (Drobny, 2013).

Os eletrões são gerados em vácuo, geralmente a 1026 Torr, por um cátodo aquecido. Este processo ocorre num campo eletrostático entre um cátodo e um ânodo (Drobny 2013). Os eletrões são acelerados no sentido cátodo-ânodo, pois o cátodo encontra-se num potencial negativo de alta tensão (Drobny, 2013). Na Figura 2.15 é possível visualizar-se um exemplo de uma secção transversal de um canhão de feixe de eletrões com a respetiva legenda.



Legenda:

1- Cabo de alta voltagem;
2-Tampa superior da pistola;
3- Isolador de alta voltagem;
4-Cartucho de troca de cátodo;
5-Eletrodo de controle;
6-Anodo;
7-Espaço gerador de feixe de eletrões;
8-Estágio de pressão;
9-Válvula da coluna;
10-Comexoes para evacuar o gerador de feixe de eletrões;
11-Iluminação para o sistema de visualização ótica;
12-Sistema de visualização com telescópio;
13-Lente de focalização;
14-Sistema de deflexão do feixe
15-Parte da câmara de trabalho;
16-Escudo térmico;

Figura 2.15- Secção transversal de um canhão de feixe de eletrões (Schultz, 1993).

A energia ganha pelos eletrões é proporcional à tensão de aceleração e é expresso em *electron-volts* (eV), que representa a energia ganha por uma partícula de carga unitária ao passar pela diferença de potencial de 1 V (Drobny, 2013). Os eletrões só têm a capacidade de sair da câmara de vácuo se e só se a sua energia for suficiente para penetrar na janela de titânio de 15-20 µm de espessura do canhão de saída do acelerador (Drobny, 2013).

Quando um eletrão é emitido no AE, perde energia e desacelera gradualmente consoante as interações que vai sofrendo com as partículas que encontra no meio (Drobny, 2013).

Os eletrões transferem a sua energia para o material (Drobny, 2013). Quando um eletrão contacta com outro eletrão de outro átomo pode provocar a ionização ou excitação do átomo do material.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Materiais

3.1.1. Substrato orgânico

No presente estudo foi utilizado um substrato orgânico, preparado em laboratório, com o objetivo de simular um resíduo alimentar doméstico. A sua composição é apresentada na Tabela 3.1, tendo sido sugerida por Liotta et al. (2014).

Tabela 3.1- Composição do substrato orgânico preparado em laboratório (Adaptado de Liotta et al., 2014)

Constituição	Peso (g mh)
Batata	200
Brócolos	180
Mistura de Alface, Couve Roxa e Coentros	180
Tomate	170
Beringela	170
Tangerina	170
Pão	151
Bolacha	151
Maçã	150
Banana	150
Cenoura	140
Carne Branca (frango)	70
Carne Vermelha (vaca)	70
Peixe (pescada)	70
Arroz	50
Massa	50
Queijo	20
Leite (meio gordo)	20

mh: Matéria húmida

A utilização de um substrato preparado em laboratório, com o intuito de simular um resíduo alimentar, apresenta a vantagem de proporcionar um substrato com uma reduzida variabilidade da sua composição ao longo dos ensaios. Isto reduz a incerteza dos resultados

associados à variabilidade da composição de um resíduo alimentar originado em cozinhas (resíduo alimentar original).

Os alimentos, como a carne branca e vermelha, peixe, batata, beringela, brócolos, cenoura, arroz e massa, foram previamente cozinhados em água com sal, tendo sido considerado o peso de cada alimento após a cozedura. Posteriormente, foram retirados todos os ossos e cartilagens das carnes e dos peixes. Os alimentos foram misturados e triturados por uma picadora elétrica até se obter uma mistura homogénea.

Após este procedimento, o resíduo alimentar foi divido em frações com a dimensão necessária para um ensaio de DA e congelado a -18 °C. Para cada ensaio realizado, foi descongelada uma fração desse resíduo alimentar, com aproximadamente 110 g.

Para realizar a preparação do substrato para um ensaio da DA, o resíduo alimentar foi diluído com água mili-Q, que apresenta um elevado grau de pureza, numa razão volúmica (resíduo alimentar/água) de 1/8. A razão de diluição foi escolhida com base em ensaios preliminares, que permitiram definir as condições ótimas para que ocorra uma digestão estável, sem que suceda a acidificação do meio, e, ao mesmo tempo, se verifique a produção de biogás.

Seguidamente, a amostra diluída foi triturada com uma varinha mágica, de forma a obter-se uma mistura homogénea. Para além de garantir uma maior homogeneização, esta etapa permitiu acelerar a taxa de degradação do substrato. Por fim, o pH do substrato foi corrigido no início de cada digestão para o valor aproximado de 7,5. Esta correção foi realizada com recurso ao hidróxido de cálcio, em pó, de forma a fornecer alcalinidade ao meio e prevenir a ocorrência da sua rápida acidificação.

Na Figura 3.1 é possível visualizar-se as diferentes fases de preparação do substrato orgânico.

Figura 3.1- [A] Mistura de resíduos alimentares; [B] Mistura homogénea do resíduo alimentar congelado; [C] Substrato de resíduo alimentar diluído.

3.1.2. Polihidroxibutirato, PHB

O PHB foi produzido no grupo de Engenharia Bioquímica (BIOENG), UCIBIO, da NOVA FCT, pela aluna de doutoramento Beatriz Almeida sob a orientação da Professora Filomena Freitas.

O polímero foi produzido por cultivo da bactéria *Burkholderia sacchari* DSM 17165, utilizando um hidrolisado enzimático, de resíduos lignocelulósicos, como fonte de carbono. O hidrolisado continha aproximadamente 50g.L^{-1} de glucose e 15 g.L^{-1} de xilose. O cultivo teve uma duração de 2 dias, num biorreator de 2 L, em condições controladas de pH (7,0), temperatura (30^{o}C) e concentração de oxigénio dissolvido (20 %). No final do ensaio, o caldo do cultivo foi centrifugado e a biomassa foi liofilizada. O PHB foi extraído da biomassa seca por *Soxhlet* com clorofórmio e purificado por precipitação em etanol gelado, sendo seco à temperatura ambiente numa *hotte*.

O hidrolisado foi produzido pelo LNEG a partir de pasta de papel no âmbito do projeto realizado pelo BIOREF, em colaboração com a NOVA FCT e o RAÍZ.

As membranas inteiras de PHB foram preparadas por dissolução do polímero de PHB em clorofórmio. Após a homogeneização da mistura na placa de agitação, a solução foi vertida para uma superfície de vidro. Seguidamente, foi utilizado um balizador de espessura para garantir a semelhança das membranas, com aproximadamente 5 mm. Verificou-se a evaporação do clorofórmio, resultando a formação evidente da membrana inteira de PHB, Figura 3.2. Cada membrana de PHB tinha, aproximadamente 1,2 g de peso.

Figura 3.2- Membranas inteiras de PHB (não porosa).

Para preparar as membranas porosas foram usadas duas técnicas: através da incorporação de sais de NaCl e por emulsão. Para provocar a porosidade através da incorporação de sais de NaCl nas membranas de PHB, foi adicionado NaCl à solução de PHB em clorofórmio (cerca de 3g). Seguidamente, a solução foi vertida para uma superfície de vidro e observou-se a evaporação do clorofórmio. As membranas de PHB foram lavadas com água milli-Q para remover os sais de NaCl e foi verificada a condutividade.

A técnica de emulsão consistiu em agitar vigorosamente uma mistura constituída por água, polímero PHB e o clorofórmio. Seguidamente, a solução foi vertida para uma placa de vidro. A água forma pequenos gotículas no interior da membrana, enquanto o clorofórmio se evapora, dando origem à porosidade na membrana após a secagem.

Algumas membranas inteiras foram sujeitas a pré-tratamentos, mecânico e físico.

3.1.2.1. Pré-tratamentos aplicados às membranas de PHB

As membranas inteiras que foram sujeitas a um pré-tratamento mecânico, fragmentação, foram cortadas de forma a se obter uma maior semelhança entre o tamanho dos fragmentos. Estes apresentaram um tamanho de, aproximadamente, 1,5 cm × 2,0 cm.

Para realizar o pré-tratamento físico, radiação ionizante, as membranas inteiras foram devidamente dobradas e, no caso de serem irradiadas numa atmosfera inerte, foram colocadas dentro de um saco zip esterilizado e preenchido com N_2. Estas foram expostas à radiação γ e ao feixe de eletrões. As irradiações foram realizadas no Campus Tecnológico e Nuclear (C2TN) do Instituto Superior Técnico pelo doutor Pedro Santos.

3.1.2.1.1. Radiação γ

Na radiação γ, as amostras foram irradiadas com 1, 3, 5, e 12 kGy (1 Gy = 1 $J.kg^{-1}$ de matéria) numa atmosfera de N_2 e numa atmosfera com O_2 (atmosfera normal).

Na câmara de irradiação (*PRECISA 22, Gravner)* (Figura 3.3), constituída por 4 fontes de ^{60}Co, as amostras foram inseridas em frascos de 50 mL. Nos ensaios realizados na presença de O_2, os frascos encontravam-se perfurados. Os frascos foram posteriormente colocados no suporte de irradiação, com os respetivos dosímetros.

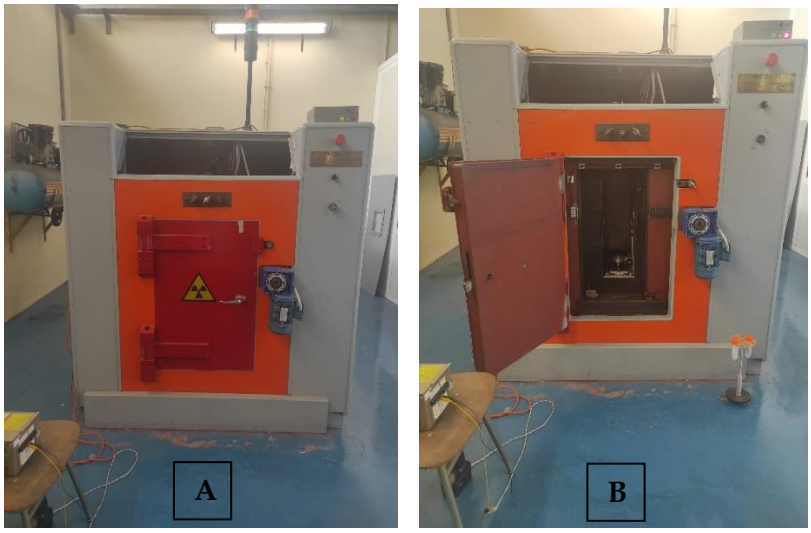


Figura 3.3- Câmara de irradiação (*PRECISA 22*, Gravner), fechada [A] e aberta [B], vendo-se o suporte de irradiação com a amostra e o dosímetro.

As amostras foram irradiadas com uma taxa de dose de 0,6 $kGy.h^{-1}$, até se atingir as doses absorvidas indicadas anteriormente (1, 3, 5 e 12 kGy).

Para garantir a eficiência e reprodutibilidade do processo, as amostras foram colocadas numa posição pré-definida, em cada irradiação, e a dose absorvida foi monitorizada através da utilização de 1 dosímetro de rotina de polimetilmetacrilato (Amber Perspex, 3042), fornecido pela *Harwell Dosimeters Limited* (Figura 3.4).

Figura 3.4- Dosímetro Amber Perspex 3042 (*Harwell Dosimeters Limited*).

Após a medição da espessura e da absorvância a 651 nm de cada dosímetro, os dados foram inseridos na curva de calibração fornecida e referenciada no lote de dosímetros e a dose exata foi obtida, com um erro máximo de ± 2,5 %.

3.1.2.1.2. Feixe de eletrões, no AE

No AE (Figura 3.5), as amostras foram irradiadas com um feixe de eletrões, na presença de O_2 (atmosfera normal), com 12, 30 e 50 kGy, a uma taxa de dose de 11 kGy.min^{-1} (660 kGy.h^{-1}).

Figura 3.5- Imagem do acelerador de eletrões (LINAC); [A] - câmara de irradiação; [B]- canhão de eletrões do acelerador.

Para garantir a eficiência e reprodutibilidade do processo, as amostras (Figura3.6-[B]) foram centralizadas perpendicularmente à boca do canhão de eletrões. As irradiações foram

acompanhadas com um dosímetros de rotina de Alanina (*FWT-60, Radiachromic Dosimeter*), (Figura 3.6-[C]). O suporte das amostras (Figura 3.6-[A]) foi devidamente fechado para que as amostras fossem irradiadas.

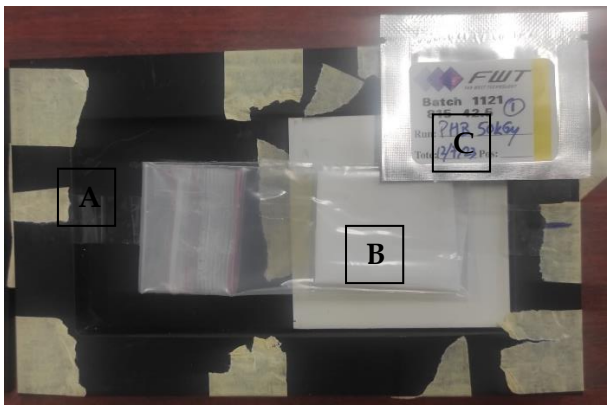


Figura 3.6- [A] Suporte para o material irradiado [B] Membrana de PHB devidamente dobrada e colocada no saco zip e [C] Dosímetro.

3.1.3. Inóculo anaeróbio

O inóculo utilizado ao longo dos ensaios foi recolhido na Estação de Tratamento e Valorização Orgânica (ETVO) da Valorsul (São Brás, Amadora).

Este correspondeu a uma mistura de efluentes de dois reatores anaeróbios que são operados em condições termófilas (51ºC), com uma capacidade nominal de 3400 m^3 e com TRH de 21 d, Figura 3.7-[A].

Durante o período dos ensaios, o inóculo foi armazenado numa arca frigorífica a 4°C, Figura 3.7-[B].

Figura 3.7-[A] Reatores anaeróbios na ETVO- Amadora [B] Mistura de efluentes dos reatores anaeróbios (inóculo).

3.2. Ensaios de Digestão Anaeróbia (DA)

3.2.1. Condições experimentais dos ensaios de DA

Os ensaios de DA foram realizados em regime descontínuo, a uma temperatura termófila de 51,0 ± 0,2ºC e com um tempo de ensaio de aproximadamente 21 dias. Foi selecionada uma temperatura termófila porque, segundo Cucina et al. (2022) a biodegradação efetiva dos bioplásticos é mais eficaz em condições termófilas, devido à necessidade de se atingir a Tg destes materiais.

Os biorreatores foram agitados manualmente, duas vezes por dia, para se reduzir o efeito de sedimentação do inóculo anaeróbio e dos SV do substrato orgânico e das membranas de PHB.

O volume total de inóculo e substrato utilizado em cada biorreator foi de 200 mL, num volume útil de 250 mL e com um *headspace*, espaço vazio que se encontra acima do conteúdo que o frasco contém, de 133 mL. A razão volúmica de inóculo/substrato foi de 2:1, com base em resultados obtidos em trabalhos anteriores.

Foram utilizados quatro tipos de membranas de PHB: *i)* membranas inteiras (MI); *ii)* membranas fragmentadas (MF); *iii)* membranas porosas (MP) (produzida através da utilização de NaCl (MP_{NaCl}) e da técnica de emulsão com água (MP_{H_2O})); *iv)* membranas inteiras irradiadas a 50 kGy no AE (MI_{50}).

As membranas foram inseridas e submersas nos biorreatores, para que fossem biodegradadas pelos microrganismos presentes no inóculo.

Na Tabela 3.2 estão apresentados os ensaios experimentais da DA realizados.

Em todos os ensaios foram realizadas duas réplicas do ensaio em branco (EB), constituído apenas por inóculo e substrato, para efeito de controlo no processo de produção do biogás a partir do inóculo.

No total foram realizados sete ensaios:

a) Ensaio B (EB) - Ensaio em branco, constituído por Inóculo + Substrato;
b) Ensaio MI (EMI) - Três réplicas do ensaio contendo a membrana inteira, constituído por Inóculo + Substrato + MI;
c) Ensaio MF (EMF) - Três réplicas do ensaio contendo a membrana fragmentada, constituído por Inóculo + Substrato + MF;
d) Ensaio MP_{NaCl} (EMP_{NaCl}) - Três réplicas do ensaio contendo a membrana porosa, produzidas com NaCl, constituído por Inóculo + Substrato + MP_{NaCl};

e) Ensaio MP_{H2O} (EMP_{H2O}) -Três réplicas do ensaio contendo a membranas porosas, produzias através da técnica de emulsão, constituído por Inóculo + Substrato + MP_{H2O};
f) Ensaio IMF (IMF) - Três réplicas do ensaio constituído por Inóculo + MF, sem substrato orgânico;
g) Ensaio MI_{50} (EMI_{50}) -Três réplicas do ensaio contendo a membrana irradiada a 50 kGy no AE, constituído por Inóculo + Substrato +MI_{50}.

Tabela 3.2-Condições dos ensaios de DA.

Ensaios	**Inóculo (V=133 mL)**	**Substrato orgânico (V=67 mL)**	**Pré-tratamento da membrana**
Branco	Presente	Presente	Sem pré-tratamento
EMI	Presente	Presente	Sem pré-tratamento
EMF	Presente	Presente	Mecânico, corte
EMP_{NaCl}	Presente	Presente	Membrana porosa, mas sem pré-tratamento
EMP_{H2O}	Presente	Presente	Membrana porosa, mas sem pré-tratamento
EIMF	Presente	Não utilizado	Mecânico, corte
EMI_{50}	Presente	Presente	Físico, membrana irradiada com 50 kGy no AE

3.2.2. Configuração dos Biorreatores de DA

Durante os ensaios foram utilizados biorreatores de vidro (frascos *Schott*), com um volume útil de 250 mL (Figura 3.8-[A]). Cada biorreator possuía duas tampas de rosca com abertura (*Schott GL45* e *Schott GL25)*, que por sua vez estavam ligadas entre si através de adaptadores e anilhas estanques.

A rosca superior encontrava-se ligada a um tubo polimérico de cristal transparente, que por sua vez se encontrava ligado a um saco *Tedlar SKC* que continha uma válvula de corte. O biogás foi recolhido e armazenado nos sacos *Tedlar SKC* com um volume útil de 500 mL. Todas as componentes e as respetivas conexões deste sistema estavam hermeticamente fechados.

Os biorreatores foram imersos num banho de água termostatizado com circulação permanente da água (*Grant, GD100*) (Figura 3.8-[B]). A temperatura foi mantida a 51,0 ± 0,2 °C por ação de um termostato com resistência elétrica, termopar e controlador de temperatura.

Para se fazer a medição do volume de biogás contido nos sacos *Tedlar*, foi utilizada uma coluna de vidro graduada, de 600 mL, preenchida com água acidificada (Figura 3.8-[C]). O saco contendo o biogás foi ligado à coluna de vidro e a válvula do saco foi aberta. A válvula

de corte do saco Tedlar foi fechada e foi colocado uma anilha no tubo polimérico de cristal transparente para que não haja fugas de biogás. A medição do volume do biogás foi realizada através do deslocamento da água na coluna causada pela entrada de biogás. O volume de água deslocado na coluna corresponde ao volume de biogás transferido do saco de *Tedlar* para a coluna.

Periodicamente, o biogás foi analisado com o objetivo de conhecer-se a sua composição. A análise da composição do biogás encontra-se descrita mais adiante.

Figura 3.8- [A] Biorreator com conexões e saco Tedlar; [B] Banho de água termostatizado com biorreatores imersos; [C] Coluna de medição do volume de biogás.

3.3. Caracterização do inóculo, substrato, misturas de partida e digeridos

O inóculo, o substrato orgânico, as misturas colocadas nos biorreatores no início de cada ensaio e os digeridos obtidos após cada ensaio de DA foram analisados relativamente aos teores de Sólidos Totais (ST), Sólidos Voláteis (SV), Sólidos Fixos (SF), Carência Química de Oxigénio total (CQO_T) e Carência Química de Oxigénio solúvel (CQO_s). Para todos os ensaios realizados foram registados os valores de pH.

3.3.1. Quantificação dos teores de sólidos totais, fixos e voláteis e da eficiência de remoção de sólidos voláteis

Os ST, SF e SV foram quantificados de acordo com os métodos 2540B e 2540E, do *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* (WEF Chair et al., 2017). Todas as quantificações foram efetuadas em duplicado.

Os cadinhos, vazios, foram previamente pesados numa balança analítica (*Denver Instruments Company, TR-204*), após a secagem, a 105 ± 1 °C, durante 2 h, e calcinação, a 550 ± 1°C, durante 2 h, ambas realizadas numa mufla (CEM, MAS-7000). Posteriormente, foram colocados 5 mL de amostra em cada cadinho e evaporadas em banho de água (*J.PSelecta, 600 1239*), a 96 ± 1 °C, até a evaporação completa da água. Seguidamente, os cadinhos foram colocados na mufla, a 105 ± 1 °C, durante 2 h, para secagem completa da amostra. Após arrefecimento num exsicador, os cadinhos foram pesados na balança analítica. Os ST de cada amostra foram calculados através da equação (3.1):

$$\mathrm{ST} = \frac{\mathrm{P_1} - \mathrm{P_0}}{\mathrm{V}} \times 1000 \tag{3.1}$$

Em que:

ST - Concentração de sólidos totais ($g.L^{-1}$);

P_0 - Tara do cadinho, a 105 ± 1°C (g);

P_1 - Peso do cadinho com os sólidos totais, a 105 ± 1°C (g);

V - Volume de amostra (mL);

1000 - Fator de conversão da unidade de volume.

Os cadinhos contendo os ST foram incinerados na mufla, a 550 ± 1°C, durante 2h. Após o arrefecimento num exsicador, foram pesados na balança analítica. Os SF foram calculados através da equação (3.2).

$$\mathrm{SF} = \frac{\mathrm{P_2} - \mathrm{P_0}}{\mathrm{V}} \times 1000 \tag{3.2}$$

Em que:

SF - Concentração de sólidos fixos ($g.L^{-1}$);

P_0 - Tara do cadinho, a 550 ± 1 °C (g);

P_2 - Peso do cadinho com os sólidos fixos, a 550 ± 1 °C (g);

V - Volume de amostra (mL);

1000 - Fator de conversão da unidade de volume.

Os SV resultam da diferença entre os ST e os SF, equação (3.3).

$$\mathrm{SV} = \mathrm{ST} - \mathrm{SF} \tag{3.3}$$

Em que:

SV - Concentração de sólidos voláteis ($g.L^{-1}$);

ST - Concentração de sólidos totais ($g.L^{-1}$);

SF - Concentração de sólidos fixos ($g.L^{-1}$);

O valor da Eficiência de Remoção (ER) de SV em cada ensaio de DA foi obtido através da equação (3.4):

$$\mathrm{ER_{SV}} = \frac{\mathrm{SV_A} - \mathrm{SV_E}}{\mathrm{SV_A}} \times 100 \tag{3.4}$$

Em que:

ER_{SV} - Eficiência da remoção de SV em cada ensaio de DA (%);

SV_A - Concentração de SV na mistura colocada no biorreator, no início de cada ensaio de DA ($g.L^{-1}$);

SV_E - Concentração de SV no digerido de cada ensaio de DA, após o final do ensaio ($g.L^{-1}$);

3.3.2. Quantificação da Carência Química de Oxigénio total e solúvel

A quantificação do CQO_T foi realizada através do método ISO 15705:2002 (International Organization for Standardization, 2002). Este método baseia-se na quantificação do excedente de dicromato de potássio ($K_2Cr_2O_7$) que não foi reduzido no processo de oxidação da matéria orgânica presente na amostra.

As amostras foram digeridas num termorreator (*Behr, Labor-Technick*), a 160°C, durante 75 min, com $K_2Cr_2O_7$ (0,50 N), em meio fortemente ácido, por utilização de H_2SO_4 (95-98 % $v.v^{-1}$). Após arrefecimento das amostras, o excedente de dicromato potássio, não envolvido na oxidação da matéria orgânica, foi quantificado por titulação com sulfato ferroso

amoniacal ($(N{H_4})_2Fe(SO_4)_2.\ 6H_2O$) (0,5 N), na presença do indicador corado de ferroína. Para cada uma das amostras, o CQO_T foi quantificado em duplicado e foi sempre preparado um branco (sem amostra).

Para preparação das amostras, dependendo da sua concentração, foi realizada uma diluição prévia de 5/100 ou 8/100. Usou-se, depois, 5 mL de cada amostra diluída para se efetuar a quantificação de CQO_T.

A concentração do CQO_T foi calculada através da equação (3.5):

$$\mathrm{CQO_T} = \frac{(\mathrm{V_{TB}} - \mathrm{V_{TA}}) \times \mathrm{C} \times 8}{\mathrm{V_{AC}}} \times \mathrm{d_C} \tag{3.5}$$

Em que:

CQO_T- Carência química de oxigénio total (g $O_2.L^{-1}$);

V_{TB}- Volume de titulante gasto no branco (mL);

V_{TA}- Volume de titulante gasto na amostra (mL);

C- Normalidade do dicromato de potássio (= Normalidade do sulfato ferroso amoniacal) (equivalente-mole $Cr.L^{-1}$ = equivalente-mole $Fe.L^{-1}$) (N);

8 - Fator de conversão de equivalente-mole de Cr para gramas de oxigénio molecular (8 g O_2.equivalente-$mole^{-1}$ Cr);

V_A - Volume de amostra diluída usado na digestão (mL);

d - Fator de diluição da amostra.

A CQO_S foi quantificada de forma idêntica ao descrito anteriormente para a CQO_T, contudo foi utilizada uma fração de sobrenadante que resultou da centrifugação prévia das amostras.

Cerca de 30 mL de cada amostra foram previamente centrifugados numa centrífuga refrigerada (*Sigma, 4K15*), em dois ciclos consecutivos: no primeiro ciclo, as amostras foram sujeitas a uma força centrífuga, denominada de *relative centrifugal force* (*FCR*), de 1000 *g*, durante 20 minutos; no segundo ciclo, as amostras resultantes do ciclo anterior foram sujeitas a 5000 *g*, durante 30 minutos. Os dois ciclos decorreram a uma temperatura constante de 20 °C. Uma amostra do sobrenadante, diluída numa razão de 10/100 mL, foi depois usada num procedimento igual ao que foi descrito anteriormente para a CQO_T.

A concentração da CQO_S foi calculada através da equação (3.6):

$$\mathrm{CQO_S} = \frac{(\mathrm{V_{TB}} - \mathrm{V_{TA}}) \times \mathrm{C} \times 8}{\mathrm{V_{AC}}} \times \mathrm{d_C} \tag{3.6}$$

Em que:

CQO_s- Carência química de oxigénio solúvel (g O_2.L^{-1});

V_{TB}- Volume de titulante gasto no branco (mL);

V_{TA}- Volume de titulante gasto na amostra (mL);

C- Normalidade do dicromato de potássio (= Normalidade do sulfato ferroso amoniacal) (equivalente-mole Cr.L^{-1} = equivalente-mole Fe.L^{-1}) (N);

8 - Fator de conversão de equivalente-mole de Cr para gramas de oxigénio molecular (8 g O_2 equivalente-mole^{-1} Cr);

V_{AC} - Volume de amostra centrifugada e diluída usado na digestão (mL);

d_C - Fator de diluição da amostra centrifugada.

3.4. Caracterização das membranas de PHB

3.4.1. Análise termogravimétrica, TGA

A análise TGA é amplamente utilizada para caracterizar as propriedades físicas e químicas de materiais orgânicos, inorgânicos e sintéticos (analyzers, 2023), nomeadamente a sua estabilidade térmica, como por exemplo a temperatura de degradação térmica (T_{Deg}) e a temperatura de fusão (T_f), entre outros, sob condições controladas de aquecimento e atmosfera (Wall, 1994).

Esta análise mede a variação de massa e a respetiva taxa de variação em função da temperatura sob condições controladas de aquecimento e atmosfera. Os dados obtidos na análise de TGA são também importantes para estabelecer os limites de temperatura para a análise de calorimetria diferencial de varrimento (Instruments, 2023). É ainda possível analisar a estabilidade térmica e oxidativa de materiais, teor de humidade, cinética de decomposição, entre outros (Instruments, 2023; Analyzers, 2023).

Em cada análise foram usadas aproximadamente, 6 mg de cada membrana de PHB, com e sem pré-tratamento físico. Seguidamente, foram sujeitas a uma taxa de aquecimento de 10 $^oC.min^{-1}$, desde a temperatura ambiente (21^oC) até aos 450 ^oC, sob atmosfera de N_2. Esta caracterização foi realizada num equipamento TGA da *TA Instruments*, modelo Q500 (Figura 3.9).

Figura 3.9- Equipamento de análise termogravimétrica (*TA Instruments*, modelo Q500).

Os termogramas obtidos foram analisados através do software de controle e tratamento de dados *Universal Analysis 2000 (TA Instruments)*. Desta forma foi possível determinar a T_{Deg} das membranas utlizadas ao longo desta dissertação. As T_{Deg} foram obtidas através do método *Onset Point,* de acordo com a norma ISO 11358-1/2022 (International Standard, 2022).

3.4.2. Calorimetria Diferencial de Varrimento, DSC

A análise DSC, *Differencial Scanning Calorimetry,* é uma técnica capaz de medir o fluxo de calor, associado às transições de fase/estado dos materiais, em função da temperatura de aquecimento/arrefecimento (Chemspeed, 2023). Estas medidas fornecem informações qualitativas e quantitativas (entalpias) sobre as mudanças físicas e químicas, com uma expressão endotérmica ou exotérmica e variações da capacidade térmica dos materiais (O`Driscoll & Corrigan, 1994).

Esta análise é um complemento valioso na identificação e caracterização de materiais e é utilizada em inúmeras aplicações em diversas áreas da indústria, nomeadamente, química e farmacêutica (Chemspeed, 2023).

Em cada análise foram hermeticamente encapsuladas numa cápsula de alumínio, aproximadamente 6 mg de cada membrana de PHB, submetidas e não submetidas à irradiação. Nesta análise, é possível medir diretamente a quantidade de energia calorifica trocada entre a cápsula de alumínio que contêm a amostra e o cápsula de alumínio de referência, sem amostra.

As amostras foram submetidas a uma taxa de aquecimento de 10 ^{o}C.min^{-1} até aos 450 ^{o}C, sob uma atmosfera de N_2. Esta análise foi realizada no aparelho *TA Instruments*, modelo Q2000 (Figura 3.10).

Figura 3.10- Equipamento de calorimetria diferencial de varrimento (*TA Instruments*, modelo Q2000).

Os termogramas de DSC obtidos foram analisados através do software *Universal Analysis 2000* (*TA Instruments*), permitindo assim calcular as entalpias de fusão ($\Delta_f H$), a T_f e entalpia de degradação ($\Delta_{Deg} H$) das membranas de PHB utlizadas ao longo desta dissertação. A metodologia de utilização deste equipamento e o tratamento dos dados experimentais para obtenção dos parâmetros termodinâmicos das amostras analisadas seguiram a norma ISO 11357:2016 (International Standard, 2016).

3.4.3. Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier, FTIR

A análise por infravermelho é uma técnica espectroscópica vibracional que funciona como uma sonda de grupos funcionais, fundamental no diagnóstico estrutural das moléculas e na composição dos materiais (SCIENTIFIC, 2024).

Este método baseia-se no princípio de que, quando a radiação infravermelha (R-IV) incide no material, parte da radiação é absorvida, provocando uma vibração molecular. A outra

parte da R-IV atravessa o mesmo sem ser absorvido. A radiação é registada no recetor, que se encontra no lado oposto à fonte de radiação (MERCK, 2023).

As ligações covalentes de uma molécula absorvem seletivamente R-IV a um comprimento de onda específico, alterando a energia vibracional da ligação. Diferentes ligações e grupos funcionais absorvem diferentes frequências/comprimento de onda, sendo que o padrão de transmitância é diferente para diferentes moléculas (Ansari & Fatma, 2016; Cristy et al., 2001; MERCK, 2023).

O FTIR é uma técnica que não destrói as amostras analisadas (MERCK, 2023).

As membranas de PHB foram analisadas no aparelho *Thermo Scientific TM*, modelo *IS50 FT-IR* (Figura 3.11), no modo de transmitância (ATR). Os espectros foram analisados através do software do equipamento, *OMNIC TM*. Os espectros foram obtidos com uma resolução de 4 cm^{-1}, a partir da acumulação de 128 scans, no intervalo entre 4000 e 450 cm^{-1}, a uma temperatura média de 24 ^{o}C.

Figura 3.11- Equipamento de análise de Espectrometria de Infravermelho (*Thermo Scientific TM*, modelo *iS50 FT-IR*).

3.4.4. Espectroscopia de aniquilação de positrões, PALS

A espetroscopia de tempo de vida de aniquilação de positrão é uma técnica que permite obter informação sobre os defeitos presentes nos materiais, como nanocavidades, deslocações ou lacunas na rede cristalina ou estrutural, entre outros. Esta técnica é caracterizada por ser não destrutiva e mede o tempo decorrido entre a implantação do positrão no material e a emissão da radiação de aniquilação do mesmo (Biganeh et al., 2020; Bosnar, 2009).

Quando um positrão atinge um eletrão, ambas as partículas aniquilam-se e verifica-se a emissão de radiação eletromagnética. Ocorre a emissão de dois fotões, que se deslocam em

direções opostas com uma energia aproximada de 511 keV, que corresponde à energia em repouso da massa de cada uma das partículas (ROSSENDORF, 2023).

Como fonte de positrões utilizou-se um isótopo do sódio, nomeadamente o ^{22}Na. Na Figura 3.12 é possível visualizar-se o decaimento do isótopo sódio, ^{22}Na.

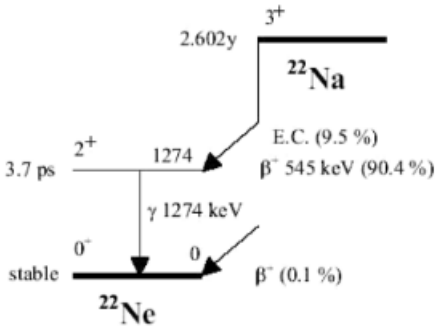


Figura 3.12- Decaimento do isótopo de sódio, ^{22}Na (RearchGate, 2023).

É possível visualizar-se, através da Figura 3.12, que 90,4 % dos casos o ^{22}Na decai para um estado excitado do ^{22}Ne através da emissão $\beta+$. O ^{22}Ne permanece neste estado durante 3,7 ps até decair para o estado fundamental, emitindo um fotão γ com uma energia de 1274 keV.

O tempo de vida de aniquilação de positrões tem um valor característico para diferentes materiais e defeitos elementares, contudo depende da densidade eletrónica local no ponto de aniquilação, uma vez que existe uma relação entre este intervalo de tempo e o tamanho das nanocavidades (ROSSENDORF, 2023).

Na Figura 3.13 é possível visualizar-se o equipamento de PALS utilizado.

De forma que todos os positrões fossem aniquilados em cada amostra e para minimizar possíveis aniquilações no exterior, as amostras de PHB foram dobradas e no meio das mesmas foi colocado a fonte de positrões.

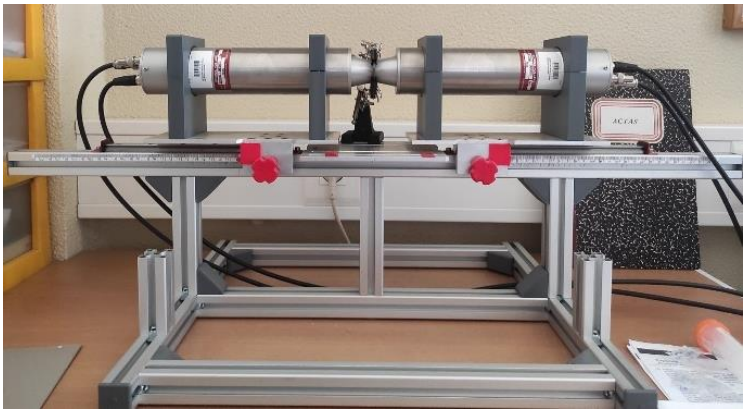


Figura 3.13- Equipamento de análise Espectroscopia de Aniquilação de Positrões.

A análise PALS foi realizada no Centro de Ciências e Tecnologias Nucleares (C2TN), do Instituto Superior, pelo aluno António Casimiro.

3.4.5. Análise de microscopia eletrónica de varrimento

A metodologia SEM tem a capacidade de ampliar uma região específica de uma amostra, utilizando um feixe focado de eletrões de alta energia. Esta análise é realizada sob vácuo para garantir que o feixe de eletrões permanece focado e não interage com partículas que podem estar presentes ou ser transportadas pelo ar. Esta metodologia fornece informações sobre a topologia da superfície da amostra, permitindo assim uma imagem mais detalhada sobre a mesma (Inada & Zhu, 2014).

Neste trabalho, as diferentes amostras foram analisadas com recurso a um microscópio *Hitachi*, modelo S2400 (Figura 3.14), operado a 20 kV e com uma ampliação de x500 e x1000. Foi utilizado um filme de ouro e platina nas amostras para minimizar o carregamento e melhorar o contraste da imagem.

Figura 3.14- Equipamento de Microscópica Eletrónica de Varrimento (*Hitachi*, modelo S-2400).

3.5. Caracterização do Biogás

A caracterização química do biogás foi efetuada por cromatografia gasosa (CG), com deteção por condutividade térmica (GC-TCD), aplicando o método de rampa de aquecimento. Os sacos *Tedlar*, contendo as amostras de biogás, foram recolhidos no decorrer dos diferentes ensaios. Em cada amostra de biogás foram analisados os seguintes compostos: CH_4, CO_2, H_2, N_2 e O_2.

Previamente foram obtidas retas de calibração para cada um dos compostos mencionados anteriormente, através da injeção de diferentes misturas destes gases, sendo conhecida a composição de cada mistura. As retas de calibração correlacionam a área de pico do composto, para cada um dos tempos de saída da coluna de CG, com o número de moles presentes no volume de amostra injetada. Através da lei dos gases perfeitos, foi possível estimar o número total de moles existentes no volume de gás injetada. A fração de cada composto analisado, presente na amostra injetada, foi calculada através da divisão do número de moles do composto, pelo número total de moles existentes na amostra.

Foi realizada a análise da composição do biogás de todos os sacos *Tedlar*, até ao 7º dia de ensaio. Após este dia, caso não se verificasse uma produção significativa de biogás, foi considerada a existência de uma estabilidade da composição do biogás, com base nos ensaios realizados anteriormente.

3.6. Cálculos dos Rendimentos em Biogás e Biometano

Os rendimentos em biogás e biometano foram calculados através das equações (3.7) a (3.10):

$$R_B = \frac{V}{SV \times V_u} \tag{3.7}$$

Em que:

R_B: Rendimento em biogás (mL.g_{SV}^{-1});

V: Volume de biogás produzido (mL);

SV: Concentração de sólidos voláteis na mistura adicionada aos biorreatores (g.L^{-1});

V_u: Volume útil nos biorreatores (L).

$$RA_B = \frac{\sum_{i=1}^{n} V_i}{SV \times V_u} \tag{3.8}$$

Em que:

RA_B: Rendimento acumulado em biogás (mL.g_{SV}^{-1});

V_i: Volume de biogás produzido no tempo de ensaio *i* (mL);

SV: Concentração de sólidos voláteis na mistura adicionada aos biorreatores (g.L^{-1});

V_u: Volume útil no biorreator (L).

$$R_{CH_4} = \frac{V \times CH_4}{SV \times V_u} \tag{3.9}$$

Em que:

R_{CH_4}: Rendimento em biometano (mL$_{CH4}$.g_{SV}^{-1});

V: Volume de biogás produzido (mL);

CH_4: Teor de biometano no biogás (% v.v^{-1});

SV: Concentração de sólidos voláteis na mistura adicionada aos biorreatores (g.L^{-1});

V_u: Volume útil nos biorreatores (L).

$$RA_{CH_4} = \frac{\sum_{i=1}^{n}(V_i \times CH_{4,i})}{SV \times V_u} \tag{3.10}$$

Em que:

RA_{CH_4}: Rendimento acumulado de biometano ($mL_{CH4}.g_{SV}^{-1}$);

V_i: Volume de biogás produzido no tempo de ensaio i (mL);

$CH_{4,i}$: Teor de biometano no biogás, no tempo de ensaio i (% $v.v^{-1}$);

SV: Concentração de sólidos voláteis na mistura adicionada aos biorreatores ($g.L^{-1}$);

V_u: Volume útil nos biorreatores (L);

3.7. Modelação da Cinética de Produção de Biogás (modelo modificado de Gompertz)

A cinética de produção de biogás nos ensaios decorridos foi realizada através do modelo de Gompertz modificado equação (3.11):

$$P(t) = P \times \exp\left\{-\exp\left[\frac{R_{max} \times \exp(1)}{P} \times (\lambda - t) + 1\right]\right\} \quad (3.11)$$

Em que:

$P(t)$: Rendimento acumulado de biogás no tempo t ($mL.g_{SV}^{-1}$);

R_{max}: Taxa diária máxima de rendimento de biogás ($mL.(g_{SV}.d)^{-1}$);

P : Rendimento acumulado final de biogás ($mL.g_{SV}^{-1}$);

λ : *Lag phase*, fase de latência (d);

t : Duração do ensaio (d).

O modelo foi ajustado aos dados experimentais através da ferramenta *solver* (método "GRG Nonlinear") do *MS Excel 365*. A função objetivo foi delimitada como sendo o mínimo da soma do quadrado dos erros residuais, correspondente ao quadrado da diferença entre os valores experimentais e os valores estimados pelo modelo, através da alteração da variável λ.

O P(t) obtido no modelo modificado de Gompertz representa o RA_B.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Caracterização dos materiais de partida

4.1.1. Caracterização dos inóculos

A atividade e a composição química do consórcio microbiano do inóculo afetam o desempenho da DA, podendo influenciar a cinética do processo da DA, nomeadamente a produção de biogás (Shaah et al., 2017).

Na Tabela 4.1 encontram-se os valores das propriedades físico-químicas dos inóculos utilizados ao longo dos ensaios, nomeadamente teores de sólidos, CQO e valores de pH. Os valores de CQO_T e de ST apresentaram um maior desvio padrão em relação à média.

É importante realçar que a composição do inóculo pode ser muito variável, visto que este depende das condições de operação do digestor de onde este provém, bem como da composição do alimento fornecido a esse digestor e da variabilidade da sua composição (Agabo-García, Solera, umd Perez 2022; Banks et al. 2018; Rico, Montes, and Lobo 2020).

Tabela 4.1- Concentração de sólidos, CQO_T, CQO_S e valores de pH dos inóculos utilizados nos ensaios de DA ($\bar{x} \pm \sigma$).

	Parâmetros					
	ST ($g.L^{-1}$)	SF ($g.L^{-1}$)	SV ($g.L^{-1}$)	CQO_T ($gO_2.L^{-1}$)	CQO_S ($gO_2.L^{-1}$)	pH
Inóculo	26,2 ± 1,8	10,9 ± 0,1	15,3 ± 1,7	21,8 ± 3,5	9,6 ± 1,6	8,4 ± 0,2

4.1.2. Caracterização do substrato

O substrato orgânico foi preparado em laboratório com o intuito de simular um resíduo alimentar doméstico e, consequentemente, apresentar uma reduzida variabilidade da sua composição ao longo dos ensaios de DA.

Na Tabela 4.2 é possível visualizar-se os valores típicos para resíduos alimentares europeus.

Tabela 4.2- Valores padrão para resíduos alimentares europeus (Banks et al., 2018)

	Parâmetros		
	ST (% matéria húmida)	SV (% matéria húmida)	SV (% ST)
Resíduo alimentar europeu	24,0	22,0	91,6

Na Tabela 4.3 estão apresentados os parâmetros físico-químicos e o respetivo pH do substrato utilizado nos ensaios.

Os valores obtidos na caracterização do substrato encontram-se próximos dos valores referidos na literatura de resíduos alimentares, como é possível visualizar-se na Tabela 4.2 e 4.3 (Banks et al., 2018).

Como é possível verificar na Tabela 4.3, mais de 99 % dos ST do substrato transformam-se em SV. Este substrato apresenta, portanto, um elevado potencial de produção de biogás.

Tabela 4.3 Concentração de sólidos, CQO_T, CQO_S e valores de pH do substrato utilizado nos ensaios ($\bar{x} \pm \sigma$).

	Parâmetros					
	ST ($g.L^{-1}$)	SF ($g.L^{-1}$)	SV ($g.L^{-1}$)	CQO_T ($gO_2.L^{-1}$)	CQO_S ($gO_2.L^{-1}$)	pH
Substrato	20,4 ± 2,1	0,14 ± 0,0	20,3 ± 2,1	38,8 ± 0,0	4,0 ± 0,6	4,56 ± 0,0

4.1.3. Caracterização das membranas PHB

4.1.3.1. Membranas não irradiadas

Na Tabela 4.4 é possível visualizar-se os valores dos parâmetros físico-químicos da membrana inteira PHB, não irradiada e produzida sem técnicas que induzem a porosidade na membrana.

Tabela 4.4- Teor de sólidos e CQO_T da membrana inteira de PHB, não irradiada e sem porosidade induzida, utilizada nos ensaios de DA ($\bar{x} \pm \sigma$).

	Parâmetros			
	ST ($g.L^{-1}$)	SF ($g.L^{-1}$)	SV ($g.L^{-1}$)	CQO_T ($gO_2.L^{-1}$)
PHB	5,76 ± 0,1	0,53 ± 0,1	5,23 ± 0,1	8,00 ± 0,0

Através da Tabela 4.4 é possível verificar-se que apenas 9,2 % dos ST são SF. Deste modo, a membrana de PHB contribui, de forma significativa, para o aumento dos SV, quando inserida nos ensaios de DA. A análise das membranas de PHB, não sujeitas a irradiação e sem porosidade induzida, tem como objetivo a comparação com a composição das membranas inteiras irradiadas, selecionadas para os ensaios de DA.

Na Figura 4.1 é possível visualizar-se três termogramas de TGA das membranas inteiras de PHB, não irradiadas e sem porosidade induzida. Estas membranas são termicamente estáveis até, aproximadamente, os 237,8 ± 2,2°C, temperatura a partir do qual se observa uma perda acentuada de massa até à degradação total das membranas aos 270 °C, aproximadamente. Segundo Etxabide et al. (2022), esta curva acentuada deve-se, principalmente, à rutura de ligações C=O e C−O na estrutura da membrana.

É também possível visualizar-se uma perda de massa, pouco acentuada, entre os 50 e os 100 °C. Esta perda de massa está associada à evaporação do solvente residual e humidade presentes nas membranas de PHB.

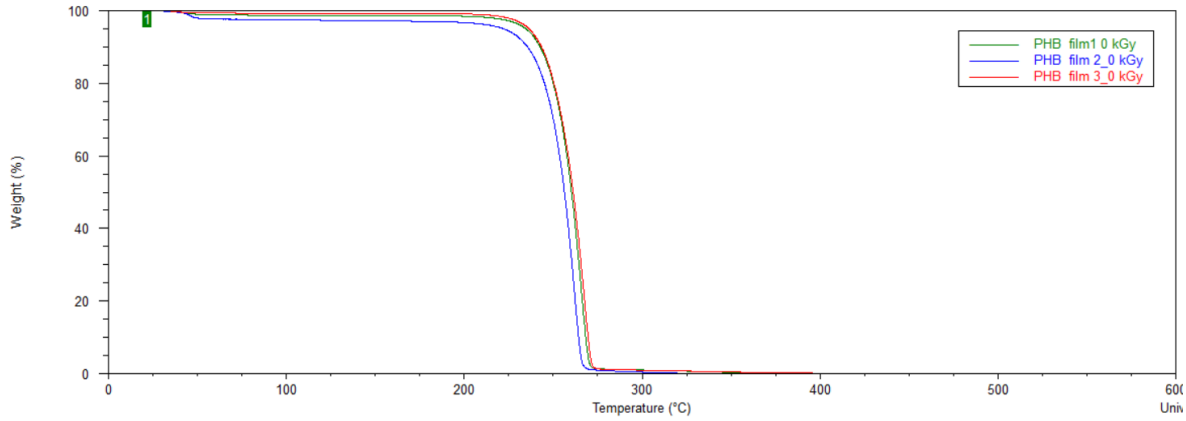


Figura 4.1- Termogramas de TGA da membrana de PHB não irradiadas e sem porosidade induzida (três réplicas).

O comportamento de fusão e degradação das membranas de PHB foram analisadas através da análise dos termogramas de DSC (Figura 4.2). O valor médio da $\Delta_{Deg}H$ das membranas foi de 622,1 ± 18,6 $J.g^{-1}$, que corresponde à área do pico centrado próximo dos 260 °C.

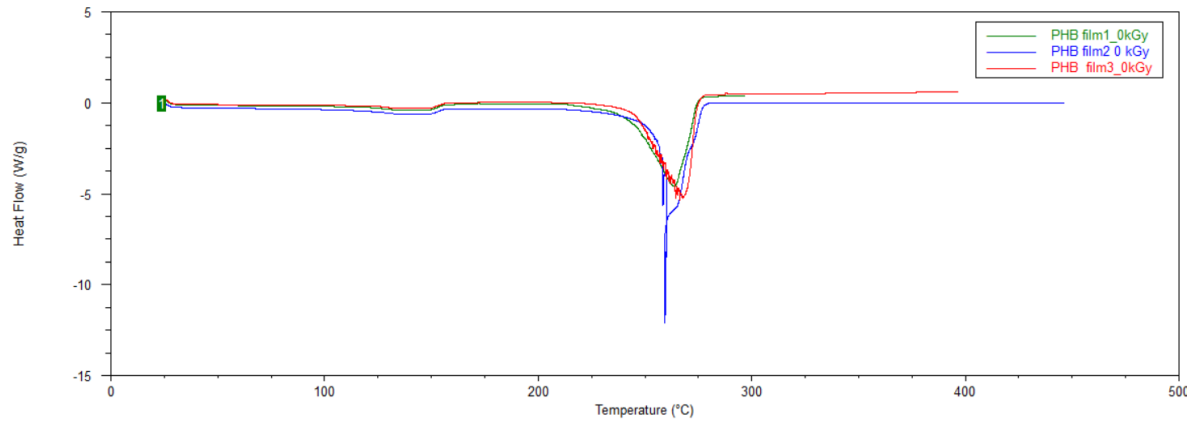


Figura 4.2- Termogramas de DSC da membrana de PHB, não irradiada e sem porosidade induzida (três réplicas).

Segundo Alarfaj et al. (2015), o polímero de PHB pode suportar temperaturas até aproximadamente 300 ºC sem se verificar uma perda significativa de massa da amostra. Contudo, o mesmo não se verificou com as membranas utilizadas neste trabalho. Isto pode dever-se ao método de produção das membranas de PHB e ao solvente utilizado na produção as mesmas. Propriedades como capacidade de dissolução, polaridade e não polaridade, volatilidade, entre outras características do solvente e o método de produção das membranas de PHB podem influenciar na cinética de degradação da membrana.

As membranas inteiras de PHB apresentaram uma T_f e $\Delta_f H$ de 148,3 ± 0,3°C e 37,6 ± 1,8 $J.g^{-1}$, respetivamente.

O grau de cristalinidade de um polímero (X_c) pode ser calculado através da respetiva $\Delta_f H$, de acordo com a equação (4.1):

$$X_C = \frac{\Delta_f H}{\Delta_0 H} \times 100 \qquad (4.1)$$

Em que:

X_C: Grau de cristalinidade (%);

$\Delta_f H$: Entalpia de fusão para o polímero cristalino (J.g^{-1});

$\Delta_0 H$: Entalpia de fusão da amostra polimérica obtida pela técnica DSC (J.g^{-1}).

Segundo Mallamaci et al. (2023), a $\Delta_f H$ para um polímero de PHB cristalino é de 146 J.g^{-1}. As membranas inteiras de PHB, não irradiadas e sem porosidade induzida, utilizadas ao longo deste trabalho, apresentam um grau de cristalinidade de 25,7 ± 1,8 %. Quanto maior

o grau de cristalinidade do polímero, maior será a resistência à degradação térmica do PHB (Pradhan et al., 2017).

Com o intuito de observar a organização superficial da membrana inteira de PHB, recorreu-se à análise de microscopia eletrónica de varrimento, designada por SEM. Na Figura 4.3 é possível visualizar-se alguns espaços vazios, sugerindo que a morfologia superficial da membrana é heterogénea. As membranas inteiras, apesar de não terem sido produzidas com recurso aos sais de NaCl ou à técnica de emulsão, apresentam nanocavidades, porosidade.

Estas nanocavidades podem dever-se à dispersão heterogénea do polímero PHB no clorofórmio e à respetiva cinética de evaporação do clorofórmio.

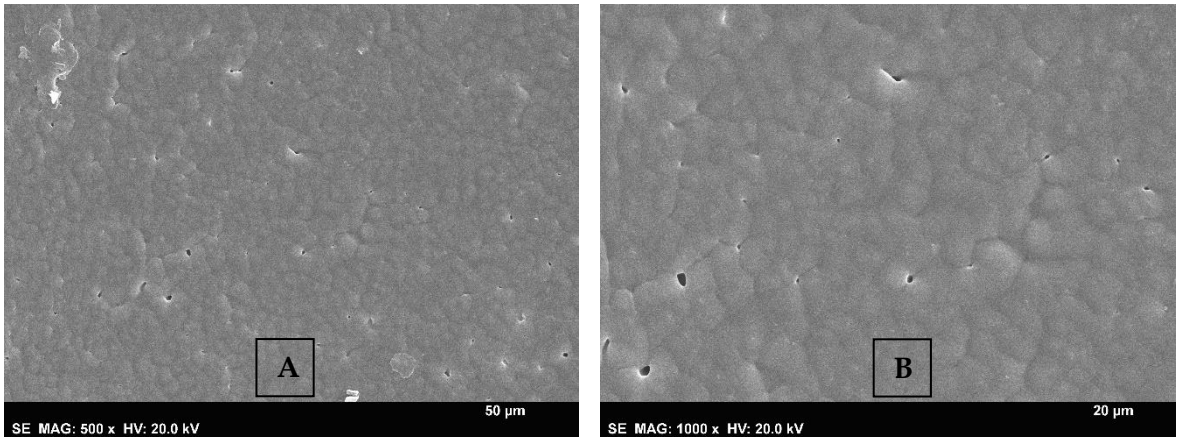


Figura 4.3-Imagem SEM da membrana de PHB, não irradiada e sem porosidade ([A] ampliação de 1000×; [B] ampliação de 500×).

As membranas apresentaram uma espessura que variou entre os 0,002 e 0,004 mm. Esta variância pode influenciar a cinética de biodegradação das membranas quando submetidas à DA. Ora, quanto maior for a espessura da membrana, maior será o tempo necessário para biodegradar a mesma.

Através da técnica de espectroscopia de aniquilação de positrões (PALS), verificou-se que os tamanhos dos poros das membranas variaram entre o, valor máximo de 0,2762 nm, e, o valor mínimo de, 0,2736 nm, apresentando um valor médio de 0,2749 nm.

As membranas de PHB foram analisadas pela técnica de FTIR (Figura 4.4). Nesta análise, foram identificadas bandas características a 1383 e 1462 cm^{-1} correspondentes aos grupos $-CH_3$ e $-CH_2$, respetivamente (Ansari & Fatma, 2016; Etxabide et al., 2022). A banda em 1720 cm^{-1} corresponde ao grupo carbonilo (C=O) (Etxabide et al., 2022) e o pico 1379 corresponde à ligação C−OH (Alarfaj et al., 2015). Segundo Alarfaj et al. (2015) e Etxabide et al. (2022), a banda compreendida entre 1057 e 1277 cm^{-1} correspondem a ligações C−O.

Bandas de absorção compreendida entre 2854 e 2959 cm^{-1} correspondem a ligações -CH. Já o pico em 1279 cm^{-1} corresponde à ligação assimétrica O−C−O, característica da ligação éster encontrada no polímero de PHB (Ansari & Fatma, 2016).

As ligações verificadas no espectro das membranas de PHB coincidem com as ligações mencionadas na literatura encontrada.

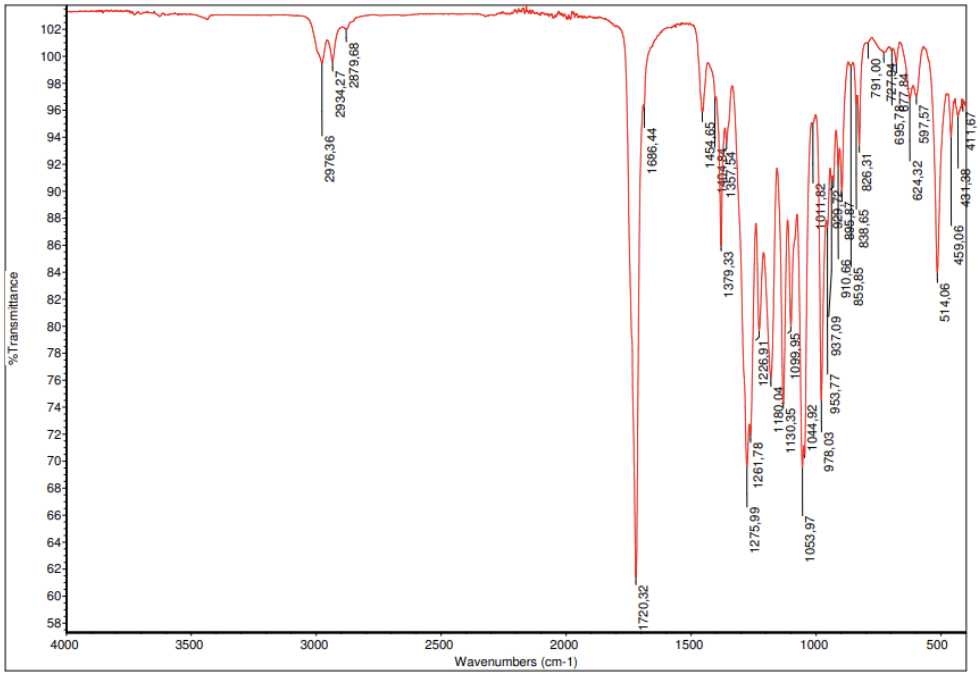


Figura 4.4- Espectro de transmitância (FTIR) da membrana de PHB, não irradiada e sem porosidade induzida.

4.1.3.2. Membranas irradiadas

Para averiguar qual a dose e atmosfera de irradiação que provocaria maior grau de desagregação das membranas inteiras de PHB, tornando-as mais facilmente biodegradáveis, foram realizadas várias irradiações.

Segundo Divyashree e Shamala (2009), quando os polímeros, neste caso o PHB, são sujeitos à radiação ionizante, verificam-se alterações na estrutura química dos mesmos. Estas alterações provocadas pela radiação incluem: reticulação e degradação. As alterações verificadas na estrutura do polímero dependem da intensidade e natureza da radiação, da natureza do polímero e mecanismos de reação (Chmielewski, Haji-Saeid, and Ahmed 2005).

As membranas inteiras de PHB foram sujeitas, inicialmente, à radiação gama, numa atmosfera inerte, contendo apenas N_2 (atmosfera inerte), e seguidamente numa atmosfera oxidante (atmosfera normal). Na Tabela 4.5 são apresentadas T_{Deg}, T_f, $\Delta_{Deg}H$, Δ_fH e X_C. As

irradiações que provocaram uma maior diminuição na $\Delta_{Deg}H$ foi a de 5 kGy, sob uma atmosfera oxidante, e a 12 kGy, sob uma atmosfera inerte.

Tabela 4.5- T_{Deg}, $\Delta_{Deg}H$, T_f, Δ_fH e X_c das membranas de PHB submetidas a diferentes doses de radiação gama e atmosferas ($\bar{x} \pm \sigma$).

Membranas submetidas à radiação gama								
	Atmosfera contendo oxigénio				Atmosfera inerte			
	1 kGy	3 kGy	5 kGy	12 kGy	1 kGy	3 kGy	5 kGy	12 kGy
T_{Deg} (ºC)	239,5±0,5	239,4±0,7	239,9±1,0	242,5±0,3	237,6±1,1	238,0±1,6	237,2±0,7	240,9±0,7
$\Delta_{Deg}H$ ($J.g^{-1}$)	581,1±12,8	616,3±98,7	487,3±107,5	570,6±76,3	659,0±31,3	639,2±26,5	643,1±30,3	536,6±225,7
T_f (ºC)	147,4±0,7	149,5±0,9	150,0±2,7	149,5±1,0	148,3±1,2	147,7±0,7	149,5±0,9	148,2±0,8
Δ_fH ($J.g^{-1}$)	31,2±7,8	31,2±1,9	29,4±3,2	33,1±5,6	34,9±1,5	30,1±5,0	33,0±2,3	42,4±1,7
$\mathbf{X_C}$ (%)	21,4±5,3	21,4±1,3	20,2±2,2	22,6±3,8	23,9±1,0	20,6±3,4	22,6±1,6	29,0±1,5

Era desejado, que com o aumento da dose de radiação se verificasse a uma diminuição da T_{Deg} e $\Delta_{Deg}H$. Contudo e segundo os resultados apresentados na Tabela 4.5 é possível verificar que tal não se sucedeu. Pelo contrário, para algumas das situações verificou-se o aumento dos referidos valores, o que poderá dever-se ao processo de *crosslinking*. Neste processo ocorre a criação de novas ligações covalentes entre as cadeias longas do polímero por efeito da energia absorvida pelo material por exposição à radiação γ. O *crosslinking* parece conferir assim à membrana uma maior resistência. Ou seja, quando se verifica o *crosslinking*, é necessário um valor de energia calorífica superior para degradar a membrana de PHB, em resultado do maior número de ligações químicas a destruir.

Em sentido oposto, as cadeias da matriz do PHB, quando são sujeitas a uma dose superior à qual ocorreu *crosslinking*, começam novamente a separar-se, pois absorvem energia suficiente para quebrar as ligações criadas no processo de *crosslinking* e as ligações covalentes intramoleculares, provocando a diminuição dos valores de T_{Deg} e $\Delta_{Deg}H$.

Na Tabela 4.5 também é possível visualizar-se a T_f e Δ_fH. Quanto maior for o X_c maior será a resistência à degradação térmica do PHB (Pradhan et al. 2017). A dose onde se verificou

um maior X_c foi a de 12 kGy numa atmosfera inerte, pois apresenta um valor de $\Delta_f H$ superior comparativamente aos outros valores observados.

Comparativamente com os valores obtidos com a membrana de PHB sem irradiação, é possível verificar-se que os valores obtidos na Tabela 4.5 são, na generalidade, superiores aos mencionados.

Nas Figuras 4.5 e 4.6 é possível visualizar-se as superfícies das membranas de PHB, quando sujeitas a 1 e 12 kGy de radiação γ, respetivamente. Comparando a superfície da membrana não irradiada (Figura 4.3) com a superfície da membrana irradiada a 1 kGy, numa atmosfera inerte na radiação γ, podemos verificar que aparentemente, não existem diferenças significativas. Em contrapartida, a membrana que foi sujeita a 12 kGy, parece ter sofrido *crosslinking*, evidenciando uma superfície mais uniforme e sem nanocavidades. O *crosslinking* é um processo que pode ocorrer ao longo de toda a espessura da membrana, devido à exposição à radiação γ.

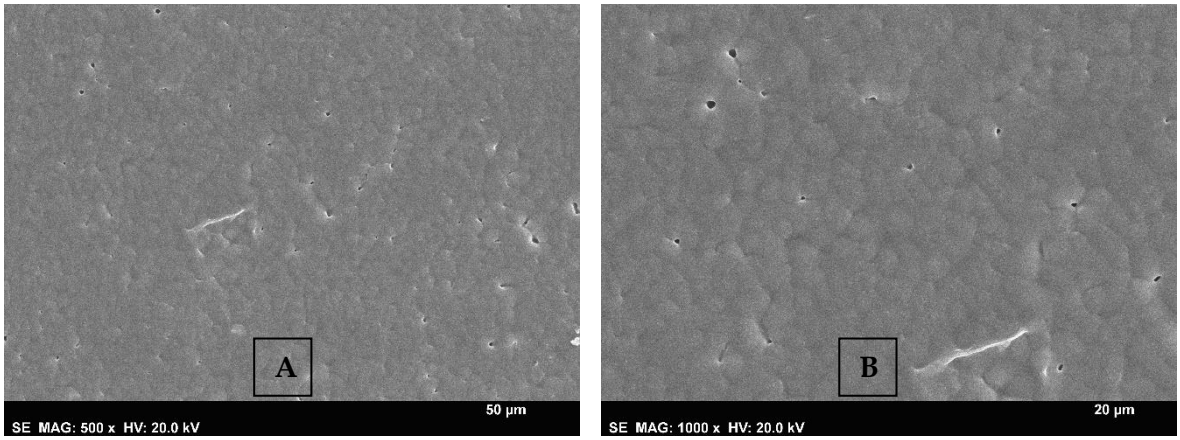


Figura 4.5- Imagens SEM da membrana inteira irradiada com radiação gama a 1 kGy numa atmosfera inerte, com uma [A] ampliação de 500 x e [B] ampliação de 1000 x.

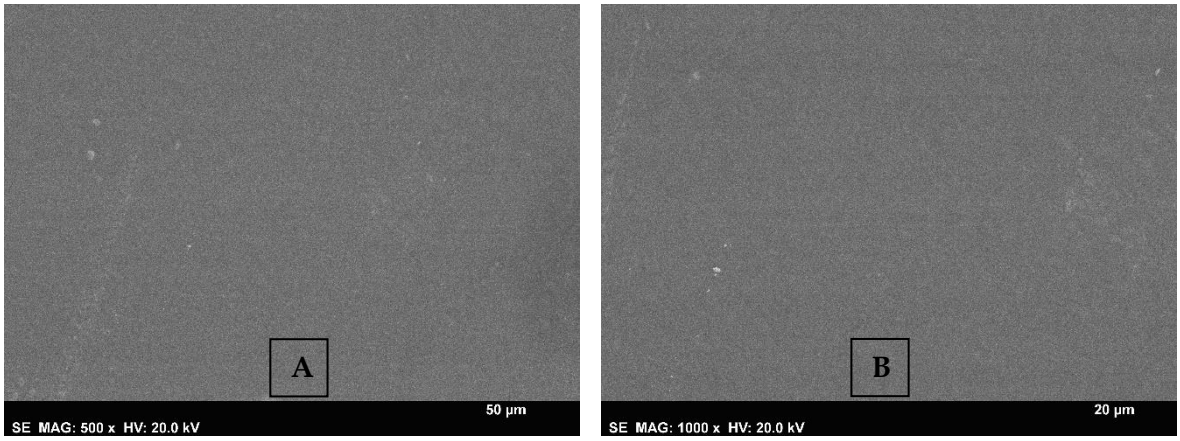


Figura 4.6- Imagens SEM da membrana inteira irradiada com radiação gama a 12 kGy numa atmosfera inerte, com [A] ampliação de 500 x e [B] ampliação de 1000 x.

Na técnica PALS, com o aumento da dose de radiação, até aos 5 kGy, verificou-se a diminuição gradual do tamanho dos poros (Figura 4.7). Contudo, quando aplicada uma dose de 12 kGy houve uma inversão da tendência, verificando-se um aumento do tamanho dos poros. O processo de crosslinking promove a reticulação das cadeias que constituem a matriz polimérica, porém quando a membrana é sujeita a uma determinada dose pode verificar-se um efeito parcialmente destrutivo da radiação, provocando o aumento do tamanho dos poros.

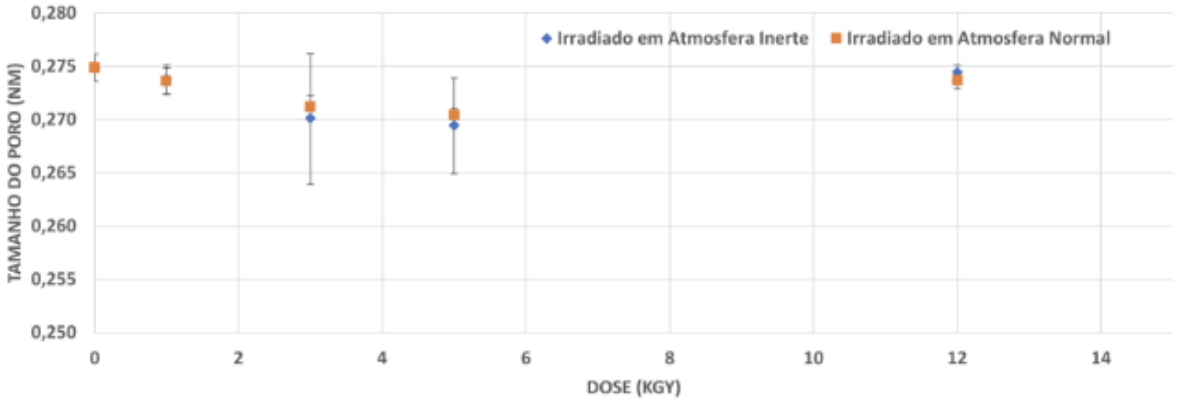


Figura 4.7- Evolução do tamanho dos poros de PHB em função da dose de radiação γ , em atmosfera inerte e numa atmosfera contendo oxigénio, até uma dose máxima de 12 kGy.

Na espectroscopia de infravermelhos não se verificou diferenças significativas nas ligações e composição das membranas irradiadas com radiação γ.

No AE, as membranas foram irradiadas com 12, 30 e 50 kGy, todas numa atmosfera oxidante (Tabela 4.6). A dose onde se verificou menor valor de T_{Deg} e $\Delta_{Deg}H$ foi a de 50 kGy numa atmosfera oxidante, registando valores de 240,6 ± 0,5 ^{o}C e 504,3 ± 43,6 J.g^{-1},

respetivamente. Nas Tabelas 4.6 e 4.5 é possível verificar-se que a dose de 50 kGy no AE teve valores semelhantes à de 12 kGy na radiação γ numa atmosfera inerte.

Tabela 4.6- T_{Deg}, $\Delta_{Deg}H$, T_f, Δ_fH e X_c submetidas a diferentes doses de radiação no AE e numa atmosfera contendo oxigénio ($\bar{x} \pm \sigma$).

Membranas submetidas à irradiação por Acelerador de Eletrões			
Atmosfera contendo oxigénio			
	12 kGy	30 kGy	50 kGy
T_{Deg} (ºC)	239,8±0,8	239,2±1,7	240,6±0,5
$\Delta_{Deg}H$ (J.g^{-1})	660,7±38,4	685,0±5,7	504,3±43,6
T_f (ºC)	148,9±0,5	148,7±3,4	150,0±0,1
Δ_fH (J.g^{-1})	30,4±2,2	29,4±3,2	32,4±6,8
$\mathbf{X_C}$(%)	20,8±1,5	20,1±2,2	22,2±4,6

Na Tabela 4.6, é possível verificar-se que a dose na qual se obteve um menor X_c da membrana de PHB foi a 30 kGy. Contudo, a membrana submetida a esta dose de radiação apresentou um valor de $\Delta_{Deg}H$ superior comparativamente ao valor apresentado na dose de 50kGy.

Nas Figuras 4.8 e 4.9 é possível visualizar-se imagens SEM das membranas irradiadas no AE a 12 e a 50 kGy, respetivamente. Na Figura 4.9, relativa à dose de radiação de 50 kGy, é possível observar-se um maior número de nanocavidades e depressões em comparação às imagens SEM das membranas de PHB com ou sem irradiação, como por exemplo é possível visualizar-se nas Figuras 4.5 e 4.3.

Como mencionado anteriormente, a energia fornecida pelo AE provém de um feixe de partículas eletricamente carregadas (eletrões) que podem induzir maior grau de destruição à superfície das membranas irradiadas (Drobny, 2013).

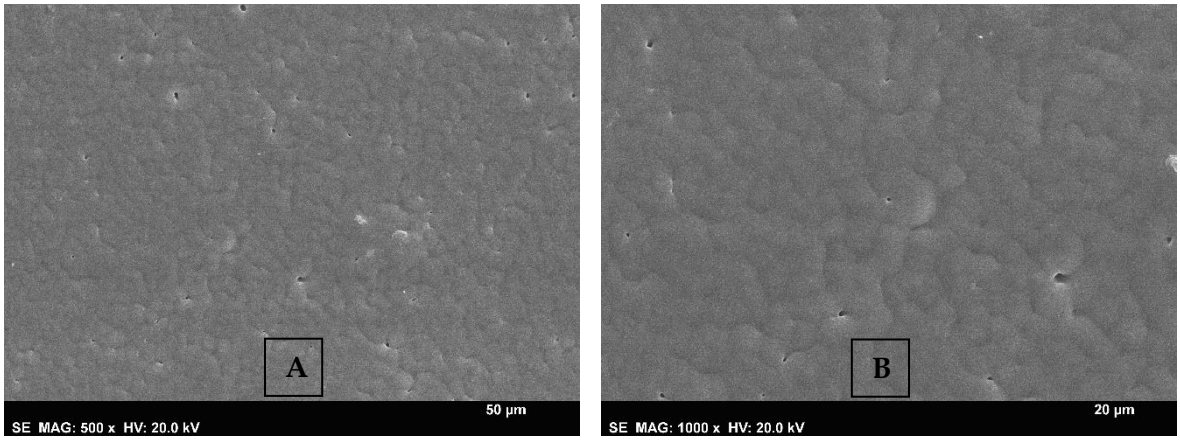


Figura 4.8- Imagens SEM da membrana inteira irradiada no AE a 12 kGy, numa atmosfera na presença contendo oxigénio, com [A] ampliação de 500 x e [B] ampliação de 1000 x.

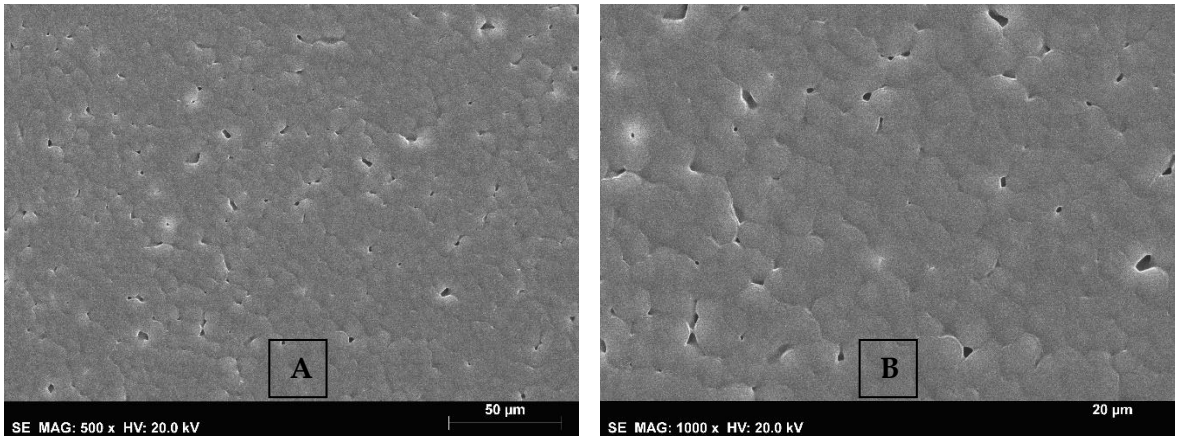


Figura 4.9- Imagens SEM da membrana inteira irradiada no AE a 50 kGy, numa atmosfera contendo de oxigénio, com [A] ampliação de 500 x e [B] ampliação de 1000 x.

É importante realçar que na técnica SEM apenas é possível visualizar-se as nanocavidades e organização à superfície da membrana e não o seu interior.

Na técnica PALS (Figura 4.10) a dose de 50 kGy foi a que apresentou um maior diâmetro dos poros, com um valor médio de 0,276 nm, aproximadamente.

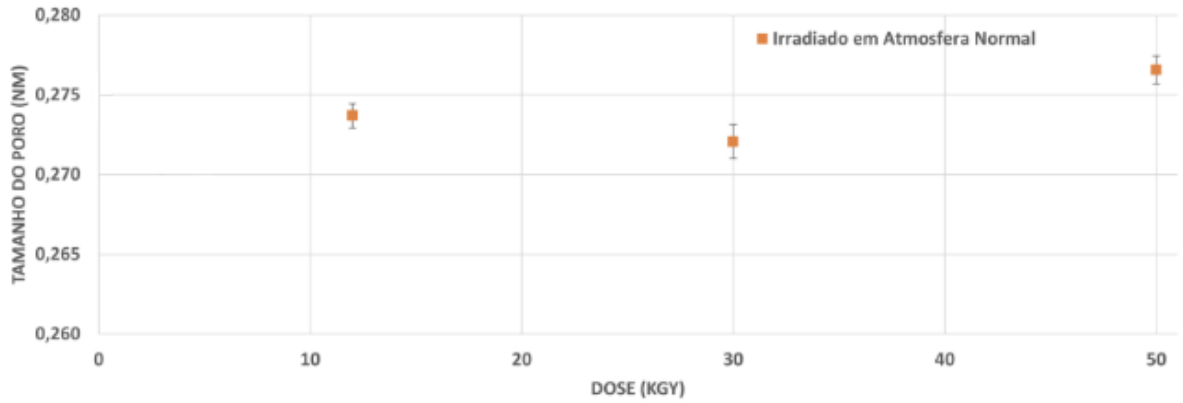


Figura 4.10- Evolução do tamanho dos poros de PHB em função da dose do AE, numa atmosfera contendo oxigénio, até uma dose máxima de 50kGy.

Na espectroscopia de infravermelhos não se verificou diferenças significativas nos picos de absorção característicos das membranas irradiadas no AE comparativamente às membranas não irradiadas.

4.2. Caracterização de sólidos e CQO da mistura colocada nos biorreatores no início do ensaio de DA e dos digeridos obtidos no final dos ensaios de DA

Na Tabela 4.7 apresenta-se a caracterização dos parâmetros físicos-químicos da mistura colocada nos biorreatores no início do ensaio de DA (MI_{DA}) e dos digeridos obtidos no final dos ensaio de DA (D_{DA}).

Os valores dos parâmetros físico-químicos de cada ensaio foram discutidos no respetivo subcapítulo e foram realizadas comparações entre os valores apresentados nos outros ensaios.

Os resultados obtidos na caracterização da mistura colocada no início da DA do EMI, foram utilizados como referência para misturas colocadas no início da DA dos seguintes ensaios: *i*) Ensaio com inóculo, substrato e membrana porosa produzida com sais de NaCl (EMP_{NaCl}); *ii*) Ensaio com inóculo, substrato e membrana porosa produzida com a técnica de emulsão (EMP_{H2O}); *iii*) Ensaio com inóculo, substrato e membrana fragmentada (EMF).

A membrana utilizada no EMI é idêntica às membranas utilizadas nos outros ensaios mencionados, com a única diferença de possuir um menor grau de porosidade e não ter sido sujeita a um pré-tratamento mecânico, corte.

Tabela 4.7- Concentração de sólidos, CQO_T, CQO_S, ER de SV e CQO_T e valores de pH do EB, EMI, EMP_{NaCl}, EMP_{H2O}, EMF, EIMF e EMI_{50} ($\bar{x} \pm \sigma$).

	Parâmetros									
	ST ($g.L^{-1}$)	SF ($g.L^{-1}$)	SV ($g.L^{-1}$)	CQO_T ($gO_2.L^{-1}$)	CQO_S ($gO_2.L^{-1}$)	*ER de SV* (%)	*ER de CQO$_T$* (%)	pH_I	pH_{1d}	pH_F
Ensaio em branco (EB)										
MI_{DA}	21,4±0,4	6,37±0,1	15,0±0,3	24,0±0,7	8,8±0,0	-	-	8,5±0,0	-	-
D_{DA}	16,0±0,4	8,8±1,1	7,23±0,6	14,0±0,0	3,7±1,0	51,8±0,7	41,7±0,7	8,5±0,0	7,8±0,3	8,5±0,2
Ensaio com inóculo, substrato e membrana inteira (EMI)										
MI_{DA}	27,3±0,0	6,0±0,1	21,3±0,1	28,8±1,8	8,8±0,0	-	-	8,5±0,0	-	-
D_{DA}	17,0±0,4	8,5±0,3	8,5±0,7	16,2±0,8	4,4±0,4	60,1±0,7	43,8±2,0	8,5±0,0	7,9±0,1	8,1±0,1
Ensaio com inóculo, substrato e membrana porosa produzida com sais de NaCl (EMP_{NaCl})										
D_{DA}	15,5±0,3	6,7±0,1	8,76±0,17	28,7±2,3	6,9±0,9	58,9±0,2	0,4±2,9	8,5±0,0	8,0±0,0	8,3±0,0
Ensaio com inóculo, substrato e membrana porosa produzida com a técnica de emulsão (EMP_{H2O})										
D_{DA}	18,1±0,5	7,3±0,3	10,8±0,7	17,0±1,0	4,4±0,8	49,3±0,7	41,0±2,1	8,5±0,0	7,8±0,0	8,5±0,0
Ensaio com inóculo, substrato e membrana fragmentada (EMF)										
D_{DA}	16,4±0,5	8,3±0,6	8,1±0,2	14,0±1,0	4,1±0,2	62,0±0,2	51,4±2,1	8,5±0,0	8,0±0,0	8,3±0,0
Ensaio com inóculo e membrana fragmentada (EIMF)										
MI_{DA}	35,4±1,0	10,1±0,1	25,3±0,8	39,0±0,7	9,6±1,6	-	-	8,4±0,0	-	-
D_{DA}	26,3±0,8	10,4±1,2	15,9±1,4	23,2±0,8	8,3±0,5	37,2±1,6	40,5±1,1	8,4±0,0	8,4±0,1	8,7±0,0
Ensaio com inóculo, substrato e membrana inteira irradiada a 50 kGy no AE (EMI_{50})										
MI_{DA}	31,4±0,0	7,5±0,0	23,9±0,0	28,3±1,8	8,8±0,0	-	-	8,5±0,0	-	-

D_{DA}	19,8±0,2	7,7±0,3	12,1±0,2	19,2±0,6	8,4±0,0	49,4±0,2	32,2±1,89	8,47±0,0	7,4±0,1	8,7±0,112345

[1] pH_0- pH registado no início do ensaio, dia 0
[2] pH_1- pH registado no primeiro dia de ensaio, dia 1
[3] pH_F- pH registado no fim do ensaio
[4] MI_{DA}- Mistura colocada nos biorreatores no início do ensaio da DA
[5] D_{DA}- Digerido obtido no final do ensaio de DA

4.2.1. Ensaio B (EB)

Na Tabela 4.7 estão apresentados os valores dos parâmetros físico-químicos do D_{DA} decorrentes do EB, ensaio constituído por inóculo e substrato.

Segundo Liotta et al. (2014), o teor de ST para a DA húmida deve ser inferior a 10 % ($m.m^{-1}$). A percentagem de ST no EB foi de 1,7 %, o que representa uma percentagem relativamente baixa. Segundo Liotta et al. (2014), elevados teores de ST podem induzir a acidificação do processo, devido à produção excessiva de AGV. A acidificação do meio não permite que a fase da metanogénese ocorra de forma estável, inibindo o crescimento e desenvolvimento das *archaea* metanogénicas e, consequentemente, a produção de metano. Neste ensaio, é possível verificar-se que o mesmo não aconteceu. O pH registado no último dia de ensaio encontra entre a gama de valores ótimos para a fase de metanogénese, 6,5 a 8 (Ajayi-Banji & Rahman, 2022; Jain et al., 2015).

A eficiência de remoção (ER) de SV é um importante indicador para avaliar o desempenho dos microrganismos dentro do biorreator e, consequentemente, está relacionado com a produção de biogás. A ER de SV no EB foi de 51,8 % (Tabela 4.7), atingindo uma produção acumulada de biogás de 708 $mL.g_{SV}^{-1}$ (Figura 4.11). O EB foi o 4º ensaio onde se verificou maior produção de biogás, com uma ER de CQO_T de 41,7 %.

Na Figura 4.11 está representado o RA_B, com o ajustamento do modelo modificado de Gompertz. Como é possível visualizar, existem dois patamares de produção de biogás. O primeiro patamar de produção, mesmo que ténue, ocorre do 1º até ao 4º dia de ensaio, com uma produção média diária de 33,5 $mL.(g_{SV}.d)^{-1}$. O segundo patamar de produção ocorre após o 4º dia até ao 20º dia de ensaio, com uma produção média diária de 35,0 $mL.(g_{SV}.d)^{-1}$. Após o 20º dia de ensaio, a produção média diária foi apenas de 6,15 $mL.(g_{SV}.d)^{-1}$, indicando o fim do ensaio.

Observou-se uma *lagphase* (λ) de um dia, indicando que houve um crescimento rápido da população *archaea* metanogénicas. O inóculo utilizado nos ensaios, foi recolhido de dois digestores anaeróbios metanogénicos. Isto permite que a produção de metano se inicie logo no início do ensaio, visto que o inóculo apresente um consórcio microbiano rico em bactérias das quatro fases da DA.

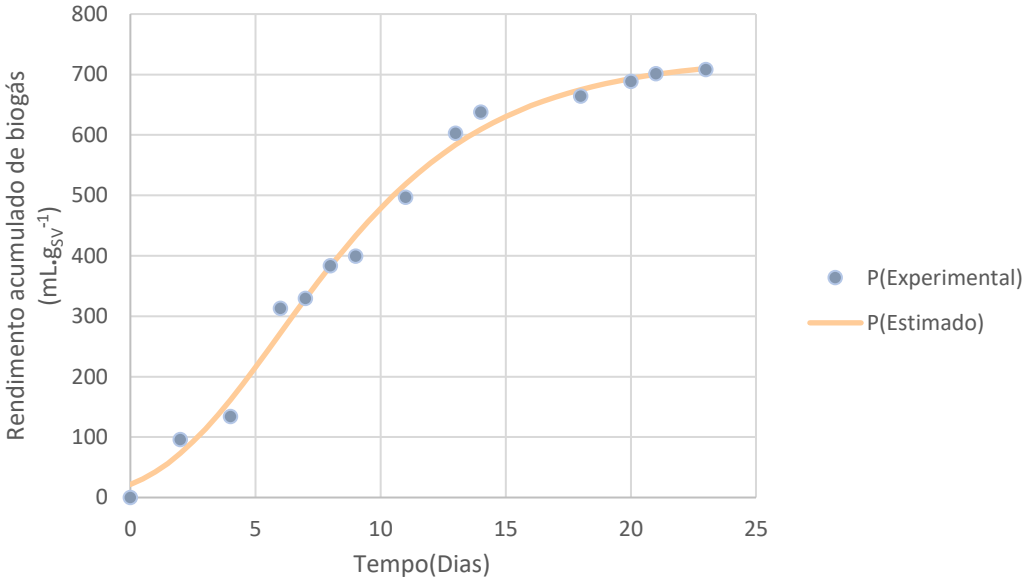


Figura 4.11- RA_B produzido ao longo do EB, com ajustamento do modelo modificado de Gompertz.

Na Figura 4.12 é possível visualizar-se a composição do biogás do EB. A percentagem de metano aumenta de forma constante até ao 9º dia de ensaio. Do 9º dia até ao 11º dia de ensaio verifica-se uma diminuição do volume de metano produzido comparativamente ao volume produzido anteriormente. Segundo Rocamora et al. (2020), a diminuição da produção de metano pode estar relacionada com o aumento de AGV, inibindo ou diminuindo a atividade das *archaea* metanogénicas. Este fenómeno ocorre quando a produção de AGV, durante a fase da hidrólise, é superior comparativamente à sua assimilação durante a fase da acetonogénese e metanogénese. Contudo, a percentagem final de metano encontra-se entre a gama de valores obtidos nos outros ensaios (45 a 78 % v.v^{-1} de metano).

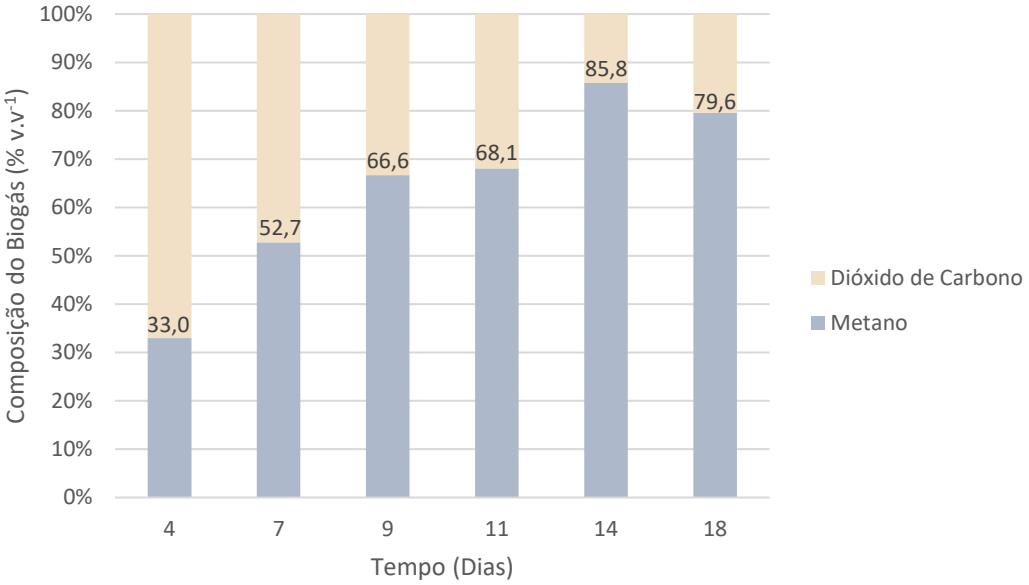


Figura 4.12- Composição do biogás ao longo do EB.

Na Tabela 4.8 é possível visualizar-se os parâmetros cinéticos do modelo modificado de Gompertz e o coeficiente de correlação entre os dados experimentais e os dados estimados por este modelo. Segundo este modelo, obteve-se um produção total de 729 mL.g_{SV}^{-1} e uma produção média máxima diária 57,0 mL.(g_{SV}.d)$^{-1}$. O coeficiente de correlação obtido neste ensaio apresentou uma excelente aproximação, 0,9916.

4.2.2. Ensaio MI (EMI)

Na Tabela 4.7 é possível visualizar-se os resultados dos parâmetros físicos-químicos da MI_{DA} e do D_{DA} do EMI, ensaio constituído por inóculo, substrato e membrana inteira.

Neste ensaio, a ER de SV foi de 60,1 % e a ER de CQO_T de 43,8 %. Apesar de não ter sido o ensaio que apresentou o valor mais elevado de ER de SV, foi ensaio onde se verificou maior volume de biogás produzido, 827 mL.g_{SV}^{-1}. A ER de SV reflete a eficácia do processo de remover e degradar os sólidos voláteis presentes na amostra. A ER de CQO_T, por sua vez, indica a eficiência do processo de remover o carbono orgânico total de uma amostra ou sistema.

A inserção de membranas de PHB nos ensaios de DA constituem uma fonte adicional de C e energia para os microrganismos. Neste sentido, é expectável que os ensaios que contêm membranas de PHB apresentem uma produção de biogás maior comparativamente ao EB.

Na Tabela 4.4, é possível verificar-se que a membrana de PHB apresenta um alto teor de SV, sendo que é esperado que a inserção da membrana nos ensaios da DA aumente o teor de SV no D_{DA} comparativamente ao EB. Como é possível visualizar-se na Tabela 4.7, todos os ensaios, constituídos por inóculo, substrato e membrana de PHB, apresentam teores de SV no D_{DA} superiores ao teor de SV do D_{DA} no EB.

Na Figura 4.13 é possível visualizar o RA_B do EMI com o ajustamento do modelo modificado de Gompertz. Este ensaio teve uma duração de 23 dias. É possível verificar-se uma λ inicial na produção de biogás. Esta fase, que se deve à adaptação dos microrganismos a novas condições, teve uma duração aproximada de dois dias. Após uma fase exponencial de produção de biogás muito curta, de aproximadamente 2 dias, é possível visualizar-se a primeira fase estacionária. Os microrganismos consomem primeiro as substâncias mais facilmente biodegradáveis, como por exemplo as substâncias dissolvidas que se encontram no substrato orgânico. De uma forma geral, são substâncias que requerem menos energia por parte dos microrganismos para serem biodegradadas. Após o 7º dia de ensaio, verifica-se a segunda fase exponencial de produção de biogás. Nesta fase, substâncias mais complexas são biodegradadas. Após o 21º dia de ensaio, verifica-se a segunda fase estacionária.

Apesar de ter sido o ensaio no qual se obteve um maior volume acumulado de biogás, foram necessários 23 dias para atingir esta produção.

Neste ensaio, as membranas inteiras deixaram de ser visíveis, por observação direta, após o 6º dia de ensaio, o que corresponde ao início da segunda fase exponencial de produção de biogás. Este facto sugere que inicialmente os microrganismos consumiram primeiro o substrato e só após o 6º dia de ensaio iniciaram o consumo da membrana de PHB.

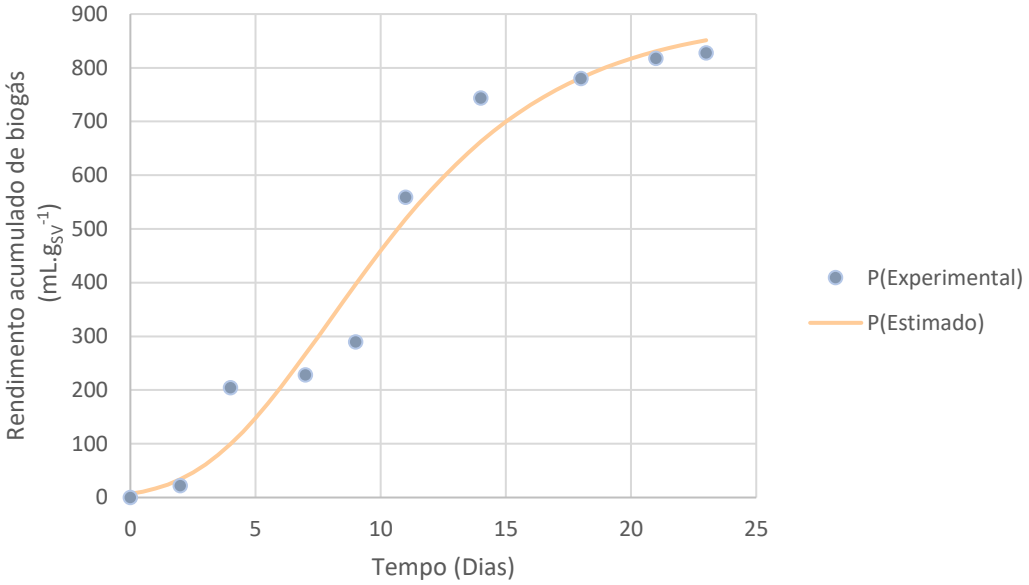


Figura 4.13- RA_B produzido ao longo do EMI, com o ajustamento do modelo modificado de Gompertz.

Na Figura 4.14 está representada a composição do biogás ao longo do EMI, até ao 18º dia. Ao longo do ensaio não se verificou a formação de outros gases para além de metano e dióxido de carbono.

É possível verificar-se que, após o 7º dia de ensaio, a percentagem de metano no biogás aumenta significativamente (de 33,3 para 73,1% $v.v^{-1}$). É de realçar que este aumento do teor de metano coincide com o desaparecimento da membrana de PHB por observação direta e com a produção exponencial de biogás.

À medida que a percentagem de metano aumenta, chegando até os 80,1 % $v.v^{-1}$, a percentagem de dióxido de carbono diminui. Registou-se um volume acumulado de metano aproximado de 625 $mL.g_{SV}^{-1}$, num volume total de biogás de 780 $mL.g_{SV}^{-1}$, ao 18º dia.

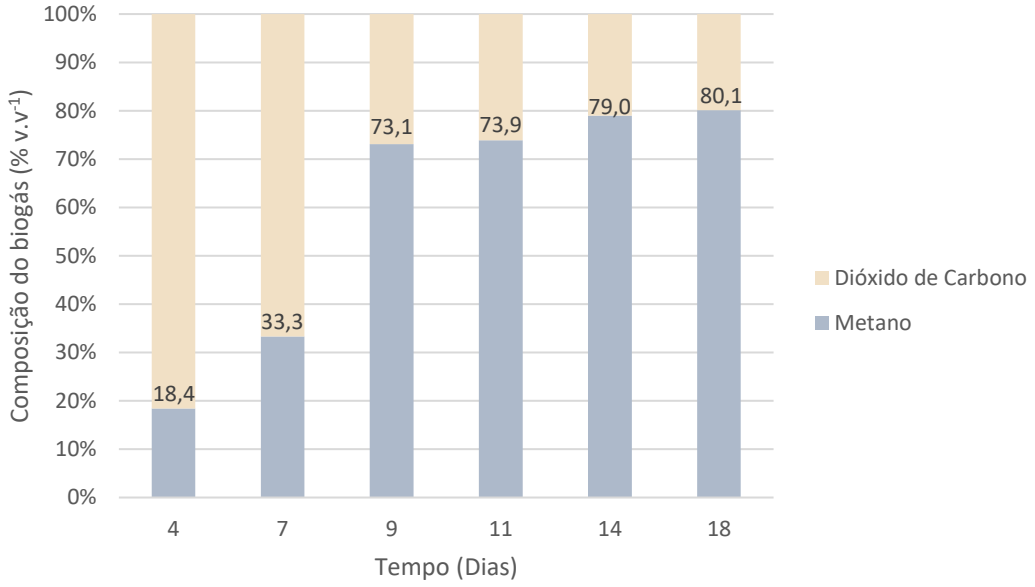


Figura 4.14- Composição do biogás ao longo do EMI.

Os parâmetros cinéticos do modelo modificado de Gompertz e o respetivo coeficiente de correlação estão apresentados na Tabela 4.8.

Com o modelo modificado de Gompertz verificou-se uma produção máxima de 895 mL.g_{SV}^{-1} e uma produção máxima diária de 65,4 mL.(g_{SV}.d)$^{-1}$. Comparando com o ensaio anterior, é possível verificar-se que este ensaio com a membrana inteira teve uma produção superior, aproximadamente em 100 mL.g_{SV}^{-1}, contudo teve uma λ superior.

Neste ensaio obteve-se um coeficiente de correlação de 0,9671 entre os valores experimentais e os valores estimados pelo modelo modificado de Gompertz.

4.2.3. Ensaio MP_{NaCl} e ensaio MP_{H2O} (EMP_{NaCl} e MP_{H2O})

Na Tabela 4.7 é possível visualizar-se os resultados dos parâmetros físicos-químicos D_{DA} do EMP_{NaCl}, ensaio constituído por inóculo, substrato e membrana porosa produzida com sais de NaCl.

Este ensaio apresentou um valor de ER de SV de 58,9 % e de ER de CQO de 0,4 % (Tabela 4.7). O teor elevado de CQO_T e CQO_S no D_{DA} deve-se ao facto destas membranas terem sido produzidas com recurso de sais de NaCl. Apesar das membranas terem sido lavadas com água milli-Q, com o intuito de remover os sais de NaCl contidos à superfície da membrana,

verificou-se que no interior das mesmas permaneceram partículas deste sal. Estas partículas foram libertadas quando as membranas de PHB começaram a ser biodegradadas, influenciando os valores destes parâmetros.

O ião cloreto é um dos interferentes na quantificação da CQO, contribuindo para o aumento do seu valor por oxidação pelo dicromato de potássio, sem que isso represente um aumento da matéria orgânica no meio.

Embora o ião sódio seja essencial para o crescimento bacteriano, elevadas concentrações do ião sódio podem provocar *stress* osmótico nas células, causando a inibição da atividade microbiana (Lee et al., 2021; Suwannoppadol et al., 2012). Isto provoca a acumulação de AGV, diminuindo o valor do pH e, consequentemente, a produção de biogás.

Na Figura 4.15 é possível visualizar-se o RA_B no EMP_{NaCl} com o ajustamento do modelo modificado de Gompertz. Existindo a forte possibilidade de existirem sais de NaCl intrínsecos na membrana, verificou-se que a produção de biogás não ultrapassou os 500 $mL.g_{SV}^{-1}$. Este valor é significativamente inferior ao registado nos restantes ensaios, incluindo o EB.

Observou-se a existência de uma λ, no qual os microrganismos demoraram cerca de três dias para se adaptarem às condições do novo meio e produzirem biogás. A λ observada neste ensaio foi a mais elevada visualizada entre todos os ensaios realizados. Neste ensaio observou-se duas fases estacionárias. A primeira fase estacionária ocorreu do 7º ao 9º dia de ensaio e a segunda fase após o 18º dia.

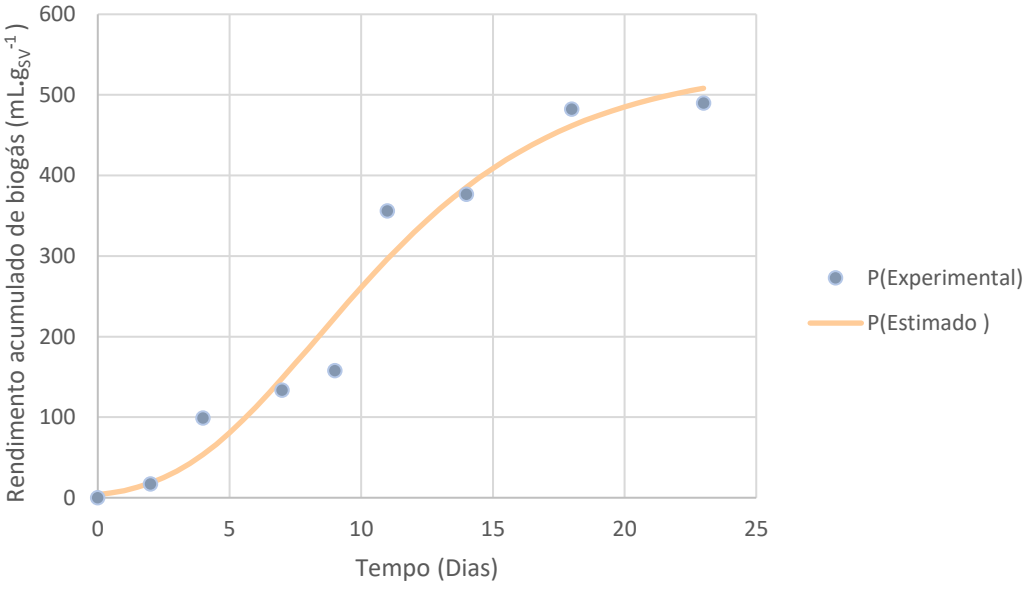


Figura 4.15- RA_B produzido ao longo do EMP_{NaCl}, com o ajustamento do modelo modificado de Gompertz.

Na Figura 4.16 está representada a composição do biogás ao longo do ensaio, até ao 18º dia. A percentagem de metano ao 18º dia do EMP_{NaCl} foi ligeiramente inferior comparativamente ao EMI. Contudo, o volume de metano produzido durante este ensaio não ultrapassou os 400 $mL.g_{SV}^{-1}$, o que representa cerca de metade do volume de biogás produzido no EMI.

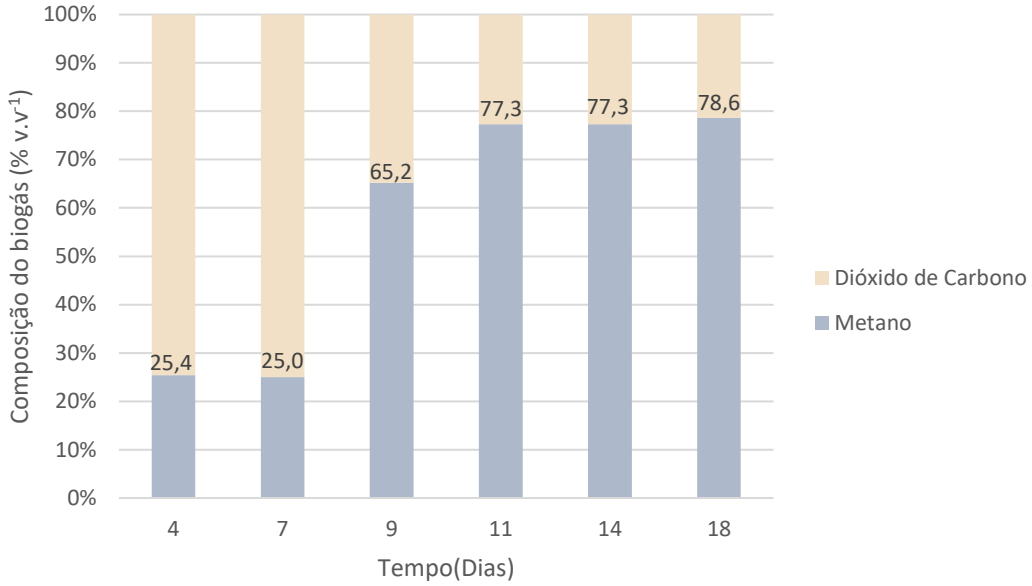


Figura 4.16- Composição do biogás ao longo do EMP_{NaCl}.

Os parâmetros cinéticos do modelo modificado de Gompertz e o respetivo coeficiente correlação estão apresentados na Tabela 4.8. Obteve-se uma produção máxima de biogás 539 $mL.g_{SV}^{-1}$ e uma produção máxima diária de 38,2 $mL.(g_{SV}.d)^{-1}$.

Os valores estimados e experimentais apresentam uma boa aproximação (R^2=0,9634).

Após ter sido detetada a influência negativa da utilização de NaCl na produção das membranas porosas, produziram-se três novas membranas porosas através da técnica de emulsão. Na Tabela 4.7 é possível visualizar-se os resultados dos parâmetros físicos-químicos do D_{DA} do EMP_{H2O}, ensaio constituído por inóculo, substrato e membrana porosa produzida através da técnica de emulsão.

Comparativamente aos ensaios constituídos por inóculo, substrato e membrana de PHB (sem irradiação), é possível verificar que este ensaio, EMP_{H2O}, apresentou um valor de SV no D_{DA} superior comparativamente aos outros ensaios. Este facto sugere que ainda existia MO para ser consumida pelos microrganismos, podendo tratar-se de substrato dificilmente biodegradável. A ER de SV neste ensaio foi apenas de 43,3 %.

Na Figura 4.17 é possível visualizar-se a RA_B com o ajustamento do modelo modificado de Gompertz do EMP_{H2O}. A λ foi inexistente, ou seja, a produção do biogás iniciou-se desde o 1º dia de ensaio. A porosidade promove o contacto entre os microrganismos e a membrana de PHB, aumentando as áreas de possível consumo para os microrganismos. Deste modo, a produção de biogás foi imediata e mais constante ao longo do tempo, não se verificando a existência de dois patamares de produção de biogás.

Ao 7º dia de ensaio obteve-se, particamente, o volume máximo acumulado de biogás.

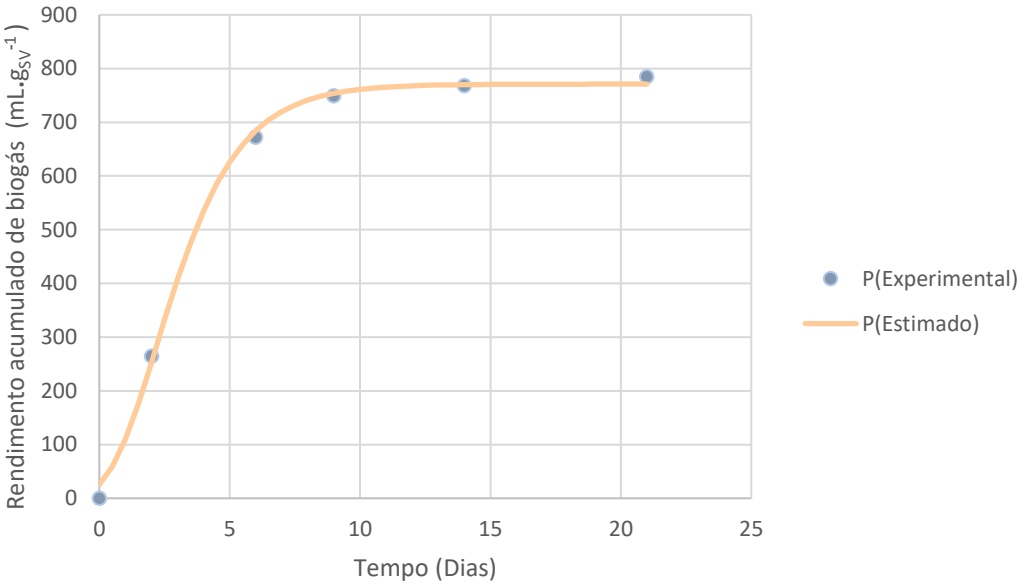


Figura 4.17- RA_B produzido ao longo do EMP_{H2O}, com o ajustamento do modelo modificado de Gompertz.

Na Figura 4.18 está representada a composição do biogás ao longo do ensaio, até ao 9º dia. O volume de metano acumulado, até ao 9º dia de ensaio, foi de 550 mL.g_{SV}^{-1} num volume acumulado de biogás de 749 mL.g_{SV}^{-1}. A percentagem de metano ao 9º dia de ensaio, 73,4 % v.v^{-1}, encontra-se dentro da gama de valores observados nos outros ensaios (45 a 78 % v.v^{-1} de metano).

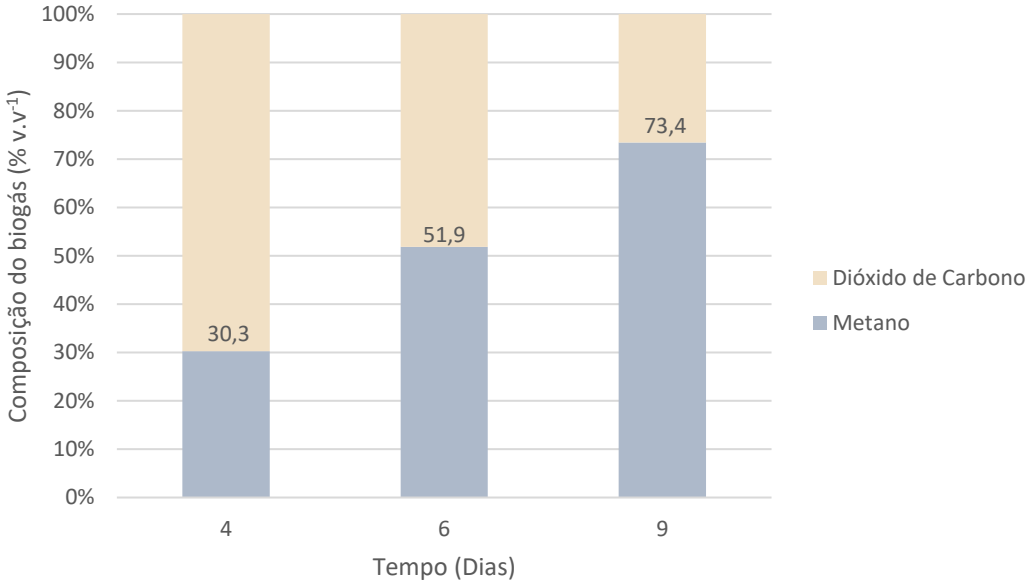


Figura 4.18- Composição do biogás ao longo do EMP_{H2O}.

Os parâmetros cinéticos do modelo modificado de Gompertz e o respetivo coeficiente de correlação estão apresentados na Tabela 4.8. O coeficiente de correlação neste ensaio, entre os dados experimentais e os estimados, foi o que apresentou o valor mais próximo de 1, R^2= 0,9983, apresentando uma excelente aproximação. Este ensaio foi o que apresentou uma maior produção máxima diária de biogás, com um valor de 158 $mL.(g_{SV}.d)^{-1}$.

4.2.4. Ensaio MF (EMF)

Na Tabela 4.7 é possível visualizar-se os resultados dos parâmetros físicos-químicos do D_{DA} do EMF, ensaio constituído por inóculo, substrato e membrana fragmentada.

A membrana fragmentada resultou da segmentação física, por corte, de uma membrana inteira. Este procedimento permite que os microrganismos tenham uma maior área de contacto com a matriz polimérica da membrana de PHB.

Este ensaio foi o que apresentou um maior valor ER de SV e ER de CQO_T, indicando que, comparativamente com os outros ensaios, houve maior biodegradação da MO e da membrana de PHB. Neste ensaio obteve-se uma produção acumulada de biogás de 731 $mL.g_{SV}^{-1}$ (Figura 4.19). O EMF foi o terceiro ensaio onde se obteve uma maior produção de biogás.

Na Figura 4.19 é possível visualizar-se o RA_B produzido ao longo do ensaio EMF, com o ajustamento do modelo modificado de Gompertz. A fase λ é inexistente, mas é possível visualizar-se duas fases de produção de biogás. Verifica-se a primeira fase estacionária entre o 7º e o 9º dia de ensaio e a segunda fase após o 14º dia. A produção acumulada de biogás até ao 4º dia de ensaio foi superior comparativamente aos outros ensaios, exceto no caso do ensaio MP_{H2O}.

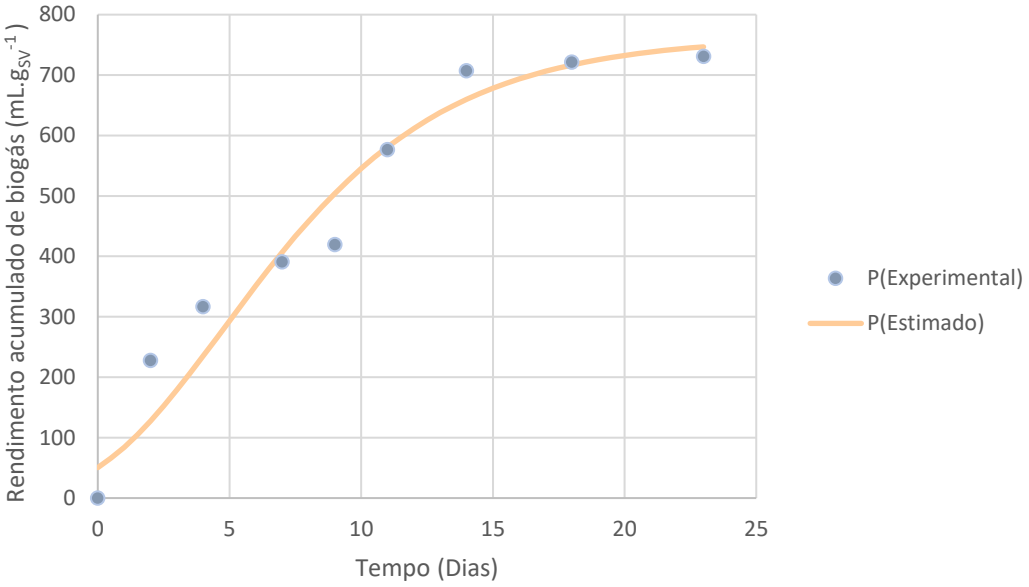


Figura 4.19- RA_B produzido ao longo do EMF, com o ajustamento do modelo modificado de Gompertz.

Na Figura 4.20 está representada a composição do biogás ao longo do ensaio EMF. É possível verificar-se que a percentagem de metano diminuiu do 4º ao 7º dia de ensaio, tal como ocorreu no EMP_{NaCl}.

A diminuição da percentagem de metano pode dever-se à acidificação do meio. A membrana de PHB fragmentada pode representar uma sobrecarga orgânica no digestor. Esta sobrecarga pode provocar a acumulação AGV, provocando a acidificação do meio. As *archaea* metanogénicas só produzem metano em meios neutros a ligeiramente alcalinos.

Neste ensaio, ao 11º dia, obteve-se uma produção acumulada de metano de 433 $mL.g_{SV}^{-1}$, num volume acumulado de biogás de 576 $mL.g_{SV}^{-1}$.

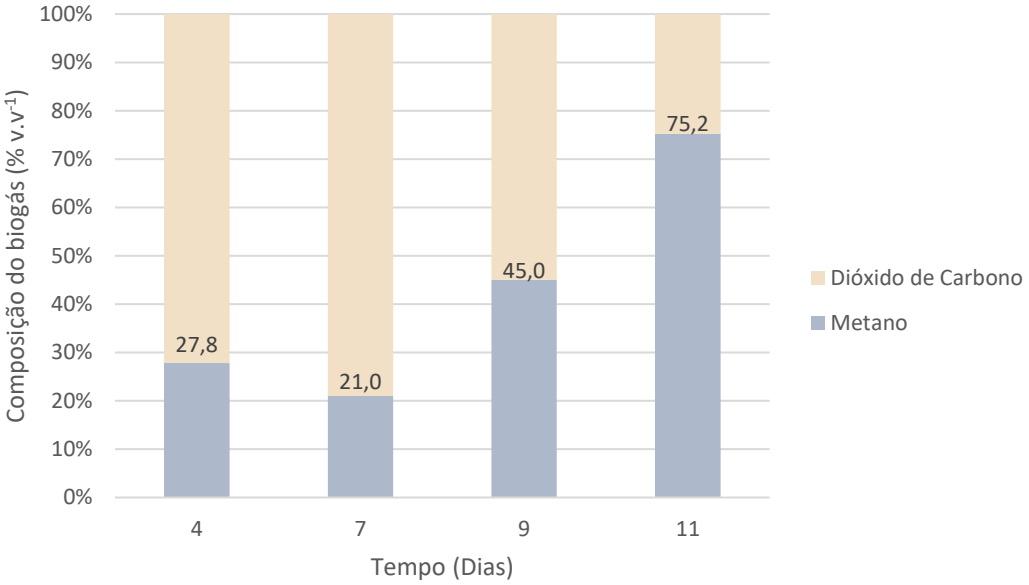


Figura 4.20- Composição do biogás ao longo do EMF da DA.

Os parâmetros cinéticos do modelo modificado de Gompertz e o respetivo coeficiente de correlação estão apresentados na Tabela 4.8. O modelo modificado de Gompertz indicou uma produção máxima diária de 58,7 mL.$(g_{SV}.d)^{-1}$, uma produção acumulada de biogás de 763 mL.g_{SV}^{-1} e um coeficiente de correlação relativamente elevado (R^2= 0,9461).

O ensaio EMF foi o terceiro ensaio no qual se verificou maior volume acumulado de biogás e uma λ igual a 0, comprovando que o pré-tratamento mecânico foi benéfico para aumentar do volume de biogás produzido e diminuir o valor de λ.

4.2.5. Ensaio IMF (EIMF)

Na Tabela 4.7 estão apresentados os valores dos parâmetros físico-químicos do D_{DA} decorrentes do EIMF, ensaio constituído por inóculo e membrana fragmentada.

Com este ensaio pretendeu-se estudar a evolução da produção de biogás quando a membrana de PHB é a única fonte de C e energia para os microrganismos envolvidos na DA.

Este ensaio, no qual a membrana é a única fonte de carbono, foi o que apresentou teores mais elevados de SV, SF, CQO_T e CQO_S no D_{DA} e menor ER de SV e CQO_T. Era expectável que estes parâmetros fossem inferiores aos ensaios que contém inóculo, substrato e membrana de PHB.

Na Figura 4.21 é possível visualizar-se o RA_B produzido no EIMF, com o ajustamento do modelo modificado de Gompertz. A produção acumulada de biogás neste ensaio foi muito reduzida (148 $mL.g_{SV}^{-1}$). Contudo, é possível observar-se que a produção de biogás se iniciou desde o primeiro dia de ensaio, indicando que a membrana, tratando-se da única fonte de carbono e energia para os microrganismos, é biodegradada desde o início do ensaio. Podemos constatar que, tal como ocorreu no ensaio EMF, o pré-tratamento mecânico é benéfico para que a produção de biogás se inicie desde o primeiro dia de ensaio. O EMF apresentou uma λ igual a 0.

Na figura 4.21 é possível verificar-se a existência de dois patamares estacionários, o primeiro patamar ocorreu do 2º ao 6º dia e o segundo patamar após o 14º dia de ensaio.

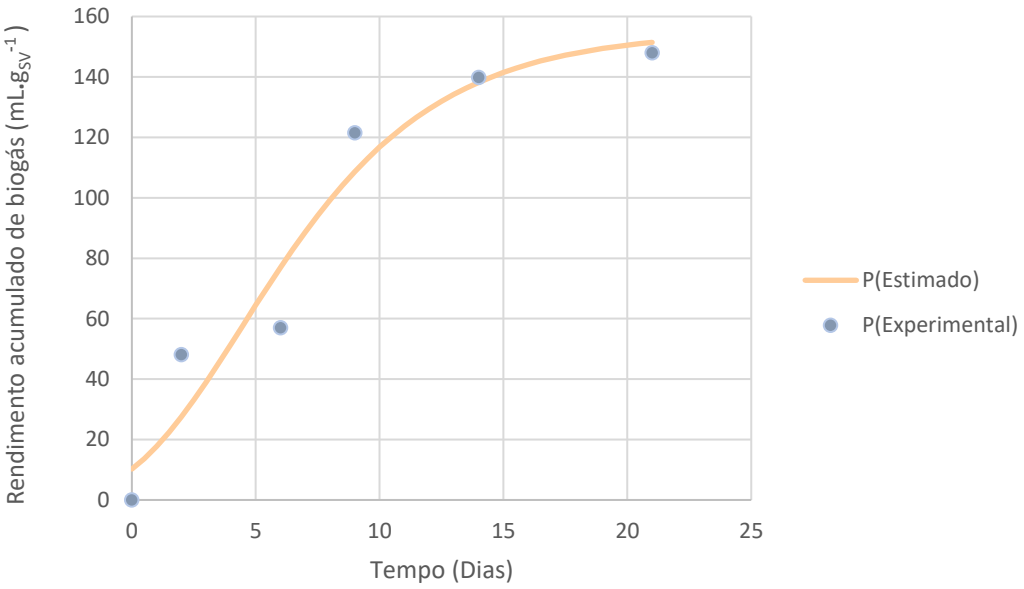


Figura 4.21- RA_B produzido ao longo do EIMF, com o ajustamento do modelo modificado de Gompertz.

Na Figura 4.22 está representada a composição do biogás ao longo do ensaio EIMF. Como a produção de biogás foi muito reduzida, só foi possível analisar-se a composição do biogás no 9º e no 14º dia de ensaio. O biogás apresentou uma percentagem de metano de 86,1 % $v.v^{-1}$ no 14º dia de ensaio e, comparativamente com os outros ensaios, o EIMF foi o que apresentou uma maior percentagem de metano, embora com um volume muito reduzido de biogás.

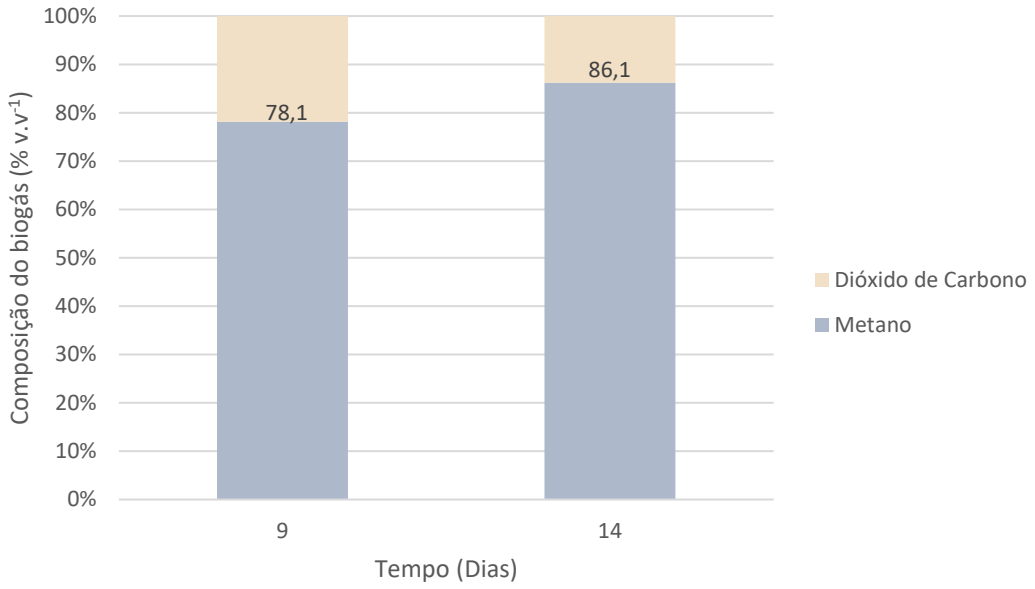


Figura 4.22- Composição do biogás ao longo do EIMF da DA.

Os parâmetros cinéticos do modelo modificado de Gompertz e o respetivo coeficiente de correlação estão apresentados na Tabela 4.8. Este ensaio foi o que apresentou uma menor produção máxima de biogás diário (12,9 mL.(g_{SV}.d)$^{-1}$) e uma produção acumulada de biogás de 155 mL.g_{SV}^{-1}. O coeficiente de correlação entre os valores estimados e os valores experimentais foi de R^2 = 0,9374.

4.2.6. Ensaio MI_{50} (EMI_{50})

No Tabela 4.7 é possível visualizar-se os resultados dos parâmetros físicos-químicos do D_{DA} do EIM_{50}, ensaio constituído por inóculo, substrato e membrana inteira irradiada a 50 kGy no AE.

Como referido no subcapítulo 4.1.3.2. a membrana irradiada a 50 kGy no AE apresentou uma T_{Deg} e uma $\Delta_{Deg}H$ de 240,65 ± 0,5 ºC e 504,35 ± 43J.g^{-1}, respetivamente. Estes valores foram inferiores comparativamente aos valores obtidos na membrana inteira não irradiada. Com a diminuição do valor $\Delta_{Deg}H$ era esperado que o teor de SV no D_{DA} fosse menor, tendo em conta que os microrganismos precisam de menos energia para consumir a membrana de PHB. Contudo, o mesmo não se verificou. A ER de SV neste ensaio foi 49,4 %.

Contudo, como é possível visualizar-se na Tabela 4.6, a radiação de 50 kGy no AE foi a que apresentou um maior X_C. Segundo Pradhan et al. (2017) quanto maior for o X_C maior será a resistência à degradação térmica da membrana de PHB.

Na Figura 4.23 é possível visualizar-se o RA_B produzido no EMI_{50}, com o ajustamento do modelo modificado de Gompertz. A produção acumulada de biogás neste ensaio foi de 519 $mL.g_{SV}^{-1}$, o segundo ensaio, constituído por inóculo, substrato e membrana, no qual se verificou menor produção de biogás. É possível visualizar-se que não existiu uma λ, tal como aconteceu no EMF, EIMF e EMP_{H2O}. Isto demonstra que os microrganismos não necessitaram de tempo de adaptação para produzirem biogás. As nanocavidades e os vazios observados na análise SEM, Figura 4.9, funcionam como possíveis pontos de ataque para os microrganismos, acelerando a produção do biogás no inicio da DA.

Verificaram-se duas fases estacionárias de produção de biogás no EMI_{50}, a primeira fase que ocorreu do 4º ao 8º dia e o segunda fase após o 13º dia.

A membrana de PHB deixou de ser visível por observação direta ao 2º dia de ensaio, enquanto que nos outros ensaios, a membrana deixou de ser visível ao 6º dia de ensaio.

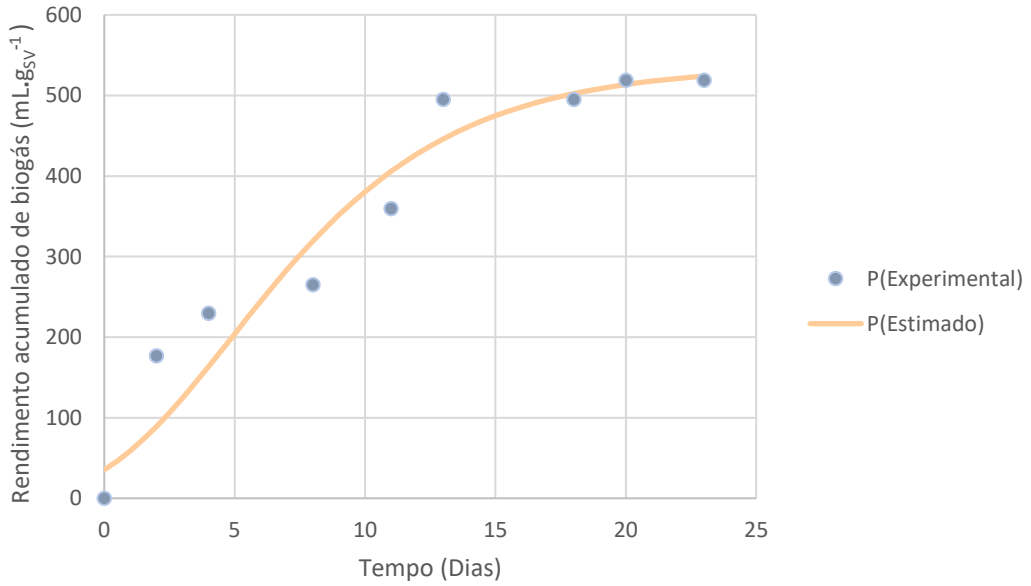


Figura 4.23- RAB produzido ao longo do EIM_{50}, com o ajustamento do modelo modificado de Gompertz.

Na Figura 4.24 está representada a composição do biogás ao longo do ensaio EIM_{50}, até ao 11º dia de ensaio. A percentagem de metano ao 11º dia de ensaio foi superior comparativamente a todos os outros ensaios, registando um volume acumulado de metano de 387 $mL.g_{SV}^{-1}$.

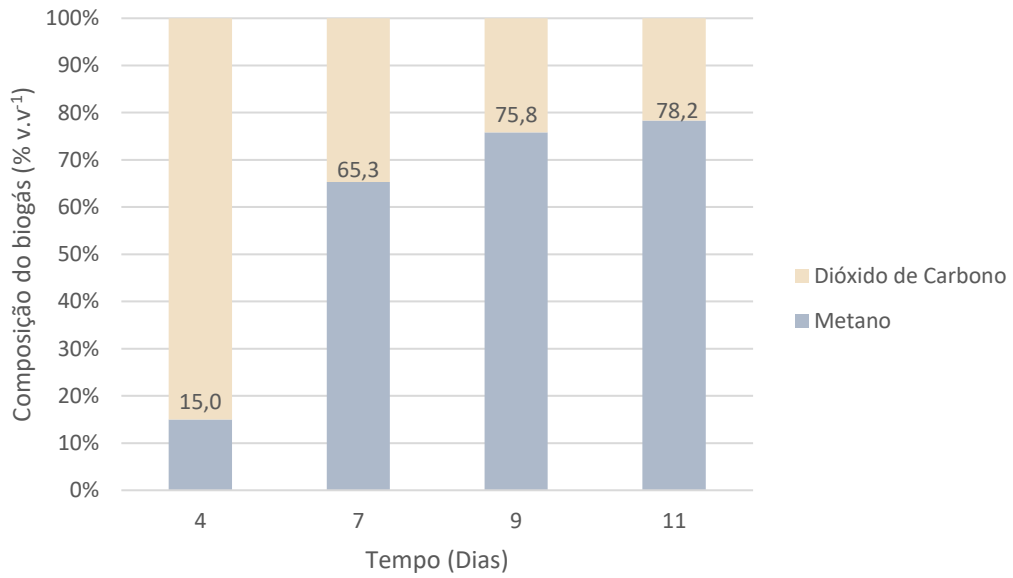


Figura 4.24- Composição do biogás ao longo do EIM_{50}.

Os parâmetros cinéticos do modelo modificado de Gompertz e o respetivo coeficiente de correlação estão apresentados na Tabela 4.8. A produção obtida através deste modelo foi de 536 mL.g_{SV}^{-1}, com uma produção máxima diária de 40,8 mL.(g_{SV}.d)$^{-1}$. Neste ensaio o valor de λ foi igual a 0, indicando que a produção de metano se iniciou no 1º dia de ensaio. O pré-tratamento físico, por radiação ionizante, provocou a diminui do valor da λ devido ao aumento de nanocavidades observadas à superfície da membrana de PHB.

O coeficiente de correlação (R^2= 0,9299) entre os valores modelados e os valores experimentais indicou haver um bom ajustamento do modelo aos valores experimentais.

4.3. Parâmetros cinéticos do modelo modificado de Gompertz e coeficiente de correlação dos ensaios

Na tabela 4.8 é possível visualizar os parâmetros cinéticos do modelo modificado de Gompertz e o coeficiente de correlação obtidos em cada ensaio.

Tabela 4. 8- Parâmetros cinéticos do modelo modificado de Gompertz e coeficiente de correlação.

Ensaio	P ($mL.g_{SV}^{-1}$)	$R_{máx}$ ($mL.(g_{SV}.d)^{-1}$)	λ (d)	R^2
EB	729	57,0	1,22	0,9916
EMI	895	65,4	2,93	0,9671
EMP_{NaCl}	539	38,2	3,14	0,9634
EMP_{H2O}	771	158	0,40	0,9983
EMF	736	58,7	0	0,9461
EMI_{50}	536	40,8	0	0,9299
EIMF	155	12,9	0	0,9374

4.4. Caracterização das membranas, após a DA

Após a conclusão dos ensaios de DA, repetiu-se as análises de *TGA*, *DSC* e *FTIR* nos fragmentos de PHB que se encontraram no D_{DA}. Realizou-se esta análise nos fragmentos provenientes do EMI e EMI_{50}. Foram selecionados estes ensaios porque: *i*) os ensaios continham membrana inteira, pelo que existia uma maior probabilidade de se encontrar fragmentos de membrana de PHB; ii) é possível realizar a comparação entre a membrana inteira de PHB e os fragmentos encontrados nos digeridos, pois foi realizada a caracterização da membrana de PHB com e sem a irradiação, previamente ao início da DA.

No EMI, os fragmentos de membrana de PHB recolhidos apresentaram diferentes tonalidades. Verificou-se a existência de fragmentos de PHB que se encontravam, visualmente, com um aspeto semelhante à membrana inteira antes de ser inserida nos biorreatores da DA (transparente). Estes fragmentos com esta tonalidade, mais transparente, foram designados por fragmentos da membrana inteira aparentemente menos biodegradados (PHB digerido (-)). Os outros fragmentos da membrana que apresentaram uma tonalidade mais escura, foram designados como fragmentos da membrana inteira aparentemente mais biodegradados (PHB digerido (+)) (Figura 4.25). O fragmento PHB digerido (-) sugere que a membrana não foi tão biodegradada comparativamente ao fragmento PHB digerido (+).

Figura 4.25- Fragmentos de PHB presentes no DDA do EMI.

Como é possível visualizar-se na Figura 4.26, estes fragmentos apresentaram diferentes comportamentos térmicos por análise de TGA. O fragmento PHB digerido (-) apresentou uma T_{Deg} de 275,44 º C e fragmento PHB digerido (+) um valor de 272,63 º C. Contudo, como é possível visualizar-se na Figura 4.26, o fragmento PHB digerido (+) apresentou até aos 100 º C uma maior perda de massa. Esta perda pode dever-se a uma maior percentagem de humidade presente no fragmento. Também é possível verificar que o PHB digerido (+) (curva preta) apresentou uma cinética de degradação mais lenta comparativamente ao PHB digerido (-).

Segundo Etxabide et al. (2022), o declive acentuado no termograma pode dever-se, principalmente, à rutura de ligações C=O e C−O. Na Figura 4.26, é possível visualizar-se os termogramas de TGA do fragmento PHB digerido (-), do PHB digerido (+) e da membrana inteira não irradiada e antes de ser inserida nos biorreatores da DA.

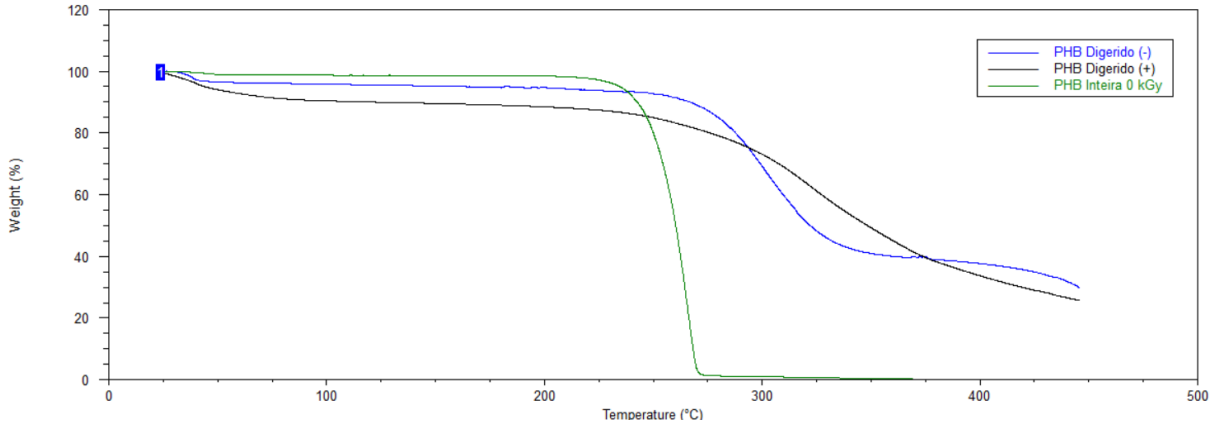


Figura 4.26- Termogramas de TGA dos fragmentos de membrana de PHB presentes no D_{DA} do EMI e da membrana inteira não irradiada e antes de ser inserida nos biorreatores da DA, TGA.

A $\Delta_{Deg}H$ do PHB digerido (-) e PHB digerido (+) foi, respetivamente, 213,7 e 100,3 $J.g^{-1}$ (Figura 4.27). Estes valores vão de encontro com os termogramas de TGA visualizadas na Figura 4.26. A membrana PHB digerido (+) é a que apresenta menor valor de $\Delta_{Deg}H$, ou seja, os

microrganismos necessitam de menos energia para degradar o fragmento da membrana de PHB, enquanto que o PHB digerido (-), que se assemelha, visualmente, mais à membrana inteira não irradiada e antes de ser inserida na DA, apresenta um valor superior.

Comparativamente com os valores obtidos na caracterização das membranas inteiras não irradiadas e antes de serem inseridas nos biorreatores da DA, é possível verificar-se que estes valores são inferiores aos mencionados. Como já referido anteriormente, é expectável que os microrganismos consumam primeiro as partes da membrana de PHB mais fragilizadas ou partes que estejam mais expostas aos mesmos e, posteriormente, as partes da membrana com maior complexidade estrutural. Na Figura 4.27, é possível visualizar-se os termogramas de DSC do fragmento PHB digerido (-), do PHB digerido (+) e da membrana inteira não irradiada e antes de ser inserida nos biorreatores da DA.

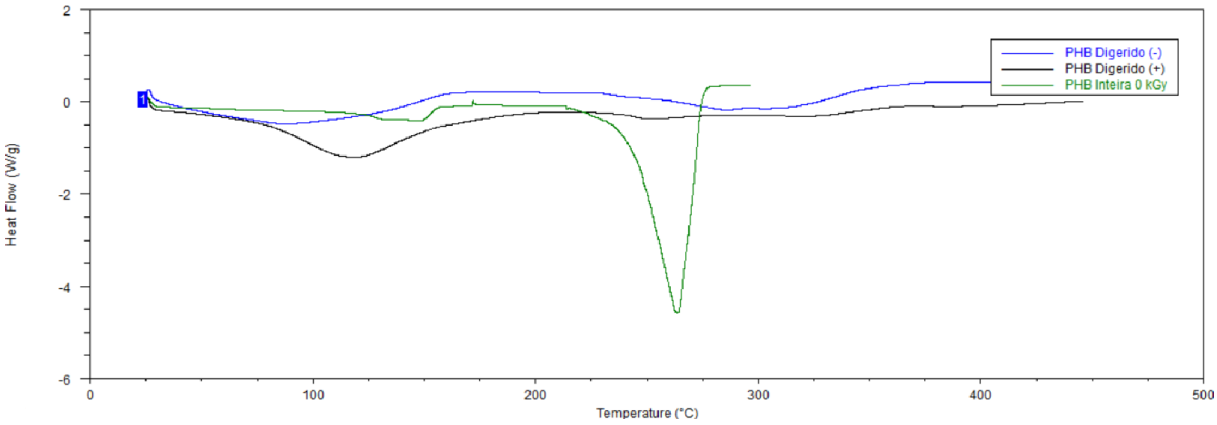


Figura 4.27- Termogramas de DSC dos fragmentos de membrana de PHB presentes no D_{DA} do EMI e da membrana inteira não irradiada e antes de ser inserida nos biorreatores da DA, DSC.

Estes fragmentos de membranas foram sujeitos à análise FTIR. Na Figura 4.28 é possível visualizar-se o espectro de transmitância correspondente ao fragmento PHB digerido (-) e na Figura 4.29 o espectro de transmitância do fragmento PHB digerido (+).

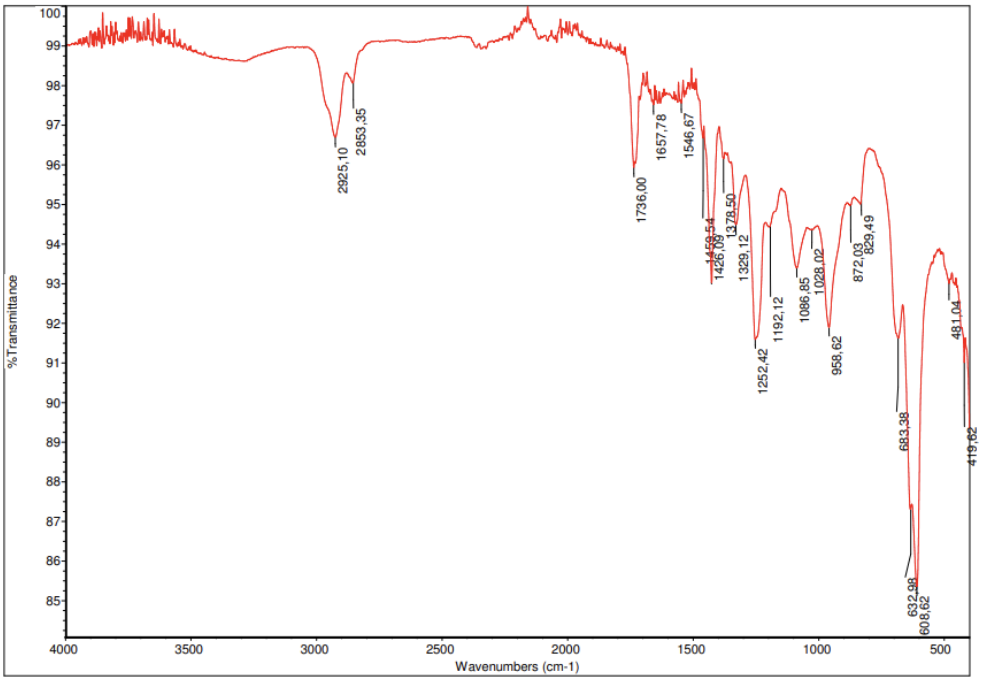


Figura 4.28- Espectro de transmitância (FTIR) do fragmento PHB digerido (-).

Comparando o espectro de transmitância do fragmento PHB digerido (-) com o espectro de transmitância da membrana de PHB antes da digestão, Figura 4.4, é possível verificar-se as seguintes alterações: *i*) a banda compreendida entre 2959-2854 cm^{-1}, que corresponde a ligações -CH, apresentam uma maior área de representatividade; *ii*) não se visualiza o pico 1720 cm^{-1} que indicava a vibração de estiramento do grupo carbonilo, C=O; e ainda *iii*) os picos 1086-1252, 1379 e 1454 cm^{-1} que corresponde respetivamente às ligações C-O, $-CH_3$ e CH_2 apresentam uma menor expressão.

Comparando o espectro de transmitância do fragmento PHB digerido (+), Figura 4.29, com o espectro do fragmento PHB digerido (-), Figura 4.28, e o da membrana de PHB antes de ser colocado na DA, Figura 4.4, é possível verificar-se que: *i*) surge uma nova banda larga entre 3600-3000 cm^{-1} e um novo pico 1029 cm^{-1}, correspondente ao elongamento da ligação O-H e à ligação C-O; *ii*) os picos de absorção 2918 e 2850 cm^{-1}, característicos das ligações O-H e HC=O, apresentam uma maior intensidade vibracional; e ainda *iii*) o pico correspondente à ligação C=O, 1739 cm^{-1}, apresenta uma menor intensidade vibracional.

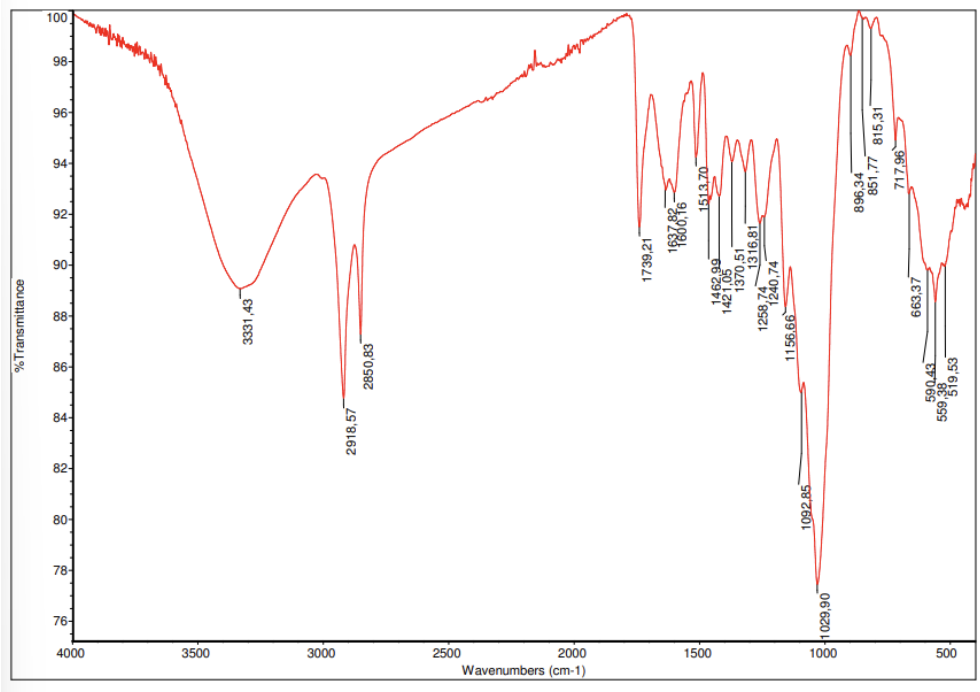


Figura 4.29- Espectro de transmitância (FTIR) do fragmento IM (+).

Isto demonstra que diferentes fragmentos da membrana foram sujeitos a diferentes grupos de microrganismos e, consequentemente, apresentaram diferentes graus de biodegradação e ligações químicas.

Os fragmentos de membrana resultantes do EIM_{50} também foram analisados. Obteve-se uma T_{Deg} de 292,53 ºC e um valor de $\Delta_{Deg}H$ de 1267 $J.g^{-1}$, Figura 4.30 e 4.31. Na Figura 4.30 e 4.31, é possível visualizar-se, respetivamente, os termogramas de TGA e DSC do fragmento digerido de PHB, sujeito a 50 kGy, e da membrana inteira sujeita a 50 kGy antes de ser inserida nos biorreatores da DA.

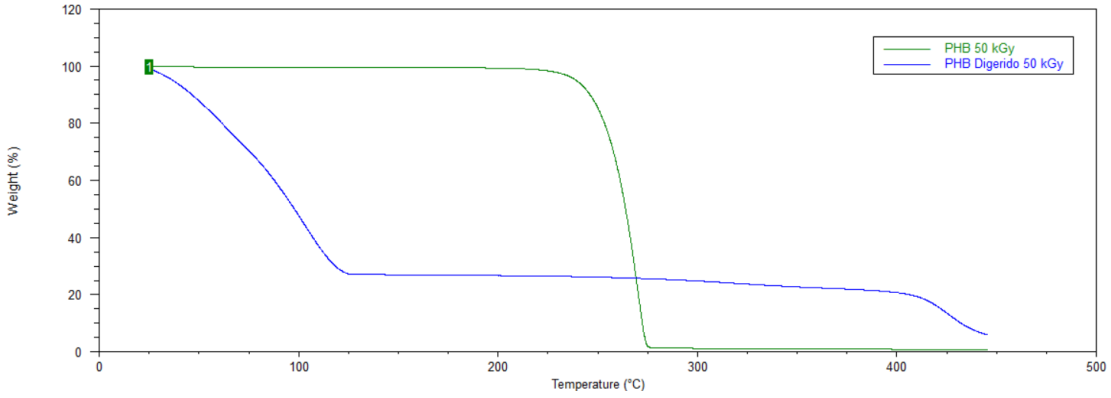


Figura 4.30- Termograma de TGA do fragmentos de membrana de PHB sujeita a 50 kGy presentes no DDA do EMI50 e da membrana de PHB sujeita a 50 kGy antes de ser inserida nos biorreatores da DA, TGA.

O declive acentuado até aos 100 ºC pode dever-se à evaporação da água que o fragmento de membrana pudesse conter.

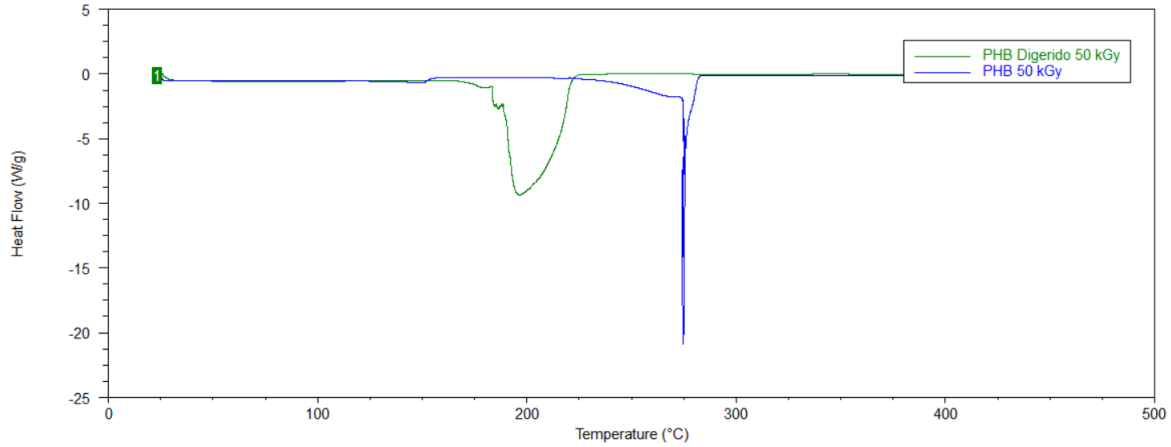


Figura 4.31- Termograma de DSC do fragmento de membrana de PHB presentes no DDA do EMI_{50} e da membrana de PHB sujeita a 50 kGy antes de ser inserida nos biorreatores da DA, DSC.

Nestes ensaios os fragmentos não apresentaram diferentes tonalidades. Apesar dos valores de T_{Deg} e $\Delta_{Deg}H$ das membranas de PHB sujeitas a 50 kGy no AE serem inferiores aos valores observados nas membranas não sujeitas à irradiação antes da DA, os valores dos fragmentos resultantes do EIM_{50} foram bastante superiores aos mencionados. Como referido no subcapítulo 4.1.3.2, quando sujeitas à irradiação, as membranas podem sofrer o processo *cross-slinking* provocando a diminuição dos valores de T_{Deg} e $\Delta_{Deg}H$. Contudo, as membranas expostas a 50 kGy no AE, quando inseridas nos ensaios de DA, adquiriram características que resultaram no aumento destes parâmetros. As interações com os microrganismos e as condições estritamente especificas da DA, como a temperatura, conferiram propriedades às membranas que as tornaram menos biodegradáveis.

5. CONCLUSÕES E TRABALHOS FUTUROS

5.1. Conclusões

O trabalho desenvolvido permite constatar que:

No EB, ensaio constituído apenas por inóculo e substrato, verificou-se que a produção de biogás foi inferior comparativamente a todos os ensaios que continham membrana de PHB (inóculo, substrato e membrana de PHB), exceto o ensaio EMP_{NaCl} e o EMI_{50}.

A membrana de PHB constituiu uma fonte adicional de carbono e energia para os microrganismos, potencializando a produção de biogás e biometano. Era esperado que os ensaios que continham a membrana de PHB apresentassem maior volume de biogás acumulado.

O EMI, ensaio constituído por inóculo, substrato e membrana inteira, foi o ensaio que apresentou maior volume acumulado de biogás produzido entre todos os ensaios, registando um valor de 827 $mL.g_{SV}^{-1}$ e a segunda maior percentagem de biometano de 80,1 % $v.v^{-1}$. Adicionalmente, foi o segundo ensaio no qual se obteve uma maior eficiência de remoção de sólidos voláteis (ER de SV) e de carência química de oxigénio total (ER de CQO_T). As membranas inteiras de PHB, apesar de não terem sido produzidas através de técnicas que induzem a porosidade nas mesmas, apresentaram nanocavidades. Estes vazios podem dever-se à dispersão heterogénea do polímero de PHB no clorofórmio e à respetiva cinética de evaporação do clorofórmio. Os resultados obtidos sugerem que a inserção de membranas inteiras de PHB potencializa a produção de biogás, mesmo sem serem produzidas através de técnicas específicas de porosidade ou serem sujeitas a pré-tratamentos.

As nanocavidades presentes nas membranas de PHB concedem aos microrganismos novos pontos de ataque, acelerando a biodegradação. Nos ensaios que continham membranas de PHB produzidas através de técnicas que induzem a porosidade, verificaram-se os seguintes resultados:

- EMP_{NaCl}: No ensaio constituído por inóculo, substrato e membrana porosa produzida com recursos a sais de NaCl, constatou-se que existiam partículas deste sal intrínsecas na membrana. Ao iniciar-se a biodegradação da membrana de PHB, houve libertação dos iões sódio e cloreto. Elevadas concentrações do ião sódio provocam a inibição da atividade microbiana. O ião cloreto, por sua vez, é um interferente na quantificação da CQO. Neste ensaio o volume de biogás produzido não ultrapassou os 500 $mL.g_{SV}^{-1}$, sendo inferior ao valor obtido no EB.
  O ensaio EMP_{NaCl} foi o que apresentou uma *lagphase* (λ) mais elevada, indicando que os microrganismos precisaram de mais tempo para se adaptarem e iniciarem

a produção de biogás. Estes resultados ressaltam o efeito negativo dos sais de NaCl, utilizados para produzir membranas porosas, no processo da DA e na eficiência de produção de biogás.

- EMP_{H2O}: Neste ensaio, constituído por inóculo, substrato e membrana porosa produzida por emulsão, verificou-se uma produção exponencial de biogás, sem a existência de duas fases estacionárias, obtendo-se um volume acumulado de biogás de 771 $mL.g_{SV}^{-1}$. As nanocavidades da membrana permitiram que a biodegradação da mesma fosse constante e mais rápida ao longo do tempo. Estes resultados demonstram que as membranas porosas produzidas por emulsão podem ser uma estratégia promissora para melhorar a eficiência de produção de biogás no processo da DA.

Em relação ao efeito dos pré-tratamentos observou-se as seguintes resultados:

- Tratamento mecânico: Teve como princípio aumentar a área de contacto dos microrganismos com a membrana. O EMF, ensaio constituído por inóculo, substrato e membrana inteira cortada, foi o terceiro ensaio no qual se verificou maior produção acumulada de biogás. Contudo, ao contrário do que se observou no ensaio EMP_{H2O}, obteve-se duas fases estacionárias de produção de biogás e foi o ensaio que apresentou valores de ER de SV e ER de CQO mais elevados. Podemos concluir que aumentar a área de contacto entre os microrganismos e a membrana é uma estratégia que tem impactos positivos no volume de biogás produzido.
- Tratamento físico: O tipo de radiação ionizante com o qual se verificou maior grau de desagregação das membranas inteiras de PHB, foi com o feixe de eletrões no acelerador de eletrões (AE), com uma dose de 50 kGy, em atmosfera oxidante. O EMI_{50}, ensaio constituído por inóculo, substrato e membrana inteira irradiada a 50 kGy no AE, foi o ensaio que apresentou menor volume acumulado de biogás. Comparativamente com os ensaios que contém inóculo, substrato e membrana de PHB, foi o que apresentou menores valores de ER de SV e ER de CQO, à exceção do EMP_{NaCl}. Apesar de se ter verificado a diminuição dos parâmetros T_{Deg} e $\Delta_{Deg}H$ e de se ter observado nanocavidades em maior número e de maior dimensão na imagem SEM, a membrana irradiada a 50 kGy no AE apresentou um maior grau de cristalinidade, X_C. O elevado grau de cristalinidade influencia negativamente a produção de biogás pois requer que os microrganismos consumam mais energia para biodegradar a membrana. Contudo, ao 11º dia de ensaio foi o ensaio que apresentou maior percentagem de metano, registando um

volume acumulado de metano de 387 mL.g_{SV}^{-1}. Podemos concluir que a radiação ionizante dificultou a produção de biogás porque tornou a membrana de PHB mais complexa de biodegradar.

O EIMF, ensaio constituído por inóculo e membrana fragmentada, foi realizado com o objetivo de analisar a evolução da produção de biogás quando a membrana de PHB é a única fonte de C e energia para os microrganismos envolvidos na DA. Observou-se uma λ igual a 0, indicando que a membrana de PHB foi consumida desde o início do ensaio de DA. É, assim, possível concluir que a membrana de PHB é consumida em simultâneo com o substrato. O volume acumulado de biogás neste ensaio foi inferior a 150 mL.g_{SV}^{-1}, contudo de somarmos o volume de biogás produzido neste ensaio e o volume acumulado de biogás produzido no EB, podemos verificar que o resultado encontra-se entre os volumes acumulados de biogás dos ensaios EMP_{H2O} e EMF.

Os resultados obtidos indicam que a inserção de membrana de PHB na DA potencializa a produção de biogás e biometano.

5.2. Sugestões de Trabalho Futuros

No decorrer da realização desta dissertação verificou-se uma série de desafios devido à ausência de dados específicos da caracterização de membranas de PHB, com e sem pré-tratamentos. Também se verificou a ausência de dados referentes à digestão anaeróbia de bioplásticos, nomeadamente o homopolímero PHB.

Surgem, assim, algumas temáticas interessantes a serem exploradas, de modo a aprofundar e a melhorar o conhecimento nesta área, nomeadamente:

- Expor as membranas de PHB a doses e taxas de radiação ionizante mais elevadas e analisar a sua degradação;
- Submeter as membranas de PHB a diferentes pré-tratamentos em simultâneo, como pré-tratamentos físico, mecânico, térmicos, entre outros;
- Realizar a DA de membranas de PHB submetidas a diferentes doses e taxas de radiação ionizante e a pré-tratamentos, com temperaturas termófilas e mesófilas;
- Realizar os ensaios de DA com membranas de PHB em biorreatores de fluxo contínuo;
- Análise custo-benefício, económica e ambiental, da introdução de bioplásticos, nomeadamente o PHB, na digestão anaeróbia de resíduos alimentares, incluindo com e sem pré-tratamentos físicos e mecânicos.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Adekunle, K. F., & Okolie, J. A. (2015). A Review of Biochemical Process of Anaerobic Digestion. *Advances in Bioscience and Biotechnology*, *06*(03), 205–212. https://doi.org/10.4236/abb.2015.63020

Agabo-García, C., Solera, R., & Perez, M. (2022). Anaerobic sequential batch reactor for CO-DIGESTION of slaughterhouse residues: Wastewater and activated sludge. *Energy*, *255*. https://doi.org/10.1016/j.energy.2022.124575

Agência Portuguesa do Ambiente. (2022). *RARU_2021- Introdução*.

Ajayi-Banji, A., & Rahman, S. (2022). A review of process parameters influence in solid-state anaerobic digestion: Focus on performance stability thresholds. In *Renewable and Sustainable Energy Reviews* (Vol. 167). Elsevier Ltd. https://doi.org/10.1016/j.rser.2022.112756

Akunna, J. C. (2019). *Anaerobic Waste-Wastewater Treatment and Biogas Plants*.

Alarfaj, A. A., Arshad, M., Sholkamy, E. N., & Munusamy, M. A. (2015). Extraction and characterization of polyhydroxybutyrates (PHB) from Bacillus thuringiensis KSADL127 isolated from mangrove environments of Saudi Arabia. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, *58*(5), 781–788. https://doi.org/10.1590/S1516-891320150500003

Ali, S. S., Elsamahy, T., Abdelkarim, E. A., Al-Tohamy, R., Kornaros, M., Ruiz, H. A., Zhao, T., Li, F., & Sun, J. (2022). Biowastes for biodegradable bioplastics production and end-of-life scenarios in circular bioeconomy and biorefinery concept. In *Bioresource Technology* (Vol. 363). Elsevier Ltd. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2022.127869

Ali Shah, F., Mahmood, Q., Maroof Shah, M., Pervez, A., & Ahmad Asad, S. (2014). Microbial ecology of anaerobic digesters: The key players of anaerobiosis. In *The Scientific World Journal* (Vol. 2014). Hindawi Limited. https://doi.org/10.1155/2014/183752

Ansari, S., & Fatma, T. (2016). Cyanobacterial polyhydroxybutyrate (PHB): Screening, optimization and characterization. *PLoS ONE*, *11*(6). https://doi.org/10.1371/journal.pone.0158168

Aquino, K. A. da S. (2012). *Sterilization by Gamma Irradiation*. InTech.

Báez, J. E. (2016). El crecimiento en los extremos: Reactividad de grupos terminales en polímeros para la síntesis de copolímeros bloque. *Educacion Quimica*, *27*(2), 97–104. https://doi.org/10.1016/j.eq.2015.11.001

Banks, C., Heaven, S., Zhang, Y., Baier, U., & IEA Bioenergy Programme. (2018). *Food waste digestion : anaerobic digestion of food waste for a circular economy*.

Baredar, P., Khare, V., & Nema, S. (2020). Control system of biomass power plant. In *Design and Optimization of Biogas Energy Systems* (pp. 157–185). Elsevier. https://doi.org/10.1016/b978-0-12-822718-3.00004-6

Barzic, A. I. (2023). *An Introduction to Engineering Applications of Bioplastics* (T. Altalhi & Inamuddin, Eds.; 2nd ed.).

Barzilov, A. P., Novikov, I. S., & Womble, P. C. (2012). *Material Analysis Using Characteristic Gamma Rays Induced by Neutrons*. InTech.

Bhattacharya, A. (2000). *Radiation and industrial polymers*.

Biganeh, A., Kakuee, O., & Rafi-Kheiri, H. (2020). Positron Annihilation Spectroscopy of KCl (Zn) crystals. *Applied Radiation and Isotopes*, *166*. https://doi.org/10.1016/j.apradiso.2020.109330

Bioplastics, E. (2022). *FACT SHEET*. http://www.european-bioplastics.org/news/publications/

Bosnar, D. (2009). *POSITRON ANNIHILATION SPECTROSCOPY: DIGITAL VS. ANALOG SIGNAL PROCESSING*.

Bouallagui, H., Rachdi, B., Gannoun, H., & Hamdi, M. (2009). Mesophilic and thermophilic anaerobic co-digestion of abattoir wastewater and fruit and vegetable waste in anaerobic sequencing batch reactors. *Biodegradation*, *20*(3), 401–409. https://doi.org/10.1007/s10532-008-9231-1

Briški, F., Vuković, M., Papa, K., Gomzi, Z., & Domanovac, T. (2007). Modelling of composting of food waste in a column reactor. *Chemical Papers*, *61*(1), 24–29. https://doi.org/10.2478/s11696-006-0090-0

Brodin, M., Vallejos, M., Opedal, M. T., Area, M. C., & Chinga-Carrasco, G. (2017). Lignocellulosics as sustainable resources for production of bioplastics – A review. In *Journal of Cleaner Production* (Vol. 162, pp. 646–664). Elsevier Ltd. https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2017.05.209

Bugnicourt, E., Cinelli, P., Lazzeri, A., & Alvarez, V. (2014). Polyhydroxyalkanoate (PHA): Review of synthesis, characteristics, processing and potential applications in packaging. *Express Polymer Letters*, *8*(11), 791–808. https://doi.org/10.3144/expresspolymlett.2014.82

Carlsson, M., Lagerkvist, A., & Morgan-Sagastume, F. (2012). The effects of substrate pre-treatment on anaerobic digestion systems: A review. *Waste Management*, *32*(9), 1634–1650. https://doi.org/10.1016/j.wasman.2012.04.016

Chandra, R., Takeuchi, H., & Hasegawa, T. (2012). Methane production from lignocellulosic agricultural crop wastes: A review in context to second generation of biofuel production.

In *Renewable and Sustainable Energy Reviews* (Vol. 16, Issue 3, pp. 1462–1476). https://doi.org/10.1016/j.rser.2011.11.035

Chen, Y., Cheng, J. J., & Creamer, K. S. (2008). Inhibition of anaerobic digestion process: A review. In *Bioresource Technology* (Vol. 99, Issue 10, pp. 4044–4064). https://doi.org/10.1016/j.biortech.2007.01.057

Chmielewski, A. G., Haji-Saeid, M., & Ahmed, S. (2005). Progress in radiation processing of polymers. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research, Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms*, *236*(1–4), 44–54. https://doi.org/10.1016/j.nimb.2005.03.247

Cirne, D. G., Lehtomäki, A., Björnsson, L., & Blackall, L. L. (2007). Hydrolysis and microbial community analyses in two-stage anaerobic digestion of energy crops. *Journal of Applied Microbiology*, *103*(3), 516–527. https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2006.03270.x

Conant, T., Karim, A., & Datye, A. (2008). Coating of steam reforming catalysts in non-porous multi-channeled microreactors. *Bioresource Technology*, *99*(4), 882–888. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2007.01.013

Cristy, A. A., Ozaki, Y., & Gregoriou, V. G. (2001). *Sampling techniques and applications*.

Cucina, M., Carlet, L., De Nisi, P., Somensi, C. A., Giordano, A., & Adani, F. (2022). Degradation of biodegradable bioplastics under thermophilic anaerobic digestion: A full-scale approach. *Journal of Cleaner Production*, *368*. https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2022.133232

De La Rubia, M. A., Perez, M., Romero, L. I., & Sales, D. (2002). *Anaerobic Mesophilic and Thermophilic Municipal Sludge Digestion*.

Deublein, D., & Steinhauser, A. (2011). *Biogas from waste and renewable resources : an introduction*. Wiley-VCH.

Divyashree, M. S., & Shamala, T. R. (2009). Effect of gamma irradiation on cell lysis and polyhydroxyalkanoate produced by Bacillus flexus. *Radiation Physics and Chemistry*, *78*(2), 147–152. https://doi.org/10.1016/j.radphyschem.2008.08.010

Dong, L., Zhenhong, Y., Yongming, S., Xiaoying, K., & Yu, Z. (2009). Hydrogen production characteristics of the organic fraction of municipal solid wastes by anaerobic mixed culture fermentation. *International Journal of Hydrogen Energy*, *34*(2), 812–820. https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2008.11.031

Drobny, J. G. (2013). Introduction. In *Ionizing Radiation and Polymers* (pp. 1–10). Elsevier. https://doi.org/10.1016/b978-1-4557-7881-2.00001-8

Emadian, S. M., Onay, T. T., & Demirel, B. (2017). Biodegradation of bioplastics in natural environments. In *Waste Management* (Vol. 59, pp. 526–536). Elsevier Ltd. https://doi.org/10.1016/j.wasman.2016.10.006

Etxabide, A., Kilmartin, P. A., Guerrero, P., de la Caba, K., Hooks, D., West, M., & Singh, T. (2022). Polyhydroxybutyrate (PHB) produced from red grape pomace: Effect of purification processes on structural, thermal and antioxidant properties. *International Journal of Biological Macromolecules*, *217*, 449–456. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2022.07.072

Fernández, J., Pérez, M., & Romero, L. I. (2008). Effect of substrate concentration on dry mesophilic anaerobic digestion of organic fraction of municipal solid waste (OFMSW). *Bioresource Technology*, *99*(14), 6075–6080. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2007.12.048

Fezzani, B., & Cheikh, R. Ben. (2010). Two-phase anaerobic co-digestion of olive mill wastes in semi-continuous digesters at mesophilic temperature. *Bioresource Technology*, *101*(6), 1628–1634. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.09.067

Francis, D., & Parayil, D. J. (2023). *Microbial Technology in Bioplastic Production and Engineering* (Inamuddin & T. Altalhi, Eds.; 2nd ed.).

Getachew, A., & Woldesenbet, F. (2016). Production of biodegradable plastic by polyhydroxybutyrate (PHB) accumulating bacteria using low cost agricultural waste material. *BMC Research Notes*, *9*(1), 1–9. https://doi.org/10.1186/s13104-016-2321-y

Ghaniyari-Benis, S., Borja, R., Monemian, S. A., & Goodarzi, V. (2009). Anaerobic treatment of synthetic medium-strength wastewater using a multistage biofilm reactor. *Bioresource Technology*, *100*(5), 1740–1745. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2008.09.046

Grossule, V., Zanatta, S., Modesti, M., & Lavagnolo, M. C. (2023a). Treatment of food waste contaminated by bioplastics using BSF larvae: Impact and fate of starch-based bioplastic films. *Journal of Environmental Management*, *330*. https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2023.117229

Grossule, V., Zanatta, S., Modesti, M., & Lavagnolo, M. C. (2023b). Treatment of food waste contaminated by bioplastics using BSF larvae: Impact and fate of starch-based bioplastic films. *Journal of Environmental Management*, *330*. https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2023.117229

Hartmann, H., & Ahring, B. K. (2005). Anaerobic digestion of the organic fraction of municipal solid waste: Influence of co-digestion with manure. *Water Research*, *39*(8), 1543–1552. https://doi.org/10.1016/j.watres.2005.02.001

Horan, N., & J., W. (2018). *Anaerobic Digestion of Screenings for Biogas Recovery*. https://doi.org/https://doi.org/10.1007/978-981-10-8129-3

Huang, P. M., & Hardie, A. G. (2009). *FORMATION MECHANISMS OF HUMIC SUBSTANCES IN THE ENVIRONMENT*.

Hussain, C. M. (2022). *Advanced Organic Waste Management*.

Inada, H., & Zhu, Y. (2014). *SCANNING TRANSMISSION ELECTRON MICROSCOPY OF NANOMATERIALS Basics of Imaging and Analysis*.

International Organization for Standardization. (2002). *ISO 15705*. www.iso.ch

International Standard. (2016). *ISO 11357-1*.

International Standard. (2022). *ISO 11358-1/2022*. www.iso.org

Jain, S., Jain, S., Wolf, I. T., Lee, J., & Tong, Y. W. (2015). A comprehensive review on operating parameters and different pretreatment methodologies for anaerobic digestion of municipal solid waste. In *Renewable and Sustainable Energy Reviews* (Vol. 52, pp. 142–154). Elsevier Ltd. https://doi.org/10.1016/j.rser.2015.07.091

Khalid, A., Arshad, M., Anjum, M., Mahmood, T., & Dawson, L. (2011). The anaerobic digestion of solid organic waste. In *Waste Management* (Vol. 31, Issue 8, pp. 1737–1744). https://doi.org/10.1016/j.wasman.2011.03.021

Lapa, N., Surra, E., A.A.C. Esteves, I., P.P.L. Ribeiro, R., & P.B.Mota, J. (2018). *Production of Biogas and bioH2 Biochemical Methods* (M. R. Riazi & D. Chiaramonti, Eds.).

Lee, J., Kim, E., & Hwang, S. (2021). Effects of inhibitions by sodium ion and ammonia and different inocula on acetate-utilizing methanogenesis: Methanogenic activity and succession of methanogens. *Bioresource Technology*, *334*. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.125202

Lesteur, M., Bellon-Maurel, V., Gonzalez, C., Latrille, E., Roger, J. M., Junqua, G., & Steyer, J. P. (2010). Alternative methods for determining anaerobic biodegradability: A review. In *Process Biochemistry* (Vol. 45, Issue 4, pp. 431–440). https://doi.org/10.1016/j.procbio.2009.11.018

Li, Y., Park, S. Y., & Zhu, J. (2011). Solid-state anaerobic digestion for methane production from organic waste. In *Renewable and Sustainable Energy Reviews* (Vol. 15, Issue 1, pp. 821–826). Elsevier Ltd. https://doi.org/10.1016/j.rser.2010.07.042

Liotta, F., D'Antonio, G., Esposito, G., Fabbricino, M., Van Hullebusch, E. D., Lens, P. N. L., Pirozzi, F., & Pontoni, L. (2014). Effect of total solids content on methane and volatile fatty acid production in anaerobic digestion of food waste. *Waste Management and Research*, *32*(10), 947–953. https://doi.org/10.1177/0734242X14550740

Ma, X., Jiang, T., Chang, J., Tang, Q., Luo, T., & Cui, Z. (2019). Effect of Substrate to Inoculum Ratio on Biogas Production and Microbial Community During Hemi-Solid-State Batch Anaerobic Co-digestion of Rape Straw and Dairy Manure. In *Applied Biochemistry and Biotechnology* (Vol. 189, Issue 3, pp. 884–902). Humana Press Inc. https://doi.org/10.1007/s12010-019-03035-9

Mai, J., Kockler, K., Parisi, E., Chan, C. M., Pratt, S., & Laycock, B. (2024). Synthesis and physical properties of polyhydroxyalkanoate (PHA)-based block copolymers: A review.

International Journal of Biological Macromolecules, *263*, 130204. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2024.130204

Mallamaci, G., Brugnoli, B., Mariano, A., d'Abusco, A. S., Piozzi, A., Di Lisio, V., Sturabotti, E., Alfano, S., & Francolini, I. (2023). Surface modification of polyester films with polyfunctional amines: Effect on bacterial biofilm formation. *Surfaces and Interfaces*, *39*. https://doi.org/10.1016/j.surfin.2023.102924

Mao, C., Feng, Y., Wang, X., & Ren, G. (2015). Review on research achievements of biogas from anaerobic digestion. In *Renewable and Sustainable Energy Reviews* (Vol. 45, pp. 540–555). Elsevier Ltd. https://doi.org/10.1016/j.rser.2015.02.032

Merlin Christy, P., Gopinath, L. R., & Divya, D. (2014). A review on anaerobic decomposition and enhancement of biogas production through enzymes and microorganisms. In *Renewable and Sustainable Energy Reviews* (Vol. 34, pp. 167–173). Elsevier Ltd. https://doi.org/10.1016/j.rser.2014.03.010

Náthia-Neves, G., Berni, M., Dragone, G., Mussatto, S. I., & Forster-Carneiro, T. (2018). Anaerobic digestion process: technological aspects and recent developments. In *International Journal of Environmental Science and Technology* (Vol. 15, Issue 9, pp. 2033–2046). Center for Environmental and Energy Research and Studies. https://doi.org/10.1007/s13762-018-1682-2

Niaounakis, M. (2016). *Biopolymers : processing and products*.

O`Driscoll, C., & Corrigan, O. I. (1994). CLOFAZIMINE. In *Advances in Chemical Engineering* (Vol. 19, Issue C, pp. 1–50). https://doi.org/10.1016/S0065-2377(08)60212-4

Oliveira, V. M., & Navega, F. (2017). *Relatório nacional sobre a implementação da Agenda 2030 para o Desenvolvimento Sustentável PORTUGAL Por ocasião da Apresentação Nacional Voluntária no Fórum Político de Alto Nível das Nações Unidas*.

Pradhan, S., Borah, A. J., Poddar, M. K., Dikshit, P. K., Rohidas, L., & Moholkar, V. S. (2017). Microbial production, ultrasound-assisted extraction and characterization of biopolymer polyhydroxybutyrate (PHB) from terrestrial (P. hysterophorus) and aquatic (E. crassipes) invasive weeds. *Bioresource Technology*, *242*, 304–310. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.03.117

Rabii, A., Aldin, S., Dahman, Y., & Elbeshbishy, E. (2019). A review on anaerobic co-digestion with a focus on the microbial populations and the effect of multi-stage digester configuration. *Energies*, *12*(6). https://doi.org/10.3390/en12061106

Raza, Z. A., Abid, S., & Banat, I. M. (2018). Polyhydroxyalkanoates: Characteristics, production, recent developments and applications. In *International Biodeterioration and Biodegradation* (Vol. 126, pp. 45–56). Elsevier Ltd. https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2017.10.001

Riau, V., De la Rubia, M. Á., & Pérez, M. (2010). Temperature-phased anaerobic digestion (TPAD) to obtain class A biosolids: A semi-continuous study. *Bioresource Technology*, *101*(8), 2706–2712. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.11.101

Rico, C., Montes, J. A., & Lobo, A. (2020). Dry batch anaerobic digestion of food waste in a box-type reactor system: Inoculum preparation and reactor performance. *Journal of Cleaner Production*, *251*. https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2019.119751

Rivera-Briso, A. L., & Serrano-Aroca, Á. (2018). Poly(3-Hydroxybutyrate-co-3-Hydroxyvalerate): Enhancement strategies for advanced applications. In *Polymers* (Vol. 10, Issue 7). MDPI AG. https://doi.org/10.3390/polym10070732

Rocamora, I., Wagland, S. T., Villa, R., Simpson, E. W., Fernández, O., & Bajón-Fernández, Y. (2020). Dry anaerobic digestion of organic waste: A review of operational parameters and their impact on process performance. In *Bioresource Technology* (Vol. 299). Elsevier Ltd. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.122681

Salleh, K. M., Zulkifli, A., Mazlan, N. S. N., & Zakaria, S. (2023). *Biobased Materials: Types and Sources* (Inamuddin & T. Altalhi, Eds.; 2nd ed.).

Sangwan, N., Chauham, A., Singh, J., & Avti, P. K. (2023). *Microorganism-Derived Bioplastics for Clinical Applications* (Inamuddin & T. Altalhi, Eds.; 2nd ed.).

Schnürer, A., & Jarvis, Å. (2010). *Microbiological Handbook for Biogas Plants Swedish Waste Management U2009:03 Swedish Gas Centre Report 207*. www.avfallsverige.se

Schultz, H. 1932-. (1993). *Electron beam welding machines and equipment*.

Shaah, F. A., Mahmood, Q., Shah, M. M., Pervez, A., & Asad, S. A. (2017). Retracted: Microbial Ecology of Anaerobic Digesters: The Key Players of Anaerobiosis. In *TheScientificWorldJournal* (Vol. 2017, p. 3852369). NLM (Medline). https://doi.org/10.1155/2017/3852369

Shayanfar, S., & D. Pillai, S. (2022). *Ionizing Radiation Technologies*.

Show, K. Y., Lee, D. J., & Chang, J. S. (2011). Bioreactor and process design for biohydrogen production. *Bioresource Technology*, *102*(18), 8524–8533. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.04.055

Silva, A. S., & Fernandes, J. P. M. (2020). 20201212+mene+maac+acordo+paris. *ACORDO DE PARIS*.

Singh, N. B., De, A., Shukla, S. K., & Guin, M. (2023). *Bioplastic From Renewable Biomass*.

Stalter, R., & Howarth, D. (2012). *Gamma Radiation*. InTech.

Suwannoppadol, S., Ho, G., & Cord-Ruwisch, R. (2012). Overcoming sodium toxicity by utilizing grass leaves as co-substrate during the start-up of batch thermophilic anaerobic digestion. *Bioresource Technology*, *125*, 188–192. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.08.091

Uemura, S. (2010). Mineral Requirements for Mesophilic and Thermophilic Anaerobic Digestion of Organic Solid Waste. *Int. J. Environ. Res*, *4*(1), 33–40.

Wall, G. M. (1994). NAPHAZOLINE HYDROCHLORIDEEngineering. In *Advances in Chemical Engineering* (Vol. 19, Issue C, pp. 1–50). https://doi.org/10.1016/S0065-2377(08)60212-4

Wang, J., Wang, Z., Li, J., Wang, B., Liu, J., Chen, P., Miao, M., & Gu, Q. (2012). Chitin nanocrystals grafted with poly(3-hydroxybutyrate-co-3- hydroxyvalerate) and their effects on thermal behavior of PHBV. *Carbohydrate Polymers*, *87*(1), 784–789. https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2011.08.066

WEF Chair, R. B. B., AWWA, A. D. E., & APHA, F. E. W. R. (2017). *Preparation of Common Types of Desk Reagents Specified in Standard Methods* (L. L. Bridgewater, Ed.; 3rd ed.). https://doi.org/10.2105/SMWW.2882.216

Zhao, X., Anwar, I., Zhang, X., Pellicciotti, A., Storts, S., Nagib, D. A., & Vodovotz, Y. (2021). Thermal and Barrier Characterizations of Cellulose Esters with Variable Side-Chain Lengths and Their Effect on PHBV and PLA Bioplastic Film Properties. *ACS Omega*, *6*(38), 24700–24708. https://doi.org/10.1021/acsomega.1c03446

Zhu, B., Gikas, P., Zhang, R., Lord, J., Jenkins, B., & Li, X. (2009). Characteristics and biogas production potential of municipal solid wastes pretreated with a rotary drum reactor. *Bioresource Technology*, *100*(3), 1122–1129. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2008.08.024

7. ANEXOS

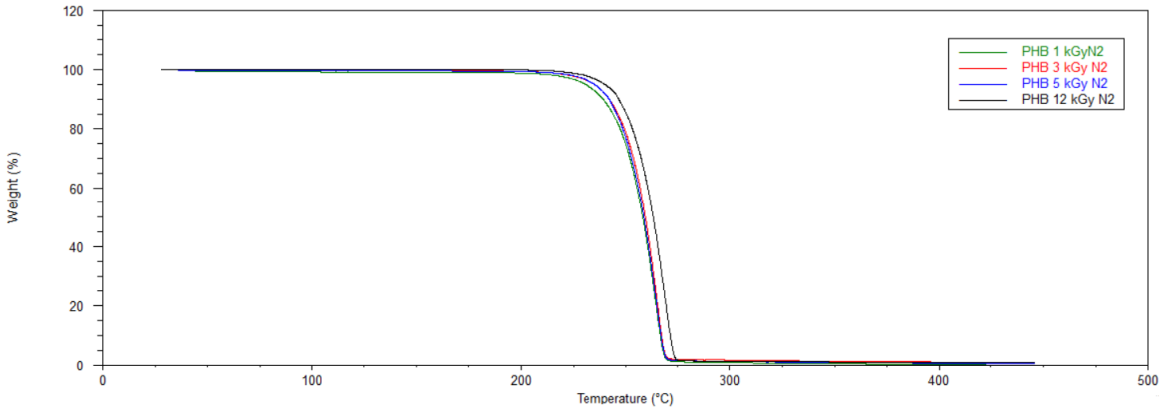


Figura 7. 1- Termogramas de TGA da membrana inteira de PHB, sujeitas à radiação γ, numa atmosfera inerte, a 1, 3. 5 e 12 kGy.

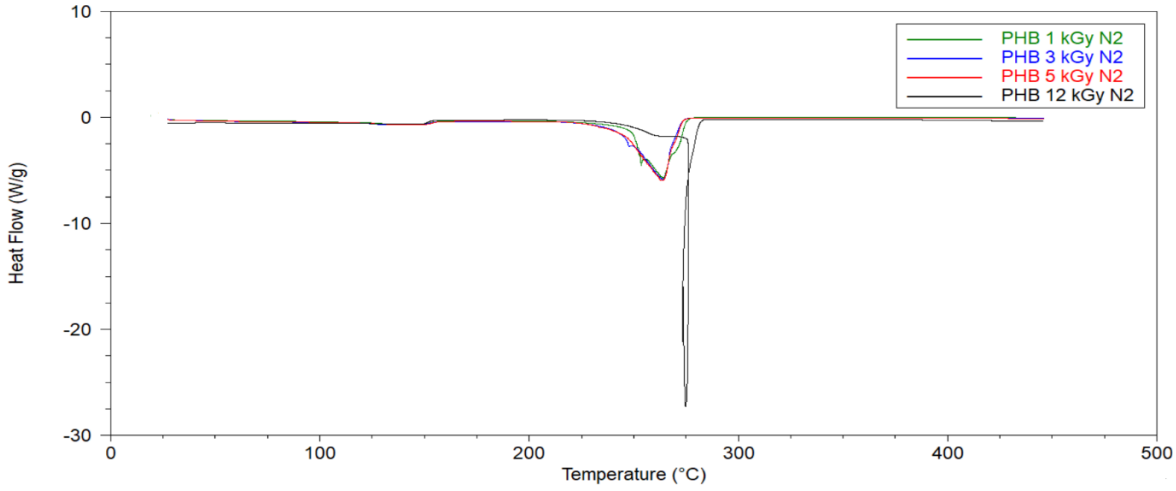


Figura 7. 2- Termogramas de DSC da membrana inteira de PHB, sujeitas à radiação γ, numa atmosfera inerte, a 1, 3. 5 e 12 kGy.

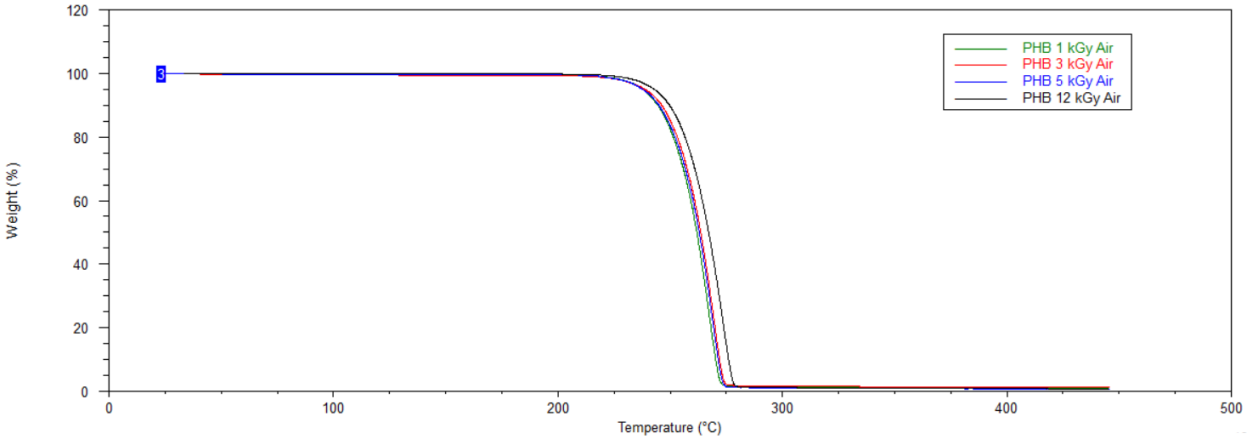


Figura 7. 3- Termogramas de TGA da membrana inteira de PHB, sujeitas à radiação γ, numa atmosfera na presença de oxigénio, a 1, 3. 5 e 12 kGy.

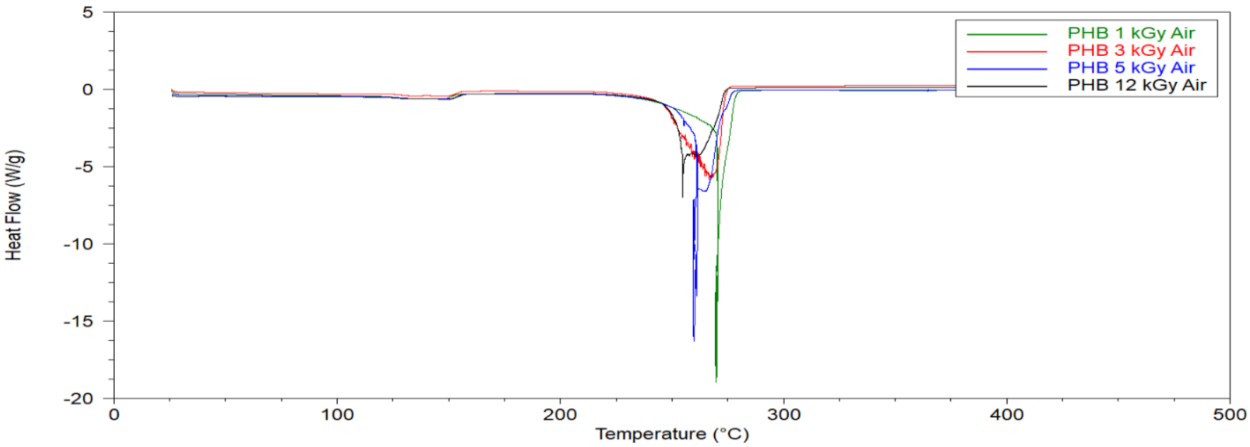


Figura 7. 4- Termogramas de DSC da membrana inteira de PHB, sujeitas à radiação γ, numa atmosfera na presença de oxigénio, a 1, 3. 5 e 12 kGy.

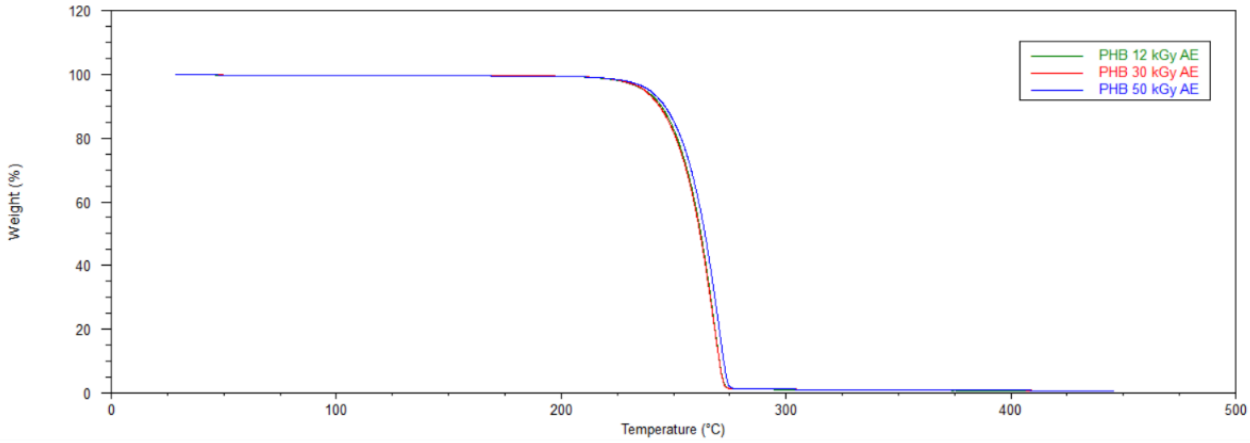


Figura 7. 5- Termogramas de TGA da membrana inteira de PHB, sujeitas a 12, 30 e 50 kGy no AE.

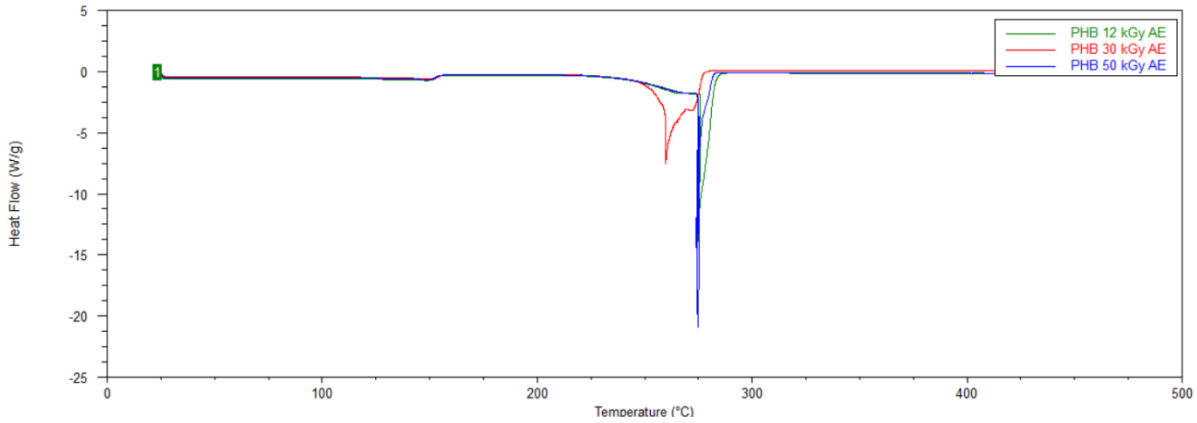


Figura 7. 6- Termogramas de DSC da membrana inteira de PHB, sujeitas a 12, 30 e 50 kGy no AE.