



Departamento de Química

Produção de biohidrogénio por bactérias a partir de resíduos fermentescíveis

Por

Luís Miguel Viegas das Neves

Dissertação apresentada na Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa para obtenção do grau de Mestre em Engenharia Química e Bioquímica.

Orientadora: Doutora Paula Alexandra Santinho Soares Marques

Co-orientadora: Professora Doutora Maria Ascensão Carvalho Fernandes Miranda Reis

Lisboa

2009

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Engenharia Química e Bioquímica, realizada sob a orientação científica de Doutora Paula Alexandra Santinho Soares Marques, Investigadora Auxiliar do Instituto Nacional de Engenharia e Tecnologia Inovação (INETI) e co-orientação de Maria Ascensão Reis, Professora Associada da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa.

Agradecimentos

A vida é construída por etapas e objectivos, sendo que a concretização do curso é uma das mais importantes. Assim, gostaria de deixar patente o meu agradecimento à Doutora Paula Marques pelo seu apoio e ensinamentos prestados ao longo do estágio realizado no INETI, pelo que sem eles seria de todo impossível realizar esta Tese. Acima de tudo considero que ganhei uma amiga.

Em seguida, à Eng.^a Manuela Tomé, Eng.^a Lourdes Bartolomeu, Doutora Paula Passarinho, Graça Conceição, Natércia Sousa e Paula Candeias por todas as ajudas prestadas, mesmo em momentos em que os meus conhecimentos não acompanhavam o exigido. A estas pessoas também devo o objectivo alcançado.

Aos estagiários e bolsheiros que sempre tiveram uma conversa de simpatia, resultando numa integração harmoniosa neste Instituto.

À Família, nomeadamente aos meus Pais, que suportaram moral e financeiramente os meus estudos. À minha irmã que com o seu sorriso e sensatez característicos sempre me conseguiu animar e aconselhar. Ao Nuno Sol, cunhado, que há muitos anos conheço e considero um grande amigo.

Aos meus amigos e colegas de Faculdade, em geral, que me apoiaram nas fases mais complicadas e comigo estudaram mesmo para as cadeiras mais desafiantes.

Ao Filipe Calixto que considero como irmão. Na vida fazem falta pessoas como ele, eu sei que tive sorte em conhecê-lo. Muito obrigado.

À D. Maria José (Mãe da Catarina) que muitas vezes me suportou e me animou com os seus deliciosos jantares e por vezes almoços, mas acima de tudo pela boa disposição sempre constante.

Por último, à Catarina, a minha namorada e mulher da minha vida, a ti devo-te o curso e muitas outras coisas, estiveste sempre presente e ajudaste-me tal como eu te ajudei, mas o que é isso se não o significado da palavra Casal...

Muito Obrigado por tudo, mas sinto que ainda vou ter muito que te agradecer...

O erro é o motor da Ciência

Imanuelle Kant (1724-1804)

Resumo

Palavras-chave: hidrogénio, *Enterobacter aerogenes*, glicerol, resíduos de biodiesel, processo anaeróbio, Desenho Composto Central (DCC)

Como é do conhecimento geral, as necessidades energéticas mundiais têm aumentado exponencialmente, as reservas de combustíveis fósseis têm vindo a diminuir e a sua combustão tem sérios efeitos nefastos ambientais, devido às emissões de CO₂. Tendo tudo isto em consideração, o desenvolvimento de um mundo energeticamente sustentável requer a redução da dependência dos combustíveis fósseis e a diminuição da poluição por eles gerada. O biohidrogénio é considerado uma alternativa “limpa”, viável e um vector energético do futuro.

Assim, com vista à sua utilização como biocombustível, a Directiva Europeia CE/30/2003 propõe uma incorporação de 8% de biocombustíveis, no sector dos transportes, até 2020.

O principal objectivo deste estudo foi o desenvolvimento de um processo microbiológico anaeróbio de conversão do glicerol em biohidrogénio, com valorização simultânea deste subproduto da produção de biodiesel. Além disso, tendo em conta a forma reduzida do carbono no glicerol e o custo dos processos anaeróbios, o metabolismo fermentativo do glicerol tem especial interesse do ponto de vista de viabilidade económica.

Neste trabalho, comparou-se a produção de H₂ por uma estirpe da *Enterobacter aerogenes*, utilizando glicerol puro e glicerol contido nos resíduos da produção do biodiesel, como substrato. O estudo do efeito de parâmetros físico-químicos como, temperatura do processo e a concentração inicial de substrato e de biomassa, na produção de biohidrogénio, foi também levado a cabo pela metodologia do Desenho Composto Central para determinar as concentrações óptimas de substrato e de biomassa para o processo. O efeito da remoção da fase gasosa, durante a fermentação, foi também avaliado.

Os resultados obtidos mostraram que a diminuição da temperatura de operação de 37 para 30°C, conduziu a um aumento da taxa de biohidrogénio produzido e a uma redução no tempo de equilíbrio do processo.

Além disso, foi também observado que a utilização de 10 g/L de glicerol puro ou de resíduos contendo a mesma concentração de glicerol, conduziu a valores de rendimento produção de H₂ similares (cerca de 2,5 L H₂/L meio de cultura), provando que o desempenho da estirpe de *E. aerogenes* utilizada, não foi influenciado pela presença de outros compostos presentes nos resíduos, que não o glicerol, pelo menos para a concentração de resíduos de biodiesel estudada.

A remoção simultânea de gases formados, principalmente H₂ e CO₂, ao longo da sua produção, mostrou ser bastante eficiente conduzindo a um aumento do valor da razão volumétrica mL H₂/mL CO₂, podendo esse atingir 18 na *headspace*, 6 no saco de recolha e 7 no sistema global, o que é bastante promissor, tendo em conta os custos envolvidos nas tecnologias existentes para a purificação do hidrogénio contido na fase gasosa.

Abstract

Keywords: hydrogen, *Enterobacter aerogenes*, glycerol, biodiesel residues, anaerobic process, Central Composite Design (CCD)

The worldwide energy need has been increasing exponentially, the reserves of fossil fuels have been decreasing, and the combustion of fossil fuels has serious negative effects on environment because of CO₂ emissions. Therefore, the building of a sustainable energy world will require reduction of dependency of fossil fuels and lowering of the amount of pollution that is generated. Bio-hydrogen is considered a clean and viable alternative fuel and “energy carrier” of future.

Regarding its use as biofuel in the transport sector, a target of 8% by 2020 is proposed in the European directive for biofuels - EC/30/2003.

The main goal of this work was the development of an anaerobical microbiological process allowing producing bio-hydrogen from glycerol, with simultaneous valorization of that by-product of biodiesel production. Moreover, given the highly reduced nature of carbon in glycerol and the cost of anaerobic processes, fermentative metabolism of glycerol is of special interest concerning the economic viability.

In this work, H₂ production by a strain of *Enterobacter aerogenes* using as substrate pure glycerol and glycerol-containing biodiesel wastes was compared. The effect of physico-chemical parameters such as temperature, initial substrate and biomass concentrations on the bio-hydrogen production efficiency was investigated. Central Composite Design methodology was used to optimize initial glycerol containing biodiesel wastes and biomass concentrations for the anaerobic fermentation process. The influence of the simultaneous removal of gases produced was also evaluated

The results obtained showed that a decrease of the process temperature of 37 to 30 °C, leads to both an increase of the bio-hydrogen production rate and a decrease of the equilibrium time of the process.

Furthermore, it was also observed that using 10 g/L of pure glycerol or biodiesel wastes containing the same concentration of glycerol as substrate leads to very similar bio-hydrogen production yields (2.5L H₂/L fermentation medium).

This proves that the performance of the strain of *E. aerogenes* used in this work was not influenced by the presence of other components than glycerol in biodiesel residues, at least for the biodiesel wastes concentration studied.

Simultaneous removal of the formed gases (mainly H₂ and CO₂), with its production, shows to be very efficient leading to an increase of the value of the mL H₂/mL CO₂ volumetric ratio, reaching 18 in the headspace, 6 in the retraction bag and 7 in the total, what is very promising regarding costs involved in the technologies for purification of hydrogen produced.

Índice

Resumo	6
Abstract	8
Índice	10
Índice de Figuras	13
Índice de Tabelas	16
Introdução	21
Capítulo 1 Revisão da Literatura	23
1.1 Panorama Energético Global	24
1.1.1 Combustíveis fósseis	24
1.1.2 Energias Alternativas	25
1.2 O Hidrogénio	26
1.3 Produção de hidrogénio por via biológica	28
1.4 <i>Dark Fermentation</i> ou Fermentação anaeróbia	33
1.4.1 Tipos de microorganismos	35
1.4.2 Condições operacionais e físico-químicas	36
1.4.2.1 Inóculos	37
1.4.2.2 Tipos de Substratos	38
1.4.2.3 Tipo de reactor	41
1.4.2.4 Efeito da presença de íons fosfato e metálicos	42
1.4.2.5 Temperatura	42
1.4.2.6 pH	43
1.5 Produção de biohidrogénio por <i>Enterobacter aerogenes</i> com diferentes substratos	44
1.6 Produção de biohidrogénio por <i>Enterobacter aerogenes</i> com glicerol contido nos resíduos da produção de biodiesel	45
1.7 Biorefinarias - O futuro	47

Capítulo 2	Materiais e Métodos	50
2.1	Materiais	51
2.1.1	Microrganismo	51
2.1.2	Meio de Crescimento	51
2.1.3	Reagentes	52
2.1.4	Equipamento	53
2.1.5	Montagem experimental	54
2.2	Métodos	55
2.2.1	Obtenção de células de <i>Enterobacter aerogenes</i> , utilizadas para a produção de hidrogénio.	55
2.2.2	Produção de Hidrogénio	57
2.2.2.1	Optimização do processo pela metodologia do desenho Composto Central	58
2.3	Métodos Analíticos	60
2.3.1	Medição do volume de gás produzido	61
2.3.2	Determinação do conteúdo em H ₂ , CO ₂ e N ₂	62
2.3.3	Determinação do conteúdo em etanol	62
2.3.4	Determinação do conteúdo em glicerol	61
2.3.5	Determinação do peso seco da biomassa	60
Capítulo 3	Apresentação e Discussão de Resultados	63
3.1	Obtenção Laboratorial de Células de <i>Enterobacter aerogenes</i>	64
3.1.1	Crescimento da biomassa	64
3.1.2	Determinação da recta de calibração densidade óptica vs peso seco	65
3.2	Produção de biohidrogénio	67
3.2.1	Optimização das condições operacionais do processo	67
3.2.1.1	Produção de biohidrogénio a partir de glicerol puro e de glicerol contido nos resíduos	68
3.2.1.2	Efeito do aumento da concentração de glicerol	70
3.2.1.3	Efeito da temperatura no rendimento do processo	71
3.2.1.4	Comparação do valor da razão volumétrica H ₂ /CO ₂ obtido utilizando uma coluna de Mariotte e uma saco de recolha de gases.	72
3.2.1.5	Estudo do efeito do tipo de agitação	73
3.2.1.6	Estudo da forma do vaso de reacção	74

3.2.1.7	Estudo do efeito da remoção da fase gasosa	75
3.2.1.8	Estudo do efeito da utilização de uma válvula anti-retorno (VAR) e válvula de alta pressão (VAP)	77
3.2.2	Optimização da concentração de glicerol e biomassa pela Metodologia do Desenho Composto Central (MDCC)	79
3.2.2.1	Varição da produção de etanol na fase líquida	85
3.2.2.2	Varição do consumo de glicerol	86
Capítulo 4	Conclusões Gerais e Sugestões para Trabalho Futuro	88
Capítulo 5	Bibliografia	92
Anexos		98
I.	Considerações Gerais	99
II.	Planeamento do desenho factorial	100
III.	Análise de Resultados	101
III.1	Estimativa dos efeitos e das interacções entre factores	101
III.2	Determinação dos coeficientes da equação polinomial de 2ª ordem	104
III.3	Análise estatística do modelo	105
III.4	Metodologia da superfície de resposta	106
IV.	Resultados experimentais do desenho composto central	107
IV.1	Desenho Factorial $2^{(2)}$	107

Índice de Figuras

Capítulo 1

- Figura 1.1 - Tendência do uso do combustível pela Humanidade ao longo da sua existência; Fonte: (Kotay e Das, 2007).25
- Figura 1.2 - Representação esquemática das diferentes abordagens na produção de biohidrogénio; Fonte: (Kotay e Das, 2007)32
- Figura 1.3 - Caminho metabólico para a produção de hidrogénio por *dark fermentation*; Fonte: (Tanisho, Kuromoto e Kadokura, 1998)34
- Figura 1.4 - Representação esquemática do funcionamento de uma biorefinaria. Fonte: (Drapcho, Nhuan e Walker, 2008)49

Capítulo 2

- Figura 2.1 - Montagem utilizada para a produção de hidrogénio por via biológica em regime descontínuo, na incubadora a 30°C com agitação orbital. 1. Vaso de reacção; 2. Cabeça de vidro com duas saídas; 3. Ponto de recolha de amostra da fase gasosa; 4. Tubo de gás; 5. Bomba peristáltica; 6. Tubo de silicone; 7. Saco de recolha da fase gasosa. 54

Figura 2.2 - Montagem utilizada para a produção de hidrogénio por via biológica em regime descontínuo, (a) no <i>Mariotte</i> a 30 e a 37°C com agitação magnética e (b) na incubadora a 30°C com agitação orbital. 1. Vaso de reacção; 2. Cabeça de vidro com duas saídas; 3. Ponto de recolha de amostra da fase gasosa; 4. Tubo de gás; 5. Bomba peristáltica; 6. Tubo de silicone; 7. Saco de recolha da fase gasosa; 8. Coluna de Mariotte; 9. Placa de agitação magnética.	55
---	----

Capítulo 3

Figura 3.1 - Curvas de crescimento de células de <i>Enterobacter aerogenes</i> , em meio líquido de crescimento (peptona, 20 g/L e NaCl, 5 g/L) a 30°C (□) e 37°C (◆), numa incubadora com agitação orbital de 150 rpm.	65
Figura 3.2 - Recta de calibração peso seco/D.O. de suspensões de células de <i>Enterobacter aerogenes</i>	67
Figura 3.3 - Superfície de resposta, na headspace, do estudo do efeito da concentração de biomassa e de glicerol pela metodologia do desenho composto central. Condições experimentais: $[Biomassa]_{inicial} = 0,1-2$ g/L e $[Glicerol]_{inicial} = 10-30$ g/L. $T = 30^{\circ}C$, $V_{Total}/V_{Líquido} = 2,3$ e com agitação orbital de 150 rpm.	82
Figura 3.4 - Superfície de resposta, no saco de recolha, do estudo do efeito da concentração de biomassa e de glicerol pela metodologia do desenho composto central. Condições experimentais: $[Biomassa]_{inicial} = 0,1-2$ g/L e $[Glicerol]_{inicial} = 10-30$ g/L. $T = 30^{\circ}C$, $V_{Total}/V_{Líquido} = 2,3$ e com agitação orbital de 150 rpm.	83

Figura 3.5 - Superfície de resposta, no sistema global, do estudo do efeito da concentração de biomassa e de glicerol pela metodologia do desenho composto central. Condições experimentais: $[Biomassa]_{inicial} = 0,1-2$ g/L e $[Glicerol]_{inicial} = 10-30$ g/L. $T = 30^{\circ}C$, $V_{Total}/V_{Líquido} = 2,3$ e com agitação orbital de 150 rpm. 85

Índice de Tabelas

Capítulo 1

Tabela 1.1 - Rendimentos de produção de compostos utilizando diferentes fontes de carbono, por <i>E. aerogenes</i> HU-101; Condições da cultura: [Substrato]=10g/L; tempo de reacção, 14h. Os valores apresentados representam médias de duplicados. Fonte: (Nakashimada e colaboradores, 2002)	44
---	----

Capítulo 2

Tabela 2.1 - Composição do meio de crescimento da bactéria <i>E. aerogenes</i>	51
Tabela 2.2 - Composição do meio base.	52
Tabela 2.3 - Reagentes utilizados para a determinação de glicerol em resíduos do Biodiesel	53
Tabela 2.4 - Parâmetros estudados, níveis e expansão considerados para a optimização do processo de produção de biohidrogénio, pela metodologia o desenho factorial $2^{(2)}$ expandido.	59
Tabela 2.5 - Planeamento dos ensaios relativos aos níveis (-1/+1) e à expansão (-1,414/+1,414). O código dos níveis encontra-se na Tabela 2.4.	59

Capítulo 3

- Tabela 3.1 - D.O. e correspondente peso seco para diferentes suspensões celulares, de *Enterobacter aerogenes*, preparadas a partir da solução *stock*..... 66
- Tabela 3.2 - Comparação dos resultados obtidos na produção de hidrogénio a partir de glicerol puro e de glicerol contido nos resíduos provenientes de uma fábrica de produção de biodiesel. Condições experimentais: T=37°C, agitação magnética, $V_{\text{Total do reactor}}/V_{\text{Líquido}}=2,3$ [Biomassa]_{inicial}=0,1 g/L, [Glicerol]_{inicial}=10 g/L. 69
- Tabela 3.3 - Comparação da produção de hidrogénio a partir de resíduos industriais provenientes de uma fábrica de biodiesel com concentrações de 10 e 20 g/L. Condições experimentais: T=37°C, agitação magnética, $V_{\text{Total do reactor}}/V_{\text{Líquido}}=2,3$, [Biomassa]_{inicial}=0,1 g/L. 70
- Tabela 3.4 - Comparação da produção de hidrogénio à temperatura de 30°C e 37°C a partir de resíduos industriais provenientes de uma fábrica de biodiesel. Condições experimentais: Agitação magnética, $V_{\text{Total}}/V_{\text{Líquido}}=2,3$, [Biomassa]_{inicial}=0,1 g/L, [Glicerol]_{inicial} =20 g/L..... 71
- Tabela 3.5 - Comparação da produção de hidrogénio a partir de resíduos industriais provenientes de uma fábrica de biodiesel com coluna de *Mariotte* e saco de recolha. Condições experimentais: T=30°C, Agitação magnética, $V_{\text{Total}}/V_{\text{Líquido}}=2,3$, [Biomassa]_{inicial}=0,1 g/L, [Glicerol]_{inicial} =20 g/L..... 72
- Tabela 3.6 - Comparação da produção de hidrogénio a partir de resíduos industriais provenientes de uma fábrica de biodiesel com diferentes tipos de agitação, magnética e orbital. Condições experimentais: T=30°C, $V_{\text{Total}}/V_{\text{Líquido}}=2,3$, [Biomassa]_{inicial}=0,1 g/L, [Glicerol]_{inicial} =20 g/L..... 73

- Tabela 3.7 - Comparação da produção de hidrogénio a partir de resíduos industriais provenientes de uma fábrica de biodiesel com diferentes tipos de vasos de reacção, *erlenmeyer* e reactor tubular. Condições experimentais: $T=30^{\circ}\text{C}$, $V_{\text{Total}}/V_{\text{Líquido}}=2,3$, $[\text{Biomassa}]_{\text{inicial}}=0,1 \text{ g/L}$, $[\text{Glicerol}]_{\text{inicial}}=20 \text{ g/L}$ 74
- Tabela 3.8 - Comparação dos resultados da produção de hidrogénio obtidos para a *headspace* (HS), saco de recolha de gases e tendo em conta o sistema global, com e sem remoção da fase gasosa. Condições experimentais: Agitação orbital de 150rpm $T=30^{\circ}\text{C}$, $V_{\text{Total}}/V_{\text{Líquido}}=2,3$, $[\text{Biomassa}]_{\text{inicial}}=0,1 \text{ g/L}$, $[\text{Glicerol}]_{\text{inicial}}=20 \text{ g/L}$ 76
- Tabela 3.9 - Comparação da produção de hidrogénio a partir de resíduos industriais provenientes de uma fábrica de biodiesel com remoção contínua por uma bomba peristáltica ou válvula de alta pressão e válvula HIP. Condições experimentais: Agitação orbital de 150rpm $T=30^{\circ}\text{C}$, $V_{\text{Total}}/V_{\text{Líquido}}=2,3$, $[\text{Biomassa}]_{\text{inicial}}=0,1 \text{ g/L}$, $[\text{Glicerol}]_{\text{inicial}}=20 \text{ g/L}$ 77
- Tabela 3.10 - Condições operacionais óptimas determinadas em ensaios de produção de hidrogénio, por via biológica, a partir de glicerol contido nos resíduos de produção de biodiesel. Condições experimentais: $V_{\text{Total}}/V_{\text{Líquido}}=2,3$, $[\text{Biomassa}]_{\text{inicial}}=0,1 \text{ g/L}$, $[\text{Glicerol}]_{\text{inicial}}=20 \text{ g/L}$ 78
- Tabela 3.11 - Análise do efeito da concentração inicial de biomassa e da concentração inicial de glicerol e respectiva interacção, na *headspace*, no saco de recolha da fase gasosa e no sistema global.com base na construção das tabelas de contrastes..... 80
- Tabela 3.12 - Correlação entre os resultados experimentais obtidos e os modelos estabelecidos para a optimização da concentração de glicerol e biomassa. 81

Tabela 3.13 - Variação do consumo de glicerol para os diferentes parâmetros estudados pela metodologia do desenho factorial. Condições experimentais: [Biomassa] _{inicial} =0,1-2 g/L e [Glicerol] _{inicial} =10-30g/L.T=30°C, V _{Total} /V _{Líquido} =2,3 e com agitação orbital de 150 rpm.	86
--	----

Anexos

Tabela I.1 - Tabela de contraste para o desenho factorial 2 ⁽²⁾ , para os factores: concentração de biomassa (A) e concentração de glicerol (B). A resposta considerada foi a razão entre os volumes obtidos de H ₂ e CO ₂	101
Tabela I.2 - Aplicação do algoritmo de Yates, no desenho factorial 2(2), na determinação do efeito e da interacção dos factores: concentração de biomassa (A), concentração de glicerol (B). A resposta considerada foi o rendimento razão entre os volumes obtidos de H ₂ e CO ₂ , na <i>headspace</i>	103
Tabela I.3 - Aplicação do algoritmo de Yates, no desenho factorial 2 ⁽²⁾ , na determinação do efeito e da interacção dos factores: concentração de biomassa (A), concentração de glicerol (B). A resposta considerada foi o rendimento razão entre os volumes obtidos de H ₂ e CO ₂ , no saco de recolha.	103
Tabela I.4 - Aplicação do algoritmo de Yates, no desenho factorial 2 ⁽²⁾ , na determinação do efeito e da interacção dos factores: concentração de biomassa (A), concentração de glicerol (B). A resposta considerada foi o rendimento razão entre os volumes obtidos de H ₂ e CO ₂ , no total obtido.	103
Tabela I. 5 - Valores de F _{crítico} para um intervalo de confiança de 95%.....	106

Tabela I.6 - Valores da razão volumétrica H_2/CO_2 obtidos sob as condições experimentais estabelecidas para o desenho (-1/+1).....	107
Tabela I.7 - Valores da razão volumétrica H_2/CO_2 obtidas sob as condições experimentais estabelecidas para a expansão (-1,414/+1,414).....	108
Tabela I.8 - Valores da razão volumétrica H_2/CO_2 obtidas sob as condições experimentais estabelecidas para o ponto médio.....	108

Introdução

O presente panorama energético global demonstra a evolução no consumo de combustíveis para satisfazer as necessidades da Humanidade. A grande problemática actual, prende-se ao facto deste consumo incidir, maioritariamente, nos combustíveis fósseis, que no decorrer da sua combustão, libertam-se gases nefastos para a atmosfera.

Assim, é necessário recorrer a novas alternativas energéticas, tal como o hidrogénio, que é considerado um vector energético do futuro. (Kapdan e Kargi 2006)

Este trabalho teve como objectivo otimizar parâmetros e condições operacionais para a produção de biohidrogénio por fermentação anaeróbia por uma estirpe da bactéria *Enterobacter aerogenes*, utilizando, como substrato, glicerol puro e contido nos resíduos duma fábrica de produção de biodiesel.

Normalmente, o glicerol gerado como resíduo em vários processos industriais, tais como na produção de biodiesel, é utilizado como matéria-prima para a produção de diversos compostos, como alguns produtos farmacêuticos e alimentares. No entanto, quando proveniente da produção do biodiesel a partir de óleos usados, este resíduo bruto possui um valor comercial muito baixo, essencialmente devido às impurezas que contém, devendo ser previamente purificado, antes de sua utilização, o que é economicamente pouco rentável. Um das alternativas para a utilização deste glicerol de baixa qualidade é a sua utilização como substrato num processo de fermentação, como seja a produção de hidrogénio por via biológica.

Assim, inicialmente determinou-se a curva de crescimento da estirpe de *E. aerogenes*, seleccionada para este trabalho e a relação entre a D.O. e o seu peso seco de diferentes suspensões celulares.

Seguidamente, optimizaram-se as condições operacionais e físico-químicas do processo.

Posteriormente, nas melhores condições operacionais foi levada a cabo a optimização das concentrações de biomassa e de substrato, pela metodologia no desenho composto central (DCC), para o processo de produção de H₂ por fermentação anaeróbia.

Na fase final deste estudo apresentam-se algumas sugestões para trabalho futuro, com o objectivo de rentabilizar o processo, tanto ao nível de matérias-primas e produto final, como financeiro.

Capítulo 1 Revisão da Literatura

1.1 Panorama Energético Global

1.1.1 Combustíveis fósseis

O Homem tem procurado satisfazer as suas necessidades energéticas desde o princípio da sua existência. Os combustíveis da Humanidade têm, continuamente, evoluído para melhores, mais eficientes, mais seguros, e mais “limpos”. Desde a madeira, gordura animal, carvão, petróleo, gás natural até ao hidrogénio, houve uma clara tendência para a utilização de combustíveis menos poluentes (Das, 2008).

Presentemente, a utilização de combustíveis fósseis está a causar mudanças climáticas globais, devido, em grande parte, à emissão de substâncias químicas poluentes como CO_x , NO_x , SO_x , C_xH_x , cinzas e outros compostos orgânicos que são libertados para a atmosfera, como resultado da sua combustão (Das e Veziroglu, 2001). Além disso, o seu uso indiscriminado conduziu à situação de limitação das reservas existentes, tornando-se crucial a busca de novas alternativas de produção de energia (Das, 2008).

Tal cenário tem feito com que muitos investigadores tenham vindo a desenvolver investigação na área de combustíveis alternativos como os biocombustíveis (Figura 1.1).

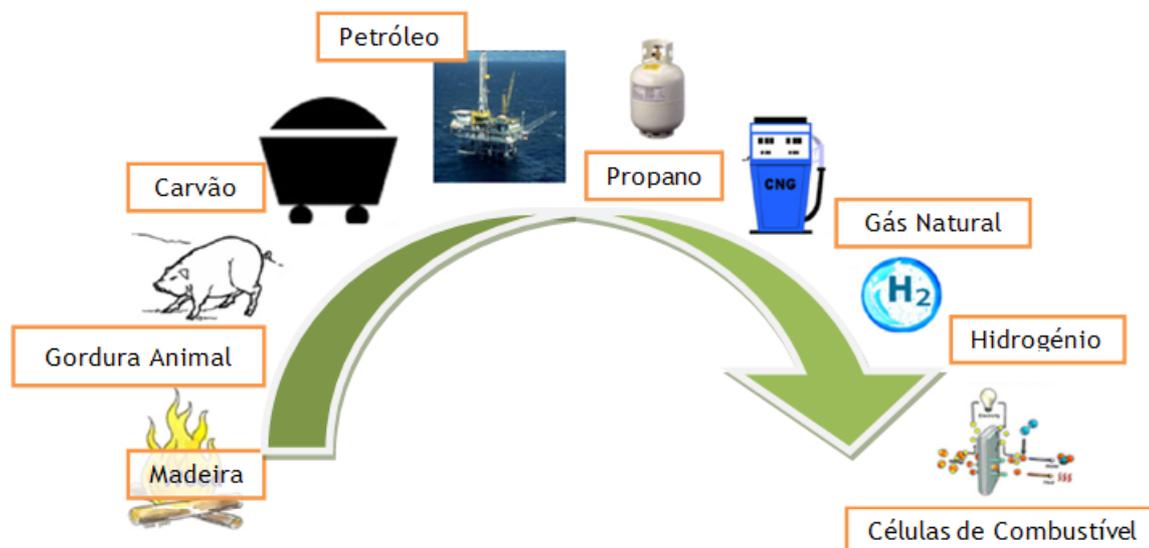


Figura 1.1 - Tendência do uso do combustível pela Humanidade ao longo da sua existência; Fonte: (Kotay e Das, 2007).

1.1.2 Energias Alternativas

Entende-se por energias alternativas (renováveis) as que derivam do sol, do vento, das ondas e da biomassa, as quais apresentam um enorme potencial para se desenvolver e satisfazer as necessidades energéticas globais.

Os biocombustíveis derivam de fontes biológicas e entre eles, encontram-se o metano produzido por digestão anaeróbia e o bioetanol produzido por fermentação da cana-de-açúcar e de outros substratos como o amido. Mais recentemente biocombustíveis como o biohidrogénio e o biodiesel podem ser produzidos e aplicados para produção de energia.

Relativamente ao bioetanol, biodiesel, biohidrogénio e o biogás, estes têm sido foco de investigação e as tecnologias para a sua produção desenvolvidas, embora a grande maioria não esteja ainda pronta para comercialização à escala mundial (Drapcho e colaboradores, 2008).

Tendo isto em consideração, foi proposto por uma Directiva Europeia o uso de 8% de biocombustíveis no sector dos transportes - CE/30/2003.

A directiva Europeia é adoptada por todos os países da União Europeia, sendo que para o caso específico de Portugal, foi aprovado por Resolução de Conselho de Ministros (RCM) nº 21/2008 a utilização de 10 % em biocombustíveis até 2010.

Actualmente, o hidrogénio é mais caro do que os outros combustíveis disponíveis, sendo que poderá ter uma maior contribuição na economia a longo prazo, se a tecnologia para a sua produção melhorar, por abaixamento dos custos envolvidos no processo. Nesse sentido a produção de biohidrogénio, pode ser uma resposta potencial para suprimir alguns confinamentos económicos e satisfazer muitas das nossas necessidades energéticas. Contudo é necessário um estudo técnico-económico com a comparação entre produção de hidrogénio por via biológica e por métodos convencionais (Kotay e Das, 2007).

1.2 O Hidrogénio

O hidrogénio é o elemento mais abundante no universo, representando $\frac{3}{4}$ de toda a matéria existente e a sua utilização como energia alternativa sustentável apresenta um grande potencial pois tem zero emissões de gases nefastos para o ambiente, formando apenas água quando ocorre a sua combustão.



A atmosfera contém cerca de 0,07% de hidrogénio, enquanto que na superfície terrestre existe 0,14%, onde é o elemento mais leve, sendo a sua massa 0,09 g, em comparação com a massa do ar que tem o valor de 1,2 g (Das e Veziroglu, 2001).

A densidade energética do hidrogénio é de 143 kJ/g , sendo a mais elevada de todos os combustíveis, estando na ordem de 2,75 vezes superior quando comparada com combustíveis de hidrocarbonetos pesados (Kapdan e Kargi, 2006; Drapcho e colaboradores, 2008).

Em termos de aplicações, este biocombustível tem como destino o consumo doméstico/industrial, sendo mais fácil e seguro de manusear que o gás natural (Das, 2008). Outra aplicação possível é a sua combustão directa em motores, ou como elemento fundamental em células de combustível. Contudo as indústrias dos fertilizantes e petróleo são os maiores consumidores de H_2 , com 50 e 37%, respectivamente.

As vendas do hidrogénio cresceram 6% nos últimos cinco anos, o que pode estar relacionado com o aumento da utilização deste gás, para o melhoramento da qualidade de combustíveis convencionais, imposto por normas e directivas europeias (Kotay e Das, 2007). No entanto, existem outras aplicações possíveis como, reagente em processos de hidrogenação, extractor de oxigénio, com objectivo de prevenir a oxidação e corrosão de materiais, como combustível para *rockets* e como fluido de refrigeração em geradores eléctricos, tirando partido das suas características físico-químicas únicas (Das e Veziroglu, 2001).

Presentemente, 40% do hidrogénio é produzido a partir de gás natural, 30% de óleos pesados ou Nafta, 18% do carvão e 5% a partir de electrólise (Das, 2008).

A produção biológica do hidrogénio, apenas contribui com uma pequena porção, cerca de 1%, para o total produzido, sendo que se espera que esta cresça, exponencialmente, com o acompanhar da inovação e desenvolvimento de novas técnicas e processos (Drapcho e colaboradores, 2008).

1.3 Produção de hidrogénio por via biológica

Uma das vantagens da produção de hidrogénio por via biológica, sobre os processos químicos convencionais, reside no facto dos microorganismos terem a capacidade de “seleccionar” o seu substrato, mesmo quando este se encontra numa mistura de outros compostos.

Assim, minimiza-se a necessidade de isolar e purificar o substrato fundamental ao processo, o que se traduz num maior espectro de compostos a utilizar, havendo menor necessidade de tratamentos químicos (Drapcho e colaboradores, 2008).

Outra vantagem relevante do processo microbiológico é o facto das temperaturas e pressões de operação serem muito similares à temperatura e pressão atmosféricas, tornando-se num processo com balanço energético favorável (Das, 2008).

Os grandes bioprocessos utilizados para a produção de hidrogénio podem ser classificados em três categorias principais:

1. Bio-fotólise da água por algas.
2. *Dark-Fermentation* durante a fase acidogénica da digestão anaeróbia da matéria orgânica.
3. Processos de duas etapas, *dark* e *photo-fermentation*.

A produção de hidrogénio a partir de água por algas, consiste na separação de moléculas de água em iões hidrogénio e oxigénio, via fotossíntese, sendo que os iões hidrogénio formados são convertidos em hidrogénio molecular pelo enzima hidrogenase.

Uma espécie de alga bem conhecida, produtora de hidrogénio, é a *Chlamydomonas reinhardtii*, tendo sido também detectada actividade do enzima hidrogenase em algas verdes, *Scenedesmus obliquus*, em algas verdes marinhas, *Chlorococum littorale*, *Playtmonas subcordiformis* e ainda na *Chlorella fusca* (Kapdan e Kargi, 2006). A diferente actividade da hidrogenase foi comparada em diferentes espécies, sendo que na *Scenedesmus* é menor que na *Chlamydomonas reinhardtii* (Winker e colaboradores, 2002).

A produção de hidrogénio por Algas pode ser considerada economicamente viável e sustentável em termos da utilização de água como fonte renovável e consumo de CO₂, dado que este é um dos poluentes atmosféricos existente. Contudo, este processo apresenta algumas limitações como a inibição do enzima hidrogenase, em presença do oxigénio e o facto de não utilizar resíduos como substrato (Kapdan e Kargi, 2006). Nesse aspecto, a *dark* e *photo fermentation* são consideradas vantajosas, devido ao facto da produção de hidrogénio poder ser realizada a partir de resíduos, associando dois factores, o tratamento de um efluente e a produção de “energia limpa” (Kapdan e Kargi, 2006).

Em relação à digestão anaeróbia de matéria orgânica, neste caso, o hidrogénio é produzido por organismos quimio-organotróficos que utilizam substratos orgânicos como fonte de carbono. A digestão anaeróbia é um processo que decorre em anaerobiose.

A produção de hidrogénio por fermentação está geralmente associada à presença ferredoxina, que é um transportador de baixo potencial redox. O hidrogénio pode ser produzido por microorganismos dos géneros *Archaea* e *Bacteria*, os quais podem desenvolver o seu metabolismo em diferentes gamas de temperatura, sendo mesófilos (25 a 40°C), termófilos (40 a 65°C), termófilos extremos (65 a 80°C) e hipertermófilos (>80°C).

Da produção de hidrogénio por fermentação resultam também outros compostos (subprodutos) cujas concentrações e taxas de produção dependem de parâmetros físico-químicos como as concentrações de biomassa e de substrato, pH e temperatura do processo (Drapcho e colaboradores, 2008). Como se trata de um processo anaeróbio, não ocorre o problema da limitação por O₂ (Kotay e Das, 2007).

Para aplicação ao nível industrial, existem vantagens deste processo, tais como, a elevada taxa de crescimento, tanto das bactérias como da produção de hidrogénio, o facto de poder decorrer durante o dia e a noite e utilizar, como substratos, compostos orgânicos (Das e Veziroglu, 2001).

A fermentação anaeróbia pode ser maximizada por acoplamento dos seguintes factores (Das e Veziroglu, 2001):

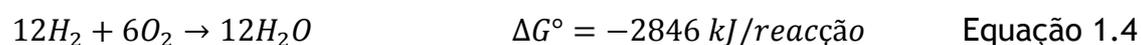
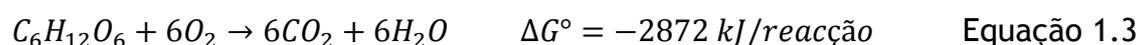
1. Uma fonte acessível e rica em electrões.
2. Hidrogenase activa.

Assim, é importante avaliar este processo, energeticamente. Assim, em teoria, a reacção de produção de hidrogénio por microorganismos a partir, por exemplo, de glucose pode ser descrita pela equação 1.2.



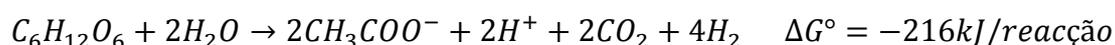
Em que ΔG° corresponde à energia libertada durante o processo.

Nesta reacção, 99% da energia originalmente presente na glucose está contida em 12 mol de H₂ produzidos. Este valor corresponde ao cálculo efectuado comparando a energia libertada pela combustão da glucose e pela combustão do hidrogénio (Equações 1.3 e 1.4).



A energia livre de formação de hidrogénio (Equação 1.2) acredita-se ser demasiado reduzida para proporcionar crescimento microbiológico, pelo que este caminho metabólico não é conhecido por ocorrer em sistemas biológicos, pois são necessários 42 a 50 kJ para a síntese do ATP em condições de equilíbrio e 63 KJ para situações de não-equilíbrio (Drapcho e colaboradores, 2008).

No entanto, em sistemas biológicos, os passos metabólicos que se conhecem fazem prever a formação de, no máximo, 4 mol de H₂ por mol de glucose.



Equação 1.5

Neste caso o valor de ΔG° é suficiente para que ocorra, tanto síntese de ATP como crescimento celular, sendo portanto um mecanismo, termodinamicamente, favorável (Drapcho e colaboradores, 2008).

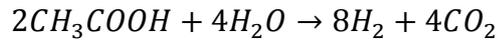
Já a combinação de *dark* com a foto fermentação num sistema híbrido de duas etapas poderá melhorar os rendimentos totais, em relação à produção de hidrogénio, uma vez que a sinergia do processo conduz à maior utilização de substrato, por diminuição das limitações biológicas. Na primeira etapa, numa *dark fermentation* termófila a biomassa é metabolizada, com produção de acetato, dióxido de carbono e hidrogénio. Num fotoreactor separado, o acetato é então convertido em mais hidrogénio e dióxido de carbono.

Esta combinação pode atingir um resultado mais próximo do resultado máximo teórico esperado, 12 mol de H₂ (mol glucose)⁻¹, de acordo com as seguintes reacções (Equações 1.6 e 1.7) (Das e Veziroglu, 2008).

i. Etapa I - *Dark fermentation* (anaeróbios facultativos)



ii. Etapa II - Fotofermentação (bactéria fotossintética)



Equação 1.7

Em resumo e de forma esquemática, a Figura 1.2 representa as diferentes abordagens na produção de biohidrogénio.

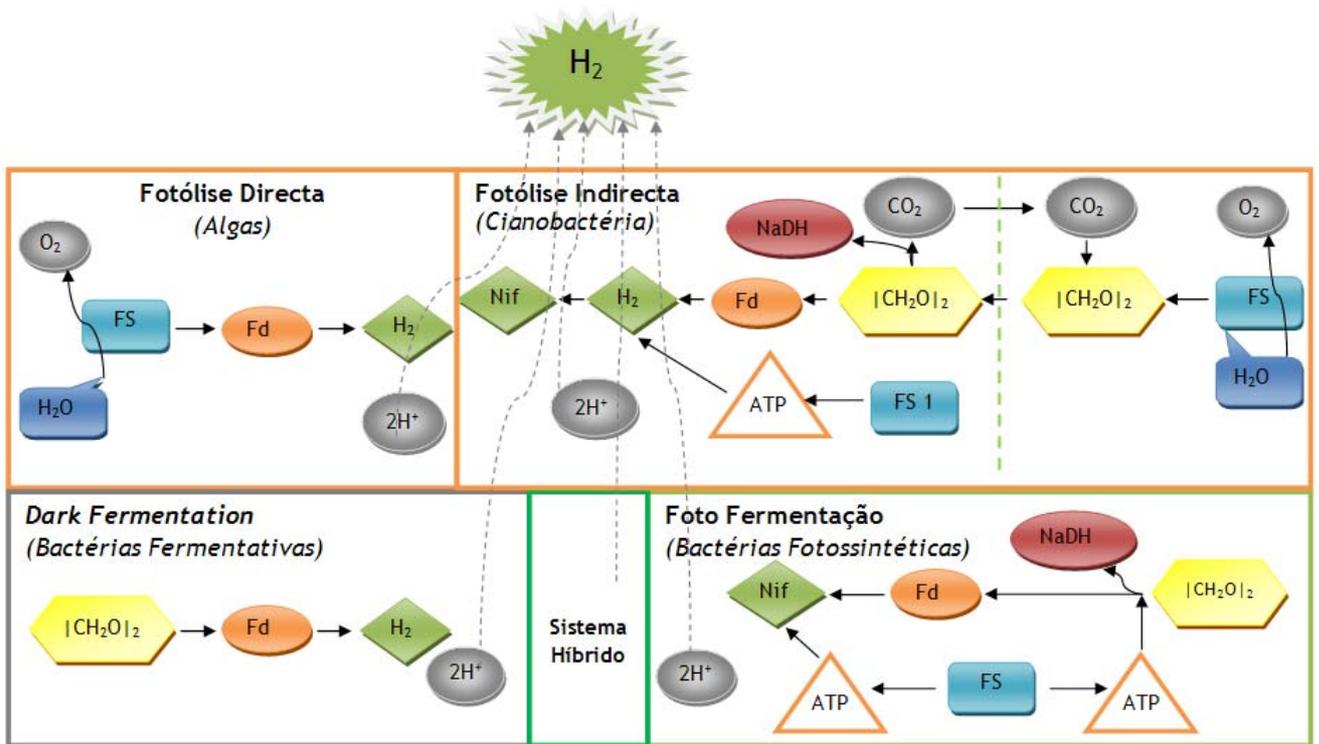


Figura 1.2 - Representação esquemática das diferentes abordagens na produção de biohidrogénio; Fonte: (Kotay e Das, 2007)

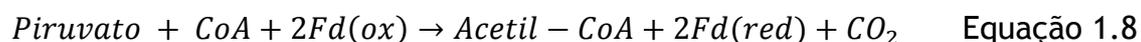
1.4 *Dark Fermentation*

A produção de hidrogénio por fermentação anaeróbia é um fenómeno que ocorre sob condições anóxicas, ou seja, sem oxigénio presente como aceitador de electrões. Quando a bactéria cresce com substratos orgânicos, crescimento heterotrófico, o que ocorre é que estes mesmos substratos são degradados por oxidação para fornecer energia para o crescimento metabólico. Esta oxidação gera electrões, os quais se distribuem de modo a obter neutralidade electrónica. Num ambiente onde exista oxigénio, este é reduzido sendo a água o produto. Num ambiente anóxico, outros elementos, tais como, protões (H^+), são reduzidos a hidrogénio molecular (H_2), actuando como aceitadores de electrões.

No processo de fermentação, utilizando glucose como substrato esta é inicialmente convertida em piruvato, por via glicolítica. Por sua vez este é oxidado a acetil-CoA, podendo ser convertido a acetil fosfato, o que resulta na geração de ATP e na produção de acetato.

A oxidação do piruvato a acetil-CoA requer a redução da ferredoxina. A ferredoxina reduzida é oxidada pela hidrogenase que gera $Fd(ox)$ e liberta electrões para produzir hidrogénio molecular.

A reacção geral pode ser esquematizada e descrita pelas equações 1.8 e 1.9.



A fermentação anaeróbia permite a produção de hidrogénio por uma via relativamente simples, com um largo espectro de utilização de substratos, incluindo substratos contidos em resíduos como é o caso da glucose (Das e Veziroglu, 2008) (Figura 1.3).

As bactérias anaeróbias podem ser de dois tipos; anaeróbias obrigatórias e anaeróbias facultativas. No que respeita às bactérias anaeróbias facultativas estas produzem 2 mol de H_2 por mol de glucose, enquanto que as estritamente anaeróbias dão 4. Contudo as anaeróbias facultativas são menos sensíveis à presença de oxigénio e, por vezes, têm a capacidade de retomar a produção de hidrogénio depois de danos acidentais causados pelo oxigénio, esgotando-o no seu meio. Como consequência deste facto, uma bactéria anaeróbia facultativa é considerada melhor que uma estritamente anaeróbia, para levar a cabo a produção de H_2 por fermentação (Das e Veziroglu, 2008). O caminho metabólico para a produção de hidrogénio por *dark fermentation*, a partir da glucose está representado na Figura 1.3.

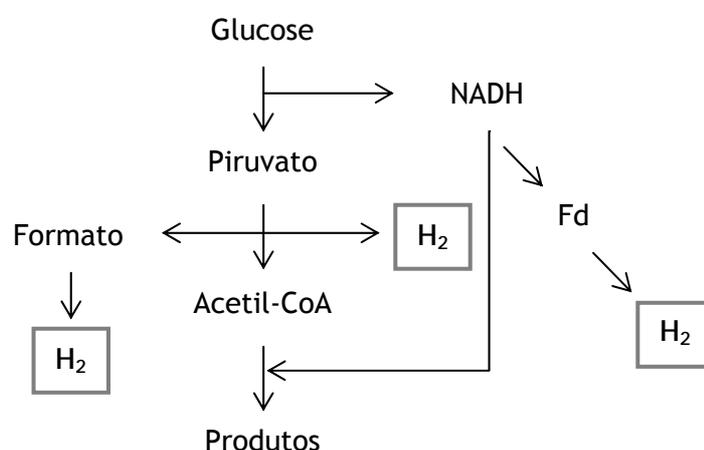


Figura 1.3 - Caminho metabólico para a produção de hidrogénio por *dark fermentation*; Fonte: (Tanisho e colaboradores, 1998).

1.4.1 Tipos de microorganismos

São vários os microorganismos anaeróbios que podem produzir hidrogénio, tendo como fonte de carbono compostos orgânicos contidos em resíduos. Entre esses, encontram-se os microorganismos pertencentes ao género *Clostridium*, tal como *C. buytricum*, *C. pasteurianum*, *C. paraputrificum* e *C. bifermentans*, os quais são anaeróbios obrigatórios e mesófilos. Relativamente às espécies *Clostridia*, estas produzem hidrogénio para a fase gasosa durante a sua fase exponencial de crescimento, dado que o metabolismo celular, ao atingir a fase estacionária altera-se, passando da produção de hidrogénio, para a produção de outros compostos, tais como acetona.

Estudos sobre a diversidade microbiológica de microorganismos mesófilos produtores de hidrogénio levaram à conclusão de que a espécie *Clostridia* representa 64,6% do total das populações estudadas. Esta espécie pode ser facilmente obtida por tratamento calorífico de lamas biológicas.

Para além do género *Clostridium*, foram também isolados a partir de lamas biológicas outros géneros de bactérias anaeróbias, tais como, *Actinomyces* e *Porphyromonos* (Kapdan e Kargi, 2006).

Outros microorganismos mesófilos, mas anaeróbios facultativos, capazes de produzir hidrogénio são as espécies pertencentes ao género *Enterobacteriaceae* os quais têm a capacidade de metabolizar por fermentação anaeróbia substratos, como a glucose em misturas com ácidos ou com 2,3-butanodiol. Em ambos os casos, CO₂ e H₂ são produzidos para a fase gasosa, e na fase líquida formam-se ácido fórmico, etanol e 2,3-butanodiol. Entre essas espécies, a capacidade de produção de hidrogénio de culturas de *Enterobacter aerogenes*, tem sido largamente estudada, tendo sido obtido o rendimento de 1,97 mmol de H₂ / g_{glucose} (Kapdan e Kargi, 2006). Outra estirpe é a *Enterobacter cloacae* ITT-BY 08 que apresenta um rendimento de produção de 2,2 mol de H₂ / mol_{glucose}.

Para além das bactérias mesófilas, tem vindo também a ser estudada a capacidade de microorganismos termófilos, pertencentes ao género *Thermoanaerobacterium*, para produzir hidrogénio. No entanto, estirpes de *T. thermosaccharolyticum* e *Desulfotomaculum geothermicum*, mostraram, em condições mesófilas, produzir hidrogénio por fermentação anaeróbia (Shin e colaboradores, 2004). A bactéria termófila *Thermococcus kodakaraensis*, com temperatura óptima de crescimento de 85°C, foi também isolada e identificada como produtora de hidrogénio em condições mesófilas (Kanay e colaboradores, 2005). A bactéria *Clostridium thermolactium* conduziu à produção de H₂ à temperatura de 58°C, a partir da lactose (Collet e colaboradores, 2004).

Contudo, do ponto de vista económico é importante o desenvolvimento de um processo de produção de hidrogénio temperaturas mais baixas, tendo em vista a minimização dos custos inerentes ao processo.

Recentemente, a produção de hidrogénio foi também avaliada em culturas aeróbias tais como, *Aeromonas*, *Pseudomonas* e *Vibrio* (Kapdan e Kargi, 2006).

1.4.2 Condições operacionais e físico-químicas

A produção de hidrogénio por fermentação anaeróbia depende de uma série de condições e parâmetros operacionais e físico-químicos que influenciam o processo, nomeadamente, o tipo de inóculo e de substrato, tipo de reactor, temperatura e a presença e concentração de azoto, fosfatos e iões metálicos e pH.

1.4.2.1 Inóculos

Entende-se por inóculo a biomassa que se adiciona ao meio de fermentação (substrato e outros componentes) com vista a produzir um determinado composto.

✓ Culturas puras

Uma cultura pura é composta por um único tipo de microorganismo.

Os géneros *Clostridium* e *Enterobacter* são os mais utilizados como inóculos para a produção de hidrogénio, por via fermentativa. As espécies do género *Clostridium*, são gram-positivas, em forma de bastão e estritamente anaeróbias, enquanto que as espécies do género *Enterobacter* são gram-negativas, em forma de bastão e anaeróbias facultativas (Li e Fang, 2007). Muitos dos estudos realizados com estas culturas foram realizados em sistema descontínuo, utilizando glucose como substrato. Contudo, a utilização de resíduos orgânicos contendo fontes de carbono, em regime contínuo, é de grande interesse tendo em vista a aplicação industrial (Wang e Wan, 2008).

A estirpe de *Enterobacter aerogenes* utilizada no presente trabalho tem a capacidade de produzir hidrogénio a partir de glicerol contido nos resíduos provenientes de uma indústria produtora de biodiesel, não sendo necessário o tratamento prévio dos mesmos. Esta estirpe é mesófila e anaeróbia facultativa, o que lhe confere outra vantagem para aplicação à escala industrial.

✓ Culturas mistas

Existem consórcios de bactérias em ambientes naturais, tais como, lamas residuais e adubos, entre outros, os quais podem ser utilizados como inóculos para a produção de hidrogénio, por via anaeróbia.

Os processos de fermentação para a produção de hidrogénio utilizando culturas mistas, em comparação com os que utilizam culturas puras, são mais simples de manusear e controlar, podendo inclusive ser capaz de metabolizar um espectro mais alargado de substratos.

Contudo, neste caso, porque estão presentes no consórcio, vários tipos de bactérias o hidrogénio produzido pelas bactérias produtoras de hidrogénio, pode vir a ser consumido pelas bactérias consumidoras de hidrogénio, durante o processo global de fermentação, o que é uma desvantagem pois induz a diminuição do rendimento final de produção. Uma das formas de contornar esse efeito é a aplicação de um pré-tratamento para suprimir a actividade das bactérias consumidoras de hidrogénio, preservando a viabilidade das bactérias produtoras de hidrogénio. Existem diversos tipos de tratamento para este efeito, tais como, choque térmico, ou adição de compostos químicos como clorofórmio, 2-bromoetanosulfato e isopropano. Entre estes, o mais recorrentemente aplicado, é o choque térmico (Wang e Wan, 2008).

1.4.2.2 Tipos de Substratos

✓ *Glucose*

A glucose é um açúcar simples que pode ser uma fonte de carbono, facilmente, biodegradável e encontra-se na maioria de resíduos agrícolas. Como referido, anteriormente (secção 1.3), de acordo com a estequiometria da reacção, o rendimento teórico de produção de hidrogénio é 12 mol H₂/mol glucose e quando ocorre a formação de acetato, apenas se originam 4 mol de H₂. Se o produto intermédio for o butirato, o número de moles obtidas reduz-se para 2, o que sugere desvios na via metabólica, devido a factores físico-químicos ou condições operacionais.

No entanto, na prática, o rendimento máximo de hidrogénio obtido, a partir de glucose como substrato foi de 2,0-2,4 mol de H₂/mol de glucose (Ueno, e colaboradores, 2001; Fang e Liu, 2002; Morimoto e colaboradores, 2004).

✓ *Amido*

O amido contido em resíduos proveniente da indústria alimentar é também uma fonte de carbono para os microorganismos produtores de hidrogénio, sendo além disso abundante na natureza (cereais, tubérculos).

Teoricamente, de acordo com a estequiometria da reacção, um máximo de 553 mL de hidrogénio são produzidos com grama de amido. Este rendimento pode diminuir em determinadas condições físico-químicas, dado que o amido pode também ser utilizado para síntese celular.

Liu e Shen observaram que a taxa específica de produção de H₂ por uma estirpe de *C.pasteurianum* a partir de uma concentração de 24 g/L de milho comestível foi de 237 mL de H₂/sólidos suspensos voláteis dia (SSV d), enquanto que utilizando uma cultura mista a taxa específica de produção de hidrogénio foi de 480 mL/SSV d a partir de 4,6 g/L do mesmo substrato (Liu e Shen, 2004).

✓ *Celulose*

A celulose é o constituinte mais abundante das plantas, estando também presente em resíduos agrícolas e efluentes industriais tais como os provenientes da indústria da pasta de papel (Kapdan e Kargi, 2006).

A produção de hidrogénio a partir de celulose em condições mesófilas, por uma cultura mista foi estudada por Lay (2001) com um rendimento máximo de 2,18 mol H₂/mol celulose e tendo este verificado que o aumento da concentração deste substrato conduziu a menores rendimentos do processo. Contudo, foi observado que a produção de hidrogénio pela bactéria termófila *Thermoanaerobacterium*, em condições mesófilas (37°C), conduziu a um aumento da taxa específica de produção de H₂, o que poderá estar relacionado com o facto de a 37°C ocorrer uma diminuição da hidrólise da celulose, resultando assim numa menor concentração de substrato disponível para a biomassa (Liu e colaboradores, 2003)..

De um modo geral, a glucose, a sacarose e o amido são os substratos mais utilizados em processos de fermentação para a produção de biohidrogénio. Contudo, nos últimos anos, tem existido uma tendência para se utilizarem resíduos ricos nestes compostos, como substrato com vista a minimizar os custos inerentes ao processo.

✓ *Resíduos da indústria alimentar*

Foi desenvolvido um estudo, utilizando resíduos da indústria de frutas e tubérculos, mais especificamente, maçãs e batatas, onde se obteve um máximo de 0,21 L H₂/g resíduo (Ginke e colaboradores, 2005).

O principal problema deste tipo de resíduos é o facto de conterem várias concentrações de hidratos de carbono e proteínas, na mesma mistura, não sendo, por isso, um substrato facilmente degradável (Kapdan e Kargi, 2006).

Com base em trabalhos desenvolvidos verificou-se que o rendimento máximo da produção de hidrogénio, foi obtido utilizando um resíduo com maior teor em hidratos de carbono, podendo ser até cerca de 20 vezes superior quando comparado com os resíduos ricos em proteínas. Este comportamento pode ser explicado com base no facto de, neste caso, ocorrer consumo de hidrogénio e azoto, gerado pela degradação das proteínas, para formação de amónia (Lay e colaboradores, 2003).

Foi demonstrado que numa gama apropriada, o aumento da concentração de substrato conduz ao aumento da capacidade de produção de hidrogénio, pelas bactérias produtoras de hidrogénio. No entanto, se este aumento for demasiadamente elevado, de acordo com o tipo de inóculo e condições operacionais, pode ocorrer um decréscimo do rendimento em H₂ (Loe e colaboradores, 2008; Ginkel e colaboradores, 2001).

1.4.2.3 Tipo de reactor

Muitos dos estudos realizados na área da produção de hidrogénio, por fermentação anaeróbia, foram conduzidos em regime descontínuo. Contudo, as operações à escala industrial requerem processos contínuos, por razões práticas de engenharia.

O reactor tipo CSTR (*Continuous Stirred Tank Reactor*) é o mais utilizado em estudos para a produção de hidrogénio em regime contínuo. Num reactor CSTR convencional (sem material de suporte), a biomassa encontra-se homogeneizada com o meio de fermentação, do qual faz parte o efluente a ser utilizado como substrato. Neste caso, o *washout* da biomassa pode ocorrer num período menor do que o tempo de retenção hidráulico (TRH) o que é uma das desvantagens da utilização deste tipo reactor dado que a concentração de biomassa e produção de hidrogénio, são limitadas. Uma das alternativas é a utilização de células imobilizadas, ou seja, um reactor capaz de manter quantidades elevadas de biomassa e de operar a um menor TRH, sem o *washout* da biomassa. Esta imobilização pode ser levada a cabo pela formação de grânulos ou biofilmes (Li e Fang, 2007). Efectivamente, Zhang e colaboradores demonstraram que a formação de grânulos nas lamas, permite o aumento da concentração de biomassa dentro do reactor evitando o *washout*, resultando num aumento de produção de biohidrogénio (Zhang e colaboradores, 2007).

Numa abordagem final, foram realizados estudos que levaram à conclusão de que a retenção da biomassa no reactor por grânulos é mais eficaz quando comparada com a formação de biofilmes, dado que conduz a maiores rendimentos de produção de hidrogénio, no processo de fermentação, em regime contínuo (Wang e Wan, 2008).

1.4.2.4 Efeito da presença de iões fosfato e metálicos

A presença de fosfatos é vantajosa para a produção de biohidrogénio, devido ao seu valor nutricional e à sua capacidade de efeito tampão.

Foi demonstrado que, numa gama apropriada, um aumento da concentração de fosfatos, pode aumentar a viabilidade das bactérias produtoras de hidrogénio, resultando num aumento do rendimento do processo, sendo que, concentrações demasiado elevadas podem conduzir a uma redução do hidrogénio produzido (Bisaillon e colaboradores, 2006; Lay e colaboradores, 2005).

Em relação aos iões metálicos, os estudos efectuados focaram-se sobretudo no Fe(II), em quantidades traço, caso contrário inibiriam a actividade das bactérias produtoras de H₂. Estes iões influenciam o processo de fermentação, provavelmente, pela sua presença ser fundamental para o metabolismo do enzima hidrogenase (Li e Fang, 2007; Wang e Wan, 2008).

1.4.2.5 Temperatura

A temperatura é um dos parâmetros operacionais que mais influencia o processo de fermentação para a produção de biohidrogénio.

Foi demonstrado que numa gama apropriada, o aumento da temperatura pode conduzir a um aumento da produção de hidrogénio, sendo que temperaturas muito elevadas podem conduzir a uma diminuição da viabilidade e rendimento por parte de bactérias produtoras de hidrogénio (Wang e Wan, 2008).

Contudo, a gama de temperaturas óptima encontra-se aproximadamente nos 37°C, para condições mesófilas e para a gama das termófilas, aproximadamente, nos 55°C para culturas puras (Li e Fang, 2007).

Para culturas mistas foi demonstrado por (Wang e Wan, 2008) que, em regime descontínuo, a produção de etanol, ácido acético e H₂ aumentaram com um aumento da temperatura de 20°C para 35°C, e diminuíram para temperaturas entre os 35 e 55°C. Este comportamento poderá estar relacionado com a uma alteração do metabolismo ou percurso metabólico induzido por determinadas bactérias que são dominantes a certas temperaturas.

1.4.2.6 pH

Outro factor muito importante para o processo de produção de hidrogénio, por via biológica, é o pH, pois altera a actividade do enzima hidrogenase, bem como os percursos metabólicos das bactérias produtoras de hidrogénio podendo diminuir a sua concentração.

Vários autores demonstraram que valores de pH entre 6 e 7 conduzem a rendimentos mais elevados em hidrogénio (Wang e Wan, 2008).

1.5 Produção de biohidrogénio por *Enterobacter aerogenes* com diferentes substratos

A maior parte dos estudos de produção de hidrogénio têm sido realizados por fermentação anaeróbia utilizando várias espécies de bactérias *Clostridium*. Contudo, as *Enterobacter aerogenes* apresentam uma vantagem em relação a estas, pois o seu crescimento não é inibido na presença de uma atmosfera de 100% em hidrogénio, possuindo a mesma capacidade para, converter hidratos de carbono, em hidrogénio, etanol, 2,3 - butanodiol, lactato e acetato (Ito, 2005).

Com o objectivo de estudar o metabolismo fermentativo da bactéria *Enterobacter aerogenes*, têm sido realizados vários estudos, a partir de diferentes substratos. Na Tabela 1.1, estão apresentados os diferentes substratos utilizados e os respectivos rendimentos obtidos.

Tabela 1.1 - Rendimentos de produção de compostos utilizando diferentes fontes de carbono, por *E. aerogenes* HU-101; Condições da cultura: [Substrato]=10g/L; tempo de reacção, 14h. Os valores apresentados representam médias de duplicados. Fonte: (Nakashimada e colaboradores, 2002)

Substrato	Rendimento (mmol/g substrato)						
	H ₂	CO ₂	Etanol	Acetato	Butanodiol	Acetona	Lactato
Gluconato	1,44	4,85	0,86	2,69	1,59	0,11	1,35
Glucose	1,97	8,25	2,59	0,81	2,66	0,10	1,99
Frutose	2,17	8,02	2,73	1,32	2,46	0,15	1,53
Galactose	1,90	7,87	2,65	1,02	2,61	0,12	1,28
Sorbitol	4,96	8,29	5,80	0,74	1,27	0,03	1,08
Manitol	5,20	7,68	5,30	0,37	1,43	0,07	2,15
Glicerol	6,69	7,59	7,05	0,17	0,15	0,00	1,95

Verifica-se que o glicerol foi a fonte de carbono que conduziu ao maior rendimento em hidrogénio e etanol. Este comportamento suscitou a utilização deste substrato, quando contido em resíduos industriais, tais como a produção de biodiesel.

Outro facto a salientar, é que, sendo a fonte de carbono o glicerol, a produção dos subprodutos é mínima, mais precisamente de acetato, butanodiol, acetona e lactato (Ito, 2005).

1.6 Produção de biohidrogénio por *Enterobacter aerogenes* a partir de glicerol contido nos resíduos da produção de biodiesel

Os custos de matérias-primas desempenham um papel muito importante para a envolvente geral económica da produção de hidrogénio. Diversos resíduos industriais têm sido utilizados com sucesso no processo de produção de hidrogénio, tal como resíduos industriais contendo amido, para minimizar os custos inerentes (Das e Veziroglu, 2008).

A conversão biológica do glicerol em vários produtos tem sido estudada, recentemente, com particular interesse para produção de 1,3-propanodiol, (normalmente utilizado como matéria-prima para a produção de poliésteres) por diferentes microorganismos como *Klebsiella pneumoniae*, *Citrobacter freundii*, *Clostridium butyricum* e *Enterobacter agglomerans*. Contudo, a produção por via biológica, de hidrogénio e etanol a partir de glicerol é também atractiva, pois o hidrogénio é uma fonte de energia “limpa” e o etanol pode ser aplicado como aditivo na gasolina comum (Ito, 2005).

Ito e colaboradores levaram a cabo estudos de produção de hidrogénio por uma estirpe de *E. aerogenes* (HU-101), isolada de uma lama metanogénica, a partir de glicerol puro e contido em resíduos provenientes da produção de biodiesel, cuja composição era de 41% (m/m), sendo os restantes 59% outros compostos como, cinzas (8%, m/v), metanol (25, m/m), diacilglicerol (0,04%, m/m) e monoacilglicerol (0,01%, m/m), não tendo sido detectado triacilglicerol. Assim, inicialmente os autores realizaram ensaios contendo somente água desionizada e glicerol, verificando que não ocorreu nem crescimento celular, nem produção de hidrogénio, nessas condições. Esses resultados foram, depois, comparados com os obtidos quando os resíduos foram diluídos com um meio de cultura contendo nutrientes em vez de água.

Verificaram que para uma concentração inicial de 1,7 g/L de glicerol comercial e contido nos resíduos da produção de biodiesel, os rendimentos obtidos foram de 1,12 mol de H₂/mol de glicerol e de 1,0 mol de H₂/mol de glicerol, respectivamente. Este resultado sugeriu que, outros compostos que não o glicerol, fazem parte da composição dos resíduos, os quais podem servir como fonte de carbono ou de electrões, contribuindo assim para o aumento do rendimento da reacção (Ito, 2005).

Além disso, realizaram também ensaios em regime contínuo com células livres e imobilizadas em flocos utilizando resíduos contendo glicerol, como substrato, tendo obtido uma taxa volumétrica de 30 mm H₂/L/h, (taxa de diluição de 0,8 h⁻¹) e de 63 mm H₂/L/h (taxa de diluição de 1,2 h⁻¹), respectivamente (Ito, 2005).

Estes resultados mostraram ser vantajosa a imobilização da biomassa para o processo.

1.7 Biorefinarias – O futuro

Numa biorefinaria, os produtos provenientes da agricultura e de processos industriais, são processados como matéria-prima, por métodos físico-químicos e biológicos, com possível produção de biocombustíveis e de biomateriais, como biopolímeros.

Este conceito pode ser comparado com o de uma refinaria de petróleo, na qual este é processado em combustíveis, plásticos e outros produtos petroquímicos.

Os produtos obtidos e recuperados, numa biorefinaria, abrangem uma vasta gama, desde ingredientes básicos para a alimentação, até componentes de medicamentos farmacêuticos e de simples materiais de construção a polímeros altamente versáteis. Além disso, fibras, adesivos e plásticos biodegradáveis tais como, ácido poliláctico, surfactantes biodegradáveis e enzimas, produzidos numa biorefinaria, podem também ser posteriormente aplicados na indústria, em geral.

Um dos principais objectivos propostos para as biorefinarias é o de se atingir “zero” de emissão de gases nefastos para o meio ambiente. Adjacente a este objectivo está a utilização de resíduos como matéria-prima e obtenção da energia necessária para o funcionamento de todos os processos a partir de fontes renováveis, a fim de tornar os processos menos poluentes e energeticamente mais eficientes e viáveis.

O etanol e o biodiesel são bons exemplos de biocombustíveis que podem ser produzidos em biorefinarias com integração dos produtos secundários, resultantes, em outros processos. Assim, da produção de etanol, por fermentação alcoólica, são produzidos cerca de 0,96 kg de CO₂ / kg de etanol formado, o qual pode ser alimentado a bioreactores para o crescimento de algas, das quais se podem extrair óleos, que podem ser utilizados na produção de biodiesel. Em média 3 kg de CO₂ é consumido por 1 kg de alga seca (peso seco).

Outro exemplo é a potencial aplicação de células de combustível microbiológicas para gerar electricidade, utilizando resíduos contendo compostos orgânicos como substrato para a produção de biocombustíveis, por fermentação anaeróbia. Mais concretamente refere-se o exemplo do hidrogénio produzido por via biológica a partir de resíduos industriais fermentescíveis, não necessitando estes de pré-tratamento. O biohidrogénio produzido pode depois ser aplicado num processo de hidrogenação de óleos para a produção de biodiesel, ou pode ser direccionado por *pipelines* para a própria instalação fabril para ser utilizado como biocombustível, minimizando os custos das utilidades e como substituinte do *fuel gas* (Drapcho e colaboradores, 2008).

Também abrangido no conceito de sustentabilidade de biorefinaria, está a utilização de tecnologias e processos “verdes”, com o fim de substituir os processos químicos convencionais. Por exemplo, o CO₂ supercrítico pode ser utilizado para extrair óleos de sementes oleaginosas, em vez de se utilizar o processo que utiliza solventes orgânicos tóxicos, como o hexano.

O etanol pode também ser aplicado na produção de biodiesel pelo processo de transesterificação de óleos extraídos a partir de biomassa (sementes oleaginosas e microalgas), em substituição do metanol, tradicionalmente utilizado.

Em adição aos benefícios ambientais da biorefinação, estão os benefícios económicos, com a emergência e crescimento de novas indústrias, para dar resposta às necessidades de consumo actuais. Assim, uma completa análise económica, incluindo o ecossistema, impacto ambiental, transportes, processos e armazenagem, deverá ser levada a cabo, com vista a implementar as biorefinarias.

As Directivas Energéticas Europeias propõem um aumento de 0,5 % para 20 % em compostos bioquímicos e de 5 % para 25 % em biomateriais (Drapcho e colaboradores, 2008).

Este objectivo só será possível alcançar com uma concertação de toda a Humanidade, com vista a massificar o conceito e aplicação de biorefinarias

Na Figura 1.4, apresenta-se, de forma esquemática, o funcionamento e aplicação dos produtos de uma biorefinaria.

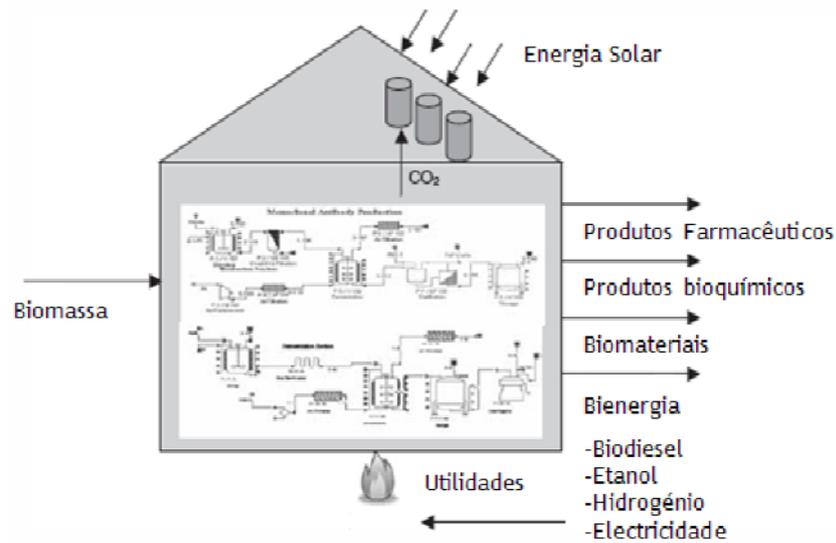


Figura 1.4 - Representação esquemática do funcionamento de uma biorefinaria. Fonte: (Drapcho e colaboradores, 2008).

Capítulo 2 Materiais e Métodos

2.1 Materiais

2.1.1 Microrganismo

Neste trabalho, utilizou-se, como bactérias fermentativas para a produção de hidrogénio, uma estirpe da *Enterobacter aerogenes* (ATCC 13048 *Sputum*). A sua manutenção em laboratório foi levada a cabo em tubos de ensaio contendo um meio de repicagem sólido inclinado, preparado pela dissolução, a quente, de 40 g/L da mistura caso-Agar (Merck) num litro de água bidestilada.

As culturas foram conservadas a 4°C e repicadas aquando o início de cada experiência.

2.1.2 Meio de Crescimento

Antes de cada ensaio as bactérias foram previamente crescidas num meio líquido cuja composição se apresenta na Tabela 2.1, nas condições de T=30°C e 150 rpm (pré-inóculo).

Tabela 2.1 - Composição do meio de crescimento da bactéria *E. aerogenes*.

Reagentes	Concentração (g/L)	Pureza	Marca
Peptona	20	-	Oxoid
NaCl	5	99%	Fisher Scientific

Em relação ao meio utilizado em cada experiência, denominado por meio de fermentação ou meio base, a composição encontra-se na Tabela 2.2.

Este meio foi também utilizado por outros autores, para a produção de biohidrogénio por uma estirpe diferente de *E. aerogenes* e tendo como substrato glicerol contido nos resíduos provenientes de uma fábrica de produção de biodiesel em Hiroshima (Ito, 2005).

Tabela 2.2 - Composição do meio base.

Reagente	Concentração (g/L)	Grau de pureza	Marca
K_2HPO_4	7	98%	Merck
KH_2PO_4	5,5	98%	Baker and Adamson
$(NH_4)_2SO_4$	1	99%	Riedel-de Haën
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,25	97%	Merck
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	0,021	98%	Merck
$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	0,12	97%	Merck
Ácido Nicotínico	0,002	98%	Merck
Na_2SeO_3	0,000172	99%	Merck
$NiCl_2$	0,00002	98%	Merck
Triptona	5	-	Becton Dickinson
Extracto de levedura	5	-	Biokon Diagnostics
Elementos Traço			
$MnCl_2 \cdot 4H_2O$	0,5	97%	Riedel-de Haën
H_3BO_3	0,1	98%	Merck
Na_2EDTA	0,5	99%	Panreac
$AlK(SO_4)_2 \cdot H_2O$	0,01	97%	AnalaR
$CuCl_2 \cdot H_2O$	0,001	99%	Merck

2.1.3 Reagentes

Os reagentes utilizados para a determinação do conteúdo em glicerol, pelo método Ea 6-51 da *American Oil Chemists Society*, quer no glicerol, comercial (puro), quer nas amostras de resíduos provenientes de uma fábrica portuguesa de produção de biodiesel, encontram-se na Tabela 2.3.

Tabela 2.3 - Reagentes utilizados para a determinação de glicerol em resíduos do Biodiesel

Reagente	Concentração (mol/L)	Grau de pureza	Marca
H ₂ SO ₄	0,10	98%	Merck
NaOH	0,13	98%	Merck
NaOH	0,05	98%	Merck
NaIO ₄ ,	0,30	99%	Panreac Química SA
HOCH ₂ CH ₂ OH	0,50	97%	Merck

2.1.4 Equipamento

- Incubadora Orbital modelo New Brunswick Scientific CO. Inc Edison, N.J. U.S.A.;
- Incubadora modelo Lab Line instruments, Inc.;
- Balança de bancada Mettler modelo PM4600;
- Centrífuga de bancada Eppendorf AG modelo 5415D;
- Hotte Captain modelo Cruma;
- Vortex modelo VELP Scientific;
- Espectrofotômetro de varrimento HITACHI U2000;
- Cromatógrafo Gasoso VARIAN modelo CP 3800;
- Integrador Shimadzu modelo C-R5A;
- Cromatógrafo Gasoso HP modelo 5890;
- Balança analítica de bancada Mettler Toledo modelo AB204-S;
- Estufa Memmert;
- Centrífuga Beckman modelo J-25I;
- Placa de agitação magnética Fisher Bioblock Scientific modelo 10517;
- Autoclave VITEQUIPA;
- Centrífuga de bancada Thermo Scientific modelo Heraeus multifuge 3SR⁺;
- Bomba Peristáltica Ecoline;
- Medidor de pH WTW, modelo pH 340-A;
- Contador de gases Schlumberger.

2.1.5 Montagem experimental

A montagem utilizada, para levar a cabo os estudos de produção de biohidrogénio por fermentação anaeróbia, foi otimizada ao longo do trabalho.

Assim, os primeiros estudos realizaram-se num banho termostatizado a 30 e a 37°C, contendo o vaso de reacção ligado a uma coluna de *Mariotte*. A leitura do gás produzido realizada de acordo com a lei de *Boyle-Mariotte*. A agitação dentro do reactor conseguida por introdução de um agitador magnético.

Numa fase posterior, os estudos foram realizados numa incubadora, com agitação orbital de 150 rpm a 30°C, em que o conjunto consistiu num *erlenmeyer* com uma conexão a uma cabeça de vidro de duas saídas. Uma destas saídas teve como funcionalidade recolher amostras da fase gasosa na *headspace*, para análise da sua composição em termos de cada um dos gases presentes, por cromatografia gasosa. A outra saída foi conectada a um saco de recolha indicado para a recolha de gases com moléculas de baixo peso molecular (SKC com a referência 245-05), passando por uma bomba peristáltica, para remoção contínua da fase gasosa formada ao longo do processo (Figura 2.1).

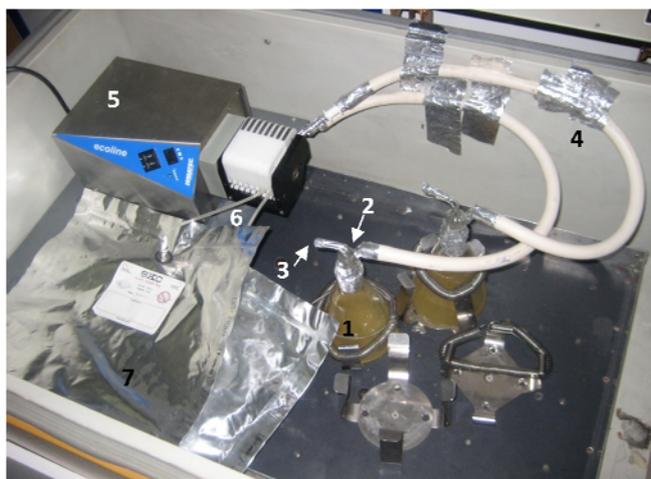


Figura 2.1 - Montagem utilizada para a produção de hidrogénio por via biológica em regime descontínuo, na incubadora a 30°C com agitação orbital. 1. Vaso de reacção; 2. Cabeça de vidro com duas saídas; 3. Ponto de recolha de amostra da fase gasosa; 4. Tubo de gás; 5. Bomba peristáltica; 6. Tubo de silicone; 7. Saco de recolha da fase gasosa.

A Figura 2.2 apresenta, de forma esquemática cada uma das montagens utilizadas neste trabalho.

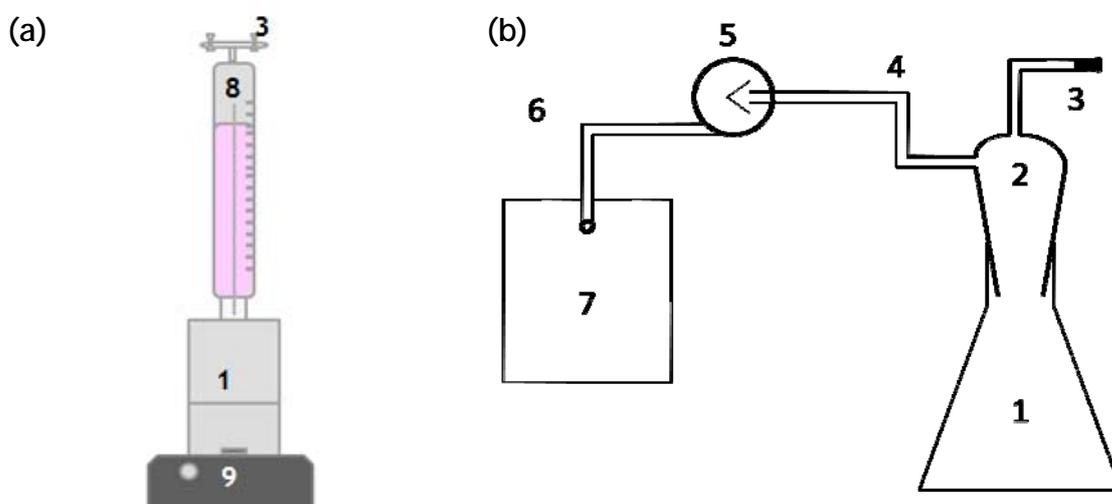


Figura 2.2 - Montagem utilizada para a produção de hidrogénio por via biológica em regime descontínuo, (a) no *Mariotte* a 30 e a 37°C com agitação magnética e (b) na incubadora a 30°C com agitação orbital. 1. Vaso de reacção; 2. Cabeça de vidro com duas saídas; 3. Ponto de recolha de amostra da fase gasosa; 4. Tubo de gás; 5. Bomba peristáltica; 6. Tubo de silicone; 7. Saco de recolha da fase gasosa; 8. Coluna de *Mariotte*; 9. Placa de agitação magnética.

2.2 Métodos

2.2.1 Obtenção de células de *Enterobacter aerogenes*, utilizadas para a produção de hidrogénio.

Para a produção da biomassa de *Enterobacter aerogenes*, em meio líquido, no laboratório, preparou-se o meio de crescimento com a composição indicada na Tabela 2.1. Para tal, o meio de crescimento previamente foi esterilizado em autoclave nas condições de $T=121^{\circ}\text{C}$ e $P=2$ bar, durante 20 minutos, com o objectivo de evitar a presença e desenvolvimento de microorganismos contaminantes.

A produção de células de *Enterobacter aerogenes* foi realizada de duas formas distintas, consoante os objectivos:

- a) Determinação da curva de crescimento e recta da densidade óptica (D.O.) *vs* peso seco, as quais foram obtidas por inoculação de uma ansada retirada de uma rampa de conservação em 2 *erlenmeyers* de 500 mL, contendo 250 mL de meio de crescimento (Tabela 2.1), à temperatura de 30 e 37°C sob agitação orbital de 150 rpm.

Num dos *erlenmeyers* foram recolhidas amostras ao longo do tempo para a leitura da D.O. da suspensão celular a um comprimento de onda (c.d.o.) de 640 nm e obtenção da curva de crescimento da biomassa.

No outro *erlenmeyer* após 24 horas de incubação (final da fase exponencial) recolheu-se a biomassa total do outro *erlenmeyer* para centrifugação e ressuspensão em água bidestilada (solução *stock*), para determinação da recta D.O. *vs* peso seco, secção 3.1.2.

- b) Obtenção do pré-inóculo para o processo de fermentação. Neste caso, após cerca de 15 horas (no final da fase exponencial do crescimento de acordo com a curva de crescimento obtida) centrifugou-se a suspensão celular a 10.000 rpm durante 20 minutos a 5°C e ressuspendeu-se a biomassa no mesmo volume de água bidestilada esterilizada, para lavagem das células e procedeu-se a nova centrifugação. O sobrenadante foi sempre desprezado, após cada centrifugação.

Seguido da lavagem/centrifugação, a biomassa foi ressuspensa num determinado volume de água bidestilada esterilizada, a fim de obter uma suspensão celular com uma D.O. apropriada, correspondente ao peso seco pretendido. Para esse efeito, calculou-se o volume de água a ressuspender as células foi calculado com base na recta D.O. *vs* Peso seco, por forma a inocular um volume constante de 2 mL da suspensão celular, no meio de fermentação contendo o substrato e com borbulhamento de azoto gasoso durante cerca de 2 minutos, para obtenção de condições de anaerobiose.

A inoculação do meio foi levada a cabo numa *hotte* com aspiração e em condições de assépcia, ou seja, à chama.

2.2.2 Produção de Hidrogénio

Os ensaios para a produção de hidrogénio por fermentação anaeróbia foram realizados em diferentes condições operacionais, com optimização de parâmetros mantendo, no entanto, constante a razão entre o volume do reactor e volume da fase líquida (cerca de 2,3), correspondente ao volume da *headspace* (volume da fase gasosa acima do líquido). O facto de este valor ser constante para todas as experiências realizadas, teve por objectivo comparar resultados obtidos na optimização de parâmetros operacionais e físico-químicos influentes ao processo, como a temperatura e as concentrações de biomassa e de substrato. Assim:

1. Numa primeira fase, as experiências foram realizadas num banho à temperatura constante de 30 e 37°C, com agitação magnética, onde o reactor foi ligado, directamente, a uma coluna de *Mariotte*, por forma a possibilitar o acompanhamento do processo, em termos de quantidade de volume de gás produzido. Estes ensaios permitiram comparar os resultados obtidos utilizando glicerol puro e contido em resíduos provenientes de uma indústria de biodiesel e também seleccionar a temperatura que conduziu à maior velocidade de produção de fase gasosa, assim como ao estabelecimento do tempo de equilíbrio da reacção.
2. Numa fase posterior e com o objectivo de facilitar o manuseamento do equipamento e a recolha da fase gasosa produzida ao longo do processo, realizaram-se ensaios numa incubadora à temperatura de 30°C com agitação orbital de 150 rpm.

Neste caso, o reactor encontrava-se ligado, directamente ao saco de recolha, sem e com colocação de uma bomba peristáltica à saída do vaso de reacção a trabalhar continuamente com um caudal de 2,6 mL/min, para remoção da fase gasosa da *headspace* para o saco de recolha.

Nesta fase do trabalho, todos os ensaios foram levados a cabo utilizando, como substrato, resíduos da produção de biodiesel contendo glicerol.

Em cada conjunto de ensaios realizados introduziu-se sempre um reactor sem biomassa (branco), nas mesmas condições operacionais, para controlo.

2.2.2.1 Optimização de parâmetros físico-químicos pela metodologia do Desenho Composto Central (DCC)

O estudo de optimização das concentrações de substrato (glicerol contido no volume de resíduos adicionado) e de biomassa foi realizado numa incubadora, com agitação orbital nas condições operacionais descritas, anteriormente (secção 2.2.2, ponto 2), e planeadas de acordo com a metodologia do Desenho Composto Central, para intervalos de concentração de biomassa entre 0,1-2 g/L e concentração de substrato entre 10-30 g/L.

Por esta metodologia, construiu-se, inicialmente, um desenho factorial $2^{(2)}$, isto é, considerando cada uma das duas variáveis referidas, a dois níveis simétricos (-1/+1). Além disso, para tornar possível o estabelecimento da relação polinomial quadrática, o desenho factorial foi ainda expandido a dois níveis extremos (-1,414/+1,414) (Tabela 2.4). A expansão do desenho teve por objectivo permitir avaliar um maior número de combinações das duas variáveis, aumentando a hipótese de determinar a resposta quanto ao ponto óptimo para um dado factor.

Este estudo implicou a realização de 11 ensaios, sendo 4 do desenho factorial, 4 da expansão e 3 réplicas do ponto médio, correspondente ao nível 0 da Tabela 2.5.

Tabela 2.4 - Parâmetros estudados, níveis e expansão considerados para a optimização do processo de produção de biohidrogénio, pela metodologia o desenho factorial $2^{(2)}$ expandido.

Factor	Nível				
	-1,414	-1	0	+1	+1,414
1. Concentração de biomassa (g/L)	0,10	0,38	1,05	1,72	2,00
2. Concentração de Glicerol (g/L)	10,00	12,90	20,00	27,10	30,00

Tabela 2.5 - Planeamento dos ensaios relativos aos níveis (-1/+1) e à expansão (-1,414/+1,414). O código dos níveis encontra-se na Tabela 2.4.

Desenho (-1/+1)		
Sequência	Biomassa (g/L)	Glicerol (g/L)
1	-	-
2	+	-
3	-	+
4	+	+
Ponto Médio	0	0

Expansão (-1,414/+1,414)		
Sequência	Biomassa (g/L)	Glicerol (g/L)
#1	-1,414	0
#2	+1,414	0
#3	0	-1,414
#4	0	+1,414
Ponto Médio	0	0

Assim, os ensaios para a produção de biohidrogénio decorreram segundo as condições experimentais descritas na Tabela 2.5, mantendo constante, a razão entre o volume total do reactor e o volume de líquido utilizado (2,3).

2.3 Métodos Analíticos

2.3.1 Determinação do peso seco da biomassa

A determinação da concentração de biomassa em termos de peso seco foi realizada por filtração de 10 mL suspensões celulares, com diferentes concentrações de biomassa, por membranas de nitrato de celulose (0,45 μm de poro e 0,47 mm de diâmetro, Whatman).

Assim, na fase inicial do procedimento, as membranas foram colocadas na estufa a 80°C, durante 16 horas, com o objectivo de retirar a humidade após o que foram pesadas.

Para a determinação do peso seco, em termos de $\text{g}_{\text{biomassa seca}}/\text{L}_{\text{suspensão celular}}$, prepararam-se 8 diluições (1/2, 1/10, 1/15, 1/20, 1/30, 1/35, 1/40, 1/50) a partir de uma solução *stock*, obtida por centrifugação da biomassa produzida em 24 horas (fase estacionária) seguida da sua ressuspensão num volume igual de água bidestilada.

De cada diluição obtida retiraram-se 10 mL da suspensão celular, sob agitação forte, para se proceder à filtração por vácuo.

A biomassa retida na membrana foi depois lavada com o igual volume de água bidestilada, colocando-se, de seguida, novamente na estufa a 80°C, durante 16 horas. Após este tempo, pesaram-se, as membranas com a biomassa seca de modo a obter os respectivos pesos secos. Os valores determinados corresponderam à média dos resultados obtidos para cada triplicado, em cada ponto.

2.3.2 Determinação do conteúdo em glicerol

Para determinar o conteúdo inicial em glicerol na solução de glicerol puro, obtida comercialmente, e nos resíduos provenientes de uma fábrica de produção de biodiesel, realizou-se o método Ea 6-51 da *American Oil Chemists Society*. Este método consiste na oxidação do glicerol por periodato de sódio em meio ácido, formando aldeídos e ácido fórmico. A concentração deste último é uma medida do teor em glicerol da amostra, sendo determinado por titulometria ácido-base após destruição do excesso de periodato com etilenoglicol.

A determinação de glicerol na fase líquida do reactor, após o processo de fermentação, foi levada a cabo por cromatografia gasosa, dada a baixa gama de concentrações de glicerol esperada nesta fase.

O cromatógrafo gasoso utilizado para esta determinação foi um Varian (modelo CP 3800 GC) com uma coluna FFAP-CB capilar com $25m \times 0,32mm$, com um detector de ionização de chama e um injector *on-column*. O gás de arrasto foi o hélio.

2.3.3 Leitura do volume de gás produzido

A fase gasosa resultante do processo de fermentação anaeróbia foi mensurada por dois métodos:

1. Coluna de *Mariotte*
2. Contador de gases

Em relação ao primeiro método, utilizou-se a montagem já descrita no ponto 2.1.5, em que foi possível ler o volume de gás produzido, por deslocamento de um líquido corado, (NaCl 20% (*m/v*), 2-3 gotas de HCl e de alaranjado de metilo), no interior da coluna e de acordo com a lei de *Boyle-Mariotte*.

Em relação ao segundo método, no final do processo leu-se o volume de gás contido no saco, por ligação a um contador de gases (Schlumberger).

A leitura do volume da fase gasosa foi de extrema importância, pois permitiu efectuar os cálculos dos volumes de H₂ e CO₂ produzidos e respectiva razão volumétrica H₂/CO₂, para cada ensaio.

2.3.4 Determinação do conteúdo em H₂, CO₂ e N₂

Após cada experiência realizada procedeu-se à análise, quantitativa e qualitativa da fase gasosa, na *headspace* do reactor e no saco de recolha, produzida, num cromatógrafo de fase gasosa (VARIAN, modelo CP3800), com detector de condutividade térmica. A coluna utilizada foi uma Porapack S, de 3 m x 1/8 " e o gás de arrasto foi o azoto.

2.3.5 Determinação do conteúdo em etanol

A concentração de etanol presente na fase líquida (meio fermentado) foi determinada por cromatografia gasosa, num cromatógrafo gasoso Hewlett Packard (modelo 5890), com detector de ionização de chama e injector *on-column*.

A coluna utilizada foi 4% CW (Carbowax) - 20 M, 1% *Trimesil Acid* 80-120 Carbopack BDA 2 m x 1/8 in SP 30000189. O gás de arrasto foi o hélio.

*Capítulo 3 Apresentação e Discussão de
Resultados*

3.1 Obtenção Laboratorial de Células de *Enterobacter aerogenes*

A produção de células de *Enterobacter aerogenes* foi planeada por forma a que a quantidade de biomassa adicionada ao meio fosse sinónimo de elevado estado de viabilidade, ou seja, que a recolha das células fosse efectuada durante a fase exponencial de crescimento, durante a qual os mecanismos de transporte das células estão funcionais, o que resulta numa melhor troca de nutrientes e da fonte de carbono e, conseqüentemente, num melhor desempenho metabólico da biomassa.

3.1.1 Crescimento da biomassa

Tal como referido e descrito no Capítulo 2, secção 2.2.1, o processo de crescimento de biomassa teve por objectivo quer a determinação da curva de crescimento da bactéria à temperatura de 30 e 37°C, quer a obtenção de um pré-inóculo, para inoculação do meio de fermentação com 2 mL de suspensão celular com uma D.O. apropriada. Relativamente à curva de crescimento, como se verifica na Figura 3.1, as curvas correspondentes a cada uma das temperaturas apresentam perfis ligeiramente diferentes durante a fase exponencial de crescimento, observando-se uma maior inclinação (declive), nessa fase, quando os ensaios de crescimento foram levados a cabo à temperatura constante de 30°C, o que corresponde a uma mais-valia do ponto de vista económico, com vista à aplicação deste processo à indústria.

Esse comportamento também se revelou a nível de taxa de produção de H₂, conforme será descrito mais adiante.

Observando a Figura 3.1 verifica-se ainda que ambas as curvas apresentam de forma clara as diferentes fases de crescimento da bactéria: fase de latência, fase exponencial e fase estacionária.

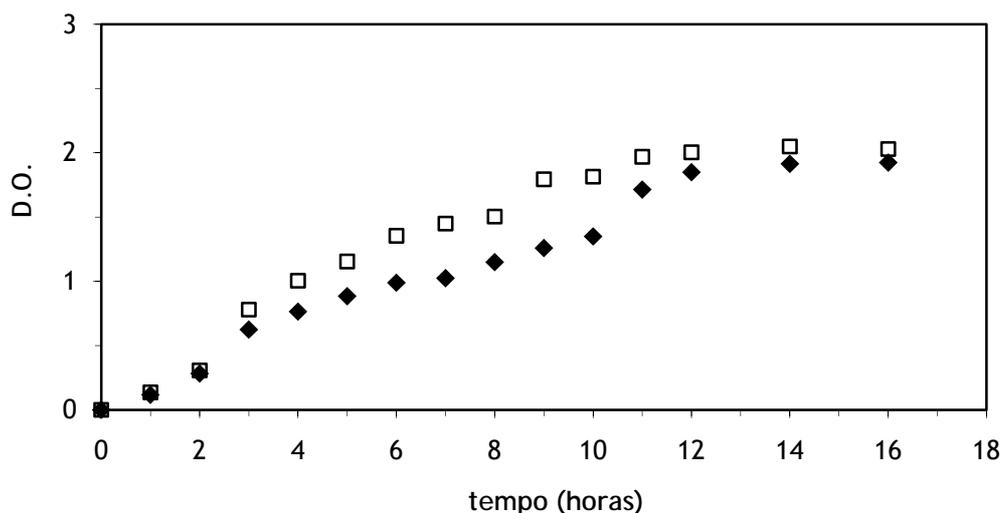


Figura 3.1 - Curvas de crescimento de células de *Enterobacter aerogenes*, em meio líquido de crescimento (peptona, 20 g/L e NaCl, 5 g/L) a 30°C (□) e 37°C (◆), numa incubadora com agitação orbital de 150 rpm.

3.1.2 Determinação da recta de calibração densidade óptica (D.O.) vs peso seco (p.s.)

Pesando a massa de uma população microbiana retida à superfície de uma membrana filtrante de poro suficientemente fino para não deixar passar as células, fica-se a conhecer o chamado peso húmido. Este tem pouco significado prático, por ser difícil determinar qual a quantidade de água que faz parte integrante das células ou que se encontra no exterior. Mais significativo é o peso seco, que se determina após secagem da biomassa retida na membrana filtrante, a 80°C, durante o tempo necessário, até se obter peso constante.

Na prática laboratorial, a leitura da D.O. de suspensões de células é utilizada com mais frequência para seguir o crescimento microbiano, por ser mais rápida do que a determinação do peso seco. Contudo, a D.O. pode ser facilmente convertida em peso seco através de uma relação previamente estabelecida e que se designa por recta de calibração peso seco/D.O. (Madeira e Fonseca, 1996).

Esta recta de calibração revelou-se de extrema importância para este trabalho, tornando possível calcular a concentração das células de *Enterobacter aerogenes* (g_{biomassa}/L) a partir da leitura da D.O. da suspensão celular a 640 nm, em cada experiência.

Para determinação da recta D.O./ peso seco, procedeu-se à diluição de uma solução *stock* de *E. aerogenes*, recolhida na fase estacionária do crescimento, obtendo-se 8 suspensões celulares com diferentes concentrações celulares. Para cada diluição, foi realizada a leitura da D.O. e a determinação do correspondente peso seco.

A Tabela 3.1 apresenta as diluições levadas a cabo a partir da solução *stock*, assim como as densidades ópticas e pesos secos.

Tabela 3.1 - D.O. e correspondente peso seco para diferentes suspensões celulares, de *Enterobacter aerogenes*, preparadas a partir da solução *stock*.

Diluição	D.O.	Média do Peso Seco
1/10	0,285	0,1200
1/15	0,175	0,0633
1/20	0,138	0,0533
1/35	0,077	0,0367
1/40	0,073	0,0200
1/50	0,025	0,0100

Com base nestes valores construiu-se a recta de calibração D.O./peso seco (Figura 3.2), a qual pode ser representada pela equação $y = 2,330x + 0,011$, com um coeficiente de correlação (r^2) de 0,976 que pode considerar-se como sendo aceitável dado tratar-se de um sistema microbiológico. Esta permitiu efectuar os cálculos conducentes a iniciar cada ensaio de produção de biohidrogénio com a concentração de biomassa pretendida, a partir do pré-inóculo.

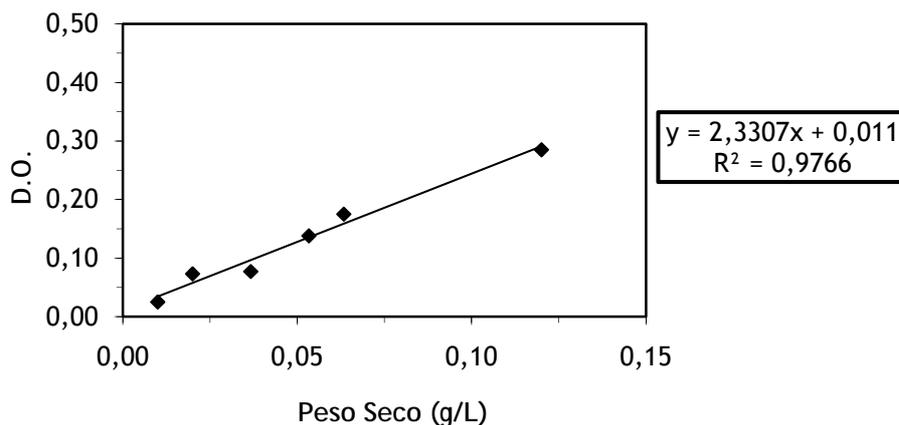


Figura 3.2 - Recta de calibração peso seco/D.O. de suspensões de células de *Enterobacter aerogenes*.

3.2 Produção de biohidrogénio

Neste trabalho, todas as experiências foram realizadas com a adição de 2 mL de uma suspensão de *E. aerogenes*, ao meio de fermentação contendo o glicerol puro ou contido nos resíduos (inoculação). A suspensão celular foi obtida a partir de um pré-inóculo de acordo com o processo descrito em 2.2.2 b), e com uma D.O. apropriada, de forma a corresponder ao peso seco pretendido, após adição.

A inoculação do meio foi levada a cabo com borbulhamento de azoto gasoso no meio de fermentação, para garantir condições de anaerobiose, numa *hotte* com aspiração constante e em condições de assépsia (chama).

3.2.1 Optimização das condições operacionais do processo

Por forma a otimizar as condições operacionais do processo, em laboratório, foram realizadas várias experiências tendo em conta parâmetros como, a facilidade de manuseamento do equipamento, tempo de equilíbrio da reacção/tipo de agitação, recolha da fase gasosa produzida e valor da razão volumétrica final H_2/CO_2 .

Todas as conexões existentes na montagem experimental foram isoladas com fita adesiva de alumínio (TESA), com o objectivo de evitar fugas no sistema (Capítulo 2 Figura 2.1).

Nesta fase do trabalho em todos os ensaios realizados a concentração de biomassa utilizada para o inóculo do meio de fermentação contendo 10 ou 20 g/L glicerol puro ou contido nos resíduos da produção de biodiesel foi de 0,1 g/L.

Embora o etanol produzido ao longo do processo não seja o principal produto da reacção, a sua importância demarca-se por se tratar de um biocombustível líquido, pelo que também se determinou o teor em etanol na fase líquida para todos os ensaios realizados.

Todos os valores ao longo desta secção (3.2.1) correspondem à média de pelo menos, seis ensaios independentes, com um desvio padrão sempre inferior a 10 % dos valores registados.

Os resíduos utilizados continham 86 % (*m/m*) em glicerol e 6,2 % (*m/m*) em MONG (Material Orgânico que Não o Glicerol), sendo destes, 4,6 % (*m/m*) impurezas, que na maioria são cinzas e 0,03 % (*m/m*) em metanol.

3.2.1.1 Produção de biohidrogénio a partir de glicerol puro e de glicerol contido nos resíduos

Sendo o objectivo deste trabalho estudar e otimizar a produção de biohidrogénio, a partir de glicerol contido nos resíduos de uma fábrica de produção de biodiesel, numa primeira fase realizaram-se ensaios com 10 g/L de glicerol puro e com a mesma concentração inicial de glicerol contido nos resíduos, nas mesmas condições operacionais, para comparação e interpretação de resultados (Tabela 3.2).

Este estudo foi levado a cabo num banho, termostaticado a 37°C, como já descrito no Capítulo 2, secção 2.2.1.

Nesta fase do trabalho foi também avaliado o tempo de equilíbrio do processo.

Tabela 3.2 - Comparação dos resultados obtidos na produção de hidrogénio a partir de glicerol puro e de glicerol contido nos resíduos provenientes de uma fábrica de produção de biodiesel. Condições experimentais: $T=37^{\circ}\text{C}$, agitação magnética, $V_{\text{Total do reactor}}/V_{\text{Líquido}}=2,3$ $[\text{Biomassa}]_{\text{inicial}}=0,1$ g/L, $[\text{Glicerol}]_{\text{inicial}}=10$ g/L.

Glicerol	Total			Etanol (g/L)
	H ₂ (mL)	CO ₂ (mL)	H ₂ /CO ₂	
Puro	608,7	292,2	2,1	2,7
Resíduos	624,8	252,7	2,5	3,8

Assim, observando a Tabela 3.2 pode-se concluir que a utilização de resíduos contendo glicerol não só não inibiu o metabolismo da bactéria, como também pode ter actuado como fonte de carbono ou de electrões, dado que conduziu a valores superiores de volume de hidrogénio produzido, da razão volumétrica H₂/CO₂ e da concentração de etanol. Por isso a utilização de resíduos pode ser favorável, já que quanto maior for a razão volumétrica H₂/CO₂ mais facilitada será a obtenção de hidrogénio puro, a partir da fase gasosa (Das e Veziroglu, 2001). Além disso, o facto de se utilizar um resíduo industrial com baixo grau de pureza, como substrato, permitindo produzir uma energia “limpa” e simultaneamente o tratamento do efluente é uma mais-valia.

Este comportamento foi também observado por outros autores, que utilizaram outra estirpe de *E. aerogenes*, para produzir hidrogénio, a partir de resíduos de biodiesel contendo 1,7 g/L de glicerol (Ito, 2005).

Outro resultado importante foi o tempo de equilíbrio do processo, cerca de 12-13 horas, o qual foi igual tendo como substrato glicerol puro ou contido nos resíduos da produção de biodiesel.

O rendimento foi, em média, 2,5 L H₂/L Meio de fermentação e observou-se que a concentração de etanol obtida foi de 2,7 e 3,8 g/L utilizando glicerol puro e contido nos resíduos de uma fábrica de produção de biodiesel, respectivamente (Tabela 3.2).

3.2.1.2 Efeito do aumento da concentração de glicerol

Com o objectivo de aumentar o volume de hidrogénio, realizaram-se ensaios com resíduos contendo 20 g/L de glicerol, nas mesmas condições operacionais do ponto anterior.

Tabela 3.3 - Comparação da produção de hidrogénio a partir de resíduos industriais provenientes de uma fábrica de biodiesel com concentrações de 10 e 20 g/L. Condições experimentais: T=37°C, agitação magnética, $V_{\text{Total do reator}}/V_{\text{Líquido}}=2,3$, $[\text{Biomassa}]_{\text{inicial}}=0,1$ g/L.

Resíduos	Total			Etanol (g/L)
	H ₂ (mL)	CO ₂ (mL)	H ₂ /CO ₂	
10 g/L	624,8	252,7	2,5	3,8
20 g/L	710,0	345,0	2,1	5,1

Por observação da Tabela 3.3, constatou-se claramente que, o aumento da concentração de glicerol conduziu ao aumento do volume de H₂ produzido, sendo que não ocorreram alterações significativas no valor da razão volumétrica entre H₂ e CO₂. Assim, os ensaios posteriores foram levados a cabo utilizando sempre resíduos industriais contendo 20 g/L de glicerol.

O tempo de equilíbrio do processo foi também determinado como sendo de aproximadamente de 24 horas com uma coluna de *Mariotte*.

O rendimento calculado do processo foi, em média, de 2,5 L H₂/L Meio de fermentação para ambas as concentrações iniciais de glicerol, testadas, enquanto que a concentração de etanol determinada na fase líquida aumentou de 3,8 para 5,1 g/L, com o aumento da concentração do substrato (Tabela 3.3).

3.2.1.3 Efeito da temperatura no rendimento do processo

Nesta fase do trabalho teve-se por objectivo estudar o efeito da diminuição da temperatura, sobre o rendimento do processo, tendo em conta a redução de gastos energéticos.

Assim, realizaram-se ensaios a 30°C nas mesmas condições operacionais descritas anteriormente para a temperatura de 37°C, para comparação de resultados (Tabela 3.4).

Tabela 3.4 - Comparação da produção de hidrogénio à temperatura de 30°C e 37°C a partir de resíduos industriais provenientes de uma fábrica de biodiesel. Condições experimentais: Agitação magnética, $V_{Total}/V_{Líquido}=2,3$, $[Biomassa]_{inicial}=0,1$ g/L, $[Glicerol]_{inicial}=20$ g/L.

Temperatura	Total			Etanol (g/L)
	H ₂ (mL)	CO ₂ (mL)	H ₂ /CO ₂	
37°C	710,0	345,0	2,1	5,1
30°C	714,0	372,0	1,9	3,7

Observando a Tabela 3.4 verifica-se que embora, não tenham ocorrido variações significativas, em termos de composição, a diminuição da temperatura do processo para 30°C mostrou ser vantajosa, pois observou-se que após 2 horas da inoculação, o volume de gás produzido foi de 200 mL, em contraste com as experiências realizadas a 37°C, cujo volume, para o mesmo período de tempo, foi nulo.

Este comportamento sugere que a aplicação deste processo a nível industrial, poderá permitir realizar um maior número de operações num menor período de tempo, minimizando também os custos energéticos operacionais.

O rendimento de produção foi, em média de 2,5 L H₂/L Meio de fermentação e observou-se que a concentração de etanol obtida foi de 5,1 e 3,7 g/L, para os ensaios realizados a 37 e 30°C, respectivamente (Tabela 3.4).

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

Nesta fase do trabalho pretendeu-se comparar os valores da razão volumétrica H_2/CO_2 obtidos a partir da leitura do volume da fase gasosa produzido por deslocamento de um líquido corado numa coluna de *Mariotte* e através da utilização de um contador de gases (Schlumberger). Este estudo teve em conta dois aspectos: a determinação da concentração e composição, por cromatografia gasosa não corresponder à situação real, dada a possibilidade de estratificação de gases na coluna de *Mariotte*, dada a sua forma alongada e a diferença de densidades dos gases produzidos e facilitar o manuseamento do equipamento.

Assim, levaram-se a cabo ensaios paralelos para comparação de resultados, tendo em conta os dois tipos de leitura de volumes referidos anteriormente (Tabela 3.5).

Tabela 3.5 - Comparação da produção de hidrogénio a partir de resíduos industriais provenientes de uma fábrica de biodiesel com coluna de *Mariotte* e saco de recolha. Condições experimentais: $T=30^\circ C$, Agitação magnética, $V_{Total}/V_{Liquido}=2,3$, $[Biomassa]_{inicial}=0,1$ g/L, $[Glicerol]_{inicial}=20$ g/L.

	Total	Etanol (g/L)
	H_2/CO_2	
<i>Mariotte</i>	1,9	3,7
Saco	2,1	3,7

A Tabela 3.5 mostra claramente que o valor da razão volumétrica H_2/CO_2 foi semelhante, em ambas as condições, assim como a concentração de etanol presente na fase líquida. Outra vantagem foi o melhor aproveitamento do espaço disponível onde ocorreram as reacções.

O rendimento foi, em média, 2,5 L H_2/L Meio de fermentação e observou-se que a concentração de etanol obtida foi de 3,7 g/L, utilizando 20 g/L de glicerol contido nos resíduos de uma fábrica de produção de biodiesel, para ambos os ensaios realizados, ou seja, no *Mariotte* e no saco de recolha de gases (Tabela 3.5).

3.2.1.5 Estudo do efeito do tipo de agitação

Nesta fase do trabalho, pretendeu-se avaliar a influência do tipo de agitação do meio de fermentação, sobre o desempenho das células de *Enterobacter aerogenes*.

Para esse efeito, levaram-se a cabo ensaios de produção de biohidrogénio no banho, com agitação magnética e numa incubadora com agitação orbital a uma velocidade de 150 rpm, a partir de resíduos de biodiesel contendo 20 g/L de glicerol e nas condições operacionais já seleccionadas, isto é, 30°C e com recolha da fase gasosa para um saco apropriado para o efeito. Os resultados foram comparados com os obtidos nas mesmas condições, no banho termostatzados (Tabela 3.6).

Tabela 3.6 - Comparação da produção de hidrogénio a partir de resíduos industriais provenientes de uma fábrica de biodiesel com diferentes tipos de agitação, magnética e orbital. Condições experimentais: T=30°C, $V_{\text{Total}}/V_{\text{Líquido}}=2,3$, $[Biomassa]_{\text{inicial}}=0,1$ g/L, $[Glicerol]_{\text{inicial}}=20$ g/L.

	Total			Etanol g/L
	H ₂ mL	CO ₂ mL	H ₂ /CO ₂	
Banho	594,0	283,7	2,1	3,7
Incubadora	533,5	271,0	2,0	4,1

Observando-se e comprando os valores apresentados na Tabela 3.6 verifica-se que embora se tenham obtido volumes diferentes de H₂ e CO₂ produzidos, o valor da razão volumétrica H₂/CO₂ foi igual para ambos os tipos de agitação. Em face disto e tendo em conta a de maior facilidade de manuseamento de equipamento decidiu-se que todas as experiências a realizar, posteriormente, teriam lugar na incubadora, nas condições operacionais descritas.

Novamente, o rendimento do processo foi, em média, 2,5 L H₂/L Meio de fermentação tendo também sido observado que a concentração de etanol obtida foi de 3,7 e 4,1 g/L, no banho e na incubadora, respectivamente o que mais uma vez revela similaridade de comportamento, por parte da bactéria e ausência da influência do tipo de agitação no reactor, para os valores estudados (Tabela 3.6).

3.2.1.6 Estudo da influência da forma do vaso de reacção

Nesta fase do trabalho pretendeu-se verificar se a forma do reactor condicionava o efeito da pressão parcial de fase gasosa, produzida ao longo do tempo, sobre a fase líquida, podendo alterar o desempenho da biomassa, com consequências sobre a produção de hidrogénio.

Assim, para comparação de resultados realizaram-se experiências utilizando como vaso de reacção um reactor com forma cilíndrica (tubular) e forma cónica (*erlenmeyer*) (Tabela 3.7).

Tabela 3.7 - Comparação da produção de hidrogénio a partir de resíduos industriais provenientes de uma fábrica de biodiesel com diferentes tipos de vasos de reacção, *erlenmeyer* e reactor tubular. Condições experimentais: T=30°C, V_{Total}/V_{Líquido}=2,3, [Biomassa]_{inicial}=0,1 g/L, [Glicerol]_{inicial} =20 g/L.

Reactor	Total			Etanol g/L
	H ₂ mL	CO ₂ mL	H ₂ /CO ₂	
Tubular	533,5	271,0	2,0	4,1
<i>Erlenmeyer</i>	545,8	220,3	2,5	4,2

Observando a Tabela 3.7, verifica-se que não ocorreram diferenças significativas quanto ao valor da razão volumétrica H₂/CO₂, sendo ainda assim ligeiramente superior quando se utilizou o *erlenmeyer* como vaso de reacção.

Em média, o rendimento do processo foi de 2,5 L H₂/L Meio de fermentação e a concentração de etanol obtida de 4,1 e 4,2 g/L, quer no reactor tubular quer no *erlenmeyer*, respectivamente (Tabela 3.7).

Com base nestes resultados todos os ensaios posteriores foram realizados em *erlenmeyer*.

3.2.1.7 Estudo do efeito da remoção da fase gasosa

Tendo em conta o objectivo deste estudo em desenvolver e otimizar parâmetros que possam ser vantajosos no que respeita a uma aplicação a nível industrial, nesta fase do trabalho pretendeu-se estudar um outro parâmetro operacional que, segundo outros autores (Das, 2008; Tanisho e colaboradores, 1998), influencia de forma positiva a produtividade do hidrogénio, por via biológica, que é diminuição da pressão parcial da fase gasosa na *headspace* do reactor, ao longo do processo.

Assim, realizaram-se ensaios em que se colocou uma bomba peristáltica (Ecoline), entre a ligação da cabeça do reactor e o saco de recolha, para remoção da fase gasosa ao longo da sua produção. A bomba foi colocada a funcionar ao fim de aproximadamente 2 horas, após o início do processo e com uma caudal constante de 2,6 mL/min, de acordo com o perfil de produção da fase gasosa, observado em experiências anteriores.

A Tabela 3.8 apresenta os resultados nestas condições, em comparação com os obtidos na ausência da bomba peristáltica em três experiências independentes.

Tabela 3.8 - Comparação dos resultados da produção de hidrogénio obtidos para a *headspace* (HS), saco de recolha de gases e tendo em conta o sistema global, com e sem remoção da fase gasosa. Condições experimentais: Agitação orbital de 150rpm T=30°C, $V_{Total}/V_{Liquido}=2,3$, $[Biomassa]_{inicial}=0,1$ g/L, $[Glicerol]_{inicial}=20$ g/L.

	HS			Saco			Sistema Global*			Etanol (g/L)
	H ₂ (mL)	CO ₂ (mL)	H ₂ /CO ₂	H ₂ (mL)	CO ₂ (mL)	H ₂ /CO ₂	H ₂ (mL)	CO ₂ (mL)	H ₂ /CO ₂	
Sem Bomba Peristáltica	167,6	78,7	2,1	300,0	160,0	1,9	467,6	238,7	1,9	3,8
	153,9	54,7	2,8	460,0	220,0	2,1	613,9	274,7	2,2	2,7
	150,5	51,3	2,9	450,0	210,0	2,1	600,5	261,3	2,3	3,7
Com Bomba Peristáltica	191,5	157,3	1,2	390,0	50,0	7,8	581,5	205,0	2,8	2,9
	181,3	160,7	1,1	574,0	70,0	8,2	755,3	230,7	3,3	4,1
	188,1	167,6	1,1	440,0	80,0	5,5	628,1	247,6	2,5	5,3

* Correspondente à soma de mL de H₂ e mL de CO₂ obtidos para *headspace* (HS) e saco de recolha de gases.

Observando e comparando os resultados da tabela, verifica-se claramente, que a introdução da bomba no sistema e remoção de fase gasosa ao longo do processo revelou ser vantajosa, principalmente no que respeita ao valor da razão volumétrica H₂/CO₂ no saco, em que se registaram, valores quatro vezes superiores aos obtidos em média nas experiências efectuadas na ausência de remoção da fase gasosa.

Quanto à *headspace*, o valor da razão volumétrica diminuiu, o que seria de esperar, embora os volumes de H₂ e CO₂ tenham aumentado, revelando uma melhoria do desempenho da bactéria e sugerindo quer uma diminuição do efeito de inibição pelo produto quer uma maior actividade do enzima hidrogenase, catalisador do metabolismo que origina a produção de hidrogénio (Nakashimada e colaboradores, 2002).

Ao nível industrial se se considerar como ponto de recolha um tanque de armazenagem, a utilização de bomba é deveras vantajosa, pois quanto maior o valor da razão volumétrica H₂/CO₂ maior a facilidade de purificação do H₂ produzido. Para esse efeito poder-se-á utilizar por exemplo, uma coluna de absorção de CO₂, em contracorrente, com uma solução de KOH 50 % (m/v) (Das e Veziroglu, 2001).

O rendimento do processo obtido em todos os ensaios realizados foi, em média igualmente de 2,5 L H₂/L Meio de fermentação e as concentrações de etanol de 3,8, 2,7 e 3,7 g/L sem bomba peristáltica e 2,9, 4,1 e 5,3 g/L com bomba peristáltica, respectivamente (Tabela 3.8).

3.2.1.8 Estudo do efeito da utilização de uma válvula anti-retorno (VAR) e válvula de alta pressão (VAP)

Nesta fase recorreu-se à introdução, no sistema, de dois instrumentos: uma válvula de anti-retorno (VAR) e uma válvula de alta pressão (VAP), que pudessem conduzir à diminuição de pressão dos gases na *headspace*, tal como a bomba peristáltica, por forma a reduzir os custos inerentes à utilização da bomba, dado que estas válvulas de forma a que a passagem dos gases para o saco não seja reversível, sem gastos de energia. Deste modo, realizaram-se ensaios nas condições definidas anteriormente mas introduzindo entre a saída da cabeça do reactor e a entrada do saco de recolha de gases, uma VAR ou uma VAP. Os resultados observados nestas condições são apresentados na Tabela 3.9 e comparados com os obtidos numa das experiências com remoção forçada da fase gasosa, pela bomba peristáltica.

Tabela 3.9 - Comparação da produção de hidrogénio a partir de resíduos industriais provenientes de uma fábrica de biodiesel com remoção contínua por uma bomba peristáltica ou válvula de alta pressão e válvula HIP. Condições experimentais: Agitação orbital de 150rpm T=30°C, V_{Total}/V_{Líquido}=2,3, [Biomassa]_{inicial}=0,1 g/L, [Glicerol]_{inicial} =20 g/L.

	HS			Saco			Sistema Global*			Etanol (g/L)
	H ₂ (mL)	CO ₂ (mL)	H ₂ /CO ₂	H ₂ (mL)	CO ₂ (mL)	H ₂ /CO ₂	H ₂ (mL)	CO ₂ (mL)	H ₂ /CO ₂	
Com bomba	181,3	160,7	1,1	574,0	70,0	8,2	755,3	230,7	3,3	4,1
VAR	160,7	58,1	2,8	430,0	130,0	3,3	590,7	188,1	3,1	3,5
VAP	160,7	47,9	3,3	390,0	180,0	2,2	550,7	227,9	2,4	4,2

* Correspondente à soma de mL de H₂ e mL de CO₂ obtidos para *headspace* (HS) e saco de recolha de gases.

Observando e comparando os resultados obtidos, verificou-se que nem a válvula anti-retorno, nem a válvula de alta pressão conduziram a valores superiores aos obtidos se introduzida uma bomba peristáltica no sistema.

Mais uma vez, em todos os ensaios realizados, o rendimento do processo foi em média de 2,5 L H₂/L Meio de fermentação e as concentrações de etanol obtidas de 4,1 g/L com bomba peristáltica e 3,5 e 4,2 g/L com uma válvula anti-retorno e uma válvula de alta pressão, utilizando 20 g/L de glicerol contido nos resíduos de uma fábrica de produção de biodiesel, respectivamente (Tabela 3.9).

A Tabela 3.10 apresenta, de forma sucinta, todas as condições testadas até esta fase do trabalho, estando demarcadas as condições operacionais que conduziram aos melhores rendimentos do processo e valores de razão volumétrica H₂/CO₂, e por isso, as condições seleccionadas para prosseguir com os estudos.

Tabela 3.10 - Condições operacionais óptimas determinadas em ensaios de produção de hidrogénio, por via biológica, a partir de glicerol contido nos resíduos de produção de biodiesel. Condições experimentais: $V_{Total}/V_{Líquido}=2,3$, $[Biomassa]_{inicial}=0,1$ g/L, $[Glicerol]_{inicial}=20$ g/L.

		Condições operacionais óptimas
Temperatura	37°C	
	30°C	✓
Local de Recolha	<i>Mariotte</i>	
	Saco	✓
Tipo de agitação	Magnética - Banho	
	Orbital - Incubadora	✓
Tipo de vaso de reacção	Tubular	
	<i>Erlenmeyer</i>	✓
Sem bomba		
Com bomba		✓
VAR		
VAP		

Com base nesta tabela, todos os ensaios posteriores foram realizados, tendo em conta as condições operacionais ótimas.

3.2.2 Optimização da concentração de glicerol e biomassa pela Metodologia do Desenho Composto Central (DCC)

Após definição dos parâmetros operacionais mais favoráveis ao processo, pretendeu-se otimizar parâmetros físico-químicos influentes como a concentração de glicerol e da biomassa, e tendo como objectivo determinar as concentrações que conduzissem ao maior valor da razão volumétrica H_2/CO_2 . Essa optimização foi levada a cabo aplicando a metodologia do desenho composto central. De acordo com a referida metodologia construiu-se inicialmente um desenho factorial $2^{(2)}$ [dois parâmetros a dois níveis simétricos (-1 e +1)], seguida da sua expansão para os pontos estrela, formando o chamado Desenho Composto Central (DCC), com base no qual se planearam os ensaios a realizar. A resposta considerada como alvo foi o valor da razão volumétrica H_2/CO_2 na *headspace*, no saco de recolha da fase gasosa e no sistema global. A análise do efeito das variáveis seleccionadas foi levada a cabo por interpretação dos valores calculados a partir dos resultados experimentais obtidos e da sua representação sob a forma de superfície de resposta.

Assim, para o planeamento das experiências a levar a cabo escolheram-se como limites, para as concentrações de biomassa e de glicerol contido nos resíduos valores entre 0,1-2 g/L e 10-30 g/L, respectivamente.

Após realização dos ensaios e por tratamento dos resultados obtidos apresenta-se na Tabela 3.11 a relação entre os efeitos de cada um dos factores em estudo e as secções da montagem consideradas como importantes para análise: *headspace*, saco de recolha e sistema global.

Tabela 3.11 - Análise do efeito da concentração inicial de biomassa e da concentração inicial de glicerol e respectiva interação, na *headspace*, no saco de recolha da fase gasosa e no sistema global com base na construção das tabelas de contrastes.

	Parâmetros	Interações	Estimativa dos Efeitos dos Parâmetros
<i>Headspace</i>	Concentração inicial de biomassa (A)	-	-6,00
	Concentração inicial de glicerol (B)	-	11,00
	-	AB	6,50
Saco de recolha	Concentração inicial de biomassa (A)	-	-3,50
	Concentração inicial de glicerol (B)	-	0,50
	-	AB	-0,50
Sistema Global	Concentração inicial de biomassa (A)	-	-2,85
	Concentração inicial de glicerol (B)	-	2,25
	-	AB	-2,05

Observando a Tabela 3.11, verifica-se claramente que o factor com maior influência sobre os valores de razão volumétrica (H_2/CO_2) foi a concentração inicial de glicerol, em todos os locais da montagem experimental considerados para a realização dos cálculos matemáticos.

Além da análise já realizada, a aplicação do método da regressão múltipla linear, aos resultados experimentais, permitiu ainda obter os coeficientes da equação polinomial quadrática para a razão volumétrica H_2/CO_2 . Para tal, os coeficientes polinomiais foram obtidos através das seguintes equações para a *headspace* (equação 3.1), saco de recolha (equação 3.2) e sistema global (equação 3.3).

$$Y = -3,01 + 2,87 \times C_{biomassa} - 0,01 \times C_{Glicerol} + 3,45 \times C_{Biomassa}^2 + 0,03 \times C_{Glicerol}^2 - 0,63 \times C_{biomassa} \times C_{Glicerol}$$

Equação 3.1

$$Y = 3,44 + 0,95 \times C_{biomassa} - 0,05 \times C_{Glicerol} - 0,70 \times C_{Biomassa}^2 - 0,004 \times C_{Glicerol}^2 - 0,05 \times C_{biomassa} \times C_{Glicerol}$$

Equação 3.2

$$Y = 0,25 + 3,39 \times C_{biomassa} + 0,006 \times C_{Glicerol} - 0,12 \times C_{Biomassa}^2 + 0,008 \times C_{Glicerol}^2 - 0,22 \times C_{biomassa} \times C_{Glicerol}$$

Equação 3.3

Onde Y corresponde à resposta obtida para cada ensaio realizado.

Estes cálculos possibilitaram construção de gráficos tridimensionais, para cada um dos referidos locais em estudo.

A análise estatística, para comparação dos resultados experimentais com os obtidos pelo modelo DCC, foi realizada através da determinação do coeficiente de regressão múltipla (r^2) e do valor da variável F da variância, que relaciona a variância associada ao modelo com variância associada ao erro experimental (Tabela 3.12). A comparação do valor de $F_{calculado}$ com valor de $F_{tabelado}$, para um intervalo de confiança de 95% e de acordo com os graus de liberdade do sistema, indicou a validade estatística do modelo, pois o valor de $F_{calculado}$ foi sempre bastante inferior ao $F_{crítico}$ tabelado para o nível de confiança escolhido, apesar do valor relativamente baixo dos coeficientes de correlação obtidos (Passarinho, 2002).

Tabela 3.12 - Correlação entre os resultados experimentais obtidos e os modelos estabelecidos para a otimização da concentração de glicerol e biomassa.

Resposta avaliada		Réplicas do ponto médio	r^2	$F_{calculado}$	$F_{crítico}$ (intervalo de confiança de 95%)
H_2/CO_2	Headspace	3	0,527	0,393	19,164
	Saco		0,520	0,348	
	Total		0,544	0,373	

De acordo com os ensaios efectuados, o ponto considerado mais favorável experimentalmente foi o de 0,38 e 27,1 g/L de biomassa e glicerol contido nos resíduos da produção de biodiesel, respectivamente.

De seguida, apresentam-se as três superfícies de resposta obtidas com base no tratamento dos resultados experimentais pela aplicação da metodologia do Desenho Composto Central, para a *headspace*, para o saco de recolha da fase gasosa e considerando o sistema global (Figuras 3.3, 3.4 e 3.5).

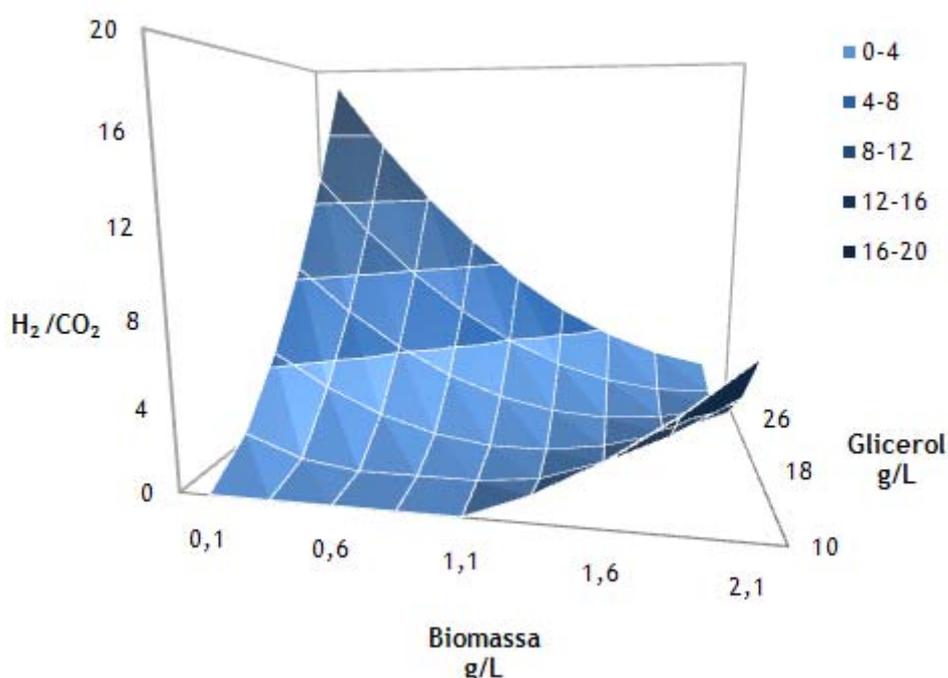


Figura 3.3 - Superfície de resposta, na *headspace*, do estudo do efeito da concentração de biomassa e de glicerol pela metodologia do desenho composto central. Condições experimentais: $[Biomassa]_{inicial} = 0,1-2$ g/L e $[Glicerol]_{inicial} = 10-30$ g/L. $T = 30^\circ C$, $V_{Total}/V_{Líquido} = 2,3$ e com agitação orbital de 150 rpm.

Assim, relativamente à *headspace*, o valor óptimo obtido para a razão volumétrica H_2/CO_2 foi de 18, correspondente a valores de concentração de biomassa e de glicerol de 0,1 g/L e 30 g/L, respectivamente.

Em relação ao efeito dos parâmetros estudados sobre o valor da resposta observou-se que, em geral, para o intervalo de concentração de glicerol entre 18 e 27 g/L ocorreu um decréscimo do valor da razão volumétrica H_2/CO_2 com o aumento da concentração de biomassa.

Este resultado poderá sugerir quer devido a inibição por substrato quer por produto dado que o caudal de remoção da fase gasosa foi constante para todos os ensaios podendo conduzir ao aumento da pressão parcial dos gases na *headspace*, em condições de maior concentração de glicerol ou de biomassa, das quais podem resultar maior velocidade de formação da fase gasosa.

Excepção a este comportamento foi observada para as concentrações de glicerol próximas de 10 g/L, para as quais ocorreu um aumento do valor da razão volumétrica H_2/CO_2 (de 1 para 8) para concentrações de biomassa superiores a 1,1 g/L (Figura 3.3), o que vai de encontro ao referido anteriormente sobre a velocidade de remoção da fase gasosa constante para todas as gamas poder causar efeitos de inibição com consequência sobre os rendimentos do processo.

A análise efectuada no saco de recolha da fase gasosa conduziu a um valor máximo para a razão volumétrica H_2/CO_2 de 6 obtido, para as mesmas concentrações de biomassa e de glicerol que na *headspace*, isto é 0,1 e 30 g/L, respectivamente (Figura 3.4).

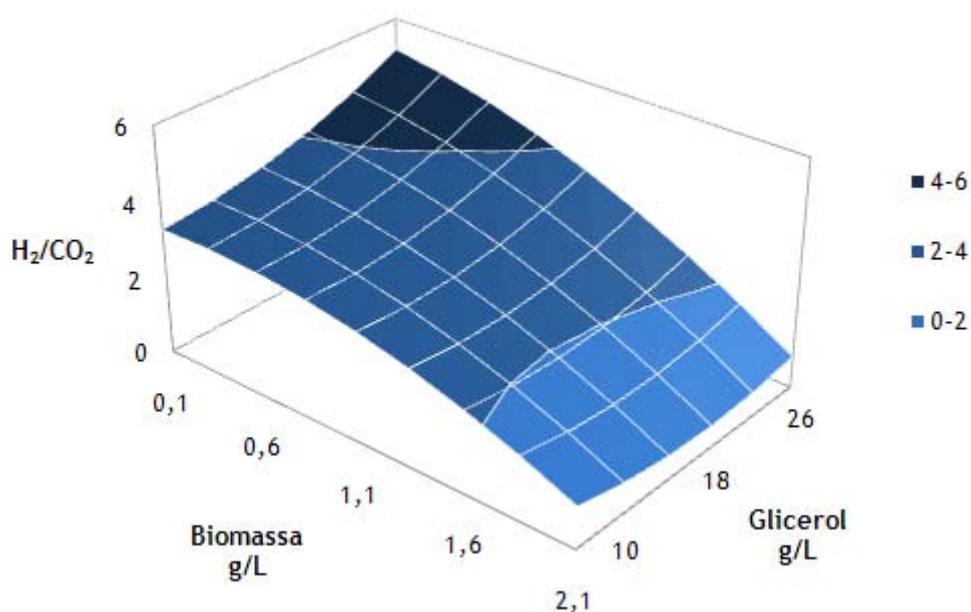


Figura 3.4 - Superfície de resposta, no saco de recolha, do estudo do efeito da concentração de biomassa e de glicerol pela metodologia do desenho composto central. Condições experimentais: $[Biomassa]_{inicial} = 0,1-2$ g/L e $[Glicerol]_{inicial} = 10-30$ g/L. $T = 30^\circ C$, $V_{Total}/V_{Líquido} = 2,3$ e com agitação orbital de 150 rpm.

Os maiores valores da resposta foram obtidos numa gama de baixa concentração de biomassa, registando-se, nessa gama, um aumento mais acentuado da razão volumétrica H_2/CO_2 , relativamente à gama de elevada concentração de biomassa.

Por último apresenta-se a superfície de resposta correspondente aos resultados obtidos considerando o sistema global (headspace e saco de recolha) (Figura 3.5). Observando a Figura 3.5 verifica-se, como seria de esperar que os parâmetros que conduziram ao valor de resposta mais elevado foram concentração de biomassa = 0,1 g/L e concentração de glicerol = 30 g/L.

Relativamente à variação do factor resposta, constata-se que para a concentração inicial de glicerol de 10 g/L, ocorreu um ligeiro aumento do valor da razão volumétrica com o aumento gradual da biomassa, contrariamente ao observado em condições de elevadas concentrações de biomassa e glicerol.

De facto, para concentrações elevadas de substrato, ocorre um aumento acentuado da resposta com a diminuição de biomassa.

Este facto poderá estar associado a uma maior velocidade de produção de H_2 e de CO_2 nestas condições, não acompanhada por um aumento do caudal da bomba peristáltica, tornando a remoção do gás produzido na *headspace* menos eficaz, com possíveis consequências sobre o metabolismo do enzima hidrogenase e produção de hidrogénio, sugerindo fenómenos de inibição por produto.

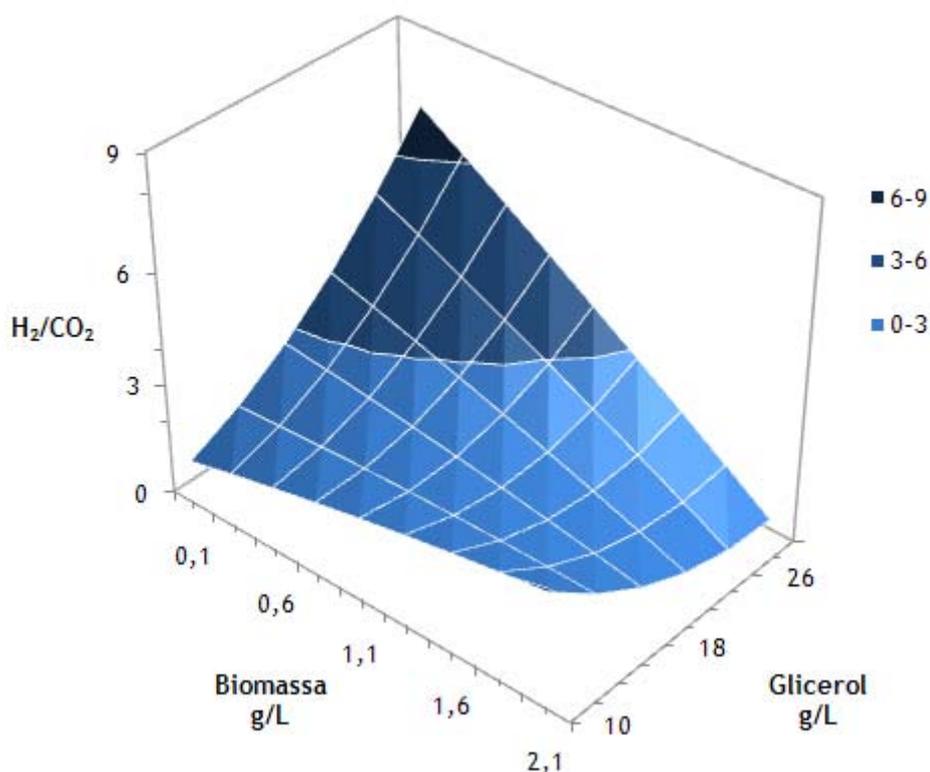


Figura 3.5 - Superfície de resposta, no sistema global, do estudo do efeito da concentração de biomassa e de glicerol pela metodologia do desenho composto central. Condições experimentais: $[Biomassa]_{inicial} = 0,1-2$ g/L e $[Glicerol]_{inicial} = 10-30$ g/L. $T = 30^\circ C$, $V_{Total}/V_{Líquido} = 2,3$ e com agitação orbital de 150 rpm.

3.2.2.1 Variação da produção de etanol na fase líquida

Em relação ao valor da concentração de etanol, que também é produto da fermentação em estudo, este não variou significativamente para os intervalos de concentração de biomassa e glicerol estudados pela metodologia DCC situando-se entre 3 e 4 g/L.

Normalmente para o ponto definido como ponto óptimo de concentração (0,1 e 30 g/L de biomassa e glicerol, respectivamente), a concentração de etanol na fase líquida foi de 2,6 g/L.

3.2.2.2 Variação do consumo de glicerol

Sendo o glicerol o substrato utilizado neste trabalho, a sua gama de consumo pelas células de *Enterobacter aerogenes* está inerente à optimização do processo.

Assim, por cromatografia gasosa determinou-se a concentração de glicerol residual para cada um dos ensaios realizados.

A Tabela 3.13 mostra a relação entre quatro parâmetros, a concentração inicial de biomassa, concentrações de glicerol inicial e consumido e razão volumétrica H₂/CO₂, correspondente aos ensaios realizados nesta fase.

Tabela 3.13 - Variação do consumo de glicerol para os diferentes parâmetros estudados pela metodologia do desenho factorial. Condições experimentais: [Biomassa]_{inicial} =0,1-2 g/L e [Glicerol]_{inicial}=10-30g/L. T=30°C, V_{Total}/V_{Líquido}=2,3 e com agitação orbital de 150 rpm.

		Glicerol (g/L)		mL H ₂ /mL CO ₂		
		Inicial	Consumido	HS	Saco	Sistema Global
Biomassa (g/L)	0,1	20	12,9	2	2	2
	0,38	12,9	12,9	1	5	3
		27,1	14,5	18	6	7
	1,05	10	10,0	1	2	2
		20	11,7	1	3	2
		20	10,9	1	3	2
		20	13,8	1	3	3
		30	16,2	1	3	2
	1,72	12,9	5,7	1	2	2
		27,1	12,8	6	2	2
	2	20	17,0	1	1	1

Com base na tabela, é possível concluir que para as condições óptimas determinadas o consumo de glicerol foi de 14,5 g/L e os valores de razão volumétrica H₂/CO₂ para a headspace, saco de recolha e sistema global, foram de 18, 6 e 7, respectivamente.

O valor da concentração de glicerol consumido, nestas condições, não foi o maior obtido, verificando-se que para uma concentração de biomassa de 1,05 g/L e uma concentração inicial de glicerol de 30 g/L o consumo foi de 16,2 g/L, o que leva à conclusão de que uma maior concentração de substrato não conduziu necessariamente ao melhor razão volumétrica entre H₂ e CO₂, nas condições operacionais estudadas.

*Capítulo 4 Conclusões Gerais e Sugestões
para Trabalho Futuro*

O panorama energético actual reflecte a necessidade iminente de investigar formas de energia alternativas, pois o consumo de combustíveis fósseis tem aumentado, exponencialmente, assim como, os gases resultantes da sua combustão. O hidrogénio tem sido referenciado como o vector energético do futuro, pois a sua densidade energética é a mais elevada de todas as energias disponíveis conhecidas. Para além disso, do resultado da combustão do hidrogénio resulta apenas em vapor de água, o que lhe confere denominação de energia “limpa”.

O principal objectivo deste trabalho foi desenvolver e otimizar um processo fermentativo para a produção de hidrogénio (biohidrogénio) por uma estirpe de *Enterobacter aerogenes*, a partir de glicerol contido em resíduos provenientes da produção de biodiesel, com valorização simultânea destes.

A estirpe da bactéria *E. aerogenes*, utilizada neste trabalho, mostrou ser eficiente na conversão do glicerol presente nos resíduos de uma indústria de produção de biodiesel em hidrogénio.

Inicialmente foram estabelecidas as condições mais favoráveis de operação, como sendo, agitação orbital de 150 rpm, temperatura de operação de 30°C, num *erlenmeyer*, com remoção constante da fase gasosa para um saco de recolha, tendo sido mantida constante a razão $V_{\text{Total}}/V_{\text{Líquido}}=2,3$.

Estas condições foram obtidas por um processo de optimização composto por várias etapas, sendo que, primeiramente realizaram-se ensaios no banho, com agitação magnética, passando posteriormente para a incubadora, com agitação orbital. Nesta fase de transição procedeu-se também à comparação entre a coluna de *Mariotte* e o saco de recolha, tendo sido mais favorável a utilização do último.

Aplicando a metodologia do Desenho Composto Central (DCC), foi possível determinar as concentrações óptimas de glicerol nos resíduos e de biomassa, como sendo 30 g/L e 0,1 g/L, respectivamente, tendo-se obtido valores máximos para a razão volumétrica H_2/CO_2 de 18, 6 e 7, na *headspace* do reactor, saco de recolha da fase gasosa e no sistema global, respectivamente.

O processo desenvolvido neste trabalho mostrou ser eficiente quanto aos objectivos propostos, conduzindo a resultados promissórios, com vista à sua aplicação a sistemas reais, sugerindo o interesse de realizar outros estudos com o objectivo de aumentar a produção de hidrogénio por *E.aerogenes* e integrar numa biorefinaria. Assim as sugestões propostas são:

- ✓ Substituir tanto quanto possível os componentes mais caros do meio de fermentação por resíduos. Diminuição de custos do processo;
- ✓ Realizar um ensaio experimental nas condições definidas como óptimas de operação pelas superfícies obtidas pela metodologia do DCC, com o objectivo de validar o método.
- ✓ Estudar o efeito da velocidade de remoção da fase gasosa, ao longo do processo;
- ✓ Operação do processo em regime contínuo: maior produção de hidrogénio. Forma do reactor; variação das taxas de diluição; imobilização da biomassa;
- ✓ Aplicar as condições óptimas obtidas neste trabalho a outras espécies e estirpes de bactérias, nomeadamente, a *Enterobacter cloacae*, que segundo alguns autores, é também um potencial microorganismo produtor de hidrogénio (Kumar e Das, 2000).
- ✓ Estudo económico do processo, com vista a avaliar a sua viabilidade de implementação numa biorefinaria.

Capítulo 5 Bibliografía

Bisaillon, A, Turcot J., e Hallenbeck PC. “The effect of nutrient limitation on hydrogen production by batch cultures of E.coli.” *International Journal of Hydrogen Energy*, 2006: 1504-8.

Collet, C, Adler, N, Péringer, JP, Schwitzguébel, P. “Hydrogen Production by *Clostridium thermolactium* during continuous fermentation of lactose.” *International Journal of Hydrogen Energy*, 2004: 1245-9.

Das, D., Badri, P.K., Kumar, N. e Bhattacharya, P. “continuous, Simulation and modeling of H₂ production process by *Enterobacter cloacae* IIT-BT 08 using different bioreactor configuration.” *Enzyme and Microbial Technology*, 2002: 867-875.

Das, Debabrata. “Advances in biohydrogen production processes:An approach towards commercialization.” *International Journal of Hydrogen Energy*, 2008: 1-9.

Das, Debabrata e Veziroglu, T.N. “Advances in biological hydrogen production processes.” *International Journal of Hydrogen Energy*, 2008: 6046-6057.

Das, Debabrata e Veziroglu, T.N. “Hydrogen production by biological process: a survey of literature.” (*International Journal of Hydrogen Energy*) 2001.

Das, Debabrata e Veziroglu, T.N. “Hydrogen production by biological processes: a survey of literature.” *International Journal of Hydrogen Energy*, 2001: 13-28.

Drapcho, C, Nhuan, N e Walker, T. *Biofuels Engineering Process Technology*. The McGraw-Hill Companies, Inc., 2008.

Fang, H.H.P., e Liu, H. “Effect of pH on hydrogen production from glucose by mixed culture.” *Bioresource Technology*, 2002: 87-93.

Fennell, D.E., e Gossett, J.M. “Modeling the production of and competition for hydrogen in a Dechlorinating culture.” *Environmental Science Technology*, 1998: 2450-2460.

Ginkel, V, Sung, S, e Lay, J.J. “Biohydrogen production as a function of pH and substrate concentration.” *Environmental Science Technology*, 2001: 4726-30.

Ito, T. “Hydrogen and Ethanol Production from Glycerol-Containing Wastes Discharged after Biodiesel Manufacturing Process.” *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2005.

Kanay, T, Imanaka, H, Nakajima, A, Uwamori, K, Omori, Y e Fukui, T. “Continuous hydrogen production by thermophilic *archeon Thermococcus kodakaraensis* KOD1.” *J.Biotechnology*, 2005: 76-81.

Kapdan, I, Karapinar e Kargi, F. “Bio-hydrogen production from waste materials.” *Enzyme and Microbial Technology*, 2006: 569-582.

Khanal, S.K., Chen, W.H., Li, L e Sung, S. “Biological hydrogen production: effects of pH and intermediate products.” *International Journal of Hydrogen Energy*, 2004: 1123-31.

Kotay, S e Das, D. “Biohydrogen as a renewable energy resource-Prospects and potentials.” *International Journal of Hydrogen Energy*, 2007: 258-263.

Kumar, N. e Das, D. “Enhancement of hydrogen production by *Enterobacter aerogenes*.” *Process Biochemistry*, 2000: 589-593.

Lay, JJ. “Biohydrogen generation by mesophilic anaerobic fermentation of microcrystalline cellulose.” *Biotechnology and Bioengineering*, 2001: 281-7.

Lay, JJ, Fan, K.S., Chang, J. e Ku C.H. "Influence of chemical nature of organic waste on their conversion of hydrogen by heat-shock digested sludge." *International Journal of Hydrogen Energy*, 2003: 1361-7.

Lay, JJ, Fan, K.S., Hwang, J.I., Chang, J.I. e Hsu, P.C. "Factors affecting hydrogen production from food wastes by *Clostridium*-rich composts." *Journal of Environmental Engineering*, 2005: 595-602.

Lee, Y.J., Miyahara, T. e Noike, T. "Effect of pH on microbial hydrogen fermentation." *Journal Chem. Technol. Biotechnol*, 2002: 694-8.

Li, C.L. e Fang H.H.P. "Fermentative hydrogen production from wastewater and solid wastes by mixed cultures." *Environmental Science Technology*, 2007: 1-39.

Liu, G. e Shen, J. "Effects of culture and medium conditions on hydrogen production from starch using anaerobic bacteria." *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2004: 251-6.

Liu, H., Zhang, T. e Fang, H.P.P. "Thermophilic H₂ production from cellulose containing wastewater." *Biotechnol Lett*, 2003: 365-9.

Lo, Y.C., Chen, W.M., Hung, C.H., Chen, S.D. e Chang, J.S. "Dark H₂ fermentation from sucrose and xylose using H₂-producing indigenous bacteria: feasibility and kinetic studies." *Water Res.*, 2008: 827-842.

Madeira, A. e Fonseca, A.. *Biologia Microbiana 1ªed.* Portugal: Universidade Aberta, 1996.

Minnan, L., Jinli, H., Xiaobin, W., Huijuan, X., Jinzao, C. e Chuannan, L. "Isolation and characterization of a high hydrogen producing strain *Klebsiella oxytoca* HP1 from a hot spring." *Res. Microbiology*, 2005: 76-81.

Morimoto, M., Atsuko, M., Atif, A.A.Y., Ngan, M., Fakhru'l-Razi, A. e Iyuke, S.E. “Biological production of hydrogen from glucose by natural anaerobic microflora.” *Internation Journal of Hydrogen Energy*, 2004: 709-13.

Mota, D.I.A., “Bio-remoção de metais pesados pela cortiça”. Relatório de estágio profissionalizante da Licenciatura em Química Tecnológica, *FCL-UL*, 2004

Nakashimada, Y., Rachman, M.A., Kakizono, T. e Nishio, N. “Hydrogen production of *Enterobacter aerogenes* altered by extracellular and intracellular redox states.” *International Journal of Hydrogen Energy*, 2002: 1399-1405.

Passarinho, P. C., “Destoxificação de águas ruças.” Tese para obtenção do grau de Doutor em Biotecnologia, *IST-UTL*, Lisboa, 2002: 236-240.

Podestá, J.J., Navarro, A.M.G., Estrella, C.N. e Estesó, M.A. “Electrochemical measurements of trace concentrations of biological hydrogen produced by *Enterobacteriaceae*.” *Inst.Pasteur*, 1997: 87-93.

Ginkel, S., Logan, B e Oh, S. “Biohydrogen production from food processing and domestic wastwaters.” *International Journal of Hydrogen Energy*, 2005: 1535-42.

Shin, H.S., Youn, J.H. e Kim, S.H. “Hydrogen Production from food waste in anaerobic and thermophilic acidogenesis.” *International Journal of Hydrogen Energy*, 2004: 1355-63.

Tanisho, S., Kuromoto, M. e Kadokura N. “Effect of CO₂ removal on hydrogen production by fermentation.” *Internation Journal of Hydrogen Energy*, 1998: 559-563.

Ueno, Y., Haruta, S., Ishii, S. e Igarashi, Y. “Characterization of microorganism isolated from the effluent of hydrogen fermentation by microflora.” *Journal of Bioscience Bioengineering* , 2001: 397-400.

Wang, J.L. e Wan, W. “Factors influencing fermentative hydrogen production.” *International Journal fo Hydrogen Energy*, 2008.

Wang, J.L., e Wan, W. “Comparison od different pretreatment methods for enriching hydrogen-producing cultures from digested sludge.” *International Journal of Hydrogen Energy*, 2008: 2934-41.

Wang, J.L., e Wan, W. “Effect of temperature on fermentative hydrogen production by mixed cultures.” *International Journal of Hydrogen Energy*, 2008: 5392-93.

Winker, M., Hemschemeir ,A., Gotor C., e Happer, T. e Melis, A. “[Fe]-hydrogenases in green *algae*:photo-fermentation and hydrogen evolution under sulfur deprivation.” *International Journal of Hydrogen Energy*, 2002: 1431-9.

Yazdani, S. e Gonzalez, R. “Anaerobic fermentation of glycerol: a path to economic viability for biofuels industry. Current Opinion in Biotechnology.” *Current opinion in biotechnology*, 2007: 213-219.

Zhang, Z.P., Show, K.Y., Tay, J.H., Liang, D.T., Lee, D.J. e Jiang, W.J. “Rapid formation of hydrogen-producing granules in an anaerobic continuous stirred tank reactor induced by acid incubation.” *Biotechnology and Bioeng.*, 2007: 1040-50.

Anexos

I. Considerações Gerais

Num planeamento pela metodologia do desenho factorial, o termo *factor* representa uma variável essencial na experiência, como por exemplo a concentração, o caudal, o pH, o tipo de tratamento, entre outros. A escolha dos factores a serem incluídos numa experiência é consequência dos objectivos experimentais e é pré-definida pelo experimentador. Além disso, consideram-se também os níveis, os quais são valores ou estados atribuídos a um determinado factor.

A escolha dos níveis depende fundamentalmente do conhecimento do sistema a otimizar e de condicionantes experimentais (Mota, D.I.A., 2004).

Como em muitas situações, o experimentador pretende examinar simultaneamente os efeitos e interacções de muitas variáveis sobre uma variável dependente, a metodologia do desenho factorial apresenta a vantagem de permitir a optimização de vários parâmetros de um sistema em estudo, reduzindo o número de ensaios a realizar (Mota, D.I.A., 2004).

Contudo, é necessário ter algum conhecimento prévio do comportamento do sistema para se poder definir quais as variáveis a considerar e em que níveis (Passarinho, 2002).

De seguida a apresentam-se as várias fases envolvidas na aplicação desta metodologia.

II. Planeamento do desenho factorial

No planeamento do desenho factorial, deve-se seguir o seguinte procedimento (Mota, D.I.A., 2004):

- a) Seleccionar as variáveis mais importantes;
- b) Definir se as variáveis devem (ou podem) ser todas incluídas no mesmo desenho ou se é necessário planear mais do que um desenho factorial;
- c) Definir os níveis -1, 0 e +1 para cada uma das variáveis, os quais devem ser simétricos;
- d) Definir os limites de expansão que serão diferentes dependendo do número de variáveis. Se esse for baixo implica uma menor extensão ($\pm 1,414$ para $2^{(2)}$, $\pm 1,682$ para $2^{(3)}$), enquanto que se este for elevado conduz a intervalos mais alargados ($\pm 3,363$ para $2^{(7)}$).

As experiências definidas pelo desenho factorial, assim como as réplicas do ponto médio (no mínimo 3) devem ser efectuadas ao acaso, visto que permitem o estabelecimento de erros experimentais associados ao sistema em estudo (Mota, D.I.A., 2004).

Um exemplo de planeamento do desenho factorial para 2 factores é descrito na secção 2.2.2.1 (Tabela 2.5).

III. Análise de Resultados

III.1 Estimativa dos efeitos e das interações entre factores

De modo a determinar os efeitos e as interações entre os factores, pode-se construir com base nas respostas experimentais obtidas, uma *tabela de contrastes* ou um *algoritmo de Yates* (Mota, D.I.A., 2004).

De seguida, apresentam-se um exemplo de cada uma destas tabelas, tendo em conta o estudo desenvolvido neste trabalho, no qual se considerou o efeito de dois factores ($2^{(2)}$), sobre a resposta do sistema em termos de razão entre H_2 e CO_2 obtida.

a) Tabela de contraste

A tabela de contraste (Tabela II.1) teve como base a Tabela 2.5 (para os níveis -1 e +1). A esta tabela foi associada a coluna que contém os valores da resposta (H_2/CO_2) obtida para cada experiência e as colunas correspondentes às interações entre os factores estudados. O sinal da coluna da interação (AB) foi obtido por multiplicação dos sinais dos factores envolvidos.

Tabela I.1 - Tabela de contraste para o desenho factorial $2^{(2)}$, para os factores: concentração de biomassa (A) e concentração de glicerol (B). A resposta considerada foi a razão entre os volumes obtidos de H_2 e CO_2

Média	A	B	AB	H_2/CO_2		
				<i>headspace</i>	Saco de Recolha	Sistema Global
+	-	-	-	1	5	2,7
+	+	-	-	1	2	1,9
+	-	+	+	18	6	7,0
+	+	+	+	6	2	2,1
4	2	2	2			

O valor do efeito do factor ou da interacção entre factores foi obtido afectando os valores da última coluna (H_2/CO_2) pelos sinais da coluna cujo factor ou interacção foi avaliado e dividindo pelos valores da última linha. Assim, para a interacção concentração de biomassa (A)/concentração de glicerol (B), para a *headspace* do reactor, saco de recolha e sistema global, tem-se, respectivamente:

$$AB = \frac{(1 - 1 - 18 + 6)}{2} \Leftrightarrow AB = -6 \quad \text{Equação I.1}$$

$$AB = \frac{(5 - 2 - 6 + 2)}{2} \Leftrightarrow AB = -0,5 \quad \text{Equação I. 2}$$

$$AB = \frac{(2,7 - 1,9 - 7,0 + 2,1)}{2} \Leftrightarrow AB = -2,05 \quad \text{Equação I. 3}$$

As estimativas dos efeitos de cada factor em estudo e das interacções entre estes encontram-se nas Tabelas 3.11, 3.12 e 3.13.

b) Algoritmo de Yates

O algoritmo de Yates (Tabelas II.2) teve como base a Tabela 2.5, para os níveis -1 e +1 do desenho factorial.

Tal como na tabela de contraste, também a esta tabela se associou a coluna respeitante à resposta obtida (H_2/CO_2) para cada ensaio e mais k colunas (neste caso, $k=2$), cujos cálculos permitem a caracterização final dos efeitos principais e das interacções associando a cada valor o efeito definido pelo sinal positivo.

Tabela I.2 - Aplicação do algoritmo de Yates, no desenho factorial 2(2), na determinação do efeito e da interacção dos factores: concentração de biomassa (A), concentração de glicerol (B). A resposta considerada foi o rendimento razão entre os volumes obtidos de H₂ e CO₂, na headspace.

A	B	mL H ₂ /mL CO ₂	1	2	Divisor	Estimativa	Efeito
-	-	1	2	26	4	6,5	média
+	-	1	24	-12	2	-6	A
-	+	18	0	22	2	11	B
+	+	6	-12	-12	2	-6	AB

Tabela I.3 - Aplicação do algoritmo de Yates, no desenho factorial 2⁽²⁾, na determinação do efeito e da interacção dos factores: concentração de biomassa (A), concentração de glicerol (B). A resposta considerada foi o rendimento razão entre os volumes obtidos de H₂ e CO₂, no saco de recolha.

A	B	mL H ₂ /mL CO ₂	1	2	Divisor	Estimativa	Efeito
-	-	5	7	15	4	3,75	média
+	-	2	8	-7	2	-3,5	A
-	+	6	-3	1	2	0,5	B
+	+	2	-4	-1	2	-0,5	AB

Tabela I.4 - Aplicação do algoritmo de Yates, no desenho factorial 2⁽²⁾, na determinação do efeito e da interacção dos factores: concentração de biomassa (A), concentração de glicerol (B). A resposta considerada foi o rendimento razão entre os volumes obtidos de H₂ e CO₂, no total obtido.

A	B	mL H ₂ /mL CO ₂	1	2	divisor	estimativa	efeito
-	-	2,7	4,6	13,7	4	3,43	média
+	-	1,9	9,1	-5,7	2	-2,85	A
-	+	7	-0,8	4,5	2	2,25	B
+	+	2,1	-4,9	-4,1	2	-2,05	AB

Assim, os primeiros dois valores da coluna 1 obtêm-se a partir da adição de pares sucessivos da coluna resposta mL H₂/mL CO₂ e os seguintes por subtracção (valor de baixo - valor de cima). A coluna 2 obtém-se utilizando os valores da coluna 1, de modo análogo ao anterior.

O valor correspondente a cada efeito ou interacção de factores obtém-se pela divisão do valor da coluna k pelo da coluna divisor (na qual a primeira célula contém o valor $2^{(k)}$ e as restantes o valor $2^{(k-1)}$) e a identificação do tipo de efeito, pela coluna em que aparece o sinal positivo da matriz inicial (Mota, D.I.A., 2004).

III.2 Determinação dos coeficientes da equação polinomial de 2ª ordem

Na equação I.4, apresenta-se o polinómio que representa um desenho factorial expandido de duas variáveis

$$Y = b_0 + b_1x_1 + b_2x_2 + b_{11}x_1^2 + b_{22}x_2^2 + b_{12}x_1x_2 \quad \text{Equação I. 4}$$

Em que, Y é a resposta obtida para cada ensaio e x o factor estudado. Para a determinação dos coeficientes polinomiais desta equação, constrói-se uma nova matriz fazendo a correspondência entre a resposta obtida e os valores de cada factor para os vários ensaios.

Os coeficientes da equação são calculados por regressão múltipla linear. O conhecimento destes coeficientes permite determinar os valores teóricos para a resposta, razão volumétrica (mL H₂/mL CO₂).

III.3 Análise estatística do modelo

A análise estatística do modelo é efectuada através do teste F da variância e da determinação do coeficiente de correlação, r^2 , que permitem avaliar o ajuste do modelo relativamente aos dados experimentais.

A variável aleatória F é dada por:

$$F = \frac{SQ_{\text{lof}}/m}{SQ_{\text{exp}}/n} \quad \text{Equação I.5}$$

Em que, $SQ_{\text{lof}} = \sum(Y_{\text{rep}} - \hat{Y})^2$ e $SQ_{\text{exp}} = \sum(Y - Y_{\text{rep}})^2$; Y_{rep} é a média dos valores experimentais das réplicas do ponto médio; \hat{Y} é o valor estimado para cada ensaio e Y é o valor experimental; m (diferença entre o número total de experiências diferentes e o número de coeficientes do modelo) e n (diferença entre o número total de experiências e o número total de experiências diferentes) são os graus de liberdade associados, respectivamente, a SQ_{lof} e SQ_{exp} .

Assim, relativamente ao valor de F, se for inferior ao valor tabelado $F_{\text{crítico}}$ (Tabela II.3), para igual número de graus de liberdade e para um determinado intervalo de confiança, indica uma elevada probabilidade do modelo encontrado ser adequado para o sistema em estudo.

Quanto ao valor do quadrado do coeficiente de correlação (r^2), o qual é dado pela equação II.3, quanto mais próximo de 1 este estiver, com maior confiança o modelo poderá ser aplicado à situação experimental em estudo.

$$r^2 = \frac{SQ_{\text{fact}}}{SQ_{\text{Corr}}} \quad \text{Equação I.6}$$

Onde, $SQ_{\text{fact}} = \sum(\hat{Y} - Y_{\text{med}})^2$ e $SQ_{\text{Corr}} = \sum(Y - Y_{\text{med}})^2$.

Tabela I. 5 - Valores de $F_{\text{crítico}}$ para um intervalo de confiança de 95%.

n_1	n_2											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	15	20
1	161,4	199,5	215,7	224,6	230,2	234,0	236,8	238,9	240,5	241,9	245,9	248,0
2	18,51	19,00	<u>19,16</u>	19,25	19,30	19,33	19,35	19,37	19,38	19,40	19,43	19,446
3	10,128	9,552	9,277	9,117	9,013	8,941	8,887	8,845	8,812	8,786	8,703	8,660
4	7,709	6,944	6,591	6,388	6,256	6,163	6,094	6,041	5,999	5,964	5,858	5,803
5	6,608	5,786	5,409	5,192	5,050	4,950	4,876	4,818	4,772	4,735	4,619	4,558
6	5,987	5,143	4,757	4,534	4,387	4,284	4,207	4,147	4,099	4,060	3,938	3,874
7	5,591	4,737	4,347	4,120	3,972	3,866	3,787	3,726	3,677	3,637	3,511	3,445
8	5,318	4,459	4,066	3,838	3,687	3,581	3,500	3,438	3,388	3,347	3,218	3,150
9	5,117	4,256	3,863	3,633	3,482	3,374	3,293	3,230	3,179	3,137	3,006	2,936
10	4,965	4,103	3,708	3,478	3,326	3,217	3,135	3,072	3,020	2,978	2,845	2,774
15	4,543	3,682	3,287	3,056	2,901	2,790	2,707	2,641	2,588	2,544	2,403	2,328
20	4,351	3,493	3,098	2,866	2,711	2,599	2,514	2,447	2,393	2,348	2,203	2,124

$n_1 = m$, corresponde ao número de graus de liberdade no denominador; $n_2 = n$, corresponde ao número de graus de liberdade no denominador.

Os valores de F podem ser encontrados em qualquer livro de estatística ou podem ser obtidos, usando no Excel, a fórmula: =INVF(0,05, n_1 , n_2).

III.4 Metodologia da superfície de resposta

A representação gráfica para o modelo de dependência polinomial encontrado é uma representação tridimensional de superfície de resposta, na qual se avalia a variação da resposta do sistema com a variação de dois dos factores, mantendo as restantes num valor constante, como se encontra representado nas Figuras 3.4, 3.5 e 3.6.

IV. Resultados experimentais do desenho composto central

Nesta tese de mestrado, a aplicação da metodologia do desenho factorial na determinação dos efeitos e das interacções entre os vários factores estudados, foi realizada através da construção de uma tabela de contrastes, a qual teve por base os resultados obtidos nos ensaios experimentais.

De seguida apresentam-se os resultados que conduziram à construção das tabelas de contrastes para o desenho factorial 2⁽²⁾.

IV.1 Desenho Factorial 2⁽²⁾

Parâmetros estudados na optimização da produção de hidrogénio por *E. aerogenes* com glicerol contido nos resíduos duma fábrica de produção de biodiesel:

- Concentração inicial de biomassa (g/L)
- Concentração inicial de glicerol (g/L)

Resposta: Razão entre os volumes produzidos de H₂ e CO₂, mL H₂/mL CO₂, na *headspace*, no saco de recolha e no sistema global.

Tabela I.6 - Valores da razão volumétrica H₂/CO₂ obtidos sob as condições experimentais estabelecidas para o desenho (-1/+1).

Experiência	Biomassa inicial (g/L)	Glicerol inicial (g/L)	mL H ₂ /mL CO ₂		
			Headspace	Saco de recolha	Sistema Global
1	0,38	12,9	1,2	5,1	2,7
2	1,72	12,9	1,3	2,2	1,9
3	0,38	27,1	18,0	6,1	7
4	1,72	27,1	6,0	2,2	2,1

Tabela I.7 - Valores da razão volumétrica H₂/CO₂ obtidas sob as condições experimentais estabelecidas para a expansão (-1,414/+1,414).

Experiência	Biomassa inicial (g/L)	Glicerol inicial (g/L)	mL H ₂ /mL CO ₂		
			Headspace	Saco de recolha	Sistema Global
#1	0,10	20,0	2,1	2,3	1,6
#2	2,00	20,0	1,2	1,2	1,2
#3	1,05	10,0	1,1	2,2	2,2
#4	1,05	30,0	1,2	3,1	2,3

Tabela I.8 - Valores da razão volumétrica H₂/CO₂ obtidas sob as condições experimentais estabelecidas para o ponto médio

Experiência	Biomassa inicial (g/L)	Glicerol inicial (g/L)	mL H ₂ /mL CO ₂		
			Headspace	Saco de recolha	Sistema Global
1	1,05	20,0	1,1	3,0	2,2
2	1,05	20,0	1,3	2,8	2,4
3	1,05	20,0	1,2	2,7	2,5