Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"

Efeito da suplementação com Sulfato de Ferro ($FeSO_4$) na vinhaça sobre a produção de biogás

Gabriela Maria Ferreira Lima Leite

Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestra em Ciências. Área de concentração: Microbiologia Agrícola

Piracicaba
2020

Gabriela Maria Ferreira Lima Leite
Tecnóloga em Agroindústria

Efeito da suplementação com Sulfato de Ferro ($FeSO_4$) na vinhaça sobre a produção de biogás

versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011

Orientador:
Prof. Dr. **ANTONIO SAMPAIO BAPTISTA**

Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestra em Ciências. Área de concentração: Microbiologia Agrícola

Piracicaba
2020

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA – DIBD/ESALQ/USP

Leite, Gabriela Maria Ferreira Lima

Efeito da suplementação com Sulfato de Ferro ($FeSO_4$) na vinhaça sobre a produção de biogás / Gabriela Maria Ferreira Lima Leite - - versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011. - - Piracicaba, 2020.

67 p.

Dissertação (Mestrado) - - USP / Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz".

1. Vinhaça 2. Biodigestão anaeróbia 3. Suplementação 4. Biogás I. Título

AOS MEU PAIS,

Odair e Luzia,

Pelo amor, apoio e confiança sempre depositados

e por estarem sempre presentes.

Meu eterno amor e admiração.

DEDICO.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus pela oportunidade concedida, por ter me dado força e determinação para alcançar meus objetivos e por ter iluminado meu caminho em todos os momentos.

Á toda minha família por sempre estar ao meu lado, pelo apoio, paciência, compreensão, amor, carinho e disposição em sempre me ajudar. Todos da minha família, sem dúvidas, são indispensáveis na minha vida. Amo todos vocês!

Ao orientador Prof. Dr. Antonio Sampaio Baptista, que tão carinhosamente acreditou na realização deste estudo, pela orientação, paciência, compreensão, pelos ensinamentos e oportunidades, sobretudo, a amizade. Minha eterna admiração.

Agradeço à ESALQ/USP e ao programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola pela oportunidade, infra-estrutrua e os demais recursos disponibilizados para a conclusão desse estudo.

As agências de fomento CAPES e CNPq pelo suporte financeiro.

Ao grupo de pesquisa GTSBio e todos os colegas de laboratório, por toda ajuda concedida, em especial à Laysa, Tamires, Maria Carolina, Eric, Rubens, Manuella, Layna e Ana Paula, por todo suporte e pela amizade construída.

A equipe técnica do laboratório: Pedro, Silvino e Rose, por toda ajuda.

Ao Manoel e equipe técnica do Departamento de Química da ESALQ/USP pela colaboração em uma etapa do meu trabalho.

Á Fátima e Liz Mary do CENA/USP pelo suporte nas análises.

Á Usina Iracema e a Usina São Martinho, que concederam os materiais que foram essenciais para a realização deste estudo.

Aos meus amigos, Talita, Rebeca, Silas, Matheus e meus pastores Rosemeire e Alberto pelas orações, pela amizade, por sempre estarem ao meu lado me auxiliando em todos os momentos, pelo apoio, incentivo, por todas as lembranças, por sempre acreditarem na minha capacidade e me darem coragem para enfrentar as minhas dificuldades. Amo vocês!

Por fim, agradeço a todos que de alguma maneira contribuíram com a realização desse trabalho. Gostaria que soubessem que todos são importantantes e fazem parte dessa conquista. Minha eterna gratidão!

Que os vossos esforços desafiem as impossibilidades, lembrai-vos de que as grandes coisas do homem foram conquistadas do que parecia impossível.
Charles Chaplin

SUMÁRIO

RESUMO 7

ABSTRACT 8

1. INTRODUÇÃO 9

2. HIPÓTESE 11

3. OBJETIVO 13

3.1 Geral 13
3.2 Especificos 13

4. JUSTIFICATIVA 15

5 REVISÃO DE LITERATURA 17

5.1 Vinhaça: Composição e aplicações 17
5.2 Produção de biogás 18
5.3 Fatores que interferem a produção de biogás 20
5.4 Suplementação nutricional na produção de biogás 21

6.MATERIAL E MÉTODOS 25

6.1 Instalações Experimentais 25
6.2 Vinhaça 25
6.3 Inóculo 25
6.4 Unidade experimental 25
6.5 Procedimento Experimental 26
6.6 Determinações físico-químicas 27
6.6.1 Monitoramento do pH 28
6.6.2 Demanda Química de Oxigênio (DQO) 28
6.6.3 Alcalinidade total, parcial, intermediária e relação AI/AP 28
6.6.4 Ácidos voláteis totais 29
6.6.5 Teor de ácidos orgânicos 30
6.6.6 Teor de cátions 30
6.6.7 Teor de ânions 31
6.6.8 Volume do biogás 31
6.6.9 Composição do biogás 32
6.7Delineamento Experimental e Análise Estatística 33

7. RESULTADOS E DISCUSSÃO 35

7.1Caracterização do substrato 35
7.2 Produção de biogás e remoção de DQO 37
7.3 Teores de ânions 40
7.4 Ácidos orgânicos 43
7.5 Teor de Metano (CH_4) 48
7.6 Teores de Cátions 51
7.7 Monitoramento do processo por pH, alcalinidade e acidez volátil total 55

8. CONCLUSÕES 59

REFERÊNCIAS 60

RESUMO

Efeito da suplementação com Sulfato de Ferro ($FeSO_4$) na vinhaça sobre a produção de biogás

A agroindústria sucroenergética possui vários desafios, dentre eles, transformar passivos ambientais em ativos, gerando riquezas, diminuindo custos com gestão de resíduos e melhorando os índices de sustentabilidade desse setor. Entre esses passivos ambientais, a vinhaça se caracteriza pelo alto volume gerado e às altas concentrações de material orgânico. Nesse contexto, verifica-se a necessidade de dar uma finalidade nobre para esse subproduto. A biodigestão anaeróbia é uma tecnologia que proporciona a redução da Demanda Química de Oxigênio (DQO), neutralização do pH e a redução de possíveis compostos nocivos à microbiota do solo. Além disso, promove a produção do biogás, o qual é classificado como biocombustível. O processo de biodigestão anaeróbia, por sua vez, pode ser influenciado por diversos fatores, os quais estão relacionados com o substrato, as características do biodigestor, bem como as condições de operação. Por esses motivos, este projeto teve como objetivo verificar o efeito da suplementação da vinhaça com sulfato de ferro, a fim de promover o aumento de produtividade e de eficiência do processo de produção de biogás, através de processo de biodigestão anaeróbia. Foram utilizados dois biorreatores (R1 e R2) do tipo UASB (Upflow Anaerobic Sludge Blanket) com capacidade de 50 litros e volume reacional de 34,5 litros cada, operados sob temperatura de 38 ºC, com tempo de detenção hidráulica de 24 horas por 63 dias. Foram avaliadas duas dosagens de suplementação da vinhaça com sulfato de ferro ($FeSO_4$), 500 mg L^{-1} (T2) e 1000 mg L^{-1}(T3). Também foi conduzido um tratamento controle, sem a adição do sulfato de ferro (T1). Os ensaios foram realizados em triplicatas, sendo que cada ensaio teve a duração de 7 dias. Os resultados obtidos demonstraram que as produções de biogás foram 68,23 (±2,98), 68,06 (±0,84) L dia^{-1} e 66,80 (±0,81) L dia^{-1}, T1, T2 e T3, respectivamente. O teor de metano foi 61,97 % (±0,05), 60,41 % (±0,32) e 61,65 % (±1,45) para T1, T2 e T3 respectivamente. A maior remoção de DQO foi observada no T2 (70,11 %). Todos os tratamentos apresentaram concentração elevada de sulfato. Não houve acúmulo de ácidos orgânicos no processo, sendo que o T1 apresentou a menor concentração (211,93 ± 70,93) mg L^{-1} de ácido acético e o T2 a maior concentração (280,15 ± 64,38) mg L^{-1} desse elemento. No tocante aos teores de cátions, o cálcio expressou a maior porcentagem de remoção, 64,34 %, 63,16 % e 60,77 % T1, T2 e T3, respectivamente. Os valores de pH foram 7,81 (T1), 7,74 (T2) e 7,79 (T3). A relação alcalinidade parcial/alcalinidade intermediária (AI/AP) na vinhaça submetida ao T1 foi de 0,11 (±0,01), nos tratamentos T2 e T3 a relação foi de 0,12 (±0,01). A concentração de ácidos voláteis totais (AVT) foi maior para o T1 (387,74 ± 84,47) e menor para o T3 (310,78 ± 19,67). A utilização da solução de $FeSO_4$ não permitiu atingir o aumento da produtividade e da qualidade do biogás obtido no processo de biodigestão anaeróbia da vinhaça, entretanto, o processo foi estável e não verificou-se acúmulo de produtos intermediários.

Palavras-chave: Vinhaça, Biodigestão anaeróbia, Suplementação, Biogás

ABSTRACT

Effect of iron sulphate supplementation ($FeSO_4$) on vinasse on biogas production

The sugar-energy agroindustry has several challenges, including transforming passive environments into assets, generating wealth, reducing waste management costs and improving the sustainability indices of this sector. Among these environmental liabilities, the vinasse is characterized by the high volume generated and the high concentrations of organic material. In this context, there is a need to give a noble purpose to this byproduct. Anaerobic digestion is a technology that provides the reduction of Chemical Oxygen Demand (COD), neutralization of pH and the reduction of possible compounds harmful to soil microbiota. In addition, it promotes biogas production, which is classified as biofuel. The anaerobic digestion process, in turn, can be influenced by several factors, which are related to the substrate, the characteristics of the biodigester, as well as the operating conditions. For these reasons, this project aimed to verify the effect of iron sulphate vinasse supplementation in order to promote the increase of productivity and efficiency of the biogas production process, through an anaerobic biodigestion process. Two UASB (Upflow Anaerobic Sludge Blanket) bioreactors (R1 and R2) were used, with a capacity of 50 liters and a rational volume of 34.5 liters each, operated at a temperature of 38 ºC, with a hydraulic detention time of 24 hours for 63 days. Two dosages of iron sulphate vinasse supplementation ($FeSO_4$), 500 mg L^{-1} (T2) and 1000 mg L^{-1} (T3) were evaluated. A control treatment was also conducted without the addition of iron sulphate (T1). Assays were performed in triplicates, each assay lasted 7 days. The results showed that biogas yields were 68.23 (± 2.98), 68.06 (± 0.84) L day^{-}1 and 66.80 (± 0.81) L day^{-1}, T1, T2 and T3, respectively. The methane content was 61.97% (± 0.05), 60.41% (± 0.32) and 61.65% (± 1.45) for T1, T2 and T3 respectively. The highest COD removal was observed at T2 (70.11 %). All treatments showed high sulfate concentration. There was no accumulation of organic acids in the process. T1 had the lowest concentration (211.93 ± 70.93) mg L^{-1} of acetic acid and T2 the highest concentration (280.15 ± 64.38) mg L^{-1} of this element. Regarding cation contents, calcium expressed the highest percentage of removal, 64.34 %, 63.16 % and 60.77 % T1, T2 and T3, respectively. The pH values were 7.81 (T1), 7.74 (T2) and 7.79 (T3). The ratio of partial alkalinity / intermediate alkalinity (AI / AP) in vinasse submitted to T1 was 0.11 (± 0.01), in treatments T2 and T3, the ratio was 0.12 (± 0.01). The concentration of total volatile acids (TVA) was higher for T1 (387.74 ± 84.47) and lower for T3 (310.78 ± 19.67). The use of $FeSO_4$ solution did not allow to increase the productivity and quality of biogas obtained in the anaerobic digestion process of vinasse, however, the process was stable and there was no accumulation of intermediate products.

Keywords: Vinasse, Anaerobic digestion, Supplementation, Biogas

1. INTRODUÇÃO

Devido à busca pela sustentabilidade econômica, ambiental e social, contribuindo ainda para a redução das emissões de gases de efeito estufa no país tendo como objetivo ampliar a participação dos biocombustíveis na matriz de transportes brasileira, a nova política nacional de biocombustíveis (RenovaBio) instituída pela Lei 13.576/2017, é uma politica de estado de descarbonização do transporte. Entende-se que os biocombustíveis podem ser utilizados como fontes complementares ou sucedâneas aos combustíveis fósseis.

Dentre os biocombustíveis, o etanol é o que tem mais reconhecido destaque. Além disso, a cadeia da agroindústria sucroenergética contribui positivamente para a redução de emissão dos gases do efeito estufa para a atmosfera, por meio da remoção do CO_2, através da fotossíntese, para a produção de biomassa.

No entanto, o setor sucroenergético precisa superar desafios para proporcionar de fato uma atividade totalmente limpa e sustentável. Isto porque gera grandes volumes de resíduos. A vinhaça gerada na etapa de destilação é o mais importante deles, tanto em volume quanto em potencial poluidor (GRANATO; SILVA, 2002).

Além da elevada proporção em que é produzida, razão de 10-14 litros de vinhaça por litro de álcool, considerado o efluente de maior volume da indústria do álcool, pode representar um problema ecológico devido à sua elevada carga orgânica, demanda química de oxigênio (DQO) aproximadamente 35 000 mg L^{-1}, composta pelo residual dos carboidratos não consumidos na fermentação alcoólica e também pela elevada concentração de sais e ácidos orgânicos (CORTEZ et al., 2014; SYDNEY et al., 2014; CETESB, 2006).

Com isso surge a preocupação relacionada ao destino final desse subproduto. Devido a sua composição, faz-se possível o uso da vinhaça para a produção de biogás através da biodigestão anaeróbia. Esse processo é responsável pela redução da DQO, mantém a composição nutricional da vinhaça, além de proporcionar um biofertilizante e a produção do biogás (CHERNICHARO, 2007).

Diferentes abordagens têm sido aplicadas para melhorar a produção de biogás em biodigestores. Devido à necessidade de aprimorar e melhorar o processo, aumentou-se o interesse em diversas técnicas. Entre elas, a suplementação de aditivos inorgânicos e biológicos tem mostrado bons resultados na melhora do desempenho dos biodigestores (ROMERO-GUIZA et al., 2016a). A presença de concentrações adequadas de micronutrientes

é fundamental para que os processos de tratamento de efluentes sejam operados com êxito (BOHRZ, 2010).

Fornecer condições ao meio é de suma importância, considerando que um determinado fator provoca desequilíbrio no processo, afetando principalmente as arqueas metanogênicas, que por serem mais sensíveis às condições de meio, deixam de produzir o biogás, ocasionando o aumento na concentração dos ácidos orgânicos voláteis e de outros produtos intermediários, inibindo ainda mais a produção do biogás (OLIVEIRA, 2009; MEYSTRE, 2007).

2. HIPÓTESE

É possível aumentar a produtividade e melhorar a qualidade do biogás proveniente do processo de biodigestão anaeróbia de vinhaça através da suplementação com o sulfato de ferro.

3. OBJETIVO

3.1 Geral

Verificar o efeito da suplementação da vinhaça com sulfato de ferro, a fim de promover o aumento de produtividade e de eficiência do processo de produção do biogás, através do processo de biodigestão anaeróbia.

3.2 Especificos

1) Definir a melhor dosagem de sulfato de ferro para estimular a biodigestão anaeróbia da vinhaça;
2) Estudar os efeitos de diferentes concentrações de sulfato de ferro sobre o processo de biodigestão anaeróbia;
3) Verificar o efeito da suplementação da vinhaça com sulfato de ferro sobre a composição do biogás produzido.

4. JUSTIFICATIVA

A agroindústria sucroenergética tem uma participação importante na economia brasileira, no entanto enfrenta alguns desafios, tais como o alto volume de resíduos produzidos. Entre esses, a vinhaça, gerada na etapa de destilação, é o mais importante deles, tanto em volume quanto em potencial poluidor.

Pelo fato da vinhaça ser muito utilizada na forma de fertirrigação, em 2006, a Companhia Ambiental do Estado de São Paulo (CETESB) publicou uma Instrução Normativa Nº 4.321, a qual define critérios e orienta a aplicação da vinhaça. Segundo essa instrução normativa, o potássio proveniente da vinhaça deve corresponder ao máximo de potássio a 5% da capacidade de troca catiônica (CTC) do solo. Isso restringe a aplicação da vinhaça em pequenas áreas e exige que cada ano se aumente o raio médio de gerenciamento do mesmo, aumentando o custo da gestão desse resíduo. Por esses motivos, as usinas têm buscado novas alternativas para o destino e uso da vinhaça.

Uma das alternativas para o aproveitamento reacional da vinhaça é a biodigestão anaeróbia, a qual resulta na geração de biogás e um produto final com potencial de ser utilizado como biofertilizante. Além disso, o biogás produzido pode ser queimado diretamente em caldeiras para gerar energia elétrica, ou, pode ser purificado, para a obtenção de biometano e poder ser utilizado como combustível substituto ou complementar ao diesel na frota da própria usina.

Diante disso, o processo de biodigestão anaeróbia deve ser bem ajustado e monitorado, a fim de se obter as maiores produtividades e qualidade do produto final. Desse modo, a insuficiência ou o excesso de alguns componentes podem prejudicar o processo, entre eles os teores de nutrientes, os quais podem ser adicionados ao processo para suprirem as necessidades do metabolismo dos microrganismos, promovendo o acréscimo na produção e qualidade do biogás.

5. REVISÃO DE LITERATURA

5.1 Vinhaça: Composição e aplicações

A vinhaça é um líquido residual da destilação alcoólica e representa a mais preocupante água residuária da indústria sucroenergética, devido à grande quantidade em que é gerada. Para cada um litro de etanol produzido são gerados até 14 litros de vinhaça. Apresenta diferente composição em função do clima, composição do mosto, teor alcoólico do vinho e sistema de aquecimento do vinho nos aparelhos de destilação (PAOLIELLO, 2006). Entretanto, pode-se observar em sua composição: baixo teor de sólidos totais, alta turbidez e concentração de compostos orgânicos, como ácidos, álcoois, aldeídos, cetonas, ésteres e açúcares, os íons potássio (K^+), cálcio (Ca^{2+}), magnésio (Mg^{2+}) e sulfato (SO_4^{2-}) e tem o pH em torno de 4,5 (ORTEGÓN et al., 2016). Além disso, apresenta mais de 90 % de água em sua composição (CORTEZ et al., 2014).

A preocupação que se tem com o destino adequado para a vinhaça existe, pois, este subproduto é considerado um poluente quando atinge as massas de água, trazendo grande preocupação ambiental quanto a sua eliminação, pois apresenta alta carga de matéria orgânica, tornando-se uma fonte importante de crescimento microbiano (CAMPOS et al., 2014).

Devido a composição físico-química da vinhaça, ela representa várias aplicações, tais como: produção de adubo, fertirrigação (em lavouras da própria cana-de-açúcar), combustão, biodigestão, produção de proteína unicelular, alimentação animal e reciclagem para diluição do melaço (MARTINS; OLIVETTE; NACHILUK, 2011; GRANATO; SILVA, 2002). Dessas aplicações, a fertirrigação e a biodigestão são as duas alternativas mais viáveis.

A biodigestão anaeróbia é um processo realizado em reatores que pode ser conduzido até a etapa de metanogênese, onde se tem a produção de biogás, cuja proporção em metano pode chegar a 96% em processos otimizados (CORTEZ et al., 2014), apresentando grande potencial para ser aproveitado na produção de energia elétrica. No caso da vinhaça ao ser submetida à digestão anaeróbia conserva seus nutrientes, nitrogênio, fósforo e potássio (GRANATO; SILVA, 2002; SOUZA; SANTOS; FRACARA, 2011).

Através desse processo, para cada 1 m^3 de vinhaça pode-se obter cerca de 14,6 m^3 de biogás (SOUZA; SANTOS; FRACARO, 2011), o qual apresenta em sua composição 55 - 65 % de metano (GRANATO; SILVA, 2002).

Portando, o processo de biodigestão anaeróbia é uma alternativa para se aproveitar o potencial energético existente na vinhaça além do interesse econômico e ambiental que são fundamentais.

5.2 Produção de biogás

É através da biodigestão anaeróbia, um processo biológico natural, no qual o material orgânico é degradado na ausência de oxigênio por diferentes populações de microrganismos em cooperação (Figura 1), gerando produtos finais na fase gasosa (H_2, CH_4, CO_2) (MCCARTY, 1982; FORESTI, 1994; ERSAHINet al., 2011). Há mais de um século que a formação de metano tem interessado químicos e microbiologistas (PELCZAR; CHAN & BRIEG, 1996).

Por exigir um menor consumo de energia, espaço e produzir menor quantidade de lodo em comparação com as tecnologias disponíveis para tratamento aeróbico, o tratamento anaeróbico de efluente é mais vantajoso (ERSAHIN et al., 2011).

Desde o século XIX se faz uso comercial dessa fermentação, no qual era utilizada apenas para estabilizar os resíduos orgânicos em tanques sépticos. Uma companhia australiana, em 1911, começou a produzir e vender gás oriundo da decomposição biológica do esgoto. Desde então, gases provenientes de efluentes têm sido utilizados para aquecimento e geração de energia em boa parte do mundo (PATURAU, 1969).

O processo para a produção de biogás ocorre em diferentes fases interligadas. Em cada fase atua um grupo de agentes microbiológicos distinto. A realização do processo é dada em quatro estágios: hidrólise, acidogênese, acetogênese e metanogênese.

Inicialmente, acontece a hidrólise extracelular dos compostos orgânicos complexos como carboidratos, ácidos graxos, proteínas e demais compostos em monômeros básicos, através de enzimas hidrolíticas. Quando degradados em monômeros, esses compostos são transportados para o meio intracelular originando ácidos orgânicos, CO_2 e H_2. Sendo os principais ácidos gerados nessa etapa o ácido butírico, o ácido propiônico e em menor quantidade o ácido acético, por bactérias ácidogênicas. Constituindo a segunda etapa do processo, acidogênese (RITTMANN; MCCARTY, 2001; CORTEZ, et al., 2007).

A importância dos ácidos produzidos pelas bactérias acidogênicas reside na disponibilidade de substrato para bactérias acetogênicas. Na terceira etapa, as bactérias acetogênicas transformam os ácidos orgânicos da etapa anterior em acetato e hidrogênio, no qual dois grupos distintos de microrganismos podem ser distinguidos, baseados em seu

metabolismo: As bactérias acetogênicas hidrogenotróficas, que produzem ácido acético, CO_2 e H_2 a partir de uma grande variedade de substratos, dentre eles ácidos orgânicos e álcoois, e as homoacetogênicas, que produzem hidrogênio facultativamente, ao contrário das hidrogenotróficas, catalisam acetato a partir de CO_2 e H_2 e são independentes das relações sintróficas com organismos consumidores de H_2 (MOSEY, 1982; RITTMANN; MCCARTY, 2001).

E, por fim, a última etapa realizada por arqueas metanogênicas que convertem o acetato e o hidrogênio em gás metano e dióxido de carbono. Existem dois grupos, as que são preferencialmente consumidoras de acetato, conhecidas como acetoclásticas, e as consumidoras de H_2, hidrogenotróficas. Esta é a fase mais lenta e controla as taxas de conversão do processo (CANHOS; VAZOLLER, 1999).

O sistema microbiano que leva à produção de biogás é um processo autorregulado e muito eficiente na conversão de matéria orgânica em CH_4, CO_2 e H_2. No entanto, a condução de processos anaeróbios deve favorecer condições adequadas para todos os microrganismos envolvidos. Caso contrário, o desequilíbrio entre os diversos metabolismos microbianos pode afetar a eficiência do processo (SILVERIO, 2017).

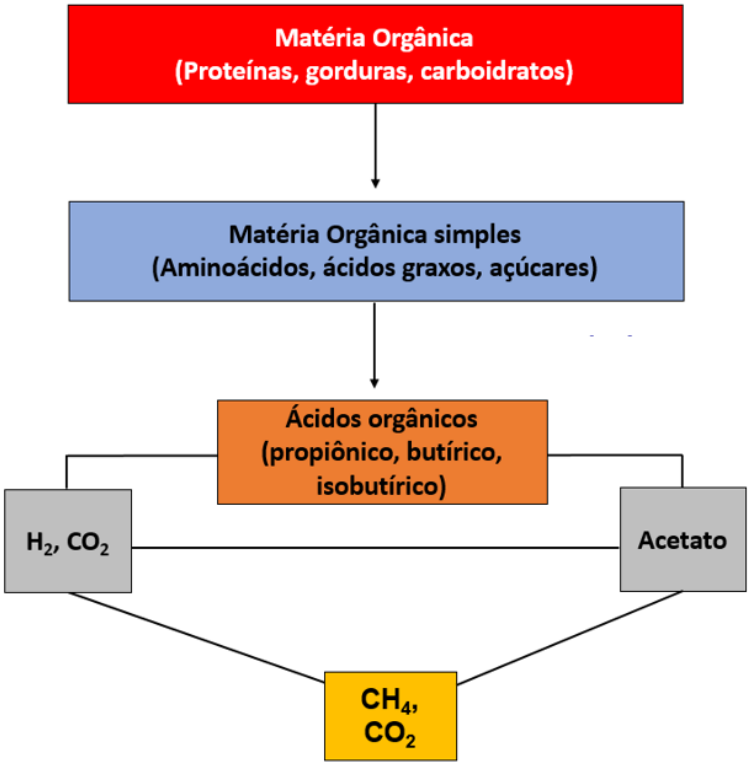

Figura 1 - Processo de biodigestão anaeróbia

Fonte: Adaptado de Chernicharo, (1997)

5.3 Fatores que interferem a produção de biogás

As populações microbianas precisam estar em condições favoráveis dentro dos reatores para assegurar que o processo ocorra de maneira estável (MOSEY, 1982; RAJESHWARI et al., 2000). Fatores ambientais que influenciam a digestão anaeróbia e afetam taxas de reações química e bioquímica, envolvem principalmente temperatura, disponibilidade de nutrientes, pH e alcalinidade.

A temperatura é um dos fatores mais importantes, pois afeta a velocidade das reações químicas e bioquímicas A variação da temperatura acima ou abaixo da faixa ideal pode acarretar a inibição dos microrganismos, podendo levar até mesmo a danos irreversíveis (FNR, 2010).

A falta de controle de temperatura pode afetar o balanço de produção e consumo de produtos intermediários principalmente ácidos orgânicos voláteis, o crescimento microbiano, em especial o das arqueas metanogênicas, e a taxa de hidrólise de proteínas, lipídios e partículas, diminuindo a eficiência do processo (FORESTI, 1994; SPEECE, 1996).

A disponibilidade de micronutrientes é essencial para o desenvolvimento dos microrganismos. Sendo a deficiência nutricional um dos principais motivos para o baixo desempenho de alguns processos metanogênicos, muitos estudos comprovam que a adição de elementos traços podem estimular a produção de biogás, assim como podem promover a estabilidade do sistema por meio da manutenção dos teores de ácidos voláteis e da alcalinidade (ROMERO-GUIZA et al., 2016b).

As arqueas são os microrganismos mais sensíveis da comunidade, e por isso, são as primeiras a serem afetadas pelas condições ambientais, podendo afetar todo o sistema. Quando as acetoclásticas apresentam baixa atividade, tem-se o acúmulo de ácido acético. Quando as hidrogenotróficas se encontram em condições desfavoráveis elas deixam de consumir o H_2, o qual se acumula no sistema (MOSEY, 1982; MADIGAN et al., 2011).

Um dos principais indicadores de desiquilíbrio do sistema é a produção de ácidos. Pelo processo de digestão anaeróbia gerar ácidos orgânicos, é importante fornecer alcalinidade suficiente ao sistema para manter o pH na faixa ótima (6,5-8,2). Os principais substratos utilizados no processo de digestão anaeróbia apresentam em sua composição proteínas, que liberam amônia e sais de ácidos orgânicos fracos quando hidrolisadas, devido isso, a alcalinidade é gerada durante o processo (FORESTI, 1994). O monitoramento da alcalinidade em reatores anaeróbios é mais eficiente que o monitoramento do pH, principalmente porque a alcalinidade é expressa em escala linear, enquanto a escala de pH é logarítmica.

A produção de gás também compõe o conjunto de parâmetros importantes do desempenho do reator juntamente com a concentração de ácidos orgânicos e alcalinidade. É fundamental que haja monitoramento desses parâmetros para que se tenha uma eficiência constante do processo.

Como já descrito anteriormente, vários fatores podem influenciar na capacidade de conversão da matéria orgânica em biogás, sendo um dos principais, o próprio afluente.

A variação de composição da vinhaça pode ser considerada como um dos principais desafios no tratamento por digestão anaeróbia, por se tratar de um resíduo proveniente de outro processo biológico, a fermentação alcoólica. No entanto, seu alto teor em matéria orgânica, que está predominantemente solúvel, faz dela um resíduo de grande potencial para a aplicação na produção de biogás (SILVERIO, 2017).

5.4 Suplementação nutricional na produção de biogás

A falta de alguns nutrientes foi identificada como uma das principais razões pelo fraco desempenho do processo de processo de digestão anaeróbia. Por esse motivo, micro e macronutrientes têm sido fornecidos como suplemento em plantas agroindustriais para a produção de biogás (DEMIREL; SCHERER, 2011; SCHATTAUER et al., 2011; NGES; BJÖRNSSON, 2012). Estudos mostram que a dosagem com micro e macronutrientes estimulam a produção de metano, bem como melhora a estabilidade do processo, como, manter o pH dentro dos valores ideais evitando o acúmulo de ácidos graxos voláteis e / ou fornecendo um nível mínimo de alcalinidade (NGES; BJÖRNSSON, 2012; ZHANG; LEE; JAHNG, 2011; GERARDI, 2003).

Os macronutrientes (por exemplo, P, N e S) são constituintes indispensáveis da biomassa, mas também desempenham um papel necessário como agentes tamponantes, enquanto os micronutrientes (por exemplo, Fe, Ni, Mo, Co, W e Se) são co-fatores essenciais em numerosas reações enzimáticas envolvidas na formação de metano (SCHATTAUER et al., 2011; LO et al., 2012). No entanto, concentrações excessivas de alguns macro e micronutrientes podem levar à inibição do processo digestão anaeróbia (LO et al., 2012).

É essencial para o crescimento e atividade microbiana a disponibilidade de certos nutrientes. Para estimular o metabolismo microbiano anaeróbio, estudos sobre requerimentos nutricionais apontam um importante papel no uso de íons inorgânicos, especialmente metais traços. Segundo Speece (1983), a deficiência de ferro, cobalto e níquel foi a causa de resultados negativos no tratamento de efluentes industriais no passado.

Cada espécie de microrganismo envolvido na decomposição anaeróbia tem sua necessidade própria de micro e macronutrientes. A taxa de crescimento e a atividade das diversas populações estão relacionadas à concentração e a disponibilidade desses nutrientes. Considerando que existe uma grande diversidade de cultura, cada uma com sua capacidade adaptativa, os limites máximo e mínimo de concentrações típicos de cada espécie são difíceis de definir. Um dos pré-requisitos para a estabilidade do processo é a proporção adequada entre macro e micronutrientes (SEYFRIED; WEILAND, 1990).

A disponibilidade de micronutrientes é essencial para a sobrevivência dos microrganismos. A demanda de micronutrientes é geralmente atendida na maioria das usinas de biogás agrícolas, através do substrato utilizado, porém ocorre uma carência de elementos traços. Por isso, a concentração dos micronutrientes no reator é um valor referencial de importância decisiva (LINDORFER; BRAUN; KIRCHMEYR, 2006; BISCHOFF, 2009).

O ferro, o níquel e o cobalto são os micronutrientes mais estudados no processo de digestão anaeróbia por serem fundamentais para a via acetoclástica do processo. A deficiência de Fe e Ni se mostra como fator importante para o acúmulo de ácidos voláteis e consequente acidificação do meio.

O ferro se destaca como um dos aditivos mais utilizados para melhorar o processo de digestão anaeróbia devido à sua condutividade e baixo preço (KATO; HASHIMOTO; WATANABE, 2012; ZHOU et al., 2014; YAMADA et. al., 2014).. Além de atuar como um cofator em diversos processos enzimáticos apresenta capacidade de oxidação e redução, também possibilita a formação de um ambiente favorável para a digestão anaeróbia (ROMERO-GUIZA et al., 2016b).

As vantagens do uso ferro com aditivo para a produção do biogás incluem a capacidade de diminuir o potencial oxidativo-redutor (ORP) dos meios de digestão anaeróbica e, portanto, proporcionar um ambiente mais favorável para a digestão anaeróbica (LIU et al., 2011), atua como co-fator estimulando as atividades de várias enzimas importantes, como a piruvato-ferrodoxina-oxidoredutase, que contém aglomerados de Fe-S e desempenha um papel fundamental na fermentação (LIU et al., 2012).

No reator, os micronutrientes podem se combinar com fosfatos, sulfetos e carbonatos livres, formando ligações de baixa solubilidade, o que os torna indisponíveis para os microrganismos. Por essa razão, a análise da concentração dos micronutrientes na massa de fermentação não é suficiente para determinar com certeza a disponibilidade dos microelementos. Somente é determinada a concentração total. Assim, o processo deve ser alimentado com quantidades de micronutrientes maiores do que as que seriam necessárias

para meramente compensar uma concentração deficiente. A determinação da carência deve sempre considerar as concentrações dos micronutrientes em todos os substratos (FNR, 2010).

Embora a suplementação seja importante nos processos metabólicos dos microrganismos que atuam no processo de digestão anaeróbia, é difícil estimar a exata demanda por micronutrientes (CHERNICHARO, 2007), pois em altas concentrações, muitos íons metálicos podem atuar como inibidores, bloqueando a função enzimática. Devido isso, é importante que antes da adição de micronutrientes primeiro deve-se determinar o seu teor no biodigestor a fim de evitar a superdosagem (FERMOSO et al., 2009).

6. MATERIAL E MÉTODOS

6.1 Instalações Experimentais

O estudo foi realizado nas dependências do Departamento de Agroindústria Alimentos e Nutrição – Setor de Açúcar e Álcool da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" (ESALQ) da Universidade de São Paulo (USP).

6.2 Vinhaça

O material utilizado foi adquirido em uma usina da região de Piracicaba. Esse material inicialmente foi reconcentrado por evaporação até aproximadamente 50º Brix, em equipamento instalado no laboratório para facilitar o armazenamento. O material concentrado foi armazenado em *freezer* sob temperatura de -10º C.

Antes de ser utilizada no processo de biodigestão, a vinhaça foi diluída em água filtrada de modo que se ajustasse a concentração para 3,2 % de sólidos solúveis. Esses valores foram determinados por refratometria em ºBrix utilizando um refratômetro portátil, de leitura automática, com correção automática da temperatura, com valor final expresso sob 20º C. Após a diluição, o pH da vinhaça era corrigido até a faixa ideal de 6,8 – 7,2 com adição de bicarbonato de sódio ($NaHCO_3$).

6.3 Inóculo

O lodo metanogênico utilizado nos ensaios foi obtido de uma unidade industrial produtora de biogás na região de Pradópolis/SP. Trata-se de um lodo ativo granular de um reator anaeróbio termofílico em operação. O volume de inóculo utilizado foi correspondente à metade do volume do reator.

O inóculo não necessitou de adaptação para start no presente estudo, uma vez que já havia passado por processo de adaptação em projetos paralelos, estando assim apto para aplicação no experimento.

6.4 Unidade experimental

Foram utilizados dois reatores do tipo UASB (*Up-flow Anaerobic Sludge Blanket*), construídos de forma similar, em aço inox, com volume total de 50 L e volume reacional de 34,5 L (1500 mm de altura x 200mm de diâmetro). Estes reatores contam com separadores

trifásicos e saída para o biogás em sua parte superior. Para controle da temperatura de 38° C (± 2 °C), os reatores contavam com sistema de controle de temperatura, por circulação de água aquecida gerada por uma caldeira, através de camisa de revestimento do biorreator, com acionamento da circulação da água automatizado por PT-100, 3 fios, com conversor para 4 a 20 mA, controlado porcontrolador lógico programado (CLP).

Os reatores contavam com cinco pontos para a tomada de amostras ao longo do corpo reacional, uma entrada para alimentação na parte inferior e duas saídas para efluente na parte superior (Figura 2).

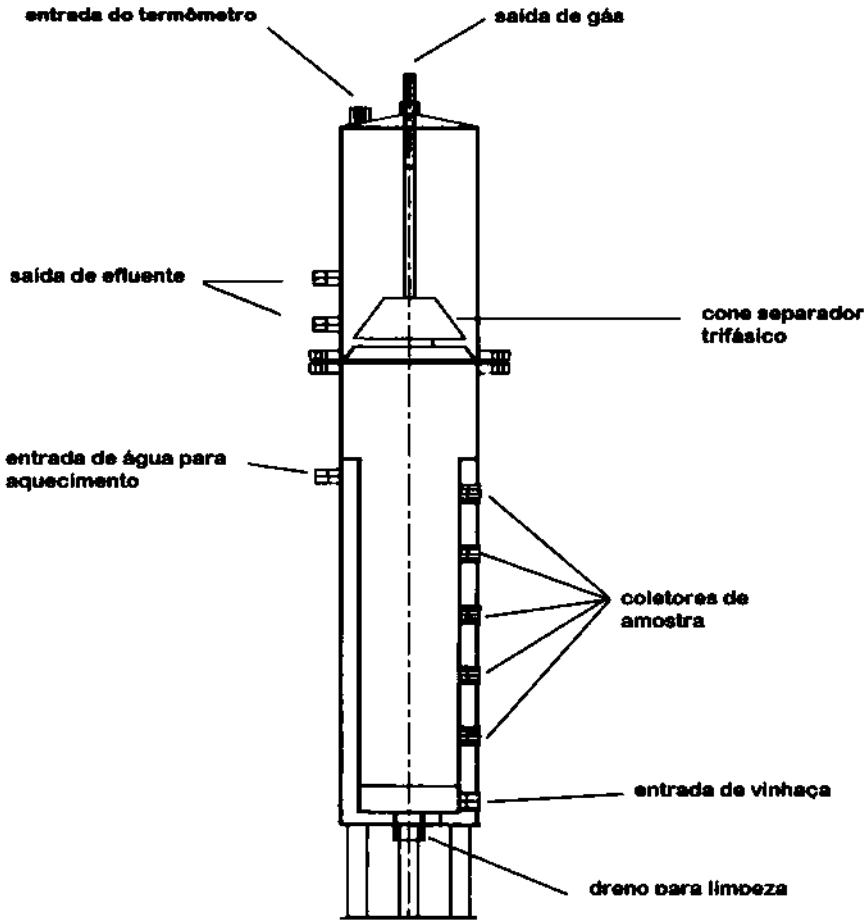

Figura 2 - Representação esquemática do biorreator, Calegari 2017

6.5 Procedimento Experimental

A condução dos ensaios de biodigestão ocorreu de forma continua, durante 63 dias com alimentação em batelada, cada reator foi alimentado diariamente com 5 L de vinhaça.

Foram testadas duas dosagens de sulfato de ferro ($FeSO_4$), 500 mg L^{-1} (T2) e 1000 mg L^{-1}(T3), além de um tratamento controle, sem a adição do sulfato de ferro (T1), com 3 repetições cada. Dessa forma, o estudo foi dividido em 5 ensaios de forma aleatória (Tabela 1). Cada ensaio teve a duração de 7 dias, após o fim desse período, os reatores foram alimentados somente com vinhaça no decorrer de 7 dias a fim de retirar os resquícios de sulfato de ferro, conforme o tratamento da fase anterior para posteriormente dar início ao próximo ensaio.

Tabela 1 - Descrição dos tratamentos e sequência de realização dos ensaios de biodigestão anaeróbia.

BIORREATORES	ENSAIOS				
	1	2	3	4	5
REATOR 1 (R1)	T1R1	T2R3	T3R1	T3R3	T1R2
REATOR 2 (R2)	T2R1	T3R2	T2R2	T1R3	-

T1 – controle; T2 –500 mg L^{-1} $FeSO_4$; T3 – 1000 mg L^{-1} $FeSO_4$; R – repetições

6.6 Determinações físico-químicas

A avaliação do desempenho do processo de biodigestão anaeróbia foi baseada no monitoramento do afluente, efluentes e do biogás gerado em cada reator (Tabela 2). Os tratamentos tiveram a duração de 7 dias, e os parâmetros de pH, DQO, alcalinidade e acidez volátil foram avaliados no efluente em duas etapas, 2º e 6º dia do experimento respectivamente.

Tabela 2 - Parâmetros, determinações e frequências

Parâmetros e determinações	Frequência	Referências
pH	2º e 6 º dia (efluente)	APHA, 2012
DQO	2º e 6 º dia (efluente)	APHA, 2012
Alcalinidade	2º e 6 º dia (efluente)	JENKINS et al., 1983
Acidez volátil	2º e 6 º dia (efluente)	DILALLO &ALBERTSON,1961
Teor de cátions	Afluente, 2º e 6 º dia (efluente)	KRUG, 2016
Teor de ânions	Afluente, 2º e 6 º dia (efluente)	EITH et al., 2006
Teor de ácidos orgânicos	Afluente, 2º e 6 º dia (efluente)	EITH et al., 2006
Biogás		
Volume	Diariamente	Wet tip gas meter®
Composição	2º e 6 º dia	SHIMADZU, 2014

6.6.1 Monitoramento do pH

Foi utilizado um pHmetro da marca Phox P50, para analisar o pH dos afluentes e dos efluentes seguindo recomendações do Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater (APHA; AWWA & WEF, 2012). A medição de pH foi feita para as vinhaças preparadas para afluente dos reatores, e também para o efluente na forma bruta, em seguida da coleta no reator.

6.6.2 Demanda Química de Oxigênio (DQO)

A DQO foi determinada pelo método colorimétrico, de acordo com Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater (APHA, 2012), utilizando duas soluções, sendo uma de $K2Cr_2O_7$ (2%) + $HgSO_4$ (3%) acidificada com H_2SO_4 (solução A) e outra de Ag_2SO_4 (1%) em H_2SO_4 (solução B). Em 1 tubo com tampa (rosca) foi adicionado 1,20 mL da solução A + 2,80 mL da solução B + 2 mL da amostra diluída. Para caracterizar a vinhaça afluente foi necessário dilui-lá 50 vezes, já para vinhaça efluente de ambos os reatores uma diluição de 25 vezes.

Posteriormente os tubos foram levados para um termo-reator, marca Hanna®, modelo HI 83099, durante duas horas sob 150 ºC. Após o término da digestão foi necessário esperar a temperatura baixar até 120 ºC para retirar os tubos e coloca-lós em um ambiente escuro até esfriar completemente. Após o resfriamento foi realizada a leitura da cor, em um leitor de COD and Multiparameter Photometer da marca Hanna Instruments®.

A eficiência (E) de DQO foi determinada pela equação 1 (COLARES; SANDRI, 2013):

$$E = \left(\frac{DQO_{afluente} - DQO_{efluente}}{DQO_{afluente}} \right) * 100 \qquad \text{(Equação 1)}$$

6.6.3 Alcalinidade total, parcial, intermediária e relação AI/AP

Com a finalidade de monitorar o desempenho dos reatores foram analisados os seguintes parâmetros: Alcalinidade Total (AT), Alcalinidade Parcial (AP), Alcalinidade Intermediária (AI) e a relação entre Alcalinidade Intermediária e Alcalinidade Parcial (AI/AP) dos efluentes de ambos os reatores. Essas análises foram realizadas segundo o método titulométrico com detecção potenciométrica descritos por JENKINS et al. (1983). Os

resultados obtidos foram expressos em miligramas de carbonato de cálcio por litro (mg $CaCO3.L^{-1}$).

As determinações de alcalinidade foram realizadas em todos os ensaios. Para tal, foram utilizados 50 mL da vinhaça efluente. Em seguida, com auxílio de um pHmetro e um agitador magnético foi realizada a titulação, utilizando ácido sulfúrico padronizado 0,0749 N, até atingir o pH 5,75 (alcalinidade parcial - AP), anotando o volume utilizado. Em seguida continuou-se a titulação até atingir o pH 4,30 (alcalinidade intermediária - AI) anotando o volume de H_2SO_4 gasto na titulação. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas sob 336 *g* durante 10 minutos. Por fim, foram utilizados 50 mL do sobrenadante, sendo necessário o ajusto do pH para aproximadamente 2,8. Para então ser utilizado no parâmetro de acidez volátil.

EQUAÇÃO

$AP = (V_{titulado} * N_{H2SO4} * 50\ 000) / V_{amostra}$

$AI = (V_{titulado} * N_{H2SO4} * 50\ 000) / V_{amostra}$

$AT = (AP + AI * N_{H2SO4} * 50\ 000) / V_{amostra}$

AI/AP

Onde,

$V_{titulado}$ = Volume de H_2SO_4 titulado

N_{H2SO4} = Normalidae de H_2SO_4 utilizado

$V_{amostra}$ = volume de amostra

6.6.4 Ácidos voláteis totais

O teor de ácidos voláteis totais (AVT) foi determinado como parâmetro de controle do processo de produção do biogas noss reatores. Para tal, foi utilizado o método titulométrico descrito por Dilallo e Albertson (1961), obtendo resultados expressos em mg ácido acético por litro ($CH_3COOH\ L^{-1}$).

Para determinação da acidez volátil dos reatores utilizou-se a amostra obtida na etapa de alcalinidade a qual baixou o pH para menor que 3. Posteriormente, a amostra no béquer foi coberta com vidro de relógio e levada para ser aquecida, sendo necessário contar 3 minutos após a fervura. Em seguida, esperou-se a amostra esfriar e com auxílio de um pHmetro e um agitador magnético, titulou-se a solução de hidróxido de sódio 0,007 N até o pH 4,0 desprezou esse volume e continuou a titulação até o pH 7,0 anotando o volume gasto.

Cálculo de acidez volátil:

$$\text{Ácidos graxos voláteis (AGV mg L}^{-1}) = (V_{titulado} * N_{NaOH} * 60\,000 * 1{,}5) / V_{amostra}$$

Onde,

$V_{titulado}$ = Volume de NaOH titulado

N_{NaOH} = Normalidade de NaOH utilizado

$V_{amostra}$ = volume de amostra

6.6.5 Teor de ácidos orgânicos

Foram analisadas as concentraçãoes de ácido acético, ácido butírico e ácido succínico para a caracterização da vinhaça afluente e efluente. Primeiramente, realizou-se a centrifugação de 14 mL da amostra sob 860 *g*, durante 10 minutos, posteriosmente foram diluídas 5 vezes e filtradas em unidades filtrantes de 0,45 μm.

Foi utilizado um cromatógrafo de íons, modelo IC 930 Compact, marca*Metrohm*®, equipado com coluna Metrosep OrganicAcid e detector de condutividade. O Sistema cromatográfico utilizado foi: solução eluente de ácido sulfúrico (H_2SO_4) 0,5 mM + 15 % de acetona, com fluxo de 0,5 mL min^{-1}, sob 25 ºC e 20 µL de amostra, juntamente com uma solução de regeneração do supressor químico de 20 mM de Cloreto de Lítio (LiCL). O tempo da corrida cromatográfica foi de 27 minutos.

6.6.6 Teor de cátions

Foram tranferidos 2 mL do material para os frascos de digestão. Em seguida, foram adicionados 6 mL de 2,8 mol L^{-1} HNO_3 e 2 mL de 30 % m m^{-1} H_2O_2. Os frascos foram fechados, acondicionados no suporte apropriado para 15 amostras e colocadas na câmara única de reação com aquecimento assistido por radiação micro-ondas (Ultrawave, Milestone). O sistema foi fechado, pressurizado com Ar (40 bar) e iniciado o programa de aquecimento (Tabela 3). Ao término da digestão, o sistema foi resfriado com uma taxa de despressuarização de 6 bar min^{-1}. Após essa etapa, o sistema foi aberto e as soluções das amostras digeridas foram transferidas para tubos tipo *Falcon* de polietileno de 50 mL e os volumes completados para 15 mL com água deionizada ultrapura.

Após finalizar a digestão da amostra, a determinação de potássio, magnésio, cálcio e ferro na amostra de vinhaça afluente e efluente foram realizadas empregando a técnica de espectrometria de emissão atômica por plasma acoplado indutivamente (do inglês, Inductively

Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry, ICP-OES) utilizando o iCAP 7000 Series da Thermo Scientific. As análises foram realizadas no Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA-USP) no laboratório de Química Analítica.

Tabela 3 - Programa de aquecimento para decomposição da amostra de vinhaça assistida por radiação micro-ondas

Etapa	t (min)	E (W)	T1 (ºC)	T2 (ºC)	P (bar)
1	00:08:30	800	100	40	150.0
2	00:05:00	800	100	40	150.0
3	00:08:30	800	180	60	150.0
4	00:10:00	1000	180	60	150.0

6.6.7 Teor de ânions

As determinações das concentrações de cloreto, fosfato e sulfato presentes no afluente e efluentes foram realizadas por cromatografia iônica seguindo-se a metodologia descrita pelo fabricante (EITH, et al., 2006). Primeiramente, realizou-se a centrifugação de 14 mL da amostra sob 860 *g*, durante 10 minutos, posteriormente foram diluídas 5 vezes e filtradas em unidades filtrantes de 0,45 μm.

Para as análises foi utilizado um cromatógrafo de íons modelo IC 930 Compact da *Metrohm*®, equipado com a coluna Metrosep A Supp 5 250/4.0, à 25 ºC. O sistema cromatográfico utilizado foi composto por uma solução de carbonato de sódio 3,2 mM e bicarbonate de sódio 1,0 mM sob fluxo de 0,7 mL min^{-1}, sendo injetado 20 μL de amostra. Juntamente com uma solução de supressão, composta por ácido sulfúrico 100 mM.A. O tempo da corrida cromatográfica foi 28 minutos.

6.6.8 Volume do biogás

O volume de biogás foi medido, em tempo real, durante todos os ensaios, com auxílio do medidor de gás úmido *Archaea Press (Wet Tip Gas Meter*)®, que possui um mecanismo basculante em uma câmara de tombamento com dois compartimentos separados, onde o gás é recolhido. A cada 100 mL (± 3 mL) é realizado um tombamento e registrado o volume em um contador. Foi necessária calibração e limpeza do medidor a cada 15 dias. Além disso, ao passar o gás pelo medidor, foi emitido um sinal para um controlador lógico programável (CLP) captado por um sistema de supervisão e aquisição de dados (SCADA), com o qual foi

possível adquirir os dados da produção de biogás uma vez por cada segundo. No entanto, para facilitar a tabulação, os dados foram considerados resultados médios obtidos a cada 60 minutos (1 h).

Figura 3 –Procedimento para quantificação de biogás

6.6.9 Composição do biogás

A qualidade do biogás foi analisada através da determinação da concentração de metano no biogás formado no processo de digestão anaeróbia. Essa análise foi realizada por cromatografia de fase gasosa, com o auxílio do cromatógrafo gasoso modelo CG-2014 da *Shimadzu*®, equipado com detector de ionização em chamas "Flame Ionization Detector". Seguindo as recomendações do fabricante (SHIMADZU, 2014) para a realização das análise: Nitrogênio (N_2) como gás de arraste, com fluxo constante de 10,0 mL min^{-1}. Coluna SH-Rt-Q-BOND, sob temperatura de 150° C e fluxo de 2,00 mL min^{-1}. Temperatura do injetor e do detector de 250 °C. E a aquisição dos dados através do *software GC Solution*®. Para realizar a análise, foram coletadas 60 mL do biogás diretamente retiradas do bioreator utilizando seringa (INJEX) de rosca acoplada a torneira de 3 vias Luer Lock no intuito de aprisionar o gás e posteriormente foram injetados no cromatógrafo gasoso. As análises foram realizadas em triplicata.

6.7 Delineamento Experimental e Análise Estatística

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado com dados longitudinais, sendo 3 tratamentos com 3 repetições e duas etapas, 2º e 6º dia. Os resultados obtidos foram submetidos ao teste de F da análise de variância e posteriormente ao teste de Tukey, ao nível de 5 % de significância com auxílio do software SAS 9.8® (SAS INSTITUTE, 1985).

7 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na Tabela 3 estão apresentados os resultados da caracterização da vinhaça, substrato empregado no estudo. Em seguida, os resultados e a interpretação da avaliação do desempenho dos reatores submetidos ao processo de biodigestão anaeróbia da vinhaça.

7.1 Caracterização do substrato

O teor médio de sólidos solúveis totais encontrado na vinhaça utilizada nos reatores foi de 3,2 ºBrix. Estes resultados corroboram com aqueles apresentados por Carvalho (2010), que cita a concentração de sólidos solúveis totais da vinhaça na indústria sucroenergética variando entre 3 e 5º Brix.

O pH baixo, entre 3,5 e 5, é uma característica da vinhaça (CHRISTOFOLETTI, et al., 2013), no entanto quando aplicado ao tratamento anaeróbio é necessário que haja a correção do pH para uma faixa ideal de trabalho de 6,8 a 7,2 (CHERNICHARO, 2007).

A matéria orgânica da vinhaça, expressa na forma de DQO, apresenta alto teor em sua composição, a qual varia entre 20 000 e 35 000 mg L^{-1}. Por isso, a DQO estabelecida para alimentar os reatores foi de 29744,52 mg L^{-1}, concentração semelhante àquela encontrada na vinhaça *in natura*, conforme a literatura.

Os ácidos orgânicos encontrados na vinhaça são provenientes do processo fermentativo realizado pelas leveduras. O acético é de suma importância para o processo de metanogênese, visto que é o substrato direto para as arqueas metanogênicas acetoclásticas, as quais são dirigentes de cerca de 70 % da produção de metano em reatores anaeérobios (MCCARTY, 1994; SPEECE, 1996; LONGO, 2015). Ademais, outros ácidos orgânicos encontrados na vinhaça também são de interesse, pois podem servir de substrato para as bactérias envolvidas nas demais etapas do processo de biodigestão anaeróbia.

A concentração de ácido acético encontrada na vinhaça foi de 456,90 (±5,30) mg L^{-1}. Este valor foi menor do que o encontrado em outros trabalhos. Calegari (2017) caracterizou sua vinhaça, proviente de processo de produção de etanol, encontrando teor médio de 7644,66 (±2493,99) mg L^{-1} de ácido acético. Isso porque a composição da vinhaça varia de acordo com o clima, composição do mosto, teor alcoólico (PAOLIELLO, 2006).

A concentração de acidez volátil total (AVT) encontrada na vinhaça utilizada no estudo foi de 3577,64 mg CH_3COOH L^{-1}. Esses ácidos também servem como substrato para os microrganismos envolvidos no processo de biodigestão aneróbia. No trabalho de Calegari

(2017), o resultado obtido em relação aos teores de AVT também foi maior (8483,95 mg CH_3COOH L^{-1}) do que encontrado no material utilizado no presente estudo.

No tocante aos resultados dos teores de ânions, o fosfato foi encontrado em menor concentração, 69,31 (±0,37) mg L^{-1}. Christofoletti et al. (2013), reportaram que a concentração média é de 190 mg L^{-1} para a vinhaça proveniente da cana-de-açúcar.

O ácido succínico é proveniente do processo de fermentação alcoólica e está relacionado ao metabolismo da levedura (ALVES, 1994). A concentração encontrada desse ácido em questão foi de 1274, 95 (±35,61) mg L^{-1}, valor próximo ao encontrado por Calegari (2017), 10584, 52 (±897,14) mg L^{-1}.

A concentração do sulfato se dá pelo uso do ácido sulfúrico no tratamento ácidos utilizado processo de fermentação alcoólica, para reduzir a contaminação microbiana (BARTH et al., 2014). A vinhaça afluente empregada nesse estudo expressou a concentração de 3896,83 (±8,80) mg L^{-1}. Lens et al. (1998) relataram que a concentração varia entre 500 e 3000 mg SO_4^{2-} L^{-1}.

O sulfato no processo de biodigestão anaeróbia pode proporcionar o crescimento de bactérias redutoras de sulfato (BRS) que são responsáveis pela produção de sulfeto de hidrogênio (H_2S), um agente altamente corrosivo, tóxico e com odor desagradável. Além disso, as BRS utilizam o propionato e o H2, que são utilizados por bactérias acetogênicas e arqueas metanogênicas hidrogenotróficas, respectivamente, comprometendo o consórcio microbiano (MUYZER; STAMS, 2008).

Os cátions podem ser avaliados como tóxico ou estimulatório ao processo de biodigestão anaeróbia, isso depende da concentração dos sais e do grau de adaptação da biomassa (MCCARTY, 1964; OMIL et al., 1996; LONGO, 2015). Na vinhaça encontra-se teores de nutrientes, como por exemplo, o potássio, o mais abundade na vinhaça. Foi observado que a concentração desse elemento obtido na vinhaça afluente foi de 3615,08 (±20,52) mg L^{-1}. Segundo Prada e colaboradores (1998), a concentração de potássio na vinhaça obtida a partir da fermentação utilizando melaço varia entre 3.740–7830 mg $L-^{1}$. Silverio (2017), em seu trabalho encontrou a concentração de 8618,9 mg $L-^{1}$. E os resultados encontrados para magnésio, cálcio e ferro foram 409,24 (±3,35), 699,39 (±16,11) e 11,11 (±0,16), respectivamente.

Tabela 4 - Caracterização físico-química da vinhaça utilizada no experimento.

Parâmetros	Substrato
Sólidos solúveis (º Brix)	3,20
pH	5,08
Alcalinidade total (mg $CaCO_3$ L^{-1})	97,37
Ácidos voláteis totais (mg CH_3COOH L^{-1})	3577,64
DQO (mg L^{-1})	29744,52 ± 582,73
Ácido succínico (mg L^{-1})	1274, 95 ± 35,61
Ácido acético (mg L^{-1})	456,90 ± 5,30
Ácido butírico (mg L^{-1})	1351,93 ± 6,26
Cloreto (mg L^{-1})	2625,45 ± 4,58
Fosfato (mg L^{-1})	69,31 ± 0,37
Sulfato (mg L^{-1})	3896,83 ± 8,80
Magnésio (mg L^{-1})	409,25 ± 3,35
Potássio (mg L^{-1})	3615,08 ± 20,52
Cálcio (mg L^{-1})	699,39 ± 16,11
Ferro (mg L^{-1})	11,11 ± 0,16

7.2 Produção de biogás e remoção de DQO

A produção de biogás é um dos parâmetros utilizados para verificar o desempenho do processo de biodigestão anaeróbia. Durante o período operacional, a média de todos os tratamentos, considerando as repetições foram: 68,23 (±2,98) L, 68,06 (±0,84) L e 66,80 (±0,81) L, para T1, T2 e T3, respectivamente.

No entanto, como citado no item 6.6, cada tratamento teve a duração de 7 dias e contou com 3 repetições. A Tabela 5 demonstra a média da produção de biogás de cada tratamento, em cada dia do experimento. Observa-se que não houve diferença significativa entre os tratamentos. Porém, T3 apresentou diferença signifivativa entre os dias de operação, constata-se também que a produção foi aumentando gradualmente a cada dia, possivelmente, se o reator fosse operado por mais tempo, observaríamos melhor o comportamento nas variações da produção.

As variações nas concentrações de biogás são resultantes das mudanças nos diversos parâmetros do processo, ocorridas durante o tratamento. Assim, deve-se considerar a composição do substrato, pois existem alguns compostos específicos que melhor atuam no processo de metanogênese. Contudo, somente a quantidade de biogás produzido não condiz

sobre a eficiência do processo, sendo imprescindível, também, a avaliação da remoção da carga orgânica, além do conhecimento da qualidade deste biogás produzido.

Tabela 5: Produção de biogás durante o período dos ensaios, com três repetições de 7 dias de operação cada ensaio

Tratamentos	Biogás (L)							
	DIA 1	DIA 2	DIA 3	DIA 4	DIA 5	DIA 6	DIA 7	CV (%)
T1	64,40 aA	66,20 Aa	69,43 aA	67,73 aA	70,27 aA	69,67 aA	69,87 aA	7,69
T2	62,40 aA	63,77 aA	66,37 aA	71,93 aA	70,87 aA	68,27 aA	75,50 aA	6,7
T3	63,30 aA	63,77 aA	64,53 aAB	67,83 aAB	67,60 aAB	68,37 aAB	72,20 aB	4,13
CV (%)	4,99	4,72	6,53	4,47	4,13	6,19	10,56	

Médias seguidas de letras minúsculas diferentes na mesma coluna diferem estatisticamente ente si através do teste de Tukey a 5 % de nível de significância; Médias seguidas de letras maiúsculas na mesma linha diferem estatisticamente ente si através do teste de de Tukey a 5 % de nível de significância; T1: Controle; T2 500 mg L^{-1} de $FeSO_4$; T3: 1000 mg L^{-1} $FeSO_4$; CV: Coeficiente de variação.

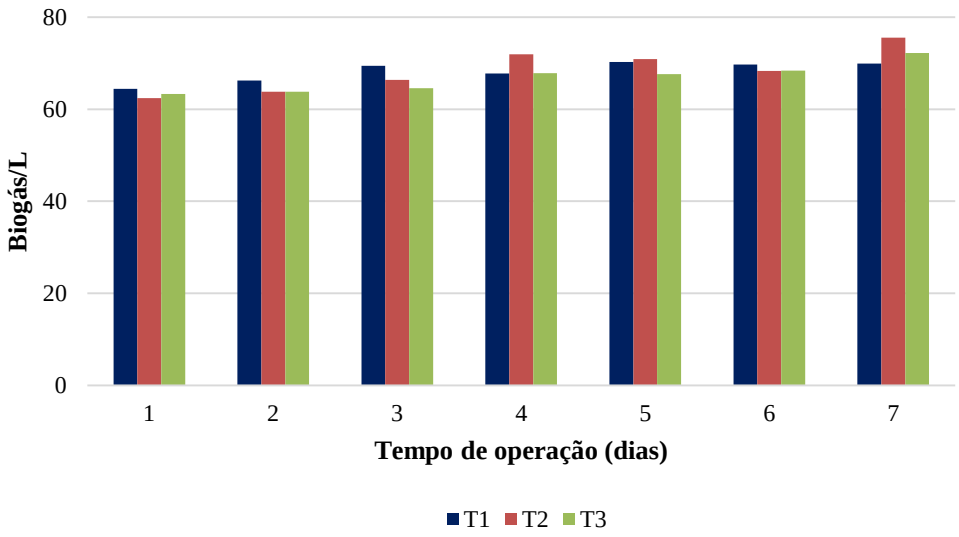

Figura 4 - Produção diária de biogás em todos os tratamentos: T1 (controle); T2 (500 mg L^{-1} $FeSO_4$) e T3 (1000 mg L^{-1} $FeSO_4$).

A DQO expressa em matéria orgânica é um parâmetro importante de monitoramento no processo de biodigestão anaeróbia, que reflete o consumo da carga orgânica transformada em biogás. Os microrganismos, porém, não consomem somente essa matéria orgânica, eles também utilizam as outras substâncias presentes no substrato.

A avaliação da DQO ocorreu nos 2º e 6º dia de cada ensaio. A carga orgânica inicial, na vinhaça afluente, utilizada em todos os tratamentos foi de 29744,52 (±582,73) mg L^{-1}.

O tratamento controle (T1) apresentou a DQO média (2º e 6º dia) do efluente de 10534,89 (±400,25) mg L^{-1} correspondendo a remoção de 64,59 % de matéria orgânica. Em

contrapartida o T2 (500 mg L^{-1} de $FeSO_4$) expressou 8892,53 (±491,28) mg L^{-1} de DQO e 70,11 % de remoção. Já o T3 (1000 mg L^{-1} de $FeSO_4$) apontou 9324,07 (± 373,10) mg L^{-1} de DQO e uma remoção de 68,66 % da matéria orgânica (Tabela 6).

A vinhaça submetida ao processo de digestão anaeróbia, com a suplementação de 500 mg L^{-1} de $FeSO_4$ (T2) apresentou a maior porcentagem de remoção de carga orgânica (70,11 %). Essa diferença foi 5,52 % maior do que o tratamento controle. Contudo, foi apenas 1,45 % maior do que a capacidade de remoção da DQO quando comparado com a vinhaça do Tratamento T3, com 1000 mg L^{-1} de $FeSO_4$. Porém esses resultados não apresentaram diferença estatísticamente significativa ao nível de significância de 5% através do teste de Tukey (Tabela 6).

Espinosa et al. (1995), observaram o aumento na remoção de DQO de 44 % para 58 % após a suplementação do afluente com a carga orgânica volumétrica de 7,4 g DQOtotal L^{-1} d^{-1} juntamente com 100 mg. L^{-1} de Ferro (Fe). Porém, no presente estudo não foram observadas diferenças significas na remoção da DQO da vinhaça submetidas aos tratamentos T1, T2 e T3. Isso demonstra que a suplementação com $FeSO_4$ não promoveu aumento da remoção da DQO. A concentração utilizada por Espinosa et al. (1995) foi menor do que a utilizada nesse estudo, provavelmente a dose de suplementação deveria ser menor que 500 mg L^{-1}. Além disso, a presença de sulfato na solução pode agir como um inibidor indireto, pois estimulam o crescimento de bactérias que desfavorecem a metanogênese.

Tabela 6 - Concentração e remoção da DQO no 2º e 6º dia de cada tratamento

Tratamentos	DQO (mg L^{-1} O_2)			Remoção de DQO (%)		
	2º dia	6º dia	CV (%)	2º dia	6º dia	CV (%)
T1	10817,91 aA	10251,87 aA	17,59	63,63 aA	65,54 aA	9,64
T2	8545,31 aA	9240,08 aA	12,45	71,78 aA	68,93 aA	5,96
T3	9060,16 aA	9587,80 aA	9,79	69,54 aA	67,77 aA	4,47
CV (%)	18,78	8,69		8,77	4,2	

Médias seguidas de letras minúsculas diferentes na mesma coluna e médias seguidas de letras maiúsculas diferentes na mesma linha diferem estatisticamente ente si através do teste de Tukey a 5 % de nível de significância; T1: Controle; T2 500 mg L^{-1} de $FeSO_4$; T3: 1000 mg L^{-1} $FeSO_4$; CV: Coeficiente de variação.

Outro parâmetro importante utilizado para avaliar a processo de biodigestão anaeróbia é a taxa de produção de biogás em relação à remoção de DQO (DQO-biogás). A média da relação da conversão de DQO em biogás obtidas para os tratamentos que receberam a

suplementação com $FeSO_4$ foram idênticas. Comparando com o tratamento sem adição da solução do micronutriente ferro foi observado a diferença de 10,7 % (Tabela 7). O estudo de España-Gamboa e colaboradores (2011), operando com reator de manta de lodo, fluxo ascendente e com 3 L de volume reacional apresentaram resultados de 0,21 $L_{biogás}$ $gDQO_{remov}^{-1}$, utilizando a DQO afluente a 17050 mg L^{-1} com remoção média de 69 % de DQO.

Tabela 7 - Conversão de DQO em biogás

	Conversão de DQO em biogás ($L_{biogás}$ $gDQO_{remov}^{-1}$)				
	média	**DP**	**CV (%)**	**mínimo**	**máximo**
T1	0,28	0,03	10,16	0,26	0,31
T2	0,31	0,02	5,31	0,29	0,33
T3	0,31	0,01	3,90	0,29	0,31

7.3 Teores de ânions

Os ânions têm papel importante no equilíbrio do processo de biodigestão anaeróbia. Nesse estudo, os principais ânions estudados foram: Cloreto, Fosfato e Sulfato. Na Tabela 8, estão manifestados os resultados de ânions obtidos em cada tratamento estudado. Na Figura 5 ilustra a concentração dos ânions cloreto e fosfato, e na Figura 6 a concetração do sulfato.

Tabela 8 - Teores de ânions na vinhaça biodigerida em cada tratamento.

Tratamentos	Cloreto (mg L^{-1})			Fosfato (mg L^{-1})			Sulfato (mg L^{-1})		
	2º dia	**6º dia**	**CV (%)**	**2º dia**	**6º dia**	**CV (%)**	**2º dia**	**6º dia**	**CV (%)**
T1	2655,39 aA	2609,35 aA	1,02	79,7 aA	82,17 aA	7,12	19722,01 aA	19668,89 aA	5,66
T2	2757,06 aA	2716,75 bA	1,01	88 abA	96,92 bB	1,74	21922,16 bA	21258,53 aA	1,88
T3	2697,06 aA	2726,55 bA	1,85	93,73 bA	80,52 aB	1,75	22019,79 bA	20944,71 aA	3,4
CV (%)	1,6	1,06		5	2,93		3,51	4,16	

Médias seguidas de letras minúsculas diferentes na mesma coluna diferem estatisticamente ente si através do teste de Tukey a 5 % de nível de significância; Médias seguidas de letras maiúsculas na mesma linha diferem estatisticamente ente si através do teste de de Tukey a 5 % de nível de significância; T1: Controle; T2 500 mg L^{-1} de $FeSO_4$; T3: 1000 mg L^{-1} $FeSO_4$; CV: Coeficiente de variação.

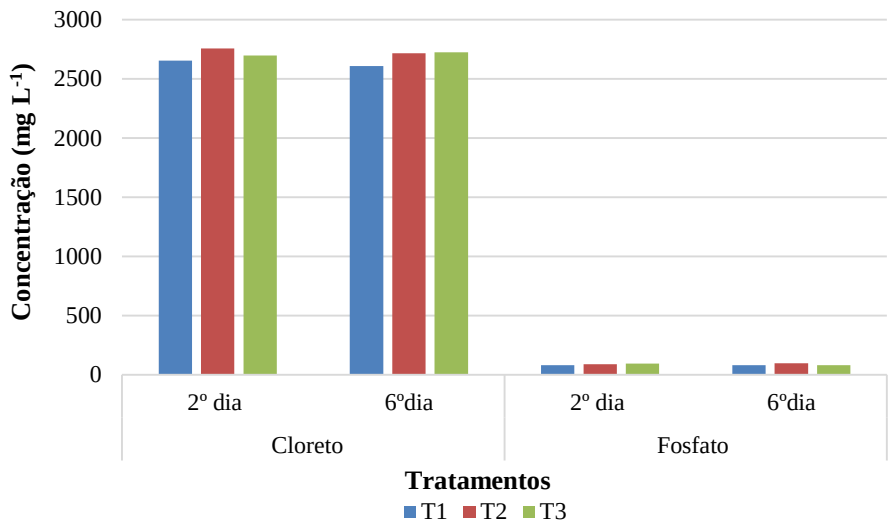

Figura 5 - Resultados das concentrações de cloreto e fosfato no 2º e 6 º dia dos tratamentos: T1 (controle); T2 (500 mg L^{-1} $FeSO_4$) e T3 (1000 mg L^{-1} $FeSO_4$).

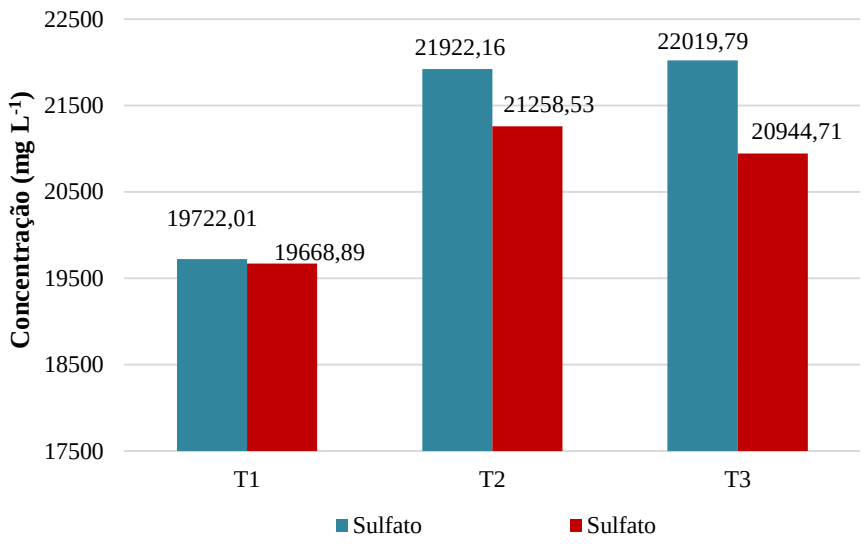

Figura 6 - Resultados das concentrações de sulfato no 2º e 6 º dia dos tratamentos: T1 (controle); T2 (500 mg L^{-1} $FeSO_4$) e T3 (1000 mg L^{-1} $FeSO_4$).

A concentração de cloreto na vinhaça afluente foi de 2625,45 mg L^{-1} e observando os resultados obtidos no processo nota-se que não houve remoção desse elemento. Calegari (2017) em seu estudo apresentou a eficiência de remoção inferior a 27 %. Os resultados da concentração de cloreto mostraram que não houve diferença significativa entre os tratamentos no 2º dia do ensaio, porém, no 6º dia, T2 e T3 diferenciaram do T1, aumentando 4,12 % e 4,49 % respectivamente.

No tocante aos teores de fosfato, no 2º dia de monitoramento o T1 não apresentou diferença significativa em relação ao T2, mas diferenciou-se do T3. Já o T2 não apresentou diferença significativa em relação ao T1 e T3. Porém, no 6º dia, somente o T2 diferenciou-se dos outros tratamentos. Ademais, os T2 e T3 demonstraram entre si uma diferença significativa com relação ao 2º e 6º dia do experimento.

A vinhaça afluente apresentou o teor de fosfato de 69,31 mg L^{-1}. Verificando os tratamentos constatou-se que não se teve uma remoção desse elemento e sim um aumento durante o processo de biodigestão anaeróbia. No T1, 2º dia notou-se aumento de 15 %, enquanto no 6º dia 18,6 %. Para o T2 o aumento foi de 26, 97 % e 39,84 %. Na vinhaça efluente nas condições do T3, foi verificado o aumento de 35,23 % e 16,17 %, 2º e 6º dia respectivamente.

Em relação ao 6º dia, o T1 expressou aumento de 3,1 % em relação ao 2º dia, e o T2 apresentou 10,14 % a mais de fosfato no 6º dia. Em contrapartida, o T3 apresentou uma remoção de 14,1 % de fosfato no 6º dia.

Grande parte do fósforo disponível no substrato é disponibilizado na forma de fosfato ao longo do processo. A produção de fosfato está associada com a geração de alcalinidade durante o processo de degradação da matéria orgânica. Da mesma forma à geração de bicarbonatos, o fosfato tem papel relevante na neutralização à geração de bicarbonatos, sendo importante na neutralização dos ácidos orgânicos produzidos pelas bactérias acidogênicas (DILALLO; ALBERTSON, 1961; SHARMA et al., 2013; WANG et al., 2015).

O sulfato é o composto mais importante a ser monitorado nos processos anaeróbios, pois é capaz de favorecer a população de bactérias redutoras de sulfato (BRS) que competem com as bactérias acetogênicas no consumo do propionato e com as arqueas hidrogenotróficas pelo H_2. Portanto para processos de digestão anaeróbia visando à produção de biogás, a redução da quantidade de sulfato é de maior interesse (ESPAÑA-GAMBOA et al., 2012).

Em relação aos tratamentos, era esperado que T2 e T3 apresentassem diferença significa em relação ao T1 pelo fato da adição de Sulfato de Ferro ($FeSO_4$), no entanto, é notório que apresentaram diferença somente no 2º dia de monitoramento, compreendendo que esse elemento foi mantido e não removido durante o processo.

A concentração de sulfato encontrado na vinhaça afluente foi de 3896,83 (± 8,80) mg L^{-1}. Os resultados obtidos em todos tratamentos mostram o aumento elevado do ânion sulfato durante o processo de biodigestão anaeróbia. Em relação à média dos tratamentos, o T1 expressou o aumento de sulfato de 405,42 %, o T2 454,04 % e o T3 451,28 %.

Quando se objetiva a produção de biogás, quanto maior a concentração de sulfeto, maior a interferência nas rotas de biodegradação da matéria orgânica. Quando um sistema apresenta uma quantidade excessiva de sulfato e matéria orgânica é insuficiente para a redução completa do mesmo, o H_2 disponível é usado pelas bactérias redutoras de sulfato (BRS), afetando então a produção de biogás (ROBINSON; TIEDJE, 1984).

Devido à complexidade e a atuação de numerosas espécies de microrganismos que existem no processo, a presença do sulfato passa a ser utilizado pelas BRS, provocando alterações das rotas metabólicas dos microrganismos envolvidas no processo de biodigestão anaeróbia. Sendo que o sulfato pode agir como um inibidor indireto ao estimular o crescimento das BRS que desfavorecem a metanogênese, pois competem com as arqueas metanogênicas por substratos disponíveis (CHERNICHARO, 2007).

De acordo com Hulshoff Pol et al. (2001), em ambientes onde o sulfato está presente, as BRS irão competir contra o consórcio metanogênico, por substratos comuns como hidrogênio e acetato. Comparadas às metanogênicas, as BRS são muito mais versáteis. Compostos como propionato e butirato, os quais requerem consórcios sintróficos em ambientes metanogênicos, podem ser degradados discretamente por espécies de BRS (LOVLEY; PHILLIPS, 1994).

A competição com as arqueas hidrogenotróficas pelo H_2 pode ser preocupante para o processo, pois as BRS apresentam maiores velocidades de crescimento celular do que as arqueas. Devido em sua composição conter sulfato, constata-se que o elemento utilizado nesse estudo ($FeSO_4$) pode ter sido um interferente no processo, prejudicando a produção de biogás.

7.4 Ácidos orgânicos

Os ácidos orgânicos são substâncias de suma importância no processo de biodigestão anaeróbia. Servem como base para monitoramento assim como para eficiência de produção de biogás. Esses ácidos são produzidos pelas bactérias acidogênicas e disponibilizados como substratos para as bactérias acetogênicas, as quais são responsáveis pela produção do acetato e H_2 que serão consumidos pelas arqueas metanogênicas para a geração do biometano e CO_2.

A matéria orgânica complexa é hidrolisada, fermentada e convertida em ácido propiônico e butírico. Na ocasião que há pouco consumo de H_2 pelas arqueas, a conversão do ácido propiônico e ácido butírico em ácido acético pelas acetogênicas é afetada. Associadamente, a transformação da matéria orgânica em ácido acético gera maior quantidade de H_2 por mol do que a conversão em propionato e butírico. Neste contexto, somando-se a

baixa atividade de arqueas acetoclásticas, o ácido acético disponível é lentamente consumido. Assim, gerando o acúmulo dos ácidos orgânicos em questão sendo o resultado da baixa atividade de bactérias acetogênicas, aqueas hidrogenotróficas e acetoclásticas (MOSEY, 1982).

Nesse estudo foram avaliados os teores de ácidos succínico, acético e butírico, os quais estão descritos na Tabela 9, sendo possível observar o comportamento desses ácidos durante os dias de monitoramento, 2º e 6º dia (Figura 7).

Nota-se que os teores dos ácidos succínico, acético e butírico sofreream diminuição em todos os tratamentos. Não sendo observado acúmulo de nenhum desses ácidos durante o processo de biodigestão anaeróbia. No tocante aos teores de ácido succínico, no início do experimento, o T2 diferenciou-se do T1, e no 6º dia nenhum tratamento apresentou diferença significativa. Ademais, nenhum tratamento apresentou diferença significativa entre si, no 2º e 6º dia do estudo em relação ao ácido succínico.

A concentração de ácido succínico na vinhaça afluente foi de 1274, 95 mg L^{-1}, obtendo a redução da média (2º e 6º dia) de 96,7 %, 95,11 % e 95,9 % para T1, T2 e T3 respectivamente. A Figura 8 está representando a variação dos teores desse ácido em todos os tratamentos.

Tabela 9 - Concentração de ácidos orgânicos (succínico, acético e butírico) no 2º e 6º dia de cada tratamento

Tratamentos	Succínico (mg L^{-1})			Acético (mg L^{-1})			Butírico (mg L^{-1})		
	2º dia	6ºdia	CV (%)	2º dia	6ºdia	CV (%)	2º dia	6ºdia	CV (%)
T1	42,51 aA	42,62 aA	16,75	161,77 aA	262,08 aB	13,22	37,84 aA	38,68 aA	8,44
T2	63,46 bA	61,19 aA	6,05	234,62 aA	325,67 aA	24,89	39,03 aA	46,09 bA	8,45
T3	53,68 abA	51,53 aA	24,78	248,73 aA	262,11 aA	8,57	45, 88 aA	47,07 bA	2,08
CV (%)	14,62	18,93		17,82	18,05		8,53	4,56	

Letras minúsculas diferentes na mesma coluna e maiúsculas na mesma linha diferem estatisticamente ente si através do teste de Tukey a 5 % de nível de significância; T1: Controle; T2 500 mg L^{-1} de $FeSO_4$; T3: 1000 mg L^{-1} $FeSO_4$; CV: Coeficiente de variação.

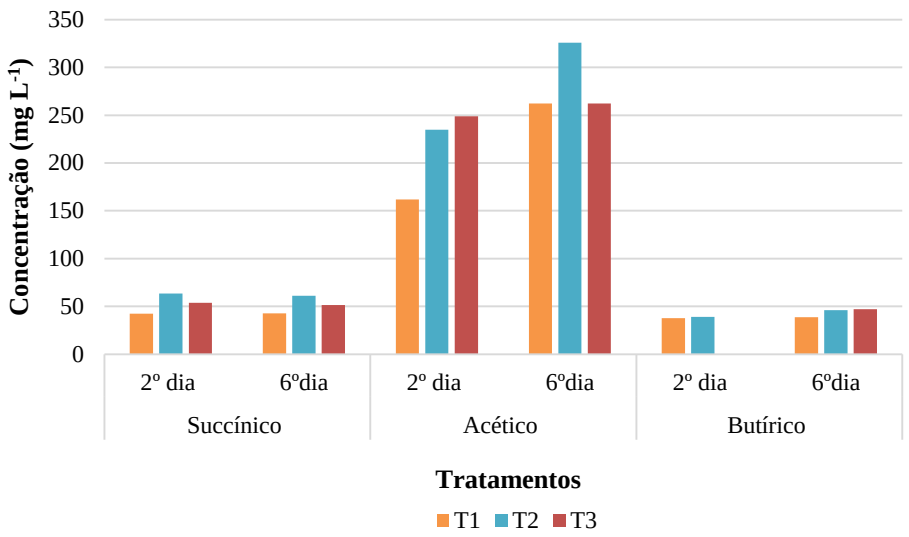

Figura 7 - Acompanhamento da concentração de ácidos orgânicos no 2º e 6º dia dos tratamentos: T1 (controle); T2 (500 mg L^{-1} $FeSO_4$) e T3 (1000 mg L^{-1} $FeSO_4$).

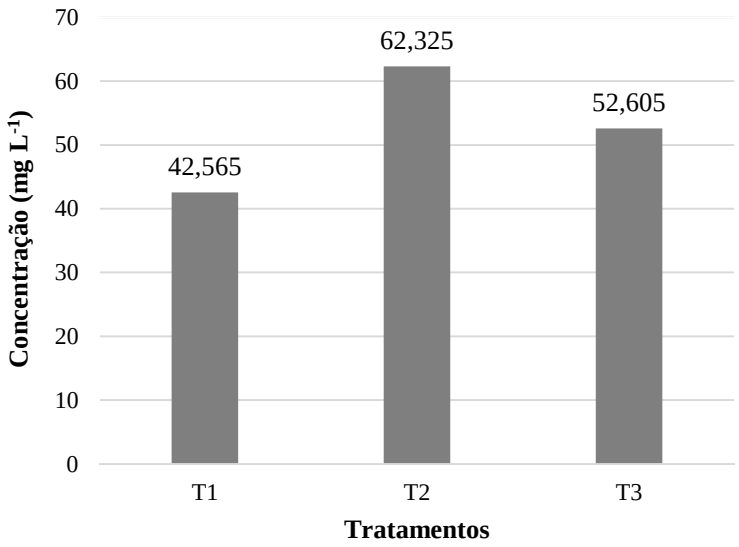

Figura 8 - Concentração de ácido succínico em cada tratamento: T1 (controle); T2 (500 mg L^{-1} $FeSO_4$) e T3 (1000 mg L^{-1} $FeSO_4$).

O ácido acético é produzido pelas bactérias acetogênicas e está diretamente relacionado ao produto final, metano e dióxido de carbono, sendo conhecido como um intermediário importante para o processo de biodigestão anaeróbia (WIJEKOON; VISVANATHAN; ABEYNAYAKA, 2011).

É fundamental salientar que o acúmulo do ácido acético, geralmente está relacionado com a baixa atividade das arqueas metanogênicas. Devido a sua velocidade de crescimento e metabolismo serem mais lentos em relação ao das bactérias, isso é considerado como fator de

vulnerabilidade intrínseca do sistema metanogênico para o equilíbrio de geração e consumo de metabólitos. Para evitar o acúmulo do ácido acético no reator, é necessário que haja o consumo do H_2 e acetato pelas arqueas hidrogenotróficas e acetoclásticas (MOSEY, 1982).

Observou-se que não houve diferença significativa entre os tratamentos em relação a concentração do ácido acético. Porém, o T1 no 6º dia apresentou diferença significativa em relação ao 2º dia, aumentando 62 % a concentração de ácido acético nesse tratamento.

Os resultados dos teores médios de ácido acético foram de 211,93 mg L^{-1} (±70,93), 280,15 (± 64,38) e 255,42 (±9,41) para T1, T2 e T3 respectivamente. Avaliando que os tratamentos com a suplementação de $FeSO_4$ T2 e T3 apresentaram maiores teores médios de ácido acético, o T2 com 500 mg L^{-1} de $FeSO_4$ foi o que apresentou maior concentração (Figura 9). Schmidt et al., (2014) em seus estudos observaram que a deficiência de Ferro (Fe) não causou aumento de ácido acético, porém, quando utilizaram a concentração de 100 mg L^{-1}de Fe juntamente com 0,7 mg L^{-1} Níquel (Ni) constataram o acréscimo geral na concentração de ácidos orgânicos voláteis, concluindo que somente o uso desses elementos não é suficiente para manter um processo estável e que outros elementos também podem estar em deficiência.

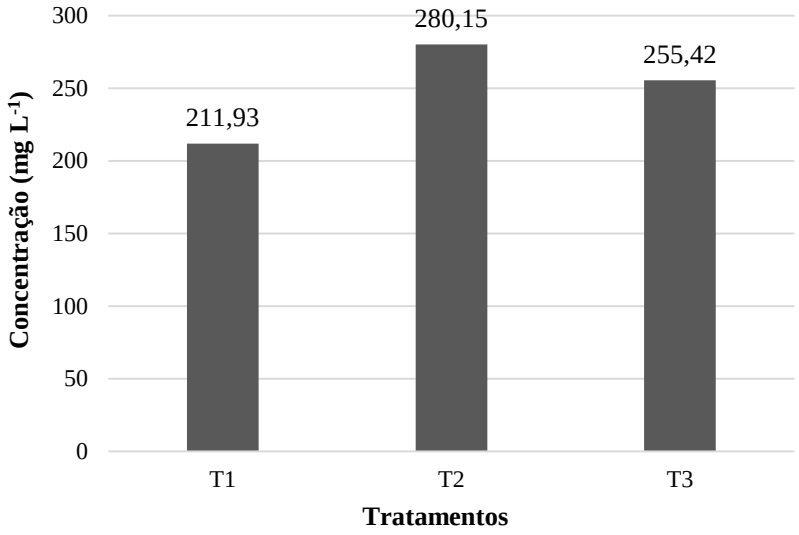

Figura 9 - Concentração de ácido acético em cada tratamento: T1 (controle); T2 (500 mg L^{-1} $FeSO_4$) e T3 (1000 mg L^{-1} $FeSO_4$).

A concentração de ácido acético na vinhaça afluente foi de 456,90 mg L^{-1}, resultando em remoções de 53,62 %, 38,68 %, 44,09 % para T1, T2 e T3, respectivamente. Devido a vinhaça ser um substrato de composição variada nota-se que a concentração de ácido acético encontrado no material utilizado para o processo de biodigestão anaeróbia não apresentou

concentração elevada. Silverio (2017) em seu estudo caracterizou a vinhaça afluente obtendo 1641,9 mg L^{-1} de ácido acético em sua composição. Nos primeiros dias (1º - 6º) verificou-se eficiência no consumo de ácido acético, atingindo no 2º dia a concentração de 441,99 mg L^{-1}, alcançando a redução de 65,94 % de ácido acético, porém após esse período observou o aumento das concentrações de ácidos orgânicos no reator.

Todavia, no presente estudo não foi observado acúmulo de ácido acético no reator, pelo fato de ter sido consumido pelas bactérias acetogênicas, mas também não foi apresentado consumo eficiente, pois a remoção desse elemento foi relativamente pequena considerando a concentração do efluente.

Em sistemas com acúmulo de H_2 e ácido acético, o consumo de ácido butírico é prejudicado. A conversão do ácido butírico em ácido acético são reações que geram H_2 em proporções relativamente grande. Visando a manutenção e o equilíbrio no sistema quanto a disponibilidade de H_2, reações que favorecem o excesso de H_2 no reator acabam sendo anuladas, resultando no acúmulo de ácido propiônico e butírico como consequência do baixo consumo de H_2 e ácido acético por arqueas metanogênicas (MOSEY, 1982; MCCARTY, 1964; MADIGAN et al., 2011; FERRY, 2010; STAMS et al., 2012).

No tocante à concentração de ácido butírico, observa-se que no 2º dia não houve diferença significativa entre os tratamentos. No entanto, no 2º dia T2 e T3 apresentaram diferença significativa em relação ao T1.

Os resultados obtidos foram satisfatórios, pois demonstraram que esse ácido foi consumido e não acumulado no reator, evidenciando o processo de transformação do ácido butírico em ácido acético que também foi consumido evitando acidez no meio.

A concentração de ácido butírico expresso na vinhaça afluente foi de 1351,96 mg L^{-1}, obtendo vinhaça biodigerida com concentrações médias de 38,36 (±0,59), 42,56 (±4,99) e 46,48 (±0,84) e a redução de 97,16 %, 96, 85 % e 96,56 %, para o T1, T2 e T3 respetivamente.

Constatou-se que o T3 com 1000 mg L^{-1} de $FeSO_4$ foi o que apresentou maior concentração de ácido butírico, possivelmente a conversão para acetato utilizando essa concentração foi menos eficiente em relação aos outros tratamentos (Figura 10).

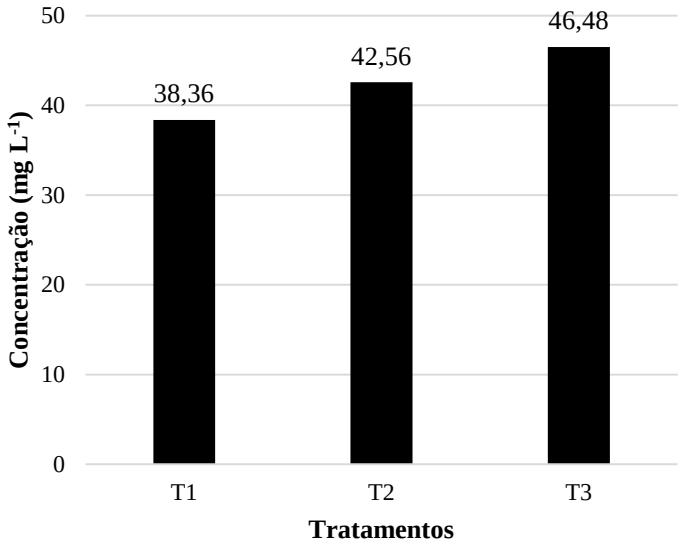

Figura 10 - Concentração de ácido butírico em cada tratamento: T1 (controle); T2 (500 mg L^{-1} $FeSO_4$) e T3 (1000mg L^{-1} $FeSO_4$).

7.5 Teor de Metano (CH_4)

O biogás possui, como composição típica, 60 % de metano, 35 % de dióxido de carbono e 5 % de uma mistura de hidrogênio. Dentre esses, o de maior interesse, é o metano, pois quanto maior a porcentagem de metano, maior é o poder energético do biogás. Dependendo da eficiência do processo, influenciado por fatores como carga orgânica, pressão e temperatura durante a fermentação, o biogás pode conter entre 40 e 80 % de metano (SOUZA et al., 2005; COELHO et al., 2006).

O substrato utilizado no presente estudo, a vinhaça, é propicio para o processo de biodigestão anaeróbia devido sua composição, já que maior parte dessa matéria orgânica é solubilizada. Por meio desse processo, há o potencial de se obter 14,6 m^3 de biogás por 1 m^3 de vinhaça (SOUZA; SANTOS; FRACARO, 2011), que expressa cerca de 55-65 % de metano (GRANATO; SILVA, 2002). Existem trabalhos que relataram a concentração de 96 % de metano no biogás em processos altamente otimizados (CORTEZ et al., 2014).

As concentrações de metano identificado nos tratamentos estudados não apresentaram diferenças, estatisticamente significativa, no 2º e 6º dia do experimento (Tabela 10), expressando valores relativamente próximos. O teor médio de CH_4 observado no biogás obtido no tratamento T1 foi 61,97 **(**±0,05), T2 60,41 (± 0,32) e T3 61,65 (± 1,45), além de expressarem a produção semelhante durante o processo (Figura 11), ficando evidente que o uso na solução de $FeSO_4$ não foi satisfatória para melhorar a qualidade do biogás no que se

refere a concentração de metano. Galbiatti et al. (2009), utilizando esterco de aves de corte com cama de capim napier triturado como substrato obtiveram teor de metano de 79,56 %.

Tabela 10 - Teor de metano no 2º e 6º dia de cada tratamento

Tratamentos	Teor de Metano (% CH4)		
	2º dia	6ºdia	CV (%)
T1	61,93 aA	62,00 aA	7,73
T2	60,63 aA	60,18 aA	3,47
T3	60,62 aA	62,67 aA	4,3
CV (%)	5,76	5,25	

Letras minúsculas diferentes na mesma coluna e maiúsculas na mesma linha diferem estatisticamente ente si através do teste de Tukey a 5 % de nível de significância; T1: Controle; T2 500 mg L^{-1} de $FeSO_4$; T3: 1000 mg L^{-1} $FeSO_4$; CV: Coeficiente de variação.

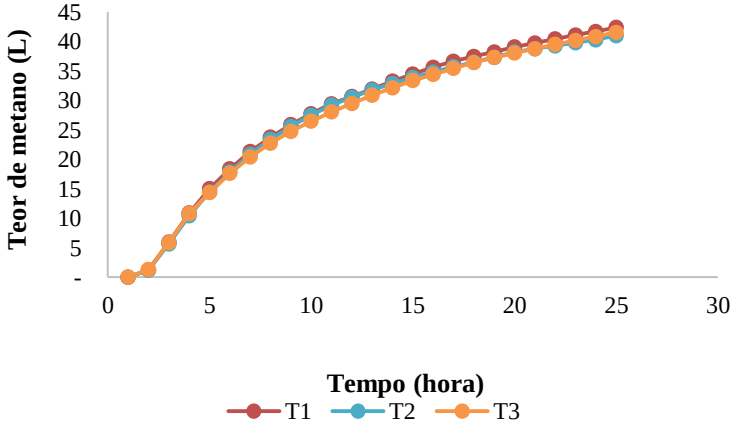

Figura 11 - Cinética dos tratamentos T1 (controle); T2 (500 mg L^{-1} $FeSO_4$) e T3 (1000 mg L^{-1} $FeSO_4$) em relação a produção de metano durante 24 horas por meio da biodigestão anaeróbia.

O metano que compõe o biogás é produzido por arqueas metanogênicas, entre as quais estes são os principais gêneros encontrados em sistemas anaeróbios: *Methanobacterium, Methanococcus, Methanospirillum, Methanosarcina.* Os principais substratos consumidos por essas arqueas são o acetato e o H_2, nos quais dois grupos de microrganismo atuam na etapa de Metanogênese, sendo as acetoclásticas as arqueas consumidoras de acetato e as arqueas consumidoras de H_2 as hidrogenotróficas. Cerca de 70 % do metano produzido no processo é oriundo do metabolismo das acetoclásticas. O acetato é degradado de forma que seu grupo metil é conservado (CH_3) e reduzido até metano. O grupo carbonila (COOH) é oxidado ao CO_2. Na reação que o metano é gerado a partir de H_2, o CO_2 dissolvido age como aceptor de elétrons e é reduzido com o H_2, obtido a partir da degradação enzimática de compostos

orgânicos, formando o CH_4. Nessa via, o CO_2, nunca é limitante, pois está sempre em excesso no sistema (MOSEY, 1982; MCCARTY, 1964; MADIGAN et al., 2011).

Devido algumas enzimas conter cobalto, níquel e ferro envolvidos na bioquímica da fermentação e produção de metano, a exigência dos microrganismos anaeróbios para oligoelementos é específica. Portanto, a falta de um único metal pode limitar severamente o processo geral de conversão anaeróbica. O ferro está presente em aglomerados de ferro-enxofre, responsáveis pelo transporte de elétrons, e em várias enzimas e citocromos. O teor de ferro para *Methanosarcina barkeri*, por exemplo, é 2150 µg g de células secas^{-1}.

No estudo de Zandvoort e colaboradores (2003) utilizando o metanol como substrato para produção de biogás, suplementando com 2000 mg L^{-1} de Cloreto de Ferro ($FeCl_2$) na concentração de 1387 mg L^{-1} de DQO obtiveram uma concentração de 86,8 % (± 2,1) de CH_4 no biogás, em contrapartida, na concentração de 4034 mg L^{-1} de DQO, a concentração de CH_4 no biogás diminuiu para 79,4 % (± 3,2).

Quanto maior a eficiência do tratamento, maior será a produção de metano pelo sistema e a capacidade de obtenção de energia (JIANG et al., 2013; DENG et al., 2014). Comparando a produção de biogás com o teor de metano obtido a cada hora do experimento, observa-se que na 5ª hora obteve-se o maior volume, em litros por hora, tanto de biogás quanto em teor de metano para todos os tratamentos, mostrando mais uma vez que os tratamentos tiveram comportamento semelhante (Figura 12). Pode-se dizer que nesse momento de maior produção estava ocorrendo a maior taxa de transformação da matéria orgânica em biogás. Para validar essa hipótese, seria necessário estipular um tempo e realizar os parâmetros de monitoramento do processo.

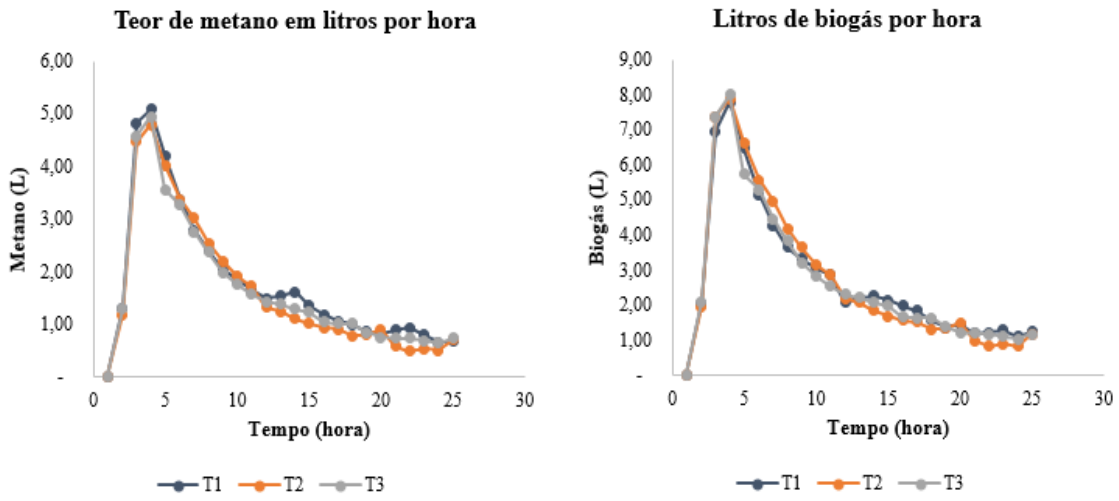

Figura 12 - Comparação do teor de metano e produção de biogás por hora em cada tratamento: T1 (controle); T2 (500 mg L^{-1} $FeSO_4$) e T3 (1000 mg L^{-1} $FeSO_4$).

A qualidade do biogás está diretamente ligada à concentração de H_2S, que em condições favoráveis apresenta maior produção e transferência do H_2S dissolvido para a fase gasosa (OUDE ELFERINK et al., 1994). No item 7.3, discutido sobre o teor de ânions, destaca-se a presença do sulfato em concentrações elevadas. Quanto maior a concentração de sulfeto, maior a interferência nas rotas de biodegradação da matéria orgânica, de modo que as BRS competem pelo substrato utilizado pelas arqueas para a produção do biogás limitando a extração de energia através do CH_4. A toxicidade do sulfeto também pode anular a atividade metanogênica nos sistemas de biodigestão anaeróbia permeando diretamente a membrana celular como forma não ionizada (H_2S) e desnaturando proteínas específicas ou indiretamente aumentando a precipitação de metais essenciais como formas ionizadas (HS^- e S^{2-}) (CAMILOTI et al., 2014, CHEN et al., 2008, VELA; ZAIAT; FORESTI , 2002).

7.6 Teores de Cátions

Os teores de cátions foram analisados a fim de caracterizar e monitorar o processo de biodigestão anaeróbia. É possível observar na vinhaça biodigerida que os teores de ferro, magnésio e potássio foram semelhantes aos observados na vinhaça afluente. Entretanto, o cálcio foi removido durante o processo de biodiestão anaeróbia. Nota-se também que não houve diferença significativa da concetração dos cátions em nenhum tratamento estudado (Tabela 11). Na Figura 12 é possível acompanhar a concentração de ferro, e na Figura 13 as concentrações de magnésio, potássio e cálcio em todos os tratamentos.

De acordo com McCarty (1964), as concentrações em que potássio, magnésio e cálcio se encontram no meio podem servir como estimulantes, inibidores moderados ou fortes inibidores do processo anaeróbio. A concentração da média e potássio obtido foi 3553,26 (±136,09) mg L^{-1}, 3273,31 (±206,46) mg L^{-1} e 3369,42 (±277,99) mg L^{-1}, para o T1, T2 e T3, respectivamente. Comparando a concentração de potássio na vinhaça afluente (3615,08 ± 20,52 mg L^{-1}) observa-se que os tratamentos T2 e T3 apresentaram maior remoção, 9,45 % e 6,79 %, respectivamente. Porém, os resultados alcançados desse cátion em todos os tratamentos, mostra que o mesmo esteve na faixa de inibição relatada por McCarty (1964), que é de 2.500 – 4.500 mg L^{-1}.

A concentração de magnésio encontrado na vinhaça afluente foi de 409,25 (± 3,35) mg L^{-1} e os valores da média obtidos foram 387,76 (±7,26) mg L^{-1}, 369,97 (±12,24) mg L^{-1} e 374,67 (±15,72) mg L^{-1}, obtendo a redução de 5,25 %, 9,59 % e 8,45 % para o T1, T2 e T3,

respectivamente. Considerando que a faixa de inibição do magnésio é de 3000 mg L^{-1}, todos os tratamentos estudados não apresentaram valores de inibição referente a esse cátion.

No que se refere a concentração de cálcio, a caracterização da vinhaça afluente resultou em 699,39 (±16,11) mg L^{-1}. A concentração de inibição para o cálcio no processo de biodigestão anaeróbia é a partir de 8000 mg L^{-1} e os resultados obtidos da média foram 249,40 (±35,76) mg L^{-1}, 257,66 (±38,79) mg L^{-1} e 274,40 (±27,55) mg L^{-1}, para o T1, T2 e T3, respectivamente, mostrando que esse elemento não apresentou concentração de inibição no processo de biodigestão anaeróbia. Ademais, foi o elemento que se obteve maior remoção em relação aos outros cátions estudados. Atingindo a remoção de 64,34 %, 63,16 % e 60,77 %, para T1, T2 e T3 respectivamente.

No que se refere à concentração de ferro, os valores da média para os tratamentos foram 9,90 (±4,53) mg L^{-1}, 8,69 (±3,97) mg L^{-1} e 10,99 (±1,84) mg L^{-1}, T1, T2 e T3 respectivamente. Considerando a concentração de ferro na vinhaça afluente 11,11 (±0,16), ota-se que nenhum tratamento obteve acúmulo desse elemento e sim remoção de 10,89 %, 21, 78 % e 1,08 % para T1, T2 e T3 respectivamente. O T2 teve adição de 500 mg L^{-1} de $FeSO_4$, e foi o tratamento que apresentou maior remoção de ferro durante o processo de biodigestão anaeróbia. Por outro lado, o T3 que teve a adição de 1000 mg L^{-1} de $FeSO_4$ foi o tratamento que expressou a menor remoção durante o processo de biodigestão anaeróbia.

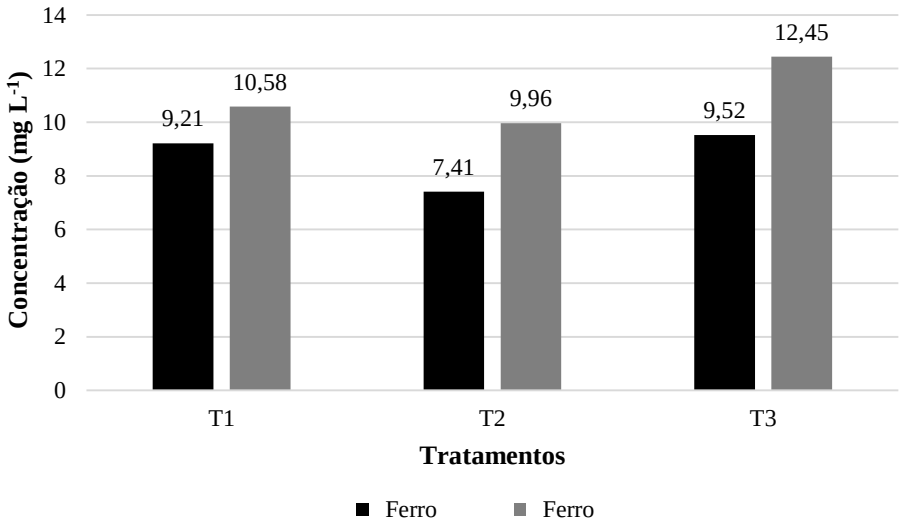

Figura 12 - Acompanhamento das concentrações de ferro no 2º e 6º dia dos tratamentos: T1 (controle); T2 (500 mg L^{-1} $FeSO_4$) e T3 (1000 mg L^{-1} $FeSO_4$).

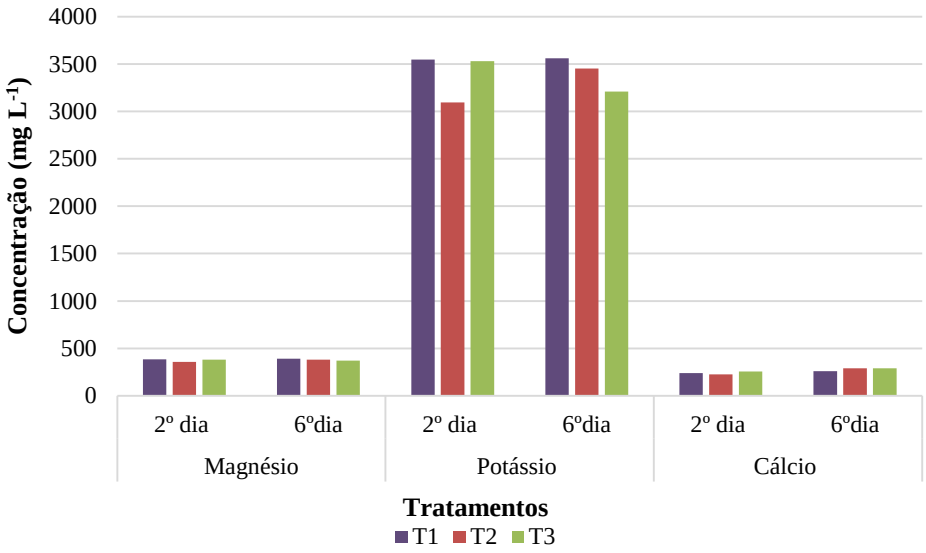

Figura 13 - Acompanhamento das concentrações de magnésio, potássio e cálcio no 2º e 6º dia dos tratamentos: T1 (controle); T2 (500 mg L^{-1} $FeSO_4$) e T3 (1000 mg L^{-1} $FeSO_4$).

Tabela 11 – Concentração de cátions no no 2º e 6º dia de cada tratamento

Tratamentos	Ferro (mg L^{-1})			Magnésio (mg L^{-1})			Potássio (mg L^{-1})			Cálcio (mg L^{-1})		
	2º dia	6ºdia	CV (%)	2º dia	6ºdia	CV (%)	2º dia	6ºdia	CV (%)	2º dia	6ºdia	CV (%)
T1	9,21 aA	10,58 aA	50,50	386,04 aA	389,48 aA	1,89	3545,21 aA	3561,30 aA	3,39	240,08 aA	258,72 aA	20,50
T2	7,41 aA	9,96 aA	47,89	357,59 aA	382,34 aA	4,66	3094,79 aA	3451,83 aA	10,49	224,76 aA	290,56 aA	26,82
T3	9,52 aA	12,45 aA	9,18	379,87 aA	369,47 aA	5,82	3530,99 aA	3207,86 aA	13,08	257,78 aA	291,02 aA	10,46
CV (%)	37,11	39,01		3,77	4,93		8,81	10,66		14,01	23,31	

Médias seguidas de letras minúsculas diferentes na mesma coluna diferem estatisticamente ente si através do teste de Tukey a 5 % de nível de significância; Médias seguidas de letras maiúsculas na mesma linha diferem estatisticamente ente si através do teste de de Tukey a 5 % de nível de significância; T1: Controle; T2 500 mg L^{-1} de $FeSO_4$; T3: 1000 mg L^{-1} $FeSO_4$; CV: Coeficiente de variação.

7.7 Monitoramento do processo por pH, alcalinidade e acidez volátil total

O monitoramento do pH no processo de biodigestão anaeróbia é importante, pois cada grupo de microrganismo envolvido nesse processo tem sua atividade máxima em diferentes faixas de pH.

As arqueas apresentam atividade metabólica em pH entre 6,6 e 7,4 e são sensíveis à diminuição de pH, ao passo que as bactérias acidogênicas se mostram mais ativas em pH baixo, 4,5 (CHERNICHARO, 2007).

No processo de digestão anaeróbia, os valores ótimos de pH para as reações enzimáticas ocorrem entre 6,2 e 7,6 (MCCARTY, 1964), embora seja possível alcançar estabilidade na formação de metano na faixa 6,0 a 8,2 (SPEECE, 2008). Assim, os valores de pH apresentados em todos os tratamentos estiveram dentro do indicado pela literatura e foram relativamente próximos (Tabela 12), indicando que o uso da solução de $FeSO_4$ não promoveu interferência nos valores de pH dos substratos investigados.

Tabela 12–Valores da média, mínmo e máximo, desvio padrão e coeficiente de variação do pH obtido em cada tratamento

	pH				
TRATAMENTOS	**pH**	**DP**	**CV (%)**	**mínimo**	**máximo**
1	7,81	0,08	0,97	7,73	7,88
2	7,74	0,11	1,43	7,62	7,84
3	7,79	0,12	1,57	7,68	7,92

Mesmo que os valores de pH se apresentem dentro da faixa desejada, não são indicadores do equilíbrio do processo. Portanto, se faz necessário realizar o monitoramento pelos parâmetros de alcalinidade e também pela concentração de ácidos voláteis totais (AVT). Os resultados obtidos a partir da alcalinidade total (AT) e AVT permitem avaliar a capacidade do poder tamponante e o consumo e produção de ácidos orgânicos no reator.

O consumo da alcalinidade e o acúmulo de ácidos orgânicos voláteis, particularmente o ácido acético, podem levar a mudanças na população metanogênica no processo de biodigestão anaeróbia (BOONAPATCHAROEN et al., 2007), e o decaimento do pH prejudica o crescimento da comunidade de microrganismos metanogênicos, causando redução na produção de biogás (BUDIYONO; KUSWORO, 2011).

A alcalinidade total, dada pela capacidade de neutralizar ácidos, é a soma da alcalinidade parcial (ou bicarbonato) e intermediária (devida aos ácidos voláteis), permitindo prever acúmulo de ácidos nos reatores.

A alcalinidade a bicarbonato (HCO_3^-) pode ser gerada em condições anaeróbias pela degradação de compostos orgânicos nitrogenados ou sais de ácidos orgânicos, redução de sulfito e sulfatos e compõe a principal fonte de capacidade tampão na faixa de pH neutro. A capacidade de tamponamento do sistema anaeróbio é quase completamente em pH na faixa de 6,0 e 7,5 (CHERNICHARO, 2007).

Quando há equilíbrio na produção e no consumo de ácidos no sistema, a alcalinidade total e alcalinidade a bicarbonato apresentam valores próximos. Em contrapartida, com o aumento de ácidos orgânicos no meio, o bicarbonato disponível é consumido para neutralizá-los e a alcalinidade a bicarbonato é reduzida frente à alcalinidade total (MCCARTY, 1964).

No presente estudo, nos resultados obtidos de alcalinidade total, o T2 apresentou a maior média, 1741, 92 (± 706,64) com relação aos outros tratamentos, 1283,41 (± 102,38), 1361,81 (± 21,85) T1 e T3 respestivamente. Isso pode ter ocorrido em virtude do acréscimo na concentração de bicarbonato. Para sistemas anaeróbios em condições mesofílicas, McCarty (1964) indica que alcalinidade a bicarbonato desejável fica em torno de 2.500 – 5.000 mg L^{-1}. Todos os tratamentos apresentaram valores menores do que indicado pela literatura (Tabela 12).

A alcalinidade intermediária (AI), proporcionada pelos ácidos graxos voláteis, encontrada para o T1 foi menor em relação ao T2 e T3, 125,83 (±18,03), 178, 89 (± 39,55) e 147,55 (± 26,48) respectivamente (Tabela 13), indicando que o consumo destes ácidos foi mais eficiente para o T1. O T2 apresentou a maior média de AI (178, 89 ± 39,55), com acréscimo de 42,17 % em relação ao tratamento controle (T1), da mesma forma que apresentou a maior concentração de ácido acético em relação aos outros tratamentos. Já o T3 expressou um acréscimo de 17,26 % em relação ao T1.

Ademais, a relação entre alcalinidade intermediária e a alcalinidade parcial (AI/AP) é um importante indicador do equilíbrio do processo anaeróbio (FORESTI, 1994). Relações AI/AP superiores a 0,3 são indesejáveis ao processo, pois indicam a ocorrência de distúrbios no processo de digestão anaeróbia (RIPLEY, 1986). Pode-se observar que resultados obtidos em todos os tratamentos apresentaram a relação AI/AP de acordo com o desejável, segundo a literatura (Tabela 13). Desta forma o processo manteve-se estável, e verificou-se efeito tamponante em todos os tratamentos.

Tabela 13: Valores da média de alcalinidade total (AT), alcalinidade intermediária (AI), alcalinidade parcial (AP) e relação AI/AP em todos os tratamentos

Parâmetros	Tratamentos		
	1	2	3
AT (mg CaCO3 L^{-1})	1283,41 ± 102,38	1741,92 ± 706,64	1361,81 ± 21,85
AI (mg CaCO3 L^{-1})	125,83 ± 18,03	178,89 ± 39,55	147,55 ± 26,48
AP (mg CaCO3 L^{-1})	1157,58 ± 91,82	1593,04 ± 668,23	1214,25 ± 47,81
AI/AP	0,11 ± 0,01	0,12 ± 0,02	0,12 ± 0,02

A instabilidade do processo anaeróbio ocorre quando a velocidade de produção de ácidos for maior que seu consumo, acarretando queda do pH e inibição das atividades de arqueas metanogênicas sensíveis a mudanças nas condições ambientais. Para que haja estabilidade no processo de biodigestão anaeróbia a faixa de ácidos voláteis totais (AVT) recomendada é de 50 a 500 mg L^{-1}(GERARDI, 2003).

A concentração média de AVT no efluente foi 387,74 (± 84,47); 355,06 (±29,49) e 310,78 (±19,67) mg CH_3COOH L^{-1}, resultando na redução de 89,16 %, 90,08 %, 91,31 % para o T1, T2 e T3 respectivamente, considerando que a concentração de AVT na vinhaça afluente foi de 3577,64 mg CH_3COOH L^{-1}.

O T3 com a maior concentração de $FeSO_4$ (1000 mg L^{-1}) apresentou a menor concentração de AVT em comparação aos outros tratamentos (Figura 13), porém as porcentagens de redução em todos os tratamentos foram próximas.

Os resultados de alcalinidade obtidos demonstraram que todos os tratamentos se apresentaram dentro da faixa de concentração recomendada pela literatura e não expressaram acúmulo de AVT no processo. Apresentando eficiência no consumo dos ácidos voláteis pelos microrganismos e consequentemente o equilíbrio entre as bactérias acidogênicas e as arqueas metanogênicas.

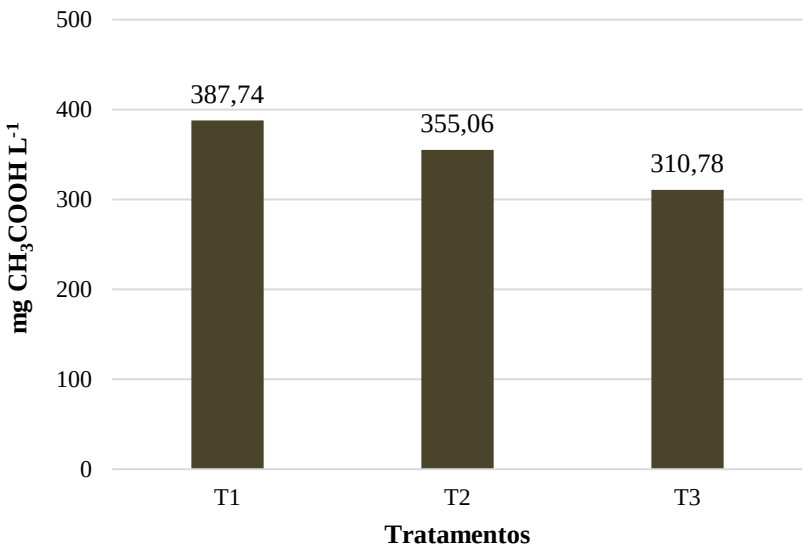

Figura 13 - Concentração em mg CH_3COOH L^{-1} de AVT em cada tratamento

8 CONCLUSÕES

Os tratamentos utilizando 500 e 1000 mg L^{-1} da solução de sulfato de ferro ($FeSO_4$) para a suplementação de vinhaça não promoveram estímulo da produção de biogás, e não apresentaram efeito sobre a composição de metano no biogás obtido no processo de biodigestão anaeróbia. No entanto, o processo manteve-se estável e não se verificou o acúmulo de produtos intermediários.

A utilização do $FeSO_4$ pode ter influenciado negativamente o potencial do ferro no processo de biodigestão anaeróbia. Sendo assim, sugere-se que o uso de outra fonte de ferro para avaliar melhor o potencial de uso desse micronutriente no processo de biodigestão anaeróbia da vinhaça.

REFERÊNCIAS

ALVES, D. M. G. **Fatores que afetam a formação de ácidos orgânicos bem como outros parâmetros da fermentação alcoólica**. Piracicaba. 1994. 274p. Dissertação (Mestrado) – Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo.

AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION (APHA). 2012. **Standard methods for the examination of water and wastewater**. 22ª ed., Washington: American Public Health Association, 2012. 1935 p.

BARTH, D.; MONTEIRO, A. R. S.; COSTA, M. M. da; VIRKAJÄRVI, I.; SACON, V.; WILHEMSOM, A. DesinFix TM 135 in fermentation process for bioethanol production. **Brazilian Journal of Microbiology,** v. 45, n. 1, p. 323-325, 2014.

BISCHOFF, M.: Erkenntnisse beim Einsatz von Zusatzund Hilfsstoffen sowie Spurenelementen in Biogasanlagen; VDI Berichte nº 2057; "Biogas 2009 – Energieträger der Zukunft"; VDI Verlag, Düsseldorf, 2009.

BOHRZ, G. I. **Geração de metano em lagoa anaeróbia: um estudo de caso em abatedouro de bovinos**. 2010. 153 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Processos) - Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Tecnologia, Santa Maria, 2010.

BOONAPATCHAROEN, N.; MEEPIAN, K.; CHAIPRASERT, P.; TECHKARNJANARUK, S. Molecular Monitoring of Microbial Population Dynamics During Operational Periods of Anerobic Hybrid Reactor Treating Cassava Starch Wastewater. **Microbial Ecology,** v. 54, p.21-30, 2007.

BUDIYONO, B.; KUSWORO, T. D. Biogas production from cassava starch efluente using microalgae as biostabilisator. **International Jounal of Science and Engeneering.** v. 2, n. 1, p.4-8, 2011.

CALEGARI, R. P. **Produção de biogás a partir de vinhaça concentrada**. 75 p. Dissertação (Mestrado) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba/SP, 2017.

CARVALHO, T. C. **Redução do Volume de Vinhaça através do Processo de Evaporação.** 2010. 90p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Engenharia Mecânica, Universidade Estadual Paulista, Bauru, 2010.

CAMPOS, C. R.; MESQUITA, V. A.; SILVA, C. F.; SCHWAN, R. F. Efficiency of Physicochemical and biological treatments of vinasse and their influence on indigenous microbiota for disposal into the environment. **Waste Management**, v. 34, n. 11, p. 2036–2046, 2014.

CAMILOTI, P. R.; MOCKAITIS, G.; RODRIGUES, J. A. D.; DAMIANOVIC, M. H. R. Z.; FORESTI, E.; ZAIAT, M. **Innovative anaerobic bioreactor with fixed-structured bed (ABFSB) for simultaneous sulfate reduction and organic matter removal** J. Chem. Technol. Biotechnol., 89 (2014), pp. 1044-1050.

CANHOS, V. P., VAZOLLER, R.F**. Biodiversidade do Estado de São Paulo**: Microrganismos & Vírus. São Paulo: FABESP, 1999.

CETESB – Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental do Estado de São Paulo. **Vinhaça – critérios e procedimentos para aplicação no solo agrícola. Norma Técnica P4.231**, 2006.

CHEN, Y.; CHENG, J. J.; CREAMER, K. S. **Inhibition of anaerobic digestion process: a review** Bioresour. Technol., 99 (2008), pp. 4044-4064

CHERNICHARO, C. A. L. de**. Reatores anaeróbios: princípios do tratamento biológico de águas residuárias**. Belo Horizonte: DESA-UFMG, 2007. 359 p.

CHERNICHARO, C. A. L. **Reatores Anaeróbios: Princípios do Tratamento Biológico de Águas Residuárias**. v. 5, Belo Horizonte, 1997. 246 p.

CHRISTOFOLETTI, C. A.; ESCHER, J. P.; CORREIA, J. E.; MARINHO, J. F. U.; FONTANELLI, C. S. Sugarcane vinasse: Environmental implications of its use. **Waste Management,** v. 33, s. n., p. 2752-2761, set., 2013.

COELHO, S. T.; GOLDEMBERG, J.; LUCON, O.; GUARDABASSI, P. Brazilian sugarcane etanol: lessons learned**. Energy for Sustainable Development**, v. 10, n. 2, p. 26-29, 2006.

COLARES, C. J. G.; SANDRI, D. Eficiência do tratamento de esgoto com tanques sépticos seguidos de leitos cultivados com diferentes meios de suporte. **Rev. Ambient. Água**, Taubaté, v. 8, n. 1, p. 172-185, Apr. 2013.

CORTEZ, L. A. B.*;* ROSSEL, C. E. V.; JORDAN, R. A.; LEAL. M. R. L. V.; LORA, E. E. S. R&d needs in the industrial production of vinasse. **Sugarcane bioethanol - R & D for productivity and sustainability**, p. 619–636, 2014.

CORTEZ, L. A. B.; SILVA, A.; LUCAS JUNIOR, J. de; JORDAN, R. A.; CASTRO, L. R. de. Biodigestão de Efluentes. In: CORTEZ, L.A. B.; LORA, E. S. (Coord.) **Biomassa para Energia**. Campinas: Editora da UNICAMP, 2007. Cap. 15, p. 493–529.

DEMIREL, B.; SCHERER, P. **Requisitos do elemento traçador de digestores agrícolas de biogás durante a conversão biológica de biomassa renovável em metano** Biomassa Bioenergia, 35 (2011), pp. 992 – 998.

DENG, Y.; XU, J.; LIU, Y.; MANCL, K. (2014) Biogas as a sustainable energy source in China: Regional development strategy application and decision making. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 35, p. 294-303.

DILALLO, R.; ALBERTSON, O. E. Volatile Acids by Direct Titration. ENERGIGAS SVERIGE. **Biogas in Sweden**. 4. v. 33, p. 356–365, Abril 1961.

EITH, C; KOLB, M; SEUBERT, A & VIEHWEGERm K. H. **Práticas em Cromatografia de íons: Uma Introdução**. 2006. 142 p. Metrohm, 2006.

ERSAHIN, M. E.; OZGUN, H.; DERELI, R. K.; OZTURK, I. **Anaerobic treatment of industrial effluents: An overview of applications.** Waste Water – Treatment and Reutilization; InTech: New York, NY, EUA, 2011.

ESPINOSA, A.; ROSAS, L.; ILONGOVAN, K.; NOYOLA. A. Efect of the Trace Metals on the Anaerobic Degradation of Volatile Fatty Acids in Molasses Stillage. **Water Science and Technology**. London, v. 32, n. 12, p. 121-129, 1995.

ESPAÑA-GAMBOA, E.; MIJANGOS-CORTES, J.; BARAHONA-PEREZ, L.; DOMINGUEZ-MALDONADO, J.; HERNÁNDEZ-ZARATE, G.; ALZATE-GAVIRIA, L. Vinasse: characterization and treatments. **Waste management & research: the jounral of the international Solid Wastes and Public Cleansing Association, ISWA**, v. 29, n.12, p. 1235, 2011.

Fachagentur Nachwachsende Rohstoffe e. V. (FNR). Guia Prático do Biogás, Geração e utilização. Ministério da Nutrição, Agricultura e Defesa do Consumidor da Alemanha, 5ª edição, 2010.

FERMOSO, F.; BARTACEK, J.; JANSEN, S.; LENS, P. N. Metal supplementation to UASB bioreactors: from cell–metal interactions to full-scale applications. **Sci Total Environ**, 2009; 4007:3652–67.

FERRY, J. G. The chemical biology of methanogenesis. **Planetary and Space Science**, v. 58, n. 14-15, p. 1775-1783, 2010.

FORESTI, E. Fundamentos do processo de digestão anaerobia In: Universidad de la República. **Tratamiento anaerobio**. Montevideo, s.n, 1994. p.97-110.

GALBIATTI, J. A.; CARAMELO, A. D.; SILVA, F. G.; GERARDI, E. A. B.; CHICONATO, D. A. Estudo qualiquantitativo do biogás produzido por substratos em biodigestores tipo batelada. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v.14, n.4, p.432–437. Campina Grande, PB, UAEA/UFCG, 2010.

GERARDI, M. H. **A microbiologia do digestor anaeróbico** John Wiley & Sons Inc., Hoboken, Nova Jersey (2003).

GRANATO, E. F.; SILVA, C. L. **Geração de energia elétrica a partir do resíduo vinhaça**. ENCONTRO DE ENERGIA NO MEIO RURAL, 4. Campinas 2002.

HULSHOFF-POL, L. W.; LEANS, P. N. L.; WEIJMA, J.; STAMS, A. J.M. New developments in reactor and process technology for sulfate reduction. **Water Science and Technology,** v. 44, n.8, 0. 67-76, 1001.

JIANG, X.; HAYASHI, J.; SUN, Z.Y.; YANG, L.; TANG, Y.Q.; OSHIBE, H.; OSAKA, N.; KIDA, K. (2013) Improving biogas production from protein-rich distillery wastewater by decreasing ammonia inhibition. **Process Biochemistry**, v. 48, p. 1778-1784.

KATO S, HASHIMOTO K, WATANABE K. Methanogenesis facilitated by electric syntrophy via (semi) conductive iron-oxide minerals. **Environ Microbiol**. v. 14, 2012.

KRUG, F. J. Métodos de preparo de amostras para análise elementar. São Paulo: **EditSBQ – Sociedade Brasileira de Química,** 572 p. 2016.

LINDORFER, H.; BRAUN, R.; KIRCHMEYR, R.: The self-heating of anaerobic digesters using energy crops; **Water Science and Technology 53** (8), 2006.

LENS, P. N. L.; VISSER, A. JANSSEN, A. J. H.; HULSHOFF POL, L. W.; LETTINGA. G. **Biotechnological treatment of sulfate-rich wastewaters** Crit. Rev. Env. Sci. Tec., 28 (1) (1998), pp. 41-88.

LIU, Y.; ZHANG, Y.; QUAN, X.; CHEN, S.; ZHAO, H. Applyinganelectric field inabuilt-in zero valentiron—anaerobic reactor for enhancement of sludge granulation. **Water Res**, 2011.

LIU, Y.; ZHANG, Y.; QUAN, X.; LI, Y.; ZHAO, Z.; MENG, X. Optimization of anaerobic acidogenesis by adding FeO powder to enhance anaerobic wastewater treatment. **Chem Eng J**, 2012.

LO, H. M.; CHIU, H. Y.; LO, S. W.; LO, F. C. **Efeitos de diferentes SRT na digestão anaeróbia de RSU dosados com várias cinzas MSWI** Bioresour Technol , 125 (2012), pp. 233–238.

LOVLEY, D. R.; PHILLIPS, E. J. P. Novel processes for anaerobic sulfate production from elemental súlfur by sulfate-reducing bactéria. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 60, p. 2394-2399, 1994.

MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; STAHL, D. A.; CLARK, D. P. **Biology of Microorganisms**. 13a. ed. [s.l.] Benjamin Cummings, Pearson Education, 2011.

MARTINS, R.; OLIVETTE, M. P. D. A.; NACHILUK, K. **SUSTENTABILIDADE: novos desafios e oportunidades para a produção paulista de cana-de-açúcar**: Informações Econômicas, SP. 41 2011.

MCCARTY, P. L.; Anaerobic waste treatmente fundamentals. **Public Works**, v.95, n.9, 10, 11 e 12; 1964

MCCARTY, P. L. One hundred years of anaerobic treatment. In: Hughes DE, Stafford DA, Wheatley BI et al (eds) Anaerobic digestion, 1981: proceedings of the second international symposium on anaerobic digestion**. Elsevier Biomedical**, Amsterdam, 1982, p. 3–22.

MEYSTRE, J. A. **Partida de um reator UASB, em escala piloto, para tratamento de efluente doméstico:** estudo de caso para a região da Serra da Mantiqueira. 2007. 128 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia da Energia) - Universidade Federal de Itajubá, Itajubá, 2007.

MOSEY, F. E. New developments in the anaerobic treatment of industrial wastes. **Water pollution control**, V. 81, n. 4, p. 540-552, 1982.

MUYZER, G.; STAMS, A. J. M. The ecology and biotechonology of sulfate-reducing bactéria. **Nature Reviwes – Microbiology**. v, 6, p. 441-454, 2008.

NGES, I. A.; BJÖRNSSON, L. Alta produção de metano e operação estável durante a digestão anaeróbica de misturas de culturas energéticas suplementadas com nutrientes **Biomassa Bioenergia,** 47 (2012), pp. 62 – 70.

OLIVEIRA, R. D. **Geração de energia elétrica a partir do biogás produzido pela fermentação anaeróbia de dejetos em abatedouro e as possibilidades no mercado de carbono.** 2009. 79 p. Trabalho de Conclusão de Curso (Engenharia Elétrica) – Universidade de São Paulo, Escola de Engenharia de São Carlos, São Carlos, 2009.

OMIL, F.; LENS, P.; HULSHOFF POL, L.; LETTINGA, G. Effect of upward velocity and suphide concentration on volatile fatty acid degradation in a sulphidogenic granular sludge reactor. **Process Biochemistry**, v. 31, n. 17, p. 699-710, 1996.

ORTEGÓN, G. P.; ARBOLEDA, F. M.; CANDELA, L.; TAMOH, K.; VALDES-PANT, D.; ADHOLEYA, A. Biological approaches for treatment of distillery wastewater: A review **Bioresource Technology**, v. 98, n. 12, p. 2321–2334, 2007.

OUDE ELFERINK, S.; VIESSER, A.; HULSHOFF POL, L. W.; STAMS, A. J. M. Sulfate reduction in methanogenic bioreactores. **FSMS Microbiology Reviews**, v.15, n. 2-3, p. 119-136, 1994.

PAOLIELLO, J. M. M. **Aspectos ambientais e potencial energético no aproveitamento de resíduos da indústria sucroalcooleira.** 2006. 180p. Dissertação (Mestre em Engenharia Industrial) - Faculdade de Engenharia da UNESP. Bauru, 2006.

PATURAU, M. J. **By-products of the cane sugar industry:** an introduction to their industrial utilization. Amsterdam: Elsevier, 1969.

PELCZAR J. R., M. J., CHAN, E. C. KRIEG, N. R. **Microbiologia conceitos e aplicações**. Vol.1, 2ªed. São Paulo: Makron Books. 524 p. 1996.

PRADA, S. M.; GUEKEZIAN, M.; ENCARNACIÓN, M.; SUÁREZ-ILHA, V. M**etodologia analítica para a determinação de sulfato em vinhoto.** Instituto de Química - Universidade de São Paulo, 1998.

RAJESHWARI, K. V.; BALAKRISHNAN, M.; KANSAL, A.; LATA, K.; KISHORE, V. V. N. **Estado da arte da tecnologia de digestão anaeróbica para tratamento de efluentes industriais** Energia Renovável Sustentável Rev ,4 (2000), pp. 135 – 156.

RIPLEY, L. E.; BOYLE, W. C.; CONVERSE, J. C. Improved alkalimetric monitoring for anaerobic digestion of high-strength wastes. **Journal Water Pollution Control Federation**, v. 58, n. 5, p. 406-411, 1986.

RITTMANN, B. E.; McCARTY, P. L. **Environmental biotechnology: principles and applications**. Boston: McGraw-Hill, 2001.

ROBINSON, J. A.; TIEDJE, J. M.; Competition between sulfate-reducing and methanogenic bacteria for H2 under resting and gowing conditions. **Archives of Microbiology**, V. 137, p. 26-32, 1984.

ROMERO-GUIZA, M. S.; VILA, J.; MATA-ALVAREZ, J.; CHIMENOS, J. M.; ASTAIS, S. The role of additives on anaerobic digestion: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews** Volume 58, May 2016, Pages 1486-1499a.

ROMERO-GUIZA, M. S.; MATA-ALVAREZ, J.; CHIMENOS, J. M.; ASTALS, S. The effect of magnesium as activator and inhibitor of anaerobic digestion. **Waste Management 56.** 2016, p.137–142b.

SAS INSTITUTE, INC. Users Guide: Statistics, Version 5 Edition. SAS Institute Inc., Cary, North Carolina, USA, 1985.

SCHATTAUER, A.; ABDOUN, E.; WEILAND, P.; PLÖCHL, M.; HEIERMANN, M. **Abundância de oligoelementos em plantas de biogás demonstração** Biosyst Eng , 108 (2011) , pp. 57 – 65.

SEYFRIED, C. F.; WEILAND, P. Anaerobe Verfahren zur Behandlung von **Industrieabwässern. Korrespondenz Abwasser**, v. 37, pp. 1247 – 1251, 1990.

SHARMA, S. B. et al. Phosphate solubilizing microbes: substainable approach for managing phosphorus deficiency in agricultural soils. **SpringerPlus,** v. 2, n. 1, p. 587, 2013.

SHIMADZU (2014) **N2O/CO/CO2/CH4 analysis system (TCD/FID) GC-2014NCCC1**. Application data sheet no.57.

SILVERIO, M. S. **Digestão anaeróbia de vinhaça 2G para produção de biogás**. 78 p. Dissertação (Mestrado) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba/SP, 2017.

SCHMIDT, T.; NELLES, M.; SCHOLWIN, F.; PROTER, J. Trace element supplementation in the biogas production from wheat stillage – Optimization of metal dosing. **Bioresource Technology**, V. 168, P. 80-85. 2014.

SOUZA, C. F.; LUCAS J. J.; FERREIRA W. P. M. Biodigestão anaeróbia de dejetos de suínos sob efeito de três temperaturas e dois níveis de agitação do substrato: considerações sobre a partida. **Engenharia Agrícola**, v.25, n.2, p.530-539, 2005.

SOUZA, S. N. M. D.; SANTOS, R. F.; FRACARO, G. P. M. **Potential for the production of biogas in alcohol and sugar cane plants for use in urban buses in the Brazil**. World Renewable Energy Congress. Linkoping, Sweden**:** 6 p. 2011.

SPEECE, R. E. Anaerobic biotechnology for industrial wasterwater treatmentet. ***Environ Sci. Technol*, 1983**, *17* (9), pp 416A-427.

SPEECE, R. E. **Anaerobic biotechnology for industrial wastewaters**. Archae Press, Nashville, Tennesse, EUA. 394 p., 1996.

SPEECE, R. E. **Anaerobic Biotechnology and Odor/Corrosion Control for Municipalities and Industries**. Archae Press, Nashville, Tennesse, EUA. p. 586 , 2008.

STAMS, A. J. M.; SOUSA, D.; KLEEREBEZEM, R.; PLUGGE, C. M. Role of syntrophic microbial communities in high-rate methanogenic bioreactors. **Water Science and Technology**, v. 66, n. 2, p. 352, 1 jun. 2012.

SYDNEY, E. B.; LARROCHE, C.; NOVAK, A. C.; NOUAILLE, R.; SARMA, S. J.; BRAR, S. K.; LETTI, L. A. JR.; SOCCOL, V. T.; SOCCOL, C. R. Economic process to produce biohydrogen and volatile fatty acids by a mixed culture using from sugarcane etanol industry as nutrient source. **Bioresource technology..** v. 159, p 380-386, May 2014.

VELA, F. J.; ZAIAT, M. FORESTI, E. **Influence of the COD to sulphate ratio on the anaerobic organic matter degradation kinetics** Water SA, 28 (2002), pp. 213-216.

WANG, R.; LI, Y.; WANG, W.; CHEN, Y.; VANROLLEGHEM, P. A. Effect of High Orthophosphate Concentrations on Methane Production During Mesophilic Anaerobic Digestion. **Chemical Engineering Journal** 260, p.791–800, 2015.

WIJEKOON, K. C.; VISVANATHAN, C.; ABEYNAYAKA, A."Effect of organic loading rate on VFA production, organic matter removal and microbial activity of a two-stage thermophilic anaerobic membrane bioreactor," **Bioresource Technology**, vol. 102, no. 9, pp. 5353–5360, 2011.

YAMADA, C.; KATO, S.; UEONO, Y. ISHII, M.; IGARASHI, Y. Conductive iron oxides accelerate thermophilic methanogenesis from acetate and propionate. **J. Biosci Bioeng**, 2014.

ZANDVOORT, M. H.; GEERTS, R.; LETIINGA, G.; LENS, P. N. L. Methanol degradation in granular sludge reactors at sub-optimal metal concentrations: role of iron, nickel and cobalto. **Enzyme and Microbial Technology** v. 33, p. 190-198. 2003.

ZHANG, L.; LEE, Y.; JAHNG, D. **Co-digestão anaeróbica de resíduos alimentares e efluentes de suinocultura: enfocando o papel dos oligoelementos** Bioresour Technol, 102 (2011), pp. 5048 – 5059.

ZHOU, S.; XU, J.; YANG, G.; ZHUANG, L. Methanogenesis affect by the co-occurrence of iron (II) oxides and humic substance. **FEMS Microbiol Ecol.** v. 88, 2014.