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

Produção de biogás a partir de vinhaça concentrada

Rubens Perez Calegari

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

Piracicaba
2017

Rubens Perez Calegari
Engenheiro Ambiental

Produção de biogás a partir de vinhaça concentrada

versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011

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

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

Piracicaba
2017

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

Calegari, Rubens Perez

Produção de biogás a partir de vinhaça concentrada / Rubens Perez Calegari - - versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011. - - Piracicaba, 2017.

81 p.

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

1. Biodigestão anaeróbia 2. Metanogênese 3. Tratamento de efluente industrial 4. Biogás I. Título

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Valdomiro e Isolete Calegari.

AGRADECIMENTOS

À minha família, pelo amor, compreensão e suporte incondicional.

Ao Professor Dr. Antonio Sampaio Baptista, pela orientação, paciência, grandes ensinamentos repassados e sobretudo, a amizade.

Aos meus ex-orientadores Dr. Alexandre Rodrigo Coelho, Dr. Eder da Costa dos Santos, Drª. Claudine Dinali Santos Seixas e Drª. Elisa Yoko Hirooka, pelo suporte que me foi dado durante a graduação e encaminhamento para a pós-graduação.

À ESALQ-USP e ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, que abriram suas portas para o aperfeiçoamento dos meus conhecimentos.

Aos professores, técnicos e alunos que me ajudaram ao longo do mestrado, em especial: Prof. Dr. Eugenio Foresti, Profª. Marcia Damianovic e ao Doutorando Rogerio Silveira Vilela da EESC-USP; Prof. Dr. Carlos Eduardo Cerri e Profª. Drª. Sonia Piedade da ESALQ-USP.

Ao Grupo de Pesquisa Hugot-Bioenergia e todos os colegas de laboratório, por me acolherem e ajudarem durante o curso de mestrado, em especial à Manuella Silverio, Gabriela Leite, Lucas Gil, Laysa Maciel, Eric Alberto, Eduardo Castro e Bianca Chaves.

Às Usinas São Martinho e Iracema pela concessão do material que foi utilizado no presente estudo.

Aos meus amigos que se mostraram de braços abertos em todos os momentos.

Às agências de fomento CAPES e FUSP, pelo suporte financeiro.

Embora não seja possível agradecer a todas as pessoas que contribuiram, ao menos de alguma forma no decorrer da elaboração deste trabalho, gostaria que soubessem que vocês fazem parte de meus pensamentos e da minha gratidão.

Muito obrigado!

EPÍGRAFE

"Uma descoberta consiste em ver o que todo mundo já viu e pensar o que ninguém pensou"

Dr. Albert Szent-Gyorgyi

SUMÁRIO

RESUMO 7
ABSTRACT 8
LISTA DE FIGURAS 9
LISTA DE TABELAS 10
1. INTRODUÇÃO 11
2. HIPÓTESES 13
3. OBJETIVO 15
4. JUSTIFICATIVA 17
5. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA 19
6. MATERIAL E MÉTODOS 27
6.1. TIPO DA PESQUISA 27
6.2. INSTALAÇÕES EXPERIMENTAIS 27
6.3. VINHAÇA 27
6.4. INÓCULO 28
6.5. REATORES 28
6.6. CONDUÇÃO DOS ENSAIOS DE BIODIGESTÃO 30
6.7. EXAMES E DETERMINAÇÕES FISICO-QUÍMICAS 32
6.8. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E ANÁLISE ESTATÍSTICA 37
7. RESULTADOS E DISCUSSÃO 39
7.1. CARACTERIZAÇÃO PRELIMINAR 39
7.2. DESEMPENHO DOS REATORES NA BIODIGESTÃO DA VINHAÇA 44
8. CONCLUSÕES 71
REFERÊNCIAS 73

RESUMO

Produção de biogás a partir de vinhaça concentrada

O Brasil é o segundo maior produtor de etanol do mundo. Na safra 2015/16, foram produzidos 30,4 bilhões de litros. Na produção de etanol realizada no Brasil é gerado grande volume de vinhaça, cerca de 10 a 13 litros desse resíduo por litro de etanol produzido. Isso significa uma produção anual de cerca de 300 bilhões de litros desse material residual. Em função disso e do risco de contaminação ambiental por esse material, há necessidade de reduzir o volume desse resíduo. Com isso minimizar o custo com a gestão desse passivo ambiental. Isso pode ser feito mediante a concentração da vinhaça. Além disso, o mercado de energia elétrica tem se apresentado com uma boa oportunidade para o setor sucroenergético. Por esses motivos, o objetivo deste projeto foi a produção de metano a partir do uso de vinhaça concentrada. Para tal, a vinhaça concentrada foi obtida em uma usina no Estado de São Paulo que utiliza concentrador de vinhaça de múltiplos efeitos. Utilizaram-se dois reatores (R1 e R2) do tipo UASB (reator anaeróbio de fluxo ascendente e manta de lodo) com capacidade para 50 L e volume reacional de 34,5 L cada. Os reatores foram operados à 38 ºC, com tempo de detenção hidráulica de 24 horas por 103 dias. O reator R1 recebeu cargas orgânicas volumétricas (COV) crescentes durante 9 fases (3,94; 3,5; 3,89; 4,66; 4,94; 5,33; 5,66; 6,08; 6,38 e 8,96 g DQO (L d)$^{-1}$), com DQO afluente variando de 23.927 mg L^{-1} a 44.060 mgL^{-1}. O reator R2 operou como tratamento controle, com COV variando entre 3,83 e 4,32 g DQO (L d)$^{-1}$. A avaliação do processo de biodigestão anaeróbia foi realizada com base na produção de biogás, eficiência de remoção de DQO, pH, alcalinidade, concentração de ácidos voláteis totais (AVT), concentração de sólidos no lodo e atividade metanogênicas específica do lodo (AME). R1 mostrou-se mais eficiente, com pH e alcalinidade dentro da faixa ideal e efluente com menor concentração de AVT. O desempenho do processo mostrou-se estável, atingindo eficiência máxima de remoção de DQO de 90% em R1. A maior produção volumétrica de biogás ocorreu concomitantemente com a maior produção específica de biogás, quando a DQO afluente foi de 42.003 mg L^{-1}, a produção volumétrica de biogás foi de 135,24 L dia^{-1}, e a produção de biogás em relação a DQO removida foi de 0,362 $L_{biogás}$ $gDQO_{remov}^{-1}$. No fim do experimento, a AME de R1 foi de 1,19 $gDQO_{CH4}$ gSTV.d^{-1}, 40% superior a R2, que teve 0,85 $gDQO_{CH4}$ gSTV.d^{-1}. A alta eficiência de remoção de matéria orgânica e produção de biogás no reator alimentado com alta concentração de DQO foi obtida através da adaptação gradual do consórcio microbiano.

Palavras-chave: Biodigestão anaeróbia; Metanogênese; Tratamento de efluente industrial; Biogás

ABSTRACT

Biogas production from concentrated vinasse

Brazil is the second largest producer of ethanol in the world. In the 2015/16 crop, 30.4 billion liters were produced. In Brazil's ethanol production, a large volume of vinasse is generated, about 10 to 13 liters of this residue per liter of ethanol produced. This means an annual output of about 300 billion liters of this waste material. Because of this and the risk of environmental contamination by this material, there is a need to reduce the volume of this waste. This will minimize the cost of managing this environmental liability. This can be done by concentrating the vinasse. In addition, the electricity market has presented itself with a good opportunity for the sugar-energy sector. For these reasons, the objective of this study was to produce methane from concentrated vinasse. For this purpose, concentrated vinasse was obtained from a mill that uses a multi-purpose vinasse concentrator in São Paulo State. Two reactors (R1 and R2) of UASB type (up-flow anaerobic sludge blanket) with capacity for 50 L and reactional volume of 34.5 L each one. The reactors were operated at 38 ºC, with hydraulic retention time of 24 hours for 103 days. The reactor R1 received increasing organic load rate (OLR) during 9 phases (3.94, 3.5, 3.89, 4.66, 4.94, 5.33, 5.66, 6.08, 6.38 And 8.96 g COD (L d)$^{-1}$), with affluent COD ranging from 23,927 mg L^{-1} to 44,060 mg L^{-1}. The R2 reactor was operated as a control treatment, with OLR ranging from 3.83 to 4.32 g COD (L d)$^{-1}$. The evaluation of the anaerobic biodigestion process was carried out based on biogas production, COD removal efficiency, pH, alkalinity, total volatile acid concentration (TVA), sludge solids concentration and sludge specific methanogenic activity (SMA). R1 showed to be more efficient, with pH and alkalinity within the ideal range and effluent with lower concentration of TVA. The process performance was stable, achieving maximum COD removal efficiency of 90% in R1. The higher volume of biogas production occurred concurrently with the higher specific biogas production, when the COD was 42.003 mg L^{-1}, the volumetric biogas production was 135.24 L day^{-1}, and the biogas production in relation to removed COD was 0.362 L_{biogas} $gCOD_{removed}^{-1}$. At the end of the experiment, the SMA of R1 was 1.19 $gCOD_{CH4}$ gTVS.day^{-1}, 40% higher than R2, which had 0.85 $gCOD_{CH4}$ gTVS.day^{-1}. The high efficiency of organic matter removal and biogas production in the reactor fed with high COD concentration was obtained through the gradual adaptation of the microbial consortium.

Keywords: Anaerobic biodigestion; Methanogenesis; Industrial efluente treatment; Biogas

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Fases metabólicas e grupos microbianos envolvidos na biodigestão aneróbia fonte: Adaptado de Harper e Pohland, 1986. 23
Figura 2 - Representação esquemática do reator 29
Figura 3 - Foto das instalações experimentais 29
Figura 4 - Foto de microscopia óptica do lodo coletado (aumento de 40 vezes) 44
Figura 5 - DQO afluente (mg L^{-1}) dos reatores R1 e R2 ao longo das fases de 1 a 9 47
Figura 6 - DQO (mg L^{-1}) do afluente e do efluente dos reatores R1 e R2 durante as fases de 1 a 9 49
Figura 7 - Produção volumétrica de biogás (L dia^{-1}) nos reatores R1 e R2 51
Figura 8 - Variação do pH nos reatores R1 e R2 ao longo do experimento 54
Figura 9 - Relação AI/AP nos reatores R1 e R2 57
Figura 10 - Variação temporal da concentração de ácidos voláteis totais (AVT) no afluente, efluente e eficiência de remoção em R1 60
Figura 11 - Variação temporal da concentração de ácidos voláteis totais (AVT) no afluente, efluente e eficiência de remoção em R2 61
Figura 12 - Variação temporal da concentração de sulfato (mg L^{-1}) no afluente, efluente e eficiência de remoção em R1 64
Figura 13 - Variação temporal da concentração de sulfato (mg L^{-1}) no afluente, efluente e eficiência de remoção em R2 64
Figura 14 - Concentração de sólidos totais (ST), em g L^{-1}, no lodo dos reatores R1 e R2 66
Figura 15 - Concentração de sólidos totais voláteis (STV), em g L^{-1}, no lodo dos reatores R1 e R2 66
Figura 16 - Concentração de sólidos totais fixos (STF), em g L^{-1}, no lodo dos reatores R1 e R2 67
Figura 17 - Volume de metano produzido por tempo 67
Figura 18 - Atividade metanogênica específica 68

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Comparativo entre a composição da vinhaça in natura e da vinhaça concentrada . 21
Tabela 2 - Condições operacionais dos reatores R1 e R2 durante as fases 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 e 9 31
Tabela 3 – Determinações analíticas 32
Tabela 4 - Soluções utilizadas para a caracterização da atividade metanogênica específica dos lodos 35
Tabela 5 - Composição das vinhaças utilizadas no experimento 40
Tabela 6 - Teor de sólidos no lodo granular 44
Tabela 7 - Concentração média de matéria orgânica aplicada aos reatores expressa em DQO45
Tabela 8 - DQO efluente e eficiência de remoção de DQO nos reatores R1 e R2 durante as fases de 1 a 9 47
Tabela 9 - Produção volumétrica de biogás durante as fases de 1 a 9 nos reatores R1 e R2... 50
Tabela 10 - Conversão de DQO em biogás 52
Tabela 11 - Média do pH nos reatores R1 e R2 e seus respectivos desvios padrão, coeficientes de variação (CV), máximo e mínimo 53
Tabela 12 - Valores médios da alcalinidade total (AT), alcalinidade parcial (AP), alcalinidade intermediária (AI), relação AI/AP dos afluentes (A1 e A2) e efluentes obtidos no reator 1 (R1) e no reator 2 (R2), durante as fases 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 e 9 56
Tabela 13 - Valores médios de ácidos voláteis totais (AVT) nos afluentes e efluentes de R1 e R2 e a eficiência de remoção 59
Tabela 15 - Teor de sólidos do lodo dos reatores 65

1. INTRODUÇÃO

Um sistema de produção é uma associação de processos e procedimentos que resulta em um produto final, que por sua vez deve estar acompanhado de qualidade e servir uma certa demanda. O sistema de produção de etanol no Brasil movimenta 1,5% do PIB e representa 18% da matriz energética do país, sendo o Brasil o maior produtor de açúcar e o segundo maior produtor de etanol do mundo (CONAB, 2016).

A possibilidade de expansão da produção de cana-de-açúcar, aliada à demanda aumenta gradativamente, surgindo simultaneamente a preocupação de qual destino os resíduos gerados na indústria sucroenergética terão, uma vez que esses rejeitos apresentam alto potencial de toxicidade ao ambiente.

A vinhaça, principal resíduo resultante da produção de etanol, é um efluente rico em matéria orgânica, nutrientes minerais e água. Devido ao seu grande teor de matéria orgânica, a vinhaça apresenta alto índice de DBO (Demanda Bioquímica de Oxigênio), variando de 12.000 a 20.000 mg L^{-1} (LAMONICA, 2004). Sendo considerada um efluente com alto teor poluente (DAMIANO, 2005).

Há alguns anos, que a vinhaça gerada é empregada *in natura* na lavoura da cana-de-açúcar, o volume aplicado varia entre 400 a 500 m^3/ha, de acordo com a necessidade de nutrientes do solo (ROSSETTO, 1987; FREIRE & CORTÊZ, 2000). Atua na fertirrigação da cana-de-açúcar como fonte de potássio, pode proporcionar melhor desenvolvimento das plantas e aumento do índice de área foliar, resultando em maior produção de fotoassimilados e consequentemente maior produção de sólidos solúveis pela cana-de-açúcar (BARBOSA et al., 2012).

Porém, a utilização da vinhaça como fertilizante causa preocupação devido ao seu alto potencial de impacto quando distribuída no ambiente, devido a suas características de baixo pH e elevada demanda química de oxigênio (DQO) podendo contaminar águas subterrâneas e mananciais superficiais através da percolação ou arraste de substâncias concentradas como: potássio, manganês, ferro, entre outros (SILVA et al., 2014). Também por possuir teor de sólidos muito baixo (de 2 a 10%), a vinhaça é composta por um grande volume, que acarreta custos de transportes muito elevados. Por tais motivos, justifica-se a diminuição do seu volume final (FREIRE & CORTEZ, 2000).

Com as atuais tecnologias disponíveis, tais resíduos deixam de ser um incômodo para a indústria e passam a ser subprodutos com alto valor agregado.

Devido a presença de tais compostos, faz-se possível o uso da vinhaça para a produção de biogás através da digestão anaeróbia de bactérias metanogênicas, e também possível recuperação da água residuária deste processo.

A biodigestão anaeróbia da vinhaça para a produção de metano tem-se mostrado um processo interessante, por ser responsável pela diminuição da DBO, produção de gás metano e o deflúvio resultante do sistema ainda pode ser utilizado como fertilizante, por ainda conter nutrientes minerais.

Após a biodigestão anaeróbia da vinhaça, obtem-se dois subprodutos: o biogás oriundo da metanogênese e a água residuária. Em relação ao primeiro, suas principais aplicações na indústria sucroenergética são relacionadas a geração de energia a partir de turbina a gás conjugada com gerador elétrico ou até mesmo a queima do gás em caldeira com finalidade de geração de vapor para ser utilizado em outros processos dentro da indústria (GRANATO, 2003).

Já o efluente líquido resultante da digestão, pode ser utilizado em outros processos na indústria, como: lavagem da cana, água de embebição, limpeza e até mesmo o uso em caldeiras, o que dependerá da qualidade final desse efluente.

2. HIPÓTESES

- É possível adaptar o consórcio microbiano responsável pelo processo de biodigestão às altas concentrações de carga orgânica do meio;
- A biodigestão anaeróbia da vinhaça concentrada gerará uma maior quantidade de metano por unidade de volume do reator quando comparada a vinhaça *in natura.*

3. OBJETIVO

Produção de biogás a partir da biodigestão anaeróbia da vinhaça concentrada;

Objetivos específicos

a) Produzir biogás utilizando vinhaça com DQO maior do que 30.000 mg L^{-1};
b) Analisar o rendimento e a produtividade do biogás produzido;
c) Avaliar a composição química da vinhaça antes e após a metanogênese.

4. JUSTIFICATIVA

A constante expansão da produção de biocombustíveis é reflexo da demanda mundial por combustíveis de fontes renováveis que cresce dia após dia. Fato é que se não houvesse o emprego das tecnologias atualmente disponíveis, a produção de combustíveis já seria insuficiente para suprir a população mundial. No caso do Brasil, o aumento da produção de etanol acarreta no aumento proporcional da geração de resíduos, como a vinhaça. Esta que atualmente é aplicada nos canaviais por fertirrigação com o objetivo de aumentar a disponibilidade de nutrientes para as plantas. Porém seu uso exacerbado pode acarretar lixiviação de nutrientes e consequente contaminação dos lençóis freáticos e mananciais. Em função disso, a CETESB publicou em 2006 a Instrução Normativa 4.231, a qual orienta e obriga todas as usinas do estado de São Paulo a apresentarem um plano de aplicação da vinhaça (PAV), antes do início de cada safra. A normativa regulamenta a aplicação da vinhaça com índice máximo de potássio correspondente a 5% da CTC (capacidade de troca catiônica) do solo. Por essa razão, a tendência é que a cada ano, a aplicação da vinhaça venha a ser cada vez mais distante da usina, aumentando os gastos com distribuição, que já estão estimados em R$ 5,09/m³, podendo tornar-se inviável sua aplicação, fazendo com que as usinas busquem novas alternativas para a destinação e uso da vinhaça. Diante do quadro atual, a produção de metano a partir da vinhaça tem-se mostrado um processo viável para a digestão dos compostos orgânicos (diminuição da DQO), produção de biogás e possível conversão em energia elétrica. Além da possibilidade do reaproveitamento da água residuária desse processo para aplicação na indústria, aliada a redução dos impactos ambientais. A utilização de vinhaça concentrada para a biodigestão anaeróbia pode ter reflexo na diminuição do custo com instalações e promover aumento da produtividade na produção de metano. Com isso, tornando essa técnica mais atraente do ponto de vista técnico-econômico e ambiental, permitindo assim desenvolver a atividade com mais sustentabilidade no ciclo de produção.

5. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Produção de cana-de-açúcar e geração de etanol

Atualmente, o Brasil é o maior produtor de cana-de-açúcar no mundo, devendo alcançar taxa média de aumento da produção de 3,25%, até 2018/19. Dentre os estados produtores, São Paulo é o maior produtor de cana-de-açúcar no país, com uma área plantada de 4,8 milhões ha. Conferindo à cana-de-açúcar, a posição de quarto produto de maior importância da atividade agropecuária do país (CONAB, 2016).

Dos mais diversos subprodutos derivados da cana, o açúcar e o etanol se destacam economicamente. O Brasil é responsável por mais da metade do açúcar comercializado no mundo e alcançou a produção de 29,2 bilhões de litros etanol na safra 2014/15 (CONAB, 2015).

A produção comercial de álcool no Brasil para finalidades carburantes se dá pela via biológica, que parte de matéria-prima açucarada, caldo de cana ou mel residual das usinas açucareiras, a qual é submetida ao processo fermentativo e resulta então em álcool, o principal produto da atividade enzimática das leveduras (LEÃO, 2002).

No Brasil, o álcool vem sendo usado como combustível desde 1933 (SLAPACK; RUSSEL; STEWART, 1986) e hoje é utilizado tanto na forma hidratado como na forma anidro, correspondendo a 27% da composição da gasolina comum (CONAB, 2015).

Tal produção de etanol resulta em inúmeros resíduos, os quais possuem alto potencial de se transformarem em novas fontes de combustíveis. Dentre os resíduos provenientes da indústria sucroenergética que podem ser utilizados para a cogeração de energia destacam-se: a palha da cana, o bagaço, os ponteiros da cana-de-açúcar, cinzas, torta de filtro, melaço e a vinhaça (RAJESHWARI et al., 2000; RIBAS, 2006; OGATA, 2013).

Vinhaça

É o principal efluente das destilarias de álcool, também conhecida como vinhoto, vinhote, mosto, *vinasse*, *stillage*, *cachaza*, *vinaza*, etc. É um líquido marrom escuro, ácido, com forte odor fétido, resultante da rápida decomposição devida sua alta carga orgânica. A vinhaça sai da bica de destilação com temperatura aproximada em 107 ºC e possui uma relação entre 10 e 13 litros por litro de álcool destilado (FREIRE; CORTEZ, 2000), valor este que pode alcançar 20 litros, dependendo da matéria-prima e da tecnologia empregada em seu processamento

(WILKIE, 2008) em que todos os fatores do processo que exercem ação direta ou indireta na composição do vinho terão influência na composição da vinhaça.

As principais opções de aproveitamento da vinhaça descritas na literatura (PAMPLONA, 1984; HORII, BLUMER & RIBEIRO, 1999) são:

- ✓ Produção de proteínas, através da fermentação aeróbia;
- ✓ Produção de biogás (metano) a partir da fermentação anaeróbia;
- ✓ Concentração em torno de 60º Brix e posterior utilização na produção de fertilizantes e rações animais;
- ✓ Uso agrícola *in natura* na lavoura, em substituição de parte da adubação mineral (fertirrigação).

Dentre as opções apresentadas anteriormente, a mais empregada atualmente é o uso na fertirrigação da cana-de-açúcar como fonte de potássio, que pode proporcionar melhor desenvolvimento das plantas e aumento do índice de área foliar, resultando em maior produção de fotoassimilados e consequentemente maior produção de sólidos solúveis pela planta (BARBOSA et al., 2012).

Todos os anos são gerados bilhões de litros de vinhaça e sua disposição indevida em lagos, córregos e lençóis freáticos pode gerar grandes impactos ambientais, principalmente devido seu alto índice de DBO (Demanda Bioquímica de Oxigênio), responsável pela eutrofização do sistema aquático (SILVA et al., 2014), e devido a percolação e arrasto de altas concentrações de substâncias como: ferro, manganês, potássio, alumínio, cloreto e matéria orgânica (HASSUDA; REBOUÇAS & CUNHA, 1990).

Não obstante, a constante aplicação de vinhaça em excesso no solo aumenta a salinidade do mesmo, devido sua alta concentração de potássio (SILVA et al., 2014), podendo baixar o pH ao longo prazo de aplicação (ZOLIN, et al., 2011; PAULINO et al., 2011) e alterar suas propriedades químicas e físico-químicas (CHRISTOFOLETTI, et al., 2013).

Concentração da vinhaça

Por possuir um teor de sólidos baixo (de 2 a 10%), a vinhaça é composta por um grande volume, o que acarreta custos de transportes elevados. Por tais motivos, justifica-se a diminuição do volume final do efluente, sendo os principais meios de concentração da vinhaça *in natura* empregados:

- ✓ Concentração mediante a evaporação da água;

- ✓ Reciclagem utilizando parte da vinhaça na diluição do caldo a ser fermentado;
- ✓ Desenvolvimento de novas linhagens de leveduras que suportem altos teores de álcool no mosto (FREIRE & CORTEZ, 2000; TONOLI, 2006).

No processo de concentração de vinhaça, a água é removida sem perda dos sólidos, (CHRISTOFOLETTI et al., 2013). Um processo que pode diminuir os custos de transporte dos caminhões tanque, aumentando o raio de aplicação de vinhaça, onde a fertirrigação em dutos não é mais viável (ANA, 2009).

Como pode-se observar na Tabela 1, após o processo de concentração, o conteúdo de sólidos e nutrientes minerais presentes na vinhaça aumenta significativamente.

Tabela 1 - Comparativo entre a composição da vinhaça in natura e da vinhaça concentrada

Parâmetros	**Vinhaça *in natura***	**Vinhaça concentrada**
pH (25° C)	3,64 - 4,80	4,2 - 5,3
Sólidos totais (g L^{-1})	2 – 7	100 – 200
Sólidos voláteis totais (mg L^{-1})	4.340	-
DQO (mg L^{-1})	20.970	13.100 – 27.500
DBO (mg L^{-1})	13.033	75.000 - 150.000
Nitrogênio (mg L^{-1})	148 - 1.230	2.040 - 22.200
Fósforo (mg L^{-1})	1-190	600 - 2.980
Sulfato (mg L^{-1})	1.186	2.020 - 18.630
Potássio (mg L^{-1})	1.247	3.390 -23.300

Fonte: SILVA, 2012; NOGUEIRA et al., 2015.

A utilização de evaporadores de múltiplos efeitos para a concentração da vinhaça tem se mostrado uma alternativa eficiente e vantajosa na recuperação dos compostos orgânicos pelo processo de concentração até 60º Brix (cerca de 10 vezes). Rezende (1984) cita que o uso da vinhaça concentrada pode ser de diferentes formas, como: Componente de forragens, suplementos alimentares e rações animais; uso direto como fertilizante, incineração a cinzas e biodigestão anaeróbia para a produção de metano.

Biodigestão anaeróbia da vinhaça e produção de metano

A formação de metano de forma natural tem interessado químicos e microbiologistas há mais de um século, sendo o metano e o dióxido de carbono os principais produtos da fermentação anaeróbia de resíduos orgânicos e materiais celulósicos (PELCZAR; CHAN & KRIEG, 1996).

A digestão anaeróbia é um processo biológico natural muito complexo em termos químicos e microbiológicos, no qual o material orgânico é degradado anaerobiamente por

diferentes populações de micro-organismos em cooperação, gerando produtos finais na fase gasosa (H_2, CH_4, CO_2), compostos orgânicos valiosos na fase líquida e biosólidos estabilizados (MCCARTY, 1982; FORESTI, 1994; ERSAHIN et al., 2011).

O uso comercial dessa fermentação data desde o século XIX, quando era utilizada apenas para estabilizar os resíduos orgânicos em tanques sépticos. Em 1911, uma companhia australiana começou produzir e vender gás oriundo da decomposição biológica do esgoto da cidade. Desde então, gases provindos de efluentes têm sido utilizados para aquecimento e geração de energia de boa parte do mundo (PATURAU, 1969).

O processo fermentativo para a produção de biogás ocorre em diferentes fases. Em cada fase atua um agente microbiológico distinto, sendo o tratamento anaeróbio dos efluentes mais vantajoso em comparação ao aeróbio, por exigir um menor consumo de energia, espaço e produzir menor quantidade de lodo em comparação com as tecnologias disponíveis para tratamento aeróbico (ERSAHIN et al., 2011). A realização do processo é dada em quatro estágios: Hidrólise, acidogênese, acetogênese e metanogênese.

Na primeira etapa de degradação anaeróbia ocorre a hidrólise dos compostos orgânicos complexos em monômeros básicos, através de enzimas hidrolíticas. Posteriormente, os compostos de cadeia menor são oxidados por bactérias anaeróbias obrigatórias e facultativas, originando ácidos orgânicos, como o ácido acético (CH_3COOH) e ácido propiônico (CH_3CH_2COOH), constituindo a segunda etapa, que denomina-se acidogênese (RITTMANN & MCCARTY, 2001; CORTEZ, et al., 2007).

Na terceira etapa as bactérias acetogênicas transformam os ácidos orgânicos da etapa anterior em acetato e hidrogênio, dois grupos distintos 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).

Finalmente, na última etapa, as arqueas metanogênicas convertem o acetato e o hidrogênio em gás metano e dióxido de carbono. Esta é a fase mais lenta e controla as taxas de conversão do processo (CANHOS & VAZOLLER, 1999).

Na figura 1 pode-se visualizar o esquema simplificado das principais fases metabólicas e grupos microbianos envolvidos na biodigestão aneróbia.

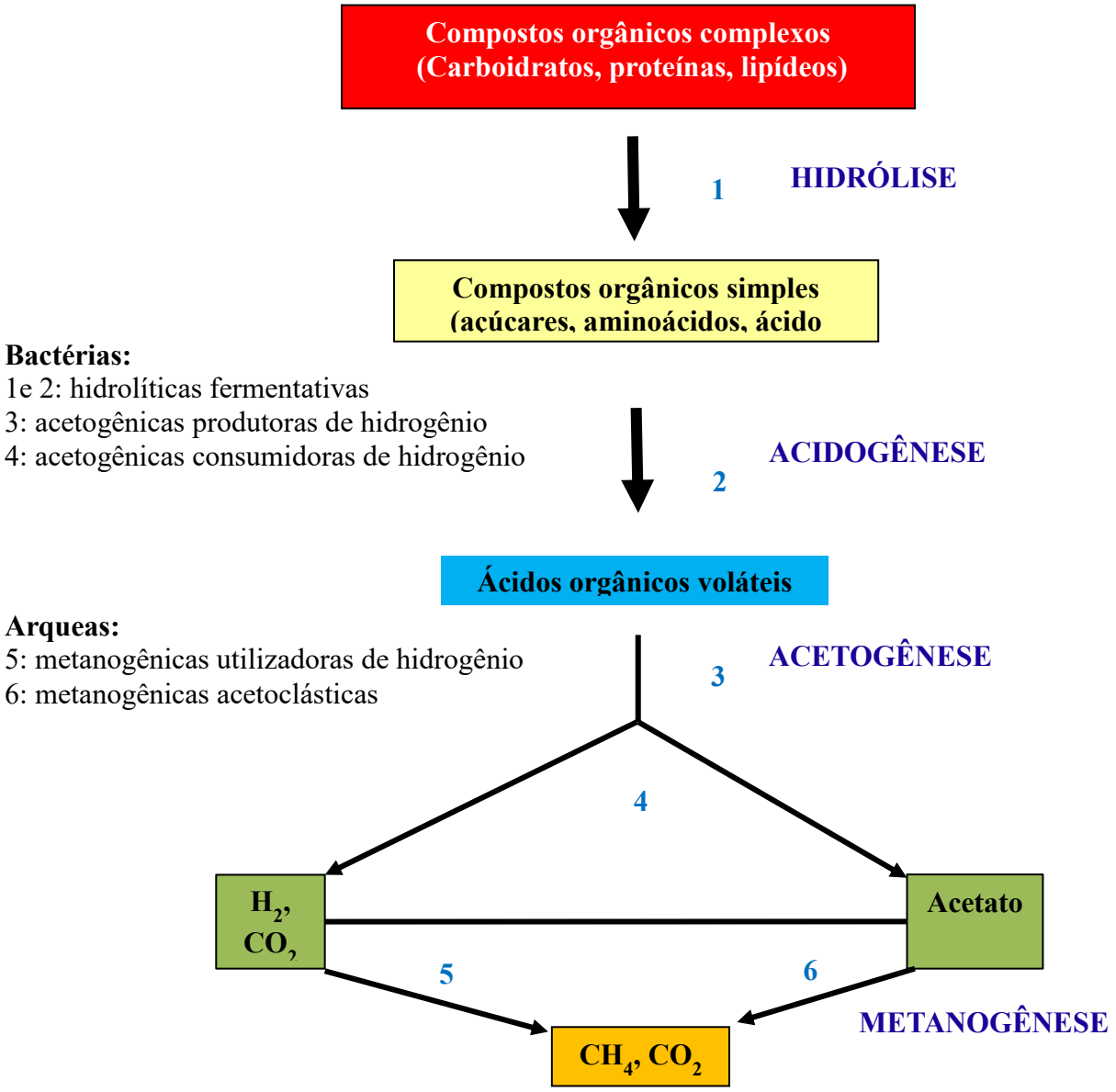

Figura 1 - Fases metabólicas e grupos microbianos envolvidos na biodigestão aneróbia fonte: Adaptado de Harper e Pohland, 1986.

Dentre os organismos vivos, as arqueas metanogênicas são as únicas capazes de produzirem grandes quantidades de gás metano (CH_4). Vários tipos de arqueas metanogênicas podem ser diferenciadas com base em sua morfologia e na coloração de gram. São encontradas em ambientes anaeróbios ricos em matéria orgânica como: brejos, açudes, lagos, rúmen de bovinos, lodaçal, dentro de digestores anaeróbios, em estações de tratamento de água e efluentes, onde são responsáveis pela produção de milhares de metros cúbicos de gás metano por dia (PELCZAR; CHAN & KRIEG, 1996).

A biodigestão anaeróbia da vinhaça para a produção de metano tem mostrado ser um processo interessante, por ser responsável pela remoção da DBO de 70 a 80% e produção de

gás metano em torno de 0,3 a 0,5 m³ por kg de DBO e o deflúvio resultante do sistema ainda pode ser utilizado como fertilizante, por ainda conter 20% de matéria orgânica e nutrientes minerais (REZENDE, 1984; VON SPERLING, 2005).

O biogás gerado possui um poder calorífico entre 5000 e 7000 kcal/m³, podendo ser potencializado até 12000 kcal/m³, se o dióxido de carbono for removido do composto (CORTÊZ, et al., 2007).

A biodigestão tornou-se atrativa a partir do momento que desenvolveram-se reatores de alto desempenho e com baixo tempo de detenção hidráulico (TDH), como o caso do reator UASB (Reator Anaeróbio de Fluxo Ascendente e de Manta de Lodo), que pode ser intensamente utilizado no caso da vinhaça (GRANATO, 2003).

A eficiência da biodigestão dependerá de condições operacionais específicas, como: pH, temperatura, tipo de substrato utilizado, concentração de sólidos e o TDH (DÖLL & FORESTI, 2010; CRUZ et al., 2010).

Segundo Von Sperling (2005), em reatores UASB, o efluente é conduzido da parte inferior do reator por fluxo ascendente até a manta de lodo, onde os micro-organismos presentes fazem a conversão da matéria orgânica em CH_4 e CO_2, sendo o efluente coletado na parte superior e os gases gerados captados na parte central do separador trifásico.

Nacheva et al. (2009), obtiveram resultados satisfatórios ao utilizarem um reator UASB mesofílico no tratamento de vinhaça com alimentação de 16 kg DBO $m^{-3}dia^{-1}$. Pôde-se remover mais de 90% da carga orgânica, separação de sólidos e neutralização do efluente final.

Dentre as diferentes maneiras que o biogás oriundo dos processos anaeróbios pode ser utilizado, as principais citadas por Holm-Nielsen, AlSeadi & Oleskowicz-Popiel (2009) são: A geração de calor ou vapor, a produção de energia elétrica através da cogeração, o uso como combustível para veículos, a produção de químicos e injeção em redes de gás natural.

Algumas possibilidades de uso do biogás na indústria sucroenergética também podem ser citadas, como: operar turbinas movidas a gás associadas a um gerador de energia, substituir parte do combustível utilizado na agroindústria durante a época de colheita ou utilizar em caldeiras para a geração de vapor (CORTEZ et al., 2007; SZYMANSKI et al., 2010; CHRISTOFOLETTI et al., 2013).

Em estudo de caso realizado por Nogueira et al. (2015), calculou-se a viabilidade de implantação em destilarias do processo de geração de energia elétrica a partir da queima de biogás proveniente da vinhaça. Os cálculos foram feitos analisando três tipos de operação e cinco diferentes cenários foram considerados, variando do mais otimista para o mais

pessimista (melhor e pior preço de venda de energia). A viabilidade foi encontrada em praticamente todos os cenários na planta estudada, com *payback* menor que 20 anos, para investimento inicial de instalação de uma planta para a geração de 1 MW de US$ 2.122.115,38.

Portanto, o uso de vinhaça para biodigestão apresenta um cenário promissor, no qual o metano, um coproduto de sua digestão, pode ser produzido em quantidade significante para geração de energia (NOGUEIRA et al., 2015).

6. MATERIAL E MÉTODOS

6.1. Tipo da Pesquisa

A pesquisa realizada foi de abordagem quantitativa, do tipo aplicada, que pode ser classificada de acordo com os objetivos como: pesquisa explicativa, que de acordo com Gil (2007), deve se preocupar com os fatores determinantes ou contribuintes para ocorrência de fenômenos. Quanto aos procedimentos adotados, a pesquisa é classificada como experimental.

6.2. Instalações Experimentais

O presente estudo foi realizado no Setor de Açúcar e Álcool, nas dependências do Departamento de Agroindústria, Alimentos e Nutrição (LAN), da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" (ESALQ) da Universidade de São Paulo (USP).

6.3. Vinhaça

A vinhaça coletada foi oriunda do processo de produção de etanol a partir de melaço de cana-de-açúcar e na indústria foi submetida ao processo de concentração em evaporador tipo múltiplo-efeitos.

O material utilizado foi proveniente da Usina Iracema, do grupo São Martinho, localizada na cidade de Iracemápolis/SP.

Esse material inicialmente foi reconcentrado no laboratório até aproximadamente 50º Brix e armazenado em *freezer* sob temperatura de -10 ºC.

Antes de ser utilizada no processo de biodigestão, a vinhaça era diluída em água filtrada, até a obtenção da DQO desejada. Para isso, estabeleceu-se uma curva de regressão linear (R^2=0,995) entre a DQO e a concentração de sólidos totais em suspensão, determinada por refratometria em graus Brix.

A escolha de diluir-se a vinhaça com base na refratometria foi devido ser uma medida simples e rápida. Essa técnica é utilizada amplamente para avaliar o desenvolvimento das fermentações nas indústrias, conforme ocorre a atenuação de brix, observa-se que os açúcares são consumidos pelas leveduras (HORII; BLUMER & RIBEIRO, 1999).

A determinação do Brix foi realizada por refratômetro digital, de leitura automática, com correção automática da temperatura, com valor final expresso em 20 ºC.

Após a diluição, o pH da vinhaça era corrigido até a faixa entre 6,8 e 7,8 com adição de $NaHCO_3$.

Foram realizadas duas coletas de vinhaça concentrada junto a usina: A primeira em 18 de novembro de 2015 e a segunda em 24 de agosto de 2016. A primeira vinhaça coletada foi utilizada no experimento de biodigestão no período de 21 de junho até 28 de agosto de 2016, a segunda vinhaça coletada foi utilizada no período de 29 de agosto até 30 de setembro de 2016.

6.4. Inóculo

O inóculo empregado foi obtido do lodo granular de um reator anaeróbio termofílico em operação da Usina São Martinho, localizada em Pradópolis/SP. O volume de inóculo utilizado foi correspondente à metade do volume do reator.

6.5. Reatores

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). Os reatores contaram com separadores trifásicos e saída para o biogás em sua parte superior. Para controle da temperatura de 38 °C (± 2 °C), os reatores foram encamisados e utilizaram água aquecida por uma caldeira com acionamento da circulação da água automatizado por controladores de temperatura do tipo *Tic-17 RGTi®*.

Os reatores contaram 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 (Figuras 2 e 3).

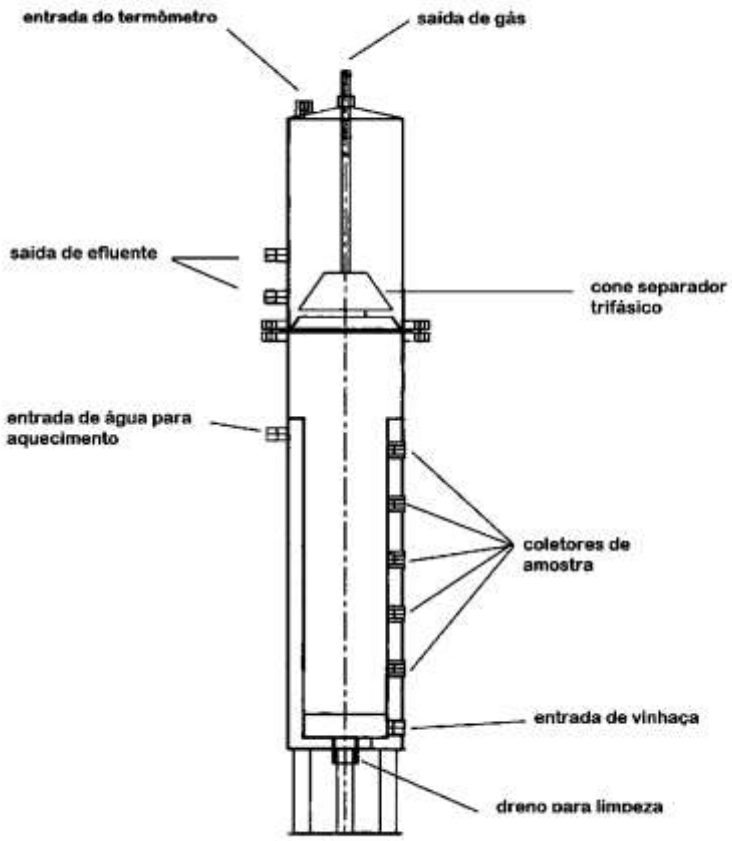

Figura 2 - Representação esquemática do reator

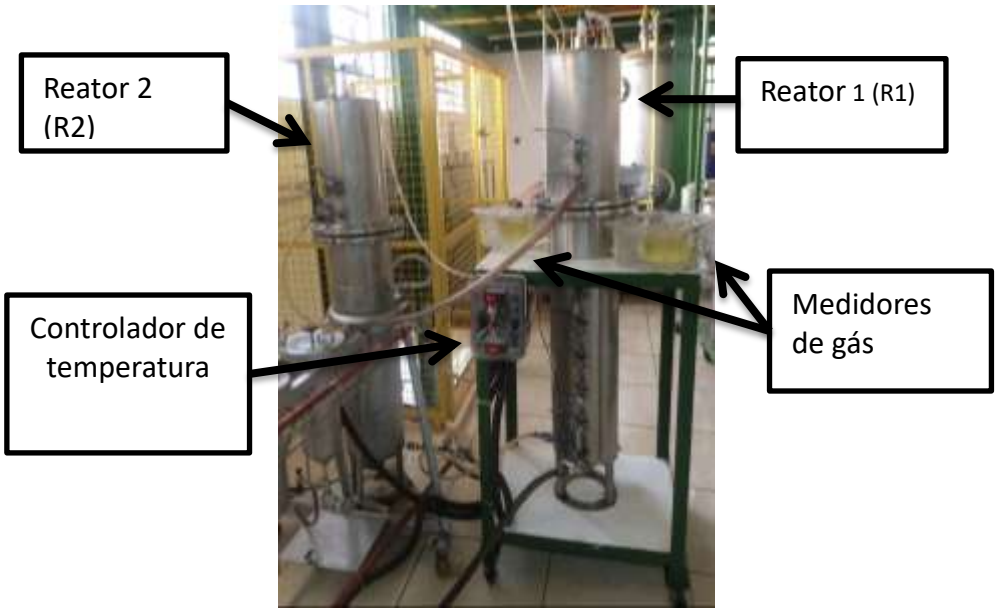

Figura 3 - Foto das instalações experimentais

6.6. Condução dos ensaios de biodigestão

A condução dos ensaios de biodigestão da vinhaça ocorreu de forma contínua, durante 103 dias, com alimentação em batelada. Cada reator foi alimentado diariamente com o volume de 5 litros de vinhaça.

Para avaliar a remoção de matéria orgânica e produção de biogás, foram utilizadas nove fases, em que se realizou a adaptação do inóculo para ambos os reatores até a fase 3. A partir desta, o reator 1 (R1) continuou recebendo incremento gradativo da concentração de DQO ao longo das fases, enquanto que o reator 2 (R2) manteve-se a concentração de 30 g L^{-1} até o fim do experimento. Esta concentração foi escolhida como controle devido a vinhaça *in natura* apresentar esse valor (informação cedida pela empresa) no momento da coleta.

A escolha de mudança de fase sempre foi feita quando estabilizava-se a conversão da DQO em biogás e a concentração de ácidos orgânicos no reator era menor que 500 mg CH_3COOH L^{-1}, como recomendado por Gerardi (2003). As condições operacionais dos reatores estão descritas na Tabela 2.

Tabela 2 - Condições operacionais dos reatores R1 e R2 durante as fases 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 e 9

Parâmetros		**Fases**																		**CV(%)**	**F**
		1		2		3		4		5		6		7		8		9			
DQO (mg L^{-1})	R1	26.429	efA	23.927	fA	27.277	efA	32.210	deA	34.107	cdA	36.838	bcdA	39.077	abcA	42.003	abA	44.060	aA	30,14	30,34**
	R2	26.429	aA	29.283	aB	25.290	aA	28.630	aA	29.823	aA	29.309	aB	29.586	aB	29.270	aB	29.744	aB	13,18	1,34 ns
COV (g DQO (L d)$^{-1}$	R1	3,84	efA	3,5	fA	3,89	efA	4,66	edA	4,94	cdA	5,33	bcdA	5,66	abcA	6,08	abA	6,38	aA	8,96	33,59**
	R2	3,83	aA	3,95	aA	3,54	aA	4,25	aA	4,32	aB	4,19	aB	4,28	aB	4,24	aB	4,31	aB	11,82	11,82*
TDH (h)	R1	24	-	24	-	24	-	24	-	24	-	24	-	24	-	24	-	24	-	-	-
	R2	24	-	24	-	24	-	24	-	24	-	24	-	24	-	24	-	24	-	-	-
Tempo de operação (d)		11	-	16	-	26	-	12	-	8	-	7	-	7	-	11	-	5	-	-	-

DQO: Demanda Química de oxigênio; COV: Carga Orgânica Volumétrica; TDH: Tempo de Detenção Hidráulica; Letras minúsculas iguais na mesma linha ou maiúsculas na mesma coluna diferem ao Teste de Tukey a 5%; *: significativo a 1% de probabilidade (p<0,01); **: significativo a 5% de probabilidade (p<0,05); ns: não significativo.

6.7. Exames e determinações fisico-químicas

A avaliação do desempenhos dos tratamentos foi baseada no monitoramento dos afluentes (vinhaças), efluentes, lodo e do biogás gerado em cada reator. A Tabela 3 sintetiza as determinações analíticas e suas respectivas frequências.

Tabela 3 – Determinações analíticas

Determinações analíticas	Frequência	Referências
	Afluentes e efluentes	
pH	2 vezes/ semana	APHA; AWWA & WEF, 2012
DQO	2 vezes/ semana	APHA; AWWA & WEF, 2012
Alcalinidade total, parcial, intermediária e relação AI/AP	2 vezes/ semana	JENKINS et al., 1983
Teor de sólidos	Quinzenalmente	APHA; AWWA & WEF, 2012
Ácidos voláteis totais (AVT)	2 vezes/ semana	DILALLO &ALBERTSON,1961
Ácidos graxos voláteis (AGV)	Quinzenalmente	LAZARO, 2009
Teor de açúcares e glicerol	Quinzenalmente	EITH et al., 2006
Teor de cátions	Quinzenalmente	EITH et al., 2006
Teor de ânions	Quinzenalmente	EITH et al., 2006
	Lodo	
Teor de sólidos	quinzenalmente	APHA; AWWA & WEF, 2012
Atividade metanogênicas específica	Inóculo inicial e final	ROCHA, 2003; Aquino et al., 2007; SILVA et al., 2013
	Biogás	
Volume	Diariamente	*Wet tip gas meter®*
Composição	Duas vezes por semana	SHIMADZU, 2014

6.7.1. Potencial hidrogeniônico

O pH dos afluentes e efluentes foi determinado em potenciômetro da marca *Metrohm®* modelo 827, seguindo recomendações do *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* (APHA; AWWA & WEF, 2012). As amostras foram mensuradas na forma bruta, em seguida da coleta no reator.

6.7.2. 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; AWWA & WEF, 2012). As análises de DQO foram realizadas para caracterização da vinhaça afluente e efluente de ambos reatores.

A eficiência de remoção (E) de DQO foi determinada pela equação 1 (COLARES & SANDRI, 2016):

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

6.7.3. Alcalinidade total, parcial, intermediária e relação AI/AP

Com a finalidade de monitorar o desempenho dos reatores quanto à geração e consumo de ácidos orgânicos, foram determinados os 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 segundo o método titulumétrico com detecção potenciométrica (JENKINS et al., 1983).

Os resultados obtidos foram expressos em miligramas de carbonato de cálcio por litro (mg $CaCO_3$ L^{-1}).

6.7.4. Teor de sólidos

Foram realizadas análises mensais de Sólidos Totais (ST), Sólidos Totais Fixos (STF) e Sólidos Totais Voláteis (STV) no lodo dos reatores. O método utilizado foi por gravimetria, descrito pelo *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* (APHA; AWWA & WEF, 2012).

6.7.5. Ácidos voláteis totais

O teor de ácidos voláteis totais (AVT) dos efluentes foi determinado como parâmetro de controle do processo dos reatores. O método empregado foi o titulométrico descrito por Dilallo & Albertson (1961). Resultados foram expressos em mg CH_3COOH L^{-1}.

6.7.6. Ácidos graxos voláteis

Os ácidos graxos voláteis (AGV) dos efluentes foram determinados por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), utilizando o cromatógrafo *Shimadzu*® modelo *UFLC Prominence*, com solução eluente de ácido sulfúrico 0,005M, coluna *Aminex HPX-87H* (300mmx 7,8mm; Bio-Rad) operando sob temperatura de 64 ºC, com fluxo de 0,4 $mL.min^{-1}$ e detector ultravioleta com arranjo de diodos em comprimento de onda de 208 nm. Seguiu-se a metodologia descrita por Lazaro (2009) para o preparo das amostras.

Os analitos avaliados foram: ácido acético, ácido propiônico, ácido butírico, ácido iso-butírico, ácido lático, ácido fórmico, ácido succínico e ácido cítrico e seus respectivos resultados foram expressos em miligramas por litro (mg L^{-1}).

6.7.7. Teor de açúcares e glicerol

O glicerol e os açúcares: Sacarose, glicose e frutose foram mensurados por cromatografia iônica, seguindo-se a metodologia descrita pelo fabricante (EITH et al., 2006).

Utilizou-se o cromatógrafo de íons modelo IC 930 Compact da *Metrohm*®, equipado com a coluna Metrosep Carb 1 150/4.0, à 30 ºC, com solução eluente de hidróxido de sódio 100 mM e acetato de sódio, fluxo de 0,5 mL min^{-1}. As amostras foram diluidas 200 vezes e filtradas (0,45 µm). O volume de amostra injetado foi de 20 µL.

6.7.8. Teor de cátions

Os cátions: Sódio, potássio, amônio, ferro, magnésio e cálcio foram determinados por cromatografia iônica para os afluentes e efluentes dos reatores seguindo-se a metodologia descrita pelo fabricante (EITH et al., 2006).

Foi utilizado o cromatógrafo de íons modelo IC 930 Compact da *Metrohm*®, equipado com a coluna Metrosep C4 250/4.0, a 30 ºC, com solução eluente de ácido tartárico 7,5 mM, ácido dipicolínico 0,135 mM e ácido ascórbico 3 mM, com fluxo de 0,9 mL min^{-1}. As amostras foram diluidas 200 vezes e filtradas (0,45 µm). O volume de amostra injetado foi de 20 µL.

6.7.9. Teor de ânions

Os ânions: cloreto, nitrato, nitrito, fosfato e sulfato presentes nos afluentes e efluentes foram avaliados por cromatografia iônica seguindo-se a metodologia descrita pelo fabricante (EITH et al., 2006).

Foi utilizado o cromatógrafo de íons modelo IC 930 Compact da *Metrohm®*, equipado com a coluna Metrosep A Supp 5 250/4.0, a 25 ºC. O eluente utilizado foi a solução de carbonato de sódio 3,2 mM e bicarbonato de sódio 1,0 mM sob fluxo de 0,7 mL min^{-1}. A solução de supressão utilizada foi de ácido sulfúrico 100 mM. As amostras foram diluidas 200 vezes e filtradas (0,45 µm). O volume de amostra injetado foi de 20 µL.

6.7.10. Atividade metanogênica específica

A Atividade Metanogênica Específica (AME) dos lodos dos reatores foi avaliada no fim do experimento. Esta análise teve o objetivo de avaliar a capacidade máxima de produção de metano pelo consórcio de micro-organismos.

Os ensaios foram realizados com soluções descritas por diversos autores (ROCHA, 2003; AQUINO et al., 2007; SILVA et al., 2013), cujas composições estão descritas na Tabela 4.

Tabela 4 - Soluções utilizadas para a caracterização da atividade metanogênica específica dos lodos

Solução I – Macronutrientes (g L^{-1})	
$NaHCO_3$	1,0
KH_2PO_4	0,65
K_2HPO_4	0,15
NH_4Cl	0,5
$MgCl_2$	0,1
$CaCl_2.2H_2O$	0,1
Extrato de levedura	0,05
Solução II – Ácidos orgânicos (mL L^{-1})	
Ácido Acético Glacial (100%)	3,8
Ácido Propiônico (99%)	1,0
Ácido Butírico (99%)	1,04

Para os ensaios de AME, utilizaram-se frascos de vidro de 0,5 L de volume reacional como reatores. O *headspace* foi mínimo (aproximadamente 50 mL) para que o biogás gerado

fosse direcionado para um sistema de medida de gás, onde encontra-se uma solução de NaOH 30 g L^{-1}, com solução indicadora de fenoftaléina alcóolica, que era responsável pela captura do CO_2 presente no biogás, dessa forma o volume de gás medido era composto por CH_4.

Os reatores continham 497 mL de Solução (I) e 2,92 mL de Solução (II). O lodo metanogênico adicionado aos reatores foi previamente caracterizado para seu teor de Sólidos Totais Voláteis (STV), conforme descrito no Item 6.7.4. O lodo foi diluído para que apresentasse a concentração desejável de 2,5 g STV L^{-1} no volume reacional do reator de AME. Os experimentos foram conduzidos em banho-maria sob agitação a 38 ºC.

A determinação da AME foi obtida em produção de metano por matéria orgânica (DQO), como dado pela Equação 2 (SOARES & HIRATA, 1999):

$$AME = (R*24) / (38,5 * STV) \qquad \text{(Equação 2)}$$

Onde,

AME: atividade metanogênica específica ($gDQO_{CH4}$ $gSTV.d^{-1}$)
R: taxa de produção de metano (L_{CH4} h^{-1})
24: fator de conversão de horas para dias
38,5: fator de conversão de volume de CH_4 para gDQO
STV: Sólidos Totais Solúveis (g L^{-1})

6.7.11. Volume do biogás

A medição do volume de biogás foi realizada com o 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 em um contador.

6.7.12. Composição do biogás

A qualidade do biogás foi analisada mediante a determinação da concentração de metano em relação ao biogás. Essa análise foi feita utilizando a 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”. Seguiram-se as

recomendações do fabricante (SHIMADZU, 2014) para a realização das análises: Nitrogênio (N_2) como gás de arraste, com fluxo constante de 10,0 mL min^{-1}. A coluna utilizada foi a SH-Rt-Q-BOND, com temperatura de 150° C e fluxo de 2,00 mL min^{-1}. A temperatura do injetor e do detector foi de 250 ºC. A aquisição dos dados foi realizada utilizando o *software GC Solution*®.

6.8. Delineamento Experimental e Análise Estatística

O delineamento experimental adotado foi o inteiramente casualizado no esquema fatorial 2x9. Os dados foram submetidos ao teste F da análise da variância e posteriormente ao teste de Tukey, ao nível de 5% de significância, com auxílio do software *SAS 9.8*®.

Quando necessário, para atender as exigências do modelo estatístico, algumas variáveis tiveram seus dados transformados utilizando Log(y+1). As variáveis que foram transformadas são: Alcalinidade total, alcalinidade intermediária, alcalinidade parcial, relação ai/ap e ácidos voláteis totais.

A análise de pH dos reatores foi realizada a partir da estatística descritiva (média, máximo, mínimo e desvio padrão).

7. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A seguir, serão apresentados os resultados da caracterização dos materiais empregados no estudo: lodo metanogênico e vinhaça, que correspondem a primeira parte do trabalho, em seguida, aqueles relativos à interpretação da avaliação do desempenho dos reatores na biodigestão da vinhaça.

7.1. Caracterização preliminar

7.1.1. Substrato

Análises físico-químicas foram realizadas nas duas vinhaças que foram coletadas na Usina Iracema, pertencente ao Grupo São Martinho, localizada na cidade de Iracemápolis – SP.

A primeira vinhaça coletada apresentou a concentração de sólidos solúveis totais de 16,8º Brix. Já a segunda vinhaça, apresentou 11,6º Brix.

Foi definido diluir ambas as vinhaças à concentração de 3,2º Brix, por esta ser a concentração na primeira coleta da vinhaça *in natura* (antes de passar pelo processo de concentração em evaporador de múltiplos-efeitos). Esse valor está de acordo com o que foi descrito por Carvalho (2010), em que a concentração de sólidos solúveis totais da vinhaça na indústria sucroenergética varia entre 3 e 5º Brix.

Na Tabela 5 encontram-se os valores obtidos para as duas vinhaças coletadas.

Tabela 5 - Composição das vinhaças utilizadas no experimento

Parâmetros	1ª Coleta	2ª Coleta
Sólidos solúveis (º Brix)	3,20	3,20
pH	4,34	5,03
Alcalinidade total (mg $CaCO_3$ L^{-1})	104,45 ± 36,80	781,29 ± 52,11
Ácidos voláteis totais (mg CH_3COOH L^{-1})	8.483,95	8.043,39
DQO (mg L^{-1})	28.956,00 ± 739,20	29.348,67 ± 652,45
Sólidos totais (mg L^{-1})	36.820,00 ± 537,40	28.080,00 ± 905,10
Sólidos voláteis totais (mg L^{-1})	29.230,00 ± 622,25	19.195,00 ± 601,04
Sólidos fixos totais (mg L^{-1})	7.590,00 ± 84,85	8.885,00 ± 304,06
Glicerol (mg L^{-1})	1.953,71 ± 3,40	2.047,14 ± 3,69
Glicose (mg L^{-1})	88,04 ± 8,84	58,34 ± 9,27
Frutose (mg L^{-1})	129,62 ± 12,94	94,65 ± 13,76
Sacarose (mg L^{-1})	283,12 ± 15,89	153,42 ± 58,34
Ácido cítrico (mg L^{-1})	572,14 ± 223,89	ND
Ácido succínico (mg L^{-1})	10.584,52 ± 897,14	14.833,54 ± 468,04
Ácido lático (mg L^{-1})	9.085,26 ± 4.124,49	23.070,24 ± 1.225,50
Ácido fórmico (mg L^{-1})	ND	ND
Ácido acético (mg L^{-1})	7.644,66 ± 2.493,99	12.563,16 ± 4.002,08
Ácido propiônico (mg L^{-1})	7.906,68 ± 847,73	11.786,16 ± 4.664,02
Ácido isobutírico (mg L^{-1})	ND	ND
Ácido butírico (mg L^{-1})	3.837,91 ± 56,55	ND
Cloreto (mg L^{-1})	2.517,74 ± 38,87	2.433,94 ± 2,32
Nitrito (mg L^{-1})	ND	ND
Nitrato (mg L^{-1})	576,43 ± 2,54	571,26 ± 0,85
Amônio (mg L^{-1})	39,72 ± 10,91	14,38 ± 4,62
Fosfato (mg L^{-1})	88,39 ± 1,24	ND
Sulfato (mg L^{-1})	2.978,12 ± 20,77	3.517,97 ± 283,00
Sódio (mg L^{-1})	222,38 ± 13,97	442,19 ± 26,65
Potássio (mg L^{-1})	18.073,31 ± 40,24	19.353,22 ±143,29
Magnésio (mg L^{-1})	4.696,91 ± 205,92	4.162,86 ± 533,86
Cálcio (mg L^{-1})	3.277,43 ±183,96	3.774,57 ± 363,75

Valores médios de três repetições ± desvio padrão; ND= não detectável

O pH em ambas as vinhaças apresentou-se ácido (4,34 na primeira coleta e 5,03 na segunda). O pH baixo (entre 3,5 e 5) é uma característica da vinhaça (CHRISTOFOLETTI et al., 2013), porém, para o tratamento anaeróbio, é desejável correção do pH para a faixa ideal de trabalho, que varia entre 6,6 a 7,4 (CHERNICHARO, 2007).

A pequena variação na DQO entre as vinhaças diluídas (1,35%) foi essencial para a subsequente condução do estudo, devido às mudanças bruscas na concentração de matéria

orgânica serem prejudiciais ao processo de biodigestão, pois podem causar estresse ao consórcio microbiano.

A vinhaça apresenta elevado teor de DQO, que geralmente varia entre 20 e 35 g L^{-1} (COSTA et al., 1986; SZYMANSKI; BALBINOT & NAGEL,2010), portanto, a DQO escolhida para o tratamento controle (29 g L^{-1}) está dentro do que é relatado pela literatura.

Apesar de as vinhaças analisadas apresentarem DQOs semelhantes, o teor de sólidos foi distinto. A concentração de sólidos totais e sólidos voláteis totais foi maior na vinhaça coletada em 2015 (31,13% e 52,28%, respectivamente), porém, a concentração de sólidos fixos totais foi 17,06% maior na vinhaça coletada em 2016.

O glicerol é produto secundário mais abundante produzido pelas leveduras responsáveis pela fermentação. A levedura produz glicerol com o intuito de fazer o balanço redox, onde a frutose é convertida em gliceraldeído (que origina etanol e dióxido de carbono) e dihidroxiacetona (DHA), que, por sua vez, é convertida em glicerol (LEHNINGER; NELSON & COX, 2000).

A presença de glicerol na vinhaça pode ser fundamentada pela produção natural pelas leveduras em seu crescimento celular e produção de ácido succínico. Seu aumento pode ser justificável em situações de estresse, como a pressão osmótica, causada por elevadas concentrações de açúcares ou sais no mosto, presença de contaminantes bacterianos e presença de sulfitos (RODELLA et al., 1983).

Nos processos de metabolismo microbiano, o glicerol atua como fonte solúvel e prontamente disponível de carbono para micro-organismos quimiorganotróficos (PRATA, et al., 2001).

Assim como o glicerol, os carboidratos possuem grande importância ao processo de biodigestão anaeróbia, pois são rapidamente metabolizados (MADIGAN et al., 2012). Os açúcares residuais totais avaliados (sacarose, glicose e frutose) apresentam valores distintos. Na vinhaça de 2015 a concentração foi 61,19% maior (500,78 mg L^{-1}) do que em relação a vinhaça coleta em 2016 (306,41 mg L^{-1}).

Os ácidos orgânicos encontrados na vinhaça são originários do processo fermentativo realizado pelas leveduras e por contaminantes bacterianos. Entre ambas as vinhaças coletadas, o ácido acético é o que merece maior destaque, uma vez que é o precursor direto das árqueias metanogênicas acetoclásticas, que são responsáveis por cerca de 70% da produção de metano em reatores anaeróbios (SPEECE, 1996; LONGO, 2015).

As concentrações de ácido acético foram: 7.644,66 mg L^{-1} e 1.2563,16 mg L^{-1} para a primeira e a segunda coleta, respectivamente.

O ácido lático presente nas vinhaças (9.085,26 mg L^{-1} na primeira coleta e 23.070,24 mg L^{-1} na segunda coleta) é proveniente da contaminação bacteriana presente na fermentação.

Bactérias láticas são responsáveis pela degradação da sacarose e formação do ácido lático (OLIVA-NETO & YOKOYA, 1997; FREDERICK, 1994). O que resulta em perda de açúcares e possível queda no desempenho da fermentação, pois as bactérias contaminantes podem promover a lise (RIBÉREAU-GAYON, 2005) e o aumento da floculação nas leveduras (CHERUBIN, 2003; RAVNÖ & PURCHASE, 2006).

A concentração de ácidos voláteis totais na segunda vinhaça (8043,39 mg L^{-1}) foi similar a primeira coleta (8.043,39 mg L^{-1}). A presença de ácidos orgânicos é desejada, pois também podem ser utilizados como substrato pelos micro-organismos envolvidos na biodigestão.

Quanto ao íon fosfato, a primeira vinhaça apresentou concentração de 88,39 mg L^{-1}, enquanto que na segunda vinhaça coletada não foi detectada a presença do mesmo. O que difere do que foi relatado por Christofoletti et al. (2013), que mencionam a concentração média de 190 mgL^{-1} para a vinhaça proveniente da cana-de-açúcar.

O íon nitrito não foi detectado em ambas as vinhaças, valores menores que 0,01 mg L^{-1} foram relatados por Longo (2015). Concentrações entre 87,38 e 462,22 mg L^{-1} de nitrato também foram encontradas pelo mesmo autor, valores similares aos dos materiais em estudo (576,43 mg L^{-1} na primeira coleta e 571,26 mg L^{-1} na segunda coleta de vinhaça, respectivamente). Já o amônio, teve concentração 2,8 vezes maior na primeira vinhaça (39,72 mg L^{-1}) em relação à segunda (14,38 mg L^{-1}).

A concentração de sulfato na segunda vinhaça coletada (3.517,97 mg L^{-1}), foi 18,13% maior do que na primeira (2.978,12 mg L^{-1}), valores próximos aos descritos por Lens et al. (1998), que afirma que a vinhaça contém concentrações elevadas de sulfato, geralmente variando entre 500 e 3.000 mg SO_4^{2-} L^{-1}. As altas concentrações de sulfato na vinhaça são decorrentes do tratamento ácido do levedo, que utiliza ácido sulfúrico para o controle de contaminações bacterianas na fermentação (BASSO et al., 2011; BROWN et al., 2013).

Torna-se importante salientar que altas concentrações de sulfato no afluente proporcionam o crescimento de bactérias redutoras de sulfato (BRS), responsáveis pela produção de sulfeto de hidrogênio (H_2S), que é um agente altamente corrosivo, tóxico e com odor desagradável (MATTORANO & MERINAR, 1999; MUYZER; STAMS, 2008). Além disso, as BRS podem comprometer o consórcio microbiano, devido ao consumo de substratos

como o propionato e o H_2, que são utilizados por bactérias acetogênicas e arqueas metanogênicas hidrogenotróficas, respectivamente.

A fração DQO:Sulfato é relatada como interferente direto na degradação da matéria orgânica por processos anaeróbios (McCARTNEY & OLESZKIEWICZ, 1993). A relação DQO:sulfato de 0,67 é considerada como o limite teórico da completa remoção da matéria orgânica nos processos anaeróbios. Para relações DQO:Sulfato maiores que 0,67 a remoção de toda a matéria orgânica só acontecerá em associação dos processos de metanogênese e sulfetogênese (LENS et al., 1998; GODOI; DAMIANOVIC & FORESTI, 2015). Nessas condições, as BRS são capazes de oxidar parcialmente ácidos voláteis produzidos durante a acidogênese, produzindo acetato, que pode ser utilizado pelas arqueas metanogênicas (DAMIANOVIC & FORESTI, 2009).

No presente estudo a relação DQO:Sulfato da vinhaça utilizada no período de 06 de junho até 28 de agosto foi de 9,72, e no período que compreendeu 29 de agosto até 30 de setembro de 2016 a relação foi de 8,34.

Em relação aos micronutrientes, o potássio foi encontrado em maior concentração (18.073,31 e 19.353,22 mg L^{-1}, para primeira e segunda coleta, respectivamente), seguido de magnésio (4.696,91 e 4.162,86 mg L^{-1}, para primeira e segunda coleta, respectivamente), cálcio (3.277,43 e 3.774,57 mg L^{-1}, para primeira e segunda coleta, respectivamente) e sódio (222,38 e 442,19 mg L^{-1}, para primeira e segunda coleta, respectivamente), em ambas as vinhaças analisadas. A presença destes cátions pode ser avaliada como tóxica ou estimuladora ao processo biológico, o dependerá diretamente da concentração dos sais e do grau de adaptação da biomassa (McCARTY, 1964; LETTINGA et al., 1996; LONGO, 2015).

7.1.1. Inóculo

A biomassa utilizada para a partida e operação nos reatores correspondeu ao lodo previamente granulado de um reator termofílico em operação no tratamento anaeróbio de vinhaça *in natura* (Figura 4). Adicionaram-se 20 litros de lodo em cada reator.

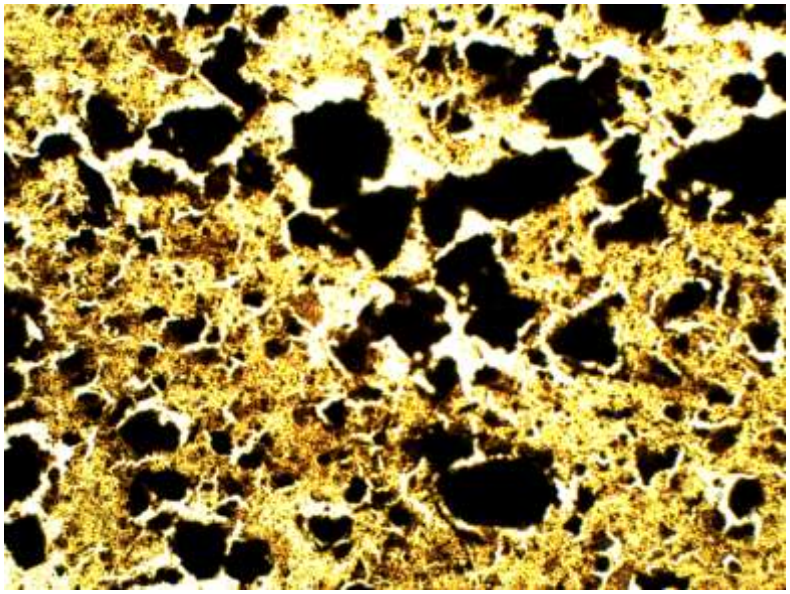

Figura 4 - Foto de microscopia óptica do lodo coletado (aumento de 40 vezes)

A caracterização do teor de sólidos do lodo encontra-se na Tabela 6.

Tabela 6 - Teor de sólidos no lodo granular

Parâmetros	**Lodo (g L^{-1})**
Sólidos totais (ST)	29,00 ± 6
Sólidos totais voláteis (STV)	18,00 ± 4,36
Sólidos totais fixos (STF)	11,00 ± 2,65

A concentração de sólidos voláteis totais presente no inóculo correspondeu a 62,06% do conteúdo de sólidos do lodo, enquanto a concentração de sólidos fixos totais correspondeu a 37,94%.

7.2. Desempenho dos reatores na biodigestão da vinhaça

7.2.1. Carga orgânica

As cargas orgânicas volumétricas (COV) médias aplicadas no reator 1 foram crescentes ao longo das fases. Durante as fases 1, 2 e 3 realizou-se a adaptação do lodo e as COV aplicadas foram 3,84; 3,5; 3,89 g DQO $(L\ d)^{-1}$; respectivamente (Tabela 2). Nas fases 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 e 9 as COV aplicadas foram 4,66; 4,94; 5,33; 5,66; 6,08 e 6,38 g DQO $(L\ d)^{-1}$ ($p<0,01$), respectivamente.

No reator controle (R2), as COV médias aplicadas nas fases de adaptação 1, 2 e 3 foram 3,83; 3,95 e 3,54 g DQO (L d)$^{-1}$, respectivamente. Para as fases 4, 5, 6, 7, 8 e 9, as COV aplicadas foram 4,25; 4,32; 4,19; 4,28; 4,24 e 4,31, respectivamente ($p>0,01$).

Quando comparados os reatores, observou-se que as fases 1, 2, 3 e 4 não apresentaram diferença significativa ($p>0,05$). A partir da fase 5, a COV no reator 1 manteve-se crescente ao longo do ensaio ($p<0,01$), enquanto que em R2 manteve-se a mesma COV até o final do ensaio ($p>0,05$).

No presente estudo a COV máxima aplicada foi de 6,38 g DQO (L d)$^{-1}$, valor adequado para o tipo de reator escolhido, que Segundo Chernicharo (2007), as COV tipicamente aplicadas em reatores do tipo UASB são inferiores a 15 g DQO (L d)$^{-1}$.

Em estudo realizado por Longo (2015) tratando vinhaça em reator do tipo UASB, o reator foi submetido a cargas orgânicas volumétricas crescentes de 0,7 a 7 g DQO (L d)$^{-1}$, porém observou-se estabilidade do sistema somente entre as COV de 0,7 e 4,8 g DQO (L d)$^{-1}$, quando foram aplicadas cargas entre 5,3 e 7,0 g DQO (L d)$^{-1}$, registrou-se disturbios no processo e queda significativa na eficiência de remoção de DQO para 65,8%. Vale ressaltar que no trabalho realizado por Longo (2015), aumentou-se a COV em função do aumento da taxa hidráulica e manteve-se a DQO afluente de 20.090 mg L^{-1} durante todo o processo.

No atual estudo, manteve-se a taxa hidráulica e variou-se a DQO do afluente (Tabela 7) ao longo do tempo.

Na Tabela 7 encontram-se os valores médios da DQO afluente aplicada aos reatores R1 e R2 ao longo das fases de 1 a 9.

Tabela 7 - Concentração média de matéria orgânica aplicada aos reatores expressa em DQO

	DQO Afluente mg L^{-1}			
Fase	**R1**		**R2**	
1	26.429	efA	26.429	aA
2	23.928	fA	29.284	aB
3	27.277	efA	25.290	aA
4	32.211	deA	28.630	aA
5	34.107	cdA	29.823	aB
6	36.838	bcdA	29.309	aB
7	39.077	abcA	29.586	aB
8	42.003	abA	29.270	aB
9	44.060	aA	29.740	aB
CV (%)	30,1		13,1	

Letras minúsculas diferentes na mesma coluna ou maiúsculas na mesma linha diferem ao teste de Tukey a 5%;
CV: Coeficiente de variação

Os valores médios de DQO observados no afluente do R1 foram 26.429, 23.927, 27.277 mg L^{-1} durante as fases de adaptação (1, 2 e 3, respectivamente). Para as fases de 4 a 9, os valores médios de DQO foram 32.210; 34.107; 36.838; 39.077; 42.003 e 44.060, respectivamente ($p<0,05$). É importante salientar que a DQO da última fase foi 66,71% maior que a fase inicial. O que comprova que o acréscimo de carga orgânica aplicada ao reator ocorreu em função do aumento da concentração da vinhaça afluente, e não do aumento da taxa hidráulica.

A DQO média utilizada na última fase do reator tratamento (44.060 mg L^{-1}) correspondeu a 5,02 Brix da vinhaça, o equivalente a 43,3% da concentração da vinhaça coletada no concentrador de multiplos-efeitos (11,6 Brix).

Deve-se frisar que a concentração de DQO afluente na última fase (44.060 mg L^{-1}) é superior aos valores utilizados por outros autores, como: Longo (2015), que realizou biodigestão de vinhaça em reator do tipo UASB e trabalhou com DQO afluente média de 20.000 mg L^{-1}; Montalvo et al. (2010), que realizou biodigestão de vinhaça com DQO afluente variando entre 1 e 24 g L^{-1}; Souza et al. (1992), que trabalhou na faixa termofílica na biodigestão de vinhaça utilizando reator UASB e DQO media de 31,5 g L^{-1}.

No afluente de R2, os valores médios de DQO observados foram 26.429; 29.283 e 25.290 mg L^{-1}, durante as fases de adaptação 1, 2 e 3, respectivamente ($p>0,05$). Nas fases 4, 5, 6, 7, 8 e 9 a DQO para R2 foi 28.630; 29.823; 29.309; 29.586; 29.270 e 29.744 mg L^{-1}, respectivamente. Mesmo com alteração da vinhaça, que foi utilizada a partir da fase 5, manteve-se a faixa de DQO no afluente sem diferença significativa ($p>0,05$) durante todas as fases, o que demonstra a manutenção do valor da concentração de matéria orgânica dentro do planejado para o tratamento controle.

Quando comparados os reatores R1 e R2 ao longo das fases quanto a DQO afluente, registrou-se que as fases 1, 3 e 4 não diferiram estatisticamente ao nível de 5%, já durante todas as demais fases (2, 5, 6, 7, 8 e 9) R1 apresentou as maiores médias ($p<0,05$).

A Figura 5 registra a variação da DQO afluente nos reatores R1 e R2 ao longo das nove fases.

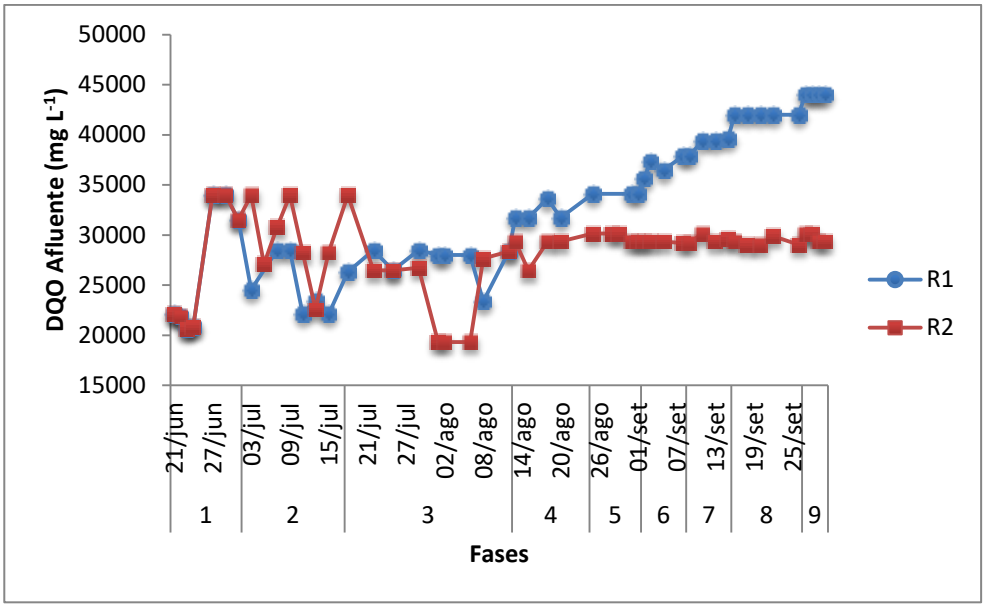

Figura 5 - DQO afluente (mg L^{-1}) dos reatores R1 e R2 ao longo das fases de 1 a 9

Em relação à eficiência de remoção de DQO, mesmo trabalhando com cargas orgânicas superiores, R1 obteve maior eficiência global de remoção de DQO ao longo do experimento. A eficiência global de R1 foi 79,9%, enquanto a eficiência de R2 foi 64,7%.

As eficiências de remoção de DQO em R1 foram de 73,9; 74,8; 79,3; 76,7; 89,5; 90,0; 82,1; 78,1 e 75,0% nas fases 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 e 9, respectivamente, e diferiram significativamente ($p<0,05$) (tabela 8). As maiores eficiências de remoção ($p<0,05$) ocorreram durante as fases 5 e 6, com DQO afluente de 34.107 e 36.838 mg L^{-1} e COV de 4,94 e 5,33 g DQO $(L\ d)^{-1}$, respectivamente (Tabela 8).

Tabela 8 - DQO efluente e eficiência de remoção de DQO nos reatores R1 e R2 durante as fases de 1 a 9

	DQO Efluente (mg L^{-1})				**Eficiência de remoção** (%)			
Fase	**R1**		**R2**		**R1**		**R2**	
1	6.540	bcdA	8.511	bcA	73,9	bA	66,1	abA
2	6.170	bcdB	10.446	abcA	74,8	bA	61,6	abB
3	5.194	cdB	15.637	aA	79,3	abA	34,2	cB
4	7.515	abcB	13.842	abA	76,7	abA	54,3	bcB
5	4.065	cdA	5.800	cA	89,5	aA	80,4	aA
6	3.386	dB	6.824	cA	90,0	aA	74,8	abB
7	6.909	bcdB	10.153	bcA	82,1	abA	64,3	abB
8	8.985	abA	9.324	bcA	78,1	abA	68,6	abA
9	11.102	aB	6.381	cA	75,0	bA	78,2	aA
CV (%)	27,3	-	25,9	-	8,75	-	16,5	-

Letras minúsculas diferentes na mesma coluna e maiúsculas na mesma linha diferem ao teste de Tukey a 5%; CV: Coeficiente de variação;

No R2, as eficiências de remoção de DQO foram: 66,1; 61,5; 34,2; 54,3; 80,4; 74,8; 64,3; 68,6 e 78,2; para as fases 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 e 9, respectivamente. Durante as fases 3 e 4, a eficiência de remoção de DQO foi consideravelmente baixa, tal fato deve-se ao

incremento da acidez no reator, causado pelo aumento da COV. Como consequência, possivelmente ocorreu a queda na eficiência da metanogênese, e, consequentemente, queda na eficiência de remoção da matéria orgânica em 27,4% em relação a fase anterior.

Devido a essas condições de estresse, a duração da fase 3 foi maior. Levaram-se 26 dias para o reestabelecimento da estabilidade do processo. Para isto, realizou-se a recirculação do efluente com adição de bicarbonato de sódio, de forma a neutralizar os ácidos orgânicos produzidos e recuperar a concentração de alcalinidade do meio, que será detalhado nos itens subsequentes.

As maiores eficiências de remoção de DQO observadas em R2 ocorreram durante as fases 5 e 9, com 80,4 e 78,2%, respectivamente.

Montalvo et al. (2010) ao realizarem biodigestão de vinhaça com DQO afluente variando entre 1 e 24 g L^{-1}, obtiveram eficiência de remoção entre 80 e 85%. Resultados próximos aos obtidos por Pinto (1999), que descreveu que reatores anaeróbios tratando vinhaça geralmente possuem eficiência de remoção de DQO em até 85% e com 70% de metano na composição do biogás.

Porém, em estudo realizado por Mota et al. (2013), utilizando dois reatores do tipo UASB (fase acidogênica e metanogênicas separadas) na biodigestão de vinhaça, obtiveram 96% da eficiência de remoção de DQO, entretanto a carga orgânica aplicada era baixa [2,5 g DQO $(L\ d)^{-1}$]. Deve-se ressaltar que no presente estudo a eficiência máxima obtida na remoção de DQO aconteceu na sexta fase, com 90% de eficiência, porém a COV aplicada foi mais que o dobro [5,33 g DQO $(L\ d)^{-1}$] do que a utilizada por Mota e colaboradores (2013).

Omil e colaboradores (1998), ao utilizarem reator UASB na biodigestão de efluente rico em acetato e ácidos orgânicos voláteis, levaram um período de adaptação de 250 dias para atingirem eficiência média de remoção de matéria orgânica superior a 80%. Porém, no presente estudo, durante a quinta fase, ao 74º dia, atingiu-se a eficiência media de remoção de 89,5 e 80,4%, em R1 e R2, respectivamente.

A Figura 6 insere a variação temporal da concentração afluente e efluente de DQO dos reatores R1 e R2 durante as 9 fases.

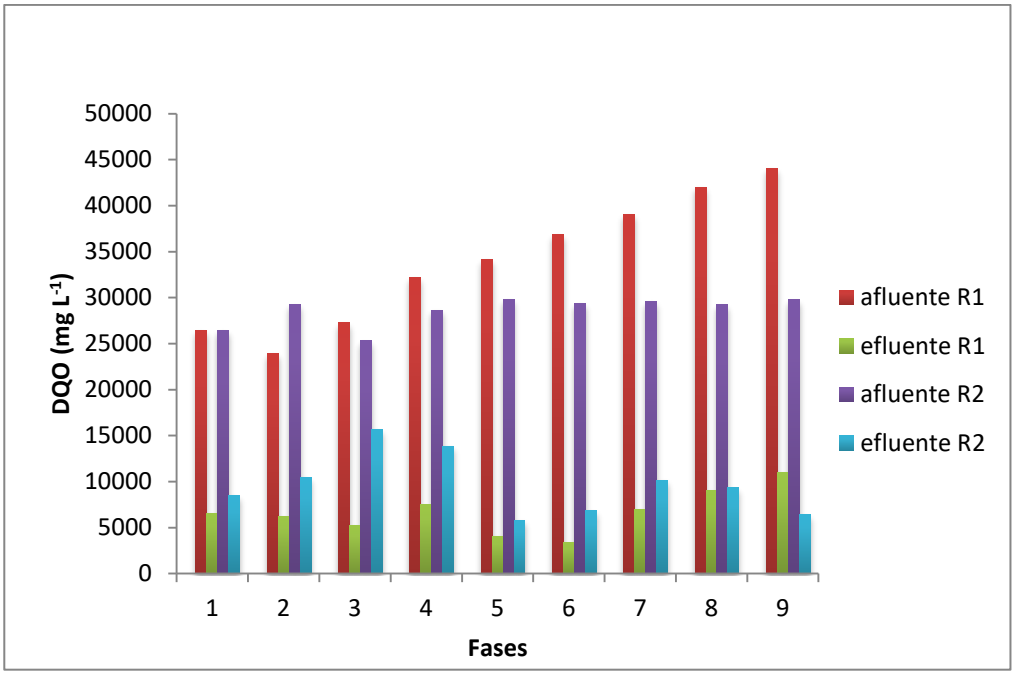

Figura 6 - DQO (mg L^{-1}) do afluente e do efluente dos reatores R1 e R2 durante as fases de 1 a 9

No que se refere a DQO efluente, em R1 as médias foram: 6.540, 6.170, 5.194, 7.515, 4.065, 3.386, 6.909, 8.985 e 11.102 mg L^{-1}, para as fases de 1 a 9, respectivamente. As menores DQO no efluente de R1 ocorreram durante as fases 5 e 6 ($p>0,05$), que também foram responsáveis pelas maiores eficiências de remoção.

Em R2, as médias de DQO foram: 8.511, 10.446, 15.637, 13.842, 5.800, 6.824, 10.153, 9.324 e 6.381, para as fases de 1 a 9, respectivamente. Na terceira fase, foi observado a maior média de DQO efluente em relação às demais ($p<0,05$),

Durante as fases 2, 3, 4, 6, 7 e 9, o reator R1 obteve os menores valores de DQO no efluente ($p<0,05$), quando comparado com R2. Nas demais fases (1, 5 e 8), não houve diferença significativa entre os reatores ($p>0,05$).

7.2.2. Produção de biogás

O desempenho da biodigestão nos reatores foi avaliado segundo a produção volumétrica de biogás. Análises de cromatografia gasosa foram realizadas com a finalidade de avaliar a composição do biogás gerado nos reatores, porém, observou-se que o armazenamento das amostras de biogás foi incorreto, o que comprometeu o resultado final desta análise. Portanto, os resultados de composição do biogás não serão apresentados.

Durante o período operacional, os reatores produziram uma vazão média de biogás de 81,62 e 49,38 L d^{-1}, nos reatores R1 e R2, respectivamente.

No R1, as médias de produção diária de biogás foram: 23,54; 72,63; 80,47; 80,26; 58,90; 107,01; 98,97; 135,24 e 61,20 litros por dia, durante as fases 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 e 9,respectivamente. Já no R2, as médias diárias foram: 44,64; 67,05; 24,67; 55,24; 69,90; 57,60; 54,05; 63,19 e 64,27 litros, para as fases de 1 a 9, respectivamente (Tabela 9).

Tabela 9 - Produção volumétrica de biogás durante as fases de 1 a 9 nos reatores R1 e R2

	Produção volumétrica de biogás (L $d)^{-1}$			
Fase	**Reator 1**		**Reator 2**	
1	23,54	cA	44,46	abA
2	72,63	bcA	67,05	aA
3	80,47	abcA	24,67	bB
4	80,26	abcA	55,24	abA
5	58,90	bcA	69,90	aA
6	107,01	abA	57,60	abB
7	98,97	abA	54,05	abB
8	135,24	aA	63,19	aB
9	61,20	bcA	64,27	aA
CV (%)	41,53		39,14	

CV – Coeficiente de variação; Letras minúsculas diferentes na mesma coluna e maiúsculas na mesma linha diferem ao teste de Tukey a 5%

No reator R1, a menor produção de biogás ocorreu na primeira fase (23,54 L), o que se justifica por ser a fase inicial, em que o lodo passou pelo processo de aclimatação no reator. Já na segunda fase, mesmo com redução da COV de 3,84 para 3,50 g DQO (L $d)^{-1}$, a produção de biogás triplicou (72,63 L). Este aumento considerável na produção de biogás pode ser explicado pela eficiência na adaptação do consórcio microbiano.

Com o aumento gradativo da COV, foi observado o aumento da produção média de biogás nas fases subsequentes, com exceção nas fases 5 e 9.

Na fase 5, R1 produziu em media 58,90 litros de biogás por dia, um decréscimo em relação a fase anterior ($p<0,05$). Entretanto, na fase seguinte pôde-se observar aumento na produção de biogás para 107,01 (L $d)^{-1}$ ($p<0,05$), isto se deve ao reestabelecimento da estabilidade do processo.

Na penúltima fase (fase 8), observou-se a maior produção de biogás, com volume médio de 135,24 (L d^{-1}) e COV de 6,08 g DQO (L $d)^{-1}$.

Na Figura 7, estão apresentados os dados da variação temporal da produção volumétrica de biogás em R1 e R2.

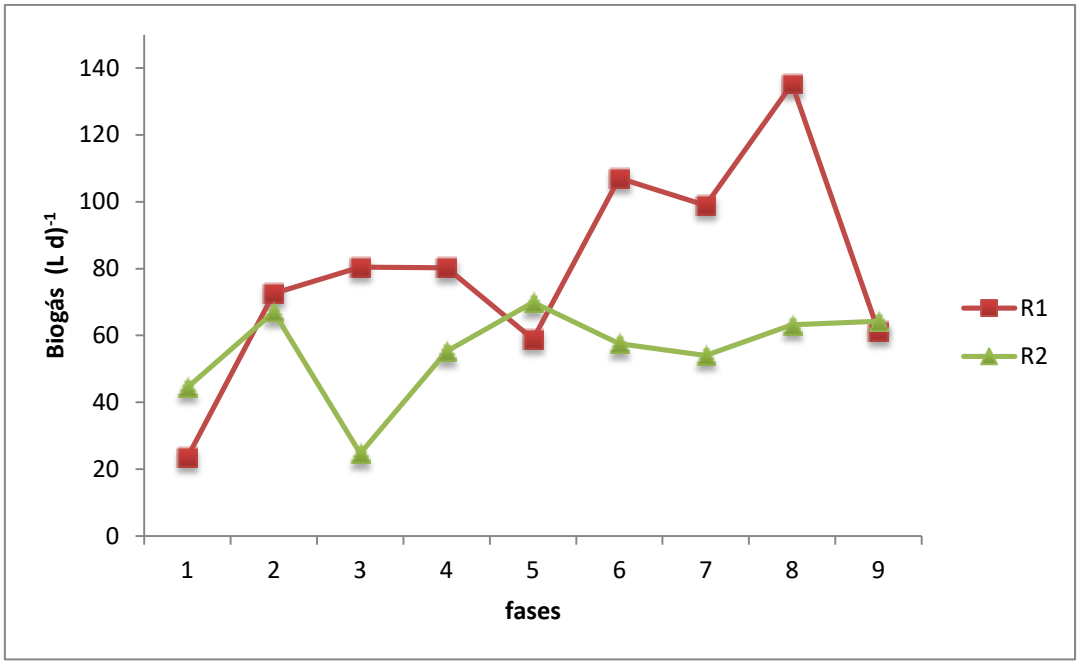

Figura 7 - Produção volumétrica de biogás (L dia^{-1}) nos reatores R1 e R2

Pode-se verificar a estabilidade na produção volumétrica de biogás em R2 a partir da fase 5 (Figura 7), quando a relação AI/AP (0,06) foi reestabelecida, assim como a concentração de ácidos voláteis totais (288,04 mg L^{-1}).

Quando comparados R1 e R2 quanto à produção volumétrica de biogás, observou-se diferença significativa ($p<0,05$) durante as fases 3, 6, 7 e 8, em que R1 obteve os maiores valores.

Um importante parâmetro utilizado para avaliar a produção de biogás é a taxa de produção de metano como remoção de DQO (DQO-CH_4), porém, no presente estudo as amostras de biogás foram armazenadas de forma incorreta, o que comprometeu a análise de cromatografia gasosa do biogás. Portanto, não serão apresentados os valores de DQO-CH_4. Em vez disso, a taxa de produção de biogás em relação à remoção de DQO (DQO-biogás) será apresentada a seguir.

A Tabela 10 mostra a conversão de DQO em biogás. As menores médias tanto em R1, quanto em R2, ocorreram durante a primeira fase (0,076 e 0,130 $L_{biogás}$ $gDQO_{remov}^{-1}$ para R1 e R2, respectivamente). O que se justifica pelo fato de ser a fase inicial e o lodo passar pelo processo de aclimatação.

Tabela 10 - Conversão de DQO em biogás

Conversão de DQO em biogás ($L_{biogás}$ $gDQO_{remov}^{-1}$)				
Fase	**R1**		**R2**	
1	0,076	bA	0,130	aA
2	0,151	abA	0,210	aA
3	0,171	abA	0,217	aA
4	0,228	abA	0,315	aA
5	0,275	abA	0,213	aA
6	0,247	abA	0,164	aA
7	0,249	abA	0,173	aA
8	0,362	aA	0,221	aB
9	0,164	abA	0,163	aA
CV (%)	24,36		39,52	

CV – Coeficiente de variação; Letras minúsculas diferentes na mesma coluna e maiúsculas na mesma linha diferem ao teste de Tukey a 5%

Quando comparado R1 com R2, todas as fases apresentaram médias sem diferença significativa ($p>0,05$), com exceção da oitava fase, em que R1 apresentou a maior média, de 0,362 $L_{biogás}$ $gDQO_{remov}^{-1}$ ($p<0,01$). Esta também foi a fase com maior desempenho na taxa de conversão de DQO em biogás dentro do reator R1 ($p<0,01$), que operou com COV média de 6,08 g DQO $(L\ d)^{-1}$ e DQO afluente média de 42.003 mg L^{-1}.

Por outro lado, em R2, o maior valor médio de conversão de DQO em biogás ocorreu durante a quarta fase (0,315 $L_{biogás}$ $gDQO_{remov}^{-1}$). Porém, esta fase diferiu significativamente das demais ($p>0,05$).

Na nona e última fase, as taxas médias de conversão de DQO não apresentaram diferença significativa ($p>0,05$), pressupõe-se que o período de adaptação de R1 tenha sido curto durante essa fase (5 dias). Devido a isso, houve queda na taxa de conversão de DQO em biogás, redução da produção volumétrica de biogás e aumento na concentração de ácidos voláteis no efluente.

De acordo com España-Gamboa et al. (2011), as concentrações típicas de CH_4 e CO_2 encontradas em reatores UASB realizando biodigestão anaeróbia de vinhaça variam entre 50 e 70% e 16 e 44%, respectivamente. Segundo Andreoli et al. (2007), a potência calorífica do biogás com 70% de metano em sua composição é de aproximadamente 23.380 kJ m^{-3} (6,5kW m^{-3}).

7.2.3. Monitoramento do processo por pH, alcalinidade e ácidos voláteis totais

As médias de pH para R1 variaram entre 7,47 e 7,83 durante todas as fases (Tabela 11), já em R2, as médias variaram entre 7,31 – 8,09. Os valores mínimos observados

foram 6,92 para R1 e 6,35 para R2, e os valores máximos foram 8,04 e 8,14 para R1 e R2, respectivamente.

Tabela 11 - Média do pH nos reatores R1 e R2 e seus respectivos desvios padrão, coeficientes de variação (CV), máximo e mínimo

Fase	Reator	média	Desv	CV (%)	mínimo	máximo
fase 1	**R1**	7,59	0,21	2,73	6,92	7,85
	R2	7,61	0,20	2,66	7,36	8,10
fase 2	**R1**	7,54	0,28	3,70	7,21	7,98
	R2	7,31	0,56	7,61	6,35	7,93
fase 3	**R1**	7,79	0,11	1,39	7,66	8,00
	R2	7,93	0,26	3,23	7,33	8,37
fase 4	**R1**	7,83	0,08	1,07	7,66	7,85
	R2	8,09	0,08	1,02	8,00	8,22
fase 5	**R1**	7,82	0,14	1,75	7,72	8,04
	R2	8,04	0,06	0,68	8,00	8,13
fase 6	**R1**	7,78	0,21	2,68	7,44	7,82
	R2	7,95	0,40	4,98	7,38	8,14
fase 7	**R1**	7,47	0,14	1,86	7,47	7,49
	R2	7,42	0,11	1,43	7,34	7,49
fase 8	**R1**	7,76	0,16	2,01	7,49	7,81
	R2	7,74	0,21	2,72	7,42	7,99
fase 9	**R1**	7,79	0,01	0,13	7,78	7,80
	R2	7,90	0,05	0,63	7,86	7,93

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 de 6,0 a 8,2 (SPEECE, 2008).

Portanto, os valores encontrados de pH nos efluentes de R1 e R2 estiveram dentro do recomendado pela literatura, o que pode indicar uma produção estável de metano.

A variação de pH ao longo das fases nos reatores 1 e 2 pode ser visualizada na Figura 8.

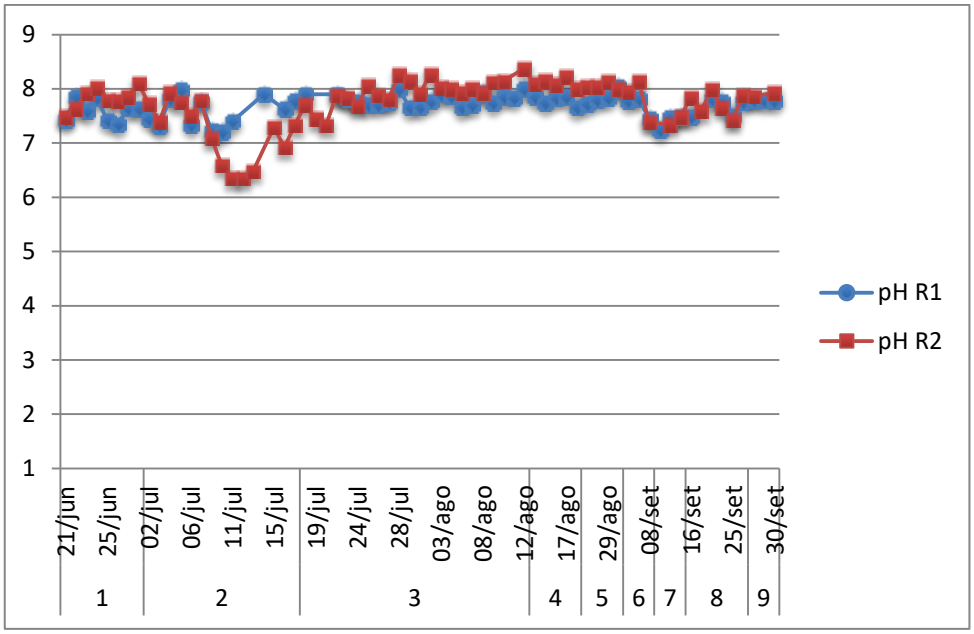

Figura 8 - Variação do pH nos reatores R1 e R2 ao longo do experimento

Segundo Chen, Cheng & Creamer (2008), aumento considerável no pH pode resultar em aumento da toxicidade do substrato dentro do reator, devido a mudança de estado da amônia livre (NH_3) para o íon amônio (NH_4^+).

Processos instáveis aliados ao amônio, geralmente resultam em acúmulo de ácidos graxos voláteis no reator, que podem proporcionar queda indesejável no pH.

A interação indesejada entre amônia livre, ácidos graxos voláteis e pH pode ocasionar o "estado inibitório estacionário" da metanogênese, uma condição onde o processo ocorre de forma estável, porém com baixo rendimento de metano (ANGELIDAKI et al., 1993). Portanto, faz-se necessário o controle do pH do processo dentro da faixa ideal da metanogênese.

Entretanto, valores de pH, mesmo quando dentro da faixa ideal, não são bons indicadores de equilíbrio do processo metanogênico, por isso, faz-se necessário as análises da alcalinidade e de ácidos graxos totais (AGT). Segundo Speece (1996), os dados de alcalinidade total (AT) e AGT nos permite observar a capacidade de consumo e produção de ácidos orgânicos no reator e do poder tamponante do mesmo.

A Tabela 12 apresenta os valores de alcalinidade total (AT), alcalinidade intermediária (AI), alcalinidade parcial (AP) e a relação AI/AP.

Os valores médios de AT no efluente variaram de 4.154 a 6.926 mg $CaCO_3$ L^{-1} no R1 e 4.148 a 9.762 mg $CaCO_3$ L^{-1} no R2.

As vinhaças que foram utilizadas como afluentes dos reatores (Tabela 5), apresentaram valores médios de alcalinidade total de 104,15 e 781,29 mg $CaCO_3$ L^{-1}, na primeira e segunda coleta, respectivamente. Quando comparados estes valores com os encontrados nos efluentes dos reatores, observa-se maiores valores de AT no efluente de ambos os reatores durante todas as fases (Tabela 12). O que indica que houve incremento da alcalinidade durante o processo anaeróbio, que pode ter sido responsável pelo poder tampão do processo anaeróbio.

O aumento da AT no R1 ao longo do experimento ocorreu em virtude do acréscimo na concentração de bicarbonato, como pode ser observado pelo aumento da alcalinidade parcial (AP), que ocorreu ao longo das fases de 1 a 8. Na fase 9 houve decréscimo na alcalinidade total, assim como na alcalinidade parcial e na alcalinidade intermediária, porém a relação AI/AP manteve-se semelhante a fase anterior (0,13 na fase 8 e 0,13 na fase 9) ($p>0,01$), que pode indicar a preservação na estabilidade do processo.

No R2, foi observado grande variação na concentração da alcalinidade total, o que pode ser justificado pela instabilidade do processo nas fases iniciais. Os maiores valores de AT observados ocorreram durante as fases 3 e 4 (9.284 e 9.762 mg $CaCO_3$ L^{-1} respectivamente), em que houve suplementação do pH com bicarbonato de sódio.

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; DUDA, 2010).

Tabela 12 - Valores médios da alcalinidade total (AT), alcalinidade parcial (AP), alcalinidade intermediária (AI), relação AI/AP dos afluentes (A1 e A2) e efluentes obtidos no reator 1 (R1) e no reator 2 (R2), durante as fases 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 e 9

Parâmetros		**Fases**																		**CV (%)**	**F**
		1		2		3		4		5		6		7		8		9			
AT	R1	4154	dA	4858	dA	5621	acA	6257	abcA	5867	abcA	6758	abcA	6926	aA	6889	abA	5405	acdA	1,6	18,7**
(mg $CaCO_3$ L^{-1})	R2	4148	cA	5223	cA	9284	abA	9762	aA	6873	abcA	6305	bcA	5933	cA	6031	cA	4240	cA	1,8	27,56**
AI	R1	571	aA	1207	aA	543	aA	456	aA	380	aA	743	aA	701	aA	776	aA	636	aA	12,9	31,3**
(mg $CaCO_3$ L^{-1})	R2	605	bA	2374	abA	4142	aA	2632	abA	384	bA	843	abA	1045	abA	953	abA	387	bA	7,1	17,8**
AP	R1	3582	cA	3703	cA	5071	bA	5864	aA	5487	abA	6015	aA	6224	aA	6058	aA	4769	bA	1,7	33,0**
(mg $CaCO_3$ L^{-1})	R2	3543	efA	2848	fA	5142	bcdA	7130	aA	6488	abA	5463	bcA	4888	cdeA	5077	bcdeA	3853	defA	3,0	9,77**
AI/AP	R1	0,01	bA	0,33	aB	0,11	bB	0,08	bA	0,07	bA	0,12	bA	0,11	bA	0,13	bA	0,13	bA	39,3	17,1**
	R2	0,17	aA	1,37	aA	0,85	aA	0,37	aA	0,06	aA	0,16	aA	0,21	aA	0,19	aA	0,10	aA	69,2	5,0**

CV – Coeficiente de variação; Letras minúsculas diferentes na mesma linha e maiúsculas na mesma coluna diferem ao Teste de Tukey a 5%; ** - significativo a 1% de probabilidade ($p<0,01$); * - significativo a 5% de probabilidade ($p<0,05$); ns - não significativo

Como pode-se observar no R2 durante a fase 2, a relação AI/AP foi de 1,37 (figura 9). No momento que este dado foi observado, optou-se por realizar a recirculação do efluente com adição de bicarbonato de sódio. Como consequência, observou-se decréscimo na relação AI/AP nas fases subsequentes (0,85; 0,37; 0,06; 0,16; 0,21; 0,19 e 0,10, para as fases 3, 4, 5, 6, 7, 8 e 9, respectivamente).

O reestabeleciemtno da relação AI/AP ideal no efluente de R2 promoveu o regulamento da estabilidade do processo anaeróbio, como consequência, observou-se aumento na produção volumétrica de biogás, que passou de 24,66 litros na terceira fase para 55,24 litros na quarta e 69,9 na quinta fase ($p<0,05$).

No R1, mesmo com aumento crescente da COV ao longo das fases, a relação AI/AP não ultrapassou 0,33. Desta forma o processo manteve-se estável, dentro do intervalo considerado ótimo descrito pela literatura.

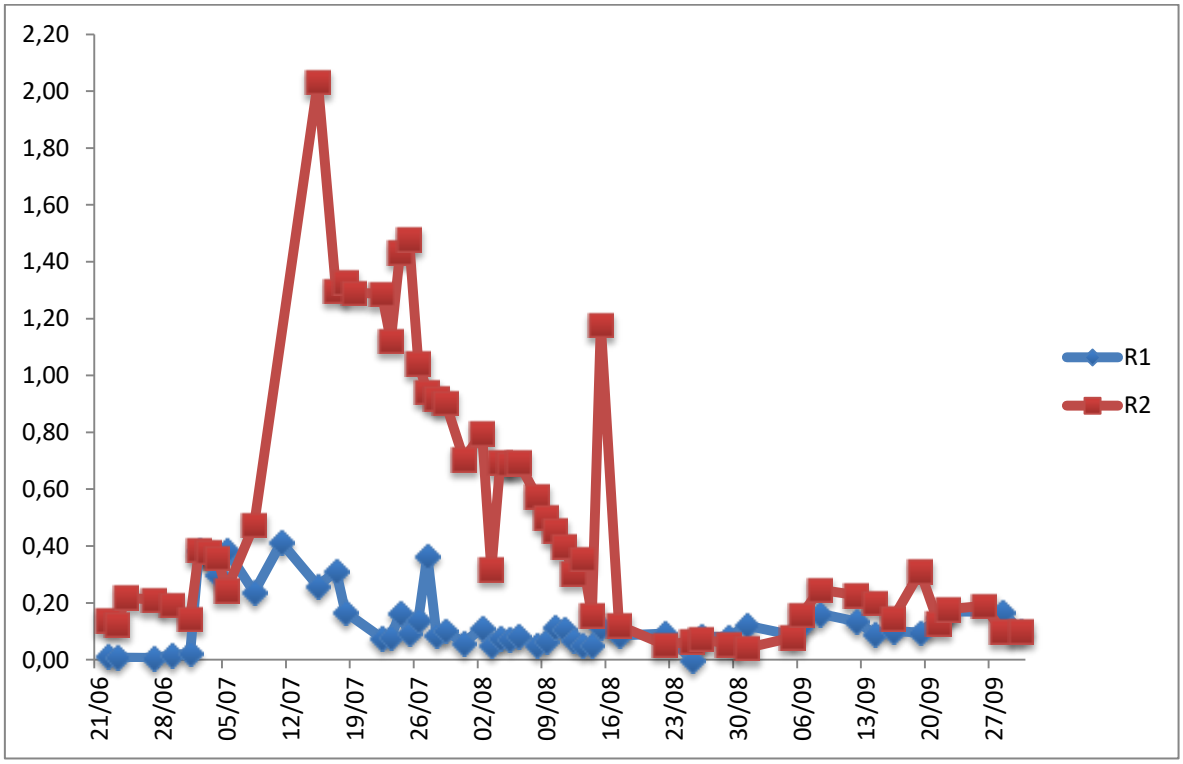

Figura 9 - Relação AI/AP nos reatores R1 e R2

Durante a primeira fase não se realizaram análises da concentração de AVT devido dificuldades encontradas na padronização do método. Portanto, os valores médios de AVT encontrados na Tabela 13 são da segunda fase em diante.

A concentração média de AVT no afluente do R1 foi maior em todas as fases ($p<0,05$), com exceção da fase 2, que no R2 apresentou concentração de 8572,6 e R1 7200,0 mg CH_3COOH L^{-1} ($p<0,05$).

O aumento na concentração média de ácidos voláteis totais em cada fase no reator R1 nunca excedeu 10% em relação à fase anterior, as porcentagens médias de aumento foram 9,9; 7,1; 7,1; 8,4; 7,8; 8,3 e 5,1%, para as fases 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 e 9, respectivamente ($p>0,05$). Já em R2, manteve-se a concentração média afluente de AVT variando entre 6452,4 e 8572,6 mg L^{-1}

No tocante ao efluente, os valores médios de AVT de ambos os reatores e em todas as fases foram menores que os observados nos afluentes (Tabela 13).

Segundo GERARDI (2003), a faixa de valores de AVT recomendada para que haja estabilidade no processo anaeróbio é de 50 a 500 mg L^{-1}.

Em R1 as menores médias de AVT efluente ocorreram durante as fases 2, 4 e 7 ($p>0,05$), que foram 227,0; 205,8 e 201,2 mg L^{-1}, respectivamente. Já os maiores valores ocorreram durante as duas últimas fases ($p<0,05$), 510,2 e 522,6 mg L^{-1} (fase 8 e 9, respectivamente), o que pode ser explicado pelo fato de serem as fases em que foram aplicadas as maiores cargas orgânicas (6,08 e 6,38 g DQO $(L\ d)^{-1}$).

Tabela 13 - Valores médios de ácidos voláteis totais (AVT) nos afluentes e efluentes de R1 e R2 e a eficiência de remoção

AVT		**Fases**																		**CV (%)**	**F**
mg CH_3COOH L^{-1}		**1**		**2**		**3**		**4**		**5**		**6**		**7**		**8**		**9**			
Afluente	R1	15.743,1	aA	7.200,0	aB	7.909,5	aA	8.472,6	aA	9.074,2	aA	9.840,3	aA	10.605,3	aA	11.487,8	aA	12.070,9	aA	3,6	0,7 ns
	R2	6.452,4	bB	8.572,6	aA	7.585,1	abB	7.631,4	abB	7.678,2	abA	7.336,3	bB	7.580,6	abB	7.441,9	bB	7.539,4	abB	1,3	4,8**
Efluente	R1	-	-	227,0	bA	306,1	abB	205,8	bA	211,7	bA	317,0	abA	201,2	bA	510,2	aA	522,6	aA	7,5	3,7ns
	R2	-	-	543,3	bA	2.364,7	aA	683,1	bA	288,04	bA	386,6	bA	559,2	bA	532,5	bA	501,2	bA	6,4	17,8**
Eficiência de remoção	R1	-	-	96,6	aA	96,5	aA	97,6	aA	97,7	aA	96,8	aA	98,1	aA	95,8	aA	95,7	aA	1,1	1,9ns
	R2	-	-	91,4	aA	71,4	bB	91,1	aB	96,3	aA	94,8	aA	92,5	aB	92,9	aB	93,3	aA	6,7	8,3**

CV – Coeficiente de variação; Letras minúsculas diferentes na mesma linha e maiúsculas na mesma coluna diferem ao Teste de Tukey a 5%; ** - significativo a 1% de probabilidade ($p<0,01$); * - significativo a 5% de probabilidade ($p<0,05$); ns - não significatito.

Entretanto, as concentrações de ácidos voláteis no R1 foram muito menores do que as descritas no trabalho de Longo (2015), que ao realizar biodigestão anaeróbia de vinhaça em reator do tipo UASB com COV variando entre 5,6 e 7 g DQO (L d)$^{-1}$, observou valor médio da concentração de AVT de 1.349,4 mg L^{-1}, que ocasionou desequilíbrio no processo anaeróbio.

A eficiência de remoção de AVT em R1 variou entre 95,8 e 98,1% (Tabela 13), o que demonstra eficiência no consumo e conversão dos ácidos voláteis pelos micro-organismos e consequente equilíbrio entre as bactérias acidogênicas e as arqueas metanogênicas em todas as fases analisadas. Portanto, constatou-se que períodos de aumento da COV não refletiram em queda da porcentagem de remoção de AVT no R1, como pode ser visualizado na Figura 10.

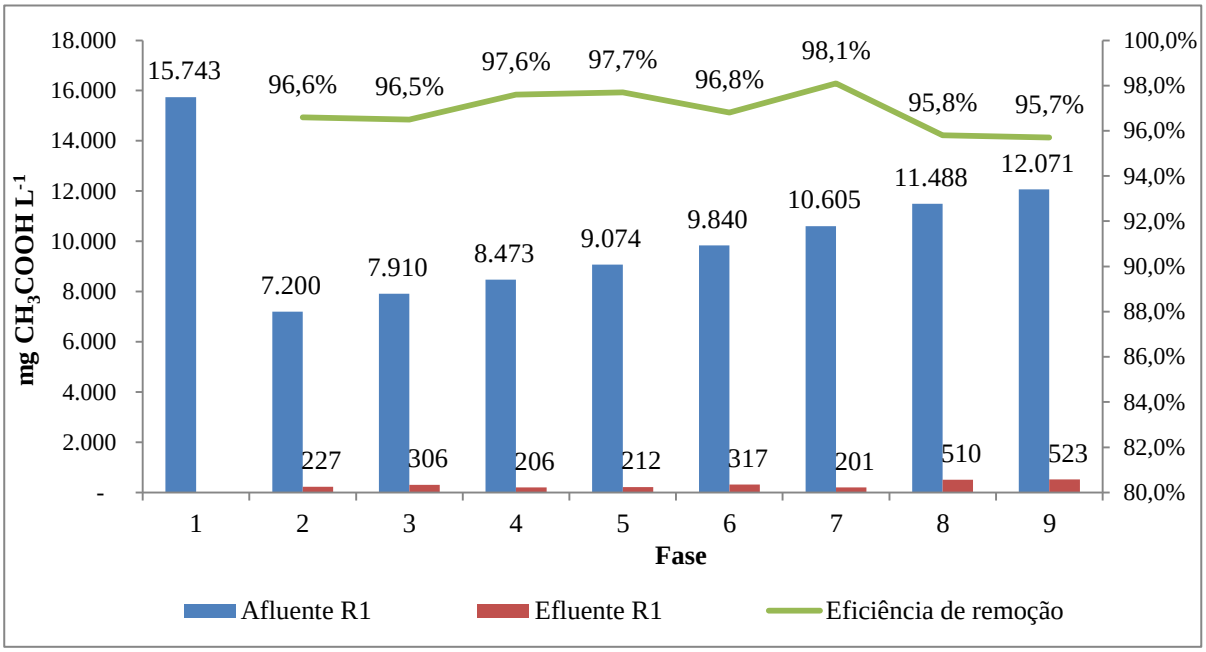

Figura 10 - Variação temporal da concentração de ácidos voláteis totais (AVT) no afluente, efluente e eficiência de remoção em R1

Porém, no R2, observou-se distúrbio do processo durante as fases 2, 3 e 4, quando a concentração de ácidos voláteis no reator chegou alcançar o valor médio de 2.364,7 mg L^{-1} durante a terceira fase. Neste momento, a eficiência de remoção de ácidos voláteis decaiu de 91,4% para 71,4% ($p<0,01$)(Figura 11).

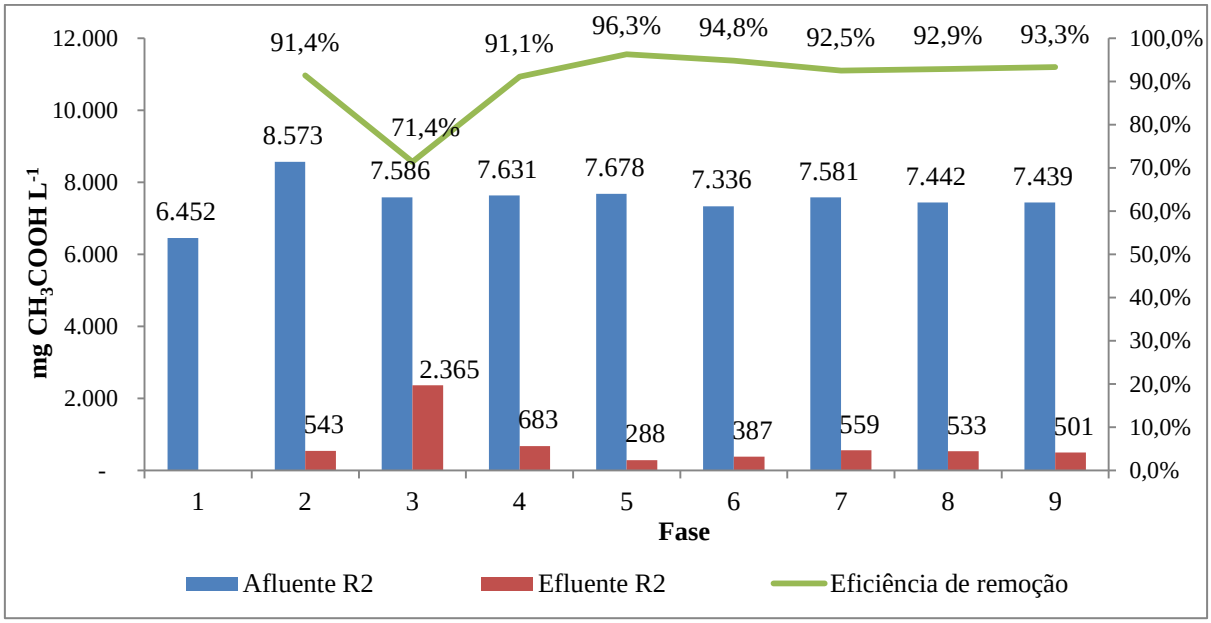

Figura 11 - Variação temporal da concentração de ácidos voláteis totais (AVT) no afluente, efluente e eficiência de remoção em R2

No entanto, ao se realizar a tática de recirculação do efluente com adição de bicarbonato em R2, pôde-se observar a recomposição da estabilidade do processo a partir do decréscimo da concentração de AVT, que passou de 2.365 mg L^{-1} na fase 3, para 683 mg L^{-1} na fase 4. E durante a quinta fase, a média de ácidos voláteis foi a menor em todo o ensaio, 288 mg L^{-1}.

Portanto, o monitoramento dos reatores por ácidos voláteis totais (AVT) mostrou-se uma medida adequada para o controle operacional.

7.2.1. Monitoramento do processo por ânions

Os ânions nitrito, nitrato, fosfato, sulfato e cloreto foram avaliados durante o processo de biodigestão, os valores médios encontrados nos efluentes e suas respectivas taxas de eficiência de remoção encontram-se na tabela 14.

Verifica-se que o ânion nitrito não esteve presente nos efluentes de ambos os reatores, durante todas as fases. Nitrito também não foi identificado no afluente dos reatores, como descrito anteriormente na caracterização das vinhaças utilizadas (tabela 5).

Em relação as concentrações de nitrato nos efluentes estudados, não houve diferença significativa ($p>0,05$) entre as fases nem entre os reatores. As concentrações de nitrato no efluente de R1 foram: 296,1; 610,7; 571,3; 570,5; 572,6; 563,2; 571,4; 248,0; 0,0 e 0,88 mg L^{-1} para as fases 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 e 9, respectivamente.

Tabela 14 - Monitoramento por ânions dos reatores R1 e R2 durante as fases 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 e 9

Parâmetros		Fases																		CV(%)	F
		1		2		3		4		5		6		7		8		9			
Nitrito (mg L^{-1})	R1	0,0	aA	0,0	aA	0,0	aA	0,0	aA	0,0	aA	0,0	aA	0,0	aA	0,0	aA	0,0	aA	0,0	0 ns
	R2	0,0	aA	0,0	aA	0,0	aA	0,0	aA	0,0	aA	0,0	aA	0,0	aA	0,0	aA	0,0	aA	0,0	0 ns
Eficiência de remoção (%)	R1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	R2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Nitrato (mg L^{-1})	R1	296,1	aA	610,7	aA	571,3	aA	570,5	aA	572,6	aA	563,2	aA	571,4	aA	248,0	aA	0,0	aA	0,88	3231 17**
	R2	0,0	aA	585,3	aA	569,2	aA	559,9	aA	561,2	aA	561,5	aA	280,4	aA	0,0	aA	245,1	aA	36,7	6,2**
Eficiência de remoção (%)	R1	25,3	-	-13,0	-	0,89	-	9,5	-	15,6	-	23,1	-	28,7	-	71,1	-	100	-	-	-
	R2	100	-	-8,3	-	1,3	-	2,9	-	1,8	-	1,7	-	50,9	-	100	-	57,1	-	-	-
Fosfato (mg L^{-1})	R1	38,7	aA	99,6	aA	0,0	aA	0,0	aA	0,0	aA	0,0	aA	0,0	aA	0,0	aA	0,0	aA	135,2	3,6 ns
	R2	0,0	aA	134,1	aA	42,48	aA	36,86	aA	74,7	aA	0,0	aA	0,0	aA	0,0	aA	0,0	aA	118,5	2,3 ns
Eficiência de remoção (%)	R1	36,3	-	-20,2	-	100	-	100	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	R2	100	-	-61,8	-	51,9	-	58,3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Sulfato (mg L^{-1})	R1	565,4	aA	185,6	aA	487,0	aA	0,0	aA	0,0	aA	0,0	aA	8,9	aA	1.049,2	aA	353,4	aA	185,1	0,6 ns
	R2	381,6	aA	169,6	aA	0,0	aA	0,0	aA	0,0	aA	0,0	aA	0,0	aA	236,9	aA	246,2	aA	194,8	0,9 ns
Eficiência de remoção (%)	R1	72,4	-	93,4	-	83,6	-	100	-	100	-	100	-	99,8	-	80,1	-	93,6	-	-	-
	R2	81,4	-	93,9	-	100	-	100	-	100	-	100	-	100	-	93,3	-	93,0	-	-	-
Cloreto (mg L^{-1})	R1	1703,6	bA	2231,0	abA	2199,3	abB	2514,6	abA	2120,6	abA	2575,2	abA	2759,8	abA	3176,8	aA	3342,8	aA	10,3	6,1*
	R2	1721,6	aA	2161,0	aA	2763,3	aA	2342,9	aA	2544,5	aA	2392,9	aA	2227,0	aA	2190,2	aB	2381,1	aB	11,4	2,9ns
Eficiência de remoção (%)	R1	1,6	-	5,5	-	12,6	-	8,7	-	26,6	-	17,4	-	19,2	-	13,0	-	13,1	-	-	-
	R2	0,5	-	8,4	-	6,9	-	10,9	-	-4,5	-	1,7	-	8,5	-	10,0	-	2,2	-	-	-

Letras minúsculas iguais na mesma linha ou maiúsculas na mesma coluna diferem ao Teste de Tukey a 5%; *: significativo a 1% de probabilidade ($p<0,01$); **: significativo a 5% de probabilidade ($p<0,05$); ns: não significativo.

A eficiência de remoção de nitrato em R1 foi relativamente baixa durante as fases de 1 a 7, com valores menores que 30%. Já durante as duas últimas fases observou-se aumento na eficiência de remoção de nitrato, as eficiências foram 71,1 e 100% para as fases 8 e 9, respectivamente.

Em R2 as concentrações de nitrato no efluente durante as fases 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 e 9 foram 0,0; 585,3; 569,2; 559,2; 561,2; 561,5; 280,4; 0,0 e 245,1 mg L-1, respectivamente. A eficiência de remoção de nitrato em R2 durante as fases 2, 3, 4, 5 e 6 foi baixa (valores inferiores a 3%) similar a R1. Porém, observou-se eficiências de remoção superiores a 50% durante as fases 1, 7, 8 e 9.

Quanto ao íon fosfato, observou-se a presença do mesmo durante as fases de 1 a 4 no afluente de ambos os reatores. A partir da fase 5 não foram encontrados valores de fosfato nos afluentes dos reatores, consequentemente o íon não foi encontrado nos efluentes dos reatores. O que se justifica pelo fato de que durante essas fases a vinhaça utilizada (segunda coleta – tabela 5) não apresentou teores de fosfato em sua composição.

Taxas negativas de eficiência de remoção de fosfato foram observadas durante a segunda fase em R2, o mesmo foi observado para o ânion nitrato. Essas eficiências negativas podem estar atreladas ao fato de que houve carreamento de lodo junto ao efluente dos reatores durante essa fase.

No que se refere ao íon cloreto, as concentrações do mesmo nos efluentes de R1 foram: 1703,6; 2231,0; 2199,3; 2514,6; 2120,6; 2575,2; 2759,8; 3176,8 e 3342,8 mg L-1, para as fases de 1 a 9, respectivamente. As fases 2, 3, 4, 5, 6 e 7 não diferiram significativamente ($p<0,05$). As maiores concentrações foram encontradas nas duas últimas fases ($p>0,05$), que receberam as maiores COV.

Já em R2, as concentrações de cloreto foram: 1721,6; 2161,0; 2763,3; 2342,9; 2544,5; 2392,9; 2227,0; 2190,2 e 2381,1 mg L-1, para as fases 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 e 9, respectivamente.

As eficiências de remoção de cloreto em ambos os reatores foram inferiores a 27%. Diferentemente dos demais ânions, o sulfato foi removido pelo processo anaeróbio com eficiências superiores a 72% em R1 e a 81% em R2.

As concentrações de sulfato no efluente de R1 foram: 565,4; 185,6; 487,0; 0,0; 0,0; 0,0; 8,9; 1049,2 e 353,4 mg L^{-1}, para as fases de 1 a 9, respectivamente ($p<0,05$). Já em R2, as concentrações de sulfato no efluente foram: 381,6; 169,9; 0,0; 0,0; 0,0; 0,0; 0,0; 236,9 e 246,2 mg L^{-1}, para as fases 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 e 9, respectivamente.

As concentrações de sulfato nos afluentes, efluentes e suas respectivas eficiências em R1 podem ser visualizadas na Figura 12 e na Figura 13 para R2.

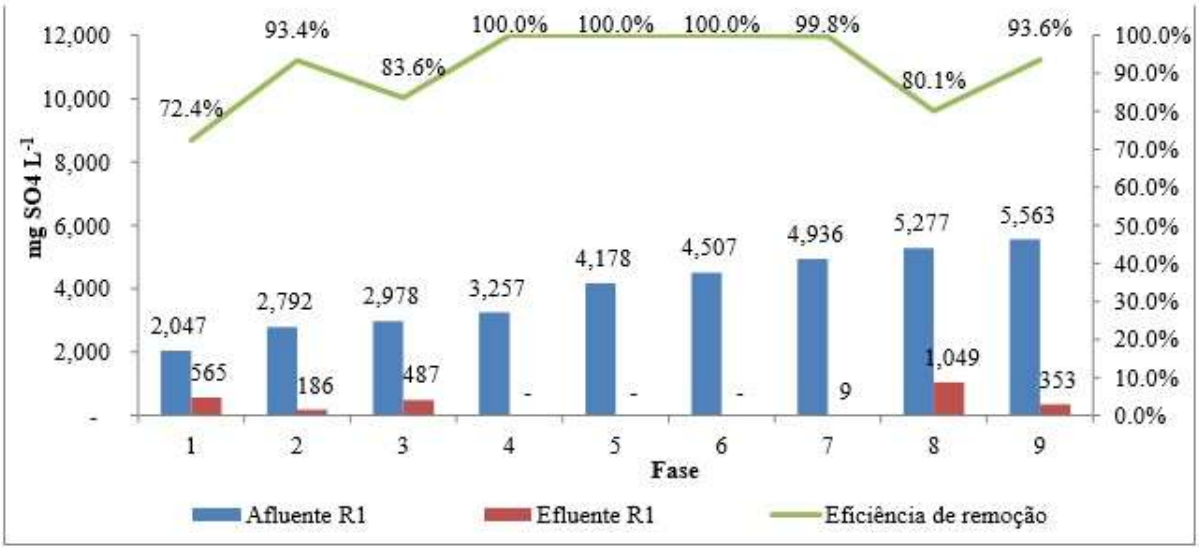

Figura 12 - Variação temporal da concentração de sulfato (mg L^{-1}) no afluente, efluente e eficiência de remoção em R1

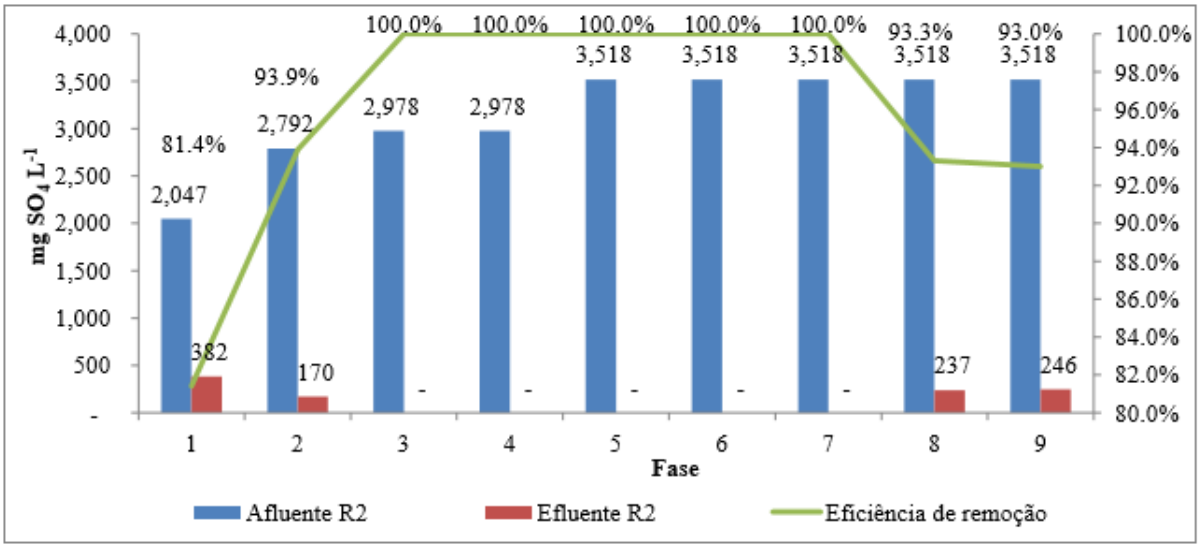

Figura 13 - Variação temporal da concentração de sulfato (mg L^{-1}) no afluente, efluente e eficiência de remoção em R2

7.2.2. Teor de sólidos presente no lodo

O teor de sólidos no lodo dos reatores foi avaliado mensalmente, na Tabela 15 encontram-se as médias e desvios padrões para a concentração de sólidos totais (ST), sólidos totais voláteis (STV) e sólidos totais fixos (STF).

Tabela 14 - Teor de sólidos do lodo dos reatores

Data	Reator	ST (g L^{-1})	STV (g L^{-1})	STF (g L^{-1})
06/06/16	**R1**	29,00 ± 6	18,00 ± 4,36	11,00 ± 2,65
	R2	29,00 ± 6	18,00 ± 4,36	11,00 ± 2,65
15/07/16	**R1**	51,89 ± 3,81	35,00 ± 3,02	16,88 ± 1,04
	R2	57,60 ± 1,08	34,26 ± 1,03	23,34 ± 1,11
12/08/16	**R1**	44,78 ± 2,00	28,72 ± 1,69	16,07 ± 0,32
	R2	45,70 ± 0,18	33,15 ± 0,15	12,55 ± 0,30
29/09/16	**R1**	52,33 ± 1,74	35,11 ± 1,86	17,23 ± 0,12
	R2	24,10 ± 2,23	16,18 ± 1,14	7,92 ± 1,09

No R1, as concentrações de ST, STV e STF aumentaram durante os primeiros 60 dias de ensaio. A concentração de ST sofreu um acréscimo de 78,9% em R1 e 98,6% em R2, a concentração de STV aumentou 94,4% em R1 e 90,3% em R2, já a concentração de STF cresceu em 53,5% em R1 e 122,2% em R2.

Posteriormente, no período de 60 a 90 dias foi observada uma diminuição de 15,9% e 21,9% de ST no R1 e no R2, respectivamente; 26% e 3,3% na concentrações de STV no R1 e no R2, respectivamente; e 86% na concentração de STF em R2. Nesse período, a concentração de STF se mateve constante em nível médio de 16,07 g L^{-1} em R1, semelhante aos primeiros 60 dias de ensaio.

Após 102 dias de biodigestão, pôde-se visualizar o incremento na concentração de ST, STV e STF em R1, indicando reestabelecimento do processo e multiplicação dos micro-organismos dentro do reator (Figuras 14, 15 e 16).

O reator controle, R2, apresentou decréscimo na concentração de ST, STV e STF durante o período de 30 a 102 dias de experimento.

Quando observada a diminuição no conteúdo de sólidos dos reatores, resultou em aumento na concentração de sólidos nos efluentes.

O decréscimo na concentração de sólidos do lodo ocorreu em virtude do arraste de sólidos com o efluente, que pode ter sido causado pela alta velocidade ascencional da alimentação dos reatores (dados não disponíveis).

Outra possível causa da lavagem no lodo pode ter sido a ineficiência dos separadores trifásicos dos reatores. O gás é formado dentro do grânulo e o carrega para a parte superior do reator. Se o separador não funciona adequadamente, os grânulos podem colmatar na parte superior, ao invés de sedimentarem.

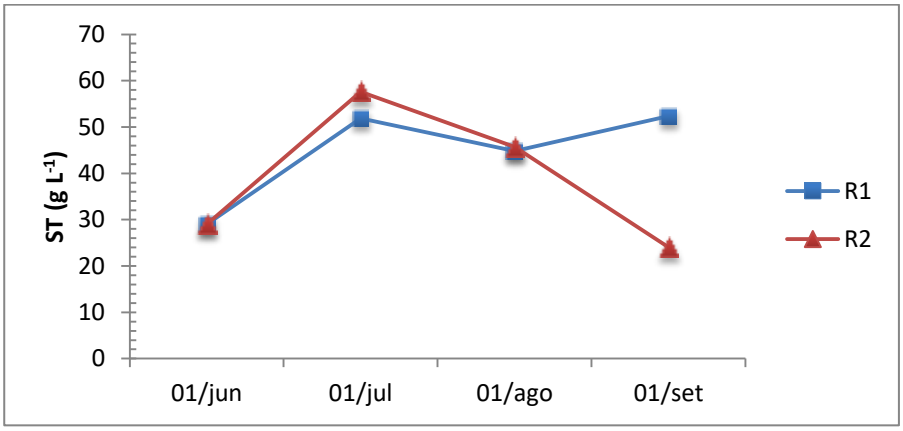

Figura 14 - Concentração de sólidos totais (ST), em g L^{-1}, no lodo dos reatores R1 e R2

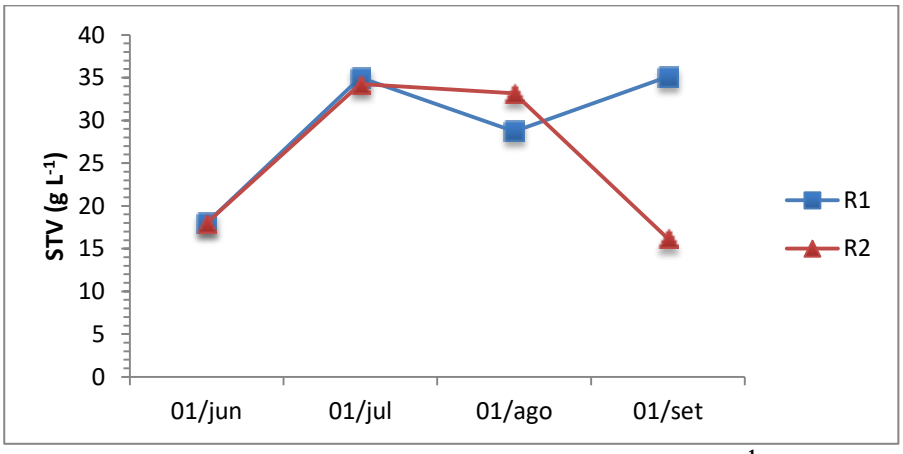

Figura 15 - Concentração de sólidos totais voláteis (STV), em g L^{-1}, no lodo dos reatores R1 e R2

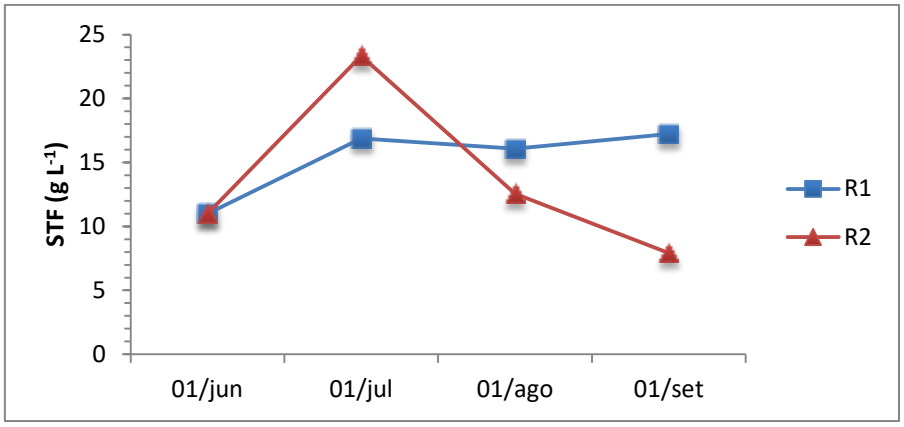

Figura 16 - Concentração de sólidos totais fixos (STF), em g L^{-1}, no lodo dos reatores R1 e R2

7.2.3. Atividade metanogênica específica (AME) do lodo

A atividade metanogênica específica (AME) dos lodos dos reatores R1 e R2 foi avaliada ao fim do experimento.

A AME teve como objetivo avaliar o potencial metanogênico do lodo e descobrir qual é a capacidade máxima de produção de metano por um consórcio de micro-organismos anaeróbios, ou seja, qual é a capacidade de converter a DQO em metano (AQUINO et al., 2007).

A produção volumétrica de metano a partir do lodo dos reatores R1 e R2 pode ser visualizada na Figura 17, onde se observa que R1 teve maior desempenho ao longo das 32 horas avaliadas e produção acumulada de 117,7 mL de metano, enquanto que R2 produziu aproximadamente a metade desse volume, ou seja, 52,3 mL de metano.

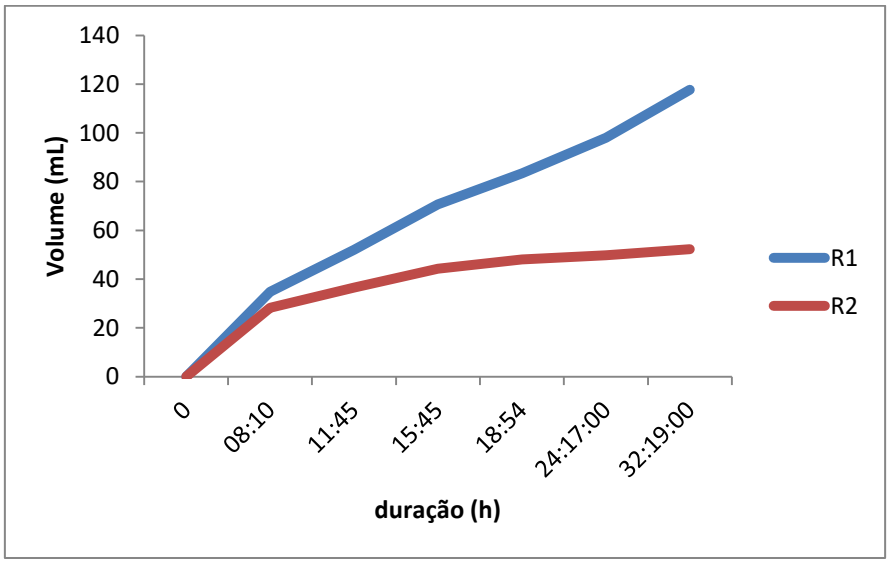

Figura 17 - Volume de metano produzido por tempo

A AME é calculada com base no coeficiente angular no trecho de maior inclinação, que pode ser visualizado na Figura 18. O ápice de produzão ocorreu em aproximadamente 12 horas em R1 e 8 horas em R2.

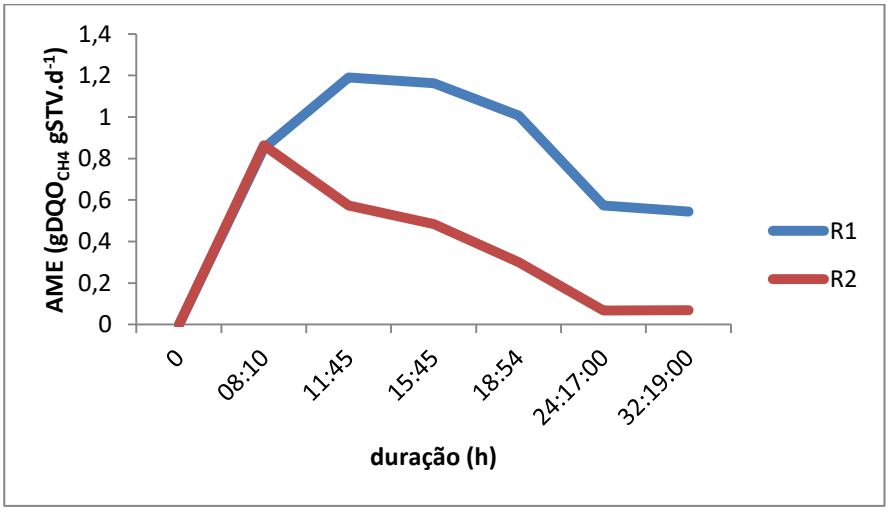

Figura 18 - Atividade metanogênica específica

No reator controle (R2), o lodo metanogênico apresentou AME de 0,850 gDQO$_{CH4}$ gSTV d^{-1}. Já no reator R1, que sofreu aumento de COV ao longo do experimento, foi observado AME de 1,191 gDQO$_{CH4}$ gSTV.d^{-1}. Isto significa que o potencial metanogênico do lodo do reator R1 foi 40,1% superior em relação ao consórcio de micro-organismos do reator R2.

Pode-se inferir que o reator R1 teve maior desempenho na atividade metanogênica específica, ou seja, as arqueas metanogênicas presentes em R1 demonstraram atividade maior do que os micro-organismos metanogênicos presentes no tratamento controle.

Na literatura, lodos granulares com alta eficiência na biodigestão de compostos orgânicos apresentam geralmente AME variando entre 0,24 a 1,26 (ROCHA, 2003).

Portanto, ambos os reatores avaliados apresentaram elevado potencial de conversão da matéria orgânica em metano, destaca-se que o reator R1 apresentou maior atividade metanogênica específica.

Ao analisar os resultados da AME juntamente com a produção volumétrica de biogás e taxa de remoção de DQO, pode-se inferir que houve eficiência na adaptação do inóculo para ambos os reatores.

Em trabalho realizado por Omil et al. (1998), o período de adaptação necessário para o lodo apresentar eficiência de remoção de matéria orgânica superior a 80% foi de 250 dias,.

Opresente estudo durou 103 dias, porém taxa de remoção de DQO superior a 80% foi alcançada em 74 dias para ambos os reatores.

8. CONCLUSÕES

A biodigestão anaeróbia de vinhaça concentrada mostrou-se possível para DQO afluente superior a 30.000 mg L^{-1}

O desempenho do processo mostrou-se estável, atingindo eficiência máxima de remoção de DQO de 90%. O maior valor médio de DQO afluente aplicado foi de 44.060 mgL^{-1} e a eficiência de remoção de matéria orgânica neste momento atingiu 75% com produção volumétrica de biogás de 61,20 L dia^{-1}.

A maior produção volumétrica de biogás ocorreu concomitantemente com a maior produção específica de biogás. Quando a DQO afluente foi de 42.003 mg L^{-1}, a produção volumétrica de biogás foi de 135,24 L dia^{-1} e a produção de biogás em relação a DQO removida foi de 0,362 $L_{biogás}$ $gDQO_{remov}^{-1}$.

Desta forma, conclui-se que a alta eficiência de remoção de matéria orgânica e produção de biogás no reator alimentado com alta concentração de DQO foi obtida devido a adaptação gradual do consórcio microbiano.

O presente estudo pode fornecer dados que corroboram a capacidade de sistemas anaeróbios de biodigestão de vinhaça concentrada para a produção de biogás. A utilização de vinhaça concentrada para a produção de biogás pode acarretar em redução de custos com instalações e promover aumento na produtividade de biogás e diminuição da carga poluente.

REFERÊNCIAS

AGÊNCIA NACIONAL DE ÁGUAS - ANA. **Manual de Conservação e Reuso de Água na Agroindústria Sucroenergética**. (2009). 294p. Agência Nacional de Águas; Federação das Indústrias do Estado de São Paulo; União da Indústria da Cana-de-açúcar; Centro de Tecnologia Canavieira – Brasília: ANA, 2009.

AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION; AMERICAN WATER WORKS ASSOCIATION; WATER ENVIRONMENT FEDERATION – APHA; AWWA; WEF. (2012). **Standard methods for the examination of water and wastewater**. 22ª ed., Washington: American Public Health Association, 2012. 1935 p.

ANDREOLI, C. V.; SPERLING, M; FERNANDES, F. (2007). **Sludge Treatment and Disposal**. IWA Publishing, London, UK.

ANGELIDAKI, I.; ELLEGAARD, L.; AHRING, B. K. (1993). A mathematical model for dynamic simulation of anaerobic digestion of complex substrates: focusing on ammonia inhibition. **Biotechnology and Bioengineering**. n.42, p.159–166.

AQUINO, S. F.; CHERNICHARO, C. A. L.; FORESTI, E.; SANTOS, M. L. F.; MONTEGGIA, L. O. (2007). Metodologias para determinação da Atividade Metanogênica Específica (AME) em Lodos Anaeróbios.**Engenharia Sanitária e Ambiental**. v. 12, n. 2, 192–201p.

BARBOSA, E. A. A.; ARRUDA, F. B.; PIRES, R. C. M.; SILVA, T. J. A.; SAKAI, E. (2012). Cana-de-açúcar fertirrigada com vinhaça e adubos minerais via irrigação por gotejamento subsuperficial: Ciclo da cana-planta. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v.16, 952-958p.

BASSO, L. C.; BASSO, T. O.; ROCHA, S. N. (2011). Ethanol Production in Brazil: The Industrial Process and Its Impact on Yeast Fermentation. **Biofuel Production – Recent Developments and Prospects**. 1 ed. Rijeka: In Tech, 2011, v.1, 85-100p.

BROWN, N. A.; CASTRO, P. A.; FIGUEIREDO B. C. P.; SAVOLDI, M.; BUCKERIDGE, M. S.; LOPES, M. L.; PAULLILO S. C. L.; BORGES, E. P.; AMORIM, H. V.; GOLDMAN, M. H.; BONATTO, D.; MALAVAZI, I.; GOLDMAN, G.H. (2013). Transcriptional profiling of Brazilian *Saccharomyces cerevisiae* strains selected for semi-continuous fermentation of sugarcane must. **FEMS Yeast Research**. v. 1, n. 13, 277-290p.

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

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

CHEN, Y.; CHENG, J. J.; CREAMER, K. S. (2008). Inhibition of anaerobic digestion process: a review. **Bioresource Technology**. v. 99, n 10, 4044-4064p.

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

CHERUBIN, R. A. **Efeitos da viabilidade da levedura e da contaminação bacteriana na fermentação alcoólica**. 2003. 137p. Tese (Doutorado em Agronomia) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2003.

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

COLARES, C. J. G.; SANDRI, D.(2013). Eficiência do tratamento de esgoto com tanques sépticos seguidos de leitos cultivados com diferentes meios de suporte. **Revista Ambiente & Água**, Taubaté , v. 8, n. 1, 172-185p. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1980-993X2013000100013&lng=en&nrm=iso>. Accesso em 20 nov. 2016.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO (CONAB). **Acompanhamento da Safra Brasileira:** Cana-de-açúcar, segundo levantamento, agosto/2014, Brasilia, 2014. 20p.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO (CONAB). **Acompanhamento da safra brasileira de cana-de-açúcar**. v. 2 – Safra 2015/16, n.1 – Primeiro Levantamento, Brasília, 1-28p, abr. 2015.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO (CONAB) **Conjuntura mensal**: Cana-de-açúcar. V.1 – Período janeiro/2016, Brasília, 1-7p, 2016.

CORTEZ, L. A. B.; ROSSELL, C. E. V.; JORDAN, R. A.; LEAL, M. R. L. V.; LORA, E. E. S.; "R&D NEEDS IN THE INDUSTRIAL PRODUCTION OF VINASSE", 619-636p. In: CORTEZ, Luis Augusto Barbosa. **Sugarcane Bioethanol — R&D for Productivity and Sustainabilit**y. São Paulo: Blucher, 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, 493–529p.

COSTA F.J.C.B., ROCHA B.B.M., VIANA C.E., TOLEDO AC.(1986). Utilization of vinasse effluents from an anaerobic reactor. **Water Science Technology**. v. 18, n. 12, 135-41p.

CRUZ, P. C. F.; TEIJEIRA, P. S.; CARLOS, L. E.; PEREIRA, C.; DÖLL; M. M. R.; BARANA, A. C.(2010). Desempenho de um Filtro Anaeróbico Ascendente de Fluxo Contínuo Preenchido com Espuma de Poliuretano para Tratamento de Esgoto. **Revista Engenharia e Tecnologia**. v. 4, n. 2, 1-10p.

DAMIANO, E. S. G. **Tratamento da vinhaça em reator anaeróbio de leito fluidificado. Dissertação**. 2005.98p. Dissertação (Mestrado em Hidráulica e Saneamento). Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2005.

DAMIANOVIC, M. H. R. Z.; FORESTI, E. (2009). Dynamics of sulfidogenesis associated to methanogenesis in horizontal-flow anaerobic immobilized biomass reactor. **Process Biochemistry**, v. 44, n. 9, 1050-1054p.

DILALLO, R.; ALBERTSON, O. E. (1961). Volatile acids by direct titration**. Journal Water Pollution Control Federation**. v. 33, n. 4, 356-365p.

DÖLL, M. M. R.; FORESTI, E. (2010). Efeito do Bicarbonato de Sódio no Tratamento de Vinhaça em AnSBBR Operado a 55 e 35 °C. **Engenharia Sanitária e Ambiental**, v. 15, n. 3, 275-282p.

DUDA, R. M. **Desempenho de sistema compost por reatores anaeróbios em série seguido de filtro biológico percolador no tratamento de águas residuárias de suinocultura**. 2010. 241 p. Tese (Doutorado em Microbiologia Agropecuária) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2010.

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.Disponível em: <http://www.intechopen.com/books/waste-water-treatment-and-reutilization/anaerobic-treatment-of-industrial-effluents-an-overview-of-applications> acesso em 15 jun. 2015.

ESPAÑA-GAMBOA E.; MIJANGOS-CORTES J.; BARAHONA-PEREZ L.; DOMINGUEZ-MALDONADO J.; HERNÁNDEZ-ZARATE G.; ALZATE-GAVIRIA L.(2012). Vinasses: Characterization and treatments. **Waste Management & Research**. v. 29, n. 12, 1235-50p.

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

FREDERICK, M. K. B. **Estudo genético, fisiológico e molecular de Lactobacillus fermentum envolvidos na floculação de leveduras**. 1994. 56p. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1994.

FREIRE, W. J.; CORTÊZ, L. A. B. **Vinhaça de cana-de-açúcar**. Guaíba: Agropecuária, 2000. 203p.

GERARDI, M. H. **The microbiology of anaerobic digesters.** Jon Wiley & Sons, 2003. 130p.

GIL, A. C. **Como elaborar projetos de pesquisa**. 4. ed. São Paulo: Atlas, 2007.

GODOI, L. A. G.; DAMIANOVIC, M. H. R. Z.; FORESTI, E. (2015). Sulfidogenesis interference on methan production from carbohydrate-rich wastewater. **Water Science & Technology**, v. 72, n. 9, 1644-52p.

GRANATO, E. F. **Geração de energia através da biodigestão anaeróbia de vinhaça**. 2003. Dissertação (Mestrado em Engenharia Industrial) – Universidade Estadual Paulista, Bauru, 2003.

JENKINS, S. R.; MORGAN, J. M.; SAWYER, C. L. (1983). Measuring anaerobic sludge digestion and growth by a simple alkalimetric titration. **Water Pollution Control**. v. 55, n. 5, 448-453p.

HARPER, S. R.; POHLAND, F. G.(1986). Recent developments in hydrogen management during anaerobic biological wasterwater treatment. **Biotechnology and Bioengineering**. v. 28, 585-602p.

HASSUDA, S.; REBOUÇAS, A. C.; CUNHA, R. C. A. (1990). Aspectos qualitativos da infiltração da vinhaça de cana no Aquífero Bauru. São Paulo. **Revista do Instituto Geológico**, v. 11, n. 2, 5-20p.

HOLM-NIELSEN, J. B.; AL SEADI, T.; OLESKOWICZ-POPIEL P. Thefutureofanaerobic digestion and biogas utilization. (2009). **Bioresource Technology**, v. 100, n. 22, 5478-5484p.

HORII, J.; BLUMER, S. A. G.; RIBEIRO, C. A. F. **Fundamentos de tecnologia sucroalcooleira**. [S.l: s.n.], 1999.

LAMONICA, H. M. (2004). Potencial de geração de excedentes de energia elétrica com o biogás produzido a partir da biodigestão da vinhaça na indústria sucro-alcooleira brasileira. **Energy**, v. 0, 1–5p. 2004. Disponível em: <http://www.proceedings.scielo.br/pdf/agrener/n6v2/097.pdf>. Acesso em 15 jun. 2015.

LAZARO, C. Z. **Obtenção e caracterização filogenética de consórcio de bactérias fototróficas púrpuras não sulfurosas consumidoras de ácidos orgânicos visando a produção de hidrogênio em reator anaeróbio de batelada**. 2009. 127p. Dissertação (Mestrado) Departamento de Engenharia Hidráulica e Saneamento, Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2009.

LEÃO, R. M. **Álcool, Energia Verde**. São Paulo: Iqual, 2002.

LEHNINGER, A.L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de Bioquímica**. 2. ed. São Paulo: Sarvier, 2000. 839p.

LENS, P. N. L.; VISSER, A.; JANSSEN, A. J. H.; HULSHOFF POL, L. W.; LETTINGA, G. (1998) Biotechnological treatment of sulphate-rich wastewaters. **Critical Reviews in Environmental Science and** Technology. v. 1, n. 28, 41–88p.

LETTINGA, G.; HULSHOF POL, L. W.; ZEEMAN, G. **Biological Wastewater Treatment. Part I: Anaerobic wastewater treatment**. Lecture Notes. Wageningen Agricultural University, ed. January, 1996.

LONGO, R. R. **Geração de metano em reator UASB: Avaliação de parâmetros de monitoramento para controle do processo de tratamento anaeróbio de vinhaça**. 2015. 147p. Dissertação (Mestrado em Hidráulica e Saneamento) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2015.

MATTORANO, D.A.; MERINAR, T. (1999) Respiratory protection on offshore drilling rigs. **Applied Occupational and Environmental Hygiene**. v. l, n. 14, 141–148p.

MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; STAHL, D. A.; CLARCK, D. P. (2012) **Brock: Biology of Microorganisms**. 13th ed. Benjamim Cummings, Pearson Education. San Francisco, USA.

McCARTY, P. L. (1982) 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, p. 3–22.

McCARTY, P. L. (1964). Anaerobic waste treatment fundamentals III. **Public Works**. v. 95, 91-94p.

McCARTNEY, D. M.; OLESZKIEWICZ, J. A. (1993). Competition between methanogens and sulfate reducers: effect of COD:sulfate ratio and acclimation. **Water Environment Research**. v. 65,n. 5, 655-664p.

MONTALVO, S.; GUERRERO, L.; BORJA, R.; CORTÉS, I.; SÁNCHES, E.; COMLMENAREJO, M. F. (2010). Effect of the Influent COD Concentration on the Anaerobic Digestion of Winery Wastewaters from Grape-Red and Tropical Fruit 137(Guava) Wine Production in Fluidized Bed Reactors with Chilean Natural Zeolite for Biomass Immobilization. **Chemical and Biochemical Engineering**. v.24, n. 2, 219-226p.

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

MOTA, V. T.; SANTOS, F. S.; AMARAL, M. C. S. (2013). Two-stage anaerobic membrane bioreactor for the treatment of sugarcane vinasse: Assessment on biological activity and filtration performance**. Bioresource Technology**, v. 146, n. 0, p. 494-503p.

MUYZER, G.; STAMS, A. J. M. (2008). The ecology and biotechnology of sulphate- reducing bacteria. **Nature Reviews: Microbiology**. v. 6, n. 6, 441-454p.

NACHEVA, P. M.; CHÁVEZ, G. M.; CHACÓN, J. M.; CHUIL, A. C. (2009). Treatment of cane sugar mill wastewater in an upflow anaerobic sludge bed reactor. **Water Science Technology**, v. 60, n. 5, 1347-1352p.

NOGUEIRA, C. E. C.; SOUZA, S. N. M.; MICUANSKI, V. C.; AZEVEDO, R. L.(2015). Exploring possibilities of energy insertion from vinasse biogas in the energy matrix of Paraná State, Brazil. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**. v. 48, n. 1, 300-305p.

OGATA, B. C. **Caracterização das frações celulose, hemicelulose e lignina de diferentes genótipos de cana-de-açúcar e potencial de uso em biorrefinarias**. 2013.108p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2013.

OLIVA-NETO, P.; YOKAYA, F. (1997). Effects of nutritional factors on growth of *Lactobacillus fermentum* mixed with *Saccharomyces cerevisiae* in alcoholic fermentation. **Revista de** Microbiologia. v. 25, n. 1, 25-31p.

OMIL, F.; LENS, P.; VISSER, A.; HULSHOFF POL, L.W.; LETTINGA, G. (1998). Long-term competition between sulphate reducing and methanogenic bacteria in UASB reactors treating volatile fatty acids. **Biotechnology Bioengineering**, v. 57, n. 6, 676-685p.

PAMPLONA, C. **PROÁLCOOL:** impacto em termos técnico-econômicos e sociais do programa no Brasil. Rio de Janeiro: Instituto do Açúcar e do Álcool, 1984. 93p.

PATURAU, M. J. **BY-PRODUCTS OF THE CANE SUGAR INDUSTRY: An Introduction to Their Industrial Utilization**. 1ed. Amsterdam: Elsevier Publishing Company, 1969.

PAULINO, J.; ZOLIN, C. A.; BERTONHA, A.; FREITAS, P. S. L.; FOLEGATTI, M. V.(2011). Estudo exploratório do uso da vinhaça ao longo do tempo. II. Características da cana-de-açúcar**. Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 15, n. 3, p. 244-249p.

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

PINTO, C. P. **Tecnologia da Digestão Anaeróbia da Vinhaça e Desenvolvimento Sustentável**. 1999. 145p. Dissertação (Mestrado em Planejamento de Sistemas Energéticos) - Faculdade de Engenharia Mecânica, Universidade Estadual de Campinas. Campinas, 1999.

PRATA, F.; LAVORENTI, A.; REGITANO, J. B.; TORNISIELO, V. L.(2001). Degradação e sorção de ametrina em dois solos com aplicação de vinhaça. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. 36, 975– 981.

RAJESHWARI, K. V.; BALAKRISHNAN, M.; KANSAL, A.; LATA, K.; KISHORE, V. V. N. (2000). State-of-the-art of anaerobic digestion technology for industrial wastewater treatment. **Renewable & Sustainable Energy Reviews**. v. 4, n. 4, 135-156p.

RAVNÖ, A. B.; PURCHASE, B. S. (2005). Dealing with dextran in the South African sugar industry. **Proceedings of the South African Sugar Technologists Association**. n. 79, v.1, 28-47p.

REZENDE, J. O. (1984). Vinhaça: Outra Grande Ameaça ao Meio Ambiente. **Revista Magistra**, v.1.

RIBAS, M. M. F. **Tratamento de vinhaça em reator anaeróbio operado em batelada sequencial contendo biomassa imobilizada sob condições termofílicas e mesofílicas**. 2006. 175 p. Tese (Doutorado em Engenharia Civil) - Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2006.

RIBÈREAU-GAYON, P.; DUBOURDIER, D.; DONÈCHE, B.; ANDLONVAUD,A. **Handbook of Oenology**. v. 1. The microbiology of wine and vinifications. John Wiley and Sons, West Sussex, 2005.

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

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

ROCHA, M. A. G. **Estudos da atividade metanogênica de lodos e da biodegradabilidade anaeróbia de efluentes de indústria de bebidas**. 2003. 130 p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Ambiental e Recursos Hídricos) – Centro de Tecnologia e e Geociências, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2003.

RODELLA, A. A.; ZAMBELLO JÚNIOR, E.; ORLANDO FILHO, J. Effects of vinasse added to soil on pH and exchangeable aluminum content. In: CONGRESS OF THE INTERNATIONAL SOCIETY OF SUGAR CANE TECHNOLOGISTS, 18., Havana, 1983. **Proceedings**. Havana : Universidad de La Habana, 1983. p. 189-214.

ROSSETTO, A. J. **Utilização Agronômica dos Subprodutos e Resíduos da Indústria Açucareira e Alcooleira**. In: PARANHOS, S. B. (Coord.) Cana-de-açúcar – cultivo e utilização. Campinas: Fundação Cargill, 1987, 433-504p.

SHIMADZU (2014) **N2O/CO/CO2/CH4 analysis system (TCD/FID) GC-2014NCCC1**. Application data sheet no.57. Disponível em <http://www.shimadzu.com/an/literature/systemgc/hkc114057.html> acesso em 21 jul. 2016.

SILVA, A. L. L.; COSTA, J. L.; GOLLO, A. L.; SANTOS, J. D.; FORNECK, H. R.; BIASI, L. A.; SOCCOL, V. T.; CARVALHO, J. C.; SOCCOL, C. R. (2014). Development of a vinasse culture médium for plant tissue culture. **Pakistan Journal of Botany**. v. 46, n. 6, 2195-2202p.

SILVA, da A. **Vinhaça concentrada da cana-de-açúcar: monitoramento das propriedades químicas do solo e mineralização líquida do nitrogênio**. 2012. 109 p. Tese (Doutorado em Ciências. Área de concentração: Energia na Agricultura e no Ambiente) - Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2012.

SILVA, J. D.; SCHNEIDERS, D.; TILL, A.; LAPA, K. R.; PINHEIRO, A. (2013). Atividade metanogênica específica (AME) de lodos industriais provenientes do tratamento biológico aeróbio e anaeróbio. **Ambiente & Água.** v 8, n. 2, 135-145p.

SLAPACK, G. E.; RUSSEL, I.; STEWART, G. G. **Thermophilic Microbes in Ethanol Production**. CRC Press, Inc. Boca Raton, Florida, 1987.186p.

SOARES, H. M.; HIRATA, Y. S. Classroom practice. In: COURSE OF BIOLOGICAL TREATMENT OF WASTE, 4., 30 jun. - 11 jul., Florianopolis. **Proceedings.**[S.l.]: CBAB MCT/CNPQ ALFA FURB CPGENQ/UFSC, 1999.

SOUZA, M.; FUZARO, G.; POLEGATO, A. Thermophilic anaerobic digestion of vinasse in pilot plant UASB reactor.(1992). **Water Science Technology**. v. 25, n. 7, 213–222p.

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

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

SZYMANSKI, M. S.; BALBINOT, R.; SCHIRMER, NAGEL, W. (2010). Biodigestão anaerobia da vinhaça: aproveitamento energético do biogás e obtenção de créditos de carbono- estudo de caso. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 31, n. 4, 901-912p.

TONOLI, F. C. **Adaptação de leveduras para fermentação com alto teor alcóolico**. 2016. 77p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) – Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2016.

VON SPERLING, M. **Introdução à qualidade das águas e ao tratamento de esgotos**. 3ª ed. Belo Horizonte: Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental/ UFMG, 2005.

WILKIE, A. C. Biomethane from biomass, biowaste and biofuels. In:**Bioenergy**. 195-205p. WALL, J. D. HARDWOOD, C. S.; DEMAIN, A. (eds).American Society For Microbiology Press, Washingtoon DC.2008.

ZOLIN, C. A.; PAULINO, J.; BERTONHA, A.; FREITAS, P. S. L. de. FOLEGATTI, M. V. (2011). Estudo exploratório do uso da vinhaça ao longo do tempo. I. Características do solo**. Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental,** v.15, n.1, 22-28.