UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO - USP
ESCOLA DE ENGENHARIA DE SÃO CARLOS - EESC
PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA HIDRÁULICA E SANEAMENTO

MATHEUS ARNDT DE SOUZA

**EFEITOS DA SUPLEMENTAÇÃO DE METAIS TRAÇO NO PROCESSAMENTO
DA VINHAÇA DE CANA-DE-AÇÚCAR EM REATORES ANAERÓBIOS
MESOFÍLICOS EM BATELADA**

VERSÃO CORRIGIDA

São Carlos – SP

2014

MATHEUS ARNDT DE SOUZA

**EFEITOS DA SUPLEMENTAÇÃO DE METAIS TRAÇO NO PROCESSAMENTO
DA VINHAÇA DE CANA-DE-AÇÚCAR EM REATORES ANAERÓBIOS
MESOFÍLICOS EM BATELADA**

Dissertação apresentada à Escola de Engenharia de São Carlos, da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências: Engenharia Hidráulica e Saneamento.

Orientador: Prof. Dr. Eduardo Cleto Pires

São Carlos – SP

2014

AUTORIZO A REPRODUÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO,
POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS
DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

S729e Souza, Matheus Arndt de
Efeitos da suplementação de metais traço no
processamento da vinhaça de cana-de-açúcar em reatores
anaeróbios mesofílicos em batelada / Matheus Arndt de
Souza; orientador Eduardo Cleto Pires. São Carlos,
2014.

Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação
e Área de Concentração em Hidráulica e Saneamento --
Escola de Engenharia de São Carlos da Universidade de
São Paulo, 2014.

1. Tratamento anaeróbio. 2. Vinhaça. 3. Reator
anaeróbio em batelada. 4. Metano. 5. Metais traço. I.
Título.

FOLHA DE JULGAMENTO

Candidato: Bacharel **MATHEUS ARNDT DE SOUZA.**

Título da dissertação: "Efeitos da suplementação de metais traço no processamento da vinhaça de cana-de-açúcar em reatores anaeróbios mesofílicos em batelada".

Data da defesa: 19/09/2014

Comissão Julgadora:

Resultado:

Prof. Titular **Eduardo Cleto Pires (Orientador)**
(Escola de Engenharia de São Carlos/EESC)

Aprovado

Profa. Dra. **Márcia Helena Rissato Zamariolli Damianovic**
(Universidade Estadual de Campinas/UNICAMP)

Aprovado

Prof. Dr. **Arnaldo Sarti**

(Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho"/UNESP- Araraquara)

APROVADO

Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Hidráulica e Saneamento:

Profa. Associada **Maria Bernadete A. Varesche Silva**

Presidente da Comissão de Pós-Graduação:

Prof. Associado **Paulo César Lima Segantine**

O METABOLISMO DAS COISAS IV – PEDRAS E PRAIAS

“...Areia da praia, caminho longo que percorri com gosto. Areia é o fim de toda pedra que se expõe ao vento, à chuva, ao distender–contrair da matéria exposta aos caprichos da temperatura, pedra que acata o romper das amarras que oprimem átomos indomáveis. Se no meio do caminho do poeta havia uma pedra, o tempo dirá que tal pedra se tornará um caminho. Tempo longo, geológico, é verdade; tempo que não veremos. Mas imperativo: toda pedra será caminho, se exposta às intempéries...”

Paulo Robson de Souza

08.05.2014

Dedico esta pesquisa aos meus pais, Paulo Robson de Souza e Elisabeth Arndt, e minhas irmãs, Camila e Mariana, com carinho e amor.

AGRADECIMENTOS

Com prazer, gostaria de agradecer as pessoas que fizeram parte desta conquista, sem elas nada disso faria sentido. Nesta caminhada espero carregar comigo seus ensinamentos e valores, as amizades e os sorrisos sinceros.

Antes de tudo quero agradecer à minha família, vocês foram fundamentais para mais esta realização. Obrigado pelo amor, e por acreditar que os obstáculos são menores que nossos sonhos, tornando tudo isso possível. Vocês são meus maiores exemplos. Pai, Mãe, Mari e Mila, amo vocês.

Não poderia deixar de mencionar meus queridos avôs e avós. Vó Santinha e vô Jaime, vô Edna e vô Henrique (*in memoriam*). Apreendi muito com vocês. Obrigado pelo carinho e pelos momentos inesquecíveis. Tenho sorte em fazer parte desta querida família.

Ao orientador Prof. Dr. Eduardo Cleto Pires, exímio pesquisador, que mais do que auxiliar esta pesquisa, contribuiu para o desenvolvimento do meu senso crítico e crescimento profissional. E a equipe de pesquisadores, Tiago, Guilherme, Samuel, Inaê, e Vinícius, pela relação acadêmica e amizade.

À Valéria Del Nery, Marcia Damianovic, Darío Naranjo, Adriana Maluf, Livia Botta, Fabrício Motteran, Eloisa Pozzi, Gustavo Mockaitis, Carol, Inês e Janja, que contribuíram muito para a realização deste trabalho. E aos pesquisadores do LPB.

Ao companheiro de pesquisa Tiago Duarte que se tornou um grande amigo e irmão, sempre presente, mesmo nas jornadas de trabalho mais improváveis. Ao velho e bom amigo, e cofundador da República XB, Osvaldo Mamprim.

Aos meus grandes mestres da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Sônia Corina Hess, Carlos Nobuyoshi Ide, Maria Lúcia Ribeiro, Paula Loureiro Paulo, Hamilton Germano Pavão e Antônio Conceição Paranhos Filho.

Aos novos e verdadeiros amigos de São Carlos/SP, Paulo M. Maciel, Felipe Nascimento, Davi de Andrade, Samuel Aquino, Artur S. Rotiroti, Carla Diniz, Juliana Nóbrega, Karen S. Meca, Carol G. Garcia, Andressa Bechara, Lais A. Giraldi, Araceli

Fazzio e Tácyo Acioli. E aos meus amigos moradores da República XB, Rodrigo Longo, Guilherme L. Giglio e Willame Cavalcante.

Quero agradecer aos meus antigos amigos de Campo Grande/MS, que estiveram presentes desde o início do percurso. Yuri, Hallex, Wellington, Adriano, entre outros e não menos importantes. Aos amigos desde a graduação, Alex T., Gabriel Ferreira Souza, Gabriel Braga, Fillipi, Tiago Gussi, Vinícius Battistelli Lemos, Rodrigo Soares, Rodrigo Martins de Almeida, Nayara Falanca.

Em especial, quero homenagear um grande amigo e guerreiro Matheus Di Giacomo (*in memoriam*), amigo de infância, companheiro de mochilão, que me ensinou a ser forte e mostrou com sua humildade que existem muitos valores maiores que os que reluzem e cegam.

Ao CNPq, FAPESP e CAPES pelo apoio e bolsa concedida.

RESUMO

SOUZA, M. A. **Efeitos da suplementação de metais traço no processamento da vinhaça de cana-de-açúcar em reatores anaeróbios mesofílicos em batelada.** 2014. 113 p. Dissertação (Mestrado) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

O processamento anaeróbio da vinhaça se apresenta como uma alternativa para a recuperação de energia (biogás), e reaproveitamento das suas características nutricionais através da disposição no solo. Com o intuito de elevar a eficiência energética, o presente trabalho teve como objetivo estimular a produção de metano em reatores anaeróbios em batelada de lodo granular adaptado, alimentados com vinhaça de usina sucroalcooleira, por meio da adição de metais traço. Foram avaliadas as suplementações da vinhaça com Co, Zn, Mo, Ni, Mn e W. Na Fase 1 foram realizados 4 ensaios, os reatores foram analisados individualmente nas concentrações $200 \mu\text{g.L}^{-1}$, $350 \mu\text{g.L}^{-1}$, $500 \mu\text{g.L}^{-1}$ e $800 \mu\text{g.L}^{-1}$. Na Fase 2 verificou-se o comportamento dos metais em conjunto, à concentração de $350 \mu\text{g.L}^{-1}$ de cada micronutriente (Co, Ni, Zn, Mo, Cu e Mn). Os dados de produção acumulada de CH_4 foram ajustados pelo modelo modificado de Gompertz, e foram obtidas as constantes cinéticas. Na Fase 1, verificou-se que a concentração de $200 \mu\text{g.L}^{-1}$ de Co foi a mais adequada aos experimentos e apresentou a maior velocidade máxima de produção de CH_4 , $121,30 \text{ mL.d}^{-1}$ (aumento de 17% na taxa de produção de metano). Nesta mesma Fase, o W apresentou indícios de inibição à concentração de $800 \mu\text{g.L}^{-1}$, e os demais metais exibiram os melhores resultados nesta mesma concentração, a velocidade de produção (R_m) aumentou para o Mn (26%), Ni (25%), Cu (21%) e Mo (19%), e os rendimentos mais expressivos foram para Mo ($0,267 \text{ mL CH}_4.\text{mg}^{-1} \text{ DQO}_{\text{rem}}$), Zn ($0,240 \text{ mL CH}_4.\text{mg}^{-1} \text{ DQO}_{\text{rem}}$) e Ni ($0,232 \text{ mL CH}_4.\text{mg}^{-1} \text{ DQO}_{\text{rem}}$). A Fase 2 não apresentou resultados satisfatórios, as verificações não indicaram variação relevante entre os reatores do ensaio e controle.

Palavras Chaves: tratamento anaeróbio; vinhaça; reator anaeróbio em batelada; metano; metais traço.

ABSTRACT

SOUZA, M. A. **Effects of trace metals supplementation in the processing of sugarcane vinasse in mesophilic anaerobic batch reactors.** 2014. 113 p. Dissertation (Master Degree) – São Carlos School of engineering, University of São Paulo, São Paulo, 2014.

Anaerobic processing of vinasse is presented as an alternative to energy recovery (biogas), and reuse of its nutritional characteristics through the provision on the ground. In order to increase energy efficiency, this study aimed to stimulate methane production in adapted anaerobic batch reactors with granular sludge fed with vinasse from sugarcane biorefineries, through the addition of trace metals. The supplementation vinasse were evaluated with Co, Zn, Mo, Ni, Mn and W. In phase 1 four essays were realized, and micronutrient were analyzed individually in concentrations of 200 $\mu\text{g.L}^{-1}$, 350 $\mu\text{g.L}^{-1}$, 500 $\mu\text{g.L}^{-1}$ and 800 $\mu\text{g.L}^{-1}$. In phase 2 it was observed the behavior of metal together, with micronutrient's concentration of 350 $\mu\text{g.L}^{-1}$ (Co, Ni, Zn, Mo, Cu e Mn). The data of methane's production were adjusted by Gompertz modified model and kinetics constants were obtained. In phase 1 it was verified that the concentration of 200 $\mu\text{g.L}^{-1}$ of Co was optimal for the experiments and showed the highest maximum production velocity of CH_4 , 121,30 mL.d^{-1} (increase of 17%). In this phase W showed evidence of inhibition at a concentration of 800 $\mu\text{g.L}^{-1}$, and other metals showed the best results in the same concentration. The velocity of production (R_m) increased to Mn (26%), Ni (25%), Cu (21%) e Mo (19%), and the most significant yields were to Mo (0,267 $\text{mL CH}_4.\text{mg}^{-1}\text{DQO}_{\text{rem}}$), Zn (0,240 $\text{mL CH}_4.\text{mg}^{-1}\text{DQO}_{\text{rem}}$) and Ni (0,232 $\text{mL CH}_4.\text{mg}^{-1}\text{DQO}_{\text{rem}}$). Phase 2 did not show satisfactory results.

Key-words: anaerobic treatment; sugarcane vinasse; anaerobic batch reactors; methane; trace metals.

LISTA DE FIGURAS

Figura 3.1 - Mapa da produção de cana-de-açúcar (http://www.unica.com.br/mapa-da-producao/)	6
Figura 3.2 - Fluxograma do processo de fabricação do açúcar e álcool a partir do melaço da cana-de-açúcar. (Adaptado de Nandy, Shastry e Kaul, 2002). ...	7
Figura 3.3 - Efeitos da adição de metais traço na eficiência de um reator	16
Figura 4.1 - Reator anaeróbio em escala de laboratório (A: Alimentação; R: recirculação; S: Saída; B1: Bomba de alimentação; B2: Bomba de recirculação; SG: Saída do Biogás).....	23
Figura 4.2 - Detalhe da fita térmica do reator UASB.	24
Figura 4.3 - Área reacional do reator UASB (1: sistema mecânico; 2: controlador de temperatura).	24
Figura 4.4 - Detalhe do <i>head space</i> do reator UASB.	25
Figura 4.5 - Visão geral do reator UASB. (1: alimentação; 2: reservatório; B1: bomba de alimentação; B2: bomba de recirculação; S: saída).	25
Figura 4.6 - Detalhe da biomassa anaeróbia adaptada.....	25
Figura 4.7 - Calibração dos frascos Duran	26
Figura 4.8 – Detalhe Calibração dos frascos Duran.....	26
Figura 4.9 - Reatores inoculados e visão frontal do Shaker	27
Figura 4.10 - Detalhe interno do Shaker	27
Figura 4.11 - Detalhe do cromatógrafo gasoso GC-2010 Shimadzu	27
Figura 4.12 - Detalhe do barômetro	27
Figura 4.13 - Esquema experimental	28
Figura 4.14 - Matriz experimental.....	30
Figura 5.1 - Variação da DQO inicial dos ensaios em batelada da Fase 1	39
Figura 5.2 – Remoção de DQO do Ensaio A – Fase 1.....	40

Figura 5.3 - Remoção de Carboidratos do Ensaio A – Fase 1	40
Figura 5.4 - Variação dos Ácidos Graxos Voláteis (AGV) no Ensaio A - Fase 1	41
Figura 5.5 - Remoção de DQO do Ensaio B – Fase 1	45
Figura 5.6 - Remoção de Carboidratos do Ensaio B – Fase 1	45
Figura 5.7 - Variação dos Ácidos Graxos Voláteis (AGV) no Ensaio B - Fase 1	46
Figura 5.8 - Remoção de DQO do Ensaio C – Fase 1	49
Figura 5.9 - Remoção de Carboidratos do Ensaio C – Fase 1	49
Figura 5.10- Variação dos Ácidos Graxos Voláteis (AGV) no Ensaio C - Fase 1	50
Figura 5.11 - Remoção de DQO do Ensaio D – Fase 1	53
Figura 5.12 - Remoção de Carboidratos do Ensaio D – Fase 1	53
Figura 5.13 - Variação dos Ácidos Graxos Voláteis (AGV) no Ensaio D - Fase 1	54
Figura 5.14 - Remoção de DQO - Fase 2	57
Figura 5.15 - Remoção de carboidratos totais - Fase 2	57
Figura 5.16 - Variação dos Ácidos Graxos Voláteis (AVG) - Fase 2	58
Figura 5.17 - Velocidade relativa máxima de produção de metano para as variações de concentração individual dos metais traço.....	60
Figura 5.18 - Velocidade relativa máxima de produção de metano para as variações de concentração individual dos metais traço (b).....	60
Figura 5.19 - Variação dos rendimentos da produção de metano (CH ₄) nos ensaios A, B, C e D.....	61
Figura 5.20 - Variação dos rendimentos na produção de metano (CH ₄) nos ensaios B e D.	62
Figura 5.21 - Superfície de resposta do volume acumulado de CH ₄ (mL) para as concentrações de Mo (µg.L ⁻¹) pelo tempo (d).....	63
Figura 5.22 - Superfície de resposta do volume acumulado de CH ₄ (mL) para as concentrações de Ni (µg.L ⁻¹) pelo tempo (d).	63

LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1 - Sumário da caracterização da vinhaça proveniente do xarope e melaço da cana, e do material lignocelulósico (Wilkie et al. 2000).....	8
Tabela 3.2 - Eficiência de remoção de DQO associada ao tratamento anaeróbio de vinhaça.	9
Tabela 3.3 - Composição média do biogás (SALOMON e LORA, 2006).	11
Tabela 3.4 - Funções de alguns metais traço essenciais em várias enzimas envolvidas em transformações e reações anaeróbias (adaptado de FERMOSO et al. 2009)	13
Tabela 4.1 - Composição dos compostos e concentrações dos metais adicionados aos reatores.....	31
Tabela 4.2 - Análises físico-químicas realizadas no decorrer dos ensaios.	32
Tabela 5.1 - Caracterização da vinhaça da Usina São Martinho, utilizada nos ensaios.	36
Tabela 5.2 - Eficiência de remoção de matéria orgânica do Ensaio A - Fase 1	40
Tabela 5.3 - Rendimento da produção de CH ₄ com relação à remoção de matéria orgânica (Ensaio A)	42
Tabela 5.4 - Parâmetros cinéticos do Ensaio A, Fase 1.....	43
Tabela 5.5- Eficiência de remoção de matéria orgânica do Ensaio B - Fase 1	45
Tabela 5.6 - Rendimento da produção de CH ₄ com relação à remoção de matéria orgânica (Ensaio B)	47
Tabela 5.7 - Parâmetros cinéticos do Ensaio B.....	48
Tabela 5.8 - Eficiência de remoção de matéria orgânica do Ensaio C - Fase 1	49
Tabela 5.9 - Rendimento da produção de CH ₄ com relação à remoção de matéria orgânica (Ensaio C).....	51
Tabela 5.10 - Parâmetros cinéticos do Ensaio C	51

Tabela 5.11- Eficiência de remoção de matéria orgânica do Ensaio D - Fase 1	53
Tabela 5.12 - Rendimento da produção de CH ₄ com relação à remoção de matéria orgânica (Ensaio D).....	55
Tabela 5.13 - Parâmetros cinéticos do Ensaio D –	56
Tabela 5.14 - Rendimentos e parâmetros cinéticos - Fase 2	58
Tabela 7.1 - Parâmetros de matéria orgânica do Ensaio A [200 µg] da Fase 1	76
Tabela 7.2 - Parâmetros de matéria orgânica do Ensaio B [350 µg] da Fase 1	76
Tabela 7.3 -Parâmetros de matéria orgânica do Ensaio C [500 µg] da Fase 1	77
Tabela 7.4 - Parâmetros de matéria orgânica do Ensaio D [800 µg] da Fase 1	78

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AGV - Ácidos Graxo Voláteis

AnSBR – *Anaerobic sequencing batch reactor*

CAE – Carga Aplicada Específica

CAPES – Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior

CETESB - Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental

COV – Carga Orgânica Volumetrica

CH₄ - Metano

CNPq – Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

CNTP – Condições Normais de Temperatura e Pressão

DBO – Demanda Bioquímica de Oxigênio

DQO – Demanda Química de Oxigênio

EESC – Escola de Engenharia de São Carlos

MBR – Membrane Bioreactor

pH – Potencial Hidrogeniônico

RALF – Reator Anaeróbio de Leito Fluidizado

RPM – Rotações por Minuto

ST – Sólidos Totais

SSV - Sólidos Suspensos Voláteis

TDH - Tempo de Detenção Hidráulica

UASB - *Upflow anaerobic sludge blanket*

UNICA – União da Indústria de Cana de Açúcar

USP – Universidade de São Paulo

LISTA DE SIMBOLOS

P_{ac} - Produção Acumulada de Metano

P - Potencial de produção de metano (mL CH_4)

R_m - Velocidade máxima de produção de metano (mL $CH_4 \cdot d^{-1}$)

$y(t)$ - Volume acumulado de metano (mL CH_4)

λ - Fase lag (d)

Q – Vazão de bombeamento líquido

$^{\circ}C$ – Graus Celsius

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	1
2.	OBJETIVOS	4
2.1.	Objetivo Geral.....	4
2.2.	Objetivos Específicos	4
3.	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	5
3.1.	Cenário Sucroalcooleiro	5
3.2.	Vinhaça.....	6
3.2.1.	Caracterização e Impactos Ambientais	6
3.2.2.	Processamento e Disposição Final.....	9
3.2.3.	Potencial Energético da Vinhaça	10
3.3.	Metais Traço na Digestão Anaeróbia	11
3.3.1.	Biodisponibilidade e Interação Metal-Biomassa	14
3.4.	Suplementação da Água Residuária por Metais Traço	15
3.4.1.	Efeitos de Estimulação	16
3.4.2.	Efeitos de Inibição	19
3.4.3.	Efeitos Sinérgicos	20
4.	MATERIAIS E MÉTODOS.....	22
4.1.	Efluente e Inóculo	22
4.2.	Aparatos e Procedimentos Experimentais.....	26
4.3.	Configuração Experimental	29
4.4.	Métodos Analíticos	31
4.4.1.	Análises Físico-Químicas	31
4.4.2.	Ácidos Graxos Voláteis (AGV).....	32
4.4.3.	Composição do Biogás.....	33
4.4.4.	Ajuste dos Parâmetros Cinéticos.....	33
4.4.5.	Análises Estatísticas.....	34
5.	RESULTADOS E DISCUSSÕES	35

5.1.	Coleta e Caracterização da Vinhaça	35
5.2.	Adaptação da Biomassa.....	37
5.3.	Ensaio Preliminares.....	38
5.4.	Ensaio de Suplementação da Vinhaça	38
5.4.1.	Fase 1 – Avaliação da Eficiência da Digestão Anaeróbia com a Adição Individual dos Metais Traço	38
5.4.2.	Fase 2 – Avaliação dos Efeitos Sinérgicos entre os Metais Traço na Digestão Anaeróbia	56
5.4.3.	Confronto dos Parâmetros Cinéticos e de Rendimento	59
6.	Conclusões.....	65
7.	Sugestões às Próximas Pesquisas	66

1. INTRODUÇÃO

As prospecções do cenário energético, devido às questões de sustentabilidade, viabilidade econômica e incentivos fiscais, indicam tendências aos investimentos em fontes renováveis de energia. A produção de álcool da cana-de-açúcar se apresenta como uma boa solução para atender as demandas de biocombustível do Brasil, visto que, o país possui condições climáticas favoráveis, baixo custo de produção e capacidade de crescimento devido à extensão territorial.

No entanto, as questões ambientais são relevantes para a continuidade do processo de produção e devem ser tratadas com prudência. As usinas sucroalcooleiras, assim como em outros processos produtivos, possuem resíduos intermediários na obtenção de seu produto final. Na produção de açúcar e etanol podemos dar ênfase em alguns resíduos importantes, como a vinhaça, o bagaço e a palha da cana-de-açúcar.

No que tange à vinhaça, atualmente a medida mais difundida e rentável para a sua disposição é a aplicação *in natura* no solo agricultável. Este efluente assume bem o papel fertilizante, em virtude das suas características nutricionais, mesmo que a proporção dos nutrientes não seja a ideal ao solo. Entretanto, sua alta carga orgânica exige devido controle, para que a sua disposição não promova danos ambientais, como a eutrofização dos recursos hídricos e prejuízos aos solos.

Uma alternativa viável para reduzir esta adversidade se encontra na digestão anaeróbia deste substrato. Segundo Driessen, Tielbaard e Vereijken (1994), o processamento em reatores biológicos em escala real mostra-se eficiente, apresentando remoção de DQO entre aproximadamente 65% e 95%. Após a digestão e aproveitamento do biogás, o efluente processado rico em fósforo, nitrogênio e potássio, e a carga orgânica reduzida, pode ser disposto em solo para a recuperação dos nutrientes utilizados na agricultura (WILKIE, RIEDESEL E OWENS, 2000).

Embora o processo se apresente vantajoso em vários aspectos, ele exhibe instabilidades devido à complexidade do efluente. Ainda hoje, existem lacunas de conhecimento, entre eles o papel dos micronutrientes, que merecem investigações para que a digestão da vinhaça seja consolidada e ocorra com estabilidade.

As necessidades nutricionais das populações microbianas envolvidas nos processos biológicos são estabelecidas a partir da composição química das células microbianas. Para que a biodegradação ocorra com sucesso, os nutrientes inorgânicos necessários ao crescimento devem ser fornecidos em quantidades suficientes. Os efluentes industriais possuem composição mais específica e usualmente necessitam de suplementação de nutrientes para ótima degradação (CHERNICHARO, 1997).

Os principais micronutrientes requeridos pelas bactérias que formam o metano a partir do acetato são ferro, cobalto, níquel e molibdênio (SPEECE, 1996). Esses metais tem um papel importante nos processos bioquímicos. Segundo Oleszkiewicz e Sharma (1990), dependendo da sua concentração, eles podem estimular a metanogênese e melhorar a granulação anaeróbia, ou exercer efeitos tóxicos e inibitórios.

Esses metais essenciais devem estar biodisponíveis no efluente de forma que eles atuem efetivamente na digestão do sistema. Wang, Huang e Allen (2003) afirmam que existe relação entre a concentração de matéria orgânica dissolvida no efluente e a biodisponibilidade dos metais traço aos microrganismos metanogênicos, sendo que em altas concentrações, os metais tendem à redução de sua biodisponibilidade.

A biodisponibilidade dos metais traço pode sofrer interferência de outros fatores. Barber e Stuckey (2000) levantaram a influência do sulfeto na interação dos metais. Neste caso, a baixa solubilidade dos precipitados do sulfeto com os metais em ambiente anaeróbio reduz a associação dos metais com o consórcio metanogênico, ou seja, ocorre a redução da biodisponibilidade dos micronutrientes.

Visto que a vinhaça possui em média uma alta carga orgânica e elevada concentração de sulfatos, existe a possibilidade da digestão desta água residuária sofrer limitações devido à relação citada, quando comparada com outros efluentes estudados. Ou seja, ainda que a vinhaça apresente quantidade de micronutrientes significativas às rotas metabólicas, estes mesmo metais podem não estar biodisponíveis aos microorganismos da digestão anaeróbia devido às características do efluente.

Uma vez confirmada a relevância das funções dos metais traço à digestão anaeróbia, a presente pesquisa visou avaliar a interferência de alguns metais na digestão anaeróbia da vinhaça, buscando maior estabilidade no processamento deste efluente, elevar a eficiência do sistema, e com isso, estimular a produção de metano da digestão anaeróbia para a geração de energia.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Estimular a produção de metano em reatores anaeróbios em batelada de lodo granular adaptado, alimentados com vinhaça de usina sucroalcooleira, por meio da adição de metais traço na vinhaça a ser processada.

2.2. Objetivos Específicos

- a) Quantificar a concentração adequada para a suplementação de cobalto, zinco, molibdênio, níquel, manganês, cobre e tungstênio na vinhaça, buscando aumentar o rendimento da metanogênese do processamento anaeróbio em reatores em batelada.
- b) Determinar os parâmetros cinéticos da produção de metano para variadas concentrações de metais traço, através do ajuste dos dados à curva definida pelo modelo modificado de Gompertz.
- c) Avaliar o potencial energético da biodegradação da vinhaça a partir da suplementação com metais traço.
- d) Avaliar a capacidade de inibição da incorporação de altas quantidades de metais traço

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

O levantamento das pesquisas relacionadas com o assunto abordado foi realizado a partir dos bancos de dados Periódicos Capes (<http://www.periodicos.capes.gov.br/>), Water Science e Technology (<http://www.iwaponline.com/wst/toc.htm>) e Science Direct (<http://www.sciencedirect.com/>). Buscou-se resgatar o estado da arte, com os artigos mais recentes. Nestes acervos, foram feitas buscas com as palavras-chave: vinasse, stillage, trace metals, anaerobic digestion, UASB reactor, methane production, metal supplementation e inhibition, isoladamente e em conjunto.

3.1. Cenário Sucroalcooleiro

A Conab (2013) realizou um acompanhamento da safra brasileira de cana-de-açúcar, com produção destinada à fabricação de açúcar e/ou álcool, da safra 2012/2013. Nesta investigação, constatou-se que, a área cultivada com cana-de-açúcar, colhida nesta safra foi de 8.485,0 mil hectares, e houve um aumento de 1,5% em relação à área da safra passada.

O estado de São Paulo é o maior produtor, seguido por Goiás, Minas Gerais, Paraná, Mato Grosso do Sul, entre outros menos expressivos. Segundo Conab (2013), Apenas São Paulo possui 52,07% da área cultivada na safra 2012/13 (4.419,48 mil hectares). A produtividade média brasileira ficou estimada em 69.407 kg/ha, confirmando aumento na eficiência kg/ha com relação safra anterior.

A concentração da produção da cana-de-açúcar e das destilarias de açúcar, etanol e bioeletricidade, está descrita na Figura 3.1, por regiões e Estados do Brasil.

Figura 3.1 - Mapa da produção de cana-de-açúcar (<http://www.unica.com.br/mapa-da-producao/>)

3.2. Vinhaça

3.2.1. Caracterização e Impactos Ambientais

A vinhaça é um subproduto do processamento industrial para a obtenção do etanol. Nas usinas sucroalcooleiras, o volume de vinhaça produzida é de aproximadamente 15 litros para cada litro de etanol (VIANA, 2006). Segundo Unica (2014), o Estado de São Paulo produziu aproximadamente 14 bilhões de litros de etanol, volume anual acumulado até a primeira quinzena de 2014, o que demonstra o grande volume de vinhaça gerada no Estado, e que requer destinação adequada.

O fluxograma do processo de fabricação do etanol em uma usina de açúcar e álcool, que descreve a rota de produção da vinhaça, está detalhado na Figura 3.2. Constitui-se em um efluente muito concentrado, podendo atingir concentrações de DQO (demanda química de oxigênio) acima de 100 g.L^{-1} (aproximadamente 200 vezes mais concentrada que o esgoto sanitário). Esta água residuária *in natura*

apresenta temperaturas muito altas, por volta de 80 °C a 90 °C (VIANA, 2006). A vinhaça também é rica em substâncias minerais, e possui altas concentrações de sólidos suspensos.

Figura 3.2 - Fluxograma do processo de fabricação do açúcar e álcool a partir do melaço da cana-de-açúcar. (Adaptado de Nandy, Shastry e Kaul, 2002).

Segundo Wilkie, Riedesel e Owens (2000), as características da vinhaça variam de acordo com o processo produtivo e a matéria-prima utilizada na fabricação do produto final. Ela pode exibir diferentes composições qualitativas, com a variação de alguns parâmetros, como DQO, DBO (demanda bioquímica de oxigênio), cálcio, fósforo, potássio e outros nutrientes (Tabela 3.1).

Tabela 3.1 - Sumário da caracterização da vinhaça proveniente do xarope e melaço da cana, e do material lignocelulósico (WILKIE, RIEDESEL E OWENS, 2000).

Matéria-prima	Vinhaça produzida (L) / L de etanol	DQO (g.L⁻¹)	N_{total} (g.L⁻¹)	P_{total} (g.L⁻¹)	S-SO₄ (g.L⁻¹)	pH
Xarope da cana	16,3 ± 5,3	30,4 ± 8,2	0,63 ± 0,32	0,13 ± 0,11	1,36 ± 1,4	4,0 ± 0,5
Melaço da cana	14,0 ± 3,3	89,4 ± 30,6	1,23 ± 0,64	0,19 ± 0,3	3,48 ± 2,52	4,5 ± 0,3
Material celulósico	11,1 ± 4,14	61,3 ± 40,0	2,79 ± 0,45	28 ± 30	0,65 ± 0,12	5,3 ± 0,5

Devido às suas características, é necessário controlar a taxa de aplicação da vinhaça no solo, monitorando os parâmetros de necessidade de nutrientes pelo solo (nitrogênio e potássio), para manter o equilíbrio nutricional da cultura e evitar a saturação da área plantada. Essa gestão conduz a certo limite de aplicação de litros de vinhaça por hectare plantado. Por sua vez, Ribeiro et al. (2010) relatam que esta prática pode aumentar a lixiviação de metais pesados, como o chumbo, enquanto que Cruz, Righetto e Nogueira (1991) indicam, que dependendo do tipo de solo, há possibilidade de contaminação de águas subterrâneas com o aumento significativo de nitrato.

3.2.2. Processamento e Disposição Final

O processamento anaeróbio da vinhaça vem sendo investigado por vários autores (MORAES et al., 2014; SOUZA et al., 2012; UELLEND AHL e AHRING, 2010; WILKIE, RIEDESEL E OWENS, 2000). Apesar da necessidade do aprimoramento deste tratamento para altas cargas, o processo mostra-se eficiente na maioria dos casos, conforme observado na Tabela 3.2.

Tabela 3.2 - Eficiência de remoção de DQO associada ao tratamento anaeróbio de vinhaça.

Matéria-Prima	Reator	COV (g.DQO.L ⁻¹ .d ⁻¹)	Temperat. °C	Eficiência %	Referência
Cana-de-açúcar	UASB	22	22° C	88%	Driessen, Tielbaard e Vereijken (1994)
Cana-de-açúcar	MBR	2,5	22° C	96,9 %	Mota, Santos e Amaral (2013)
Cana-de-açúcar	UASB	17,4	35° C	58 %	Espinosa et al. (1995)
Vinho	UASB	27,5	45° C	> 75 %	Vlyssides et al. (2010)
Milho	ASBRs	10,71	55 °C	90 %	Agler et al. (2008)

Segundo Fuess (2013), os modelos de reatores mais empregados para o processamento destes efluentes industriais são os reatores do tipo UASB, os filtros anaeróbios e os ASBRs, devido às características construtivas, eficiência e facilidade de operação. Wilkie, Riedesel e Owens (2000), afirmam que, das 149 plantas industriais de tratamento de vinhaça existentes em escala mundial, no ano de 2000, 78 utilizavam reatores do tipo UASB.

O lançamento deste efluente em qualquer corpo hídrico está proibido por lei, segundo as portarias do extinto Ministério do Interior nº 323, de 29 de novembro de 1978, e nº 158, de 03 novembro de 1980. Após o processamento anaeróbio da

vinhaça, atualmente ela é disposta em solo, para o seu reaproveitamento nutricional, atuando assim, como um fertilizante eficiente.

Para evitar impactos ambientais negativos em sua disposição, a Cetesb elaborou a norma P4.231 “Vinhaça – Critérios e Procedimentos para Aplicação no Solo Agrícola”, em dezembro de 2006. Esta norma manifesta a necessidade de disciplinar o armazenamento, transporte e aplicação no solo da vinhaça gerada no processamento da cana-de-açúcar no Estado de São Paulo.

3.2.3. *Potencial Energético da Vinhaça*

A conversão de compostos orgânicos complexos (ex: proteínas, lipídios e carboidratos), presentes nas águas residuárias, em biogás, é desempenhada por diversos grupos de microrganismos e são necessários alguns estágios para a conversão completa da matéria orgânica (METCALF & EDDY, 2003; van HAANDEL e LETTINGA, 1994).

Considerando a digestão anaeróbia do efluente, o potencial energético do biogás é expresso pela quantidade de metano presente, e este volume de metano define o seu poder calorífico. O biogás é composto por uma combinação de gases, onde o metano e o gás carbônico estão presentes em maiores proporções (ver Tabela 3.3). O teor de metano pode variar entre 40% e 75%, dependendo da fonte geradora e da eficiência da digestão dos microrganismos envolvidos (SALOMON e LORA, 2006).

O poder calorífico do metano puro, em condições normais de temperatura e pressão (CNTP), é equivalente à 9,9 kWh/m³. Devido à presença de outros gases que compõe o biogás, segundo Magalhães et al. (2004), seu poder calorífico médio é igual a 5,5 kWh/m³.

O biogás pode ser purificado através da remoção de gás carbônico (CO₂), aumentando o seu poder calorífico, e ainda com a remoção de outros componentes, como o ácido sulfídrico (H₂S) que é o responsável pelo poder de corrosão. Existem algumas tecnologias adequadas para a purificação do biogás. Para remoção de gás carbônico e gás sulfídrico podem ser utilizados métodos de absorção com solventes

orgânicos, adsorção por carvão ativado, ou mesmo separação por membranas, dentre outros métodos (VELÁZQUEZ et al., 2003).

Tabela 3.3 - Composição média do biogás (SALOMON e LORA, 2006).

Gases	Composição %
Metano (CH ₄)	40 - 75
Dioxido de Carbono (CO ₂)	25 - 40
Hidrogênio (H ₂)	1 - 3
Nitrogênio (N ₂)	0,5 – 2,5
Oxigênio (O ₂)	0,1 - 1
Gás Sulfídrico (H ₂ S)	0,1 – 0,5
Amônia (NH ₃)	0,1 – 0,5
Monóxido de Carbono (CO)	0 – 0,1

O biogás produzido pode ter diversas aplicações, como o abastecimento de frotas de ônibus e automóveis (SOUZA et al., 2012), geração de energia elétrica em motores de combustão interna ou na combustão em caldeiras industriais de vapor (MORAES et al., 2014). Quando utilizado como combustível, o biogás pode substituir até 40% do diesel utilizado nas operações de transporte em uma indústria sucroalcooleira e ainda fornecer 14 MWh anualmente com a cogeração. Ainda em seu processo, se o biogás fosse queimado em caldeira, cerca de 12% do bagaço poderia ser destinado à geração de etanol de segunda geração (MORAES et al., 2014).

3.3. Metais Traço na Digestão Anaeróbia

Os metais são importantes em todos os processos bioquímicos e fisiológicos de qualquer organismo vivo. São denominados metais traço essenciais por serem necessários em pequenas quantidades. Alguns destes podem ser citados, como por

exemplo, cobalto, molibdênio, manganês, cobre e zinco. A maioria deles faz parte dos sítios ativos das enzimas e apresentam funções importantes na digestão anaeróbia (FERMOSO et al., 2009).

O papel fundamental exercido pelos metais traço nos processos bioquímicos motivou várias pesquisas nesta área. Esses metais estão frequentemente presentes nos sistemas enzimáticos, tanto como parte de um cofator, apresentado na Tabela 3.4, ou como sendo um componente de vital importância para o sistema (ZANDVOORT et al., 2006). Esses metais podem estar envolvidos também em processos não enzimáticos, como a respiração microbiana, ligados à parede celular e realizando o papel de aceptores de elétrons (NEWMAN e KOLTER, 2000).

A deficiência de metais traço essenciais às bactérias metanogênicas pode conduzir um reator anaeróbio ao colapso (SPEECE, 1996). Neste caso este grupo biológico sofre limitações devido à baixa disponibilidade de algum metal traço, e as condições de estabilidade do processo de digestão não são observadas. Visto que, em um consórcio microbiano anaeróbio, as bactérias metanogênicas apresentam limitação cinética ao processo por terem taxa de crescimento menor que as demais bactérias, o que resulta numa biodigestão incompleta com a elevação da concentração de ácidos graxos voláteis (AGV) e consequentemente aumento do pH. Estas condições caracterizam o desequilíbrio do processo (van HAANDEL e LETTINGA, 1994).

Tabela 3.4 - Funções de alguns metais traço essenciais em várias enzimas envolvidas em transformações e reações anaeróbias (adaptado de FERMOSO et al., 2009)

Elemento	Funções
Cobalto (Co)	<ul style="list-style-type: none"> • Enzimas B12 • CO Desidrogenase • Metiltransferase
Zinco (Zn)	<ul style="list-style-type: none"> • Hidrogenase • Formato Desidrogenase • Superóxido Dismutase
Molibdênio (Mo)	<ul style="list-style-type: none"> • Formato Desidrogenase • Nitrato Redutase • Nitrogenase
Níquel (Ni)	<ul style="list-style-type: none"> • Hidrogenase • Metil-CoM Redutase (F_{430}) • Síntese de Acetil-CoA • Co Desidrogenase • Urease
Manganês (Mn)	<ul style="list-style-type: none"> • Estabilizar a metiltransferase em bactérias produtoras de metano • Reações Redox
Cobre (Cu)	<ul style="list-style-type: none"> • Superóxido Dismutase • Hidrogenase (Anaeróbias Facultativas) • Nitrato Redutase • Síntese de Acetil-CoA
Tungstênio (W)	<ul style="list-style-type: none"> • Formato Desidrogenase • Antagonista do Molibdênio • Aldeído-oxidoreductase

3.3.1. Biodisponibilidade e Interação Metal-Biomassa

A biodisponibilidade dos metais está relacionada com a capacidade de interação com os microrganismos presentes na biomassa. Esta relação pode variar conforme a especiação dos metais no meio. De acordo com Zandvoort et al. (2006b), os metais presentes no meio líquido podem se apresentar na forma de íons, complexos ou precipitados. Os fenômenos como precipitação e complexação, com agentes quelantes orgânicos ou inorgânicos, ocorrem simultaneamente, isso torna difícil prever a distribuição da forma dos metais em um sistema elaborado como os reatores anaeróbios. A especiação pode ser afetada por fatores como a concentração total de metal, pH, potencial-redox, temperatura e concentração dos agentes quelantes orgânicos e inorgânicos (AQUINO e STUCKEY, 2007).

Segundo pesquisas, presume-se que os íons metálicos livres e alguns complexos metálicos orgânicos apresentam biodisponibilidade, e com isso, podem manter relação direta com os microrganismos e serem incorporados às células bacterianas (BUTTER et al., 1998; GUSTAVSSON, SVENSSON e KARLSSON, 2011; ZANDVOORT et al., 2006b). A interação do metal com a biomassa presente pode ocorrer de diversas formas. Os metais podem ser adsorvidos pela parede celular, podem também sofrer o processo de internalização pela célula, ou exercer a função de transporte de massa como íon livre (FERMOSO et al., 2008).

A adsorção dos metais na parede celular ocorre tanto na biomassa ativa, organismos vivos, quanto nos organismos não ativos e é um processo reversivo. Este processo depende, tanto do pH, quanto da concentração de matéria orgânica dissolvida, mas não do metabolismo da célula (AQUINO e STUCKEY, 2007; BUTTER et al., 1998; FERMOSO et al., 2008).

Quando os metais traço possuem reduzida biodisponibilidade existe a chance de ocorrer problemas operacionais nos sistemas anaeróbios, considerando que eles não vão exercer as devidas funções relacionadas à digestão aneróbia (SPEECE, 1996). Portanto, em alguns casos, mesmo quando há a presença considerável dos metais traço no meio, as características do efluente pode torná-los indisponíveis.

Wang, Huang e Allen (2003) levantaram que a matéria orgânica dissolvida reduziu a incorporação dos metais pelo consórcio metanogênico, devido à

competição entre a cinética de complexação e a cinética de adsorção. A partir desta pesquisa pode-se esperar que em um efluente como a vinhaça, onde a carga orgânica é elevada, a interação metal-biomassa pode sofrer interferência negativa com a redução da biodisponibilidade dos metais traço.

Segundo esta pesquisa, Wang, Huang e Allen (2003) averiguaram que a redução de Cu (II), Ni (II) e Co (II) pode ter sido causada pela complexação destes metais com a elevação da concentração da matéria orgânica dissolvida. Concluíram ainda que a formação destes complexos podem ter afetado significativamente a incorporação destes pela biomassa.

Outro fator importante e interveniente na biodisponibilidade dos metais traço é a presença de sulfatos, carbonatos e fosfatos no meio líquido. A concentração de sulfetos é a mais significativa, uma vez que os produtos da precipitação do sulfato com o metal possuem baixa solubilidade (CALLANDER e BARFORD, 1983b citado por GUSTAVSSON, SVENSSON e KARLSSON, 2011).

Os pesquisadores Barber e Stuckey (2000) analisaram a biodisponibilidade dos metais traço em um reator anaeróbio compartimentado, tratando um efluente sintético com DQO de 4000 mg.L⁻¹ e 500 mg.L⁻¹ de sulfato (SO_4^{2-}). Eles concluíram que a precipitação do sulfeto metálico contribuiu para a redução da biodisponibilidade dos metais. Os metais mais afetados pela precipitação, em ordem decrescente, foram ferro, cobalto e níquel.

3.4. Suplementação da Água Residuária por Metais Traço

O tratamento anaeróbio de efluentes industriais pode apresentar algumas instabilidades, como mencionado anteriormente. Em casos onde é evidenciada a baixa produção de metano e acúmulo de ácidos graxos voláteis, uma das possíveis adversidades pode vir a ser a deficiência nutricional.

Conforme relata Speece (1996), os processos que possuem efluentes com esta carência de micronutrientes, podem ser facilmente remediados a partir da suplementação dos metais traço necessários. Segundo o autor, a recuperação do sistema após a suplementação pode ser notada de um a vinte dias, com o consumo dos ácidos graxos voláteis acumulados no período de privação.

Vários autores averiguaram a influência da suplementação de metais traço na digestão anaeróbia. Constataram que a adição destes metais pode induzir a estimulação da conversão da matéria orgânica e produtos intermediários em metano (ESPINOSA et al. 1995; FENG et al. 2010; GUSTAVSSON, SVENSSON e KARLSSON, 2011), e a capacidade de sinergismo entre os metais (MURRAY e BERG, 1981; OLESZKIEWICZ e SHARMA, 1990). Outros autores observaram efeitos de inibição e toxicidade da metanogênese devido à presença de altas concentrações de metais (ALTAS, 2009; AQUINO e STUCKEY, 2007; FLORENCIO et al., 1993).

A Figura 3.3 demonstra graficamente os efeitos da suplementação de metais traço na eficiência do reator:

Figura 3.3 - Efeitos da adição de metais traço na eficiência de um reator
(adaptado de Fermoso et al. 2009)

3.4.1. Efeitos de Estimulação

Na literatura observam-se muitas pesquisas relacionadas à suplementação de metais traço em reatores anaeróbios. Com a suplementação busca-se aumentar a eficiência do sistema, visando suprir a deficiência dos devidos micronutrientes. Existem pesquisas com relação à suplementação de diversos substratos, como por exemplo, do metanol (FERMOSO et al. 2008; FLORENCIO et al. 1993; GIL, KLEERREBEZEM e LETTINGA, 1999), de indústria alimentícia (FENG et al. 2010; MURRAY & BERG, 1981), do processamento do milho (GUSTAVSSON,

SVENSSON e KARLSSON, 2011; POBEHEIM et al. 2010; POBEHEIM et al, 2011), e por fim da vinhaça (ESPINOSA et al. 1995).

Alguns pesquisadores avaliaram a relevância do cobalto, e nestas pesquisas foi evidenciada a relação positiva desta suplementação nas rotas metabólicas de digestão, estimulando os consórcios metanogênicos. Este metal em baixas concentrações atuou como limitante da digestão anaeróbia. Existem muitas pesquisas relacionadas à estimulação deste metal, e foram encontrados níveis significantes no aumento da produção de metano (CRESSON et al. 2006; ESPINOSA et al. 1995; FENG et al. 2010; FLORENCIO et al. 1993; GIL, KLEERREBEZEM e LETTINGA, 1999; MILÁN et al. 2010; MURRAY e BERG, 1981; POBEHEIM et al. 2011; TAKASHIMA, SHIMADA e SPEECE, 2011; ZANDVOORT et al., 2006).

O efeito do cobalto, na degradação do metanol, foi estudado por Florencio et al. (1993). Analisou-se o comportamento de reatores UASB de lodo granular na digestão anaeróbia do metanol com a variação da concentração do metal. Inicialmente foram realizados testes em batelada e neles foi determinada a concentração ótima de $0,25 \text{ mg.L}^{-1}$ de cobalto. A partir disto, o reator UASB e com acúmulo de AGV foi alimentado com adição de cobalto, observou-se o consumo dos ácidos intermediários e com isso a conversão de DQO em metano elevou 87%.

No entanto, a concentração de cobalto encontrada por Florencio et al. (1993) foi eficiente para um efluente simples, como o metanol, e para as condições do experimento, mas para um efluente complexo, como a vinhaça, a concentração pode oscilar devido às variações de fatores intervenientes do meio e do substrato (AQUINO e STUCKEY, 2007; BUTTER et al., 1998; FERMOSO et al., 2008). A limitação nutricional por cobalto pode ser superada, se o metal for adicionado continuamente, a uma taxa adequada, e com isso, favorecer o crescimento e a atividade da biomassa (GIL, KLEERREBEZEM e LETTINGA, 1999).

Os pesquisadores Fermoso et al. (2008b) se voltaram aos efeitos da escassez do zinco, outro micronutriente relevante ao processo. Neste caso, observou-se o comportamento de um reator UASB mesofílico, alimentado com metanol, com carga orgânica de $8 \text{ g.DQO.L}^{-1}.\text{dia}^{-1}$, enriquecido com nutrientes e solução de metais essenciais, exceto o zinco. Nestas condições, o reator obteve

baixa remoção de DQO e apresentou limitação de zinco em 130 dias de operação. Isto confirmou o efeito limitante do metal, apesar de menos acentuada que os efeitos de limitação do níquel e cobalto.

Posteriormente à acidificação do reator UASB, os autores suplementaram com 0,5 μM de zinco, continuamente no reator. Após 10 dias de suplementação, foi observado o crescimento da população de *Methanosarcina* e *Euryarchaeota* nos núcleos dos grânulos, o que indica o crescimento da população metanogênica.

Outro trabalho, realizado por Osuna et. al (2002), também evidenciou a estimulação por adição de zinco, em reatores UASB, quando alimentados com acetato e enriquecidos apenas com zinco. Nesta investigação a atividade metanogênica específica do lodo cresceu em 36% (OSUNA et al., 2002 citado por FERMOSO et al. 2009).

Takashima, Shimada e Speece (2011) determinaram as concentrações mínimas requeridas de cobalto, zinco e níquel na fermentação mesofílica da glicose em metano. Foram utilizados reatores em batelada de 1 L e inóculo de estação de tratamento de esgoto municipal e TDH de 5 dias. As concentrações obtidas foram de 0,017 mg.g^{-1} DQO_{removida} para cobalto, 0,049 mg.g^{-1} DQO_{removida} para o zinco, e 0,0063 mg.g^{-1} DQO_{removida}. Nota-se que Takashima, Shimada e Speece (2011) não averiguaram a melhor concentração dos nutrientes observados.

Na busca literária realizada, Espinosa et al. (1995) foram os únicos pesquisadores que examinaram a suplementação de metais em vinhaça de melaço de cana. Nesta pesquisa foram observados a influência da adição de ferro, níquel, cobalto e molibdênio em cargas orgânicas acima de 17 $\text{kg.DQO.m}^{-3}.\text{d}^{-1}$. A adição provocou redução de 94% na concentração de ácidos graxos voláteis (AGV), aumento de 38% na produção de biogás, 32% na remoção de DQO, e aumento na atividade metanogênica específica. Apesar dos resultados positivos, os autores não analisaram a influência individual de cada metal estudado, e ainda, seria relevante observar a ação da variação da concentração dos metais para a atividade metanogênica.

Segundo Murray e Berg (1981), a suplementação apenas com molibdênio não favorece a conversão do ácido acético em dióxido de carbono e metano, a produção de biogás não teve um aumento considerável. Pobeheim et al. (2010) também

evidenciaram a falta de significância do molibdênio na formação do metano. No entanto, Fermoso et al. (2009) afirmam que o molibdênio, em quantidades insuficientes no efluente, limita a oxidação de propionato que é um produto intermediário da conversão ao metano.

Diversos autores afirmam que um dos metais traço mais significativos para a digestão anaeróbia é o cobalto (FLORENCIO et al., 1994; LEBUHN et al. 2008; POBEHEIM et al. 2010). O cobalto, ferro e níquel são necessários para toda população metanogênica (WHIMAN, 1985 citado por ZANDVOORT et al., 2006b). Apenas alguns trabalhos têm abordado a ação de outros metais menos expressivos, como o manganês e molibdênio. Eles ressaltam a importância do cobalto, mas indicam que selênio e molibdênio também devem ser fornecidos para o equilíbrio do sistema (DEMIREL & SCHERER, 2011 citado por WILKIE et al. 1986; LEBUHN et al. 2008; WORM et al. 2009). Na literatura não foram encontrados dados relacionados à influência do manganês para a metanogênese. No entanto, visto a importância deste metal nos processos metabólicos (FERMOSO et al. 2009), torna-se interessante avaliar a sua influência no sistema.

3.4.2. Efeitos de Inibição

Assim como os metais traço essenciais em concentrações ideais são benéficos para a digestão anaeróbia (FERMOSO et al, 2009), alguns destes mesmos metais podem passar a exercer uma função inibitória para os microrganismos anaeróbios, quando encontrados em concentrações elevadas (OLESZKIEWICZ & SHARMA, 1990). Outros fatores também podem provocar o efeito inibitório dos metais, como por exemplo, a forma química do metal, pH e potencial redox (CHEN et al. 2008 citado por LIN e CHEN, 1999)

Florencio et al. (1993) notaram que a adição de cobalto em concentrações excessivas reduzia a atividade biológica da digestão. Foi observado que para uma concentração de 4 mg/L de cobalto, o sistema sofria uma redução de 50% da atividade biológica máxima. Em outra pesquisa, foram encontradas condições

inibitórias para concentrações de aproximadamente 10 mg/L de cobalto (POBEHEIM et al. 2010).

Concentrações elevadas de zinco também podem exercer um efeito negativo na produção de metano. De acordo com Altas (2009), o zinco induz à redução de 50% da atividade metanogênica quando presente a uma concentração de 7,5 mg/L. Entre os metais explorados - zinco, cromo, níquel e cádmio -, o zinco foi o metal que apresentou o maior potencial inibidor. Desta forma, as concentrações de zinco devem ser controladas para não exercer função tóxica, e com isso, prejudicar a atividade metanogênica do sistema.

Pobeheim et al. (2010) investigaram a presença de molibdênio acrescido de forma gradual no substrato. Foi adicionado até a concentração de aproximadamente 100 mg/L, no entanto não foi indicado nenhum efeito inibitório nítido na fermentação anaeróbia do efluente. Também não foram relatados na literatura consultada, efeitos inibitórios dos metais selênio e manganês, para os microrganismos metanogênicos.

3.4.3. Efeitos Sinérgicos

Segundo Oleszkiewicz e Sharma (1990), o sinergismo se refere à relação de um metal com outro em pequenas concentrações, presente no meio, que potencializa o efeito causado pelo primeiro. Estes efeitos foram confirmados em algumas pesquisas.

Foi constatado efeito sinérgico entre o níquel e o cobalto. De acordo com Gil et al. (1999), os dois metais, em particular, exercem uma finalidade estimulatória, e quando os dois metais foram adicionados em conjunto, a estimulação da metanogênese foi intensificada. O molibdênio em combinação com cobalto ou níquel também apresentou ligeira ação sinérgica, aumentando a atividade metanogênica quando em conjunto (MURRAY e BERG, 1981).

Feng et al. (2010) relataram o sinergismo entre os metais contendo tungstênio e baixas concentrações de cobalto. Este complexo estimulou a biodigestão de efluente de indústria alimentícia. É evidente a correlação exercida

entre os metais, e torna-se interessante maiores pesquisas relacionadas ao efeito sinérgico dos metais traço na vinhaça.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Efluente e Inóculo

O efluente utilizado nos ensaios em batelada, e na alimentação do reator anaeróbico contínuo, foi a vinhaça proveniente da destilação do caldo fermentado da sacarose para a produção de álcool. A coleta de vinhaça *in natura* foi realizada na usina São Martinho, localizada no Município de Pradópolis/SP, a aproximadamente 90 km de São Carlos/SP.

Foi realizada uma única coleta de vinhaça, em quantidade suficiente para todo o experimento, para garantir a homogeneidade das características do efluente durante os ensaios (Ex: DQO, carboidratos, nitrogênio, fosfato, sulfato e metais traço). Durante o período dos ensaios, a vinhaça foi mantida congelada, em galões condicionados dentro de um freezer horizontal, para manter suas características iniciais.

Para as diluições da vinhaça, na partida do reator UASB e ajuste de carga orgânica específica nos reatores em batelada, foi utilizada água potável do sistema de abastecimento de água de São Carlos (SAAE – São Carlos/SP), seguido da correção do pH da solução com bicarbonato de sódio (ajuste $\text{pH } 7 \pm 0,5$).

O inóculo utilizado para os testes de digestão anaeróbia em batelada foi o lodo granular coletado do reator anaeróbico UASB em escala de laboratório (Figura 4.1), que foi operado por aproximadamente 6 meses, no Laboratório de Processos Biológicos do Departamento de Hidráulica e Saneamento da EESC-USP, que, no presente trabalho, teve a finalidade apenas de fornecimento de biomassa adaptada à vinhaça para os ensaios em batelada.

O reator UASB, após permanecer 2 meses sem alimentação devido à entressafra da cana-de-açúcar da Usina São Martinho, passou por um processo de readaptação da biomassa ao efluente. A alimentação de vinhaça ocorreu inicialmente com baixas concentrações de matéria orgânica (efluente diluído) e a carga foi elevada gradativamente, de forma que o reator não entrasse em colapso relativo ao choque da alta carga orgânica.

Figura 4.1 - Reator anaeróbico em escala de laboratório (A: Alimentação; R: recirculação; S: Saída; B1: Bomba de alimentação; B2: Bomba de recirculação; SG: Saída do Biogás).

O lodo adotado foi alimentado por todo o tempo de operação com o mesmo efluente utilizado nos ensaios em batelada, deste modo, estabilizou-se conforme os padrões dos ensaios. O reator descrito por Brown (2012) tem aproximadamente 10 cm de diâmetro e altura total de 200 cm, a câmara de reação tem aproximadamente 8 litros e a porção superior (separador) tem também volume de 8 litros, totalizando por volta de 16 litros de capacidade.

O reator operou com TDH de 31,2 horas, e carga orgânica volumétrica de 4,1 kg.DQO/m³.d, e recirculação de 300%. O pH de entrada foi controlado, e mantido entre 6,5 e 7,5. A vinhaça permaneceu resfriada à aproximadamente 4 °C no

sistema afluente, de modo que não houvesse sua fermentação antes da introdução no reator UASB.

A temperatura dentro do reator foi mantida nas condições mesofílicas. Com o auxílio de uma fita térmica envolvendo a parte reacional do reator, a temperatura permaneceu em 30 °C ($\pm 0,5$). O sistema foi composto por sensor de temperatura da marca Full Gauge modelo TIC-17RGTi e um contator.

Por fim, este reator possuiu um sistema mecânico localizado entre a área reacional e a área de decantação, programado por um timer, que de hora em hora realizava uma trepidação na coluna do reator. Este tremor auxiliou a decantação do grânulo, que devido a relativo pequeno diâmetro do reator, possuiu certa dificuldade em sedimentar devido à ascensão das bolhas de gás.

Figura 4.2 - Detalhe da fita térmica do reator UASB.

Figura 4.3 - Área reacional do reator UASB (1: sistema mecânico; 2: controlador de temperatura).

Figura 4.4 - Detalhe do *head space* do reator UASB.

Figura 4.5 - Visão geral do reator UASB. (1: alimentação; 2: reservatório; B1: bomba de alimentação; B2: bomba de recirculação; S: saída).

Os grânulos do lodo coletado neste reator, que posteriormente foram utilizados nos ensaios em batelada, estão exibidos na amostra da Figura 4.6.

Figura 4.6 - Detalhe da biomassa anaeróbica adaptada.

4.2. Aparatos e Procedimentos Experimentais

Os ensaios de digestão anaeróbia da vinhaça com suplementação de metais traço foram realizados em reatores em batelada. Para compor os reatores em batelada, foram utilizados frascos Duran de 500 mL. Foram devidamente calibrados, e neste processo observou-se que o volume real se aproximou à 610 mL. Os reatores apresentaram aproximadamente 280 mL de volume reacional (substrato e inóculo) e 330 mL de *head space*. O número de frascos Duran variou conforme o decorrer experimental.

Figura 4.7 - Calibração dos frascos Duran

Figura 4.8 – Detalhe Calibração dos frascos Duran

Após inocular e adicionar o substrato nos reatores, eles passaram por um processo de correção do pH. Para favorecer as bactérias metanogênicas o pH foi mantido entre 6,5 e 7,5 com adição bicarbonato de sódio até alcançar o valor adequado.

Os reatores foram mantidos lacrados e sem contato com o ambiente externo. Fluxou-se nitrogênio, por ser um gás inerte, para compor a atmosfera anaeróbia do *head space*. Eles foram condicionados em uma câmara incubadora refrigerada com agitação orbital (Shaker) da marca Marconi, modelo MA830, onde a temperatura foi controlada e mantida em condições mesofílicas a 30 °C. Foi aplicada agitação para homogeneizar a solução e garantir a mistura completa, a uma rotação

de 80 rpm, que segundo Takashima, Shimada e Speece (2011) é apropriado para a manutenção da biomassa mesofílica.

Figura 4.9 - Reatores inoculados e visão frontal do Shaker

Figura 4.10 - Detalhe interno do Shaker

Durante o ensaio, foram realizadas análises de composição do biogás produzido. Para isto, foram utilizadas seringas de 1 mL para coleta de gás dos reatores. Antes da retirada da amostra, a seringa era lavada 3 vezes com o próprio biogás, logo depois, retirava-se 0,5 mL de amostra para injeção no cromatógrafo gasoso GC 2010 Shimadzu.

Figura 4.11 - Cromatógrafo gasoso GC-2010 Shimadzu

Figura 4.12 – Barômetro digital

A medição do volume de produção de biogás foi realizada através da relação volume e pressão utilizando o conceito da lei dos gases ideais. Para a medição de pressão foi utilizado um barômetro digital com intervalo de medição entre 0 e 800 mBar. A cada medição, a pressão do frasco foi aliviada, com isso foi obtido às pressões relativas em cada análise. Para o cálculo da pressão relativa, considerou-se que a pressão média de São Carlos / SP é igual a 0,9088 atm.

Figura 4.13 - Esquema experimental

4.3. Configuração Experimental

Foram realizados ensaios preliminares para definir o volume de inóculo, e a concentração do substrato adicionado nas etapas seguintes. Para isto, no ensaio preliminar, variou-se o volume do inóculo em 60 mL e 120 mL. A carga aplicada específica também foi variada, foram avaliadas cinco situações: 0,1; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8; 1 mg DQO.mg⁻¹ SSV para chegar às condições de ensaio.

Com os resultados do ensaio preliminar, os demais ensaios foram todos realizados observando o mesmo padrão. Definiu-se a carga aplicada específica de 0,4 mg DQO.mg⁻¹ SSV. Os reatores foram configurados com 60 mL de biomassa, 220 mL de substrato (280 mL de volume reacional) e aproximadamente 320 mL de *head space*.

Após a definição do volume de biomassa e concentração de substrato, os ensaios foram divididos em duas fases, Fase I e Fase II. Na Fase I das análises experimentais, avaliou-se as concentrações adequadas dos metais traço (cobalto, níquel, molibdênio, cobre, zinco, manganês e tungstênio) para a suplementação da vinhaça. Todos os metais foram avaliados individualmente, com a variação da concentração de cada metal. Após o primeiro momento, e já na Fase II, quando as concentrações adequadas de metais forem levantadas, esses metais foram avaliados em um único composto, com concentração determinada.

O controle, ou branco (B), foi representado em paralelo por outro reator, contendo apenas biomassa na mesma quantidade de sólidos suspensos voláteis, e a mesma carga de DQO, que os frascos que receberam a suplementação. A execução do experimento básico foi realizado em duplicata para cada um dos tratamentos e para o controle na Fase 1, e em triplicata na Fase II, e as análises dos parâmetros foram efetuados em triplicata.

Os ensaios A, B, C e D não seguem ordem cronológica, onde B e D foram realizados antes de A e C. Entretanto, foram demonstrados nesta ordem para fins didáticos. Os metais traços selecionados para o ensaio foram definidos de acordo com a bibliografia, com base nas observações do rendimento (mL CH₄.mg⁻¹ DQO) no decorrer dos ensaios, alguns destes metais foram pesquisados mais a fundo (Co, Ni,

Zn e Mo) por apresentarem resultados satisfatórios. No caso do Cu, houveram problemas técnicos e os ensaios não foram finalizados.

A matriz dos experimentos está ilustrada na Figura 4.14:

Figura 4.14 - Matriz experimental

Tabela 4.1 - Composição dos compostos e concentrações dos metais adicionados aos reatores

Metal	Composto	Concentração do composto adicionado ($\mu\text{g.L}^{-1}$)			
		200 $\mu\text{g Me.L}^{-1}$	350 $\mu\text{g Me.L}^{-1}$	500 $\mu\text{g Me.L}^{-1}$	800 $\mu\text{g Me.L}^{-1}$
Cobalto	$\text{CoCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	563,0	985,3	1407,6	2252,1
Níquel	$\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	809,6	1416,8	2024,0	3238,4
Zinco	ZnCl_2	416,8	729,4	1042,0	1667,2
Molibdênio	$(\text{NH}_4)\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	341,6	597,8	854,0	1366,4
Cobre	$\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	-	939,4	-	2147,2
Manganês	$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	-	1261,4	-	2883,2
Tungstênio	$\text{NaWO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	-	550,2	-	1257,6

4.4. Métodos Analíticos

4.4.1. Análises Físico-Químicas

As variáveis físico-químicas analisadas seguiram os métodos padronizados dispostos no “Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater” (APHA, 2005). As análises realizadas durante o experimento estão listadas na Tabela 4.2.

Tabela 4.2 - Análises físico-químicas realizadas no decorrer dos ensaios.

Variáveis	Unidade	Metodologia	
		Nome	Número
Alcalinidade	mg CaCO ₃ /L	Titulométrico*	
pH	-	Potenciométrico	4500-H+ B
Temperatura	°C	Medida direta	2550
DBO	mg/L	Colorimétrico	5220
DQO	mg/L	Colorimétrico	5220
Carboidratos tot.	mg/L	Colorimétrico**	
Metais	mg/L	Espectrofotometria	3111
ST	mg/L	Gravimétrico	2540 B
SF	mg/L	Gravimétrico	2540 E
SV	mg/L	Gravimétrico	2540 E
SST	mg/L	Gravimétrico	2540 D
SSF	mg/L	Gravimétrico	2540 E
SSV	mg/L	Gravimétrico	2540 E
*Metodologia conforme Dilallo e Albertson (1961) modificado por Ripley et al.(1986)			
**Metodologia fenol-sulfúrico proposto por Dubois et al. (1956)			

4.4.2. Ácidos Graxos Voláteis (AGV)

A quantificação dos ácidos graxos voláteis foi realizada de acordo como descrito por Ferraz (2013) por cromatografia gasosa, em cromatógrafo Shimadzu® GC 2010, equipado com detector de ionização de chama (DIC) e coluna HP - INOWAX, de 30 m.25 mm (diâmetro interno) e 0,25 mm (espessura de filme). Foram

quantificados os ácidos intermediários (ácido acético, fórmico, propiônico, butírico e valérico) e solventes (metanol, etanol e n-butanol).

4.4.3. Composição do Biogás

A análise da composição do biogás foi realizada por meio de retirada, com seringa, de amostras (0,5 mL) do *headspace* dos reatores em batelada. A análise foi realizada em cromatógrafo gasoso (GC 2010, Shimadzu®), equipado com detector de condutividade térmica (TCD – *Thermal Conductivity Detector*) e coluna Carboxen™ 1010 PLOT (30 mm x 0,53 mm, Supelco), sendo o gás de arraste o argônio (grau cromatográfico). As temperaturas do injetor e detector foram de 220 °C e 230 °C, respectivamente. A temperatura da coluna foi 130 °C com aquecimento de 46 °C min⁻¹ até 135 °C. Os limites de detecção para os gases (H₂, N₂, CH₄ e CO₂) estão descritos no apêndice Anexo I.

4.4.4. Ajuste dos Parâmetros Cinéticos

Os dados de produção acumulada de metano (y) em função do tempo de ensaio (t) foram ajustados à curva dada por meio da equação de Gompertz, modificada por Zwietering et al. (1990) ((Equação 1). O modelo de Gompertz modificado tem sido utilizado para descrever o comportamento da produção acumulada de metano (CH₄) ou hidrogênio (H₂) em experimentos realizados em batelada. A partir do ajuste dos dados à curva, os parâmetros cinéticos (*P*, *R_m* e *λ*) são encontrados por iteração matemática.

Os ajustes dos dados cinéticos foram efetuados por meio do *software* Statistica 12. Neste *software* o ajuste foi feito por regressão não linear, o método de estimação utilizado foi o Gauss-Newton e intervalo de confiança de 95% para os parâmetros estimados.

(Equação 1)

$$y(t) = P \cdot \exp \left\{ -\exp \left[\frac{Rm \cdot e}{P} \cdot (\lambda - t) + 1 \right] \right\}$$

Onde;

y(t): Volume acumulado de metano (mL CH₄)

P: Potencial de produção de metano (mL CH₄)

Rm: Velocidade máxima de produção de metano (mL CH₄.d⁻¹)

λ: Fase lag (d)

t: Tempo de ensaio (d)

4.4.5. Análises Estatísticas

As análises estatísticas dos dados obtidos foram realizadas por meio do software Minitab 16. A normalidade dos dados foi testada usando-se o Teste de Lilliefors ($\alpha=0,05$). Para verificação da existência de diferenças entre as médias populacionais, ao nível de 5% de significância, utilizou-se o Teste F pelo quadro de ANOVA. Em seguida, as médias foram comparadas utilizando-se o Teste de Tukey, também com 5% de significância.

5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1. Coleta e Caracterização da Vinhaça

Após a entressafra, realizou-se uma coleta de vinhaça na Usina São Martinho em 20/05/2013. Nesta expedição foram coletados 80 litros de vinhaça in natura. O volume de efluente transportado para o LPB (Laboratório de Processos Biológicos) da USP – EESC foi calculado para atender toda a demanda do projeto. Com isto, garantiu-se que as características físico-químicas permanecessem constantes durante os experimentos em bateladas.

A caracterização da vinhaça coletada foi realizada pelo Laboratório de Saneamento (USP-EESC), e foram levantadas as informações relevantes para a realização do trabalho (Tabela 5.1), posteriormente, a vinhaça foi congelada e armazenada em freezer, para manter sua composição original, e assegurar os dados qualitativos do efluente.

A vinhaça coletada apresentou características conforme levantados pela literatura. Segundo Wilkie, Riedesel e Owens (2000) este efluente exibiu pH entre 4,2 e 4,8; fosfatos entre 33 mg.L^{-1} e 490 mg.L^{-1} ; e nitrogênio total entre 590 mg.L^{-1} e 1870 mg.L^{-1} para os casos estudados por ele. Comparando com Ferraz (2013), que utilizou o mesmo efluente da Usina São Martinho com variação temporal, os valores de DQO e DBO são menores nas análises realizadas pelo pesquisador (DQO: $35,2 \text{ g.L}^{-1}$ e DBO_5 : $16,7 \text{ g.L}^{-1}$), por outro lado a relação DBO/DQO igual à 0,5 é aproximado aos valores das análises da vinhaça coletada.

A partir os métodos analíticos descritos anteriormente na metodologia, obteve-se $692,50 \text{ mg.L}^{-1}$ de cálcio, na vinhaça utilizada neste trabalho. Este valor condiz com os apresentados na literatura. Driessen, Tielbaard e Vereijken (1994) descrevem que a vinhaça continha 170 mg.L^{-1} de cálcio e Ferraz (2013) 1214 mg.L^{-1} . Este é um importante parâmetro a ser observado, pois de acordo com Mahoney et al. (1987) o cálcio têm influência na formação dos grânulos e auxilia na agregação microbiana. Já pela ótica de Rocha (2012), o excesso de cálcio culmina no acúmulo nos grânulos reduzindo a eficiência e podendo resultar no colapso do reator.

Tabela 5.1 - Caracterização da vinhaça da Usina São Martinho, utilizada nos ensaios.

Caracterização da Vinhaça São Martinho		
Parâmetros	Valor	Unidade
DBO ₅	24.824	mg.L ⁻¹
DQO _{filtrada}	55.800	mg.L ⁻¹
DBO/DQO	0,45	----
pH	4,43	----
Fenol	2,86	mg.L ⁻¹
Fosfato	236,00	mg.L ⁻¹
Nitrogênio amoniacal	104,00	mg.L ⁻¹
Nitrogênio total	805,00	mg.L ⁻¹
Sulfato	2100,00	mg.L ⁻¹
Magnésio	364,00	mg.L ⁻¹
Ferro	9,20	mg.L ⁻¹
Potássio	4175,00	mg.L ⁻¹
Cálcio	692,50	mg.L ⁻¹
Zinco	0,483	mg.L ⁻¹
Níquel	0,221	mg.L ⁻¹
Manganês	3,540	mg.L ⁻¹
Cobre	0,385	mg.L ⁻¹
Selênio	1,000	mg.L ⁻¹
Cobalto	0,314	mg.L ⁻¹
Molibdênio	0,860	mg.L ⁻¹

5.2. Adaptação da Biomassa

O reator passou por um período sem alimentação, devido ao intervalo de entressafra. Por se tratar de um reator anaeróbio, sabe-se que a biomassa resiste por um tempo sem carga orgânica. Mesmo assim, para evitar a acidificação do mesmo, foi dada uma nova partida, recomeçando a alimentação com vinhaça bem diluída, e aumentando a carga orgânica aplicada gradativamente.

Após a partida, o reator apresentou boa remoção da carga orgânica, variando entre 75% e 90% de remoção. A vinhaça afluyente ao reator foi mantida refrigerada, por volta dos 4°C, para evitar a fermentação da mesma, e em repouso, para o descarte dos sólidos sedimentáveis presentes no efluente.

O reator foi alimentado com vinhaça com carga orgânica de 4,1 kg.DQO/m³.d por aproximadamente 3 meses. Durante todo este período manteve-se com a eficiência elevada, como exposta anteriormente, a adição de bicarbonato de sódio garantiu pH próximo à 6,5 e alcalinidade adequada.

Quando a biomassa já demonstrava sinais de estabilização e adaptação, foi observado por indícios de lodo na recirculação do reator anaeróbio que o grânulo iniciou um processo de flotação. Este fenômeno pode ter acontecido devido à elevada idade do lodo, o grânulo cresceu excessivamente formando camadas sobrepostas e dificultando o transporte de substrato ao interior, assim o grânulo passa a ter o núcleo oco (*"hollow core"*). Com isso ocorreu mudança em sua densidade e diminuição em sua velocidade de sedimentação, favorecendo sua flotação.

A fim de evitar a flotação no reator contínuo e garantir a biomassa adaptada para os ensaios sequenciais, o grânulo adaptado foi acondicionado em um reator em batelada, e alimentado com o mesmo substrato (vinhaça) com carga orgânica idêntica ao reator contínuo, durante os ensaios de suplementação. Foram analisados parâmetros como DQO, pH e alcalinidade para acompanhar as condições da biomassa utilizada.

Os grânulos da biomassa utilizada possuíam em média 4 mm de diâmetro. A biomassa apresentou um teor médio de Sólidos Suspensos Totais (SST) igual a 52,92 g/L e Sólidos Suspensos Voláteis (SSV) igual a 41,46 g/L.

5.3. Ensaios Preliminares

Os ensaios preliminares foram essenciais para determinar os parâmetros dos ensaios com suplementação. Assim, como mencionado, foram avaliadas várias cargas orgânicas específicas, observando a produção de biogás e os ajustes dos parâmetros cinéticos nas fases lag, exponencial e estacionária, onde ocorre a estabilização da digestão anaeróbia e, segundo Aquino et al. (2007), o experimento pode ser finalizado.

A partir das primeiras respostas, ficou definido que a carga aplicada específica (CAE) utilizada nos próximos ensaios seria igual à 0,4 g.DQO/g.SSV. Obteve-se duração de aproximadamente 12 dias no shaker e a eficiência de remoção da carga orgânica ficou entre 85% e 92%.

5.4. Ensaios de Suplementação da Vinhaça

Os ensaios buscaram seguir parâmetros bem definidos, a fim de minimizar os efeitos de possíveis variáveis indesejadas. Seguindo esta direção, buscou-se padronizar a carga orgânica inicial dentro de cada ensaio, bem como o pH de cada reator.

Com o auxílio do *software* Minitab 16, as cargas orgânicas de entrada dos reatores foram analisadas com o intuito de comprovar a inexistência de variação entre eles. O teste F demonstrou que não há diferença estatística das cargas orgânicas aplicadas dos reatores, observando os ensaios individualmente.

5.4.1. Fase 1 – Avaliação da Eficiência da Digestão Anaeróbia com a Adição Individual dos Metais Traço

Os ensaios relativos à Fase 1 apresentaram homogeneidade com relação à DQO de entrada dos reatores, os valores não apresentaram variação significativa

entre os ensaios A, B, C e D, desta fase. Esta afirmação pode ser observada a partir do gráfico Boxplot na Figura 5.1:

Figura 5.1 - Variação da DQO inicial dos ensaios em batelada da Fase 1

➤ *Ensaio A [200 $\mu\text{g.L}^{-1}$]*

O Ensaio A teve duração de aproximadamente 14 dias, foram 355 horas de ensaio no total, onde foram avaliadas as eficiências de remoção de DQO e Carboidratos Totais, o comportamento dos AGV e a produção acumulada de biogás. Neste ensaio foi observado a influência dos metais traço, cobalto, níquel, zinco e molibdênio à concentração de 200 $\mu\text{g.L}^{-1}$ no processamento da vinhaça.

Os valores de DQO inicial apresentaram valores semelhantes entre o reator controle e os reatores com adição de metais traço, esta condição trouxe segurança para avaliação do rendimento entre os reatores analisados. Nos gráficos das Figura 5.2 e Figura 5.3 discriminou-se os parâmetros relativos à remoção de matéria orgânica do primeiro ensaio com a suplementação de 200 $\mu\text{g.L}^{-1}$:

Figura 5.2 – Remoção de DQO do Ensaio A – Fase 1

Figura 5.3 - Remoção de Carboidratos do Ensaio A – Fase 1

Tabela 5.2 - Eficiência de remoção de matéria orgânica do Ensaio A - Fase 1

Eficiência de Remoção	Reatores (código)				
	Controle (RA)	Co (RB)	Ni (RC)	Zn (RD)	Mo (RE)
DQO	88%	88%	88%	87%	86%
Carboidratos	95%	94%	95%	95%	94%

A eficiência de remoção de DQO no fim do ensaio variou entre 86% e 88%. Já a eficiência de remoção dos carboidratos variou entre 94% e 95%. Todos os reatores se manifestaram com alta remoção de matéria orgânica. Isto ocorreu devido ao grande tempo de ensaio (aproximadamente 14 dias), em que se pode observar que foi suficiente para a estabilização da remoção de matéria orgânica.

A matéria orgânica remanescente pode ser atribuída aos compostos recalcitrantes, ou seja, compostos de difícil degradação. Wilkie, Riedesel e Owens (2000) descreve que a vinhaça possui compostos de difícil degradação com alto peso molecular, como por exemplo, as melanoidinas, ácidos húmicos e tânico, que podem ser os compostos não biodegradados neste ensaio, assim como outras substâncias. Apesar disto, não se pode afirmar quais foram os compostos persistentes no ensaio, visto que não foram realizadas análises detalhadas do efluente final a fim de identificá-los.

Figura 5.4 - Variação dos Ácidos Graxos Voláteis (AGV) no Ensaio A - Fase 1

Podemos observar pela Figura 5.4 que os Ácidos Graxos Voláteis totais (AGV) oscilaram entre os valores de 587 mg.L⁻¹ e 354,1 mg.L⁻¹. A diferença entre os valores do início e os valores finais do ensaio mostrou-se menor para o reator suplementado com Ni, que os demais reatores. Entretanto, neste caso a concentrações iniciais de AGV eram maiores comparadas aos outros reatores e não se sabe a dinâmica destes ácidos no decorrer do ensaio, pois existe a possibilidade do acúmulo dos ácidos intermediários após o início da biodigestão.

Tabela 5.3 - Rendimento da produção de CH₄ com relação à remoção de matéria orgânica (Ensaio A)

Rendimento	Reatores (código)				
	Controle (RA)	Co (RB)	Ni (RC)	Zn (RD)	Mo (RE)
Prod. CH ₄ ac. (mL)	210,3	202,7	203,2	200,8	202,5
*(1) Carb.	1,18	1,14	1,16	1,11	1,09
*(2) DQO	0,225	0,203	0,216	0,217	0,202

*(1) mL CH₄.mg⁻¹ carboidrato (CNTP);
*(2) mL CH₄.mg⁻¹ DQO (CNTP).

O rendimento é uma variável importante quando analisamos a produção de biogás uma vez que a partir dele é possível comparar a quantidade de metano produzido em relação à matéria orgânica removida. Nas condições normais de temperatura e pressão (CNTP) 1 mg de DQO removida equivale a 0,354 mL de metano. Portanto, nota-se que a relação máxima do rendimento é de 0,354 mL CH₄.mg⁻¹ DQO na CNTP.

Os valores expostos na Tabela 5.3 já se apresentam convertidos à CNTP. Os rendimentos deste ensaio se mostraram inferiores ao reator controle, em todos os casos. Os reatores suplementados com cobalto e molibdênio (RB e RE) foram os que apresentaram menor rendimento, nestes casos os rendimentos reduziram em 10% aproximadamente. A redução no rendimento pode ter ocorrido por um possível deslocamento das rotas metabólicas, como por exemplo, a formação de gás sulfídrico não detectado pelo cromatógrafo utilizado.

Florencio et al. (1993) contradizem os resultados deste ensaio, para eles, a suplementação de 250 µg.L⁻¹ de níquel e cobalto representou a concentração ótima na potencialização da atividade metanogênica. Os resultados divergentes podem decorrer da diferença entre o efluente simples, como o metanol, objeto de pesquisa de Florencio e colaboradores, e a vinhaça abordada nesta pesquisa. O efluente mais

complexo, como a vinhaça, pode influenciar a biodisponibilidade dos metais presentes aos grânulos, devido à complexação dos metais.

Tabela 5.4 - Parâmetros cinéticos do Ensaio A, Fase 1.

Const. Cinéticas*	Reatores (código)				
	Controle (RA)	Co (RB)	Ni (RC)	Zn (RD)	Mo (RE)
P (mL)	191,95	184,20	188,45	186,95	184,60
R _m (mL.d ⁻¹)	103,95	121,30	102,70	103,90	85,90
f. Lag (d)	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
R ²	0,9685	0,9733	0,9662	0,9686	0,9516

*Valores obtidos por meio do ajuste dos dados ao modelo modificado de Gompertz.

Os valores dos parâmetros cinéticos obtidos a partir do *software* Statistica 12 para o ensaio A da Fase 1 estão descritos na Tabela 5.4. O ajuste dos dados obtidos em laboratório ao modelo modificado de Gompertz conduziram aos parâmetros P, R_m e f. Lag. Com base no R² (coeficiente de determinação) pode-se notar que os dados se ajustaram bem à curva do modelo proposto. O R² variou entre 95% e 97%.

Em todos os reatores deste ensaio a fase lag foi nula, ou seja, não houve período inicial com intervalo de tempo sem produção de metano. Isso se deve ao fato de que a biomassa se encontrava em bom estado de adaptação ao substrato (vinhaça) devido à prévia aclimação, e ainda, que a carga orgânica não causou algum tipo de colapso nos reatores em virtude de alta carga e acúmulo de ácidos intermediários.

Com esta análise cinética obtém-se um parâmetro importante à compreensão da digestão anaeróbia e da influencia da suplementação de metais traço ao sistema observado. O parâmetro R_m nos indica a taxa, ou velocidade de reação (dado em mL CH₄.d⁻¹). No ensaio A da fase 1, pode-se verificar que a velocidade máxima de

produção de CH_4 (R_m) dos reatores RC e RD, suplementados com níquel e zinco respectivamente, são semelhantes à velocidade do reator controle.

Apesar do níquel não demonstrar qualquer efetividade na acentuação do rendimento ou velocidade máxima de produção de metano para esta concentração, para os pesquisadores Gustavsson, Svensson e Karlsson (2011) a suplementação da vinhaça com $200 \mu\text{g.L}^{-1}$ de Ni auxiliou na estabilidade da biodigestão em condições próximas às aplicadas nestes ensaios. Para eles, a suplementação diária deste micronutriente implicou no aumento da produção de metano e evitou o acúmulo de ácidos intermediários no sistema.

O reator com adição de cobalto (RB), apesar de apresentar baixo rendimento de produção de metano por DQO removida, demonstrou aumento na velocidade máxima de produção de metano em 17%. Já o reator suplementado com molibdênio sofreu queda no valor de R_m .

A concentração de $200 \mu\text{g.L}^{-1}$ de Co foi o que apresentou o melhor desempenho na velocidade de produção de metano, quando comparado com as concentrações maiores analisadas. Feng et al. (2010) realizaram ensaios com os metais traço agindo em conjunto, considerando os seus efeitos sinérgicos. Para estes pesquisadores o melhor desempenho dos reatores também ocorreu quando a concentração de cobalto foi baixa ($60 \mu\text{g.L}^{-1}$), mas neste caso, em combinação com selênio ($800 \mu\text{g.L}^{-1}$) e tungstênio ($1800 \mu\text{g.L}^{-1}$).

➤ *Ensaio B [$350 \mu\text{g.L}^{-1}$]*

O Ensaio B da 1ª Fase da pesquisa teve duração de aproximadamente 305 horas, portanto um pouco mais compacto que o ensaio anterior (Ensaio A), mas conseguiu-se obter a estabilização da produção acumulada de metano, necessária para obtenção das constantes cinéticas e comparação dos resultados finais entre os ensaios.

Figura 5.5 - Remoção de DQO do Ensaio B – Fase 1

Figura 5.6 - Remoção de Carboidratos do Ensaio B – Fase 1

Tabela 5.5- Eficiência de remoção de matéria orgânica do Ensaio B - Fase 1

Eficiência de remoção	Reatores (código)							
	Controle (RA)	Co (RB)	Ni (RC)	Mo (RD)	Cu (RE)	Zn (RF)	Mn (RG)	W (RH)
DQO	93%	93%	90%	92%	93%	94%	92%	93%
Carboidratos	92%	95%	93%	94%	95%	93%	94%	95%

Os valores apresentados nos gráficos anteriores foram expressos pela média. Neste caso, foi observada a influência dos micronutrientes, cobalto, níquel, molibdênio, cobre, zinco, manganês e tungstênio. Os valores de entrada de DQO variaram entre 4.600 mg.L⁻¹ e 4.036 mg.L⁻¹, e os carboidratos de 821 mg.L⁻¹ a 496 mg.L⁻¹ (vide Tabela 7.3 em anexo). Os reatores, assim como no ensaio anterior, apresentaram boa eficiência de remoção da matéria orgânica com valores entre 90% e 93% para a DQO, e 92% a 95% para os carboidratos totais.

Figura 5.7 - Variação dos Ácidos Graxos Voláteis (AGV) no Ensaio B - Fase 1

Os AGV totais do ensaio B apresentaram valores próximos aos do ensaio anterior (ensaio A), os valores iniciais variaram entre 376 mg.L⁻¹ e 468 mg.L⁻¹, e valores entre 35 mg.L⁻¹ e 105 mg.L⁻¹ nas análises finais. Os AGV totais iniciais eram compostos principalmente por ácido acético, em média 260 mg.L⁻¹ seguido de ácido propiônico e butírico.

Tabela 5.6 - Rendimento da produção de CH₄ com relação à remoção de matéria orgânica (Ensaio B)

Rendimento	Reatores (código)							
	Cntr. (RA)	Co (RB)	Ni (RC)	Zn (RD)	Mo (RE)	Cu (RF)	Mn (RG)	W (RH)
Prod. acum. (mL CH ₄)	220,4	225,0	227,0	225,5	228,0	225,5	216,5	214,5
*(1) Carb.	1,24	1,49	1,66	1,76	1,74	1,68	1,63	1,50
*(2) DQO	0,200	0,211	0,221	0,212	0,220	0,221	0,202	0,204

*(1) mL CH₄.mg⁻¹ carboidrato (CNTP);
*(2) mL CH₄.mg⁻¹ DQO (CNTP).

O rendimento da produção de metano no ensaio B, diferente do ensaio anterior, mostrou variação entre os reatores com suplementação e os reatores controle. Apenas nos reatores RG e RH não foram evidenciados aumento relevante no rendimento. Os demais exibiram variação positiva nos valores de rendimento.

Níquel, cobre e molibdênio foram os metais traço que mais estimularam a produção de metano. Para esta concentração o rendimento aumentou por volta de 10%. Cobalto e zinco também tiveram rendimento de aproximadamente 5% acima dos reatores controle. Apesar do reator (RB) manifestar efeito positivo nesse ensaio, ele teve rendimento mais expressivo para a concentração de 200 µg.L⁻¹ de cobalto (ensaio A).

No ensaio B os dados exibiram bom ajuste ao modelo proposto, o coeficiente de determinação ajustado se mostrou, em todos os casos, acima de 93%. Não houve evidência da fase lag neste ensaio. As constantes de produção potencial de metano (P) são similares. Entretanto as constantes R_m apresentaram variações entre os ensaios.

Os reatores RA apresentaram velocidade máxima de produção de metano próximo a 153 mL CH₄.d⁻¹, enquanto para os reatores com adição de 350 µg.L⁻¹ de zinco (RD) e manganês (RG) foram obtidos valores superiores, 161 mL CH₄.d⁻¹ e 174,65 mL CH₄.d⁻¹ respectivamente. Neste ponto, temos para o manganês a

evidência positiva na velocidade da metanogênese, onde houve aumento de aproximadamente 14% com relação ao reator controle.

Tabela 5.7 - Parâmetros cinéticos do Ensaio

Constantes Cinéticas*	Reatores (código)							
	Cntr. (RA)	Co (RB)	Ni (RC)	Zn (RD)	Mo (RE)	Cu (RF)	Mn (RG)	W (RH)
P (mL CH ₄)	201,6	201,6	203,4	204,7	199,8	206,7	200,4	194,1
R _m (mL CH ₄ .d ⁻¹)	153,2	150,7	149,0	161,5	155,7	153,9	174,65	153,3
f. Lag (d)	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
R ²	0,9720	0,9337	0,9375	0,9501	0,9412	0,9506	0,9592	0,9472

*Valores obtidos por meio do ajuste dos dados ao modelo modificado de Gompertz.

➤ Ensaio C [500 µg.L⁻¹]

O ensaio C buscou analisar a decorrência da adição de 500 µg.L⁻¹ dos metais Co, Ni, Zn e Mo. Este ensaio teve duração de aproximadamente 355 horas. Os parâmetros de entrada como DQO, carboidratos totais e AVG, estão representados pelos gráficos das Figura 5.8, Figura 5.9 e Figura 5.10:

Figura 5.8 - Remoção de DQO do Ensaio C – Fase 1

Figura 5.9 - Remoção de Carboidratos do Ensaio C – Fase 1

Tabela 5.8 - Eficiência de remoção de matéria orgânica do Ensaio C - Fase 1

Eficiência de remoção	Reatores (código)				
	Controle RA	Co RB	Ni RC	Zn RD	Mo RE
DQO	88%	88%	86%	88%	86%
Carboidratos	95%	95%	94%	93%	93%

A porcentagem média de remoção de DQO oscilou entre 86% e 88%, e para os carboidratos entre 93% e 95%, semelhante à remoção de 90% a 93% do ensaio B, se considerarmos o erro experimental. O atual ensaio, apesar da redução da eficiência de remoção comparada com o ensaio anterior, ainda exibe alta remoção de matéria orgânica. A DQO inicial variou entre 3.715 mg.L⁻¹ e 4.338 mg.L⁻¹. Os carboidratos iniciais variaram entre 630 mg.L⁻¹ e 746 mg.L⁻¹.

Figura 5.10- Variação dos Ácidos Graxos Voláteis (AGV) no Ensaio C - Fase 1

Não houve o acúmulo de AGV no ensaio C entre o início e fim do ensaio, o que era de se esperar, devido à carga aplicada, à adaptação da biomassa e ao tempo extenso do ensaio (355 horas). A partir das análises de AGV realizadas, não foi possível descrever a dinâmica de formação e consumo dos ácidos intermediários, pois de acordo com o planejamento experimental do projeto foi inviável a realização de análises intermediárias de AGV, DQO e carboidratos. Os parâmetros e porcentagem de remoção entre início e final do ensaio, estão descritos na Tabela 7.4 (em anexo) com detalhes das análises em duplicatas.

Tabela 5.9 - Rendimento da produção de CH₄ com relação à remoção de matéria orgânica (Ensaio C)

Rendimento	Reatores (código)				
	Controle RA	Co RB	Ni RC	Zn RD	Mo RE
Prod. CH ₄ ac. (mL)	210,0	210,0	210,5	199,5	205,0
*(1) Carb.	1,18	1,11	1,19	1,16	1,23
*(2) DQO	0,225	0,212	0,219	0,198	0,232

*(1) mL CH₄.mg⁻¹ carboidrato (CNTP);
*(2) mL CH₄.mg⁻¹ DQO (CNTP).

Para condições do experimento, com a suplementação de 500 µg.L⁻¹ de metais traço, a única condição onde houve o aumento do rendimento na produção de metano por DQO removida foi com a suplementação de molibdênio. Os restantes se mostraram com um rendimento abaixo da condição controle. Não foram programados ensaios com o cobre para estas concentrações, com isso não se consegue comparar os efeitos desta suplementação que trouxe resultados positivos no caso anterior com a adição de 350 µg.L⁻¹ deste micronutriente.

Tabela 5.10 - Parâmetros cinéticos do Ensaio C

Const. Cinéticas*	Reatores (código)				
	Controle RA	Co RB	Ni RC	Zn RD	Mo RE
P (mL)	192,0	189,8	191,5	187,0	189,3
Rm(mL.d ⁻¹)	103,95	114,05	98,60	102,65	104,65
f. Lag (d)	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
R ²	0,9685	0,9680	0,9701	0,9771	0,9525

*Valores obtidos por meio do ajuste dos dados ao modelo modificado de Gompertz.

Observando os dados de produção de metano acumulada em relação ao tempo deste ensaio, visualiza-se o bom ajuste de dados pelo alto coeficiente de determinação ajustado maior que os ensaios anteriores. Neste caso também não houve fase lag, a biomassa se mostrou ativa e bem adaptada, e logo nas primeiras análises de composição do biogás foi detectado a produção de metano (Tabela 5.10).

A partir das constantes cinéticas (Tabela 5.10) obtidas por iteração pelo *software* Statistica 12, fica claro que com a concentração de $500 \mu\text{g.L}^{-1}$ de metais traço, apenas o cobalto surtiu efeito positivo para o R_m , enquanto que níquel, zinco e molibdênio não esboçaram variação na velocidade de produção do biogás.

Nos experimentos realizados por Gustavsson, Svensson e Karlsson (2011), a suplementação da vinhaça com $500 \mu\text{g.L}^{-1}$ de cobalto em conjunto com ferro (500 mg.L^{-1}) e níquel ($200 \mu\text{g.L}^{-1}$), foi essencial na estabilização do reator anaeróbio mesofílico com altas taxas de sulfato e acúmulo de AGV. Este efeito benéfico se mostrou de acordo com os resultados obtidos pelo ensaio C, onde houve aumento da taxa de produção de CH_4 com a adição da mesma concentração de cobalto. Segundo Gustavsson, Svensson e Karlsson (2011), a presença de altas taxas de sulfato no efluente pode inibir a biodisponibilidades destes metais traço.

➤ *Ensaio D [800 $\mu\text{g.L}^{-1}$]*

O ensaio D, último ensaio da fase 1 da pesquisa, teve o objetivo de avaliar a maior concentração da adição de metais traço na vinhaça deste trabalho. Foram suplementados $800 \mu\text{g.L}^{-1}$ de Co, Ni, Mo, Cu, Zn, Mn e W. O ensaio teve duração de um pouco mais que 307 horas. As cargas orgânicas e eficiências de remoção estão representadas nos gráficos e tabelas abaixo (Figura 5.11, Figura 5.12 e Tabela 5.11):

Figura 5.11 - Remoção de DQO do Ensaio D – Fase 1

Figura 5.12 - Remoção de Carboidratos do Ensaio D – Fase 1

Tabela 5.11- Eficiência de remoção de matéria orgânica do Ensaio D - Fase 1

Eficiência de remoção	Reatores (código)							
	Controle RA	Co RB	Ni RC	Mo RD	Cu RE	Zn RF	Mn RG	W RH
DQO	85%	86%	85%	83%	87%	84%	84%	86%
Carboidratos	93%	91%	91%	90%	93%	91%	91%	93%

Os valores de DQO de entrada variaram entre 3.900 mg.L⁻¹ e 4.600 mg.L⁻¹. A relação de remoção manteve-se alta, como em todos os ensaios, a eficiência média esteve entre 84% e 87%. A concentração de carboidratos totais inicial permaneceu entre 540 mg.L⁻¹ e 821 mg.L⁻¹, e a eficiência de remoção entre 90% e 93%.

A Tabela 7.5 (em anexo), detalha os dados do experimento. Os valores de DQO, AGV e carboidratos totais estão descritos para maiores esclarecimentos.

Figura 5.13 - Variação dos Ácidos Graxos Voláteis (AGV) no Ensaio D - Fase 1

O último ensaio da fase 1, como nos ensaios anteriores, mostrou que não houve ocorrência de acúmulo de AGV no fim do ensaio. A parcela mais relevante dos AGV totais é o ácido acético, no início chegou a apresentar valores entre 390 mg.L⁻¹ e 460 mg.L⁻¹.

Tabela 5.12 - Rendimento da produção de CH₄ com relação à remoção de matéria orgânica (Ensaio D)

Rendimento	Reatores (código)							
	Cntr. (RA)	Co (RB)	Ni (RC)	Zn (RD)	Mo (RE)	Cu (RF)	Mn (RG)	W (RH)
Prod. CH ₄ ac. (mL)	220,7	218,1	228,2	217,6	226,4	223,7	224,7	203,5
*(1) Carb.	1,10	1,47	1,38	1,40	1,58	1,41	1,47	1,03
*(2) DQO	0,214	0,221	0,232	0,240	0,267	0,225	0,233	0,192

*(1) mL CH₄.mg⁻¹ carboidrato (CNTTP);

*(2) mL CH₄.mg⁻¹ DQO (CNTTP).

Os dados de rendimento do ensaio D exibiram resultados acima dos valores levantados pelos reatores controle (RA), exceto para o reator RH, isto indica que com a suplementação de 800 µg.L⁻¹ ocorreu estimulação da metanogênese. O zinco e o molibdênio foram os metais traço mais significativos, o primeiro teve rendimento superior de aproximadamente 12%, enquanto o molibdênio obteve por volta de 25% acima do rendimento da condição sem suplementação.

Segundo Altas (2009), a concentração de Zn e Ni utilizada neste ensaio não causaria inibição metanogênica. Este autor, observando o tratamento de efluente doméstico e utilizando o mesmo tipo de lodo granular, levantou que para a redução de 50% da produção acumulada de metano seria necessário uma concentração de 7500 µg.L⁻¹ para o Zn e 35000 µg.L⁻¹ para o Ni. A concentração descrita por ele é consideravelmente maior que a do ensaio D.

Tabela 5.13 - Parâmetros cinéticos do Ensaio D –

Constantes Cinéticas*	Reatores (código)							
	Cntr. (RA)	Co (RB)	Ni (RC)	Zn (RD)	Mo (RE)	Cu (RF)	Mn (RG)	W (RH)
P (mL)	212,2	206,4	214,7	207,0	217,1	211,8	216,1	193,8
R _m (mL.d ⁻¹)	156,05	161,60	194,55	169,55	186,30	189,35	196,25	150,65
f. Lag (d)	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
R ²	0,9917	0,9783	0,9803	0,9781	0,9810	0,9754	0,9777	0,9782

*Valores obtidos por meio do ajuste dos dados ao modelo modificado de Gompertz.

Os coeficientes de determinação mostram que os dados deste ensaio foram os que realizaram os melhores ajustes às curvas descritas pelo modelo modificado de Gompertz. Neste caso também não houve evidência de fase lag no ensaio.

Os parâmetros cinéticos descritos na Tabela 5.13, assim como nos dados de rendimento, indicam que para esta concentração houve estimulação da metanogênese, exceto para o tungstênio. As adições destes micronutrientes elevaram a velocidade máxima de produção de metano. O molibdênio, o cobre, o níquel e manganês, em ordem crescente de relevância, foram os metais traço com maiores valores da constante R_m. Eles elevaram em 19%, 21%, 25% e 26%, respectivamente.

5.4.2. Fase 2 – Avaliação dos Efeitos Sinérgicos entre os Metais

Traço na Digestão Anaeróbia

Na fase final da pesquisa (Fase 2) buscou-se analisar os efeitos sinérgicos dos metais traço, cobalto, níquel, zinco, molibdênio, cobre e manganês nas concentrações de 350 µg.L⁻¹ de cada micronutriente. Nesta fase os experimentos foram realizados em triplicata, e foram indicadas as médias e desvios padrão dos resultados. As relações de remoção das cargas orgânicas de cada reator estão representadas nos gráficos das Figura 5.14, Figura 5.15 e Figura 5.16.

Figura 5.14 - Remoção de DQO - Fase 2

Os reatores A são apenas para controle das variações do experimento, ele é composto por biomassa ativa e vinhaça apenas. Os reatores B foram suplementados com a solução de micronutrientes. A DQO inicial dos reatores A apresentou média igual a 3252,8 mg.L⁻¹ e desvio padrão de 323,1 mg.L⁻¹, e os reatores B uma média igual a 3244,2 mg.L⁻¹ e desvio padrão de 174,1 mg.L⁻¹. As eficiências de remoção variaram entre 85% e 94%.

Nesta Figura 5.15 pode-se observar que a variação da remoção de carboidratos totais se mostrou maior para o reator controle (A), comparado com o ensaio B. Isto pode ser um indicativo que a suplementação auxiliou no aumento da estabilidade da biodigestão.

Figura 5.15 - Remoção de carboidratos totais - Fase 2

Figura 5.16 - Variação dos Ácidos Graxos Voláteis (AGV) - Fase 2

A Tabela 5.14 descreve o rendimento relacionada à DQO ($\text{mL CH}_4 \cdot \text{mg}^{-1} \text{DQO}_{\text{rem}}$) e aos carboidratos totais ($\text{mL CH}_4 \cdot \text{mg}^{-1} \text{Carb}_{\text{rem}}$), além dos parâmetros cinéticos obtidos a partir do *software* Statistica 12.

Tabela 5.14 - Rendimentos e parâmetros cinéticos - Fase 2

Reatores	Rendimento		Constantes Cinéticas			
	DQO	Carb.	P	R _m	F. Lag	R ²
A	0,237 ± 0,035	1,513 ± 0,159	177,8 ± 4,9	53,15 ± 3,75	0,0	0,9589 ± 0,0090
B	0,242 ± 0,008	1,846 ± 0,194	178,8 ± 5,9	54,99 ± 14,27	0,0	0,9475 ± 0,0146

Espinosa et al. (1995), a partir da suplementação de Fe (100 mg.L^{-1}), Ni (15 mg.L^{-1}), Co (10 mg.L^{-1}) e Mo ($0,2 \text{ mg.L}^{-1}$) adicionados à vinhaça da cana de açúcar com carga orgânica de $21,5 \text{ kg DQO} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{d}^{-1}$, obtiveram aumento na eficiência de remoção de DQO em 36%, e rendimento de $0,29 \text{ mL CH}_4 \cdot \text{mg}^{-1} \text{DQO}_{\text{rem}}$. O rendimento obtido por Espinosa e colaboradores foi superior ao destacado neste ensaio, referente à média de $0,24 \text{ mL CH}_4 \cdot \text{mg}^{-1} \text{DQO}_{\text{rem}}$. Devido à alta carga orgânica aplicada, Espinosa et al. (1995) tiveram produção de biogás de $14,8 \text{ l.d}^{-1}$ com 56% composto por metano.

Os dados do experimento apontados pela Tabela 5.14 foram analisados estatisticamente (vide Anexo II). Não foram evidenciadas diferenças estatísticas entre os valores de rendimento, e nem para as constantes de velocidade. Então, para a concentração estudada ($350 \mu\text{g.L}^{-1}$ de adição de cada metal traço), não houve estimulação da metanogênese, assim como na pesquisa de Espinosa et al. (1995), e tão pouco efeito sinérgico entre estes metais à digestão anaeróbia.

5.4.3. Confronto dos Parâmetros Cinéticos e de Rendimento

As velocidades máximas de produção de metano variaram entre um ensaio e outro, conforme as oscilações das concentrações de metais traço na vinhaça. Na grande maioria dos casos, a elevação da concentração de um micronutriente específico induziu o aumento da velocidade da reação de produção de CH_4 (R_m).

As constantes R_{m_x} obtidas em cada ensaio, para efeito de avaliação, foram comparadas em relação às constantes $R_{m_{cx}}$ dos reatores controle de cada ensaio, assim, a relação $R_{m_x} \cdot R_{m_{cx}}^{-1}$ pode ser interpretada como um índice de velocidade de produção de metano do reator. Esta medida foi adotada devido ao decaimento da velocidade observada entre os reatores controles de um ensaio e outro.

A realização dos ensaios dependeu da disponibilidade de equipamentos, como o shaker e o cromatógrafo gasoso, o que demandou certo intervalo de tempo entre os ensaios. Considerando o tempo entre o início do primeiro ensaio e o início do último ensaio, houve um período de aproximadamente quatro meses entre eles. Este intervalo causado por questões técnicas pode ser responsável por essa variação da atividade da biomassa.

Os gráficos das Figura 5.17 e Figura 5.18 demonstram a variação da velocidade de produção de metano conforme a elevação da concentração dos metais traço adicionados ao sistema.

Figura 5.17 - Velocidade relativa máxima de produção de metano para as variações de concentração individual dos metais traço.

Figura 5.18 - Velocidade relativa máxima de produção de metano para as variações de concentração individual dos metais traço (b).

A partir dos resultados expostos nos gráficos das Figura 5.17 Figura 5.18 pode-se observar que os metais na concentração de 800 µg.L⁻¹ foram os que apresentaram os resultados mais significativos. Houve elevação da velocidade em relação aos reatores sem suplementação. Nesta concentração mais elevada, o níquel, molibdênio, cobre, manganês e zinco, foram os que expressaram os melhores resultados. O níquel foi o micronutriente mais relevante nesta concentração, ele propiciou velocidade aproximadamente 25% maior que o reator controle.

Apenas o cobalto e o tungstênio demonstraram comportamento diferente dos demais, sendo que o cobalto obteve a maior velocidade de produção com $200 \mu\text{g.L}^{-1}$ deste metal adicionado à vinhaça, a constante cinética (R_m) para esta concentração elevou em aproximadamente 17%. O tungstênio, pelo contrário, não apresentou o efeito de estimulação à metanogênese com a adição de $800 \mu\text{g.L}^{-1}$, concentração que para as outras condições foi a mais notável, para este metal, presenciou-se a redução do R_m em quase 10%.

Apesar de muitos pesquisadores afirmarem que o cobalto é um dos metais traço mais relevante para a atividade metanogênica (FLORENCIO et al., 1994; LEBUHN et al. 2008; POBEHEIM et al. 2010), neste caso ele apenas apresentou certa influência em baixas concentrações. Existe a possibilidade de que a concentração de cobalto biodisponível na vinhaça desta pesquisa seja suficiente para o processo de conversão da DQO. Além disso, segundo Takashima, Shimada e Speece (2011), a concentração mínima necessária de cobalto à atividade metanogênica é menor que a concentração do zinco, $17 \mu\text{g.g}^{-1} \text{DQO}_{\text{rem}}$ e $49 \mu\text{g.g}^{-1} \text{DQO}_{\text{rem}}$ respectivamente.

Os rendimentos dos ensaios ($\text{mL CH}_4.\text{mg}^{-1} \text{DQO}_{\text{rem}}$) foram comparados observando as variações em relação ao aumento da concentração dos micronutrientes. Foram obtidos os gráficos das Figura 5.19 e Figura 5.20.

Figura 5.19 - Variação dos rendimentos da prod. de metano (CH_4) nos ensaios A, B, C e D.

Figura 5.20 - Variação dos rendimentos na produção de metano (CH₄) nos ensaios B e D.

A Figura 5.19 expressa claramente o aumento significativo do rendimento da produção de metano diretamente proporcional ao aumento da concentração de metais traço enriquecidos na vinhaça. O resultado mais expressivo foi encontrado para a concentração de metais de 800 µg.L⁻¹, para esta concentração todos os metais, exceto o tungstênio, apresentaram estimulação no processo da metanogênese, com o aumento de metano por unidade de DQO removida.

O molibdênio requer destaque devido ao aumento gradativo do rendimento, foi o metal traço que apresentou a maior resposta para a produção de biogás. Considerando o intervalo entre o ensaio A (200 µg.L⁻¹ Mo) e o ensaio D (800 µg.L⁻¹ Mo), o rendimento passou de 0,203 mL CH₄.mg⁻¹ DQO_{rem} para 0,268 mL CH₄.mg⁻¹ DQO_{rem}.

Em contrapartida, o tungstênio se mostrou desfavorável, em maiores concentrações, à produção de metano. Além da velocidade de produção máxima de metano decair com o aumento da concentração de 350 µg.L⁻¹ W para 800 µg.L⁻¹ W, o rendimento também sofreu redução. O rendimento passou de 0,205 mL CH₄.mg⁻¹ DQO_{rem} (ensaio B) para 0,182 mL CH₄.mg⁻¹ DQO_{rem} (ensaio D).

Conforme os resultados positivos obtidos com a suplementação de molibdênio e níquel a partir dos ensaios cinéticos, foram plotados as superfícies de respostas (Figura 5.21 e Figura 5.22) por meio do *software* Statistica 12. Observando os gráficos em três dimensões é possível constatar com a inclinação da fase inicial que, à medida que a concentração de Mo ou Ni aumenta, a velocidade de

produção de CH_4 também eleva. Levando em conta o plano XY da superfície, consegue-se evidenciar a maior produção de CH_4 para as altas concentrações de metal.

Figura 5.21 - Superfície de resposta do volume acumulado de CH_4 (mL) para as concentrações de Mo ($\mu\text{g.L}^{-1}$) pelo tempo (d).

Figura 5.22 - Superfície de resposta do volume acumulado de CH_4 (mL) para as concentrações de Ni ($\mu\text{g.L}^{-1}$) pelo tempo (d).

A partir das análises iniciais da vinhaça utilizada para o experimento, que constataram a presença em quantidade significativa dos metais essenciais para a digestão anaeróbia, e dos ensaios de suplementação, que evidenciaram a estimulação da ação efetiva dos microrganismos, pode-se supor que estes metais presentes no efluente não estavam biodisponíveis em quantidades ideais para as bactérias. Provavelmente, este fato pode ter ocorrido, devido à sulfetogênese e a complexação dos metais, tornando indisponíveis. Estas suposições devem ser confirmadas com novos ensaios e análises químicas específicas.

6. Conclusões

A partir da discussão acerca dos resultados obtidos pelos ensaios em batelada, alimentados com vinhaça e suplementada por metais traço, observando a produção de metano (CH_4) e o comportamento dos rendimentos e parâmetros cinéticos, conclui-se que:

- A maior velocidade máxima de produção de metano (R_m) com a suplementação de cobalto ocorreu com baixas concentrações do metal (adição de $200 \mu\text{g.L}^{-1}$ de Co). O R_m aumentou aproximadamente 17 % em relação ao reator controle.
- O ensaio D apresentou os melhores resultados de rendimento e velocidade de produção CH_4 . A taxa de produção (R_m) aumentou significativamente com a adição de $800 \mu\text{g.L}^{-1}$ dos metais traço, Mn (26%), Ni (25%), Cu (21%) e Mo (19%). Os rendimentos ($\text{mL CH}_4.\text{mg}^{-1} \text{DQO}_{\text{rem}}$) mais expressivos foram para Mo, Zn e Ni.
- O tungstênio apresentou indícios de inibição da metanogênese com a adição de $800 \mu\text{g.L}^{-1}$ do metal. A taxa de produção (R_m) e o rendimento ($\text{mL CH}_4.\text{mg}^{-1} \text{DQO}_{\text{rem}}$) sofreram redução para esta condição.
- As concentrações utilizadas no ensaio final (Fase 2) foram insuficientes e não causaram nenhum efeito na metanogênese, seja no rendimento, quanto na taxa de velocidade R_m . Com isso, não foram observadas efeitos sinérgicos dos metais traços no processamento da vinhaça e produção de biogás.

7. Sugestões às Próximas Pesquisas

Com os resultados e observações do presente trabalho, sugere-se:

- Realizar análises de biodisponibilidade, do tipo Tissier modificado, dos metais em lodo, a fim de quantificar e qualificar os metais traços presentes na matriz sólida.
- Analisar a influência da alta concentração de sulfatos presentes na vinhaça, na biodisponibilidade dos metais.
- Testar a capacidade de recuperação de um reator acidificado, alimentada com alta carga de vinhaça, a partir da suplementação de metais traço, em concentrações determinadas por ensaios prévios em batelada.
- Avaliação da influência dos micronutrientes na partida do reator.

REFERÊNCIAS

ALTAS, L., 2009. *Inhibitory effect of heavy metals on methane-producing anaerobic granular sludge*. *Journal of Hazardous Materials*, v. 162, p. 1551-1556.

APHA; AWWA; WPCF, 2005. *Standard methods for the examination of water and wastewater*. 21. ed. Washington, DC: American Public Health Association.

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. *Eng. Sanit. Ambient*, vol.12, p. 192-201.

AQUINO, S. F.; STUCKEY, D. C., 2007. *Bioavailability and Toxicity of Metal Nutrients during Anaerobic Digestion*. *Journal of Environmental Engineering*, v. 133, p. 8.

BARBER, W. P.; STUCKEY, D. C.; 2000. *Metal Bioavailability and Trivalent Chromium Removal In ABR*. *J. Environ. Eng.*, v. 126, p. 649-656.

BROWN, A. I. T., 2012. Comportamento da Biomassa de Reator Anaeróbio Utilizado no Processamento de Vinhaça de Destilaria de Alcool. 114 f. Tese (Doutorado) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos.

BUTTER, T. J.; EVISON, L. M.; HANCOCK, I. C.; HOLLAND, F. S., 1998. *The Kinetics of Metal Uptake by Microbial Biomass: Implications for the Design of a Biosorption Reactor*. *Wat. Sci. Tech.*, v. 38, p. 279-286.

CHEN, Y.; CHENG, J. J.; CREAMER, K. S., 2008. *Inhibition of Anaerobic Digestion Process: A Review*. *Bioresource Technology*, v. 99, p. 4044-4064.

CHERNICHARO, C. A. de L., 1997. Retores Anaeróbios. 2 ed. Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental – UFMG. Belo Horizonte.

CONAB, 2013. Acompanhamento da Safra Brasileira: Cana-de-Açúcar, terceiro levantamento. Companhia Nacional de Abastecimento, p.18. Brasília.

CRESSON, R.; CARRÈRE, H.; DELGENÈS, J.P.; BERNET, N., 2006. *Biofilm Formation During the Start-Up Period Of An Anaerobic Biofilm Reactor—Impact Of Nutrient Complementation. Biochemical Engineering Journal*, v. 30, p. 55-62.

CRUZ, R. L.; RIGHETTO, A. M.; NOGUEIRA, M. A., 1991. *Experimental investigation of soil and groundwater impacts caused by vinasse disposal. Water Science and Technology*, v. 24, p. 77-85.

DEMIREL, B.; SCHERER, P., 2011. *Trace Element Requirements of Agricultural Biogas Digesters During Biological Conversion of Renewable Biomass to Methane. Biomass and Bioenergy*, v. 35, p. 992-998.

DRIESSEN, W. J. B. M.; TIELBAARD, M. H.; VEREIJKEN, T. L. F. M., 1994. *Experience on anaerobic treatment of distillery effluent with the UASB process. Water Science and Technology*, v 30, p 193–201.

ESPINOSA, A.; ROSAS, L.; ILANGO VAN, K.; NOYOLA, A., 1995. *Effect Of Trace Metals On The Anaerobic Degradation Of Volatile Fatty Acids In Molasses Stillage. Water Science and Technology*, v. 32, p. 121-129.

FENG, X. M.; KARLSSON, A.; SVENSSON, B. H.; BERTILSSON, S., 2010. *Impact of Trace Element Addition on Biogas Production From Food Industrial Waste - Linking Process to Microbial Communities. Microbiology Ecology*, v. 74, p. 226-240.

FERMOSO, F. G.; BARTACEK, J.; CHUNG, L. C.; LENS, P., 2008. *Supplementation of Cobalt to UASB Reactors By Pulse Dosing: CoCl₂ Versus CoEDTA²⁻ Pulses. Biochemical Engineering Journal*, v. 42, p. 111-119.

FERMOSO, F. G.; COLLINS, G.; BARTACEK, J.; LENS, P. N. L., 2008b. *Zinc Deprivation of Methanol Fed Anaerobic Granular Sludge Bioreactors. J Ind Microbiol Biotechnol*, v. 35, p. 543-557.

FERMOSO, G. F.; BARTACEKA, J.; JANSENC, S.; LENS, P. N. L. (2009). Metal Supplementation to UASB Bioreactors: From Cell-Metal Interactions to Full-Scale Application. *Science of the Total Environment*, v. 407, p. 3652-3667.

FERRAZ Jr., A. D. N., 2013. Digestão anaeróbia da vinhaça da cana de açúcar em reator acidogênico de leito fixo seguido de reator metanogênico de manta de lodo. 162 f. Tese (Doutorado) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo.

FLORENCIO, L.; FIELD, J. A.; LETTINGA, G., 1994. *Importance of Cobalt for Individual Trophic Groups in an Anaerobic Methanol-Degrading Consortium. Applied and Environmental Microbiology*, v. 60, p. 227-234.

FLORENCIO, L.; JENICEK, P.; FIELD, J. A.; LETTINGA, G., 1993. *Effect of Cobalt On The Anaerobic Degradation Of Methanol. Journal of Fermentation and Bioengineering*, v. 75, p. 368-374.

FUESS, L. T., 2013. Potencial contaminante e energético da vinhaça: Riscos de contaminação ao solo e recursos hídricos e recuperação de energia a partir da digestão anaeróbia. f. 163. Dissertação (Mestrado). Universidade Estadual Paulista.

GIL, G. G.; KLEERREBEZEM, R.; LETTINGA, G., 1999. *Effect of Nickel and Cobalt on Kinetics of Methanol Conversion by Methanogenic Sludge as Assessed by On-line CH₄ Monitoring. Applied and Environmental Microbiology*, v. 65, p. 1789-1793.

GUSTAVSSON, J.; SVENSSON, B. H.; KARLSSON, A., 2011. *The Feasibility of Trace Element Supplementation For Stable Operation of Wheat Stillage-Fed Biogas Tank Reactors. Water Science and Technology*, v. 64, p. 320-325.

HAANDEL van, A. C.; LETTINGA, G., 1994. *Anaerobic sewage treatment: a practical guide for regions with a hot climate. J. Wiley*, f. 226. Universidade de Michigan.

LAZARO, C. Z., 2012. Influência da concentração de substrato e da temperatura na produção de hidrogênio a partir de vinhaça de cana-de-açúcar. f. 157. Tese (Doutorado) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo.

LEBUHN, M.; LIU, F.; HEUWINKEL, H.; GRONAUER, A., 2008. *Biogas Production From Mono-Digestion of Maize Silage—Long-Term Process Stability and Requirements*. *Water Science & Technology*, v. 58, p. 1645-1651.

MAGALHÃES, E. A.; SOUZA, S. N. M.; AFONSO, A. D. L.; RICIERI, R. P., 2004. Confecção e avaliação de um sistema de remoção do CO₂ contido no biogás. *Acta Scientiarum. Technology*, v. 26, p.11-19.

MAHONEY, E. M.; VARANGU, L. K.; CAIRNS, W. L.; KOSARIC, N.; MURRAY, R. G. E., 1987. *The Effect of Calcium on Microbial Aggregation During UASB Reactor Start-Up*. *Wat. Sci. Tech*, V 19, p. 249-260.

METCALF, E.; EDDY, H., 2003. *Wastewater Engineering Treatment and Reuse*, 4^a ed. McGraw hill, f. 1819. New York, USA.

MILÁN, Z.; MONTALVO, S.; RUIZ-TAGLE, N.; URRUTIA, H.; CHAMY, R.; SÁNCHEZ, E.; BORJA, R., 2010. *Influence Of Heavy Metal Supplementation On Specific Methanogenic Activity And Microbial Communities Detected in Batch Anaerobic Digesters*. *Journal of Environmental Science and Health*, v. 45, p. 1307-1314.

MORAES, B. S.; JUNQUEIRA, T. L.; PAVANELLO, L. G.; CAVALETT, O.; MANTELLATO, P. E.; BONOMI, A.; ZAIAT, M., 2014. *Anaerobic digestion of vinasse from sugarcane biorefineries in Brazil from energy, environmental, and economic perspectives: Profit or expense?*. *Applied Energy*, v. 113, p. 825-835.

MORAES, E.; ADORNO, M.; ZAIAT, M.; FORESTI, E., 2000. Determinação de Ácidos Voláteis por Cromatografia Gasosa em Efluentes de Reatores Anaeróbios Tratando Resíduos Líquidos e Sólidos. In: VI Oficina e Seminário Latino-Americano

de Digestão Anaeróbia. Anais da VI Oficina e Seminário Latino-Americano de Digestão Anaeróbia, vol. 2. Recife – PE: Universitária UFPE, p. 235-238.

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, p. 494-503.

MURRAY, W. D.; BERG, V. D., 1981. *Effects of Nickel, Cobalt, and Molybdenum on Performance of Methanogenic Fixed-Film Reactors. Applied and Environmental Microbiology*, v. 42, p. 502-505.

NANDY, T.; SHASTRY, S.; KAUL, S. N.; 2002. *Wastewater management in a cana molasses distillery involving bioresource recovery. Journal of Environmental Management*, v. 65, p. 25-38.

NEWMAN, D. K; KOLTER, R., 2000. *A role for excreted quinones in extracellular electron transfer. Nature*, v. 405, p. 94-97.

OLESZKIEWICZ, J. A.; SHARMA. V. K., 1990. *Stimulation and Inhibition Of Anaerobic Processes By Heavy Metals – A Review. Biological Wastes*, v. 31. p. 45-67.

POBEHEIM, H.; MUNK, B.; JOHANSSON, J.; GUEBITZ, G. M., 2010. *Influence Of Trace Elements On Methane Formation From a Synthetic Model Substrate For Maize Silage. Bioresource Technology*, v. 101, p. 836-839.

POBEHEIM, H.; MUNK, B.; LINDORFER, H.; GUEBITZ, G. M., 2011. *Impact Of Nickel And Cobalt On Biogas Production And Process Stability During Semi-Continuous Anaerobic Fermentation Of a Model Substrate For Maize Silage. Water Research*, v. 45, p. 781-787.

RIBEIRO, B. T.; LIMA, J. M.; GUILHERME, L. R. G.; JULIAO, L. G. F., 2010. *Lead sorption and leaching from an Inceptisol sample amended with sugarcane vinasse*. Sci. Agric., v. 67, p. 441-447.

RIPLEY, L. E.; BOYLE, W. C.; CONVERSE, J. C., 1986. *Improved Alkalimetric Monitoring for Anaerobic Digestion of High-Strength Wastes*. Water Pollution Control Federation, v. 58, p. 406-411.

ROCHA, V. C., 2012. *Processamento Anaeróbico de Vinhaça Pré-Tratada com Biopolímero à Base de Cálcio*. 86 f. Dissertação (Mestrado) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos.

SALOMON, K. R.; LORA, E. E. S., 2006. *Estimativa do Potencial de Geração de Energia Elétrica para Diferentes Fontes de Biogás no Brasil*. Biomassa e Energia, v. 2, p. 57-67.

SIQUEIRA, L. M., 2008. *Influência da taxa de carregamento orgânico na degradação anaeróbia da vinhaça em reator de leito fluidizado*. São Carlos – SP, 130p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de São Carlos.

SOLOMON, K. R., 2007. *Avaliação Técnico-Econômica e Ambiental da Utilização do Biogás Proveniente da Biodigestão da Vinhaça em Tecnologias para Geração de Eletricidade*. f. 219. Tese (Doutorado). Instituto de Engenharia Mecânica, Universidade Federal de Itajubá.

SOUZA, S. N. M.; BORSOI, A.; SANTOS, R. F.; SECCO, D.; FRIGO, E. P.; SILVA, M. J., 2012. *Production potential of biogas in sugar and ethanol plants for use in urban buses in Brazil*. Journal of Food, Agriculture & Environment, v. 10, p. 908-910.

SPEECE, R. E., 1996. *Anaerobic Biotechnology for Industrial Wastewaters*. Archae Press, p. 416.

TAKASHIMA, M.; SHIMADA, K.; SPEECE, R. E., 2011. *Minimum Requirements for Trace Metals (Iron, Nickel, Cobalt, and Zinc) in Thermophilic and Mesophilic Methane Fermentation from Glucose. Water Environment Research*, v. 83, p. 339- 346.

UELLEND AHL, H.; AHRING B.K., 2010. *Anaerobic Digestion as Final Step of a Cellulosic Ethanol Biorefinery: Biogas Production From Fermentation Effluent in a UASB Reactor—Pilot-Scale Results. Biotechnology and Bioengineering*, v. 107, p. 59-63.

UNICA, 2014. Acompanhamento Quinzenal. União da Indústria de Cana-de-Açúcar, p.10. São Paulo.

VELÁZQUEZ, S. M. S. G; AVELLAR, L. H. N; MARTINS, O. S; COSTA, D. F; GUARDABASSI, P. M; VARKULYA, A. J; PECORA, V., 2003. Sistema de Purificação de Biogás de Esgoto para utilização em Microturbinas. 5th Latin-American Congress: Electricity Generation and Transmission. P. 13.

VIANA, A. B., 2006. Tratamento Anaeróbio de Vinhaça em Reator UASB Operado em Temperatura na Faixa Termófila (55 °C) e Submetido ao Aumento Progressivo de Carga Orgânica. Dissertação (Mestrado). Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo.

VLYSSIDES, A.; BARAMPOUTI, E. M.; MAI, S.; STAMATOGLU, A.; TSIMAS, E., 2010. *Alternative Biological Systems For The Treatment Of Vinasse From Wine. Water Science and Technology*, v. 62, p. 2899-2904.

WANG, J.; HUANG, C. P.; ALLEN, H. E.; 2003. *Modeling heavy metal uptake by sludge particulates in the presence of dissolved organic matter . Water Research*, v. 37, p. 4835-4840.

WEILAND, P.; ROZZI, A., 1991. *The Start-Up, Operation And Monitoring Of High-Rate Anaerobic Treatment Systems: Discusser's Report. Wat. Sci.Tech.*, v. 24, p. 257-277.

WILKIE, A. C.; RIEDESEL, K. J.; OWENS, J. M., 2000. *Stillage characterization and anaerobic treatment of ethanol stillage from conventional and cellulosic feedstocks. Biomass and Bioenergy*, v. 19, p. 63-102.

WORM, P.; FERMOSO, F. G.; LENS, P. N. L.; PLUGGE, C. M., 2009. *Decreased Activity of a Propionate Degrading Community in a UASB Reactor Fed With Synthetic Medium Without Molybdenum, Tungsten and Selenium. Enzyme and Microbial Technology*, v. 45, p.139-145.

ZANDVOORT, M. H.; HULLEBUSCH, E. D. V.; GIETELING, J.; LENS, P. N. L., 2006. *Granular Sludge in Full-Scale Anaerobic Bioreactors: Trace Element Content and Deficiencies. Enzyme and Microbial Technology*, v. 39, p. 337-346.

ZANDVOORT, M. H.; van HULLEBUSCH, E. D.; FERMOSO, F. G.; LENS, P. N. L., 2006 (b). *Trace Metals in Anaerobic Granular Sludge Reactors: Bioavailability and Dosing Strategies. Engineering in Life Sciences*, v. 6, p. 293-301.

ANEXOS

Anexo I

Tabela 7.1 - Limites de detecção (LD) para análise de composição do biogás por cromatografia gasosa.

Composto	LD(μ mol)
Hidrogênio	0,902
Nitrogênio	1,985
Metano	1,039
Gás Carbônico	0,747

Anexo II – Parâmetros de remoção de matéria orgânica

Tabela 7.2 - Parâmetros de matéria orgânica do Ensaio A [200 µg] da Fase 1

Reatores (duplicata)		Parâmetros								
		DQO (mg.L ⁻¹)			Carboidratos tot. (mg.L ⁻¹)			AGV totais (mg.L ⁻¹)		
		Inicial	Final	*Δ	Inicial	Final	*Δ	Inicial	Final	*Δ
RA Controle	1	3881	456	88%	681,1	33,8	95%	556,8	80,5	86%
	2	3728	485	87%	666,2	39,0	94%	427,1	63,0	85%
RB Co	1	4085	489	88%	682,0	37,9	94%	441,6	80,2	82%
	2	3999	466	88%	667,5	36,8	94%	491,1	100,0	80%
RC Ni	1	3572	440	88%	611,8	30,5	95%	354,1	96,9	73%
	2	4105	498	88%	705,4	32,8	95%	399,5	96,9	76%
RD Zn	1	3912	503	87%	682,0	35,0	95%	587,0	79,9	86%
	2	3695	503	86%	680,6	39,5	94%	567,0	96,2	83%
RE Mo	1	4000	540	86%	718,0	46,1	94%	440,7	80,3	82%
	2	4202	488	88%	705,6	40,5	94%	492,0	94,4	81%

*Δ: porcentagem de remoção

Tabela 7.3 - Parâmetros de matéria orgânica do Ensaio B [350 µg] da Fase 1

Reatores (duplicata)		Parâmetros								
		DQO (mg.L ⁻¹)			Carboidratos tot. (mg.L ⁻¹)			AGV totais (mg.L ⁻¹)		
		Inicial	Final	*Δ	Inicial	Final	*Δ	Inicial	Final	*Δ
Controle	1	4147	306	93%	586,1	44,0	92%	411,0	81,9	80%
	2	4612	586	87%	821,6	54,8	93%	411,0	125,0	70%
Co	1	4105	281	93%	574,0	28,9	95%	376,1	116,7	69%
	2	4095	313	92%	575,1	35,9	94%	437,0	48,6	89%

Ni	1	4036	408	90%	527,0	37,6	93%	400,9	49,9	88%
	2	4065	345	92%	523,0	32,4	94%	457,1	94,9	79%
Zn	1	4029	256	92%	450,1	31,9	93%	468,9	73,1	84%
	2	4082	244	92%	535,7	31,9	94%	435,3	96,1	78%
Mo	1	4030	306	92%	505,0	29,3	94%	384,6	35,5	91%
	2	4074	378	91%	496,6	35,2	93%	421,6	51,7	88%
Cu	1	4078	304	93%	515,6	27,7	95%	434,4	69,5	84%
	2	4011	482	88%	501,4	27,7	94%	410,0	67,1	84%
Mn	1	4165	316	92%	557,8	35,2	94%	390,8	47,0	88%
	2	4132	325	92%	469,2	33,9	93%	424,5	62,6	85%
W	1	4096	301	93%	563,4	30,7	95%	454,2	40,6	91%
	2	4054	327	92%	524,2	34,3	93%	421,7	105,0	75%

*Δ: porcentagem de remoção

Tabela 7.4 -Parâmetros de matéria orgânica do Ensaio C [500 µg] da Fase 1

Reatores (duplicata)		Parâmetros								
		DQO (mg.L ⁻¹)			Carboidratos tot. (mg.L ⁻¹)			AGV totais (mg.L ⁻¹)		
		Inicial	Final	*Δ	Inicial	Final	*Δ	Inicial	Final	*Δ
Controle	1	3881	456	88%	681,1	33,8	95%	556,8	80,5	86%
	2	3728	485	87%	666,2	39,0	94%	427,1	63,0	85%
Co	1	3933	465	88%	686,4	36,7	95%	492,0	125,0	75%
	2	4097	496	88%	745,8	38,0	95%	502,8	125,0	75%
Ni	1	3765	510	86%	652,9	42,3	94%	404,7	117,2	71%
	2	3981	347	91%	706,9	45,0	94%	440,7	100,9	77%
Zn	1	4338	501	88%	649,0	44,4	93%	566,0	84,3	85%
	2	3916	523	87%	681,9	49,5	93%	546,0	63,0	88%

Mo	1	3628	519	86%	657,8	48,0	93%	556,8	106,2	81%
	2	3715	499	87%	629,8	47,8	92%	427,1	78,9	82%

*Δ porcentagem de remoção

Tabela 7.5 - Parâmetros de matéria orgânica do Ensaio D [800 µg] da Fase 1

Reatores (duplicata)		Parâmetros								
		DQO (mg.L ⁻¹)			Carboidratos tot. (mg.L ⁻¹)			AGV totais (mg.L ⁻¹)		
		Inicial	Final	*Δ	Inicial	Final	*Δ	Inicial	Final	*Δ
Controle	1	4612	586,2	87%	821,6	54,8	93%	724,77	81,91	89%
	2	4099	694,7	83%	733,4	61,0	92%	623,16	125,00	80%
Co	1	4340,5	574,6	87%	591,4	57,4	90%	657,02	116,67	82%
	2	3907	595	85%	575,4	46,2	92%	603,15	48,57	92%
Ni	1	4227	660	84%	676,4	56,9	92%	614,27	49,94	92%
	2	4093	617	85%	621,4	58,5	91%	645,39	94,90	85%
Zn	1	3744	636	83%	572,0	55,1	90%	645,57	73,13	89%
	2	4011	610	85%	660,2	56,0	92%	683,25	96,15	86%
Mo	1	3712	637	83%	701,6	59,0	92%	601,16	35,48	94%
	2	3602	610	83%	480,0	53,5	89%	584,42	51,70	91%
Cu	1	4011	437	89%	707,8	34,7	95%	513,21	69,45	86%
	2	4142	622	85%	540,8	54,1	90%	656,90	67,06	90%
Mn	1	4018	660	84%	555,2	50,0	91%	598,69	46,98	92%
	2	4202	672	84%	651,0	52,5	92%	775,05	62,62	92%
W	1	4308	539	87%	725,8	61,2	92%	624,22	40,56	94%
	2	4479	664	85%	809,0	49,0	94%	667,09	105,00	84%

*Δ porcentagem de remoção

Anexo III - Análises estatísticas

➤ DQO inicial – FASE 1

One-way ANOVA: Ensaio A; Ensaio B; Ensaio C; Ensaio D

Source	DF	SS	MS	F	P
Factor	3	441924	147308	3,27	0,029
Error	48	2164998	45104		
Total	51	2606922			

S = 212,4 R-Sq = 16,95% R-Sq(adj) = 11,76%

Pooled StDev = 212,4

Grouping Information Using Tukey Method

	N	Mean	Grouping
Ensaio B	16	4113,2	A
Ensaio D	16	4094,4	A
Ensaio C	10	3915,2	A
Ensaio A	10	3914,6	A

Means that do not share a letter are significantly different.

Tukey 95% Simultaneous Confidence Intervals
All Pairwise Comparisons

Individual confidence level = 98,94%

➤ Rendimento e Parâmetros Cinéticos– FASE 2

One-way ANOVA: A; B

Source	DF	SS	MS	F	P
Factor	1	5	5,05	0,840	
Error	4	435	109		
Total	5	440			

S = 10,43 R-Sq = 1,15% R-Sq(adj) = 0,00%

Pooled StDev = 10,43

Grouping Information Using Tukey Method

N	Mean	Grouping
B 3	54,99	A
A 3	53,16	A

Means that do not share a letter are significantly different.

Tukey 95% Simultaneous Confidence Intervals All Pairwise Comparisons

Individual confidence level = 95,00%

One-way ANOVA: A; B

Source	DF	SS	MS	F	P
Factor	1	0,000037	0,000037	0,06	0,822
Error	4	0,002561	0,000640		
Total	5	0,002598			

S = 0,02530 R-Sq = 1,43% R-Sq(adj) = 0,00%

Individual 95% CIs For Mean Based on

Level	N	Mean	StDev	Pooled StDev
A	3	0,23656	0,03487	(-----*-----)
B	3	0,24153	0,00803	(-----*-----)

-----+-----+-----+-----
0,200 0,225 0,250 0,275

Pooled StDev = 0,02530

Grouping Information Using Tukey Method

	N	Mean	Grouping
B	3	0,24153	A
A	3	0,23656	A

Means that do not share a letter are significantly different.

Tukey 95% Simultaneous Confidence Intervals
All Pairwise Comparisons

Individual confidence level = 95,00%

Anexo IV – Dados adaptados à curva do modelo modificado de Gompertz