UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA DE ENGENHARIA DE SÃO CARLOS

ANDRÉ DO VALE BORGES

Codigestão mesofílica de vinhaça de cana-de-açúcar e glicerol destilado em
reator de leito fixo estruturado

VERSÃO CORRIGIDA

São Carlos

2020

ANDRÉ DO VALE BORGES

Codigestão mesofílica de vinhaça de cana-de-açúcar e glicerol destilado em
reator de leito fixo estruturado

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

Orientadora: Profa. Dra. Márcia Helena Rissato
Zamariolli Damianovic

São Carlos
2020

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.

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Prof. Dr. Sérgio Rodrigues Fontes da
EESC/USP com os dados inseridos pelo(a) autor(a).

B732c Borges, André do Vale
 Codigestão mesofílica de vinhaça de
cana-de-açúcar e glicerol destilado em reator de leito
fixo estruturado / André do Vale Borges; orientadora
Márcia Helena Rissato Zamariolli Damianovic. São
Carlos, 2020.

 Dissertação (Mestrado) - Programa de
Pós-Graduação em Engenharia Hidráulica e Saneamento e
Área de Concentração em Hidráulica e Saneamento --
Escola de Engenharia de São Carlos da Universidade de
São Paulo, 2020.

 1. Biocombustíveis . 2. Codigestão de resíduos.
3. Recuperação energética. I. Título.

FOLHA DE JULGAMENTO

Candidato: Bacharel **ANDRÉ DO VALE BORGES**.

Título da dissertação: " Codigestão mesofílica de vinhaça de cana-de-açúcar e glicerol destilado em reator de leito fixo estruturado ".

Data da defesa: 06/08/2020.

Comissão Julgadora:

Resultado:

Profa. Dra. **Márcia Helena Rissato Zamarilli Damianovic**
(**Orientadora**)
(Escola de Engenharia de São Carlos/EESC-USP)

Aprovado

Prof. Dr. **Rogers Ribeiro**
(Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos/FZEA-USP)

Aprovado

Prof. Dr. **Lucas Tadeu Fuess**
(Escola Politécnica/EP-USP)

Aprovado

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

Prof. Dr. **Eduardo Mario Mendiando**

Presidente da Comissão de Pós-Graduação:

Prof. Titular **Murilo Araujo Romero**

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela vida, pela esperança em dias melhores, pelo cuidado diário e fidelidade em todos os momentos da minha caminhada. Por ouvir-me, perdoar-me, inspirar-me, fortalecer meus sonhos e amar-me desmedidamente.

A minha mãe, por todo amor e carinho. Grato pelas orações, pelo amor mais genuíno e puro, por toda preocupação e ajuda nos dias difíceis. Te amo sem fim, dona Suely!

As minhas irmãs: Bianca e Nataly, pelo carinho, preocupação e momentos de felicidade compartilhados. Bi, valeu por salvar minha dissertação nos 45 no 2º tempo! Ao meu cunhado, Carlos, por toda ajuda nas dificuldades até aqui.

Ao meu pai, Claudio [em memória], pelo exemplo de honestidade e simplicidade de caráter e coração. Sinto tanto sua falta, meu pai! O senhor estará sempre vivo no meu coração.

Aos demais familiares, pelo carinho e orações.

À professora, orientadora e amiga Dra. Marcia Damianovic, por todo apoio, pelas palavras de carinho, esperança e preocupações nos dias difíceis. Você é um exemplo de profissional e ser humano, sem dúvida.

Aos professores e técnicas do LPB, muito obrigado por todo auxílio, conhecimentos compartilhados. Agradecimentos especiais à Valeria del Nery pelas contribuições na qualificação, ao Lucas Fuess (sujaaa!) por toda ajuda nessa quarentena, incluindo a contribuição da sua grande tese que devo ter decorado cada linha de tanto que li, haha! Você é fera, rapaz! E, claro, à Inaê pela amizade e toda ajuda dispensada para a finalização deste trabalho.

Às amigas: Camis (meu borzaum), Paty (Patriciona) e Tais, obrigado por compartilharem momentos incríveis desde 2014, pelos rolês na capital, praias belíssimas (né Dona Patrícia? E nem vou falar desse Carnaval, hein princesa rosa). Amo vocês, gordas (cisco no olho direito)! Camis, obrigado por você existir e por me chamar para ser padrinho do seu casamento, haha! Dani, você já se tornou parte da família agora!

Ao casal de amigos Gabriel e Andreza, por tudo o que vivemos, das alegrias até momentos de tristeza. Gabriel, você é um amigo e tanto, meu querido. Obrigado por ouvir-me e “*be there for me*” naquele laboratório e nos momentos em que precisei de um amigo sincero. Esse casal fará muita falta!

Aos amigos rolezeiros: Alexandre (Xandinho), Ana Paula, Amandinha e Hylma pelo carinho, risadas e essa amizade linda que construímos. Vocês são incríveis!

A todos os amigos e colegas de trabalho. Abraço especial para: Mariê, essa menina gênio de coração gigante, Heitor (amigo querido), Fabrício, Jean, Cris e Paulinha que contribuíram direta ou indiretamente com a realização deste trabalho. Ao Rômulo (bebezinho), pela companhia e amizade (você vai longe, mlk!). Ao Dimas, por toda ajuda e incentivo nos momentos difíceis. Ao Elias e Gabi, pela amizade e conselhos.

À Williane (Willie para alguns, pinscherzinha só pra mim), obrigado por tudo! Saiba que você é um exemplo de profissionalismo e ser humano para mim. Nossos cafés, risadas, passeios e até conversas bobas (com doses de ironia que eu amo, Brasil!) ficarão para sempre comigo.

Ao meu amigo e psicólogo Ediângelo por toda ajuda nessa jornada em São Carlos. Sou muito grato por ouvir-me (porque eu sou chato, haha), por todos os direcionamentos e conversas que tivemos. Você foi essencial (e continuará sendo) em todo meu processo de aprendizado e evolução!

Aos funcionários da Usina São Martinho pelo fornecimento das amostras de vinhaça e lodo. Aos funcionários da limpeza do LPB por manter tudo sempre em ordem e aos guardas-noturnos pela prestação de serviço e por abrirem a porta pra mim na madrugada quando eu esquecia o cartão, haha.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ) pelo fornecimento da bolsa de estudos.

À Universidade do Sagrado Coração pela formação de qualidade no curso de Engenharia Química.

A todos que estiveram presentes na minha trajetória e na elaboração deste estudo, meus sinceros agradecimentos.

“Neste cenário de tristeza e caos mundial,
reforço aqui meus desejos mais sinceros de paz
aos corações que choram, esperança aos que
ainda sorriem, luz às mentes ignorantes e amor
aos corações cruéis.” (Autoria própria)

RESUMO

BORGES, A.V. Codigestão mesofílica de vinhaça de cana-de-açúcar e glicerol destilado em reator de leito fixo estruturado. 2020. 137 p. Dissertação (Mestrado) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2020.

Os combustíveis fósseis constituem a principal fonte de energia nos dias atuais, ocupando 81% da demanda mundial de energia, segundo dados da Agência Internacional de Energia para 2016. Apesar de sua notável influência no crescimento socioeconômico das nações, os combustíveis fósseis apresentam inconvenientes, como a disponibilidade limitada na natureza e implicações ambientais inerentes ao seu uso, como a geração de resíduos tóxicos, sobretudo a emissão de gases de efeito estufa (GEE) nocivos ao ser humano e à natureza. Diante destas limitações, são fundamentais os estudos acerca da viabilidade de fontes alternativas e sustentáveis de energia a fim de reduzir a dependência dos combustíveis fósseis. A compreensão das tecnologias de codigestão a partir dos resíduos de biocombustíveis, como a vinhaça e o glicerol, constitui um passo importante na busca por melhorias nas condições operacionais dos sistemas anaeróbios, potencializando a recuperação energética na forma de biogás. Nesse sentido, o uso de glicerol em codigestão mesofílica com a vinhaça com vistas à produção de bioenergia se apresenta como uma alternativa interessante para incrementar o conteúdo orgânico do sistema, dado o seu volume de produção excedente e saturação no mercado quanto às suas aplicações. Ante o exposto, o presente estudo propôs avaliar as condições operacionais e a produção de metano a partir da codigestão mesofílica da vinhaça de cana-de-açúcar e glicerol destilado em reator de leito fixo estruturado (AnSTBR). O estudo experimental foi conduzido em duas etapas principais. A primeira etapa iniciou com a operação de reatores em regime de batelada, com enfoque na determinação da produção de metano a partir de variações na DQO afluente. A segunda etapa propôs o sistema de codigestão mesofílica da vinhaça e glicerol em reator AnSTBR, adotando-se a estratégia de aumento progressivo de carga orgânica até $5 \text{ kg.m}^{-3}.\text{d}^{-1}$ associada à eficiência de conversão de matéria orgânica da ordem de 70%, com vistas à produção de metano. Nos reatores em batelada, a proporção 70% glicerol e 30% vinhaça contribuiu para o aumento da velocidade de produção de metano em 95% em relação à monodigestão da vinhaça. O maior rendimento de metano foi observado na proporção 50% vinhaça e 50% glicerol, com valor médio de $352 \pm 17 \text{ mLCH}_4.\text{g}^{-1}\text{DQOr}$ e eficiência de remoção de DQO de 97%, o que motivou a manutenção da referida proporção na operação do reator contínuo. A operação do reator AnSTBR registrou maior rendimento médio e produção volumétrica de metano na COVa de $3,5 \text{ kgDQO.m}^{-3}.\text{d}^{-1}$, com valores de $210 \pm 31 \text{ mL.g}^{-1}\text{DQOr}$ e $668 \pm 73 \text{ mL.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$, respectivamente. As eficiências médias para a remoção de DQO, carboidratos totais e glicerol ao longo dos 105 dias de operação foram de $77,1 \pm 5,4\%$, $81,9 \pm 7,7\%$ e $99,7 \pm 0,6\%$, corroborando o desempenho satisfatório do sistema de codigestão anaeróbia a partir dos cossustratos testados. A partida lenta do reator foi necessária frente à elevada taxa de acidificação dos cossustratos utilizados, em especial do glicerol. O aumento na concentração de propionato com o incremento de COVa reforça a necessidade de alterações lentas de carga orgânica, buscando-se a manutenção da codigestão anaeróbia.

Palavras-chave: AnSTBR. Biocombustíveis. Codigestão de resíduos. Recuperação energética.

ABSTRACT

BORGES, A.V. Mesophilic codigestion of sugarcane vinasse and distilled glycerol in a structured-bed reactor. 2020. 137 p. Dissertação (Mestrado) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2020.

Fossil fuels are the main source of energy in today's society, accounting for 81% of the total energy demand worldwide, according to 2016 International Energy Agency data. Despite its notable influence on the socioeconomic growth of nations, fossil fuels still present drawbacks, such as limited availability in nature and environmental implications concerning their use, such as the generation of toxic waste, especially the emission of greenhouse gases, harmful to humans and nature. Faced with these limitations, studies on the feasibility of alternative and sustainable sources of energy are essential to reduce reliance on fossil fuels. The understanding of codigestion technologies from residues of biofuels, such as vinasse and glycerol, is an important step in the search for improvements in the operational conditions of anaerobic systems, potentializing the energy recovery in the form of biogas. Given the above, the use of glycerol in mesophilic codigestion with vinasse, aiming at producing bioenergy, presents itself as an interesting alternative to increase the organic content of the system, given its surplus production volume and saturation in the market. Thus, the present study proposed to evaluate the operational conditions and production of methane from the mesophilic codigestion of sugarcane vinasse and distilled glycerol in a structured-bed reactor. The experimental study was conducted in two main stages. The first stage started with the operation of batch reactors, with a main focus on determining methane production from variations in COD proportions. The second stage includes the mesophilic codigestion of vinasse and glycerol itself in an AnSTBR reactor, applying the strategy of increasing organic load from 0,5 up to 5 kg.m⁻³.d⁻¹, associated with the conversion efficiency of organic matter up to 70%. In batch reactors, the flasks fed with 70% glycerol and 30% vinasse contributed to an increase in the speed of methane production by 95% compared to the monodigestion of vinasse. The highest methane yield was observed in the flasks fed with 50% vinasse and 50% glycerol, with an average value of 352 ± 17 mLCH₄.g⁻¹COD_r and COD removal efficiency of 97%, which motivated the use of this proportion for the AnSTBR operation. The operation of the AnSTBR showed higher average yield and volumetric methane production during OLR of 3.5 kgCOD.m⁻³.d⁻¹, with average values of 210 ± 31 mL.g⁻¹COD_r and 668 ± 73 mL.L⁻¹.d⁻¹, respectively. The average efficiencies for the removal of COD, total carbohydrates, and glycerol over the 105 days of operation were 77.1 ± 5.4%, 81,9 ± 7.7% and 99.7 ± 0.6%, corroborating the satisfactory performance of the anaerobic codigestion system based on the applied co-substrates. The slow start up of the reactor was necessary based on the high acidification rate of both co-substrates used, especially glycerol. The increase in the concentration of propionate with the increase in OLRs reinforces the need for slow changes in organic load, seeking to maintain the anaerobic codigestion working properly.

Keywords: AnSTBR. Biofuels. Waste codigestion. Energy recovery.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Diagrama do processo convencional da produção de açúcar e etanol.....	35
Figura 2 - Transesterificação dos triglicerídeos com álcool.....	40
Figura 3 - Processo industrial para a purificação do glicerol bruto.....	42
Figura 4 - Vias metabólicas do glicerol bruto.....	48
Figura 5 - Ensaio em batelada aplicando-se diferentes concentrações de DQO dos cossustratos.....	57
Figura 6 - Condições adicionais para a determinação da produção de metano.....	58
Figura 7 - Desenho esquemático do reator de leito fixo estruturado.....	62
Figura 8.a - Monitoramento da corrente gasosa em termos de produção acumulada de metano.....	81
Figura 8.b - Monitoramento da corrente gasosa em termos de velocidade de produção de metano em função do tempo.....	81
Figura 9 - Produção de metano nos reatores alimentados com glicerol, sob diferentes condições nutricionais.....	86
Figura 10 - Produção acumulada de metano após substituição da vinhaça por glicerol.....	89
Figura 11 - Produção acumulada de metano após substituição do glicerol por vinhaça.....	90
Figura 12.a - Monitoramento da fase líquida do reator metanogênico (AnSTBR): pH afluente e efluente.....	95
Figura 12.b - Monitoramento da fase líquida do reator metanogênico (AnSTBR): alcalinidade parcial (AP)	95
Figura 12.c - Monitoramento da fase líquida do reator metanogênico (AnSTBR): razão intermediária/alcalinidade parcial (AI/AP).....	95
Figura 13 - Produção de ácidos voláteis totais (AVT) em função do tempo.....	96
Figura 14.a - Perfil temporal para remoção de matéria orgânica para as diferentes COVa no reator.....	97
Figura 4.b - Perfil temporal para eficiência de remoção de DQO bruta e solúvel.....	97
Figura 15.a - Monitoramento do reator quanto à remoção de carboidratos totais no reator.....	100

Figura 15.b - Monitoramento do reator quanto ao consumo de glicerol em função da COVa..	100
Figura 16 - Concentração de sulfato nas amostras líquidas ao longo da operação.....	101
Figura 17 - Composição do biogás no reator AnSTBR.....	102
Figura 18.a - Resultados observados para a vazão de biogás (VBG).....	104
Figura 18.b - Resultados observados para a vazão molar de metano (VMM).....	104
Figura 18.c - Resultados observados para a produção volumétrica de metano (PVM)	104
Figura 18.d - Resultados observados para o rendimento de metano (MY).....	104
Figura 19.a - Monitoramento dos metabólitos solúveis na corrente efluente, quanto à concentração de metabólitos.....	107
Figura 19.b - Monitoramento dos metabólitos solúveis na corrente afluenta quanto à distribuição de metabólitos.....	107
Figura 20 - Perfil temporal para a concentração de SSV afluenta e efluente.....	110
Figura 21 - Aspecto físico do reator na maior COVa ao sistema de codigestão.....	111
Figura 22 - Retenção de biomassa ao longo do tempo.....	113
Figura 23 - Perfil temporal da COVe em função do aumento de COVa.....	115
Figura 24 - Influência da COVe no rendimento de metano.....	116
Figura 25 - Balanço de massa da fase solúvel da corrente efluente ao reator AnSTBR.....	117
Figura 26 - Balanço de massa global para o sistema de codigestão.....	118

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Composição da vinhaça a partir do etanol de primeira geração em diferentes tipos de mosto	37
Tabela 2 - Principais características físico-químicas do glicerol bruto.....	41
Tabela 3 - Produção de metano em reatores de leito fixo a partir de diferentes temperaturas e substratos.....	46
Tabela 4 - Caracterização físico-química da vinhaça bruta utilizada na alimentação dos reatores biológicos	55
Tabela 5 - Solução de macronutrientes utilizada nos reatores em batelada.....	60
Tabela 6 - Condições operacionais aplicadas no reator AnSTBR de fase única.....	63
Tabela 7 - Frequência dos métodos analíticos para o monitoramento do reator AnSTBR	65
Tabela 8 - Equações para o monitoramento das variáveis-resposta dos reatores em batelada e AnSTBR.....	66
Tabela 9 - Fatores de equivalência para a determinação dos balanços de massa para o sistema de codigestão.....	73
Tabela 10 - Dados experimentais de matéria orgânica e sulfato nos frascos reatores.....	75
Tabela 11 - Resultados do modelo cinético de produção de biogás.....	82
Tabela 12 - Dados referentes ao monitoramento do reator AnSTBR, em termos de estabilidade operacional, remoção de matéria orgânica e produção de metano.....	93
Tabela 13 - Ajustes de alcalinidade e remoção de matéria orgânica em sistemas anaeróbios operados com vinhaça e/ou glicerol.....	98
Tabela 14 - Concentrações médias dos metabólitos solúveis nas correntes afluentes e efluente.....	109
Tabela 15 - Produção e retenção de biomassa ao longo da operação do reator AnSTBR.....	112

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A/M: relação alimento/microrganismo

ADP: adenosina difosfato

AGL: ácidos graxos livres

AGV: ácidos graxos voláteis

AI/AP: relação alcalinidade intermediária/alcalinidade parcial

AI: alcalinidade intermediária

AME: atividade metanogênica específica

ANP: Associação Nacional de Petróleo, Gás e Combustível

AnSBBR: *anaerobic sequencing batch reactor* (reator anaeróbio em bateladas sequenciais)

AOV: ácidos orgânicos voláteis

AP: alcalinidade parcial

APBR: *anaerobic packed-bed reactor* (reator anaeróbio de leito empacotado)

APHA: *American Public Health Association* (Associação americana de saúde pública)

AnSTBR: *anaerobic structured-bed reactor* (reator de leito fixo estruturado)

ATP: adenosina trifosfato

AVT: ácidos voláteis totais

AWWA: *American Water Works Association* (Associação Americana de Serviços de Água)

BMFS: balanço de massa para a fase solúvel

BMG: balanço de massa global

BRS: bactérias redutoras de sulfato

CAGED: Cadastro Geral de Empregados e Desempregados

CAPEX: *Capital Expenditure* (Despesas de Capitais)

CETESB: Companhia Ambiental do Estado de São Paulo

CH: carboidratos totais

CND: Contribuições Nacionalmente Determinadas

CNTP: condições normais de temperatura e pressão

CONAB: Companhia Nacional de Abastecimento

COV_a: carga orgânica volumétrica

COV_e: carga orgânica volumétrica específica

CSTR: *continuously stirred-tank reactor* (reator anaeróbio continuamente agitado)

DBO₅: demanda biológica de oxigênio após 5 dias

DQO: demanda química de oxigênio

EAA: espectrometria de absorção atômica

EESC: Escola de Engenharia de São Carlos

EPE: Empresa de Pesquisa Energética

ETE: estação de tratamento de esgoto

EUA: Estados Unidos da América

FAN: *free ammonia nitrogen* (Nitrogênio amoniacal livre)

GC: *gas chromatography* (cromatografia gasosa)

GEE: gases de efeito estufa

GL: glicerol livre

GT: glicerol total

HP: *high-performance* (alta performance)

LPB: Laboratório de Processos Biológicos

Ltda: limitada

MINTER: Ministério do Interior

MME: Ministério de Minas e Energia

MO: matéria orgânica

MTE: Ministério do Trabalho e Emprego

MY: *methane yield* (rendimento de metano)

NAD: dinucleotídeo de nicotinamida e adenina

ND: não disponível

NTK: nitrogênio total Kjeldahl

OPEX: *Operational Expenditure* (Despesas Operacionais)

PABR: *periodic anaerobic baffled* (reator anaeróbio compartimentado periódico)

pH: potencial hidrogeniônico

PIB: produto interno bruto

PM: produção de metano

PNPB: Programa Nacional de Produção e Uso do Biodiesel

PRO-ÁLCOOL: Programa Nacional do Alcool

PVM: produção volumétrica de metano

RAIS: Relação Anual de Informações Sociais

RFA: *Renewable Fuels Association* (Associação de Combustíveis Renováveis)

SMP: *soluble microbial products* (produtos microbianos solúveis)

SSF: sólidos suspensos fixos

SST: sólidos suspensos totais

SSV: sólidos suspensos voláteis

T: temperatura

TAN: *total ammonia nitrogen* (nitrogênio amoniacal total)

TCD: *thermal conductivity detector* (detector de condutividade térmica)

TDH: tempo de detenção hidráulico

TRB: taxa de retenção de biomassa

UASB: *upflow anaerobic sludge blanket reactor* (reator anaeróbio de fluxo ascendente e manta de lodo)

UNICA: União da Indústria de Cana de Açúcar

USP: Universidade de São Paulo

VBG: vazão de biogás

VMM: vazão molar de metano

Vr: volume do reator

WEF: *Water Environment Federation* (Federação Ambiental de Águas)

LISTA DE SÍMBOLOS

NO₃⁻: nitrato

NO₂⁻: nitrito

K⁺: potássio

Ca⁺²: cálcio

Mg⁺: magnésio

Fe: ferro

g: gramas

C₃H₅(OH)₃: glicerol bruto

Pa.s⁻: pascal por segundo

H₂O: água

Et-OH: etanol

m³: metros cúbicos

CH₄: metano

CO₂: dióxido de carbono

H₂: hidrogênio

H₂S: sulfeto de hidrogênio

HS⁻: íon sulfeto

N₂: nitrogênio

DQO:N:P: relação DQO, nitrogênio e fósforo

DQO/SO₄⁻²: relação DQO e sulfato

ERSO₄⁻²: eficiência de remoção de sulfato

ERCH: eficiência de remoção de carboidratos totais

ERG: eficiência de remoção de glicerol

d: dias

kg: quilogramas

Cl⁻: cloro

PO₄⁻³: fosfato

P₂O₅: fórmula empírica para o pentóxido de fósforo

SO₄⁻²: sulfato

°C: grau Celsius

L: litro

ha: hectare

O₂: oxigênio

CaCO₃: carbonato de cálcio

NaHCO₃ : bicarbonato de sódio

μm: micrômetro

nm: nanômetro

Cd: cádmio

Co: cobalto

Cr: cromo

Cu: cobre

Mn: manganês

Na: sódio

Ni: níquel

Pb: chumbo

Zn: zinco

R: constante dos gases

mbar: milibar

mol.L⁻¹: concentração molar

ΔP: variação de pressão

P: pressão atmosférica

V: volume

v/v: volume/volume

K₂O: óxido de potássio

rpm: rotação por minuto

min: minuto

h: hora

nº: número

K₂HPO₄.3H₂O: fosfato dipotássico hidratado

C₂H₄O₂: ácido acético

C₃H₆O₂: ácido propiônico

C₄H₈O₂: ácido butírico

C₅H₁₀O₂: ácido valérico

C₂H₆O: etanol

C₁₂H₂₂O₁₂: sacarose

C₅H₇O₂N: componente elementar de uma célula

%CH₄: fração de metano no biogás

NmL: volume normal (nas condições de CNTP)

X₀: quantidade de biomassa aderida na espuma, no t=0

Xa: quantidade de biomassa aderida
Xd: quantidade total de biomassa descartada (descartes de fundo)
Xe: quantidade total de biomassa lavada (descartada naturalmente)
Xn: quantidade de biomassa acumulada no tempo “n”
Xn-1: quantidade de biomassa acumulada no tempo “n – 1”
Xs: quantidade de biomassa suspensa
Xt: quantidade total de biomassa produzida
Y_{X/S}: coeficiente de rendimento celular
SDQO: massa total de DQO consumida
DQO_{CARBOIDRATOS}: fração da DQO referente aos carboidratos totais
DQO_{METABÓLITOS}: fração da DQO referente aos metabólitos
DQO_{GLICEROL}: fração da DQO referente ao glicerol
SSVe: sólidos suspensos voláteis no efluente
SSVf: sólidos suspensos voláteis no final da operação
SSVi: sólidos suspensos voláteis no início da operação
Xgás: fração molar do gás
Q_{af}: vazão afluenta
DBO_r: DBO removida
DQO_{af}: DQO afluenta
DQO_{ef}: DQO efluente
ERDQOt: eficiência de remoção de DQO total ou bruta
DQO_s: DQO solúvel
ERDQOs: eficiência de remoção de DQO solúvel
DQO_t: DQO total
HAc: ácido acético
HPr: ácido propiônico
HBu: ácido butírico
HVa: ácido valérico
DQO_{ad}: DQO adicionada
A: produção máxima acumulada de metano
k: fase de latência (lag)
Xc: velocidade de produção de metano
α : razão entre os dados experimentais e teóricos
mgCaCO₃.L⁻¹: miligramas de carbonato de cálcio por litro

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	27
2	OBJETIVOS	29
2.1	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	29
3	REVISÃO DE LITERATURA	31
3.1	MATRIZ ENERGÉTICA E O CENÁRIO DOS BIOCOMBUSTÍVEIS	31
3.2	INDÚSTRIA SUCROALCOOLEIRA: ORIGEM E PERSPECTIVAS	32
3.2.1	Processo Produtivo do Açúcar e Etanol	33
3.2.2	Caracterização da Vinhaça de Destilaria	36
3.2.3	Legislação Aplicável à Vinhaça	38
3.3	GLICEROL: CARACTERÍSTICAS, PROCESSO PRODUTIVO E APLICAÇÕES	39
3.4	FUNDAMENTOS DA DIGESTÃO ANAERÓBIA	43
3.4.1	Biodigestão Anaeróbia da Vinhaça	44
3.4.2	Biodigestão Anaeróbia do Glicerol	47
3.4.3	Codigestão Anaeróbia	51
3.5	CONSIDERAÇÕES FINAIS – REVISÃO DE LITERATURA	53
4	MATERIAL E MÉTODOS	54
4.1	CARACTERIZAÇÃO DAS AMOSTRAS DE VINHAÇA	54
4.2	GLICEROL	56
4.3	APLICAÇÃO DA CODIGESTÃO ANAERÓBIA EM REGIME DE BATELADA: INÓCULO, MEIO NUTRICIONAL E CONDIÇÕES OPERACIONAIS	56
4.3.1	Inóculo	56
4.3.2	Ensaio em Batelada	57
4.3.3	Meio Nutricional	60
4.3.4	Cinética de Produção de Metano	61
4.4	SISTEMA DE FASE ÚNICA: REATOR AnSTBR	61

4.5	APLICAÇÃO DA METODOLOGIA ANALÍTICA-----	63
4.6	BALANÇO DE BIOMASSA -----	68
4.6.1	Produção Estimada de Biomassa no Reator – Cálculo da Carga Orgânica Volumétrica Específica (COVe)-----	69
4.7	CÁLCULO DO BALANÇO DE MASSA PARA O REATOR AnSTBR-----	71
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO-----	74
5.1	AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE METANO COM O DECRÉSCIMO DA PROPORÇÃO DE VINHAÇA: ESTUDO DOS PARÂMETROS CINÉTICOS.-----	76
5.2	INFLUÊNCIA DOS MACRONUTRIENTES NA BIODIGESTÃO DO GLICEROL-----	84
5.3	AVALIAÇÃO DA RESILIÊNCIA DA BIOMASSA NA PRODUÇÃO DE METANO -----	89
5.4	CONSIDERAÇÕES FINAIS – ENSAIOS EM BATELADA-----	92
5.5	DESEMPENHO DO REATOR AnSTBR: MONITORAMENTO DAS CORRENTES LÍQUIDA E GASOSA -----	92
5.5.1	Fase líquida: Estabilidade Operacional e Remoção de Compostos Orgânicos -----	92
5.5.2	Fase gasosa: Desempenho do AnSTBR na Produção e Rendimento de Metano -----	101
5.5.3	Avaliação dos Metabólitos Solúveis no Sistema de Codigestão-----	106
5.6	PRODUÇÃO E RETENÇÃO DE BIOMASSA: APLICAÇÃO DA CARGA ORGÂNICA VOLUMÉTRICA ESPECÍFICA (COVe) -----	110
5.7	BALANÇO DE MASSA PARA O REATOR AnSTBR -----	117
6	CONCLUSÃO-----	120
7	RERERÊNCIAS -----	122

1 INTRODUÇÃO

Ao florescer da Revolução Industrial, sociedades inteiras tiveram sua cultura material modificada associada às mudanças no tipo e fonte de energia disponíveis para atender às necessidades humanas de nutrição e trabalho. Com o tempo, vilarejos pequenos deram lugar às sociedades complexas, acentuando-se o fenômeno de crescimento populacional, elevação nos níveis de consumo e a crescente demanda por energia. Neste cenário de crescimento econômico, o uso dos combustíveis fósseis se intensificou ao longo das décadas, trazendo consigo demasiada insegurança energética pela finitude de seus recursos e impactos ambientais diversos, como a emissão de GEE por meio de sua queima (WRIGLEY, 2013; GRASSI; PEREIRA, 2019).

Todavia, não foi apenas o desenvolvimento econômico-social que se intensificou com o passar das gerações; as preocupações ambientais com a premissa de um futuro com “baixo carbono” têm ganhado expressiva notoriedade nas sociedades. Esforços legais, nacionais e internacionais têm reunido as nações do mundo na busca por alternativas sustentáveis de energia aliadas ao progresso econômico. Como ponto de partida para muitos destes esforços, surge o compromisso firmado entre os países com a redução de gases nocivos a partir da diversificação de suas matrizes energéticas atuais por fontes alternativas de energia limpa. Hoje, os investimentos na produção de biocombustíveis, como o etanol e o biodiesel, despontam como uma das alternativas ao uso dos combustíveis fósseis, constituindo uma realidade no quadro energético mundial e, em especial, no panorama brasileiro, dada a quantidade de resíduos de biomassa gerada no país (BRAGA; BRAGA, 2012).

No período recente, o Brasil se destaca como líder mundial na produção de etanol a partir da cana-de-açúcar, representando 18% do total dos recursos renováveis de energia que compõem a matriz energética brasileira (CONAB, 2019). Em paralelo, o país ocupa a segunda posição mundial em produção e consumo de biodiesel, tendo a soja como matéria-prima responsável por 64,8% da produção nacional (VIEGAS; ARANTES, 2018). Apesar do cenário otimista que acompanha as mudanças no setor sucroenergético brasileiro, estudiosos alertam sobre as preocupações com a disposição adequada dos subprodutos gerados nos processos produtivos do álcool e biodiesel — a vinhaça e o glicerol, respectivamente.

A vinhaça de cana-de-açúcar constitui o principal resíduo proveniente da fermentação e destilação do bioetanol, com produção volumétrica estimada em 13 litros para cada litro do

biocombustível produzido nas destilarias (HOARAU et al., 2018) Em termos gerais, esse composto rico em matéria orgânica apresenta potencial tóxico quando disposto no meio ambiente sem tratamento adequado, causando impactos ambientais significativos nos ambientes aquáticos, como a anoxia e a eutrofização; e ambientes terrestres, como a salinização e acidificação do solo e águas subterrâneas, além da contaminação destes por metais tóxicos (FUESS; GARCIA, 2014).

O glicerol compreende o principal subproduto da cadeia produtiva do biodiesel, com potencial para geração de energia graças à presença de compostos orgânicos prontamente biodegradáveis. Devido à sua elevada carga orgânica, a disposição do glicerol nos corpos hídricos pode comprometer a vida aquática, e sua queima é capaz de liberar substâncias nocivas e carcinogênicas, como a acroleína (PEITER et al., 2016). Apesar do elevado volume de produção do glicerol, a demanda atual de mercado pelo subproduto ainda é insuficiente, e a ineficiência dos dispositivos legais que regulam a disposição final do glicerol intensificam os impactos nocivos à natureza (TACONI; VENKATARAMANAN; JOHNSON, 2009; CIRIMINNA et al., 2014).

A codigestão anaeróbia de águas residuárias com elevado teor de matéria orgânica constitui uma alternativa promissora no setor de biocombustíveis, permitindo o aproveitamento de subprodutos altamente energéticos, como a vinhaça e o glicerol, para a geração de biogás. Em linhas gerais, o processo de codigestão propõe melhorias no balanço nutricional dos cossustratos envolvidos, na diluição de componentes tóxicos e, sobretudo, na possibilidade de recuperação energética com o aumento na produção volumétrica e rendimento de metano (ESPOSITO et al., 2012).

Ante o exposto e a escassa literatura no estudo da codigestão de resíduos do setor de biocombustíveis, o presente trabalho tem como objetivo propor a codigestão mesofílica da vinhaça de cana-de-açúcar e glicerol destilado, buscando-se avaliar o desempenho operacional do reator de leito fixo estruturado (AnSTBR) nas condições operacionais previamente determinadas em reatores em batelada, com vistas ao monitoramento da remoção de matéria orgânica e produção de biogás, na forma de metano.

2 OBJETIVOS

O presente trabalho tem como objetivo geral avaliar o desempenho operacional do reator de leito fixo estruturado no tratamento da vinhaça de cana-de-açúcar em codigestão mesofílica com glicerol destilado, com vistas à produção de metano.

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

A fim de alcançar o objetivo geral deste trabalho, destacam-se os seguintes objetivos específicos:

- a) Avaliar por meio de ensaios em batelada a proporção de DQO afluyente dos cossustratos vinhaça e glicerol que forneça a maior produção volumétrica e rendimento de metano;
- b) Avaliar a resiliência da biomassa na manutenção da produção de metano e estabilidade do sistema frente à substituição dos cossustratos nos frascos reatores operados em regime de batelada, simulando período de entressafra de cana-de-açúcar;
- c) Monitorar e analisar o desempenho do reator AnSTBR em termos de remoção de matéria orgânica e produção de metano, a partir da estratégia de aumento progressivo de carga orgânica volumétrica no sistema de codigestão;
- d) Avaliar a evolução da relação alimento/microrganismo na operação do reator AnSTBR mediante a determinação da carga orgânica volumétrica específica.

3 REVISÃO DE LITERATURA

Esta revisão bibliográfica prevê discorrer sobre o processo produtivo do etanol e do biodiesel, com maior detalhamento nos resíduos de suas cadeias produtivas, a vinhaça e o glicerol, respectivamente, caracterizados como subprodutos. O estudo privilegia as tecnologias de digestão anaeróbia e codigestão destes compostos altamente energéticos, buscando-se valorizar os subprodutos do setor de biocombustíveis.

3.1 MATRIZ ENERGÉTICA E O CENÁRIO DOS BIOCOMBUSTÍVEIS

Nas últimas décadas, diante da ameaça ambiental que os combustíveis fósseis oferecem à natureza e aos seres que nela habitam, diversos países têm reunido esforços por meio de ações políticas e ambientais na busca por expandir as fontes renováveis de energia de suas matrizes energéticas. Para reduzir a dependência dos combustíveis fósseis e a emissão de GEE, os biocombustíveis surgiram como uma alternativa mais sustentável em termos de processo produtivo ao promover uma combustão mais limpa e viabilizar a captura de dióxido de carbono na atmosfera por meio de processos fotossintetizantes envolvidos no plantio da biomassa (DEMIRBAS, 2009; CRUZ-SALOMÓN et al., 2017).

No Brasil, as fontes renováveis de energia compõem 42% da sua matriz energética (MaCZYŃSKA et al., 2019). Até 2030, o país assumiu o compromisso de ampliar este percentual para 45%, conforme as chamadas Contribuições Nacionalmente Determinadas (CND), propostas no Acordo de Paris, em 2016 (BENITES-LAZARO; MELLO-THÉRY; LAHSEN, 2017). Neste cenário, aproximadamente 18% das fontes renováveis do país são provenientes do cultivo da cana-de-açúcar, cuja produtividade média em 2018/2019 foi de 72.234 kg.ha⁻¹, de acordo com os dados da Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB, 2019).

Em linhas gerais, o Brasil é considerado o segundo maior produtor de bioetanol do mundo, com 26% da produção total mundial em 2017, conforme apontam os dados estatísticos da Renewable Fuels Association (RFA). Ainda de acordo com a associação, os Estados Unidos (EUA), que utilizam o milho como matéria-prima, permanecem na liderança com 58% da produção mundial; contudo, ao considerar a cana-de-açúcar como fonte de matéria-prima, o Brasil lidera o ranking mundial de produção do bioetanol, bem como da produção e exportação do açúcar (CRAGO et al., 2010).

Neste cenário de produção sustentável de energia, o Brasil ainda se destaca no panorama mundial do biodiesel, graças à riqueza de espécies vegetais utilizadas na produção do biocombustível (p.ex. amendoim, girassol, soja, mamona, entre outras) aliada à extensa criação de bovinos, dos quais obtém-se a gordura animal. Segundo dados da Agência Nacional de Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis (ANP, 2019), as regiões sul e centro-oeste produziram cerca de 82,5% de todo biodiesel consumido no país em 2018. Com o fenômeno da interiorização da indústria, nos últimos anos, o incremento do uso do biodiesel apresenta potencial para gerar novos empregos, reduzir as disparidades regionais, reduzir as emissões de gases nocivos pelo diesel e fomentar a expansão da capacidade agrícola do país (BRAGA; BRAGA, 2012).

3.2 INDÚSTRIA SUCROALCOOLEIRA: ORIGEM E PERSPECTIVAS

O passado histórico do Brasil revela que a cana-de-açúcar desempenhou relevante importância na economia do país desde a chegada dos portugueses no século XVI. Considerada um dos principais produtos agrícolas brasileiros, a cana-de-açúcar tem sua produção distribuída ao longo das regiões Centro-Sul e Nordeste, com áreas de cultivo e usinas produtoras de açúcar, etanol e bioeletricidade nos estados de São Paulo, cuja área plantada é equivalente a 50,5% da área total, Goiás (11,9%), Minas Gerais (9,4%), Paraná (8,9%), Mato Grosso do Sul (8,3%), Alagoas (2,5%), Mato Grosso (2,4%) e outros estados com área plantada inferior a 2% (CONAB, 2018). Para a região Nordeste, o período de colheita compreende os meses de setembro a abril, ao passo que as demais regiões do país apresentam um calendário de colheita que se estende de maio a novembro.

De acordo com Goes, Marra e Silva (2008), o Brasil é um país que encontra excelentes condições para o cultivo de cana-de-açúcar em virtude de sua extensão territorial e condições climáticas favoráveis ao desenvolvimento da cultura. No entanto, dados recentes do CONAB (2019) apontam percentual de queda de 2,8% na produção de cana-de-açúcar, estimada em 615,84 milhões de toneladas para a safra de 2018/2019 em comparação à safra anterior. A companhia destaca que na região Sudeste, responsável pela maior área de cultivo, as variações de clima afetaram as lavouras, gerando queda na produtividade nacional.

Apesar da produção do etanol ter sido relatada desde os anos 30 no Brasil, foi apenas a partir das tensões político-econômicas que acompanharam a crise do petróleo na década de 70 que a produção do biocombustível foi alavancada (GOLDEMBERG; COELHO;

GUARDABASSI, 2008). Com a instauração do Programa Nacional do Alcool (PRO-ÁLCOOL) em novembro de 1975, o governo brasileiro buscou estimular a produção comercial do etanol e combater os efeitos negativos da importação de grandes quantidades de petróleo ao estabelecer a adição de etanol anidro na gasolina (LOPES et al., 2016). Em 2003, com a introdução dos veículos Flex no mercado nacional, aumentou-se a popularidade do etanol que passou a diversificar a matriz energética brasileira, apresentando-se como alternativa sustentável no conjunto de medidas para minimizar os efeitos das mudanças climáticas globais (FERREIRA; JOAQUIM; HORRIDGE, 2014).

De acordo com o relatório da União da Indústria de Cana de Açúcar (UNICA, 2020), a produção de etanol anidro e hidratado na região centro-sul do Brasil, juntos, atingiram o equivalente a 33,2 bilhões de litros na safra de 2019/2020, incremento de 6,9% em relação à safra de 2018/2019. Ao longo das últimas quatro décadas, a produção do etanol de primeira geração no Brasil se consolidou fortemente, todavia existem oportunidades para o setor em termos de investimentos em pesquisas, desenvolvimento e inovação, a fim de maximizar o retorno financeiro e produtividade dos processos industriais envolvidos (MORAES; ZAIAT; BONOMI, 2015), estabelecer o controle e conservação dos recursos energéticos, prevenir poluição e reduzir custos operacionais (OLIVEIRA; CRUZ; COSTA, 2016).

3.2.1 Processo Produtivo do Açúcar e Etanol

Apesar da grande diversidade dos recursos renováveis já existentes, as necessidades ambientais e econômicas de seus usos têm proporcionado avanços importantes no desenvolvimento de tecnologias utilizadas nos processos de produção do bioetanol. Em síntese, a produção de etanol, independentemente das fontes de matéria-prima, pode ser classificada em termos de dois processos fundamentais: a fermentação dos açúcares e a destilação do álcool remanescente do processo fermentativo (WILKIE; RIEDESEL; OWENS, 2000). Segundo Cortes-Rodríguez et al. (2018), a etapa fermentativa permite a categorização do processo produtivo em três gerações do álcool: a primeira, com a fermentação de açúcares e amidos a partir de matérias-primas distintas (p. ex. milho, cana, beterraba, dentre outras); a segunda, com a fermentação de licores de pentoses e hexoses a partir da hidrólise ácida ou enzimática de material lignocelulósico, como o bagaço; e uma terceira geração baseada na utilização de microalgas.

No Brasil, o processo convencional empregado na produção do etanol se inicia com a limpeza e preparação da cana-de-açúcar para a retirada de material particulado, como poeira, terra, areia e outras impurezas. Em seguida, a cana é cortada em porções menores e direcionada para um eletroímã, responsável pela retirada de materiais ferrosos e outros constituintes metálicos que possam danificar o maquinário. Na etapa de moagem, a cana sofre prensagem nos rolos trituradores, onde 70% de sua massa forma o caldo, e a parcela restante dá origem ao bagaço. Vale ressaltar que o caldo originado ainda apresenta pequenas concentrações de impurezas sólidas, como argila e pedaços de bagaços, requerendo uma etapa de peneiramento da massa líquida e posterior armazenamento em tanques para o depósito de sólidos e formação do caldo clarificado. Ademais, o lodo de fundo formado nos tanques de decantação poderá ser utilizado como complemento dos processos de adubação ou fonte de matéria orgânica (QUINTERO et al., 2008).

Com o objetivo de eliminar as impurezas remanescentes do processo e esterilizar a mistura, o caldo sofre tratamento térmico em sistemas de evaporadores de múltiplo efeito. Já puro e concentrado, o caldo é levado às dornas, tanque onde faz-se a adição do fermento com leveduras, como a *Saccharomyces cerevisiae*, capazes de romper as moléculas de glicose e produzir etanol e gás carbônico por meio da atuação de um complexo de enzimas (VAN MARIS et al., 2006). O processo de fermentação pode ser descrito como uma etapa lenta, na qual ocorre a produção do vinho fermentado, composto formado pela mistura de leveduras, açúcares não fermentáveis e etanol. Para a obtenção do etanol presente no vinho, o líquido é evaporado em colunas de destilação e posteriormente resfriado com água corrente. Assim, obtém-se o álcool hidratado com grau alcoólico equivalente a 93,5%, podendo este ser desidratado para a produção do álcool anidro, conforme ilustra a Figura 1.

A produção de açúcar, por sua vez, dispensa a fermentação do caldo. Uma vez produzido o caldo clarificado de cana, este será conduzido ao tratamento térmico para a remoção de cerca de 75% de água, transformando-o em uma espécie de xarope concentrado. Adiante, o caldo concentrado e cozido será centrifugado e lavado com água quente e vapor para formar o melaço, produto que também poderá ser adicionado ao caldo concentrado, anterior à etapa fermentativa, para a produção do etanol. Após a centrifugação, o açúcar é encaminhado ao processo de secagem para posterior peneiramento e envase (DIAS et al., 2015).

Figura 1 – Diagrama do processo convencional da produção de açúcar e etanol.

Fonte: Adaptado de Moraes, Zaiat e Bonomi (2015).

Em termos gerais, a contribuição do setor sucroenergético para a economia do país é expressiva, com Produto Interno Bruto (PIB) estimado em US\$ 43,36 bilhões, o equivalente a 2% do PIB nacional em 2013, segundo dados da UNICA. Ainda segundo a Empresa de Pesquisa Energética (EPE, 2018) do Ministério de Minas e Energia (MME), os investimentos de capitais (CAPEX) e despesas operacionais e manutenção (OPEX) na cadeia produtiva do álcool serão de R\$ 705 bilhões entre 2018 e 2030, com 96% destinados aos investimentos no etanol de primeira geração. Convém salientar que os benefícios com o setor sucroenergético não se restringem aos aspectos econômicos, mas também assumem importante caráter social com a geração de empregos formais, abrangendo 8% de todos os empregos com carteira assinada no ano de 2017, conforme apontam os dados do Centro de Estudos Avançados em Economia Aplicada (CEPEA, 2018).

Do ponto de vista ambiental, no entanto, é preciso considerar os impactos ambientais gerados na produção do etanol brasileiro do campo ao processo industrial. De um lado o campo, onde se observam os registros da compactação de solos por tratores, a contaminação dos corpos hídricos pelo uso indiscriminado de fertilizantes e agrotóxicos, a poluição do ar pela queima das palhas de cana-de-açúcar e, sobretudo, a aplicação não controlada de seu subproduto principal, a vinhaça. De outro, os impactos gerados pela atividade industrial, com destaque para

os efeitos da poluição do ar por meio da queima do bagaço para a geração de energia elétrica, a liberação de dióxido de carbono na fermentação do açúcar em etanol, e o descarte inadequado das águas de lavagem da cana e equipamentos, bem como das águas residuárias provenientes de condensadores (PUGLIESI; LOURENCETTI, 2017; CHRISTOFOLETTI et al., 2013).

A vinhaça e o bagaço são os principais subprodutos originários do processo produtivo do etanol e, portanto, medidas de controle ambiental devem ser priorizadas a fim de tornar o setor sucroenergético mais sustentável. De modo geral, a vinhaça é um resíduo gerado no processo de fermentação e destilação do álcool que apresenta potencial tóxico e recalcitrante quando disposto no meio ambiente sem tratamento adequado, causando impactos ambientais significativos, como a anoxia, eutrofização e comprometimento da vida aquática. (HOARAU et al., 2018; FERRAZ JUNIOR et al., 2016; CRUZ-SALOMÓN et al., 2017).

3.2.2 Caracterização da Vinhaça de Destilaria

A vinhaça, também nomeada de vinhoto ou restilo, é o principal resíduo líquido proveniente da produção do etanol de primeira geração, podendo ser caracterizado como um efluente que apresenta elevado potencial poluidor e elevada concentração de matéria orgânica e nutrientes, sobretudo potássio, nitrogênio e fósforo (MORAES et al., 2014). O produto derivado da destilação do etanol deixa as colunas de destilação com temperatura aproximada de 85-90°C e com uma produção volumétrica estimada em 13 L para cada litro de etanol produzido (HOARAU et al., 2018; FERRAZ JUNIOR et al., 2016). Ainda de acordo com os autores, as estimativas de crescimento para o bioetanol são promissoras, podendo atingir o total de 134 bilhões de litros em 2024, o que implicaria na produção estimada de 1742 bilhões de litros do subproduto.

Segundo Szmrecsányi (1994), a vinhaça é constituída majoritariamente por água (94%) e sólidos suspensos (6,8%), este último constituído por matéria-orgânica (5,1%) e substâncias minerais diversas, como cálcio, magnésio, fósforo, potássio, sulfato e outros (1,7%), o que classifica o composto como uma cultura rica para os processos biológicos. España-Gamboa et al. (2011) explicam que a variação na quantidade e composição da vinhaça no processo produtivo é influenciada pelo tipo de matéria-prima empregada no processo de fermentação, pelo sistema de destilação e pelas condições operacionais e de processamento referentes à adição de insumos.

A Tabela 1 apresenta a composição da vinhaça oriunda da produção do etanol de primeira geração, segundo os diferentes tipos de mosto.

Tabela 1 – Composição da vinhaça a partir do etanol de primeira geração em diferentes tipos de mosto.

Componente	Melaço	Caldo	Misto	Referência
SO ₄ ⁻² (mg.L ⁻¹)	6400	600 – 760	3700 – 3730	Pugliesi e Lourencetti (2017)
P ₂ O ₅ (mg.L ⁻¹)	100 – 290	10 – 210	9-200	Pugliesi e Lourencetti (2017)
NTK (mg.L ⁻¹)	1610	700	710	Costa et al. (1986)
K ₂ O (mg.L ⁻¹)	3740 – 7830	1200 – 2100	3340 – 4600	Pugliesi e Lourencetti (2017)
Ca ⁺² (mg.L ⁻¹)	450 – 5180	130 – 1540	1330 – 4570	Pugliesi e Lourencetti (2017)
Mg ⁺ (mg.L ⁻¹)	420 – 1520	200 – 490	580 – 700	Pugliesi e Lourencetti (2017)
DQO (mg.L ⁻¹)	77,7	33	45	Costa et al. (1986)
DBO (mg.L ⁻¹)	25	16,5	19,8	Costa et al. (1986)
pH	4,2 – 5,0	3,7 – 4,6	4,4 – 4,6	Costa et al. (1986)

Siglas – Componente: SO₄⁻²: sulfato, P₂O₅: pentóxido de fósforo, NTK: nitrogênio total Kjeldahl, K₂O: óxido de potássio, Ca⁺²: cálcio, Mg⁺²: magnésio, DQO: demanda química de oxigênio, DBO: demanda bioquímica de oxigênio.

Fonte: Elaboração própria.

A concentração elevada de matéria orgânica na vinhaça resulta da presença de: a) açúcares não fermentáveis remanescentes da fermentação; b) compostos orgânicos intermediários, sobretudo os ácidos orgânicos e glicerol; e c) concentrações de etanol não recuperadas no processo de destilação (WILKIE; RIEDESEL; OWENS, 2000; PARNAUDEAU et al., 2008). De acordo com Rodella, Zambello Júnior e Orlando Filho (1983) e Dowd et al. (1994), as principais fontes de carbono solúvel presentes na vinhaça de cana-de-açúcar são, em ordem decrescente de concentração, o ácido láctico (7,74 g.L⁻¹), glicerol (5,86 g.L⁻¹), etanol (3,83 g.L⁻¹) e ácido acético (1,56 g.L⁻¹).

Devido aos processos empregados no preparo da matéria-prima durante a etapa de fermentação, como a adição de ácido sulfúrico, o efluente apresenta características ácidas, com

variações de pH entre 3,5 e 5,0 e valores de DQO entre 15–33 g.L⁻¹ (PRADA; GUEKEZIAN; SUÁREZ-IHA, 1998). Ainda, a presença de melanoidinas, polímeros de alto peso molecular formados pelas reações de Maillard e compostos fenólicos, conferem à vinhaça coloração marrom escura. Em geral, estas substâncias de difícil degradação são descritas como tóxicas aos microrganismos comumente utilizados no tratamento biológico e são capazes de permanecer no solo por longos períodos (FERREIRA et al., 2011; FITZGIBBON et al., 1998).

Embora constitua um resíduo com elevada toxicidade, a presença de compostos orgânicos e nutrientes na vinhaça proveniente do etanol de primeira geração permite o seu emprego como fertilizante orgânico nas culturas de cana-de-açúcar em substituição aos fertilizantes químicos de natureza ainda mais tóxica (BERNAL et al., 2017). Entretanto, quando em elevadas concentrações, uma série de impactos ambientais negativos podem surgir, culminando em condições de salinização do solo e das águas subterrâneas, contaminação com metais tóxicos, como o zinco, cobre e bário, acidificação permanente do solo e o comprometimento da atividade microbiana em função do decréscimo de oxigênio causado pelo entupimento dos poros do solo pelo excesso de carga orgânica (FUESS; GARCIA, 2014).

O despejo da vinhaça nos corpos hídricos, hoje proibido no Brasil, também exerce impactos tóxico e citotóxico potenciais que variam com a concentração do composto. Estudo recente comprova que elevadas concentrações de vinhaça nos corpos d'água promovem a desorganização severa dos tecidos de peixes, conforme apontam testes de histopatologia (MARINHO et al., 2014). A isso, somam-se os efeitos causados pelo aumento da concentração de matéria orgânica nos ambientes terrestres e marinhos, elevando o consumo de oxigênio dissolvido em virtude da proliferação de microrganismos e, portanto, levando à morte de animais aquáticos e espécies vegetais diversas (HOARAU et al., 2018; CHRISTOFOLETTI et al., 2013).

3.2.3 Legislação Aplicável à Vinhaça

Frente aos impactos ambientais supracitados, o extinto Ministério do Interior (MINTER) proibiu o lançamento da vinhaça nos corpos hídricos ao instituir a Portaria 323, em 29/11/78. No Estado de São Paulo, principal produtor de etanol e vinhaça do Brasil, as taxas de aplicação da vinhaça no solo agrícola, incluindo o armazenamento, transporte e análises qualitativas do solo, são reguladas pela Companhia Ambiental do Estado de São Paulo (CETESB) por meio da

norma técnica P4.231, intitulada Vinhaça: Critérios e procedimentos para aplicação no solo agrícola (CETESB, 2015).

Convém salientar que a norma técnica prevê ajustes nas dosagens de vinhaça a partir das necessidades da cultura com relação ao potássio, bem como estabelece a concentração máxima de potássio no solo, considerando sua capacidade de troca catiônica. Entretanto, a legislação estadual parece negligenciar o excesso dos constituintes orgânicos e inorgânicos dispostos na natureza, bem como o impacto na atmosfera em função da emissão de gases nocivos.

3.3 GLICEROL: CARACTERÍSTICAS, PROCESSO PRODUTIVO E APLICAÇÕES

A história do biodiesel tem seu início no final do século XIX, quando Rudolf Diesel e Henry Ford desenvolveram pesquisas em busca de combustíveis capazes de movimentar os motores a diesel a partir de fontes distintas de biomassa (SHAY, 1993). Com o avanço da indústria do petróleo, os caminhos para a produção de biodiesel se tornaram incertos, sendo novamente alavancados em 1937 com a descoberta do processo de transesterificação pelo belga George Chavanne. Chavanne demonstrou que a remoção da glicerina presente nos óleos vegetais produzia um combustível renovável e eficiente para os motores a diesel (DABDOUB; BRONZEL; RAMPIN, 2009). Nascia, assim, os ésteres de óleos vegetais, conhecidos como biodiesel, com a premissa de reduzirem não somente a dependência da importação do diesel, como também a emissão gases nocivos (LEUNG; WU; LEUNG, 2010).

O Brasil desempenha um papel de destaque no panorama mundial do biodiesel graças ao cultivo de diferentes espécies vegetais que podem ser utilizadas como matéria-prima na produção deste biocombustível, como a soja, algodão, girassol, palma, amendoim, mamona, canola, milho, sésamo, de onde extrai-se o óleo vegetal, além de sua extensa criação de bovinos que fornecem a gordura animal (PEITER et al., 2016). Segundo dados do Anuário Estatístico da ANP (2019), dentre a diversidade de óleos vegetais, o óleo de soja representou cerca de 69,8% da produção nacional de biodiesel, com uma produção média de 370 milhões de metros cúbicos em 2018, 20,5% superior em relação à produção de 2017.

De modo geral, o glicerol pode ser produzido por duas vias principais: química ou fermentativa. Tradicionalmente, a produção química do glicerol bruto ocorria por saponificação de óleos e gorduras, obtido como subproduto do processo de fabricação de sabões. Entretanto, a substituição dos sabões por detergentes nas indústrias tornou este processo obsoleto. (REHM, 1988; AGARWAL, 1990). Quimicamente, a produção de glicerol pode ainda ser obtida a partir

da cloração de derivados de petróleo, como o propeno, em altas temperaturas. Embora este processo constitua 12,5% da produção mundial, a formação de radicais livres como intermediários são nocivos ao meio ambiente, tendo sido comumente observada a desativação de unidades produtivas ao longo dos anos. (MOTA et al., 2009). Por via fermentativa, destaca-se a hidrogenação da sacarose sob ação de catalisador em condições severas de temperatura e pressão (de BARROS LOPES et al., 2000), embora o processo de transesterificação tenha ganhado destaque no cenário mundial em virtude da oferta do glicerol oriunda da produção do biodiesel.

O biodiesel é produzido a partir de fontes biológicas renováveis, como os óleos vegetais e a gordura animal, substâncias hidrofóbicas extraídas para a obtenção de óleos brutos ou gordura (ARDI; AROUA; HASHIM, 2015). Estes compostos são constituídos por ácidos graxos, esteroides, água, fosfolipídeos e outras impurezas (MEHER; VIDYASAGAR; NAIK, 2004; LUO et al., 2016). A partir de uma série de reações consecutivas e reversíveis da gordura (ou óleo) com o álcool (p. ex. etanol, metanol e butanol) em um processo denominado transesterificação, os triglicerídeos são convertidos em glicerol, conforme ilustra a Figura 2.

Figura 2 – Transesterificação dos triglicerídeos com álcool.

Fonte: Adaptado de Ma e Hanna (1999).

No final do processo de transesterificação, forma-se uma massa reacional constituída por duas fases, separáveis por centrifugação e/ou decantação: uma fase mais pesada, composta pela glicerina bruta; e outra mais leve, composta por ésteres de ácido graxo. Separadas as fases, o glicerol bruto deixa o processo industrial com cerca de 30% de impurezas, dependentes da natureza da matéria-prima utilizada, de origem vegetal ou animal, e do tipo de catálise empregada no processo (PARENTE, 2003). De modo geral, o glicerol é constituído por ácidos graxos livres (AGL), mono-di e triacilgliceróis, sais, água, catalisadores, biodiesel e álcool, como o metanol tóxico, dificultando sua disposição no meio ambiente (DHABHAI et al., 2016).

A criação de um mercado nacional de biodiesel ocorreu somente em 2004 com o Programa Nacional de Produção do Biodiesel (PNPB). Neste programa, o governo federal buscou implementar e incentivar a produção do biodiesel, a fim de promover a inclusão social e o desenvolvimento regional no país. Todavia, aspectos importantes relacionados à geração de efluentes e resíduos na cadeia produtiva do biodiesel parecem ter sido negligenciados pelo Poder Público ao longo dos anos. No Brasil, não há dispositivos legais acerca da destinação do glicerol, sendo o controle de descarte acompanhado pelas Secretarias Estaduais de Meio Ambiente que, de modo geral, não apresentam legislação específica para a disposição final do glicerol bruto (NOVI et al., 2018). O descarte inadequado do glicerol na natureza pode causar problemas ambientais graves, como o aumento da demanda bioquímica de oxigênio das águas; e sua queima libera compostos cancerígenos, como a acroleína (PEITER et al., 2016).

Monteiro et al. (2018) esclarecem que, para cada metro cúbico de biodiesel produzido, estima-se que 10% deste volume encontra-se na forma de glicerol bruto. Em 2018, a indústria brasileira do biodiesel gerou cerca de 440 mil toneladas do glicerol bruto, segundo dados da ANP (2019), incremento de 17,6% em relação ao ano anterior. Do total produzido, 292 mil toneladas foram destinadas à exportação, 19,4% superior em relação ao ano de 2017.

Dentre as características físico-químicas do glicerol, destacam-se sua baixa volatilidade, alta miscibilidade e viscosidade, poder solvente, solubilidade, biodegradabilidade, higroscopicidade, atoxicidade, atuando como agente adoçante, umectante e emoliente (PRADIMA; KULKARNI; ARCHNA, 2017; CHOL et al., 2018). A Tabela 2 apresenta as principais propriedades físico-químicas do glicerol bruto.

Tabela 2 – Principais características físico-químicas do glicerol bruto.

Descrição	Unidade	Valores	Referências
Fórmula Molecular	–	$C_3H_5(OH)_3$	Dhabhai et al. (2016)
Ponto de fusão	°C	17,9	Zhang (1994)
Ponto de ebulição	°C	290	Kong; Aroua e Daud (2016)
Ponto de fulgor	°C	177	Pradima; Kulkarni e Archna. (2017)
Densidade a 20°C	g.mL ⁻¹	1.044	Siles-López et al. (2009)
Viscosidade	Pa.s ⁻¹	1,5	Pagliariaro e Rossi (2010)
Solubilidade	-	> 10% em (H ₂ O)	Zhang (1994)
DQO	g.L ⁻¹	925 – 1.600	Siles-López et al. (2009)
pH	-	6,5 – 7,5	Siles-López et al. (2009)

Fonte: Elaboração própria.

Pinheiro (2011) explica que existem dois mercados consumidores para o glicerol: o primeiro, representado pela indústria farmacêutica, alimentícia e de cosméticos, demanda o produto com elevado grau de pureza; um segundo mercado utiliza o glicerol bruto ou de baixa pureza para sua transformação em novos produtos e compostos intermediários, como o propeno, propanodiol, etanol, butanol, ácido fórmico, éteres, ácido acrílico, epícloridrina e outros.

O processo de purificação do glicerol bruto constitui umas das medidas estratégicas para a aquisição do produto no mercado mundial, embora o refinamento exija disponibilidade de instalações e custos operacionais envolvidos no processo industrial. Apesar das diferentes aplicações, a demanda atual de mercado por glicerol não supera o volume de produção do coproduto, ainda que purificado (NAKAZAWA et al., 2015; CIRIMINA et al., 2014; TACONI; VENKATARAMANAN; JOHNSON, 2009). A Figura 3 apresenta um desenho esquemático do processo de purificação do glicerol bruto.

Figura 3 – Processo industrial para a purificação do glicerol bruto.

Fonte: Elaboração própria.

A primeira etapa para o refino do glicerol bruto consiste no tratamento físico a partir da filtração ou centrifugação, com o objetivo de remover sólidos grosseiros insolúveis ou precipitados. Em seguida, a água é removida nos evaporadores. A purificação final do glicerol é concluída por destilação a vácuo com injeção de vapor, seguida de branqueamento por carvão ativado. A purificação do glicerol por troca iônica (Figura 3) pode constituir uma alternativa interessante à destilação a vácuo para unidades produtivas menores, utilizando o sistema de troca iônica para remoção de catalisadores e outras impurezas.

Acreditando que a presença de compostos indesejados no glicerol bruto, como certos sais e ácidos graxos, poderia comprometer a biodegradabilidade do sistema de codigestão proposto pela presente pesquisa, bem como o desempenho da atividade metanogênica e, ainda, baseando-se nos desempenhos de rendimento de metano a partir da digestão anaeróbia das frações bruta e destilada do glicerol no trabalho Siles-López et al. (2009) em reatores em batelada, considerou-se a utilização do composto purificado no sistema de codigestão com a vinhaça de cana-de-açúcar no presente estudo.

A fim de mitigar os efeitos da acumulação do glicerol e recuperar sua estabilidade no mercado interno, conclui-se que são fundamentais pesquisas que busquem alternativas para aumentar sua demanda e tornar a produção de biodiesel ainda mais competitiva e sustentável.

3.4 FUNDAMENTOS DA DIGESTÃO ANAERÓBIA

A digestão anaeróbia pode ser descrita como um processo biológico que ocorre em ambientes livres de oxigênio, no qual diversas populações de microrganismos cooperam entre si para desempenhar um sistema estável e autorregulado, capaz de degradar e transformar compostos orgânicos complexos em formas mais facilmente assimiláveis. A conversão de macromoléculas orgânicas exercida pelo sintrofismo entre os microrganismos permite a obtenção de uma mistura gasosa ou biogás, constituído por metano (CH_4), dióxido de carbono (CO_2), hidrogênio (H_2) e sulfeto de hidrogênio (H_2S) (DEUBLEIN; STEINHAUSER, 2011). O elevado potencial energético proveniente dos sistemas de digestão anaeróbia decorre da presença do metano, cujo aproveitamento traz benefícios importantes, como a valorização dos resíduos e o compromisso com a redução do efeito estufa.

Sucintamente, o processo de conversão da matéria orgânica se divide em quatro fases associadas entre si: hidrólise, acidogênese, acetogênese e metanogênese. Nas duas primeiras etapas, as bactérias hidrolíticas fermentativas convertem as macromoléculas (p. ex. carboidratos, lipídeos e proteínas) em compostos de cadeia curta, que terão sua passagem facilitada através da parede celular dos microrganismos, produzindo ácidos orgânicos voláteis (AOV), CO_2 , H_2 e álcoois. Na acetogênese, as bactérias acetogênicas convertem os ácidos orgânicos em ácido acético, CO_2 e H_2 , principais substratos utilizados pelas arqueias metanogênicas na etapa subsequente, a metanogênese. Nesta última etapa, as arqueias metanogênicas hidrogenotróficas utilizam o CO_2 e H_2 para produzir CH_4 , ao passo que as

arqueias metanogênicas acetoclásticas são capazes de produzir o metano a partir do acetato (McCARTY; SMITH, 1986).

Em águas residuárias com elevado teor de sulfato, como ocorre com a vinhaça de cana-de-açúcar, a biodigestão também pode ser estimulada por microrganismos específicos, como as bactérias redutoras de sulfato (BRS), em um processo denominado sulfetogênese. Neste processo biológico, os compostos de enxofre são utilizados como receptores de elétrons para a oxidação dos produtos das fases acidogênica e acetogênica, com formação do sulfeto de hidrogênio (H_2S), componente tóxico aos organismos metanogênicos (VILELA; DAMIANOVIC; FORESTI, 2014; GODOI; DAMIANOVIC; FORESTI, 2015).

Na digestão anaeróbia, as rotas metabólicas que permeiam cada etapa deste processo sofrem influência direta dos fatores ambientais (p. ex. temperatura e pH) e nutricionais (p. ex. metais traços, vitaminas, aminoácidos e relação DQO: N: P) que selecionam os microrganismos atuantes nos reatores anaeróbios. No tocante às condições ambientais, destacam-se quatro faixas de temperatura aplicadas aos processos anaeróbios: psicrofílica ($< 25^{\circ}C$), mesofílica ($25-40^{\circ}C$), termofílica ($50-55^{\circ}C$) e hipertermofílica ($65-80^{\circ}C$). Os sistemas mesofílicos, por sua vez, são amplamente difundidos nas Estações de Tratamento de Esgotos (ETE) em função de sua estabilidade e facilidade operacional (CRAVEIRO; SOARES; SCHMIDELL, 1986).

3.4.1 Biodigestão Anaeróbia da Vinhaça

Entre as tecnologias disponíveis para o tratamento de águas residuárias, a digestão anaeróbia surge como uma alternativa sustentável ao tratamento biológico dos resíduos líquidos que apresentam elevadas concentrações de matéria orgânica, como a vinhaça. Nos processos anaeróbios, as populações microbianas são diversas e complexas, apresentando diferentes velocidades de crescimento celular. Com o desenvolvimento dos reatores anaeróbios de alta taxa nas últimas décadas, tornou-se possível o aumento da retenção da biomassa por meio dos mecanismos de imobilização celular, conferindo maior estabilidade ao processo e melhores eficiências de tratamento (FUESS, 2017).

Diversos reatores de alta taxa são utilizados na biodigestão anaeróbia da vinhaça, com destaques para o reator de fluxo ascendente e manta de lodo (UASB) (ESPAÑA-GAMBOA et al., 2012; ALVES, 2015; BARROS et al., 2017; del NERY et al., 2018), reatores de leito fixo empacotado e estruturado (TOLEDO-CERVANTES et al., 2018; AQUINO et al., 2017; FUESS, 2017) e reatores de leito fluidizado (SIQUEIRA; DAMIANO; SILVA, 2013; RAMOS;

SILVA, 2018). No processo de autoimobilização da biomassa, os reatores UASB apresentam vantagens interessantes com a formação de grânulos facilmente sedimentáveis. Os reatores de leito fixo, por sua vez, oferecem vantagens distintas em relação aos demais reatores anaeróbios, como a simplicidade de construção, rápida partida operacional, maior estabilidade e capacidade de suportar cargas tóxicas elevadas (VAN DEN BERG; KENNEDY; SAMSON, 1985; ACHARYA; MOHANA; MADAMWAR, 2008).

Em termos de construção, os reatores de leito fixo podem apresentar leito reacional empacotado, com a disposição aleatória do meio suporte no reator; ou leito estruturado, cujo suporte de biomassa permanece ordenado, seguindo uma geometria pré-estabelecida. Segundo Fuess (2017), os reatores de leito fixo empacotado apresentam desvantagens consideráveis na biodigestão da vinhaça de cana-de-açúcar, podendo-se citar a formação de caminhos preferenciais e zonas mortas em função do acúmulo de sólidos suspensos, baixa porosidade do leito e limitações nos processos de transferência de massa. Como alternativa, os reatores de leito fixo estruturado apresentam maior taxa de conversão de substrato e maior porosidade do leito, evitando o acúmulo de sólidos.

Van Lier et al. (2015) enunciam que os reatores de leito fixo não exigem longos períodos para a sua partida, uma vez que não requerem a formação de grânulos, como ocorre com os reatores de manta de lodo. A imobilização no material suporte está associada à rapidez na recuperação da atividade metanogênica após períodos de baixa ou nenhuma alimentação do sistema (CHAN et al., 2009; RAJESHWARI et al, 2000). De modo geral, o suporte de biomassa para os reatores de leito fixo pode ser constituído por espumas de poliuretano e polietileno, anéis plásticos e/ou cerâmicos, ou ainda partículas de rochas e carvão ativado. Estes materiais apresentam propriedades específicas, como a existência de elevada superfície específica, rugosidade, molhabilidade e área superficial, o que possibilita o mecanismo de adesão microbiana (RAJESHWARI et al., 2000).

A Tabela 3 apresenta uma compilação de dados acerca do desempenho operacional de reatores de leito fixo, incluindo dados sobre o rendimento de metano (MY), tempo de detenção hidráulica (TDH), eficiência de remoção de DQO (ERDQO) e carga orgânica volumétrica (COVa) em diferentes substratos.

Tabela 3 – Rendimento de metano em reatores de leito fixo a partir de diferentes temperaturas e substratos.

Substrato	Configuração do Reator	Temperatura (°C)	TDH (d)	% ERDQO	COVa (kg.m ⁻³ .d ⁻¹)	MY (m ³ .kg ⁻¹ DQOr)	Referência
Vinhaça de cana	Leito Fixo Empacotado	35	15 – 6	89 – 93	30	1,2 – 3,4	Russo, Sant’anna e de Carvalho Pereira (1985)
Melaço de beterraba**	Leito Fixo Empacotado	37	9,1	70	8	ND*	Athanasopoulos (1987)
Vinhaça de cana	Leito Fixo Empacotado	37	3,3 – 2,5	65,1 – 73,8	9,2 – 20,4	0,21 – 0,29	Bories, Raynal e Bazile (1988)
Melaço de cana	Leito Fixo Empacotado	35	10	78,1	25	0,17	Shrihari e Tare (1989)
Vinhaça de cana	Leito Fixo Empacotado	35	3,6 – 7,7	> 80	1,6 – 36	ND	Thanikal et al. (2007)
Melaço de cana	Leito Fixo Estruturado	55	0,5 – 10	80	1 – 17,5	0,13	Vilela (2017)
Vinhaça de cana	Leito Fixo Estruturado	55	1,5 – 0,75	83,5	15 – 30	0,3	Fuess et al. (2017)

*ND: valor não disponível

** Vinhaças de cana-de-açúcar e beterraba apresentam constituintes semelhantes, logo ambas as matérias-primas foram consideradas.

Fonte: Elaboração própria.

A partir da Tabela 3, destaca-se que apesar dos valores reportados de eficiência de DQO serem superiores a 70% em cargas orgânicas elevadas (COVa acima de $25 \text{ kg.m}^{-3}.\text{d}^{-1}$), a aplicação da biodigestão anaeróbia da vinhaça em plantas de grande porte com TDH da ordem de dias pode inviabilizar o escalonamento dos sistemas, caso a vazão de vinhaça gerada na destilaria seja elevada (FUESS, 2017).

3.4.2 Biodigestão Anaeróbia do Glicerol

Grande parte dos microrganismos é capaz de utilizar o glicerol como fonte de carbono e energia para o seu crescimento celular. Embora o glicerol possa atravessar a membrana celular por difusão simples, quando em baixas concentrações, as células não são capazes de capturá-lo em concentrações suficientes ao seu crescimento. Dessa forma, a assimilação celular do glicerol é favorecida pela difusão facilitada, com evidências de uma proteína facilitadora do transporte que permite a absorção do glicerol, glicina e pequenas moléculas de polihidróxi-álcoois. As vias metabólicas do glicerol que permeiam o processo fermentativo ocorrem por meio de rotas oxidativa e redutiva.

A via oxidativa caracteriza-se pelo processo de desidrogenação ou remoção de átomos de hidrogênio do glicerol, com formação do composto dihidroxiacetona que, ao ser fosforilado, converte-se em ácido pirúvico ou succínico. O piruvato formado poderá ser convertido a diferentes componentes, como o etanol e acetato, enquanto o succinato dará origem ao propionato, conforme mostra a Figura 4. Estas reações de conversão variam com as condições ambientais e são catalisadas por enzimas, levando à formação de diferentes compostos, como o 2,3-butanediol, lactato, acetato, etanol, butírico, formiato, dióxido de carbono e hidrogênio (SILES-LÓPEZ et al., 2009).

Na via redutiva, o glicerol é desidratado e convertido a 3-Hidroxilpropionaldeído por intermédio da coenzima glicerol-desidratase e logo reduzido a 1,3-Propanodiol pela enzima 1,3-propanodiol-desidrogenase (BIEBL et al., 1999).

A biodegradabilidade anaeróbia do glicerol bruto e a máxima produção de metano dependem da natureza do óleo vegetal e do processo de transesterificação utilizado. O composto bruto requer pré-tratamento para a retirada de compostos tóxicos e recalcitrantes, podendo ser acidificado com ácido fosfórico e centrifugado para recuperar o fosfato de potássio insolúvel, passível de ser utilizado em áreas agrícolas como fertilizante; assim como a água e metanol

podem ser removidos por destilação a vácuo para favorecer a produção de metano (VIANA et al., 2011). O glicerol não é apenas barato e abundante: seu maior grau de redução em relação aos açúcares oferece a oportunidade de obter compostos químicos reduzidos, com rendimentos mais elevados em relação àqueles obtidos com açúcares (DHARMADI; MURARKA; GONZALEZ, 2006). A Figura 4 apresenta as duas principais vias metabólicas do glicerol bruto.

Figura 4 – Vias metabólicas do glicerol bruto.

Fonte: Adaptado de Carneiro (2015).

No processo de biodigestão anaeróbia do glicerol bruto, três de seus componentes principais apresentam potencial para inibir a atividade microbiana: ácidos graxos de cadeia longa, cloretos e sulfatos (HULSHOFF Pol et al., 1998; SAWASDEE; HAOSAGUL; PISUTPAISAL, 2019).

A presença de ácidos graxos de cadeia longa no glicerol bruto, apesar de sua elevada biodegradabilidade, pode constituir um importante fator inibitório às bactérias acidogênicas e arqueias metanogênicas (LALMAN; BAGLEY, 2000). Estes compostos de baixa densidade podem permanecer aderidos na parede celular dos microrganismos, ocasionando a flotação da biomassa e sua consequente lavagem do reator. Alguns autores afirmam, ainda, que a camada de ácidos graxos aderida na biomassa pode reduzir o aporte de nutrientes através da membrana, comprometendo a comunidade microbiana (HWU et al., 1998). Contudo, a adição de sais de magnésio, cálcio e bentonita ao glicerol bruto aliada à adaptação gradual da biomassa podem reduzir o efeito tóxico destes compostos ao eliminar as formas livres dos ácidos, tornando-os indisponíveis aos microrganismos (GALBRAITH et al., 1971; ANGELIDAKI; PERTESSEN; AHRING, 1990).

Sulfatos e cloretos são formados na etapa de neutralização da mistura glicerol-biodiesel a partir da adição de ácido clorídrico e sulfúrico, a fim de prevenir a formação de sabão. A presença de sulfato pode inibir as bactérias anaeróbias por meio da competição estabelecida entre as arqueias metanogênicas e as BRS por doadores de elétrons, com perdas na produção de metano em função do favorecimento termodinâmico da via sulfetogênica (VIANA et al., 2012). A elevada concentração de cloretos no glicerol (34 a 46g Cl⁻ por litro de glicerol), requer a diluição do composto e a adaptação da biomassa nestas condições de salinidade, como forma de evitar a plasmólise celular das arqueias metanogênicas (VALLERO; LETTINGA; LENS, 2003).

Como o glicerol é um composto prontamente disponível às bactérias acidogênicas, as etapas limitantes do sistema deverão ser a acetogênese ou metanogênese. Vale ressaltar que durante o processo de digestão anaeróbia do glicerol, grande parte dos ácidos orgânicos formados pela fermentação não podem ser consumidos pelas bactérias acetogênicas e metanogênicas na mesma escala em que são produzidos. Nesse sentido, a produção de ácidos deve ser equilibrada com a presença de alcalinidade, a fim de reduzir os efeitos de inibição da atividade metanogênica e evitar o colapso do reator pelo excesso de ácidos (GAVALA; ANGELIDAKI; AHRING, 2003).

Contrim (2009) avaliou a produção de metano a partir da digestão anaeróbia do glicerol bruto em reator AnSBBR de 5 L de volume útil e COVa entre 0,6 e 3,82 kg.m⁻³.d⁻¹, preenchido com biomassa granular proveniente de reator UASB aplicado no tratamento de água residuária da indústria de processamento de aves. Na COVa de 2,44 kg.m⁻³.d⁻¹, o sistema removeu cerca de 80% da fração de matéria orgânica, alcançando rendimento de metano de 116 mLCH₄.gDQO_{ad}. Com o aumento da COVa para 3,82 kg.m⁻³.d⁻¹, a remoção de matéria orgânica permaneceu em 52%, observando-se aumento de 207 para 336 mgHac.L⁻¹. Embora a concentração de ácidos não seja suficientemente alta para causar inibição da metanogênese, o autor destaca que o intervalo de tempo aplicado às mudanças de carga pode ter contribuído para o desequilíbrio do sistema. Além disso, o autor explica que a formação de biomassa com elevada viscosidade pode ter ocasionado problemas de transferência de massa entre o lodo e o glicerol, favorecendo as condições de desequilíbrio.

Fountoulakis, Petousi e Manios (2010) avaliaram a produção de metano em reatores contínuos, operados a 35°C e pH entre 6,8 e 7,4. Um reator foi alimentado unicamente com lodo de efluente sanitário (lodo primário e lodo biológico proveniente de sistema de lodos ativados), enquanto outro reator foi operado com o acréscimo de glicerol como cossubstrato junto ao lodo. Os resultados revelaram que o reator tratado com adição de glicerol (1% v/v) apresentou aumento de 112,7% na produção diária de metano (2353 ± 94 mLCH₄.d⁻¹). O aumento da COVa do glicerol não alterou negativamente o desempenho do reator, contudo pareceu aumentar a concentração de biomassa ativa (sólidos voláteis) no sistema.

Yang, Tsukahara e Sawayama (2008) avaliaram a produção de metano a partir de água residuária sintética rica em glicerol em reatores de leito fixo empacotado, sob condições mesofílicas (35°C) e termofílicas (55°C). Os resultados demonstraram que a eficiência de remoção de matéria orgânica dissolvida foi maior e mais estável nos reatores termofílicos (86,7%), considerando a COVa máxima de 1,0 kg.m⁻³.d⁻¹. O maior rendimento de metano (MY) foi observado nos reatores termofílicos (450 mL.g⁻¹DQO_{ad}.), com COVa de 0,70 kg.m⁻³.d⁻¹, ao passo que, na mesma carga, os reatores mesofílicos apresentaram rendimento médio de 270 mL.g⁻¹DQO_{ad}, com eficiência média de remoção de DQO de 50,5%.

Apesar de poucos estudos terem sido relatados acerca da biodigestão anaeróbia do glicerol em reatores de leito fixo, a utilização do substrato como fonte de carbono principal ou secundária em reatores contínuos, em escala de bancada, tem se apresentado favorável à produção de biogás (LOVATO et al., 2019; LOVATO et al., 2015).

3.4.3 Codigestão Anaeróbia

Os interesses científicos e comerciais nos processos biológicos de codigestão cresceram ao longo dos últimos anos, conduzidos pelos princípios de segurança energética, recuperação dos recursos energéticos e proteção ambiental. O termo codigestão refere-se à digestão anaeróbia simultânea de dois ou mais substratos orgânicos (XIE et al., 2016). Comparando-se com os processos de digestão, a codigestão apresenta uma série de vantagens ambientais, econômicas e tecnológicas, podendo-se citar a melhora no balanço nutricional e relação C: N, diluição de compostos tóxicos ou inibidores, ajustes de pH, aumento na biodegradabilidade dos compostos, ampliação da diversidade dos microrganismos, melhorias no tempo de fase de latência, no rendimento e cinética de produção de metano (MATA-ALVAREZ, 2011; ESPOSITO et al., 2012).

No processo de codigestão podem ser empregados diferentes cossustratos com o objetivo de aumentar a produção de biogás. Entretanto, mudanças na composição de substratos, inibição por compostos intermediários, carga orgânica volumétrica, tempo de detenção hidráulico, tempo de detenção celular, temperatura e configuração de reatores podem alterar a estrutura dos grupos microbianos, promovendo a instabilidade do sistema e inviabilizando a produção de biogás (XIE et al., 2016; YU; WENSEL, 2013).

A composição e propriedades dos cossustratos são os principais fatores que governam o processo de codigestão anaeróbia. Muitos substratos orgânicos que apresentam dificuldades na disposição final e, ao mesmo tempo, representam fontes de energia em potencial, têm sido objeto de estudos de tratabilidade por meio dos processos de codigestão anaeróbia, como ocorre com a vinhaça de destilaria, glicerol e o soro proveniente das indústrias de queijo, por exemplo (ASTALS; NOLLA-ARDEVOL; MATA-ALVAREZ, 2012; RIAÑO et al., 2011; COMINO; RIGGIO; ROSSO, 2012).

Amon et al. (2006) propuseram o sistema de codigestão mesofílica do glicerol com mistura de silagem de milho (31%), grão de milho (15%) e esterco suíno em reatores anaeróbios em batelada, visando à produção de metano. Para os autores, o incremento de 3% a 6% v/v de glicerol elevou a produção de metano em 22%. Entretanto, para concentrações acima de 8% v/v, o aumento na produção de metano era relativo à digestão do glicerol e não aos componentes da mistura.

Holm-Nielsen et al. (2008) avaliaram o sistema de codigestão em reator anaeróbio semicontínuo tratando resíduos da indústria de alimentos e esterco, suplementado com glicerol puro em condição termofílica. A adição de 5 a 7 g.L⁻¹ de glicerol ao reator, equivalente a 0,4 e 0,5 kgDQO.m⁻³.d⁻¹, foi suficiente para causar desequilíbrio no sistema, culminando na queda de produção de metano. Segundo os autores, o acúmulo de ácidos orgânicos ocorreu em COVa relativamente baixa e, portanto, as condições de desequilíbrio podem estar relacionadas ao curto intervalo de tempo durante o incremento de COVa, dificultando a adaptação da biomassa e o crescimento das arqueias metanogênicas.

Estudo conduzido por Ma et al. (2008) avaliou a codigestão mesofílica do glicerol com água residuária de processamento de batata (reator controle) em dois reatores UASB, com 2,3 L de volume útil cada. Segundo os autores, os melhores resultados frente às condições operacionais testadas ocasionaram aumento de 24% na produção de metano em relação ao reator controle.

Luo et al. (2011) propuseram que a digestão da vinhaça de cana-de-açúcar, glicerol e torta de sementes do biodiesel fosse realizada em sistema anaeróbio de duas etapas, com o reator acidogênico operado com COVa de 97 kgDQO.m⁻³.d⁻¹ e TDH de 1 dia, seguido pelo reator metanogênico com menor COVa (7 kgDQO.m⁻³.d⁻¹) e TDH de 14 dias. Segundo os autores, observou-se aumento de 11% no rendimento energético de metano e hidrogênio em relação ao sistema de estágio único.

Silvestre, Fernández e Bonmati (2015) avaliaram a adição de glicerol bruto (1% v/v) em reatores contínuos de mistura completa alimentados com esgoto sanitário, em condições mesofílica e termofílica, perfazendo um TDH de 20 dias. De acordo com os autores, em temperatura termofílica, observou-se impacto negativo na estabilidade e desempenho do sistema, mesmo em doses muito baixas do composto, em função da rápida produção de ácidos orgânicos, ocasionando dificuldades para controlar a queda de pH. Na condição mesofílica de temperatura houve um aumento de 148% na produção de metano.

Meier et al. (2016) realizaram um estudo do perfil de produção de biogás e metano em dois reatores de escala piloto com alimentação semicontínua de água residuária suína (92,5% v/v), glicerol bruto (4,28% v/v) e vinhaça (3,22% v/v), operados a 35°C (±1°C). Já no segundo dia de operação com a adição dos cossubstratos, glicerol e vinhaça, observou-se aumento na produção de metano, estabilizada em 2.440 mLCH₄.d⁻¹ e 2.776 mLCH₄.d⁻¹ nos

reatores 1 e 2, respectivamente, representando incremento na produção de energia próximo de 60 kJ.d⁻¹.

Sawasdee, Haosagul e Pisutpaisal (2019) avaliaram a produção de metano a partir da codigestão de glicerol bruto e glucose em reatores em batelada, sob condição mesofílica (37°C). Na proporção 1:1 dos cossustratos, em termos de DQO, os autores reportaram produção acumulada de metano e velocidade máxima de produção de 298 mL ± 11 mLCH₄ e 8 mL.h⁻¹, respectivamente.

3.5 CONSIDERAÇÕES FINAIS – REVISÃO DE LITERATURA

Ante as informações até aqui expostas, destacam-se as principais diretrizes com as quais este estudo busca contribuir, incluindo: a) a utilização de glicerol em codigestão anaeróbia com a vinhaça de cana-de-açúcar em reator de leito fixo estruturado, desde que condições adequadas de proporção e incremento de carga sejam seguidas; b) a valorização dos subprodutos das cadeias produtivas do etanol e biodiesel com a recuperação de bioenergia na forma de gás metano; e c) a proposição de destinação final aos resíduos vinhaça e glicerol como alternativa para suprir suas demandas de mercado e tornar os processos produtivos mais sustentáveis.

4 MATERIAL E MÉTODOS

Para atender aos objetivos deste trabalho, esta seção direciona-se ao desenvolvimento da etapa experimental, a partir de ensaios realizados em reatores biológicos, em escala de bancada. A operação dos reatores e as análises físico-químicas foram conduzidas no Laboratório de Processos Biológicos do Departamento de Hidráulica e Saneamento, da Escola de Engenharia de São Carlos (USP), na Área 2.

4.1 CARACTERIZAÇÃO DAS AMOSTRAS DE VINHAÇA

Os experimentos foram conduzidos com a utilização dos principais subprodutos provenientes das indústrias sucroalcooleira e do biodiesel: a vinhaça de cana-de-açúcar e o glicerol, respectivamente. A vinhaça utilizada na etapa experimental foi coletada na Usina de açúcar e álcool do Grupo São Martinho, localizada no município de Pradópolis, interior do Estado de São Paulo. Em síntese, a Companhia São Martinho se apresenta como a maior processadora de cana-de-açúcar do mundo, com valores de processamento de cana que superam 20 milhões de toneladas, segundo dados apontados para a safra de 2018/2019.

Foram realizadas três coletas de vinhaça para a realização da presente pesquisa ao longo da safra de 2019, como apontam os dados da Tabela 4. A Tabela 4 apresenta as principais características físico-químicas da vinhaça de cana-de-açúcar obtidas por meio do emprego e avaliação de diferentes metodologias e procedimentos científicos.

Após as coletas, as amostras de vinhaça foram acondicionadas em reservatórios plásticos (volumes de 10 e 20 L) e mantidas a temperatura de -20°C, a fim de manter preservadas as características físico-químicas do composto. Como estratégia de operação, optou-se pela adição de álcali na alimentação dos reatores para o ajuste do pH em valores próximos da neutralidade, de modo a preservar a atividade metanogênica e evitar o desequilíbrio reacional. (WANG et al., 2014).

Na tabela 4, os valores de DQOt correspondem à concentração total de matéria orgânica contida na vinhaça, ao passo que os valores de DQOs indicam a concentração de matéria orgânica solúvel aferida após centrifugação das amostras nas condições de 9000 rpm e 5 min. Enfatiza-se, ainda, que os ajustes de carga orgânica volumétrica foram feitos baseando-se nos valores de DQO total.

Tabela 4 – Caracterização físico-química da vinhaça bruta utilizada na alimentação dos reatores biológicos.

Parâmetro	Período de coleta		
	C1 (jun. 2019)	C2 (set. 2019)	C3 (out. 2019)
DQOt (g.L ⁻¹)	27,7	29	28,6
DQOs (g.L ⁻¹)	20,6	20,3	25,3
COT (mg.L ⁻¹)	3124	1988	2129
pH	4,56	4,54	4,42
CH total (mg.L ⁻¹)	5880	4853	6557
NTK (mg.L ⁻¹)	620	620	827
Acetona (mg.L ⁻¹)	5	5	5
Metanol (mg.L ⁻¹)	14	51	80
Etanol (mg.L ⁻¹)	213	226	494
Ácido Láctico (mg.L ⁻¹)	747	1920	2723
Ácido Acético (mg.L ⁻¹)	997	856	1311
Ácido Propiônico (mg.L ⁻¹)	134	42	66
Ácido Isobutírico (mg.L ⁻¹)	7	< LD	< LD
Ácido Butírico (mg.L ⁻¹)	< LD	< LD	1,6
Ácido Isovalérico (mg.L ⁻¹)	9	< LD	< LD
Ácido Valérico (mg.L ⁻¹)	< LD	< LD	0,5
Ácido Capróico (mg.L ⁻¹)	11	< LD	< LD
Proteína (mg.L ⁻¹)	9423	8976	11066
SST (mg.L ⁻¹)	1740	2675	2360
SSF (mg.L ⁻¹)	164	212	137
SSV (mg.L ⁻¹)	1576	2463	2223
Sulfato (mg.L ⁻¹)	2308	2516	2856
Fenol (mg.L ⁻¹)	1610	1820	1936,6
Glicerol (mg.L ⁻¹)	3476	2868	2485
Cálcio (mg.L ⁻¹)	258	628	303
Fósforo total (mg.L ⁻¹)	33	21	46

Símbolos – Parâmetro: DQOt = demanda química de oxigênio total; DQOs = demanda química de oxigênio solúvel; CH = carboidratos; NTK = nitrogênio total Kjeldahl; COT = carbono orgânico total; SST = sólidos suspensos totais; SSF = sólidos suspensos fixos; SSV = sólidos suspensos voláteis.

Fonte: Laboratório de Processos Biológicos (2019).

4.2 GLICEROL

O glicerol utilizado nesta pesquisa corresponde ao produto comercial proveniente da indústria Biobrotas Oleoquímica, localizada no município de Brotas, Estado de São Paulo, que produz a fração bidestilada do glicerol com 99,5% de pureza. Em geral, o composto apresenta aspecto líquido viscoso, com densidade aproximada de $1,26 \text{ g.cm}^{-3}$, transparente, isento de cor, odor e materiais em suspensão.

Assim como a vinhaça de destilaria, o glicerol foi utilizado como fonte de carbono no processo de codigestão da vinhaça de cana-de-açúcar, com vistas à produção de metano. Em função de sua elevada DQO ($\approx 1.500 \text{ g.L}^{-1}$), foram preparadas soluções diluídas do glicerol com menores concentrações de DQO, a fim de padronizar a carga orgânica afluyente a ser adicionada no reator.

4.3 APLICAÇÃO DA CODIGESTÃO ANAERÓBIA EM REGIME DE BATELADA: INÓCULO, MEIO NUTRICIONAL E CONDIÇÕES OPERACIONAIS

Neste item são apresentadas as informações concernentes à configuração dos reatores biológicos em regime de batelada empregados no processo de codigestão anaeróbia da vinhaça e glicerol, contemplando suas etapas de inoculação e condições operacionais. A confecção dos reatores foi baseada em trabalhos acadêmicos preliminarmente desenvolvidos no Laboratório de Processos Biológicos (LPB/EESC/USP), sobretudo aqueles direcionados à produção de bioenergia a partir dos cossustratos utilizados na presente pesquisa. (BARBOSA, 2018; KIYUNA; FUESS; ZAIAT, 2017).

4.3.1 Inóculo

No processo de inoculação dos reatores biológicos em regime de batelada, bem como do reator AnSTBR (sigla em inglês para *Anaerobic Structured-Bed Reactor* — em português, reator de leito fixo estruturado), fez-se uso de lodo proveniente de reator UASB operado em escala plena, aplicado ao tratamento de água residuária do abatedouro de aves Ideal Ltda, localizado no município de Pereiras, São Paulo, sob condições mesofílicas. Durante o período dos ensaios em batelada, o lodo foi mantido preservado em frascos-reatores em câmara térmica a 4°C .

4.3.2 Ensaios em Batelada

Os ensaios em batelada foram preparados em frascos Erlenmeyer de 1090 mL de volume total, 300 mL de volume reacional e *headspace* ocupando um volume de 790 mL. Anteriormente à montagem dos frascos, determinou-se o teor de sulfato e a concentração de DQO total dos substratos, de modo a possibilitar a execução eficiente das diluições destes até atingir uma DQO fixa inicial de 5 g.L⁻¹. A Figura 5 apresenta as variações de DQO dos cossubstratos, com o objetivo de avaliar seus possíveis efeitos na produção de metano.

Figura 5 – Ensaios em batelada aplicando-se diferentes concentrações de DQO dos cossubstratos.

Fonte: Elaboração própria.

Em função da elevada densidade do glicerol, optou-se pela pesagem do composto em balança analítica para sua posterior diluição. Para a vinhaça, utilizou-se a coleta C1 para compor a fração total ou parcial de DQO nos frascos. Considerando o volume reacional de 300 mL nos reatores, calculou-se o volume da vinhaça e glicerol de acordo com a concentração de DQO pretendida de 5g.L⁻¹.

Com o objetivo de avaliar a resiliência da biomassa na produção de metano, foram estabelecidas duas condições adicionais: o inóculo previamente adaptado à condição I foi removido do Erlenmeyer, centrifugado (9000 rpm, 5 min) e acrescido de solução 100% glicerol, meio nutricional e solução tampão (condição VI); em contrapartida, o inóculo adaptado à condição V foi igualmente removido do frasco, centrifugado e acrescido de 100% vinhaça, solução nutricional e agente tamponante (condição VII). A condição VIII apresenta condições

similares à condição V, todavia os reatores não foram alimentados com solução nutricional, permitindo avaliar a influência da solução de macronutrientes na produção e cinética de metano.

A Figura 6 apresenta as condições adicionais empregadas nos reatores biológicos operados em regime de batelada.

Figura 6 – Condições adicionais para a determinação da produção de metano.

Fonte: Elaboração própria.

No processo de inoculação dos reatores foi estabelecida relação alimento/microrganismo (A/M), em $\text{gDQO.g}^{-1}\text{STV}$ de 0,3, com a biomassa centrifugada (9000 rpm, 5min) e pesada em balança analítica. Os cálculos teóricos para a quantificação de biomassa foram realizados por meio das análises dos Sólidos Totais (ST), Sólidos Totais Fixos (STF) e Sólidos Totais Voláteis (STV), esta última representando a quantidade inicial de microrganismos (M) nos frascos reatores, equivalente a $16,7 \text{ gSTV.L}^{-1}$.

Ressalta-se que ao longo da montagem das bateladas, o lodo foi centrifugado e o sobrenadante removido, a fim de evitar quaisquer alterações nos valores de DQO iniciais. Ainda, para obter maior precisão nos valores reais de sólidos voláteis e determinar a relação gSTV.glodo^{-1} , optou-se pela análise de STV da massa centrifugada de lodo. Este procedimento é uma adaptação da metodologia descrita no *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* (APHA, AWWA, WEF, 2012), todavia não se utiliza o volume do lodo nos cálculos, e sim uma massa conhecida (M_c) de amostras de lodo centrifugado, descartando-se o sobrenadante. As Equações 1, 2 e 3 apresentam os cálculos empregados na determinação da massa do inóculo.

$$ST = \frac{(M_1 - M_0)}{M_c} \quad (\text{Eq. 1})$$

$$STF = \frac{(M_2 - M_0)}{M_c} \quad (\text{Eq. 2})$$

$$STV = \frac{(M_1 - M_2)}{M_c} \quad (\text{Eq. 3})$$

Siglas: ST = sólidos totais, STF = sólidos totais fixos, STV = sólidos totais voláteis, M_0 = massa do cadinho, M_1 = massa do cadinho + massa do inóculo após período de estufa, M_2 = massa cadinho + massa inóculo após período de mufla, M_c = massa conhecida inicial de inóculo.

Com os valores definidos de massa do inóculo e volume dos substratos para as condições I a VIII, foi adicionada solução de bicarbonato de sódio na proporção de 1 gNaHCO₃.gDQO⁻¹ e solução de macronutrientes (exceto na condição VIII), conforme a metodologia descrita por Angelidaki e Sanders (2004). Os ensaios foram executados em duplicata, com três reatores controles, mantidos sob agitação constante de 130 rpm e temperatura de 30°C (incubadora de agitação orbital Infors HT, modelo Multitron Pro).

Em função do baixo valor de pH da vinhaça (aproximadamente 4,2), mesmo após a adição do alcalinizante, fez-se necessária a correção do pH das amostras com hidróxido de sódio para $7,5 \pm 0,2$. Para iniciar o procedimento, introduziu-se gás nitrogênio (N₂) puro durante 5 minutos no meio reacional para o estabelecimento do ambiente anaeróbio. Por último, os frascos Erlenmeyer foram selados com rolha de borracha butílica e tampa plástica, vedados com cola silicone na superfície externa da borracha, e dispostos no equipamento shaker à 30° e agitação constante de 130 rpm. Ao final da operação dos reatores foram realizadas análises de concentração de matéria orgânica e sulfato remanescentes para avaliação das eficiências de remoção destes compostos.

No que tange à produção de biogás, realizou-se a medida da variação de pressão no interior dos frascos no período anterior e posterior a coleta de biogás, utilizando transdutor de pressão TPR-18 (Desin Instruments, Barcelona, ESP). A medição da variação de pressão nos reatores permitiu calcular o número de mols dos gases metano e dióxido de carbono, conforme mostra a Equação 4.

$$P.V. (X_{\text{gás}}) = n.R.T \quad (\text{Eq. 4})$$

Em que: P = variação de pressão no interior dos frascos, expressa em mbar; V = volume do *headspace*, em L; $X_{\text{gás}}$ = fração do gás contida no biogás; n = número de mols do gás, em mols; R = constante dos gases, em L. mbar⁻¹.K⁻¹.mol⁻¹; T = temperatura dos testes, em K⁻¹.

Convém salientar que os reatores foram despressurizados à medida que suas respectivas pressões superavam o valor de 400 mbar, a fim de evitar erros na medição, dado que o limite máximo de medição do equipamento era de 500 mbar. Com a concentração molar de metano obtida por cromatografia foi possível determinar o volume de metano acumulado em cada frasco reator nas condições normais de temperatura e pressão (1 atm, 273 K), conforme mostra a Equação 5.

$$V_{CH_4} = \frac{n.R.T}{P} + V^{t-1}_{CH_4} \quad (\text{Eq. 5})$$

Em que: V_{CH_4} = volume acumulado de metano no tempo t, em mL; n = número de mols de metano no biogás, em mols; P = pressão atmosférica, em atm; R = constante dos gases, em $\text{atm}^{-1} \cdot \text{K}^{-1} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1}$; T = temperatura, em K; $V^{t-1}_{CH_4}$ = produção acumulada de metano no tempo t-1.

Relativo às coletas e análises da fase gasosa, a análise da composição do biogás presente no *headspace* dos reatores foi feita por cromatografia gasosa (LEBRERO et al., 2016). Com o auxílio de uma seringa com válvula de trava foram retiradas alíquotas iniciais de 500 μL de todos os frascos para injeção imediata no cromatógrafo, cujo período médio de análise atinge 15 min. Os volumes retirados dos frascos foram reduzidos para 400 e 300 μL , à proporção que o gás metano excedia o limite máximo de detecção do cromatógrafo. Ao longo dos primeiros dias da etapa experimental, as coletas do biogás eram feitas a cada 4 horas, posteriormente espaçadas para 8, 12 e 24 horas, respectivamente, até a curva de produção acumulada de metano atingir sua estabilidade, isto é, com variações na produção de metano inferiores a 10%.

4.3.3 Meio Nutricional

Conforme abordado no item 4.3.2, os reatores em regime de batelada foram alimentados com solução de macronutrientes (ANGELIDAKI E SANDERS, 2004). A Tabela 5 descreve os principais constituintes das duas soluções de macronutrientes utilizadas nos reatores biológicos.

Tabela 5 – Solução de macronutrientes utilizadas nos reatores em batelada.

Solução A	Concentração (g.L^{-1})
NH_4Cl	100
NaCl	10
$\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	10
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	5
Solução B	Concentração (g.L^{-1})
$\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$	200

Fonte: Elaboração própria.

De acordo com a metodologia, os volumes das soluções A e B foram, respectivamente, 10 mL e 2 mL, considerando um volume de 974 mL de água destilada.

4.3.4 Cinética de Produção de Metano

O cálculo das regressões não lineares para obtenção dos parâmetros cinéticos de produção de metano foi realizado com o auxílio do *software* MicroCal OriginLab®. No *software* fez-se uso da equação de Gompertz modificada, comumente utilizada na avaliação da produção de biogás em sistemas biológicos (ZWIETERING et al., 1990; PEIXOTO et al., 2012; KIYUNA; FUESS; ZAIAT, 2017) para a realização de ajustes nos dados cumulativos de produção de metano obtidos de cada condição estabelecida nos reatores em regime de batelada. A Equação 6 descreve o modelo de Gompertz modificado:

$$M(t) = A \cdot \exp \left\{ - \exp \left[\frac{x_c \cdot e}{A} (k - t) + 1 \right] \right\} \quad (\text{Eq. 6})$$

Em que: $M(t)$ é a produção acumulada de metano, em mL; A é o potencial de produção de metano, em mL; k é o tempo da fase de adaptação, em horas; x_c é a velocidade de produção de metano, em mL.h⁻¹; t é o tempo de incubação, em h; e é o número de Euler (2,71828).

4.4 SISTEMA CONTÍNUO: REATOR AnSTBR

Durante a etapa experimental, empregou-se um reator de fase única (metanogênico) com leito fixo estruturado. O reator foi confeccionado em tubos de acrílico, com diâmetro interno de 8,1 cm, diâmetro externo de 13,9 cm, 69,6 cm de comprimento total e volume total aproximado de 3,42 L, incluindo o *headspace*. O leito fixo ordenado foi composto por 13 tiras de espuma de poliuretano, fixadas em telas de aço inoxidável junto à estrutura do acrílico. (Figura 7). A escolha pela espuma de poliuretano advém de sua elevada porosidade, conforme os resultados reportados por Camiloti et al. (2014) e Mockaitis et al. (2014) que encontraram porosidades de 98% em reatores de leito fixo estruturado.

A Figura 7 apresenta o desenho esquemático do reator AnSTBR empregado na presente pesquisa.

Figura 7 - Desenho esquemático do reator de leito fixo estruturado.

Legenda: 1- Tanque de alimentação, 2- bomba peristáltica, 3- AnSTBR (base), 4- AnSTBR (leito fixo estruturado), 5- headspace, e 6- aparato de medida do biogás (sistema pulso-eletromecânico).

Fonte: Elaboração própria.

O reator foi continuamente operado com vinhaça e glicerol com 50% vinhaça e 50% glicerol, em termos de massa de DQO, em condições controladas de temperatura (30°C), durante 105 dias, com fluxo ascendente por auxílio de uma bomba peristáltica Gilson, modelo Minipuls. No início da operação, a carga orgânica volumétrica aplicada (COVa) ao reator alimentado foi mantida em $0,5 \text{ kg.m}^{-3}.\text{d}^{-1}$, com aumento progressivo de COVa ao longo da operação até atingir o valor de $5,0 \text{ kg.m}^{-3}.\text{d}^{-1}$, perfazendo um TDH de 24 horas. A proporção dos cossubstratos 50% vinhaça e 50% glicerol foi adotada mediante a observância dos resultados prévios da produção de metano nos frascos reatores operados em regime de batelada, em sistema de codigestão anaeróbia.

As mudanças e a duração das fases operacionais foram associadas à eficiência de conversão de matéria orgânica acima de 70%, conforme indicado por Del Nery et al. (2018). A Tabela 6 apresenta as condições operacionais aplicadas no reator contínuo.

Tabela 6 – Condições operacionais aplicadas no reator AnSTBR de fase única.

Dias de operação	Vinhaça (coleta)	COVa ($\text{kg.m}^{-3}.\text{d}^{-1}$)	NaHCO_3 (g.gDQO^{-1})	pH afluente
1-27	C2	0,5	0,2	7,5
28-50	C2	1,0	0,2	7,5
51-66	C2	2,0	0,5	7,5
67-90	C2	3,5	0,5	7,5
91-105	C3	5,0	0,5	7,5

Fonte: Elaboração própria.

A inoculação seguiu o protocolo descrito por Zaiat, Cabral e Foresti (1994) adaptado por Fuess (2017), em que o lodo permaneceu diluído em água (proporção 1:1) e posteriormente triturado. Adiante, as barras de espuma de poliuretano (50x1,2x0,9 cm) que constituem o meio suporte permaneceram submergidas na mistura (água e lodo triturado) por tempo equivalente a duas horas, com posterior drenagem do excesso de lodo.

Durante a fase de adaptação da biomassa, optou-se pela dosagem de bicarbonato de sódio na concentração de $0,2 \text{ gNaHCO}_3.\text{gDQO}^{-1}$ na mistura afluente, baseando-se na concentração do álcali avaliada por Döll e Foresti (2010) para a manutenção do pH e operação estável no tratamento mesofílico de vinhaça. Posteriormente, foi realizada a correção para $0,5 \text{ gNaHCO}_3.\text{gDQO}^{-1}$, dadas as condições aparentes de desequilíbrio reacional, como flutuações no pH efluente e na relação AI/AP, conforme serão discutidas na próxima seção.

4.5 APLICAÇÃO DA METODOLOGIA ANALÍTICA

O desempenho do reator de leito fixo, em termos de fase líquida, foi avaliado com base no monitoramento contínuo dos seguintes parâmetros: demanda química de oxigênio total (DQOt) e solúvel (DQOs), teor de sólidos totais voláteis (STV), concentração de carboidratos totais (CH), concentração de ácidos voláteis totais (AVT), alcalinidade parcial (AP), alcalinidade intermediária (AI) e pH.

As análises foram aplicadas nas amostras de vinhaça e glicerol diluídas de acordo com a COVa pretendida (afluente ao reator AnSTBR) para a corrente efluente ao reator, destacando-se:

- a) ácidos graxos voláteis (AGV) e solventes: análise realizada em cromatógrafo gasoso, modelo GC 2010 (Shimadzu® Scientific Instruments, Columbia, MD, EUA), equipado com detector de ionização de chama e coluna HP-INNOWAX (30 m de comprimento,

- 0,25 mm de diâmetro interno e 0,25 µm de espessura do filme), conforme a metodologia descrita por Adorno et al. (2014). As amostras foram preparadas em frasco-padrão de vidro (volume 10 mL, amostrador COMBI-PAL) com fita veda-rosca, tampa rosqueável e septo de silicone;
- b) ácidos voláteis totais (AVT): parâmetro avaliado pelo método titulométrico, descrito por Kapp (1984);
 - c) alcalinidade parcial (AP) e Intermediária (AI): análise realizada a partir da metodologia de Kapp (1984) por titulometria potenciométrica. Para a realização desta análise, as amostras foram centrifugadas (9000 rpm, 5 min) para a remoção dos sólidos suspensos;
 - d) carboidratos totais (CH): concentrações determinadas conforme o método de Dubois et al. (1956) e Blundi e Gadêlha (2001), denominado método fenol-sulfúrico por espectrofotometria. Este método possibilita a leitura da absorbância da solução na região visível (490 nm) após a desidratação dos açúcares em ácido sulfúrico concentrado e na presença de fenol. As amostras foram previamente centrifugadas (9000 rpm, 5 min);
 - e) DQOt, DQOs, ST, STF e STV: parâmetros analisados conforme o protocolo descrito no *Standard Methods of Water and Wastewater* (APHA, AWWA, WEF, 2012). Nas análises de DQOs, as amostras também foram centrifugadas (9000 rpm, 5 min);
 - f) sulfato: concentração do íon sulfato nas amostras foi determinada por método turbidimétrico, descrito no *Standard Methods of Water and Wastewater* (APHA, AWWA, WEF, 2012);
 - g) sulfeto: concentração do íon sulfeto foi determinada pelo método azul de metileno por espectrofotometria, conforme a metodologia descrita no *Standard Methods of Water and Wastewater* (APHA, AWWA, WEF, 2012); e,
 - h) glicerol: composto orgânico determinado pelo método fotoenzimático proposto por Greenhill (2003). O glicerol, na presença de ATP e da enzima glicerol-quinase, produz ADP e glicerol-3-fosfato que, na presença da enzima glicerol-3-fosfato oxidase e oxigênio, produz di-hidroxiacetona-fosfato e peróxido de hidrogênio. Por último, na presença da enzima peroxidase, acceptor de oxigênio e 4-aminoantipirina são formados água e um composto rosáceo, passível de ser determinado por espectrofotometria.

A Tabela 7 apresenta a frequência dos métodos analíticos realizados na presente pesquisa.

Tabela 7 – Frequência dos métodos analíticos para o monitoramento do reator AnSTBR.

Parâmetro	Frequência (semanal)	Método	Referência
Ácidos Graxos Voláteis	1x	Cromatografia gasosa	Adorno, Hirasawa e Varesche (2014)
Ácidos Voláteis Totais	3x	Titulometria/Potenciometria	Kapp (1984)
Alcalinidade (AI e AP)	3x	Titulação Potenciométrica	Kapp (1984)
Carboidratos Totais	3x	Espectrofotometria	Dubois et al. (1956)
Composição do biogás	3x	Cromatografia gasosa	Perna et al. (2013)
DQOt, DQOs	3x	Digestão/Espectrofotometria	APHA, AWWA e WEF (2012)
ST, STF, STV	quinzenal	Gravimetria/Calcinação	APHA, AWWA e WEF (2012)
Sulfato	3x	Turbidimétrico	APHA, AWWA e WEF (2012)
Sulfeto	3x	Espectrofotometria	APHA, AWWA e WEF (2012)
Glicerol	3x	Enzimático	Greenhill (2003)
pH	3x	Potenciometria	APHA, AWWA e WEF (2012)
Vazão do biogás	diária	-	-

Fonte: Elaboração própria.

O fluxo de elétrons para sulfetogênese foi calculado, conforme metodologia descrita por Vilela Damianovic e Foresti (2014), considerando que as BRS oxidam 0,67 g de matéria orgânica, na forma de DQO, para reduzir cada grama de sulfato (LENS et al., 1998). A Equação 7 apresenta a determinação do fluxo de elétrons associados à remoção de DQO pela via sulfetogênica. O cálculo assume que a quantidade total de sulfato inicialmente aplicada ao reator foi reduzida a sulfeto.

$$ERSO_4^{2-} (DQO) = \left[\frac{0,67 * (SO_4^{2-}{}_{af.} - SO_4^{2-}{}_{ef.})}{(DQO_{af.} - DQO_{ef.})} \right] * 100 \quad (\text{Eq. 7})$$

Símbolos: DQO_{af.} = DQO afluente ao reator, em mg.L⁻¹; DQO_{ef.} = DQO efluente ao reator, em mg.L⁻¹; ERSO₄²⁻ = eficiência de remoção de sulfato (em termos de DQO), em %; SO₄²⁻_{af.} = concentração de sulfato afluente, em mg.L⁻¹; SO₄²⁻_{ef.} = concentração de sulfato efluente, em mg.L⁻¹.

A Tabela 8 apresenta as equações empregadas no monitoramento das variáveis-resposta dos reatores biológicos operados em regime de batelada, bem como do reator de leito fixo estruturado no sistema de codigestão.

Tabela 8 – Equações para o monitoramento das variáveis-resposta dos reatores em batelada e AnSTBR (continua).

Variável-resposta	Equação	Parâmetro	Reator
Eficiência de remoção de DQOt e DQOs (%)	$ERDQO = \left(\frac{DQO_{af.} - DQO_{ef.}}{DQO_{af.}} \right) \text{ (Eq.8)}$	$DQO_{af.}$: DQO afluyente (g.L ⁻¹) $DQO_{ef.}$: DQO efluente (g.L ⁻¹)	Reatores em batelada/ AnSTBR
Vazão de biogás (VBG, em mL.d ⁻¹)	$VBG = (n^{\circ} \text{ pulsos.d}^{-1} \cdot V_{\text{pulso}}) \text{ (Eq.9)}$	V_{pulso} = volume total por pulso no tubo U (mL)	AnSTBR
Produção volumétrica de metano (PVM, em mLCH ₄ .L ⁻¹ . d ⁻¹)	$PVM = \left(\frac{VBG \cdot \%CH_4}{V_r} \right) \text{ (Eq.10)}$	VBG = vazão do biogás (mL.d ⁻¹) $\% CH_4$ = conteúdo de metano no biogás (%) V_r = volume do reator (L)	AnSTBR
Vazão molar de metano (VMM, em mmolCH ₄ .d ⁻¹)	$VMM = \left(\frac{PVM \cdot P}{R \cdot T} \right) \text{ (Eq.11)}$	PVM = Produção volumétrica de metano (mLCH ₄ .L ⁻¹ .d ⁻¹) P = pressão atmosférica (1 atm) R = constante dos gases (0,082 atm.L.mol ⁻¹ .K ⁻¹) T = temperatura (273K)	AnSTBR

Tabela 8 – Equações para o monitoramento das variáveis-resposta do reator AnSTBR (conclusão.)

Variável-resposta	Equação	Parâmetros	Reator
Rendimento de metano (MY, em mLCH ₄ .g ⁻¹ DQO)	$MY = \left(\frac{VBG \cdot \%CH_4}{Q_{af} \cdot (DQO_{af} - DQO_{ef.})} \right)$ (Eq.12)	VBG: vazão do biogás (mL d ⁻¹) % CH ₄ = conteúdo de metano no biogás (%) Q _{af.} = vazão afluyente (L.d ⁻¹) DQO _{af.} : DQO afluyente (g L ⁻¹) DQO _{ef.} : DQO efluente (g L ⁻¹)	Reatores em batelada/ AnSTBR
Conteúdo de metano no biogás (%CH ₄ , em %)	$\%CH_4 = \frac{n_{CH_4}}{n_{total}}$ (Eq.13)	nCH ₄ = número de mols de metano (mol) n _{total} : número de mols total (nCH ₄ + nCO ₂)	Reatores em batelada/ AnSTBR

Nota: Os cálculos supracitados correspondem às condições normais de temperatura e pressão (CNTP, 1 atm e 0°C).

Fonte: Adaptado de Fuess (2017).

Considerando a fase gasosa do reator contínuo, a vazão de gás foi monitorada por sistema tubo U de deslocamento de coluna d'água associado a um sistema Arduino acoplado ao *headspace* do reator (VEIGA et al., 1990). Ainda, a composição da corrente de biogás (metano e dióxido de carbono) foi determinada por cromatografia gasosa (GC-2014, Shimadzu Scientific Instruments®), com detector de condutividade térmica (TCD), conforme a metodologia descrita por LEBRERO et al. (2016).

O desempenho do reator AnSTBR foi avaliado em termos de: eficiência de remoção de DQOt e DQOs (em %); vazão do biogás (VBG, em mL.d⁻¹); razão entre alcalinidade parcial e intermediária (AI/AP); produção volumétrica de metano (PVM, em mLCH₄.L⁻¹.d⁻¹); vazão molar de metano (VMM, em mmolCH₄.d⁻¹); rendimento de metano (MY, em mLCH₄.g⁻¹DQO) e conteúdo de metano no biogás (% CH₄).

4.6 BALANÇO DE BIOMASSA

Durante o procedimento de inoculação do reator, buscou-se determinar a quantidade de biomassa acumulada no leito fixo anterior ao período de operação. Conforme metodologia descrita por Zaiat, Cabral e Foresti (1994) e adaptada por Fuess et al. (2017), o inóculo proveniente de reator UASB foi triturado, diluído e, por fim, disposto no reator por cerca de 2 horas. Dessa forma, obteve-se uma amostra do inóculo de volume conhecido e determinou-se a concentração de sólidos suspensos voláteis (SSV), por gravimetria, para o volume total de lodo. Os cálculos empregados estão apresentados nas Equações 14, 15 e 16.

$$SST = \frac{(M_5 - M_4)}{V_c} \quad (\text{Eq.14})$$

$$SSF = \frac{(M_6 - M_4)}{V_c} \quad (\text{Eq.15})$$

$$SSV = \frac{(M_5 - M_6)}{V_c} \quad (\text{Eq.16})$$

Siglas: SST = sólidos suspensos totais; SSF = sólidos suspensos fixos; SSV = sólidos suspensos voláteis; M₄ = massa da membrana; M₅ = massa da membrana + massa do inóculo após período de estufa; M₆ = massa final da membrana + massa do inóculo após período de mufla; V_c = volume conhecido de amostra.

Após a drenagem do inóculo, aplicou-se novamente o método gravimétrico para a determinação de SSV no volume de líquido drenado. Dessa maneira, estimou-se a quantidade de SSV retida no reator a partir da diferença na concentração de biomassa pré e pós drenagem do lodo. Analogamente, ao final da operação contínua do reator de leito fixo, buscou-se determinar a quantidade de biomassa suspensa contida no reator. Para isso, drenou-se a porção líquida, homogeneizou-se a mistura em um galão plástico de 5,0 L e retirou-se uma alíquota da biomassa de volume conhecido. As amostras em duplicata foram filtradas em membranas com porosidade de 1,2 μm , secas em estufa a 105°C e posteriormente calcinadas em mufla a 550°C para a determinação dos sólidos suspensos voláteis, em g.L^{-1} , conforme o cálculo apresentado na Equação 16.

Para quantificar a biomassa aderida no meio suporte, removeram-se as tiras de espuma do interior do reator e retirou-se uma amostra de espuma de dimensões conhecidas para a posterior determinação da sua massa, em g, considerando a densidade da espuma equivalente a 0,0222 g.cm^{-3} . Para a remoção dos sólidos contidos na amostra, lavou-se a espuma com água destilada em tubo falcon de 50 mL e, com o auxílio de pérolas de vidro, agitou-se a solução para facilitar a remoção de biomassa. Para a caracterização dos sólidos suspensos voláteis, as amostras foram filtradas em membranas com porosidade de 1,2 μm , secas em estufa a 105°C e calcinadas em mufla a 550°C. Dessa maneira, foi possível determinar a quantidade total de SSV em um valor conhecido de massa de espuma, aplicando-se o cálculo de biomassa ao número total de espumas no reator.

4.6.1 Produção Estimada de Biomassa no Reator – Cálculo da Carga Orgânica Volumétrica Específica (COVe)

A determinação da COVe no reator de fase única foi baseada na metodologia previamente reportada por Anzola Rojas et al. (2015) e adaptada por Aquino, Fuess e Pires (2017) para reatores metanogênicos. A princípio, obteve-se o coeficiente de rendimento celular da biomassa ($Y_{X/S}$), em $\text{gSSV.g}^{-1}\text{DQO}$, conforme descrito na Equação 17. Na Equação 17, os termos X_a , X_s , X_e e X_d referem-se, respectivamente, à quantidade de biomassa, em gSSV, aderida ao meio suporte do reator, à quantidade de biomassa no líquido drenado ao final da operação (105 dias), à quantidade total de biomassa lavada do reator na corrente efluente ao longo da operação contínua e à quantidade de biomassa nos descartes de fundo do reator. O termo SDQO representa a massa total de substrato, em termos de DQO, consumida durante a operação.

$$Y_{X/S} = \frac{X_a + X_s + X_e + X_d}{SDQO} \quad (\text{Eq. 17})$$

Para o cálculo de X_a foi estabelecida a diferença entre a massa de SSV, em g, contida na espuma ao final da operação contínua e a massa de SSV presente na espuma após a drenagem do lodo no processo de inoculação. A diferença implica, portanto, na quantificação das células que cresceram no leito fixo durante toda operação. A determinação de X_s seguiu protocolo semelhante, baseando-se na determinação de SSV suspensos no reator, utilizando-se o volume drenado ao final da operação. Considerando que durante a operação não foram realizados descartes de biomassa contida no reator, o valor de X_d foi considerado nulo.

Para a determinação de X_e foi realizado cálculo da integral da vazão mássica de sólidos eliminados na corrente efluente ao reator ao longo da operação – Equação (18). Na Equação 18, os termos $SSVe$, Q e t representam, respectivamente, a concentração de sólidos suspensos voláteis no efluente (gSSV.L^{-1}), a vazão de vinhaça aplicada no reator (L.d^{-1}) e o tempo de operação do sistema (105 dias). O cálculo da integral foi realizado no software OriginPro 2018 (OriginLab Corporation, Northampton, MA, USA).

$$X_e = \int_0^t (Q \cdot SSV_e) dt \quad (\text{Eq. 18})$$

Destaca-se que os valores de SSV efluente ao reator aqui apresentados foram estimados baseando-se na aplicação da DQO suspensa, considerando que as células microbianas são oxidadas pelo dicromato de potássio em meio ácido. Para tanto, a diferença entre a DQO bruta e a DQO solúvel fornece a fração de DQO suspensa da amostra, a qual está relacionada a uma dada concentração de SSV, medida por gravimetria. O fator de conversão teórico entre a massa de sólidos suspensos voláteis com sua respectiva DQO é da ordem de $1,42 \text{ gDQO.g}^{-1}\text{célula}$, considerando a composição elementar média da célula — $\text{C}_5\text{H}_7\text{O}_2\text{N}$ (Speece, 1996).

O parâmetro SDQO foi calculado semelhantemente ao termo X_e , a partir da integral da vazão mássica dos substratos consumidos, isto é, a massa total de matéria orgânica consumida ao longo da 105 dias operação. A Equação 19 descreve o cálculo da integral, sendo os termos Q , DQO_{af} , DQO_{ef} e t , os valores respectivos da vazão afluente ao reator (L.d^{-1}), a concentração da matéria orgânica total afluente (gDQO.L^{-1}), a concentração da matéria orgânica efluente (gDQO.L^{-1}) e o tempo total de operação do sistema de codigestão. Todos os cálculos foram realizados no software OriginPro 8 (OriginLab Corporation, Northampton, MA, USA).

$$SDQO = \int_0^t Q(DQO_{af} - DQO_{ef}) dt \quad (\text{Eq. 19})$$

Por fim, determinou-se a quantidade de biomassa acumulada no interior do reator em um determinado tempo (X_n), como mostra a Equação 20. Na Equação 20, o termo X_n corresponde a quantidade total de biomassa no interior do reator no tempo n (gSSV.L^{-1}), V_u corresponde ao volume útil do reator (L), X_{n-1} é quantidade total de biomassa no interior do reator no tempo $n - 1$ (gSSV.L^{-1}) e $D(t)$ é a massa de sólidos descartada no tempo n (gSSV), considerada nula para o reator.

$$X_n = \left[\frac{SCOD.Y_{X/S} \cdot \Delta t}{V_u} \cdot \left(\frac{X_s + X_d}{X_s + X_d + X_e} \right) + X(n - 1) - \frac{D(t)}{V_u} \right] \quad (\text{Eq. 20})$$

Ressalta-se que no tempo $t = 0$, a quantidade de biomassa no interior do reator (X_0 , em gSSV.L^{-1}) foi estimada a partir da razão entre a massa de SSV, em g, contida na espuma e o volume útil do reator. Os termos DQO_{af} e Q representam, respectivamente, a concentração de matéria orgânica afluenta ao reator, na forma de DQO total (gDQO.L^{-1}) e a vazão afluenta ao AnSTBR no tempo n .

Finalmente, a COVe ($\text{gDQO.g}^{-1}\text{SSV.d}^{-1}$) em um determinado tempo n de operação foi estimada a partir do quociente entre a carga orgânica volumétrica aplicada no reator, em $\text{kg.m}^{-3}.\text{d}^{-1}$, e a quantidade de biomassa retida neste (X_n , gSSV.L^{-1}), como mostra a Equação 21.

$$COVe = \frac{COVa}{X_n} \quad (\text{Eq. 21})$$

4.7 CÁLCULO DO BALANÇO DE MASSA PARA O REATOR AnSTBR

No presente trabalho foram elaborados dois balanços de massa distintos, em termos de DQO, para verificar a confiabilidade dos métodos analíticos empregados. O primeiro balanço refere-se à quantificação dos compostos solúveis na corrente efluente ao reator, descrito como balanço de massa da fase solúvel. O segundo balanço estende-se à produção de biogás, na forma de metano, e sólidos voláteis na corrente efluente. O cálculo para a determinação do BMFS é apresentado na Equação 22, em que os termos $DQO_{\text{METABÓLITOS}}$, $DQO_{\text{CARBOIDRATOS}}$ e DQO_{GLICEROL} referem-se à carga de DQO equivalente dos ácidos orgânicos (g.d^{-1}), à carga de DQO equivalente dos carboidratos totais (g.d^{-1}) e à carga de glicerol na corrente efluente, respectivamente. Já o termo DQO_s (g.d^{-1}) compreende a carga de DQO solúvel, determinada analiticamente ao longo da operação do reator, conforme apontamento prévio na Tabela 7.

$$\text{BMFS} = \left(\frac{\text{DQO}_{\text{metabólitos}} + \text{DQO}_{\text{carboidratos}} + \text{DQO}_{\text{glicerol}}}{\text{DQO}_s} \right) * 100 \quad (\text{Eq. 22})$$

Considerando o BMG, a Equação 23 descreve a relação entre a DQO total (DQOt) efluente (estimada) ao reator e a DQOt afluente a este. O termo DQOs efluente configura a carga de DQO solúvel efluente ao sistema de codigestão; o termo DQO_{METANO} corresponde à vazão de metano medida no reator, convertida para carga equivalente de DQO (g.d⁻¹); o termo DQO_{SSV} refere-se à carga de DQO equivalente à produção de SSV (g.d⁻¹) e o termo DQOt afluente representa a DQO total determinada na alimentação afluente ao reator.

$$\text{BMG} = \left(\frac{\text{DQOs efluente} + \text{DQO}_{\text{metano}} + \text{DQO}_{\text{ssv}}}{\text{DQOt afluente}} \right) * 100 \quad (\text{Eq. 23})$$

A Tabela 9 apresenta os fatores de equivalência empregados nos cálculos, baseando-se na reação de oxidação completa dos compostos analisados: ácido propiônico, ácido acético, ácido butírico, ácido valérico, etanol, carboidratos totais, glicerol, metano e sólidos voláteis.

Tabela 9 – Fatores de equivalência para a determinação dos balanços de massa para o sistema de codigestão.

Composto	Massa Molar (g.mol ⁻¹)	Reação de Oxidação Completa	Fator de Equivalência
Ácido acético (HAc – C ₂ H ₄ O ₂)	60,05	$C_2H_4O_2 + 2O_2 \rightarrow 2CO_2 + 2H_2O$	1,07 gDQO.g ⁻¹ HAc
Ácido propiônico (HPr – C ₃ H ₆ O ₂)	74,08	$C_3H_6O_2 + 7/2O_2 \rightarrow 3CO_2 + 3H_2O$	1,51 gDQO.g ⁻¹ HPr
Ácido butírico (HBu – C ₄ H ₈ O ₂)	88,11	$C_4H_8O_2 + 5O_2 \rightarrow 4CO_2 + 4H_2O$	1,82 gDQO.g ⁻¹ HBu
Ácido valérico (HV _a – C ₅ H ₁₀ O ₂)	102,13	$C_5H_{10}O_2 + 13/2O_2 \rightarrow 5CO_2 + 5H_2O$	2,04 gDQO g ⁻¹ HV _a
Etanol (Et-OH – C ₂ H ₆ O)	46,07	$C_2H_6O + 3O_2 \rightarrow 2CO_2 + 3H_2O$	2,09 gDQO.g ⁻¹ Et-OH
Carboidratos (CH – C ₆ H ₁₂ O ₆) ^a	342,29	$C_6H_{12}O_6 + 12O_2 \rightarrow 12CO_2 + 11H_2O$	1,06 gDQO.g ⁻¹ CH
Glicerol (C ₃ H ₈ O ₃)	92,09	$C_4H_8O_2 + 7/2O_2 \rightarrow 3CO_2 + 4H_2O$	1,22 gDQO g ⁻¹ glicerol
Metano (CH ₄)	16,04	$CH_4 + 2O_2 \rightarrow CO_2 + 2H_2O$	4,00 gDQO.g ⁻¹ CH ₄
Célula (SSV – C ₅ H ₇ O ₂ N)	113,11 ^b	$C_4H_8O_2 + 5O_2 \rightarrow 5CO_2 + 2H_2O + NH_3$	1,42 gDQO.g ⁻¹ SSV

Legenda: ^a Medição com base na molécula de glicose, ^b Valor baseado na composição elementar estimada de uma célula.

Fonte: Elaboração própria.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A operação de reatores em escala plena requer, por vezes, a adaptação da biomassa frente ao aumento progressivo de carga orgânica volumétrica (COVa), descrevendo um processo conhecido como “partida” do reator. No presente estudo, o inóculo empregado nos sistemas de digestão e codigestão provém de sistema de tratamento anaeróbio de efluente de abatedouro avícola em reator UASB, dispensando a etapa de adaptação da biomassa aos cossubstratos frente ao elevado potencial metanogênico do lodo, associado à elevada biodegradabilidade da vinhaça e glicerol. (Del NERY, 2018; YANG et al., 2006).

Em linhas gerais, a fração de matéria orgânica removida no reator constitui um fator determinante na avaliação da produção de biogás, dada a relação estequiométrica e direta entre a massa de DQO removida e o volume de metano produzido. Ressalta-se que durante a operação em batelada, os frascos reatores foram alimentados com 5 g.L⁻¹ de DQO, quer em sistema de monodigestão, quer em codigestão anaeróbia.

Para os ensaios em batelada, as diferentes condições operacionais avaliadas no procedimento experimental e discutidas nesta seção estão relacionadas à(s): a) digestão anaeróbia da vinhaça e glicerol (100% vinhaça e 100% glicerol); b) variações nas massas de DQO dos cossubstratos no sistema de codigestão (70% vinhaça e 30% glicerol; 50% vinhaça e 50% glicerol; 30% vinhaça e 70% glicerol), e c) condições especiais (avaliação da resiliência da biomassa com a troca de substratos e influência dos macronutrientes na digestão anaeróbia do glicerol). Nos frascos reatores expostos às condições acima, observou-se relativa similaridade quanto à remoção de matéria orgânica (MO), com resultados de eficiência superiores a 80%. Considerando os ensaios de codigestão, a maior remoção de MO foi observada nos reatores alimentados com 50% vinhaça e 50% glicerol, atingindo percentual de remoção de 97%.

Outro fator importante a ser considerado na avaliação do potencial metanogênico em sistemas anaeróbios é a presença de compostos recalcitrantes (melanoidinas e fenóis) e/ou compostos interferentes, sobretudo o sulfato. Nas destilarias anexas, nas quais são utilizados o melaço e o caldo de cana no processo fermentativo, o emprego de ácido sulfúrico na prevenção de contaminação microbiana e floculação da biomassa contribui com os teores elevados de sulfato na vinhaça, estimulando o processo sulfetogênico nos sistemas anaeróbios (FUESS; GARCIA, 2015; BARTH et al., 2014). Conforme discutido na revisão de literatura deste estudo,

o sulfato é reduzido a sulfeto durante a sulfetogênese graças à atuação das BRS que competem com as arqueias metanogênicas por substratos comuns, como o acetato e o hidrogênio (VILELA; DAMIANOVIC; FORESTI, 2014), limitando o recurso de energia para a produção de metano. Na sua forma não-ionizada (H_2S), o sulfeto formado pode, ainda, suprimir a atividade metanogênica ao permear através da membrana celular dos microrganismos, desnaturando proteínas específicas e/ou estimulando a precipitação de metais na sua forma ionizada (HS^- e S^{2-}). A Tabela 10 apresenta os resultados experimentais obtidos nas condições operacionais aplicadas aos reatores anaeróbios, com ênfase nas eficiências de remoção de DQO e sulfato.

Tabela 10 – Dados experimentais de matéria orgânica e sulfato nos frascos reatores.

Condição Operacional	DQO _{af.} (mg.L ⁻¹)	SO ₄ ²⁻ _{af.} (mg.L ⁻¹)	DQO/SO ₄ ²⁻	ERDQO (%)	ERSO ₄ ²⁻ (%)	% CH ₄
100% vinhaça	4567 ± 26,5	345,4 ± 7,1	13,2	95	100*	69,3
70% vinhaça 30% glicerol	4680 ± 25	251,5 ± 6,5	18,6	81	100*	70,5
50% vinhaça 50% glicerol	4330 ± 50	165 ± 3	26,2	97	100*	68,1
30% vinhaça 70% glicerol	4643 ± 97,5	101 ± 3	46	84	100*	68,4
100% glicerol (c/ nutrientes)	4588 ± 25	**	ND	98	**	67
100% glicerol (s/ nutrientes)	5000 ± 20	**	ND	85	**	65,3
100% glicerol (lodo vinhaça)	4875 ± 45	**	ND	85	**	66,3
100% vinhaça (lodo glicerol)	4905 ± 55	365 ± 13	13,4	83	100*	70,1

Símbolos: DQO_{af.}: DQO afluente; SO₄²⁻_{af.}: sulfato afluente; ERDQO: eficiência de remoção de DQO; ERSO₄²⁻: eficiência de remoção de sulfato; % CH₄: porcentagem de metano no biogás, ND: concentração não definida. *Valores abaixo do limite de quantificação do método na corrente efluente (< 5 mg.L⁻¹), assumindo-se a remoção completa de sulfato. **Valores abaixo do limite de quantificação (< 5 mg.L⁻¹).

Fonte: Elaboração própria.

Lens et al. (1998) enunciam que para valores de DQO/sulfato acima de 10, não deve ser observada influência negativa na remoção de matéria orgânica e produção de metano decorrente da via sulfetogênica, devido às baixas concentrações de sulfeto no meio reacional. A partir dos

dados da Tabela 10, verifica-se que os valores encontrados para a razão DQO/sulfato nas amostras com vinhaça são superiores ao valor estimado pelos autores, sobretudo em função da carga afluyente e do fator de diluição aplicados no sistema de digestão. Ao final da operação, a concentração de sulfato na fração líquida dos reatores permaneceu abaixo do limite de quantificação do método, indicando a redução completa do composto. A concentração de sulfeto na fase gasosa também permaneceu abaixo do limite de quantificação, conforme análise de cromatografia gasosa, uma vez que o pH do meio deslocava o equilíbrio para a forma ionizada do sulfeto, retida na fração líquida. Convém salientar que o glicerol utilizado nesta pesquisa, por constituir um composto puro, é isento de compostos sulfurosos, atribuindo à vinhaça a concentração total de sulfato nos reatores anaeróbios.

A porcentagem de metano no biogás apresentou pouca variação, com valores entre 65 e 70%.

5.1 AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE METANO COM O DECRÉSCIMO DA PROPORÇÃO DE VINHAÇA: ESTUDO DOS PARÂMETROS CINÉTICOS.

Neste item serão discutidas as variações de produção e rendimento de metano com o decréscimo da proporção de vinhaça, em termos de DQO, e o consequente incremento de glicerol nos frascos reatores. Com o objetivo de investigar o potencial metanogênico a partir da proposta de codigestão entre os cossustratos vinhaça e glicerol, foram avaliados os parâmetros cinéticos de produção de metano para as seguintes condições estabelecidas: 100% vinhaça, 70% vinhaça + 30% glicerol, 50% vinhaça + 50% glicerol, 30% vinhaça + 70% glicerol, e 100% glicerol.

A maior produção de metano foi observada na proporção 50% vinhaça e 50% glicerol, com valor médio de 557 ± 30 mLCH₄, nas condições normais de temperatura e pressão (CNTP – 1 atm, 0°C). Para o resultado reportado acima, verificou-se aumento na produção de metano com o incremento de glicerol em 11% em relação à digestão anaeróbia da vinhaça.

Os maiores decréscimos na produção e rendimento de metano foram observados nos reatores alimentados com 100% vinhaça, atingindo valores médios de $495 \pm 0,2$ mLCH₄ e 293 ± 4 mLCH₄.g⁻¹DQOr (equivalente a 279 ± 2 mLCH₄.g⁻¹DQO_{ad}), respectivamente. Convém ressaltar que os valores de rendimento de metano apresentados neste item não incluem a produção de metano proveniente do inóculo, como forma de avaliar tão somente a influência dos cossustratos vinhaça e glicerol, descontando-se a produção do reator controle (branco).

López-González, Pereda Reyes e Romero Romero (2017) avaliaram a produção de metano a partir da digestão anaeróbia da vinhaça de cana-de-açúcar e sua codigestão com a torta de filtro proveniente da indústria sucroalcooleira. Em reatores em batelada operados a $37,5 \pm 1^\circ\text{C}$ e relação substrato/microrganismo de $0,5 \text{ gDQO.g}^{-1}\text{SSV}$, os autores reportaram rendimento de metano para a digestão da vinhaça, neste caso sem o incremento do cossustrato, de $240 \pm 6 \text{ mLCH}_4.\text{g}^{-1}\text{DQO}_{\text{ad.}}$, 14% inferior ao rendimento obtido com a digestão da vinhaça na presente pesquisa. Os autores relataram aumento de 11% no rendimento de metano, ao longo dos 30 dias de experimento, com a proporção 1:1 v/v de vinhaça e torta de filtro, demonstrando que a torta de filtro apresentou condições favoráveis à produção de metano.

Siles et al. (2011) analisaram a produção de metano a partir da digestão anaeróbia da vinhaça de cana-de-açúcar em reatores em batelada, sob condições mesofílicas, com aumento gradual da $\text{DQO}_{\text{af.}}$ até atingir o valor de $3,0 \text{ g.L}^{-1}$. Os autores reportaram rendimento médio de metano de $250 \text{ mLCH}_4.\text{g}^{-1}\text{DQO}_{\text{ad.}}$, 10,5% inferior ao resultado encontrado nesta pesquisa, aplicando-se uma DQO afluenta de 5 g.L^{-1} .

Peixoto et al. (2012) avaliaram a produção de hidrogênio e metano obtida com a digestão anaeróbia de diferentes compostos: esgoto doméstico, vinhaça, glicerol, sucrose e água residuária de arroz parboilizado. Os experimentos foram conduzidos em duas fases (acidogênica e metanogênica), em regime de batelada a $25 \pm 0,9^\circ\text{C}$. Para a vinhaça, considerando uma DQO afluenta de 500 mg.L^{-1} (10 vezes inferior à aplicada na presente pesquisa), os autores observaram rendimento de metano de $385 \text{ mLCH}_4.\text{g}^{-1}\text{DQO}_{\text{r.}}$, valor que supera o resultado deste estudo em 24% para a digestão da vinhaça. Para os autores, a diluição da vinhaça pode ter reduzido a proporção de compostos tóxicos e/ou inibidores à fase metanogênica. Ainda, a ausência de geração de compostos orgânicos de cadeia longa, como os ácidos succínico, valérico e propiônico manteve elevada a produção de metano, dado que a degradação destes compostos requer grandes quantidades de energia, culminando com o consequente atraso ou redução na produção de metano.

No tocante aos ensaios de codigestão da vinhaça com o glicerol propostos pela presente pesquisa, observou-se que os frascos reatores alimentados com 50% vinhaça e 50% glicerol apresentaram não somente a maior produção volumétrica de metano, conforme discussão prévia, como também maior rendimento de metano ($352 \pm 17 \text{ mL.g}^{-1}\text{DQO}_{\text{r.}}$), representando acréscimos de 9% e 5% em relação aos reatores alimentados com 70% e 30% vinhaça, respectivamente.

Syaichurrozi et al. (2016) estudaram a codigestão da vinhaça de cana-de-açúcar com água residuária de produção de tofu em reatores em batelada operados a 35°C. De acordo com os autores, o rendimento de metano para a digestão da água residuária de tofu saltou de 76 para 159 mL.g⁻¹DQO_r com o incremento de 20% vinhaça (em termos de DQO), o que caracteriza a vinhaça como um cossustrato favorável à produção de metano. Contudo, o rendimento de metano apresentou queda significativa após aumento na proporção volumétrica de vinhaça. Segundo os autores, o acúmulo de ácidos orgânicos no sistema e a consequente queda de pH contribuíram para a morte das arqueias metanogênicas.

Sousa et al. (2019) avaliaram a codigestão da vinhaça com soro de queijo em reator AnSBBR, operado com COVa de 5,0 kgDQO.m⁻³.d⁻¹ e DQO inicial de 5000 mg.L⁻¹, valor também aplicado aos reatores desta pesquisa, em condição mesofílica. Considerando as proporções de vinhaça e soro de queijo (em termos de DQO) de 75% e 25%, respectivamente, observou-se rendimento de metano de 236,5 mL.g⁻¹DQO_r, 32,9% inferior ao rendimento obtido com o incremento de 50% glicerol na presente pesquisa, corroborando para o potencial do cossustrato na produção de metano. Todavia, menor porcentagem de metano no biogás foi observada com o glicerol (68,2 ± 0,2%) em relação à codigestão com o soro de queijo (77,9 ± 0,2%).

Estudo recente sobre a codigestão de vinhaça e soro de queijo foi desenvolvido por Lovato et al. (2018) em reator AnSBBR, operado com COVa de 6,4 kgDQO.m⁻³.d⁻¹ e DQO fixa de 5000 mg.L⁻¹ a 30°C. Segundo os autores, o incremento de 75% de soro de queijo à vinhaça, em massa de DQO, contribuiu com aumento de 26% no rendimento de metano em relação à monodigestão da vinhaça. Nesta proporção, o rendimento médio de metano reportado pelos autores foi de 275 mL.g⁻¹DQO_r, 14% superior ao resultado apontado por Sousa et al. (2019) na mesma proporção dos cossustratos, todavia não supera os valores reportados nesta pesquisa com a codigestão mesofílica do glicerol e vinhaça. Em condições termofílicas, Albuquerque, Ratusznei e Rodrigues (2019) também examinaram a codigestão da vinhaça e soro de leite em reator AnSBBR com COVa de 25 kg.m⁻³.d⁻¹ e observaram rendimento de metano equivalente a 343 mL.g⁻¹DQO_r.

Considerando apenas os ensaios de codigestão, a menor produção de metano (493 ± 2,1 mL) foi verificada nos frascos com maior proporção de vinhaça (70%), cujo rendimento médio de metano foi de 320 ± 0,2 mL.g⁻¹DQO_r. Reduções nos valores de produção volumétrica e rendimento de metano em função do aumento na proporção de vinhaça também foram

observadas nos trabalhos de Lovato et al. (2018) e Lovato et al. (2019). Contrariamente ao glicerol que constitui uma fonte de carbono prontamente disponível aos microrganismos anaeróbios, a vinhaça de cana-de-açúcar apresenta constituintes diversos, com potencial para causar inibição do consórcio metanogênico em função dos teores de ácidos orgânicos, compostos recalcitrantes, como as melanoidinas, e compostos fenólicos (KUMAR et al., 1997; CHEN; CHENG; CREAMER, 2008).

A vinhaça utilizada na presente pesquisa provém de destilaria caracterizada como anexa, isto é, empregam-se o melaço e o caldo de cana no processo fermentativo. A concentração de fenol encontrada foi de 1610 mg.L⁻¹. Para vinhaças provenientes da produção autônoma do etanol e cachaça, Santos et al. (2019) reportaram concentrações menores: 604 e 361 mg.L⁻¹, respectivamente. A partir dessa observação, é possível inferir que a menor produção de metano na condição supracitada possa estar relacionada à natureza complexa dos constituintes da vinhaça.

Estudos recentes têm avaliado o uso de glicerol na codigestão com diferentes cossustratos orgânicos altamente energéticos, todavia de difícil tratabilidade e/ou destinação final. Neste contexto, Silva et al. (2018) avaliaram a produção de metano em ensaios em batelada a partir da codigestão de resíduos alimentícios, lodo de esgoto doméstico e glicerol bruto. Os ensaios foram conduzidos a 35°C, mantendo-se a relação A/M em 0,33 gDQO.g⁻¹STV (condições operacionais similares àquelas aplicadas neste estudo) e DQO_{af} de 3,3 g.L⁻¹. Com um incremento de 1% v/v glicerol, a produção acumulada de metano atingida foi de 144 mL, já descontando-se a produção de metano pelo inóculo, e rendimento médio de metano de 363 mL.g⁻¹DQO_{ad}. No entanto, aumentando-se a proporção de glicerol bruto para 3% v/v, observaram-se decréscimos significativos na produção e rendimento de metano de 36,9% e 34,4%, respectivamente.

Haosagul et al. (2019) realizaram um estudo cinético a partir da codigestão mesofílica de glicerol bruto (69,3% glicerol) com ácido acético em reatores em batelada, com DQO_{af} de 5.200 mg.L⁻¹, semelhante à DQO aplicada na pesquisa. Avaliando-se as diferentes proporções de ácido acético como cossustrato, a maior produção de metano foi observada na proporção glicerol/ácido acético 6:4, em termos de DQO, com 60% de remoção de matéria orgânica e valores de produção acumulada de metano, velocidade de produção de metano e tempo de fase lag iguais a 240 mL, 14 mL.h⁻¹ e 11 h, respectivamente.

Na presente pesquisa, não foram observadas diferenças significativas na produção e rendimento de metano entre as proporções 50% e 100% glicerol, com esta última atingindo produção acumulada de 570 ± 8 mL e rendimento médio de 338 ± 9 mL.g⁻¹DQO_r. Resultados similares foram obtidos por Siles-López et al. (2009) que compararam o rendimento de metano das frações bruta e destilada do glicerol, utilizando lodo granular e não granular em reatores em batelada, em condição mesofílica. Com variação de carga orgânica afluyente entre 1,0 e 2,0 gDQO, o maior rendimento de metano foi registrado nos reatores alimentados com glicerol destilado e lodo granular (356 mL.g⁻¹DQO_r) a 1 atm e 25°C. Em contrapartida, a digestão do glicerol bruto com lodo não granular apresentou queda de 19,1% no rendimento de metano.

A Figura 8.a apresenta o perfil temporal de produção acumulada de metano para as condições operacionais até aqui percorridas, com a aplicação do ajuste não-linear dos dados experimentais executado pelo modelo Gompertz modificado. Os dados da Figura 8.b foram obtidos por meio da primeira derivada da curva ajustada pelo mesmo modelo.

Figura 8 - Monitoramento da corrente gasosa, em termos de: a) produção acumulada de metano e b) velocidade de produção de metano. Legenda: V: vinhaça e G: Glicerol.

Fonte: Elaboração própria.

Com base nos dados da Figura 8.b, os reatores alimentados apenas com vinhaça apresentaram decréscimo significativo na velocidade de produção de metano ($73,9 \pm 6,6$ mLCH₄.d⁻¹) em comparação aos frascos nos quais aplicou-se a codigestão. López-González,

Pereda Reyes e Romero Romero (2017) encontraram resultado similar para a digestão anaeróbia da vinhaça, em reatores em batelada, próximo de $71,7 \text{ mLCH}_4.\text{d}^{-1}$.

A Tabela 11 apresenta os parâmetros cinéticos obtidos a partir da regressão não-linear do modelo de Gompertz modificado para as condições operacionais discutidas acima.

Tabela 11 - Resultados do modelo cinético de produção de biogás.

Condição Operacional	A (mLCH_4)	x_c ($\text{mLCH}_4.\text{d}^{-1}$)	k (d)	R^2	α
100% vinhaça	$441,27 \pm 13,6$	$73,96 \pm 6,6$	0	0,95	0,84
70% vinhaça + 30% glicerol	$447,61 \pm 10,4$	$125,67 \pm 11,0$	0	0,97	0,92
50% vinhaça + 50% glicerol	$502,85 \pm 8,2$	$120,12 \pm 6,7$	0	0,98	1,01
30% vinhaça + 70% glicerol	$490,55 \pm 6,8$	$144,17 \pm 6,7$	0	0,99	0,96
100% glicerol	$500,7 \pm 9,0$	$132,86 \pm 7,4$	0,5	0,99	0,97
Reator controle	$108,23 \pm 2,2$	$19,46 \pm 0,8$	0,7	0,99	-

Em que: A é o potencial de produção de metano, em mL; k é o tempo da fase de adaptação, em horas; x_c é a velocidade de produção de metano, em mL.h^{-1} ; R^2 é o coeficiente de determinação; e α é a relação entre o volume de metano obtido experimentalmente e o volume teórico.

Fonte: Elaboração própria.

A maior velocidade de produção de metano para a presente pesquisa foi encontrada nos reatores alimentados com 70% glicerol ($144,2 \text{ mL.d}^{-1}$), cuja produção de metano se assemelha à condição de codigestão na proporção 1:1, conforme apontam os dados da Tabela 11. A hipótese levantada é que por apresentar compostos mais complexos, a degradação da vinhaça pelo consórcio microbiano é dificultada e a hidrólise pode ocorrer de maneira mais lenta em relação à natureza constituinte do glicerol. Com base nas observações descritas, pode-se verificar que na presente pesquisa, a codigestão da vinhaça de cana-de-açúcar com 70% de glicerol contribuiu para o aumento da velocidade de produção de metano em 95% em relação à monodigestão da vinhaça.

Para a digestão anaeróbia do glicerol bruto em reatores em bateladas com DQO_{af} de 5200 mg.L^{-1} , Sawasdee, Haosagul e Pisutpaisal (2019) registraram velocidade de metano de $118,3 \text{ mL.d}^{-1}$, 11% inferior ao resultado observado para a digestão anaeróbia do glicerol neste estudo. Esta diferença pode estar relacionada à pureza do glicerol, considerando que o presente estudo propõe a utilização da fração bidestilada do composto e, portanto, livre de impurezas que possam inibir a atividade microbiana. No mesmo estudo, a adição de glicose ao glicerol bruto na proporção 1:1, em termos de DQO, aumentou a velocidade de metano para

194,6 mL.d⁻¹. Na codigestão do glicerol bruto com ácido acético na proporção 6:4, respectivamente, Haosagul et al. (2019) observaram velocidade de produção de metano próxima de 336 mL.d⁻¹, com a mesma DQO_{af} reportada por Sawasdee, Haosagul e Pisutpaisal. (2019). Neste caso, a elevada produção e velocidade de metano sofreu influência direta do ácido acético, já que o composto é o principal substrato convertido à metano pela via acetoclástica.

As velocidades máximas de produção de metano para as cinco primeiras condições analisadas na presente pesquisa, com exceção do reator controle, foram atingidas em tempos relativamente próximos: 0,83 d (100% vinhaça), 0,77 d (70% vinhaça), 1,09 d (50% vinhaça), 1,21 d (30% vinhaça) e 1,88 d (100% glicerol), embora esta última condição tenha atingindo sua velocidade máxima em tempo superior, possivelmente em função da maior fase de latência apresentada. Nos frascos reatores preenchidos com inóculo, água destilada e solução de macronutrientes (condição controle), a velocidade máxima de produção de metano foi observada somente no tempo de 2,6 d. Assim, pode-se inferir que houve pouca influência da parcela do inóculo, como biomassa, na produção de metano durante a fase exponencial das condições avaliadas, na qual a velocidade de produção de metano foi crescente.

Em relação à fase de adaptação microbiana, ou fase lag, não foram observados valores positivos para os reatores alimentados com vinhaça, em quaisquer proporções de DQO aplicadas neste estudo. Nesse contexto, é importante salientar que nestes reatores foram observadas variações significativas de pressão logo nas primeiras medições, isto é, quatro horas após a incubação dos frascos. A ausência de fase lag pode estar associada à(s): elevada biodegradabilidade da vinhaça para inóculo com elevada biodiversidade, conforme apontam os resultados de microscopia óptica do inóculo apresentados por Garcia (2019); e condições nutricionais impostas favoráveis à rápida assimilação dos cossustratos pelo consórcio microbiano anaeróbio.

Syaichurrozi et al. (2016) também registraram valor nulo de fase lag, em dias, para reator anaeróbio alimentado com vinhaça de cana-de-açúcar (DQO_{af} ≈ 8.300 mg.L⁻¹) em regime de batelada, sob condição mesofílica. Para frações muito diluídas de vinhaça (DQO_{af} ≈ 500 mg.L⁻¹), Peixoto et al. (2012) encontraram fase de latência de 0,75 d, podendo este valor estar relacionado à menor concentração de carboidratos disponíveis às comunidades microbianas.

Em contrapartida, os frascos alimentados apenas com glicerol apresentaram fase de latência próxima de 0,5 d (12 horas, em média), tempo semelhante ao reportado por Silva et al. (2018) para a codigestão de resíduos alimentícios e 3% v/v glicerol em reatores anaeróbios. Peixoto et al. (2012) registraram fase de latência para a digestão anaeróbia do glicerol próxima de 3,6 d. Neste caso, a observância de fase lag nos reatores alimentados unicamente com glicerol pode estar relacionada à capacidade do substrato de produzir e acumular ácidos orgânicos mais rapidamente, podendo retardar a produção de metano em função do desequilíbrio entre as comunidades metanogênicas e acidogênicas. Além disso, a ausência de micronutrientes no glicerol pode ter dificultado o desempenho de atividades celulares específicas, levando mais tempo para a manutenção do sistema anaeróbio. Neste caso, a aplicação da codigestão anaeróbia do glicerol com a vinhaça de cana-de-açúcar pode ter contribuído com ajustes no balanço nutricional do sistema, possibilitando o estabelecimento de melhores condições adaptativas das comunidades microbianas anaeróbias no meio reacional.

Para estimar o possível efeito sinérgico da codigestão na produção de metano produzido a partir de reações biológicas em cada frasco reator, calculou-se o parâmetro α que descreve a razão entre o volume de metano obtido experimentalmente e o volume teórico de metano. Conforme apontam os dados apresentados pela Tabela 11, os reatores expostos ao sistema de codigestão apresentaram maior similaridade dos resultados experimentais com a produção teórica estimada, dado o maior volume de metano produzido em relação à monodigestão da vinhaça.

5.2 INFLUÊNCIA DOS MACRONUTRIENTES NA BIODIGESTÃO DO GLICEROL

Neste item foi avaliada a influência dos macronutrientes na produção de metano a partir da digestão anaeróbia do glicerol destilado. A priori, enfatiza-se que em função da etapa de purificação do glicerol, compostos orgânicos voláteis e não-voláteis são removidos por destilação e filtração, respectivamente. Consequentemente, a fração pura do glicerol carece de componentes nutricionais, essenciais à manutenção do metabolismo microbiano em sistemas de digestão anaeróbia.

Assim como os fatores ambientais (temperatura, pH, alcalinidade e salinidade) afetam diretamente a dinâmica dos processos biológicos, os parâmetros nutricionais exercem funções específicas nestes processos, atuando na síntese de enzimas, estabilização da parede celular da microbiota, mecanismos de divisão celular, mobilidade, entre outras funções. Além dos

macronutrientes no meio reacional, como o nitrogênio, fósforo e sulfato, o metabolismo microbiano requer a presença de elementos-traços (Co, Ni, Zn, Cu, Fe, Mn e outros) em baixas concentrações. Em águas residuárias, estes compostos, em geral determinados por espectrometria de absorção atômica (EAA), têm demonstrado contribuir com a estabilidade dos sistemas anaeróbios, elevando a degradação da matéria orgânica e reduzindo a geração de ácidos orgânicos com potencial para inibir a produção de metano. (CHOONG et al., 2016; SAWATDEENARUNAT et al., 2015; RAJAGOPAL; MASSÉ; SINGH, 2013).

A vinhaça de cana-de-açúcar caracteriza-se como um resíduo líquido rico em matéria orgânica e componentes nutricionais diversos, dentre os quais podem ser citados: potássio e magnésio, encontrados nos tecidos vegetais da cana e obtidos na extração do caldo; cálcio, proveniente do solo e/ou oxidantes e hidróxidos incorporados ao tratamento do caldo; ferro, composto liberado no solo por minerais; sulfato, obtido pela adição de ácido sulfúrico na etapa fermentativa; nitrogênio, sobretudo na sua forma orgânica; e ainda metais traços, como Co, Ni, Cd e Mn (FUESS; GARCIA; ZAIAT, 2018; SANTOS et al., 2019). Todos estes compostos desempenham papel fundamental no potencial de recuperação de energia na forma de biogás, o que atribui à vinhaça vantagens competitivas como cossubstrato no processo de codigestão.

O glicerol bruto, por sua vez, apresenta diferentes concentrações de nutrientes, em geral dependentes da origem (animal ou vegetal) do processo produtivo do biodiesel. Embora sejam reportadas concentrações de macronutrientes, como nitrogênio, sulfato e fosfato; e micronutrientes, incluindo sódio, cálcio, magnésio, ferro e manganês, a presença de compostos tóxicos e/ou inibidores, como certos sais, pode inviabilizar economicamente a produção de energia a partir do composto bruto. Em contrapartida, a fração destilada do glicerol não dispõe de nutrientes em sua composição, sendo necessária a adição de solução nutricional para favorecer a atividade microbiana nos sistemas de digestão anaeróbia, como observado nos trabalhos de Vasconcelos et al. (2019), Dinh et al. (2014), Vlassis et al. (2013), Peixoto et al. (2012) e Siles-López et al. (2009), com poucos estudos em que os autores dispensaram o uso de nutrientes na biodigestão do glicerol (SADASWEE; HAOSAGUL; PISUTPAISAL, 2019; ZAHEDI et al., 2018; JENSEN et al., 2014).

A fim de eliminar quaisquer incertezas relacionadas à deficiência nutricional que poderiam eventualmente comprometer a atividade microbiana, optou-se pela utilização da solução de macronutrientes proposta por Angelidaki e Sanders (2004) que prevê uma elevada relação N:P para águas residuárias diversas com concentrações distintas de carbono.

Buscando-se avaliar a influência da solução de macronutrientes na produção de metano observada para o sistema de biodigestão do glicerol, uma nova condição operacional foi estabelecida: frascos reatores receberam alimentação com 100% glicerol sem a adição de nutrientes, permitindo a comparação destes dados experimentais de produção de metano com aqueles já reportados pela Tabela 11, cujos reatores alimentados com 100% glicerol receberam a solução de macronutrientes. Enfatiza-se que os ensaios foram realizados em duplicata, mantendo-se as condições operacionais estabelecidas nos ensaios anteriores.

Contrariando as expectativas, os reatores isentos de solução de macronutrientes apresentaram maior produção acumulada de metano ($633 \pm 3 \text{ mLCH}_4$), um aumento de 9,8% em relação aos reatores alimentados com solução nutricional. A Figura 9 apresenta a curva de produção acumulada de metano com os dados ajustados pelo modelo Gompertz modificado.

Figura 9 - Produção de metano nos reatores alimentados com glicerol, sob diferentes condições nutricionais. Legenda: G: Glicerol.

Fonte: Elaboração própria.

Para investigar possíveis causas que contribuíram com a redução da produção de metano nos reatores que receberam macronutrientes, avaliou-se a possibilidade de ter ocorrido inibição da metanogênese pelo excesso de amônia. Rajagopal, Massé e Singh (2013) destacam que um dos principais fatores que podem interferir na estabilidade da digestão anaeróbia pode ter relação com a corrente afluyente, sobretudo em função da sua composição e presença de compostos nitrogenados. Concentrações elevadas de amônia livre ou mesmo íons amônio

podem inibir diretamente enzimas produtoras de metano ou difundir-se na membrana celular, ocasionando o desequilíbrio de prótons e deficiência de potássio (WITTMANN; ZENG; DECKWER, 1995; GALLERT; BAUER; WINTER, 1998).

Nesse contexto, destaca-se que toda concentração de nitrogênio contida nos frascos reatores com glicerol provinham da solução de macronutrientes, dado que a fração bidestilada do composto não apresenta compostos nitrogenados. A adição de macronutrientes, em especial o cloreto de amônio, garantiu às amostras uma concentração de nitrogênio amoniacal total (TAN – em inglês, *Total Ammonia Nitrogen*) de 1 g.L⁻¹. Baseando-se na relação DQO:N:P para o cumprimento dos requisitos nutricionais descritos por Lettinga et al. (1997), observou-se relação de 1000:200:80 na condição supracitada, em contraste com a relação estabelecida pelos autores de 1000:5:1 para biomassa com elevado coeficiente de produção celular.

Apesar da elevada relação DQO:N:P na corrente afluyente, Hejnfelt e Angelidaki (2009) relatam que o fenômeno de inibição ocorre em condições cuja TAN seja superior a 1,5 g.L⁻¹. Procházka et al. (2012) e Sung e Liu (2003) observaram inibição às arqueias metanogênicas somente em concentrações acima de 4 g.L⁻¹. Não foram encontrados trabalhos científicos que apontassem os efeitos de inibição e/ou toxicidade para concentrações de nitrogênio amoniacal menores que 1,5 g.L⁻¹. Ainda, concentrações menores que 500 mg.L⁻¹ podem resultar na redução do rendimento de metano, perda de biomassa ou perda da atividade microbiana, sobretudo das arqueias metanogênicas acetoclásticas (PROCHÁZKA et al., 2012).

Além disso, alguns autores consideram o nitrogênio amoniacal livre (FAN – da sigla em inglês, *Free Ammonia Nitrogen*) a forma mais tóxica ao sistema de digestão anaeróbia. Sabe-se que alguns fatores contribuem para a conversão da forma ionizada de nitrogênio (N-NH₄⁺) em amônia (N-NH₃), como a temperatura, salinidade e, principalmente, o pH. Considerando que o pH dos reatores permaneceu próximo da neutralidade, apenas 1% da TAN encontrava-se na forma de amônia, reduzindo as chances de inibição por amônia nas amostras. Ressalta-se, ainda, que nos estudos supracitados com ocorrência de inibição por amônia verificou-se a presença de ácidos orgânicos voláteis no efluente, em contraste com os resultados observados nos reatores desta pesquisa, em que a concentração de ácidos orgânicos no final da operação em batelada permaneceu abaixo dos limites de detecção do método cromatográfico, inclusive para a digestão do glicerol.

Em reatores AnSBBR com recirculação, Lovato et al. (2019) avaliaram a produção de metano a partir da codigestão anaeróbia da vinhaça e glicerol, em diferentes proporções volumétricas, a 30°C. Com variação de COVa de 5 a 10 kgDQO.m⁻³.d⁻¹, os autores relataram que, embora o aumento na proporção volumétrica de vinhaça fosse capaz de reduzir a eficiência de remoção de matéria orgânica em função da presença de compostos recalcitrantes, observou-se redução na concentração de ácidos voláteis totais (AVT) no meio reacional em função do decréscimo da proporção de glicerol. Na presente pesquisa, não foram detectadas concentrações de ácidos orgânicos, tais como acético, propiônico, butírico e valérico no final da operação, que refletissem condições de instabilidade operacional, sugerindo que a codigestão anaeróbia prosseguiu adequadamente, com a produção e o consumo dos ácidos orgânicos.

Retomando-se a discussão acerca da hipótese de inibição por amônia, outro ponto a ser destacado foi a observância de que todas as condições propostas nos ensaios de batelada (item 5.1) alimentadas com solução nutricional apresentaram resultados experimentais muito próximos da produção teórica estimada para o metano, refutando a hipótese de inibição metanogênica por amônia. Entretanto, o volume de metano produzido na ausência de macronutrientes para a digestão do glicerol excedeu a produção teórica em 22%.

Aquino e Stuckey (2003) explicam que em condições de estresse do meio reacional, como a ausência de nutrientes, produtos microbianos solúveis (SMP – em inglês, *Soluble Microbial Products*), compostos orgânicos de biodegradabilidade mais lenta, podem ser excretados como resultado da lise celular e/ou como mecanismo para destinar os elétrons que não puderam ser utilizados na síntese de novas células pela deficiência nutricional. Em reatores em batelada operados sob condição mesofílica, os autores avaliaram a produção de metano e SMP em condições nutricionais distintas: adição de substrato e nutriente; ausência de metais traços; ausência de nitrogênio e fósforo; ausência de vitaminas; ausência de substrato (glucose) e adição de fosfato. Segundo os autores supracitados, a maior produção de SMP (> 700 mg.L⁻¹) ocorreu nos reatores com deficiência de N e P. Ao serem liberados no meio líquido, esses compostos orgânicos podem fornecer nutrientes e fatores de crescimento para a manutenção da atividade celular de outras comunidades microbianas. Inicialmente, os autores relataram que a velocidade de produção de metano foi menor nos reatores com deficiência de N e P, todavia, após alguns dias de operação, verificou-se o mesmo volume acumulado de metano em relação aos reatores alimentados com solução nutricional. Ademais, a concentração de ácidos voláteis permaneceu abaixo do limite de detecção na corrente efluente.

Apesar da limitação de estudos relacionando a deficiência nutricional com a produção de SMP e metano, com base no estudo de Aquino e Stuckey (2003) pode-se inferir que a falta de nutrientes nos reatores alimentados com glicerol possa ter contribuído com a morte celular, com o consequente aumento de carga orgânica e a excreção de SMP no meio, beneficiando o consórcio microbiano (bactérias fermentativas, acidogênicas, acetogênicas e metanogênicas) com a liberação de nutrientes essenciais à manutenção de suas atividades celulares, sobretudo às arqueias metanogênicas, explicando, portanto, a produção de metano observada com a limitação de N e P.

5.3 AVALIAÇÃO DA RESILIÊNCIA DA BIOMASSA NA PRODUÇÃO DE METANO

Neste item será discutida a resiliência da biomassa na produção de metano, baseando-se na troca dos substratos vinhaça e glicerol, conforme apresentado na seção anterior. A primeira condição a ser avaliada foram os reatores alimentados com 100% glicerol em biomassa previamente adaptada à vinhaça de cana-de-açúcar.

A Figura 10 apresenta os dados de produção acumulada de metano com a troca de vinhaça por glicerol purificado.

Figura 10 - Produção acumulada de metano após substituição da vinhaça por glicerol.
Legenda: V: Vinhaça e G: Glicerol.

Fonte: Elaboração própria.

Com a substituição da vinhaça por glicerol bidestilado, verificou-se que a produção acumulada de metano se manteve praticamente inalterada, todavia registrou-se aumento de 10,8% no rendimento de metano, com menor consumo de DQO em relação à monodigestão da vinhaça. Esse comportamento evidencia que o consórcio microbiano já adaptado à vinhaça foi capaz de degradar o glicerol sem causar prejuízos à metanogênese.

Não foram observadas diferenças significativas na velocidade de produção de metano com a mudança de substrato, mantendo-se um valor médio de $78,9 \text{ mLCH}_4 \cdot \text{d}^{-1}$. Entretanto, após a alimentação com glicerol, observou-se fase de latência de 0,64 d, valor similar ao observado nos reatores alimentados com glicerol sem adaptação prévia da biomassa na presente pesquisa.

Analogamente, para simular possível condição de retorno da alimentação com vinhaça, frascos reatores foram alimentados com 100% vinhaça a partir de biomassa previamente adaptada com glicerol. Neste caso, observaram-se decréscimos na produção acumulada e rendimento de metano equivalentes a 6 e 8%, respectivamente. Com a substituição do glicerol pela vinhaça, a velocidade de produção de metano sofreu decréscimo de 22,7%, atingindo média de $102,7 \text{ mLCH}_4 \cdot \text{d}^{-1}$ e não foi observada fase lag. A Figura 11 apresenta os dados da produção acumulada de metano com a adição de vinhaça em biomassa adaptada com glicerol.

Figura 11 - Produção acumulada de metano após substituição do glicerol pela vinhaça. Legenda: V: Vinhaça e G: Glicerol.

Fonte: Elaboração própria.

O estudo da resiliência da biomassa frente à substituição de substratos altamente energéticos com vistas à produção de bioenergia pode facilitar a compreensão dos processos de codigestão, possibilitando avaliar mudanças na diversidade das comunidades microbianas produtoras de biogás, ou até mesmo favorecer processos industriais já consolidados, como a indústria sucroalcooleira, por exemplo. O emprego da digestão anaeróbia da vinhaça nas usinas sucroalcooleiras enfrenta dificuldades no período de entressafra, período de parada programada das usinas de açúcar e álcool para promover ações de manutenção (preventiva, corretiva e preditiva). Na entressafra, cessa-se a produção do etanol e, por conseguinte, não há produção de vinhaça para alimentar os reatores anaeróbios que governam os processos de digestão. A interrupção na alimentação dos reatores anaeróbios por longos períodos pode retardar a repartida do reator, além de comprometer a diversidade microbiológica em função de mudanças na expressão gênica e nas propriedades fisiológicas do consórcio microbiano (KJELLVIEBERG et al., 1993; KONOPKA; ZAKHAROVA; NAKATSU, 2002).

Estudos recentes com o incremento de melaço em sistemas de codigestão anaeróbia com vinhaça vêm sendo realizados, simulando-se o período de entressafra. Barbosa (2017) avaliou a produção de metano com a substituição gradual da vinhaça por melaço diluído em reator UASB, com aumento de COV_a em condição mesofílica. A troca de vinhaça por melaço não causou prejuízos à produção volumétrica de metano, contudo o retorno da alimentação com vinhaça gerou instabilidade operacional no sistema em virtude da menor diversidade morfológica de microrganismos no meio líquido. Barros (2013) e Santana Junior (2013) também registraram queda na produção volumétrica de metano após o retorno da alimentação com vinhaça em reatores UASB alimentados com melaço.

Na presente pesquisa, a substituição de vinhaça por glicerol revelou aumento de 11% no rendimento de metano com menor consumo de DQO, enquanto a substituição de glicerol por vinhaça, 8% de redução, indicando possíveis mudanças na diversidade microbiológica na presença de glicerol. Os resultados evidenciam que as populações microbianas desenvolvidas em ambos os reatores apresentaram capacidade de degradar a vinhaça e o glicerol, abrindo perspectivas para beneficiar processos industriais consolidados no mercado, além de promover a destinação sustentável de resíduos do setor de biocombustíveis. Novos testes para acompanhar os sistemas de digestão anaeróbia em condições de permuta de substratos altamente energéticos em reatores contínuos permitirão afirmar que a permuta pode constituir alternativas sustentáveis

e eficientes na produção de bioenergia, considerando que a sucessão ecológica ocorrerá de maneira mais intensa com a troca contínua do meio reacional.

5.4 CONSIDERAÇÕES FINAIS – ENSAIOS EM BATELADA

Os resultados associados à operação dos reatores anaeróbios em regime de batelada fundamentaram duas escolhas importantes nas etapas subsequentes deste estudo: a) a determinação da proporção 50% vinhaça e 50% glicerol a ser aplicada no reator contínuo de fase única, baseando-se nos registros de remoção de matéria orgânica (97%) e rendimento de metano; e b) a adoção de estratégias na operação do reator contínuo, como a ausência de solução nutricional no sistema de codigestão anaeróbia da vinhaça e glicerol e a aplicação de menor dosagem de alcalinizante ($0,2 \text{ gNaHCO}_3 \cdot \text{g}^{-1} \text{DQO}$), considerando a ausência de ácidos orgânicos na corrente efluente aos reatores aliada à elevada eficiência de remoção de matéria orgânica.

5.5 DESEMPENHO DO REATOR AnSTBR: MONITORAMENTO DAS CORRENTES LÍQUIDA E GASOSA

Os subprodutos do setor de biocombustíveis, vinhaça e glicerol, foram utilizados na alimentação do reator de leito fixo estruturado (AnSTBR) operado a 30°C , nas condições previamente descritas na seção 4.4, buscando-se avaliar o sistema de codigestão em termos de estabilidade operacional do reator e monitoramento contínuo das correntes líquida, com a eficiência de remoção de matéria orgânica; e gasosa, com a produção de metano.

5.5.1 Fase líquida: Estabilidade Operacional e Remoção de Compostos Orgânicos

Condições crescentes de COVa foram aplicadas no reator — 0,5, 1,0, 2,0, 3,5 e 5,0 $\text{kgDQO} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{d}^{-1}$ —, cuja operação perdurou 105 dias com TDH de 24 horas, de maneira que a COVa máxima compreendeu 5,0 $\text{kgDQO} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{d}^{-1}$, baseando-se na estabilidade operacional dos reatores anaeróbios reportada em trabalhos desenvolvidos no Laboratório de Pesquisas Biológicas (USP/LPB) (ALVES, 2015; BARBOSA, 2017).

A Tabela 12 apresenta os dados gerais de monitoramento do reator referentes à estabilidade operacional, remoção de matéria orgânica e produção de biogás para cada COVa ao reator.

Tabela 12 - Dados referentes ao monitoramento do reator AnSTBR, em termos de estabilidade operacional, remoção de matéria orgânica e produção de metano.

COVa (kg.m ⁻³ .d ⁻¹)		0,5	1,0	2,0	3,5	5,0
Variável-resposta	Unidade					
pH	(-)	6,5 ± 0,1	6,8 ± 0,3	7,2 ± 0,2	7,3 ± 0,1	7,1 ± 0,1
AI/AP	(-)	0,37 ± 0,1	0,69 ± 0,3	0,23 ± 0,03	0,31 ± 0,1	0,27 ± 0,1
ERDQOt	(%)	73,6 ± 6,5	81,5 ± 2,5	80,2 ± 3,1	75,8 ± 3,4	75,5 ± 4,9
ERDQOs	(%)	82,6 ± 3,9	83,6 ± 1,9	81,9 ± 2,7	77 ± 4,1	79,8 ± 3,5
Conteúdo de CH ₄	(%)	ND	81,6 ± 1,5	71,7 ± 1,1	65,3 ± 2,1	61,9 ± 1,5
VMM	(mmolCH ₄ .d ⁻¹)	ND	0,5 ± 0,2	15,3 ± 8,3	29,8 ± 3,3	7,4 ± 4,4
PVM	(mLCH ₄ .L ⁻¹ .d ⁻¹)	ND	11 ± 4	402 ± 137	668 ± 73	166 ± 98
MY*	(mLCH ₄ .g ⁻¹ DQOr ^a)	ND	15 ± 7	171 ± 96	210 ± 31	40 ± 21

Notas: *Condições normais de temperatura e pressão (CNTPs - 0°C, 1 atm); ^aCalculado a partir remoção de DQO total. Siglas – Variáveis-resposta: pH = pH medido na corrente efluente. Razão AI/AP = razão alcalinidade intermediária/alcalinidade parcial, ERDQOt = eficiência de remoção de DQO total, ERDQOs = eficiência de remoção de DQO solúvel, VMM = vazão molar de metano, PVM = produção volumétrica de metano, MY = rendimento de metano.

Com base na razão AI/AP para a investigação da estabilidade operacional, destaca-se que o reator apresentou variações crescentes desde sua partida até o 45º dia, atingindo maior pico na COVa de $1,0 \text{ kgDQO.m}^{-3}.\text{d}^{-1}$, com razão estabelecida em 0,74, conforme dados da Figura 12.c. A relação AI/AP manteve-se instável no início da operação, comportamento associado ao desenvolvimento da população metanogênica para manutenção do equilíbrio da digestão anaeróbia. A partir do 46º dia, a relação AI/AP manteve-se praticamente constante, com valores entre 0,2 e 0,4, indicando estabilidade do sistema (RIPLEY; BOYLE; CONVERSE, 1986).

Yang, Tsukahara e Sawayama (2008) observaram queda de pH de 8,0 para 5,4 nos primeiros 55 dias de operação do reator APBR, alimentado com meio sintético composto por glicerol e solução nutricional, e COVa entre $0,25\text{-}1,0 \text{ kgDQO.m}^{-3}.\text{d}^{-1}$ em condição mesofílica, associado à rápida acidificação do substrato. Conforme já discutido nos ensaios anteriores, o glicerol é um composto orgânico prontamente biodegradável e não contribui com a alcalinidade no meio reacional, podendo acelerar o processo de acidificação do sistema e afetar negativamente as comunidades de arqueias metanogênicas.

Neste estudo, optou-se pela partida do reator com baixa dosagem de bicarbonato de sódio no afluente, permitindo a adaptação gradual da biomassa, apoiado no conceito de autocontrole do processo, em que a produção e consumo de ácidos orgânicos precisam ser mantidos para a estabilidade do sistema. O monitoramento da alcalinidade e da concentração de CO_2 no biogás constitui importante ferramenta de operação, permitindo reduzir a COVa anteriormente ao desequilíbrio irreversível do processo. Destaca-se que águas residuárias de elevadas concentrações e ricas em carboidratos oferecem maior risco de acidificação em reatores anaeróbios. Para elevação da capacidade tampão do reator, aumentou-se a concentração de 0,2 para 0,5, refletindo no aumento da disponibilidade de álcali (Figura 12.b).

As quedas pontuais do pH efluente ocorreram como resposta do sistema ao aumento de COVa ao reator, uma vez que os organismos consumidores de ácidos necessitam se organizar para o novo aporte de carga orgânica. O reator AnSTBR foi operado com pH afluente médio de $7,3 \pm 0,3$ e pH efluente de $6,9 \pm 0,4$ (Figura 12.a). As quedas de pH também estiveram associadas ao aumento da concentração de AVT, em função do incremento de COVa. As Figuras 12.a, 12.b e 12.c apresentam os resultados para o monitoramento da fase líquida do reator em termos de pH, alcalinidade parcial (AP), relação alcalinidade intermediária e parcial (AI/AP).

Figura 12 - Monitoramento da fase líquida do reator metanogênico (AnSTBR), em termos de: a) pH afluente e efluente; b) alcalinidade parcial (AP) e c) razão alcalinidade intermediária/parcial (AI/AP). Legenda: afluente (-▲-), efluente (-■-) e $[\text{HCO}_3^-]$ no afluente (-x-).

Fonte: Elaboração própria.

As concentrações médias de AVT, por titulometria, para o afluente foram de 33 ± 10 ; 117 ± 21 ; 346 ± 28 ; 323 ± 68 e 275 ± 56 mg.L^{-1} para as COVa de 0,5, 1,0, 2,0 3,5 e 5,0 $\text{kgDQO.m}^{-3}.\text{d}^{-1}$, respectivamente. Apresentando comportamento similar, as concentrações médias de AVT para o efluente foram de 56 ± 14 ; $149,2 \pm 28$; 308 ± 19 ; 366 ± 129 e 368 ± 101

mgHAc.L⁻¹, com destaque para as maiores variações observadas nas COVa de 3,5 e 5,0 (Figura 13). Os valores de AVT efluente se aproximam do resultado reportado por Lovato et al. (2015), com valores médios entre 107 e 325 mgHAc.L⁻¹ observados para a codigestão do glicerol com soro de queijo na COVa de 7,5 kgDQO.m⁻³.d⁻¹. Segundo os autores citados, a adição de glicerol eleva a fração prontamente biodegradável do meio, contribuindo com o aumento nos valores de AVT. A Figura 13 apresenta os dados de produção de ácidos voláteis ao longo da operação.

Figura 13 - Produção de ácidos voláteis totais (AVT) em função do tempo. Legenda: efluente (-■-) e [COVa] (-*-).

Fonte: Elaboração própria.

Examinando-se o perfil de remoção de DQO total (DQOt), constatou-se que os primeiros dias de operação do reator (COVa de 0,5 kg.m⁻³.d⁻¹) apresentaram as maiores variações de eficiência de remoção, com valor médio de $73,6 \pm 6,5\%$. Com a mudança de COVa para 1,0 kg.m⁻³.d⁻¹, nota-se que logo o reator aumentou sua eficiência de remoção de matéria orgânica bruta e solúvel, com valores médios de $81,5 \pm 2,5\%$ e $83,7 \pm 1,9\%$, respectivamente, indicando a adaptação da biomassa às condições de operação (Figura 14.a).

De maneira geral, a análise temporal de remoção de DQO por fases demonstrou que mesmo com o incremento da carga orgânica aplicada ao reator, a remoção manteve-se praticamente estável em todas as fases, com médias acima de 70%. As Figuras 14.a e 14.b apresentam, respectivamente, as concentrações de DQOt e as eficiências de remoção de DQO total (DQOt) e solúvel (DQOs) ao longo da operação.

Figura 14 - Perfil temporal para: a) remoção de matéria orgânica para as diferentes COVa no reator, e b) eficiência de remoção de DQO total e solúvel. Legenda: afluente (-▲-); efluente (-■-); eficiência de remoção DQO total (-*-); eficiência de remoção de DQO solúvel (ERDQOs) (-○-); e eficiência de remoção de DQO total (ERDQOt) (-●-)

Fonte: Elaboração própria.

Na Tabela 13 são apresentados dados de ajustes de alcalinidade e remoção de matéria orgânica bruta e solúvel em estudos de digestão e codigestão anaeróbia empregando vinhaça e glicerol, com COVa de até $7,5 \text{ kg} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{d}^{-1}$, em condição mesofílica.

Tabela 13 - Ajustes de alcalinidade e remoção de matéria orgânica em sistemas anaeróbios operados com vinhaça e/ou glicerol (continua).

Referência	Características do Processo	Remoção de MO (%)
Este trabalho (vinhaça diluída e glicerol destilado)	Reator: AnSTBR	ERDQOt = $82 \pm 3\%$ (COV= 1,0)
	DQO = $1,0 - 5,0 \text{ g.L}^{-1}$	ERDQOs = $84 \pm 2\%$ (COV= 1,0)
	COVa = $1,0 - 5,0 \text{ kg.m}^{-3}.\text{d}^{-1}$	
	T = 30°C	ERDQOt = $75 \pm 5\%$ (COV= 5,0)
	NaHCO₃/DQO = $0,2 - 0,5 \text{ g.g}^{-1}\text{DQO}$	ERDQOt = $80 \pm 4\%$ (COV= 5,0)
Boncz et al. (2012) (vinhaça diluída)	Reator = UASB	ERDQOt = ND
	DQO = $8,0 \text{ g.L}^{-1}$	ERDQOs = 96%
	COVa = $4,0 \text{ kg.m}^{-3}.\text{d}^{-1}$	
	T = 37°C	
	NaHCO₃/DQO = $0,8 \text{ g.g}^{-1}\text{DQO}$	
Albarez et al. (2016) (vinhaça diluída)	Reator = AnSBBR	ERDQOt = $82 \pm 2\%$
	DQO = $5,0 \text{ g.L}^{-1}$	ERDQOs = $83 \pm 2\%$
	COVa = $5,54 \text{ kg.m}^{-3}.\text{d}^{-1}$	
	T = $30 \pm 1^{\circ}\text{C}$	
	NaHCO₃/DQO = $0,5 - 1,0 \text{ g.g}^{-1}\text{DQO}$	
Vlassis et al. (2013) (glicerol bruto)	Reator = CSTR e PABR	ERDQOt = 94% (CSTR)
	DQO = $5 - 37,5 \text{ g.L}^{-1}$	95% (PABR)
	COVa = $0,25 \text{ a } 0,5 \text{ kg.m}^{-3}.\text{d}^{-1}$ (CSTR)	ERDQOs = ND
	$1,0 \text{ a } 3,75 \text{ kg.m}^{-3}.\text{d}^{-1}$ (PABR)	
	T = 35°C	
	NaHCO₃/DQO = $1,0 - 0,5 \text{ g.g}^{-1}\text{DQO}$ (CSTR)	
	$0,5 - 0,15 \text{ g.g}^{-1}\text{DQO}$ (PABR)	
Sousa et al. (2019) (vinhaça e soro de queijo)	Reator = AnSBBR	ERDQOt = $92 \pm 1\%$
	DQO = $5,0 \text{ g.L}^{-1}$	ERDQOs = $93 \pm 0,9\%$
	COVa = $5,0 \text{ kg.m}^{-3}.\text{d}^{-1}$	
	T = 30°C	
	NaHCO₃/DQO = $1 - 0,05 \text{ g.g}^{-1}\text{DQO}$	

Tabela 13 - Ajustes de alcalinidade e remoção de matéria orgânica em sistemas anaeróbios operados com vinhaça e/ou glicerol (conclusão) .

Lovato et al. (2018) (vinhaça e soro de queijo)	Reator = AnSBBR	ERDQOt = 81,7 ± 2%
	DQO = 5,0 g.L ⁻¹	ERDQOs = 85,7 ± 2,1%
	COVa = 6,4 kg.m ⁻³ .d ⁻¹	
	T = 30 °C	
	NaHCO₃/DQO = 0,7g.g⁻¹DQO	
Lovato et al. (2015) (glicerol e soro de queijo)	Reator = AnSBBR	ERDQOt = ND
	DQO = 5,0 g.L ⁻¹	ERDQOs = 92,3 ± 2
	COVa = 7,5 kg.m ⁻³ .d ⁻¹	
	T = 30 °C	
	NaHCO₃/DQO = 0,7g.g⁻¹DQO	
Lovato et al. (2019) (glicerol e vinhaça de cana-de açúcar)	Reator = AnSBBR	ERDQOt = 91± 4
	DQO = 5,0 g.L ⁻¹	ERDQOs = 92± 4
	COVa = 5,0 kg.m ⁻³ .d ⁻¹	
	T = 30 °C	
	NaHCO₃/DQO = 0,5g.g⁻¹DQO	

Siglas – Características do processo: DQO = demanda química de oxigênio, COVa = carga orgânica volumétrica aplicada, T = temperatura, ND = valores não definidos, Reator: AnSBBR = *anaerobic sequencing biofilm batch reactor*, APBR = *anaerobic packed-bed reactor*, AnSTBR = *anaerobic structured-bed reactor*, CSTR = *continuous-stirred reactor*, PABR = *periodic anaerobic baffled reactor*, UASB = *upflow anaerobic sludge blanket reactor*.

Apesar da ausência de estudos acerca da codigestão de vinhaça e glicerol em reatores de leito fixo, é possível observar o desempenho satisfatório dos reatores metanogênicos em termos da remoção de matéria orgânica nos trabalhos reportados na Tabela 13, quer no sistema de digestão, quer para a codigestão da vinhaça e glicerol com outros substratos altamente energéticos.

Em termos de conversão de carboidratos totais, observou-se que a partir da COVa de 2 kg.m⁻³.d⁻¹, a eficiência de conversão manteve-se próxima a 90%. A Figura 15.a apresenta os dados de conversão de carboidratos nas diferentes cargas aplicadas.

Figura 15 - Monitoramento do reator quanto: a) à remoção de carboidratos totais no reator, e b) ao consumo de glicerol em função da COVa. Legenda: afluente (-▲-), efluente (-■-), eficiência de remoção de carboidratos (ERCH) (-*-) e eficiência de remoção de glicerol (ERG) (-*-).

Fonte: Elaboração própria.

De maneira simplificada, pode-se inferir que o desempenho do reator para a conversão de carboidratos não sofreu influência direta do desequilíbrio no sintrofismo da digestão anaeróbia, considerando a eficiência na degradação dos compostos orgânicos e a consequente produção de ácidos orgânicos pelas bactérias acidogênicas.

Analogamente, a eficiência de remoção do glicerol (Figura 15.b) manteve-se elevada ($99,7 \pm 0,6\%$) ao longo da operação. Resultados semelhantes foram reportados por Lovato et

al. (2019; 2015) em reatores metanogênicos expostos ao sistema de codigestão anaeróbia com glicerol, em condições mesofílicas.

Quanto à eficiência de remoção de sulfato (ERSO_4^{-2}), a partir da COVa de $2 \text{ kg.m}^{-3}.\text{d}^{-1}$ observou-se o estabelecimento da sulfetogênese, com eficiência de remoção acima de 90%. Destaca-se que o lodo utilizado como inóculo, as características dos cossustratos de alimentação e o incremento de cargas foram adequados para estabelecimento estável da sulfetogênese, como apontam os dados da Figura 16. A Figura 16 ilustra os dados das concentrações de sulfato nas correntes afluyente e efluente, bem como sua eficiência mínima de remoção.

Figura 16 - Concentração de sulfato nas amostras líquidas ao longo da operação. Legenda: afluyente (-▲-), efluente (-■-), eficiência de remoção de sulfato (ERSO_4^{-2}) (-*-).

Fonte: Elaboração própria.

As razões $\text{DQO}/\text{SO}_4^{-2}$ mantiveram-se próximas a 25 para todas as fases estudadas. Em linhas gerais, conclui-se que houve o estabelecimento da sulfetogênese no reator, todavia a fração da matéria orgânica na forma de DQO removida pela via sulfetogênica variou entre 1,9 e 3,2%, indicando baixo fluxo de elétrons estabelecido na competição de substrato com as BRS (KIYUNA; FUESS; ZAIAT, 2017).

5.5.2 Fase gasosa: Desempenho do AnSTBR na Produção e Rendimento de Metano

A produção de metano foi monitorada a partir do 31º dia de operação, período em que o reator de leito fixo apresentava COVa de $1,0 \text{ kg.m}^{-3}.\text{d}^{-1}$. Observaram-se decréscimos na

porcentagem de metano com o incremento da COVa, variando de $81,6 \pm 1,5\%$ para COVa de $1,0 \text{ kg.m}^{-3}.\text{d}^{-1}$ a $61,9 \pm 1,5\%$ a partir da COVa de $3,5 \text{ kg.m}^{-3}.\text{d}^{-1}$. Ressalta-se que os desvios-padrões em cada aplicação de carga orgânica volumétrica mantiveram-se abaixo de 2%. A Figura 17 apresenta a composição do biogás no reator AnSTBR em função do tempo operacional.

Figura 17 - Composição do biogás no reator AnSTBR. Legenda: CH_4 (-■-) e CO_2 (-□-)

Fonte: Elaboração própria.

Com o aumento na dosagem de bicarbonato de sódio para $0,5 \text{ gNaHCO}_3.\text{g}^{-1}\text{DQO}$ no 46º dia, notou-se um incremento de 5% de CO_2 no conteúdo total do biogás ainda na COVa de $1,0 \text{ kg.m}^{-3}.\text{d}^{-1}$. A partir da COVa de $3,5 \text{ kg.m}^{-3}.\text{d}^{-1}$, o aumento da proporção de CO_2 no biogás esteve associado ao crescente acúmulo de ácidos orgânicos no sistema no período correspondente, em função do consumo da alcalinidade do meio.

Em termos quantitativos, observou-se baixa produção de metano associada à carga orgânica e rendimento de metano aquém do potencial na COVa de $1,0 \text{ kgDQO.m}^{-3}.\text{d}^{-1}$, comportamento que pode estar associado ao desvio de energia para a síntese celular. Na Figura 18 são apresentados os dados temporais referentes à VBG, PVM, VMM e MY obtidos ao longo da operação do reator.

A partir do 50º dia de operação, ao final da COVa de $1,0 \text{ kgDQO.m}^{-3}.\text{d}^{-1}$, as produções de biogás (VBG) e de metano (PVM, VMM e MY) aumentaram paulatinamente, estabelecendo-

se a digestão anaeróbia. Os valores médios de vazão do biogás (VBG) foram de 42 ± 17 ; 1518 ± 599 ; 3281 ± 422 e 853 ± 499 para as COVa de 1,0, 2,0, 3,5 e 5,0 $\text{kg.m}^{-3}.\text{d}^{-1}$, respectivamente.

A produção volumétrica de metano (PVM) nas condições CNTP também aumentou com o incremento de carga orgânica, contudo apresentou comportamento decrescente a partir da COVa de 3,5 $\text{kg.m}^{-3}.\text{d}^{-1}$, indicando possível acúmulo de ácidos orgânicos, tópico abordado no próximo item. A priori, infere-se que os ácidos orgânicos produzidos em função do aumento de COVa e, sobretudo, favorecidos pela oxidação do glicerol, possam ter desequilibrado os processos acetogênico e metanogênico, todavia mantendo-se a eficiência de remoção de matéria orgânica bruta e solúvel na forma de DQO acima de 70%.

O maior valor médio de PVM para o reator AnSTBR foi encontrado na COVa de 3,5 $\text{kg.m}^{-3}.\text{d}^{-1}$ equivalente a $668 \pm 73 \text{ mLCH}_4.\text{L}^{-1}.\text{d}^{-1}$ (mínimo e máximo de 536 e 775 $\text{mLCH}_4.\text{L}^{-1}.\text{d}^{-1}$, respectivamente). A partir da Figura 18.c, verifica-se que logo no início da mudança de COVa de 3,5 para 5,0 $\text{kg.m}^{-3}.\text{d}^{-1}$, no 92º dia de operação, registrou-se queda acentuada de PVM, que atingiu o valor de 304 $\text{mLCH}_4.\text{L}^{-1}.\text{d}^{-1}$ no início da COVa de 5,0. Este comportamento possivelmente está associado ao desvio da rota metabólica para o anabolismo, necessário para amortecer as cargas aplicadas, contribuindo para a manutenção da eficiência de remoção de DQO. Destaca-se que até o início da COVa de 3,5 $\text{kg.m}^{-3}.\text{d}^{-1}$, a relação AI/AP manteve-se estável e próxima a 0,2, indicando que os AVT produzidos permaneciam sendo consumidos no sistema.

As Figuras 18.a, 18.b, 18.c e 18.d apresentam os resultados referentes ao monitoramento da corrente gasosa do reator AnSTBR, em termos de vazão de biogás, vazão molar de metano, produção volumétrica de metano e rendimento de metano, respectivamente.

Figura 18 - Resultados observados para: a) vazão de biogás (VBG); b) vazão molar de metano (VMM); c) produção volumétrica de metano (PVM), e d) rendimento de metano (MY).

Fonte: Elaboração própria.

Com relação aos dados de rendimento de metano na presente pesquisa, verificou-se comportamento similar à PVM, com valores médios obtidos experimentalmente aquém do valor teórico ($350 \text{ mLCH}_4.\text{g}^{-1}\text{DQOr}$) para a COVa de $1,0 \text{ kg.m}^{-3}.\text{d}^{-1}$ ($15 \pm 7 \text{ mLCH}_4.\text{g}^{-1}\text{DQOr}$), atingindo valores crescentes dobrando-se a COVa ($171 \pm 96 \text{ mLCH}_4.\text{g}^{-1}\text{DQOr}$). Destaca-se que o maior rendimento de metano foi observado no 66º dia de operação, com valor médio de $309 \text{ mLCH}_4.\text{g}^{-1}\text{DQOr}$, correspondente a 88,4% do valor teórico na CNTP.

Direcionando a análise dos dados de rendimento de metano para os reatores de leito fixo em condições mesofílicas, verifica-se que os maiores valores médios obtidos experimentalmente neste estudo ($171 - 210 \text{ mLCH}_4.\text{g}^{-1}\text{DQOr}$, Tabela 13), mostraram-se próximos aos valores reportados na literatura, considerando a aplicação da digestão anaeróbia no tratamento de vinhaça bruta: $181 - 253 \text{ mLCH}_4.\text{g}^{-1}\text{DQOr}$ (BORIES; RAYNAL; BAZILE, 1988 – vinhaça de melaço, operação a 37°C), $170 \text{ mLCH}_4.\text{g}^{-1}\text{DQOr}$ (SHRIHARI; TARE, 1989 – vinhaça de melaço, operação a 35°C); e no tratamento do glicerol puro: $270 \text{ mLCH}_4.\text{g}^{-1}\text{DQOr}$ (YANG; TSUKAHARA; SAWAYAMA, 2008 – água residuária sintética rica em glicerol puro, operação a 35°C).

Outro fator preponderante a ser considerado na avaliação da produção volumétrica e rendimento de metano para a codigestão da vinhaça e glicerol é o tempo de operação aplicado às mudanças de carga orgânica volumétrica. É possível que períodos maiores de operação associados à mudança de COVa em sistemas de fase única permitam melhores condições adaptativas ao consórcio microbiano, favorecendo o crescimento da biomassa e a manutenção do equilíbrio no sintrofismo entre as comunidades anaeróbias.

Nartker et al. (2014) suplementaram o glicerol da indústria de biodiesel ao lodo de esgoto primário, com o objetivo de aumentar a produção de gás e o conteúdo de metano no biogás por meio de um processo contínuo de codigestão anaeróbia. O glicerol foi adicionado continuamente ao reator CSTR (*Continuous Stirred Tank Reactor* — em português, reator anaeróbio continuamente agitado) em diferentes proporções, variando-se gradualmente de 0 a 60% do total de COVa, em $\text{kgSSV.m}^{-3}.\text{d}^{-1}$. Sob essas condições, a operação do reator permaneceu equilibrada e estável, elevando a produção de metano de $0,35$ para $0,92 \text{ LCH}_4.\text{g}^{-1}\text{SSV.d}^{-1}$. No entanto, o aumento da proporção de glicerol para 70% da COVa total (em termos de massa de SSV) causou efeito inibitório às arqueias metanogênicas em função do acúmulo de HPr no sistema. Por conseguinte, o estudo sugere que altas cargas de glicerol podem ser melhor

manipuladas desde que sua suplementação seja gradual, de modo que permita a adaptação das comunidades microbianas.

Nesse ponto, pode-se apresentar como alternativa para a manutenção da estabilidade operacional em sistemas de codigestão, a aplicação da estratégia de separação de fases que permita o balanceamento entre as populações acidogênicas e metanogênicas, evitando o acúmulo de ácidos orgânicos em função da rápida velocidade de acidificação dos cossustratos (HARPER e POHLAND, 1986). A aplicação de uma fase acidogênica separada para a vinhaça e o glicerol possibilitaria o controle eficiente da produção e aplicação de ácidos na fase subsequente, favorecendo o processo metanogênico. Nesse contexto, rendimentos de metano superiores poderiam ser obtidos por meio da pronta disponibilização de acetato à biomassa metanogênica, potencializando a recuperação de energia do sistema anaeróbio a partir da geração de metano, quer em regime mesofílico, quer em condições termofílicas de operação (LEE e CHUNG, 2010).

5.5.3 Avaliação dos Metabólitos Solúveis no Sistema de Codigestão

Analisando-se a Figura 19.a, verifica-se que na menor COVa testada estabeleceram-se baixas concentrações de ácido acético ($\text{HAc} < 5 \text{ mg.L}^{-1}$) e as concentrações de ácido propiônico (HPr) mantiveram-se próximas de $29 \pm 10 \text{ mg.L}^{-1}$, configurando uma relação HPr/HAc equivalente a 12,1. Este comportamento evidencia aumento na pressão parcial de hidrogênio, causado pela ineficiência da população de arqueias metanogênicas hidrogenotróficas e bactérias homoacetogênicas. As Figuras 19.a e 19.b apresentam a concentração de ácidos orgânicos no efluente e a proporção destes nas diferentes cargas, respectivamente.

Com COVa no reator de $1,0 \text{ kg.m}^{-3}.\text{d}^{-1}$, observou-se pico de 49 mg.L^{-1} de HPr no 38º dia de operação, constituindo 58,1% da DQO efluente. Convém destacar que o desempenho do sistema pode estar intrinsecamente relacionado às características composicionais dos cossustratos utilizados, com destaque para o glicerol, cuja elevada biodegradabilidade favorece condições de rápida acidificação do meio reacional, sobretudo com a produção excessiva de ácido propiônico a partir da atuação de três gêneros principais de bactérias: *Propionibacterium acidipropionici*, *Propionibacterium acnes* e *Clostridium propionicum* (BARBIRATO; CHEDAILLE; BORIES, 1997).

Figura 19 - Monitoramento dos metabólitos solúveis na corrente efluente, quanto: a) à concentração de metabólitos, em mg.L^{-1} ; e b) à distribuição dos metabólitos, em %.
Legenda: ácido acético (-■-) e ácido propiônico (-▨-).

Fonte: Elaboração própria.

Como esperado, o aumento na dosagem de bicarbonato no afluente de 0,2 para 0,5 $\text{gNaHCO}_3.\text{g}^{-1}\text{DQO}$ ao final da COVa de 1,0 $\text{kg.m}^{-3}.\text{d}^{-1}$ proporcionou melhores condições relativas à manutenção da atividade celular com o ajuste de pH próximo da neutralidade. Em termos de relação HPr/HAc, observou-se redução na proporção de HPr na corrente efluente ao longo da COVa de 1,0 $\text{kg.m}^{-3}.\text{d}^{-1}$, culminando na relação média de HPr/HAc de 1,7. Hill, Cobb e Bolte (1987) apresentaram valores menores que 1,4 para a razão HPr/HAc como referência para previsão da estabilidade operacional em sistemas anaeróbios. Embora a relação estabeleça

uma medida direta e rápida acerca do desempenho do reator, deve-se ter cautela na adoção de parâmetros de referência para a avaliação da estabilidade operacional — assim como na razão AI/AP —, dado que cada sistema apresenta suas particularidades em função da natureza e complexidade do(s) substrato(s), bem como condições operacionais diversas (AHRING et al., 1995).

Considerando-se a dinâmica de ácidos orgânicos na COVa de $2,0 \text{ kg.m}^{-3}.\text{d}^{-1}$, verificou-se redução na relação HPr/HAc para 0,7, embora os valores de HPr permanecessem ascendentes até o 64º dia. No 66º dia, a razão HPr/HAc foi de 0,5, coincidindo com o período no qual o reator apresentou melhor rendimento de metano ($309 \text{ mLCH}_4.\text{g}^{-1}\text{DQOr}$), indicando que o fluxo de elétrons para metanogênese ocorria predominantemente.

Com o aumento da COVa para $3,5 \text{ kg.m}^{-3}.\text{d}^{-1}$, observou-se aumento na concentração de propionato, conforme ilustra a Figura 19.a, atingindo valores médios de 242 ± 72 e $319 \pm 45 \text{ mg.L}^{-1}$ para as COVa de 3,5 e 5,0, respectivamente, evidenciando o aumento da pressão parcial de hidrogênio, com prejuízo à atividade acetogênica. Nesse ponto, destaca-se que as reações acetogênicas a partir do propionato e butirato só poderão ocorrer efetivamente se os produtos formados, hidrogênio e acetato, permanecerem em baixas concentrações, graças à ação dos microrganismos consumidores de acetato (arqueias metanogênicas acetoclásticas) e hidrogênio (arqueias metanogênicas hidrogenotróficas).

Segundo Mosey (1983), o acúmulo dos ácidos butírico e propiônico em sistemas metanogênicos surge como resposta das comunidades microbianas ao excesso de hidrogênio associado ao aumento de carga orgânica. De acordo com Sunyoto et al. (2016), a energia necessária para a oxidação do HPr a HAc ($\Delta G = +76,1 \text{ kJ.mol}^{-1}$) é substancialmente maior em relação à requerida para a conversão do HBu a HAc ($\Delta G = +48,1 \text{ kJ.mol}^{-1}$). Dessa forma, a taxa de produção de HAc por meio da oxidação do HPr torna-se reduzida, comprometendo a produção de metano pelas arqueias metanogênicas acetoclásticas, como discutido no item 5.5.2.

Similarmente à produção de HPr, valores crescentes de HAc no efluente foram observados com o incremento de COVa no sistema. Na Tabela 14, nota-se que os maiores desvios-padrões para os ácidos acético e propiônico na corrente efluente ocorreram na COVa de $3,5 \text{ kg.m}^{-3}.\text{d}^{-1}$, indicando aumento na produção de ácidos logo após a mudança de carga orgânica e o consumo destes ao longo da aplicação da carga. O mesmo comportamento pode ser observado na Figura 13, com o decaimento dos AVT para a referida COVa. Entretanto, na

COVa de $5,0 \text{ kg.m}^{-3}.\text{d}^{-1}$, verificam-se maiores valores de AVT, o que reflete o desequilíbrio nas taxas de produção e consumo dos ácidos intermediários. Novamente, é possível que a aplicação de maiores intervalos de tempo para cada COVa permita o reestabelecimento das condições de equilíbrio entre as comunidades produtoras e utilizadoras de ácidos.

A Tabela 14 apresenta as concentrações médias de ácidos orgânicos no reator AnSTBR ao longo da operação.

Tabela 14 - Concentrações médias dos metabólitos solúveis nas correntes afluenta e efluente.

COVa ($\text{kg.m}^{-3}.\text{d}^{-1}$)	0,5	1,0	2,0	3,5	5,0
Ácidos Orgânicos (mg.L^{-1})	afluente				
HPr	< LD	6 ± 6	< LD	9 ± 11	< LD
HAc	< LD	14 ± 14	2 ± 48	184 ± 55	39 ± 27
HVa	< LD	< LD	< LD	< LD	< LD
M-OH	< LD	< LD	< LD	< LD	< LD
Et-OH	5 ± 2	27 ± 29	59 ± 34	162 ± 33	27 ± 9
	efluente				
HPr	29 ± 10	44 ± 4	90 ± 24	242 ± 72	319 ± 45
HAc	1 ± 1	27 ± 3	124 ± 6	287 ± 88	334 ± 66
HVa	< LD	< LD	< LD	1 ± 2	4 ± 3
M-OH	< LD	< LD	< LD	$2 \pm 3^*$	< LD
Et-OH	< LD	< LD	4 ± 10	2 ± 5	< LD

Notas: *Detectada a presença de metanol na corrente efluente nos dias 71° e 73°; Siglas – Ácidos Orgânicos: HPr = ácido propiônico, HAc = ácido acético, HVa = ácido valérico, M-OH = metanol, Et-OH = etanol, LD = limite de detecção do cromatógrafo gasoso (1 mg.L^{-1}).

Fonte: Elaboração própria.

Barbosa (2017) ao propor o sistema de codigestão da vinhaça de cana-de-açúcar e melaço em reator UASB constatou o crescente acúmulo de ácidos orgânicos com o incremento de melaço em relação à monodigestão anaeróbia da vinhaça, motivando a adoção de estratégias operacionais que incluíram o aumento na dosagem de alcalinizante de 0,3 para $0,7 \text{ gNaHCO}_3.\text{g}^{-1}\text{DQO}$ a fim de promover a neutralização dos ácidos, bem como o aumento gradual de carga para permitir a adaptação da biomassa metanogênica para COVa acima de $10 \text{ kg.m}^{-3}.\text{d}^{-1}$. Segundo a autora, o aumento na proporção de melaço comparativamente à quantidade de carboidratos acelerou o processo de acidificação do sistema.

Vlassis et al. (2013) analisaram a produção de metano em reator CSTR, alimentado com glicerol puro, aplicando-se uma DQO inicial de 5000 mg.L^{-1} e COVa de $0,25 \text{ gDQO.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$ a

35°C. Nesta condição, obteve-se rendimento de metano de 300 mLCH₄.g⁻¹DQO_{ad}. e remoção de 94% de matéria orgânica. Contudo, em cargas maiores que 0,25 gDQO.L⁻¹.d⁻¹, observou-se queda na produção de metano em função do acúmulo de ácidos orgânicos voláteis (> 3,0 g.L⁻¹) no sistema.

Para concluir, destaca-se que os cossustratos utilizados apresentam elevada taxa de acidificação, requerendo operação cuidadosa para manutenção de todas as etapas da digestão anaeróbia, focando-se na fase mais crítica, a metanogênese. A adição de álcali na corrente afluenta precisa ser considerada, uma vez que a redução do pH no meio reacional, por eventual desbalanceamento das fases ácida e metanogênica, poderia comprometer a atividade celular dos microrganismos presentes no inóculo do reator.

5.6 PRODUÇÃO E RETENÇÃO DE BIOMASSA: OBTENÇÃO DA CARGA ORGÂNICA VOLUMÉTRICA ESPECÍFICA (COVe)

Examinando a capacidade de retenção/eliminação estimada de sólidos para o sistema de codigestão, verificou-se aumento gradual de sólidos suspensos voláteis (SSV) na corrente afluenta a partir do incremento de COVa, bem como maior lavagem da biomassa no reator a partir do final da COVa de 3,5 kg.m⁻³.d⁻¹, conforme ilustram os dados da Figura 20.

Figura 20 - Perfil temporal para a concentração de SSV afluenta e efluente. Legenda: afluenta (-▲-) e efluente (-□-).

Fonte: Elaboração própria.

Em linhas gerais, observa-se que até o 85º dia de operação, a capacidade de eliminação de biomassa no efluente manteve-se praticamente constante, com valores abaixo de 50 mg.L⁻¹, favorecendo a retenção de sólidos no reator. Em sistemas com baixa eliminação de biomassa

(*washout*, termo em inglês), espera-se que menos energia seja direcionada à síntese celular (AQUINO, FUESS e PIRES, 2017).

A partir do 85º dia de operação (COVa de $3,5 \text{ kg.m}^{-3}.\text{d}^{-1}$), nota-se aumento na lavagem da biomassa (mínimo de 120 mg.L^{-1} e máximo de 300 mg.L^{-1}) e, possivelmente, maior quantidade de energia foi destinada à produção de novas células para manter elevada a eficiência na conversão dos compostos orgânicos. Segundo Aquino, Fuess e Pires (2017), a síntese celular compreende uma resposta dos microrganismos para compensar a perda contínua da atividade biológica por meio do processo de lavagem. É importante salientar que os valores de eliminação de biomassa compreendidos na Figura 20 são estimativas para descrever o comportamento dos sólidos no interior do reator, podendo estes sub ou superestimar os valores reais observados para o período operacional.

Considerando os parâmetros físicos, o aumento da produção de biomassa tornou-se mais evidente com a mudança de COVa de 3,5 para $5,0 \text{ kg.m}^{-3}.\text{d}^{-1}$ no reator. A Figura 21 apresenta o aspecto físico do reator observado na última carga orgânica, na qual a biomassa parecia acumular continuamente nas paredes do acrílico.

Figura 21 - Aspecto físico do reator na maior COVa ao sistema de codigestão.

Fonte: Elaboração própria.

Aquino, Fuess e Pires (2017) avaliaram a capacidade de retenção de biomassa a partir da digestão anaeróbia da vinhaça de cana-de-açúcar em reatores de leito fixo empacotado (APBR) e estruturado (AnSTBR), com variações na COVa de 2,4 a $18,0 \text{ kg.m}^{-3}.\text{d}^{-1}$. Segundo os autores, nas mesmas condições operacionais estabelecidas para ambos os reatores, o reator AnSTBR apresentou maior taxa de eliminação de SSV ao longo da operação em relação ao reator APBR

(605,4 gSSV — AnSTBR; 254,7 gSSV — APBR). A menor retenção de biomassa no reator de leito fixo estruturado, atribuída à elevada porosidade de seu leito, exigiu que maior quantidade de energia fosse direcionada à síntese celular, conforme diferenças observadas no coeficiente de rendimento celular para os reatores ($Y_{x/s} = 0,095 \text{ gSSV.g}^{-1}\text{DQO}$ — AnSTBR; $Y_{x/s} = 0,067 \text{ gSSV.g}^{-1}\text{DQO}$ — APBR).

Com o objetivo de investigar os fatores que contribuíram com a instabilidade na produção volumétrica e rendimento de metano a partir da COVa de $3,5 \text{ kg.m}^{-3}.\text{d}^{-1}$, buscou-se estimar o coeficiente de rendimento celular da biomassa ($Y_{x/s}$), bem como os perfis temporais de retenção celular (X_n) e carga orgânica volumétrica específica (COVe) para o reator AnSTBR a partir de modificações propostas por Aquino, Fuess e Pires (2017) na metodologia descrita por Anzola Rojas et al. (2015), conforme apontamento no item 4.6.1. Os detalhes da produção e retenção de biomassa no reator ao longo do tempo de operação estão descritos na Tabela 15.

Tabela 15 - Produção e retenção de biomassa ao longo da operação do reator AnSTBR.

Parâmetros	Resultados
Biomassa inicial no reator ^a – X_0 (g)	12,57
Biomassa aderida na espuma ^b – X_a (g)	1,83
Biomassa suspensa no reator ^c – X_s (g)	4,24
Biomassa lavada do reator ^d – X_e (g)	16,83
Biomassa nos descartes de fundo – X_d (g)	0
Biomassa total produzida no reator – X_t (g)	22,90
Consumo de DQO ^e – C_x (g)	602,89
$Y_{x/s}$ (gSSV.g ⁻¹ DQO)	0,036

^a Quantidade de biomassa aderida na espuma, no $t = 0$. ^b Quantidade de biomassa aderida na espuma ao longo da operação. ^c Quantidade de biomassa no líquido drenado ao final da operação. ^d Quantidade de biomassa lavada do reator na corrente afluyente ao longo da operação. ^e Massa total de DQO consumida ao longo da operação.

Fonte: Elaboração própria.

Na Tabela 15 verifica-se que o coeficiente de rendimento celular da biomassa encontrado para o reator foi de $0,036 \text{ gSSV.g}^{-1}\text{DQO}$, quase três vezes inferior ao valor reportado por Aquino, Fuess e Pires (2017), considerando as similaridades nos processos, como a configuração e volume útil do reator, material suporte, temperatura, procedimento para inoculação, e substrato (vinhaça de cana-de-açúcar). A hipótese levantada é que a discrepância nos valores de $Y_{x/s}$ pode estar associada, por exemplo, à subestimação na quantidade de biomassa lavada do sistema (X_e), baseando-se no cálculo da DQO suspensa para a presente

pesquisa, bem como na diferença de COVa. Ademais, ressalta-se que a metodologia empregada para estimar o comportamento dos sólidos no reator considera apenas um valor médio de $Y_{x/s}$ e, portanto, nuances ao longo da operação não são quantificadas. Em processos acidogênicos, Blanco, Fuess e Zaiat (2017) associaram valores elevados de $Y_{x/s}$ com condições menos favoráveis à retenção de biomassa em reatores de leito fixo estruturado, alimentados com sucrose e submetidos a diferentes dosagens de cálcio.

Em termos de valores de $Y_{x/s}$, o valor obtido neste estudo se assemelha aos menores valores tipicamente encontrados em sistemas anaeróbios de tratamento de esgoto doméstico (0,03-0,06 gSSV.g⁻¹DQO; TCHOBANOGLIOUS et al., 2003). Considerando a matriz orgânica dos cossustratos envolvidos e a configuração do reator empregada, esperava-se valores maiores para o coeficiente de rendimento celular da biomassa, sobretudo em virtude da porosidade do leito estruturado que desfavorece a retenção celular. Os processos acidogênicos, por sua vez, apresentam valores de $Y_{x/s}$ próximos a 0,15 gSSV.g⁻¹DQO (HENZE; HARREMOËS, 1983), em função do crescimento das bactérias acidogênicas associado ao aumento de COVa. A Figura 22 apresenta o perfil temporal de retenção de biomassa no reator AnSTBR.

Figura 22 - Retenção de biomassa ao longo do tempo.

Fonte: Elaboração própria.

Apesar das similaridades supracitadas com o estudo de Aquino, Fuess e Pires (2017), é importante salientar que o valor obtido na presente pesquisa para a concentração de SSV aderidos na espuma após a drenagem do inóculo (X_o), no início da operação, foi de 3,9 gSSV.L⁻¹, enquanto os autores citados reportaram valor próximo de 15 gSSV.L⁻¹.

Como pode ser observado pela Figura 22, é possível que a partir da COVa de 3,5 kg.m⁻³.d⁻¹, o sistema tenha direcionado grande parte da energia ao crescimento de biomassa, a fim de manter eficiente a remoção de matéria orgânica a partir da atuação das bactérias fermentativas e acidogênicas, corroborando com os resultados de baixa produção de metano. A discrepância nos valores de X_o pode também estar associada às diferentes áreas específicas ocupadas pelo leito fixo em ambos os trabalhos (1314 m² — AQUINO, FUESS e PIRES, 2017; 682,6 m² — este trabalho), resultantes das diferentes características de espumas de poliuretano utilizadas, em termos de quantidade e dimensões.

Para verificar a precisão e confiabilidade dos dados de retenção celular apresentados na Figura 22, determinou-se a taxa de retenção de biomassa (TRB), como mostra a Equação 24.

$$TRB = \frac{(SSV_f - SSV_i)}{\Delta t} \quad (\text{Eq. 24})$$

Siglas: SSV_f = quantidade de SSV, em gramas, no leito fixo e suspensos no reator no final da operação. SSV_i = quantidade de SSV, em gramas, retido na espuma após a drenagem da biomassa na inoculação, Δt = tempo total de operação do reator.

O valor obtido para a concentração de biomassa no final da operação (SSV_f) (somatória da biomassa suspensa e aderida no leito) foi de 7,5 g.L⁻¹_{REATOR}, valor que supera em 20% a concentração final estimada para a retenção de biomassa por meio do cálculo de X_n. Esta diferença pode ser atribuída à redução no volume útil do reator observada no final da operação, possivelmente em razão do crescimento de biomassa e retenção de sólidos fixos no material suporte. O valor encontrado para TRB foi de 0,035 gSSV.L⁻¹.d⁻¹, inferior ao valor reportado por Aquino, Fuess e Pires (2017) para o reator AnSTBR (0,083 gSSV.L⁻¹.d⁻¹), possivelmente em função da diferença na COVa.

Os perfis temporais de carga orgânica volumétrica específica (COVe) e COVa no período operacional estão apresentados na Figura 23.

Figura 23 - Perfil temporal da COVe em função do aumento de COVa. Legenda: COVe (-■-), COVa (-■-).

Fonte: Elaboração própria.

Analisando a Figura 23, observa-se que o aumento nos valores de COVa alavancou os valores de COVe, esta última atingindo média de $0,97 \text{ gDQO.g}^{-1}\text{SSV.d}^{-1}$ na maior carga aplicada ao sistema de codigestão, praticamente o dobro do valor observado para a digestão anaeróbia da vinhaça de cana-de-açúcar no trabalho de Aquino, Fuess e Pires (2017) em reator AnSTBR com COVa de $18,0 \text{ kg.m}^{-3}.\text{d}^{-1}$. A COVe da ordem de $1 \text{ gDQO.g}^{-1}\text{SSV.d}^{-1}$ pode ter causado o desvio para rota do anabolismo, visando manter a eficiência do sistema com o aumento do aporte de carga orgânica.

Na Figura 23, nota-se que até a COVa de $3,5 \text{ kg.m}^{-3}.\text{d}^{-1}$, os valores de COVe acompanharam o aumento de COVa em proporções semelhantes. Ao final da referida COVa, verifica-se que os valores de COVe aumentaram, contudo em proporções menores em relação às cargas anteriores. Este comportamento evidencia o aumento na proporção de biomassa, sobretudo na COVa de $5,0 \text{ kg.m}^{-3}.\text{d}^{-1}$, corroborando com a hipótese de mudança metabólica para o anabolismo.

Destaca-se que a literatura científica ainda é escassa na aplicação da COVe em sistemas metanogênicos, principalmente em reatores de leito fixo. Apenas alguns estudos são relatados e direcionados ao tratamento anaeróbio de esgoto doméstico (CHERNICHARO, 2007) e vinhaça de cana-de-açúcar (AQUINO, FUESS e PIRES, 2017; BARROS; DUDA; OLIVEIRA, 2016). Enfatiza-se que os estudos supracitados, bem como o presente, apresentaram COVe entre $0,05 - 0,15 \text{ gDQO.g}^{-1}\text{SSV.d}^{-1}$ no início da operação, conforme recomendação para

sistemas de leitos de lodo (CHERNICHARO, 2007). Entretanto, deve-se considerar que diferentes valores de COVe podem estar associados à estabilidade dos sistemas metanogênicos, dependendo das condições operacionais empregadas e da natureza do(s) substrato(s).

Aproximando-se a discussão em termos de produção de biogás, verifica-se que o maior rendimento de metano foi observado na COVe de $0,46 \text{ gDQO.g}^{-1}\text{SSV.d}^{-1}$, associado à baixa relação HPr/HAc (0,5) e razão AI/AP de 0,2. A Figura 24 apresenta a relação dos valores de rendimento de metano (MY) com os dados de COVe ao longo da operação.

Figura 24 - Influência da COVe no rendimento de metano: Legenda: MY (-■-) e COVe (-■-).

Fonte: Elaboração própria.

Na mudança de COVa de 2,0 para $3,5 \text{ kg.m}^{-3}.\text{d}^{-1}$, os valores de COVe ultrapassaram 0,8, atingindo pico de $0,94 \text{ gDQO.g}^{-1}\text{SSV}$ no 83º dia de operação. Nos dias subsequentes, nota-se tendência decrescente no rendimento de metano que não se recuperou até o final da operação. Vale enfatizar que no período em que a queda no rendimento de metano se acentuou, observou-se maior retenção da biomassa (Figura 22) como possível resposta dos microrganismos ao aumento de carga orgânica. Destaca-se, também, que possíveis valores subestimados para a lavagem da biomassa (X_e) poderiam subestimar o coeficiente $Y_{x/s}$ para o reator, todavia, nestas condições, alterações mínimas seriam observadas nos valores estimados para retenção celular (X_n) e COVe, como mostram as Equações 20 e 21.

Barros, Duda e Oliveira (2016) reportaram instabilidade operacional em reatores UASB tratando vinhaça de cana-de-açúcar com aumento da COVe de 0,27 para 0,42-0,68 $\text{gDQO.g}^{-1}\text{SSV.d}^{-1}$, comportamento similar ao observado para o reator AnSTBR no estudo de Aquino, Fuess e Pires (2017), verificando-se queda na eficiência de remoção de matéria

orgânica em função da sobrecarga orgânica. Na presente pesquisa não foram observados decréscimos significativos na eficiência de remoção de DQO para maior carga orgânica aplicada ao sistema, reiterando-se o desvio metabólico de rota para a síntese celular, a manutenção de condições satisfatórias à remoção dos compostos orgânicos (carboidratos e glicerol) e a elevação na produção de ácidos orgânicos frente ao aumento de COVa. O aumento na produção de biomassa pode ter sido estimulado pela baixa concentração de sólidos retidos na espuma durante a inoculação do reator e/ou como possível resposta dos microrganismos ao aumento de carga orgânica no sistema de codigestão.

5.7 BALANÇO DE MASSA PARA O REATOR AnSTBR

Neste trabalho foram realizados dois balanços de massa, em termos de DQO, para o reator AnSTBR, com o objetivo de verificar a confiabilidade dos métodos analíticos empregados. O primeiro balanço refere-se à quantificação dos compostos solúveis na corrente efluente ao reator, descrito como balanço de massa da fase solúvel (BMFS) e o segundo constitui o balanço de massa global (BMG), que se estende à produção de metano e sólidos voláteis na corrente efluente. A Figura 25 apresenta o balanço de massa da fase solúvel referente à operação do reator AnSTBR em função da COVa, com as contribuições dos grupos de compostos envolvidos no balanço registradas na Tabela 9.

Figura 25 – Balanço de massa: a) fase solúvel da corrente efluente ao reator AnSTBR. Legenda: metabólitos (■-), carboidratos (-▨-) e fração indeterminada (-□-).

Fonte: Elaboração própria.

Com base na Figura 25, nota-se aumento das frações de DQO calculadas para o BMFS com o incremento da COVa, indicando maior eficiência na conversão dos compostos orgânicos da fração indeterminada a ácidos orgânicos. O BMFS estimado para o reator atingiu valor médio de 77,5%, com máximo de 81,1% observado para as COVa de 3,5 e 5,0 $\text{kg.m}^{-3}.\text{d}^{-1}$. Deste último percentual, grande parte dos valores observados são constituídos pela fração de DQO correspondente à concentração de metabólitos, como resultado do aumento de carga orgânica. Por outro lado, o decréscimo nas frações correspondentes de carboidratos totais revela a intensificação da atividade acidogênica no reator, sugerindo que as bactérias acidogênicas não foram afetadas pela presença de metabólitos solúveis no meio reacional.

A fração indeterminada é atribuída aos compostos orgânicos recalcitrantes à biodegradação, como os compostos fenólicos e melanoidinas, ambos presentes na vinhaça de cana-de-açúcar e não quantificados no presente trabalho. Como discutido na revisão de literatura, as melanoidinas constituem macromoléculas com propriedades antioxidantes — conferindo à vinhaça coloração marrom escura —, passíveis de remoção por processos físico-químicos.

A Figura 26 apresenta o balanço de massa global referente à operação do reator AnSTBR a partir da COVa de 1,0 $\text{kg.m}^{-3}.\text{d}^{-1}$.

Figura 26 – Balanço de massa global para o sistema de codigestão. Legenda: metano (-■-), sólidos suspensos voláteis (-▒-), efluente solúvel (-□-) e fração indeterminada (-□-).

Fonte: Elaboração própria.

Com relação ao BMG, observa-se a elevada fração de DQO não medida na corrente efluente ao reator. Como discutido previamente, é possível que parte da fração indeterminada esteja associada aos sólidos voláteis na corrente efluente (Xe), cujas concentrações podem ter

sido subestimadas ao longo da operação baseando-se na diferença entre as DQO bruta e solúvel. A isso, soma-se a parcela de DQO acumulada no interior do reator, resultado do crescimento da biomassa ativa frente ao aumento de carga e, portanto, não quantificada na corrente de saída. Em termos fração correspondente a metano, destaca-se a contribuição proveniente de possíveis falhas na medição do biogás, vazamentos ou condições relativas à ineficiência do sistema para liberar o biogás formado, tendo em vista o aprisionamento de bolhas no leito.

6 CONCLUSÃO

Baseando-se nos objetivos e nos resultados das análises físico-químicas para o monitoramento dos reatores biológicos empregados na presente pesquisa, as principais conclusões incluem:

Para os testes realizados em reatores em batelada:

O sistema de codigestão anaeróbia proposto para o tratamento da vinhaça de cana-de-açúcar e glicerol destilado revelou condições satisfatórias em termos de produção de metano nos reatores operados em regime de batelada, sob condição mesofílica. Nos ensaios de codigestão, o maior rendimento de metano foi observado na proporção 50% vinhaça e 50% glicerol, em termos de DQO, com valor médio de $352 \pm 17 \text{ mLCH}_4.\text{g}^{-1}\text{DQOr}$ e eficiência de remoção de DQO de 97%. A concentração de AOV permaneceu abaixo do limite de quantificação do método cromatográfico no final da operação. A proporção 70% glicerol e 30% vinhaça contribuiu para aumento da velocidade de produção de metano em 95% em relação à monodigestão da vinhaça. A biomassa adaptada à vinhaça e submetida à alimentação com glicerol elevou o rendimento de metano em 11%, enquanto a biomassa adaptada com glicerol e submetida à alimentação com vinhaça sofreu perda de 8%. Os resultados abrem perspectivas para avaliar a manutenção da digestão anaeróbia em condições de permuta de substratos biodegradáveis, apresentando potencial para contribuir com os atuais desafios dos processos industriais do setor de biocombustíveis, em termos de produção de bioenergia.

Para a operação contínua do reator de leito fixo estruturado:

A operação do reator de leito fixo estruturado registrou maior rendimento médio e produção volumétrica de metano na COVa de $3,5 \text{ kgDQO.m}^{-3}.\text{d}^{-1}$, com valores de $210 \pm 31 \text{ mL.g}^{-1}\text{DQOr}$ e $668 \pm 73 \text{ mL.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$, respectivamente. As eficiências médias para remoção de DQO, carboidratos totais e glicerol ao longo dos 105 dias de operação foram de $77,1 \pm 5,4\%$, $81,9 \pm 7,7\%$ e $99,7 \pm 0,6\%$, respectivamente, corroborando o desempenho satisfatório do sistema de codigestão anaeróbia a partir dos cossustratos testados. O lento incremento de COVa ao reator foi necessário em função da elevada taxa de acidificação dos cossustratos utilizados, em especial do glicerol. Foram observados aumentos na concentração de propionato com o incremento de COVa, indicando que a biomassa metanogênica não acompanhou adequadamente o desenvolvimento da população acidogênica, reforçando-se a necessidade de alterações lentas de carga orgânica, com o objetivo de manter a codigestão anaeróbia. Nesse

sentido, a estratégia de separação de fases poderia favorecer o balanceamento das comunidades produtoras e consumidoras de ácidos, favorecendo o sistema de codigestão. O crescimento de biomassa a partir da COVa de $3,5 \text{ kg.m}^{-3}.\text{d}^{-1}$ sugere mudança de rota metabólica para o anabolismo, como resposta dos microrganismos ao aumento de carga orgânica.

RERERÊNCIAS

- ACHARYA, B.K.; MOHANA, S.; MADAMWAR, D. Anaerobic treatment of distillery spent wash – A study on upflow anaerobic fixed film bioreactor. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 11, p. 4621-4626, jul. 2008.
- ADORNO, M.A.T.; HIRASAWA, J.S.; VARESCHE, M.B.A. Development and validation of two methods to quantify volatile acids (C2-C6) by GC/FID: Headspace (Automatic and Manual) and Liquid-Liquid Extraction (LLE). **American Journal of Analytical Chemistry**, v. 5, n. 7, p. 406–414, 6 maio 2014.
- AGARWAL, G.P. Glycerol. In: A. Fiechter, ed. Advance in biotechnological engineering/biotechnology: **Microbial Bioproducts**, v. 41. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag, p. 95–128, 1990.
- AHRING, B.K.; SANDBERG, M.; ANGELIDAKI, I. Volatile fatty acids as indicators of process imbalance in anaerobic digesters. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 43, p. 559-565, 1995.
- ALBANEZ, R.; CHIARANDA, B.C.; FERREIRA, R.G.; FRANÇA, A.L.P.; HONÓRIO, C.D.; RODRIGUES, J.A.D.; RATUSZNEI, S.M.; ZAIAT, M. (2016) Anaerobic biological treatment of vinasse for environmental compliance and methane production. **Appl. Biochem. Biotechnol.**, v. 178, p. 21– 43.
- ALBUQUERQUE, J.N.; RATUSZNEI, S.M.; RODRIGUES, J.A.D. Biomethane production by thermophilic co-digestion of sugarcane vinasse and whey in an AnSBBR: Effects of composition, organic load, feed strategy and temperature. **Journal of Environmental Management**, v. 251, 109606, 2019.
- ALVES, I. Caracterização de grânulos de reator UASB empregado no processamento de vinhaça. 2015. 85 f. Dissertação (Mestrado em Ciências: Engenharia Hidráulica e Saneamento) - Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2015. Disponível em: < <https://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/18/18138/tde-10082015-100837/pt-br.php>> Acesso em: 10 mar. 2019.
- AMON, T.; AMON, B.; KRYVORUCHKO, V.; BODIROZA, V; PÖTSCH, E; ZOLLITSCH, W. Optimising methane yield from anaerobic digestion of manure: Effects of dairy systems and of glycerine supplementation. **International Congress Series**, v. 1293, p. 217-220, 2006.
- ANGELIDAKI, I.; PETERSEN, S.P.; AHRING, B.K. Effects of lipids on thermophilic anaerobic digestion and reduction of lipid inhibition upon addition of bentonite, **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 33, p. 469–472, 1990.
- ANGELIDAKI, I.; SANDERS, W. Assessment of the anaerobic biodegradability of macropollutants. **Reviews in Environmental Science and Bio/Technology**, v. 3(2), p. 117–129, 2004.
- ANP. Anuário Estatístico Brasileiro do Petróleo e do Gás Natural, 2019. Rio de Janeiro, 2008. Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis – ANP. Disponível em: <http://www.anp.gov.br/arquivos/central-conteudos/anuario-estatistico/2019/2019-anuario-versao-impressao.pdf>. Acesso em: jun. 2019.

- ANZOLA-ROJAS, M.P.; FONSECA, D.G.; OLIVEIRA, V.M.; ZAIAT, M. The use of the carbon/nitrogen ratio and specific organic loading rate as tools for improving biohydrogen production in fixed-bed reactors. **Biotechnol. Rep.**, v. 5, p. 46-54, 2015.
- APHA, AWWA, WEF. Standard methods for examination of water and wastewater. 22nd. ed. American Public Health Association, Washington, D.C., 2012.
- AQUINO, S.; FUESS, L.T.; PIRES, E.C. Media arrangement impacts cell growth in anaerobic fixed-bed reactors treating sugarcane vinasse: Structured vs. randomic biomass immobilization. **Bioresource Technology**, v. 235, p. 219–228, 2017.
- AQUINO, S.F.; STUCKEY, D.C. Production of soluble microbial products (SMP) in anaerobic chemostats under nutrient deficiency. **Journal of Environmental Engineering**, v. 129(11), p. 1007–1014, 2003.
- ARDI, M.S.; AROUA, M.K.; HASHIM, N.A. Progress, prospect, and challenges in glycerol purification process: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 42, p. 1164-1173, fev. 2015.
- ASTALS, S.; NOLLA-ARDEVOL, V.; MATA-ALVAREZ, J. Anaerobic co-digestion of pig manure and crude glycerol at mesophilic conditions: biogas and digestate. **Bioresour. Technol.**, v. 110, p. 63–70, 2012.
- ATHANASOPOULOS, N. Anaerobic treatment of beet molasses alcoholic fermentation wastewater in a downflow filter. **Resources and Conservation**, v. 15, n. 1-2, p. 147-150, jun. 1987.
- BARBIRATO F.; CHEDAILLE D.; BORIES, A. Propionic acid fermentation from glycerol: comparison with conventional substrates. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 47, p. 441–6, 1997.
- BARBOSA, M.Y.U. **Reator anaeróbio alimentado com vinhaça de cana-de-açúcar: avaliação dos efeitos causados pela interrupção na alimentação e estratégias para mitigação**. 2017. 146 f. Dissertação (mestrado) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2017. Disponível em: < <https://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/18/18138/tde-26092017-163317/pt-br.php> > Acesso em: 12 fev. 2020.
- BARBOSA, R. M. **Influência do sulfato na produção de metano a partir de vinhaça de cana-de-açúcar**. 2018. 113f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Hidráulica e Saneamento) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos. 2018. Disponível em: < <https://teses.usp.br/teses/disponiveis/18/18138/tde-19032019-145951/fr.php> > Acesso em: 8 fev. 2020.
- BARROS, V.G. de; DUDA, R.M.; VANTINI, J. da S.; OMORI, W.P.; FERRO, M.I.T.; OLIVEIRA, R A. de. (2017). Improved methane production from sugarcane vinasse with filter cake in thermophilic UASB reactors, with predominance of *Methanothermobacter* and *Methanosarcina* archaea and *Thermotogae* bacteria. **Bioresource Technology**, v. 244, p. 371–381.
- BARROS, V.G. **Conversão anaeróbia de vinhaça e melaço em reatores UASB inoculados com lodo granulado**. Dissertação (Mestrado em microbiologia agropecuária) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - UNESP - Campus Jaboticabal, p. 69, 2013. Disponível em: < <https://repositorio.unesp.br/handle/11449/99356> >. Acesso em: 10 mar. 2019.

- BARROS, V.G.; DUDA, R.M.; OLIVEIRA, R.A. Biomethane production from vinasse in upflow anaerobic sludge blanket reactors inoculated with granular sludge. **Braz. J. Microbiol.**, v. 47 (3), p. 628-639, 2016.
- BARTH, D.; MONTEIRO, A.R.S.; COSTA, M.M.; VIRKAJÄRVI, I.; SACON, V.; WILHELMSOM, A. DesinFix TM 135 in fermentation process for bioethanol production. **Braz. J. Microbiol.**, v. 45, p. 323–325, 2014.
- BENITES-LAZARO, L.L.; MELLO-THÉRY, N.A.; LAHSEN, M. Business storytelling about energy and climate change: The case of Brazil's ethanol industry. **Energy Research & Social Science**, v. 31, p. 77-85, set. 2017.
- BERNAL, A.P.; SILVA DOS SANTOS, I.F.; MONI SILVA, A.P.; BARROS, R.M.; RIBEIRO, E.M. Vinasse biogas for energy generation in Brazil: An assessment of economic feasibility, energy potential and avoided CO₂ emissions. **Journal of Cleaner Production**, v. 151, p. 260-271, maio 2017.
- BIEBL, H.; MENZEL K.; ZENG A.P.; DECKWER, W.D. Microbial production of 1,3-propanediol. **Applied Microbiology and Biotechnology**. v. 52, p. 289–297, 1999.
- BLANCO, V.M.C.; FUESS, L.T.; ZAIAT, M. Calcium dosing for the simultaneous control of biomass retention and the enhancement of fermentative biohydrogen production in an innovative fixed-film bioreactor. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 42(17), p. 12181–12196, 2017.
- BLUNDI, S.F., GADÊLHA, R. F. Método para determinação de matérias orgânica específica em águas residuárias. In: **Chenicharo, C.A.L. (Coord.). Pós tratamento de 126 efluentes de reatores anaeróbios: aspectos metodológicos**, p. 9–17, 2001.
- BONCZ, M.A.; FORMAGINI, E.L.; SANTOS, L.S.; MARQUES, R.D.; PAULO, P.L. Application of urea dosing for alkalinity supply during anaerobic digestion of vinasse. **Water Sci. Technol.**, v. 66, p. 2453-2460, 2012.
- BORIES, A.; RAYNAL, J.; BAZILE, F. Anaerobic digestion of high-strength distillery wastewater (cane molasses stillage) in a fixed-film reactor. **Biological Wastes**, v. 23, n. 4, p. 251-267, jan. 1988.
- BRAGA, C.F.G.V.; BRAGA, L.V. Desafios da energia no Brasil: panorama regulatório da produção e comercialização do biodiesel. **Cad. EBAPE.BR**, v. 10, nº 3, opinião 4, Rio de Janeiro, 2012.
- CAMILOTI, P.R.; MOCKAITIS, G.; RODRIGUES, J.A.D.; DAMIANOVIC, M.H.R.Z.; FORESTI, E.; ZAIAT, M. Innovative anaerobic bioreactor with fixed-structured bed (ABFSB) for simultaneous sulfate reduction and organic matter removal. **J. Chem. Technol. Biotechnol.**, v. 89, p. 1044–1050, 2014.
- CARNEIRO, R. **Utilização de glicerol como fonte de carbono para desnitrificação e remoção biológica de fósforo em reator submetido à aeração intermitente**. Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental – Departamento de Hidráulica e Saneamento. Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2015. Disponível em: <<https://teses.usp.br/teses/disponiveis/18/18138/tde-27052015-155302/es.php>> Acesso em: fev. 2019.
- CEPEA. Centro de Estudos Avançados em Economia Aplicada. Universidade de São Paulo, ESALQ, 2018. Disponível em: < <https://www.cepea.esalq.usp.br/br/releases/mercado-de->

- trabalho-cepea-numero-de-trabalhadores-no-setor-sucro-cai-mas-qualidade-dos-empregos-cresce.aspx>. Acesso em: 25 jun. 2020.
- CETESB. Companhia Ambiental do Estado de São Paulo. **Norma P4.231**: Vinhaça – Critérios e procedimentos para aplicação no solo agrícola. 3. ed. São Paulo: CETESB, 2015. 15. p. Disponível em: < https://cetesb.sp.gov.br/wp-content/uploads/2013/11/NTC-P4.231_Vinha%C3%A7a_-Crit%C3%A9rios-e-procedimentos-para-aplica%C3%A7%C3%A3o-no-solo-agr%C3%ADcola-3%C2%AA-Ed-2%C2%AA-VERS%C3%83O.pdf >. Acesso em: 12 abr. 2020.
- CHAN, Y.J.; CHONG, M.F.; LAW, C.L.; HASSELL, D.G. A review on anaerobic-aerobic treatment of industrial and municipal wastewater. **Chem. Eng. J.**, v. 155, p. 1–18, 2009.
- CHEN, Y.; CHENG, J.J.; CREAMER, K.S. Inhibition of anaerobic digestion process: a review, **Bioresource Technol.**, v. 99, p. 4044–4064, 2008.
- CHERNICHARO, C.A.L. Anaerobic reactors. 1st ed. London, New York: IWA Publishing; 2007. 175 p.
- CHOL G.C.; DHABHAI, R.; DALAI, A.K.; REANEY, M. Purification of crude glycerol derived from biodiesel production process: Experimental studies and techno-economic analyses. **Fuel Processing Technology**, v. 178, p. 78-87, set. 2018.
- CHOONG, Y.Y.; NORLI, I.; ABDULLAH, A.Z.; YHAYA, M.F. Impacts of trace element supplementation on the performance of anaerobic digestion process: A critical review. **Bioresource Technology**, v. 209, p. 369–379, 2016.
- CHRISTOFOLETTI, C.A.; ESCHER, J.P.; CORREIA, J.E.; MARINHO, J.F. U.; FONTANETTI, C.S. Sugarcane vinasse: Environmental implications of its use. **Waste Management**, v. 33, n. 12, p. 2752–2761, 2013.
- CIRIMINA, R.; PINA, C.D.; ROSSI, M.; PAGLIARO, M. Understanding the glycerol market. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v.116, p. 1432-1439, 2014.
- COMINO, E.; RIGGIO, V.A.; ROSSO, M. Biogas production by anaerobic codigestion of cattle slurry and cheese whey. **Bioresour. Technol.**, v. 114, p. 46–53, 2012.
- CONAB. Acompanhamento da Safra brasileira: cana de açúcar. v. 5. – Safra 2018/2019. N.3 – Terceiro Levantamento. Dezembro/2018. Brasília, CONAB, 2018. Disponível em: <<http://www.conab.gov.br/info-agro/safras/cana>>. Acesso: 11 fev. 2020.
- CONAB. Acompanhamento da Safra brasileira: cana de açúcar. v. 6 – Safra 2019/2020. N.1 – Primeiro Levantamento. Maio/2019. Brasília, CONAB, 2019. Disponível em: <<http://www.conab.gov.br/info-agro/safras/cana>>. Acesso: 11 fev. 2020.
- CONTRIM, L.H.B. **ASBR aplicado ao tratamento de efluente do processo de produção de biodiesel**. 2009. 171 p. Dissertação de Mestrado - Escola de Engenharia Mauá, Instituto Mauá de Tecnologia, São Caetano do Sul, Brasil, 2009. Disponível em: < <https://maua.br/files/dissertacoes/asbr-aplicado-ao-tratamento-de-efluente-no-processo-de-producao-de-biodiesel.pdf> > Acesso em: 20 jun. 2020.
- CORTES-RODRÍGUEZ, E.F; FUKUSHIMA N.A.; PALACIOS-BERECHE R.; ENSINAS A.V.; NEBRA S.A. Vinasse concentration and juice evaporation system integrated to the conventional ethanol production process from sugarcane – Heat integration and impacts in cogeneration system. **Renewable Energy**, v. 115, p. 474-488, jan. 2018.

- COSTA, F.J.C.B.; ROCHA, B.B.M.; VIANA, C.E.; TOLEDO, A.C. Utilization of vinasse effluents from anaerobic reactor. **Water Sci. Technol.**, v. 18(12), p. 135-141, 1986.
- CRAGO, C.L.; KHANNA, M.; BARTON, J.; GIULIANI, E.; AMARAL, W. Competitiveness of Brazilian sugarcane ethanol compared to US corn ethanol. **Energy Policy**, v. 38, n. 11, p. 7404-7415, nov. 2010.
- CRAVEIRO, A.M.; SOARES, H.M.; SCHMIDELL, W. Technical aspects and cost estimations for anaerobic systems treating vinasse and brewery/soft drink wastewaters. **Water Science and Technology**, v. 18, n. 12, p. 123-134, dez. 1986.
- CRUZ-SALOMÓN, A.; MEZA-GORDILLO, R.; ROSALES-QUINTERO, A.; VENTURA-CANSECO, C.; LAGUNAS-RIVERA, S.; CARRASCO-CERVANTES, J. Biogas production from a native beverage vinasse using a modified UASB bioreactor. **Fuel**, v. 198, p. 170-174, jun. 2017.
- DABDOUB, M.J.; BRONZEL, J.L.; RAMPIN, M.A. Biodiesel: visão crítica do status atual e perspectivas na academia e na indústria. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p. 776-792, 2009.
- de BARROS LOPES, M.; REHMAN A.U.; GOCKOWIAK, H.; HEINRICH A.J.; LANGRIDGE, P.; HENSCHKE, P.A. Fermentation properties of a wine yeast overexpressing the *Saccharomyces cerevisiae* glycerol 3-phosphate dehydrogenase gene (GPD2). **Aust J. Grape Wine Res.**, v. 6, p. 208-215, 2000.
- del NERY, V.; ALVES, I.; DAMIANOVIC, M.H.R.Z. PIRES, E.C. Hydraulic and organic rates applied to pilot scale UASB reactor for sugar cane vinasse degradation and biogas generation. **Biomass and Bioenergy**, v. 119, p. 411-417, 2018.
- DEMIRBAS, A. (2009). Biofuels securing the planet's future energy needs. **Energy Conversion and Management**, v. 50(9), p. 2239-2249, 2009.
- DEUBLEIN, D., STEINHAUSER, A. Biogas from Waste and Renewable Resources: An Introduction. Weinheim: Wiley-VCH, p. 89-290, 2011.
- DHABHAI, R.; AHMADIFEIJANI, E.; DALAI, A.K.; REANEY, M. Purification of crude glycerol using a sequential physico-chemical treatment, membrane filtration, and activated charcoal adsorption. **Separation and Purification Technology**, v. 168, p. 101-106, ago. 2016.
- DHARMADI, Y.; MURARKA, A.; GONZALEZ, R. Anaerobic fermentation of glycerol by *Escherichia coli*: a new platform for metabolic engineering. **Biotechnol. Bioeng.**, v. 94, p. 821-829, 2006.
- DIAS, M.O.S.; FILHO, R.M.; MANTELATTO, P.E.; CVALETT, O.; ROSSEL, C.E.V.; BONOMI, A.; REAL, M.R.L.V. Sugarcane processing for ethanol and sugar in Brazil. **Environmental Development**, v. 15, p. 35-51, 2015.
- DINH, N.T.; HATTA, K.; KWON, S.H.; ROLLON, A.P.; NAKASAKI, K. Changes in the microbial community during the acclimation stages of the methane fermentation for the treatment of glycerol. **Biomass and Bioenergy**, v. 68, p. 240-249, 2014.
- DÖLL, M.M.R.; FORESTI, E. Efeito do bicarbonato de sódio no tratamento de vinhaça em AnSBBR operado a 55 e 35°C. **Eng. Sanit. Ambient.**, Rio de Janeiro, v. 15, n. 3, p. 275-282, 2010.

- DOWD, M.K.; JOHANSEN, S.L.; LAURA CANTARELLA, L.; REILLY, P.J. Low molecular weight organic composition of ethanol stillage from sugarcane molasses, citrus waste, and sweet whey. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 42, n. 2, p. 283-288, fev. 1994.
- DUBOIS, M.; GILLES, K.A.; HAMILTON, J.K.; REBERS, P. A.; SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical Chemistry**, v. 28, n.3, p. 350-356, 1956.
- EPE. Empresa de Pesquisa Energética. Investimentos e custos operacionais e de manutenção no setor de biocombustíveis: 2018 – 2030. Rio de Janeiro, 2018. Disponível em: <http://epe.gov.br/sites-pt/publicaçõesdadosabertos/publicações/PublicacoesArquivos/publicacao-343/tópico-449/Investimentos_Custos_O_e_M_Bios_2018-2030.pdf>. Acesso em: 25 jun. 2020.
- ESPAÑA-GAMBOA E.; MIJANGOS-CORTES, J.; BARAHONA-PEREZ, L.; DOMINGUEZ-MALDONADO, J.; HERNÁNDEZ-ZARATE, G.; ALZATE-GAVIRIA, L. Vinasses: characterization and treatments. **Waste Management & Research**, v. 29, n. 12, p. 1235-1250, dez. 2011.
- ESPAÑA-GAMBOA, E.I.; MIJANGOS-CORTÉS, J.O.; HERNÁNDEZ-ZÁRATE, G.; MALDONADO, J.A.D.; ALZATE-GAVIRIA, L.M. Methane production by treating vinasses from hydrous ethanol using a modified UASB reactor. **Biotechnology for Biofuels**, v. 5, n. 1, p.82-91, 2012.
- ESPOSITO, G.; FRUNZO, L.; GIORDANO, A.; LIOTTA, F.; PANICO, A.; PIROZZI, F. Anaerobic co-digestion of organic wastes. **Rev Environ Sci Biotechnol.**, v. 11, p. 325–341, 2012.
- FERRAZ JÚNIOR, A.; KOYAMA, M.H.; DE ARAÚJO JÚNIOR, M.M.; ZAIAT, M. Thermophilic anaerobic digestion of raw sugarcane vinasse. **Renewable Energy**, v. 89, p. 245-252, abr. 2016.
- FERREIRA, F.; JOAQUIM, B.S.; HORRIDGE, M. Ethanol expansion and indirect land use change in Brazil. **Land Use Policy**, v. 36, p. 595-604, jan. 2014.
- FERREIRA, L.F.R.; AGUIAR, M.M.; MESSIAS, T.G.; POMPEU, G.B.; QUEIJEIRO LOPEZ, A.M.; SILVA, D.P.; MONTEIRO, R.T. Evaluation of sugarcane vinasse treated with *Pleurotus sajor-caju* utilizing aquatic organisms as toxicological indicators. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 74, n. 1, p. 132-137, jan. 2011.
- FITZGIBBON, F.; SINGH, D.; MCMULLAN, G.; MARCHANT, R. The effect of phenolic acids and molasses spent wash concentration on distillery wastewater remediation by fungi. **Process Biochemistry**, v. 33, n. 8, p. 799-803, nov. 1998.
- FOUNTOULAKIS, M.S.; PETOUSHI, I.; MANIOS, T. Co-digestion of sewage sludge with glycerol to boost biogas production. **Waste Management**, v. 30, p. 1849-1853, 2010.
- FUESS, L.T.; GARCIA, M.L. Implications of stillage land disposal: A critical review on the impacts of fertigation. **Journal of Environmental Management**, v. 145, p. 210-229, dez. 2014.
- FUESS, L.T.; GARCIA, M.L.; ZAIAT, M. Seasonal characterization of sugarcane vinasse: Assessing environmental impacts from fertirrigation and the bioenergy recovery potential through biodigestion. **Science of The Total Environment**, v. 634, p. 29–40, 2018.

- FUESS, L.T.; KIYUNA, L.S.M.; FERRAZ, A.D.N.; PERSINOTI, G.F.; SQUINA, F.M.; GARCIA, M. L.; & ZAIAT, M. Thermophilic two-phase anaerobic digestion using an innovative fixed-bed reactor for enhanced organic matter removal and bioenergy recovery from sugarcane vinasse. **Applied Energy**, v. 189, p. 480–491, 2017.
- FUESS, L.T. **Biodigestão anaeróbia termofílica de vinhaça em sistemas combinados do tipo acidogênico-metanogênico para potencialização da recuperação de bioenergia em biorrefinarias de cana-de-açúcar de primeira geração**. 2017. 332f. Tese (Doutorado em Ciências: Engenharia Hidráulica e Saneamento) - Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2017. Disponível em: < <https://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/18/18138/tde-13042017-145118/pt-br.php> > Acesso: 10 mar. 2019.
- FUESS, L.T.; GARCIA, M.L Bioenergy from vinasse anaerobic digestion to enhance the energy balance ratio of ethanol production. **J. Environ. Manage.**, v. 162, p. 102– 114, 2015.
- GALBRAITH, H.; MILLER, T.B.; PATON, A.M.; THOMPSON, J.K. Thompson, Antibacterial activity of long chain fatty acids and the reversal with calcium, magnesium, ergocalciferol and cholesterol, **J. Appl. Bacteriol.**, v. 34, p. 803–813, 1971.
- GALLERT, C.; BAUER, S.; WINTER, J. Effect of ammonia on the anaerobic degradation of protein by a mesophilic and thermophilic biowaste population. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 50(4), p. 495–501, 1998.
- GARCIA, C.C.B. **Codigestão anaeróbia de glicerol residual com esgoto sanitário em reator híbrido visando ao aumento da produção de biogás**. 2019. 100f. Dissertação (Mestrado) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2019. Disponível em: < <https://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/18/18138/tde-17062019-144701/pt-br.php> > Acesso em: jan. 2020.
- GAVALA, H.N.; ANGELIDAKI, I.; AHRING, B.K. Kinetics and modeling of anaerobic digestion process. **Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.**, v. 81, p. 57–93, 2003.
- GODOI, L.A.G.; DAMIANOVIC, M.H.R.Z.; FORESTI, E. Sulfidogenesis interference on methane production from carbohydrate-rich wastewater. **Water Science and Technology**, v. 72, n. 9, p.1644-1652, 20 jul. 2015.
- GOES, T.; MARRA, R.; SILVA, G.S. Setor sucroalcooleiro no Brasil: situação atual e perspectivas. **Revista de Política Agrícola**, n. 2, p. 13, 2008.
- GOLDEMBERG, J.; COELHO, S.T.; GUARDABASSI, P. The sustainability of ethanol production from sugarcane. **Energy Policy**, v. 36, n. 6, p. 2086-2097, jun. 2008.
- GRASSI, M.C.B.; PEREIRA, G.A.G. Energy-cane and RenovaBio: Brazilian vectors to boost the development of Biofuels. **Industrial Crops & Products**, v. 129, p. 201-205, 2018.
- GREENHILL, S. Method for determination of free and combined glycerin in biodiesel. U.S. Patent Application 10/744,272, 22 dez. 2003.
- HAOSAGUL, S.; VIKROMVARASIRI, N.; SAWASDEE, V.; PISUTPAISAL, N. Impact of acetic acid in methane production from glycerol/acetic acid co-fermentation. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 44, p. 29568-29574, 2019.
- HARPER, S.R.; POHLAND, F.G. Recent developments in hydrogen management during anaerobic biological wastewater treatment. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 28, n. 4, p. 585–602, 1986.

- HEJNFELT, A.; ANGELIDAKI, I. Anaerobic digestion of slaughterhouse by-products. **Biomass and Bioenergy**, v. 33(8), p. 1046–1054, 2009.
- HENZE, M.; HARREMOËS, P. Anaerobic treatment of wastewaters in fixed film reactors – a literature review. **Water Sci. Technol.**, v. 15 (8–9) p. 1-101, 1983.
- HILL, D.T.; COBB, S.A.; BOLTE, J.P. Using volatile fatty acid relationships to predict anaerobic digester failure. **Trans. ASAE**, v. 30(2), p. 496-501, 1987.
- HOARAU, J.; CARO, Y.; GRONDIN, I.; PETIT, T. Sugarcane vinasse processing: Toward a status shift from waste to valuable resource. A review. **Journal of Water Process Engineering**, v. 24, p. 11-25, 2018.
- HOLM-NIELSEN, J. B.; LOMBORG, C. J.; OLESKOWICZ-POPIEL, P.; ESBENSEN, K. H. On-line near infrared monitoring of glycerol-boosted anaerobic digestion processes: evaluation of process analytical technologies. **Biotechnology**, v. 99, n. 2, p. 302-313, 2008.
- HULSHOFF Pol, L.W.; LENS, P.N.; STAMS, A.J.M.; LETTINGA, G. Anaerobic treatment of sulphate-rich wastewaters. **Biodegradation**, v. 9, p. 213–224, 1998.
- HUNSOM, M.; AUTTHANIT, C. Adsorptive purification of crude glycerol by sewage sludge-derived activated carbon prepared by chemical activation with H_3PO_4 , K_2CO_3 and KOH. **Chemical Engineering Journal**, v. 229, p. 334-343, ago. 2013.
- HWU, C.S.; TSENG, S.K.; YUAN, C.Y.; KULIK, Z.; LETTING, G. Biosorption of long-chain fatty acids in UASB treatment process. **Water Res.**, v. 32, p. 1571–1579, 1998.
- JENSEN, P.D.; ASTALS, S.; LU, Y.; DEVADAS, M.; BATSTONE, D.J. Anaerobic codigestion of sewage sludge and glycerol, focusing on process kinetics, microbial dynamics, and sludge dewaterability. **Water Research**, v. 67, p. 355–366, 2014.
- KAPP, H. Schlammfaulung mit hohem Feststoffgehalt. Stuttgarter Berichte zur Siedlungswasserwirtschaft (Sludge with a High Solids Content, Stuttgart reports for Urban Water Management), Band 86, Oldenbourg Verlag, München, p.300, 1984.
- KIYUNA, L. S. M.; FUESS, L. T.; ZAIAT, M. Unraveling the influence of the COD/sulfate ratio on organic matter removal and methane production from the biodigestion of sugarcane vinasse. **Bioresource Technology**, v. 232, p. 103–112, 2017.
- KJELLEBERG, S.; ALBERTSON, N.; FLARDH, K.; HOLMQUIST, L.; JOUPERJAAN, A.; MAROUGA, R.; JOSTLING, J.; SVENBLAD, B.; WEICHART, D. How do non-differentiating bacteria adapt to starvation. Antonie Van Leeuwenhoek **Int. J. Gen. Mol. Microbiol.**, v. 63, p. 333 – 341, 1993.
- KONG, P.S.; AROUA, M.K.; DAUD, W.M.A.W. Conversion of crude and pure glycerol into derivatives: A feasibility evaluation. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 63, p. 533-555, set. 2016.
- KONOPKA, A.; ZAKHAROVA, T.; NAKATSU, C. Effect of starvation length upon microbial activity in a biomass recycle reactor. **J. Ind. Microbiol. Biotechnol.**, v. 29, p. 286–291, 2002.
- KUMAR, V.; WATI, L.; FITZGIBBON, F.; NIGAN, P.; BANAT, M.; SINGH, D.; MARCHANT, R. Bioremediation and decolorization of anaerobically digested distillery spent wash, **Biotechnol. Lett.**, v.19, p. 311–313, 1997.

- LALMAN, J.; BAGLEY, D.M. Anaerobic degradation and inhibitory effects of linoleic acid. **Water. Res.**, v. 34, p. 4220–4228, 2000.
- LEBRERO, R.; TOLEDO-CERVANTES, A.; MUNOZ, R.; DEL NERY, V.; FORESTI, E. Biogas upgrading from vinasse digesters: a comparison between an anoxic biotrickling filter and an algal-bacterial photobioreactor. **J. Chem. Techn. Biotechnol.**, v. 91, p. 2488–2495, 2016.
- LEE, Y.W.; CHUNG, J. Bioproduction of hydrogen from food waste by pilot-scale combined hydrogen/methane fermentation. **Int J. Hydrogen Energy**, v. 35, p. 11746–11755, 2010.
- LENS, P.N.L.; VISSER, A.; JANSSEN, A.J.H.; HULSHOFF POL, L.W.; LETTINGA, G. Biotechnological treatment of sulfate-rich wastewaters. **Crit. Rev. Env. Sci. Tec.**, v. 28(1), p. 41–88, 1998.
- LETTINGA, G.; HULSHOF, P.L.W.E.; ZEEMAN, G. Biological wastewater treatment part I: Anaerobic wastewater treatment. 1. ed. Wageningen: Agricultural University, 1996. Apud CHERNICHARO, C.A.L. Reatores Anaeróbios – Princípios do tratamento biológico de águas residuárias. 2. ed. Belo Horizonte: DESA/UFMG, v. 5, 1997. 380 p.
- LEUNG, D.Y.C.; WU, X.; LEUNG, M.K.H. A review on biodiesel production using catalyzed transesterification. Department of Mechanical Engineering. The University of Hong Kong. **Applied Energy** 87. Hong Kong, China, p. 1083–1095, 2010.
- LOPES, M.L.; PAULILLO, S.C.L.; GODOY, A.; CHERUBIN, R.; LORENZI, M.S.; GIOMETTI, F.H.C.G.; BERNARDINO, C.D.; NETO, H.B.A.; AMORIM, H.V. Ethanol production in Brazil: a bridge between science and industry. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 47, p. 64–76, 2016.
- LÓPEZ-GONZÁLEZ, L.M.; PEREDA REYES, I.; ROMERO ROMERO, O. Anaerobic co-digestion of sugarcane press mud with vinasse on methane yield. **Waste Management**, v. 68, p. 139–145, 2017.
- LOVATO, G.; ALBANEZ, R.; TRIVELONI, M.; RATUSZNEI, S. M.; RODRIGUES, J.A. D. Methane production by co-digesting vinasse and whey in an ansbbr: effect of mixture ratio and feed strategy. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 187(1), p. 28–46, 2018.
- LOVATO, G.; BATISTA, L.P.P.; PREITE, M.B.; YAMASHIRO, J.N.; BECKER, A.L.S.; VIDAL, M.F.G.; RODRIGUES, J.A.D. Viability of using glycerin as a co-substrate in anaerobic digestion of sugarcane stillage (Vinasse): Effect of Diversified Operational Strategies. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 188, p. 720–740, 2019.
- LOVATO, G.; RATUSZNEI, S.M.; RODRIGUES, J.A.D.; ZAIAT, M. Co-Digestion of whey with glycerin in an ansbbr for biomethane production. **Appl. Biochem. Biotechnol.**, v. 178, p. 126–143, 2015.
- LUO, G.; XIE, L.; ZHOU, Q.; ANGELIDAKI, I. Enhancement of bioenergy production from organic wastes by two-stage anaerobic hydrogen and methane production process. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 18, p. 8700–8706, 2011.
- LUO, X.; GE X.; CUI S.; LI Y. Value-added processing of crude glycerol into chemicals and polymers. **Bioresource Technology**, v. 215, p. 144–154, set. 2016.
- MA, F.; HANNA, M.A. Biodiesel production: A review. **Bioresour. Technol.**, v. 70, p. 1–15, 1999.

- MA, J.; VAN WAMBEKE, M.; CARBALLA, M.; VERSTRAETE, W. Improvement of the anaerobic treatment of potato processing wastewater in a UASB reactor by codigestion with glycerol. **Biotechnology letters**, v. 30, p. 861-867, 2008.
- MaCZYńska, J.; KRZYWONOS, M.; KUPCZYK, A.; TUCKI, K.; SIKORA, M.; PIŃKOWSKA, H.; WIELEWSKA, I. Production and use of biofuels for transport in Poland and Brazil – The case of bioethanol. **Fuel**, v. 241, p. 989-996, abr. 2019.
- MARINHO, J.F.U. MARINHO, J.E.C.; MARCATO, A.C.C.; PEDRO-ESCHER, J.; FONTANETTI, C.S. Sugar cane vinasse in water bodies: Impact assessed by liver histopathology in tilapia. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 110, p. 239-245, dez. 2014.
- MATA-ALVAREZ, J.; DOSTA, J.; MACÉ, S.; ASTALS, S. Codigestion of solid wastes: a review of its uses and perspectives including modeling. **Crit. Rev. Biotechnol.**, v. 31, p. 99-111, 2011.
- McCARTY, P.L.; SMITH, D.P. Anaerobic wastewater treatment. **Environ. Sci. Technol.**, v. 20, p. 1200-1206, 1986.
- MEHER, L.; VIDYASAGAR, D.; NAIK, S. Technical aspects of biodiesel production by transesterification—a review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 10, n. 3, p. 248-268, jun. 2006.
- MEIER, T.R.W.; CREMONEZ, P.A.; MATTJIE, A.C.; PARISOTTO, E.I.B.P.; DIETER, J.; ELEKEN, J.G. Biogas production from co-digestion of wastewater swine, vinasse and crude glycerol in a semi continuous operating reactor. **E-xacta**, v. 9, n. 2, p. 111-112, 2016.
- MOCKAITIS, G.; PANTOJA, J.L.R.; RODRIGUES, J.A.R.; FORESTI, E.; ZAIAT, M. Continuous anaerobic bioreactor with a fixed-structure bed (ABFSB) for wastewater treatment with low solids and low applied organic loading content. **Bioprocess Biosyst. Eng.**, v. 37, p. 1361– 1368, 2014.
- MONTEIRO, M.R.; KUGELMEIER, C.L.; PINHEIRO, R.S.; BATALHA, M.O.; CESAR, A.S. Glycerol from biodiesel production: Technological paths for sustainability. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 88, p. 109-122, 2018.
- MORAES, B.S.; JUNQUEIRA, T.L.; PAVANELLO, L.G.; CVALETT, O.; MANTELATTO, P. E.; BONOMI, A.; ZAIAT, M. 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, jan. 2014.
- MORAES, B.S.; ZAIAT, M.; BONOMI, A. Anaerobic digestion of vinasse from sugarcane ethanol production in Brazil: Challenges and perspectives. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 44, p. 888-903, abr. 2015.
- MOSEY, F.E. Mathematical modeling of the anaerobic digestion process: regulatory mechanisms for the formation of short-chain volatile acids from glucose. **Water Sci. Technol.**, v. 15(8-9), p. 209-232, 1983.
- MOTA, C.J.A.; SILVA, C.X.A. da; GONÇALVES, V.L.C. Gliceroquímica: novos produtos e processos a partir da glicerina de produção de biodiesel. **Química Nova**, v. 32(3), p. 639–648, 2009.

- NAKAZAWA, M.M.; SILVA JÚNIOR, W.R.S.; KATO, M.T.; GAVAZZA S.; FLORENCIO L. Anaerobic treatment of crude glycerol from biodiesel production. **Water Science and Technology**, v. 72, n. 8, p. 1383-1389, 7 jul. 2015.
- NARTKER, S.; AMMERMAN, M.; AURANDT, J.; STOGSDIL, M.; HAYDEN, O.; ANTLE, C. Increasing biogas production from sewage sludge anaerobic co-digestion process by adding crude glycerol from biodiesel industry. **Waste Management**, v. 34(12), p. 2567–2571, 2014.
- NOVI, J.C.; OLIVEIRA, S.V.W.B. de; SALGADO JUNIOR, A.P.; OLIVEIRA, M.M.B. de. Análise da gestão do glicerol: riscos e oportunidades sobre sua destinação frente à lacuna normativa e aspectos sustentáveis. **REAd. Revista Eletrônica de Administração** (Porto Alegre), Porto Alegre, v. 24, n. 3, p. 217-243, 2018.
- OLIVEIRA, C.M.; CRUZ, A.J.G.; COSTA, C.B.B. Improving second generation bioethanol production in sugarcane biorefineries through energy integration. **Applied Thermal Engineering**, v. 109, p. 819-827, out. 2016.
- PAGLIARO, M.; ROSSI, M. The future of glycerol: New usage for a versatile raw material. Cambridge: RSC Publishing. Cap.1: Glycerol: Production and Properties, p. 1-17, 2010.
- PARENTE, E.J.S. Biodiesel: uma aventura tecnológica num país engraçado. Fortaleza: Tecbio, 66 p., 2003.
- PARNAUDEAU, V.; CONDOM, N.; OLIVER, R.; CAZEVIEILLE, P.; RECOUS, S. Vinasse organic matter quality and mineralization potential, as influenced by raw material, fermentation, and concentration processes. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 6, p. 1553-1562, abr. 2008.
- PEITER, G.C.; ALVEZ, H.J.; SEQUINEL, R.; BAUTITZ, I.R. Alternativas para o uso do glicerol produzido a partir do biodiesel. **Revista Brasileira de Energias Renováveis**, v. 5, n. 4, p. 519-537, 2016.
- PEIXOTO, G.; PANTOJA-FILHO, J. L. R.; AGNELLI, J. A. B.; BARBOZA, M.; ZAIAT, M. Hydrogen and methane production, energy recovery, and organic matter removal from effluents in a two-stage fermentative process. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 168, n. 3, p. 651–671, 2012.
- PERNA, V. CASTELLÓ, E.; WENZEL, J.; ZAMPOL, C.; FONTES LIMA, D. M.; BORZACCONI, L., ETCHEBEHERE, C. et al. Hydrogen production in an upflow anaerobic packed bed reactor used to treat cheese whey. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 38, n. 1, p. 54–62, 2013.
- PINHEIRO, R.S. Processos de inovação tecnológica para a glicerina produzida no processo de obtenção de biodiesel no Brasil. 2011. 97f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Produção) – Universidade federal de São Carlos, São Carlos, 2011. Disponível em: <<https://repositorio.ufscar.br/handle/ufscar/3663>>. Acesso em: 10 mar. 2020.
- PRADA, S.M.; GUEKEZIAN, M.; SUÁREZ-IHA, M.E.V. Metodologia analítica para a determinação de sulfato em vinhoto. **Quím. Nova**, v. 21, p. 249–252, 1998.
- PRADIMA, J.; KULKARNI, M.R.; ARCHNA. Review on enzymatic synthesis of value-added products of glycerol, a by-product derived from biodiesel production. **Resource-efficient Technologies**, v. 3, n. 4, p. 394-405, dez. 2017.

- PROCHÁZKA, J.; DOLEJŠ, P.; MÁCA, J.; DOHÁNYOS, M. Stability and inhibition of anaerobic processes caused by insufficiency or excess of ammonia nitrogen. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 93(1), p. 439–447, 2012.
- PUGLIESE, L.; LOURENCETTI, C. Impactos ambientais na produção do etanol brasileiro: do campo à indústria. **Revista Brasileira Multidisciplinar (ReBraM)**, v. 20, n. 1, p. 142-165, 2017.
- QUINTERO, J.A.; MONTOYA, M. I.; SÁNCHEZ, O. J.; GIRALDO, O. H.; CARDONA, C. A. Fuel ethanol production from sugarcane and corn: Comparative analysis for a Colombian case. **Energy**, v. 33, n. 3, p. 385-399, mar. 2008.
- RAJAGOPAL, R.; MASSÉ, D. I.; SINGH, G. A critical review on inhibition of anaerobic digestion process by excess ammonia. **Bioresource Technology**, v. 143, p. 632–641, 2013.
- RAJESHWARI, K.V.; BALAKRISHNAN, M.; KANSAL, A.; LATA, K.; KISHORE, V.V. State-of-the-art of anaerobic digestion technology for industrial wastewater treatment. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 4, n. 2, p. 135-156, jun. 2000.
- RAMOS, L.R.; SILVA, E.L. Continuous hydrogen production from cofermentation of sugarcane vinasse and cheese whey in a thermophilic anaerobic fluidized bed reactor. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 43, p. 13081-13089, 2018.
- REHM, H.J. Microbial production of glycerol and other polyols. In: Rehm H-J, Reed G (eds) *Biotechnology*, vol. 6b. VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim, p. 52–69, 1988.
- RENEWABLE FUELS ASSOCIATIONS. World fuel ethanol production, 2017. Disponível em: <<https://ethanolrfa.org/resources/industry/statistics>>. Acesso em: 10 jan. 2019.
- RIAÑO, B.; MOLINUEVO, B.; GARCIA-GONZALES, M.C. Potential for methane production from anaerobic co-digestion of swine manure with winery wastewater. **Bioresour. Technol.**, v. 102, n. 5, p. 4131 – 4136, 2011.
- RIPLEY, A.L.E.; BOYLE, W.C.; CONVERSE, J.C. Alkalimetric Improved for anaerobic digestion wastes monitoring of high-strength wastes. v. 58, n. 5, p. 406–411, 1986.
- RODELLA, A.A.; ZAMBELLO JÚNIOR, E.; ORLANDO FILHO, J. Effects of vinasse added to soil on pH and exchangeable aluminum content. In: CONGRESS OF THE INTERNATIONAL SOCIETY OF SUGAR CANE TECHNOLOGISTS, 18., Havana, 1983. Proceedings... Havana: Universidad de La Habana, 1983. p. 189-214.
- RUSSO, C.; SANT'ANNA, G.L.; de CARVALHO PEREIRA, S.E. An anaerobic filter applied to the treatment of distillery wastewaters. **Agricultural Wastes**, v. 14(4), p. 301–313, 1985.
- SANTANA JUNIOR, A.E. **Produção de metano a partir de vinhaça e melaço em reatores UASB termofílicos, em dois estágios**. 84 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agropecuária) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2013. Disponível em: <<https://repositorio.unesp.br/handle/11449/108660>>. Acesso em: fev. 2020.
- SANTOS, P.S.; ZAIAT, M.; OLLER DO NASCIMENTO, C.A.; FUESS, L.T. Does sugarcane vinasse composition variability affect the bioenergy yield in anaerobic systems? A dual kinetic-energetic assessment. **Journal of Cleaner Production**, v. 240, 118005, 2019.

- SAWASDEE, V.; HAOSAGUL, S.; PISUTPAISAL, N. Co-digestion of waste glycerol and glucose to enhance biogas production. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 44, p. 29575-29582, 2019.
- SAWATDEENARUNAT, C.; SURENDRA, K.C.; TAKARA, D.; OECHSNER, H.; KHANAL, S.K. Anaerobic digestion of lignocellulosic biomass: Challenges and opportunities. **Bioresource Technology**, v. 178, p. 178–186, 2015.
- SHAY, E.G. Diesel fuel from vegetable oils: Status and opportunities. **Biomass and Bioenergy**, v. 4, p. 227-242, 1993.
- SHRIHARI, S., TARE, V. Anaerobic-aerobic treatment of distillery wastes. **Water Air Soil Pollut**, v. 43, p. 95-108, 1989.
- SILES, J.A.; GARCÍA-GARCÍA, I.; MARTÍN, A.; MARTÍN, M.A. Integrated ozonation and biomethanization treatments of vinasse derived from ethanol. **Journal of Hazardous Materials**, v. 188, p. 247-253, 2011.
- SILES-LÓPEZ, J.A.; MARTÍN-SANTOS, M.D.L.A.; CHICA-PÉREZ, A.F.; MARTÍN-MARTÍN, A. Anaerobic digestion of glycerol derived from biodiesel manufacturing. **Bioresour. Technol.**, v. 100, p. 5609–5615, 2009.
- SILVA, F.M.S.; MAHLER, C.F.; OLIVEIRA, L.B.; BASSIN, J.P. Hydrogen and methane production in a two-stage anaerobic digestion system by co-digestion of food waste, sewage sludge and glycerol. **Waste Management**, v. 76, p. 339–349, 2018.
- SILVESTRE, G.; FERNÁNDEZ, B.; BONMATI, A. Addition of crude glycerin as strategy to balance the C/N ratio on sewage sludge thermophilic and mesophilic anaerobic co-digestion. **Bioresour. Technol.**, v. 193, p. 377-385, 2015.
- SIQUEIRA, L.M.; DAMIANO, E.S.G.; SILVA, E.L. Influence of organic loading rate on the anaerobic treatment of sugarcane vinasse and biogas production in fluidized bed reactor. **Journal of Environmental Science and Health, Part A**, v. 48, n. 13, p.1707-1716, 10 nov. 2013.
- SOUSA, S.P.; LOVATO, G.; ALBANEZ, R.; RATUSZNEI, S.M., RODRIGUES, J.A. D. Improvement of sugarcane stillage (vinasse) anaerobic digestion with cheese whey as its co-substrate: achieving high methane productivity and yield. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 189, p. 987-1006, 2019.
- SPEECE, R.E. Anaerobic Biotechnology for Industrial Wastewaters. Archae Press, Nashville, USA, 1996.
- SUNG, S.; LIU, T. Ammonia inhibition on thermophilic anaerobic digestion. **Chemosphere**, v. 53(1), p. 43–52, 2003.
- SUNYOTO, N.M.S.; ZHU, M.; ZHANG, Z.; ZHANG, D. Effect of biochar addition on hydrogen and methane production in two-phase anaerobic digestion of aqueous carbohydrates food waste. **Bioresource Technology**, v. 219, p. 29–36, 2016.
- SYAICHURROZI, I.; RUSDI; DWICAHYANTO, S.; TORON, Y.S. Biogas production from co-digestion vinasse waste and tofu-processing wastewater and kinetics. **International journal of renewable energy research**, v. 6, n. 3, 2016.
- SZMRECSÁNYI, T. Tecnologia e Degradação Ambiental: O Caso Da Agroindústria. **Informações Econômicas**, v. 24, n. 10, p. 73–82, 1994.

- TACONI, K.A.; VENKATARAMANAN, K.P.; JOHNSON, D. T. Growth and solvent production by *Clostridium pasteurianum* ATCC® 6013™ utilizing biodiesel-derived crude glycerol as the sole carbon source. **Environmental Progress & Sustainable Energy**, v. 28, n. 1, p. 100-110, abr. 2009.
- TCHOBANOGLIOUS, G.; BURTON, F.L.; STENSEL, H.D.; METCALF & EDDY Inc., Wastewater Engineering: Treatment and Reuse (4th ed.), McGraw-Hill Inc., New York (2003).
- THANIKAL, J.V.; TORRIJOS, M.; HABOUZIT, F.; MOLETTA, R. Treatment of distillery vinasse in a high rate anaerobic reactor using low density polyethylene supports. **Water Science and Technology**, v. 56, n. 2, p. 17-24, july. 2007.
- TOLEDO-CERVANTES, A.; GUEVARA-SANTOS, N.; ARREOLA-VARGAS, J.; SNELL-CASTRO, R.; MÉNDEZ-ACOSTA, H. O. Performance and microbial dynamics in packed-bed reactors during the long-term two-stage anaerobic treatment of tequila vinasses. **Biochemical Engineering Journal**, v. 138, p. 12–20, 2008.
- ÚNICA. União Da Indústria De Cana-De-Açúcar. UnicaData, Produção: Histórico de produção e moagem, 2020. Disponível em: <<http://unicadata.com.br/pdfHPM.php?idioma=1&tipoHistorico=4&idTabela=2449&produto=&safr=2019/2020&safrIni=&safrFim=&estado=RS,SC,PR,SP,RJ,MG,ES,MS,MT,G O,DF,BA,SE,AL,PE,PB,RN,CE,PI,MA,TO,PA,AP,RO,AM,AC,RR>>. Acesso: 25 jun. 2020.
- VALLERO, M.V.G.; LETTINGA, G.; LENS, P.N.L. Long-term adaptation of methanol-fed thermophilic (55°C) sulfate reducing reactors to NaCl. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 30, p. 375–382, 2003.
- VAN DEN BERG L.; KENNEDY K.J.; SAMSON R. Anaerobic downflow stationary fixed film reactors: performance under steady-state and non-steady conditions. **Water Science and Technology**, v. 17, p. 89±102, 1985.
- VAN LIER, J.B.; VAN DER ZEE, F.P.; FRIJTERS, C.T.M.J; ERSAHIN, M.E. Celebrating 40 years anaerobic sludge bed reactors for industrial wastewater treatment. **Reviews in Environmental Science and Bio/technology**, v. 14, n. 4, p. 681-702, 30 ago. 2015.
- VAN MARIS, A.J.A; ABBOTT, A.D.; BELLISSIMI, E.; VAN DEN BRINK, J.; KUYPER, M.; LUTTIK, M. A. H.; WISSELINK, H. W.; SCHEFFERS, W. A.; VAN DIJKEN, J.P.; PRONK, J. T. Alcoholic fermentation of carbon sources in biomass hydrolysates by *Saccharomyces cerevisiae*: current status. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 90, n. 4, p. 391-418, 11 out. 2006.
- VASCONCELOS, E.A.F.; SANTAELLA, S.T.; VIANA, M.B.; DOS SANTOS, A.B.; PINHEIRO, G.C.; LEITÃO, R.C. Composition and ecology of bacterial and archaeal communities in anaerobic reactor fed with residual glycerol. **Anaerobe**, v. 59, p. 145-153, 2019.
- VEIGA, M.C.; SOTO, M.; MÉNDEZ, R.; LEMA, J.M. A new device for measurement and control of gas production by bench scale Anaerobic digesters. **Water Research**, v. 24, n. 12, p. 1551-1554, 1990.
- VIANA, M.B.; FREITAS, A.V.; LEITÃO, R.C.; PINTO, G.A.S.; SANTAELLA, S.T. Anaerobic digestion of crude glycerol: a review. **Environmental Technology Reviews**, v. 1, n. 1, p. 81-92, nov. 2012.

- VIANA, M.B.; FREITAS, A.V.; LEITÃO, R.C.; SANTAELLA, S.T. Anaerobic biodegradability, methane production potential and toxicity of the glycerol generated on biodiesel industry. *In: Proceedings of the 10th Latin American Workshop and Symposium on Anaerobic Digestion*, Ouro Preto, Brazil, 2011.
- VIEGAS, T.O.C.; ARANTES, L.S. Políticas públicas para a ampliação da produção de biodiesel no Brasil. **Revista Observatorio de la Economía Latinoamericana**, Equador, out. 2018.
- VILELA, R.S. **Produção de Hidrogênio e Metano a partir de subproduto da indústria sucroalcooleira, em reatores anaeróbios de fases separadas sob condições termofílica**. 2017. 164f. Tese (Doutorado em Ciências: Engenharia Hidráulica e Saneamento) - Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2017. Disponível em: < <https://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/18/18138/tde-18042017-110703/pt-br.php>> Acesso em: 10 mar. 2019.
- VILELA, R.S.; DAMIANOVIC, M.H.R.Z.; FORESTI, E. Removing organic matter from sulfate-rich wastewater via sulfidogenic and methanogenic pathways. **Water Science and Technology**, v. 69, n. 8, p. 1669-1675, fev. 2014.
- VLASSIS, T.; STAMATELATOU, K.; ANTONOPOULOU, G.; LYBERATOS, G. Methane production via anaerobic digestion of glycerol: a comparison of conventional (CSTR) and high-rate (PABR) digesters. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, 2013.
- WANG, K., YIN, J., SHEN, D., LI, N. Anaerobic digestion of food waste for volatile fatty acids (VFAs) production with different types of inoculum: effect of pH. **Bioresour. Technol.**, v. 161, p. 395–401, 2014.
- WILKIE, A.C.; RIEDESEL, K.J.; OWENS, J.M. Stillage characterization and anaerobic treatment of ethanol stillage from conventional and cellulosic feedstocks. **Biomass and Bioenergy**, v. 19, n. 2, p. 63-102, ago. 2000.
- WITTMANN, C.; ZENG, A.P.; DECKWER, W.D. Growth inhibition by ammonia and use of a pH-controlled feeding strategy for the effective cultivation of *Mycobacterium chlorophenolicum*. **Appl Environ Microbiol**, v. 44, p. 519–525, 1995.
- WRIGLEY, E.A. Energy and the English industrial revolution. *philosophical transactions of the royal society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences*, v. 371, mar. 2013.
- XIE, S.; FAISAL, I.H.; XINMIN Z.; WENSHAN, G.; HAO, H.N.; PRICE, W.E. NGHIEM, L.D. Anaerobic co-digestion: A critical review of mathematical modelling for performance optimization. **Bioresource Technology**, v. 222, p. 498-512, 2016.
- YANG, Y.; TSUKAHARA, K.; SAWAYAMA, S. Biodegradation and methane production from glycerol-containing synthetic wastes with fixed-bed bioreactor under mesophilic and thermophilic anaerobic conditions. **Process Biochem.**, v. 43, p. 362–367, 2008.
- YU, L.; WENSEL, P.C. Mathematical modeling in anaerobic digestion (AD). **Journal of Bioremediation & Biodegradation**, s.4, 2013.
- ZAHEDI, S.; RIVERO, M.; SOLERA, R.; PEREZ, M. Mesophilic anaerobic co-digestion of sewage sludge with glycerine: Effect of solids retention time. **Fuel**, v. 215, p. 285–289, 2018.
- ZAIAT, M.; CABRAL, A.K.A.; FORESTI, E. Reator anaeróbio horizontal de leito fixo para tratamento de águas residuárias: concepção e avaliação preliminar de desempenho. **REBEQ**, v. 11(2), p. 33-42, 1994.

- ZHANG, D. Crystallization characteristics and fuel properties of tallow methyl esters. Master thesis: **Food Science and Technology**. USA: University of Nebraska-Lincoln, 1994.
- ZHOU, C.H.; BELTRAMINI, J.N.; FAN, Y.X.; LU, G.Q. Chemoselective catalytic conversion of glycerol as a biorenewable source to valuable commodity chemicals. **Chemical Society Reviews**, v. 37, n. 3, p. 527-549, 2008.
- ZWIETERING, M. H.; JONGENBURGER, I.; ROMBOUTS, F.M.; VAN'T RIET, K. Modeling of the bacterial growth curve. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 56, n. 6, p. 1875–1881, 1990.