UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA DE ENGENHARIA DE SÃO CARLOS

PAULA YUMI TAKEDA

Manutenção da produção de metano em indústrias sucroalcooleiras, a partir da substituição de vinhaça por glicerol no período de entressafra de cana-de-açúcar

VERSÃO CORRIGIDA

São Carlos

2021

PAULA YUMI TAKEDA

Manutenção da produção de metano em indústrias sucroalcooleiras, a partir da substituição de vinhaça por glicerol no período de entressafra de cana-de-açúcar

Dissertação apresentada à Escola de Engenharia de São Carlos da Universidade de São Paulo, como requisito para a obtenção do Título de Mestre em Ciências: Engenharia Hidráulica e Saneamento.

Orientadora: Prof^a Dr^a Márcia Helena Rissato Zamariolli Damianovic

VERSÃO CORRIGIDA

São Carlos

2021

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).

T136m Takeda, Paula Yumi
 Manutenção da produção de metano em indústrias
 sucroalcooleiras, a partir da substituição de vinhaça
 por glicerol no período de entressafra de cana-de-
 açúcar / Paula Yumi Takeda; orientadora Márcia Helena
 Rissato Zamariolli Damianovic. São Carlos, 2021.

 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, 2021.

 1. Vinhaça de cana-de-açúcar. 2. Codigestão
 anaeróbia. 3. Bioenergia. 4. Biodiesel. 5.
 Entressafra.. I. Título.

FOLHA DE JULGAMENTO

Candidata: Engenheira **PAULA YUMI TAKEDA**.

Título da dissertação: "Manutenção da produção de metano em indústrias sucroalcooleiras, a partir da substituição de vinhaça por glicerol no período de entressafra de cana-de-açúcar".

Data da defesa: 02/07/2021.

Comissão Julgadora

Resultado

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

Aprovada

Profa. Dra. **Simone Damasceno Gomes**
(Universidade Estadual do Oeste do Paraná/UNIOESTE)

Aprovada

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

Aprovada

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

Agradeço, primeiramente, a Deus, pelo dom da vida, por abençoar minhas decisões e me conduzir em cada momento da minha caminhada.

Aos meus pais, Clara e Sandro, pela educação, determinação, disciplina e por sempre incentivar o caminho que escolhi. Por todo amor, carinho e companheirismo em minha vida. À minha irmã, pelas risadas e momentos divididos, por vê-la crescer e desenvolver seu caráter.

À minha orientadora, Professora Márcia, por todo ensinamento. Obrigada por toda atenção, compreensão e disposição em me ajudar em todas as situações, pelo acolhimento e carinho, e por ser esse grande exemplo de humildade e dedicação - Muito feliz por participar de seu grupo!

Ao professor Rogers, professora Simone e Valéria pelas imensas contribuições no decorrer desse trabalho e conhecimentos compartilhados. À professora Jackeline, pela valiosa contribuição em minha iniciação científica, pelos ensinamentos e amizade construída.

Às amigas Camila e Ana Paula, por compartilhar de grandes momentos, das alegrias às preocupações, desde 2014. Por todo apoio, amizade e mensagens trocadas, obrigada.

Às roommates, Luana e Rafaela, pelo compartilhamento do “Lar doce lar”, pelas gordices e risadas, por sempre me ouvirem (reclamar), por tornarem os dias mais leves, pela compreensão e companheirismo na longa caminhada da pós. E, não menos importante, pelos doramas compartilhados.

Aos grandes companheiros e amigos do LPB: Mariê, Rafaela, Luana, Luciana, Lili, Jeny, Pam, Lucas, Dudu, Renan, Will, Felipe, obrigada por alegrarem meus dias na bancada, por me salvarem de todos os apuros do reator, pelos marcantes momentos de bandeco e café na copinha.

Aos fiéis amigos de grupo: Carol, Rhayssa, Cris, Guilherme, Alex, André, Inaê, Heitor, por toda atenção, disposição e ajuda ao longo dessa jornada, “ao vivo” ou “online”. Especialmente, agradeço à Carol, Rhayssa e Cris, por sempre compartilharem das risadas e perrengues da pesquisa.

Aos vinhacers, Luana, Rafaela, Drica, Jaque, Will, Felipe, Renan e André, pela cumplicidade nas coletas e todo conhecimento compartilhado.

Agradecimento especial à Mariê, dorameira kpopeira, que foi o porto seguro que a pós me deu, que me incentivou e aguentou, principalmente nos temíveis dias de pandemia, que alegrou meus dias dentro e fora do laboratório!

À Gabriela, aquela que compartilhou grandes horas comigo durante as disciplinas e a escrita, a primeira grande amiga de Sanca, por todas as conversas, desabafos e risadas, muitíssimo obrigada!

Às técnicas Carol Sabatini, Janja, Bel e Elô do Laboratório de Processos Biológicos, por toda ajuda e por tornarem possível a realização desse trabalho.

Aos funcionários da Usina São Martinho, pelo fornecimento das amostras de vinhaça.

A todos aqueles que de alguma forma contribuíram para a conclusão dessa etapa.

Às agências de fomento, Fundação de Amparo e Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), processo nº 2019/13847-8, e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão de bolsa e todo investimento.

Meus mais sinceros agradecimentos.

“Não existe um caminho para a felicidade.

A felicidade é o caminho”

Mahatma Ganghi

“You gotta know that you’re one in a million”

One in a million – TWICE

RESUMO

TAKEDA, P. Y. **Manutenção da produção de metano em indústrias sucroalcooleiras, a partir da substituição de vinhaça por glicerol no período de entressafra de cana-de-açúcar.** 2021. 121f. Dissertação (Mestrado) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2021.

Os sistemas de tratamento de águas residuárias que utilizam os processos anaeróbios são promissores para remoção da carga orgânica poluidora da vinhaça, associada à produção de bioenergia. O interesse científico aponta para o aprimoramento do processo de degradação desse efluente, pela interpretação das vias metabólicas associadas, permitindo a implantação e manutenção dos processos envolvidos com elevada eficiência e produção de metano para recuperação energética. A interrupção na operação de reatores anaeróbios em períodos de entressafra de cana-de-açúcar é, seguramente, um grande desafio a ser enfrentado no tratamento anaeróbio de águas residuárias das indústrias sucroalcooleiras, uma vez que o período de repartida é mais lento que o desejado, comprometendo negativamente o balanço energético em usinas sucroalcooleiras. Outro resíduo, com elevado conteúdo orgânico que merece destaque é o glicerol, subproduto da cadeia produtiva de biodiesel, produzido em volumes expressivos e difícil disposição, uma vez que o mercado se encontra saturado quanto às suas aplicações. Perante o exposto, avaliou-se o potencial uso de glicerol por digestão anaeróbia para geração de metano e manutenção da população microbiana ativa em reator anaeróbio de leito fixo estruturado (AnSTBR) tratando vinhaça, durante o período relativo à entressafra. A codigestão de ambos os resíduos também foi avaliada com o objetivo de verificar melhorias nas condições operacionais e potencializar a recuperação energética. O estudo experimental foi conduzido em cinco fases contínuas de substituição de substratos em proporção de carga orgânica de 100% vinhaça (I); 50% vinhaça e 50% glicerol (IIA, IIB); 100% glicerol (III); 50% vinhaça e 50% glicerol (IV); e 100% vinhaça (V), respectivamente, aplicando carga orgânica volumétrica de $5,0 \text{ kgDQO m}^{-3} \text{ d}^{-1}$. Excepcionalmente, a fase II foi subdividida em duas etapas, em que houve interrupção da operação do reator por um período de 150 dias entre as etapas. A operação do reator AnSTBR apresentou resultados promissores quanto à remoção de matéria orgânica, com eficiências de $81,1 \pm 1,5\%$; $84,7 \pm 1,1\%$; $83,7 \pm 0,9\%$; $93,1 \pm 0,6\%$; $91,0 \pm 0,9\%$; $82,3 \pm 0,6\%$, em termos de DQO total; e à produção de metano, com rendimentos de $250,6 \pm 13,2$; $268,8 \pm 12,5$; $246,5 \pm 8,0$; $232,2 \pm 17,2$; $227,7 \pm 15,3$; $235,2 \pm 9,9 \text{ NmLCH}_4 \text{ g}^{-1} \text{DQO}_{\text{removida}}$, respectivamente. A codigestão de vinhaça e glicerol incrementou em cerca de 12% a produção de metano comparativamente à monodigestão de vinhaça, anteriormente à interrupção do reator e utilização de glicerol como única fonte de carbono. A estratégia operacional de permuta gradual de substratos permitiu estabilidade ao sistema ao longo da operação, mantendo a biomassa ativa, com suplementação de álcali de $0,15 \text{ gNaHCO}_3 \text{ g}^{-1} \text{DQO}$ e ajuste do pH afluente em 7,0. Os resultados indicaram o potencial da estratégia de utilização do glicerol em substituição à vinhaça em período de entressafra de cana-de-açúcar, assim como da codigestão de ambos os resíduos da agroindústria, promovendo a manutenção da produção de metano.

Palavras-chave: Vinhaça de cana-de-açúcar. Codigestão anaeróbia. Bioenergia. Biodiesel. Entressafra.

ABSTRACT

TAKEDA, P. Y. **Maintenance of methane production in sugar-ethanol industries, by replacing vinasse with glycerol in sugarcane off-season.** 2021. 121f. Dissertação (Mestrado). Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2020.

Wastewater treatment systems using anaerobic processes are promising for removing the organic polluting load from vinasse, associated with the production of bioenergy. Scientific interest points to the improvement of the degradation process of this effluent, through the interpretation of the associated metabolic pathways, allowing the implementation and maintenance of the processes involved with high efficiency and methane production for energy recovery. The interruption in the operation of anaerobic reactors in the off-season of sugarcane is certainly a major challenge to be faced in the anaerobic treatment of wastewater from the sugar-ethanol industries. ~~ABSTRACT~~ the restart-up period is slower than desired, negatively compromising the energy balance in sugar-ethanol industry. Another waste with high organic content that deserves mention is glycerol, a by-product of the biodiesel production chain, produced in expressive volumes and difficult to dispose of, since the market is saturated about its applications. Given the above, the potential use of glycerol by anaerobic digestion for the generation of methane and maintenance of the active microbial population in an anaerobic structured bed reactor (AnSTBR), was evaluated treating vinasse during the off-season period. The co-digestion of both wastes was also evaluated in order to verify improvements in operational conditions and enhance energy recovery. The experimental study was carried out in five continuous phases of substrate replacement in a proportion of organic load of 100% vinasse (I); 50% vinasse and 50% glycerol (IIA, IIB); 100% glycerol (III); 50% vinasse and 50% glycerol (IV); and 100% vinasse (V), respectively, applying an organic load rate of 5.0 kgCOD m⁻³ d⁻¹. Exceptionally, phase II was subdivided into two stages, in which the operation of the reactor was interrupted for a period of 150 days between the stages. The operation of the AnSTBR reactor showed promising results regarding the removal of organic matter, with efficiencies of 81.1 ± 1.5%; 84.7 ± 1.1%; 83.7 ± 0.9%; 93.1 ± 0.6%; 91.0 ± 0.9%; 82.3 ± 0.6%, in terms of total COD; and the methane production, with yields of 250.6 ± 13.2; 268.8 ± 12.5; 246.5 ± 8.0; 232.2 ± 17.2; 227.7 ± 15.3; 235.2 ± 9.9 mLCH₄ g⁻¹COD_{removed}, respectively. Vinasse and glycerol co-digestion increased methane production about 12% compared to vinasse mono-digestion, prior to the interruption of the reactor and use of glycerol as the sole carbon source. The operational strategy of gradual substrates exchange demonstrated stability throughout the operation, maintaining the biomass active, with an alkali supplementation of 0.15 gNaHCO₃ g⁻¹COD and pH adjustment at 7.0. The results indicated the potential of the strategy of using glycerol to replace vinasse in the sugarcane off-season, as well as the co-digestion of both residues from the agro-industry, promoting the maintenance of methane production.

Keywords: Sugarcane vinasse. Anaerobic co-digestion. Bioenergy. Biodiesel. Off-season.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Fluxograma simplificado da produção de açúcar e etanol.	29
Figura 2: Sequência das atividades metabólicas na digestão anaeróbia.	37
Figura 3: Reação de transesterificação de triglicerídeos	44
Figura 4: Rotas metabólicas de fermentação de glicerol.	46
Figura 5: Representação esquemática do aparato experimental.	54
Figura 6: Detalhes do reator: (a) Estrutura do reator com material suporte; (b) Montagem do reator em câmara climatizada; (c) Bomba dosadora; (d) Medidor tubo em U e sistema arduíno.	55
Figura 7: Fluxograma de fases experimentais.	56
Figura 8: Perfil temporal do (a) pH (-○-) e proporção de glicerol afluyente (—);.....	69
Figura 9: Perfil temporal das eficiências de remoção de matéria orgânica (ER _{DQOt} , -○-; ER _{DQOs} , -●-); proporção do substrato glicerol (—) e DQOt afluyente (■) e efluente (■).....	71
Figura 10: Gráfico <i>boxplot</i> da eficiência de remoção de matéria orgânica, em termos de DQOt, em relação à cada fase experimental.	74
Figura 11: Perfil temporal da eficiência de conversão de (a) carboidratos totais e (b) glicerol (ER _{CH} , ER _{GL} , -○-); concentração de carboidratos totais e glicerol afluyente (CH, GL, ■) e efluente (CH, GL, ■) e proporção de glicerol afluyente (—).....	79
Figura 12: Perfil temporal da eficiência de conversão de sulfato (ER _{SO4} , -○-); proporção do substrato glicerol (—) e concentração de sulfato afluyente (SO ₄ ⁻² , ■) e efluente (SO ₄ ⁻² , ■).	80
Figura 13: Composição do biogás (CH ₄ , -●-; CO ₂ , -○-); proporção do substrato glicerol (—) e carga orgânica volumétrica aplicada (COV, ■).....	82
Figura 14: Perfil temporal de: (a) vazão de biogás (VBG, -●-) e proporção de glicerol	84
Figura 15: Gráfico <i>boxplot</i> da produção volumétrica de metano (PVM) em relação à cada fase experimental.	86
Figura 16: Gráfico <i>boxplot</i> do rendimento de metano (MY) em relação à cada fase experimental.	89
Figura 17: Metabólitos solúveis: (a) perfil temporal de concentração de metabólitos e proporção de glicerol afluyente (—); (b) proporção de metabólitos e relação de ácidos propiônico e acético (HPr/HAc, ●). Legenda: ácido acético (■), ácido propiônico (▨), ácido butírico (■) e metanol (■).....	94
Figura 18: Perfil temporal da concentração de sólidos suspensos voláteis efluente (-○-); proporção do substrato glicerol (—).	97

Figura 19: Aspecto físico do reator: (a) após inoculação e (b) no 122º dia de operação.	97
Figura 20: Perfil temporal da: (a) biomassa retida (-○-) e proporção de glicerol afluyente (—); (b) carga orgânica volumétrica específica (COVe, -●-) e aplicada (COV, ■).....	100
Figura 21: Relação entre COVe (-●-) no rendimento de metano (MY, ■).....	102
Figura 22: Aspecto físico da biomassa aderida ao meio suporte nas fases: (a) I; (b) III e (c) V.	103
Figura 23: Balanços de massa: (a) fração solúvel e (b) global	105
Figura 24: Amostras efluentes (a) pré precipitação e pós precipitação e filtração; (b) e (c) formação do precipitado orgânico.....	106

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Características físico-químicas da vinhaça.....	31
Tabela 2: Vantagens e desvantagens de opções tecnológicas para destinação da vinhaça.	33
Tabela 3: Referências em digestão anaeróbia da vinhaça de cana-de-açúcar (continua).....	40
Tabela 4: Referências em codigestão anaeróbia a partir de vinhaça e outros substratos.	42
Tabela 5: Composição físico-química do glicerol bruto.	45
Tabela 6: Referências em codigestão anaeróbia a partir de glicerol e outros substratos (continua).....	48
Tabela 7: Caracterização físico-química das amostras de vinhaça de cana-de-açúcar (continua).	51
Tabela 8: Caracterização do inóculo quanto à concentração de sólidos.....	53
Tabela 9: Solução de macronutrientes.....	57
Tabela 10: Solução de micronutrientes para cada 1 gDQO L ⁻¹	58
Tabela 11: Condições experimentais aplicadas.	58
Tabela 12: Análises e métodos analíticos para monitoramento do reator.	59
Tabela 13: Principais equações utilizadas para verificação do desempenho dos reatores (continua).....	61
Tabela 14: Fatores de equivalência para balanço de massa.....	64
Tabela 15: Eficiências de remoção de matéria orgânica em mono- e codigestão de vinhaça e glicerol.	75
Tabela 16: Ajustes de alcalinidade e remoção de matéria orgânica em sistemas anaeróbios operados com vinhaça e/ou glicerol (continua).....	76
Tabela 17: Comparação entre reatores anaeróbios contínuos tratando vinhaça e glicerol quanto à produção de metano (continua).....	90
Tabela 18: Dados gerais dos parâmetros de monitoramento do reator.....	92
Tabela 19: Produção e retenção de biomassa ao longo do período operacional.	98

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

%CH₄: Conteúdo de metano no biogás

%CO₂: Conteúdo de gás carbônico no biogás

ADP: Adenosina difosfato

AI: Alcalinidade intermediária

AM: Arqueas metanogênicas

AP: Alcalinidade parcial

APBR: Reator anaeróbio de leito fixo empacotado (*Anaerobic packed-bed reactor*)

AnSBBR: Reator anaeróbio operado em bateladas sequenciais

AnSTBR: Reator anaeróbio de leito fixo estruturado

AT: Alcalinidade total

ATP: Adenosina trifosfato

AVT: Ácidos voláteis totais

APHA: *American public health association*

BMFS: Balanço de massa da fração solúvel

BMG: Balanço de massa global

BRS: Bactérias redutoras de sulfato

C:N: Relação carbono:nitrogênio

C1-C4: Coleta de vinhaça

CAPES: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior

CH: Concentração de carboidratos totais

CH₄: Gás metano

CNTP: Condições Normais de Temperatura e Pressão

CONAB: Companhia Nacional de Abastecimento

CO₂: Gás carbônico

COT: Carbono orgânico total

COV: Carga orgânica volumétrica

COVe: Carga orgânica volumétrica específica

CSTR: Reator anaeróbio de tanque agitado (*Continuously stirred-tank reactor*)

D: Massa de sólidos descartada no tempo “n”

DBO: Demanda bioquímica de oxigênio

DGGE: Eletroforese em Gel de Gradiente Desnaturante (*Denaturing Gradient Gel Electrophoresis*)

DQO: Demanda química de oxigênio

DQOr: Demanda química de oxigênio removida

DQOt: Demanda química de oxigênio total

DQOs: Demanda química de oxigênio solúvel

EESC: Escola de Engenharia de São Carlos

ERCH: Eficiência de remoção de carboidratos

ER_{DQO}: Eficiência de remoção de DQO

ER_{GL}: Eficiência de remoção de glicerol

ER_{SO4}: Eficiência de remoção de sulfato

EtOH: Etanol

FAPESP: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo

GC: Cromatografia gasosa

GL: Glicerol

H₂: Gás hidrogênio

H₂S: Sulfeto de hidrogênio

H₂SO₄: Ácido sulfúrico

HAc: Ácido acético

HBu: Ácido butírico

HCa: Ácido caproico

HCl: Ácido clorídrico

HPr: Ácido propiônico

HVa: Ácido valérico

HUASB: Reator anaeróbio de fluxo ascendente e manta de lodo híbrido

K: Potássio

KH₂PO₄: Fosfato de potássio monobásico

LPB: Laboratório de Processos Biológicos

MeOH: Metanol

MY: Rendimento de metano

N: Nitrogênio

NaCl: Cloreto de sódio

NAD/NADH: Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo

NaHCO₃: Bicarbonato de sódio

NaOH: Hidróxido de sódio

nd: Não determinado

NH₄Cl: Cloreto de amônio

NTK: Nitrogênio Total Kjeldahl

P: Fósforo

PCR: Reação em Cadeia de Polimerase (*Polymerase Chain Reaction*)

pH: Potencial hidrogeniônico

PVM: Produção volumétrica de metano

Px: Produção de biomassa por consumo de substrato em um determinado intervalo de tempo

Q: Vazão

S: Massa total de DQO consumida

SO₄⁻²: Sulfato

SSF: Sólidos suspensos fixos

SST: Sólidos suspensos totais

SSV: Sólidos suspensos voláteis

SSVe: Sólidos suspensos voláteis na corrente efluente

ST: Sólidos totais

SV: Sólidos voláteis

T: Temperatura

TCD: Detector de condutividade térmica

TDH: Tempo de detenção hidráulica

UASB: Reator anaeróbio de fluxo ascendente e manta de lodo (*Upflow anaerobic sludge blanket*)

USP: Universidade de São Paulo

V: Vinhaça

VBG: Vazão de biogás

VMM: Vazão molar de metano

Vr, Vu: Volume útil do reator

Xa: Quantidade de biomassa aderida

Xd: Quantidade de biomassa descartada

Xe: Quantidade de biomassa lavada

Xn: Quantidade de biomassa acumulada/retida no tempo “n”

Xn-1: Quantidade de biomassa acumulada no tempo “n-1”

Xs: Quantidade de biomassa suspensa

Xt: Quantidade de biomassa total produzida

$Y_{X/S}$: Coeficiente de rendimento celular

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA	23
2. HIPÓTESE E OBJETIVOS	25
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	27
3.1. Indústria sucroalcooleira	27
3.2. Vinhaça	29
3.3. Tratamento anaeróbio de vinhaça: Fundamentos e aplicação.....	34
3.3.1. Digestão anaeróbia	34
3.3.2. Codigestão anaeróbia.....	38
3.4. Glicerol	43
3.4.1. Fermentação do glicerol	45
3.4.2. Glicerol como cossustrato em potencial.....	46
3.5. Considerações finais	50
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	51
4.1. Origem, coleta e caracterização da vinhaça e do glicerol.....	51
4.2. Inóculo	53
4.3. Instalação experimental.....	53
4.4. Procedimentos experimentais	55
4.5. Avaliação do desempenho do reator: Métodos analíticos e cálculos.....	59
4.5.1. Balanço de massa.....	63
4.5.2. Coeficiente de rendimento celular (YX/S) e carga orgânica volumétrica específica (COVe)	65
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	67
5.1. Desempenho do reator: Fase líquida.....	67
5.1.1. Estabilidade operacional.....	67
5.1.2. Remoção de matéria orgânica.....	70
5.2. Desempenho do reator: Fase gasosa	81
5.2.1. Produção e rendimento de metano	81
5.3. Avaliação dos metabólitos solúveis	93
5.4. Avaliação do crescimento da biomassa: análise da carga orgânica volumétrica específica (COVe)	96
5.5. Balanços de massa: fração solúvel e global	104
6. CONCLUSÕES.....	108

REFERÊNCIAS..... 109

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

A presente pesquisa aborda questões referentes ao tratamento de águas residuárias, vinhaça e glicerol, com o objetivo de geração de metano, investigando a potencial utilização do processo de codigestão anaeróbia no incremento do potencial de recuperação energética e do glicerol como substrato alternativo para manutenção da produção de biogás durante período de entressafra de cana-de-açúcar.

A busca por fontes alternativas e renováveis de energia tem incentivado a investigação da capacidade energética de diferentes substratos, como os subprodutos da indústria de processamento de cana-de-açúcar, abundantemente gerados no Brasil. A cana-de-açúcar compreende uma das principais culturas da economia brasileira. A indústria sucroalcooleira busca conciliar as preocupações relativas ao meio ambiente e os efeitos indesejáveis da utilização dos combustíveis fósseis, ao produzir etanol a partir de fonte renovável (CONAB, 2020).

No processo de produção do biocombustível é gerada como principal água residuária a vinhaça, (BNDES, CGEE, 2008; ESPAÑA-GAMBOA et al., 2011; DOS SANTOS et al., 2013; MORAES, ZAIAT, BONOMI, 2015). Devido à elevada carga orgânica da vinhaça, verifica-se potencial de aplicação de processos biológicos visando a recuperação de energia ou outros produtos de interesse (FUESS, GARCIA, 2014; MORAES et al., 2014).

Sabe-se que nas indústrias sucroalcooleiras, a produção da cana-de-açúcar é sazonal. A interrupção da safra de cana-de-açúcar e, conseqüentemente, da produção de etanol e açúcar, pode prejudicar o balanço energético da indústria, devido à interrupção da produção de metano em reatores anaeróbios alimentados com vinhaça. Além disso, o período de repartida de tais reatores no período de safra deve ser o mais rápido possível, visando promover a devida destinação da vinhaça e explorar seu potencial de produção de metano. A utilização de outros substratos, a exemplo do melaço, nos períodos de entressafra tem sido pouco explorada como alternativa, principalmente em função da dificuldade de estabilidade do sistema com a troca de fonte orgânica e retorno à utilização da vinhaça (JÁUREGUI-JÁUREGUI et al., 2014; BARBOSA, 2017).

O interesse científico aponta para a associação de diferentes substratos, com o objetivo de aumentar a recuperação bioenergética, fazendo uso do processo de codigestão anaeróbia (BELLE et al., 2015). Essa união de substratos vem sendo considerada uma opção interessante para superar as limitações da digestão anaeróbia com apenas um substrato, pois além de

fornecer nutrientes que podem manter o equilíbrio do processo e aumentar a produção de metano, ela também pode reduzir os custos do tratamento de vários resíduos (MATA-ALVAREZ et al., 2014; GUVEN et al., 2018).

Alguns relatos de codigestão anaeróbia de vinhaça de cana-de-açúcar e outros substratos, tais como o soro de leite e o glicerol, apresentaram resultados satisfatórios quanto à maior recuperação bioenergética do efluente da indústria sucroalcooleira (ALBUQUERQUE, RATUSZNEI, RODRIGUES, 2019; BORGES, 2020; LOVATO et al., 2019a, 2019b; SOUSA et al., 2019; SYAICHURROZI et al., 2016). Desse modo, o presente projeto buscou associar glicerol como potencial cossustrato no tratamento anaeróbio da vinhaça de cana-de-açúcar, verificando sua viabilidade operacional, e aplicando o conceito de biorrefinaria.

O glicerol, proveniente da cadeia produtiva do biodiesel, equivale a aproximadamente 10% do volume total do biocombustível produzido, é um resíduo de elevada carga orgânica biodegradável, com alto potencial poluente (NGHIEM et al., 2014; HE, MCNUTT, YANG, 2017). Tal composto apresenta características as quais apontam para uma alternativa atrativa de utilização como substrato em reatores anaeróbios em substituição à vinhaça, e como cossustrato, visando maior recuperação bioenergética. Isto deve-se à presença de glicerol na constituição da própria vinhaça, indicando uma possível manutenção das comunidades microbianas, das eficiências de remoção de matéria orgânica e da produção de metano quando da permuta de substratos; elevada carga orgânica biodegradável do glicerol; presença de nutrientes e sulfato na vinhaça, deficientes no glicerol; pH ácido da vinhaça em associação com o pH neutro do glicerol (DEL NERY et al., 2018; FUESS et al., 2017; LARSEN et al., 2013).

Diante desse cenário, a proposta deste projeto foi avaliar a substituição da vinhaça por glicerol em período referente à entressafra da cana-de-açúcar. A fim de contribuir com as bases científicas para propor soluções frente à problemática da entressafra, compreendendo a resiliência das comunidades microbianas frente à substituição de substratos. A avaliação dos processos de mono e codigestão anaeróbia de ambas as matrizes orgânicas também foi realizada e avaliada quanto ao conceito de biorrefinaria.

2. HIPÓTESE E OBJETIVOS

A condução desta pesquisa derivou da hipótese central de que a substituição de vinhaça por glicerol no período entressafra não causa grandes alterações na eficiência do reator e produção de biogás, mantendo a população microbiana ativa. Dessa forma, teve-se por objetivo principal avaliar o efeito da permuta de substrato na eficiência do sistema e o retorno à utilização da vinhaça.

Para alcançar o objetivo principal foram formulados os seguintes objetivos específicos:

- Objetivo específico 1: Avaliar experimentalmente a codigestão anaeróbia de vinhaça e glicerol; e monodigestão de vinhaça e de glicerol em relação à eficiência do reator e produção de metano;
- Objetivo específico 2: Avaliar experimentalmente duas fases de utilização de vinhaça, antes e pós entressafra (substituição por glicerol), quanto à eficiência e produção de metano;
- Objetivo específico 3: Compreender a resposta da biomassa a cada etapa experimental por meio dos valores de coeficiente de rendimento celular e carga orgânica volumétrica específica.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

O presente capítulo apresenta informações consultadas na literatura de referência, julgadas como relevantes para a contextualização do projeto de pesquisa, atuando como base para discussão dos resultados, com destaque para os resíduos de vinhaça de cana-de-açúcar e glicerol, e o processo de monodigestão e codigestão anaeróbia para a produção de biogás e metano.

3.1. Indústria sucroalcooleira

O Proálcool foi um programa governamental, instituído em 1975, com o intuito de incentivar a produção de etanol para utilização como combustível, como uma alternativa ao uso de combustíveis petrolíferos, de elevado valor comercial no período (RODRIGUES, 2011). O programa possibilitou avanços tecnológicos na indústria sucroalcooleira, com investimentos em infraestrutura e gestão da produção de cana-de-açúcar. Deste modo, o Brasil atualmente é visto como referência mundial na produção de etanol à base de cana-de-açúcar (COELHO et al., 2006; GOES, MARRA, SILVA, 2008).

De maneira geral, o Brasil é considerado o segundo maior produtor mundial de bioetanol, com 26% da produção total em 2017, conforme dados estatísticos da *Renewable Fuels Association* (RFA). Liderando o cenário mundial ao considerar a cana-de-açúcar como fonte de matéria-prima (CRAGO et al., 2010).

O etanol pode ser utilizado como biocombustível, em substituição ou associação com gasolina, a fim de reduzir o consumo de combustíveis fósseis e emissão de gases de efeito estufa no setor de transportes, reduzindo em cerca de 12,7 milhões de toneladas de carbono equivalente ou redução em 70% de emissão de dióxido de carbono (CO₂) na atmosfera (PIMENTEL, 2003; VIEIRA, LIMA, BRAGA, 2007; FUESS et al., 2018).

O mercado brasileiro de açúcar e álcool tornou-se altamente competitivo a partir do Proálcool, da obrigatoriedade de misturar álcool com gasolina, e das legislações ambientais mais rigorosas quanto à utilização de biocombustíveis, fazendo com que a produção brasileira de álcool se expandisse (PACHECO, 2011).

As regiões tradicionais de plantio da cana são o Triângulo Mineiro, os estados de São Paulo, Goiás, Mato Grosso do Sul, Paraná e algumas regiões do Nordeste, sendo São Paulo o maior produtor atualmente (CONAB, 2020). A produção de cana-de-açúcar na safra 2020/21

foi estimada em 665 milhões de toneladas, com um acréscimo de 3,5% da produção referente à safra anterior de 2019/20. Excepcionalmente nessa safra estimou-se uma produção superior de açúcar (41,8 milhões de toneladas), contra 29,8 milhões na safra anterior (2019/20). Contrariando o recorde na produção de etanol da safra 2019/20, a redução na demanda por biocombustíveis resultou em redução de 7,9% da produção de etanol em relação à safra passada, equivalente à redução de 35,7 bilhões para 32,9 bilhões de litros de etanol, anidro e hidratado (CONAB, 2020).

O Brasil, dentre diversos países, possui condições favoráveis para a ampliação da produção de cana, visto que possui condições climáticas favoráveis para o desenvolvimento da cultura. Além de dominar a tecnologia de produção do etanol (GOES, MARRA, SILVA, 2008).

No caso da cana-de-açúcar, a matéria-prima é colhida, lavada para retirada de material particulado, e moída para extração do caldo. Como subproduto dessa etapa é gerado o bagaço, equivalente a cerca de 30% da massa inicial, é utilizado como combustível pela própria usina por meio de sua queima para geração de vapor, produzindo energia para o processamento da cana-de-açúcar. O caldo extraído é submetido a um tratamento físico-químico para retirada de impurezas, gerando a torta de filtro. O caldo é encaminhado para o processo de evaporação, cozimento, centrifugação e secagem na produção de açúcar, gerando como subproduto o melaço de cana-de-açúcar, de elevado teor de sacarose (QUINTERO et al., 2008; SALOMON, LORA, 2009).

Após a fermentação do melaço, do mosto (mistura de caldo e melaço) ou do caldo de cana, a partir de microrganismos fermentadores capazes de romper as moléculas de glicose e produzir etanol e gás carbônico, o líquido resultante (vinho), composto formado pela mistura de leveduras, açúcares não fermentáveis e etanol, é encaminhado para as colunas de destilação para separação do etanol, em que, por sua vez, produz um resíduo denominado vinhaça ou vinhoto. O produto da destilação do vinho passa por retificação gerando o etanol hidratado, com grau alcoólico de 93,5%, o qual, por desidratação obtém-se o produto final: etanol anidro (DIAS et al., 2015; QUINTERO et al., 2008; SALOMON, LORA, 2009). A Figura 1 apresenta um fluxograma com as etapas para produção de açúcar e etanol, a partir de cana-de-açúcar para melhor compreensão do processo.

A produção de açúcar, em contrapartida, dispensa a fermentação do caldo. O caldo clarificado de cana é conduzido ao tratamento térmico para remoção de cerca de 75% de água, para produção de uma espécie de xarope concentrado. Posteriormente, o caldo concentrado é centrifugado e lavado com água quente e vapor, produzindo o melaço. Finalmente, o açúcar é encaminhado à secagem, peneiramento e envase do produto (DIAS et al., 2015).

O correto gerenciamento das águas residuárias e resíduos gerados também é importante na cadeia produtiva. Quanto aos resíduos sólidos, o bagaço e palha são queimados em caldeiras para geração de vapor e eletricidade, suprimindo o consumo energético da indústria. Já a torta de filtro, gerada a partir do tratamento do caldo, é utilizada na adubação dos canaviais, devido à presença de nutrientes em sua composição (MORAES; ZAIAT; BONOMI, 2015). Quanto às águas residuárias, a vinhaça gerada é disposta principalmente no solo, no entanto algumas limitações ambientais estão associadas à esta disposição, conforme abordado nas seções seguintes.

Figura 1: Fluxograma simplificado da produção de açúcar e etanol.

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

3.2. Vinhaça

A vinhaça, ou vinhoto, é a principal água residuária da cadeia produtiva do etanol, sendo um subproduto originado na etapa de destilação (DOS SANTOS et al., 2013). Dados presentes da literatura indicam uma produção de 10 a 15 L de vinhaça a cada 1 L de etanol. Em termos gerais, a vinhaça é um efluente de cor escura, apresenta elevada concentração de matéria

orgânica, assim como de potássio e sulfato, elevada cor e salinidade, características ácidas e corrosivas, e elevada temperatura, aproximadamente 85-90°C (CRAVEIRO, SOARES, SCHMIDELL, 1986; SALOMON, LORA, 2009; ESPAÑA-GAMBOA et al., 2011; DE GODOI et al., 2019).

A composição da vinhaça é de cerca de 93% de solução aquosa e 7% de sólidos em suspensão, sendo que 5% desses últimos são constituídos de matéria orgânica, enquanto os 2% restantes são substâncias minerais como nitratos, fósforo, cálcio, magnésio, potássio e sulfato. A composição da vinhaça exige que cuidados sejam tomados avisando reduzir a inibição dos microrganismos em reatores anaeróbios (CRAVEIRO, SOARES, SCHMIDELL, 1986).

Na Tabela 1 são apresentados alguns parâmetros físico-químicos da vinhaça de acordo com a literatura de referência. Vale ressaltar a presença de glicerol como importante constituinte da vinhaça, advindos do processo de fermentação do caldo e/ou do melaço, em concentrações de 0,3 a 5,4 g L⁻¹ (DOWD et al., 1994; BONINI, 2012; DE GODOI et al., 2019), responsável pela escolha do glicerol como cossubstrato na codigestão anaeróbia da vinhaça nesta pesquisa, conforme abordado nas seções seguintes.

Na etapa de fermentação, no processo produtivo do biocombustível, a adição de ácido sulfúrico resulta na característica ácida do efluente, com variações de pH entre 3,5 e 5,0. As melanoidinas, compostos poliméricos de elevado peso molecular, formadas por reações de Maillard e diversos compostos fenólicos são importantes constituintes da vinhaça, os quais conferem coloração marrom escura ao efluente (ESPAÑA-GAMBOA et al., 2011; FERREIRA et al., 2011; MORAES, ZAIAT, BONOMI, 2015).

Segundo Salomon e Lora (2009), a composição química da vinhaça depende das características do solo, da variedade de cana-de-açúcar, do período de colheita e do processo industrial utilizado na produção de etanol. Devido à sua elevada carga orgânica e nutricional, a disposição da vinhaça diretamente nos corpos hídricos está associada à poluição de mananciais, destruição da fauna e flora aquáticas, prejudicando o abastecimento de água potável (BARBOSA, 2017).

Tabela 1: Características físico-químicas da vinhaça.

Referência	Matéria-prima	pH	DBO (g L ⁻¹)	DQO (g L ⁻¹)	NTK (mg L ⁻¹)	P (mg L ⁻¹)	K (mg L ⁻¹)	SO ₄ ⁻² (mg L ⁻¹)
Costa et al. (1986)	Caldo	3,7-4,6	16,5	33,0	700	91	1742	760
Craveiro, Soares, Schmidell (1986)		3,9	17,1	31,3	412	109	1473	nd
Prada, Guekezian, Suárez-Iha (1998)		3,7-4,6	6-16,5	15-33	150-700	10-120	1200-2100	600-700
Ferreira et al. (2011)		3,9	11,3	42	70	200	2300	1300
Del Nery et al. (2018)		4,2	nd	19,2	345	nd	1470	648
Costa et al. (1986)	Caldo + melaço	4,4-4,6	19,8	45,0	710	87	3817	3730
Prada, Guekezian, Suárez-Iha (1998)		4,4-4,6	19,8	45,8	480-710	9-200	3340-4600	3700-3730
Ferraz Jr. et al., (2014)		4,6	16,7	35,2	700	160	nd	1400
Fuess et al. (2017)		4,5	14,6	28,3	862	113	nd	1700
Costa et al. (1986)	Melaço	4,2-5,0	25	65	1610	127	6497	6400
Banu, Kaliappan, Beck (2006)		4,0-4,7	nd	82-101,5	1300-1850	250-750	7000-7200	1800-3000
España-Gamboa et al. (2012)		4,0	nd	121	1341	141	7262	5336

Legenda: DBO: demanda bioquímica de oxigênio; DQO: demanda química de oxigênio; NTK: nitrogênio total Kjeldahl; P: fósforo; K: potássio; SO₄⁻²: sulfato; nd: não determinado.

No Brasil, a vinhaça é comumente utilizada como fertilizante e fonte de potássio em áreas agrícolas como disposição do efluente. No entanto, essa prática não é recomendada sem a devida análise das características do solo e da vinhaça, visto que em quantidades inapropriadas pode ocorrer contaminações das águas subterrâneas, bem como problemas no solo (CRAVEIRO, SOARES, SCHMIDELL, 1986; SALOMON, LORA, 2009; BARBOSA, 2017).

Os critérios para disposição da vinhaça em uso agrícola são regulamentados, no estado de São Paulo, pela Portaria Estadual nº 4.231, estabelecida pela Companhia Ambiental do Estado de São Paulo (CETESB, 2015), porém, infelizmente, nessa regulamentação consta apenas dados de potássio, sendo negligenciada a elevada carga orgânica (MORAES, ZAIAT, BONOMI, 2015).

Com relação à disposição nos corpos d'água, a Portaria nº 323, publicada em novembro de 1978, pela Secretaria Especial do Meio Ambiente (SEMA) e vinculada ao Ministério do Interior, proíbe o lançamento direto e indireto em qualquer coleção hídrica pelas destilarias, obrigando-as a apresentarem projetos para implantação de sistemas que utilizem, de modo racional, a vinhaça e demais águas residuárias geradas na produção do etanol.

Devido à grande quantidade de vinhaça produzida foram desenvolvidos processos e operações de tratamentos e usos alternativos, como por exemplo, a reciclagem desse resíduo na fermentação, fertirrigação, concentração por evaporação, produção de biogás e energia (CHRISTOFOLETTI et al., 2013). A Tabela 2 demonstra algumas opções tecnológicas, bem como suas vantagens e desvantagens para destinação da vinhaça.

A disposição inadequada e indiscriminada da vinhaça em solos provoca alterações nas suas características resultando em modificações em suas propriedades químicas e físicas, como o aumento da disponibilidade de alguns elementos para os vegetais, aumento da probabilidade de lixiviação de íons, principalmente do nitrato e do potássio, e elevação do escoamento superficial. As consequências desses impactos podem resultar na contaminação de águas superficiais e subterrâneas (CRAVEIRO, SOARES, SCHMIDELL, 1986; SILVA, GRIEBELER, BORGES, 2007; CHRISTOFOLETTI et al., 2013).

Alternativamente, a digestão anaeróbia tem se mostrado adequada no tratamento da vinhaça ao converter a matéria orgânica em bioenergia, gerando biogás – conforme abordado no item 3.3. Além disso, como não há remoção de nutrientes no tratamento por digestão anaeróbia, a vinhaça biodigerida não sofre redução do seu potencial de utilização como fertilizante, tornando a fertirrigação uma destinação ambientalmente adequada do efluente (FUESS, GARCIA, 2014; MORAES, ZAIAT, BONOMI, 2015; DEL NERY et al., 2018; FUESS, GARCIA, ZAIAT, 2018; DE GODOI et al., 2019).

Tabela 2: Vantagens e desvantagens de opções tecnológicas para destinação da vinhaça.

Processo/ Uso final	Vantagens	Desvantagens
Fertirrigação	Baixo custo Fácil implementação	Custo de transporte Efeito desconhecido a longo prazo
Evaporação/ Alimentação animal	Baixo custo Fácil implementação	Pouco estudado
Digestão anaeróbia/ Biogás	Produção de bioenergia Redução da carga poluidora Efluente pode ser utilizado como fertilizante Baixo custo de operação (digestor)	Alto custo de implantação Requer maiores tecnologias
Combustão em caldeira	Eliminação completa Produção de energia Recuperação de potássio em cinzas	Pouco estudado

Fonte: Adaptado de Christofolletti et al. (2013).

A utilização de reatores UASB tem sido amplamente aplicada para tratamento de águas residuárias industriais e dados da literatura de referência apresentam a potencial aplicação do reator mencionado para tratamento de vinhaça, mitigando os efeitos do lançamento *in natura* no meio ambiente e produzindo metano (CRAVEIRO, SOARES, SCHMIDELL, 1986; ESPAÑA-GAMBOA et al., 2012; ALVES, 2015; BARBOSA, 2017; FUESS et al., 2017; DEL NERY et al., 2018). Entretanto, sua aplicação tecnológica não tem sido relatada.

As indústrias sucroalcooleiras trabalham sazonalmente, em função do período de safra da matéria-prima, majoritariamente cana-de-açúcar, no Brasil. No Estado de São Paulo, compreende o período de abril a dezembro (CONAB, 2020). A entressafra compreende o período entre o fim de uma colheita até o início da outra. No referido período, a moagem e a produção industrial cessam, dando espaço à manutenção de equipamentos agrícolas.

No período de entressafra, portanto, não há geração de resíduos e águas residuárias provenientes da cadeia produtiva. Sem efluente para alimentação dos reatores anaeróbios, esses são interrompidos por longos períodos, o que pode acarretar necessidade de longos períodos de repartida, causando transtornos quanto ao acúmulo de vinhaça. Ademais, a consequente interrupção da produção de metano pode afetar negativamente o balanço energético das usinas, especialmente quando o metano produzido é utilizado em aplicações além da própria usina (BARBOSA, 2017).

Do ponto de vista biológico, a interrupção do reator pode induzir alterações na dinâmica da biomassa microbiana, como o estado fisiológico e a composição da comunidade, afetando o

desempenho do processo. Ademais, pode alterar a cinética de crescimento microbiano e sua atividade, podendo reduzir a eficiência de tratamento da água residuária (KOUTINAS et al., 2007).

A repartida de um reator compreende o retorno da operação do sistema, após um intervalo de determinado período de tempo, de modo que se atinja a mesma carga orgânica volumétrica utilizada anteriormente à paralisação do sistema. O período de partida e repartida de reatores UASB é mais longo do que o desejado devido à alta sensibilidade dos microrganismos atuantes no processo. Devida a sensibilidade a variações de carga orgânica volumétrica e outras perturbações externas, o sistema de tratamento anaeróbio é frequentemente propenso a mudanças da população microbiana, resultando em instabilidade do processo (BARBOSA, 2017; DEL NERY et al., 2018).

Sabe-se que a etapa de metanogênese pode ser limitante no processo de digestão anaeróbia, conforme será abordado nos itens seguintes, pois as arqueas metanogênicas são sensíveis e apresentam crescimento mais lento, comparado aos demais microrganismos. Assim, uma partida estável e rápida do reator depende da presença de uma comunidade metanogênicas ativa (KOBAYASHI et al., 2009; BARBOSA, 2017).

A fim de mitigar esses problemas, um dos objetivos deste trabalho foi utilizar glicerol, em substituição à vinhaça para alimentação do reator, conforme será abordado no item a seguir.

3.3. Tratamento anaeróbio de vinhaça: Fundamentos e aplicação

3.3.1. Digestão anaeróbia

Definido em 1983 por Mosey, a digestão anaeróbia compreende uma série de processos metabólicos sequenciais e autorregulados que se desenvolvem em anaerobiose. Os processos em questão são conduzidos por um consórcio de diferentes tipos de microrganismos, o qual atua a fim de promover a transformação de compostos orgânicos complexos em produtos mais simples, resultando principalmente em metano e dióxido de carbono (KHANAL, 2008).

Primeiramente, o material orgânico particulado, mais complexo, é hidrolisado em compostos dissolvidos menores, por meio da ação de enzimas extracelulares de microrganismos hidrolíticos e fermentativos. Os produtos formados são convertidos em ácidos orgânicos, como acético, propiônico e butírico, álcoois, dióxido de carbono e hidrogênio. Posteriormente, na fase denominada acetogênese, os ácidos orgânicos produzidos são reduzidos a acetato. Por fim, o

acetato e o hidrogênio produzidos são convertidos a metano e dióxido de carbono pelas arqueas metanogênicas (AM) acetoclásticas e hidrogenotróficas (CHERNICHARO, 2007).

A fase de metanogênese é limitada segundo dois aspectos. Primeiro, a acetogênese apresenta termodinâmica desfavorável para sua formação. Em reações de redução de ácidos orgânicos como propiônico e butírico, e álcoois, como etanol, para formação de acetato, o hidrogênio é produzido conjuntamente, e essas reações são termodinamicamente favoráveis apenas se a pressão parcial de H_2 for mantida abaixo de valores de 10^{-4} , 10^{-3} e 10^{-1} atm para ácido propiônico, butírico e etanol, respectivamente (SPEECE, 1985).

Desta forma, o equilíbrio da reação necessita ser deslocado para que ocorra a produção de acetato. Isso é possível quando o H_2 é consumido continuamente por reações receptoras de elétrons, como a produção de metano pelas arqueas metanogênicas hidrogenotróficas. Caso os níveis de H_2 estejam muito elevados, essa conversão não pode prosseguir, o que implica no acúmulo de ácidos orgânicos no sistema, podendo causar inibição da metanogênese.

O segundo aspecto deve-se à cinética de crescimento das arqueas metanogênicas, a qual é mais lenta comparada aos outros microrganismos participantes do processo anaeróbio. Nesse sentido, qualquer mudança significativa no meio ao qual estas estão habitadas causa redução em seu crescimento e distúrbio da proporção de comunidades microbianas acidogênicas e arqueas metanogênicas podendo não ocorrer formação de metano.

Diante desses aspectos, a presença de vários microrganismos diferentes coexistindo em sintrofismo é importante para o balanceamento do processo de conversão anaeróbia. Ainda, vários fatores ambientais também influenciam diretamente o consórcio microbiano. Dentre eles: temperatura, pH, alcalinidade, macronutrientes (N, P SO_4^{2-}) e micronutrientes (metais traços), fonte de carbono e características do reator (crescimento de biomassa suspensa ou aderida).

Em águas residuárias com elevada concentração de sulfato, pode-se remover a matéria orgânica presente via rota sulfetogênica, em detrimento à metanogênica, utilizando o sulfato como aceptor final de elétrons. O sulfato aparece comumente em resíduos industriais, como por exemplo, nas indústrias de papel e celulose, farmacêuticas, alimentícias, petroquímica e mineração (HAO et al., 2014). No caso da indústria sucroalcooleira, deve-se à adição de ácido sulfúrico para controle bacteriano durante a etapa de fermentação (MORAES, ZAIAT, BONOMI, 2015).

A via sulfetogênica deve-se às bactérias redutoras de sulfato (BRS), as quais utilizam o sulfato para degradação de componentes orgânicos e hidrogênio (OUDE ELFERINK et al., 1994), sendo o mesmo reduzido à sulfeto. A relação DQO/sulfato é determinante para

compreender a via predominante na degradação da matéria orgânica (metanogênica ou sulfetogênica), pois implica na disponibilidade de elétrons para as reações bioquímicas. Para baixas relações DQO/sulfato observa-se competição entre as BRS e AM por acetato e hidrogênio.

A partir de estequiometria das reações, Lens et al. (1998) provaram a necessidade de relação DQO/sulfato de aproximadamente 0,67 para que ocorra remoção da matéria orgânica somente via sulfetogênese. Assim, haveria sulfato suficiente no meio para que as BRS conseguissem consumir a matéria orgânica disponível. Em valores inferiores, seria necessária a suplementação de matéria orgânica para remoção do sulfato. Já para superiores, a remoção da matéria orgânica ocorre por ambas vias metanogênica e sulfetogênica.

Em condições mesofílicas, relações DQO/sulfato superiores a 10 acarretam a prevalência da metanogênese, em contrapartida, relações iguais ou inferiores a 1, prevalece a sulfetogênese, desde que microrganismos aptos estejam presentes (DAMIANOVIC, FORESTI, 2007).

De acordo com aspectos da cinética e da termodinâmica da metabolização do acetato, as BRS têm vantagens sobre as AM, uma vez que BRS ganham mais energia no consumo de acetato e tendem a ter maiores taxas de crescimento comparadas às AM (OUDE ELFERINK et al., 1994). Nesse sentido, em caso de elevadas concentrações de sulfato, as BRS podem superar as AM e se tornar a espécie dominante, entretanto, a concentração de BRS em lodos anaeróbios é, em geral, muito inferior à de espécies metanogênicas requerendo elevado intervalo de tempo para se estabelecer.

A Figura 2 apresenta um fluxograma simplificado da sequência de processos da digestão anaeróbia via metanogênese e sulfetogênese.

A aplicação da digestão anaeróbia no tratamento da vinhaça é uma solução atrativa devido à redução de carga orgânica, baixo custo de operação, produção de energia limpa e possibilidade de aplicação da vinhaça biodigerida como fertilizante nas áreas agrícolas, associando o conceito de biorrefinaria ao setor sucroalcooleiro (CRAVEIRO, SOARES, SCHMIDELL, 1986; CHRISTOFOLETTI et al., 2013; FUESS, GARCIA, 2014; MORAES, ZAIAT, BONOMI, 2015). Diante desse cenário, a tecnologia UASB (*Upflow Anaerobic Sludge Blanket*) vem ganhando força no tratamento de efluentes industriais no geral, conforme citado anteriormente.

Figura 2: Sequência das atividades metabólicas na digestão anaeróbia.

Fonte: Adaptado de McCarty e Smith (1986).

Os reatores UASB apresentam vantagens quanto à autoimobilização da biomassa, formando grânulos facilmente sedimentáveis. Comparativamente, os reatores de leito fixo oferecem vantagens distintas como a simplicidade de construção, rápida partida e maior estabilidade operacional (ACHARYA, MOHANA, MADAMWAR, 2008).

A Tabela 3 apresenta alguns estudos que utilizaram o processo anaeróbio no tratamento da vinhaça, visando a remoção de matéria orgânica e/ou a produção de metano. Vale ressaltar que grande maioria dos estudos realizados em digestão anaeróbia de vinhaça, trata-se de estudos em escala de bancada ou piloto, ou seja, em questão de tecnologia, escala plena, há poucos relatos. Ademais, a aplicação da biodigestão da vinhaça em plantas de grande porte com baixas cargas orgânicas ou TDH da ordem de dias pode inviabilizar o escalonamento dos sistemas, caso a vazão de vinhaça gerada seja elevada (FUESS, 2017). Acerca da problemática da entressafra e do tratamento anaeróbio, Barbosa (2017) avaliou a aplicação de melaço como substrato alternativo na entressafra e, posteriormente, a aplicação de vinhaça em reator UASB. A autora, após realizar a permuta de substratos, relatou a necessidade de redução das cargas

orgânicas volumétricas aplicadas de 33 kgDQO m⁻³ d⁻¹ (melaço) para 19 kgDQO m⁻³ d⁻¹ (vinhaça), devida a instabilidade operacional observada. Destaca-se que o melaço apresenta alto valor agregado, sendo destinado às dornas de fermentação para produção de etanol, em contraste com o glicerol, o qual necessita de uma destinação adequada.

3.3.2. Codigestão anaeróbia

O interesse científico nos processos biológicos cresceu ao longo dos últimos anos, visando principalmente a recuperação energética de efluentes, produzindo compostos de alto valor agregado. O processo de codigestão não é diferente, este consiste na digestão anaeróbia da mistura de dois ou mais substratos simultaneamente, os quais apresentam características complementares, provando ser uma opção viável sob o ponto de vista técnico e econômico para aumentar a produção de metano em reatores já existentes (BELLE et al., 2015; GUVEN et al., 2018; XIE et al., 2016).

Um substrato pode fornecer nutrientes que estejam deficientes em outro, melhorando o balanço nutricional e a relação C:N:P, e ao mesmo tempo proporcionar de maneira geral um efeito sinérgico positivo no meio, conduzindo à digestão estável, ao aumento da produção de biogás e à redução de custos de tratamento dos resíduos (KOUPIAIE et al., 2014; MATA-ALVAREZ et al., 2014; XU et al., 2018).

Na codigestão anaeróbia, a escolha dos substratos em associação tem como objetivo promover interações positivas. Dentre as inúmeras vantagens, constam o aumento da carga orgânica, principal fator para o aumento da produção de biogás; a complementação nutricional e/ou a correção de pH. Além disso, a codigestão anaeróbia pode estabelecer sinergia entre substratos, diluir compostos inibidores ou tóxicos, aumentar a estabilidade do processo e, ainda, atuar como uma alternativa à digestão anaeróbia de substratos sazonais (MATA-ALVAREZ et al., 2014; FONOLL et al., 2015; HAGOS et al., 2017).

Vale ressaltar, entretanto, fatores que podem inviabilizar a potencialização da produção de metano nesse processo, tais como mudanças na composição de substratos, inibição por compostos intermediários, carga orgânica volumétrica, tempo de detenção hidráulica, tempo de retenção celular, temperatura, responsáveis por causar instabilidade ao sistema (XIE et al., 2016).

Alguns trabalhos abordaram a associação de vinhaça com outros substratos, como melaço e soro de leite, conforme é demonstrado na Tabela 4, a qual sintetiza os principais resultados obtidos em trabalhos anteriores. Apesar do elevado desempenho observado na

codigestão de vinhaça e soro de leite, destaca-se que o soro de leite apresenta alto valor agregado, sendo comercializado para a indústria de alimentos, ao contrário do glicerol, o qual é abundante e necessita de uma destinação adequada.

Nesse contexto, a codigestão anaeróbia dos substratos em foco de estudo – vinhaça e glicerol – pode proporcionar maiores eficiências de remoção de matéria orgânica, estabilidade do processo biológico e produção de biogás, bem como auxiliar na substituição de substratos no período de entressafra da vinhaça de cana-de-açúcar, conforme é abordado a seguir.

Tabela 3: Referências em digestão anaeróbia da vinhaça de cana-de-açúcar (continua).

Referência	Características da vinhaça	Reator	Condições experimentais	Resultados principais
Costa et al. (1986)	Caldo DBO = 16,5 g L ⁻¹ DQO = 31,3 g L ⁻¹	UASB (11 m ³)	T = nd COV = 18,3 kgDQO m ⁻³ d ⁻¹ TDH = 20 h	ER _{DQO} = 76% MY = 0,28 m ³ kg ⁻¹ DQOr
Craveiro, Soares, Schmidell (1986)	Caldo DQO = 31,3 g L ⁻¹	UASB (11 m ³)	T = 28-33°C COV = 6,4 kgDQO m ⁻³ d ⁻¹ TDH = 20 h	ER _{DQO} = 88,5% MY = 0,22 m ³ kg ⁻¹ DQOr
Kumar, Gupta, Singh (2007)	Melaço DQO = 36-44 g L ⁻¹	HUASB (15 L)	T = nd COV = 4,53-11,13 kgDQO m ⁻³ d ⁻¹ TDH = 8,5-4 d	ER _{DQO} = 62-80% MY = 0,34 m ³ kg ⁻¹ DQOr
España-Gamboa et al. (2012)	Melaço DQO = 121 g L ⁻¹	UASB (3 L)	T = 30°C COV = 7,27-22,16 kgDQO m ⁻³ d ⁻¹ TDH = 15-6 d	ER _{DQO} = 69% MY = 0,26 m ³ kg ⁻¹ DQOr
Alves (2015)	DQO = 200 g L ⁻¹	UASB (60 L)	COV = 2,5-10,0 kgDQO m ⁻³ d ⁻¹ Recirculação = 200% Álcali = 0,3-0,5 gNaHCO ₃ gDQO ⁻¹	ER _{DQO} = 92-95%
Ferraz Jr. et al. (2016)	Caldo + melaço DQO = 35,2 g L ⁻¹	UASB (10 L)	T = 55°C COV = 15-25 kgDQO m ⁻³ d ⁻¹ TDH = 2,3-1,4 d	ER _{DQO} = 50,2-60,7% MY = 0,18-0,23 m ³ kg ⁻¹ DQOr
De Aquino, Fuess, Pires (2017)	Caldo + melaço DQO = 20,0-32,2 g L ⁻¹	APBR (2,7 L)	T = 30°C COV = 2,4-18 kgDQO m ⁻³ d ⁻¹ Álcali = 0,3 gNaHCO ₃ gDQO ⁻¹ TDH = 60 h	ER _{DQO} = 58-90% MY = 0,18-0,31 m ³ kg ⁻¹ DQOr

Tabela 3: Referências em digestão anaeróbia da vinhaça de cana-de-açúcar (conclusão).

Referência	Características da vinhaça	Reator	Condições experimentais	Resultados principais
De Aquino, Fuess, Pires (2017)	Caldo + melaço DQO = 20,0-32,2 g L ⁻¹	AnSTBR (3,4 L)	T = 30°C COV = 2,4-18 kgDQO m ⁻³ d ⁻¹ Álcali = 0,3 gNaHCO ₃ gDQO ⁻¹ TDH = 60 h	ER _{DQO} = 54-87% MY = 0,26-0,31 m ³ kg ⁻¹ DQOr
Fuess et al. (2017)	Caldo + melaço DQO = 28,3 g L ⁻¹	APBR (2,3 L) + AnSTBR (2,5 L)	T = 55°C COV = 15-30 kgDQO m ⁻³ d ⁻¹ TDH = 15,5-44,5 h	ER _{DQO} = 55,1-73,9% MY = 0,32-0,33 m ³ kg ⁻¹ DQOr
		APBR (2,3 L) + UASB (3,5 L)	T = 55°C COV = 15-25 kgDQO m ⁻³ d ⁻¹ TDH = 15,5-44,5 h	ER _{DQO} = 54,8-62,9% MY = 0,30-0,33 m ³ kg ⁻¹ DQOr
Barbosa (2017)	DQO = 200 g L ⁻¹	UASB (60 L)	COV = 5-34 kgDQO m ⁻³ d ⁻¹ Recirculação = 200% Álcali = 0,3 gNaHCO ₃ gDQO ⁻¹ TDH = 13,7 h	ER _{DQO} = 84±3,35% MY = 0,35 m ³ kg ⁻¹ DQOr
Del Nery et al. (2018)	Caldo DQO = 19,2 g L ⁻¹	UASB (60 L)	T = 22°C COV = 0,5-39,0 kgDQO m ⁻³ d ⁻¹ Recirculação = 1:3 Álcali = 0,3 gNaHCO ₃ gDQO ⁻¹	ER _{DQO} = 87,5±5,3% MY = 0,299±0,066 m ³ kg ⁻¹ DQOr

Legenda: APBR: reator anaeróbio de leito fixo empacotado; AnSTBR: reator anaeróbio de leito fixo estruturado; HUASB: reator anaeróbio de fluxo ascendente e manta de lodo híbrido; UASB: reator anaeróbio de fluxo ascendente e manta de lodo; COV: carga orgânica volumétrica; T: temperatura; TDH: tempo de detenção hidráulica; ER_{DQO}: eficiência de remoção de DQO; MY: rendimento de metano; DQO: demanda química de oxigênio removida.

Tabela 4: Referências em codigestão anaeróbia a partir de vinhaça e outros substratos.

Referência	Substratos	Reator	Condições experimentais	Resultados principais
Syaichurrozi et al., (2016)	Efluente do processamento de tofu e vinhaça	Batelada	Relação 80:20% (%v/v), respectivamente T = 35°C Tempo = 20 d	Aumento de 14,9x na produção de biogás, comparado à monodigestão anaeróbia de vinhaça
Marin-Batista et al. (2016)	Estrume de frango e vinhaça	Batelada	Relação 1:3 (SV) Temperatura = $37 \pm 2^\circ\text{C}$ Tempo = 30 d	Aumento de 1,5x na produção de biogás, comparado à monodigestão anaeróbia de vinhaça
Albuquerque, Ratusznei, Rodrigues (2019)	Soro de queijo e vinhaça	Batelada sequencial com biomassa imobilizada	Relação 25:75% (% DQO), respectivamente Tempo de ciclo = 8 h T = 55°C COV = $6,3 \text{ kgDQO m}^{-3} \text{ d}^{-1}$	Conteúdo de metano no biogás = 73% ER _{DQO} = 87%
Lovato et al. (2019a)	Vinhaça e glicerina	Batelada sequencial com biomassa imobilizada	Batelada alimentada Relação 50:50% (% DQO) Tempo de ciclo = 8 h T = 30°C COV = $5 \text{ kgDQO m}^{-3} \text{ d}^{-1}$	Aumento de 87 para 91% ER _{dqo} em relação à operação de monodigestão anaeróbia de vinhaça de cana-de-açúcar Aumento de 79,4 para 83% CH ₄ em relação à operação de monodigestão anaeróbia de glicerina
Sousa (2019)	Soro de queijo e vinhaça	Batelada sequencial com biomassa imobilizada	Relação 25:75% (m/v), respectivamente T = 30°C Tempo de ciclo = 8 h COV = $15,3 \text{ kgDQO m}^{-3} \text{ d}^{-1}$	Produção de metano de $4,7 \text{ LCH}_4 \text{ L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ Conteúdo de metano no biogás = 72% ER _{DQO} = 88,8%

Legenda: T: temperatura; COV: carga orgânica volumétrica; CSTR: reator anaeróbio de tanque agitado; TDH: tempo de detenção hidráulica; ER_{DQO}: eficiência de remoção de DQO; SV: sólidos voláteis; UASB: reator anaeróbio de fluxo ascendente e manta de lodo.

3.4. Glicerol

O Brasil tem grande destaque na produção mundial de biocombustível devido sua alta diversidade de espécies vegetais que podem ser utilizadas como matéria-prima na produção de biodiesel, entre essas sojas, dendê, girassol, babaçu, amendoim e mamona, do qual é extraído o óleo vegetal, e a sua extensa criação de animais bovinos que fornecem gordura animal (PEITER et al., 2016).

O Programa Nacional de Produção e Uso do Biodiesel, lançado pelo Governo Federal em 2004, incluiu o biodiesel na matriz energética brasileira e fixou a adição de um percentual mínimo obrigatório de biodiesel ao óleo diesel, de 10%, em volume, em 2019, conforme Lei nº 13.263/2016. A implantação do programa, acarretou aumento da oferta de biodiesel no país. A principal rota de obtenção do biodiesel é a partir da transesterificação de óleos vegetais ou gordura animal com álcool, geralmente metanol, na presença de um catalisador químico (MANOSAK, LIMPATTAYANATE, HUNSOM, 2011).

Segundo dados da Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis (ANP, 2020), as usinas de biodiesel encontram-se presentes em todas as regiões do país, destacando-se as regiões centro-oeste e sul. Sendo o óleo de soja, a principal matéria-prima utilizada para produção de biodiesel no país (ANP, 2020), as regiões centro-oeste e sul se sobressaem às demais devido à redução de custos, em termos de logística e incentivos fiscais.

Além da produção do glicerol por meio do biodiesel, ele pode ser obtido por fermentação biológica, síntese química a partir de petroquímicos e saponificação no processo de manufatura de sabões (TAHERZADEH, ADLER, LIDÉN, 2002; LOPES, CECHINEL, WENTZ, 2011).

O processo de transesterificação de um éster carboxílico em outro, por meio da troca do grupo OR^- presente no éster original (triglicerídeo), por outro grupo semelhante proveniente de um álcool, na presença de um catalisador, ou não (condições supercríticas), origina biodiesel e glicerol (DABDOUB, BRONZEL, RAMPIN, 2009), conforme ilustra a Figura 3.

Devido ao elevado potencial de produção de biodiesel no país, aumentou-se também a oferta de glicerol. Visto que o glicerol é o principal subproduto gerado na produção de biodiesel, aproximadamente 10% do volume total de biodiesel produzido (TEMUDO et al., 2008; DA SILVA, MACK, CONTIERO, 2009; NGHIEM et al., 2014; HE, MCNUTT, YANG, 2017). Em 2019, a indústria brasileira de biodiesel aumentou em 10% em comparação ao ano anterior, atingindo produção nacional de 7,4 milhões de toneladas, gerando 623 mil toneladas de glicerol bruto, segundo dados da ANP (2020).

Figura 3: Reação de transesterificação de triglicerídeos

Fonte: Adaptado de Dabdoub, Bronzel e Rampin (2009).

Segundo Peiter et al. (2016), após a transesterificação, obtêm-se uma massa final composta por duas fases, que são separáveis por decantação e/ou centrifugação. A fase mais densa é composta de glicerol bruto, e a fase menos densa é constituída de uma mistura de ésteres metílicos de ácido graxo. Após a separação, obtém-se o resíduo de glicerol bruto, em que cerca de 30% trata-se de impurezas, como catalisadores, álcoois, ácidos graxos e sais. Estas impurezas dependem da natureza do óleo vegetal ou da gordura animal utilizada e do tipo de catálise empregada na preparação do biodiesel.

Oficialmente denominado 1,2,3-propanotriol segundo nomenclatura IUPAC, o glicerol é um composto orgânico de função álcool com três hidroxilas, de fórmula molecular $\text{C}_3\text{H}_5(\text{OH})_3$. É líquido, não tem cheiro, de densidade de aproximadamente $1,26 \text{ g cm}^{-3}$, é caracterizado por apresentar uma baixa volatilidade, elevada viscosidade, miscibilidade, solubilidade e biodegradabilidade (MA et al., 2008; DA SILVA, MACK, CONTIERO, 2009; BEATRIZ, ARAÚJO, LIMA, 2011). Dados da literatura científica indicam a composição físico-química do glicerol bruto, conforme Tabela 5.

No Brasil, não há dispositivos legais quanto à destinação desse subproduto. Entretanto, o descarte inadequado no meio ambiente pode causar problemas graves, como o aumento da demanda bioquímica de oxigênio de corpos receptores; e a sua combustão libera compostos cancerígenos, como a acroleína (NOVI et al., 2018; PEITER et al., 2016).

O glicerol puro pode ser convertido em outros produtos para utilização em indústrias de cosméticos, farmacêutica e alimentícia (DA SILVA, MACK, CONTIERO, 2009; PEITER et al., 2016; HE, MCNUTT, YANG, 2017). Porém, o glicerol bruto, proveniente do biodiesel, contém impurezas, como o umidade, cinzas, cloretos e metanol, acarretando elevado custo de tratamento, o que pode tornar o uso deste subproduto inviável para as indústrias acima citadas (AYOUB, ABDULLAH, 2012).

Tabela 5: Composição físico-química do glicerol bruto.

Parâmetro	Ma et al. (2008)	Larsen et al. (2013)	Jensen et al. (2014)	Panpong et al. (2014)	de Castro et al. (2019)
DQO (g L ⁻¹)	1120	1900	1056	1760	1028,6
pH	nd	8,8	nd	nd	6,4
Ácidos orgânicos (mgHAc L ⁻¹)	337	nd	nd	nd	7200
Alcalinidade total (mg L ⁻¹)	nd	nd	nd	nd	4500
Sólidos totais (g L ⁻¹)	nd	nd	829	969	146
Sólidos voláteis (g L ⁻¹)	nd	nd	746	910	29

Fonte: Adaptado de Ma et al. (2008), Larsen et al. (2013), Jensen et al. (2014), Panpong et al. (2014) e de Castro et al. (2019). Legenda: nd: não determinado.

O processo de purificação do glicerol consiste, primeiramente, no tratamento físico por meio da filtração ou centrifugação, a fim de remover sólidos insolúveis ou precipitados. Posteriormente, a água é removida em evaporadores e o glicerol segue para as colunas de destilação a vácuo e branqueamento por carvão ativado. Outras tecnologias de tratamento incluem as resinas de troca iônica, separação por membranas e acidificação seguida de neutralização e extração de solvente (ABDUL RAMAN, TAN, BUTHIYAPPAN, 2019).

Com o intuito de mitigar os efeitos da acumulação do glicerol, bruto ou purificado, os processos biológicos têm se mostrado atrativos para obtenção de subprodutos de valor agregado e destinação ambientalmente adequada.

3.4.1. Fermentação do glicerol

O glicerol pode ser metabolizado biologicamente por duas rotas fermentativas, redutora ou oxidativa. Na primeira, há desidratação do glicerol produzindo 1,3-propanodiol. Na última, há desidrogenação da molécula de glicerol formando dihidroxiacetona, a qual é fosforilada e convertida a piruvato ou succinato, e posteriormente propionato ou outros compostos. A formação de tais compostos depende de condições ambientais e dos organismos responsáveis pela produção de enzimas que mediam as reações, podendo originar 2,3-butanediol, lactato, butirato, etanol, acetato, hidrogênio e dióxido de carbônico (DA SILVA, MACK, CONTIERO, 2009; KAUR et al., 2020; TEMUDO et al., 2008). A Figura 4 ilustra as possíveis rotas metabólicas de fermentação do glicerol.

A biodegradabilidade do glicerol bruto depende da natureza do óleo vegetal e do processo de transesterificação utilizado. Além de barato e abundante, o glicerol é rapidamente

reduzido, com rendimentos elevados, oferecendo oportunidades de obtenção de compostos de elevado valor agregado (DHARMADI; MURARKA; GONZALEZ, 2006; KAUR et al., 2020).

Figura 4: Rotas metabólicas de fermentação de glicerol.

Fonte: Adaptado de Temudo et al. (2008); Da Silva; Mack, Contiero (2009); Carneiro (2015).

3.4.2. Glicerol como cossubstrato em potencial

Estudos anteriores indicam que a associação de diferentes substratos com glicerol, seja bruto e purificado, favoreceu a digestão anaeróbia de tais substratos, demonstrando as potencialidades do glicerol como cossubstrato. Conforme consta na literatura de referência apresentada na Tabela 6, a maioria dos estudos realizados associou lodos de estações de tratamento e glicerol bruto.

Na Tabela 6 também se verifica, majoritariamente, a adição de glicerol como cossubstrato a teores reduzidos de glicerol, em cerca de 2%, evitando a necessidade de transporte do referido resíduo em grandes volumes até as unidades de tratamento de águas

residuais. Os teores reduzidos de glicerol devem-se ao seu elevado conteúdo orgânico, favorecendo sua utilização como cossustrato na produção de biogás. Ademais, a instalação de usinas de biodiesel distribuídas em todo país não é um fator limitante à utilização do subproduto glicerol como cossustrato.

De acordo com Rivero, Solera, Perez (2014), He, McNutt e Yang (2017), o glicerol é altamente benéfico para a codigestão anaeróbia, pois aumenta significativamente a produção de biogás, uma vez que o glicerol aumenta a carga orgânica biodegradável, apresenta pH que condiz com as condições da digestão anaeróbia e pode melhorar a relação C:N, favorecendo o tratamento biológico das mesmas.

Todavia, três componentes principais no processo de digestão do glicerol bruto são potenciais inibidores da atividade metanogênica: ácidos graxos de cadeia longa, cloretos e sulfatos (HULSHOFF POL et al., 1998). A aplicação do glicerol bruto como cossustrato na codigestão deve considerar tais componentes, evitando assim inibição da metanogênese e colapso do reator anaeróbio. Diante do exposto, optou-se pela utilização do glicerol purificado no presente estudo de mono e codigestão anaeróbia de vinhaça e glicerol.

Embora poucos estudos tenham sido realizados com os substratos vinhaça e glicerol purificado, as características físico-químicas dessas águas residuais apontam para uma alternativa atrativa de maior produção de metano. Dentre tais características ressaltam-se:

- i. Presença de macro e micronutrientes na vinhaça, ausentes no glicerol;
- ii. Presença de sulfato na vinhaça, ausente no glicerol, possibilitando ocorrência da via sulfetogênica de remoção de matéria orgânica, além da produção de alcalinidade a bicarbonato;
- iii. Presença de glicerol na constituição da vinhaça, indicando possível manutenção da população microbiana;
- iv. Presença de alguns compostos tóxicos na vinhaça, como as melanoidinas e compostos fenólicos, no entanto a codigestão anaeróbia proporciona sua diluição;
- v. pH ácido da vinhaça e neutro do glicerol, podendo alcançar valores favoráveis para metanogênese em função da proporção de substratos utilizada;
- vi. Elevada carga orgânica biodegradável presente no glicerol pode resultar em rápida conversão e acúmulo de ácidos orgânicos, inibindo a metanogênese. No entanto, a codigestão anaeróbia pode facilmente reverter tal cenário, ao associar fonte orgânica complexa, como a vinhaça.

Tabela 6: Referências em codigestão anaeróbia a partir de glicerol e outros substratos (continua).

Referência	Substratos	Reator	Condições experimentais	Resultados principais
Fountoulakis; Manios (2010)	Lodo de esgoto e glicerol	CSTR	Teor de 1% de glicerol $T = 35^{\circ}\text{C}$	Aumento de 1106 ± 36 para 2353 ± 94 $\text{mLCH}_4 \text{ d}^{-1}$
Castrillón et al. (2013)	Estrume bovino e glicerina	CSTR	Teor de 6% de glicerina $T = 55^{\circ}\text{C}$ TDH = 20 dias $\text{COV} = 5,4 \text{ kgDQO m}^{-3} \text{ d}^{-1}$	$\text{MY} = 350 \text{ mLCH}_4 \text{ g}^{-1}\text{DQOr}$ $\text{ER}_{\text{dgo}} = 80,7\%$
Larsen et al. (2013)	Resíduo de fecularia e glicerina	Fluxo semicontínuo	Teor de 2% de glicerina $T = 26^{\circ}\text{C}$ TDH = 5 dias $\text{COV} = 9,32 \text{ kgDQO m}^{-3} \text{ d}^{-1}$	Aumento de 1,17 para 1,98 $\text{Lbiogás L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ $\text{ER}_{\text{dgo}} = 98,69\%$
Athanasoulia, Melidis, Aivasidis (2014)	Lodo de esgoto e glicerol	CSTR	Teor de 2-3% de solução de glicerol (100gDQO L^{-1}) $T = 37^{\circ}\text{C}$ TDH = 12,3-19,7 d $\text{COV} = 1,0\text{-}1,7 \text{ kgDQO m}^{-3} \text{ d}^{-1}$	Aumento na produção de metano em 3,8-4,7x, comparado à operação sem adição de glicerol
Lovato et al. (2016)	Soro de queijo e glicerol	Batelada sequencial com biomassa imobilizada	Batelada alimentada Teor de glicerina de 25% (% DQO) Tempo de ciclo = 8 h $T = 30^{\circ}\text{C}$ $\text{COV} = 7,5 \text{ kgDQO m}^{-3} \text{ d}^{-1}$	Aumento na produção de metano em 30%, comparado à monodigestão de glicerina
Ayabe (2018)	Esgoto sanitário e glicerol	UASB	$\text{COV} = 5,7 \text{ kgDQO m}^{-3} \text{ d}^{-1}$	Aumento na produção de metano em 3x, comparado à operação sem adição de glicerol

Tabela 6: Referências em codigestão anaeróbia a partir de glicerol e outros substratos (conclusão).

Referência	Substratos	Reator	Condições experimentais	Resultados principais
Meneses-Reyes et al. (2018)	Óleo extraído de microalga, cama de frango e glicerol	Fluxo contínuo	Proporção 30:67:3, respectivamente T = 37°C TDH = 30 dias	Produção de metano de 270 mLCH ₄ gSV ⁻¹
Zahedi et al. (2018)	Lodo de esgoto e glicerina	Tanque agitado semicontínuo	Teor de 1% de glicerina T = 35°C	Produção de metano de 0,91 LCH ₄ L ⁻¹ d ⁻¹ ER _{dqo} = 65%
de Castro et al. (2019)	Lixiviado de aterro industrial e glicerina	Batelada	Teor de 1,5% de glicerina T = 30°C Tempo = 30 dias	Produção de metano de 92,47 mLCH ₄ ER _{dqo} = 90,8%
Garcia (2019)	Esgoto sanitário e glicerol	HUASB	TDH = 8 h COV = 2,09 ± 0,22 kgDQO m ⁻³ d ⁻¹	MY = 75 ± 68 mLCH ₄ gDQOremovida ⁻¹
Takeda, Gotardo e Gomes (2020)	Lixiviado de aterro sanitário e glicerol	Batelada	Teor de 1,71% (v/v) de glicerol T = 37°C Tempo = 33,2 dias	Aumento na produção de biogás em 20x, comparado à monodigestão de lixiviado de aterro sanitário

Legenda: COV: carga orgânica volumétrica; CSTR: reator anaeróbio de tanque agitado; T: temperatura; TDH: tempo de detenção hidráulica; ER_{dqo}: eficiência de remoção de DQO; MY: rendimento de metano; SV: sólidos voláteis; UASB: reator anaeróbio de fluxo ascendente e manta de lodo; HUASB: reator anaeróbio de fluxo ascendente e manta de lodo híbrido.

Desse modo, a associação de vinhaça e glicerol pode ser uma alternativa viável para o tratamento desses resíduos, aumentando a eficiência do sistema quanto à remoção de matéria orgânica, produção de biogás e proporcionando maior estabilidade operacional quanto ao acúmulo de ácidos orgânicos e inibição da metanogênese.

3.5. Considerações finais

Com base nas informações até aqui apresentadas, reiteram-se os principais pontos com os quais a presente pesquisa visou contribuir, são eles: a) a aplicabilidade do glicerol purificado, como substrato alternativo à vinhaça no período de entressafra, possibilitando a manutenção da biomassa ativa em reator anaeróbio e da produção de metano; b) a potencialidade de incrementar a recuperação energética via codigestão anaeróbia de vinhaça e glicerol, a partir de resíduos provenientes da indústria de biocombustíveis.

4. MATERIAL E MÉTODOS

Neste capítulo são apresentados os procedimentos metodológicos utilizados de modo a alcançar os objetivos e verificar a hipótese apresentada.

4.1. Origem, coleta e caracterização da vinhaça e do glicerol

Os substratos em estudo foram a vinhaça de cana-de-açúcar e o glicerol. A vinhaça foi disponibilizada pela Usina São Martinho, localizada no Município de Pradópolis, São Paulo, cuja coleta compreendeu a safra 2019/2020 de cana-de-açúcar. Os principais produtos da usina compreendem o açúcar e o etanol, portanto, a unidade faz uso de melaço e caldo de cana no processo fermentativo.

Durante o período experimental foram realizadas quatro coletas (C1-C4) de vinhaça, preservados em reservatórios plásticos mantidos à temperatura de -20°C. A Tabela 7 apresenta as características físico-químicas da vinhaça, as quais foram realizadas de acordo com os procedimentos e metodologias descritos no *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* (APHA, 2012), Stickland (1951), Dubois et al. (1956), Taylor (1996), Buchanan e Nicell (1997), Greenhill (2004) e Adorno, Hirasawa e Varesche (2014).

Tabela 7: Caracterização físico-química das amostras de vinhaça de cana-de-açúcar (continua).

Parâmetro	Período de amostragem (2019)				Referência
	C1 29/ago	C2 18/set	C3 07/out	C4 15/out	
DQOt (g L ⁻¹)	29,2	29,0	27,4	28,6	APHA (2012)
DQOs (g L ⁻¹)	22,6	20,3	20,0	25,3	
pH	4,58	4,54	4,69	4,42	
SST (mg L ⁻¹)	2085	2675	2610	2360	
SSF (mg L ⁻¹)	245	212	308	137	
SSV (mg L ⁻¹)	1840	2463	2302	2223	
Sulfato (mgSO ₄ ⁻² L ⁻¹)	2996,1	2515,7	2712,3	2855,6	Buchanan e Nicell (1997)
NTK (mg L ⁻¹)	723,0	620,0	654,0	827,0	
Fenóis totais (mg L ⁻¹)	1750,0	1820,0	1680,0	1936,6	
CH (mg L ⁻¹)	5856,7	4853,3	4573,3	6556,7	Dubois et al. (1956)

Tabela 7: Caracterização físico-química das amostras de vinhaça de cana-de-açúcar (conclusão).

Parâmetro	Período de amostragem (2019)				Referência
	C1 29/ago	C2 18/set	C3 07/out	C4 15/out	
Proteína (mg L ⁻¹)	9755,9	8975,6	9290,9	11066,3	Stickland (1951)
Glicerol (mg L ⁻¹)	3422,0	2868,0	2484,0	2485,0	Greenhill (2004)
Acetona (mg L ⁻¹)	4,3	5,4	97,7	5,1	Adorno, Hirasawa e Varesche (2014)
Metanol (mg L ⁻¹)	12,4	51,2	9,1	80,2	
Etanol (mg L ⁻¹)	280,2	225,6	183,7	494,3	
Ácido acético (mg L ⁻¹)	863,4	855,5	935,6	1311,0	
Ácido propiónico (mg L ⁻¹)	73,1	42,4	145,9	66,2	
Ácido isobutírico (mg L ⁻¹)	0	0	7,3	0	
Ácido butírico (mg L ⁻¹)	4,0	0	7,3	1,6	
Ácido isovalérico (mg L ⁻¹)	0	0	4,9	0	
Ácido valérico (mg L ⁻¹)	0	0	0	0,5	
Ácido caproico (mg L ⁻¹)	5,8	0	1,3	0	Taylor (1996)
Ácido láctico (mg L ⁻¹)	1936,7	1920,0	2053,3	2723,3	

Legenda: DQOt: Demanda química de oxigênio total; DQOs: Demanda química de oxigênio solúvel; DBO: Demanda bioquímica de oxigênio; COT: Carbono orgânico total; SST: Sólidos suspensos totais; SSF: Sólidos suspensos fixos; SSV: Sólidos suspensos voláteis; NTK: Nitrogênio total Kjeldahl; CH: Carboidratos totais.

Com relação ao glicerol, as amostras correspondem ao produto comercial de 99,5% de pureza proveniente da indústria Biobrotas Oleoquímica, localizada no município de Brotas, São Paulo. Dado o elevado conteúdo orgânico das amostras de cerca de 1600 gDQO L⁻¹, o composto foi reservado à 30°C, mantendo suas características de líquido viscoso, com densidade de aproximadamente 1,26 g cm⁻¹, isento de cor, odor e materiais em suspensão.

4.2. Inóculo

O inóculo utilizado foi o lodo anaeróbio proveniente de um reator UASB (*Upflow Anaerobic Sludge Blanket*) de tratamento de águas residuárias do abatedouro de aves Ideal Ltda, localizado no município de Pereiras, São Paulo, operado sob condição mesofílica. A Tabela 8 apresenta a caracterização do inóculo utilizado quanto aos sólidos presentes.

A inoculação do reator anaeróbio seguiu o protocolo descrito por Zaiat, Cabral e Foresti (1994), em que o lodo foi diluído em água (proporção 1:1) e triturado. Posteriormente, o meio suporte, hastes de espuma de poliuretana, permaneceu submerso na mistura por cerca de 2 h, e então, drenado o excesso de lodo. A biomassa aderida foi estimada por meio da quantificação da biomassa inicial e drenada, em termos de sólidos suspensos voláteis.

Tabela 8: Caracterização do inóculo quanto à concentração de sólidos.

Parâmetro	Concentração média (g L ⁻¹)
Sólidos totais	57,0
Sólidos fixos	8,2
Sólidos voláteis	48,8
Sólidos suspensos	48,8
Sólidos suspensos fixos	6,5
Sólidos suspensos voláteis	42,2

4.3. Instalação experimental

A instalação experimental foi implantada no Laboratório de Processos Biológicos (LPB), da Escola de Engenharia de São Carlos (EESC), Universidade de São Paulo (USP), composta por um reator anaeróbio de leito fixo estruturado (Figuras 5, 6a e 6b), reservatório dos substratos, bomba dosadora (Figura 6c), sistema de medição de biogás (Figura 6d) e câmara climatizada.

Adotou-se o reator de leito fixo estruturado (AnSTBR, *Anaerobic Structured-Bed Reactor*), visto que esse favorece o escoamento e facilita o acesso dos compostos orgânicos à superfície do biofilme, conforme apresenta as Figuras 5 e 6 (a, b).

Figura 5: Representação esquemática do aparato experimental.

Fonte: Elaboração própria.

O reator foi confeccionado em tubo de acrílico, com diâmetro interno de 6 cm, 75 cm de comprimento total e volume útil total aproximado de 1,8 L. O leito fixo ordenado foi composto por 7 hastes de espuma de poliuretano (50x1,2x0,9 cm), fixadas em telas de aço inoxidável junto à estrutura do acrílico (Figura 6a).

O sistema foi operado em escoamento ascendente e alimentação contínua. Para alimentação do reator utilizou-se uma bomba dosadora *Grundfos* modelo DDA 30-4 AR. Quanto à medição do volume de biogás produzido, utilizou-se um medidor em formato U, grafites HB, retirados de lápis preto (9000 HB Faber-Castell), como material condutor, acoplado a um sistema arduíno de medição de pulsos obtidos por deslocamento de uma solução salina – 37 mL NaCl, 270 g L⁻¹ em pH 2,0 –, desenvolvido no Laboratório de Processos Biológicos – LPB (Figura 6d). O sistema de medição de gás (medidor/arduíno) foi previamente calibrado, em que cada pulso contabilizado equivale a uma produção de biogás equivalente a 7,64 NmL.

Figura 6: Detalhes do reator: (a) Estrutura do reator com material suporte; (b) Montagem do reator em câmara climatizada; (c) Bomba dosadora; (d) Medidor tubo em U e sistema arduino.

Fonte: Elaboração própria.

4.4. Procedimentos experimentais

Tendo em vista os objetivos apresentados no item 2, o ensaio em escala de bancada foi desenvolvido em cinco fases, conforme descrito na Figura 7. O potencial de recuperação do reator frente à permuta de substratos foi observado para carga orgânica volumétrica (COV) de $5,0 \text{ kgDQO m}^{-3} \text{ d}^{-1}$. Essa COV foi fixada de acordo com estudos anteriores, como Aquino,

Fuess e Pires (2017), em que para COV inferiores a $7,2 \text{ kgDQO m}^{-3} \text{ d}^{-1}$, a configuração de reator de leito fixo estruturado apresentou estabilidade de processo no tratamento de vinhaça. Deste modo, a COV aplicada nesse trabalho não foi um fator de instabilidade para o sistema proposto.

A temperatura mesofílica foi controlada em 30°C e o tempo de detenção hidráulica (TDH) foi de 24 h. A adição de álcali (NaHCO_3) foi feita na proporção de $0,15 \text{ g gDQO}^{-1}$ e o pH afluyente foi corrigido para 7,0 com hidróxido de sódio (NaOH , 50%, cerca de $0,3 \text{ mL L}^{-1}$ alimentação).

Figura 7: Fluxograma de fases experimentais.

Nota: Valores em termos de carga orgânica volumétrica (COV). Legenda: Vinhaça (V), glicerol (G).

A primeira fase operacional compreendeu a partida do reator anaeróbio de leito fixo estruturado em monodigestão de vinhaça, referente ao período de safra da cana-de-açúcar. De modo a promover a adaptação da biomassa, aplicou-se uma COV inicial de $0,5 \text{ kgDQO m}^{-3} \text{ d}^{-1}$, com aumentos progressivos para 1,0; 2,0; 3,5 e $5,0 \text{ kgDQO m}^{-3} \text{ d}^{-1}$, por um período de 112 dias. Após a estabilização da fase I, dada em função da eficiência de conversão de matéria orgânica, em termos de DQO, superior a 80%, e coeficiente de variação inferior a 2% para os últimos 7 pontos de amostragem (cerca de 15 dias), iniciou-se o processo de codigestão anaeróbia.

A codigestão anaeróbia operada na fase II foi subdividida em 2 etapas (A e B), em que a primeira etapa consistiu na substituição gradual de substratos, por meio da adição de glicerol à alimentação do reator a cada 10%, nas proporções de 90 (V, vinhaça):10 (G, glicerol), 80:20, e assim sucessivamente até a proporção de 50:50, em termos de COV. O incremento de glicerol na codigestão foi condicionada à eficiência de remoção de matéria orgânica, em termos de DQO, superior à 80% e comportamento decrescente dos valores de relação alcalinidade

intermediária e parcial (AI/AP). Posteriormente, a operação do reator foi interrompida, com preservação da biomassa em câmara fria (4°C) durante 150 dias.

O período de repartida do sistema e sua estabilização compreendeu a etapa B, realizada novamente com o aumento progressivo da COV de 0,5 a 5,0 kgDQO m⁻³ d⁻¹, na codigestão de 50V:50G.

A fase III simulou o período correspondente à entressafra nas indústrias sucroalcooleiras. Desse modo, incrementou-se a proporção de glicerol afluyente a cada 10%, até a completa monodigestão de glicerol. Devido a insuficiência de nutrientes presente no mesmo, foi adicionado solução de macro e micronutrientes a partir da codigestão anaeróbia de 20V:80G, a qual apresentava relação DQO e nitrogênio total Kjeldahl (DQO:NTK) de aproximadamente 160:1. A solução de macronutrientes foi adicionada (Tabela 9), utilizando os reagentes de cloreto de amônio (NH₄Cl) e fosfato de potássio monobásico (KH₂PO₄), e respeitando a relação DQO, nitrogênio e fósforo (DQO:N:P) de 700:5:1. Como fonte de micronutrientes foi adicionado o meio nutricional adaptado de Del Nery (1987), conforme Tabela 10.

Com o retorno simulado do período de safra, a fase IV foi conduzida a partir do retorno à codigestão anaeróbia dos substratos em 50% vinhaça e 50% glicerol. Assim como nas fases IIA e III, a troca de substratos foi gradual a cada 10%, prevendo uma eficiência de conversão de matéria orgânica mínima de 80% para troca. A suplementação de nutrientes foi cessada a partir da codigestão de 20V:80G, similarmente à fase III. Após a estabilização do sistema, iniciou-se a fase V, em que foi adicionado, novamente, apenas vinhaça como substrato. Em especial, nas fases IV e V foi avaliada a permuta de substrato, simulando o período de retorno de safra.

A duração de cada fase operacional, portanto, foi determinada conforme a resposta do reator quanto à sua estabilização (coeficiente de variação inferior a 2% para os últimos 7 pontos de amostragem) e eficiência de remoção de DQO superior a 80%. A Tabela 11 apresenta as condições experimentais aplicadas. Em todas as etapas experimentais, a vinhaça bruta e o glicerol foram diluídos em água de abastecimento para obtenção da COV desejada, sendo a DQO total afluyente coincidente à COV aplicada, mantendo-se a vazão fixa em 75 mL h⁻¹.

Tabela 9: Solução de macronutrientes.

Reagente		Concentração da solução (g L ⁻¹)
Cloreto de amônio	NH ₄ Cl	68,2
Fosfato de potássio monobásico	KH ₂ PO ₄	5,1

Tabela 10: Solução de micronutrientes para cada 1 gDQO L⁻¹.

Solução	Reagente	Concentração da solução (mg L ⁻¹)
A	Sulfato de níquel	NiSO ₄ .H ₂ O
	Sulfato ferroso	FeSO ₄ .7H ₂ O
	Cloreto férrico	FeCl ₃ .6H ₂ O
	Cloreto de cobalto	CoCl ₂ .2H ₂ O
B	Cloreto de cálcio	CaCl ₂ .6H ₂ O
C	Dióxido de selênio	SeO ₂
D	Fosfato de potássio monobásico	KH ₂ PO ₄
	Fosfato de potássio dibásico	K ₂ HPO ₄
	Fosfato de sódio dibásico	Na ₂ HPO ₄ .2H ₂ O

Fonte: Adaptado de Del Nery (1987).

Tabela 11: Condições experimentais aplicadas.

Fases experimentais	Período de operação (d)	Vinhaça (%) (Coleta)	Glicerol (%)	COV (kgDQO m ⁻³ d ⁻¹)
I	0-72	100 (C1-C4)	0	0,5-5,0
	73-112	100 (C4)	0	5,0
II A	113-147	100-50 (C4)	0-50	5,0
	148-180	50 (C4)	50	5,0
II B	330-353	50 (C4)	50	0,5-5,0
	354-371	50 (C4)	50	5,0
III	372-397	50-0 (C4)	50-100	5,0
	398-413	0	100	5,0
IV	414-440	0-50 (C4)	100-50	5,0
	441-474	50 (C4)	50	5,0
V	475-497	50-100 (C4)	50-0	5,0
	498-520	100 (C4)	0	5,0

4.5. Avaliação do desempenho do reator: Métodos analíticos e cálculos

O desempenho do reator durante o período de operação baseou-se no monitoramento analítico de amostras do afluente, efluente e biogás. Os parâmetros físico-químicos, as metodologias e a frequência das análises empregados são apresentados na Tabela 12.

Tabela 12: Análises e métodos analíticos para monitoramento do reator.

Parâmetro	Frequência na semana	Método analítico	Referência
DQOt e DQOs	3x	Espectrofotométrico	APHA (2012)
pH	3x	Potenciométrico	APHA (2012)
Alcalinidade (AP, AI)	3x	Titulométrico	Kapp (1984)
Ácidos voláteis totais	3x	Titulométrico	Kapp (1984)
Ácidos orgânicos e solventes	1x	Cromatografia gasosa	Adorno, Hirasawa e Varesche (2014)
SSV	1x	Gravimétrico	APHA (2012)
CH	3x	Espectrofotométrico	Dubois et al. (1956)
Glicerol	3x	Enzimático	Greenhill (2004)
Sulfato	3x	Turbidimétrico	APHA (2012)
Sulfeto dissolvido	1x	Espectrofotométrico	APHA (2012)
Vazão de biogás	Diária	Sistema arduíno	-
Composição de biogás	3x	Cromatografia gasosa	Perna et al. (2013)

Legenda: DQOt: demanda química de oxigênio total; DQOs: demanda química de oxigênio solúvel; AP: alcalinidade parcial ou a bicarbonato; AI: alcalinidade intermediária; SSV: sólidos suspensos voláteis; CH: carboidratos totais.

Os parâmetros de DQOt, DQOs, SSV, sulfato e sulfeto dissolvido foram analisados conforme protocolo descrito no *Standard Methods of Water and Wastewater* (APHA, 2012). Nas análises de DQOs, sulfato e sulfeto dissolvido, as amostras foram previamente filtradas em membrana de fibra de vidro com porosidade de 0,47 µm.

A alcalinidade, parcial e intermediária, e os ácidos voláteis totais foram avaliados pelo método titulométrico, descrito por Kapp (1984). Para realização desta análise, as amostras foram previamente centrifugadas (9000 rpm, 5 min) para remoção de sólidos suspensos.

Os carboidratos totais (CH) foram determinados segundo método fenol-sulfúrico de Dubois et al. (1956), por espectrofotometria. O método possibilita a leitura da absorbância da solução em comprimento de onda de 490 nm, região visível, após desidratação dos açúcares em

ácido sulfúrico e na presença de fenol. O glicerol, por sua vez, foi determinado pelo método enzimático proposto por Greenhill (2004). As amostras de ambas as análises foram previamente filtradas (0,47 μm).

Os ácidos orgânicos e solventes foram analisados por cromatografia gasosa, previamente filtradas (0,47 μm), em cromatógrafo modelo GC 2010 em sistema Shimadzu® equipado com detector de ionização em chama e coluna HP-INNOWAX (30 m de comprimento, 0,25 mm de diâmetro interno e 0,25 μm de espessura do filme), para determinação das concentrações de metanol, etanol, ácido acético, propiônico, isobutírico, butírico, isovalérico, valérico e caproico, segundo a metodologia descrita por Adorno, Hirasawa e Varesche (2014).

A vazão de biogás foi monitorada continuamente por medidor de gás acoplado ao *headspace* do sistema. A análise da composição do biogás – metano (CH_4), dióxido de carbono (CO_2) e sulfeto (H_2S) – foi realizada em cromatógrafo gasoso modelo GC 2014 em sistema Shimadzu® equipado com detector de condutividade térmica (TCD), com coluna HP-PLOT/Q (30 m de comprimento, 0,53 mm de diâmetro externo e 0,40 μm de espessura), e gás de arraste hidrogênio. As temperaturas do injetor e detector serão de 160°C e 170°C, respectivamente, e tempo de corrida de aproximadamente 5,25 minutos (PERNA et al., 2013).

Diante das análises realizadas, as variáveis resposta para a verificação do desempenho foram: eficiência de remoção de DQOt e DQOs (ER_{DQO} , em %); eficiência de remoção de CH (ER_{CH} , em %); eficiência de conversão de sulfato (ER_{SO_4} , em %); eficiência de remoção de glicerol (ER_{GLI} , em %); relação entre alcalinidade intermediária e parcial (AI/AP); vazão de biogás (VBG, em mL d^{-1}); produção volumétrica de metano (PVM, em $\text{mLCH}_4 \text{ L}^{-1} \text{ h}^{-1}$); vazão molar de metano (VMM, em $\text{mmolCH}_4 \text{ h}^{-1}$); rendimento de metano (MY, em $\text{mLCH}_4 \text{ g}^{-1}\text{DQOr}$) e conteúdo de metano no biogás ($\%\text{CH}_4$). Vale ressaltar que os valores para as variáveis resposta referentes à produção de biogás correspondem às condições normais de temperatura e pressão (CNTP) de 1 atm e 0°C (273,15K). As equações utilizadas para cálculo do desempenho dos reatores são apresentadas na Tabela 13.

Tabela 13: Principais equações utilizadas para verificação do desempenho dos reatores (continua).

Variável	Unidade	Equação	
Eficiência de remoção de DQO (ER_{DQO})	%	$ER_{DQO} = \left(\frac{DQO_{af} - DQO_{ef}}{DQO_{af}} \right) \cdot 100$	DQO_{af} : DQO afluente ($g\ L^{-1}$) DQO_{ef} : DQO efluente ($g\ L^{-1}$)
Eficiência de remoção de carboidratos (ER_{CH})	%	$ER_{CH} = \left(\frac{CH_{af} - CH_{ef}}{CH_{af}} \right) \cdot 100$	CH_{af} : Carboidratos totais afluente ($g\ L^{-1}$) CH_{ef} : Carboidratos totais efluente ($g\ L^{-1}$)
Eficiência de conversão de sulfato (ER_{SO4})	%	$ER_{SO4} = \left(\frac{SO_4^{-2}_{af} - SO_4^{-2}_{ef}}{SO_4^{-2}_{af}} \right) \cdot 100$	$SO_4^{-2}_{af}$: Sulfato afluente ($g\ L^{-1}$) $SO_4^{-2}_{ef}$: Sulfato efluente ($g\ L^{-1}$)
Contribuição da via sulfetogênica na remoção de DQO (DQO_{SO4})	%	$DQO_{SO4} = 0,67 \cdot \left(\frac{SO_4^{-2}_{af} - SO_4^{-2}_{ef}}{DQO_{af} - DQO_{ef}} \right) \cdot 100$	$SO_4^{-2}_{af}$: Sulfato afluente ($g\ L^{-1}$) $SO_4^{-2}_{ef}$: Sulfato efluente ($g\ L^{-1}$) DQO_{af} : DQO afluente ($g\ L^{-1}$) DQO_{ef} : DQO efluente ($g\ L^{-1}$)
Contribuição da via metanogênica na remoção de DQO (DQO_{CH4})	%	$DQO_{CH4} = 100 - DQO_{SO4}$	DQO_{SO4} : Contribuição da via sulfetogênica na remoção de DQO (%)
Eficiência de remoção de glicerol (ER_{GL})	%	$ER_{GL} = \left(\frac{GL_{af} - GL_{ef}}{GL_{af}} \right) \cdot 100$	GL_{af} : Concentração de glicerol afluente ($g\ L^{-1}$) GL_{ef} : Concentração de glicerol efluente ($g\ L^{-1}$)
Vazão de biogás (VBG)	$mL\ d^{-1}$	$VBG = \frac{V_{gasômetro}}{t_{medição}}$	$V_{gasômetro}$: Volume de biogás medido no gasômetro (mL) $t_{medição}$: Tempo de medição (d)

Tabela 13: Principais equações utilizadas para verificação do desempenho dos reatores (conclusão).

Variável	Unidade	Equação	
Conteúdo de metano (%CH ₄) e gás carbônico (%CO ₂) no biogás	%	$\%CH_4 = \frac{nCH_4}{n_{total}}$ $\%CO_2 = \frac{nCO_2}{n_{total}}$	nCH ₄ : Número de mols de CH ₄ (mol) nCO ₂ : Número de mols de CO ₂ (mol) n _{total} : nCH ₄ + nCO ₂ (mol)
Vazão molar de metano (VMM)	mmolCH ₄ h ⁻¹	$VMM = \frac{VBG \cdot nCH_4}{V_i}$	VBG: Vazão de biogás (mL h ⁻¹) nCH ₄ : Número de mols de CH ₄ (mol) V _i : Volume de biogás injetado no cromatógrafo (mL)
Produção volumétrica de metano (PVM)	mLCH ₄ L ⁻¹ h ⁻¹	$PVM = \frac{VBG \cdot \%CH_4}{V_r}$	VBG: Vazão de biogás (mL h ⁻¹) %CH ₄ : conteúdo de metano no biogás (%) V _r : Volume útil do reator (L)
Rendimento de metano (MY)	mLCH ₄ g ⁻¹ DQOr	$MY = \frac{VBG \cdot \%CH_4}{Q_{af} \cdot (DQO_{af} - DQO_{ef})}$	VBG: Vazão de biogás (mL h ⁻¹) %CH ₄ : conteúdo de metano no biogás (%) Q _{af} : Vazão afluenta (L d ⁻¹) DQO _{af} : DQO afluenta (g L ⁻¹) DQO _{ef} : DQO efluente (g L ⁻¹)

Nota: Os cálculos correspondem às condições normais de temperatura e pressão (CNTP).

4.5.1. Balanço de massa

De modo a auxiliar na compreensão dos processos de remoção de matéria orgânica ao longo de toda operação foi realizado o balanço de massa da fração solúvel (BMFS) e global (BMG) do sistema a partir do monitoramento do efluente. Para determinação do BMFS, os ácidos orgânicos e solventes detectados por cromatografia gasosa foram convertidos em equivalentes de matéria orgânica, dado em forma de DQO, de acordo com suas respectivas reações de oxidação (Tabela 14).

A Equação 1 foi utilizada para o BMFS, em que a DQO referente aos ácidos orgânicos, ou metabólitos intermediários, é a concentração de cada ácido multiplicado por seu respectivo fator de equivalência. Os termos DQO_{CH} e DQO_{GL} representam a concentração de matéria orgânica em DQO equivalente aos carboidratos totais e glicerol, respectivamente. E o termo DQO_{sef} corresponde à DQO solúvel na corrente efluente.

$$BMFS = \left(\frac{DQO_{metabólitos} + DQO_{CH} + DQO_{GL}}{DQO_{sef}} \right) \cdot 100 \quad (\text{Eq. 1})$$

Na Tabela 14 são apresentadas as massas moleculares, reações de oxidação e fatores de equivalência para os metabólitos e outros compostos determinados no sistema.

O BMG considerou, além dos compostos solúveis, a produção de metano e sólidos ao longo da operação do reator, expressa na Equação 2. Em que o termo DQO_{CH_4} corresponde à vazão de metano convertida para carga equivalente em DQO ($g\ d^{-1}$), dada segundo fator de equivalência apresentado na Tabela 14. O termo DQO_{SSV} corresponde à concentração de matéria orgânica em DQO equivalente à produção de SSV ($g\ d^{-1}$), considerando fator de equivalência de $1,42\ gDQO\ g^{-1}SSV$ (FERRAZ JR. et al., 2014). E o termo $DQO_{t_{af}}$ representa a concentração de matéria orgânica em DQO total na corrente afluenta.

$$BMG = \left(\frac{DQO_{sef} + DQO_{CH_4} + DQO_{SSV}}{DQO_{t_{af}}} \right) \cdot 100 \quad (\text{Eq. 2})$$

Tabela 14: Fatores de equivalência para balanço de massa.

Composto	Massa molar (g mol ⁻¹)	Reação de oxidação	Fator de equivalência
Ácido acético (HAc) (C ₂ H ₄ O ₂)	60,05	$\text{C}_2\text{H}_4\text{O}_2 + 2\text{O}_2 \rightarrow 2\text{CO}_2 + 2\text{H}_2\text{O}$	1,07 gDQO g ⁻¹ HAc
Ácido propiônico (HPr) (C ₃ H ₆ O ₂)	74,08	$\text{C}_3\text{H}_6\text{O}_2 + 7/2\text{O}_2 \rightarrow 3\text{CO}_2 + 3\text{H}_2\text{O}$	1,51 gDQO g ⁻¹ HPr
Ácido butírico (HBu) (C ₄ H ₈ O ₂)	88,11	$\text{C}_4\text{H}_8\text{O}_2 + 5\text{O}_2 \rightarrow 4\text{CO}_2 + 4\text{H}_2\text{O}$	1,82 gDQO g ⁻¹ HBu
Metanol (MeOH) (CH ₄ O)	32,04	$2\text{CH}_4\text{O} + 3\text{O}_2 \rightarrow 2\text{CO}_2 + 4\text{H}_2\text{O}$	1,50 gDQO g ⁻¹ MeOH
Carboidratos (CH) (C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁)	342,29	$\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11} + 12\text{O}_2 \rightarrow 12\text{CO}_2 + 11\text{H}_2\text{O}$	1,12 gDQO g ⁻¹ CH
Glicerol (GL) (C ₃ H ₈ O ₃)	92,09	$\text{C}_3\text{H}_8\text{O}_3 + 7/2\text{O}_2 \rightarrow 3\text{CO}_2 + 4\text{H}_2\text{O}$	1,22 gDQO g ⁻¹ GL
Metano (CH ₄)	16,04	$\text{CH}_4 + 2\text{O}_2 \rightarrow \text{H}_2\text{O} + \text{CO}_2$	4,00 gDQO g ⁻¹ CH ₄

4.5.2. Coeficiente de rendimento celular ($Y_{X/S}$) e carga orgânica volumétrica específica (COVe)

Com o intuito de compreender a dinâmica de crescimento da biomassa presente no reator, foi calculado a produção de biomassa aderida e suspensa, assim como a carga orgânica volumétrica específica. A COVe foi baseada na metodologia previamente reportada por Anzola-Rojas et al. (2015) e adaptada por Aquino, Fuess e Pires (2017) para sistemas metanogênicos.

Primeiramente, foi obtido o coeficiente de rendimento celular da biomassa ($Y_{X/S}$, gSSV g⁻¹DQO) para cada fase operacional, uma vez que a aplicação de diferentes substratos influencia em tal coeficiente, conforme Equação 3. Na Equação 3, os termos X_a , X_s , X_e e X_d (gSSV) referem-se à quantidade de biomassa aderida ao meio suporte do reator, à quantidade de biomassa suspensa no meio líquido, à quantidade de biomassa lavada do reator na corrente efluente ao longo do período de operação e à quantidade de biomassa proveniente de descartes de fundo do reator, respectivamente. O termo S representa a massa de substrato consumida, dada em termos de DQO.

$$Y_{X/S} = \frac{X_a + X_s + X_e + X_d}{S} \quad (\text{Eq. 3})$$

Para o cálculo de X_a foi estabelecida a diferença entre a massa de SSV (g), no início e fim de cada fase operacional. A diferença implica, portanto, na quantificação das células que cresceram no leito fixo durante a operação. Ao final de cada fase operacional foi retirada uma fração do meio suporte, a qual foi quantificada a biomassa presente e, então, estimada a massa total presente no reator. Na fase inicial (I), a massa inicial correspondeu à massa de SSV aderida à espuma após a drenagem do lodo no processo de inoculação. 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 fase operacional. Considerando que durante a operação não foram realizados descartes de biomassa contida no reator, o valor de X_d foi nulo.

Para a determinação de X_e foi realizado o cálculo da integral da vazão mássica de sólidos eliminados na corrente efluente ao reator ao longo da operação (Equação 4). Na Equação 4, os termos $SSVe$, Q e t representam, respectivamente, a concentração de sólidos suspensos voláteis no efluente (gSSV L⁻¹), a vazão afluyente ao reator (L d⁻¹) e o tempo de operação do sistema.

$$X_e = \int_0^t (SSVe \cdot Q) dt \quad (\text{Eq. 4})$$

O termo S foi calculado de maneira semelhante, a partir da integral da vazão mássica de substrato consumido ao longo da operação. Na Equação 5 é apresentado o cálculo da referida integral, sendo os termos Q, DQOaf, DQOef e t, respectivamente, a vazão afluenta ao reator ($L\ d^{-1}$), a concentração de matéria orgânica afluenta e efluente ($gDQO\ L^{-1}$) e o tempo total de operação do sistema (d).

$$S = \int_0^t Q(DQOaf - DQOef)dt \quad (Eq. 5)$$

A partir do cálculo de $Y_{x/s}$ foi possível determinar a produção de biomassa pelo consumo de substrato em um determinado intervalo de tempo (P_x), conforme indicado na Equação 6. Finalmente, por meio da Equação 7 calculou-se a quantidade de biomassa acumulada no interior do reator em um determinado tempo (X_n). Na Equação 7 tem-se que V_u corresponde ao volume útil do reator (L), X_t é a quantidade total de biomassa produzida ao longo da operação do reator ($X_a + X_s + X_e + X_d$, em gSSV), X_n é quantidade total de biomassa no interior do reator no tempo n ($gSSV\ L^{-1}_{reator}$), X_{n-1} é quantidade total de biomassa no interior do reator no tempo n – 1 ($gSSV\ L^{-1}_{reator}$) e D é a massa de sólidos descartada no tempo n (gSSV).

$$P_x = Q(DQOaf - DQOef) \cdot Y_{x/s} \quad (Eq. 6)$$

$$X_n = \left[\frac{\int_{n-1}^n P_x dt}{V_u} \cdot \left(\frac{X_a + X_s + X_d}{X_t} \right) \right] + X_{n-1} - \frac{D}{V_u} \quad (Eq. 7)$$

Desta forma, a COVe ($gDQO\ g^{-1}SSV\ d^{-1}$) em um determinado tempo n de operação foi obtida pelo quociente entre a carga orgânica volumétrica aplicada e a quantidade de biomassa retida (X_n , $gSSV\ L^{-1}_{reator}$), conforme apresentado na Equação 8.

$$COVe = \frac{COV}{X_n} \quad (Eq. 8)$$

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste capítulo são apresentados os resultados obtidos a partir do monitoramento contínuo do sistema biológico, operado por um período de 520 dias, considerando o período de interrupção do reator de 150 dias. Pretendeu-se contribuir para a elucidar aspectos da problemática da entressafra da cana-de-açúcar na geração de metano e mitigação dos efeitos ambientais de dois subprodutos provenientes da cadeia produtiva de biocombustíveis, a vinhaça e o glicerol.

5.1. Desempenho do reator: Fase líquida

5.1.1. Estabilidade operacional

O reator anaeróbio apresentou uma operação relativamente estável em todas as fases operacionais, baseando-se na relação entre alcalinidade intermediária e parcial, AI/AP, como parâmetro de avaliação. A relação AI/AP manteve-se majoritariamente na faixa de 0,05-0,20 durante o estado estacionário dinâmico, apresentando elevação dos valores até 0,5; quando da substituição de substratos, conforme dados apresentados na Figura 8. Porém, a relação AI/AP apresentou comportamento decrescente com a manutenção da alimentação do sistema, indicando a diminuição na concentração de ácidos voláteis totais (AVT) e adequação do consórcio microbiano ao meio reacional.

A fase inicial (I) de partida do reator apresentou relação AI/AP variável, associados ao incremento da COV e desenvolvimento da população metanogênica para manutenção do equilíbrio do processo anaeróbio. Uma vez estabelecida a população, aplicando a COV de 5,0 kgDQO m⁻³ d⁻¹, a estabilidade do sistema foi verificada com relação AI/AP média de 0,09 ± 0,02. Comparativamente à fase final (V), operada nas mesmas condições, ou seja, aplicando apenas vinhaça como substrato, a relação média reduziu para 0,05 ± 0,01.

Comportamento similar foi observado nas fases II e IV, de codigestão anaeróbia. Em que a relação AI/AP média reduziu de 0,16 ± 0,04, na fase IIA, e de 0,20 ± 0,03, na IIB, para 0,08 ± 0,01, na fase IV. O provável desenvolvimento de microrganismos metanogênicos explica a redução na relação AI/AP, acompanhado também de redução dos ácidos voláteis efluente, de 283,1 ± 54,3 (IIA) e 305 ± 48,8 (IIB) para 138,6 ± 15,8 mgHAc L⁻¹ (IV); e incremento da eficiência média de remoção de matéria orgânica.

Borges (2020) avaliou a codigestão anaeróbia de vinhaça e glicerol (50:50) em reator anaeróbio de leito fixo estruturado, aplicando COV de 0,5 a 5,0 kgDQO m⁻³ d⁻¹. A relação AI/AP e a concentração média efluente de ácidos voláteis totais foram superiores aos verificados no presente estudo, com valores médios de $0,27 \pm 0,10$ e 368 ± 101 mgHAc L⁻¹, respectivamente, não apresentando, entretanto, instabilidade operacional. Lovato et al. (2019a) obtiveram valores de AVT inferiores, entre 60 a 90 mgHAc L⁻¹, na codigestão anaeróbia de vinhaça e glicerina (50:50) em reator anaeróbio operado em batelada sequencial, para uma COV de 5,0 kgDQO m⁻³ d⁻¹.

O glicerol é um composto orgânico prontamente biodegradável, sendo convertido rapidamente à ácidos orgânicos (DA SILVA, MACK, CONTIERO, 2009; HE, MCNUTT, YANG, 2017; KAUR et al., 2020). A rápida conversão em ácidos pode ser observada na Figura 8, em que as concentrações de ácidos voláteis totais atingem os maiores valores na fase III. No 381º dia de operação, foi verificado incremento na concentração ácidos voláteis e, conseqüentemente, na relação AI/AP, atingindo pico de 0,56. No entanto, não foi necessário aumentar a suplementação de álcali, mantendo-se a adição de apenas 0,15 gNaHCO₃ gDQO⁻¹.

Unicamente nessa fase experimental, a concentração de alcalinidade a bicarbonato efluente foi inferior ao afluyente, a partir do 396º dia, em que foi atingido a proporção de 100% glicerol. Nesse caso, a alcalinidade a bicarbonato foi consumida com o intuito do sistema se autorregular e manter o pH próximo à neutralidade, de $6,9 \pm 0,1$. A partir do 402º dia, a relação AI/AP apresentou comportamento decrescente, atingindo valores inferiores a 0,3, indicando adequação da biomassa ao meio reacional.

A alcalinidade a bicarbonato na monodigestão de glicerol foi inferior à observada para a vinhaça. Diferentemente da vinhaça, o glicerol não gera alcalinidade a partir da sulfetogênese (LENS et al., 1998), pois não apresenta sulfato em sua composição, conforme verificado na Figura 12.

Yang, Tsukahara e Sawayama (2008) observaram queda do pH efluente de 8,0 para 5,4 nos primeiros 55 dias de operação semicontínua do reator APBR (*Anaerobic packed-bed reactor*), alimentado com meio sintético composto por glicerol e solução nutricional, a uma COV de 0,25 kgDQO m⁻³ d⁻¹ em condição mesofílica, associado à rápida conversão do substrato. Os autores suplementaram o sistema com alcalinizante (4,2 gNaHCO₃ L⁻¹) e o pH efluente aumentou para 7,5. Na presente pesquisa, o pH efluente mínimo foi de 6,7, a uma COV de 5,0 kgDQO m⁻³ d⁻¹. Com exceção da fase III, o pH efluente manteve-se superior a 7,0; embora a vinhaça também ofereça risco de acidificação em reatores anaeróbios devido à sua composição rica em carboidratos, para as COVs aplicadas.

Figura 8: Perfil temporal do (a) pH (-○-) e proporção de glicerol afluyente (—); (b) alcalinidade parcial afluyente (-■-) e efluente (-□-) e relação AI/AP (■); (c) ácidos voláteis totais efluente (-●-).

Fonte: Elaboração própria.

Acerca da composição da vinhaça, Ferraz Jr et al. (2016) demonstraram a necessidade do suprimento de alcalinizante (NaHCO_3) em sistema anaeróbio para estabilização do reator, uma vez que as concentrações consideráveis de carboidratos favorecem sua rápida acidificação

(BONCZ et al., 2012). Segundo Boncz et al. (2012), a rápida hidrólise dos açúcares, o pH ácido e a ausência de alcalinidade da vinhaça, tornam a metanogênese a etapa limitante da digestão anaeróbia da vinhaça, podendo ocasionar o desequilíbrio entre as populações microbianas e o acúmulo de ácidos orgânicos.

De maneira geral, o reator apresentou estabilidade operacional, fazendo uso da estratégia operacional de aumento progressivo da carga orgânica e da permuta gradual de substratos, demonstrando a resiliência da biomassa.

5.1.2. Remoção de matéria orgânica

O perfil de remoção de matéria orgânica, em termos de DQO total (DQOt) e DQO solúvel (DQOs), assim como a DQOt afluente e efluente, são apresentados na Figura 9. Notadamente, a DQOt afluente corresponde à COV aplicada. Na fase I, a eficiência média de remoção de DQO do sistema foi de $81,1 \pm 1,5\%$ e $83,4 \pm 1,2\%$, em termos de DQO total e solúvel, respectivamente, para COV máxima de $5,0 \text{ kgDQO m}^{-3} \text{ d}^{-1}$. Os dados foram similares ao observado por Aquino, Fuess e Pires (2017) de $87,0 \pm 1,2\%$ e $82,0 \pm 5,3\%$, para as COV aplicadas de 3,8 e $5,5 \text{ kgDQO m}^{-3} \text{ d}^{-1}$, respectivamente, ao tratar vinhaça em reator AnSTBR. Barros, Duda e Oliveira (2016) também conduziram o tratamento da vinhaça, em que foi obtido eficiência de remoção de matéria orgânica similar de 81%, ao testar cargas orgânicas entre 2,5 e $5,0 \text{ kgDQO m}^{-3} \text{ d}^{-1}$, em reator UASB mesofílico. Del Nery et al. (2018) obtiveram eficiências superiores de $87,5 \pm 5,3\%$ e $90,5 \pm 3,6\%$ em termos de DQO total e solúvel, respectivamente, em reator UASB, escala piloto, tratando vinhaça em cargas orgânicas de 0,5 – $32,4 \text{ kgDQO m}^{-3} \text{ d}^{-1}$. Os últimos autores creditaram a manutenção da eficiência ao procedimento operacional, em que as alterações de carga orgânica foram realizadas a partir de pequenos incrementos.

Ressalva-se que o presente trabalho teve como objetivo a substituição da vinhaça na condição de entressafra, e que outros estudos com o mesmo reator (AnSTBR) permitem a aplicação de COV aplicadas superiores a $5 \text{ kgDQO m}^{-3} \text{ d}^{-1}$, conforme relatado por Aquino, Fuess e Pires (2017).

A fase II compreendeu o processo de codigestão de vinhaça e glicerol, com duração de 260 dias, subdividida em duas etapas (IIA, 68 dias e IIB, 42 dias). Na fase IIA foi verificada eficiência média superior à fase anterior, com $84,7 \pm 1,1\%$ e $87,0 \pm 1,4\%$, em termos de DQO total e solúvel, respectivamente. Similar à fase IIB de $83,7 \pm 0,9\%$ e $86,8 \pm 1,4\%$, demonstrando resiliência da população microbiana, após interrupção do reator durante 150 dias, com manutenção à 4°C .

Jáuregui-Jáuregui et al. (2014) avaliaram a repartida de um reator de leito fixo a partir de vinhaça de tequila. Após um período de 6 meses de interrupção, o reator apresentou um período de repartida de 28 dias, demonstrando estabilização e resiliência do biofilme. A COV aumentou de 2,2 a 5,2 kgDQO m⁻³ d⁻¹ e nesse período o sistema alcançou eficiência de remoção de DQO de 80%, no início da operação, atingindo valores superiores a 90%. No presente estudo, o reator também apresentou estabilização e resiliência do biofilme frente à interrupção do funcionamento e troca de substrato.

Figura 9: Perfil temporal das eficiências de remoção de matéria orgânica (ER_{DQOt}, -○-; ER_{DQOs}, -●-); proporção do substrato glicerol (—) e DQOt afluente (■) e efluente (■).

Legenda: Lavagem de biomassa do reator (→). Fonte: Elaboração própria.

As eficiências médias de remoção obtidas foram superiores aos resultados reportados por Borges (2020), o qual obteve valores médios de 75,5 e 79,8%, em termos de DQOt e DQOs respectivamente, em codigestão de vinhaça e glicerol, para COV de 5,0 kgDQO m⁻³ d⁻¹, em reator AnSTBR. A codigestão (50V:50G), portanto, demonstrou maior eficiência de remoção de matéria orgânica, quando comparado à monodigestão de vinhaça de cana-de-açúcar. Isso possivelmente deve-se à adição de material prontamente biodegradável, o glicerol, e à diluição de compostos tóxicos e recalcitrantes presentes na vinhaça, como as melanoidinas e compostos fenólicos.

Resultados da literatura de referência reportaram aumento na eficiência de remoção de matéria orgânica com a adição de glicerol como cossubstrato em diferentes águas residuárias (CASTRILLÓN et al., 2013; LARSEN et al., 2013; ATHANASOULIA; MELIDIS; AIVASIDIS, 2014). Lovato et al. (2019a) associaram vinhaça e glicerina, em batelada sequencial com biomassa imobilizada, e verificaram um aumento de 87 para 91% na eficiência em relação à operação de monodigestão anaeróbia de vinhaça de cana-de-açúcar.

Conforme apresentado na Figura 9, durante a fase IIA foram verificadas reduções pontuais da eficiência de remoção de matéria orgânica em termos de DQO total, nos dias 122 e 143 de operação. Concomitantemente, foram verificados desprendimento e arraste da biomassa do meio suporte (“washout”), resultando no incremento da concentração de sólidos no efluente e redução de ER_{DQOt} . O incremento da concentração de sólidos pode ser verificado na Figura 18.

A vinhaça foi totalmente substituída na fase III por glicerol, período referente à entressafra de cana-de-açúcar. Com uma duração de 42 dias, a substituição gradual de substrato e a matéria orgânica altamente biodegradável do glicerol resultou em eficiências de remoção de matéria orgânica superiores, em média de $93,1 \pm 0,6\%$ e $94,3 \pm 0,7\%$, em termos de DQO total e solúvel.

Devido às baixas concentrações de nutrientes presentes do glicerol, a solução de macro e micronutrientes foi adicionada, a partir da proporção 20V:80G, deste modo, os nutrientes não foram fatores limitantes ao desempenho da biomassa. Viana (2011) observou arraste da biomassa de um reator UASB operado com glicerol, o qual foi creditado à falta de nutrientes. Conforme foi fornecido quantidade adequada de nutrientes, por meio de solução sintética, o reator foi capaz de operar sob condições estáveis e sem acúmulos de ácidos orgânicos para uma COV de $10 \text{ kgDQO m}^{-3} \text{ d}^{-1}$.

Com o retorno da alimentação com vinhaça, referente ao período de início da safra de cana-de-açúcar, o reator foi operado em codigestão, novamente, associando vinhaça e glicerol na fase IV. A adição crescente de vinhaça, matriz de maior complexidade do que o glicerol, mantendo-se a carga orgânica, não apresentou instabilidade operacional, conforme mencionado anteriormente, e o reator apresentou eficiência de remoção de matéria orgânica superior a 90%, em termos de $DQOt$ e $DQOs$. Tal eficiência foi superior à observada nas fases IIA e IIB, indicando adaptação e resiliência da biomassa frente à permuta de substratos. A elevada remoção de matéria orgânica verificada na fase IV aproxima-se dos resultados reportados por Lovato et al. (2019a), conforme mencionado anteriormente.

A partir da codigestão 20V:80G, em que há aumento na proporção de vinhaça para essa fase experimental, a alimentação do reator não mais foi suplementada com solução de macro e micronutrientes, uma vez que a vinhaça apresenta concentrações satisfatórias de nutrientes em sua composição (FUESS; GARCIA, 2014a).

Finalmente, na fase V, o retorno à condição de 100% vinhaça apresentou eficiência superior à fase I, com eficiências médias de $82,3 \pm 0,6$ e $84,9 \pm 0,7\%$, para DQOt e DQOs. A Tabela 15 sumariza as eficiências de remoção de matéria orgânica ao longo de todo período operacional, apresentando as condições transientes de substituição gradual de substratos.

Os dados apresentados na Tabela 15 demonstram as maiores eficiências obtidas em codigestão de vinhaça e glicerol comparativamente à monodigestão de vinhaça, à exceção das proporções 40:60 e 30:70. As menores eficiências nessas proporções podem estar associadas às menores concentrações de nutrientes no meio, uma vez que as eficiências aumentaram ao adicionar macro e micronutrientes, em 20:80. Os micronutrientes são constituintes de enzimas e co-fatores enzimáticos participantes em rotas metabólicas do processo anaeróbio (CHOONG et al., 2016; ZIELIŃSKI et al., 2019), podendo promover maior conversão de matéria orgânica, como observado.

Apesar da carência de estudos acerca da problemática da entressafra e da codigestão anaeróbia de vinhaça e glicerol em reatores contínuos, o sistema proposto apresentou desempenho satisfatório em termos de estabilidade e remoção de matéria orgânica. Na Tabela 16 são apresentados dados de ajustes de alcalinidade e remoção de matéria orgânica em diversos estudos de monodigestão e codigestão anaeróbia empregando como substratos vinhaça e glicerol. Vale ressaltar o desempenho satisfatório do sistema tratando apenas vinhaça a uma adição de álcali inferior ($0,15 \text{ gNaHCO}_3 \text{ g}^{-1}\text{DQO}$) aos dados relatados na literatura de referência (Tabela 16), reduzindo custos de alcalinização.

A Figura 10 apresenta o gráfico boxplot da eficiência de remoção de matéria orgânica, em termos de DQOt, para cada fase operacional. As fases iniciais apresentaram maior dispersão de dados, demonstrando maior estabilidade ao final da fase experimental. Aplicando-se o teste paramétrico de análise de variância (ANOVA), constatou-se que ao menos uma das eficiências de remoção de matéria orgânica difere significativamente das demais ($\alpha = 0,05$).

Com o intuito de comparar as fases experimentais alimentadas a partir do mesmo substrato, foi realizado um teste T paramétrico. Segundo o teste estatístico, não foi verificado diferença significativa ($p\text{-valor} < 0,05$) entre as fases I e V, ou IIA e IIB. Deste modo, a interrupção do reator durante 150 dias, entre as fases IIA e IIB, não impactou significativamente o desempenho do reator, quanto à remoção de matéria orgânica, em termos de DQOt.

Aplicando-se o teste T e observando o gráfico *boxplot* (Figura 10), verificou-se diferença significativa entre os processos de codigestão anaeróbia pré e pós monodigestão de glicerol, apresentando eficiência superior após a troca de substratos. O melhor desempenho pós permuta de substratos, em codigestão, pode ser atribuído à maior conversão de matéria orgânica por microrganismos responsáveis pela metanogênese, as arqueas metanogênicas (AM), e pela sulfetogênese, as bactérias redutoras de sulfato (BRS), conforme é discutido em 5.2.1.

Com bases nos dados apresentados até o momento, a aplicação do glicerol como fonte de material orgânico à alimentação de reator anaeróbio em mono ou codigestão demonstrou potencialidades quanto à remoção de matéria orgânica e à estabilidade operacional.

Figura 10: Gráfico *boxplot* da eficiência de remoção de matéria orgânica, em termos de DQOt, em relação à cada fase experimental.

Fonte: Elaboração própria.

Tabela 15: Eficiências de remoção de matéria orgânica em mono- e codigestão de vinhaça e glicerol.

Fase experimental	Substratos	Proporção (V:G) ^a	ER _{DQOt} (%)	ER _{DQOs} (%)	Fase experimental	Substratos	Proporção (V:G) ^a	ER _{DQOt} (%)	ER _{DQOs} (%)
I	Vinhaça	100:0	81,1 ± 1,5	83,4 ± 1,2	III	Glicerol	0:100	93,1 ± 0,6	94,3 ± 0,7
IIA	Vinhaça e glicerol	90:10	84,7 ± 2,0	85,8 ± 1,0	IV	Vinhaça e glicerol	10:90	90,4 ± 1,7	93,0 ± 1,6
		80:20	87,3 ± 1,0	89,4 ± 0,8			20:80	91,5 ± 0,8	94,0 ± 1,1
		70:30	86,8 ± 0,5	88,4 ± 0,1			30:70	90,3 ± 1,6	92,0 ± 1,1
		60:40	88,1 ± 0,9	89,3 ± 1,4			40:60	89,5 ± 1,4	90,7 ± 0,2
		50:50	84,7 ± 1,1	87,0 ± 1,4			50:50	91,0 ± 0,9	92,5 ± 0,7
IIB	Vinhaça e glicerol	50:50	83,7 ± 0,9	86,8 ± 1,4	V	Vinhaça e glicerol	60:40	90,9 ± 0,6	92,7 ± 0,8
III	Vinhaça e glicerol	40:60	81,1 ± 1,1	83,2 ± 1,4			70:30	90,2 ± 1,0	92,5 ± 0,9
		30:70	81,5 ± 1,5	81,9 ± 1,8			80:20	87,1 ± 0,9	89,6 ± 0,2
		20:80	84,5 ± 1,1	86,0 ± 2,4			90:10	86,8 ± 0,3	87,9 ± 0,4
		10:90	88,2 ± 2,2	90,7 ± 1,6		Vinhaça	100:0	82,3 ± 0,6	84,9 ± 0,7

^a Proporção vinhaça:glicerol (%COV)

Tabela 16: Ajustes de alcalinidade e remoção de matéria orgânica em sistemas anaeróbios operados com vinhaça e/ou glicerol (continua).

Referência	Substratos	Características	Eficiências (%)
Este trabalho	Vinhaça (Fase I)	Reator AnSTBR DQO = 5,0 g L ⁻¹	ER _{DQOt} = 81,1 ± 1,5 ER _{DQOs} = 83,4 ± 1,2
	Vinhaça e glicerol (Fase IIA)	COV = 5,0 kgDQO m ⁻³ d ⁻¹ T = 30°C	ER _{DQOt} = 84,7 ± 1,1 ER _{DQOs} = 87,0 ± 1,4
	Vinhaça e glicerol (Fase IIB)	NaHCO ₃ /DQO = 0,15 g g ⁻¹	ER _{DQOt} = 83,7 ± 0,9 ER _{DQOs} = 86,8 ± 1,4
	Glicerol (Fase III)		ER _{DQOt} = 93,1 ± 0,6 ER _{DQOs} = 94,3 ± 0,7
	Vinhaça e glicerol (Fase IV)		ER _{DQOt} = 91,0 ± 0,9 ER _{DQOs} = 92,5 ± 0,7
	Vinhaça (Fase V)		ER _{DQOt} = 82,3 ± 0,6 ER _{DQOs} = 84,9 ± 0,7
Boncz et al. (2012)	Vinhaça	Reator UASB DQO = 8,0 g L ⁻¹ COV = 4,0 kgDQO m ⁻³ d ⁻¹ T = 37°C NaHCO ₃ /DQO = 0,8 g g ⁻¹	ER _{DQOs} = 96
Albanez et al. (2016)	Vinhaça	Reator AnSBBR DQO = 5,0 g L ⁻¹ COV = 5,54 kgDQO m ⁻³ d ⁻¹ T = 30 ± 1°C NaHCO ₃ /DQO = 0,5-1,0 g g ⁻¹	ER _{DQOt} = 82 ± 2 ER _{DQOs} = 83 ± 2
Sousa et al. (2019)	Vinhaça e soro de queijo	Reator AnSBBR DQO = 5,0 g L ⁻¹ COV = 5,0 kgDQO m ⁻³ d ⁻¹ T = 30°C NaHCO ₃ /DQO = 0,2-1,0 g g ⁻¹	ER _{DQOt} = 92 ± 1,0 ER _{DQOs} = 93 ± 0,9
Lovato et al. (2019b)	Vinhaça e soro de queijo	Reator AnSBBR DQO = 5,0 g L ⁻¹ COV = 6,4 kgDQO m ⁻³ d ⁻¹ T = 30°C NaHCO ₃ /DQO = 0,7 g g ⁻¹	ER _{DQOt} = 84 ± 5 ER _{DQOs} = 88 ± 4

Tabela 16: Ajustes de alcalinidade e remoção de matéria orgânica em sistemas anaeróbios operados com vinhaça e/ou glicerol (conclusão).

Referência	Substratos	Características	Eficiências (%)
Lovato et al. (2016)	Glicerol	Reator AnSBBR	$ER_{DQOs} = 87 \pm 4$
	Glicerol e soro de queijo	DQO = $5,0 \text{ g L}^{-1}$ COV = $7,5 \text{ kgDQO m}^{-3} \text{ d}^{-1}$ T = 30°C $\text{NaHCO}_3/\text{DQO} = 0,7 \text{ g g}^{-1}$	$ER_{DQOs} = 94 \pm 1$
Lovato et al. (2019a)	Vinhaça e glicerol	Reator AnSBBR	$ER_{DQOt} = 91 \pm 5$
		DQO = $5,0 \text{ g L}^{-1}$ COV = $5,0 \text{ kgDQO m}^{-3} \text{ d}^{-1}$ T = 30°C $\text{NaHCO}_3/\text{DQO} = 0,5 \text{ g g}^{-1}$	$ER_{DQOs} = 92 \pm 4$
Borges (2020)	Vinhaça e glicerol	Reator AnSTBR DQO = $1,0\text{-}5,0 \text{ g L}^{-1}$ COV = $1,0\text{-}5,0 \text{ kgDQO m}^{-3} \text{ d}^{-1}$ T = 30°C $\text{NaHCO}_3/\text{DQO} = 0,2\text{-}0,5 \text{ g g}^{-1}$	$ER_{DQOt} = 75 \pm 5$ $ER_{DQOs} = 80 \pm 4$

Legenda: DQO: demanda química de oxigênio; COV: carga orgânica volumétrica; T: temperatura; NaHCO_3 : bicarbonato de sódio; ER_{DQOt} : eficiência de remoção de DQO total; ER_{DQOs} : eficiência de remoção de DQO solúvel; AnSBBR: reator anaeróbio operado em bateladas sequenciais; AnSTBR: reator anaeróbio de leito fixo; UASB: reator anaeróbio de fluxo ascendente e manta de lodo.

Em termos de conversão de carboidratos totais (Figura 11), o sistema apresentou eficiências superiores a 80%, com exceção da fase III, em que a partir do 398º de operação iniciou-se a monodigestão de glicerol, o qual não apresenta carboidratos em sua composição. A elevada eficiência observada ao longo de toda operação deve-se ao fato de os carboidratos serem facilmente assimiláveis nas etapas iniciais – hidrólise e acidogênese – da digestão anaeróbia. Apesar da rápida conversão desses compostos, não foi verificado acúmulo de ácidos orgânicos no sistema, ou instabilidade, conforme mencionado em 5.1.1.

Associado ao incremento das COV aplicadas na partida do reator, foi verificado aumento nas eficiências de remoção de matéria orgânica e conversão de carboidratos, possivelmente em razão da cinética de biodegradação, mais favorável para maiores concentrações iniciais, corroborado por Aquino, Fuess e Pires (2017), que obtiveram maiores velocidades de degradação de matéria orgânica ao incrementar a carga orgânica de 2,4 até $15,0 \text{ kgDQO m}^{-3} \text{ d}^{-1}$, tratando vinhaça em reator AnSTBR e APBR.

A conversão de carboidratos totais na fase IIB ($92,1 \pm 0,7\%$) foi superior à IIA ($90,8 \pm 0,9\%$), apesar da interrupção do sistema, demonstrando a estabilidade do biofilme previamente formado, aderido ao meio suporte. Já na fase IV, a conversão manteve-se semelhante ($91,9 \pm 0,9\%$), apesar da fase III não fornecer carboidratos como substrato, demonstrando resiliência da biomassa frente à substituição de substratos. Tal fato pode ser observado também ao comparar-se as fases experimentais I ($93,3 \pm 0,3\%$) e V ($92,5 \pm 0,6\%$), a qual foi fornecido apenas vinhaça como substrato.

Acerca da conversão de glicerol, as eficiências mantiveram-se elevadas ao longo da operação, cerca de 99% em todas as fases experimentais, conforme pode ser observado na Figura 11. Resultados similares foram reportados por Borges (2020) e Lovato et al. (2016, 2019a) em sistemas anaeróbios de codigestão com glicerol, em condições mesofílicas.

A codigestão anaeróbia, portanto, demonstrou-se mais eficiente ao remover matéria orgânica e converter alguns compostos do que a monodigestão de vinhaça de cana-de-açúcar.

Quanto as eficiências de conversão de sulfato, observou-se o estabelecimento da sulfetogênese quando da monodigestão de vinhaça, a partir da COV de $1 \text{ kgDQO m}^{-3} \text{ d}^{-1}$ e codigestão de vinhaça e glicerol (Figura 12).

Independente do aumento na concentração de sulfato afluyente proveniente do aumento na COV aplicada (fase I), as eficiências de conversão desse composto mantiveram-se elevadas, conforme apresentado na Figura 12. Foi possível verificar o fluxo de elétrons e a predominância da via metanogênica na degradação da matéria orgânica, responsável por $92,2 \pm 0,7\%$ da eficiência do sistema; ao passo que a via sulfetogênica foi responsável por apenas $7,8 \pm 0,7\%$, na fase I. A predominância da via metanogênica deve-se às baixas concentrações de sulfato afluyente e elevada relação DQO/sulfato, cerca de 12, nas quatro coletas de vinhaça realizadas.

Kiyuna, Fuess e Zaiat (2017) investigaram a influência da relação DQO/sulfato no tratamento biológico da vinhaça, em meio termofílico. Foi verificada uma redução na produção de metano em 35%, ao reduzir a relação de 12,0 para 7,5. Diante desse cenário, maiores concentrações de sulfato na vinhaça poderiam alterar a predominância do fluxo de elétrons para a sulfetogênese.

Devido às concentrações de sulfato afluyente de 36 a 485 mg L^{-1} na fase I, não foi observada elevada produção de sulfeto total dissolvido, produzido em sistemas sulfetogênicos por BRS. A produção máxima de sulfeto total dissolvido obtida analiticamente foi de $2,8 \text{ mg L}^{-1}$, não apresentando problemas de toxicidade ao sistema. A concentração de sulfeto de hidrogênio que permanece dissolvida no meio líquido depende do pH do meio, a qual pode estar na forma ionizada (HS^{-1}) ou molecular (H_2S). Para valores de pH obtidos, de cerca de 7,8

$\pm 0,1$ (fase I), o sulfeto tende a estar presente majoritariamente sob a forma ionizada, a qual é menos tóxica aos microrganismos, quando comparado à forma molecular (HULSHOFF POL et al., 2001).

Figura 11: Perfil temporal da eficiência de conversão de (a) carboidratos totais e (b) glicerol (ER_{CH} , ER_{GL} , $-\circ-$); concentração de carboidratos totais e glicerol afluente (CH, GL, $\blacksquare$) e efluente (CH, GL, $\blacksquare$) e proporção de glicerol afluente (—).

Fonte: Elaboração própria.

Figura 12: Perfil temporal da eficiência de conversão de sulfato (ER_{SO_4} , -○-); proporção do substrato glicerol (—) e concentração de sulfato afluente (SO_4^{2-} , ■) e efluente (SO_4^{2-} , ■).

Fonte: Elaboração própria.

Apesar da redução da concentração de sulfato afluente proporcionado pela fase II, comparativamente à fase anterior, as eficiências de conversão se mantiveram elevadas. Esta redução também implicou aumento da relação DQO/sulfato para cerca de 25. Já na fase III, a partir do 398º dia de operação, em 100% glicerol, não mais foi fornecido sulfato, cessando a sulfetogênese no sistema.

Assim como ocorrido com a conversão de carboidratos, a substituição de substratos não interferiu negativamente na conversão de sulfato, pelo contrário, as eficiências foram superiores após o período simulado de entressafra de cana-de-açúcar, atingindo eficiências médias de $97,7 \pm 0,6\%$ e $98,0 \pm 0,7\%$, nas fases IV e V respectivamente. Dando indícios de que a população microbiana composta por BRS mantiveram-se ativas após a substituição de substratos. Segundo Damianovic e Foresti (2009), as BRS, em sistemas que operam sob limitação de sulfato, são capazes de oxidar parcialmente os ácidos orgânicos produzidos na acidogênese, produzindo acetato, o qual pode ser utilizado posteriormente por arqueas metanogênicas acetoclásticas, podendo promover aumento na produção de metano, como verificado na fase III, abordado em 5.2.1. Ademais, de acordo com Qatibi Bories e Garcia (1991), algumas espécies de *Desulfovibrio* são capazes de degradar glicerol na ausência de sulfato.

Com base nos cálculos de contribuição da sulfetogênese na remoção de matéria orgânica solúvel, obteve-se os valores médios de $7,8 \pm 0,7\%$, $2,9 \pm 0,3\%$, $3,3 \pm 0,2\%$, $3,5 \pm 0,4\%$ e $8,4$

$\pm 0,2\%$, respectivos às fases I, IIA, IIB, IV e V. Esses valores serão significativos na discussão do item 5.2.1., uma vez que a rota sulfetogênica, apesar de contribuir na remoção de matéria orgânica, inclusive fornecendo alcalinidade ao meio, pode reduzir a produção de metano e a recuperação energética potencial dessa.

5.2. Desempenho do reator: Fase gasosa

5.2.1. Produção e rendimento de metano

A composição do biogás variou de 62 a 90%CH₄, em que a maior proporção de metano no biogás foi observada para a COV inicial de partida do reator de 0,5 kgDQO m⁻³ d⁻¹. Essa, contudo, foi reduzida ao passo que a COV foi incrementada, apresentando uma média de 67,5 $\pm 0,3\%$, ao final da fase I, a uma COV aplicada de aproximadamente 5,0 kgDQO m⁻³ d⁻¹, conforme ilustrado na Figura 13.

Dados da literatura de referência apresentaram conteúdo de metano no biogás similar, ao tratar vinhaça biologicamente. Barbosa (2017) obteve composições de biogás com média de 66 $\pm 4\%$ de metano, ao aplicar cargas orgânicas crescentes de 5 a 29 kgDQO m⁻³ d⁻¹, em reator UASB, escala piloto. Aquino, Fuess e Pires (2017) obtiveram um conteúdo médio de 61,1% para COV aplicada de 5,5 kgDQO m⁻³ d⁻¹. Del Nery et al. (2018) atingiram uma média de 65% de metano no biogás em cargas orgânicas de 0,5 - 32,4 kgDQO m⁻³ d⁻¹.

O incremento no conteúdo de CO₂ no biogás foi observado, associado ao aumento da COV aplicada, em que há maior produção de alcalinidade a bicarbonato no meio (HCO₃⁻), o qual, ao reagir com H⁺, libera CO₂. A liberação de CO₂ da fração líquida está associada ao equilíbrio termodinâmico gás-líquido, definido pela Lei de Henry, em que as frações de dióxido de carbono, bicarbonato e carbonato dependem da temperatura, pressão parcial e solubilidade (CRONE et al., 2016). Assim, como não foi verificada evidências de instabilidade ao longo do período de operação, avaliando a relação entre alcalinidades a bicarbonato e ácidos (AI/AP) – detalhado no item 5.1.1 –, é corroborada a importância de não se considerar isoladamente o aumento da proporção de CO₂ como parâmetro para identificação de instabilidades na operação de reatores anaeróbios, uma vez que o mesmo se torna aparente apenas quando o acúmulo de ácidos predomina no sistema, associado, posteriormente, a alterações no pH (DILALLO; ALBERTSON, 1961).

Além disso, de acordo com Grover Marwaha e Kennedy (1999), o aumento na COV no sistema implica no aumento de produção de biogás, devido à maior disponibilidade de substrato

a ser convertido a biogás, e resulta na queda do teor de metano, o qual pode ser atribuído ao rápido crescimento dos microrganismos fermentativos, quando comparados às arqueas metanogênicas.

Figura 13: Composição do biogás (CH_4 , -●-; CO_2 , -○-); proporção do substrato glicerol (—) e carga orgânica volumétrica aplicada (COV, ■).

Fonte: Elaboração própria.

Segundo Parsaee, Kiani, Karimi (2019), do biogás produzido a partir da vinhaça, 1% corresponde a sulfeto de hidrogênio (H_2S), devido à concentração de sulfato na vinhaça de cana-de-açúcar. Entretanto, no presente estudo, não foi detectado produção de H_2S , possivelmente devido à diluição da vinhaça afluenta, fornecedora de sulfato, e pH superior a 7,5, permanecendo majoritariamente dissolvida no meio.

No processo de codigestão anaeróbia das fases IIA e IIB, foi verificado conteúdo de metano médio no biogás de $64,9 \pm 0,8\%$ e $64,6 \pm 0,5\%$, respectivamente. Apesar da redução na proporção de metano, comparado à fase anterior, a vazão de biogás (Figura 14a) foi superior nessa fase, resultando em maior vazão molar e produção volumétrica de metano (Figura 14b, c). Em relatos bibliográficos anteriores de codigestão anaeróbia foi verificado um conteúdo médio de metano no biogás de 72-73% ao associar vinhaça e soro de queijo (ALBUQUERQUE, RATUSZNEI, RODRIGUES, 2019; SOUSA et al., 2019), e 76,4% ao associar glicerina e soro de queijo (LOVATO et al., 2016). Borges (2020) associou vinhaça e glicerol em reator AnSTBR, a uma COV de $5,0 \text{ kgDQO m}^{-3} \text{d}^{-1}$, e obteve cerca de 60% de metano na composição

do biogás produzido. Enquanto que Lovato et al. (2019a) obtiveram um conteúdo médio de $83 \pm 1\%$ de metano ao associar vinhaça e glicerina, em batelada alimentada.

O fornecimento de apenas glicerol como substrato no período de entressafra, não alterou a composição média do biogás produzido, sendo obtido um valor médio de $64,7 \pm 0,4\%$. Similar ao relatado por Vlassis et al. (2013), em que foi obtida composição de metano de aproximadamente 67%, ao operar um reator CSTR alimentado por glicerol e solução de nutrientes, a uma COV de $0,25 \text{ kgDQO m}^{-3} \text{ d}^{-1}$.

Ao passo que o conteúdo de metano no biogás aumentou nas fases IV e V, respectivamente, para $65,9 \pm 0,3\%$ e $69,6 \pm 0,6\%$. O incremento no conteúdo de metano pode estar associado ao desenvolvimento de microrganismos homoacetogênicos, redutores de gás carbônico a acetato (STAMS, 1994). Lazaro et al. (2014) relataram a presença da via homoacetogênica na fermentação de vinhaça de cana-de-açúcar e observaram a presença de diferentes espécies do gênero de *Clostridium*, relatadas como responsáveis pela homoacetogênese, sob temperaturas mesofílicas. Demonstrando, novamente, resiliência da biomassa e estabilidade do processo frente à permuta de substratos, indicando resultados promissores para recuperação energética do metano produzido, inclusive no período equivalente à entressafra de cana-de-açúcar.

A partir da análise do volume produzido e da composição do biogás, produzido a partir da conversão biológica da matéria orgânica, foi obtido a vazão de biogás (Figura 14a), vazão molar (Figura 14b), produção volumétrica (Figura 14c) e rendimento de metano (Figura 14d). De maneira geral, o comportamento observado para essas variáveis desempenho foi crescente conforme incremento da COV aplicada; decrescente nos períodos iniciais de cada fase operacional, em que houve substituição gradual de substratos, variando as proporções de cossustratos; e crescente nos períodos finais de cada fase operacional.

Durante o período operacional das fases I e IIB, o reator apresentou vazões crescentes de biogás, dado em função da maior disponibilidade de fonte de carbono proporcionado pelas crescente COV aplicadas, similarmente ao obtido por Del Nery et al. (2018). Entretanto, ao aumentar a COV para $5,0 \text{ kgDQO m}^{-3} \text{ d}^{-1}$, na fase I, ocorreu uma redução na vazão de biogás e possivelmente desvio do fluxo de elétrons para síntese celular, sendo essa redução revertida com a manutenção da COV aplicada, apresentando uma média de $2617,2 \pm 120,3 \text{ NmL d}^{-1}$, nas condições normais de temperatura e pressão (CNPT), ao final da fase I. Tal comportamento também foi verificado para as demais variáveis resposta de produção de metano.

Figura 14: Perfil temporal de: (a) vazão de biogás (VBG, -●-) e proporção de glicerol afluente (—); (b) vazão molar de metano (VMM, -●-); (c) produção volumétrica de metano (PVM, -●-); (d) rendimento de metano (MY, -●-).

Fonte: Elaboração própria.

Com relação à produção volumétrica de metano, foi obtido uma produção média de $980,0 \pm 40,9 \text{ NmLCH}_4 \text{ L}^{-1} \text{ d}^{-1}$, na fase I. Similar ao observado por Albanes et al. (2016), os quais obtiveram um valor médio de $973 \text{ NmLCH}_4 \text{ L}^{-1} \text{ d}^{-1}$, ao aplicar COV de $5,54 \text{ kgDQO m}^{-3} \text{ d}^{-1}$, em reator AnSBBR tratando vinhaça.

Conforme abordado anteriormente, nas fases IIA e IIB foi verificado uma produção superior de $1106,9 \pm 70,2 \text{ NmLCH}_4 \text{ L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ e $1006,1 \pm 33,8 \text{ NmLCH}_4 \text{ L}^{-1} \text{ d}^{-1}$, respectivamente, corroborando com os resultados obtidos de maiores eficiências da codigestão anaeróbia. Similarmente, a vazão molar de metano apresentou um aumento entre as fases I e IIA, com média de $78,7 \pm 3,3 \text{ mmolCH}_4 \text{ d}^{-1}$ e $88,9 \pm 5,6 \text{ mmolCH}_4 \text{ d}^{-1}$, respectivamente. Desse modo, a codigestão de vinhaça e glicerol (IIA) incrementou em cerca de 12% a produção de metano, em termos de produção volumétrica, comparativamente à monodigestão de vinhaça (I) ao aplicar a mesma COV. Aumento da produção de metano também foi relatado por Larsen et al. (2013) na codigestão de glicerina e resíduo de fecularia (2% de glicerina); Lovato et al. (2016) na codigestão de glicerina e soro de queijo (25:75, %DQO); Marin-Batista et al. (2016) na codigestão de vinhaça e estrume de frango (3:1, SV); Syaichurrozi et al. (2016) na codigestão de vinhaça e efluente do processamento de tofu (20:80, %v:v); Lovato et al. (2019a) na codigestão de vinhaça e glicerina (50:50, %DQO).

A interrupção do reator por 150 dias reduziu em cerca de 9% a produção de metano em processo de codigestão, fases IIA e IIB, possivelmente associado ao desvio do fluxo de elétrons para síntese celular de microrganismos metanogênicos.

Hwang et al. (2010) avaliaram os efeitos da interrupção de reator anaeróbio por 115 dias, tratando água residuária de suinocultura. Os autores verificaram redução na produção de metano em 44% e redução na eficiência de remoção de matéria orgânica em 7%, após o período de interrupção, associado à redução da atividade metanogênica. Em análise microbiológica, os autores relataram a redução na concentração de microrganismos metanogênicos, sem alteração da diversidade.

Sequencialmente, as produções médias foram de $1075,1 \pm 95,0$; $1015,7 \pm 77,1$ e $1014,1 \pm 38,7 \text{ NmLCH}_4 \text{ L}^{-1} \text{ d}^{-1}$, em monodigestão de glicerol, codigestão de vinhaça e glicerol, e monodigestão de vinhaça, respectivamente. Os dados médios de PVM demonstram a manutenção da produção de metano ao utilizar glicerol como substrato alternativo à vinhaça de cana-de-açúcar.

A Figura 15 apresenta o gráfico *boxplot* da produção volumétrica de metano para cada fase experimental. Aplicando-se o teste T para as fases operacionais I e V, não se constatou diferença significativa ($\alpha = 0,05$), assim como verificado para a remoção de DQOt. De modo

geral, portanto, a troca de substratos não impactou negativamente a eficiência do sistema, ocorreu manutenção da eficiência quando do retorno à utilização de vinhaça.

A paralisação do reator, entre as fases IIA e IIB, não apresentou diferença significativa quanto à eficiência de remoção de matéria orgânica, entretanto tal comportamento não foi observado quanto à produção volumétrica de metano, afetando negativa e significativamente a produção de metano. Após a permuta de substratos, não foi observado diferença significativa entre as fases de codigestão isto é, entre IIA/IV e IIB/IV, uma vez que os dados referentes à fase IV demonstraram maior dispersão.

Figura 15: Gráfico *boxplot* da produção volumétrica de metano (PVM) em relação à cada fase experimental.

Fonte: Elaboração própria.

O rendimento de metano apresentou valor médio de $250,6 \pm 13,2$ NmLCH₄ g⁻¹DQOr, na fase I (Figura 14d), inferior ao valor teórico de 350 NmLCH₄ g⁻¹DQOr, indicando que o metano recuperado foi inferior ao potencial obtido pela carga removida, sendo que foi possível recuperar cerca de 72% em produção de metano. Além disso, foi verificada redução significativa no rendimento durante aplicação da carga máxima em estudo, possivelmente em função do desvio de energia para adaptação da biomassa microbiana à nova condição do meio (maior COV aplicada). Ao final do período de operação referente à fase I, contudo, notou-se incremento do rendimento de metano, indicando adaptação da biomassa e maior produção de metano por matéria orgânica removida.

Em seu estudo, Barros, Duda e Oliveira (2016) utilizaram vinhaça como substrato em reator UASB mesofílico, com 2,8 dias de TDH e obtiveram rendimento de metano máximo de

181 NmLCH₄ g⁻¹DQOr, ao incrementar progressivamente a COV de 0,2 até 7,5 kgDQO m⁻³ d⁻¹ durante 230 dias de operação. Aquino, Fuess e Pires (2017) obtiveram rendimento médio de metano superior de 290 ± 60 NmLCH₄ g⁻¹DQOr, em reator AnSTBR mesofílico, com TDH de 2,5 dias, para COV aplicada de 5,5 kgDQO m⁻³ d⁻¹, passando por 2,4 e 3,8 kgDQO m⁻³ d⁻¹ durante cerca de 150 dias. Del Nery et al. (2018) obtiveram rendimento elevado de 299 ± 60 NmLCH₄ g⁻¹DQOr em reator UASB mesofílico, escala piloto, aplicando COV de até 35 kgDQO m⁻³ d⁻¹.

Com aplicação de COV de até 33 kgDQO m⁻³ d⁻¹, Barbosa (2017) obteve um rendimento de metano médio de 350 NmLCH₄ g⁻¹DQOr, em reator UASB, escala piloto, sendo esse rendimento reduzido para 260 NmLCH₄ g⁻¹DQOr ao realizar a troca de substrato de vinhaça para melaço, e posteriormente, para vinhaça novamente. Os resultados apresentados pelos diversos autores citados e no presente trabalho corroboraram a necessidade de adaptação da população às cargas e substratos aplicados, que requerem desvio da rota metabólica de síntese sempre que solicitados além do potencial estabelecido.

Ao associar os substratos na fase IIA, foi obtido um rendimento médio de metano de 268,8 ± 12,5 NmLCH₄ g⁻¹DQOr, recuperando cerca de 77% do potencial de metano produzido. No entanto, foi verificado um rendimento de 394,3 NmLCH₄ g⁻¹DQOr, superior ao teórico, na proporção de 60V:40G no 143º dia de operação. Na referida data também foi verificado aumento na concentração de sólidos efluente, decorrente do desprendimento da biomassa aderida ao meio suporte, conforme descrito anteriormente. Nesse sentido, o desprendimento possivelmente ocasionou morte celular, fornecendo maior quantidade de matéria orgânica e ocorrendo aumento na produção de metano.

Lovato et al. (2019a) obtiveram um rendimento de aproximadamente 310,5 e 303,5 NmLCH₄ g⁻¹DQOr, para monodigestão de vinhaça e codigestão de vinhaça e glicerina (50:50, %DQO), respectivamente, em reatores em batelada alimentada. Albuquerque, Ratusznei e Rodrigues (2019) associaram vinhaça e soro de queijo (50:50, %volume) e obtiveram um rendimento de 10,2 mmolCH₄ g⁻¹DQOr ou 228,5 NmLCH₄ g⁻¹DQOr, em reatores em batelada termofílico.

Borges (2020) obteve um rendimento de metano de 210 ± 31 NmLCH₄ g⁻¹DQOr na codigestão anaeróbia de vinhaça e glicerol (50:50, %DQO), em reator AnSTBR, a uma COV de 3,5 kgDQO m⁻³ d⁻¹. Entretanto, o autor verificou uma redução no rendimento de metano para 40 ± 21 NmLCH₄ g⁻¹DQOr ao incrementar a COV para 5,0 kgDQO m⁻³ d⁻¹, essa redução foi creditada ao desvio da rota metabólica para anabolismo. Assim como verificado no presente

estudo, em que houve redução do rendimento de metano quando do aumento da COV (fase I), sendo esse comportamento revertido com a manutenção da COV.

O fornecimento de apenas glicerol como fonte de carbono, na fase III, reduziu o rendimento de metano para $232,2 \pm 17,2$ NmLCH₄ g⁻¹DQOr ou $216,6 \pm 17,2$ NmLCH₄ g⁻¹DQOadicionada. Yang, Tsukahara e Sawayama (2008) e Vlassis et al. (2013) estudaram o tratamento anaeróbio do glicerol puro e obtiveram um rendimento de metano superior de 270 NmLCH₄ g⁻¹DQOr, em reator APBR, e 300 NmLCH₄ g⁻¹DQOadicionada, em reator CSTR, respectivamente, em condições mesofílicas (35°C).

Com relação às fases operacionais posteriores à permuta de substratos, IV e V, os rendimentos médios de metano foram de $227,7 \pm 15,3$ NmLCH₄ g⁻¹DQOr e $235,2 \pm 9,9$ NmLCH₄ g⁻¹DQOr, respectivamente. Na fase IV, o reator apresentou o menor rendimento dentre as fases operacionais realizadas, sendo recuperado cerca de 65% do rendimento teórico de metano.

Embora as eficiências de remoção de matéria orgânica tenham sido superiores nas fases posteriores à troca de substratos, o rendimento de metano se apresentou inferior. Isso pode estar relacionado ao crescimento da biomassa ou, ainda, desvio de rota metabólica de metanogênese para sulfetogênese. A primeira hipótese foi refutada com os dados calculados de rendimento celular, apresentados no item 6.4, em que o coeficiente de rendimento celular foi inferior nestas fases operacionais. Ao passo que a segunda é corroborada pelo aumento da redução de sulfato à sulfeto.

Na fase IV, a sulfetogênese contribuiu em cerca de 3,5% na remoção de DQOs, valor este superior às fases anteriores de codigestão, isto é, de 2,9% e 3,3%. O incremento da via sulfetogênica foi de 22% entre as fases IIA e IV, implicando redução proporcional no rendimento de metano, cujo valor teórico é de 220,2 NmLCH₄ g⁻¹DQOr, similar ao obtido experimentalmente de $227,7 \pm 15,3$ NmLCH₄ g⁻¹DQOr. Igualmente ao verificado para as fases I e V, em que a contribuição da via sulfetogênica aumentou em 7% nessa última, equivalente ao rendimento de metano teórico de 233,4 NmLCH₄ g⁻¹DQOr, similar ao valor experimental de $235,2 \pm 9,9$ NmLCH₄ g⁻¹DQOr.

O gráfico *boxplot* referente ao rendimento de metano para cada fase experimental é apresentado na Figura 16. Segundo o teste estatístico T, paramétrico, os rendimentos obtidos nas fases I e V não apresentaram diferença significativa ($\alpha = 0,05$), conforme obtido para as eficiências de remoção de matéria orgânica e produção volumétrica de metano. Entretanto, para o processo de codigestão anaeróbia (fases IIA, IIB e IV) foi observado diferença estatística entre as três fases. Ou seja, o menor rendimento obtido na fase IIB, comparativamente à fase

IIA, obtido após paralisação do reator foi significativo estatisticamente. Assim como o rendimento inferior obtido na fase IV, após a substituição de substratos, possivelmente decorrente da alteração de fração do fluxo de elétrons da metanogênese para a sulfetogênese, conforme mencionado.

Figura 16: Gráfico *boxplot* do rendimento de metano (MY) em relação à cada fase experimental.

Fonte: Elaboração própria.

Apesar das reduções observadas, ao longo do período de operação, o reator desempenhou satisfatoriamente sua função, convertendo o material orgânico em metano. Visando sustentar a recuperação satisfatória de metano, a Tabela 17 apresenta estudos de mono e codigestão empregando vinhaça e glicerol, com COV de até $7,5 \text{ kgDQO m}^{-3} \text{ d}^{-1}$, em condição mesofílica.

Finalmente, resumizando as variáveis resposta médias referentes à cada fase experimental quanto à estabilidade do processo, remoção de matéria orgânica e produção de biogás e metano, a Tabela 18 foi composta. A utilização de glicerol como substrato alternativo à vinhaça, em período referente à entressafra, permitiu eficientemente manter a geração de metano em reator anaeróbio. Inclusive, incrementou a remoção de matéria orgânica pós permuta de substratos.

Tabela 17: Comparação entre reatores anaeróbios contínuos tratando vinhaça e glicerol quanto à produção de metano (continua).

Referência	Substratos	Características	%CH ₄	MY (NmLCH ₄ g ⁻¹ DQOr)
Este trabalho	Vinhaça (Fase I)	Reator AnSTBR	67,5 ± 0,3	250,6 ± 13,2
	Vinhaça e glicerol (Fase IIA)	DQO = 5,0 g L ⁻¹	64,9 ± 0,8	268,8 ± 12,5
	Vinhaça e glicerol (Fase IIB)	COV = 5,0 kgDQO m ⁻³ d ⁻¹	64,6 ± 0,5	246,5 ± 8,0
	Glicerol (Fase III)	T = 30°C	64,7 ± 0,4	232,2 ± 17,2
	Vinhaça e glicerol (Fase IV)	NaHCO ₃ /DQO = 0,15 g g ⁻¹	65,9 ± 0,3	227,7 ± 15,3
	Vinhaça (Fase V)		69,6 ± 0,6	235,2 ± 9,9
Albanez et al. (2016)	Vinhaça	Reator AnSBBR DQO = 5,0 g L ⁻¹ COV = 5,54 kgDQO m ⁻³ d ⁻¹ T = 30 ± 1°C NaHCO ₃ /DQO = 0,5-1,0 g g ⁻¹	77	212
Sousa et al. (2019)	Vinhaça e soro de queijo	Reator AnSBBR DQO = 5,0 g L ⁻¹ COV = 5,0 kgDQO m ⁻³ d ⁻¹ T = 30°C NaHCO ₃ /DQO = 0,2-1,0 g g ⁻¹	77,9 ± 0,2	236,5
Lovato et al. (2019b)	Vinhaça e soro de queijo	Reator AnSBBR DQO = 5,0 g L ⁻¹ COV = 6,4 T = 30°C NaHCO ₃ /DQO = 0,7 g g ⁻¹	77,1	259,8

Tabela 17: Comparativo entre reatores anaeróbios contínuos tratando vinhaça e glicerol quanto à produção de metano (conclusão).

Referência	Substratos	Características	%CH ₄	MY (mLCH4 g ⁻¹ DQOr)
Lovato et al. (2016)	Glicerol	Reator AnSBBR	79,1	-
	Glicerol e soro de queijo	DQO = 5,0 g L ⁻¹	76,4	-
		COV = 7,5 kgDQO m ⁻³ d ⁻¹		
		T = 30°C		
		NaHCO ₃ /DQO = 0,7 g g ⁻¹		
Lovato et al. (2019a)	Vinhaça	Reator AnSBBR	83,2 ± 0,5	310,5
	Glicerol	DQO = 5,0 g L ⁻¹	79,4 ± 0,3	312,5
	Vinhaça e glicerol	COV = 5,0 kgDQO m ⁻³ d ⁻¹	83 ± 1	303,5
		T = 30°C		
		NaHCO ₃ /DQO = 0,5 g g ⁻¹		
Borges (2020)	Vinhaça e glicerol	Reator AnSTBR	61,9 ± 1,5	40 ± 21
		DQO = 5,0 g L ⁻¹		
		COV = 5,0 kgDQO m ⁻³ d ⁻¹		
		T = 30°C		
		NaHCO ₃ /DQO = 0,2-0,5 g g ⁻¹		

Legenda: %CH₄: conteúdo de metano no biogás; MY: rendimento de metano; DQO: demanda química de oxigênio; COV: carga orgânica volumétrica; T: temperatura; NaHCO₃: bicarbonato de sódio; AnSBBR: reator anaeróbio operado em bateladas sequenciais; AnSTBR: reator anaeróbio de leito fixo; UASB: reator anaeróbio de fluxo ascendente e manta de lodo.

Tabela 18: Dados gerais dos parâmetros de monitoramento do reator.

Parâmetro	Unidade	Fase I (100:0)	Fase IIA (50:50)	Fase IIB (50:50)	Fase III (0:100)	Fase IV (50:50)	Fase V (100:0)
ER _{DQOt}	%	81,1 ± 1,5	84,7 ± 1,1	83,7 ± 0,9	93,1 ± 0,6	91,0 ± 0,9	82,3 ± 0,6
ER _{DQOs}	%	83,4 ± 1,2	87,0 ± 1,4	86,8 ± 1,4	94,3 ± 0,7	92,5 ± 0,7	84,9 ± 0,7
ER _{CH}	%	93,3 ± 0,3	90,8 ± 1,3	92,1 ± 0,7	-	91,9 ± 0,9	92,5 ± 0,6
ER _{GL}	%	98,9 ± 0,3	99,8 ± 0,0	99,8 ± 0,0	99,8 ± 0,2	99,8 ± 0,1	98,3 ± 0,4
ER _{SO4}	%	96,7 ± 1,2	96,9 ± 1,5	96,7 ± 0,7	-	97,7 ± 0,6	98,0 ± 0,7
pH efluente	-	7,8 ± 0,1	7,7 ± 0,1	7,5 ± 0,1	6,9 ± 0,1	7,5 ± 0,0	7,8 ± 0,1
AP	mgCaCO ₃ L ⁻¹	1472,9 ± 71,1	911,4 ± 33,1	880,9 ± 25,4	252,7 ± 14,7	834,7 ± 62,9	1613,8 ± 98,5
AI	mgCaCO ₃ L ⁻¹	139,4 ± 30,6	141,7 ± 27,1	152,7 ± 24,4	84,6 ± 11,2	69,3 ± 7,9	72,6 ± 11,1
AI/AP	-	0,09 ± 0,02	0,16 ± 0,04	0,20 ± 0,03	0,34 ± 0,06	0,08 ± 0,01	0,05 ± 0,01
AVT	mgHAc L ⁻¹	278,9 ± 61,3	283,4 ± 54,3	305,5 ± 48,8	169,1 ± 22,3	138,6 ± 15,8	145,1 ± 22,2
VBG	mL d ⁻¹	2617,2 ± 120,3	3071,9 ± 188,6	2804,4 ± 86,7	2825,6 ± 260,0	2619,4 ± 203,5	2475,9 ± 100,3
Conteúdo de metano no biogás	%CH ₄	67,5 ± 0,3	64,9 ± 0,8	64,6 ± 0,5	64,7 ± 0,4	65,9 ± 0,3	69,6 ± 0,6
VMM	mmolCH ₄ d ⁻¹	78,7 ± 3,3	88,9 ± 5,6	80,8 ± 2,7	81,5 ± 7,2	77,0 ± 5,8	76,9 ± 2,9
PVM	mLCH ₄ L ⁻¹ d ⁻¹	980,0 ± 40,9	1106,9 ± 70,2	1006,1 ± 33,8	1075,1 ± 95,0	1015,7 ± 77,1	1014,1 ± 38,7
MY	mLCH ₄ g ⁻¹ DQOr	250,6 ± 13,2	268,8 ± 12,5	246,5 ± 8,0	232,2 ± 17,2	227,7 ± 15,3	235,2 ± 9,9

Legenda: ER_{DQOt}: eficiência de remoção de DQO total; ER_{DQOs}: eficiência de remoção de DQO solúvel; ER_{CH}: eficiência de remoção de carboidratos; ER_{GL}: eficiência de remoção de glicerol; ER_{SO4}: eficiência de remoção de sulfato; AP: alcalinidade parcial ou a bicarbonato; AI: alcalinidade intermediária; AVT: ácidos voláteis totais; VBG: vazão de biogás; VMM: vazão molar de metano; PVM: produção volumétrica de metano; MY: rendimento de metano.

5.3. Avaliação dos metabólitos solúveis

Analisando-se a Figura 17, verifica-se a quantificação de metabólitos apenas a partir do 40º dia de operação, em que as concentrações aumentaram devido ao aumento da COV a valores superiores ao limite inferior de detecção segundo metodologia utilizada (ADORNO; HIRASAWA E VARESCHE, 2014). Ao atingir a COV de $5,0 \text{ kgDQO m}^{-3} \text{ d}^{-1}$, no 73º dia, observou-se um incremento nas concentrações de ácido acético (HAc) para aproximadamente 25 mg L^{-1} , e ácido propiônico (HPr) para 21 mg L^{-1} . Essa última reduziu-se com a manutenção da COV e incrementou as concentrações de ácido butírico (HBu).

Embora não quantificados, tendo em vista a metodologia empregada, os ácidos succínico e láctico estão comumente presentes na vinhaça, provenientes de contaminações do mosto por bactérias (FUESS, 2017). A presença destes e outros ácidos, a exemplo dos ácidos fórmico, cítrico e levulínico, não quantificados, podem estar relacionados às maiores concentrações de ácidos totais obtidos por titulação.

Na fase IIA, a adição gradual de glicerol no meio manteve as concentrações de ácidos inferiores a 20 mg L^{-1} . Entretanto, ao atingir a proporção desejada de codigestão de 50:50, as concentrações de metabólitos aumentaram, atingindo valor máximo de 277 mg L^{-1} (Figura 17a). Ademais, nessa condição, o reator apresentou um incremento da relação HPr/HAc de 0,4 para 2,1 (Figura 17b), evidenciando aumento da pressão parcial de hidrogênio, porém com redução da relação com a manutenção da condição afluenta, 50:50.

Comportamento similar à fase I foi observado em IIB, de incremento gradual da concentração de ácidos totais, ao incrementar gradualmente a COV. Ao atingir a COV de $5,0 \text{ kgDQO m}^{-3} \text{ d}^{-1}$, no 356º dia, observou-se um incremento nas concentrações de HAc para aproximadamente 92 mg L^{-1} , e HPr para 104 mg L^{-1} . Seguido de um pico de 126 mgHAc L^{-1} e 103 mgHPr L^{-1} , no 367º dia de operação. Coincidindo com os menores rendimentos de metano desta condição experimental ($213,8$ e $234,8 \text{ NmLCH}_4 \text{ g}^{-1}\text{DQOr}$), indicando menor fluxo de elétrons para metanogênese.

Na codigestão 30:70, observou-se pico de 274 mg L^{-1} de HPr no 381º dia de operação, e as relações HPr/HAc e AI/AP apresentaram pico de 6,6 e 0,54, respectivamente. Associado ao incremento na concentração de ácidos e na pressão parcial de hidrogênio, as eficiências de remoção de matéria orgânica foram reduzidas nessa condição, conforme apresentado na Tabela 15. O aumento na pressão parcial de hidrogênio foi creditado à ineficiência da população de arqueas metanogênicas hidrogenotróficas e bactérias homoacetogênicas, associado à rápida conversão de glicerol a ácidos orgânicos.

Figura 17: Metabólitos solúveis: (a) perfil temporal de concentração de metabólitos e proporção de glicerol afluyente (—); (b) proporção de metabólitos e relação de ácidos propiônico e acético (HPr/HAc, ●). Legenda: ácido acético (■), ácido propiônico (▨), ácido butírico (■) e metanol (▤).

Fonte: Elaboração própria.

Em períodos de incremento da proporção de glicerol afluyente houve aumento da concentração de ácidos efluente, porém, esta última apresentou comportamento decrescente com a manutenção da alimentação do sistema. Em monodigestão de glicerol, a partir do 402º dia observou-se redução nas concentrações de ácidos efluente. Em termos de relação HPr/HAc, a fase III apresentou média de $1,1 \pm 0,3$ no estado estacionário dinâmico. Segundo Hill, Cobb e Bolte (1987), valores inferiores a 1,4 para a razão HPr/HAc prevêm estabilidade operacional em sistemas anaeróbios. Apesar da rápida conversão de glicerol a ácidos, a razão HPr/HAc

demonstra a estabilidade do sistema, com a manutenção da alimentação afluenta. Inclusive, o rendimento de metano (Figura 14d) apresentou comportamento crescente, a partir do 402º dia, indicando predominância de fluxo de elétrons para metanogênese.

Na fase IV, a partir do 420º dia, em codigestão 20:80, observou-se a presença de solvente metanol na corrente efluente na faixa de 20-25 mg L⁻¹ (Figura 17a). O metanol é comumente gerado na fermentação de pectina (SCHINK & ZEIKUS, 1980). Por sua vez, a vinhaça pode conter pectina residual em sua composição, resultante do processamento do bagaço na produção de etanol (REIS et al., 2015).

Em monodigestão de vinhaça (fase V), as concentrações de metanol efluente também se mantiveram na faixa de 20-25 mg L⁻¹, no entanto, o solvente representou cerca de 70% dos metabólitos solúveis detectados, superior ao observado na fase anterior de cerca de 50%.

Reis et al. (2015) investigaram a codigestão de glicose e vinhaça em diferentes proporções e relataram a predominância do metabólito metanol ao incrementar o conteúdo de vinhaça na codigestão de 75:25 (glicose:vinhaça) para 25:75. Os autores também observaram no reator a presença de algumas espécies de *Clostridium butyricum*, microrganismos capazes de produzir metanol.

O metanol produzido pode ser utilizado por diversos microrganismos, dentre eles as arqueas metanogênicas, bactérias redutoras de sulfato e homoacetogênicas (WEIJMA & STAMS, 2001).

De maneira geral, verificou-se incremento nas frações de HPr e HBU em períodos de alteração da condição experimental, seja aumento de COV ou incremento da proporção de glicerol afluenta. E, posteriormente, redução com a manutenção da alimentação do sistema.

Barbosa (2017) avaliou a codigestão de vinhaça e melaço em reator UASB, com aplicação de COV de até 33 kgDQO m⁻³ d⁻¹ e constatou o crescente acúmulo de ácidos orgânicos com o incremento de melaço em relação à monodigestão de vinhaça, resultando no aumento da dosagem de álcali de 0,3 para 0,7 como estratégia operacional, a fim de promover a neutralização dos ácidos. Segundo a autora, o aumento na proporção de melaço comparativamente à quantidade de carboidratos acelerou o processo de acidificação do sistema.

Borges (2020) avaliou a codigestão de vinhaça e glicerol em reator AnSTBR, com aplicação de COV de até 5,0 kgDQO m⁻³ d⁻¹. Na condição de COV de 3,5 kgDQO m⁻³ d⁻¹, o autor relatou aumento na concentração de ácido propiônico, atingindo valores de 242 ± 72 mg L⁻¹. Para COV 5,0 kgDQO m⁻³ d⁻¹, o autor constatou desequilíbrio nas taxas de produção e consumo dos ácidos orgânicos intermediários.

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 COV de $0,25 \text{ kgDQO m}^{-3} \text{ d}^{-1}$ a 35°C . Nesta condição, obteve-se rendimento de metano de $300 \text{ NmLCH}_4 \text{ g}^{-1}\text{DQOad}$ e remoção de 94% de matéria orgânica. Contudo, em cargas maiores que $0,25 \text{ kgDQO m}^{-3} \text{ d}^{-1}$, observou-se queda na produção de metano em função do acúmulo de ácidos orgânicos voláteis ($> 3,0 \text{ g L}^{-1}$) no sistema, sendo observado predominantemente ácido propiônico.

Apesar da composição dos substratos em estudo apresentar elevada taxa de acidificação, conforme relatado por Barbosa (2017), Borges (2020) e Vlassis et al., (2013), o reator não apresentou acúmulo de ácidos orgânicos, indicando equilíbrio da participação dos microrganismos acidogênicos e metanogênicos.

5.4. Avaliação do crescimento da biomassa: análise da carga orgânica volumétrica específica (COVe)

O perfil temporal da concentração de sólidos suspensos voláteis na corrente efluente indicou maior lavagem da biomassa no reator na fase IIA, conforme mencionado no item 5.1.2., e conforme ilustra a Figura 18. Especialmente nos dias 122 e 143 de operação, em que houve incremento na proporção do cossubstrato glicerol para 20% e 40%, e no dia 344, em que houve incremento na COV aplicada de 2,0 para $3,5 \text{ kgDQO m}^{-3} \text{ d}^{-1}$, assim como apresentado na Figura 9, cuja eficiência de remoção de matéria orgânica, em termos de DQOt , foi reduzida pontual e consideravelmente.

Com a eliminação de biomassa, possivelmente, maior quantidade de energia foi destinada à produção de novas células para manutenção da eficiência do sistema na conversão dos diversos compostos orgânicos presentes. A síntese celular consiste em uma resposta do consórcio microbiano frente à perda contínua da atividade biológica por meio do processo de lavagem (AQUINO, FUESS E PIRES, 2017). A Figura 19 apresenta o aspecto físico da zona reacional do reator, após inoculação; e do *headspace* do reator, em que pode ser observado a biomassa lavada no 122º dia de operação.

Aquino, Fuess e Pires (2017) avaliaram a capacidade de retenção de biomassa em monodigestão anaeróbia da vinhaça de cana-de-açúcar em reatores de leito fixo estruturado (AnSTBR) e empacotado (APBR), aplicando COV de 2,4 a $18,0 \text{ kgDQO m}^{-3} \text{ d}^{-1}$. 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 ($605,4 \text{ gSSV}$, AnSTBR; $254,7 \text{ gSSV}$, 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).

Figura 18: Perfil temporal da concentração de sólidos suspensos voláteis efluente (-o-); proporção do substrato glicerol (—).

Fonte: Elaboração própria.

Figura 19: Aspecto físico do reator: (a) após inoculação e (b) no 122º dia de operação.

Fonte: Elaboração própria.

Com o intuito de compreender a dinâmica de crescimento da biomassa presente no reator, buscou-se estimar o coeficiente de rendimento celular da biomassa ($Y_{x/s}$) para cada fase operacional, assim como os perfis temporais de retenção celular (X_n) e a carga orgânica volumétrica específica (COVe), conforme descrito no item 5.5.2. Os detalhes da produção e retenção da biomassa são descritos na Tabela 19.

Vale ressaltar que os coeficientes de rendimento celular são estimativas baseadas na quantificação da biomassa no reator em cada fase operacional, considerando o período de transição de proporção de cossubstratos e o período estacionário dinâmico.

O coeficiente de rendimento celular da biomassa obtido para o reator operado com vinhaça foi de 0,056 e 0,057 gSSV g⁻¹DQO, nas fases I e V, cerca de 1,7 vezes inferior ao obtido por Aquino, Fuess e Pires (2017). Apesar das similaridades nos sistemas, de configuração do reator, material suporte, temperatura, procedimento de inoculação e substrato (vinhaça), a aplicação de COV superior (até 18 kgDQO m⁻³ d⁻¹) pelos autores possivelmente resultou no rendimento celular superior.

Tabela 19: Produção e retenção de biomassa ao longo do período operacional.

Parâmetros	Fases experimentais					
	I	IIA	IIB	III	IV	V
Biomassa inicial ^a (X_o , g)	10,77	14,49	13,26	14,37	17,52	19,28
Biomassa aderida no meio suporte (X_a , g)	3,73	1,22	1,11	3,15	1,76	1,72
Biomassa suspensa no reator (X_s , g)	8,25	9,52	3,40	5,42	8,15	8,04
Biomassa lavada do reator (X_e , g)	14,74	22,20	4,85	4,24	9,70	8,98
Biomassa nos descartes de fundo (X_d , g)	0	0	0	0	0	0
Biomassa total produzida no reator (X_t , g)	26,71	32,94	9,36	12,80	19,61	18,74
Consumo de DQO (S , g)	479,41	491,64	190,78	288,51	427,62	326,49
Tempo de operação (d)	112	68	42	42	60	45
Coeficiente de rendimento celular ($Y_{x/s}$, gSSV g ⁻¹ DQO)	0,056	0,067	0,049	0,044	0,046	0,057

^a Quantidade de biomassa aderida no meio suporte.

Na codigestão anaeróbia, os rendimentos celulares apresentaram comportamento decrescente ao longo do período operacional. Ressalta-se a lavagem da biomassa observada na fase IIA, exigindo que maior quantidade de energia fosse direcionada à síntese celular, apresentando o maior rendimento celular dentre os processos de codigestão. Observou-se uma redução do rendimento celular em IIB ($0,049 \text{ gSSV g}^{-1}\text{DQO}$), creditado ao período de repartida do reator, em que o incremento da COV foi gradual, requerendo menor desvio de fluxo de elétrons, comparativamente à fase anterior.

Na fase IV, em que a biomassa demonstrou adaptação e estabilidade frente às condições aplicadas, observou-se menor rendimento celular de $0,046 \text{ gSSV g}^{-1}\text{DQO}$, ou seja, a biomassa foi menos solicitada, em termos de síntese celular, nessa fase. Assim, o consórcio microbiano ativo no reator ao final da monodigestão de glicerol, possivelmente, foi capaz de metabolizar o novo cossustrato (vinhaça), a exemplo das BRS.

Tais valores, em codigestão, foram superiores ao observado por Borges (2020), de $0,036 \text{ gSSV g}^{-1}\text{DQO}$ considerando as similaridades nos sistemas, tais como configuração do reator, material suporte, temperatura, procedimento para inoculação, COV e cossustratos (50% vinhaça e 50% glicerol).

Observando os dados obtidos de produção de biomassa aderida (Tabela 19), o processo de monodigestão de glicerol apresentou o maior valor, comparativamente aos outros processos de monodigestão de vinhaça e codigestão de vinhaça e glicerol. Ao passo que a produção de biomassa suspensa foi relativamente inferior aos demais processos, considerando o tempo de operação para a COV de $5,0 \text{ kgDQO m}^{-3} \text{ d}^{-1}$. Provavelmente, proveniente da alteração na fonte de carbono, uma vez que a vinhaça, substrato anteriormente fornecido, apresenta uma matriz mais complexa do que o glicerol.

Na Figura 20a verifica-se a quantidade de biomassa retida no reator ao longo da operação. Ao final de cada fase operacional, optou-se por drenar a biomassa suspensa do reator devido ao acúmulo observado da mesma na porção inferior do reator, reduzindo, portanto, a concentração de biomassa retida. Ao final do período operacional foi totalizado um crescimento da biomassa retida de aproximadamente três vezes a quantidade inicial inoculada.

A drenagem da biomassa suspensa pareceu exercer fator importante no desempenho do reator, uma vez que não foi observado perdas consideráveis na eficiência do sistema, nas mudanças de fase, e que concentrações elevadas poderiam interferir negativamente na transferência de massa.

Conforme pode ser observado na Figura 20a, ao atingir a maior COV aplicada de $5,0 \text{ kgDQO m}^{-3} \text{ d}^{-1}$, na fase I, o sistema demonstrou ter direcionado grande parte da energia

metabólica ao crescimento de biomassa. Verificado pelo incremento mais acelerado da biomassa retida, em curto período de tempo, com manutenção do desempenho de remoção de matéria orgânica.

Os perfis temporais de carga orgânica volumétrica específica e aplicada estão apresentados na Figura 20b. O aumento nos valores de COV observados na partida e repartida do reator (fases I e IIB) resultaram em comportamento similar nos valores de COVe, ocorrendo decréscimo gradual desta última com a manutenção da COV e crescimento da biomassa retida no reator.

Figura 20: Perfil temporal da: (a) biomassa retida (-○-) e proporção de glicerol afluyente (—); (b) carga orgânica volumétrica específica (COVe, -●-) e aplicada (COV, ■).

Fonte: Elaboração própria.

Os maiores valores de COVe foram observados no aumento da COV para 5,0 kgDQO m⁻³ d⁻¹ e início de cada fase experimental, cuja biomassa suspensa foi drenada do reator. Sendo o maior valor de aproximadamente 0,6 gDQO g⁻¹SSV d⁻¹, é possível a ocorrência de desvio para rota do anabolismo, visando manter a eficiência do sistema com a troca de substratos. A redução da COVe ao final de cada fase experimental corrobora a hipótese de mudança metabólica para o anabolismo, ou síntese celular.

Com a síntese celular, os valores de COVe ao final de cada fase experimental variaram de 0,3-0,4 gDQO g⁻¹SSV d⁻¹. Valores estes condizentes com os observados por Aquino, Fuess e Pires (2017) em reator AnSTBR para COV de 5,5 kgDQO m⁻³ d⁻¹. À exceção da fase IIB, em que a COVe foi de 0,5 gDQO g⁻¹SSV d⁻¹, em que possivelmente o curto período de operação na COV de 5,0 kgDQO m⁻³ d⁻¹ não promoveu crescimento da comunidade microbiana a níveis consideráveis para maior decréscimo na COVe.

Em codigestão anaeróbia de vinhaça e glicerol, Borges (2020) obteve valores de COVe próximas a 1,0 gDQO g⁻¹SSV d⁻¹ em reator AnSTBR para COV de 5,0 kgDQO m⁻³ d⁻¹. Nessa condição, o autor observou mudança de rota metabólica para anabolismo em detrimento da produção de metano, o qual foi inferior a 50 NmLCH₄ g⁻¹DQOr.

Salienta-se que a literatura científica ainda é escassa na aplicação da COVe em sistemas metanogênicos, principalmente em reatores de leito fixo. Alguns poucos estudos são direcionados ao tratamento anaeróbio de esgoto doméstico (CHERNICHARO, 2007), vinhaça de cana-de-açúcar (AQUINO, FUESS, PIRES, 2017; BARROS, DUDA, OLIVEIRA, 2016) e vinhaça e glicerol em codigestão (BORGES, 2020).

Investigando a relação entre a COVe e o rendimento de metano, o comportamento decrescente do rendimento de metano observado no início das fases experimentais deve-se à substituição gradual de substratos. Entretanto, de maneira geral, ao final de cada fase experimental, uma vez estabelecida as condições ambientais de estudo, o rendimento de metano apresentou comportamento crescente, provavelmente associado à adaptação e crescimento da biomassa, verificado pela redução na COVe, conforme Figura 21. Este último comportamento pode ser verificado a partir dos dias 87, 367, 409, 458 e 500 de operação nas fases I, IIB, III, IV e V.

Vale ressaltar que a quantificação da biomassa aderida foi obtida por extrapolação de uma fração do meio suporte, retirado ao final de cada fase. A Figura 22 demonstra o aspecto físico da biomassa aderida nas fases operadas nos processos de monodigestão de vinhaça e glicerol. Observa-se o incremento da quantidade de biomassa aderida e alteração na coloração possivelmente resultante da substituição de substratos ao longo do período operacional. Além

disso, em especial na fase III, ocorreu alteração na coloração da biomassa aderida ao longo do meio suporte, em que os microrganismos de coloração mais clara (amarelada) foram observados na região mais próxima à base do reator, ao passo que os mais escuros se encontraram próximos ao *headspace*. A coloração amarelada pode ser proveniente da predominância de bactérias acidogênicas, a exemplo dos gêneros *Clostridium*, *Staphylococcus* e *Streptococcus* (MADIGAN et al., 2015; TOMMASO et al., 2002). Embora tenha sido verificado as alterações supracitadas, apenas análises microbiológicas e moleculares poderão afirmar as alterações de diversidade da biomassa.

Figura 21: Relação entre COVe (-●-) no rendimento de metano (MY, ■).

Fonte: Elaboração própria.

Barbosa (2017) realizou análises microbiológicas de reação em cadeia de polimerase (PCR) e eletroforese em gel com gradiente desnaturante (DGGE) do manto de lodo de um reator UASB operado com os substratos vinhaça, melaço e novamente vinhaça. A autora verificou coeficiente de similaridade elevado (cerca de 95%) para o domínio *Archaea*, entre a substituição de substratos, porém com redução na diversidade dessas populações. Com relação ao domínio *Bacteria*, a similaridade da comunidade bacteriana foi inferior, de 59% na troca de fonte de carbono de vinhaça para melaço, indicando alterações dessas populações para metabolizar o novo substrato imposto, melaço. Enquanto o retorno para vinhaça demonstrou alteração em 34% da comunidade bacteriana. Ainda, de acordo com o índice de Shannon, a autora observou aumento de diversidade bacteriana na substituição para melaço, e menor para o retorno para

vinhaça. A maior alteração na comunidade microbiana do domínio *Bacteria* foi creditada ao fato da população bacteriana atuar no início da digestão anaeróbia, precisamente nas etapas de hidrólise, acidogênese e acetogênese, em que há conversão de compostos orgânicos mais complexos em substrato apropriado para as arqueas metanogênicas.

Figura 22: Aspecto físico da biomassa aderida ao meio suporte nas fases: (a) I; (b) III e (c) V.

Fonte: Elaboração própria.

5.5. Balanços de massa: fração solúvel e global

Com o objetivo de verificar a confiabilidade dos métodos analíticos empregados foi realizado o balanço de massa da fração solúvel (BMFS) e global (BMG) do sistema, conforme apresentado na Figura 23. O BMFS se estende aos metabólitos produzidos, carboidratos e glicerol, ao passo que o BMG se refere à produção de metano e sólidos suspensos voláteis na corrente efluente.

Com base na Figura 23, observa-se uma tendência crescente das frações de DQO calculadas para o BMFS com o incremento da proporção de glicerol na corrente afluenta, isso se deve à composição dos cossubstratos, uma vez que a vinhaça apresenta matriz orgânica mais complexa, comparada ao glicerol. No glicerol, as moléculas são rapidamente hidrolisadas, alterando a dinâmica entre produção e consumo de ácidos orgânicos (HE; MCNUTT; YANG, 2017; KAUR et al., 2020).

Atribui-se a fração indeterminada analiticamente a não quantificação de outros compostos orgânicos presentes nos substratos. Dentre os compostos presentes na vinhaça destaca-se alguns compostos fenólicos e as melanoidinas, responsáveis por conferir cor ao substrato, além dos carboidratos e glicerol.

As melanoidinas são macromoléculas formadas por meio da reação de Maillard, ou reação do tipo carbonila-amina, entre aminoácidos e açúcares sob condições de elevada temperatura (RYAN et al., 2008). Essas moléculas comportam-se como matéria orgânica natural, ou seja, substâncias húmicas, em solução aquosa, e apresentam características recalcitrantes, explicando a coloração da corrente efluente e, parcialmente, a elevada fração indeterminada no BMFS.

Vale ressaltar que o BMFS foi calculado considerando os metabólitos quantificados por cromatografia gasosa, segundo metodologia descrita por Adorno, Hirasawa e Varesche (2014), podendo essa, portanto, ter sido subestimada. Realizando o BMFS a partir das concentrações obtidas de ácidos voláteis totais por titulometria (Kapp, 1984), a fração solúvel correspondente aos metabólitos aumenta consideravelmente com valores de 12-34%. Conforme relatado anteriormente, as diferenças obtidas entre as duas metodologias devem-se à quantificação de diferentes compostos, dentre eles: ácido fórmico, succínico, láctico, cítrico, levulínico, entre outros, não quantificados por cromatografia gasosa.

Nas proporções de codigestão anaeróbia de 30V:70G e 20V:80G, entre os dias 382 a 392 de operação, referentes à fase III, foi constatado a formação de um precipitado orgânico na corrente efluente ao reduzir o pH para valores inferiores a 4,0; via adição de ácido sulfúrico

(H₂SO₄) ou clorídrico (HCl). As amostras efluentes pré e pós precipitação são apresentadas na Figura 24.

Após a constatação da formação do precipitado foram realizados quatro testes para identificação e caracterização desse composto. Primeiramente, foi quantificado a remoção de matéria orgânica, em termos de DQO, proveniente da precipitação, cujo valor foi de aproximadamente 13%. Sequencialmente, a amostra pós formação do precipitado foi filtrada e encaminhada à estufa (110°C, 24h) e à mufla (550°C, 1h) para caracterização de sólidos suspensos. Os resultados obtidos demonstraram que o composto formado se trata de um composto orgânico, dado que os sólidos foram voláteis em sua totalidade.

Figura 23: Balanços de massa: (a) fração solúvel e (b) global

Fonte: Elaboração própria.

O terceiro teste realizado foi a realização de uma varredura em espectrofotômetro nos comprimentos de onda UV/VIS de 200 a 600nm, em amostra pré e pós precipitação. Infelizmente, os dados obtidos não foram conclusivos quanto ao composto precipitado, visto que as amostras apresentaram muitos interferentes provenientes da presença de diversos compostos.

Figura 24: Amostras efluentes (a) pré precipitação e pós precipitação e filtração; (b) e (c) formação do precipitado orgânico

Fonte: Elaboração própria.

Por fim, foram quantificadas as concentrações de fenóis totais, novamente pré e pós precipitação, verificando sua remoção, segundo metodologia descrita por Buchanan e Nicell (1997). A análise demonstrou a ocorrência de remoção de 35% de fenóis totais, levantando a hipótese de que o precipitado se trata de um composto fenólico. Além disso, conforme pode ser observado na Figura 24, ocorreu redução considerável de cor, dando indícios da possibilidade de alguns compostos responsáveis pelo fornecimento de cor, tais como as melanoidinas, ácido tânico, ácido húmico, entre outros compostos presentes na vinhaça (ESPAÑA-GAMBOA et al., 2011; MORAES, ZAIAT, BONOMI, 2015).

Zhao et al. (2008) identificaram alguns ácidos fenólicos presentes no caldo cana-de-açúcar, o qual é utilizado na cadeia produtiva da indústria sucroalcooleira, estando presente, portanto, na vinhaça. Dentre os ácidos fenólicos mais abundantes obtidos, encontram-se os ácidos cafeico, gálico e ferúlico. Freitas et al. (2018) por sua vez, obtiveram os ácidos vanílico e cafeico como os principais ácidos fenólicos presentes diretamente na vinhaça de cana-de-açúcar.

Sun, Tomkinson e Bolton (1999) relataram a precipitação de diversos compostos fenólicos em valores de pH inferiores a 4,8. A exemplo dos ácidos vanílico, sirínico e ferúlico.

Dentre os compostos supracitados, os ácidos vanílico e ferúlico enquadram-se nas características obtidas nos testes realizados.

Os ácidos vanílico e ferúlico são compostos fenólicos derivados da lignina, flavorizante e antioxidante, respectivamente, recalcitrante e tóxico à comunidade microbiana. McCoy e Schlicht (1974) relataram a adsorção de compostos fenólicos em espuma de poliuretano, material suporte utilizado no presente estudo. A hipótese formulada, portanto, é a precipitação de compostos fenólicos, dentre eles ácido vanílico e ferúlico, e possivelmente outros compostos fornecedores de cor, anteriormente adsorvidos no meio suporte e na biomassa, a qual foi lavada do reator em função da substituição de substratos, conforme relatado nos itens 5.1.2 e 5.4. A presença dos referidos compostos podem ter contribuído para a fração solúvel indeterminada.

Com relação ao BMG, a fração de DQO não determinada na corrente efluente, em seu pior cenário, foi observado na fase I, em cerca de 40%. As perdas podem estar associadas a vazamentos do biogás produzido, ou ainda, ao aprisionamento das bolhas do biogás formado no leito do reator. À exceção da fase inicial, a fração de metano gerada quando o sistema atingiu estabilidade operacional foi superior a 50%, corroborando a hipótese de possíveis perdas na fração de metano nessa etapa.

6. CONCLUSÕES

As principais conclusões incluem a viabilidade operacional de utilização do glicerol como fonte alternativa de material orgânico para manutenção de reator anaeróbio em período referente à entressafra de cana-de-açúcar e geração de metano.

A substituição de substratos no decorrer da operação não acarretou prejuízos significativos, estatisticamente, no desempenho do reator em monodigestão de vinhaça, com eficiências de remoção de matéria orgânica superiores a 80%, em termos de DQO. Além de promover a manutenção da produção de metano, com recuperação de cerca de 70% do material orgânico consumido, demonstrando a resiliência da biomassa frente as condições aplicadas.

O processo de codigestão anaeróbia, 50V:50G, forneceu material orgânico prontamente biodegradável, isto é, glicerol; além de macro e micronutrientes provenientes da vinhaça, dispensando suplementação externa, promovendo maiores conversões de matéria orgânica, comparativamente à monodigestão de vinhaça. O estabelecimento da via sulfetogênica, também decorrente da vinhaça, contribuiu para a estabilidade do processo, fornecendo alcalinidade ao meio, evitando reduções no pH efluente observadas na monodigestão de glicerol. Tais vantagens proporcionaram incremento da produção de metano em cerca de 12%, comparativamente à monodigestão de vinhaça de cana-de-açúcar, anteriormente à interrupção do reator e utilização de glicerol como única fonte de carbono.

A interrupção da alimentação do reator anaeróbio, durante 150 dias, não reduziu significativamente a eficiência do sistema, quanto a remoção de matéria orgânica, entretanto, houve redução significativa estatisticamente da produção volumétrica, em cerca de 9%, e do rendimento de metano.

A estratégia operacional de substituição gradual de substratos demonstrou-se eficaz, mantendo o processo estável no decorrer do longo período de operação, sem acúmulo de ácidos orgânicos, promovendo o crescimento e a adaptação da biomassa do reator. Além disso, apesar da rápida conversão dos carboidratos e glicerol, compostos presentes nos substratos, não houve necessidade de incrementar a suplementação de alcalinizante. A relação de 0,15 gNaHCO₃ g⁻¹DQO mantida durante o período operacional foi inferior ao reportado por ampla literatura de referência, reduzindo elevados custos de alcalinização.

REFERÊNCIAS

ABDUL RAMAN, A. A.; TAN, H. W.; BUTHIYAPPAN, A. Two-Step Purification of Glycerol as a Value Added by Product From the Biodiesel Production Process. **Frontiers in Chemistry**, v. 7, p. 1–9, 2019.

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, 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. 05, n. 07, p. 406–414, 2014. Disponível em: <<http://www.scirp.org/journal/doi.aspx?DOI=10.4236/ajac.2014.57049>>.

ALBANEZ, R. et al. Anaerobic Biological Treatment of Vinasse for Environmental Compliance and Methane Production. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 178, n. 1, p. 21–43, 2016.

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, n. March, p. 109606, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2019.109606>>.

ALVES, I. **Caracterização de grânulos de reator UASB empregado no processamento de vinhaça**. 2015. Universidade de São Paulo, 2015.

ANP. **Anuário Estatístico Brasileiro do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis**. Rio de Janeiro, 2020.

ANZOLA-ROJAS, M. del P. et al. The use of the carbon/nitrogen ratio and specific organic loading rate as tools for improving biohydrogen production in fixed-bed reactors. **Biotechnology Reports**, v. 5, n. 1, p. 46–54, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.btre.2014.10.010>>.

APHA, AWWA. **Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater**. American Public Health Association, Washington, DC, 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. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2017.03.120>>.

ATHANASOULIA, E.; MELIDIS, P.; AIVASIDIS, A. Co-digestion of sewage sludge and crude glycerol from biodiesel production. **Renewable Energy**, v. 62, p. 73–78, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.renene.2013.06.040>>.

AYABE, D. N. **Co-digestão anaeróbia de glicerol residual com esgoto sanitário**

visando o aumento da produção de metano. 2018. Universidade de São Paulo, 2018.

AYOUB, M.; ABDULLAH, A. Z. Critical review on the current scenario and significance of crude glycerol resulting from biodiesel industry towards more sustainable renewable energy industry. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 16, p. 2671–2686, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.rser.2012.01.054>>.

BANU, R.; KALIAPPAN, S.; BECK, D. Treatment of spent wash in anaerobic thermophilic suspended growth reactor (AMSGR). **Journal of Environmental Biology**, v. 27, p. 111–117, 2006.

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. Universidade de São Paulo, 2017.

BARROS, V. G. de; DUDA, R. M.; OLIVEIRA, R. A. de. Biomethane production from vinasse in upflow anaerobic sludge blanket reactors inoculated with granular sludge. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 47, n. 3, p. 628–639, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.bjm.2016.04.021>>.

BEATRIZ, A.; ARAÚJO, Y. J. K.; LIMA, P. De. Glicerol: Um breve histórico e aplicação em sínteses estereosseletivas. **Quim. Nova**, v. 34, n. 2, p. 306–319, 2011.

BELLE, A. J. et al. Anaerobic co-digestion of forage radish and dairy manure in complete mix digesters. **Bioresource Technology**, v. 178, p. 230–237, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2014.09.036>>.

BNDES; CGEE. **Bioetanol de cana-de-açúcar: energia para o desenvolvimento sustentável.** 1ª ed. [s.l: s.n.]

BONCZ, M. A. et al. Application of urea dosing for alkalinity supply during anaerobic digestion of vinasse. **Water Science and Technology**, v. 66, n. 11, p. 2453–2460, 2012.

BONINI, M. de A. **Cultivo heterotrófico de *Aphanothece microscopica* Nageli e *Chlorella vulgaris* em diferentes fontes de carbono e em vinhaça.** 2012. Universidade Federal de São Carlos, 2012. Disponível em: <http://www.btdt.ufscar.br/htdocs/tedeSimplificado//tde_busca/arquivo.php?codArquivo=4845>.

BORGES, A. do V. **Codigestão mesofílica de vinhaça de cana-de-açúcar e glicerol destilado em reator de leito fixo estruturado.** 2020. Universidade de São Paulo, 2020.

BUCHANAN, I. D.; NICELL, J. A. Model development for horseradish peroxidase catalyzed removal of aqueous phenol. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 54, n. 3, p. 251–261, 1997.

CARNEIRO, R. B. **Utilização de glicerol como fonte de carbono para desnitrificação e remoção biológica de fósforo em reator submetido à aeração intermitente.** 2015. Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, 2015.

CASTRILLÓN, L. et al. Methane production from cattle manure supplemented with crude glycerin from the biodiesel industry in CSTR and IBR. **Bioresource Technology**, v. 127,

p. 312–317, 2013.

CASTRO, T. M. de et al. Anaerobic co-digestion of industrial landfill leachate and glycerin: methanogenic potential, organic matter removal and process optimization. **Environmental Technology**, v. 0, n. 0, p. 1–11, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1080/09593330.2019.1575915>>.

CETESB. **Vinhaça – Critérios e procedimentos para aplicação no solo agrícola**.

CHERNICHARO, C. A. de L. Anaerobic Reactors. In: IWA PUBLISHING (Ed.). Volume 4 ed. [s.l: s.n.]

CHRISTOFOLETTI, C. A. et al. Sugarcane vinasse: Environmental implications of its use. **Waste Management**, v. 33, n. 12, p. 2752–2761, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.wasman.2013.09.005>>.

COELHO, S. T. et al. Brazilian sugarcane ethanol: lessons learned. **Energy for Sustainable Development**, v. 10, n. 2, p. 26–39, 2006. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/S0973-0826\(08\)60529-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0973-0826(08)60529-3)>.

CONAB. **Acompanhamento da safra brasileira de cana-de-açúcar**, 2020. .

COSTA, F. J. C. B. et al. Effluents From an Anaerobic Reactor. **Water Science and Technology**, v. 18, n. 12, p. 135–141, 1986.

CRAGO, C. L. et al. Competitiveness of Brazilian sugarcane ethanol compared to US corn ethanol. **Energy Policy**, v. 38, n. 11, p. 7404–7415, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.enpol.2010.08.016>>.

CRAVEIRO, A. M.; SOARES, H. M.; SCHMIDELL, W. Technical aspects and cost systems treating vinasse and brewery / soft drink wastewaters. **Water Science and Technology**, v. 18, n. 12, p. 123–134, 1986.

CRONE, B. C. et al. Significance of dissolved methane in effluents of anaerobically treated low strength wastewater and potential for recovery as an energy product: A review. **Water Research**, v. 104, p. 520–531, 2016.

DA SILVA, G. P.; MACK, M.; CONTIERO, J. Glycerol: A promising and abundant carbon source for industrial microbiology. **Biotechnology Advances**, v. 27, n. 1, p. 30–39, 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biotechadv.2008.07.006>>.

DABDOUB, M. J.; BRONZEL, J. L.; RAMPIN, M. A. Biodeisel: visão crítica do status atual e perspectivas na academia e na indústria. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p. 776–792, 2009.

DAMIANOVIC, M. H. R. Z.; FORESTI, E. Anaerobic degradation of synthetic wastewaters at different levels of sulfate and COD/sulfate ratios in horizontal-flow anaerobic reactors (HAIB). **Environmental Engineering Science**, v. 24, n. 3, p. 383–393, 2007.

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

DE 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. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2017.03.120>>.

DE GODOI, L. A. G. et al. Seasonal variation of the organic and inorganic composition of sugarcane vinasse: main implications for its environmental uses. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 26, n. 28, p. 29267–29282, 2019.

DEL NERY, V. **Utilização de lodo anaeróbio imobilizado em gel no estudo de partida de reatores de fluxo ascendente com manta de lodo**. 1987. Universidade de São Paulo, 1987.

DEL NERY, V. et al. Hydraulic and organic rates applied to pilot scale UASB reactor for sugar cane vinasse degradation and biogas generation. **Biomass and Bioenergy**, v. 119, n. September, p. 411–417, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2018.10.002>>.

DHARMADI, Y.; MURARKA, A.; GONZALEZ, R. Anaerobic Fermentation of Glycerol by *Escherichia coli*: A New Platform for Metabolic Engineering. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 94, n. 5, p. 821–829, 2006.

DIAS, M. O. de S. et al. Sugarcane processing for ethanol and sugar in Brazil. **Environmental Development**, v. 15, p. 35–51, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.envdev.2015.03.004>>.

DOS SANTOS, J. D. et al. Development of a vinasse nutritive solution for hydroponics. **Journal of Environmental Management**, v. 114, p. 8–12, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jenvman.2012.10.045>>.

DOWD, M. K. et al. 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, 1994.

DUBOIS, M. et al. Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. **Analytical Chemistry**, v. 28, n. 3, p. 350–356, 1956.

ESPAÑA-GAMBOA, E. et al. Vinasses: Characterization and treatments. **Waste Management and Research**, v. 29, n. 12, p. 1235–1250, 2011.

ESPAÑA-GAMBOA, E. et al. Methane production by treating vinasses from hydrous ethanol using a modified UASB reactor. **Biotechnology for Biofuels**, v. 5, p. 1–9, 2012.

FERRAZ JR., D. N. A. et al. Effect of organic loading rate on hydrogen production from sugarcane vinasse in thermophilic acidogenic packed bed reactors. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 39, n. 30, p. 16852–16862, 2014.

FERRAZ JR., A. D. N. et al. Thermophilic anaerobic digestion of raw sugarcane vinasse. **Renewable Energy**, v. 89, p. 245–252, 2016.

FERREIRA, L. F. R. et al. Evaluation of sugar-cane vinasse treated with *Pleurotus sajor-caju* utilizing aquatic organisms as toxicological indicators. **Ecotoxicology and**

Environmental Safety, v. 74, n. 1, p. 132–137, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ecoenv.2010.08.042>>.

FONOLL, X. et al. Anaerobic co-digestion of sewage sludge and fruit wastes: Evaluation of the transitory states when the co-substrate is changed. **Chemical Engineering Journal**, v. 262, p. 1268–1274, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.cej.2014.10.045>>.

FOUNTOULAKIS, M. S.; PETOULI, I.; MANIOS, T. Co-digestion of sewage sludge with glycerol to boost biogas production. **Waste Management**, v. 30, n. 10, p. 1849–1853, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.wasman.2010.04.011>>.

FREITAS, P. V. et al. Determination of Phenolic Acids in Sugarcane Vinasse by HPLC with Pulse Amperometry. **Journal of Analytical Methods in Chemistry**, p. 1–10, 2018.

FUESS, L. T. et al. 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. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.apenergy.2016.12.071>>.

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. Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, 2017.

FUESS, L. T. et al. Temporal dynamics and metabolic correlation between lactate-producing and hydrogen-producing bacteria in sugarcane vinasse dark fermentation: The key role of lactate. **Bioresource Technology**, v. 247, p. 426–433, 2018. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2017.09.121>>.

FUESS, L. T.; GARCIA, M. L. Anaerobic digestion of stillage to produce bioenergy in the sugarcane-to-ethanol industry. **Environmental Development**, v. 35, n. 3, p. 333–339, 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. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.03.326>>.

GARCIA, C. de C. B. **Codigestão anaeróbia de glicerol residual com esgoto sanitário em reator híbrido visando ao aumento da produção de biogás**. 2019. Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, 2019.

GOES, T.; MARRA, R.; SILVA, G. S. Setor sucroalcooleiro no Brasil situação atual e perspectivas. **Revista de Política Agrícola**, v. 17, n. 2, p. 39–51, 2008. Disponível em: <<https://seer.sede.embrapa.br/index.php/RPA/article/view/407/358>>.

GROVER, R.; MARWAHA, S. S.; KENNEDY, J. F. Studies on the use of an anaerobic baffled reactor for the continuous anaerobic digestion of pulp and paper mill black liquors. **Process Biochemistry**, v. 34, p. 653–657, 1999.

GUVEN, H. et al. Co-digestion performance of organic fraction of municipal solid waste with leachate: Preliminary studies. **Waste Management**, v. 71, p. 775–784, 2018.

Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.wasman.2017.04.039>>.

HAGOS, K. et al. Anaerobic co-digestion process for biogas production: Progress, challenges and perspectives. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 76, n. September, p. 1485–1496, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.rser.2016.11.184>>.

HAO, T. wei et al. A review of biological sulfate conversions in wastewater treatment. **Water Research**, v. 65, p. 1–21, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.watres.2014.06.043>>.

HE, Q. (Sophia); MCNUTT, J.; YANG, J. Utilization of the residual glycerol from biodiesel production for renewable energy generation. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 71, n. January 2016, p. 63–76, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.rser.2016.12.110>>.

HILL, D. T.; COBB, S. A.; BOLTE, J. P. Using Volatile Fatty Acid Relationships To Predict Anaerobic Digester Failure. **Transactions of the American Society of Agricultural Engineers**, v. 30, n. 2, p. 496–501, 1987.

HULSHOFF POL, L. W. et al. Anaerobic treatment of sulphate-rich wastewaters. **Biodegradation**, v. 9, n. 3–4, p. 213–224, 1998.

HULSHOFF POL, L. W. et al. New developments in reactor and process technology for sulfate reduction. **Water Science and Technology**, v. 44, n. 8, p. 67–76, 2001.

JÁUREGUI-JÁUREGUI, J. A. et al. Anaerobic treatment of tequila vinasses under seasonal operating conditions: Start-up, normal operation and restart-up after a long stop and starvation period. **Bioresource Technology**, v. 168, p. 33–40, 2014.

JENSEN, P. D. et al. Anaerobic codigestion of sewage sludge and glycerol, focusing on process kinetics, microbial dynamics and sludge dewaterability. **Water Research**, v. 67, n. December, p. 355–366, 2014.

KAPP, H. Schlammfaulung mit hohem Feststoffgehalt (Stuttgarter Berichte zur Siedlungswasserwirtschaft), Band 86. Oldenbourg Verlag, Munchen, 1984.

KAUR, J. et al. Valorisation of crude glycerol to value-added products: Perspectives of process technology, economics and environmental issues. **Biotechnology Reports**, v. 27, p. e00487, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.btre.2020.e00487>>.

KHANAL, S. K. **Anaerobic Biotechnology for Bioenergy Production: Principles and Applications** (John Wiley & Sons, Ed.)Iowa, EUA, 2008. .

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. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2017.02.028>>.

KOBAYASHI, T. et al. Characterization of start-up performance and archaeal community shifts during anaerobic self-degradation of waste-activated sludge. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 21, p. 4981–4988, 2009. Disponível em:

<<http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2009.05.043>>.

KOUPAIE, E. H. et al. Mesophilic batch anaerobic co-digestion of fruit-juice industrial waste and municipal waste sludge: Process and cost-benefit analysis. **Bioresource Technology**, v. 152, p. 66–73, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2013.10.072>>.

KOUTINAS, M. et al. The Use of an Oil Absorber as a Strategy to Overcome Starvation Periods in Degrading 1,2-Dichloroethane in Waste Gas. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 96, n. 4, p. 673–686, 2007.

KUMAR, G. S.; GUPTA, S. K.; SINGH, G. Biodegradation of distillery spent wash in anaerobic hybrid reactor. **Water Research**, v. 41, n. 4, p. 721–730, 2007.

LARSEN, A. C. et al. Anaerobic co-digestion of crude glycerin and starch industry effluent. **Engenharia Agrícola**, v. 33, p. 341–352, 2013.

LAZARO, C. Z. et al. Sugarcane vinasse as substrate for fermentative hydrogen production: The effects of temperature and substrate concentration. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 39, p. 6407–6418, 2014.

LENS, P. N. L. et al. Biotechnological treatment of sulfate-rich wastewaters. **Critical Reviews in Environmental Science and Technology**, v. 28, n. 1, p. 41–88, 1998.

LOPES, A. N.; CECHINEL, C. A.; WENTZ, A. P. Co-produto do biodiesel - Novas aplicações para glicerina. **Diálogos & Ciência - Revista da Faculdade de Tecnologia e Ciências**, n. 27, 2011.

LOVATO, G. et al. Co-digestion of Whey with Glycerin in an AnSBBR for Biomethane Production. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 178, n. 1, p. 126–143, 2016.

LOVATO, G. et al. 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, n. 3, p. 720–740, 2019a.

LOVATO, G. et al. Methane production by co-digestion of vinasse and whey in an AnSBBR: Effect of mixture ratio and feed strategy. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 187, p. 28–46, 2019b.

MA, J. et al. Improvement of the anaerobic treatment of potato processing wastewater in a UASB reactor by co-digestion with glycerol. **Biotechnology Letters**, v. 30, n. 5, p. 861–867, 2008.

MADIGAN, M. T. et al. **Microbiologia de Brock**, 12 ed. Porto Alegre: Artmed, 960p, 2015.

MANOSAK, R.; LIMPATTAYANATE, S.; HUNSOM, M. Sequential-refining of crude glycerol derived from waste used-oil methyl ester plant via a combined process of chemical and ... **Fuel Processing Technology**, v. 92, n. 1, p. 92–99, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.fuproc.2010.09.002>>.

MARIN-BATISTA, J. et al. Anaerobic co-digestion of vinasse and chicken manure: alternative for Colombian agrowaste management. v. XVIII, n. 2, p. 6–12, 2016.

MATA-ALVAREZ, J. et al. A critical review on anaerobic co-digestion achievements between 2010 and 2013. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 36, p. 412–427, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.rser.2014.04.039>>.

MCCARTY, P. L.; SMITH, D. P. Anaerobic wastewater treatment. **Environmental Science and Technology**, v. 20, n. 12, p. 1200–1206, 1986.

MENESES-REYES, J. C. et al. Oil-extracted *Chlorella vulgaris* biomass and glycerol bioconversion to methane via continuous anaerobic co-digestion with chicken litter. **Renewable Energy**, v. 128, p. 223–229, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.renene.2018.05.053>>.

MORAES, B. S. et al. 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, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.apenergy.2013.07.018>>.

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, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.rser.2015.01.023>>.

MOSEY, F. E. Mathematical modelling of the anaerobic digestion process: Regulatory mechanisms for the formation of short-chain volatile acids from glucose. **Water Science and Technology**, v. 15, p. 209–232, 1983.

NGHIEM, L. D. et al. Co-digestion of sewage sludge and crude glycerol for on-demand biogas production. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 95, n. PA, p. 160–166, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ibiod.2014.04.023>>.

NOVI, J. C. et al. Análise da gestão do glicerol: Riscos e oportunidades sobre sua destinação frente à lacuna normativa e aspectos sustentáveis. **Revista Eletrônica de Administração**, v. 24, n. 3, p. 217–243, 2018.

OUDE ELFERINK, S. J. W. H. et al. Sulfate reduction in methanogenic bioreactors. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 15, n. 2–3, p. 119–136, 1994.

PACHECO, T. F. Produção de Etanol: Primeira ou Segunda Geração? **Circular Técnica - Embrapa**, p. 1–6, 2011. Disponível em: <<https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/32985/1/CITE-04.pdf>>.

PANPONG, K. et al. Anaerobic Co-digestion of Canned Seafood Wastewater with Glycerol Waste for Enhanced Biogas Production. **Energy Procedia**, v. 52, p. 328–336, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.egypro.2014.07.084>>.

PARSAEE, M.; KIANI, M. K. D.; KARIMI, K. A review of biogas production from sugarcane vinasse. **Biomass and Bioenergy**, v. 122, p. 117–125, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2019.01.034>>.

PEITER, G. C. et al. Alternativas para o uso do glicerol produzido a partir do biodiesel. **Revista brasileira de energias renováveis**, v. 5, n. 4, p. 519–537, 2016.

PERNA, V. 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.

PIMENTEL, D. Ethanol fuels: Energy balance, economics, and environmental impacts are negative. **Natural Resources Research**, v. 12, n. 2, p. 127–134, 2003.

PRADA, S. M.; GUEKEZIAN, M.; SUÁREZ-IHA, M. E. V. Metodologia analítica para a determinação de sulfato em vinhoto. **Química Nova**, v. 21, n. 3, p. 249–252, 1998.

QATIBI, A. I.; BORIES, A.; GARCIA, J. L. Sulfate reduction and anaerobic glycerol degradation by a mixed microbial culture. **Current Microbiology**, v. 22, n. 1, p. 47–52, 1991.

QUINTERO, J. A. et al. Fuel ethanol production from sugarcane and corn: Comparative analysis for a Colombian case. **Energy**, v. 33, n. 3, p. 385–399, 2008.

REIS, C. M. et al. Evaluation of hydrogen and methane production from sugarcane vinasse in an anaerobic fluidized bed reactor. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 40, p. 8498–8509, 2015.

RIVERO, M.; SOLERA, R.; PEREZ, M. Anaerobic mesophilic co-digestion of sewage sludge with glycerol: Enhanced biohydrogen production. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 39, n. 6, p. 2481–2488, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijhydene.2013.12.006>>.

RODRIGUES, J. A. R. Do engenho à biorrefinaria. A usina de açúcar como empreendimento industrial para a geração de produtos bioquímicos e biocombustíveis. **Química Nova**, v. 34, n. 7, p. 1242–1254, 2011.

RYAN, D. et al. A comparison of coagulant dosing options for the remediation of molasses process water. **Separation and Purification Technology**, v. 58, p. 347–352, 2008.

SALOMON, K. R.; LORA, E. E. S. Estimate of the electric energy generating potential for different sources of biogas in Brazil. **Biomass and Bioenergy**, v. 33, n. 9, p. 1101–1107, 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biombioe.2009.03.001>>.

SCHINK, B.; ZEIKUS, J. G. Microbial methanol formation: a major and product of pectin metabolism. **Current Microbiology**, v. 4, p. 387–389, 1980.

SILVA, M. A. S.; GRIEBELER, N. P.; BORGES, L. C. Uso de vinhaça e impactos nas propriedades do solo e lençol freático Use of stillage and its impact on soil properties and groundwater. n. 62, p. 108–114, 2007.

SOUSA, S. P. et al. 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, n. 3, p. 987–1006, 2019.

SOUSA, S. P. **Produção de metano em AnSBBR pela codigestão de vinhaça e soro**. 2019. Universidade de São Paulo, 2019.

SPEECE, R. E. **Advances in solar energy - An annual review of research and development**. [s.l.: s.n.].v. 2

STAMS, A. J. M. Metabolic interactions between anaerobic bacteria in methanogenic environments. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 66, p. 271–294, 1994.

STICKLAND, L. H. The determination of small quantities of bacteria by means of the Biuret reaction. **Journal of General Microbiology**, v. 5, p. 698–703, 1951.

SUN, R.; TOMKINSON, J.; BOLTON, J. Effects of precipitation pH on the physico-chemical properties of the lignins isolated from the black liquor of oil palm empty fruit bunch fibre pulping. **Polymer degradation and stability**, v. 63, p. 195–200, 1999.

SYAICHURROZI, I. et al. Biogas Production from Co-Digestion Vinasse Waste and Tofu-Processing Wastewater and Kinetics. v. 6, n. 3, 2016.

TAHERZADEH, M. J.; ADLER, L.; LIDÉN, G. Strategies for enhancing fermentative production of glycerol — a review. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 31, p. 53–66, 2002.

TAKEDA, P. Y.; GOTARDO, J. T.; GOMES, S. D. Anaerobic co-digestion of leachate and glycerol for renewable energy generation. **Environmental Technology**, v. 0, n. 0, p. 1–11, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1080/09593330.2020.1818832>>.

TAYLOR, K. A. C. C. A simple colorimetric assay for muramic acid and lactic acid. **Applied Biochemistry and Biotechnology - Part A Enzyme Engineering and Biotechnology**, v. 56, n. 1, p. 49–58, 1996.

TEMUDO, M. F. et al. Glycerol fermentation by (open) mixed cultures: A chemostat study. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 100, n. 6, p. 1088–1098, 2008.

TOMMASO, G. et al. Morphological observation and microbial population dynamics in anaerobic polyurethane foam biofilm degrading gelatin. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 19, p. 287–292, 2002.

VIANA, M. B. **Produção de biogás a partir de glicerol oriundo de biodiesel**. 2011. Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, 2011.

VIEIRA, M. C. A.; LIMA, J. F.; BRAGA, N. M. Setor Sucroalcooleiro Brasileiro: Evolucao e Perspectivas. **Perspectivas do investimento**, v. 2010, p. 207–245, 2007.

VLASSIS, T. et al. Methane production via anaerobic digestion of glycerol: A comparison of conventional (CSTR) and high-rate (PABR) digesters. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 88, n. 11, p. 2000–2006, 2013.

WEIJMA, J.; STAMS, A. J. M. Methanol conversion in high-rate anaerobic reactors. **Water Science and Technology**, v. 44, p. 7–14, 2001.

XIE, S. et al. Anaerobic co-digestion: A critical review of mathematical modelling for performance optimization. **Bioresource Technology**, v. 222, p. 498–512, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2016.10.015>>.

XU, F. et al. Anaerobic digestion of food waste – Challenges and opportunities. **Bioresource Technology**, v. 247, p. 1047–1058, 2018. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2017.09.020>>.

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 Biochemistry**, v. 43, n. 4, p. 362–367, 2008.

ZAHEDI, S. et al. Mesophilic anaerobic co-digestion of sewage sludge with glycerine: Effect of solids retention time. **Fuel**, v. 215, p. 285–289, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.fuel.2017.11.007>>.

ZHAO, Z. G. et al. Simultaneous determination of ten major phenolic acids in sugarcane by a reversed phase HPLC method. **Sugar Industry**, v. 133, p. 1–6, 2008.

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, p. 33-42, 1994.