

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
ESCOLA DE ENGENHARIA DE SÃO CARLOS  
ENGENHARIA AMBIENTAL

BEATRIZ GARDIMAN ARRUDA

**Efeitos de Elementos Traço na Produção de Metano a partir de Vinhaça de Cana-de-  
açúcar**

São Carlos, SP

2022



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
ESCOLA DE ENGENHARIA DE SÃO CARLOS  
ENGENHARIA AMBIENTAL

BEATRIZ GARDIMAN ARRUDA

**Efeitos de Elementos Traço na Produção de Metano a partir de Vinhaça de Cana-de-açúcar**

Trabalho de Graduação apresentado à  
Escola de Engenharia de São Carlos,  
da Universidade de São Paulo, como  
parte dos requisitos para a obtenção do  
título de Engenheira Ambiental.

Orientadora: Adriana Ferreira Maluf Braga

Co-orientadora: Rachel Biancalana Costa

São Carlos, SP

2022

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).

A773e      Arruda, Beatriz Gardiman  
              Efeitos de elementos traço na produção de metano  
a partir de vinhaça de cana-de-açúcar / Beatriz  
Gardiman Arruda; orientadora Adriana Ferreira Maluf  
Braga; coorientadora Rachel Biancalana Costa. São  
Carlos, 2022.

Monografia (Graduação em Engenharia Ambiental) --  
Escola de Engenharia de São Carlos da Universidade de  
São Paulo, 2022.

1. Indústria sucroalcooleira. 2. Micronutrientes.  
3. Digestão anaeróbia. 4. Delineamento Fatorial  
Fracionado. 5. Delineamento Composto Central. 6.  
Biogás. I. Título.

# FOLHA DE JULGAMENTO

---

Candidato(a): **Beatriz Gardiman Arruda**

Data da Defesa: 23/11/2022

Comissão Julgadora:

Resultado:

**Adriana Ferreira Maluf Braga (Orientador(a))**

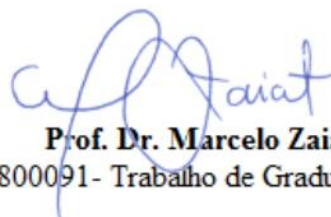
Aprovada

**Priscila Rosseto Camiloti**

Aprovada

**Guilherme Henrique Duarte de Oliveira**

Aprovada



**Prof. Dr. Marcelo Zaiat**  
Coordenador da Disciplina 1800091- Trabalho de Graduação



Dedico este trabalho a todos os pesquisadores  
brasileiros que, apesar das dificuldades,  
persistem em nome da ciência.





## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço às minhas orientadoras Adriana e Rachel, que se dedicaram amplamente a esta pesquisa. Agradeço os ensinamentos e o auxílio para a utilização dos softwares e interpretação dos resultados, a contínua revisão do texto, a mentoria no laboratório, e sua disposição para finalizarem a parte laboratorial quando eu não podia mais frequentar este espaço devido à pandemia. Sua paciência e amizade durante a iniciação científica e elaboração do Trabalho de Graduação foram essenciais. Possuo grande admiração por estas pesquisadoras e desejo todo o reconhecimento e sucesso em suas carreiras.

Aos meus pais, Virginia e Mauro, que sempre priorizaram a educação de qualidade de suas filhas, oferecendo seu incentivo, apoio e amor. E também às minhas irmãs, Ana Luiza e Patrícia, que são meus exemplos.

A todos os pesquisadores e funcionários do LPB que auxiliaram na elaboração desta pesquisa e fizeram companhia no laboratório.

A todos os professores da Engenharia Ambiental, que contribuíram para a minha formação profissional e deixaram memórias de muito carinho e admiração. Especialmente ao professor Marcelo Zaiat, que me apresentou o Laboratório de Processos Biológicos (LPB), explicando cada pesquisa e me incentivando a ingressar na iniciação científica.

A todos os funcionários da EESC-USP, que criam uma estrutura excelente. Agradeço o bandeco, o busão, a biblioteca, o CEFER, e tudo o que forma o nosso querido CAASO.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa de iniciação científica (Processo 118024/2019-1), a qual fez parte do projeto temático “Aplicação do Conceito de Biorrefinaria a Estações de Tratamento Biológico de Águas Residuárias: o Controle da Poluição Ambiental Aliado à Recuperação de Matéria e Energia” (Processo FAPESP 15/06246-7).

Aos meus amigos da Engenharia Ambiental. A trajetória com vocês em São Carlos não apenas me direcionou profissionalmente, mas principalmente me formou como pessoa.



“Uma flor nasceu na rua!  
Passem de longe, bondes, ônibus, rio de aço do  
tráfego.

Uma flor ainda desbotada  
ilude a polícia, rompe o asfalto.  
Façam completo silêncio, paralise os negócios,  
garanto que uma flor nasceu.”

Trecho do poema “A Flor e a Náusea” (1945), de  
Carlos Drummond de Andrade



## RESUMO

ARRUDA, B. G. **Efeitos de elementos traço na produção de metano a partir de vinhaça da cana-de-açúcar**. 2022. Monografia (Graduação em Engenharia Ambiental) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, 2022.

O Brasil é destaque mundial na produção de etanol como fonte renovável de energia, utilizando como principal matéria prima a cana-de-açúcar. Durante a produção deste combustível, a vinhaça é gerada como água residuária, sendo majoritariamente disposta no solo. Essa prática, além de causar impactos ambientais, também é um desperdício do alto potencial energético da vinhaça. Como alternativa, a digestão anaeróbia da vinhaça proporciona a redução da poluição ambiental e a produção de bioenergia. Entre os fatores decisivos para o bom funcionamento dos sistemas anaeróbios, destacam-se os micronutrientes, ou elementos traço, que são essenciais para os microrganismos, do mesmo modo que podem causar toxicidade conforme sua concentração disponível. Este estudo analisou o efeito da suplementação de cobalto (Co), cobre (Cu), ferro (Fe), manganês (Mn), níquel (Ni) e selênio (Se) na produção de metano a partir de vinhaça de cana-de-açúcar acidificada. Testes de potencial bioquímico de metano foram aplicados a Delineamento Fatorial Fracionado (DFF) e Delineamento Composto Central (DCC), seguidos por ensaio de validação. Foram consideradas como respostas a produção máxima de metano (P), a velocidade máxima (R<sub>m</sub>) e a produtividade. No DFF, os micronutrientes foram analisados nas seguintes concentrações: 0,3 mg.L<sup>-1</sup> para o Co, Ni, e Se, e 5 mg.L<sup>-1</sup> para o Cu, Fe e Mn. Identificou-se que o Co, Ni e Mn tiveram efeito positivo para as respostas consideradas, sendo escolhidos para comporem o DCC. O Ni teve efeito significativo positivo para P e para a produtividade no DCC, sendo adicionado na concentração de 0,9 mg.L<sup>-1</sup> no ensaio de validação. Esta suplementação ocasionou aumento de 27% na produtividade do metano, maior velocidade de conversão de acetato durante a fase exponencial de produção de metano, e menor acúmulo de ácido propiônico. Esses resultados sugerem possíveis ganhos da suplementação de Ni em ensaios com reatores contínuos, como a redução do tempo de detenção hidráulica e o aumento da carga orgânica volumétrica sem provocar acúmulo de metabólitos.

Palavras-chave: Indústria sucroalcooleira. Micronutrientes. Digestão Anaeróbia. Delineamento Fatorial Fracionado. Delineamento Composto Central. Biogás.



## ABSTRACT

ARRUDA, B. G. **Effects of trace elements on the methane production from sugarcane vinasse**. 2022. Monografia (Graduação em Engenharia Ambiental) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, 2022.

Brazil is an international reference in the production of ethanol as a source of renewable energy, using sugarcane as its main raw material. During the ethanol production, vinasse is generated as wastewater that is mostly disposed on the soil. This practice, not only causes environmental impacts, but also represents waste of high energetic potencial of the vinasse. As an alternative, the anaerobic digestion of vinasse provides the reduction of pollution in the environment and the production of bioenergy. Among the deciding factors for the good performance of the anaerobic systems, the micronutrients or trace elements are highlighted. They are essencial to microorganisms, the same way they can cause toxicity according to the available concentration. This study analysed the effect of supplementation of cobalt (Co), copper (Cu), iron (Fe), manganese (Mn), nickel (Ni) and selenium (Se) in the production of methane from acidified sugarcane vinasse. Biochemical methane potential assays were applied to Fractional Factorial Design (FFD) and Central Composite Design (CCD), followed by a validation test. The analysed responses were the maximum production of methane (P), the maximum speed of production (R<sub>m</sub>) and the productivity. In the FFD, the micronutrients were analysed in the following concentrations: 0,3 mg.L<sup>-1</sup> for Co, Ni, and Se, and 5 mg.L<sup>-1</sup> for Cu, Fe and Mn. Since Co, Ni and Mn had a positive effect for the considered responses, they were chosen to compose CCD. Ni had a significant positive effect for P and for the productivity in CCD, therefore it was added at the concentration of 0,9 mg.L<sup>-1</sup> in the validation test. This supplementation caused a 27% increase in the productivity of methane, higher speed of acetate conversion during the exponential phase of methane production and lower accumulation of propionic acid. These results suggest possible gain in the Ni supplementation in assays using continuous reactors, such as reduction of the hydraulic detention time and the increase of the volumetric organic load without causing accumulation of metabolites.

**Keywords:** Sugar-alcohol industry. Micronutrients. Anaerobic digestion. Fractional Factorial Design. Central Composite Design. Biogas.





## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Processo de produção de etanol anidro a partir do caldo e do bagaço da cana-de-açúcar .....	29
Figura 2 - Principais processos e microrganismos envolvidos na digestão anaeróbia .	34
Figura 3 - Porcentagens dos produtos formados durante a digestão anaeróbia .....	36
Figura 4 - Processos anaeróbios em fase única e com separação de fases .....	38
Figura 5 - Atividades do Delineamento Fatorial Fracionado, do Delineamento Composto Central e do Ensaio de Validação .....	48
Figura 6 - Curva de produção acumulada de metano para as 16 bateladas do Delineamento Fatorial Fracionado.....	59
Figura 7 - Gráfico de Pareto com o efeito dos fatores sobre a resposta Rm no ensaio Delineamento Fatorial Fracionado.....	61
Figura 8 - Média da resposta Rm nos níveis extremos do Co, Mn e Ni para o ensaio Delineamento Fatorial Fracionado.....	62
Figura 9 - Gráfico de Pareto com o efeito dos fatores sobre a resposta P para o ensaio Delineamento Fatorial Fracionado.....	63
Figura 10 - Média das respostas P nos níveis extremos do Co, Mn e Ni para o ensaio Delineamento Fatorial Fracionado.....	65
Figura 11 - Gráfico de Pareto com o efeito dos fatores sobre a resposta Produtividade no Delineamento Fatorial Fracionado.....	66
Figura 12 - Média das respostas Produtividade nos níveis extremos do Co, Mn e Ni para o ensaio Delineamento Fatorial Fracionado .....	67
Figura 13 - Curva de produção acumulada de metano para o primeiro bloco do Delineamento Composto Central.....	69
Figura 14 - Curva de produção acumulada de metano para o segundo bloco do Delineamento Composto Central.....	69
Figura 15 - Valores previstos e observados para a resposta Rm no Delineamento Composto Central .....	71

Figura 16 - Superfície de resposta entre Mn e Ni para a resposta Rm no Delineamento Composto Central .....	72
Figura 17 - Superfície de resposta entre Co e Mn para a resposta Rm no Delineamento Composto Central .....	73
Figura 18 - Superfície de resposta entre Co e Ni para a resposta Rm no Delineamento Composto Central .....	74
Figura 19 - Valores previstos e observados para a resposta P no Delineamento Composto Central .....	75
Figura 20 - Superfície de resposta entre Co e Mn para a resposta P no Delineamento Composto Central .....	76
Figura 21 - Superfície de resposta entre Co e Ni para a resposta P no Delineamento Composto Central .....	77
Figura 22 - Valores previstos e observados para a resposta Produtividade no Delineamento Composto Central.....	78
Figura 23 - Superfície de resposta entre Mn e Ni para a resposta Produtividade no Delineamento Composto Central.....	79
Figura 24 - Superfície de resposta entre Co e Ni para a resposta Produtividade no Delineamento Composto Central.....	80
Figura 25 - Produção de metano e remoção de sulfato na Val-C e na Val-Ni+.....	83
Figura 26 - Concentrações médias de DQO na Val-C e na Val-Ni+.....	83
Figura 27 - Concentrações médias de fenóis na Val-C e na Val-Ni+ .....	84
Figura 28 - Perfil temporal das concentrações médias dos metabólitos na Val-C (colunas empilhadas).....	85
Figura 29 - Perfil temporal das concentrações médias dos metabólitos na Val-Ni+ (colunas empilhadas).....	85

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Caracterização físico-química da vinhaça de cana-de-açúcar segundo diferentes autores (continua) .....	30
Tabela 2 - Níveis dos fatores em cada condição utilizando Delineamento Fatorial Fracionado .....	51
Tabela 3 - Níveis dos fatores do primeiro bloco do Delineamento Composto Central	52
Tabela 4 - Níveis dos fatores do segundo bloco do Delineamento Composto Central	53
Tabela 5 - Caracterização da vinhaça acidificada utilizada nos ensaios com delineamentos fatorial fracionado e composto central e no ensaio de validação. ....	57
Tabela 6 - Caracterização do lodo utilizado nos ensaios com delineamentos fatorial fracionado e composto central e no ensaio de validação. ....	58
Tabela 7 - Parâmetros ajustados de velocidade ( $R_m$ ), produção máxima ( $P$ ) e produtividade de metano no ensaio Delineamento Fatorial Fracionado .....	60
Tabela 8 - Tabela ANOVA para parâmetro velocidade $R_m$ ( $\text{mmolCH}_4.\text{DQO}^{-1}.\text{dia}^{-1}$ ) no Delineamento Fatorial Fracionado. Os números em vermelho indicam os fatores significativos a 95% de confiança .....	61
Tabela 9 - Tabela ANOVA para parâmetro produção máxima $P$ ( $\text{mmolCH}_4.\text{gDQO}^{-1}$ ) no Delineamento Fatorial Fracionado. Os números em vermelho indicam os fatores significativos a 95% de confiança .....	64
Tabela 10 - Tabela ANOVA para parâmetro Produtividade ( $\text{mmolCH}_4.\text{DQO}^{-1}.\text{dia}^{-1}$ ) no Delineamento Fatorial Fracionado. Os números em vermelho indicam os fatores significativos a 95% de confiança .....	66
Tabela 11 - Tabela ANOVA para parâmetro valocidade $R_m$ ( $\text{mmolCH}_4.\text{DQO}^{-1}.\text{dia}^{-1}$ ) no Delineamento Composto Central.....	71
Tabela 12 - Tabela ANOVA para parâmetro produção máxima $P$ ( $\text{mmolCH}_4.\text{gDQO}^{-1}$ ) no Delineamento Composto Central. Os números em vermelho indicam os fatores significativos a 95% de confiança .....	75

Tabela 13 - Tabela ANOVA para parâmetro Produtividade ( $\text{mmolCH}_4.\text{DQO}^{-1}.\text{dia}^{-1}$ ) no Delineamento Composto Central. Os números em vermelho indicam os fatores significativos a 95% de confiança..... 78

Tabela 14 - Resultados do ensaio de validação e caracterização das fases sólida e líquida ao final do experimento..... 81

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

AEAC	Álcool Etílico Anidro Combustível
AEHC	Álcool Etílico Hidratado Combustível
Al	Alumínio
ANOVA	Análise de variância
AnSTBR	Reator anaeróbio de leito estruturado (do inglês <i>anaerobic structured-bed reactor</i> )
Ba	Bário
Ca	Cálcio
CAASO	Centro Acadêmico Armando de Salles Oliveira
CEFER	Centro de Educação Física, Esportes e Recreação
CETESB	Companhia Ambiental do Estado de São Paulo
CG	Cromatografia gasosa
CH <sub>4</sub>	Metano
CNPq	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
Co	Cobalto
CO <sub>2</sub>	Dióxido de Carbono
CONAB	Companhia Nacional de Abastecimento
Cu	Cobre
d	Dia
DA	Digestão Anaeróbia
DBO	Demanda Bioquímica de Oxigênio
DCC	Delineamento Composto Central
df	Graus de liberdade
DFF	Delineamento Fatorial Fracionado
DQO	Demanda Química de Oxigênio

<i>e</i>	Número de Euler
EESC	Escola de Engenharia de São Carlos
EUA	Estados Unidos da América
F	Razão F
FAPESP	Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo
Fe	Ferro
g	Gramma
h	Hora
H <sub>2</sub>	Hidrogênio
HNO <sub>3</sub>	Ácido Nítrico
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de Hidrogênio
H <sub>2</sub> S	Sulfeto de Hidrogênio
ICP-OES	Espectrometria de Emissão Óptica com Plasma Indutivamente Acoplado
K	Potássio
kg	Quilograma
L	Litro
LD	Limite de detecção
LPB	Laboratório de Processos Biológicos
m	Metro
Mg	Magnésio
mg	Miligrama
min	Minuto
mL	Mililitro
mm	Milímetro
mmol	Milimol
Mn	Manganês

MS	Média dos quadrados
Na	Sódio
NaHCO <sub>3</sub>	Bicarbonato de sódio
Ni	Níquel
N <sub>2</sub> O	Óxido Nitroso
NTK	Nitrogênio Total Kjealdahl
P (resposta)	Produção Máxima de Metano
P	Fósforo
PBM	Potencial Bioquímico do Metano
RF	Rádio Frequência
RFA	<i>Renewable Fuels Association</i>
Rm	Velocidade Máxima de Produção de Metano
rpm	Rotações por minuto
Se	Selênio
SFT	Sólidos fixos totais
SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	Sulfato
SS	Soma dos quadrados
SSF	Sólidos suspensos fixos
SST	Sólidos suspensos totais
SSV	Sólidos suspensos voláteis
ST	Sólidos Totais
SVT	Sólidos Voláteis Totais
TCD	Detector Térmico de Condutividade
TDH	Tempo de Detenção Hidráulica
UASB	Reator anaeróbio de fluxo ascendente e manta de lodo (do inglês <i>upflow anaerobic sludge bed reactor</i> )

µg	Micrograma
µm	Micrômetro
µM	Micromolar
UNESP	Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”
µS	Microsiemens
USDA	<i>United States Department of Agriculture</i>
USP	Universidade de São Paulo
Val-C	Triplicata da condição controle no ensaio de validação
Val-Ni <sup>+</sup>	Triplicata da condição com adição de Ni no ensaio de validação
W	Watt
Zn	Zinco



## SUMÁRIO

1.	Introdução .....	25
2.	Revisão Bibliográfica.....	27
2.1	Produção sucroalcooleira a partir de cana-de-açúcar.....	27
2.2	Características da vinhaça e seu impacto ambiental.....	29
2.3	Fundamentos da digestão anaeróbia .....	34
2.4	Processos anaeróbios com separação de fases.....	37
2.5	Importância dos elementos traço na digestão anaeróbia .....	40
2.6	Delineamento de experimentos: Fatorial Fracionado e Composto Central .....	43
3.	Objetivos .....	45
4.	Materiais e Métodos.....	47
4.1	Teste de potencial bioquímico de metano (PBM) .....	49
4.2	Estudo dos metais traço na vinhaça utilizando o Delineamento Fatorial Fracionado .....	50
4.3	Estudo dos metais traço na vinhaça utilizando o Delineamento Composto Central .....	51
4.4	Ensaio de validação.....	53
4.5	Parâmetros e dados analisados .....	53
5.	Resultados e Discussão .....	57
5.1	Caracterização da vinhaça e do lodo.....	57
5.2	Delineamento Fatorial Fracionado.....	58
5.2.1	Ensaio do Potencial Bioquímico do Metano do Delineamento Fatorial Fracionado .....	58
5.2.2	Análise estatística do Delineamento Fatorial Fracionado .....	59
5.3	Delineamento Composto Central.....	68
5.3.1	Ensaio do Potencial Bioquímico do Metano do Delineamento Composto Central .....	68

5.3.2	Análise estatística do Delineamento Composto Central .....	70
5.4	Ensaio de Validação .....	80
6.	Conclusões .....	87
7.	Perspectivas e possibilidades para trabalhos futuros .....	89
	Referências Bibliográficas .....	91

## 1. INTRODUÇÃO

Os combustíveis fósseis são a fonte de energia mais utilizada globalmente e, por isso, movimentam disputas políticas e relações diplomáticas entre países. Há relevante discussão sobre seu esgotamento e os impactos ambientais de sua queima, representando uma das importantes pautas ambientais e econômicas discutidas em conferências internacionais.

Nesse sentido, esforços relacionados à busca por fontes renováveis de energia ganham crescente incentivo. No Brasil, o Programa Nacional do Álcool (Pró-Álcool) foi implementado na década de 70 para redução da dependência nacional em relação ao petróleo importado. Isso impulsionou a produção de etanol, e atualmente o país é o segundo maior produtor, utilizando cana-de-açúcar como principal matéria prima.

No processo de produção de etanol a partir de cana-de-açúcar, são produzidos dois principais resíduos: o bagaço, gerado na primeira etapa, de extração dos açúcares; e a vinhaça, gerada no processo de destilação. O bagaço é destinado à queima em caldeiras ou à produção de etanol de segunda geração. O destino majoritário da vinhaça, por sua vez, é a disposição no solo com a justificativa de fertilizá-lo (fertirrigação), prática permitida legalmente.

No entanto, diversos estudos apontam que a fertirrigação traz prejuízos para o solo, para ambientes aquáticos, e pode emitir gases de efeito estufa. Além disso, esse resíduo líquido possui alto potencial energético, e poderia ser capaz de suprir a demanda de eletricidade de uma cidade de aproximadamente 130 mil habitantes (MORAES et al., 2014).

A digestão anaeróbia (DA) da vinhaça é uma alternativa para seu aproveitamento energético. Ela tem como finalidade reduzir o potencial poluidor da vinhaça e recuperar energia por meio de biogás. A DA ocorre em quatro etapas: hidrólise, acidogênese, acetogênese e metanogênese, na qual é formado o biogás. De forma geral, as quatro etapas da DA ocorrem em um único reator. Porém, há sistemas anaeróbios com separação das fases, compostos por um reator acidogênico (hidrólise e acidogênese) e um reator metanogênico (acetogênese e metanogênese), permitindo o isolamento de dois tipos de biogás: hidrogênio e metano. Esse tipo de sistema apresenta resultados melhores de biodegradação e rendimento energético (NASR et al., 2012; FERRAS JÚNIOR, 2013; FU et al., 2017).

Para a boa operação de sistemas anaeróbios, deve-se atentar para os requisitos nutricionais dos microrganismos responsáveis pela degradação do substrato. Os elementos

traço, ou micronutrientes, são essenciais para o metabolismo dos microrganismos, e sua falta pode representar o fracasso do biodigestor, do mesmo modo que seu excesso pode causar toxicidade. Dessa forma, torna-se importante a determinação das concentrações de elementos traço que propiciam máximo rendimento energético da degradação da vinhaça, a fim de se analisar sua necessidade de suplementação.

O planejamento experimental é uma ferramenta estatística que possibilita a identificação do efeito de diversos fatores na resposta a ser analisada, como produção de biogás. Um Delineamento Fatorial Fracionado (DFF) permite que um grande número de fatores seja estudado simultaneamente com o mínimo número de ensaios através da combinação dos fatores escolhidos em 2 níveis (por exemplo, em diferentes concentrações). Assim, os fatores estatisticamente significativos (com efeito positivo ou negativo) na resposta são identificados. A partir desse resultado, outro tipo de planejamento experimental, o Delineamento Composto Central (DCC), possibilita a determinação de uma superfície de resposta variando os efeitos em 5 níveis. Ao final dessas etapas, conclui-se quais fatores causam efeito na resposta analisada, e sob que condições o efeito pode ser maximizado ou minimizado.

Neste estudo, foram analisados os efeitos da suplementação de seis elementos traço na produção de metano a partir de vinhaça de cana-de-açúcar acidificada, em reator metanogênico, por meio de DFF. Posteriormente, a partir de DCC, pretendeu-se otimizar os fatores que tiveram efeito significativo positivo na etapa anterior, com o objetivo de se determinar as concentrações a serem adicionadas desses elementos traço que maximizassem a produção de metano.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Neste item será apresentada uma contextualização dos maiores produtores de etanol e açúcar do mundo, destacando-se o papel do Brasil e, particularmente, do Estado de São Paulo. A vinhaça de cana-de-açúcar é identificada no processo, e apontam-se suas características físico-químicas, discutindo seu impacto ambiental e alto potencial como substrato para produção de biogás. Assim, os fundamentos da digestão anaeróbia são apresentados, e a adoção do processo com separação de fases é justificada.

Abordam-se o papel dos elementos traço na digestão anaeróbia e os delineamentos experimentais escolhidos para identificar e otimizar os elementos que possuem efeito significativo positivo de forma a maximizar a produção de metano.

### 2.1 Produção sucroalcooleira a partir de cana-de-açúcar

Segundo os dados de 2019 da *Renewable Fuels Association* (RFA, 2021), os Estados Unidos da América (EUA) seguem como maiores produtores de etanol do mundo, sendo responsáveis por 54,4% dos 109,8 bilhões de litros produzidos. O Brasil ocupa a segunda posição (29,6%), seguido da União Europeia (4,7%), com notável diferença (RFA, 2020).

Embora os EUA ocupem o primeiro lugar na produção de etanol, a eficiência do milho, matéria prima utilizada pelo país, é muito inferior à eficiência da cana-de-açúcar, empregada no Brasil. De acordo com Shapouri, Duffield e Wang (2002), a relação entre a energia produzida a partir do milho e a energia fóssil consumida é de 1,34. Macedo, Seabra e Silva (2008) indicam que essa relação para a cana-de-açúcar depende de diversos fatores, como produtividade da cana-de-açúcar, excedentes de eletricidade e de bagaço e aproveitamento do diesel, variando de 8,3 em 2002 a 9,3 em 2006.

Em relação ao açúcar, a estimativa da produção mundial para a safra 2019/20 foi de 166 milhões de toneladas, aproximadamente, sendo o Brasil responsável pela produção de 18,1% deste total, seguido pela Índia (17,5%) e União Europeia (10,3%) (USDA, 2020). Além de ser o maior produtor de açúcar, o país também é o maior exportador, sendo responsável por 36,2% das 53 mil toneladas exportadas, seguido pela Tailândia (13,1%) e Índia (10,9%) (USDA, 2020).

No Brasil, foram produzidos 35,6 bilhões de litros de etanol a partir da safra 2019/20, divididos entre 34 bilhões de litros de etanol a partir de cana-de-açúcar, e 1,6 bilhão de litros de etanol à base de milho. Já a quantidade de açúcar produzido foi de 29,8 milhões de toneladas (CONAB, 2020) - montante equivalente ao estimado pela USDA (2020), conforme exposto anteriormente.

Entre os estados brasileiros, o Estado de São Paulo é o maior produtor de açúcar e etanol, de acordo com os dados da CONAB (2020). A safra 2019/20 de São Paulo produziu 61,7% do total de açúcar do país, e 48,5% do total de etanol a partir da cana-de-açúcar (CONAB, 2020).

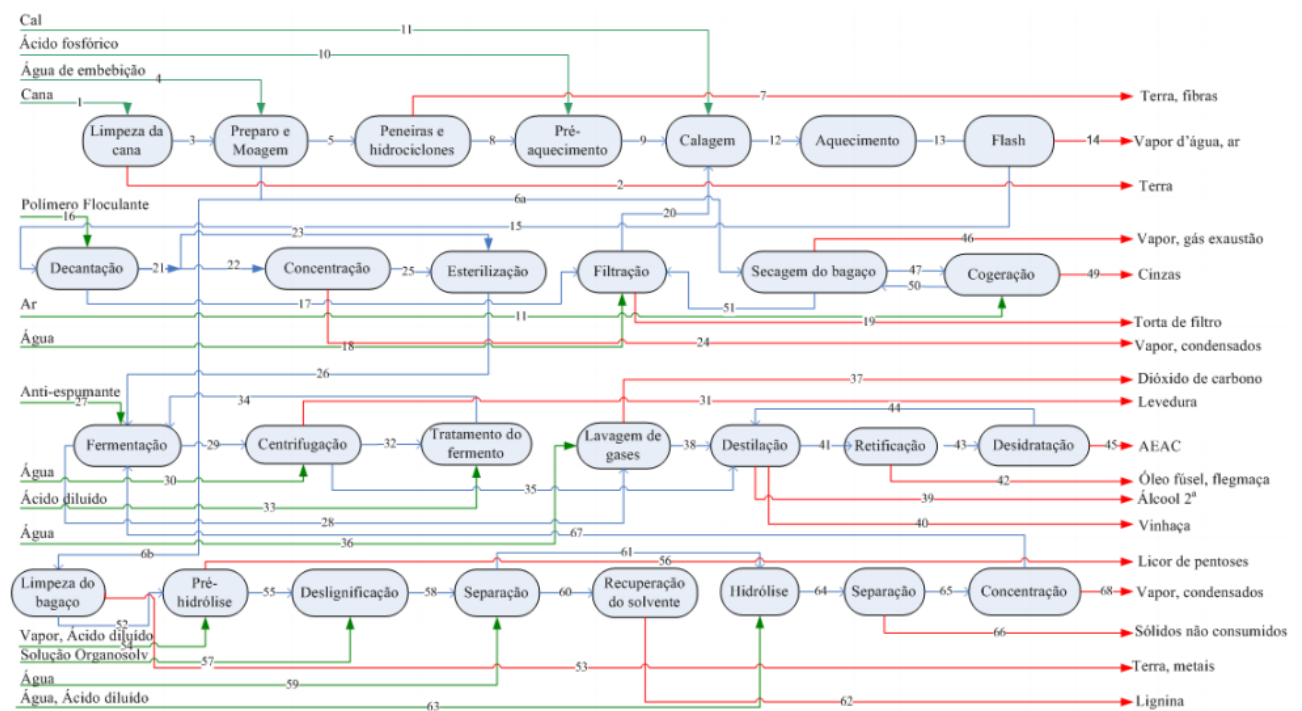
O processo de produção de etanol a partir de cana-de-açúcar é composto por diversas etapas, como mostra a Figura 1. Após ser realizada a colheita e a limpeza da cana-de-açúcar, é feita a extração dos açúcares, gerando como produtos o caldo e o bagaço (DIAS, 2008). O destino mais frequente do bagaço é sua queima em caldeiras, produzindo vapor e energia elétrica, o que permite que as usinas sejam autossuficientes ou mesmo se tornem fornecedoras de energia elétrica. Além disso, o bagaço ou a palha também podem ser utilizados para a produção de etanol celulósico - ou etanol de segunda geração – por meio do processo de hidrólise com ácidos ou enzimas específicas, sendo esta tecnologia presente no país em três empresas privadas do setor sucroenergético e de tecnologia (LORENZI; ANDRADE, 2019). Porém, mesmo que o Brasil ocupe a quarta posição em capacidade instalada para a produção de etanol celulósico, apenas 10% do potencial anual é de fato produzido, devido a dificuldades na etapa de pré-tratamento (LORENZI; ANDRADE, 2019).

A próxima etapa do processo é o tratamento do caldo, composto por tratamentos físicos e químicos, e tem como objetivo a recuperação da sacarose. Ao final deste processo, é gerado o mosto, nome dado ao caldo concentrado e esterilizado, pronto para ser enviado à unidade de fermentação (DIAS, 2008). Segundo a mesma autora, na fermentação alcoólica a levedura *Saccharomyces cerevisiae* catalisa uma série de reações químicas a fim de transformar a glicose em etanol e gás carbônico. Para o processo de fermentação, destaca-se o tratamento do fermento, que recebe adição de ácido (Figura 1). O ácido utilizado é o sulfúrico, e sua adição é o método mais empregado com a finalidade de controlar a contaminação do processo causada pelo desenvolvimento de bactérias (BARTH et al., 2014). O ácido sulfúrico diminui o pH do meio para entorno de 2, e as funções metabólicas da levedura são interrompidas até que o mosto seja alimentado no tanque de fermento, quando o pH se eleva a 5 e as funções das células são recuperadas (BARTH et al., 2014). Porém, aponta-se uma influência negativa desse método no

metabolismo da levedura, e conseqüentemente no tempo de fermentação e no rendimento do etanol (BARTH et al., 2014).

A vinhaça é produzida na etapa subsequente, sendo um dos resíduos do processo de destilação, como mostra a Figura 1. Na unidade de destilação é produzido o álcool etílico hidratado combustível (AEHC) (DIAS, 2008), que possui teor alcoólico entre 92,6 e 93,8% em massa de etanol (BRASIL, 2005), e pode ser utilizado diretamente em motores movidos a álcool ou em carros bicombustíveis. Por fim, a última etapa é a de desidratação, que tem como produto o álcool etílico anidro combustível (AEAC) (DIAS, 2008), com teor alcoólico de, no mínimo, 99,3% em massa (BRASIL, 2005), e é utilizado como aditivo na gasolina.

Figura 1 - Processo de produção de etanol anidro a partir do caldo e do bagaço da cana-de-açúcar



Fonte: Dias (2008).

Segundo Silva, Griebeler e Borges (2007), para cada litro de etanol, são produzidos de dez a dezoito litros de vinhaça. Marques et al. (2013) indicam uma proporção de um para treze. Considerando esta última proporção, foram gerados 442 bilhões de litros de vinhaça na safra brasileira 2019/20, aproximadamente.

## 2.2 Características da vinhaça e seu impacto ambiental

O atual destino da vinhaça é a fertirrigação, que consiste no despejo da vinhaça *in natura* no solo, com o objetivo de fertilizá-lo e irrigar a cultura de cana-de-açúcar (CAMARGO et al., 2009). Embora a vinhaça possa ser considerada fertilizante pelo seu alto teor de nutrientes como cálcio, nitrogênio, fósforo e potássio (MORAN-SALAZAR et al., 2016), diversos impactos podem ser causados devido ao seu alto potencial poluidor, sendo a carga orgânica cem vezes maior do que a do esgoto doméstico (CHRISTOFOLETTI et al., 2013).

As características físico-químicas da vinhaça são bastante variáveis, como mostra a Tabela 1. Em geral, ela pode ser classificada como ácida, com alta condutividade elétrica devido à presença de diversos sais orgânicos e inorgânicos, alto teor de matéria orgânica, demanda química de oxigênio (DQO) e demanda bioquímica de oxigênio (DBO), e nutrientes, (MAHIMARAJA; BOLAN, 2004). Godoi et al. (2019) verificaram a variação sazonal da vinhaça, e atribuíram como principais fatores relacionados à sazonalidade da vinhaça o cultivo da cana-de-açúcar e todo o processo da cana-de-açúcar para etanol, sendo o clima no Brasil um aspecto menos importante. Santos et al. (2019) analisaram a vinhaça de diferentes tipos de usina: usina anexada, que produz açúcar e etanol, usina autônoma de etanol, e usina de cachaça, e verificaram que a vinhaça pode ser eficientemente utilizada como substrato para a geração de bioenergia, a despeito de sua origem.

Tabela 1 - Caracterização físico-química da vinhaça de cana-de-açúcar segundo diferentes autores  
(continua)

Parâmetros	Autores			
	Conceição (2016)	Fuess (2017)	Godoi et al. (2019)	Santos et al. (2019)
DBO (g.L <sup>-1</sup> )	8,5	9,7 - 19,2	4,5 - 20	8,8 - 23,2
DQO (g.L <sup>-1</sup> )	18,4	21,7 - 32,2	27 - 42	17,9 - 58,3
Razão DBO/DQO	-	0,44 - 0,60	0,15 - 0,66	0,49 - 0,54
pH	7,2	4,3 - 4,7	4,01 - 6,47	3,34 - 4,63
Sólidos totais (mg ST.L <sup>-1</sup> )	-	-	6875-36645	-
Sólidos fixos totais (mg SFT.L <sup>-1</sup> )	-	-	1719 - 14163	-
Sólidos voláteis totais (mg SVT.L <sup>-1</sup> )	-	-	4720 - 26289	14035 - 21565
Sólidos suspensos totais (mg SST.L <sup>-1</sup> )	-	-	1200 - 10937	-
Sólidos suspensos fixos (mg SSF.L <sup>-1</sup> )	-	-	30 - 5275	-



Tabela 1 - Caracterização físico-química da vinhaça de cana-de-açúcar segundo diferentes autores (conclusão)

Parâmetros	Autores			
	Conceição (2016)	Fuess (2017)	Godoi et al. (2019)	Santos et al. (2019)
Sólidos suspensos voláteis (mg SSV.L <sup>-1</sup> )	-	781 - 1411	1160 - 10240	-
Condutividade (µS.cm <sup>-1</sup> )	-	-	11600 - 17710	-
Glicerol (mg.L <sup>-1</sup> )	-	-	90 - 5440	2598 - 3210
Ácido acético (mg.L <sup>-1</sup> )	-	-	60 - 3800	153 - 1660
Ácido propiônico (mg.L <sup>-1</sup> )	-	-	40 - 2550	0 - 64
Ácido láctico (mg.L <sup>-1</sup> )	-	-	610 - 6450	917 - 4200
Ácido butírico (mg.L <sup>-1</sup> )	-	-	-	0 - 468
Etanol (mg.L <sup>-1</sup> )	-	-	< LD* - 450	154 - 15848
Metanol (mg.L <sup>-1</sup> )	-	-	340 - 4550	0 - 594
Carboidratos (g.L <sup>-1</sup> )	1,94	3,9 - 6,9	-	3,9 - 4,7
Fenóis (mg.L <sup>-1</sup> )	0,768	0,5 - 3,5	0,09 - 3,92	361 - 1706
Sulfato (mg.L <sup>-1</sup> )	320	1044 - 2079	669 - 3298	330 - 2000
NTK (mg.L <sup>-1</sup> )	236,11	598 - 1243	119 - 540	-
P (mg.L <sup>-1</sup> )	-	21 - 290	44 - 232	-
Mg (mg.L <sup>-1</sup> )	180	2,01 - 4,33	343 - 669	-
Ca (mg.L <sup>-1</sup> )	506	812 - 2280	292 - 641	-
K (mg.L <sup>-1</sup> )	860	2500 - 4175	1542 - 3961	-
Na (mg.L <sup>-1</sup> )	20,7	16,8 - 66,0	27 - 57	-
Co (mg.L <sup>-1</sup> )	0,163	0,13 - 0,26	< LD* - 0,035	-
Cu (mg.L <sup>-1</sup> )	0,298	0,19 - 0,48	< LD* - 1,160	-
Fe (mg.L <sup>-1</sup> )	52,7	8,34 - 9,93	5,72 - 18,6	-
Mn (mg.L <sup>-1</sup> )	5,23	2,01 - 4,33	1,04 - 4,62	-
Ni (mg.L <sup>-1</sup> )	0,285	0,12 - 0,29	< LD* - 0,17	-
Se (mg.L <sup>-1</sup> )	-	-	< LD* - 0,076	-

\* LD: Limite de detecção.

Fonte: O Autor.

A aplicação da vinhaça no solo aumenta sua condutividade elétrica, favorecendo a lixiviação de nitratos e metais até aquíferos (MORAN-SALAZAR et al., 2016). A alta concentração de sais, como sulfatos, cloretos e nitratos também pode causar a salinização do solo, reduzindo seu potencial osmótico e prejudicando a absorção de água e nutrientes pelas plantas, além de gerarem toxicidade devido a íons específicos e destruírem a estrutura do solo (FUESS; GARCIA, 2014). A presença de íons de sódio no solo, por exemplo, pode causar a obstrução dos poros ao desestruturar os agregados do solo, diminuindo os níveis de oxigênio

dissolvido e favorecendo a formação de condições anaeróbias (FUESS; GARCIA, 2014). Além disso, altas concentrações de nitrogênio podem estimular o crescimento das plantas acima do desejado, ocasionando a retenção excessiva de água nos seus tecidos, afetando a qualidade e quantidade da colheita (FUESS; GARCIA, 2014). Os autores também indicam acidificação permanente do solo e dos recursos hídricos devido ao baixo pH da vinhaça.

Nos ambientes aquáticos, o alto teor de matéria orgânica da vinhaça pode causar a proliferação de microrganismos que esgotam o oxigênio dissolvido na água, matando a flora e a fauna aquáticas (CHRISTOFOLETTI et al., 2013). Moran-Salazar et al. (2016) apontam como principal causa da eutrofização as altas concentrações de nitrogênio e fósforo da vinhaça, e afirmam que além de ocorrer nos corpos d'água, esse processo também pode ocorrer no solo. De fato, Gunkel et al. (2007) revelam alterações no rio Ipojuca (PE) à jusante de uma área com fertirrigação de cana-de-açúcar, como o aquecimento da água, acidificação, aumento da turbidez e diminuição do oxigênio dissolvido.

Durante o armazenamento, transporte e disposição final da vinhaça no solo, também ocorre a liberação de gases de efeito estufa, como gás carbônico, óxido nitroso e metano, resultado da decomposição do alto teor de matéria orgânica presente na vinhaça (MORAN-SALAZAR et al., 2016).

Oliveira et al. (2013) indicam que a emissão de  $\text{CO}_2$  é triplicada nas áreas em que ocorre fertirrigação da vinhaça no solo. A emissão de  $\text{N}_2\text{O}$  também aumenta substancialmente, variando de  $-35,8$  a  $49,3 \mu\text{g N}_2\text{O-N.m}^{-2}.\text{h}^{-1}$  na área controle em que há queima da palha, comparada ao intervalo de  $11,8$  a  $327,0 \mu\text{g N}_2\text{O-N.m}^{-2}.\text{h}^{-1}$  na área com fertirrigação e mesmo tipo de colheita, sendo os valores negativos referentes ao consumo do gás pelos microrganismos do solo (OLIVEIRA et al., 2013). Nas áreas em que não é realizada a queimada, essa taxa varia de  $-0,6$  a  $169,3 \mu\text{g N}_2\text{O-N.m}^{-2}.\text{h}^{-1}$  na área controle para  $47,3$  a  $592,0 \mu\text{g N}_2\text{O-N.m}^{-2}.\text{h}^{-1}$  na área com fertirrigação (OLIVEIRA et al., 2013). No caso do  $\text{CH}_4$ , os autores indicam que a fertirrigação não altera o fluxo do gás no solo.

Apesar de diversos estudos apontarem os impactos ambientais causados pela vinhaça, há pouca regulamentação federal que estabeleça critérios para sua destinação. Encontram-se apenas as Portarias 323, de 29 de novembro de 1978 (BRASIL, 1978) e 158, de 03 de novembro de 1980 (BRASIL, 1980), que proíbem o lançamento direto ou indireto da vinhaça em qualquer coleção hídrica, desde a safra de 1979/80.

No Estado de São Paulo, a Norma Técnica P4.231 da CETESB, com sua primeira edição homologada em 2005, estabelece critérios e procedimentos para aplicação da vinhaça em solo agrícola. Porém, o cálculo da dosagem máxima a ser aplicada se baseia apenas no limite de saturação de potássio no solo, considerando a concentração de potássio presente na vinhaça e no solo, e a capacidade de troca catiônica do solo (SÃO PAULO, 2015), não estabelecendo limites de concentração para outros possíveis contaminantes.

Devido ao alto teor de matéria orgânica presente na vinhaça, esse resíduo pode ser substrato para a digestão anaeróbia, que poderia reduzir suas características poluentes por meio da degradação das substâncias orgânicas tóxicas e sua transformação em resíduos biodegradáveis (ESPAÑA-GAMBOA et al., 2011). O efluente de tratamentos anaeróbios, além de possuir níveis baixos de matéria orgânica, também apresenta pouco sulfato, pois este é reduzido a sulfeto durante o processo, e mantém os nutrientes importantes para o solo, como potássio, nitrogênio e fósforo (MORAES et al., 2014).

Ademais, o tratamento anaeróbio da vinhaça tem alto potencial para produção de biogás. Nesse sentido, é importante identificar as variações sazonais em suas características físico-químicas, pois podem prejudicar a estabilidade do processo, mas não são um impedimento para sua realização (GODOI et al., 2019). Vinhaças de diferentes tipos de usina também são adequadas como substrato do tratamento anaeróbio, como indicam Santos et al. (2019), não afetando a produção de metano como biogás. A energia potencial elétrica das vinhaças de três usinas diferentes poderia substituir 89% do carvão ou 22% do gás natural utilizado no Brasil (SANTOS et al., 2019).

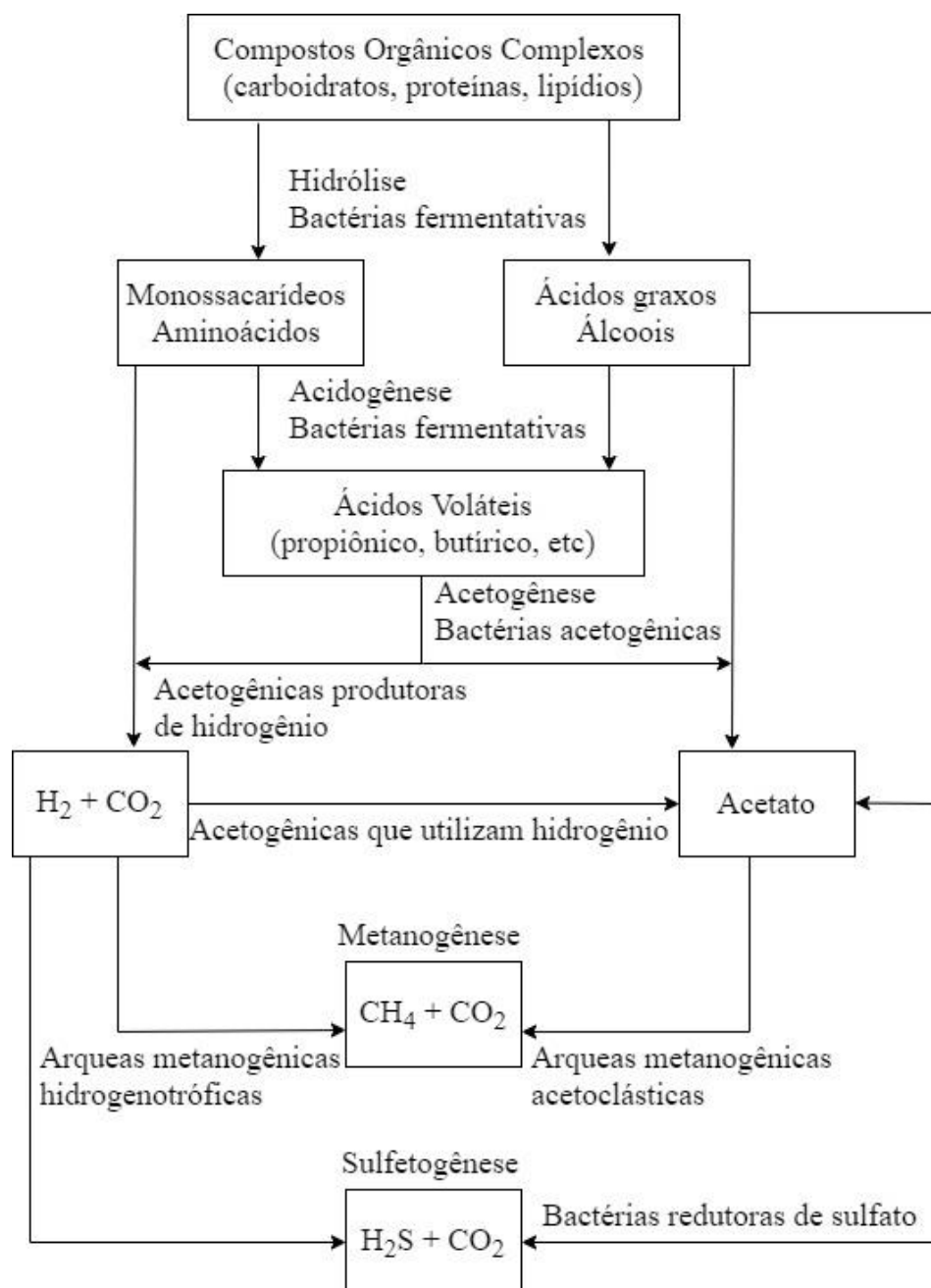
Moraes et al. (2014) calculam que o potencial anual de energia elétrica da vinhaça produzida a partir de uma única biorrefinaria de cana-de-açúcar, sendo autônoma ou anexa, poderia suprir a demanda de eletricidade de uma cidade de aproximadamente 130 mil habitantes, correspondendo a 7,5% da energia elétrica gerada em Itaipu. Para as usinas, a energia excedente comercializada a partir do bagaço aumentaria em 55% com a biodigestão da vinhaça (MORAES et al., 2014). Os autores complementam que se o biogás fosse utilizado nas caldeiras, ele substituiria 12% do bagaço utilizado, e este poderia ganhar outro destino, como a produção de etanol de segunda geração ou comercialização.

Dessa forma, a fertirrigação da vinhaça sem tratamento prévio, além de causar diversos prejuízos ambientais, representa um grande desperdício do seu potencial energético.

## 2.3 Fundamentos da digestão anaeróbia

A digestão anaeróbia conta com um consórcio de microrganismos formado por bactérias fermentativas, acetogênicas, redutoras de sulfato e arqueas metanogênicas, como mostra a Figura 2.

Figura 2 - Principais processos e microrganismos envolvidos na digestão anaeróbia



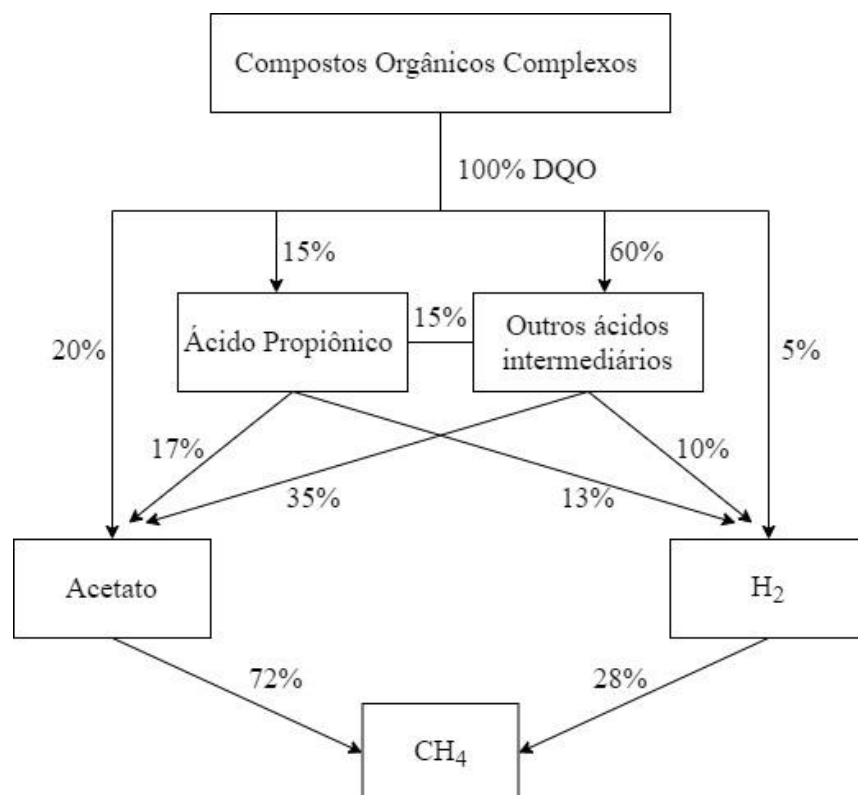
Fonte: O Autor, adaptado de Chernicharo (2007).

Na primeira etapa, os complexos orgânicos são hidrolisados pelas bactérias quimioheterotróficas, resultando em açúcares simples, os quais podem penetrar a membrana celular e serem convertidos em álcoois, ácidos voláteis, hidrogênio e dióxido de carbono (SPEECE, 1983). Depois, os álcoois e ácidos voláteis com mais de dois carbonos são oxidados a acetato e hidrogênio pelas bactérias acetogênicas, que devem existir em relação simbiótica com as arqueas metanogênicas que utilizam hidrogênio (SPEECE, 1983).

Essa relação simbiótica deve ocorrer de modo que as arqueas metanogênicas hidrogenotróficas mantenham a pressão parcial de hidrogênio extremamente baixa, sendo a única forma de possibilitar as condições termodinâmicas favoráveis para a acetogênese (SPEECE, 1983). Caso contrário, ocorre o acúmulo dos ácidos voláteis, como o propiônico e o butírico (SPEECE, 1983). De fato, a grande quantidade de hidrogênio formado durante a acetogênese possui dois destinos: o consumo pelas arqueas metanogênicas hidrogenotróficas ou a formação de ácidos orgânicos, como o propiônico e o butírico, através da reação entre hidrogênio, dióxido de carbono e ácido acético (CHERNICHARO, 2007). A produção de acetato no sistema é importante pois garante o fornecimento desse substrato para as arqueas metanogênicas acetoclásticas, e 72% da DQO é convertida a  $\text{CH}_4$  por via acetoclástica (Figura 3) (MCCARTY; SMITH, 1986).

Os principais gêneros de arqueas metanogênicas acetoclásticas são *Methanosaeta* e *Methanosarcina*, embora este último gênero contenha espécies que também utilizam hidrogênio e metilaminas, enquanto apontam-se entre as hidrogenotróficas os gêneros *Methanobacterium*, *Methanospirillum* e *Methanobrevibacter* (CHERNICHARO, 2007).

Figura 3 - Porcentagens dos produtos formados durante a digestão anaeróbia



Fonte: O Autor, adaptado de McCarty e Smith (1986).

Como mostra a Figura 2, substratos que contêm grande concentração de sulfato, como a vinhaça, quando submetidos à digestão anaeróbia também estimulam o crescimento de bactérias redutoras de sulfato, que o utilizam como aceptor de elétrons liberados durante a oxidação de materiais orgânicos (CHERNICHARO, 2007).

Esse grupo de microrganismos é considerado muito versátil, pois são capazes de usar diversos substratos, como toda a cadeia de ácidos graxos voláteis, vários ácidos aromáticos, hidrogênio, metanol, etanol, glicerol, açúcares, aminoácidos e vários compostos fenólicos (CHERNICHARO, 2007). Como resultado de seu metabolismo, são produzidos sulfeto e gás carbônico através de oxidação completa, ou acetato e sulfeto por oxidação incompleta (LENS et al., 1998). Por essa razão, as bactérias redutoras de sulfato podem competir com bactérias acetogênicas e arqueas metanogênicas pelos mesmos substratos (BROWN et al., 2019).

Dessa forma, a metanogênese pode ser afetada por essa competição por doadores de elétrons entre arqueas metanogênicas e bactérias redutoras de sulfato (LENS et al., 1998). Ressalta-se que a redução de sulfato a sulfeto de hidrogênio é energeticamente favorecida em relação à produção de metano, considerando como substrato tanto o hidrogênio quanto o acetato (SPEECE, 1983). Entretanto, a competição por hidrogênio deve ganhar maior atenção do que

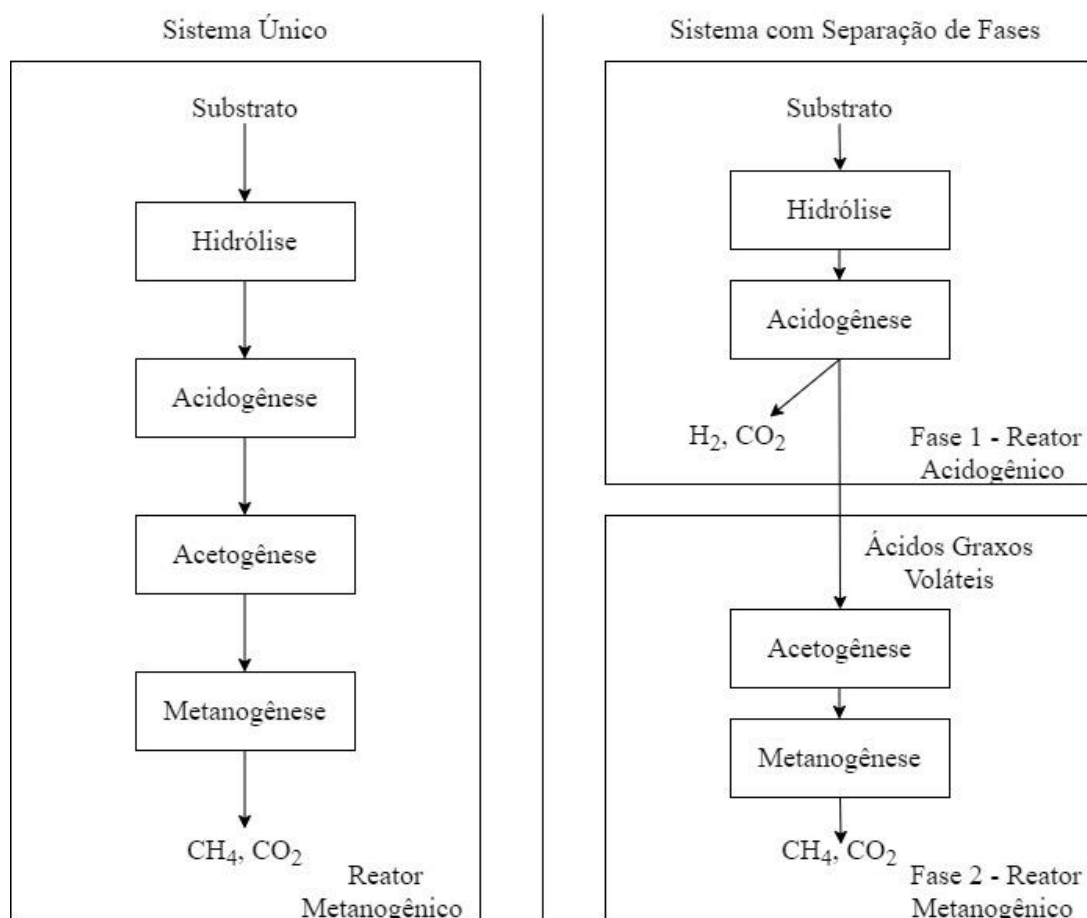
a competição por acetato, pois não ocorre inibição da metanogênese em sistemas anaeróbios cujo doador de elétrons é o acetato, e as metanogênicas podem inclusive se beneficiar com a produção de acetato pelas bactérias redutoras de sulfato por meio de oxidação incompleta (COSTA; O'FLAHERTY; LENS, 2020). A prevalência de um processo ou outro tem sido relacionada a diversos fatores, como a relação DQO/sulfato presente no meio, a capacidade de agregação microbiana e a temperatura (PAULO; STAMS; SOUSA, 2015).

Entre os gêneros de bactérias redutoras de sulfato que promovem oxidação completa dos substratos, estão *Desulfobacter*, *Desulfococcus*, *Desulfosarcina*, *Desulfobacterium* e *Desulfonema*, enquanto os gêneros *Desulfobulbus*, *Desulfomonas*, e a maioria das espécies dos gêneros *Desulfotomaculum* e *Desulfovibrio* fazem oxidação incompleta (CHERNICHARO, 2007).

## **2.4 Processos anaeróbios com separação de fases**

A separação de fases em sistemas anaeróbios consiste em separar as reações principais da digestão anaeróbia entre hidrólise e fermentação/acidogênese na primeira fase e acetogênese e metanogênese na segunda fase (FOX; POHLAND, 1994), como mostra a Figura 4.

Figura 4 - Processos anaeróbios em fase única e com separação de fases



Fonte: O Autor, adaptado de Fox e Pohland (1994).

As vantagens associadas à separação de fases são o isolamento e a otimização dos processos que são conhecidos como limitantes da taxa de degradação - a hidrólise e a metanogênese; além da melhora da cinética e da estabilidade das reações por meio do controle do pH de cada fase; melhora da estabilidade dos reatores em relação a choques de cargas; seleção de microrganismos de crescimento mais rápido; e potencial de desintoxicação na primeira fase (FOX; POHLAND, 1994). Além disso, a maior estabilidade do processo diminui a quantidade de alcalinizantes necessários a serem adicionados nos biodigestores (FUESS et al., 2017). Principalmente, os processos anaeróbios em que ocorre a separação de fases são considerados mais eficientes em termos de taxas de biodegradação e produtividade energética (SCHIEVANO et al., 2012).

Como desvantagens, a necessidade de um segundo reator eleva os custos, e a aplicabilidade e a configuração do reator são influenciadas por cada substrato, gerando uma maior dificuldade de implementação e operação (FOX; POHLAND, 1994). Além disso, citam-



se a interrupção de relações sintróficas entre bactérias acidogênicas e arqueas metanogênicas, nos casos de substratos em que essas relações são necessárias (FOX; POHLAND, 1994).

Nasr et al. (2012) alcançaram um aumento de 18,5% no rendimento de energia na digestão anaeróbia da vinhaça filtrada de milho, por meio do aumento no rendimento do metano e da energia adicional produzida a partir do hidrogênio no sistema com separação de fases. Além disso, nesse sistema a biodegradabilidade da vinhaça foi de 99%, comparada com 88,2% em sistema único (NASR et al., 2012).

Fu et al. (2017) realizaram a comparação entre sistemas utilizando como substrato a vinhaça oriunda da produção de licor na China, cujos ingredientes principais são grãos, como sorgo, arroz e trigo. No sistema com separação de fases, o rendimento cumulativo de metano foi 10,8% maior do que no sistema único, resultando em um tempo de digestão 4 dias mais curto, isto é, o número de dias necessários para obter 80% do rendimento total de biogás (FU et al., 2017).

Ferraz Júnior (2013), ao estudar a digestão anaeróbia da vinhaça de cana-de-açúcar com separação de fases e em sistema único, mostrou ganhos ambientais e energéticos no tratamento com separação de fases. O autor indicou que as eficiências de remoção da matéria orgânica total e solúvel passaram de 60,7% e 72,6% no sistema único para 74,6% e 96,1% no sistema combinado, aproximadamente. E a biodegradabilidade da vinhaça aumentou de 66,0% para 87,4% (FERRAZ JÚNIOR, 2013). Ademais, embora o rendimento energético do hidrogênio produzido no reator acidogênico tenha sido muito inferior ao do metano ( $1,5 \text{ W.L}^{-1}_{\text{vinhaça}}$  contra  $44,2 \text{ W.L}^{-1}_{\text{vinhaça}}$ ), no sistema com separação de fases a extração de energia aumentou 25,7% em comparação com o sistema único, e o hidrogênio pode ser utilizado com um biogás ideal e é produzido de forma rápida (FERRAZ JÚNIOR, 2013).

Também analisando a vinhaça de cana-de-açúcar como substrato, Fuess et al. (2017) concluíram que a adoção do sistema de separação de fases é economicamente viável para implantação em escala real nas biorrefinarias, pois os custos relacionados à produção de biogás e eletricidade são equivalentes ou menores do que em sistemas de fase única, apesar do maior custo operacional e de implementação.

## 2.5 Importância dos elementos traço na digestão anaeróbia

Além de macronutrientes como carbono, nitrogênio, fósforo e enxofre, microrganismos anaeróbios também precisam de elementos traço, ou micronutrientes, em concentrações relativamente baixas para seu metabolismo (CHOONG et al., 2016). Os requisitos nutricionais dos microrganismos na digestão anaeróbia representam um fator essencial para a estabilidade do processo, e a falta dos nutrientes pode resultar em uma degradação incompleta dos substratos e levar o biodigestor ao fracasso (KAYHANIAN; RICH, 1995).

A maioria dos metais pesados são elementos de transição com o orbital “d” incompletamente preenchido, dando origem a cátions com a capacidade de formar compostos complexos que podem ser ou não redox ativos (NIES, 1999). Então, esses cátions desempenham um papel importante como elementos traço em reações bioquímicas (NIES, 1999), tendo funções na formação do sítio ativo, do cofator e da própria estrutura de metaloenzimas, importante grupo de enzimas necessárias para a produção de metano tanto pela rota acetoclástica como pela rota hidrogenotrófica (CHOONG et al., 2016). O Quadro 1 sintetiza as principais funções dos elementos traço estudados.

Quadro 1 - Principais funções dos elementos traço estudados para a digestão anaeróbia

Metal	Principais funções	Referências Bibliográficas
Cobalto (Co)	Estrutura do fator III (metiltransferase); corrinóides.	Ferry (2010); Paulo et al. (2004).
Cobre (Cu)	Acetil-coenzima A decarbonilase/sintase em metanogênicas acetoclásticas.	Doukov et al. (2002); Seravalli et al. (2003).
Ferro (Fe)	Incentiva a conversão do propionato para acetato e a acetogênese; sítio ativo da maioria das hidrogenases em metanogênicas hidrogenotróficas; acetil-coenzima A decarbonilase/sintase em metanogênicas acetoclásticas; melhor desenvolvimento do lodo.	Meng et al. (2013); Sharma e Singh (2001); Mulrooney e Hausinger (2003).
Manganês (Mn)	Estabiliza a metiltransferase em metanogênicas; participa de reações redox.	Oleszkiewicz e Sharma (1990)
Níquel (Ni)	Sítio ativo da maioria das hidrogenases em metanogênicas hidrogenotróficas; acetil-coenzima A decarbonilase/sintase em metanogênicas acetoclásticas; cofator F <sub>430</sub> (metil-coenzima M reductase).	Mulrooney e Hausinger (2003); Ferry (2010).
Selênio (Se)	Presente na formato desidrogenase em metanogênicas.	Jones e Stadtman (1981)

Fonte: O Autor.

O cobalto, o ferro e o níquel são apontados como os elementos traço mais importantes para a digestão anaeróbia (CHOONG ET AL., 2016; OLESZKIEWICZ; SHARMA, 1990). O cobalto faz parte da estrutura do fator III, subunidade da metiltransferase que participa de todas as rotas metanogênicas (FERRY, 2010). Este metal também está envolvido com corrinóides necessários para metanogênicas que utilizam metanol como substrato, podendo ocorrer uma competição por cobalto entre esses microrganismos e homoacetogênicas quando o metal está presente em altas concentrações, apontando-se a adição de 0,1  $\mu\text{M}$  de cobalto responsável por favorecer apenas a metanogênese (PAULO et al., 2004).

A suplementação de ferro incentiva a conversão do propionato para acetato por bactérias que utilizam propionato, e também aumenta as atividades das enzimas relacionadas à acetogênese (MENG et al., 2013). Isso pode favorecer a metanogênese pela prevenção do acúmulo de ácido propiônico e pela formação de acetato. Sharma e Singh (2001) mostram que a maior conversão do propionato a metano foi obtida com a suplementação de 50  $\text{mg.L}^{-1}$  de ferro na vinhaça de cana-de-açúcar. Além disso, o ferro está relacionado com um melhor desenvolvimento do lodo, sendo a sua suplementação apontada como principal fator para a maior taxa de sedimentação do lodo (SHARMA; SINGH, 2001).

O níquel é importante tanto para as metanogênicas hidrogenotróficas como para as acetoclásticas, pois para o primeiro grupo ele está presente no sítio ativo da maioria das hidrogenases, assim como o ferro, e para o segundo grupo o níquel faz parte da acetil-coenzima A decarbonilase/sintase (MULROONEY; HAUSINGER, 2003). Além disso, o níquel está presente no cofator  $\text{F}_{430}$  que compõe a metil-coenzima M reductase, que catalisa a etapa final da formação de metano e é exclusiva de metanogênicas (FERRY, 2010; MULROONEY; HAUSINGER, 2003).

O cobre, juntamente com o ferro e o níquel, faz parte da estrutura da acetil-coenzima A decarbonilase/sintase (DOUKOV et al., 2002; SERAVALLI et al., 2003). Essa enzima é responsável tanto pela decomposição quanto pela formação de acetato, portanto além das metanogênicas acetoclásticas, ela também é necessária para as bactérias acetogênicas e para as redutoras de sulfato (MULROONEY; HAUSINGER, 2003).

O manganês estabiliza a metiltransferase em metanogênicas e participa de reações redox (OLESZKIEWICZ; SHARMA, 1990). A característica do manganês de ser doador de elétrons para a metanogênese a partir do dióxido de carbono (rota hidrogenotrófica) é apontada por Qiao et al. (2015) como o motivo pelo qual sua suplementação a 4  $\text{g.L}^{-1}$  na digestão anaeróbia de efluente sintético obteve rendimento total de metano 3,4 vezes maior e velocidade de produção

4,4 vezes maior do que no controle. Por sua vez, Pankhania e Robinson (1984) observaram que a adição de manganês a uma concentração de 50  $\mu\text{M}$  estimulou a taxa da metanogênese pela rota hidrogenotrófica da *Methanospirillum hungatei*. Em condições anaeróbias o manganês se separa dos minerais e é reduzido à sua forma mais solúvel, tornando-se bastante disponível e bem distribuído entre as frações do lodo (BRAGA et al., 2017).

O selênio está presente em uma das duas formato desidrogenases descritas por Jones e Stadtman (1981) presentes na *Methanococcus vannielii*. A primeira é composta por ferro e molibdênio, e a outra é um complexo formado por uma proteína de selênio e outra proteína contendo ferro, molibdênio e enxofre (JONES; STADTMAN, 1981). Porém, a enzima que não contém selênio está presente nos microrganismos apenas quando há uma deficiência de selênio no meio, e nesse cenário a velocidade de crescimento dessas metanogênicas é baixa, sugerindo que a selenoenzima é uma catalisadora mais eficiente (JONES; STADTMAN, 1981).

Em estudo realizado por Facchin et al. (2013), tendo como substrato resíduos de comida, o selênio se destacou entre os elementos traço estudados por aumentar a produção de metano com ambos inóculos estudados – um rico e outro com deficiência de elementos traço. Para o inóculo com 9,1 mg Se/kg<sub>sólidos totais</sub>, a suplementação de 2 mg Se/kg<sub>sólidos totais</sub> aumentou em 10% a produção de metano; e para o inóculo com menos de 1 mg Se/kg<sub>sólidos totais</sub>, a suplementação de 10 mg Se/kg<sub>sólidos totais</sub> aumentou em 28% a produção de metano, aproximadamente (FACCHIN et al., 2013).

Nota-se que a exigência da adição de micronutrientes está relacionada à caracterização do substrato ou água residuária. Braga et al. (2018) estimaram uma velocidade de produção de metano de 12 mLCH<sub>4</sub>.gDQO<sup>-1</sup>.dia<sup>-1</sup> a partir de água negra sintética, ou seja, uma combinação de esgoto e efluente de suinocultura, com a suplementação de 3,0 mg.L<sup>-1</sup> de cobre e 0,98 mg.L<sup>-1</sup> de selênio. Takashima e Speece (1989) demonstraram concentrações mínimas de oito nutrientes a serem adicionadas em ácido acético para manter altos consumos volumétricos de acetato (de 30 a 40 g.L<sup>-1</sup>.dia<sup>-1</sup>) por arqueas metanogênicas a um baixo tempo de retenção de sólidos de 5 dias. Os autores indicam cargas volumétricas de metais de 0,1 mg.L<sup>-1</sup><sub>volume do reator</sub>.dia<sup>-1</sup> para o cobalto, 0,2 mg.L<sup>-1</sup><sub>volume do reator</sub>.dia<sup>-1</sup> para o níquel e 1 mg.L<sup>-1</sup><sub>volume do reator</sub>.dia<sup>-1</sup> para o ferro. Já Sharma e Singh (2001) obtiveram resultados positivos para a remoção de DQO, produção de metano e aumento da sedimentação do lodo a partir de vinhaça de cana-de-açúcar com a adição de 0,5 mg.L<sup>-1</sup> de cobalto, 0,1 mg.L<sup>-1</sup> de níquel e 10 mg.L<sup>-1</sup> de ferro.

Torna-se necessário estudar as concentrações requeridas de elementos traço na digestão anaeróbia pois, além de poder otimizar o processo, deve-se atentar para as concentrações acima

das quais os elementos apresentam toxicidade, atuando como inibidores das funções enzimáticas. Segundo Oleszkiewicz e Sharma (1990), os metais traço são majoritariamente inibidores não específicos, não competitivos e reversíveis, isto é, eles não competem com o substrato, mas ligam-se às enzimas ou ao complexo enzima-substrato. Porém, em alguns casos eles podem atuar como inibidores competitivos, substituindo o substrato procurado pela enzima, que pode ser, por exemplo, outro metal (OLESZKIEWICZ; SHARMA, 1990). Esse segundo caso depende da afinidade do metal com a enzima, assim como as concentrações relativas de cada metal que está competindo (OLESZKIEWICZ; SHARMA, 1990).

A toxicidade dos metais depende de diversos fatores, como descrevem Chen, Cheng e Creamer (2008). Apontam-se a concentração de cada metal, o tipo de substrato e a quantidade de sólidos voláteis presentes, assim como os gêneros de microrganismos; a forma química em que o metal se encontra; e a interação dos metais, sendo sinérgica ou antagonista (CHEN; CHENG; CREAMER, 2008).

## **2.6 Delineamento de experimentos: Fatorial Fracionado e Composto Central**

Um delineamento experimental pode ser entendido como o processo pelo qual alguns fatores são selecionados e variados de forma a analisar seus efeitos na resposta estudada (WANG; WAN, 2009).

Por muito tempo, os delineamentos experimentais que tinham os elementos traço como fatores analisados eram do tipo um-fator-por-vez, ou “delineamento de um fator”, como o utilizado por Takashima e Speece (1989), em que a concentração de um nutriente era variada enquanto a dos outros deveria ser mantida constante. Porém, como os próprios autores reconhecem, o problema desse método é a dificuldade na interpolação das interações entre os elementos. Além disso, ele não é econômico, consome bastante tempo e representa um desperdício de recursos (CHAGANTI et al., 2012).

Em contraste, delineamentos fatoriais possibilitam a identificação das interações entre os fatores, pois eles estudam os efeitos de mais de um fator em dois ou mais níveis (WANG; WAN, 2009), sendo os níveis o que se está variando para cada fator, por exemplo sua concentração. O DFF é escolhido ao invés do Delineamento Fatorial Completo quando o

número de fatores e níveis é tão elevado que representa um impedimento econômico e operacional (WANG; WAN, 2009).

O DFF é usado para identificar os fatores que apresentam efeito significativo na resposta estudada, podendo mostrar também as interações, como no estudo conduzido por Jiang et al. (2017). Os autores utilizaram esse delineamento para avaliar os efeitos do cobalto, ferro, molibdênio, níquel, selênio e tungstênio na degradação dos ácidos graxos voláteis a partir de resíduos de comida. Braga et al. (2018) e Keskin et al. (2018) utilizaram Planejamento Plackett-Burman, um tipo de DFF, para realizar essa triagem dos elementos. Braga et al. (2018) avaliaram o efeito do bário, cobalto, cobre, ferro, manganês, níquel, selênio e suas interações na produção de metano a partir de água negra sintética. Keskin et al. (2018) identificaram os elementos traço que tinham efeito significativo na produção de hidrogênio a partir de resíduos de frutas e vegetais, entre onze elementos pesquisados, incluindo os seis do presente estudo.

O DCC é utilizado na metodologia da superfície de resposta para estimar uma aproximação polinomial de segunda ordem (WANG; WAN, 2009). Os autores explicam que a superfície de resposta mostra visualmente os efeitos dos níveis analisados de cada fator sobre a resposta estudada, e indica interações entre fatores. Além disso, por meio da análise de variância (ANOVA), diferenciam-se os efeitos significativos dos que não são significativos, e por meio do modelo de regressão a resposta ótima pode ser calculada (WANG; WAN, 2009). Esse tipo de delineamento permite estipular sob quais níveis os fatores possibilitam máxima ou mínima resposta, otimizando o processo. Menon, Wang e Giannis (2017) estudaram a digestão anaeróbia em duas fases de resíduos de comida, e usaram DCC para maximizar a produção de metano por meio da suplementação de cálcio, cobalto, magnésio e níquel. Thungklin, Sittijunda e Reungsang (2018) também utilizaram esse delineamento experimental para otimizar a taxa de produção de metano com separação de fases a partir de bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado, e os fatores analisados foram pH inicial, concentração de níquel e concentração de ferro.

### 3. OBJETIVOS

O objetivo geral desta pesquisa consiste em avaliar a influência da suplementação dos micronutrientes cobalto (Co), cobre (Cu), ferro (Fe), manganês (Mn), níquel (Ni) e selênio (Se) na produção de metano a partir de vinhaça acidificada, buscando o aumento do aproveitamento energético da indústria sucroalcooleira. Para isso, os seguintes objetivos específicos foram definidos:

- i. Determinar a cinética de produção de metano a partir de vinhaça acidificada utilizando ensaios em modo batelada;
- ii. Identificar quais micronutrientes apresentam efeito estatisticamente positivo ou negativo nas respostas velocidade de produção, produção máxima e produtividade de metano;
- iii. Determinar uma faixa ótima de concentração para a suplementação dos elementos traço com efeito estatisticamente positivo nas respostas analisadas;
- iv. Validar a produção de metano obtida com suplementação de elementos traço otimizada estimada pelos modelos obtidos utilizando Delineamento Composto Central.
- v. Identificar o efeito da suplementação de elementos traço otimizada nas rotas metabólicas envolvidas na digestão anaeróbia.

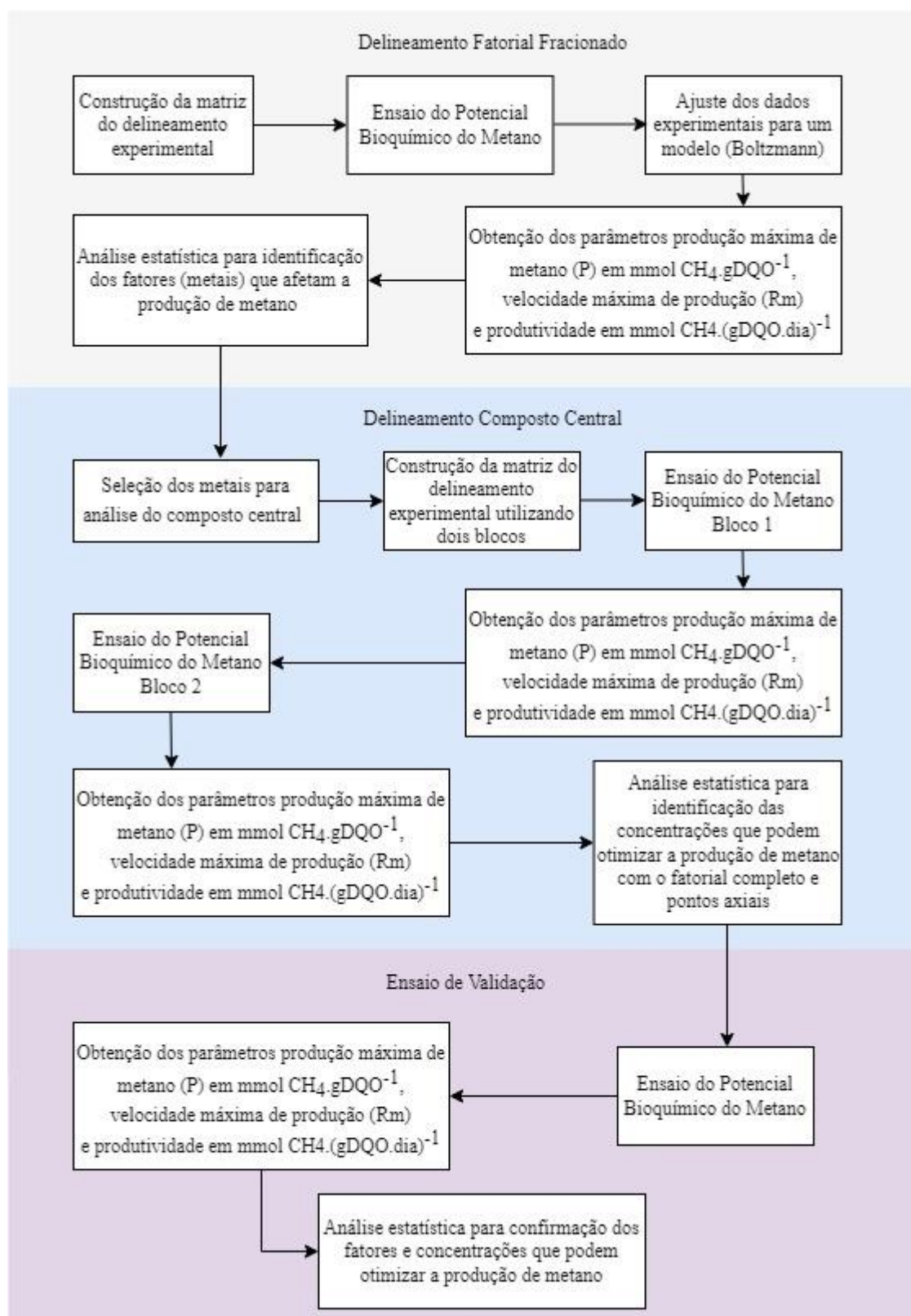




#### **4. MATERIAIS E MÉTODOS**

A Figura 5 indica o delineamento experimental utilizado para identificar e otimizar os fatores com efeito significativo positivo na produção de metano a partir de vinhaça de cana-de-açúcar, entre seis elementos traço estudados: Co, Cu, Fe, Mn, Ni e Se.

Figura 5 - Atividades do Delineamento Fatorial Fracionado, do Delineamento Composto Central e do Ensaio de Validação



#### 4.1 Teste de potencial bioquímico de metano (PBM)

O teste de potencial bioquímico de metano (PBM) foi utilizado como base para a avaliação dos metais, seguindo as matrizes de delineamentos estatísticos. Os ensaios em modo batelada utilizaram vinhaça acidificada obtida a partir de efluente de reator anaeróbio de leito estruturado (do inglês *anaerobic structured-bed reactor* - AnSTBR) acidogênico operado em condições termofílicas (55 °C) em modo contínuo (PIFFER et al., 2021), e armazenada a -18°C. Os autores buscavam investigar o estabelecimento da sulfetogênese no reator acidogênico a partir da vinhaça de cana-de-açúcar proveniente da usina São Martinho de açúcar, etanol e eletricidade localizada em Pradópolis, SP.

Os ensaios foram feitos em duplicata, com exceção do ensaio de validação, realizado em triplicata. Foram utilizados frascos de boro-silicato com 100 mL de volume reacional e 200 mL de headspace, mantidos em câmara (Multitron, Infors HT, Bottmingen, SUI) com agitação de 100 rpm em temperatura termofílica (55°C). O inóculo foi obtido de um reator anaeróbio de fluxo ascendente e manta de lodo (do inglês *upflow anaerobic sludge bed reactor* - UASB) metanogênico. O reator em escala real era operado em condições termofílicas e alimentado com vinhaça na usina São Martinho de açúcar, etanol e eletricidade localizada em Pradópolis, SP. O inóculo foi centrifugado por 10 minutos a 6000 rpm. A relação biomassa/substrato ( $\text{gSVT.gDQO}^{-1}$ ) foi de 0,3 (KIYUNA, FUESS e ZAIAT, 2017). Bicarbonato de sódio foi adicionado como agente tamponante do meio, a partir da relação bicarbonato/substrato de 0,5  $\text{gNaHCO}_3.\text{gDQO}^{-1}$ .

A pressão foi medida diariamente por meio do transdutor de pressão TPR-18 acoplado a uma interface BS 2000 (*Design Instruments*, Barcelona, ESP). A pressão, juntamente com o volume do headspace e a temperatura do ensaio (55°C), foi utilizada para calcular o número de mols do total de biogás produzido por meio da equação dos gases ideais. Esse número de mols, aliado à fração molar do  $\text{CH}_4$  obtida por cromatografia gasosa (CG), permitiu o cálculo do número de mols de  $\text{CH}_4$  produzido. A produção acumulada de metano ao longo do tempo, dividida pela DQO adicionada, foi ajustada à equação sigmoideal de Boltzmann (Equação 1), sendo a produção máxima de  $\text{CH}_4$  (P) obtida de seu parâmetro que define a assíntota da curva. Em seguida, a curva foi derivada em relação ao tempo para se obter a velocidade máxima (Rm). A produtividade foi considerada como o máximo valor obtido pela divisão da produção de metano acumulada, ajustada por Boltzmann, pelo tempo de experimento decorrido, sendo equivalente a uma máxima produção média.

Equação 1:

$$y = A1 + \frac{(A2 - A1)}{1 + e^{\frac{(x-x_0)}{dx}}}$$

Em que:

A1 = Assíntota inferior;

A2 = Assíntota superior;

X<sub>0</sub> = Ponto de inflexão da curva;

dX = Inclinação.

Os parâmetros P, Rm e produtividade foram as respostas consideradas para a análise do efeito dos metais. Assim, para o DFF, foi ajustada uma equação linear em função dos fatores (metais) testados, sem interações, a cada resposta utilizando os valores obtidos para as réplicas individualmente. Para o DCC, foi ajustada uma equação quadrática com interações para cada resposta utilizando a média dos valores obtidos para as duplicatas. A ANOVA foi utilizada para avaliar a significância do modelo e o efeito dos fatores.

Os reatores em batelada foram operados até que se estabilizasse a produção de metano, decorridas aproximadamente seis semanas para cada ensaio. No DFF, foi necessário refazer o ensaio de 3 condições, pois seus resultados foram inconsistentes no primeiro ensaio. Para isso, foram utilizados o mesmo lodo e a mesma vinhaça acidificada, submetidos a procedimentos e condições idênticos à primeira parte do ensaio. No primeiro bloco do DCC, 3 condições também apresentaram resultados inconsistentes, e por isso foram refeitas junto com as condições do segundo bloco.

## 4.2 Estudo dos metais traço na vinhaça utilizando o Delineamento Fatorial Fracionado

O efeito dos metais traço na produção de metano a partir da vinhaça foi avaliado através de ensaios com DFF. Para isso, foi construída a matriz experimental de concentrações testadas em ensaios de PBM. A matriz apresenta oito condições, cada uma em duplicata, sendo os pares de réplicas distribuídos aleatoriamente (Tabela 2). As réplicas foram identificadas com o prefixo “DFF” seguido de algarismos romanos (1 a 16), distribuídos aleatoriamente pelo

software Statistica®. Assim, o par de réplicas “DFF-7” e “DFF-15” se referem às duplicatas da condição 2 do ensaio de DFF.

Foram analisados seis fatores, sendo eles os metais Co, Ni, Se, Cu, Fe e Mn. As soluções foram preparadas para que os volumes adicionados fosse o mesmo para todos os metais, e igual a 0,7 mL. Ademais, os fatores foram analisados em dois níveis: -1 representando nenhuma adição, além das concentrações já originalmente presentes na vinhaça e no lodo, e +1 indicando adição. Para os metais Co, Ni e Se, o nível +1 correspondeu a uma adição de 0,3 mg.L<sup>-1</sup>; e para os metais Cu, Fe e Mn, adição de 5 mg.L<sup>-1</sup> (Tabela 2). Essas concentrações foram estipuladas a partir dos valores obtidos para esses metais na caracterização da vinhaça e lodo (Item 5.1).

Tabela 2 - Níveis dos fatores em cada condição utilizando Delineamento Fatorial Fracionado

Condições	Duplicatas	Níveis e Concentrações dos Fatores (mg.L <sup>-1</sup> )					
		Co	Cu	Fe	Mn	Ni	Se
1	DFF-2 e DFF-10	+1 (0,3)	-1 (0)	-1 (0)	-1 (0)	-1 (0)	+1 (0,3)
2	DFF-7 e DFF-15	-1 (0)	+1 (5)	+1 (5)	-1 (0)	-1 (0)	+1 (0,3)
3	DFF-5 e DFF-13	-1 (0)	-1 (0)	+1 (5)	+1 (5)	-1 (0)	-1 (0)
4	DFF-1 e DFF-9	-1 (0)	-1 (0)	-1 (0)	+1 (5)	+1 (0,3)	+1 (0,3)
5	DFF-4 e DFF-12	+1 (0,3)	+1 (5)	-1 (0)	+1 (5)	-1 (0)	-1 (0)
6	DFF-6 e DFF-14	+1 (0,3)	-1 (0)	+1 (5)	-1 (0)	+1 (0,3)	-1 (0)
7	DFF-3 e DFF-11	-1 (0)	+1 (5)	-1 (0)	-1 (0)	+1 (0,3)	-1 (0)
8	DFF-8 e DFF-16	+1 (0,3)	+1 (5)	+1 (5)	+1 (5)	+1 (0,3)	+1 (0,3)

Fonte: O Autor.

#### 4.3 Estudo dos metais traço na vinhaça utilizando o Delineamento Composto Central

O DCC foi dividido em dois blocos devido ao número de condições (16 condições em duplicata), sendo o primeiro bloco composto por um fatorial completo e o segundo composto pelos pontos axiais, ambos com pontos centrais. Na matriz do primeiro bloco (Tabela 3), percebem-se 3 concentrações diferentes dos metais selecionados que foram aplicadas a cada

condição, representando os níveis -1, 0 e 1. O segundo bloco (Tabela 4) englobou os pontos axiais, de níveis -1,682 e +1,682, que são definidos pelo próprio método.

Com base nos resultados do DFF, foi feita a matriz de concentrações do primeiro bloco (Tabela 3) e do segundo bloco (Tabela 4). Para os metais Co e Ni, os níveis -1,682, -1, 0, +1 e +1,682 correspondem, respectivamente, a adições de 0,16 mg.L<sup>-1</sup>, 0,3 mg.L<sup>-1</sup>, 0,5 mg.L<sup>-1</sup>, 0,7 mg.L<sup>-1</sup> e 0,84 mg.L<sup>-1</sup> (Tabelas 3 e 4). Para o Mn, esses níveis correspondem a adições de 2,61 mg.L<sup>-1</sup>, 5 mg.L<sup>-1</sup>, 8,5 mg.L<sup>-1</sup>, 12 mg.L<sup>-1</sup> e 14,39 mg.L<sup>-1</sup> (Tabela 3 e Tabela 4). As réplicas foram identificadas pelo prefixo “DCC” seguida de algarismos romanos (1 a 32) que remetem às condições testadas. No segundo bloco foram refeitas as condições do primeiro bloco cujos resultados haviam sido inconsistentes (indicadas como condições 8 e 9 do segundo bloco, Tabela 4). A condição de ponto central – indicada como 7 no primeiro bloco (Tabela 3) e 1 no segundo bloco (Tabela 4) – é naturalmente repetida de acordo com o método, e também havia apresentado resultados inconsistentes no primeiro bloco.

Tabela 3 - Níveis dos fatores do primeiro bloco do Delineamento Composto Central

Condições	Duplicatas	Níveis e Concentrações dos Fatores (mg.L <sup>-1</sup> )		
		Co	Mn	Ni
1	DCC-8 e DCC-24	+1 (0,7)	+1 (12)	+1 (0,7)
2	DCC-2 e DCC-18	-1 (0,3)	-1 (5)	+1 (0,7)
3	DCC-1 e DCC-17	-1 (0,3)	-1 (5)	-1 (0,3)
4	DCC-3 e DCC-19	-1 (0,3)	+1 (12)	-1 (0,3)
5	DCC-4 e DCC-20	-1 (0,3)	+1 (12)	+1 (0,7)
6	DCC-5 e DCC-21	+1 (0,7)	-1 (5)	-1 (0,3)
7	DCC-9 e DCC-25	0 (0,5)	0 (8,5)	0 (0,5)
8	DCC-6 e DCC-22	+1 (0,7)	-1 (5)	+1 (0,7)
9	DCC-7 e DCC-23	+1 (0,7)	+1 (12)	-1 (0,3)

Fonte: O Autor.

Tabela 4 - Níveis dos fatores do segundo bloco do Delineamento Composto Central

Condições	Duplicatas	Níveis e Concentrações dos Fatores (mg.L <sup>-1</sup> )		
		Co	Mn	Ni
1	DCC-16 e DCC-32	0 (0,5)	0 (8,5)	0 (0,5)
2	DCC-14 e DCC-30	0 (0,5)	0 (8,5)	-1,682 (0,16)
3	DCC-10 e DCC-26	-1,682 (0,16)	0 (8,5)	0 (0,5)
4	DCC-11 e DCC-27	+1,682 (0,84)	0 (8,5)	0 (0,5)
5	DCC-12 e DCC-28	0 (0,5)	-1,682 (2,61)	0 (0,5)
6	DCC-13 e DCC-29	0 (0,5)	+1,682 (14,39)	0 (0,5)
7	DCC-15 e DCC-31	0 (0,5)	0 (8,5)	+1,682 (0,84)
8	DCC-2 e DCC-18	-1 (0,3)	-1 (5)	+1 (0,7)
9	DCC-1 e DCC-17	-1 (0,3)	-1 (5)	-1 (0,3)

Fonte: O Autor.

#### 4.4 Ensaio de validação

O ensaio de validação contou com uma triplicata da condição controle, sem adição de metais (Val-C), e uma triplicata da condição com adição de níquel a uma concentração de 0,9 mg.L<sup>-1</sup> (Val-Ni+).

#### 4.5 Parâmetros e dados analisados

Os parâmetros e a referência dos métodos utilizados são descritos no Quadro 2. O Software Statistica 13.3® software (TIBCO Inc., Palo Alto, EUA) foi utilizado para a construção de matrizes de concentrações a serem adicionadas nos ensaios em batelada utilizando DFF, em seguida, utilizando o DCC, e análise das respostas dos ensaios em modo

batelada. Para a determinação dos parâmetros cinéticos P, Rm e produtividade, foi utilizado o software Origin 8.0 software (OriginLab®, Northampton, EUA).

Antes do início de cada ensaio PBM, foi feita análise de sólidos totais (ST) e sólidos voláteis totais (SVT) do lodo que foi utilizado como inóculo (APHA, 2012). Os componentes da vinhaça acidificada também foram caracterizados (Quadro 2). Os mesmos parâmetros descritos no Quadro 2 foram analisados ao longo do ensaio de validação, em que no total um volume inferior a 10% do volume reacional foi retirado para este propósito.

O monitoramento da composição de biogás foi feito por cromatógrafo gasoso. O primeiro ensaio do DFF, com 16 bateladas, e os dois blocos do DCC, com 18 bateladas, utilizaram o cromatógrafo gasoso CG 2010 (Shimadzu, Kioto, JPN) equipado com coluna capilar Carboxen 1010 plot (30 m x 0,53 mm x 0,30  $\mu$ m), utilizando argônio como gás de arraste e operando nas condições de temperatura inicial do injetor igual a 220°C; temperatura inicial do detector de 230°C e com vazão do gás de make up (Ar) de 12 mL.min<sup>-1</sup> (PERNA et al., 2013). Já o ensaio com as três condições em duplicata que precisaram ser refeitas do DFF e o ensaio de validação utilizaram cromatógrafo gasoso CG-2014 (Shimadzu, Kioto, JPN), equipado com detector térmico de condutividade (TCD) e coluna HP-PLOT/Q (30 m x 0.53 mm x 40  $\mu$ m) (ADORNO et al., 2014). Temperatura do injetor: 160 °C; temperatura do detector: 170 °C; temperatura do forno: 35 °C (2 min) a 170 (1,0 min), a 60 °C.min<sup>-1</sup> (5,25 min de corrida cromatográfica); split: 5 e fluxo de hidrogênio coluna (4 mL.min<sup>-1</sup>).

A análise de ácidos graxos voláteis e álcoois para a caracterização da vinhaça e na etapa de validação foi realizada utilizando um cromatógrafo gasoso CG 2010 (Shimadzu, Kioto, JPN) com detector de ionização de chama (DIC) e coluna HP- INNOWAX, de 30 m x 0,25 mm (diâmetro interno) x 0,25 mm (espessura de filme). O cromatógrafo era dotado de um amostrador automático (COMBI-PAL) cujas condições foram: tempo de aquecimento da amostra (13 min); temperatura do bloco de aquecimento (100°C); volume de amostra injetada (400  $\mu$ L); temperatura da seringa (100°C); tempo de lavagem da seringa com N<sub>2</sub> (3 min). As condições cromatográficas foram: rampa de temperatura do forno 35°C (0 min) 2°C.min<sup>-1</sup> 38°C (0 min) 10°C.min<sup>-1</sup> 75°C (0 min) 35°C.min<sup>-1</sup> 120°C (1 min) 10°C.min<sup>-1</sup> 170°C (2 min); temperatura do injetor (250°C); temperatura do detector (280°C); razão de split: 1,0; fluxo do gás de arraste (H<sub>2</sub>) - 1,6 mL.min<sup>-1</sup>; fluxo do make-up ou gás auxiliar (N<sub>2</sub>) - 30 mL.min<sup>-1</sup>; fluxos dos gases da chama - ar sintético (300 mL.min<sup>-1</sup>) e H<sub>2</sub> (30 mL.min<sup>-1</sup>) (ADORNO; HIRASAWA; VARESCHE, 2014).



As análises de metais totais foram realizadas no lodo utilizado como inóculo e na vinhaça utilizada como substrato iniciais, para quantificar os metais traço sem a suplementação. Para a validação, foram analisados ainda os metais traço dissolvidos e incorporados às partículas sólidas ao final do ensaio. Para isso, as amostras de lodo e as líquidas do final da validação foram previamente centrifugadas a 6000 rpm por 10 min, sendo o sobrenadante do lodo descartado e o sobrenadante das amostras líquidas guardados para a determinação dos metais traço dissolvidos. A digestão de todas as amostras foi realizada em micro-ondas Ethos Easy (Milestone, Sorisole (BG), ITA), programado com as condições de temperatura e pressão conforme descrito por Braga et al. (2017), utilizando 5 mL de  $\text{HNO}_3$  3M + 2mL de  $\text{H}_2\text{O}_2$  30%, adaptado de Bizzi et al. (2014). Os metais foram determinados por Espectrometria de Emissão Óptica com Plasma Indutivamente Acoplado (ICP-OES) Optima 8000 (Perkin Elmer, Waltham, USA) do Departamento de Engenharia Civil e Ambiental da UNESP Bauru. Os parâmetros adotados no ICP-OES foram potência de rádio frequência (RF): 1450 W, vazão do plasma de argônio: 8 L.min<sup>-1</sup>, vazão auxiliar de argônio: 0,5 L min<sup>-1</sup>, vazão do nebulizador: 0,6 L min<sup>-1</sup> e vazão da amostra: 0,5 L min<sup>-1</sup>. O Ítrio foi adicionado como padrão interno (1 mg.L<sup>-1</sup>).

Quadro 2 - Parâmetros analisados na caracterização da vinhaça acidificada

Parâmetros	Método	Referência do método utilizado
Demanda química de oxigênio (DQO)	Espectrofotométrico	APHA/AWWA/WEF (2012)
Série de sólidos	Gravimétrico	
Sulfato ( $\text{SO}_4^{2-}$ )	Turbidimétrico	
Ácido láctico	Espectrofotométrico	Taylor (1996)
Fenóis	Espectrofotométrico	Buchanan & Nicell (1997)
Açúcares totais	Espectrofotométrico	Dubois et al. (1956)
Glicerol	Espectrofotométrico	Greenhill (2003)
Alcalinidade	Titulométrico	Ripley, Boyle e Converse (1986)

Fonte: O Autor.



## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Caracterização da vinhaça e do lodo

A caracterização inicial da vinhaça acidificada utilizada para os ensaios é descrita na Tabela 5, e a caracterização do lodo é indicada na Tabela 6.

Tabela 5 - Caracterização da vinhaça acidificada utilizada nos ensaios com delineamentos fatorial fracionado e composto central e no ensaio de validação.

Caracterização da vinhaça acidificada	
DQO amostra bruta (g.L <sup>-1</sup> )	22,34 ± 1,84
DQO amostra centrifugada (g.L <sup>-1</sup> )	19,79 ± 2,34
Sulfato (SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> ) da amostra bruta (mg.L <sup>-1</sup> )	2234,92 ± 22,48
Sulfato (SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> ) da amostra centrifugada (mg.L <sup>-1</sup> )	2167,43 ± 129,08
Sulfato (SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> ) da amostra centrifugada - Validação (mg.L <sup>-1</sup> )	1501,32 ± 90,47
Fenóis (mg.L <sup>-1</sup> )	1924,00 ± 104,20
Ácido láctico (mg.L <sup>-1</sup> )	112,81 ± 3,52
Açúcares totais (mg.L <sup>-1</sup> )	1250,00 ± 101,38
Glicerol (mg.L <sup>-1</sup> )	14,47 ± 0,40
Alumínio (Al) (mg.L <sup>-1</sup> )	1,85 ± 0,25
Bário (Ba) (mg.L <sup>-1</sup> )	0,42 ± 0,00
Cobalto (Co) (mg.L <sup>-1</sup> )	0,06 ± 0,00
Cobre (Cu) (mg.L <sup>-1</sup> )	0,18 ± 0,02
Ferro (Fe) (mg.L <sup>-1</sup> )	5,01 ± 0,18
Magnésio (Mg) (mg.L <sup>-1</sup> )	347,71 ± 2,89
Manganês (Mn) (mg.L <sup>-1</sup> )	3,27 ± 0,01
Níquel (Ni) (mg.L <sup>-1</sup> )	< LD <sup>(1)</sup>
Selênio (Se) (mg.L <sup>-1</sup> )	0,34 ± 0,00
Zinco (Zn) (mg.L <sup>-1</sup> )	0,33 ± 0,02

(1) Limite de Detecção.

Fonte: O Autor.

Tabela 6 - Caracterização do lodo utilizado nos ensaios com delineamentos fatorial fracionado e composto central e no ensaio de validação.

Ensaio	Concentração
Sólidos voláteis totais (gSVT.g lodo <sup>-1</sup> )	0,20 ± 0,01
Sólidos totais (gST.g lodo <sup>-1</sup> )	0,32 ± 0,02
Alumínio (Al) (mg.gST <sup>-1</sup> )	2,55 ± 0,04
Bário (Ba) (mg.gST <sup>-1</sup> )	0,27 ± 0,01
Cobalto (Co) (mg.gST <sup>-1</sup> )	0,00 ± 0,00
Cobre (Cu) (mg.gST <sup>-1</sup> )	0,15 ± 0,00
Ferro (Fe) (mg.gST <sup>-1</sup> )	20,44 ± 0,09
Magnésio (Mg) (mg.gST <sup>-1</sup> )	12,27 ± 0,10
Manganês (Mn) (mg.gST <sup>-1</sup> )	2,50 ± 0,08
Níquel (Ni) (mg.gST <sup>-1</sup> )	0,01 ± 0,00
Selênio (Se) (mg.gST <sup>-1</sup> )	< LD <sup>(1)</sup>
Zinco (Zn) (mg.gST <sup>-1</sup> )	0,21 ± 0,01

(1) Limite de Detecção.

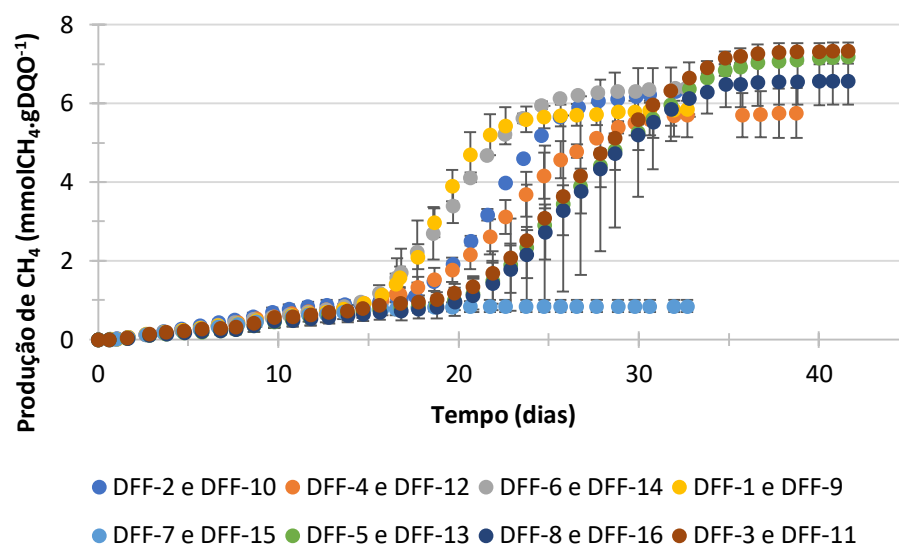
Fonte: O Autor.

## 5.2 Delineamento Fatorial Fracionado

### 5.2.1 Ensaio do Potencial Bioquímico do Metano do Delineamento Fatorial Fracionado

É possível observar pela curva de produção acumulada de metano (Figura 6) que as diferentes condições das duplicatas resultaram em diferentes cinéticas de produção de metano. Os pares de réplicas DFF-3 e DFF-11, DFF-5 e DFF-13 e DFF-8 e DFF-16 – condições 7, 3 e 8, respectivamente (Tabela 2) - correspondem ao segundo bloco de ensaio, ou seja, são as condições refeitas do primeiro bloco por não terem apresentado cinéticas semelhantes, possivelmente devido a vazamento de gás. O pH inicial do ensaio, após a adição de bicarbonato, foi medido com fita indicadora pH 0-14, modelo 921 10 (Macherey-Nagel, Düren, GER) e ficou entre 7,0 e 8,0 em todas as réplicas. O pH final foi medido com pHmetro e a média foi de 8,0 ± 0,1.

Figura 6 - Curva de produção acumulada de metano para as 16 bateladas do Delineamento Fatorial Fracionado



Fonte: O Autor.

O resultado obtido pelo par DFF-7 e DFF-15 (Figura 6) indica que a metanogênese ocorreu apenas inicialmente na condição de suplementação de  $5,0 \text{ mg.L}^{-1}$  de Cu,  $5,0 \text{ mg.L}^{-1}$  de Fe e  $0,3 \text{ mg.L}^{-1}$  de Se (Tabela 2). Desse modo, estudos futuros poderiam analisar as condições em que esses metais inibem a metanogênese, e investigar uma possível relação de favorecimento da sulfetogênese.

### 5.2.2 Análise estatística do Delineamento Fatorial Fracionado

Os parâmetros ajustados pelo Origin 8.0 software estão apresentados na Tabela 7. Observaram-se para as DFF-7 e DFF-15 – condição 2 (Tabela 2) - os valores mais baixos de máxima produção de metano ( $0,86 \text{ mmolCH}_4.\text{gDQO}^{-1}$ ) e de velocidade de reação ( $0,07 \text{ mmolCH}_4.\text{gDQO}^{-1}.\text{dia}^{-1}$ ), confirmando o padrão observado pelo gráfico dessa duplicata apresentado na Figura 6. Ademais, destaca-se que DFF-1 e DFF-9 – condição 4 (Tabela 2) - tiveram a maior velocidade de reação ( $0,94 \text{ mmolCH}_4.\text{gDQO}^{-1}.\text{dia}^{-1}$ ), porém baixo valor de produção máxima de metano ( $5,78 \text{ mmolCH}_4.\text{gDQO}^{-1}$ ).

A vantagem de se considerar a produtividade é a de que ela aborda de uma forma mais completa a cinética do processo, não havendo a necessidade de escolha entre produção máxima e a velocidade de reação, que muitas vezes não apresentam o mesmo desempenho para um fator.

Além disso, para a aplicação em reatores contínuos, pode ser mais vantajoso analisar a produtividade do que uma das outras respostas separadamente.

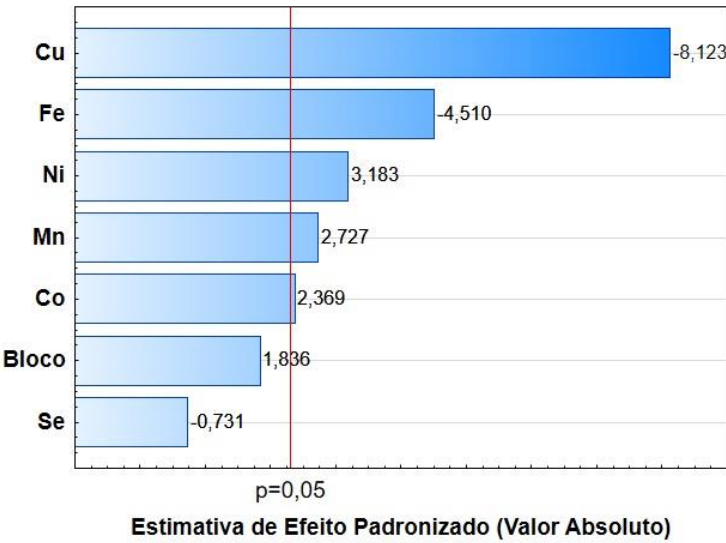
Tabela 7 - Parâmetros ajustados de velocidade (Rm), produção máxima (P) e produtividade de metano no ensaio Delineamento Fatorial Fracionado

Bloco	Réplicas	Rm (mmol CH <sub>4</sub> .gDQO <sup>-1</sup> .dia <sup>-1</sup> )	Desvio padrão de Rm (mmol CH <sub>4</sub> .gDQO <sup>-1</sup> .dia <sup>-1</sup> )	P (mmol CH <sub>4</sub> .gDQO <sup>-1</sup> )	Desvio padrão de P (mmol CH <sub>4</sub> .gDQO <sup>-1</sup> )	Produtividade de (mmol CH <sub>4</sub> .gDQO <sup>-1</sup> .dia <sup>-1</sup> )	Desvio padrão da produtividade de (mmol CH <sub>4</sub> .gDQO <sup>-1</sup> .dia <sup>-1</sup> )
1	DFF-1 e DFF-9	0,94	0,12	5,78	0,26	0,24	0,02
1	DFF-7 e DFF-15	0,07	0,02	0,86	0,14	0,06	0,00
1	DFF-2 e DFF-10	0,77	0,03	6,30	0,03	0,22	0,00
1	DFF-6 e DFF-14	0,74	0,19	6,43	0,10	0,24	0,01
1	DFF-4 e DFF-12	0,55	0,03	5,79	0,64	0,19	0,00
2	DFF-5 e DFF-13	0,72	0,05	7,19	0,30	0,21	0,02
2	DFF-3 e DFF-11	0,57	0,07	7,48	0,34	0,20	0,00
2	DFF-8 e DFF-16	0,56	0,05	6,66	0,67	0,19	0,01

Fonte: O Autor.

O gráfico de Pareto (Figura 7) mostra que os metais Cu e Fe foram significativos para a resposta Rm, com p-valores de 0,0000 e 0,0020 respectivamente (Tabela 8) porém a adição destes teve influência negativa. Em contrapartida, Ni, Mn e Co apresentaram resultados positivos quando adicionados, com p-valores de, respectivamente, 0,0129, 0,0260, e 0,0453. O único dos fatores que não teve efeito sobre a velocidade da produção de metano foi a adição de Se. Também vale ressaltar que a blocagem do ensaio de DFF não foi significativa.

Figura 7 - Gráfico de Pareto com o efeito dos fatores sobre a resposta Rm no ensaio Delineamento Fatorial Fracionado



Fonte: O Autor.

Tabela 8 - Tabela ANOVA para parâmetro velocidade Rm (mmolCH<sub>4</sub>.DQO<sup>-1</sup>.dia<sup>-1</sup>) no Delineamento Fatorial Fracionado. Os números em vermelho indicam os fatores significativos a 95% de confiança

Fatores	ANOVA; Var.: Rm (mmolCH <sub>4</sub> .DQO <sup>-1</sup> .dia <sup>-1</sup> ); R <sup>2</sup> = 0,9361; Raj = 0,8801				
	MS Erro Puro = 0,0079 DV: Rm (mmolCH <sub>4</sub> .DQO <sup>-1</sup> .dia <sup>-1</sup> )				
	SS <sup>(1)</sup>	df <sup>(2)</sup>	MS <sup>(3)</sup>	F <sup>(4)</sup>	p-valor
Blocos	0,0268	1	0,0268	3,3693	0,1037
(1)Co	0,0446	1	0,0446	5,6118	0,0453
(2)Cu	0,5241	1	0,5241	65,9815	0,0000
(3)Fe	0,1616	1	0,1616	20,3443	0,0020
(4)Mn	0,0591	1	0,0591	7,4355	0,0260
(5)Ni	0,0805	1	0,0805	10,1293	0,0129
(6)Se	0,0042	1	0,0042	0,5344	0,4856
Erro Puro	0,0636	8	0,0079		
Total SS	0,9937	15			

<sup>(1)</sup>Soma dos quadrados.  
<sup>(2)</sup>Graus de liberdade.  
<sup>(3)</sup>Média dos quadrados.  
<sup>(4)</sup>Razão F.

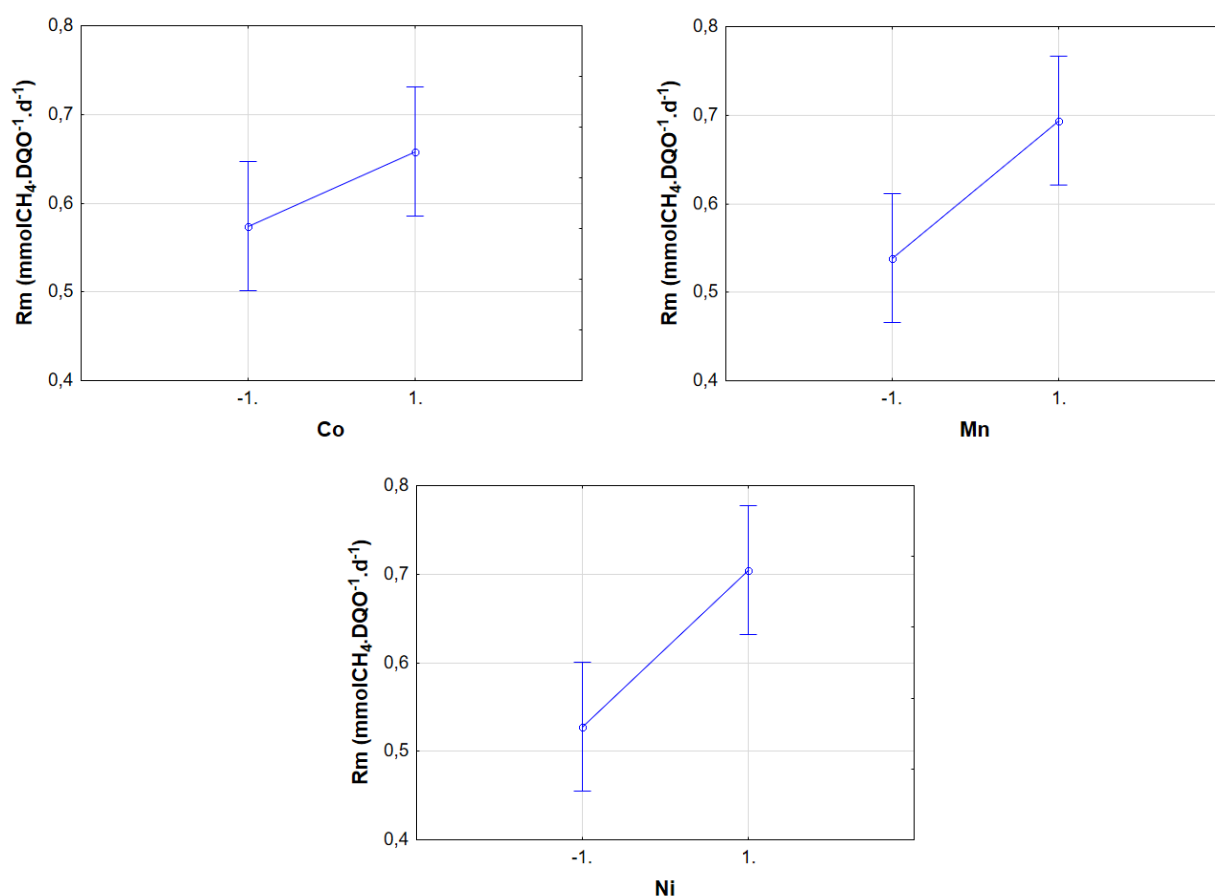
Fonte: O Autor.

Os gráficos de médias nos níveis extremos apresentados na Figura 8 indicam que no nível -1 do Co, ou seja, quando este metal não foi adicionado além das concentrações já originalmente presentes na vinhaça e no lodo, o valor de Rm foi estimado em 0,57 mmolCH<sub>4</sub>.gDQO<sup>-1</sup>.dia<sup>-1</sup>. Quando ocorreu sua adição, a resposta passou a ser de 0,66

$\text{mmolCH}_4.\text{gDQO}^{-1}.\text{dia}^{-1}$ , aproximadamente, indicando um aumento de 15% na velocidade. De maneira análoga, no nível -1 do Mn, o  $R_m$  foi de  $0,54 \text{ mmolCH}_4.\text{gDQO}^{-1}.\text{dia}^{-1}$ , enquanto no nível +1 o valor subiu para  $0,69 \text{ mmolCH}_4.\text{gDQO}^{-1}.\text{dia}^{-1}$ , o que representa um aumento de 29%. Analisando-se o Ni, os valores de cada extremo foram de 0,53 e  $0,70 \text{ mmolCH}_4.\text{gDQO}^{-1}.\text{dia}^{-1}$ , indicando um aumento de 33%.

Figura 8 - Média da resposta  $R_m$  nos níveis extremos do Co, Mn e Ni para o ensaio Delineamento

Fatorial Fracionado



Fonte: O Autor.

Por sua vez, para a resposta P de produção máxima de metano, Cu, Fe e Se foram significativos (p-valores de, respectivamente, 0,0000, 0,0000 e 0,0006) com influência negativa (Figura 9 e Tabela 9). Co e Ni foram significativos positivos (p-valores de, respectivamente, 0,0000 e 0,0033). Entretanto, diferentemente dos resultados referentes à resposta  $R_m$ , o Mn apresentou-se não significativo (p-valor de 0,1105), e a blocagem teve a maior influência entre todos os fatores, como mostra a Figura 9, com p-valor de 0,0000.

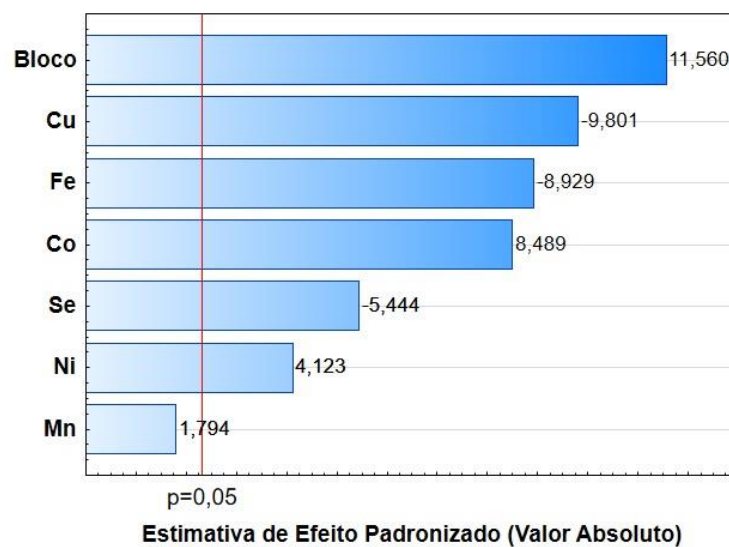
Uma possível explicação para o resultado encontrado sobre a blocagem é a utilização, no ensaio do segundo bloco, do lodo centrifugado no primeiro ensaio e acondicionado em



geladeira a 4°C. No primeiro ensaio, com as 16 bateladas, o lodo utilizado foi centrifugado no dia anterior ao inicial, estando mais fresco. Para evitar essa possível causa da influência da blocagem, o lodo foi centrifugado no início do ensaio do DCC.

Mesmo que o Mn tenha sido significativo a 95% de confiança apenas para a resposta de Rm, o p-valor de 0,1105 na resposta P é baixo, indicando aproximadamente 89% de confiança. Desse modo, ele foi selecionado, juntamente com o Co e Ni, para o DCC.

Figura 9 - Gráfico de Pareto com o efeito dos fatores sobre a resposta P para o ensaio Delineamento Fatorial Fracionado



Fonte: O Autor.

Tabela 9 - Tabela ANOVA para parâmetro produção máxima P (mmolCH<sub>4</sub>.gDQO<sup>-1</sup>) no Delineamento Fatorial Fracionado. Os números em vermelho indicam os fatores significativos a 95% de confiança

Fatores	ANOVA; Var.: P (mmolCH <sub>4</sub> .gDQO <sup>-1</sup> ); R <sup>2</sup> = 0,9815; Raj = 0,9653 Erro Puro = 0,1437 DV: P (mmolCH <sub>4</sub> .gDQO <sup>-1</sup> )				
	SS <sup>(1)</sup>	Df <sup>(2)</sup>	MS <sup>(3)</sup>	F <sup>(4)</sup>	p-valor
Blocos	19,2083	1	19,2083	133,6248	0,0000
(1)Co	10,3588	1	10,3588	72,0622	0,0000
(2)Cu	13,8071	1	13,8071	96,0503	0,0000
(3)Fe	11,4606	1	11,4606	79,7266	0,0000
(4)Mn	0,4628	1	0,4628	3,2192	0,1105
(5)Ni	2,4431	1	2,4431	16,9958	0,0033
(6)Se	4,2604	1	4,2604	29,6381	0,0006
Erro Puro	1,1500	8	0,1438		
Total SS	62,1945	15			

<sup>(1)</sup>Soma dos quadrados.

<sup>(2)</sup>Graus de liberdade.

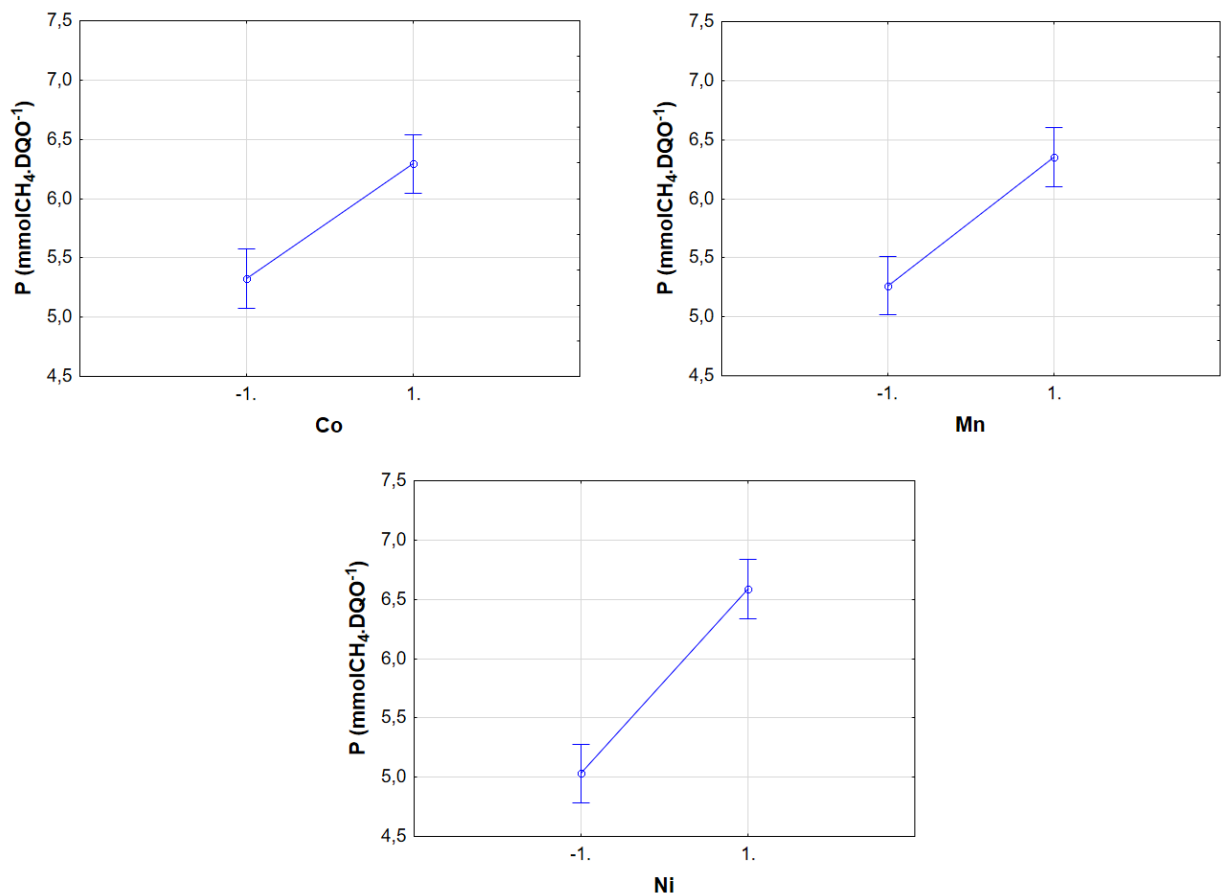
<sup>(3)</sup>Média dos quadrados.

<sup>(4)</sup>Razão F.

Fonte: O Autor.

A Figura 10 ilustra o comportamento do Co, Mn e Ni sobre a produção máxima de metano. No nível -1 do Co, P foi estimado em 5,3 mmolCH<sub>4</sub>.gDQO<sup>-1</sup>, enquanto no nível +1 a resposta foi de 6,3 mmolCH<sub>4</sub>.gDQO<sup>-1</sup>, aproximadamente, representando um aumento de 18% na produção máxima de metano. Com resultados parecidos, os extremos de -1 e +1 do Mn para a resposta analisada foram de 5,3 e 6,4 mmolCH<sub>4</sub>.gDQO<sup>-1</sup>, indicando um aumento de 21%. Por sua vez, os níveis -1 e +1 do Ni variaram de 5,0 a 6,6 mmolCH<sub>4</sub>.gDQO<sup>-1</sup>, sendo este metal responsável pelo aumento em 31% da resposta.

Figura 10 - Média das respostas P nos níveis extremos do Co, Mn e Ni para o ensaio Delineamento Fatorial Fracionado

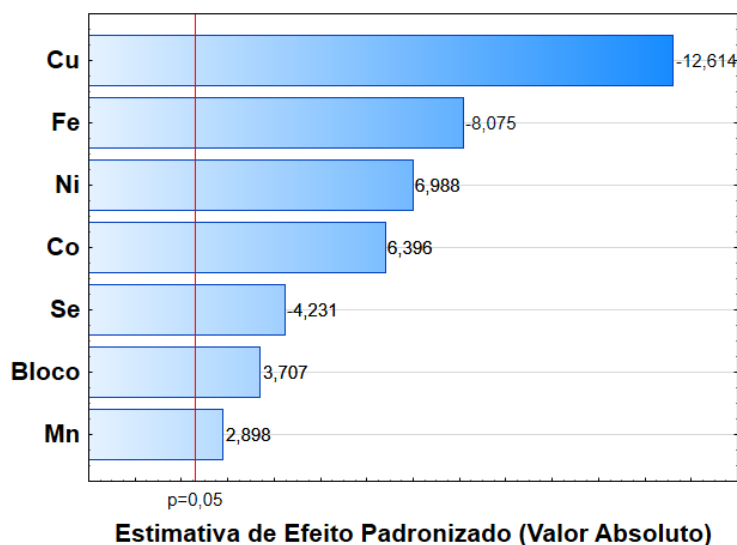


Fonte: O Autor.

Somada às análises da influência dos fatores sobre as respostas P e Rm, mais utilizadas para avaliar a cinética de produção de CH<sub>4</sub>, outra resposta considerada foi a de produtividade utilizando os dados ajustados pelo modelo de Boltzmann.

O gráfico de Pareto (Figura 11) indica que o Ni, Co e Mn foram significativos positivos, com p-valores de 0,0001, 0,0002 e 0,0199, respectivamente, como mostra a Tabela 10, reiterando os resultados encontrados para as respostas P e Rm. A blocagem teve efeito, diferentemente do que aconteceu para a resposta Rm (Figura 7), porém foi baixo, não apresentando o comportamento da análise da resposta P (Figura 9), e seu p-valor foi de 0,0060, como mostra a Tabela 10. Os metais Cu, Fe e Se foram significativos com influência negativa, e p-valores de, respectivamente, 0,0000, 0,0000 e 0,0029 (Tabela 10).

Figura 11 - Gráfico de Pareto com o efeito dos fatores sobre a resposta Produtividade no Delineamento Fatorial Fracionado



Fonte: O Autor.

Tabela 10 - Tabela ANOVA para parâmetro Produtividade ( $\text{mmolCH}_4.\text{DQO}^{-1}.\text{dia}^{-1}$ ) no Delineamento Fatorial Fracionado. Os números em vermelho indicam os fatores significativos a 95% de confiança

Fatores	ANOVA; Var.: Produtividade; $R^2 = 0,97868$ ; $R_{aj} = 0,9600$ MS Erro Puro = 0,0001 DV: Produtividade				
	SS <sup>(1)</sup>	Df <sup>(2)</sup>	MS <sup>(3)</sup>	F <sup>(4)</sup>	p-valor
Blocos	0,0017	1	0,0017	13,7397	0,0060
(1)Co	0,0050	1	0,0050	40,9147	0,0002
(2)Cu	0,0196	1	0,0196	159,1043	0,0000
(3)Fe	0,0080	1	0,0080	65,2024	0,0000
(4)Mn	0,0010	1	0,0010	8,4001	0,0199
(5)Ni	0,0060	1	0,0060	48,8376	0,0001
(6)Se	0,0022	1	0,0022	17,9033	0,0029
Erro Puro	0,0010	8	0,0001		
Total SS	0,0461	15			

<sup>(1)</sup>Soma dos quadrados.

<sup>(2)</sup>Graus de liberdade.

<sup>(3)</sup>Média dos quadrados.

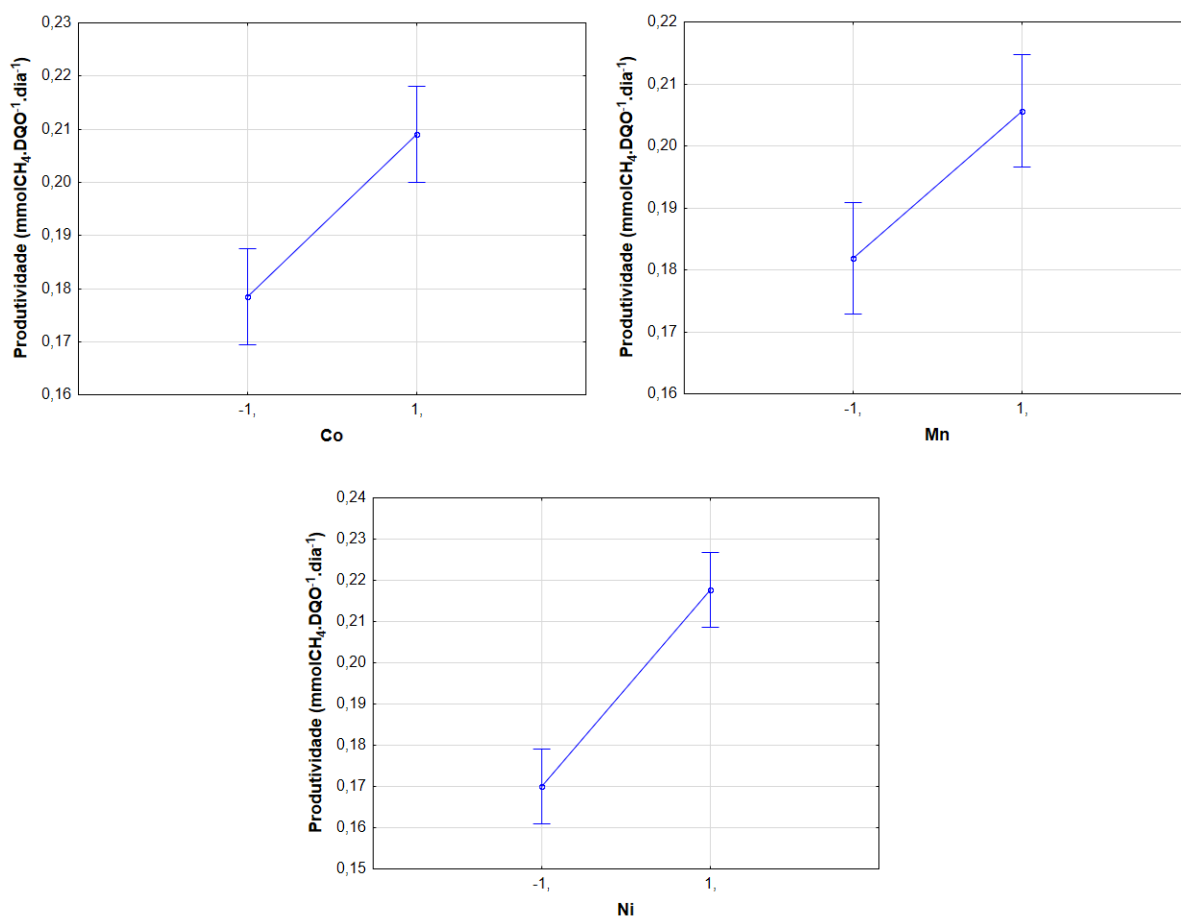
<sup>(4)</sup>Razão F.

Fonte: O Autor.

Os gráficos apresentados na Figura 12 indicam que a adição de Co provoca um aumento de 17% na produtividade, que passa de  $0,18 \text{ mmolCH}_4.\text{gDQO}^{-1}.\text{dia}^{-1}$  para  $0,21 \text{ mmolCH}_4.\text{gDQO}^{-1}.\text{dia}^{-1}$ . A adição de Mn é responsável por um aumento de 13%, sendo o valor de produtividade no nível -1 de  $0,18 \text{ mmolCH}_4.\text{gDQO}^{-1}.\text{dia}^{-1}$ , e no nível +1 de  $0,21 \text{ mmolCH}_4.\text{gDQO}^{-1}.\text{dia}^{-1}$ . O Ni, por sua vez, aumenta em 28% a resposta analisada, que possui

valor de  $0,17 \text{ mmolCH}_4.\text{gDQO}^{-1}.\text{dia}^{-1}$  no nível -1, e valor de  $0,22 \text{ mmolCH}_4.\text{gDQO}^{-1}.\text{dia}^{-1}$  no nível +1.

Figura 12 - Média das respostas Produtividade nos níveis extremos do Co, Mn e Ni para o ensaio Delineamento Fatorial Fracionado



Fonte: O Autor.

Justifica-se a escolha dos metais Co, Mn e Ni para comporem o próximo ensaio, a partir dos resultados obtidos no DFF (Quadro 3). Desse modo, para que fosse delineado o ensaio de DCC, mantiveram-se os valores de concentração do ensaio de DFF, de  $0,3 \text{ mg.L}^{-1}$  para o Co e Ni, e de  $5 \text{ mg.L}^{-1}$  para o Mn como níveis -1 do planejamento. Os níveis +1 do planejamento foram de 2 a 3 vezes os valores dos níveis -1, evitando valores negativos no ponto axial -1.68.

Quadro 3– Efeitos dos fatores no Delineamento Fatorial Fracionado

Fatores	Velocidade máxima (Rm) de metano	Produção máxima (P) de metano	Produtividade de metano
Co	Positivo	Positivo	Positivo
Cu	Negativo	Negativo	Negativo
Fe	Negativo	Negativo	Negativo
Mn	Positivo	-	Positivo
Ni	Positivo	Positivo	Positivo
Se	-	Negativo	Negativo
Blocagem	-	Positivo	Positivo

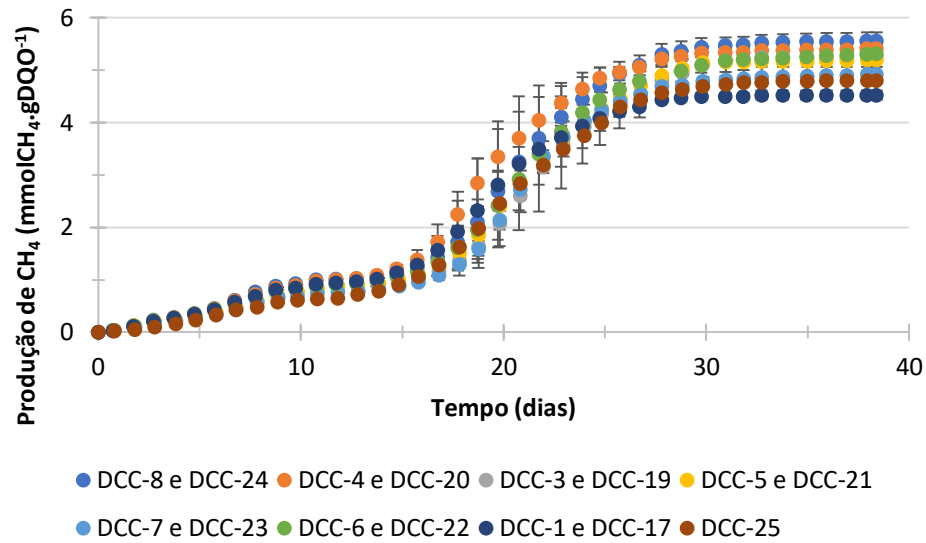
Fonte: O Autor.

### 5.3 Delineamento Composto Central

#### 5.3.1 Ensaio do Potencial Bioquímico do Metano do Delineamento Composto Central

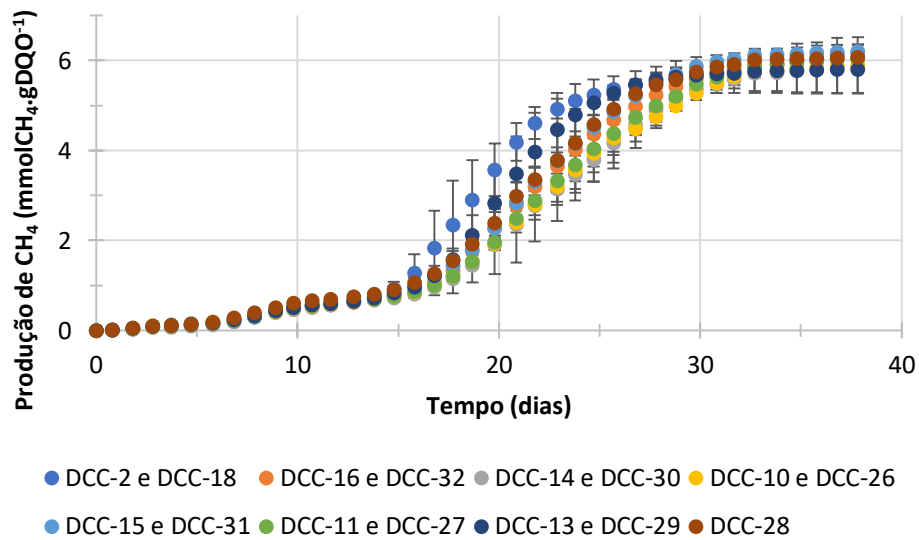
A Figura 13 e a Figura 14 mostram as curvas de produção acumulada de metano nos dois blocos do DCC que foram escolhidas para representarem as cinéticas de cada condição. O pH médio final do primeiro bloco do DCC foi de  $8,0 \pm 0,1$ , valor igual ao pH médio final obtido do segundo bloco, medidos com pHmetro.

Figura 13 - Curva de produção acumulada de metano para o primeiro bloco do Delineamento Composto Central



Fonte: O Autor.

Figura 14 - Curva de produção acumulada de metano para o segundo bloco do Delineamento Composto Central



Fonte: O Autor.

No primeiro bloco do DCC três duplicatas apresentaram cinéticas diferentes: as produções máximas entre DCC-2 e DCC-18; a velocidade entre DCC-1 e a DCC-17; e a curva da réplica DCC-9, que ficou inconsistente e não permitiu comparação com sua duplicata (DCC-25). Esta última duplicata é o ponto central, que foi repetido naturalmente no segundo bloco. As condições das outras duas duplicatas foram refeitas no segundo bloco.

Por sua vez, no segundo bloco do DCC as cinéticas de DCC-1 e DCC-17 apresentaram comportamentos diferentes e a curva da DCC-12 foi inconsistente. Dessa forma, para ser realizada a análise estatística do DCC (Item 5.3.2), o modelo de Boltzmann foi ajustado para as duplicatas, ao invés do ajuste do modelo para cada réplica como no DFF (Item 4.1). Essa abordagem foi utilizada pois as réplicas DCC-9 (condição 7 do primeiro bloco) e DCC-12 (condição 5 do segundo bloco) foram excluídas da análise, uma vez que suas curvas de produção, provavelmente, foram afetadas por problemas técnicos. Assim, para essas condições o modelo foi ajustado utilizando apenas a réplica que não apresentou problema (Tabela 3 e Tabela 4).

Entre as condições do primeiro bloco que foram refeitas, utilizou-se os resultados de DCC-2 e DCC-18 segundo bloco, porém para DCC-1 e DCC-17 as curvas cinéticas do primeiro bloco apresentaram maior similaridade do que no segundo bloco.

### 5.3.2 Análise estatística do Delineamento Composto Central

Para  $R_m$ , embora nenhum resultado tenha sido considerado significativo (Tabela 11), a comparação entre valores previstos e observados (Figura 15) foi satisfatória, e os valores de  $R^2$  (0,8663) e  $R$  ajustado (0,7492) obtidos indicam um bom ajuste pelo modelo, representado na Equação 2. Além disso, a falta de ajuste não foi considerada significativa (Tabela 11). As superfícies de resposta (Figura 16, Figura 17 e Figura 18) são a representação gráfica do modelo.



Tabela 11 - Tabela ANOVA para parâmetro valocidade Rm (mmolCH<sub>4</sub>.DQO<sup>-1</sup>.dia<sup>-1</sup>) no Delineamento Composto Central

Fatores	ANOVA; Var.: Rm; R <sup>2</sup> = 0,86626; Raj = 0,7492 MS Erro Puro = 0,0019 DV: Rm				
	SS <sup>(1)</sup>	Df <sup>(2)</sup>	MS <sup>(3)</sup>	F <sup>(4)</sup>	p-valor
Mn (L)	0,0060	1	0,0060	3,1999	0,3245
Mn (Q)	0,0189	1	0,0189	10,1735	0,1934
Ni (L)	0,0053	1	0,0053	2,8350	0,3412
Ni (Q)	0,0017	1	0,0017	0,9108	0,5149
Co (L) e Mn (L)	0,0025	1	0,0025	1,3320	0,4545
Co (L) e Ni (L)	0,0045	1	0,0045	2,4389	0,3626
Mn (L) e Ni (L)	0,0033	1	0,0033	1,7580	0,4114
Falta de ajuste	0,0044	7	0,0006	0,3366	0,8716
Erro Puro	0,0019	1	0,0019		
Total SS	0,0467	15			

<sup>(1)</sup>Soma dos quadrados.

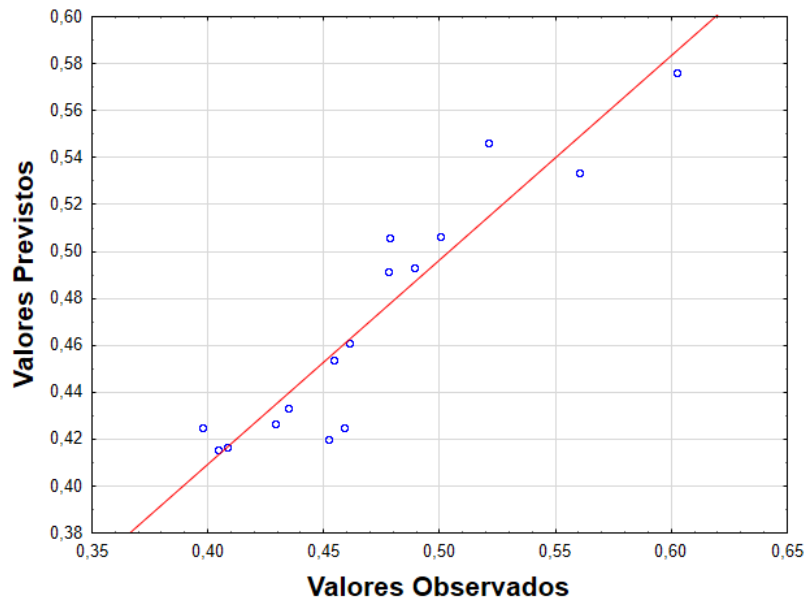
<sup>(2)</sup>Graus de liberdade.

<sup>(3)</sup>Média dos quadrados.

<sup>(4)</sup>Razão F.

Fonte: O Autor.

Figura 15 - Valores previstos e observados para a resposta Rm no Delineamento Composto Central



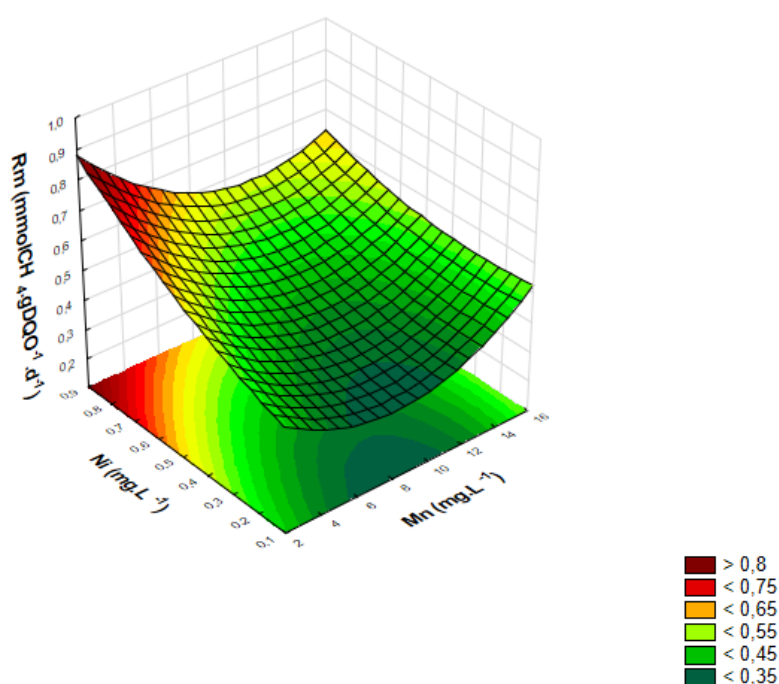
Fonte: O Autor.

Equação 2:

$$Rm = 0,5210 - (0,0522 \times Mn) + (0,0033 \times Mn^2) + (0,2790 \times Ni) + (0,3068 \times Ni^2) + (0,0314 \times Co \times Mn) - (0,4838 \times Co \times Ni) - (0,0289 \times Mn \times Ni)$$

Apesar dos fatores não terem sido significativos, as superfícies de resposta foram criadas como um exercício. Assim, pela Figura 16, identifica-se uma região de mínimo quando o Mn é adicionado nas concentrações entre 5,5 mg.L<sup>-1</sup> e 10,5 mg.L<sup>-1</sup>, aproximadamente, e os valores de Ni são inferiores a 0,3 mg.L<sup>-1</sup>, atingindo uma velocidade de produção de metano de 0,3 mmolCH<sub>4</sub>.gDQO<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup>. A região ótima tem uma tendência a ser em concentrações maiores do que 0,9 mg.L<sup>-1</sup> para o Ni, e fora da região mínima do Mn, podendo ser atingidas velocidades maiores do que 0,9 mmolCH<sub>4</sub>.gDQO<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup>.

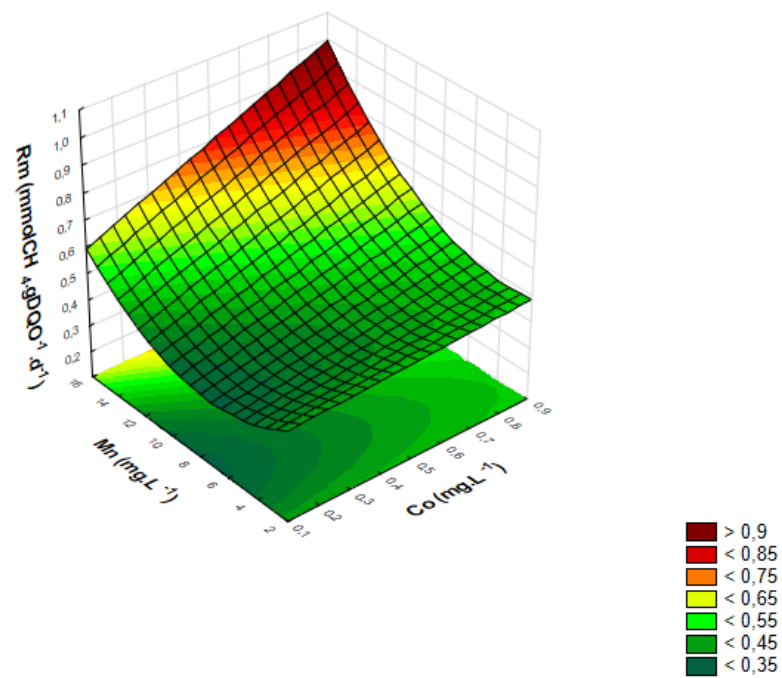
Figura 16 - Superfície de resposta entre Mn e Ni para a resposta Rm no Delineamento Composto Central



Fonte: O Autor.

Em relação às interações entre o Co e o Mn (Figura 17), identifica-se uma região de mínimo ( $R_m$  de 0,3 mmolCH<sub>4</sub>.gDQO<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup>) quando o Mn é adicionado nas concentrações entre 4,0 mg.L<sup>-1</sup> e 10,0 mg.L<sup>-1</sup>, aproximadamente, e a concentração de Co adicionada é inferior a 0,2 mg.L<sup>-1</sup>. As maiores concentrações de ambos os fatores (16,0 mg.L<sup>-1</sup> para o Mn e 0,9 mg.L<sup>-1</sup> para o Co) otimizaram a produção de metano, com aumento para 1,0 mmolCH<sub>4</sub>.gDQO<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup>.

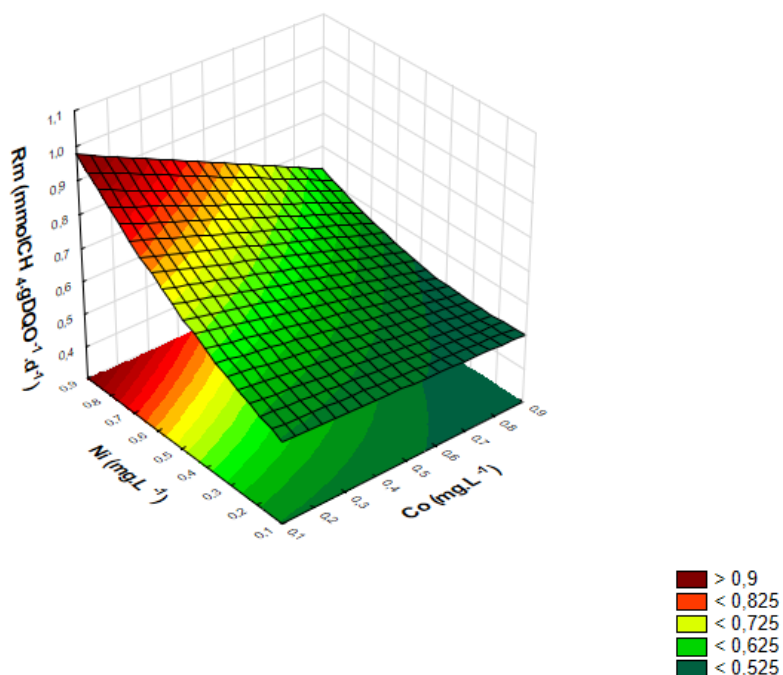
Figura 17 - Superfície de resposta entre Co e Mn para a resposta Rm no Delineamento Composto Central



Fonte: O Autor.

Por fim, ao analisar as interações entre o Ni e Co (Figura 18), quanto maior a concentração adicionada de Co, mais prejudicada foi a resposta. O efeito do níquel foi oposto, sendo a região ótima acima da adição de 0,9 mg.L<sup>-1</sup> deste fator, para concentrações de cobalto abaixo de 0,5 mg.L<sup>-1</sup>, atingindo uma velocidade de 1 mmolCH<sub>4</sub>.gDQO<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup>.

Figura 18 - Superfície de resposta entre Co e Ni para a resposta Rm no Delineamento Composto Central



Fonte: O Autor.

A blocagem e o Ni foram significativos para a resposta P, com p-valores de 0,0000 e 0,0362, respectivamente (Tabela 12). Isso significa que algum fator desconhecido, decorrente do DCC ter sido feito em dois blocos, interferiu na resposta P. De fato, houve diferença significativa nos valores da resposta P entre os blocos. Ademais, a interação entre o Co e o Mn foi significativa a 94% de confiança (p-valor de 0,0609), e o Co foi significativo a 76% de confiança (p-valor de 0,2434), de acordo com a Tabela 12. O modelo foi bem ajustado, conforme a Figura 19, sendo descrito pela Equação 3.

Tabela 12 - Tabela ANOVA para parâmetro produção máxima P ( $\text{mmolCH}_4.\text{gDQO}^{-1}$ ) no Delineamento Composto Central. Os números em vermelho indicam os fatores significativos a 95% de confiança

Fatores	ANOVA; Var.: P; $R^2 = 0,8926$ ; $R_{aj} = 0,8535$ MS Residual = 0,0422 DV: P				
	SS <sup>(1)</sup>	df <sup>(2)</sup>	MS <sup>(3)</sup>	F <sup>(4)</sup>	p-valor
Blocos	3,2859	1	3,2859	77,8825	0,0000
Co (L)	0,0641	1	0,0641	1,5194	0,2434
Ni (L)	0,2398	1	0,2398	5,6833	0,0362
Co (L) e Mn (L)	0,1838	1	0,1838	4,3566	0,0609
Erro	0,4641	11	0,0422		
Total SS	4,3210	15			

<sup>(1)</sup>Soma dos quadrados.

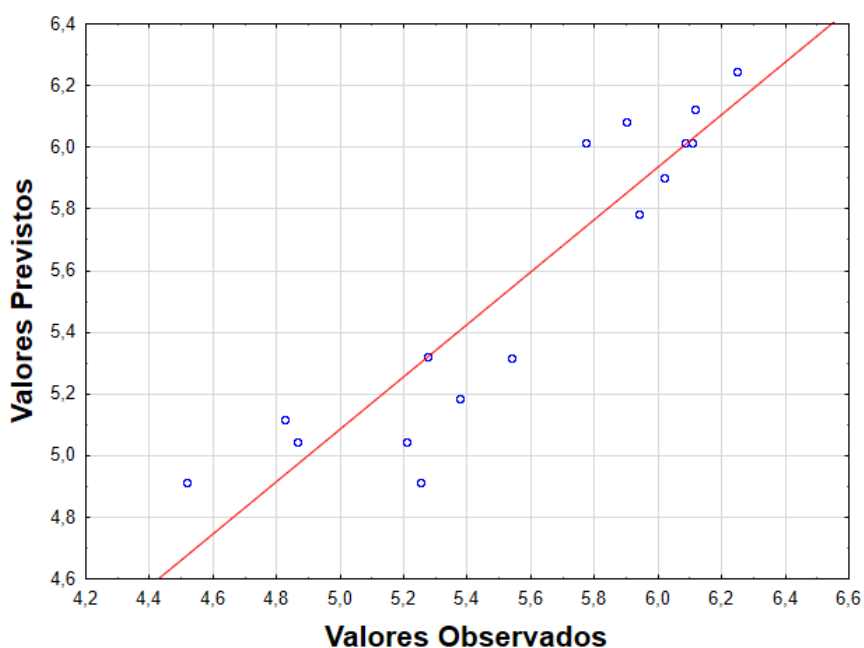
<sup>(2)</sup>Graus de liberdade.

<sup>(3)</sup>Média dos quadrados.

<sup>(4)</sup>Razão F.

Fonte: O Autor.

Figura 19 - Valores previstos e observados para a resposta P no Delineamento Composto Central



Fonte: O Autor.

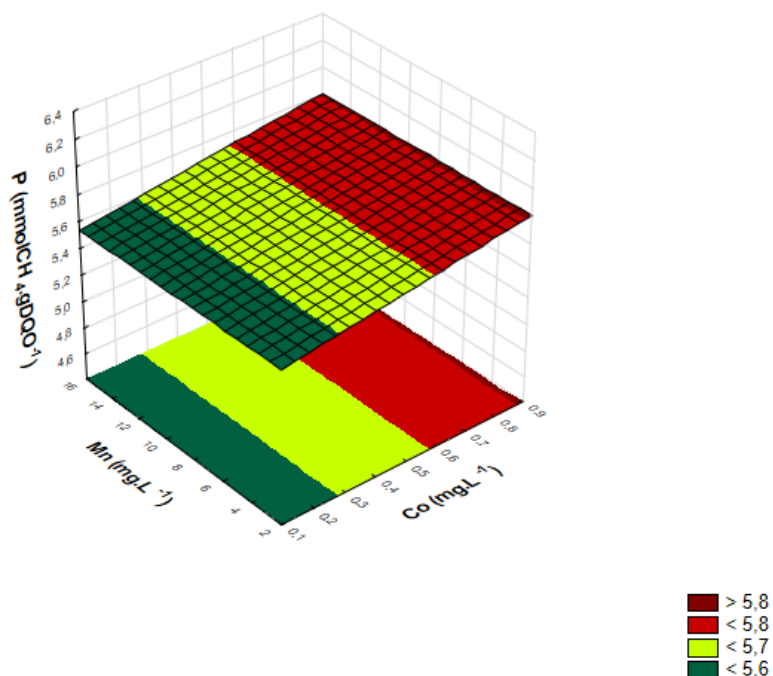
Equação 3:

$$P = 5,0577 + (0,4493 \times \text{Bloco}) + (0,3337 \times \text{Co}) + (0,6837 \times \text{Ni}) - (0,0003 \times \text{Co} \times \text{Mn})$$

Apesar da interação negativa entre o Co e o Mn (Equação 3) ser próxima do limite de significância (Tabela 12), o coeficiente relativo a esse termo (0,0003) é muito inferior ao

coeficiente positivo em relação ao efeito do Co (0,3337) (Equação 3). Por isso, na Figura 20 o efeito da interação com o Mn é quase imperceptível.

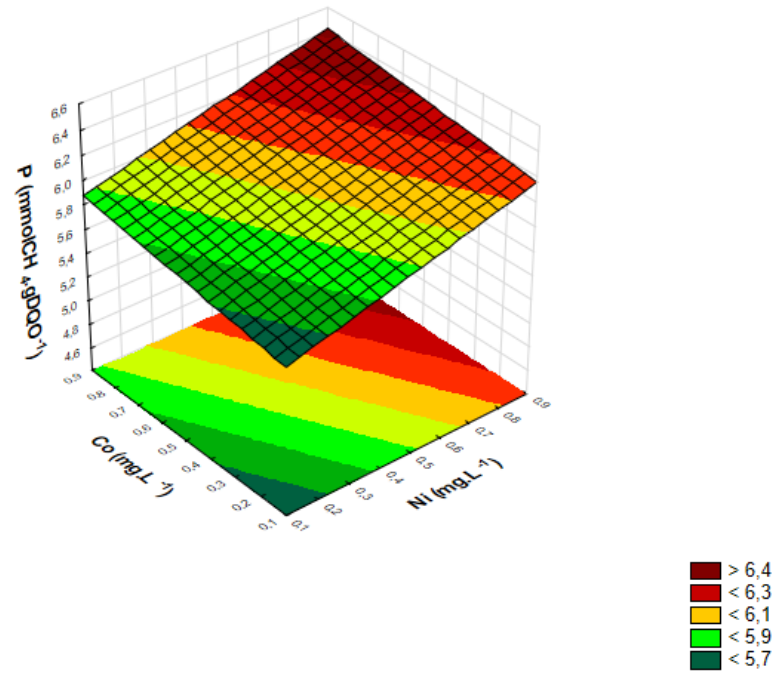
Figura 20 - Superfície de resposta entre Co e Mn para a resposta P no Delineamento Composto Central



Fonte: O Autor.

A Figura 21 indica que a partir da concentração de Ni de 0,9 mg.L<sup>-1</sup>, valores superiores a 6,4 mmolCH<sub>4</sub>.gDQO<sup>-1</sup> para a resposta P podem ser obtidos quando concentrações de Co superiores a 0,5 mg.L<sup>-1</sup> são adicionadas. Por sua vez, quando o Co é adicionado com concentração de 0,9 mg.L<sup>-1</sup>, a produção de 6,4 mmolCH<sub>4</sub>.gDQO<sup>-1</sup> é atingida para concentrações de Ni acima de 0,7 mg.L<sup>-1</sup>. Assim, podem-se encontrar as menores concentrações de Ni e Co que precisam ser adicionadas para obter essa resposta.

Figura 21 - Superfície de resposta entre Co e Ni para a resposta P no Delineamento Composto Central



Fonte: O Autor.

A superfície utilizando os fatores Mn e Ni não foi representada pois eles não interagem e o Mn não tem efeito linear nem quadrático na resposta.

Para a resposta produtividade, a blocagem, o Mn quadrático e o Ni linear foram significativos, com p-valores de 0,011, 0,0053 e 0,0017, respectivamente (Tabela 13), e a interação de Co com Ni foi significativa a 88% de confiança (p-valor de 0,1214). A Equação 4 descreve o modelo, que foi bem ajustado segundo a Figura 22.

Tabela 13 - Tabela ANOVA para parâmetro Produtividade ( $\text{mmolCH}_4.\text{DQO}^{-1}.\text{dia}^{-1}$ ) no Delineamento Composto Central. Os números em vermelho indicam os fatores significativos a 95% de confiança

Fatores	ANOVA; Var.: Produtividade; $R^2 = 0,8547$ ; $R_{aj} = 0,7579$				
	MS Residual = 0,0000 DV: Produtividade				
	SS <sup>(1)</sup>	df <sup>(2)</sup>	MS <sup>(3)</sup>	F <sup>(4)</sup>	p-valor
Blocos	0,0005	1	0,0005	10,2967	0,0107
Mn (L)	0,0001	1	0,0001	1,2283	0,2965
Mn (Q)	0,0007	1	0,0007	13,3569	0,0053
Ni (L)	0,0010	1	0,0010	19,5700	0,0017
Ni (Q)	0,0001	1	0,0001	1,8134	0,2110
Co (L) e Ni (L)	0,0001	1	0,0001	2,9246	0,1214
Erro	0,0004	9	0,0001		
Total SS	0,0030	15			

<sup>(1)</sup>Soma dos quadrados.

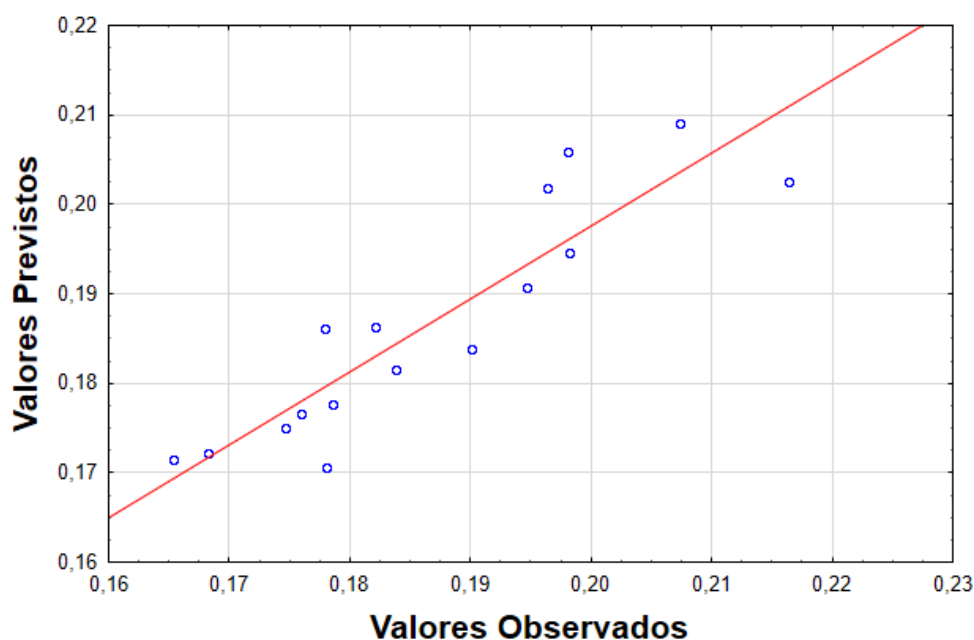
<sup>(2)</sup>Graus de liberdade.

<sup>(3)</sup>Média dos quadrados.

<sup>(4)</sup>Razão F.

Fonte: O Autor.

Figura 22 - Valores previstos e observados para a resposta Produtividade no Delineamento Composto Central



Fonte: O Autor.

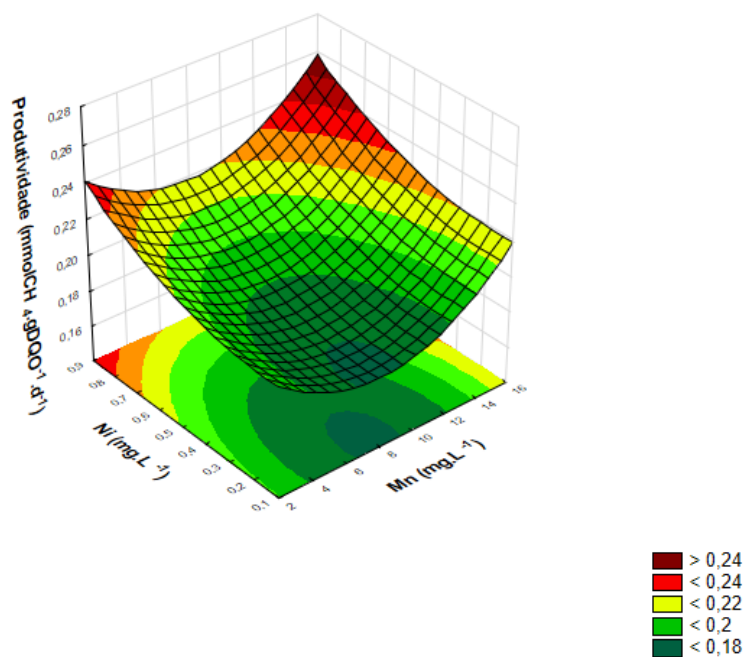
Equação 4:

$$\text{Produtividade} = 0,2141 + (0,0061 \times B) - (0,0100 \times \text{Mn}) + (0,0006 \times \text{Mn}^2) - (0,0216 \times \text{Ni}) + (0,0706 \times \text{Ni}^2) - (0,0139 \times \text{Co} \times \text{Ni})$$



Pela Figura 23, a adição de concentrações de Mn entre 6,5 mg.L<sup>-1</sup> e 9,5 mg.L<sup>-1</sup>, aproximadamente, combinadas à adição de menos de 0,3 mg.L<sup>-1</sup> para o Ni obtêm-se a região de mínimo para a resposta produtividade, atingindo 0,18 mmolCH<sub>4</sub>.gDQO<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup>. A adição de Ni com concentração maior do que a aplicada (0,9 mg.L<sup>-1</sup>) e fora da faixa de concentrações do Mn que definem a região mínima pode colaborar para se atingir a região ótima, com uma produtividade de 0,26 mmolCH<sub>4</sub>.gDQO<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup>.

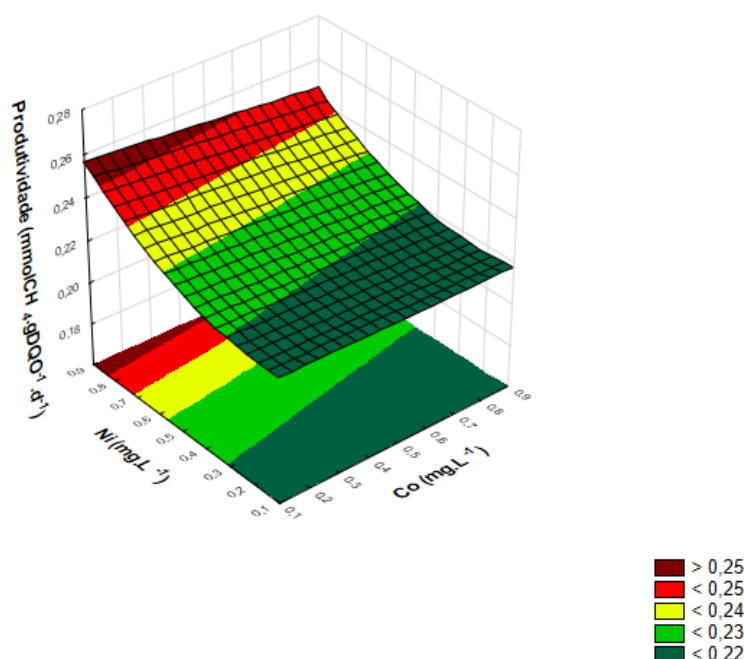
Figura 23 - Superfície de resposta entre Mn e Ni para a resposta Produtividade no Delineamento Composto Central



Fonte: O Autor.

A Figura 24 mostra a superfície de resposta da interação negativa entre o Co e o Ni. O maior valor de produtividade (0,26 mmolCH<sub>4</sub>.gDQO<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup>) é atingido com concentrações acima de 0,9 mg.L<sup>-1</sup> para o Ni e abaixo de 0,6 mg.L<sup>-1</sup> para o Co.

Figura 24 - Superfície de resposta entre Co e Ni para a resposta Produtividade no Delineamento Composto Central



Fonte: O Autor.

A superfície de resposta entre Co e Mn não foi construída pois não ocorre interação entre esses fatores e o Co, isoladamente, não tem efeito sobre a resposta produtividade. A partir dos resultados do DCC, foi determinado que apenas o Ni na concentração de 0,9 mg.L<sup>-1</sup> seria avaliado no ensaio de validação.

#### 5.4 Ensaio de Validação

A Tabela 14 mostra uma comparação dos resultados obtidos no ensaio de validação para a condição controle (Val-C) e para a condição com adição de Ni (Val-Ni+) na concentração de 0,9 mg.L<sup>-1</sup>. Apesar de P ter ficado 3% menor na Val-Ni+ em comparação com a Val-C, os parâmetros de Rm e produtividade apresentaram aumentos de 7% e 27%, respectivamente (Tabela 14). Ressalta-se que a produtividade é a produção de metano acumulada pelo tempo experimental decorrido, por substrato adicionado, portanto esse parâmetro indica uma velocidade média, enquanto a velocidade Rm é o valor máximo, obtido de forma pontual. Desse modo, a Val-Ni+ possibilitou às arqueas metanogênicas permanecerem por um tempo maior

com velocidade de produção de metano superior à da Val-C (Figura 25). Esse resultado pode permitir a redução do tempo de detenção hidráulica (TDH) em ensaios com reatores contínuos.

Tabela 14 - Resultados do ensaio de validação e caracterização das fases sólida e líquida ao final do experimento

Respostas	Condições	
	Controle $R^2 = 0,9903$ ; $R_{aj} = 0,9899$	Adição de Ni a $0,9 \text{ mg.L}^{-1}$ $R^2 = 0,9266$ ; $R_{aj} = 0,9230$
P ( $\text{mmolCH}_4.\text{gDQO}^{-1}$ )	5,86	5,69
Rm ( $\text{mmolCH}_4.\text{gDQO}^{-1}.\text{dia}^{-1}$ )	0,46	0,49
Produtividade ( $\text{mmolCH}_4.\text{gDQO}^{-1}.\text{dia}^{-1}$ )	17,11	21,77
Ni ( $\text{mg.L}^{-1}$ ) - vinhaça e lodo	$0,00 \pm 0,00$	$0,09 \pm 0,00$
Ni ( $\text{mg.L}^{-1}$ ) - fração dissolvida	$< \text{LD}^{(1)}$	$0,47 \pm 0,00$
Ni ( $\text{mg.L}^{-1}$ ) - fração particulada	$< \text{LD}^{(1)}$	$0,17 \pm 0,01$
DQO ( $\text{mg.L}^{-1}$ )	$5888,9 \pm 256,2$	$5722,22 \pm 107,2$
Fenóis ( $\text{mg.L}^{-1}$ )	$2170,2 \pm 84,1$	$2246,7 \pm 78,4$
Ácido láctico ( $\text{mg.L}^{-1}$ )	$22,1 \pm 5,3$	$17,1 \pm 1,0$
Açúcares totais ( $\text{mg.L}^{-1}$ )	$230,0 \pm 8,7$	$228,3 \pm 12,6$
Sulfato ( $\text{mg.L}^{-1}$ )	$63,5 \pm 13,2$	$79,8 \pm 8,2$
Sulfeto ( $\text{mg.L}^{-1}$ )	$156,8 \pm 8,1$	$142,30 \pm 31,9$
Alcalinidade parcial ( $\text{mgCaCO}_3\text{eq.L}^{-1}$ )	$7271,3 \pm 157,0$	$7198,2 \pm 248,0$
Sólidos voláteis totais ( $\text{gSVT.L}^{-1}$ )	$2,30 \pm 0,22$	$2,79 \pm 0,54$
Sólidos fixos totais ( $\text{gSFT.L}^{-1}$ )	$2,24 \pm 0,24$	$2,59 \pm 0,37$
Sólidos totais ( $\text{gST.L}^{-1}$ )	$4,54 \pm 0,45$	$5,38 \pm 0,89$

(1) Limite de Detecção.

Fonte: O Autor.

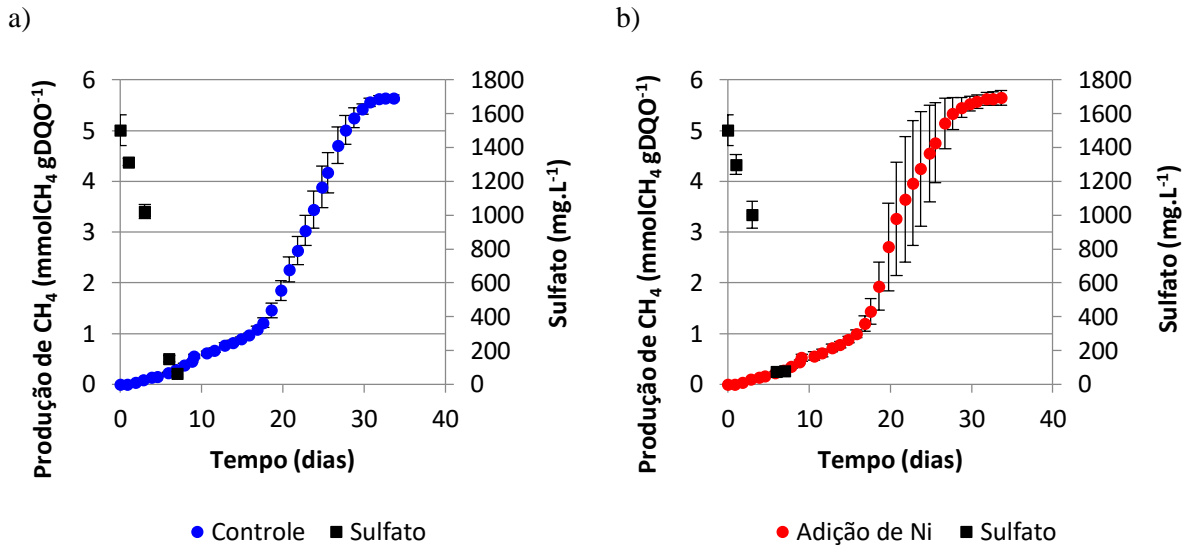
A concentração de Ni na vinhaça e no lodo da Val-C era de  $0,00 \pm 0,00 \text{ mg.L}^{-1}$ , e ficou abaixo do limite de detecção nas frações dissolvida e particulada, ao final do ensaio (Tabela 14). Por sua vez, na condição com adição de  $0,90 \pm 0,00 \text{ mg.L}^{-1}$  de Ni, obteve-se  $0,64 \pm 0,01 \text{ mg.L}^{-1}$  de Ni nas frações dissolvida e particulada (Tabela 14), sendo  $0,47 \pm 0,00 \text{ mg.L}^{-1}$  na fração dissolvida e  $0,17 \pm 0,01 \text{ mg.L}^{-1}$  na fração particulada. Assume-se que a recuperação de  $75 \pm 2\%$  do Ni adicionado nas frações dissolvida e particulada ocorreu devido à amostragem, pois a vinhaça e o lodo são heterogêneos.

O pH final das réplicas da Val-C do ensaio de validação foi de  $8,0 \pm 0,0$ , valor igual ao das réplicas da Val-Ni+. Em relação às análises do substrato, a relação DQO/sulfato inicial foi de 11,01, e os valores finais de remoção de DQO e sulfato nas duas condições foram próximos. Na Val-C, a remoção de DQO foi de  $64,4 \pm 1,6\%$  e a remoção de sulfato foi de  $95,8 \pm 0,9\%$ . Já para a Val-Ni+, a eficiência de remoção foi de  $65,4 \pm 0,7\%$  para DQO e  $94,7 \pm 0,5\%$  para o sulfato (Figura 25 e Figura 26). Entretanto, ao longo do ensaio houve um consumo maior de

DQO entre os dias 20 e 28 na Val-Ni+, indicando maior velocidade de conversão (Figura 26). Durante esse período ocorreu a produção exponencial de metano (Figura 25), o que corrobora com o maior valor de produtividade dessa condição.

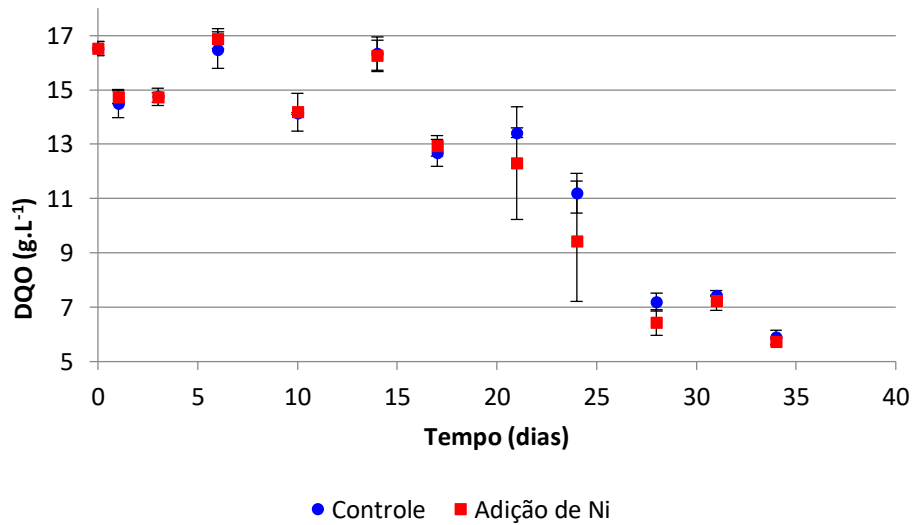
Como apontado no Item 2.3, deve-se atentar para a competição por doadores de elétrons entre arqueas metanogênicas e bactérias redutoras de sulfato em sistemas anaeróbios cujos substratos contêm grande concentração de sulfato. Resultados obtidos por Kiyuna, Fuess e Zaiat (2017) utilizando vinhaça bruta e relações de DQO/sulfato de 10 e 12 corroboraram a prevalência da sulfetogênese no início do processo, sendo necessários 50 dias para a completa conversão do sulfato na relação DQO/sulfato de 10, e 35 dias na relação DQO/sulfato de 12, aproximadamente. No presente estudo, com relação DQO/sulfato de 11, a completa conversão do sulfato foi obtida antes do décimo dia de experimento (Figura 25). Ademais, os autores obtiveram produção máxima de metano de  $452,9 \pm 4,4 \text{ L.kgSV}^{-1}$  e velocidade de produção de  $8,8 \pm 0,2 \text{ L.kgSV}^{-1}.\text{dia}^{-1}$  com a relação DQO/sulfato de 10, e  $541,4 \pm 15,4 \text{ L.kgSV}^{-1}$  e  $6,3 \pm 0,5 \text{ L.kgSV}^{-1}.\text{dia}^{-1}$  com a relação DQO/sulfato de 12. Os valores de P e Rm (Tabela 14) na condição Val-Ni+ indicam  $381,56 \text{ L.kgSV}^{-1}$  e  $32,86 \text{ L.kgSV}^{-1}.\text{dia}^{-1}$ , respectivamente, indicando maior proximidade dos resultados da condição cuja relação DQO/sulfato era de 10 para Kiyuna, Fuess e Zaiat (2017). Justifica-se que o valor de Rm obtido no presente estudo seja bastante superior aos valores encontrados pelos autores devido à vinhaça já ter passado pelo processo de acidificação, em contraste com a vinhaça bruta utilizada por Kiyuna, Fuess e Zaiat (2017). Por sua vez, indica-se que, entre outros fatores, o valor de P foi menor no presente estudo devido ao hidrogênio que poderia ser utilizado pelas arqueas metanogênicas hidrogenotróficas já ter sido liberado no reator acidogênico.

Figura 25 - Produção de metano e remoção de sulfato na Val-C e na Val-Ni+



Fonte: O Autor.

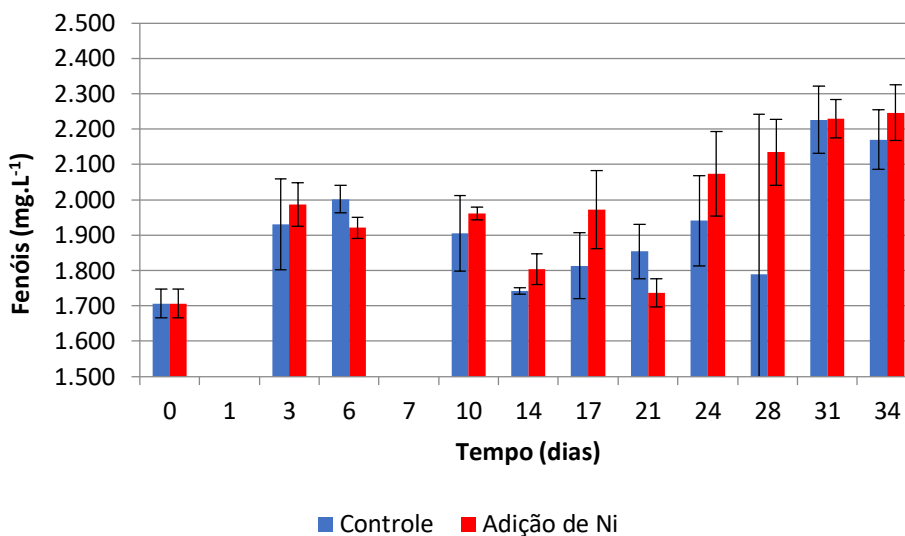
Figura 26 - Concentrações médias de DQO na Val-C e na Val-Ni+



Fonte: O Autor.

As diferenças também não foram significativas nas concentrações de fenóis, havendo um aumento de  $27,2 \pm 4,9\%$  na Val-C, e um aumento de  $31,6 \pm 4,6\%$  na Val-Ni+ (Figura 27), indicando que durante a metanogênese pode ter ocorrido hidrólise de partículas sólidas ou solubilização de polifenóis.

Figura 27 - Concentrações médias de fenóis na Val-C e na Val-Ni+



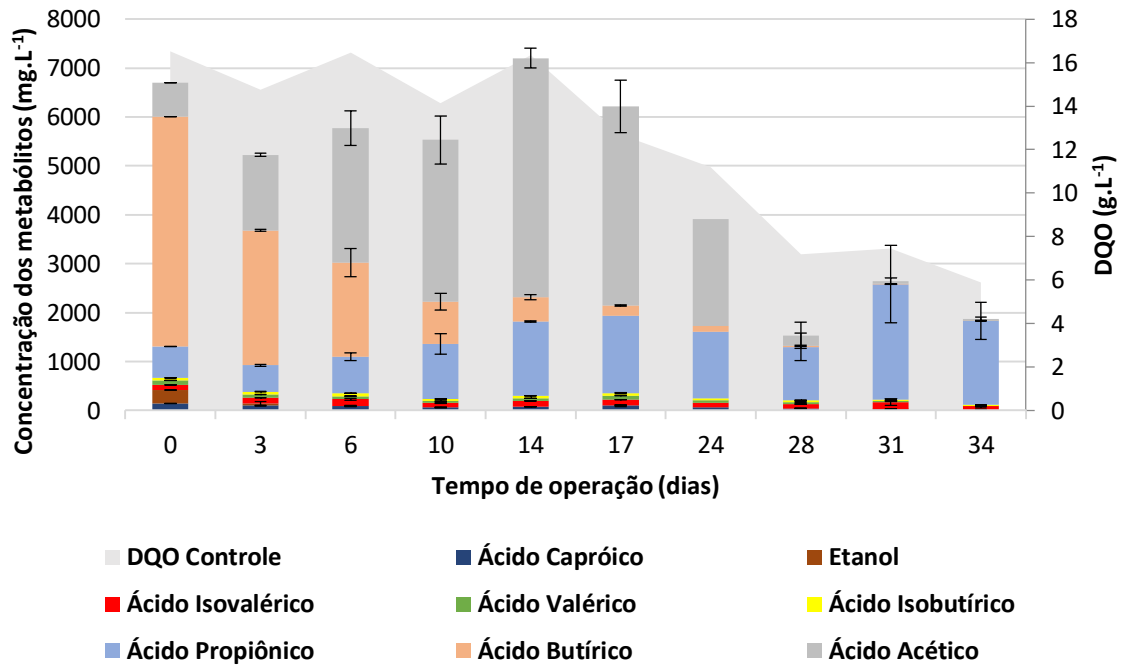
Fonte: O Autor.

Analisando-se o perfil temporal das concentrações médias de metabólitos entre as duas condições (Figura 28 e Figura 29), nota-se que o ácido butírico estava presente em maior concentração no início, com 4701,08 mg.L<sup>-1</sup>, sendo consumido progressivamente. Os valores desse metabólito ficaram um pouco menores na Val-C ao longo do experimento, com exceção dos dias 6, 24 e 31. Ressalta-se o menor valor de ácido butírico no dia 24 da Val-Ni+, pois houve uma redução de 67,4% entre os dias 17 e 24 (Figura 29), enquanto essa redução foi de 43,2% na Val-C (Figura 28).

O ácido acético foi produzido até o dia 14 nas duas condições, porém foi consumido mais rápido entre os dias 20 e 28 na Val-Ni+. Houve uma redução de 46,3% de ácido acético entre os dias 17 e 24 na Val-C (Figura 28), enquanto essa redução foi de 80,4% na Val-Ni+ (Figura 29). Isso revela uma velocidade maior de conversão de acetato para metano durante a produção exponencial de metano (Figura 25), em que ocorre maior produção de metano e maior consumo de DQO (Figura 26).

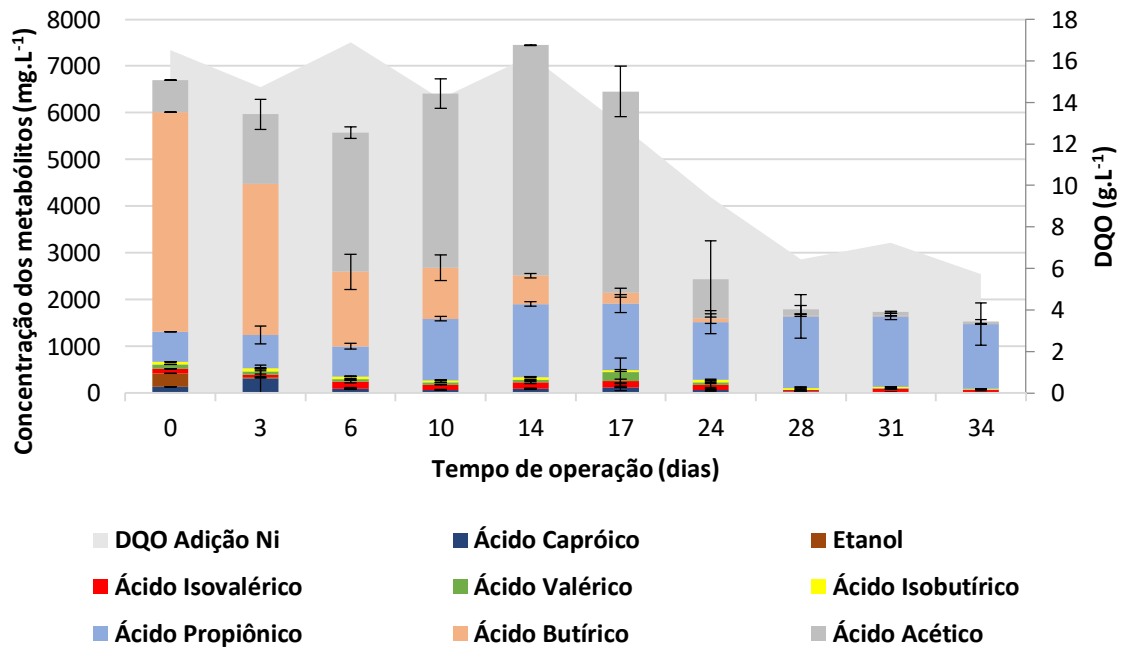
O maior consumo de acetato na Val-Ni+ pode ter ocorrido devido ao metal fazer parte da acetil-coenzima A decarbonilase/sintase, enzima presente em arqueas metanogênicas acetoclásticas (MULROONEY; HAUSINGER, 2003), como apresentado no Item 2.5. Além disso, o níquel também está presente em enzimas de arqueas metanogênicas hidrogenotróficas (MULROONEY; HAUSINGER, 2003), e faz parte do cofator F<sub>430</sub> de metanogênicas, essencial para a formação de metano (FERRY, 2010; MULROONEY; HAUSINGER, 2003).

Figura 28 - Perfil temporal das concentrações médias dos metabólitos na Val-C (colunas empilhadas)



Fonte: O Autor.

Figura 29 - Perfil temporal das concentrações médias dos metabólitos na Val-Ni+ (colunas empilhadas)



Fonte: O Autor.

Observa-se também menor acúmulo de ácido propiônico na Val-Ni+. Ao final do experimento, a concentração de ácido propiônico obtida na Val-C foi de  $1715,49 \text{ mg.L}^{-1}$  (Figura

28), enquanto o valor na Val-Ni<sup>+</sup> foi de 1386,78 mg.L<sup>-1</sup> (Figura 29). Assim, outra hipótese para a maior produtividade de metano nessa condição é uma influência desse metal na degradação do ácido propiônico.

Em relação aos outros metabólitos, não houve muita diferença entre os perfis de consumo e produção nas duas condições. O etanol, inicialmente na concentração de 283,53 mg.L<sup>-1</sup>, foi consumido completamente até o sexto dia de experimento. Os ácidos isobutírico e isovalérico foram produzidos até o dia 6, consumidos até o dia 10, quando voltaram a ser produzidos até o dia 17 e consumidos progressivamente. Já os ácidos valérico e capróico foram consumidos até o dia 10, produzidos até o dia 17, e consumidos progressivamente.



## 6. CONCLUSÕES

Os metais Co, Mn e Ni tiveram efeito significativo positivo nas respostas de velocidade máxima de produção de metano, produção máxima e produtividade no Delineamento Fatorial Fracionado. No Delineamento Composto Central, o Ni teve efeito significativo positivo para a produção máxima e para a produtividade de metano, sendo avaliado no ensaio de validação.

O impacto da suplementação de níquel no ensaio de validação foi da ordem de 5% para os parâmetros de produção máxima (P) e velocidade máxima de produção ( $R_m$ ), sugerindo baixa relevância. No entanto, a adição de  $0,9 \text{ mg L}^{-1}$  de Ni levou a um ganho de 27% na produtividade do metano, o que indica que velocidades mais altas de produção foram mantidas por mais tempo. Foi observada maior velocidade de conversão de acetato durante a fase exponencial de produção de metano, assim como um menor acúmulo de ácido propiônico na condição com suplementação de Ni. Desse modo, em ensaios com reatores contínuos, a adição de Ni pode permitir a redução do tempo de detenção hidráulica (TDH) e aumento da carga orgânica volumétrica sem provocar acúmulo de metabólitos.



## **7. PERSPECTIVAS E POSSIBILIDADES PARA TRABALHOS FUTUROS**

A partir dos resultados do presente estudo, os efeitos da adição de Ni na produção de metano a partir da digestão anaeróbia da vinhaça acidificada podem ser analisados em ensaios com reatores contínuos. Como exposto no Item 6, formula-se a hipótese de que essa suplementação possibilita a redução do tempo de detenção hidráulica (TDH) e o aumento da carga orgânica volumétrica sem provocar acúmulo de metabólitos.

Ademais, trabalhos futuros podem abordar a codigestão da vinhaça com efluentes que contenham Ni. Desse modo, evitam-se o gasto econômico e os aspectos ambientais relacionados à suplementação do metal. Além disso, a diminuição da concentração de Ni no efluente final da codigestão também poderia ser interessante sob a perspectiva ambiental.



## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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.

ADORNO, M. A. T.; MIRANDOLA, C. A. S.; PIMENTA, D. F. N.; TOMITA, I. Development and validation of a method (GC/TCD) to determine N<sub>2</sub>, CH<sub>4</sub>, CO<sub>2</sub> and H<sub>2</sub>S in biogas. **XI Latin American Workshop and Symposium on Anaerobic Digestion (DAAL)**. La Habana: 2014.

ANDRADE, C. D. **A Flor e a Náusea**. 1945.

APHA/AWWA/WEF. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. **Standard Methods**, 541. 2012. doi: ISBN9780875532356.

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

BIZZI, C. A.; FLORES, E. L. M.; NÓBREGA, J. A.; OLIVEIRA, J. S. S.; SCHMIDT, L.; MORTARI, S. R. Evaluation of a digestion procedure based on the use of diluted nitric acid solutions and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for the multielement determination of whole milk powder and bovine liver by ICP-based techniques. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**. v. 29, p. 332-338, 2014. <https://doi.org/10.1039/c3ja50330e>.

BRASIL. Ministério do Interior. Portaria nº 323, de 29 de novembro de 1978. [Proíbe o lançamento, direto ou indireto do vinhoto em qualquer coleção hídrica, pelas destilarias de álcool do país]. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 4 dez. 1978. Seção 1, p. 19456.

BRASIL. Ministério do Interior. Portaria nº 158, de 03 de novembro de 1980. [Dispõe sobre o lançamento de vinhoto em coleções hídricas, provenientes de destilarias de álcool, de bebidas alcoólicas e usinas de açúcar]. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 6 nov. 1980a. Seção 1, p. 22250.

BRASIL. **Resolução ANP n. 36, de 06/12/2005**. Brasília, 2005. Publicada no Diário Oficial da União em 07/12/2005.

BRAGA, A. F. M.; PEREIRA, M. B. O. C.; ZAIAT, M.; SILVA, G. H. R.; FERMOSO, F. G. Screening of trace metal supplementation for black water anaerobic digestion. **Environmental Technology (United Kingdom)**, v. 39, n. 14, p. 1776–1785, 2018.

BRAGA, A. F. M.; ZAIAT, M.; SILVA, G. H. R.; FERMOSO, F. G. Metal fractionation in sludge from sewage UASB treatment. **Journal of Environmental Management**, v. 193, p. 98–107, 2017.

BROWN, A. I. T.; POZZI, E.; DAMIANOVIC, M. H. R. Z.; BRIONES, H. E. U.; ORTIZ, L. E. A.; PIRES, E. C. Population changes of eubacteria, sulfate-reducing bacteria and methanogenic archaea in an anaerobic reactor processing ethanol distillery vinasse. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 62, p. 13, 2019.

BUCHNAN, I. D.; NICELL, J. A. Model Development for Horseradish Peroxidase Catalyzed Removal of Aqueous Phenol. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 54, p. 251–261, 1997.

CAMARGO, J. A.; PEREIRA, N.; CABELLO, P. R.; TERAN, F. J. C. Viabilidade da aplicação do método respirométrico de Bartha para a análise da atividade microbiana de solos sob aplicação de vinhaça. **Engenharia Ambiental**, v. 6, p. 264–271, 2009.

CHAGANTI, S. R.; KIM, D. H.; LALMAN, J. A.; SHEWA, W. A. Statistical optimization of factors affecting biohydrogen production from xylose fermentation using inhibited mixed anaerobic cultures. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 37, n. 16, p. 11710–11718, 2012.

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

CHERNICHARO, C. A. L. **Anaerobic Reactors**. IWA Publishing, 2007. v. 4

CHOONG, Y. Y.; NORLI, I.; ABDULLAH, A. Z.; YHAYA, M. F. Impacts of trace element supplementation on the performance of anaerobic digestion process: A critical review. **Bioresource Technology**, v. 209, p. 369–379, 2016.

CHRISTOFOLETTI, C. A.; ESCHER, J. P.; CORREIA, J. E.; MARINHO, J. F. U.; FONTANETTI, C. S. Sugarcane vinasse: Environmental implications of its use. **Waste Management**, v. 33, n. 12, p. 2752–2761, 2013.

CONAB – COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Acompanhamento da safra brasileira de cana-de-açúcar. Safra 2019/20**, v. 6 – Quarto levantamento. Brasília:

Conab, abril de 2020. 58p. Disponível em: <https://www.conab.gov.br/info-agro/safras/cana>. Acesso em: 28 jan. 2021.

CONCEIÇÃO, V. M. **Reator anaeróbio serial (RAS) aplicado no processamento de vinhaça de cana-de-açúcar**. 2016. 185 p. Tese (Doutorado em Hidráulica e Saneamento) - Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2016.

COSTA, R. B.; GODOI, L. A. G.; BRAGA, A. F. M.; DELFORNO, T. P.; BEVILAQUA, D. Sulfate removal rate and metal recovery as settling precipitates in bioreactors: Influence of electron donors. **Journal of Hazardous Materials**, v. 403, p. 123622, 2021.

COSTA, R. B.; O'FLAHERTY, V.; LENS, P. N. L. Biological treatment of organic sulfate-rich wastewaters. In: **Environmental Technologies to Treat Sulphur Pollution: Principles and Engineering**. Segunda edição. p. 167-213.

CUNHA, M. P.; FUESS, L. T.; RODRIGUEZ, R. P.; LENS, P. N. L.; ZAIAT, M. Sulfidogenesis establishment under increasing metal and nutrient concentrations: An effective approach for biotreating sulfate-rich wastewaters using an innovative structured-bed reactor (AnSTBR). **Bioresource Technology Reports**, v. 11, p. 100458, 2020.

DEV, S.; ROY, S.; BHATTACHARYA, J. Optimization of the operation of packed bed bioreactor to improve the sulfate and metal removal from acid mine drainage. **Journal of Environmental Management**, v. 200, p. 135–144, 2017.

DIAS, M. O. S. **Simulação do processo de produção de etanol a partir do açúcar e do bagaço, visando a integração do processo e a maximização da produção de energia e excedentes do bagaço**. Universidade Estadual de Campinas, 2008.

DOUKOV, T. I.; IVERSON, T. M.; SERAVALLI, J.; RAGSDALE, S. W.; DRENNAN, C. L. A Ni-Fe-Cu center in a bifunctional carbon monoxide dehydrogenase/acetyl-CoA synthase. **Science**, v. 298, n. 5593, p. 567–572, 2002.

DUBOIS, M.; GILLES, K. A.; HAMILTON, J. K.; REBERS, P. A.; SMITH, F. Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. **Analytical Chemistry**, v. 28, p. 350-356, 1956.

ESPAÑA-GAMBOA, E.; MIJANGOS-CORTES, J.; BARAHONA-PEREZ, L.; DOMINGUEZ-MALDONADO, J.; HERNÁNDEZ-ZARATE, G.; ALZATE-GAVIRIA, L. Vinasses: Characterization and treatments. **Waste Management and Research**, v. 29, n. 12, p. 1235–1250, 2011.

FACCHIN, V.; CAVINATO, C.; FATONE, F.; PAVAN, P.; CECCHI, F.; BOLZONELLA, D. Effect of trace element supplementation on the mesophilic anaerobic digestion of foodwaste in batch trials: The influence of inoculum origin. **Biochemical Engineering Journal**, v. 70, p. 71–77, 2013.

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

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

FOX, P.; POHLAND, F. G. Anaerobic Treatment Applications and Fundamentals: Substrate Specificity during Phase Separation. **Water Environment Research**, v. 66, n. 5, p. 716–724, 1994.

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. 346 p. Tese (Doutorado em Hidráulica e Saneamento) - Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2017.

FUESS, L. T.; ARAÚJO JÚNIOR, M. M.; GARCIA, M. L.; ZAIAT, M. Designing full-scale biodigestion plants for the treatment of vinasse in sugarcane biorefineries: How phase separation and alkalization impact biogas and electricity production costs? **Chemical Engineering Research and Design**, v. 119, p. 209–220, 2017.

FUESS, L. T.; GARCIA, M. L. Implications of stillage land disposal: A critical review on the impacts of fertigation. **Journal of Environmental Management**, v. 145, p. 210–229, 2014.

FU, S. F.; XU, X. H.; DAI, M.; YUAN, X. Z.; GUO, R. B. Hydrogen and methane production from vinasse using two-stage anaerobic digestion. **Process Safety and Environmental Protection**, v. 107, n. 189, p. 81–86, 2017.

GODOI, L. A. G.; CAMILOTI, P. R.; BERNARDES, A. N.; SANCHEZ, B. L. S.; TORRES, A. P. R.; GOMES, A. C.; BOTTA, L. S. 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.



GODOI, L. A. G.; FORESTI, E.; DAMIANOVIC, M. H. R. Z. Down-flow fixed-structured bed reactor: An innovative reactor configuration applied to acid mine drainage treatment and metal recovery. **Journal of Environmental Management**, v. 197, p. 597–604, 2017.

GREENHILL, S. **Method for determination of free and combined glycerin in biodiesel**. U.S. Patent Application nº 10/744,272, 22 dez. 2003.

GUNKEL, G.; KOSMOL, J.; SOBRAL, M.; ROHN, H.; MONTENEGRO, S.; AURELIANO, J. Sugar cane industry as a source of water pollution - Case study on the situation in Ipojuca river, Pernambuco, Brazil. **Water, Air, and Soil Pollution**, v. 180, p. 261–269, 2007.

JIANG, Y.; ZHANG, Y.; BANKS, C.; HEAVEN, S.; LONGHURST, P. Investigation of the impact of trace elements on anaerobic volatile fatty acid degradation using a fractional factorial experimental design. **Water Research**, v. 125, p. 458–465, 2017.

JONES, J. B.; STADTMAN, T. C. Selenium-dependent and selenium-independent formate dehydrogenase of *Methanococcus vannielii*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 256, n. 2, p. 656–663, 1981.

KAYHANIAN, M.; RICH, D. Pilot-scale high solids thermophilic anaerobic digestion of municipal solid waste with an emphasis on nutrient requirements. **Biomass and Bioenergy**, v. 8, n. 6, p. 433–444, 1995.

KESKIN, T.; ARSLAN, K.; ABUBACKAR, H. N.; CANSU, V.; DIDEM, E.; DUYGU, K.; YANIK, J.; OZDEMIR, G.; AZBAR, N. Determining the effect of trace elements on biohydrogen production from fruit and vegetable wastes. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 43, n. 23, p. 10666–10677, 2018.

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.

LENS, P. N. L.; VISSER, A.; JANSSEN, A. J. H.; HULSHOFF POL, L. W.; LETTINGA, G. Biotechnological Treatment of Sulfate-Rich Wastewaters. **Critical Reviews in Environmental Science and Technology**, v. 28, n. 1, p. 41–88, 1998.

LI, X., MO, H., ZHOU, C., CI, Y., WANG, J., & ZANG, L. Nickel Foam Promotes Syntrophic Metabolism of Propionate and Butyrate in Anaerobic Digestion. **ACS omega**, v. 6, n. 32, p. 21033–21042, 2021.

LORENZI, B. R.; ANDRADE, T. H. N. O etanol de segunda geração no Brasil: políticas e redes sociotécnicas. **Revista Brasileira de Ciências Sociais**, v. 34, n. 100, 2019.

MACEDO, I. C.; SEABRA, J. E. A.; SILVA, J. E. A. R. Green house gases emissions in the production and use of ethanol from sugarcane in Brazil: The 2005/2006 averages and a prediction for 2020. **Biomass and Bioenergy**, v. 32, p. 582–595, 2008.

MAHIMARAJA, S.; BOLAN, N. S. Problems and prospects of agricultural use of distillery spentwash in India. **SuperSoil 2004**. 3<sup>rd</sup> Australian New Zealand Soils Conference. 5-9 Dezembro 2004. Universidade de Sydney, Australia, 2004.

MARQUES, S. S. I., NASCIMENTO, I. A., DE ALMEIDA, P. F., & CHINALIA, F. A. Growth of *Chlorella vulgaris* on sugarcane vinasse: the effect of anaerobic digestion pretreatment. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 171, n. 8, p. 1933-1943, 2013.

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

MENG, X.; ZHANG, Y.; LI, Q.; QUAN, X. Adding Fe<sub>0</sub> powder to enhance the anaerobic conversion of propionate to acetate. **Biochemical Engineering Journal**, v. 73, p. 80–85, 2013.

MENON, A.; WANG, J. Y.; GIANNIS, A. Optimization of micronutrient supplement for enhancing biogas production from food waste in two-phase thermophilic anaerobic digestion. **Waste Management**, v. 59, p. 465–475, 2017.

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

MORAN-SALAZAR, R. G.; SANCHEZ-LIZARRAGA, A. L.; RODRIGUEZ-CAMPOS, J.; DAVILA-VAZQUEZ, G.; MARINO-MARMOLEJO, E. N.; DENDOOVEN, L.; CONTRERAS-RAMOS, S. M. Utilization of vinasses as soil amendment: consequences and perspectives. **SpringerPlus**, v. 5, p. 11, 2016.

MULROONEY, S. B.; HAUSINGER, R. P. Nickel uptake and utilization by microorganisms. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 27, p. 239–261, 2003.

NASR, N.; ELBESHBISHY, E.; HAFEZ, H.; NAKHLA, G.; HESHAM EL NAGGAR, M. Comparative assessment of single-stage and two-stage anaerobic digestion for the treatment of thin stillage. **Bioresource Technology**, v. 111, p. 122–126, 2012.

NIES, D. H. Microbial heavy-metal resistance. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 51, p. 730–750, 1999.

OLESZKIEWICZ, J. A.; SHARMA, V. K. Stimulation and inhibition of anaerobic processes by heavy metals-A review. **Biological Wastes**, v. 31, n. 1, p. 45–67, 1990.

OLIVEIRA, B. G.; CARVALHO, J. L. N.; CERRI, C. E. P.; CERRI, C. C.; FEIGL, B. J. Soil greenhouse gas fluxes from vinasse application in Brazilian sugarcane areas. **Geoderma**, v. 200–201, p. 77–84, 2013.

PANKHANIA, I. P.; ROBINSON, J. P. Heavy metal inhibition of methanogenesis by *Methanospirillum hungatei* GP1. **FEMS Microbiology Letters**, v. 22, n. 3, p. 277–281, 1984.

PAULO, L. M.; STAMS, A. J. M.; SOUSA, D. Z. Methanogens, sulphate and heavy metals: a complex system. **Reviews in Environmental Science and Biotechnology**, v. 14, n. 4, p. 537–553, 2015.

PAULO, P. L.; JIANG, B.; CYSNEIROS, D.; STAMS, A. J. M.; LETTINGA, G. Effect of Cobalt on the Anaerobic Thermophilic Conversion of Methanol. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 85, n. 4, p. 434–441, 2004.

PERNA, V.; CASTELLÓ, E.; WENZEL, J.; ZAMPOL, C.; FONTES LIMA, D. M.; BORZACCONI, L.; VARESCHE, M. B.; ZAIAT, M.; ETCHEBEHERE, C. 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.

PIFFER, M. A.; ZAIAT, M.; NASCIMENTO, C. A. O.; FUESS, L. T. Dynamics of sulfate reduction in the thermophilic dark fermentation of sugarcane vinasse: A biohydrogen-independent approach targeting enhanced bioenergy production. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 9, n. 5, p. 105956, 2021.

QIAO, S.; TIAN, T.; QI, B.; ZHOU, J. Methanogenesis from wastewater stimulated by addition of elemental manganese. **Scientific Reports**, v. 5, p. 1–10, 2015.

RFA - RENEWABLE FUELS ASSOCIATION. **Markets & Statistics Annual World Fuel Ethanol Production**. U. S. & World Ethanol Production. Disponível em: <https://ethanolrfa.org/statistics/annual-ethanol-production/>. Acesso em: 28 jan. 2021.

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

SANTOS, P. S.; ZAIAT, M.; NASCIMENTO, C. A. O.; FUESS, L. T. Does sugarcane vinasse composition variability affect the bioenergy yield in anaerobic systems? A dual kinetic-energetic assessment. **Journal of Cleaner Production**, v. 240, p. 11, 2019.

SÃO PAULO. Secretaria do Meio Ambiente. Companhia Ambiental do Estado de São Paulo. Norma Técnica P4.231, 3. ed, 2ª versão, fevereiro de 2015. Vinhaça – Critérios e procedimentos para aplicação no solo agrícola. **Diário Oficial do Estado**, São Paulo, SP, 13 fev. 2015.

SCHIEVANO, A.; TENCA, A.; SCAGLIA, B.; MERLINO, G.; RIZZI, A.; DAFFONCHIO, D.; OBERTI, R.; ADANI, F. Two-stage vs single-stage thermophilic anaerobic digestion: Comparison of energy production and biodegradation efficiencies. **Environmental Science and Technology**, v. 46, n. 15, p. 8502–8510, 2012.

SERAVALLI, J.; GU, W.; TAM, A.; STRAUSS, E.; BEGLEY, T. P.; CRAMER, S. P.; RAGSDALE, S. W. Functional copper at the acetyl-CoA synthase active site. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 100, n. 7, p. 3689–3694, 2003.

SHARMA, J.; SINGH, R. Effect of nutrients supplementation on anaerobic sludge development and activity for treating distillery effluent. **Bioresource Technology**, v. 79, n. 2, p. 203–206, 2001.

SHAPOURI, H.; DUFFIELD, J. A.; WANG, M. **The Energy Balance of Corn Ethanol: An Update**. United States Department of Agriculture (USDA). Economic Research Service. Agricultural Economic Reports. 2002.

SILVA, M. A. S.; GRIEBELER, N. P.; BORGES, L. C. Uso de vinhaça e impactos nas propriedades do solo e lençol freático. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 11, n. 1, p. 108–114, 2007.

SPEECE, R. E. Anaerobic biotechnology for industrial wastewater treatment. **Environmental Science & Technology**, v. 17, n. 9, p. 416–427, 1983.

TAKASHIMA, M.; SPEECE, R. E. Mineral nutrient requirements for high-rate methane fermentation of acetate at low SRT. **Research Journal of the Water Pollution Control Federation**, v. 61, n. 11/12, p. 1645–1650, 1989.

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

THUNGKLIN, P.; SITTIJUNDA, S.; REUNGSANG, A. Sequential fermentation of hydrogen and methane from steam-exploded sugarcane bagasse hydrolysate. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 43, n. 21, p. 9924–9934, 2018.

TOMEI, F. A.; BARTON, L. L.; LEMANSKI, C. L.; ZOCCO, T. G.; FINK, N. H.; SILLERUD, L. O. Transformation of selenate and selenite to elemental selenium by *Desulfovibrio desulfuricans*. **Journal of Industrial Microbiology**, v. 14, p. 329–336, 1995.

UHRIE, J. L.; DREVER, J. I.; COLBERG, P. J. S.; NESBITT, C. C. In situ immobilization of heavy metals associated with uranium leach mines by bacterial sulfate reduction. **Hydrometallurgy**, v. 43, p. 231–239, 1996.

USDA - UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE, 2020. Foreign Agricultural Service. **Sugar: World Markets and Trade**. Washington: USDA: FAS, 2020. Disponível em: <https://usda.library.cornell.edu/concern/publications/z029p472x?locale=en>. Acesso em: 27 jan. 2021.

VIRPIRANTA, H.; SOTANIEMI, V.; LEIVISKA, T.; TASKILA, S.; RAMO, J.; JOHNSON, D. B.; TANSKANEN, J. Continuous removal of sulfate and metals from acidic mining-impacted waters at low temperature using a sulfate-reducing bacterial consortium. **Chemical Engineering Journal**, v. 427, p. 132050, 2021.

WANG, J.; WAN, W. Experimental design methods for fermentative hydrogen production: A review. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 34, n. 1, p. 235–244, 2009.

WANG, N., YUAN, T., KO, J. H., SHI, X., & XU, Q. Enhanced syntrophic metabolism of propionate and butyrate via nickel-containing activated carbon during anaerobic digestion. **Journal of Material Cycles and Waste Management**, v. 22, n. 5, p. 1529-1538, 2020.

WOESE, C. R. Bacterial evolution. In: **Microbiological Reviews**. v. 51, p. 221–271, 1987.