

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA DE ENGENHARIA DE SÃO CARLOS

MICHAEL ANTONIO PIFFER

Sistemas sulfetogênicos-acidogênicos alimentados com vinhaça da cana-de-açúcar: uma avaliação da dinâmica da redução de sulfato e de seus impactos na produção de hidrogênio

São Carlos

2021

MICHAEL ANTONIO PIFFER

Sistemas sulfetogênicos-acidogênicos alimentados com vinhaça da cana-de-açúcar: uma avaliação da dinâmica da redução de sulfato e de seus impactos na produção de hidrogênio

Monografia apresentada ao Curso de Engenharia Ambiental, da Escola de Engenharia de São Carlos da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para obtenção do título de Engenheiro Ambiental.

Orientador: Dr. Lucas Tadeu Fuess

Coorientador: Prof. Tit. Marcelo Zaiat

VERSÃO CORRIGIDA

São Carlos

2021

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

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

P627s Piffer, Michael Antonio
 Sistemas sulfetogênicos-acidogênicos alimentados
 com vinhaça da cana-de-açúcar: uma avaliação da
 dinâmica da redução de sulfato e de seus impactos na
 produção de hidrogênio / Michael Antonio Piffer;
 orientador Lucas Tadeu Fuess; coorientador Marcelo
 Zaiat. São Carlos, 2021.

 Monografia (Graduação em Engenharia Ambiental) --
 Escola de Engenharia de São Carlos da Universidade de
 São Paulo, 2021.

 1. biorrefinaria de cana-de-açúcar. 2. biogás.
 3. digestão anaeróbia. 4. sulfetogênese. I. Título.

FOLHA DE JULGAMENTO

Candidato(a): **Michael Antonio Piffer**

Data da Defesa: 02/12/2021

Comissão Julgadora:

Resultado:

Lucas Tadeu Fuess (Orientador(a))

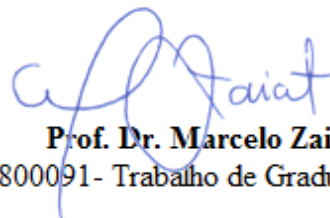
Aprovado

Adriana Ferreira Maluf Braga

Aprovado

Cristiane Arruda Oliveira

Aprovado



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

*À minha mãe, Marisa, minha
fortaleza e fonte incondicional de
inspiração. À minha avó, Célia,
minha protetora. Dedico.*

AGRADECIMENTOS

A Deus por me fortalecer e iluminar meus caminhos para que eu conseguisse conquistar meus objetivos.

À minha mãe, que apesar de todas as dificuldades que uma mulher enfrenta na sociedade brasileira me criou praticamente sozinha. Por ter se abdicado inúmeras vezes para me dar sempre o melhor que estava ao seu alcance. Por acreditar e apostar todas as suas fichas em mim. Por sempre achar que tudo que eu faço é lindo e maravilhoso. Por ser simplesmente você.

Ao Zaiat, por ser uma pessoa incrível em todos os sentidos da palavra. E que talvez mesmo sem saber, fez com que eu não desistisse do meu sonho de me tornar engenheiro ambiental quando respondeu um e-mail meu em 2017 sem nem mesmo me conhecer e ter dado aulas para mim ainda. Por ter visto potencial em mim quando por um breve momento achei que não conseguiria. E é claro, por ter me direcionado ao Lucas.

Ao Lucas, Lusca, Lucão, chefe, velho sábio da montanha, meu excelentíssimo orientador, amigo, paizão, parceiro de laboratório, ídolo e referência mor na pesquisa. Como brincavam meus amigos de sala, “O Lucas é o rei da vinhaça, então você é o príncipe”. Por sempre trazer luz e alegria com as suas brincadeiras já cedo no LPB. Algumas vezes sem pudor e noção alguma. Quem nunca foi trancado na câmara fria pelo senhor Fuess, afinal?! Um dia na sala de análises sem a sua ilustre presença jamais era a mesma coisa.

Aos demais amigos do laboratório que sempre me auxiliaram e compartilharam momentos comigo, Drica, Mira, Rachel, Cris, Fran, Henrique, Natália, Carol, Felipe, Mário e todos os outros.

À amb 016, a melhor sala que qualquer um jamais poderia sonhar em estudar. Por todas as causarias, risadas e momentos que guardarei pra sempre comigo.

À república feudo por serem os irmãos da vida que eu escolhi, por compartilharem um lar comigo, experiências e ensinamentos que me fizeram crescer e ser o homem que eu sou hoje. Morar com outras 22 pessoas e dois cachorros é algo inexplicável.

E por fim, ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelas bolsas de iniciação científica concedidas que originaram o presente trabalho de graduação.

“Sempre tenha a coragem de tomar iniciativas. Não tem importância se uma ou outra vai fracassar, mas algumas delas que vocês vão acertar, essas têm grande valor”

Leon Feffer

RESUMO

PIFFER, M.A. **Sistemas sulfetogênicos-acidogênicos alimentados com vinhaça da cana-de-açúcar: uma avaliação da dinâmica da redução de sulfato e de seus impactos na produção de hidrogênio.** 2021. 83 f. Monografia (Trabalho de Conclusão de Curso) - Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2021.

A presença de sulfato na vinhaça é um dos maiores entraves do setor sucroenergético no que se refere à recuperação de energia via digestão anaeróbia. Da literatura, sabe-se que a redução de sulfato durante a metanogênese resulta em uma perda significativa na produção de CH_4 , responsável por parcela majoritária no balanço energético global. Nesse contexto, o presente trabalho buscou explorar a versatilidade dos processos anaeróbios para direcionar a acidogênese para a recuperação de bioenergia (H_2) e/ou limpeza (remoção de sulfato) previamente à metanogênese. Primeiramente, operou-se um reator de leito estruturado (do inglês, *anaerobic structured-bed reactor*, AnSTBR) com espuma de poliuretano (PU) como material suporte, em condições termofílicas (55°C), com vinhaça de cana-de-açúcar como substrato, no qual houve o estabelecimento de um sistema sulfetogênico-acidogênico. A elevada concentração de sódio estimulou naturalmente as bactérias redutoras de sulfato (BRS), mantendo altos valores de pH ($> 6,0$). Quando o sistema perdeu a condição natural de tampão foi possível restabelecê-la por meio da dosagem de NaHCO_3 . Altas concentrações de ácido butírico e a geração de ácido capróico indicaram a ocorrência de processos de alongamento da cadeia, levando a baixos níveis de produção de hidrogênio ($< 400 \text{ NmL-H}_2 \text{ L}^{-1} \text{ d}^{-1}$). Verificada a dinâmica da redução de sulfato, buscou-se compreender seus impactos na atividade hidrogenogênica. Por meio de um planejamento experimental utilizando o delineamento do composto central rotacional (DCCR), analisou-se o efeito da disponibilidade de bicarbonato e sulfato no estabelecimento da sulfetogênese e na produção de hidrogênio durante a fermentação termofílica (55°C) da vinhaça em reatores em modo batelada. Foi utilizado como inóculo o lodo do AnSTBR sulfetogênico-acidogênico operado previamente. Os resultados obtidos indicaram um favorecimento da produção de hidrogênio nas menores concentrações e bicarbonato, enquanto o oposto foi observado para a redução do sulfato. Identificou-se também que houve inibição das BRS devido ao sódio quando se dosou NaHCO_3 e Na_2SO_4 em excesso.

Palavras chave: biorrefinaria de cana-de-açúcar, biogás, digestão anaeróbia, sulfetogênese.

ABSTRACT

PIFFER, M.A. **Sulfidogenic-acidogenic systems fed with sugarcane vinasse: an evaluation of the sulfate reduction dynamics and its impacts on hydrogen production.** 2021. 83 f. Monograph (Course Completion Paper) - School of Engineering of São Carlos, University of São Paulo, São Carlos, 2021.

The presence of sulfate in vinasse is one of the biggest obstacles in the sugar-energy sector with regard to energy recovery from anaerobic digestion. The literature shows that sulfate reduction during methanogenesis results in a significant loss in CH_4 production, responsible for the majority of the global energy balance. In this context, the present work sought to explore the versatility of anaerobic processes to direct acidogenesis for bioenergy recovery (H_2) and/or cleaning (sulfate removal) prior to methanogenesis. Firstly, an anaerobic structured-bed reactor (AnSTBR) was operated with polyurethane foam (PU) as support material, under thermophilic conditions (55°C), with sugarcane vinasse as substrate, in which a sulfidogenic-acidogenic system was established. The high sodium concentration naturally stimulated sulfate reducing bacteria (SRB), maintaining high pH values (>6.0). When the system lost its natural buffer condition, it was possible to reestablish it by measuring NaHCO_3 . High concentrations of butyric acid and the generation of caproic acid indicated the occurrence of chain elongation processes, leading to low levels of hydrogen production ($< 400 \text{ NmL-H}_2 \text{ L}^{-1} \text{ d}^{-1}$). After verifying the dynamics of sulfate reduction, we sought to understand its impacts on hydrogenogenic activity. Through an experimental design using the central composite rotatable design (CCRD), the effect of the availability of bicarbonate and sulfate on the establishment of sulfidogenesis and on the production of hydrogen during thermophilic fermentation (55°C) of vinasse in batch reactors was analyzed. The sludge of the previously operated sulfidogenic-acidogenic AnSTBR was used as inoculum. The results obtained indicated a favoring of hydrogen production in the lowest concentrations and bicarbonate, while the opposite was observed for the sulfate reduction. It was also identified that there was inhibition of SRB due to sodium when excess NaHCO_3 and Na_2SO_4 were dosed.

Keywords: sugarcane biorefinery, biogas, anaerobic digestion, sulfidogenesis.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Processos de produção de etanol considerando diferentes matérias-primas.....	31
Figura 2 - Esquema da sequência metabólica e dos grupos microbianos envolvidos na digestão anaeróbia.....	35
Figura 3 - Esquema da sequência metabólica e dos grupos microbianos envolvidos na digestão anaeróbia com simultaneidade da redução de sulfato.	37
Figura 4 - Detalhamento do aparato experimental: (a) representação esquemática do reator e (b) detalhe do leito estruturado de espuma de PU. Legenda: 1 - reservatório de vinhaça, 2 - bomba peristáltica, 3 - AnSTBR acidogênico, 4 - selo hídrico, 5 - gasômetro.	43
Figura 5 - Variação temporal de pH efluente nas diferentes fases operacionais.	49
Figura 6 - Variações temporais da concentração de SO_4^{2-} efluente e da ER-SO_4^{2-} nas diferentes fases operacionais.	50
Figura 7 - Compilado da variação temporal do pH efluente e ER-SO_4^{2-}	51
Figura 8 - Variações temporais das concentrações de HLa efluente e da EC-HLa nas diferentes fases operacionais.	52
Figura 9 - Variações temporais das concentrações de Gly efluente e EC-Gly nas diferentes fases operacionais.	52
Figura 10 - Variação da produção de AOV ao longo do tempo de operação do AnSTBR.	53
Figura 11 - Variações temporais da concentração de CH efluente e da EC-CH nas diferentes fases operacionais.	54
Figura 12 - Dispersão dos valores de pH bruto nas diferentes fases operacionais, (x) dados outliers e (●) valores médios.	55
Figura 13 - Composição do biogás (%) durante os dias de operação.....	58
Figura 14 – Produção volumétrica de hidrogênio (PVH) durante os dias de operação.	59
Figura 15 - Rendimento de hidrogênio (HY) durante os dias de operação.	59
Figura 16 - Variação temporal da concentração da DQO_T efluente e da ER-DQO_T	61
Figura 17 - Variação temporal da concentração da DQO_S efluente e da ER-DQO_S	61
Figura 18 – Variação temporal da concentração de SSV nas diferentes fases operacionais....	62
Figura 19 - Valores médios de nH_2 encontrados durante as três corridas do experimento para cada ensaio realizado.	63
Figura 20 - Teste de Pareto para o efeito das variáveis independentes, $\text{DQO}/\text{SO}_4^{2-}$ e $\text{NaHCO}_3/\text{DQO}$, na produção de hidrogênio.	64

Figura 21 - Superfície de resposta da interação entre as relações $\text{DQO}/\text{SO}_4^{2-}$ e $\text{NaHCO}_3/\text{DQO}$ na produção de hidrogênio: (a) em uma dimensão, (b) em três dimensões.....	67
Figura 22 - Variação dos valores de ER-SO_4^{2-} para cada ensaio nas diferentes corridas realizadas.	68
Figura 23 - Variação dos valores de pH para cada ensaio nas diferentes corridas realizadas. .	69
Figura 24 - Teste de Pareto para o efeito das variáveis independentes, $\text{DQO}/\text{SO}_4^{2-}$ e $\text{NaHCO}_3/\text{DQO}$, na redução de sulfato.	70
Figura 25 - Superfície de resposta da interação entre as relações $\text{DQO}/\text{SO}_4^{2-}$ e $\text{NaHCO}_3/\text{DQO}$ na redução de sulfato: (a) em uma dimensão, (b) em três dimensões.	72
Figura 26 - Variação dos valores de ER-DQO_5 para cada ensaio nas diferentes corridas realizadas.	73
Figura 27 - Variação dos valores de EC-CH para cada ensaio nas diferentes corridas realizadas.	74
Figura 28 - Variação dos valores de EC-HLa para cada ensaio nas diferentes corridas realizadas.	75
Figura 29 - Variação dos valores de EC-Gly para cada ensaio nas diferentes corridas realizadas.	75

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Caracterização da vinhaça da safra de 2018 utilizada no presente estudo.	41
Tabela 2 - Caracterização composicional da vinhaça de alambique previamente à montagem dos reatores em cada corrida experimental.....	42
Tabela 3 - Condições operacionais aplicadas no AnSTBR.	44
Tabela 4 - Valores utilizados para as relações $\text{DQO}/\text{SO}_4^{2-}$ e $\text{NaHCO}_3/\text{DQO}$	46
Tabela 5 – Combinação dos fatores por condição.	46
Tabela 6 - Ordem aleatória proposta para a montagem dos reatores nos diferentes blocos do experimento.	47
Tabela 7 - ANOVA para o efeito das relações $\text{DQO}/\text{SO}_4^{2-}$ e $\text{NaHCO}_3/\text{DQO}$ na produção de hidrogênio (F e p-valor).....	65
Tabela 8 - ANOVA para o efeito das relações $\text{DQO}/\text{SO}_4^{2-}$ e $\text{NaHCO}_3/\text{DQO}$ na produção de hidrogênio (coeficientes).	66
Tabela 9 - ANOVA para o efeito das relações $\text{DQO}/\text{SO}_4^{2-}$ e $\text{NaHCO}_3/\text{DQO}$ na redução de sulfato (F e p-valor).	70
Tabela 10 - ANOVA para o efeito das relações $\text{DQO}/\text{SO}_4^{2-}$ e $\text{NaHCO}_3/\text{DQO}$ na redução de sulfato (coeficientes).....	71

LSTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

1G: primeira geração;

2G: segunda geração;

AM: arqueias metanogênicas;

ANOVA: análise de variância;

AOV: ácidos orgânicos voláteis;

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

APHA: *American Public Health Association*;

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

ATR: açúcar total recuperado;

AWWA: *American Water Works Association*;

BioH₂: biohidrogênio;

BNDES: Banco Nacional de Desenvolvimento Econômico e Social;

BRS: bactérias redutoras de sulfato;

CETESB: Companhia Ambiental do Estado de São Paulo;

CGEE: Centro de Gestão e Estudos Estratégicos;

CH: carboidratos totais;

CNP: Conselho Nacional do Petróleo;

Conab: Companhia Nacional de Abastecimento;

COVa, COVat: carga orgânica volumétrica aplicada;

COVe: carga orgânica volumétrica específica;

CNPq: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico;

DCCR: delineamento do composto central rotacional (do inglês, *central composite rotatable design*, CCRD);

DQO, DQOt: demanda química de oxigênio;

DQOs: demanda química de oxigênio solúvel;

E1-E10: ensaios 1-10;

EPE: Empresa de Pesquisa Energética;

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

GEEs: gases do efeito estufa;

Gly: glicerol;

HLa: ácido láctico;

HY: rendimento de hidrogênio;

IAA: Instituto do Açúcar e do Alcool;

LPAE/FMUSP: Laboratório de Poluição Atmosférica Experimental da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo;

LPB: Laboratório de Processos Biológicos (EESC/USP);

PEBD: polietileno de baixa densidade;

pH: potencial hidrogeniônico;

Proálcool: Programa Nacional do Alcool;

PVH: Produção volumétrica de hidrogênio;

PU: poliuretano;

SIN: Sistema Integrado Nacional;

SSV: sólidos suspensos voláteis;

TDH: tempo de detenção hidráulica;

UNICA: Associação Brasileira da Indústria da Cana-de-açúcar;

WEF: *Water Environment Federation*.

LISTA DE SÍMBOLOS

A/M: relação alimento/microrganismo;

CH₂: concentração de hidrogênio na fase gasosa;

CH₄: metano;

CO: monóxido de carbono;

CO₂: dióxido de carbono;

CO_{2eq}: dióxido de carbono equivalente;

EC-CH: eficiência de conversão de carboidratos totais;

EC-Gly: eficiência de conversão de glicerol;

EC-HLa: eficiência de conversão de ácido láctico;

ER-DQO_T; ER-DQO_S: eficiência de remoção da DQO total e solúvel;

ER-SO₄²⁻: eficiência de remoção de sulfato;

EtOH: etanol;

H₂: hidrogênio;

H₂S: sulfeto de hidrogênio;

HAc: ácido acético;

HBu: ácido butírico;

HCa: ácido capróico;

HPr: ácido propiônico;

N₂: nitrogênio;

Na₂SO₄: sulfato de sódio;

NaHCO₃: bicarbonato de sódio;

nH₂: hidrogênio molar;

(NH₄)₂SO₄: sulfato de amônio;

P_{H2}: produção de H₂;

SO₄²⁻: sulfato;

V_{coletado}: volume coletado para análise composicional;

V_{headspace}: volume do *headspace*;

VH₂: ensaio de validação para a produção de hidrogênio;

VSO₄²⁻: ensaio de validação para a redução de sulfato;

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	25
2. OBJETIVOS	27
2.1 Objetivo Geral.....	27
2.2 Objetivos Específicos	27
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	28
3.1 Indústria Sucroalcooleira no Brasil	28
3.2 Vinhaça da Cana-de-açúcar: Composição, Destinação e Impactos Ambientais.....	32
3.3 Digestão Anaeróbia.....	34
3.3.1 Produção de Hidrogênio	35
3.4 Redução de Sulfato	36
3.4.1 Impactos da Redução de Sulfato na Digestão Anaeróbia.....	38
3.4.2 Vantagens da Remoção de Sulfato para a Metanogênese	38
4. METODOLOGIA	40
4.1 Caracterização dos Substratos	40
4.1.1 Vinhaça de Destilaria.....	40
4.1.2 Vinhaça de Alambique	41
4.2 Reator Contínuo: Aparato Experimental, Inoculação e Condições Operacionais..	43
4.3 Reatores em Batelada: Montagem e Condições de Incubação	44
4.4 Monitoramento e Análise de Desempenho dos Sistemas.....	47
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	49
5.1 Reator Contínuo.....	49
5.1.1 Desempenho do Sistema na Redução de Sulfato	49
5.1.2 Desempenho do Sistema na Produção de Hidrogênio.....	57
5.1.3 Outras Variáveis da Fase Líquida.....	60
5.2 Reatores em Batelada	62

5.2.1	Efeito das Relações DQO/SO_4^{2-} e $NaHCO_3/DQO$ na Produção de Hidrogênio.....	62
5.2.2	Efeito das Relações DQO/SO_4^{2-} e $NaHCO_3/DQO$ na Redução de Sulfato	67
5.2.3	Conversão de Substratos Orgânicos	73
6.	CONCLUSÃO	76
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	77

1. INTRODUÇÃO

O advento da industrialização foi um marco histórico responsável por alavancar a economia mundial e impulsionar o desenvolvimento tecnológico. Entretanto, com o expressivo aumento da produção industrial nos mais variados setores, foi também aumentando preocupação com o meio ambiente em decorrência do agravamento dos impactos ambientais associados às atividades industriais.

No Brasil, um dos setores mais prósperos nas últimas décadas foi o sucroenergético. Destaque mundial na produção de etanol, o Brasil produz anualmente bilhões de litros desse combustível. Atrelada à produção de etanol encontra-se a geração de uma água residuária considerada como um passivo ambiental graças à sua composição, a vinhaça.

A destinação final amplamente difundida no país para a vinhaça, pela praticidade e baixo custo, a fertirrigação, pode ser considerada controversa do ponto de vista ambiental, ocasionando diversos impactos negativos nas áreas de aplicação agrícola. Como opção à fertirrigação há a digestão anaeróbia, que além de reduzir a carga orgânica poluente da vinhaça, propicia a opção da recuperação de energia a partir do biogás gerado, tanto na forma de hidrogênio (H_2) como de metano (CH_4). Entretanto, vale ressaltar que existem fatores os quais podem afetar a produção do biogás, por exemplo, a presença de sulfato na vinhaça.

Em águas residuárias ricas em sulfato, é convencional ocorrer competição entre os microorganismos por substratos comuns, favorecendo o desvio de elétrons para a sulfetogênese e não mais para outras rotas metabólicas, como a acidogênese e a metanogênese. Consequentemente o rendimento energético global do biogás diminui, principalmente no que diz respeito ao metano, uma vez que ele representa a maior parte do potencial energético. Logo, torna-se interessante da perspectiva da engenharia criar tecnologias e processos capazes de remover o sulfato previamente à produção do metano, considerando os efeitos adversos gerados no processo, seja na atividade da comunidade microbiana, na qualidade do biogás ou ainda no efeito corrosivo do sulfeto nas estruturas metálicas, tubulações e no próprio reator.

Dessa forma, nesta pesquisa foram realizados dois experimentos cujo o intuito foi promover a sulfetogênese simultaneamente à acidogênese, de modo a reduzir o quanto possível a concentração de sulfato presente na vinhaça. No primeiro experimento, operou-se de modo contínuo um reator de leito fixo estruturado tendo espuma de poliuretano (PU) como material suporte em alternativa ao polietileno de baixa densidade (PEBD), comumente utilizado em

reatores acidogênicos. Investigou-se o comportamento do sistema e as influências das condições operacionais, composição da vinhaça e do material suporte empregado no processo.

No segundo experimento, realizado em modo batelada, foi dosado bicarbonato de sódio (NaHCO_3) nos reatores. O NaHCO_3 é um agente tamponador capaz de manter a alcalinidade do meio mesmo com a produção de ácidos orgânicos na acidogênese, de modo a estabelecer a sulfetogênese e avaliar os impactos da redução de sulfato na produção do H_2 . Embora o H_2 contribua pouco para o balanço energético global, é importante entender como a sulfetogênese impacta sua produção e possibilita maior eficiência posteriormente na metanogênese.

Tendo em vista os dados já postulados na literatura a presente pesquisa inova e é de grande interesse para o setor sucroenergético nacional, tendo em vista o campo frutífero para aplicação da digestão anaeróbia da vinhaça em escala plena nos próximos anos. As análises apresentadas buscaram trazer dados de relevância tecnológica e econômica no que concerne à concomitância das etapas da sulfetogênese e acidogênese durante o processo de digestão anaeróbia da vinhaça, mais especificamente, à dinâmica e o impacto da redução de sulfato sobre a acidogênese.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

O presente trabalho objetivou avaliar a concomitância da sulfetogênese e acidogênese durante a digestão anaeróbia da cana-de-açúcar em reatores biológicos e seus ganhos, sobretudo no que se refere à oportunidade de melhoria no rendimento energético posteriormente na etapa da metanogênese.

2.2 Objetivos Específicos

De forma específica, este trabalho buscou:

- Compreender a dinâmica da redução de sulfato em um sistema sulfetogênico-acidogênico contínuo alimentado com vinhaça de cana-de-açúcar;
- Sanar parte das lacunas existentes na literatura na influência da utilização da espuma de PU como material suporte em reatores biológicos visando à produção de H_2 e/ou a redução de sulfato;
- Avaliar os efeitos da redução de sulfato sobre a produção de hidrogênio na fermentação termofílica ($55^\circ C$) da vinhaça-de-cana de açúcar e o efeito das relações DQO/SO_4^{2-} e $NaHCO_3/DQO$ no estabelecimento da sulfetogênese em sistemas acidogênicos termofílicos;
- Identificar a situação limítrofe para a relação DQO/SO_4^{2-} a partir da qual a sulfetogênese se desenvolve plenamente;
- Delimitar a condição para a relação $NaHCO_3/DQO$ a partir da qual pH se mantém de modo a estabelecer a sulfetogênese.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Indústria Sucroalcooleira no Brasil

A origem da indústria sucroalcooleira no Brasil retoma o início da década de 70 e se enraíza na volatilidade do preço do petróleo em consonância com a busca ascensional global para a redução da emissão de gases de efeito estufa (GEEs), elucidadas por Cruz, Guerreiro e Raiher (2012), permitindo o alavancamento do setor ao atual patamar de significância na economia do país.

Desta forma, pode-se apontar o princípio de tudo como sendo o primeiro choque do petróleo ocorrido em 1973, que provinha da conjuntura internacional e afetava diretamente o Brasil, uma vez que o país era extremamente dependente desse insumo. Na época em questão, o país era o principal importador de óleo no mundo em desenvolvimento (Ribeiro, 2006).

Com esse cenário, o mundo se viu diante de um risco de desabastecimento energético. Segundo Bertelli (2005), a crise internacional elevou os gastos do Brasil com importação de petróleo de US\$ 600 milhões em 1973 para US\$ 2,5 bilhões em 1974. O impacto provocou um déficit na balança comercial de US\$ 4,7 bilhões, resultado que influiu fortemente na dívida externa brasileira e na escalada da inflação, que saltou de 15,5% em 1973 para 34,5% em 1974.

Diante da situação em que o país estava inserido, foi que diversas entidades governamentais foram acionadas para buscar uma solução ao problema. E assim, em março de 1974, foi entregue ao Conselho Nacional do Petróleo - CNP o documento intitulado Fotossíntese, que se tornaria a semente do Programa Nacional do Álcool (Proálcool). O estudo combinava as preferências do Instituto do Açúcar e Alcool - IAA pela produção de álcool direto em destilarias autônomas e da Copersucar, pelo aproveitamento da capacidade ociosa das destilarias anexas às usinas açucareiras.

Como apontado por Bertelli (2005), o álcool que antes era apenas um subproduto do açúcar, surgido como uma solução temporária, passou a ser uma solução permanente, quando muitos já alertavam sobre limitações das reservas de petróleo, fonte de energia não renovável. Não obstante a isso as vantagens do álcool se estendiam pelo fato do país possuir um setor açucareiro desenvolvido, terras propícias à cultura, clima adequado, muita mão-de-obra disponível no campo e experiência na fabricação de álcool industrial. Depois de intensos estudos e debates, o governo federal instituiu o Proálcool (Decreto nº 76.593, de 14/11/1975), há três décadas, portanto.

O Proálcool teve como objetivo não só reduzir o impacto sobre o balanço de pagamentos causados pela elevação dos preços do petróleo, mas também, mitigar as inquietações do setor sucroalcooleiro face à queda do preço do açúcar no mercado internacional (Mendonça, 2008).

A contribuição do Proálcool para o desenvolvimento do setor sucroenergético no país foi notória, o que possibilitou com que o Brasil se tornasse um dos maiores exportadores de açúcar e etanol. A produção de ambos gera biomassa vegetal residual (material lignocelulósico), que pode ser reaproveitada para fins energéticos, queimando-se bagaço em sistemas de cogeração para obtenção de eletricidade e vapor. A biomassa da cana representou cerca de 40% (54,9 milhões de tep) da matriz energética renovável do país (139,1 milhões de tep) no ano de 2020 - ou 19,1% da repartição interna de energia de 2020, a qual também inclui fontes não renováveis (Empresa de Pesquisa Energética - EPE, 2021).

No que se refere à bioeletricidade sucroenergética, sua oferta para o Sistema Integrado Nacional - SIN, de janeiro/20 até julho/20, foi de 11.339 GWh, representando 79% do total gerado para o SIN pela biomassa em geral no período (14.284 GWh). Calcula-se que essa energia tenha evitado a emissão de 3,8 milhões de toneladas de dióxido de carbono (CO₂) para a atmosfera, marca que somente seria possível com o cultivo de 27 milhões de árvores nativas ao longo de um período de 20 anos (Associação Brasileira da Indústria de Cana-de-açúcar - UNICA, 2020).

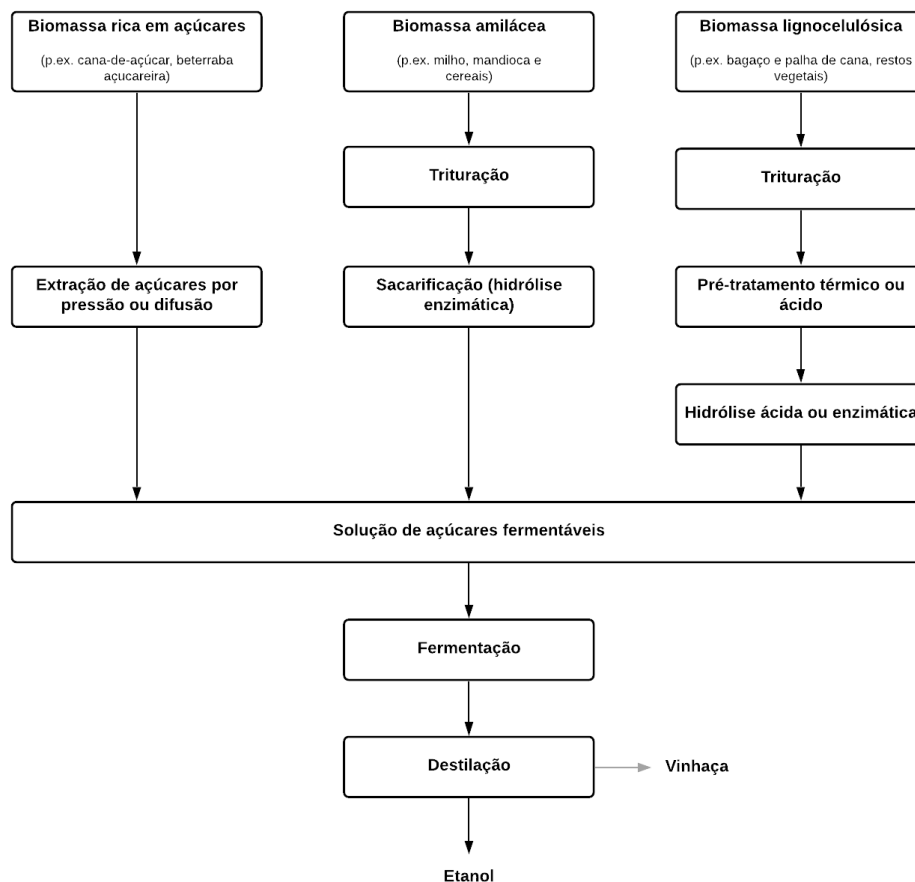
De acordo com o segundo levantamento realizado pela a Companhia Nacional de Abastecimento - Conab (2021), a estimativa feita para a produção total de cana-de-açúcar na safra 2021/22 foi de 592,03 milhões de toneladas. Por sua vez, a estimativa da produção de etanol apresentada para a mesma safra foi de 25,80 bilhões de litros. Estes números reforçam o destaque do Brasil no setor, configurando-o como o maior produtor de cana-de-açúcar do mundo e o segundo maior produtor de etanol, sendo superado apenas pelos Estados Unidos.

Além da cana-de-açúcar outras matérias-primas podem ser empregadas na produção do etanol, como é o caso dos Estados Unidos, que possui sua produção prevalentemente a partir do milho. São também matérias-primas o trigo, sorgo sacarino, mandioca e beterraba (Banco nacional de Desenvolvimento Econômico e Social – BNDES; Centro de Gestão e Estudos Estratégicos - CGEE, 2008). Essas fontes são conhecidas como matérias-primas de etanol de primeira geração (1G). Mas existem também as matérias-primas de etanol de segunda geração (2G), no caso bagaço e resíduos da colheita (palha) que são fontes de matéria lignocelulósica. Contudo, o etanol 2G ainda não é representativo no mercado devido ao seu alto custo frente ao contingente produzido de combustível.

No que diz respeito à produção de etanol, qualquer que seja a matéria-prima utilizada, o processo de produção se dá em duas etapas principais: fermentação da fonte de açúcar e destilação da solução alcoólica proveniente da fermentação (BNDES; CGEE, 2008; Fuess, 2017). Vale ressaltar que há especificidades processuais de acordo com cada tipo de matéria-prima utilizada como pode ser observado na Figura 1.

O caldo dos materiais ricos em açúcares (como a cana-de-açúcar, a beterraba e o sorgo sacarino) podem ser levados às dornas de fermentação (Figura 1), mediante algumas adequações prévias em sua composição. Já para o emprego de materiais ricos em amido (como o milho e a mandioca) e lignocelulose (como o bagaço e a palha de cana-de-açúcar) na fermentação requer uma etapa de pré-tratamento, normalmente ácido ou enzimático (Figura 1), a partir do qual os açúcares redutores tornam-se disponíveis. Considerando o caso brasileiro, as destilarias podem utilizar tanto o caldo de cana (usinas autônomas), extraído diretamente da cana-de-açúcar por meio de moendas, como uma mistura do caldo com o melaço (usinas anexas), solução residual da produção de açúcar, consequência da concentração e da precipitação dos açúcares presentes no caldo. O alto valor de mercado do açúcar exerce influência considerável na utilização do açúcar recuperado (ATR) a partir da cana, normalmente limitando o emprego direto do caldo na produção do etanol (Wilkie; Riedesel; Owens, 2000; BNDES; CGEE, 2008; Fuess, 2017).

Figura 1 - Processos de produção de etanol considerando diferentes matérias-primas.



Fonte: Adaptado de Fuess (2017).

Do ponto de vista ambiental, vale salientar o caráter renovável dessa fonte de energia, que é uma questão de muita valia e debatida no mundo contemporâneo frente às utilizações desenfreadas de fontes esgotáveis (não renováveis) de energia. Além de renovável, o etanol é considerado uma fonte de energia limpa, tanto pelo sequestro de carbono inerente à plantação de sua matéria-prima quanto pela sua combustão mais limpa devido ao elevado teor de oxigênio composicional, contribuindo para a redução de GEEs. Nas destilarias, o expressivo aproveitamento da matéria-prima, sobretudo no emprego da cana-de-açúcar, a partir da produção de etanol, açúcar, vapor e eletricidade é outro aspecto positivo da indústria sucroalcooleira, permitindo tratar as plantas industriais como biorrefinarias, assim como Dias et al. (2013) e Fuess (2017).

Os principais efeitos do uso do etanol nos centros urbanos foram a eliminação do chumbo na gasolina e a redução das emissões de monóxido de carbono - CO, como aponta Bertelli (2005). O consumo de etanol hidratado pelos automóveis flex, combinado à mistura atual obrigatória de 27% de etanol anidro na gasolina, reduziu a emissão de GEEs em mais de

440 milhões de toneladas de CO_{2eq} desde março de 2003 (data do lançamento dos veículos flex no Brasil), até junho de 2017 (UNICA, 2018).

A utilização do etanol também faz reflexo positivo no que diz respeito à saúde pública como aponta o estudo realizado pelo Laboratório de Poluição Atmosférica Experimental da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo - LPAE/FMUSP (2014). O uso do etanol tem contribuído para uma diminuição de aproximadamente 1.400 mortes e 9.000 internações por problemas respiratórios e cardiovasculares oriundos da queima de combustíveis fósseis, considerando somente as oito principais regiões metropolitanas do país. Essa redução no número de mortes e internações está associada a uma economia de cerca de R\$430 milhões na área da saúde.

Contudo, assim como salientado por Fuess (2017), a caracterização da produção de etanol como “ambientalmente amigável” também depende, entretanto, do correto gerenciamento das águas residuárias e resíduos gerados no processo. Fazendo-se uma análise de “fim de tubo” pode-se notar que o bagaço e parte da palha resultantes do processamento da cana-de-açúcar são queimados em caldeiras para geração de vapor e eletricidade, enquanto a torta de filtro, resultante de etapas de tratamento do caldo, que apresenta concentrações apreciáveis de nutrientes (Nandy; Shastry; Kaul, 2002; Fuess, 2017) é utilizada na adubação dos canaviais. No entanto, com relação às águas residuárias, mais precisamente à vinhaça, a principal destinação é a fertirrigação, destinação muito controversa do ponto de vista ambiental devido à carga orgânica poluidora componente da vinhaça. Todavia justamente por causa da sua composição que outras opções de destinação têm sido estudadas como a digestão anaeróbia associada à recuperação de energia como melhor abordado nas seguintes seções do presente trabalho.

3.2 Vinhaça da Cana-de-açúcar: Composição, Destinação e Impactos Ambientais

Considerada a principal água residuária oriunda do processo de produção do etanol, subproduto da etapa de destilação, a vinhaça possui composição complexa e rica em compostos orgânicos e nutrientes, como o sulfato (SO₄²⁻). Desta forma, a mesma é considerada como um efluente industrial de alto potencial poluidor (Moraes; Zaiat; Bonomi, 2015).

São gerados, em média, 13 litros de vinhaça a cada litro de etanol produzido (BNDES; CGEE, 2008). Sobre sua composição química, de acordo com Freire e Cortez (2000), depende

das características do solo, da variedade de cana-de-açúcar, do período de colheita e do processo industrial empregado para a produção do etanol. Além das condições climáticas, como chuva.

No que diz respeito à destinação da vinhaça tem-se como principal via, atualmente, no Brasil a fertirrigação, por ser a forma mais barata e de fácil aplicação. A fertirrigação consiste na direta aplicação do efluente no solo e é considerada extremamente controversa do ponto de vista ambiental. Na literatura, diversos são os impactos ambientais levantados associados a esta prática, tais como emissões de GEEs, salinização do solo, lixiviação de metais e sulfato, contaminação de águas subterrâneas, liberação de mau odor e proliferação de vetores de doenças. (Cruz; Righetto; Nogueira, 1991; Madrid; Barrientos, 1998; Madejón et al., 2001; Lyra; Rolim; Silva, 2003; Alves; Lavorenti, 2004; Silva; Griebeler; Borges, 2007; Ribeiro et al., 2010; España-Gamboa et al., 2011; Carmo et al., 2013; Oliveira et al., 2013; Fuess; Garcia 2014; Moraes; Zaiat; Bonomi, 2015).

É de suma relevância destacar que desde a safra 1979/1980 é proibido, através da Portaria 323 de 29 de novembro de 1978 do extinto Ministério do Interior, o lançamento direto ou indireto, da vinhaça em qualquer coleção hídrica, pelas destilarias de álcool instaladas ou que venham a se instalar no país. Posterior à Portaria 323 houve a Portaria nº 158, de 03 de novembro de 1980 que mantém as proibições.

Sobre a aplicação da vinhaça no solo, fertirrigação, a legislação brasileira ainda é muito recente e pouco abrangente e restritiva. A Companhia Ambiental do Estado de São Paulo – CETESB (2015) por meio da Norma Técnica P4.231/2005, estabelece os critérios e procedimentos para o armazenamento, transporte e aplicação da vinhaça gerada pela atividade sucroalcooleira no processamento de cana de açúcar.

Todavia, assim como também mencionado por Moraes, Zaiat e Bonomi (2015) essa norma pode ser considerada superficial, uma vez que a CETESB (2015) propõe que as doses de vinhaça podem ser calculadas apenas em função da necessidade da cultura com relação ao potássio. E neste sentido é que se enraíza o grande problema da fertirrigação. Como a vinhaça é de composição complexa e variada, como já citado neste trabalho, apenas considerar-se o potássio como proporção limitante no solo pode acarretar diversos impactos. Fuess (2017) aponta também a importância outros aspectos como as altas concentrações de matéria orgânica e sulfato e seu elevado nível de acidez. Pode-se mencionar ainda a variação na concentração de sódio.

Uma alternativa à fertirrigação é a digestão anaeróbia, tecnologia capaz de evitar esses problemas, tanto pelo seu potencial de redução da carga poluidora do efluente através da remoção da matéria orgânica como de recuperação energética na forma de biogás (H_2 e CH_4).

Todavia, a presença de sulfato na vinhaça pode ser um entrave para o desempenho global de recuperação de energia da digestão anaeróbia além propiciar a liberação de gás sulfeto (H_2S).

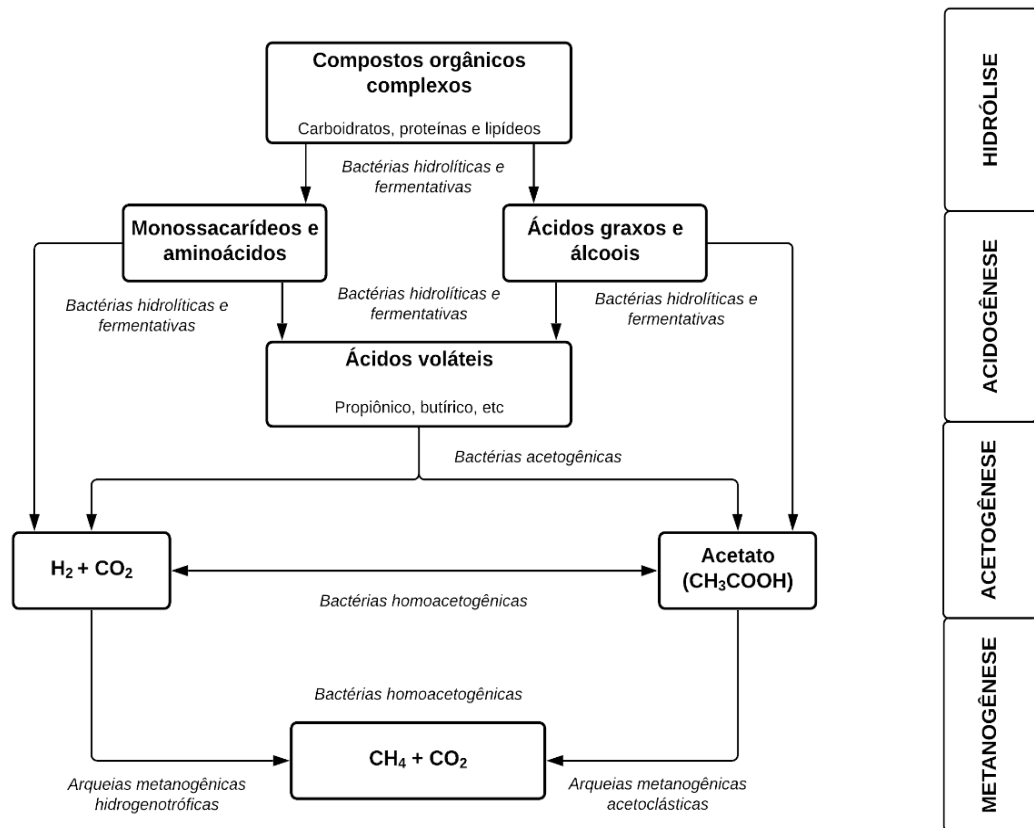
As elevadas concentrações de SO_4^{2-} na vinhaça se devem, principalmente, pela utilização de ácido sulfúrico nas indústrias sucroalcooleiras na etapa de fermentação para o controle da contaminação bacteriana e da floculação do fermento (leveduras), já que esse é um ácido forte, de baixo custo e de alto grau de pureza (Moraes; Zaiat; Bonomi, 2015).

3.3 Digestão Anaeróbia

A digestão anaeróbia consiste em um processo biológico formado por um conjunto complexo e sequencial de etapas que ocorrem na ausência de oxigênio. De forma geral, ocorre a conversão da matéria orgânica em uma mistura gasosa, denominada biogás, através da ação metabólica de diversos grupos microbianos distintos. Pelo fato de ser um processo biológico promovido por microrganismos, ela também pode ser tratada como biodigestão anaeróbia. Os produtos gasosos gerados são primordialmente CH_4 e CO_2 além de H_2 , N_2 e H_2S , o que reforça o potencial energético do biogás.

Em suma, na ausência de sulfato, a bioconversão da matéria orgânica se dá em quatro etapas: hidrólise, acidogênese, acetogênese e metanogênese. Assim como explanado por Harper e Pohland (1985) representado de forma esquemática na Figura 2, nas etapas de hidrólise e acidogênese, bactérias hidrolíticas e fermentativas convertem compostos de cadeia longa (carboidratos, lipídeos e proteínas) em compostos de cadeia curta facilmente absorvidos através da parede celular, produzindo ácidos orgânicos, álcoois, CO_2 e H_2 . Já na acetogênese, bactérias acetogênicas transformam ácidos orgânicos e álcoois em ácido acético, H_2 e CO_2 . Tais compostos correspondem aos substratos utilizados pelas arqueias metanogênicas na metanogênese. As arqueias metanogênicas hidrogenotróficas convertem H_2 e CO_2 em CH_4 , enquanto as metanogênicas acetoclásticas utilizam o acetato. Convencionalmente, a maior parte da produção de CH_4 provém das reações de transformação realizadas pelas arqueias metanogênicas acetoclásticas.

Figura 2 - Esquema da sequência metabólica e dos grupos microbianos envolvidos na digestão anaeróbia.



Fonte: Adaptado de Harper e Pohland (1985).

3.3.1 Produção de Hidrogênio

Quando submetido a condições operacionais controladas o reator pode operar isoladamente na etapa de acidogênese, onde o foco é a produção de H_2 . Características atribuídas à vinhaça como elevadas concentrações de carboidratos, DQO e baixo pH (Wilkie; Riedesel; Owens, 2000) fazem com que a vinhaça seja um bom substrato para a produção de hidrogênio por meio de processo de fermentação (Lazaro et al., 2014), ao qual por se originar de um processo biológico pode ser denominado biohidrogênio ($bioH_2$).

Tem-se que o H_2 representa uma opção interessante para a geração de energia, visto que possui um elevado poder calorífico (aproximadamente 2,75 vezes maior do que o de hidrocarbonetos) e sua combustão gera água como único “resíduo” (Chen; Lin, 2001). Por isso, o H_2 é considerado um candidato promissor como uma fonte de energia limpa.

O H_2 pode ser considerado como um vetor de energia (um método de armazenar e transportar energia) do futuro para a substituição dos combustíveis fósseis, sendo este produzido a partir de fontes renováveis de energia (Santos, F.M.; Santos, F.A., 2005).

Como apresentado por Bartels, Pate e Olson (2010), o futuro da economia do hidrogênio depende da aplicação de processos de baixo custo e ambientalmente adequados, sendo que neste contexto a produção de H_2 ganha crescente destaque (Fuess, 2017). Embora historicamente os custos da produção de H_2 a partir de combustíveis fósseis tenham se apresentado mais vantajosos em comparação ao uso de fontes renováveis em geral (Bartels; Pate; Olson, 2010), espera-se uma inversão neste cenário, sobretudo devido à pressão pela adequação ambiental (Fuess, 2017).

Trabalhos recentes têm explorado o potencial de produção de hidrogênio a partir da fermentação da vinhaça empregando-se diferentes configurações de reator. Como é o caso de Santos et al. (2014) que utilizaram reator de leito fluidizado além de Ferraz Jr. et al. (2014) e Ferraz Jr., Etchebehere e Zaiat (2015a e 2015b) com reator de leito fixo empacotado.

Todavia, fica evidenciada uma baixa remoção da matéria orgânica no processo acidogênico, fazendo-se necessária a fase metanogênica para a obtenção de maior eficiência (Ferraz Jr., 2013). Ferraz Jr. et al. (2016) e Fuess (2017) propõem a adição de um reator metanogênico em sequência ao acidogênico como solução de engenharia para esse problema. Os resultados são muito satisfatórios, uma vez que a eficiência de remoção da matéria orgânica chega a atingir 80% e o tempo de detenção hidráulica (TDH) é reduzido (< 24 h). E dessa forma é possível otimizar a produção de biogás tanto no que diz respeito ao hidrogênio quanto ao metano.

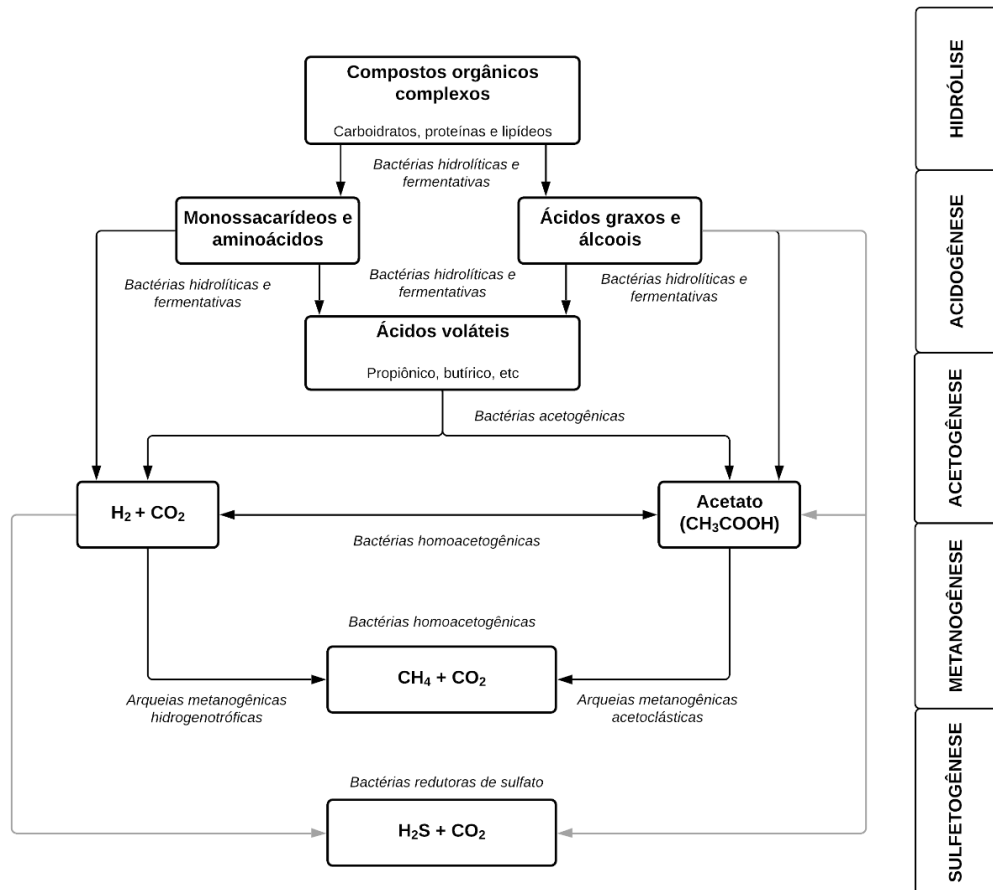
Quanto ao material suporte utilizado nos reatores operados de modo contínuo cujo enfoque era a produção de H_2 , trabalhos anteriores comumente empregaram o PEBD (Ferraz Jr, 2014; Ferraz Jr., Etchebehere; Zaiat, 2015a; Fuess et al. 2016). Mesmo quando testados outros materiais suportes (Ferraz Jr.; Etchebehere; Zaiat, 2015b) não foi testada a espuma de PU, como feito no presente trabalho.

3.4 Redução de Sulfato

O tratamento de águas residuárias ricas em sulfato por meio de sistemas de digestão anaeróbia, estimula o processo de sulfetogênese, em que o sulfato é reduzido principalmente a sulfeto por um grupo específico de microrganismos denominado como bactérias redutoras de

sulfato (BRS) (Lens et al., 1998; Vilela; Damianovic; Foresti, 2014). A Figura 3 mostra como se dá a sulfetogênese.

Figura 3 - Esquema da sequência metabólica e dos grupos microbianos envolvidos na digestão anaeróbia com simultaneidade da redução de sulfato.



Fonte: Adaptado de Harper e Pohland (1985).

Em geral um pH propício para o crescimento das BRS está compreendido na faixa que varia entre 6 e 8 (Widdel, 1988; Hao et al., 1996), porém elas também podem encontrar-se ativas em pH mais baixos (Koschorreck, 2008). Estudos anteriores, como o realizado por Fuess, Zaiat e Nascimento (2019) mostraram o controle do pH via dosagem de NaHCO_3 como uma forma de estabelecer a sulfetogênese na fermentação da vinhaça, independentemente da aplicação de baixos tempo de detenção hidráulica (6h) e elevada carga orgânica volumétrica ($\sim 100 \text{ kg-DQO m}^{-3} \text{ d}^{-1}$).

Já sobre o material suporte, em trabalho anteriormente realizado por Silva et al. (2006) foi apontada a espuma PU como o material suporte mais vantajosos para a imobilização das BRS no reator, apresentando maior concentração específica desses microrganismos em

comparação a outros materiais suporte, no caso, carbono vegetal, PEBD e cerâmica a base de alumina.

3.4.1 Impactos da Redução de Sulfato na Digestão Anaeróbia

De acordo com Kiyuna, Fuess e Zaiat (2017), a atividade metanogênica pode ser negativamente impactada pela sulfetogênese, onde quanto menor as razões DQO/SO_4^{2-} , isto é, concentrações mais altas de sulfato, correspondem a uma menor produção cumulativa de CH_4 . Foi constatado ainda por Kiyuna, Fuess e Zaiat (2017) que para a relação DQO/SO_4^{2-} na faixa de 7,5 a 12,0 ocorrerá a sulfetogênese. Não obstante a isso, para tais valores a produção de CH_4 pode sofrer um decréscimo de até 35% no limite inferior da faixa. O desvio do fluxo de elétrons para a sulfetogênese tende a cessar a partir de valores compreendidos para relação DQO/SO_4^{2-} entre 25,0 a 30,0.

Portanto, é esperado em sistemas convencionais que as arqueias metanogênicas (AM) compitam com as BRS por substratos comuns, no caso CO_2 , H_2 e acetato (Damianovic; Foresti, 2009). Nesse caso, a competição sempre favorecerá as BRS, dada a ampla versatilidade metabólica do grupo. Operando-se um reator único para a digestão anaeróbia da vinhaça o rendimento energético global reduz significativamente não apenas pela acidificação do meio e pelas condições operacionais, mas também pela presença de sulfato e o estabelecimento da rota sulfetogênica. Logo, faz-se necessária a eliminação da competição entre as AM e as BRS.

Nesse sentido, a separação de fases surge como uma estratégia interessante, isto é, operando um reator acidogênico em sequência com um reator metanogênico, torna-se possível aumentar o rendimento energético tanto aprimorando a atividade metanogênica nos reatores de segunda fase, impedindo o acúmulo de ácidos orgânicos, como explorando o potencial energético de H_2 (Ferraz Jr. et al., 2016; Fuess et al., 2017). Não obstante a isso, tem-se que a separação de fases permite explorar ainda a remoção prévia do sulfato concomitantemente à produção de H_2 .

3.4.2 Vantagens da Remoção de Sulfato para a Metanogênese

Considerando a separação de fases, pode-se projetar de forma estratégica a fase acidogênica para permitir o estabelecimento de condições de redução de SO_4^{2-} , minimizando o carregamento

de SO_4^{2-} para a etapa de metanogênese (Reis; Gonçalves; Carrondo, 1988; Reis et al., 1991). Tal estratégia corrobora para desvencilhar-se do impacto reportado por Kiyuna, Fuess e Zaiat (2017), permitindo uma produção mais eficiente de CH_4 já que há concomitância da metanogênese e da sulfetogênese passa a ser desfavorecida e, potencialmente, eliminada a partir da completa redução do sulfato na etapa fermentativa.

Dessa forma, como o biogás proveniente da fase metanogênica passa a ser mais puro, sem a presença significativa (ou mesmo a ausência) de H_2S , o processo de recuperação energética passa a ser, do ponto de vista econômico e tecnológico, mais vantajoso, já que a purificação do biogás é um processo complexo e oneroso.

Ademais, outros entraves acarretados pela redução de SO_4^{2-} , como a inibição celular direta e a precipitação de metais essenciais por sulfeto dissolvido e problemas operacionais devido à corrosão de estruturas metálicas (Koschorreck, 2008), podem ser controlados com o emprego de sistemas sulfetogênicos-acidogênicos antecedendo um reator metanogênico.

Portanto, utilizar a fase acidogênica visando à remoção do sulfato mostra-se como uma solução interessante do ponto de vista da engenharia, já que estudos realizados previamente apontam que o H_2 compreende uma baixa contribuição para a produção de bioenergia a partir da vinhaça de cana-de-açúcar, relatando-se valores abaixo de 5% de todo o rendimento global (Ferraz Jr. et al., 2016; Fuess et al., 2017). Sendo assim, uma vez que o CH_4 compreende pelo menos 95% do potencial energético do biogás torna-se interessante garantir uma geração mais eficiente de biogás a partir da metanogênese.

4. METODOLOGIA

4.1 Caracterização dos Substratos

Foram utilizados no decorrer do estudo dois substratos diferentes, a vinhaça de destilaria (produção de etanol combustível) e a vinhaça de alambique (produção de cachaça), sendo a vinhaça de destilaria utilizada para a alimentação do reator contínuo e vinhaça de alambique para os reatores em batelada. Vale ressaltar que, de acordo com os produtos pretendidos e, conseqüentemente, os processos e os insumos empregados para a transformação da cana-de-açúcar, existe uma variabilidade composicional da vinhaça. Justamente essa variabilidade é que foi explorada nos experimentos, de acordo com as respostas que se buscava obter.

4.1.1 Vinhaça de Destilaria

A vinhaça de destilaria foi coletada na Usina São Martinho, localizada no município de Pradópolis, no estado de São Paulo, Brasil. Um tipo de destilaria anexa, uma vez que, tem entre seus principais produtos o açúcar e o álcool, gerados por meio da fermentação do melaço e do caldo da cana-de-açúcar. Apesar de toda a vinhaça de destilaria utilizada nos experimentos do LPB ser proveniente da mesma usina, a São Martinho, ainda sim, pode identificar-se uma grande diferença das características entre as coletas. Por isso, foi fundamental a análise da Tabela 1 que mostra a caracterização das últimas oito coletas realizadas.

Esses resultados prévios são importantes para o controle das variáveis de entrada nos reatores biológicos de acordo com a singularidade de cada experimento. As coletas e suas respectivas caracterizações apontadas na Tabela 1 compreendem a safra de cana de 2018 e foram feitas durante a execução do presente estudo.

Um dos principais fatores que impacta na variação e na qualidade da vinhaça é direcionamento do uso de açúcares redutores totais (ART) na planta industrial. Quando a maior parte é destinada à produção de açúcar, há maior geração e melaço e, por consequência mais concentrada. Por outro lado, quanto mais ART segue para a produção de etanol, mais autônoma fica a usina, levando à vinhaça menos concentrada.

E tal variação não se restringe a um único parâmetro, como pode-se observar na Tabela 1. Atualmente, como a vinhaça não possui interesse econômico de mercado, pouco interessa às

usinas se ela apresenta altas cargas orgânicas ou um pH muito ácido, por exemplo. Já que ela é um subproduto tratado como efluente final, a usina se preocupa apenas em dar uma destinação para ela.

Destaca-se ainda que foram utilizadas para a alimentação do reator contínuo as coletas feitas nos meses de maio/2018, julho/2018 e setembro/2018. Elas serão nomeadas e descritas desta seção em diante como C1, C2 e C3, respectivamente. A referida diferenciação entre as coletas é importante para prever e atentar-se a possíveis mudanças comportamentais no reator que são detectadas por meio de uma mudança no padrão de resposta do efluente do reator.

Tabela 1 - Caracterização da vinhaça da safra de 2018 utilizada no presente estudo.

Parâmetro	Período de amostragem		
	Mai 2018	Jul 2018	Set 2018
DQO _T ^a	28098	19920	22123
DQO _S ^a	23663	16203	18720
CH _T ^a	2611	2278	3733
HLa ^a	847	267	755
Gly ^a	2831	3120	1366
SSV ^a	-	-	-
pH ^b	5,78	4,64	5,06
SO ₄ ^{2-a}	1592	982	1267
DQO _T /SO ₄ ²⁻	17,65	20,29	17,46
DQO _S /SO ₄ ²⁻	14,86	16,50	14,78
Na ^a	700	68	650

Notas: ^aConcentração em mg L⁻¹; ^bAdimensional.

Siglas: DQO_T: demanda bioquímica de oxigênio total; DQO_S: demanda bioquímica de oxigênio solúvel; CH_T: carboidratos totais; HLa: ácido láctico; Gly: glicerol; SO₄²⁻: sulfato; SSV: sólidos suspensos voláteis; pH: potencial hidrogeniônico.

Fonte: Elaboração própria.

4.1.2 Vinhaça de Alambique

Por sua vez, para a alimentação dos reatores em batelada utilizou-se vinhaça oriunda da produção de cachaça. Ela foi coletada em um alambique situado no município de São Carlos,

também no estado de São Paulo, Brasil. Optou-se por essa vinhaça uma vez que ela apresentava valores elevados para a relação DQO/SO_4^{2-} , ou seja, concentrações mínimas de SO_4^{2-} . Em caracterização feita previamente à montagem dos reatores a relação variou entre 169,70 e 192,57 durante os diferentes testes (corridas) realizados durante o experimento (Tabela 2). O que mostra a baixa concentração de sulfato presente na água residuária, permitindo maior maleabilidade para obter as condições experimentais desejadas, tendo em vista a variação da relação DQO/SO_4^{2-} .

A vinhaça de alambique se assemelha à vinhaça de destilaria proveniente da produção de etanol combustível pois, também possui elevada carga orgânica. Contudo, como na produção de cachaça não se utiliza ácido sulfúrico em nenhum dos processos produtivos como se é utilizado na produção do etanol, as concentrações de sulfato nessas vinhaças são ínfimas. Ressalta-se, ainda, que a vinhaça de alambique mantém a mesma complexidade composicional de vinhaças geradas em usinas, sendo seu uso como substrato base mais adequado do que a utilização de “vinhaças sintéticas”, cuja composição destoa consideravelmente do efluente real.

Tabela 2 - Caracterização composicional da vinhaça de alambique previamente à montagem dos reatores em cada corrida experimental.

Parâmetro	Bloco			
	I	II	III	Validação
DQO_T^a	62767	62420	58640	60890
DQO_S^a	58733	60940	53600	59620
DQO_S/DQO_T	0,94	0,98	0,91	0,98
CH_T^a	4767	4300	5220	5340
HLa^a	5555	4050	4122	3804
Gly^a	3695	3743	3497	3756
SSV^a	1712	1632	1662	1677
pH^b	3,57	3,52	3,60	3,47
SO_4^{2-a}	305	339	310	355
DQO_T/SO_4^{2-}	205,79	184,13	189,16	171,77
DQO_S/SO_4^{2-}	192,57	179,76	172,90	167,94

Notas: ^aConcentração em $mg\ L^{-1}$; ^bAdimensional.

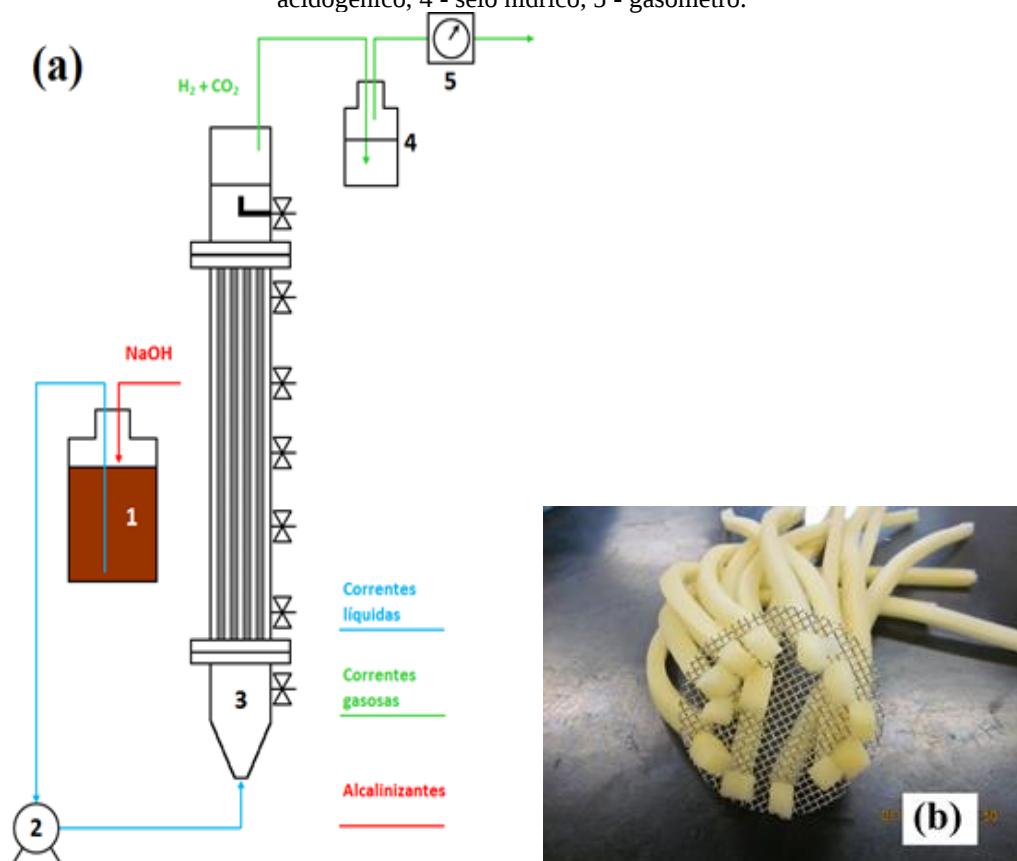
Siglas: DQO_T : demanda bioquímica de oxigênio total; DQO_S : demanda bioquímica de oxigênio solúvel; CH_T : carboidratos totais; HLa : ácido lático; Gly : glicerol; SO_4^{2-} : sulfato; SSV : sólidos suspensos voláteis; pH : potencial hidrogeniônico.

Fonte: Elaboração própria.

4.2 Reator Contínuo: Aparato Experimental, Inoculação e Condições Operacionais

O sistema experimental foi composto por um reator anaeróbio de leito estruturado (do inglês, *anaerobic structured-bed reactor*, AnSTBR) em escala de bancada (volume total de 1,9 L) operado em condições acidogênicas. O reator foi confeccionado em acrílico transparente, e alimentado por uma bomba peristáltica. O leito fixo foi formado por espuma PU. Na Figura 4 são apresentados detalhes do aparato experimental utilizado no presente estudo, incluindo aspectos da montagem do reator e características do material usado como suporte.

Figura 4 - Detalhamento do aparato experimental: (a) representação esquemática do reator e (b) detalhe do leito estruturado de espuma de PU. Legenda: 1 - reservatório de vinhaça, 2 - bomba peristáltica, 3 - AnSTBR acidogênico, 4 - selo hídrico, 5 - gasômetro.



Fonte: Elaboração própria.

Tal experimento foi conduzido em condições termofílicas de temperatura (55°C). Estudos prévios indicaram as condições termofílicas como as mais adequadas para a produção de H₂ a partir da vinhaça (Ferraz Jr. et al.; 2014; Ferraz Jr.; Etchbehere; Zaiat, 2015a). Além disso, há de se salientar que a vinhaça é gerada em alta temperatura, o que favorece o trabalho em temperaturas elevadas. O reator foi operado utilizando-se vinhaça como única fonte de

carbono, de modo que, nesta etapa, a carga orgânica volumétrica aplicada (COV_A) foi incrementada (a partir da redução do TDH), buscando-se inicialmente definir condições ótimas para produção de bioenergia, i.e., H_2 na fase acidogênica.

O reator acidogênico foi inoculado a partir do processo de fermentação natural do substrato, conforme metodologia previamente utilizada no sistema operado com vinhaça (Fuess et al., 2016). Com o reator já em operação, não se suplementou o substrato com nutrientes. Utilizou-se apenas alcalinizantes para o ajuste do pH previamente à alimentação dos reatores (hidróxido de sódio e, no caso particular da fase IIIb, bicarbonato de sódio, Figura 3).

Estabeleceu-se uma segregação para o monitoramento em cinco fases operacionais (Ia, Ib, II, IIIa e IIIb) distintas. Essencialmente, foram-se fixadas três fases preponderantes segundo o TDH aplicado, i.e, 24 h, 12 h e 6 h respectivamente (I, II e III). Posteriormente, na primeira e terceira fases fixaram-se dois desdobramentos (Ia e Ib; IIIa e IIIb) para as mesmas. A fase Ia caracterizou-se pela utilização da vinhaça da coleta C1, enquanto na fase Ib passou-se a utilizar vinhaça de uma nova coleta, C2. Na fase II foram usadas duas coletas diferentes, C2 e C3, sendo a última utilizada também nas fases IIIa e IIIb. A fase IIIb diferenciou-se pela adição de $NaHCO_3$ (1g $NaHCO_3$ /g DQO) no afluente aumentando o pH.

Detalhes das condições operacionais são apresentados na Tabela 3. O escalonamento da COV_A teve por objetivo a identificação de condições operacionais ótimas para produção de H_2 .

Tabela 3 - Condições operacionais aplicadas no AnSTBR.

Fase operacional	TDH ^t (h)	Período (d)	Vinhaça (coleta)	COV_A^t (kg-DQO.m ⁻³ .d ⁻¹)	Adição de $NaHCO_3$
Ia	24	1-66	C1	25	Não
Ib	24	67-105	C2	20	Não
II	12	106-161	C2 e C3	45	Não
IIIa	6	162-179	C3	90	Não
IIIb	6	180-186	C3	90	Sim

Notas: ^tValores teóricos.

Fonte: Elaboração própria.

4.3 Reatores em Batelada: Montagem e Condições de Incubação

Tendo sido possível verificar o estabelecimento de condições sulfetogênicas-acidogênicas no primeiro experimento, analisando a dinâmica da redução de sulfato e suas potencialidades, levantou-se a necessidade de compreender quais são suas implicações na recuperação energética. A concomitância da sulfetogênese e acidogênese viabiliza não só uma

maior recuperação energética do CH_4 em uma eventual separação de fases, como também possibilita continuar produzindo H_2 no reator acidogênico, incrementando o balanço energético global. Sendo assim, fez-se necessário compreender como a atividade redutora de sulfato impacta na produção de H_2 , o que motivou um segundo experimento, dessa vez em um sistema em modo batelada.

Foi utilizado como inóculo o lodo acidogênico obtido ao término da operação do AnSTBR, a partir da desmontagem do sistema. O teor de sólidos suspensos voláteis (SSV) apresentado no lodo acidogênico foi de $56,79 \pm 0,70 \text{ g L}^{-1}$.

Os ensaios foram conduzidos em frascos do tipo Erlenmeyer com tampa de 250 mL de volume nominal, os quais foram preenchidos com vinhaça de alambique diluída para uma DQO total (DQO_T) de 15 g/L. Os reatores foram inicialmente incubados em condições termofílicas de temperatura (55°C) e velocidade de agitação na faixa de 100 rpm. A biomassa acidogênica foi utilizada na inoculação dos reatores, procurando-se fixar uma relação A/M inicial de $5,0 \text{ g-DQO}_T \text{ g}^{-1} \text{ SSV}$, a qual simulou a carga orgânica volumétrica específica (COV_E) ótima para produção de H_2 em reatores acidogênicos (Anzola-Rojas et al., 2015; Fuess et al., 2016; Hafez et al., 2010).

Os reatores foram colocados em uma câmara com agitação (modelo Multitron PRO Incubator Shaker – Infors HT, Infors AG, Bottmingen-Basel, Suíça), sendo a composição do biogás foi monitorada por aproximadamente 7 d (168 h). Previamente à incubação na câmara de agitação, nitrogênio foi fluxionado nos frascos por 5 min para garantir o estabelecimento de condições anaeróbias.

As condições experimentais avaliadas foram definidas segundo um planejamento experimental, o qual ocorreu por meio do delineamento do composto central rotacional (DCCR, ou do inglês, *central composite rotatable design - CCRD*), assim como proposto por Rodrigues e Iemma (2014). Optou-se pela utilização do DCCR uma vez que, o mesmo se torna interessante frente aos resultados apresentados por possibilitar o cálculo dos efeitos durante o experimento e a análise da superfície de resposta gerada. Os ensaios consideraram dois fatores, as relações $\text{DQO}/\text{SO}_4^{2-}$ e $\text{NaHCO}_3/\text{DQO}$. Por isso, foram considerados 2^2 , mais quatro condições nos níveis axiais (-1,41, +1,41) e um ponto central, resultando em nove condições.

Os valores de referência utilizados para as relações $\text{DQO}/\text{SO}_4^{2-}$ e $\text{NaHCO}_3/\text{DQO}$, discriminados na Tabela 4, foram retirados da literatura. O valor máximo adotado para a relação $\text{DQO}/\text{SO}_4^{2-}$ foi de 25 (Fuess; Zaiat; Nascimento, 2019) e o mínimo de 6,5 (Fuess; Rodrigues; García, 2017). Já para a relação $\text{NaHCO}_3/\text{DQO}$ o valor máximo adotado foi de 0,5, que é um valor usualmente aplicado em sistemas metanogênicos (Fuess, 2017). Além disso, estudos no

contexto da acidogênese termofílica visando à produção de H_2 (Fuess et al., 2020) indicam tal valor como condição limite para o controle do pH em reatores contínuos. Enquanto o valor mínimo para a relação $NaHCO_3/DQO$ foi de 0 por convenção. Tal valor foi colocado como nível axial (-1,41; Tabela 4), dada a ausência de significado físico/prático para valores negativos da relação.

Tabela 4 - Valores utilizados para as relações DQO/SO_4^{2-} e $NaHCO_3/DQO$.

Fatores	Níveis				
	-1,41	-1	0	+1	+1,41
DQO/SO_4^{2-}	2,71	6,5	15,75	25	28,80
$NaHCO_3/DQO$	0	0,085	0,3	0,5	0,582

Fonte: Elaboração própria.

Tendo-se postulado os valores dos níveis para ambos fatores envolvidos, elencou-se então para cada condição as combinações possíveis desses fatores (Tabela 5).

Tabela 5 – Combinação dos fatores por condição.

Condição	DQO/SO_4^{2-}	$NaHCO_3/DQO$
1	+1	+1
2	+1	-1
3	-1	+1
4	-1	-1
5	-1,41	0
6	+1,41	0
7	0	+1,41
8	0	-1,41
9	0	0

Fonte: Elaboração própria.

Foram realizadas triplicatas genuínas onde a montagem dos reatores foi feita de forma aleatória. Isso possibilitou uma minimização de possíveis erros experimentais. A montagem das triplicatas está descrita na Tabela 6. É importante salientar que se buscou a partir desses blocos

a elaboração de dois modelos matemáticos que descrevessem a produção de H_2 e a redução de SO_4^{2-} (variáveis resposta) por meio de duas superfícies de resposta. Realizou-se o ajuste dos modelos quadráticos avaliando a significância dos efeitos através de análises de variância (ANOVA) com apoio do *software* Statistica.

Tabela 6 - Ordem aleatória proposta para a montagem dos reatores nos diferentes blocos do experimento.

Bloco I	Bloco II	Bloco III
4	1	6
8	4	4
5	6	2
7	5	7
9	9	3
1	7	5
6	2	8
3	8	9
2	3	1

Fonte: Elaboração própria.

Ademais, para a obtenção das concentrações desejadas de sulfato durante os ensaios foi dosado sulfato de sódio (Na_2SO_4) nos reatores.

4.4 Monitoramento e Análise de Desempenho dos Sistemas

Métodos analíticos comuns ao monitoramento da fase líquida dos reatores contínuos e em batelada incluíram as determinações de pH, DQO_T , DQO_S , CH, HLa, Gly, SSV e SO_4^{2-} .

Os procedimentos referentes às análises de pH, DQO_T , DQO_S e SO_4^{2-} são descritos no *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* (American Public Health Association - APHA; American Water Works Association - AWWA; Water Environment Federation - WEF, 2012). Por sua vez, as determinações de CH, HLa, Gly e ácidos orgânicos voláteis (AOV) são detalhadas respectivamente em Dubois et al. (1956), Taylor (1996), Greenhill (2003) e Adorno, Hirasawa e Varesche (2014). Previamente às análises de DQO_S , CH, HLa, e Gly as amostras foram filtradas em membranas de $0,45 \mu m$.

Com relação ao monitoramento da fase gasosa, no sistema contínuo a vazão de biogás foi monitorada a partir do acoplamento de gasômetro (modelo MGC-1 V30, Dr.-Ing. Ritter Apparatebau GMBH & CO. KG, Bochum, Alemanha) diretamente ao *headspace* do reator, enquanto que a composição foi avaliada, tanto no reator contínuo como nos reatores em batelada, por meio de cromatografia gasosa utilizando-se detector de condutividade térmica (Perna et al., 2013).

No sistema em batelada, a produção de H₂ foi calculada de acordo com a Eq. (1)-(2), nas quais os termos C_{H2}, n_{H2}, V_{coletado}, P_{H2} e V_{headspace} são, respectivamente, a concentração de H₂ na fase gasosa (mmol L⁻¹), o número de mols de H₂ (mmol), o volume de biogás coletado para análise composicional (L), a produção de H₂ (mmol) e o volume do *headspace* do reator (L). Os termos “n” e “n-1” referem-se ao tempo nas quais a análise composicional foi conduzida. A Eq. (2) descreve a produção de H₂ até o tempo n, i.e., o valor obtido apresenta caráter cumulativo, uma vez que não foi realizada a despressurização dos reatores. O termo “C_{H2,n-1}·V_{coletado,n-1}” na Eq. (2) representa a perda de H₂ pontual ocorrida na amostragem realizada no tempo n-1.

$$C_{H2,n} = \frac{n_{H2,n}}{V_{coletado,n}} \quad (\text{Eq. 1})$$

$$P_{H2,n} = C_{H2,n} \cdot V_{headspace} + C_{H2,n-1} \cdot V_{coletado,n-1} \quad (\text{Eq. 2})$$

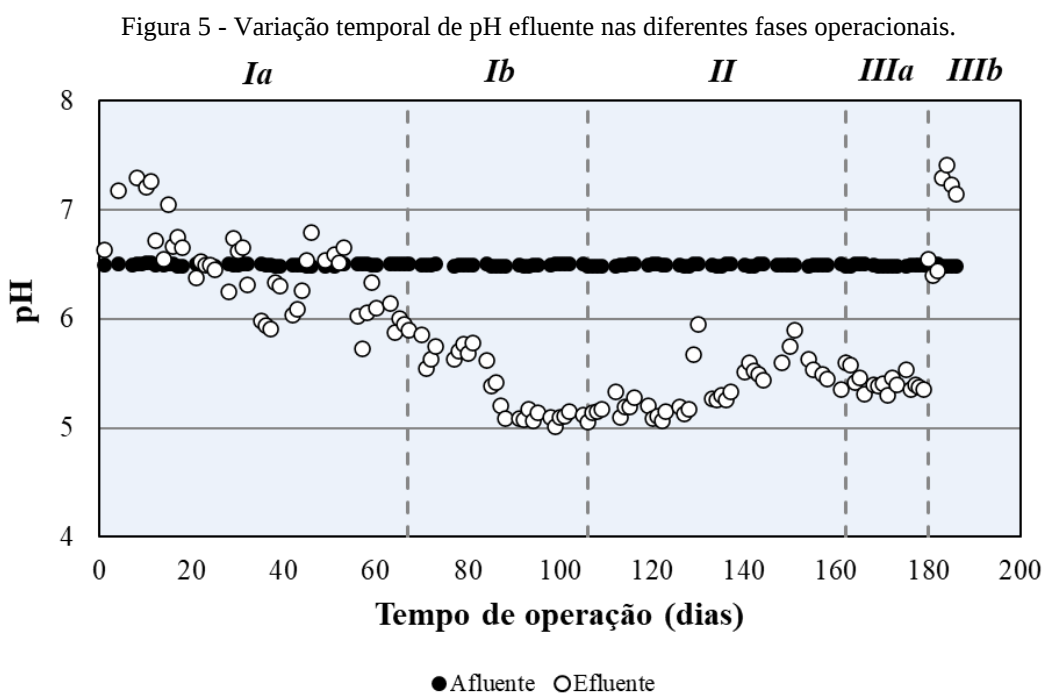
O desempenho dos reatores, contínuo e em batelada, foi avaliado a partir das eficiências de conversão de CH (EC-CH; %), HLa (EC-HLa; %) e Gly (EC-Gly; %), eficiências de remoção de DQO_T (ER-DQO_T; %) e/ou DQOs (ERDQO_S; %) e eficiência de redução de sulfato (ERSO₄²⁻; %) para a fase líquida. Além de, no caso do reator contínuo, produção volumétrica de hidrogênio (PVH, NmL-H₂ L⁻¹ d⁻¹) e rendimento de hidrogênio (HY, do inglês *hydrogen yield*; mmol-H₂ g⁻¹ CH e mmol-H₂ g⁻¹ DQO_{Taplicada}) para a fase gasosa. E nH₂ (mmol) para os reatores em batelada.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Reator Contínuo

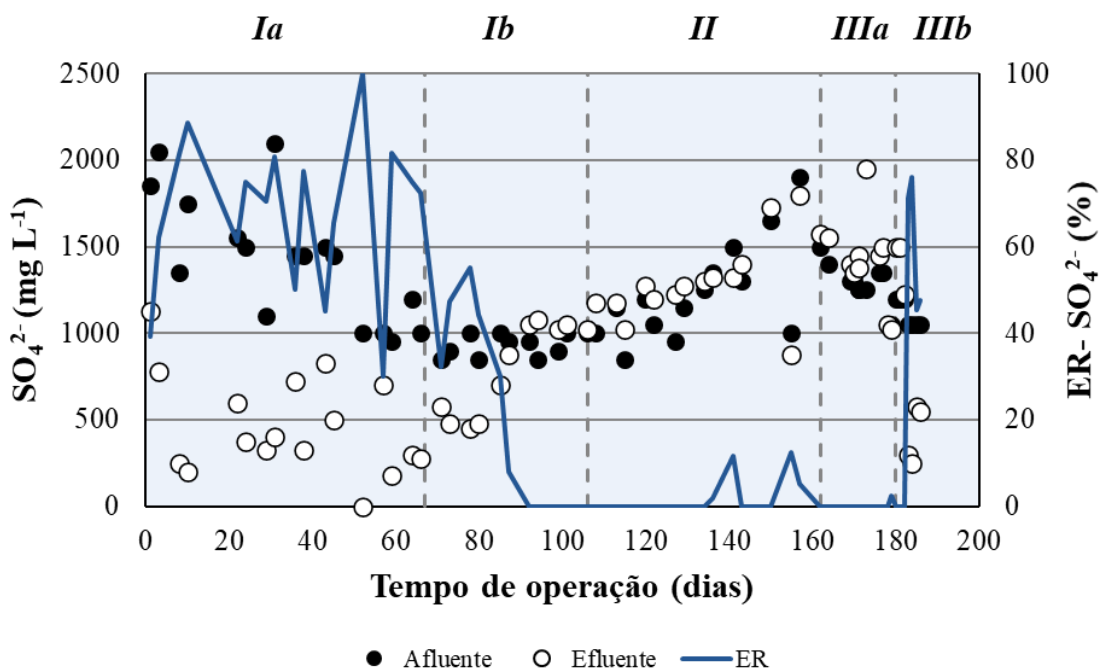
5.1.1 Desempenho do Sistema na Redução de Sulfato

Durante os 186 dias de operação do AnSTBR foi possível analisar de forma comparativa como se deu a dinâmica da redução de sulfato em condições controladas que inicialmente deveriam favorecer naturalmente a acidogênese. De modo a compreender tal dinâmica avaliou-se a ER-SO_4^{2-} em conjunto com o pH efluente, uma vez que, tais variáveis estão intimamente relacionadas e juntas permitiram um melhor entendimento do comportamento do reator. Isso acontece, pois, a ocorrência ou não de atividade redutora de sulfato depende do valor do pH (superior a 6), o que ficou evidenciado desde o início da operação.



Fonte: Elaboração própria.

Figura 6 - Variações temporais da concentração de SO_4^{2-} efluente e da ER-SO_4^{2-} nas diferentes fases operacionais.



Fonte: Elaboração própria.

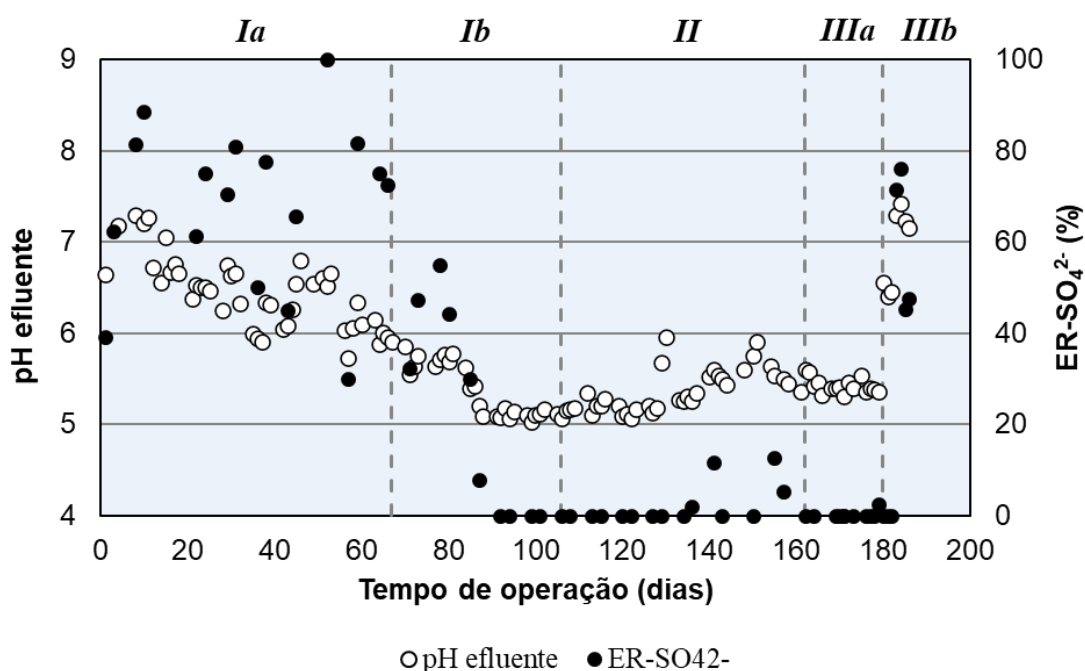
Da partida do reator ao decorrer de toda a fase Ia o pH efluente apresentou valores estritamente entre aproximadamente 6 e 7 ($6,56 \pm 0,37$) com um comportamento decrescente até estabilizar-se (Figura 5). Valores esses que se diferenciam dos encontrados na literatura (Ferraz Jr. et al., 2014; Ferraz Jr.; Etchbehere; Zaiat, 2015a; Ferraz Jr.; Etchbehere; Zaiat, 2015b; Fuess et al., 2017; Fuess; Zaiat; Nascimento, 2019), onde tem-se que para sistemas fermentativos com o emprego de vinhaça o pH efluente é ácido, ficando entre 5 e 5,5 logo no início da operação, independente de outros aspectos como a configuração do reator, temperatura e material suporte.

Percebeu-se a manutenção do pH efluente numa faixa superior a 6 quando não houve a adição de nenhum agente tamponante ao afluente. Comportamento análogo somente foi antes encontrado em estudos mediante à dosagem de NaHCO_3 à vinhaça (Fuess; Zaiat; Nascimento, 2019). Essa faixa de pH efluente sinalizou uma possível rota metabólica da sulfetogênese dentro do reator. Foi possível confirmar a presença da sulfetogênese no sistema por meio da análise de sulfato residual no efluente. Os resultados apontaram no período compreendido para a fase Ia que a ER-SO_4^{2-} apresentou elevado nível de eficiência oscilando entre valores de 60% a 80% ($68,2 \pm 15,0$) sem um padrão bem definido no espaço temporal (Figura 6).

Algumas das hipóteses inicialmente levantadas para justificar o estabelecimento da sulfetogênese consideraram a liberação de H_2 no início do período de incubação por bactérias fermentativas durante a acidificação da matéria orgânica prontamente disponível possivelmente estimulando a redução do sulfato por BRS hidrogenotróficas. Ou ainda a possibilidade da utilização da espuma PU ter favorecido o crescimento das BRS imobilizadas no material suporte (Silva et al., 2006). De modo geral, a versatilidade das BRS faz com que elas tenham vantagem na maioria das competições por substrato.

Por meio da Figura 7, foi possível um melhor entendimento da ligação entre o pH efluente e a $ER-SO_4^{2-}$. Nela, pode-se observar de forma clara a ocorrência da sulfetogênese nas fases Ia e IIIb, ambas caracterizadas pela presença de atividade redutora de sulfato, com pelo menos 40% de eficiência, associada a um pH efluente superior a 6.

Figura 7 - Compilado da variação temporal do pH efluente e $ER-SO_4^{2-}$.

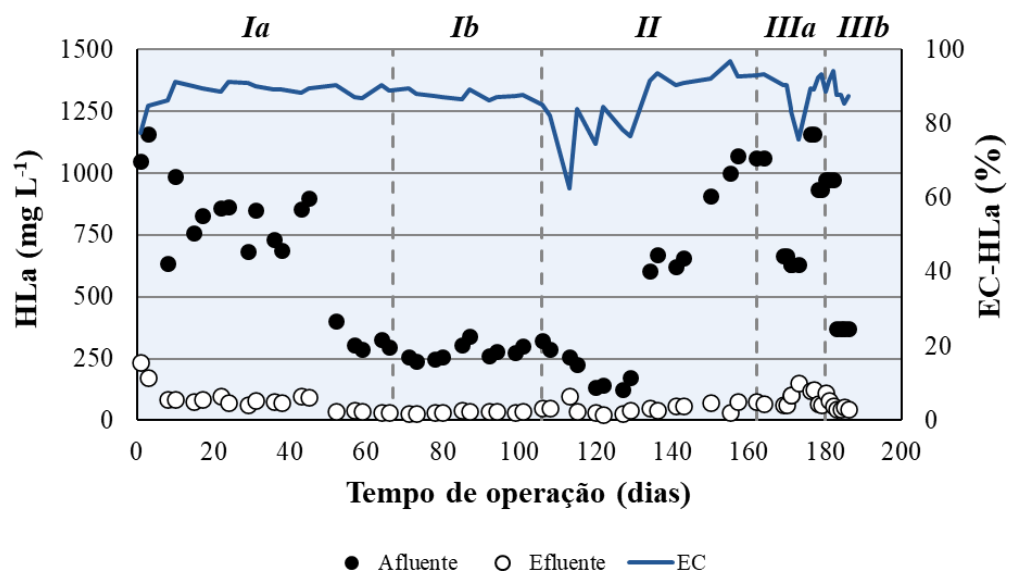


Fonte: Elaboração própria.

Já no que se refere a conversão de substratos orgânicos comuns à vinhaça de cana-de-açúcar, como o HLa e Gly (Tabela 1), destaca-se que ambos apresentaram altas eficiências de conversão, predominantemente acima de 80% para o HLa (Figura 8) e acima de 92% para o Gly (Figura 9). A metabolização desses substratos preferenciais contribui para a manutenção da sulfetogênese na fase Ia, e se estendeu às demais fases de operação. Observou-se ainda que

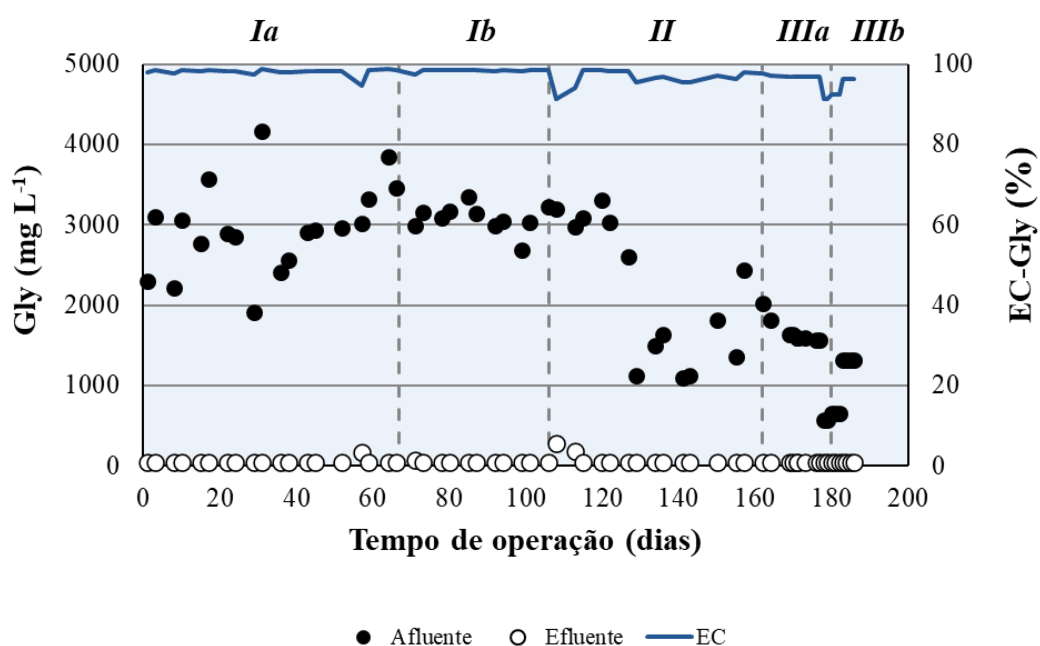
nas fases Ia e Ib, em condições sulfetogênicas, as conversões se apresentaram mais estáveis temporalmente para ambos os parâmetros (Ia: EC-HL=88,4±3,6 e EC-Gly=98,2±0,4; Ib: EC-HLa =88,1±1,3 e EC-Gly=98,1±1,0 (Figura 8-9).

Figura 8 - Variações temporais das concentrações de HLa efluente e da EC-HLa nas diferentes fases operacionais.



Fonte: Elaboração própria.

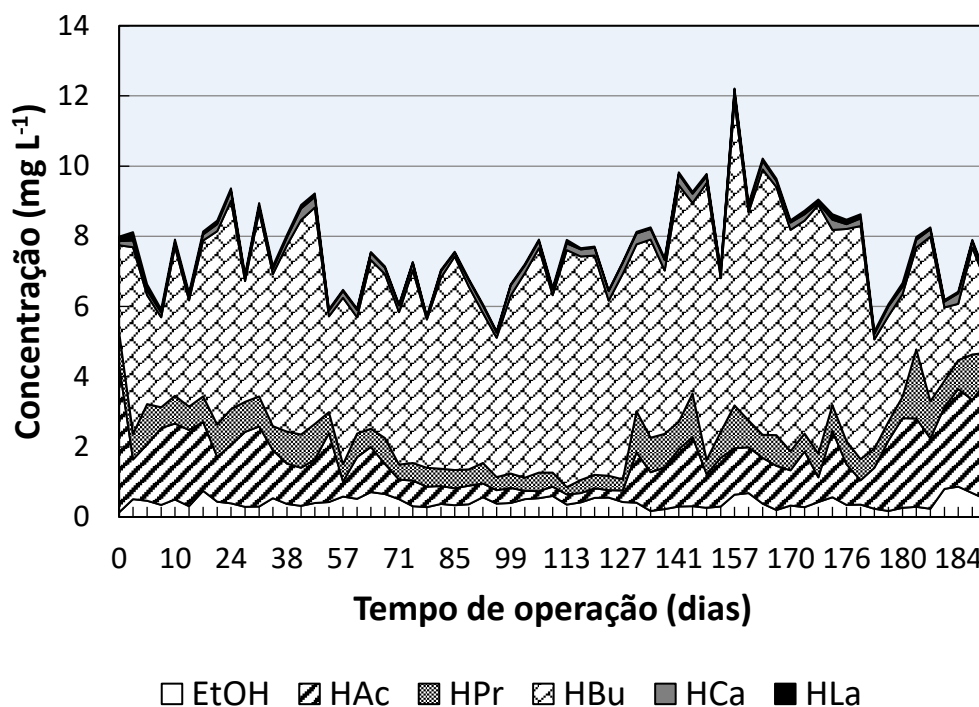
Figura 9 - Variações temporais das concentrações de Gly efluente e EC-Gly nas diferentes fases operacionais.



Fonte: Elaboração própria.

O bom desempenho da redução de sulfato esteve associado ao acúmulo dos ácidos orgânicos acético (HAc) e propiônico (HPr) (Figura 10). Por conseguinte, houve grandes chances de a concentração de HAc durante a fermentação natural e da fase Ia (Figura 10) ter resultado numa rota metabólica por parte das BRS de oxidação incompleta, onde os substratos orgânicos são transformados em HAc (Zhou; Xing, 2015).

Figura 10 - Variação da produção de AOV ao longo do tempo de operação do AnSTBR.



Fonte: Elaboração própria.

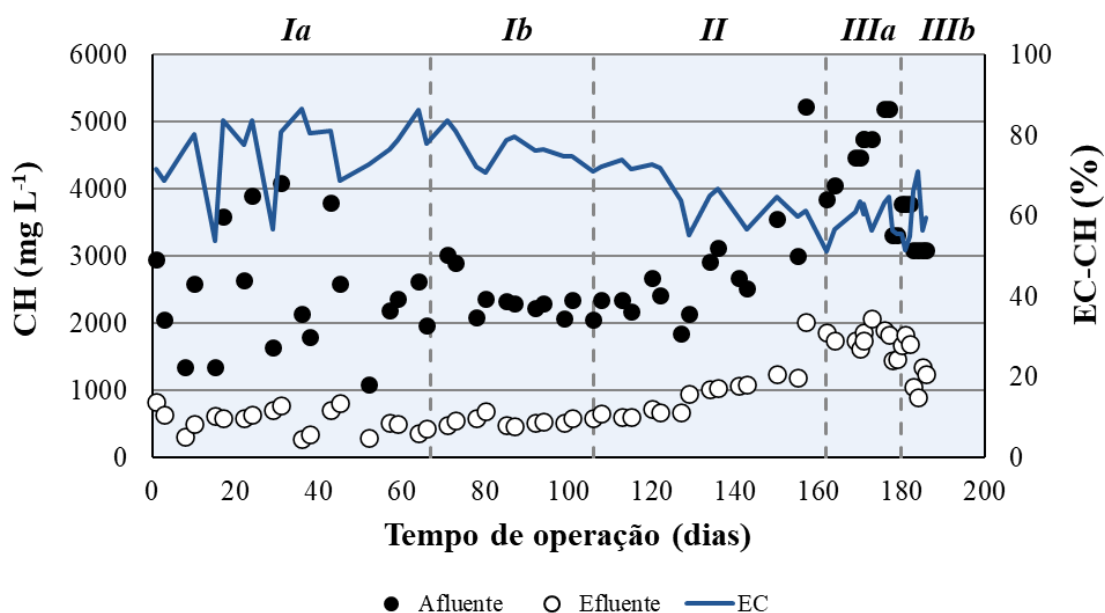
A oxidação incompleta de HLa (Eq. 3; Zhou; Xing, 2015) e Gly (Eq. 4; (Bertolino et al. 2014) pelas BRS depende alcalinidade na forma de bicarbonato ao meio, consequentemente elevando o valor do pH, que por sua vez, estimula incrementalmente as populações produtoras de propionato (HPr), como ocorrido na fermentação natural e na fase Ia.



Em termos de EC-CH foi possível observar valores entre 60 e 80% dentro de todo o período de operação (Figura 11). Mas é interessante salientar que as maiores eficiências foram

alcançadas nos dias de operação compreendidos entre o começo da fase Ia e o final da fase Ib, dias 1 a 105, quando ocorria a sulfetogênese no reator (Figura 11), mesmo sem adição de NaHCO_3 .

Figura 11 - Variações temporais da concentração de CH efluente e da EC-CH nas diferentes fases operacionais.

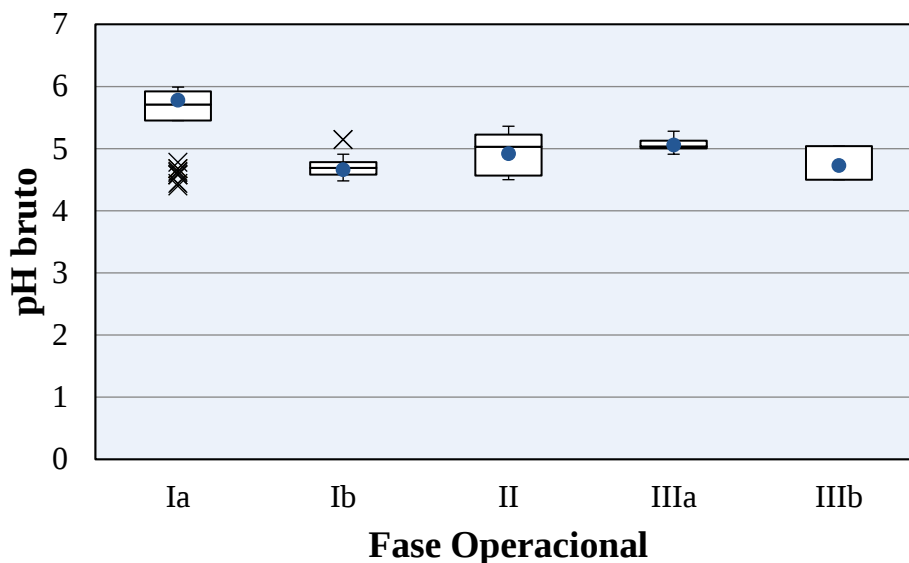


Fonte: Elaboração própria.

A partir da fase Ib, houve um desfavorecimento gradual da sulfetogênese, o que ficou evidenciado por uma queda na eficiência da redução de sulfato de patamares de 40% até 0% e também no pH efluente entre 5,0 e 5,3 (Figura 7). Assim como reportado por Hwang et al. (2009) há uma inibição do crescimento das BRS com a acidificação do meio, isto é, pH inferior a 6.

Sendo assim, vale ressaltar que esse comportamento anômalo referente a sulfetogênese no decorrer das fases Ia e Ib se deve exclusivamente à variação composicional da vinhaça entre as coletas C1 e C2, desconsiderando-se qualquer possível influência advinda da utilização da espuma de PU. Tal hipótese foi primeiramente notada pela diferença nos valores de pH bruto entre as coletas (Figura 12). E confirmada após uma investigação detalhada durante a caracterização da vinhaça onde constatou-se uma elevada concentração de sódio (Na) na primeira coleta. C1 apresentou uma concentração de Na equivalente a 700 mg L^{-1} , enquanto C2 apresentou um valor substancialmente inferior, 68 mg L^{-1} .

Figura 12 - Dispersão dos valores de pH bruto nas diferentes fases operacionais, (x) dados outliers e (●) valores médios.



Fonte: Elaboração própria.

Convencionalmente a vinhaça da cana-de-açúcar possui concentrações de sódio inferiores a 100 mg L^{-1} (Fuess; Rodrigues; Garcia, 2017; Fuess; Garcia; Zaiat, 2018). Logo, as concentrações encontradas em C1 possivelmente são resultado de algum desvio operacional no processo produtivo na indústria. O sódio na vinhaça, aliada a conversões realizadas pelas BRS pode ter sido uma fonte interna de NaHCO_3 , que pode por sua vez ainda ter sido incrementada pela utilização de NaOH na correção do pH para alimentação do reator. Consequentemente houve um deslocamento do equilíbrio na Eq. 5 para a esquerda, neutralizando os íons H^+ advindo da etapa de acidogênese da digestão anaeróbia, mantendo o pH elevado, acima de 6. Condição essa análoga a sistemas que contam com dosagem de NaHCO_3 ao substrato.



A partir do 87º dia de operação do AnSTBR a produção de ácidos orgânicos superou o efeito tampão criado pelas fontes internas de NaHCO_3 , estabelecendo-se a acidogênese no reator, que perdurou da fase Ib até o final da fase IIIa (179º dia de operação). Somente na fase IIIb a atividade sulfetogênica foi retomada e de forma induzida pela dosagem de NaHCO_3 . O que caracterizou um ótimo potencial de recuperação do sistema para o estabelecimento da atividade redutora de sulfato. O reator respondeu rapidamente à adição de NaHCO_3 (Figura 7) o que fez com que houvesse a retomada da sulfetogênese, caracterizando um ótimo potencial

de recuperação da via metabólica do sistema. O pH manteve-se novamente acima de 6 de forma estrita e a ER-SO_4^{2-} chegou a atingir 60% (Figura 7).

Frente aos resultados representados na Figura 10 notou-se que a produção do H_2 esteve diretamente associada à fermentação do tipo butírica (Figura 10) durante toda a operação do AnSTBR. Ademais, as condições sulfetogênicas não inibiram as populações produtoras de ácido butírico (HBu) (Figura 10). Na fase Ia as concentrações de HBu chegaram a $8423 \pm 2214 \text{ mg-COD L}^{-1}$ muito superiores as de HAc que foram de $1789 \pm 494 \text{ mg-COD L}^{-1}$. Resultados esses que indicam o favorecimento de uma via hidrogenotrófica para as BRS, ou seja, tendo o H_2 como substrato (Eq. 6; Zhou; Xing, 2015).



A Eq. 7 representa o alongamento da cadeia de ácidos carboxílicos via β -oxidação reversa (Cavalcante et al., 2017), com a quebra do HLa e a liberação de acetil-CoA a ser inicialmente incorporado ao HAc. O acúmulo de HBu nas fases IIa, IIb e IIIa (Figura 10) favoreceu uma etapa de alongamento da cadeia para produzir ácido capróico (HCa) em todas as condições de operação, utilizando também a HLa como fonte de acetil-CoA (Eq. 8). A manutenção dos valores de pH, sempre acima de 5,0 durante todo o período de operação (Figura 5), favoreceu uma absorção contínua de HLa (Eq. 7-8; Matsumoto; Nishimura, 2007, Cavalcante et al., 2017) que explica os elevados valores de EC-HLa, ou seja, 78,8-90,6% (Figura 8), como já indicado anteriormente.



Há de se destacar ainda sobre os metabólitos, as elevadas concentrações de etanol (EtOH) medidas durante toda a operação (Figura 10), sugerindo alguma participação relevante das fermentações etanólicas. O consumo de EtOH na fase Ia pode estar associado à atividade sulfetogênica (Eq. 9; Zhou; Xing, 2015), porque o EtOH é um substrato comum utilizado por populações de BRS (Cunha et al., 2020). Apesar do restabelecimento das condições de redução de sulfato na fase IIIb, a produção de EtOH pode estar associada à produção residual de H_2 através da fermentação tipo acetato-etanol (Eq. 10; Anzola-Rojas; Zaiat; De Wever, 2016). Esta

via em particular também produz HAC, o que poderia explicar posteriormente as altas concentrações de HAC na referida fase.



5.1.2 Desempenho do Sistema na Produção de Hidrogênio

A produção contínua de biogás foi monitorada primordialmente visando-se quantificar a geração de H_2 , produto de interesse oriundo das reações presentes na acidogênese. Desde o primeiro dia de operação, monitoraram-se os valores percentuais da composição do biogás gerado, os quais são apresentados na Figura 13.

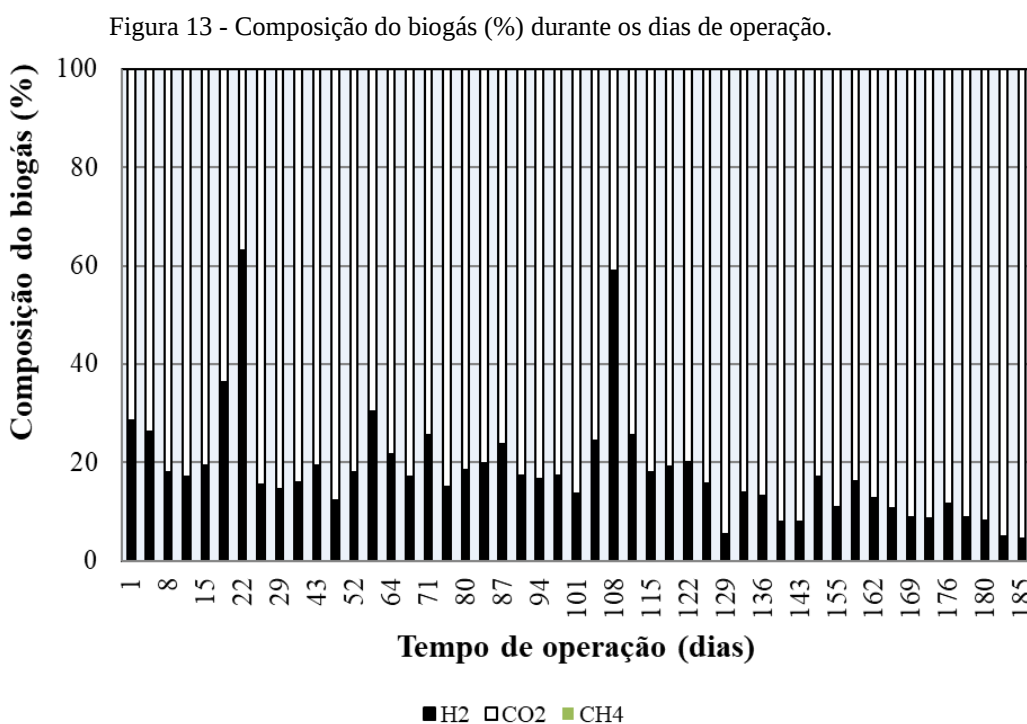
É relevante destacar que as análises da composição do biogás indicaram o estabelecimento de populações produtoras de H_2 em todas as fases. O percentual médio de H_2 durante os 186 dias de operação foi de aproximadamente 20%, enquanto que, de forma complementar, o percentual de CO_2 foi de aproximadamente 80%, uma vez que não foi observada produção de CH_4 nas condições avaliadas. Vale ressaltar também ainda que as frações de H_2 e CO_2 possam ser um pouco menores que os valores apresentados, uma vez que não foi monitorado o H_2S gasoso no reator.

Previamente ao detalhamento da evolução (aspectos quantitativos) dos padrões de H_2 , salienta-se que devido a problemas funcionais do medidor de gás, conseguiu-se obter-se dados apenas a partir do 80º dia de operação, durante a fase Ib.

A PVH (Figura 14) mostrou-se instável durante o período de operação. Os picos observados para essa variável ocorreram próximo ao 108º e ao 157º dia de operação, onde a PVH chegou a $850 \text{ mL H}_2 \text{ L}^{-1} \text{ dia}^{-1}$ e $940 \text{ mL H}_2 \text{ L}^{-1} \text{ dia}^{-1}$, respectivamente. Nesses períodos houve mudanças de fase no reator com o incremento da COV_A por meio da redução do TDH, o que justificou o aumento da produção de H_2 . Por sua vez, próximo ao 150º dia, quando se passou a utilizar a coleta C3 na alimentação do reator houve outro pico da PVH que atingiu $640 \text{ mL H}_2 \text{ L}^{-1} \text{ dia}^{-1}$, que pode ter ocorrido pela alteração composicional da vinhaça sobretudo quanto a parâmetros como DQO, CH e COV. O último pico identificado, de $770 \text{ mL H}_2 \text{ L}^{-1} \text{ dia}^{-1}$, foi no início da última fase operacional que se caracterizou pela adição de NaHCO_3 , que não necessariamente justifica o aumento descrito na produção de H_2 . Pelo fato da fase IIIb ter

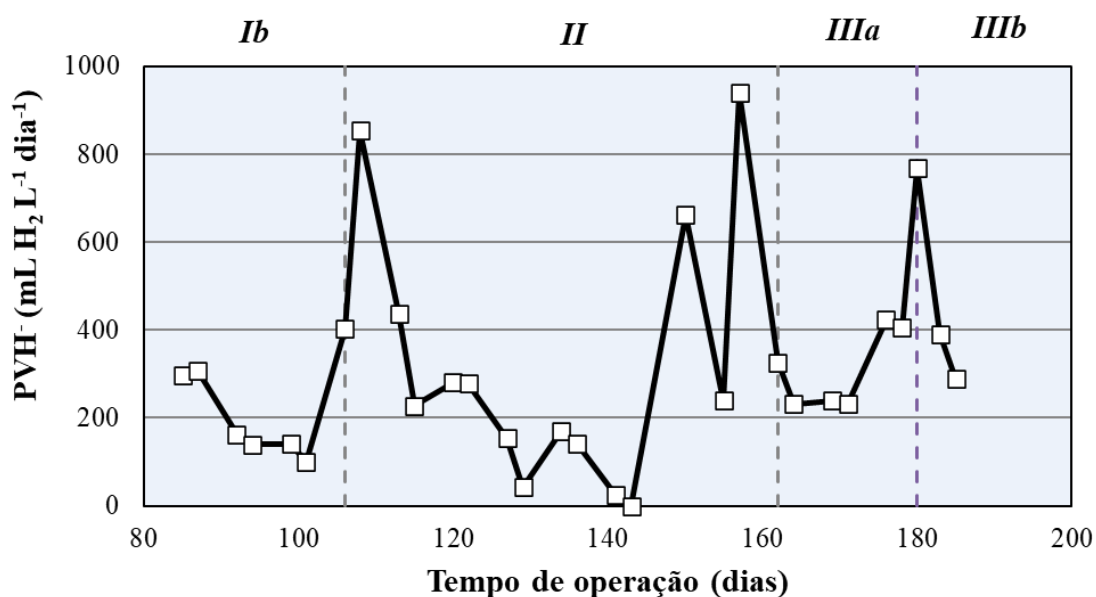
ocorrido no final da safra a disponibilidade de vinhaça foi limitada, inviabilizando a avaliação dessa condição de operação por um período maior de tempo para tirar-se outras conclusões, tais como avaliar o patamar final da atividade sulfetogênica.

Enquanto isso, o HY (Figura 15) consequente da conversão de CH, apresentou comportamento análogo ao do gráfico de PVH. O maior valor obtido foi em torno de 15 mmol $\text{H}_2 \text{ g}^{-1}\text{CH}$ no 108º dia. Contudo os picos dos dias 150 e 157 apresentaram significativamente menos expressivos para o HY em função de CH, o mesmo pode ter ocorrido pela alteração na composição da vinhaça na coleta C3, devido à diminuição da concentração de CH presente na vinhaça.



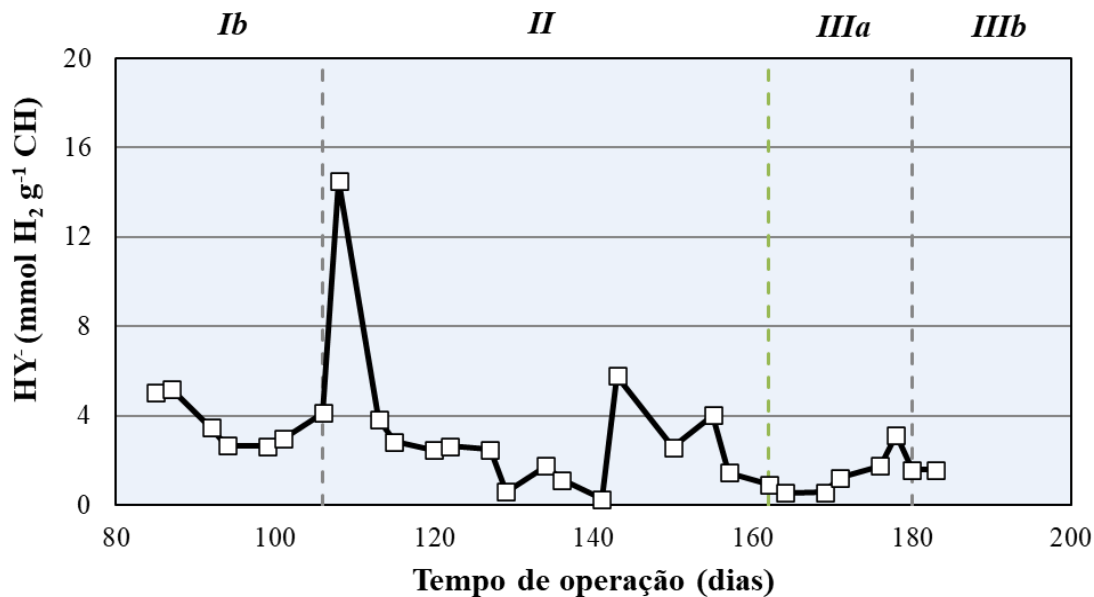
Fonte: Elaboração própria.

Figura 14 – Produção volumétrica de hidrogênio (PVH) durante os dias de operação.



Fonte: Elaboração própria.

Figura 15 - Rendimento de hidrogênio (HY) durante os dias de operação.



Fonte: Elaboração própria.

Os valores obtidos para PVH e HY foram considerados baixos, principalmente quando comparados a resultados apontados em outros trabalhos. Ferraz Jr., Etchebehere e Zaiat (2015a) obtiveram resultados inerentes ao monitoramento de um reator anaeróbio de leito empacotado

(do inglês, *anaerobic packed-bed reactor*, APBR) com polietileno de baixa densidade - PEBD como material suporte tendo a vinhaça como substrato operado em condições termofílicas, observando valores médios de $PVH=761,7 \text{ mL H}_2 \text{ L}^{-1} \text{ dia}^{-1}$ e $HY=1,6 \text{ mol H}_2 \text{ g}^{-1} \text{ CH}$. Fuess (2017) também trabalhou com um reator com a mesma configuração e condições de operação, onde obteve os valores médios de $PVH=789 \text{ mL H}_2 \text{ L}^{-1} \text{ dia}^{-1}$ e $HY=1,5 \text{ mol H}_2 \text{ g}^{-1} \text{ CH}$.

No entanto, é importante destacar-se que os valores de pico de PVH e HY obtiveram valores próximos aos valores médios reportados tanto por Ferraz Jr., Etchebehere e Zaiat (2015a) como por Fuess (2017).

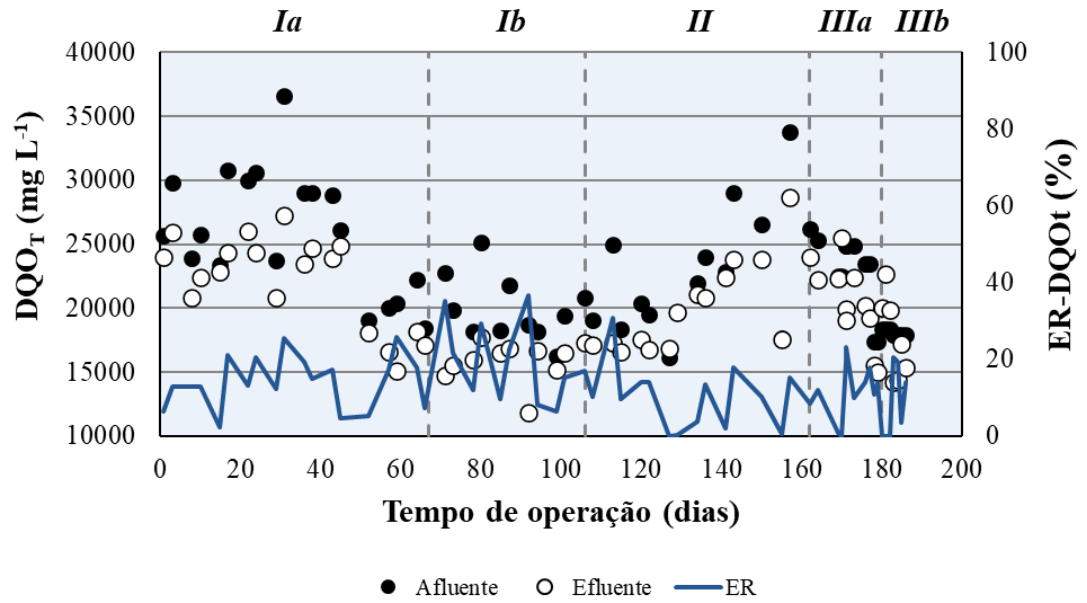
Logo, tem-se que, em termos de produção de H_2 , o emprego de espuma PU não se mostrou tão vantajoso frente a outros materiais, como por exemplo, o PEBD, considerado uma das melhores opções atualmente quando se busca unicamente obter uma maior produção de H_2 .

5.1.3 Outras Variáveis da Fase Líquida

Ademais, sobre a DQO da vinhaça, notou-se que ela obteve valores totais muito variáveis, perceptíveis principalmente com a mudança das coletas da vinhaça utilizadas na alimentação do reator. Por volta do 30º dia de operação a DQO_T apresentou cerca de 35000 mg L^{-1} , quando se utilizava a coleta C1, enquanto próximo ao 100º dia chegou a cerca de 15000 mg L^{-1} (Figura 16-17). No caso da DQO_S o comportamento dos resultados apresentou um comportamento semelhante.

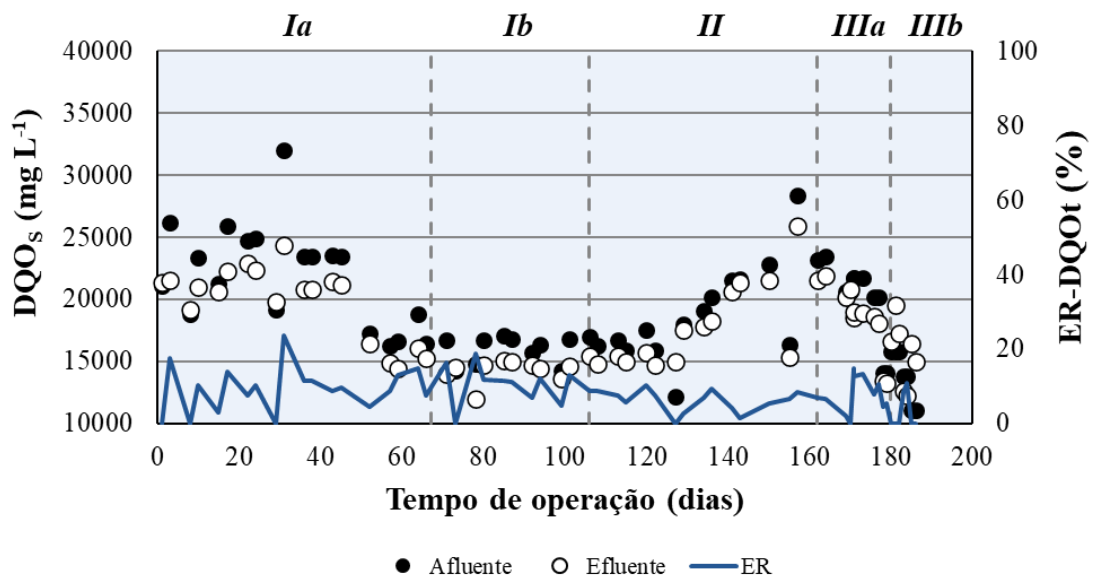
Tanto a $ER-DQO_T$ como a $ER-DQO_S$ atingiram valores médios de no máximo 25% e 12%, respectivamente, nas diferentes fases operacionais (Figura 16-17). Tais valores eram esperados, uma vez que, no processo acidogênico essa remoção é baixa, sendo necessária a pós-conversão na fase metanogênica para obtenção de maior eficiência de remoção de matéria orgânica, como apontado por Ferraz Jr. (2013).

Figura 16 - Variação temporal da concentração da DQO_T efluente e da ER-DQO_T.



Fonte: Elaboração própria.

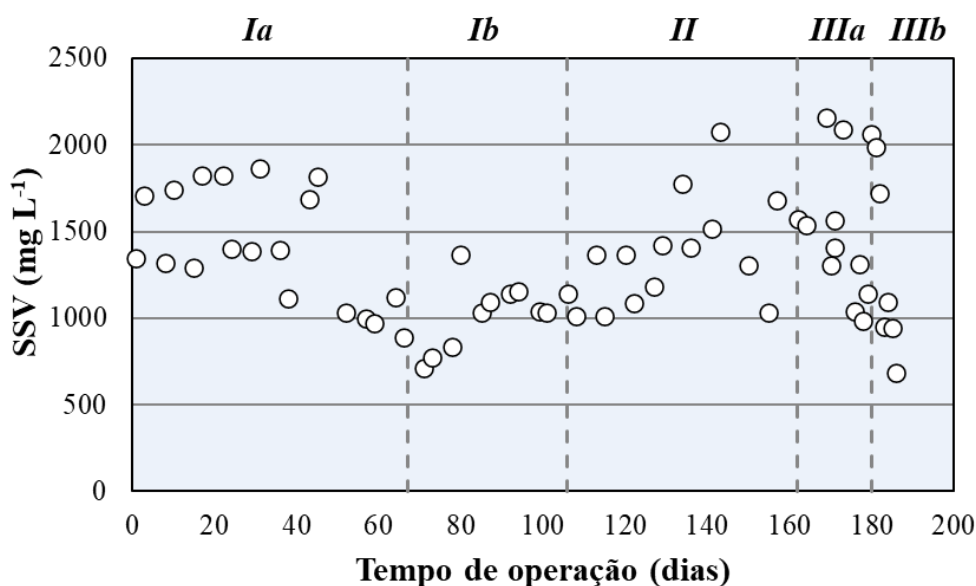
Figura 17 - Variação temporal da concentração da DQO_S efluente e da ER-DQO_S.



Fonte: Elaboração própria.

Por fim, também se monitorou os teores de sólidos efluentes, mais especificamente SSV, o qual reflete a fração orgânica sólido presente no meio.

Figura 18 – Variação temporal da concentração de SSV nas diferentes fases operacionais.



Fonte: Elaboração própria.

A dispersão de dados de SSV apresentou comportamento uniforme em todas as fases, e todas as cinco médias ficaram entre 1000 e 1500 mg L⁻¹ (Figura 18).

5.2 Reatores em Batelada

Em decorrência dos resultados observados no primeiro experimento e sucesso do estabelecimento de um sistema sulfetogênicos-acidogênico, i.e., com potencialidade tanto para redução de sulfato como para produção de H₂, buscando primordialmente, compreender a dinâmica da redução de sulfato, percebeu-se então que era necessário compreender também suas implicações na recuperação de energia, o que motivou um novo experimento, dessa vez em reatores em batelada. O foco nesse segundo experimento, portanto, foi compreender os impactos da redução de sulfato na atividade hidrogenogênica e, consequentemente, no balanço energético global na digestão anaeróbia da vinhaça de cana-de-açúcar.

5.2.1 Efeito das Relações DQO/SO₄²⁻ e NaHCO₃/DQO na Produção de Hidrogênio

Realizadas todos os blocos para os diferentes ensaios em batelada do experimento, aplicou-se o DCCR a fim de avaliar o efeito das variáveis DQO/SO₄²⁻ e NaHCO₃/DQO na produção de H₂. Foi utilizada a superfície de resposta, obtida a partir do ajuste de uma equação

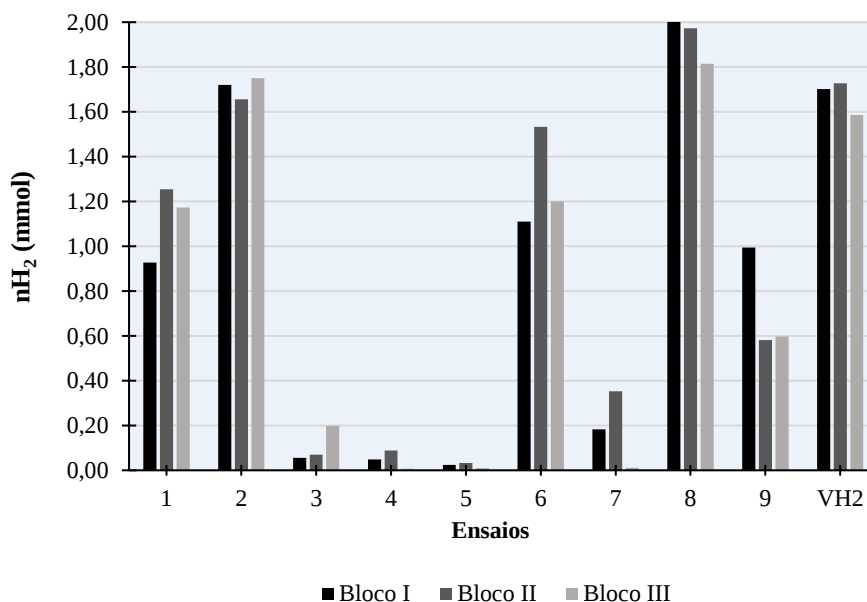
quadrática usando a ANOVA para estabelecer os fatores significativos, e assim, avaliar a região ótima para a produção de H_2 a partir da vinhaça de cana-de-açúcar em sistemas sulfetogênicos-acidogênicos.

As variáveis independentes foram estudadas em cinco níveis codificados (-1,41; -1; 0; +1; +1,41). O nível de confiança adotado para o teste foi de 95%, isto é, foram considerados como fatores significantes apenas os fatores em que $p\text{-valor} < \alpha$.

Na Figura 19 estão explicitados os valores médios dos pontos máximos de produção de hidrogênio dos três blocos do experimento. Os ensaios que obtiveram os melhores desempenhos foram o E2, com uma elevada concentração de sulfato, e o E8 que não teve a adição de bicarbonato de sódio.

Em E2 pode-se concluir que o reator funcionou como um sistema sulfetogênico-acidogênico de forma eficiente, já que houve redução de sulfato (Figura 22) e uma produção de H_2 com baixo impacto. Enquanto em E8 o sistema foi plenamente acidogênico, pois não houve redução de sulfato (Figura 22).

Figura 19 - Valores médios de nH_2 encontrados durante as três corridas do experimento para cada ensaio realizado.



Fonte: Elaboração própria.

Por sua vez, os ensaios E3, E4 e E5, os quais possuíam as concentrações mais elevadas de SO_4^{2-} foram os que obtiveram menor produção de H_2 . Sendo assim, percebeu-se que a

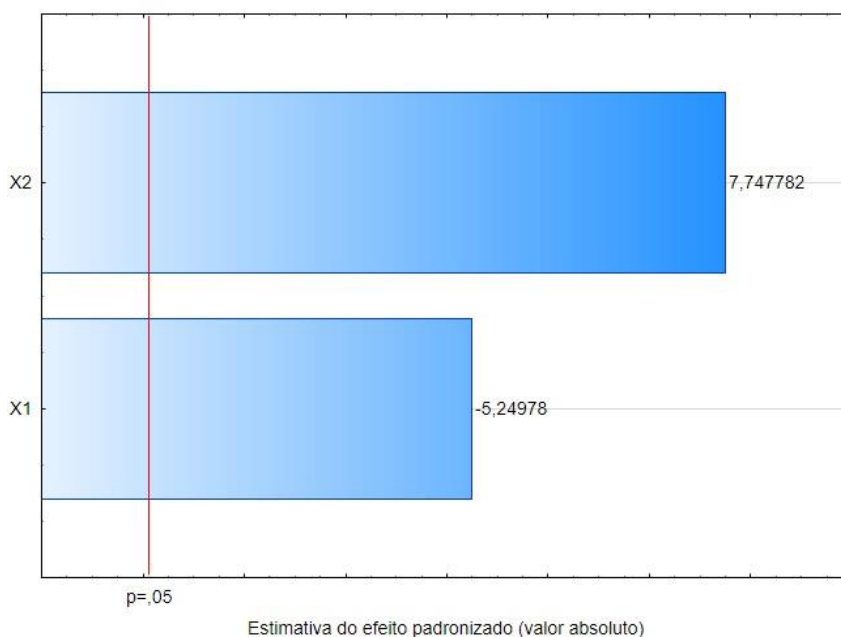
sulfetogênese impactou na produção de H_2 nos sistemas sulfetogênicos-acidogênicos, com exceção do E2.

O efeito das relações DQO/SO_4^{2-} e $NaHCO_3/DQO$ sobre a produção de H_2 esteve de acordo com a Figura 21. O modelo matemático que o descreve foi estabelecido de acordo com a variação da resposta em função das variáveis independentes codificadas e está descrito na Eq. 11. Os termos x_1 e x_2 são as relações DQO_T/SO_4^{2-} e $NaHCO_3/DQO_T$, respectivamente, representadas pelos valores codificados descritos na Tabela 5.

$$PH_2 \text{ (mmol)} = 0,79 + 1,11x_1 - 0,75x_2 \quad (\text{Eq. 11})$$

O Teste de Pareto aplicado para o efeito das variáveis independentes está representado na Figura 20.

Figura 20 - Teste de Pareto para o efeito das variáveis independentes, DQO/SO_4^{2-} e $NaHCO_3/DQO$, na produção de hidrogênio.



Fonte: Elaboração própria no software Statistica.

Enquanto isso, a adequação do modelo foi determinada por análise de variância (ANOVA) conforme apresentado nas Tabelas 7 e 8. As linhas destacadas em vermelho denotam os fatores considerados significantes ($p\text{-valor} < 0,05$).

Tabela 7 - ANOVA para o efeito das relações $\text{DQO}/\text{SO}_4^{2-}$ e $\text{NaHCO}_3/\text{DQO}$ na produção de hidrogênio (F e p-valor).

Fator	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Quadrados médios	Valor de F	p-valor
x ₁	7,41092	1	7,410918	59,50911	0,000000
x ₂	3,38381	1	3,383814	27,17177	0,000024
Erro	2,98882	24	0,124534		
Total	13,78355	26			

Fonte: Elaboração própria.

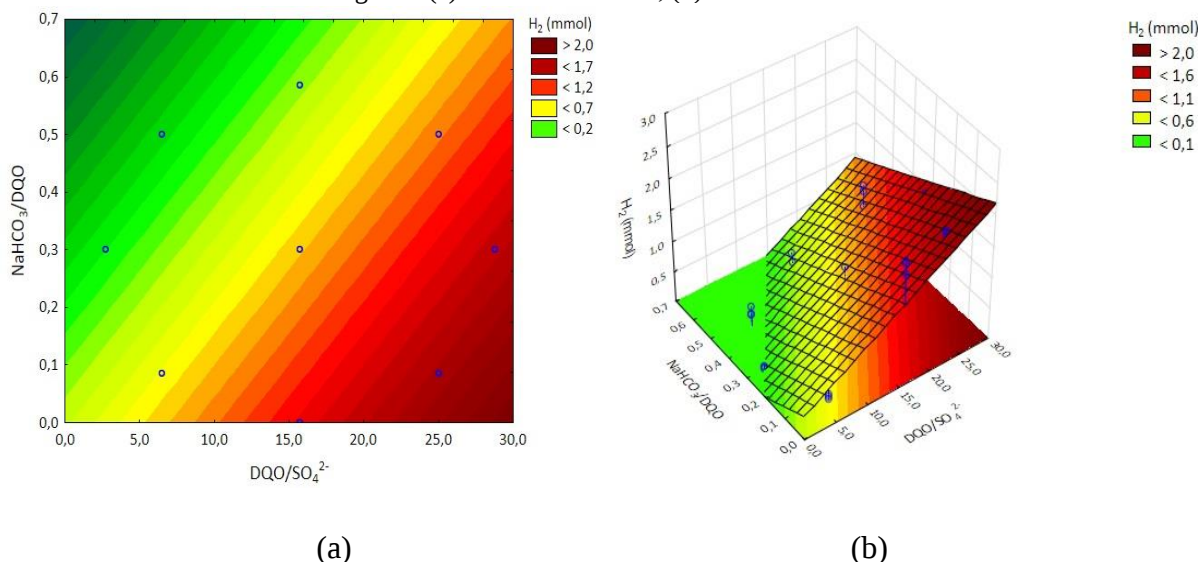
Tabela 8 - ANOVA para o efeito das relações $\text{DQO}/\text{SO}_4^{2-}$ e $\text{NaHCO}_3/\text{DQO}$ na produção de hidrogênio (coeficientes).

	Efeito	Erro padrão	t(21)	p-valor	-95% limite de confiança	+95% limite de confiança	Coeficiente	Erro padrão do coeficiente	-95% limite de confiança	+95% limite de confiança
Média	0,795160	0,067644	11,75514	0,000000	0,65555	0,934769	0,795160	0,067644	0,655550	0,934769
x_1	1,113750	0,143751	7,74778	0,000000	0,81706	1,410437	0,556875	0,071875	0,408531	0,705218
x_1^2	-0,754345	0,143691	-5,24978	0,000022	-1,05091	-0,457781	-0,377172	0,071845	-0,525454	-0,228891

Fonte: Elaboração própria.

A superfície de resposta (Figura 21) apresenta o nível máximo resultante das interações das variáveis independentes na variável de resposta, produção de H_2 . Observou-se a partir das zonas vermelho escuras das figuras que, quanto maior a relação DQO/SO_4^{2-} , i.e., menor a concentração de sulfato, e menor a relação $NaHCO_3/DQO$, maior a produção de H_2 nos reatores.

Figura 21 - Superfície de resposta da interação entre as relações DQO/SO_4^{2-} e $NaHCO_3/DQO$ na produção de hidrogênio: (a) em uma dimensão, (b) em três dimensões.



Fonte: Elaboração própria no software Statistica.

O modelo obtido foi ainda validado utilizando-se ainda uma rodada adicional de experimentos (VH_2) aplicando a maior razão DQO/SO_4^{2-} (28,8; valor codificado = +1,41) e a menor razão $NaHCO_3/DQO$ (0; valor codificado = -1,41), a partir da qual obteve-se um PH_2 experimental de $1,67 \pm 0,08$ mmol, ou seja, correspondendo a 49,0% do valor previsto pelo modelo (Eq. 11; 3,41 mmol).

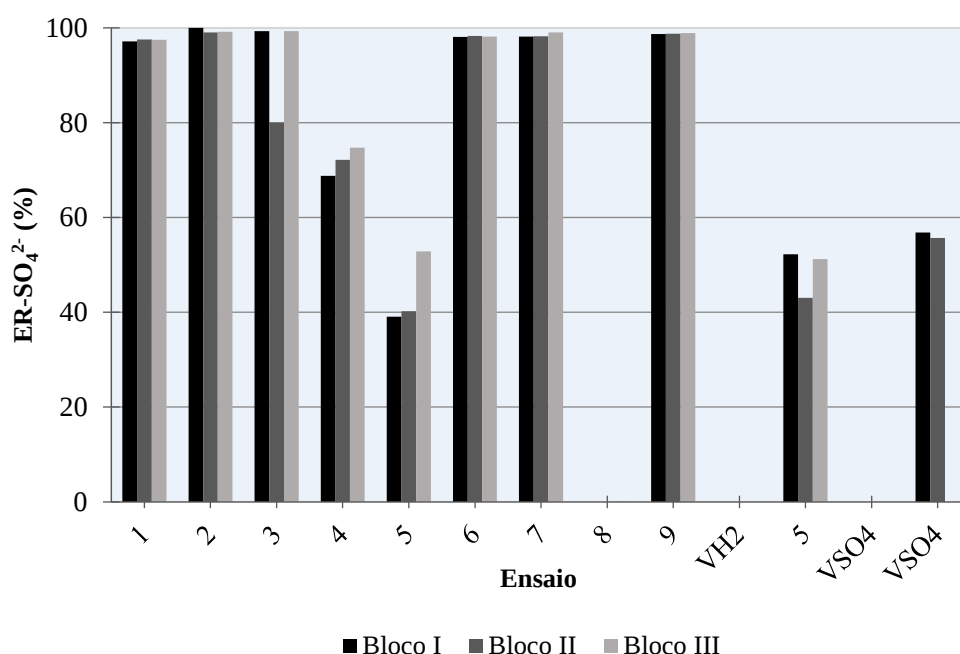
5.2.2 Efeito das Relações DQO/SO_4^{2-} e $NaHCO_3/DQO$ na Redução de Sulfato

Analogamente ao realizado para a produção de H_2 , aplicou-se o DCCR, dessa vez para avaliar o efeito das variáveis DQO/SO_4^{2-} e $NaHCO_3/DQO$ na redução de SO_4^{2-} . Visando encontrar a região ótima para a redução de SO_4^{2-} também foi utilizada a superfície de resposta, de modo a complementar o entendimento de sistemas sulfetogênicos-acidogênicos obtidos. Consideraram-se as mesmas variáveis independentes e o mesmo nível de confiança para os fatores, 95%.

De acordo com a Figura 22 pode-se notar que a maioria dos ensaios obteve valores satisfatórios no que se refere à $ER-SO_4^{2-}$, superando 90% em E1, E2, E3, E6, E7 e E9. Já em E5 a $ER-SO_4^{2-}$ chegou a atingir, em uma das corridas, o valor máximo de cerca de 50%. Apesar do pH do reator (Figura 23) ter ficado na faixa entre 6 e 8, propícia para a atividade sulfetogênica, a $ER-SO_4^{2-}$ apresentou valores médios. Uma hipótese para tal ocorrido, foi a elevada concentração SO_4^{2-} no ensaio, já que o mesmo representava a condição axial -1,41, de maior quantidade de sulfato (ou menor razão DQO/SO_4^{2-}).

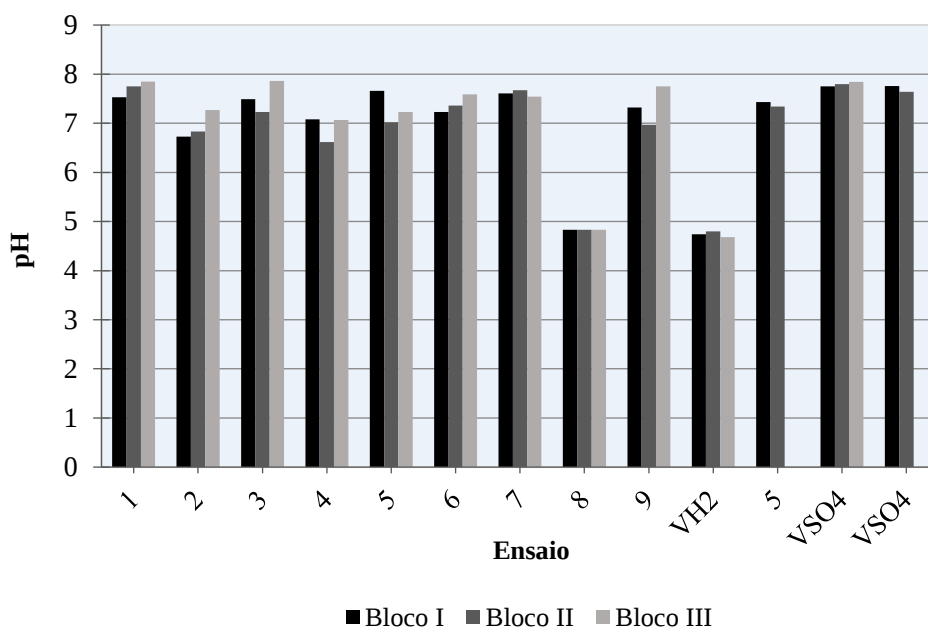
Como já mencionado anteriormente no item 5.2.1 em E8 não houve redução de sulfato (Figura 22). Nesse caso, o reator funcionou de forma estritamente acidogênica e o pH foi um limitante para a redução de SO_4^{2-} . A não adição de $NaHCO_3$ associada à produção de ácidos orgânicos oriundos da acidogênese, mantiveram o pH abaixo de 5 (Figura 23) em todas as corridas em E8, desfavorecendo a sulfetogênese.

Figura 22 - Variação dos valores de $ER-SO_4^{2-}$ para cada ensaio nas diferentes corridas realizadas.



Fonte: Elaboração própria.

Figura 23 - Variação dos valores de pH para cada ensaio nas diferentes corridas realizadas.



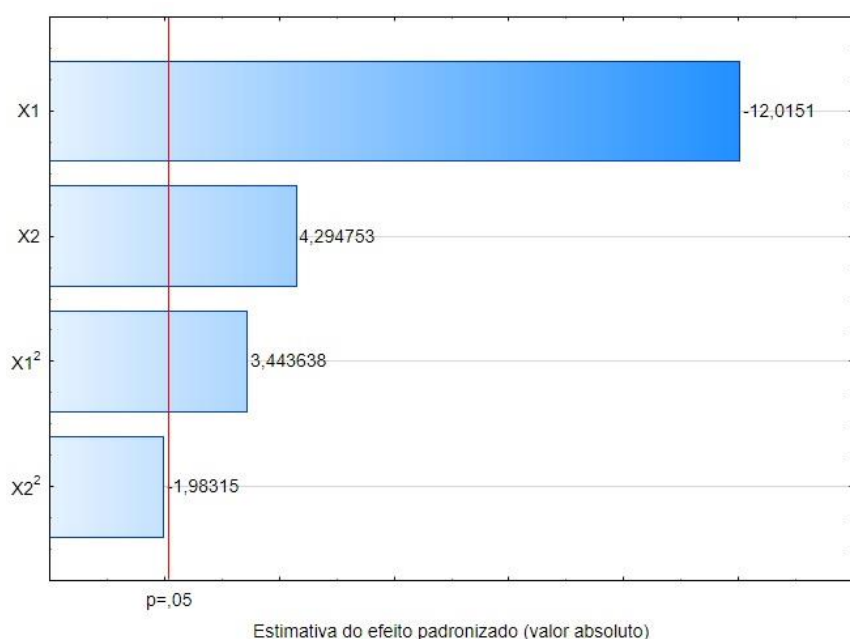
Fonte: Elaboração própria.

O efeito linear e quadrático das relações $\text{DQO}/\text{SO}_4^{2-}$ e $\text{NaHCO}_3/\text{DQO}$ foram observados quanto ao consumo de SO_4^{2-} de acordo com a Figura 25. O modelo matemático que o descreve foi estabelecido de acordo com a variação da resposta em função das variáveis independentes codificadas e está descrito na Eq. 12. Os termos x_1 e x_2 são as relações $\text{DQO}_T/\text{SO}_4^{2-}$ e $\text{NaHCO}_3/\text{DQO}_T$, respectivamente, representadas pelos valores codificados descritos na Tabela 5.

$$\text{SO}_4^{2-} \text{ consumido (mmol)} = 1,15 - 1,51x_1 + 0,72x_1^2 + 0,54x_2 - 0,41x_2^2 \quad (\text{Eq. 12})$$

O Teste de Pareto aplicado para o efeito das variáveis independentes está representado na Figura 24.

Figura 24 - Teste de Pareto para o efeito das variáveis independentes, $\text{DQO}/\text{SO}_4^{2-}$ e $\text{NaHCO}_3/\text{DQO}$, na redução de sulfato.



Fonte: Elaboração própria no software Statistica.

E a adequação do modelo foi determinada por análise de variância (ANOVA) conforme apresentado nas Tabelas 9 e 10. As linhas destacadas em vermelho denotam os fatores considerados significantes.

Tabela 9 - ANOVA para o efeito das relações $\text{DQO}/\text{SO}_4^{2-}$ e $\text{NaHCO}_3/\text{DQO}$ na redução de sulfato (F e p-valor).

Fator	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Quadrados médios	Valor de F	p-valor
x ₁	13,63859	1	13,63859	144,3630	0,000000
x ₁ ²	1,12034	1	1,12034	11,8586	0,002317
x ₂	1,74257	1	1,74257	18,4449	0,000294
x ₂ ²	0,37156	1	0,37156	3,9329	0,059971
Erro	2,07843	22	0,09447		
Total	21,35193	26			

Fonte: Elaboração própria.

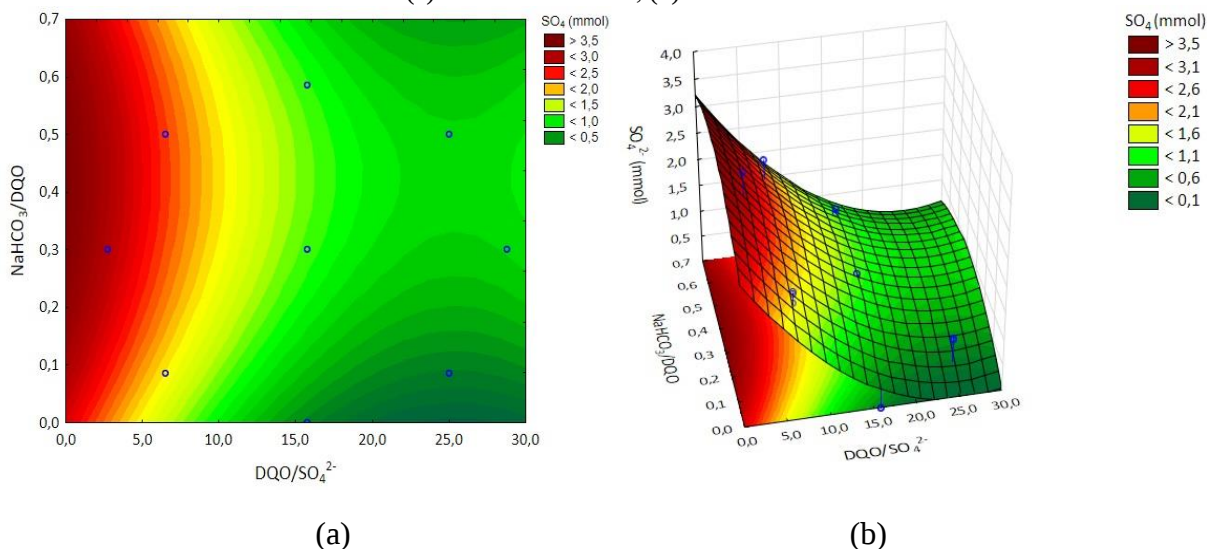
Tabela 10 - ANOVA para o efeito das relações $\text{DQO}/\text{SO}_4^{2-}$ e $\text{NaHCO}_3/\text{DQO}$ na redução de sulfato (coeficientes).

	Efeito	Erro padrão	t(21)	p-valor	-95% limite de confiança	+95% limite de confiança	Coeficiente	Erro padrão do coeficiente	-95% limite de confiança	+95% limite de confiança
Média	1,15232	0,177581	6,4890	0,000002	0,78404	1,52060	1,152316	0,177581	0,784036	1,520596
x_1	-1,51051	0,125718	-12,0151	0,000000	-1,77124	-1,24979	-0,755257	0,062859	-0,885618	-0,624896
x_1^2	0,71992	0,209058	3,4436	0,002317	0,28636	1,15348	0,359960	0,104529	0,143180	0,576741
x_2	0,53976	0,125680	4,2948	0,000294	0,27912	0,80041	0,269882	0,062840	0,139560	0,400204
x_2^2	-0,41455	0,209035	-1,9832	0,059971	-0,84806	0,01896	-0,207274	0,104517	-0,424030	0,009482

Fonte: Elaboração própria.

O nível ótimo resultante das interações das variáveis independentes na variável de resposta, redução de SO_4^{2-} está representado na superfície de resposta (Figura 25), nas zonas vermelho escuras. Percebeu-se que quanto maior a relação $\text{NaHCO}_3/\text{DQO}$ e menor a relação $\text{DQO}/\text{SO}_4^{2-}$, mais eficiente será a redução de SO_4^{2-} presente no meio.

Figura 25 - Superfície de resposta da interação entre as relações $\text{DQO}/\text{SO}_4^{2-}$ e $\text{NaHCO}_3/\text{DQO}$ na redução de sulfato: (a) em uma dimensão, (b) em três dimensões.



Fonte: Elaboração própria no software Statistica.

O ensaio de validação, VSO_4^{2-} , foi realizado utilizando o maior valor da relação $\text{NaHCO}_3/\text{DQO}$ (0,582; valor codificado = +1,41) e o menor para a relação $\text{DQO}/\text{SO}_4^{2-}$ (2,71; valor codificado = -1,41). Todavia, diferentemente do esperado, não houve redução de sulfato em nenhuma das corridas do ensaio (Figura 22). Analisando-se a Figura 23 pode-se perceber que o pH se manteve acima de 6 nas três corridas. Vale destacar que essa é uma faixa de pH que deveria favorecer a sulfetogênese.

Foi levantada a hipótese de inibição da sulfetogênese pela presença de sódio em excesso, já que esse ensaio contou com as maiores concentrações de Na_2SO_4 e NaHCO_3 (concentração de sódio estimada em $5,34 \text{ g L}^{-1}$). Para verificar tal hipótese foram realizadas mais duas corridas, uma na condição E5 e outra na condição VSO_4^{2-} , substituindo-se, todavia, o Na_2SO_4 por sulfato de amônio, i.e., $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Tal estratégia objetivou eliminar a interferência de concentrações elevadas de sódio. As eficiências de remoção de sulfato atingiram valores próximos a 50% nos dois casos, sendo equivalentes ao previamente observado em E5 (Figura 22). O padrão observado indica que houve de fato a inibição do consumo do sulfato pela presença acentuada de sódio no primeiro ensaio de validação (dosagem de Na_2SO_4). Contudo, a equivalência entre

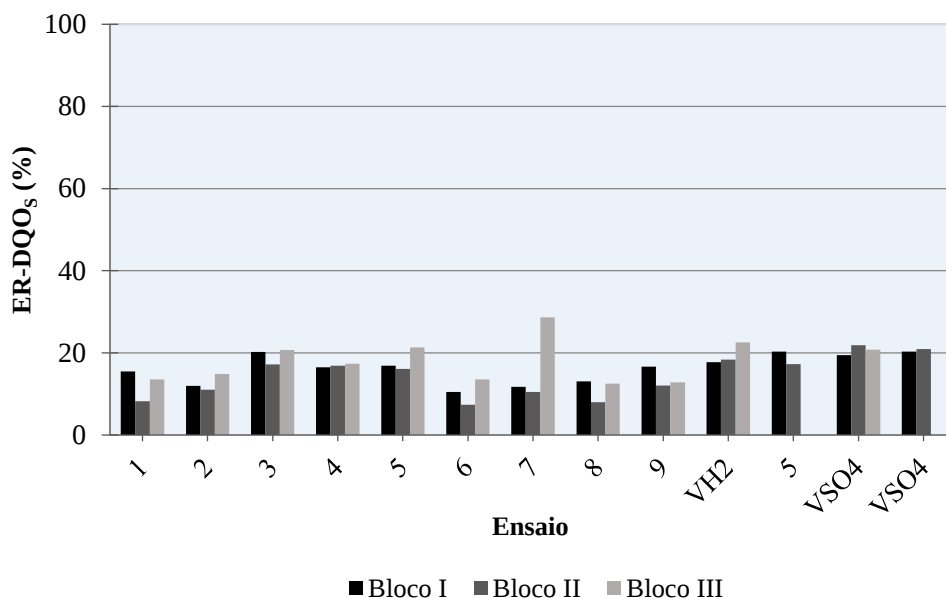
os valores de ER-SO_4^{2-} nos ensaios E5 (independentemente da fonte de sulfato) e VSO_4^{2-} (usando-se $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) indica que a redução completa de sulfato ocorreria apenas em um tempo de incubação superior ao avaliado nos ensaios.

No entanto, a resposta do DCCR não foi prejudicada por eventos de inibição derivados do sódio, de modo que o modelo (Eq. 12) foi validado satisfatoriamente, conforme evidenciado pela comparação do SO_4^{2-} consumido experimental ($3,16 \pm 0,09$ mmol) com o valor previsto pelo modelo (4,66 mmol), ou seja, uma correspondência de 67,8%.

5.2.3 Conversão de Substratos Orgânicos

Durante a operação dos reatores em batelada também foram monitoradas outras variáveis da fase líquida que complementaram as análises. No que se refere à DQOs houve constância de eficiência de remoção, majoritariamente na faixa de 10% a 20% (Figura 26), que é um valor esperado haja visto que, na acidogênese a remoção de DQO não atinge valores elevados, principalmente quando comparados à metanogênese, fase da digestão anaeróbia onde ocorre a maior parte da remoção da DQO.

Figura 26 - Variação dos valores de ER-DQO_s para cada ensaio nas diferentes corridas realizadas.

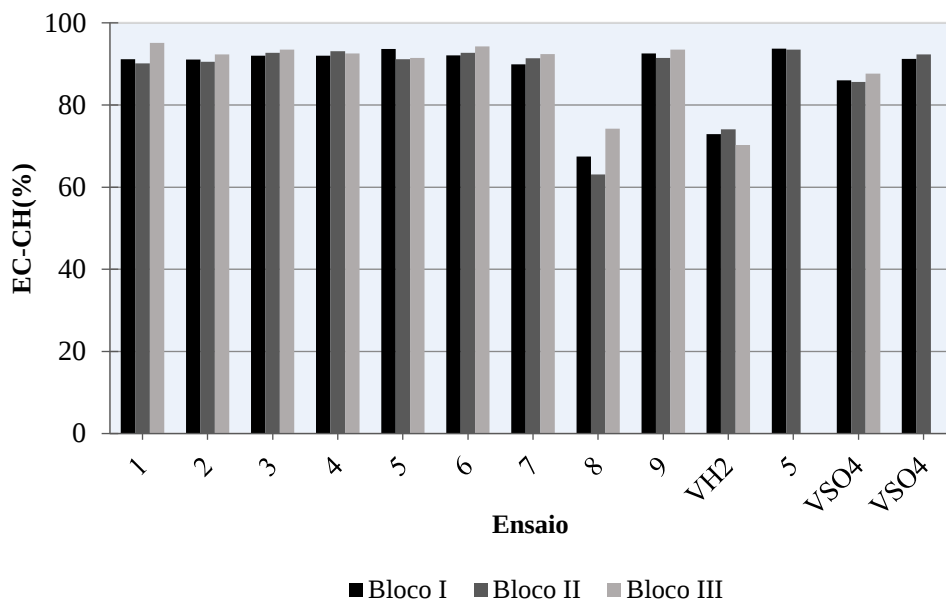


Fonte: Elaboração própria.

Em termos de EC-CH, a mesma apresentou-se superior a 80% em todos os ensaios, com exceção aos ensaios E8 e VH₂ (Figura 27). Há de se salientar que para ambos os ensaios o pH foi inferior a 6 (Figura 23) e não houve remoção de SO₄²⁻ em nenhum deles (Figura 22). Logo, ocorreu maior consumo de carboidratos nos sistemas sulfetogênicos-acidogênicos do que nos exclusivamente acidogênicos, possivelmente pela diversidade da biomassa e a concomitância de diferentes rotas metabólicas nesses sistemas.

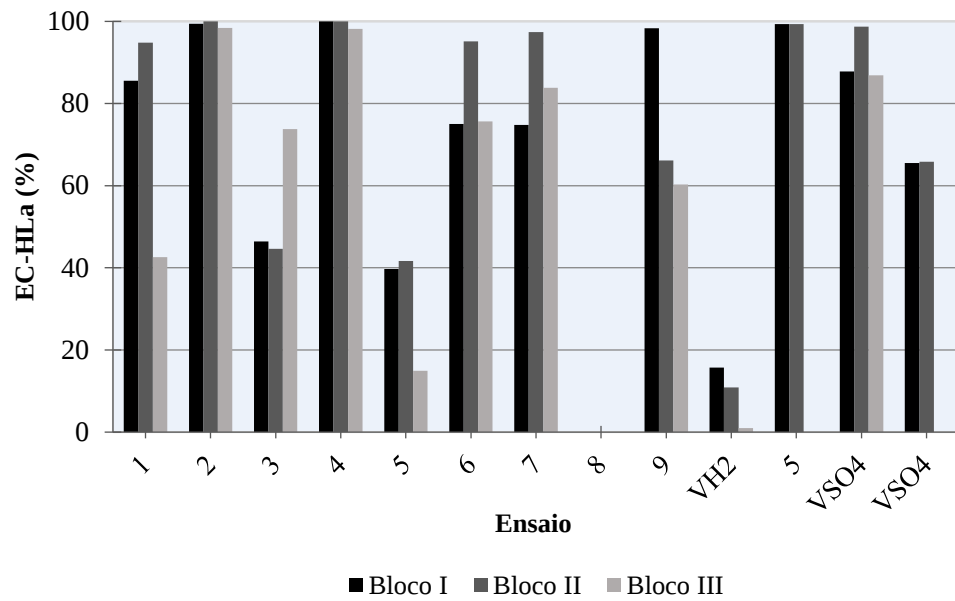
Já a EC-HLa variou consideravelmente entre os ensaios. Em alguns casos atingindo 100% de eficiência, como em E2 e E4 (Figura 28) e em outros sendo nula ou muito baixa, como nos ensaios E8 e VH₂ (Figura 28). O HLa é um substrato preferencial na metabolização da biomassa acidogênica, não era esperado que a eficiência de consumo do mesmo atingisse esses valores, e sim, que a EC-HLa se assemelhasse à EC-Gly, com comportamento constante e atingindo altos níveis de consumo, superiores a 90% para todos os ensaios (Figura 29). Possivelmente, o baixo pH observado nos referidos ensaios limitou o consumo de HLa, conforme previamente reportado para um reator acidogênico contínuo alimentado com vinhaça, i.e., o acúmulo de HLa em pH < 5,0 (Fuess; Zaiat; Oller, 2019).

Figura 27 - Variação dos valores de EC-CH para cada ensaio nas diferentes corridas realizadas.



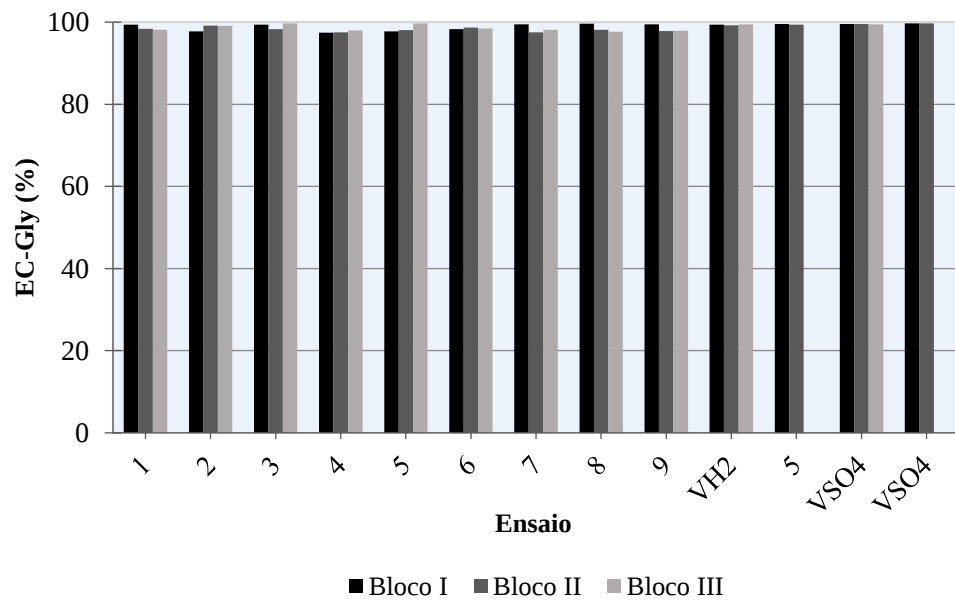
Fonte: Elaboração própria.

Figura 28 - Variação dos valores de EC-HLa para cada ensaio nas diferentes corridas realizadas.



Fonte: Elaboração própria.

Figura 29 - Variação dos valores de EC-Gly para cada ensaio nas diferentes corridas realizadas.



Fonte: Elaboração própria.

6. CONCLUSÃO

A partir dos resultados elencados no dado trabalho foi possível concluir que, houve o estabelecimento de um sistema sulfetogênico-acidogênico no AnSTBR, possibilitando a redução de sulfato durante parte considerável da operação mesmo frente a produção de ácidos orgânicos pela biomassa. A efetividade da sulfetogênese esteve intimamente correlacionada com a composição da vinhaça, em especial, no caso do presente estudo, às elevadas concentrações de sódio observadas. Houve, assim, um efeito tampão no sistema, estimulando o crescimento das BRS num pH superior a 6, por meio de um mecanismo que se assemelha ao “estoque de NaHCO_3 ”.

No que se refere à produção de H_2 , ela se apresentou relativamente baixa comparada a sistemas exclusivamente acidogênicos alimentados com vinhaça da cana-de-açúcar. Ademais, sobre a utilização da espuma de PU como material suporte para a imobilização da biomassa, não houveram resultados expressivos que correlacionassem a utilização a um favorecimento do crescimento das BRS e a um incremento na produção de H_2 .

Visando compreender os impactos da sulfetogênese na acidogênese, de acordo com as superfícies de resposta obtidas a produção de H_2 será mais eficiente quanto menor for a relação $\text{NaHCO}_3/\text{DQO}$ e maior a relação $\text{DQO}/\text{SO}_4^{2-}$ e a redução de SO_4^{2-} é otimizada quanto maior a relação $\text{NaHCO}_3/\text{DQO}$ e menor a relação $\text{DQO}/\text{SO}_4^{2-}$.

Por conseguinte, observou-se que a sulfetogênese impactou negativamente na produção de hidrogênio na maior parte dos ensaios executados, por influência do pH como um limitante, já que o mesmo se manteve estritamente acima de 6, salvaguardado nos ensaios onde não houve a adição do agente tamponante, NaHCO_3 . Portanto, o valor de 0,085 (-1) para a relação $\text{NaHCO}_3/\text{DQO}$ foi o valor mínimo para manter o pH e, consequentemente, a sulfetogênese.

Já para a relação $\text{DQO}/\text{SO}_4^{2-}$ o valor axial negativo de 2,71 (-1,41) foi o mais desvantajoso para a redução de sulfato, sendo que para esse valor a ER-SO_4^{2-} foi cerca de 50%, pois, possivelmente a concentração de sulfato estava em excesso. Logo, a relação $\text{DQO}/\text{SO}_4^{2-}$ não apresentou um valor limítrofe para o estabelecimento da sulfetogênese dentro da faixa de valores testados (0 a 0,582), estando a mesma garantida quando a relação $\text{NaHCO}_3/\text{DQO}$ não for nula.

7. 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*. 2014, 5, 406-414.
- ALVES M.E.; LAVORENTI A. Sulfate adsorption and its relationships with properties of representative soils of the São Paulo State, Brazil. *Geoderma*. 2004, 118, 89-99.
- ANZOLA-ROJAS, M.P.; FONSECA, S.G.; SILVA, C.C.; OLIVEIRA, V.M.; ZAIAT M. The use of the carbon/nitrogen ratio and specific organic loading rate as tools for improving biohydrogen production in fixed-bed reactors. *Biotechnol Rep*. 2015, 5, 46-54.
- ANZOLA-ROJAS, M.P.; ZAIAT, M.; DE WEVER, H. Improvement of hydrogen production via ethanol-type fermentation in an anaerobic down-flow structured bed reactor. *Bioresour. Technol*. 2016, 202, 42-49.
- APHA; AWWA; WEF. Standard methods for the examination of water and wastewater. 22nd. edition. APHA, Washington, D.C., 2012.
- BARTELS, J.R.; PATE, M.B.; OLSON, N.K. An economic survey of hydrogen production from conventional and alternative energy sources. *International Journal of Hydrogen Energy*. 2010, 35, 8371-8384.
- BERTELLI, L.G. A verdadeira história do Proálcool. O Estado de S. Paulo, São Paulo, p. B2, 16 nov., 2005. Disponível em: <www2.senado.leg.br/bdsf/item/id/313629>. Consultado em: 15 junho 2021.
- BNDES; CGEE. Bioetanol de cana-de-açúcar: energia para o desenvolvimento sustentável. 1º ed. BNDES, Rio de Janeiro, 2008.
- CARMO, J.B.; FILOSO, S.; ZOTELLI, L.C.; SOUSA NETO, E.R.; PITOMBO, L.M.; DUARTE NETO, P.J. Infield greenhouse gas emissions from sugarcane soils in Brazil: effects from synthetic and organic fertilizer application and crop trash accumulation. *GCB Bioenergy*. 2013, 5, 267-280.
- CAVALCANTE, W.A.; LEITÃO, R.C.; GEHRING, T.A.; ANGENENT, L.T.; SANTAELLA, S.T. Anaerobic fermentation for n-caproic acid production: a review. *Process Biochem*. 2017, 54, 106–119.

- CETESB. Norma Técnica P4.231: Vinhaça - Critérios e procedimentos para aplicação no solo agrícola. 3ª edição, fev., 2015, 15 páginas, 2º versão.
- CHEN, C.C.; LIN, C.Y. Using sucrose as a substrate in an anaerobic hydrogen-producing reactor. *Advances in Environmental Research*. 2003, 7, 695-699.
- CONAB. Acompanhamento da safra brasileira de cana-de-açúcar. v.8 nº2 safra 2021/22 – Segundo levantamento | agosto, 2021. Disponível em: < <https://www.conab.gov.br/info-agro/safras/cana/boletim-da-safra-de-cana-de-acucar> >. Acesso em: 01 outubro 2021.
- CRUZ, M.G.; GUERREIRO, E.; RAIHER, A.P. A evolução da produção de etanol no Brasil, no período de 1975 a 2009. Documentos técnicos científicos. 2012, v.43, nº 04, 143.
- CRUZ, R.; RIGHETTO, A.; NOGUEIRA, M. Experimental investigation of soil and groundwater impacts caused by vinasse disposal. *Water Science Technology*. 1991,24, 77-85.
- 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). *Bioresour. Technol. Rep.* 2020, 11, 100458.
- DAMIANOVIC, M.H.R.Z.; FORESTI, E. Dynamics of sulfidogenesis associated to methanogenesis in horizontal-flow anaerobic immobilized biomass reactor. *Process Biochemistry*. 2009, 44, 1050-1054.
- DIAS, M.O.S.; JUNQUEIRA, T.L.; CAVALETT, O.; PAVANELLO, L.G.; CUNHA, M.P.; JESUS, C.D.F.; MACIEL FILHO, R.; BONOMI, A. Biorefineries for the production of first and second generation ethanol and electricity from sugarcane. *Appl. Energy*. 2013, 109, 72-78.
- DUBOIS, S.M.; GILLES, K.A.; HAMILTON, J.K.; REBERS, P.A.; SMITH, F. Colorimetric methods for determination of sugar and related substance. *Analytical chemistry*. 1956, 228, 13-21.
- EPE. Balanço energético nacional – Relatório síntese 2021, ano base 2020, Rio de Janeiro. Empresa de Pesquisa Energética, 2021. Disponível em <https://www.epe.gov.br/pt/publicacoes-dados-abertos/publicacoes/balanco-energetico-nacional-ben>>. Acesso em: 01 outubro 2021.
- ESPAÑA-GAMBOA, E.E.; CORTES, J.M.; PEREZ, L.B.; MALDONADO, J.M.; ZARATE, G.H.; GAVIRIA, L.A. Vinasses: characterization and treatments. *Waste Management & Research*. 2011, 29, 1235-1250.

- FERRAZ JR., 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. São Carlos. Tese (Doutorado) - Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, 2013.
- FERRAZ JR., A.D.N.; WENZEL, J.; ETCHEBEHERE, C.; ZAIAT, M. Effect of organic loading rate on hydrogen production from sugarcane vinasse in thermophilic acidogenic packed bed reactors. *International Journal of Hydrogen Energy*. 2014, 39, 16852-16862.
- FERRAZ., A.D.N.; ETCHEBEHERE, C.; ZAIAT, M. High organic loading rate on thermophilic hydrogen production and metagenomic study at an anaerobic packed-bed reactor treating a residual liquid stream of a Brazilian biorefinery. *Bioresource Technology*. 2015a, 186, 81-88.
- FERRAZ JR., A.D.N.; ETCHEBEHERE, C.; ZAIAT, M. Mesophilic hydrogen production in acidogenic packed-bed reactors (APBR) using raw sugarcane vinasse as substrate: influence of support materials. *Anaerobe*. 2015b, 34, 94-105.
- FERRAZ JR., A.D.N.; KOYAMA, M.H.; ARAÚJO JR, M.M.; ZAIAT, M. Thermophilic anaerobic digestion of raw sugarcane vinasse. *Renewable Energy*. 2016, 89, 245-252.
- FUESS, L.T.; GARCIA, M.L. Implications land disposal: a critical review on the impacts of fertigation. *Journal of Environmental Management*. 2014, 145, 210-229.
- FUESS, L.T.; KIYUNA, L.S.M.; GARCIA, M.L.; ZAIAT, M. Operational strategies for longterm biohydrogen production from sugarcane stillage in a continuous acidogenic packedbed reactor. *International Journal of Hydrogen Energy*. 2016, 41, 8132–8145.
- FUESS, L.T. Biodigestão anaeróbia de vinhaça em sistemas combinados tipo acidogênico-metanogênico para potencialização da recuperação de bioenergia em biorrefinarias de cana-de-açúcar de primeira geração. São Carlos. Tese (Doutorado) - Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, 2017.
- FUESS, L.T.; RODRIGUES, I.J.; GARCIA, M.L. Fertirrigation with sugarcane vinasse: foreseeing potential impacts on soil and water resources through vinasse characterization. *Journal of Environmental Science and Health part A*, 2017, 52:11, 1063-1072.
- FUESS, L.T.; KIYUNA, L.S.M; FERRAZ JR.; A.D.N, PERSINOTI, G.F.; SQUINA, F.M.; GARCIA, M.L.; ZAIAT, M. Thermophilic two-phase anaerobic digestion using an innovative fixed-bed reactor for enhanced organic matter removal and bioenergy recovery from sugarcane vinasse. *Applied Energy*. 2017, 189, 480-491.

- FUESS, L.T.; GARCIA, M.L.; ZAIAT, M. Seasonal characterization of sugarcane vinasse: assessing environmental impacts from fertirrigation and the bioenergy recovery potential through biodigestion, *Sci. Total Environ.* 2018, 634, 29-40.
- FUESS, L.T.; ZAIAT, M.; NASCIMENTO, C.A.O. Novel insights on the versatility of biohydrogen production from sugarcane vinasse via thermophilic dark fermentation: Impacts of pH-driven operating strategies on acidogenesis metabolite profiles. *Bioresource Technology.* 2019, 286, 121-379.
- FUESS, L.T.; ZAIAT, M.; NASCIMENTO, C.A.O. Molasses vs. Juice: maximizing biohydrogen production in sugarcane biorefineries to diversify renewable energy generation. *Journal of Water Process Eng.* 2020, 37, 101534.
- FREIRE, W.J.; CORTEZ, L.A.B. Cana-de-açúcar. Editora Agropecuária. Campinas. 2000, 13.
- GREENHILL, S. Method for determination of free and combined glycerin in biodiesel. U.S. Patent Application WO2004059315A1, 2003.
- HAFEZ, H.; NAKHLA, G.; EL NAGGAR, M.H.; ELBESHBISHY, E.; BAGHCHEHSARAEI, B. Effect of organic loading on a novel hydrogen bioreactor. *Int J Hydrogen Energy.* 2010, 35(1), 81–92.
- HAO, O.J.; CHEN, J.M.; HUANG, L.; BUGLASS, R.L. Sulfate-reducing bacteria. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology.* 1996, 26, 155-187.
- HARPER, S.R.; POHLAND, F.G. Recent developments in hydrogen management during anaerobic biological wastewater treatment. *Biotechnology and Bioengineering.* 1985, 28, 585-602.
- HWANG J.H.; CHOI, J.A.; ABOU-SHANAB, R.A.I.; BHATNAGAR, A.; MIN, B.; SONG, H.; KUMAR, E.; CHOI, J.; LEE, E.S.; KIM, Y.J. Effect of pH and sulfate concentration on hydrogen production using anaerobic mixed microflora. *Int. J. Hydrog. Energy.* 2009, 34(24), 9702–9710.
- 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.* 2017, 232, 103-112.
- KOSCHORRECK, M. Microbial sulphate reduction at a low pH. Federation of European Microbiological Societies. *Microbiol Ecol.* 2008, 64, 329-342.

- LAZARO, C.Z.; PERNA, V.; ETCHEBEHERE, C.; VARESCHE, M.B.A. Sugarcane vinasse as substrate for fermentative hydrogen production: The effects of temperature and substrate concentration. *International Journal of Hydrogen Energy*. 2014, 39, 6407-6418.
- 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*. 1998, 28(1), 41-88.
- LP AE/FMUSP. Combustíveis para Frota Leve - Cenários de Mudança no Perfil de Consumo Etanol/Gasolina e Impacto Epidemiológico Estimado na Saúde. Universidade de São Paulo. Proj_1406 UNICA Cenários Etanol e Gasolina, 2014.
- LYRA, M.R.; ROLIM, M.M.; SILVA, J.A. Toposequence of soils fertigated with stillage: contribution towards the quality of ground water table. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental*. 2003, 7, 525-532.
- MADEJÓN, E.; LÓPEZ, R.; MURILLO, J.M.; CABRERA, F. Agricultural use of three (sugarbeet) vinasse composts: effect on crops and chemical properties of a Cambisol soil in the Guadalquivir River valley (SW Spain). *Agriculture, Ecosystems & Environment*. 2001, 84, 55-65.
- MADRID, L.; BARRIENTOS, E.D. Release of metals from homogeneous soil columns by wastewater from an agricultural industry. *Environmental Pollution*. 1998, 101, 43-48.
- MATSUMOTO, M.; NISHIMURA, Y. Hydrogen production by fermentation using acetic acid and lactic acid. *J. Biosci. Bioeng.* 2007, 103, 236-241.
- MENDONÇA, M.A.A.; FREITAS, R.E.; SANTOS, A.O.P.; PEREIRA, A.S.; COSTA, R.C. Expansão da produção de álcool combustível no Brasil: uma análise baseada nas curvas de aprendizagem. *XLVI Congresso da Sociedade Brasileira de Economia, Administração e Sociologia Rural*. BNDES. Rio de Janeiro - RJ – Brasil, 2008.
- MORAES, B.S.; ZAIAT, M.; BONOMI, A. Anaerobic digestion of vinasse from sugarcane ethanol production in Brazil: Challenges and perspectives. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 2015, 44, 888-903.
- NANDY, T.; SHASTRY, S.; KAUL, S.N. Wastewater management in a cane molasses distillery involving bioresource recovery. *Journal of Environmental Management*. 2002, 65, 25-38.

- 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*. 2013, 200-201, 77-84.
- 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*. 2013, 38, 54-62.
- REIS, M.A.M.; GONÇALVES, L.M.D.; CARRONDO, M.J.T. Sulphate removal in acidogenic phase anaerobic digestion. *Environmental Technology Letters*. 1998, 9, 775-784.
- REIS, M.A.M.; LEMOS, P.C.; MARTINS, M.J.; COSTA, P.C.; GONÇALVES, L.M.D.; CARRONDO, M.J.T. Influence of sulfates and operational parameters on volatile fatty acids concentration profile in acidogenic phase. *Bioprocess Engeneering*. 1991, 6, 145-151.
- RIBEIRO, C.S. O aprofundamento das relações do Brasil com os países do Oriente Médio durante os dois choques do petróleo da década de 1970: um exemplo de ação pragmática. *Revista Brasileira de Política Internacional*, 49 (julho-dezembro), 2006. Disponível em: <<http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=35849209>>. Consultado em: 15 junho 2021.
- RIBEIRO, B.T.; LIMA, J.M.; GUILHERME, L.R.G.; JULIÃO, L.G.F. Lead sorption and leaching from an Inceptisol sample amended with sugarcane vinasse. *Scientia Agricola*. 2010, 67, 441-447.
- RODRIGUES, M.I.; IEMMA, A.F. Planejamento de experimentos e otimização de processos. Casa do Pão Editora, 3ª ed., 2014.
- SANTOS, S.C.; ROSA, P.F.R.; SAKAMOTO, I.K.; VARESCHE, M.B.A.; SILVA, E.L. Hydrogen production from diluted and raw sugarcane vinasse under thermophilic anaerobic conditions. *International Journal of Hydrogen Energy*. 2014, 39, 9599-9610.
- SANTOS, F.M.; SANTOS, F.A. O combustível “hidrogênio”. *Revista Millenium* nº 31, 2015.
- SILVA, M.A.; GRIEBELER, N.P.; BORGES L.C. Use of stillage and its impact on soil properties and groundwater. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental*. 2007, 11, 108-114.
- TAYLOR, K.A.C.C. A simple colorimetric assay for muramic acid and lactic acid. *Appl. Biochem. Biotechnol*. 1996, 56(1), 49-58.

- UNICA. Fotografia do Setor Sucroenergético no Brasil e os Benefícios Econômicos e Ambientais Gerados. União da Indústria da cana-de-açúcar, 2018. São Paulo/Brasília. Disponível em:<www.unica.com.br/download.php?idSecao=17&id=35831777>. Acesso em: 01 outubro 2021.
- UNICA. A Bioeletricidade da Cana em Números - Setembro. União da Indústria da cana-de-açúcar. São Paulo/Brasília, 2020. Disponível em:< <https://unica.com.br/wp-content/uploads/2020/10/BoletimUNICABioeletricidadeSETEMBRO2020.pdf> >. Acesso em: 10 outubro 2021.
- VILELA, R.S.; DAMIANOVIC, M.H.R.Z.; FORESTI, E. Removing organic matter from sulfate-rich wastewater via sulfidogenic and methanogenic pathways. *Water Science & Technology*. 2014, 69, 1669-1675.
- WIDDEL, F. Microbiology and ecology of sulfate-and sulfur-reducing bacteria. *Biology of Anaerobic Microorganisms*. 1988, Zehnder A, 469-585.
- WILKIE, A.C.; RIEDESEL, K.J.; OWENS, J.M. Stillage characterization and anaerobic treatment of ethanol stillage from conventional and cellulosic feedstocks. *Biomass and Bioenergy*. 2000, 19, 63-102.
- ZHOU, J.; XING, J. Effect of electron donors on the performance of haloalkaliphilic sulfate-reducing bioreactors for flue gas treatment and microbial degradation patterns related to sulfate reduction of different electron donors. *Biochem Eng. J.* 2015, 96, 14-22.