UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO

ESCOLA DE QUÍMICA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM TECNOLOGIA DE PROCESSOS QUÍMICOS E BIOQUÍMICOS

MESTRADO PROFISSIONAL EM ENGENHARIA DE BIOCOMBUSTÍVEIS E PETROQUÍMICA

ROBSON RODRIGUES DE MENDONÇA

AVALIAÇÃO DE MÉTODO DE IMOBILIZAÇÃO DE LODO ANAERÓBIO

Rio de Janeiro

2017

ROBSON RODRIGUES DE MENDONÇA

AVALIAÇÃO DE MÉTODO DE IMOBILIZAÇÃO DE LODO ANAERÓBIO

Dissertação submetida ao corpo docente do Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Ciências.

Orientadoras: Profa. Dra. Magali Christe Cammarota
Profa. Dra. Melissa Limoeiro Estrada Gutarra

Rio de Janeiro

2017

Mendonça, Robson Rodrigues de
Avaliação de método de imobilização de lodo anaeróbio /
Robson Rodrigues de Mendonça. –
Rio de Janeiro, 2017.
96f.
Orientadora: Magali Christe Cammarota.
Coorientadora: Melissa Limoeiro Estrada Gutarra

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal
do Rio de Janeiro, Escola de Química, Programa de
Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e
Bioquímicos, 2017.

1. Álcool polivinílico, 2. Alginato de sódio 3. Biogás

. 4. Imobilização.
5. Lodo anaeróbio.. I. Cammarota,
Magali Christe, orient.II Gutarra, Melissa Limoeiro, coorient. III.
Título.

ROBSON RODRIGUES DE MENDONÇA

AVALIAÇÃO DE MÉTODO DE IMOBILIZAÇÃO DE LODO ANAERÓBIO

Dissertação submetida ao corpo docente do Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Ciências.

Aprovada por:

_____
Profa. Dra. Magali Christe Cammarota

_____
Profa. Dra. Melissa Limoeiro Estrada Gutarra

_____
Prof. Dr. Thiago Rocha dos Santos Mathias (IFRJ)

_____
Profa. Dra. Eliana Mossé Alhadeff (EQ/UFRJ)

_____
Profa. Dra. Isabelli do Nascimento Dias (EQ/UFRJ)

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a meus pais, Edmar e Sonia, por tudo que me ensinaram para eu seguir minha trajetória de vida; à minha esposa Luiza e a meu filho Pedro Lucas, pelo companheirismo e amor incondicionais.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me conceder a benção de mais essa vitória.

A minha esposa Luiza. Não consigo expressar em palavras tudo o que você fez para que chegasse nesse momento. Amor, compreensão, paciência e acima de tudo a fé de que esse momento final chegaria, apesar de minhas inseguranças e lamentações. A vitória é nossa!

Ao meu filho Pedro Lucas, o grande orgulho da minha vida, pela compreensão nos momentos de ausência devido ao estudo.

Aos meus pais Edmar e Sonia pelo incentivo, apoio e carinho por toda a minha vida.

Às Professoras Magali e Melissa, pela excelente orientação, dedicação, compreensão e paciência na realização deste trabalho, apesar de minhas limitações.

Ao meu irmão Bruno pela amizade e a toda minha família por estar sempre torcendo por mim.

Aos meus amigos Filipe, Carine, Rodrigo, Gabi, Hélio, Raísa, Jussara, Cintia, Guilherme e Tyla, pelo carinho e apoio em oração.

Aos meus amigos do Laboratório de Microbiologia Industrial: Andres, Manoela, Rosana, Cristina, Joyce, Priscilla, Aldo, Pedro e Jéssica. Obrigado pelos ensinamentos, companheirismo, amizade, pelas risadas e lanches maravilhosos. Vocês realmente fazem a diferença como equipe e farão sempre parte da minha vida.

A todos do Laboratório de Tecnologia Ambiental, pela orientação e ajuda nas etapas de análises do estudo.

Ao SENAI/RJ, em especial ao professor Valdir Moreira, pela oportunidade e disponibilidade de utilizar o Laboratório de Ensaios Mecânicos e Microestruturais na análise de MEV.

Agradeço a todas as pessoas que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho, e que me ajudaram nos momentos que precisei. Que Deus abençoe a todos.

RESUMO

MENDONÇA, Robson Rodrigues de. Avaliação de método de imobilização de lodo anaeróbio. Rio de Janeiro, 2017. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos) - Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2017.

Reatores anaeróbios de alta taxa do tipo UASB (*upflow anaerobic sludge blanket*), empregados no tratamento de efluentes, mantêm altas concentrações de biomassa em seu interior por meio da granulação dos microrganismos. Em algumas situações, não se consegue atingir uma boa granulação, levando a uma acentuada perda de biomassa e a um efluente de má qualidade. A busca por novos métodos de imobilização para retenção de altas concentrações de lodo nestes reatores se faz necessária. Uma forma alternativa de imobilização seria por encapsulamento dos microrganismos em uma matriz polimérica estável, densa, com durabilidade, resistência mecânica, e alta difusividade para uma boa assimilação dos substratos presentes no meio. Neste trabalho, um polímero sintético formado por álcool polivinílico (PVA) e alginato de sódio foi avaliado como método de imobilização de lodo anaeróbio. A mistura de 10% (m/v) de PVA, 2% (m/v) de alginato de sódio e lodo (5 mL de lodo em 15 mL da mistura), gotejada em solução de cloreto de cálcio (7% m/v), resultou em partículas esféricas de gel com diâmetro médio de 3 a 4 mm, que se deterioraram em 7 dias de incubação a 30 ºC no meio sintético empregado para produção de biogás (à base de sacarose e fontes de N e P). A adição de nitrato de sódio (50% m/v) à solução de cloreto de cálcio (4%) na formação do polímero com mistura de 10% PVA, 1% alginato de sódio e lodo aumentou a resistência mecânica do polímero por reticulação química com nitrato de sódio, verificando-se que as esferas se mantiveram íntegras durante 10 dias de incubação, maior produção de biogás e menores valores de demanda química de oxigênio (DQO) final, indicando menor solubilização do polímero. No entanto, o volume final e a taxa inicial de produção de biogás com lodo imobilizado foram muito baixos comparados ao experimento controle (com células livres), ainda indicando uma limitação difusional que reduz consideravelmente a assimilação do substrato pelo lodo imobilizado. O efeito da viscosidade do PVA na formação do polímero foi avaliado com 10% PVA (de alta e baixa viscosidade), 1% alginato de sódio, 4% cloreto de cálcio e 50% nitrato de sódio, sendo verificado que a adição de PVA de alta ou baixa viscosidade não fez diferença em termos de volume final de biogás. Foi feita uma avaliação do efeito das variáveis de imobilização, através de um planejamento experimental fracionado tendo como variáveis independentes as concentrações de PVA, alginato de sódio, cloreto de cálcio e nitrato de sódio, enquanto as variáveis dependentes foram o volume de biogás produzido e a DQO final, que indicou uma maior produção de biogás com alginato e cloreto de cálcio no nível inferior, 1% e 5%, respectivamente, e para nitrato de sódio no nível superior 50%. A matriz polimérica apresentou, em geral, uma resistência mecânica não prolongada, pouca durabilidade em alguns casos e baixa difusividade, dificultando a assimilação de substratos presentes no meio sintético. Os resultados revelaram que o método de imobilização de lodo anaeróbio em matriz de PVA/Alginato de sódio não se mostrou uma alternativa viável, devendo ser melhorado para aumentar a resistência e difusividade das esferas.

Palavras-chave: Álcool polivinílico, Alginato de sódio, Biogás, Imobilização, Lodo anaeróbio.

ABSTRACT

MENDONÇA, Robson Rodrigues de. Evaluation of anaerobic sludge immobilization method. Dissertation (Master of Science in Biofuels Engineering and Petrochemical) – Chemical School, Federal University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2017.

Upflow anaerobic sludge blanket (UASB) reactors, used in the wastewater treatment, maintain high concentrations of biomass in the interior through the granulation of the microorganisms. In some situations, good granulation cannot be achieved, leading to a marked loss of biomass and a poor-quality effluent. The search for new immobilization methods for retention of high concentrations of sludge in these reactors is necessary. An alternative form of immobilization would be by encapsulation of the microorganisms into a stable, dense polymer matrix with durability, mechanical strength, and high diffusivity for a good assimilation of the substrates present in the medium. In this work, a synthetic polymer formed by polyvinyl alcohol (PVA) and sodium alginate was evaluated as an anaerobic sludge immobilization method. The mixture of 10% (w/v) PVA, 2% (w/v) sodium alginate and sludge (5 ml of anaerobic sludge in 15 ml of the mixture), dripped in calcium chloride solution (7% w/v) resulted in spherical gel particles with a mean diameter of 3 to 4 mm, which deteriorated within 7 days of incubation at 30 °C in the synthetic medium used to biogas production (sucrose and N and P sources). The addition of sodium nitrate (50% w/v) to the calcium chloride solution (4%) in the formation of the polymer with a mixture of 10% PVA, 1% sodium alginate and sludge increased the mechanical strength of the polymer by chemical crosslinking with sodium nitrate, verifying that the spheres remained intact for 10 days of incubation, higher biogas production and lower values of final chemical oxygen demand, indicating lower solubilization of the polymer. However, the final volume and the initial rate of biogas production with immobilized sludge were very low compared to the control experiment (with free cells), still indicating a diffusional limitation that considerably reduces the assimilation of the substrate by immobilized sludge. The effect of PVA viscosity on polymer formation was evaluated with 10% PVA (high and low viscosity), 1% sodium alginate, 4% calcium chloride and 50% sodium nitrate, it being verified that the addition of PVA from high or low viscosity did not make a difference in terms of the final volume of biogas. An evaluation of the effect of the immobilization variables was carried out through a fractional experimental design with PVA, sodium alginate, calcium chloride and sodium nitrate as independent variables, while the dependent variables were the volume of biogas produced and the final chemical oxygen demand, which indicated a higher production of biogas with alginate and calcium chloride at the lower level, 1% and 5%, respectively, and for sodium nitrate at the upper level 50%. The polymer matrix showed, in general, a non-prolonged mechanical strength, low durability in some cases and low diffusivity, making it difficult to assimilate substrates present in the synthetic medium. The results showed that the method of immobilization of anaerobic sludge in PVA / sodium alginate matrix is not a viable alternative and should be improved to increase the resistance and diffusivity of the spheres.

Keywords: Polyvinyl alcohol, Sodium alginate, Biogas, Immobilization, Anaerobic sludge.

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1 Balanço de massa de DQO na digestão anaeróbia 20
Figura 2.2 Sequência metabólica e grupos microbianos envolvidos na biodegradação anaeróbia 22
Figura 2.3 Desenho esquemático de um reator UASB 27
Figura 2.4 Métodos básicos de imobilização de células 32
Figura 2.5 Molécula de PVA e representação química 35
Figura 2.6 Esquema de obtenção de PVA 35
Figura 2.7 Molécula de alginato 37
Figura 2.8 Formação de gel de alginato de cálcio por imobilização 38
Figura 2.9 Estrutura caixa de ovo do alginato 39
Figura 2.10 Ligações entre as moléculas de PVA por pontes de Hidrogênio 42
Figura 2.11 Reação de gelificação do PVA e ácido bórico 44
Figura 3.1 Etapas realizadas na pesquisa 47
Figura 3.2 Dispositivo para imobilização de lodo com PVA e alginato de sódio (A), mistura de PVA, alginato de sódio e lodo (B) e gotejamento da mistura de polímeros e lodo anaeróbio (na ponteira) em solução de cloreto de cálcio no bécher (C) 49
Figura 3.3 Aspecto das esferas de PVA, alginato de sódio e lodo anaeróbio 50
Figura 3.4 Ensaio de biodegradabilidade anaeróbia com esferas de lodo imobilizado e lodo suspenso (controle) em frascos penicilina 54
Figura 4.1 Aspecto das esferas formadas em 10% (m/v) de PVA, 2% (m/v) de alginato de sódio e 7% (m/v) de cloreto de cálcio, contendo lodo anaeróbio 59
Figura 4.2 Produção acumulada de biogás com lodo livre (Controle) e imobilizado com diferentes concentrações de PVA e 2% (m/v) de alginato de sódio 60
Figura 4.3 Relação entre DQO final no meio e concentração de PVA empregada na imobilização 61
Figura 4.4 Aspecto das esferas com PVA 10% (m/v), 2% (m/v) de alginato de sódio (m/v) e 7% (m/v) de cloreto de cálcio após 3 dias (A) e 7dias (B) de incubação a 30ºC em meio sintético 62
Figura 4.5 Aumento da DQO solúvel ao longo do tempo, em experimento com esferas de PVA/Alginato/$CaCl_2$, sem lodo, imersas em água destilada a 30ºC 62
Figura 4.6 Produção acumulada de biogás com lodo livre (Controle) e imobilizado com

PVA/Alginato e diferentes concentrações de nitrato de sódio 66

Figura 4.7 Produção acumulada de biogás com lodo livre (Controle) e lodo imobilizado em PVA de alta (Av) e baixa (Bv) viscosidade com alginato de sódio (1% m/v) em solução de cloreto de cálcio combinado ou não com nitrato de sódio.. 71

Figura 4.8 Produção acumulada de biogás com lodo imobilizado em 10% (m/v) PVA Bv, 1% (m/v) de alginato de sódio, 4% (m/v) de cloreto de cálcio e 50% (m/v) de nitrato de sódio com congelamento e descongelamento..... 73

Figura 4.9 Imagens de MEV de baixo vácuo, com aumentos de 1000X e 4000x, de géis contendo PVA, alginato de sódio, cloreto de cálcio e nitrato de sódio. Sem lodo anaeróbio (A), com lodo estocado em água destilada (B) e com lodo, coletados após 5 dias de incubação (C) em meio sintético a 30ºC..... 83

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1 Principais vantagens e desvantagens dos processos biológicos anaeróbios..... 21

Tabela 2.2 Microrganismos imobilizados e suportes utilizados em processos biotecnológicos 31

Tabela 2.3 Métodos de imobilização com PVA e alginato de sódio 41

Tabela 2.4 Comparação entre métodos de reticulação e propriedades do polímero... 45

Tabela 3.1 Matriz do planejamento fatorial fracionado 2^{4-1} com 3 pontos centrais e 2 réplicas 52

Tabela 3.2 Composição da solução sintética com DQO = 35200 mg/L e pH = 7. 53

Tabela 4.1 Resultados dos ensaios de biodegradabilidade anaeróbia com lodo livre (Controle) e lodo imobilizado em alginato de sódio (2% m/v) e diferentes concentrações de PVA..... 60

Tabela 4.2 Resultados dos ensaios de biodegradabilidade anaeróbia com lodo livre (Controle) e lodo imobilizado em alginato de sódio (1% m/v), PVA (10% m/v) e cloreto de cálcio combinados com diferentes concentrações de nitrato de sódio..... 65

Tabela 4.3 Comparação da resistência e a atividade microbiana do gel formado em diferentes estudos 69

Tabela 4.4 Resultados dos ensaios de biodegradabilidade anaeróbia com lodo livre (Controle) e lodo imobilizado em alginato de cálcio (2% m/v), em PVAde alta (Av) e baixa (Bv) viscosidade (10% m/v) e cloreto de cálcio combinado ou não com nitrato de sódio..... 71

Tabela 4.5 Resultados de ensaios de biodegradabilidade anaeróbia com lodo livre (Controle) e lodo imobilizado com PVA/alginato com congelamento e descongelamento (criogel)..... 73

Tabela 4.6 Resultados do planejamento fatorial fracionado 2^{4-1} com 3 pontos centrais e 2 réplicas 75

Tabela 4.7 Análise estatística do efeito das variáveis sobre a produção de biogás com PVA de baixa viscosidade 76

Tabela 4.8 Análise estatística do efeito das variáveis sobre a DQO final com PVA de

baixa viscosidade 77

Tabela 4.9 Análise estatística do efeito das variáveis sobre a produção de biogás com PVA de alta viscosidade 78

Tabela 4.10 Análise estatística do efeito das variáveis sobre a DQO final com PVA de alta viscosidade..... 78

Tabela 4.11 Composição de amostras de biogás (CG) coletadas ao final dos experimentos conduzidos nos planejamentos experimentais com lodo imobilizado em PVA de alta e baixa viscosidade..... 80

Tabela 4.12 Concentração de ácidos voláteis e alcalinidade na solução sintética inicial e no meio da condição 1 do planejamento experimental com PVA_{BV}, após 7 dias de incubação a 30ºC..... 81

Tabela 4.13 Composição de cada elemento no gel de PVA, sem lodo imobilizado, com lodo imobilizado estocado em água destilada e após 5 dias de incubação em meio sintético..... 85

LISTA DE SIGLAS

AV - Alta Viscosidade

BV - Baixa Viscosidade

DQO - Demanda Química de Oxigênio

EDS -Espectroscopia de Energia Dispersiva de Raios-X

MEV - Microscopia Eletrônica de Varredura

PEM - Produção Específica de Metano

PUF - Fibra de Poliuretano

PEI - Polietilenoimina

PVA - Álcool Polivinílico

PVAc - Acetato Polivinílico

RAFA - Reator Anaeróbio de Manta de Iodo e Fluxo Ascendente

SVT - Sólidos Voláteis Totais

TRH - Tempo de Retenção Hidráulica

TRS - Tempo de Retenção de Sólidos

UASB - *Upflow Anaerobic Sludge Blanket*

UV - Ultravioleta

SUMÁRIO

1 **INTRODUÇÃO E OBJETIVOS** 16
1.1 INTRODUÇÃO 16
1.2 OBJETIVOS 18
2 **REVISÃO BIBLIOGRÁFICA** 19
2.1 DIGESTÃO ANAERÓBIA 19
2.1.1 Etapas do Processo Anaeróbio 21
2.1.2 Fatores que Influenciam o Processo Anaeróbio 23
2.1.3 Retenção de Sólidos em Reatores Anaeróbios 25
2.2 PROCESSOS FERMENTATIVOS COM CÉLULAS IMOBILIZADAS 29
2.3 IMOBILIZAÇÃO EM MICROESFERAS DE HIDROGEL 33
2.4 IMOBILIZAÇÃO COM ÁLCOOL POLIVINÍLICO E ALGINATO 34
2.4.1 Estrutura e Propriedades do álcool polivinílico (PVA) 34
2.4.2 Estrutura e Propriedades do Alginato 37
2.4.3 Métodos de Imobilização com PVA e Alginato 40
2.5 MÉTODOS DE RETICULAÇÃO DO ÁLCOOL POLIVINÍLICO 42
2.5.1 PVA Criogel 42
2.5.2 PVA–Ácido Bórico 44
2.5.3 PVA-Nitrato de Sódio 44
3 **MATERIAL E MÉTODOS** 47
3.1 MATERIAIS 48
3.1.1 Origem e características do lodo anaeróbio 48
3.1.2 Reagentes 48
3.2 PROCEDIMENTOS DE IMOBILIZAÇÃO DO LODO ANAERÓBIO 48
3.2.1 Imobilização em PVA, alginato de sódio e cloreto de cálcio 48
3.2.2 Imobilização em PVA, alginato de sódio, cloreto de cálcio e nitrato de sódio 50
3.2.3 Imobilização em PVA, alginato de sódio, cloreto de cálcio e nitrato de sódio com congelamento – descongelamento 51
3.2.4 Avaliação das melhores condições de imobilização 51
3.3 ENSAIOS DE BIODEGRADABILIDADE ANAERÓBIA COM BIOMASSA LIVRE E IMOBILIZADA 53
3.4 MÉTODOS ANALÍTICOS 54
3.4.1 pH 54

3.4.2 Sólidos Voláteis Totais (SVT) 55
3.4.3 Demanda Química de Oxigênio (DQO) 55
3.4.4 Composição do biogás 56
3.4.5 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) / Espectroscopia de Energia Dispersiva de Raios-X (EDS) 56
3.4.6 Alcalinidade Total 56
3.4.7 Ácidos Voláteis 57
4 **RESULTADOS E DISCUSSÃO** 58
4.1 IMOBILIZAÇÃO EM PVA, ALGINATO DE SÓDIO E CLORETO DE CÁLCIO 58
4.1.1 Características das esferas com lodo imobilizado 58
4.1.2 Ensaios de biodegradabilidade anaeróbia com esferas de lodo anaeróbio imobilizado em PVA, alginato de sódio e cloreto de cálcio 59
4.2 IMOBILIZAÇÃO EM PVA, ALGINATO DE SÓDIO, CLORETO DE CÁLCIO E NITRATO DE SÓDIO 65
4.2.1 Características das esferas com lodo imobilizado 65
4.2.2 Ensaios de biodegradabilidade anaeróbia com esferas de lodo anaeróbio imobilizado em PVA, alginato de sódio, cloreto de cálcio e nitrato de sódio 65
4.2.3 Comparação da biodegradabilidade de PVAs de alta e baixa viscosidade 70
4.3 IMOBILIZAÇÃO EM PVA, ALGINATO DE SÓDIO, CLORETO DE CÁLCIO E NITRATO DE SÓDIO COM CONGELAMENTO – DESCONGELAMENTO 72
4.4 AVALIAÇÃO DO EFEITO DE VARIÁVEIS DA IMOBILIZAÇÃO 74
4.4.1 Análise da produção de biogás 76
4.5 OBSERVAÇÃO EM MICROSCÓPIO ELETRÔNICO DE VARREDURA (MEV) 81
4.6 ESPECTROSCOPIA DE ENERGIA DISPERSIVA DE RAIOS-X (EDS) 84
5 **CONCLUSÕES E SUGESTÕES** 86
5.1 CONCLUSÕES 86
5.2 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS 87
REFERÊNCIAS 88

1. INTRODUÇÃO E OBJETIVOS

1.1. INTRODUÇÃO

Existe um crescente interesse em fontes alternativas de energia como resultado do aumento da demanda e do custo dos combustíveis disponíveis. Por outro lado, uma elevada taxa de industrialização tem resultado na geração de grande quantidade de efluentes com alto conteúdo orgânico que, se tratados adequadamente, podem resultar em uma fonte de energia perpétua. Apesar da existência de um impacto ambiental negativo associado à industrialização, tal impacto pode ser minimizado por meio do aproveitamento da energia gerada na digestão anaeróbia dos efluentes industriais (SALEH & MAHMOOD, 2004).

A construção de uma sociedade sustentável exigirá redução da dependência dos combustíveis fósseis e da quantidade de poluição gerada. O tratamento de resíduos e águas residuárias é uma área em que esses dois objetivos podem ser abordados simultaneamente. Ao longo dos anos, tem se observado uma mudança de paradigma, desde a eliminação de resíduos até a sua utilização. Existem várias estratégias de processamento biológico que produzem bioenergia ou bioquímicos a partir de diferentes resíduos e águas residuárias domésticas, industriais e agrícolas, incluindo a produção de metano por digestão anaeróbia, a produção biológica de hidrogênio, células-combustível microbianas e a produção de produtos de alto valor agregado por fermentação. No entanto, existem barreiras científicas e técnicas para a implementação dessas estratégias (ANGENENT et al., 2004).

O potencial energético dos resíduos e efluentes domésticos, agrícolas e industriais pode ser considerado um caminho viável de produção de energia sustentável. A partir da utilização de reatores anaeróbios como agentes transformadores de matéria orgânica obtém-se biogás, cujo conteúdo de metano pode ser aproveitado como insumo energético, ao mesmo tempo em que se reduz a carga orgânica dos resíduos (MARIOT et al., 2013).

A digestão anaeróbia é um processo de tratamento de efluentes e resíduos sólidos com alto conteúdo orgânico, que ocorre na ausência de oxigênio, e produz uma fonte de energia renovável – o biogás - composto de CH_4, CO_2, H_2,

N_2, H_2S e vapores de água. O biogás pode ser um substituto aos combustíveis tradicionalmente utilizados, como madeira, carvão, querosene, gasolina e resíduos vegetais, mudando o atual suprimento de energia, que é altamente dependente das fontes mencionadas (SUGUMAR et al., 2016).

Dentre os reatores anaeróbios de alta taxa empregados no tratamento de efluentes, destaca-se o reator anaeróbio de manta de lodo e fluxo ascendente ou *upflow anaerobic sludge blanket* – UASB, no qual consegue-se manter altas concentrações de biomassa em seu interior por meio do processo de granulação dos microrganismos. Tal processo é resultado de condições operacionais, em especial a velocidade ascensional do líquido, e da composição do efluente alimentado (CHERNICHARO, 2007). Em muitas situações de tratamento, no entanto, não se consegue atingir uma boa granulação do lodo, que se torna floculento e é arrastado para fora do reator. A não granulação do lodo leva a uma acentuada perda de biomassa e a um efluente de má qualidade. Assim, a busca por novos meios de imobilização do lodo para sua retenção em altas concentrações nos reatores de alta taxa, independente do fluxo ascensional, se faz necessária.

Uma forma de imobilização do lodo nesses reatores seria através de encapsulamento dos microrganismos em uma matriz polimérica estável densa, com durabilidade, resistência mecânica, e alta difusividade para uma boa assimilação dos substratos presentes no meio. Estudos vêm sendo realizados para a utilização de matrizes poliméricas na imobilização de diversos materiais. Muitos polímeros são utilizados para esse fim, em especial o álcool polivinílico (PVA) e o alginato de sódio, por apresentarem propriedades de biodegradabilidade e baixa toxicidade. Em conjunto com agentes reticulantes, estes polímeros podem formar estruturas com boas propriedades mecânicas e térmicas (NARDI, 2014).

Os hidrogéis são materiais que possuem propriedades muito atraentes para serem usados em várias aplicações, e vêm sendo usados na medicina para liberação de drogas, na agricultura para encapsulamento de sementes e retenção de água em solos, e na biotecnologia para aprisionamento e imobilização de enzimas, microrganismos ou células animais. Uma aplicação interessante e promissora é o uso de lodo ativado imobilizado em hidrogéis

para remoção de componentes biodegradáveis de águas residuárias industriais ou domésticas (DORIA-SERRANO et al., 2001). No entanto, não existem relatos na literatura de aplicação destes hidrogéis com lodo anaeróbio imobilizado com a finalidade de obtenção de altos tempos de retenção celular nos reatores anaeróbios de alta taxa. Assim, neste trabalho foi estudada a obtenção de esferas à base de PVA e alginato de sódio, para imobilização de lodo anaeróbio. Além das propriedades mecânicas desejadas, as esferas também foram avaliadas quanto ao potencial de produção de biogás.

1.2. OBJETIVOS

OBJETIVO GERAL

Avaliar a imobilização de lodo anaeróbio em matriz de álcool polivinílico e alginato de sódio para tratamento de efluentes com produção de biogás.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Obter esferas com lodo anaeróbio imobilizado por gotejamento, em cloreto de cálcio, de mistura de alginato de sódio com lodo anaeróbio e diferentes concentrações de PVA;
- Avaliar a adição de nitrato de sódio e do congelamento/descongelamento como métodos de reticulação do PVA no polímero formado com PVA, alginato de sódio e cloreto de cálcio;
- Avaliar o efeito de diferentes viscosidades do PVA no polímero formado com PVA, alginato de sódio, cloreto de cálcio e nitrato de sódio;
- Obter as melhores proporções de PVA, alginato de sódio, cloreto de cálcio e nitrato de sódio na formação das esferas de lodo imobilizado por meio de planejamento experimental;
- Avaliar a produção de biogás em solução sintética à base de sacarose, com lodo livre e imobilizado nos polímeros formados.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Neste capítulo serão apresentados primeiramente os fundamentos, etapas e fatores de influência do processo de digestão anaeróbia. Em seguida, será feita uma abordagem sobre a importância da retenção de sólidos nos reatores anaeróbios, e a apresentação do emprego de lodo imobilizado desenvolvido nesta dissertação como alternativa para a retenção do lodo. Também será apresentada a imobilização celular, sendo colocados os diferentes métodos, exemplos de processos biotecnológicos empregando biomassa imobilizada e uma explicação mais detalhada dos procedimentos de imobilização utilizados nesta dissertação.

2.1. DIGESTÃO ANAERÓBIA

A digestão anaeróbia é um processo em que, na ausência de oxigênio, diversos grupos de microrganismos transformam matéria orgânica complexa em gases e novas células (VAN HAANDEL & LETTINGA, 1994; CHERNICHARO, 2007). A mistura de gases produzidos é conhecida como biogás e sua composição depende do tipo de matéria-prima submetida ao processo de digestão e do método de condução. Normalmente, sua composição se situa dentro das seguintes faixas: metano - CH_4 (50-75%), dióxido de carbono - CO_2 (25-45%), sulfeto de hidrogênio - H_2S (0-1%), hidrogênio - H_2 (0-1%), monóxido de carbono - CO (0-2%), nitrogênio - N_2 (0-2%), amônia - NH_3 (0-1%), oxigênio - O_2 (0-2%) e água - H_2O (2-7%). O biogás, dependendo do volume produzido e composição, pode ser usado para geração de calor e/ou energia em vários setores da economia (ALI SHAH et al., 2014).

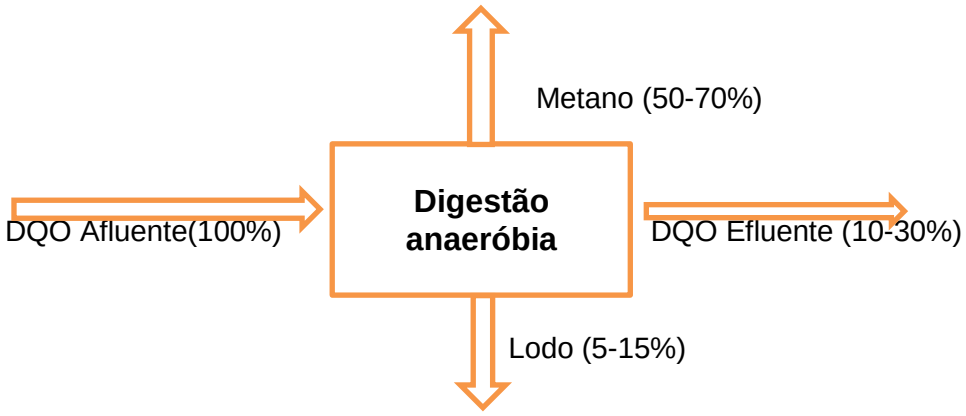
Uma das aplicações da digestão anaeróbia é no tratamento de efluentes orgânicos de origem industrial, doméstica, comercial e agrícola, podendo ser considerada uma tecnologia bem estabelecida e com grande variedade de aplicações, em especial em indústrias agrícolas, alimentícias e de bebidas (CHERNICHARO, 2007).

Este processo também pode ser muito útil para tratar resíduos com alta concentração de matéria orgânica, como lodo de esgoto, resíduos agrícolas orgânicos, resíduos sólidos municipais, resíduos verdes / botânicos e resíduos

orgânicos industriais e comerciais (MONNET, 2003). A digestão anaeróbia, além de ser um método de redução da poluição, pode contribuir para a redução do consumo de combustíveis fósseis em diversas operações (CHEN et al., 2008).

Ao contrário dos processos biológicos aeróbios, a conversão anaeróbia de matéria orgânica em gás metano produz pouca energia para os microrganismos. Assim, sua taxa de crescimento é baixa e apenas uma pequena porção do carbono do resíduo é convertida em novas células, sendo a maior parte degradável convertida em metano. Essa conversão a gás metano representa a estabilização dos resíduos, uma vez que este gás é pouco solúvel em água e é retirado da fase aquosa (McCARTY, 1964). Assim, apenas uma parte do material orgânico é convertida em biomassa microbiana (lodo), como apresentado na Figura 2.1.

Figura 2.1. Balanço de massa de DQO na digestão anaeróbia (adaptado de CHERNICHARO, 2007).



Processos biológicos aeróbios também utilizam quantidades consideráveis de energia não renovável para aeração e geram grande quantidade de lodo residual. Comparada aos processos aeróbios, a digestão anaeróbia é um tratamento mais ambientalmente sustentável (KISPERGHER, 2013). Na Tabela 2.1 são apresentadas vantagens e desvantagens dos processos biológicos anaeróbios.

Tabela 2.1. Principais vantagens e desvantagens dos processos biológicos anaeróbios.

Vantagens	Desvantagens
• Baixa produção de lodo biológico	• Efluente nem sempre atende a legislação.
• Dispensa energia para aeração	• A partida dos reatores pode ser lenta devido a lodo não adaptado
• Há produção de metano	• Falta de tradição em sua aplicação
• Há pouca necessidade de nutrientes	• Remocão de nitrogênio, fósforo e patógenos insatisfatória
• Tolerância a elevadas cargas orgânicas	• Bioquímica e microbiologia da digestão anaeróbia precisam ser melhor estudadas
• A biomassa pode ser preservada por vários meses sem alimentação	• Instabilidade dos reatores devido a choques de carga orgânica e hidráulica, presença de compostos tóxicos ou ausência de nutrientes

Fonte: CHAN et al., 2009; CHERNICHARO, 2007.

2.1.1. Etapas do Processo Anaeróbio

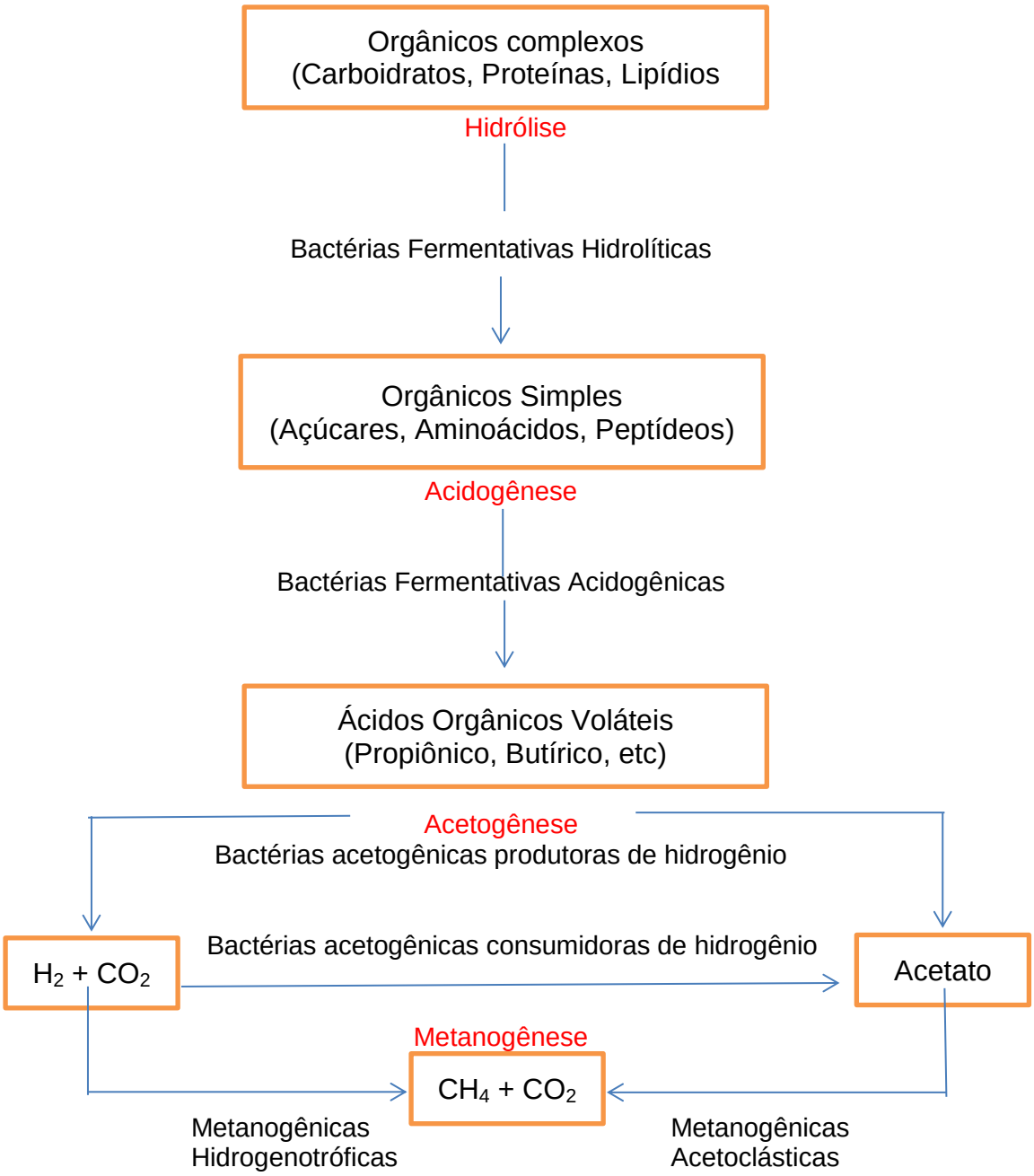
Uma variedade de microrganismos coexiste nos reatores anaeróbios e sua combinação apropriada é necessária para a conversão dos compostos orgânicos em metano (HORI et al., 2006). Assim, a bioconversão anaeróbia de material orgânico complexo é desenvolvida em uma sequência de transformações realizadas por uma população microbiana diversa, na qual pode-se distinguir quatro fases: hidrólise, acidogênese, acetogênese e metanogênese (ANGENENT et al., 2004), conforme apresentado na Figura 2.2.

Como os microrganismos não são capazes de assimilar matéria orgânica não dissolvida, existe a necessidade de uma primeira fase de hidrólise, na qual materiais orgânicos mais complexos (polímeros) são convertidos em moléculas de menor massa molecular, dissolvidas, que podem permear a membrana celular. O processo de hidrólise requer a mediação de enzimas secretadas por bactérias fermentativas hidrolíticas. Nesta fase, proteínas são degradadas a aminoácidos, carboidratos em açúcares simples (mono e dissacarídeos) e os lipídeos em ácidos graxos de cadeia longa e glicerol (CHERNICHARO, 2007).

Na fase acidogênica, os compostos solúveis gerados na etapa de hidrólise, já no interior da célula, são convertidos (por bactérias formadoras de ácidos) em ácidos voláteis (principalmente acético, propiônico e butírico), álcoois (etanol), dióxido de carbono e hidrogênio, além de novas células bacterianas. É uma

fase de cinética rápida, em que a assimilação da matéria orgânica e conversão a biomassa microbiana é maior (CHERNICHARO, 2007).

Figura 2.2. Sequência metabólica e grupos microbianos envolvidos na biodegradação anaeróbia (adaptado de CHERNICHARO, 2007).



De acordo com Chernicharo (2007), bactérias sintróficas acetogênicas são responsáveis pela oxidação dos produtos gerados na fase acidogênica em substrato apropriado para as arqueias metanogênicas - hidrogênio, dióxido de carbono e acetato. A metanogênese, etapa final do processo de degradação anaeróbia de compostos orgânicos em metano e dióxido de carbono, é efetuada pelas arqueias metanogênicas. A produção de metano segue duas rotas distintas: arqueias metanogênicas acetoclásticas convertem acetato em metano, sendo responsáveis por 70% da produção de metano; enquanto arqueias metanogênicas hidrogenotróficas produzem metano a partir da redução de dióxido de carbono e hidrogênio ou formiato, sendo responsáveis pelos 30% restantes da produção de metano (NGES et al., 2012).

As arqueias metanogênicas e a maioria das bactérias envolvidas na hidrólise, acidogênese e acetogênese são anaeróbias estritas, mas também estão presentes espécies facultativas, importantes na remoção do oxigênio dissolvido presente no material em fermentação anaeróbia e que pode afetar negativamente o processo (SPEECE, 1983).

2.1.2. Fatores que Influenciam o Processo Anaeróbio

As características fisiológicas dos microrganismos, como, por exemplo, a baixa taxa de crescimento e alta susceptibilidade a condições externas, como pH, temperatura ou produtos tóxicos e/ou inibidores, tornam todo o processo sensível a mudanças ambientais (HORI et al., 2006). Em seguida, são descritos alguns desses fatores.

Temperatura

A digestão anaeróbia é fortemente influenciada pela temperatura e pode ser agrupada em uma das seguintes categorias: psicrófila (<20 °C), mesófila (20-42 °C) e termófila (42-75 °C). Os processos bacterianos estão bem estabelecidos em todas as três faixas de temperatura, embora grande parte dos trabalhos relatados na literatura tratem da operação mesofílica. Mudanças de temperatura são bem suportadas por bactérias anaeróbias, desde que não excedam o limite superior, definido pela temperatura em que a taxa de decaimento celular excede a taxa de crescimento. Na faixa mesofílica, a

atividade bacteriana diminui cerca de 50% para cada 10 °C de redução de temperatura. Assim, para uma determinada eficiência de digestão a ser alcançada, quanto menor a temperatura, maior o tempo de digestão (SALEH & MAHMOOD, 2004).

O efeito da temperatura nas primeiras etapas do processo de digestão anaeróbia (hidrólise e acidogênese) não é muito significativo. A segunda e terceira etapas de decomposição só podem ser realizadas por certos microrganismos especializados (bactérias acetogênicas e arqueias metanogênicas) muito mais sensíveis a mudanças de temperatura (SALEH & MAHMOOD, 2004).

pH

As reações anaeróbias são altamente dependentes do pH. O pH ideal para os microrganismos produtores de metano é de 6,8 a 7,2, enquanto que para bactérias formadoras de ácido, um pH mais ácido é desejável. O pH de um sistema anaeróbio é tipicamente mantido entre os limites adequados para as arqueias metanogênicas, a fim de evitar a predominância de bactérias formadoras de ácido e o acúmulo de ácidos voláteis. É essencial que o conteúdo do reator forneça capacidade tampão suficiente para neutralizar qualquer eventual acúmulo de ácidos voláteis e para evitar o aparecimento de zonas ácidas localizadas no digestor. Em geral, bicarbonato de sódio é utilizado para suplementar a alcalinidade, uma vez que é o único produto químico que desloca suavemente o pH para o valor desejado sem perturbar o equilíbrio físico e químico da população microbiana mais sensível (SALEH & MAHMOOD, 2004).

Nutrientes

Os microrganismos atuantes no processo de digestão anaeróbia requerem macro e micronutrientes como nitrogênio, fósforo, enxofre, potássio, cálcio, magnésio, ferro, níquel, cobalto, zinco, manganês e cobre, para um crescimento ótimo. Embora esses elementos sejam necessários em concentrações extremamente baixas, a falta desses nutrientes tem efeito

adverso sobre o crescimento e o desempenho dos microrganismos na degradação anaeróbia (SALEH & MAHMOOD, 2004).

Tempo de Retenção Hidráulica (TRH) e Tempo de Retenção de Sólidos (TRS)

Estes parâmetros são fundamentais nos processos anaeróbios para uma conversão eficiente da matéria orgânica e devem ser escolhidos de acordo com o tipo ou composição do substrato (SPEECE, 1996).

No caso de poluentes orgânicos complexos gradualmente degradáveis, o TRH é um fator decisivo (SPEECE, 1983). Quando o processo é operado com baixa taxa de alimentação e alto TRH, o rendimento de metano é constante e máximo. Ao contrário, quando a taxa de alimentação é alta ou o TRH é baixo, ocorre uma diminuição do rendimento. Quanto menor o TRH, menor o volume necessário para a digestão e menor o custo de instalação dos reatores.

Já os TRS devem ser suficientemente altos para permitir que populações microbianas ativas permaneçam no reator, especialmente as arqueias metanogênicas para não limitar a metanogênese, que geralmente é a etapa limitante da conversão geral de substratos complexos a metano (SPEECE, 1996).

2.1.3. Retenção de Sólidos em Reatores Anaeróbios

A digestão anaeróbia pode ser realizada em diferentes tipos de reatores, também chamados digestores ou biodigestores. Desde o final da década de 70, vem sendo dada uma atenção considerável ao desenvolvimento de reatores de alta taxa, também conhecidos como reatores de segunda geração, para o tratamento biológico anaeróbio com alta carga orgânica de resíduos. No entanto, a eficiência do tratamento nesses reatores é sensível à composição dos resíduos, especialmente a concentração de vários íons e compostos tóxicos. A temperatura e o pH também são conhecidos por afetar o desempenho do reator, o grau de acidificação do efluente e a formação de metano (SALEH & MAHMOOD, 2004).

Um importante avanço foi feito, com o desenvolvimento dos Reatores Anaeróbios de Manta de Lodo e Fluxo Ascendente (RAFA), mais conhecidos como *Upflow Anaerobic Sludge Blanket* (UASB). O processo UASB vem sendo usado com sucesso para tratar uma variedade de águas residuárias industriais e domésticas. A presença de biomassa granulada e/ou floculada ativa é um dos fatores-chave na manutenção do tempo de retenção de sólidos projetado em um reator e no bom funcionamento do processo. Isso pode ser alcançado se as condições físicas e químicas no reator forem favoráveis à geração, granulação e sustento da biomassa. Na maioria dos reatores UASB, a biomassa é observada em forma granular (GHANGREKAR et al., 1996).

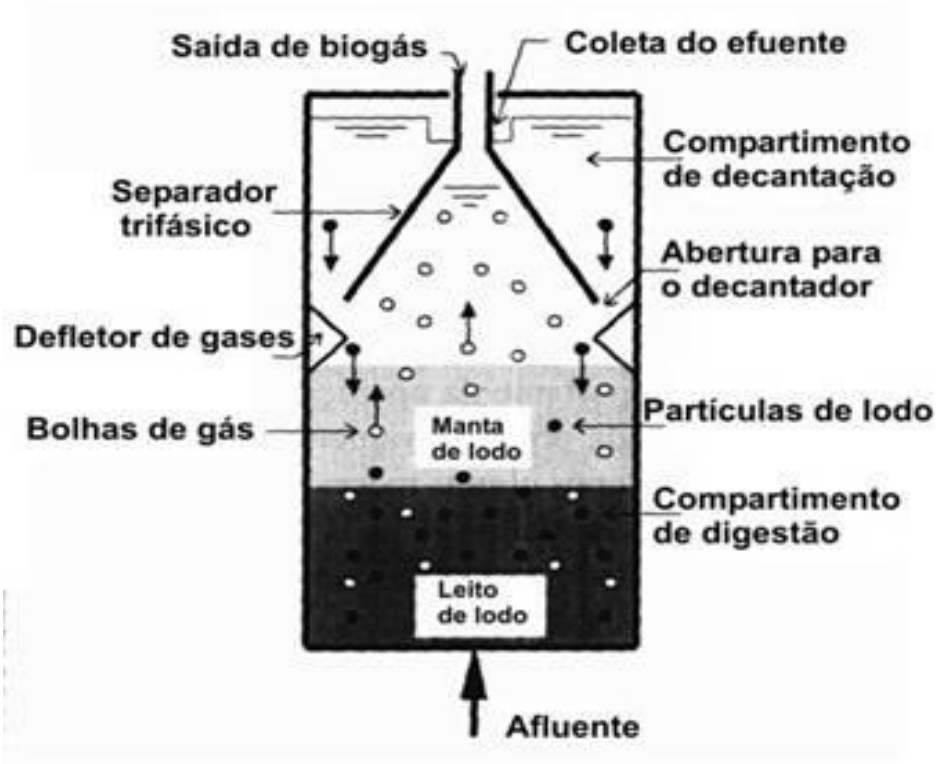
De acordo com Chernicharo (2007), o funcionamento de reatores de manta de lodo acontece com a alimentação do afluente pelo fundo do reator, que em seu movimento ascendente atravessa uma camada de lodo biológico que se encontra em sua parte inferior e passa por um separador de fases enquanto escoa em direção à superfície. Acima do leito do lodo, desenvolve-se uma zona de crescimento bacteriano denominada de manta de lodo. Com o movimento ascendente das bolhas de gás ocorre o carreamento de lodo, sendo necessária a instalação de um separador trifásico (que garante a retenção de grande quantidade de biomassa) na parte superior do reator, de modo a permitir a retenção e o retorno do lodo. Acima do separador trifásico configura-se uma câmara de sedimentação, onde o lodo mais pesado é removido da massa liquida e retorna ao compartimento de digestão, enquanto as partículas mais leves são perdidas do sistema com o efluente final (Figura 2.3).

Como resultado desta operação, nos reatores UASB o tempo médio de retenção de sólidos (TRS), isto é, o tempo médio que uma célula microbiana típica permanece no reator, é muito maior do que o tempo de retenção hidráulica (TRH), o tempo médio que os efluentes permanecem no reator. Portanto, nestes reatores pode-se converter eficientemente compostos orgânicos presentes nos efluentes em metano em pequenos reatores de "alta taxa".

Este reator, em geral, conserva de forma eficiente o consórcio microbiano complexo sem a necessidade de imobilização em um material suporte (como, por exemplo, nos reatores de biofilme). A retenção de lodo no reator é

conseguida por meio de granulação ou autoimobilização dos microrganismos, que formam grânulos com boas características de sedimentação (OLIVA, 1997).

Figura 2.3. Desenho esquemático de um reator UASB (Fonte https://o2engenharia.com.br/index.php/atuacao/projetos).



O sucesso de qualquer processo anaeróbio, especialmente os de alta taxa, depende fundamentalmente da manutenção, dentro dos reatores, de uma biomassa adaptada com elevada atividade microbiológica e resistência a choques de carga (Pontes & Chernicharo, 2009). E que um bom contato entre os constituintes das águas residuárias e o lodo também seja garantido (SAYED, 1987).

Deste modo, pode-se reduzir a concentração de matéria orgânica em menores tempos de retenção hidráulica (TRH), ocupando menos volume e área. Por conta disto, os projetistas têm buscado várias formas de concentração da biomassa dentro dos reatores, tais como sedimentação de lodos floculentos e recirculação (nos reatores de contato anaeróbio), imobilização em materiais sólidos inertes (em filtros anaeróbios) e, mais recentemente, com o uso de

membranas (nos reatores biológicos de membrana) (Pontes & Chernicharo, 2009).

A retenção de biomassa ativa no interior de reatores anaeróbios é fator decisivo para o sucesso do processo de tratamento e depende de vários fatores operacionais e ambientais. A perda da biomassa com o efluente influencia negativamente o desempenho do tratamento. Uma forma de se evitar essa perda é sua imobilização em material suporte. Assim, desvincula-se efetivamente o tempo de retenção celular do tempo de retenção hidráulica, havendo uma maior permanência dos microrganismos no reator (ZAIAT & ABREU, 2008).

Qualquer processo biológico de tratamento é considerado econômico, se puder ser operado a baixos tempos de retenção hidráulica e com tempos de retenção de sólidos suficientemente longos para permitir o crescimento dos microrganismos. A biotecnologia anaeróbia para tratamento de águas residuárias tem se desenvolvido de forma extraordinária com a introdução de reatores contendo biomassa imobilizada. Essa imobilização ocorre através da formação de um biofilme aderido a um material suporte ou pela formação de lodo granular (CHERNICHARO, 2007).

Alguns reatores anaeróbios foram projetados para operarem em bateladas sequenciais, com as seguintes etapas de operação: enchimento, reação, sedimentação e descarga do efluente tratado. Como o tempo de sedimentação é alto em relação ao tempo total e, muitas vezes, a retenção de sólidos no sistema é insatisfatória, surgiu a proposta de uma configuração contendo suporte inerte para imobilização da biomassa com o objetivo de suprimir a etapa de sedimentação e com isso reduzir o tempo de processo (MIQUELETO, 2003).

Outra forma de retenção de lodo muito utilizada é o processo de granulação (nos reatores UASB e seus derivados) que, no entanto, depende de vários fatores, tais como composição do efluente e condições de partida do reator. De modo que muitas vezes a granulação não acontece e um lodo floculento é desenvolvido, prejudicando a operação do reator UASB. Por este motivo a pesquisa de novas formas de retenção dos microrganismos nos reatores anaeróbios, em especial nos reatores UASB, é necessária.

2.2. PROCESSOS FERMENTATIVOS COM CÉLULAS IMOBILIZADAS

A imobilização celular pode ser definida como o confinamento ou localização de células microbianas viáveis em uma região definida do espaço, na qual são mantidas as atividades catalíticas. Esta região exibe características diferentes daquelas do meio ao seu redor em processos de operação contínua ou descontínua, possibilitando a reutilização das células (COVIZZI et al., 2007; CUNHA, 2006).

O desenvolvimento da tecnologia de imobilização teve início em 1950, quando Green e colaboradores produziram corantes microencapsulados por coacervação complexa de gelatina e goma arábica, para a fabricação de papel autocopiativo. As tecnologias desenvolvidas para papel de cópia levaram ao desenvolvimento de vários produtos à base de microcápsulas em anos posteriores (MISHRA, 2015).

As principais vantagens do uso de células imobilizadas em comparação ao uso de células livres nos diferentes processos biotecnológicos consistem na capacidade de operação na presença de uma maior densidade celular, no aumento da estabilidade e do tempo de atividade das células (COVIZZI et al., 2007).

Além disso, Kourkoutas et al. (2004) citam outras vantagens para o uso de células imobilizadas: a imobilização pode atuar como agente protetor contra os efeitos físico-químicos de variações de pH, temperatura, solventes ou mesmo metais pesados; maior facilidade de processamento contínuo; aumento da tolerância a alta concentração de substrato e a inibição do produto final; capacidade de usar biorreatores menores com projetos simplificados e, portanto, menores custos de capital.

O microrganismo imobilizado, dependendo de sua viabilidade, é mais facilmente reutilizado em bioprocessos subsequentes, sem a necessidade de remoção dos mesmos dos tanques fermentativos ou reatores, diminuindo assim o custo de equipamentos e demandas de energia (COVIZZI et al., 2007), sendo esta outra grande vantagem da imobilização celular, principalmente quando os suportes escolhidos para imobilização são inertes e apresentam alta resistência mecânica (DEVI e SRIDHAR, 2000).

O aperfeiçoamento e desenvolvimento de novas técnicas de imobilização celular, associadas ao uso de novos materiais como suporte, têm permitido que os processos fermentativos com células imobilizadas sejam realizados em condições adversas de pH, esterilidade e agitação (COVIZZI et al., 2007).

É a imobilização celular que ajuda a preservar a atividade catalítica para aplicações industriais e permite a reutilização da célula imobilizada. Esse método foi desenvolvido com o intuito de diminuir o custo do processo, pois ao contrário da imobilização de enzimas, não precisa passar pelas etapas de extração, isolamento e purificação. Alguns exemplos de processos em que essa ferramenta é utilizada são mostrados na Tabela 2.2.

Como desvantagem da técnica de imobilização celular pode-se citar possíveis obstáculos no transporte de substratos e produtos e limitações na transferência de oxigênio. Além disso, a matriz de imobilização pode romper-se devido ao crescimento celular e evolução de gases (MILESSI, 2012).

A seleção de uma matriz adequada para imobilização celular é essencial para a aplicação bem sucedida das células imobilizadas em bioprocessos. Vários polímeros naturais (agarose, alginato e quitosana) e sintéticos (pré-polímero de poliacrilamida, poliuretano e poli(etilenoglicol) foram utilizados com sucesso para imobilização celular. No entanto, cada polímero pode ter inconvenientes, como a fraca resistência mecânica e a durabilidade, a toxicidade para os microrganismos, ou um elevado custo (TAKEI et al., 2011).

Em particular, os materiais poliméricos a serem aplicados na imobilização de microrganismos no tratamento biológico de águas residuárias devem apresentar alta durabilidade em água, promover alta viabilidade celular e ser de baixo custo.

Existem diferentes tipos de suportes e a escolha destes, bem como do método de imobilização a ser empregado, é geralmente feita empiricamente, testando-se várias possibilidades e comparando-se os resultados obtidos com relação ao desempenho do biocatalisador imobilizado (CUNHA, 2006).

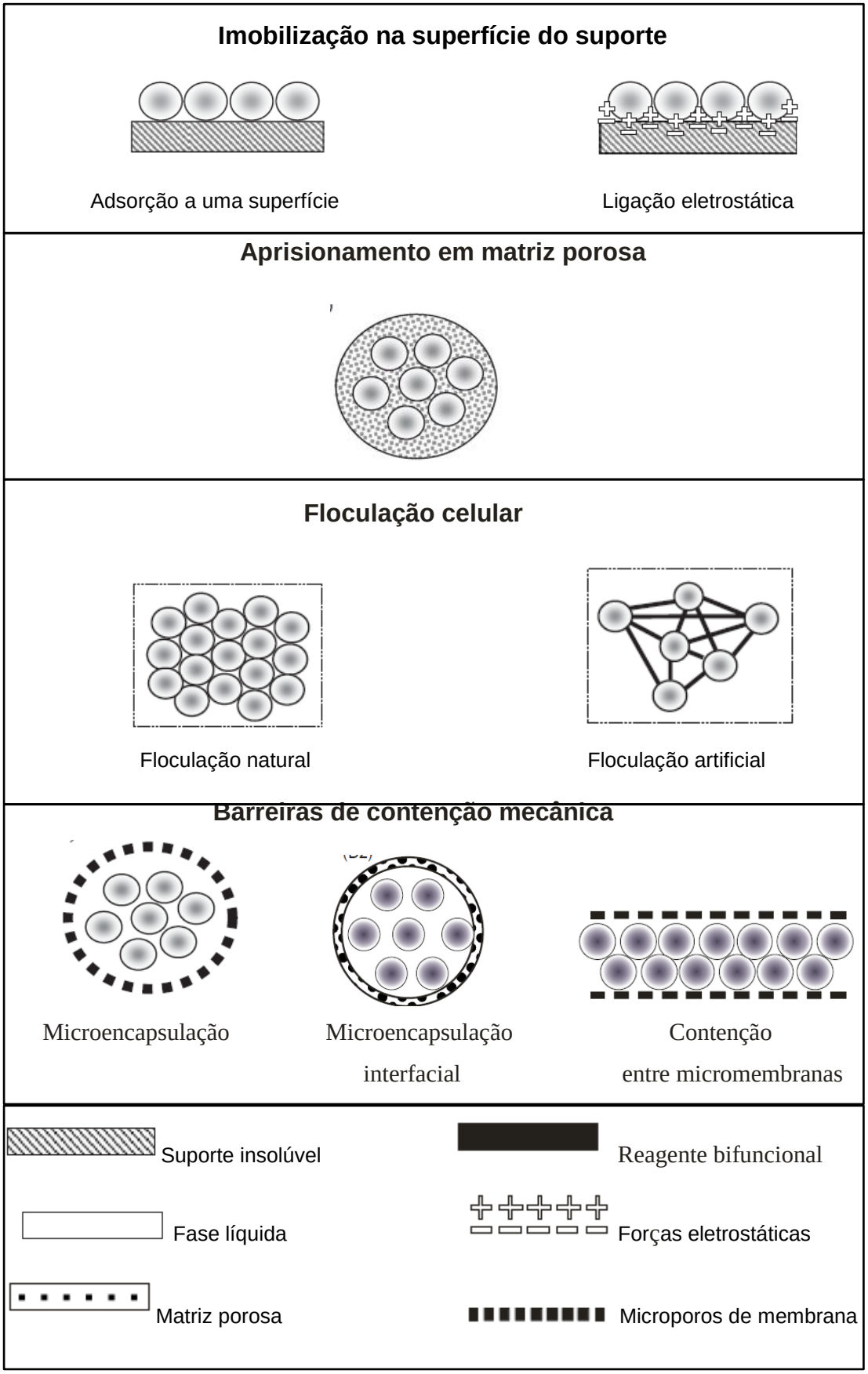
Tabela 2.2. Microrganismos imobilizados e suportes utilizados em processos biotecnológicos (adaptada de COVIZZI et al., 2007).

Produto/Processo	Microrganismo	Suporte Utilizado
Pigmentos	*M. purpureus*	alginato, PUF, carvão, perlita
	G. fujikuroi	Alginato
Proteínas	*S. cerevisiae*	PVA
Enzimas	*N. frowardii*	PUF
	T. turnirae	Alginato
Biodegradação	*Bacillus sp.*	alginato, PUF
	P. stutzeri	alginato, areia, carvão
	E. coli e *B. subtilis*	auto-imobilização
	P. chrysosporium	PUF, cerâmica, serragem
Biotransformação	*R. minuta*	agar, clara de ovo, lã de vidro/PEI
	T. versicolor	Nylon
Ácido lático	*L. casei*	Bucha vegetal
Etanol	*S. cerevisiae*	Bucha vegetal
Antibiótico	*S. clavuligerus*	Alginato, náilon

PVA: álcool polivinílico; PUF: fibra de poliuretano; PEI: polietilenoimina

Na Figura 2.4 são apresentados diferentes métodos de imobilização celular. Pode-se resumir o método de imobilização na superfície do suporte pela interação (adesão) entre a superfície celular e a superfície do suporte através de ligações iônicas (eletrostáticas). É um método simples e de baixo custo, tendo como principal desvantagem a vulnerabilidade e possível perda de células para o meio reacional. Como exemplos de suportes, pode-se citar serragem e vidro poroso.

Figura 2.4. Métodos básicos de imobilização de células (adaptado de KOURKOUTAS et al., 2004).



A utilização da técnica de aprisionamento em matriz porosa tem como fundamento a difusão celular em matriz porosa, pré-formada ou sintetizada *in situ,* que contenha poros menores do que as células usadas, tornando possível a permanência destas células na matriz e a troca de fluidos no compartimento. Uma vantagem é a formação de esferas que possuem uma grande superfície de contato, minimizando a limitação de transferência de massa. Um dos métodos mais frequentemente utilizados é a imobilização em alginato de cálcio.

A técnica de floculação celular está baseada no potencial de adesão e agregação que alguns tipos de células apresentam quando estão em suspensão, de modo que as células fiquem ligadas entre si sem que seja necessária a utilização de um suporte. Essa floculação pode acontecer de forma natural ou artificial. A desvantagem está no fato de que sem a presença de um suporte, ocorre instabilidade e baixa resistência a tensão de cisalhamento (KOURKOUTAS et al., 2004).

Existe também a técnica de barreiras de contenção mecânica, também chamada de técnica de contenção de membranas, que é realizada pelo uso de uma membrana microporosa, pela compartimentalização das células em uma microcápsula, ou ainda, através de uma superfície originada da interação entre dois líquidos imiscíveis. A desvantagem está na limitação da transferência de massa e ocorrência de bioincrustação na membrana pelo crescimento celular (VERBELEN, 2006; KOURKOUTAS et al., 2004).

Outra técnica de imobilização de células muito utilizada pode ser realizada através de hidrogéis, que são facilmente preparados, biodegradáveis e com estabilidade prolongada. (AHMED, 2015).

2.3. IMOBILIZAÇÃO EM MICROESFERAS DE HIDROGEL

Os hidrogéis podem ser definidos como redes poliméricas que podem reter uma quantidade significativa de água dentro de suas estruturas e inchar sem dissolver em água. O teor de água relativamente alto, a hidrofilicidade, a capacidade de expansão, a permeabilidade seletiva, a consistência de borracha macia e a baixa tensão interfacial estão entre as vantagens dos hidrogéis, permitindo que se assemelhem a tecidos vivos macios (Hua, Ma, Li, Yang, & Wang, 2010).

A resposta dos hidrogéis às mudanças ambientais, simulando mudanças em sistemas biológicos, como pH, temperatura, campo elétrico, força iônica, tipo de sal, etc., é uma área de pesquisa ativa. O inchaço, encolhimento, flexão e degradação estão entre as respostas únicas dos hidrogéis sensíveis ao meio ambiente (Hua et al., 2010).

O emprego intensivo desses produtos na área industrial e ambiental é considerado de primordial importância. Como esperado, os hidrogéis naturais foram gradualmente substituídos por tipos sintéticos devido à sua maior capacidade de absorção de água, longa vida útil e amplas variedades de recursos químicos brutos. A literatura sobre este assunto foi expandida, especialmente nas áreas científicas de pesquisa. Ahmed (2015) examinou várias publicações e relatórios técnicos sobre os produtos de hidrogel do ponto de vista da engenharia para visualizar os aspectos tecnológicos que abrangem esse crescente campo de pesquisa multidisciplinar (AHMED, 2015).

Os hidrogéis podem ser divididos em duas categorias com base na natureza química ou física das junções de reticulação. As redes quimicamente reticuladas têm junções permanentes, enquanto as redes físicas têm junções transitórias que surgem de emaranhados de cadeia polimérica ou interações físicas, como interações iónicas, ligações de hidrogênio ou interações hidrofóbicas (Ahmed, 2015).

Os polímeros naturais que formam hidrogel incluem proteínas (colágeno e gelatina) e polissacarídeos (amido, alginato e agarose). Os polímeros sintéticos que formam hidrogéis são tradicionalmente preparados usando métodos de polimerização química (Ahmed, 2015), como, por exemplo, o álcool polivinílico e o alginato de sódio.

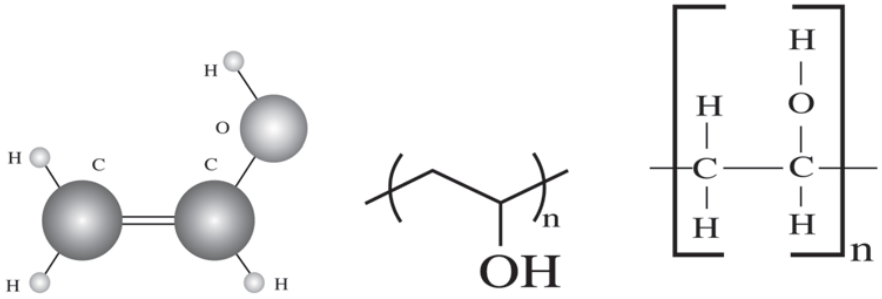
2.4. IMOBILIZAÇÃO COM ÁLCOOL POLIVINÍLICO E ALGINATO

2.4.1. Estrutura e Propriedades do álcool polivinílico (PVA)

O álcool polivinílico (PVA) é um gel sintético amplamente utilizado na imobilização celular, devido à sua propriedade de preservação da atividade biológica porque não é tóxico e é muito estável (PATTANAPIPITPAISAL et al., 2001). De acordo com Trampus (2016), o PVA é um polímero hidrossolúvel, anfifílico, com uma estrutura química relativamente simples com grupos

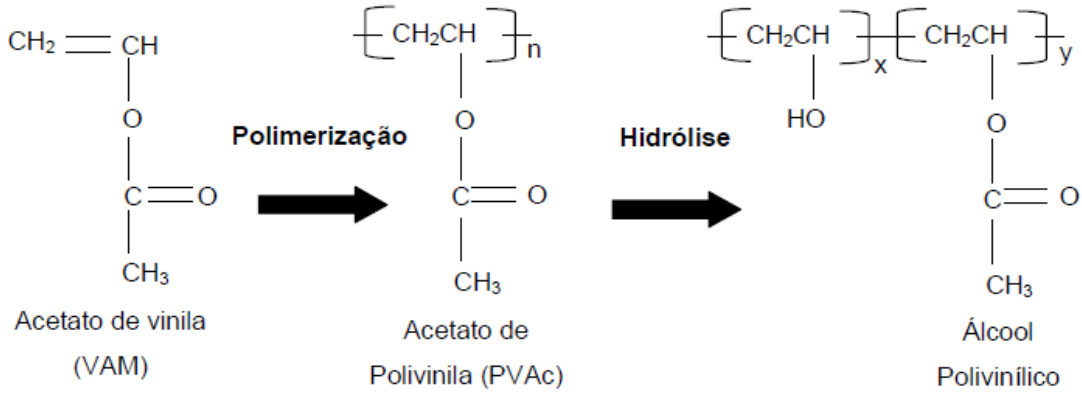
hidroxila laterais e passível de sofrer modificações por meio de reações químicas simples. A sua estrutura está representada na Figura 2.5.

Figura 2.5. Molécula de PVA e representação química (Fonte: (Ogur, 2005).



As propriedades do PVA são conhecidas pelos cientistas há muito tempo. Este polímero foi preparado pela primeira vez em 1924, por Hermann e Haehnel, na Alemanha (Ogur, 2005). O monômero, álcool vinílico, não existe em uma forma estável. O PVA é produzido pela polimerização do acetato vinílico para acetato polivinílico (PVAc), seguido pela hidrólise do PVAc para PVA, conforme apresentado na Figura 2.6. A reação de hidrólise não é completa, resultando em polímeros com diferentes graus de hidrólise, dependendo da extensão da reação. Em essência, o PVA é sempre um copolímero de PVA e PVAc (HASSAN & PEPPAS. 2000).

Figura 2.6. Esquema de obtenção de PVA (Fonte: TRAMPUS, 2016).



O grau de polimerização e o grau de hidrólise conferem diferentes propriedades aos diversos tipos de PVA, afetando a solubilidade em água, a cristalinidade e a viscosidade intrínseca. O aumento do grau de hidrólise e da massa molar do PVA, por exemplo, aumenta a viscosidade e a resistência à

água e à tração, mas diminui a solubilidade e a flexibilidade (HASSAN & PEPPAS. 2000). Diferentes propriedades do PVA permitem que este seja utilizado em um grande número de aplicações industriais (ARANHA & LUCAS, 2001).

Devido à diversidade de produtos comerciais, os diferentes tipos de PVA são classificados em relação ao grau de hidrólise em parcialmente hidrolisados e completamente hidrolisados. Com relação à massa molar (grau de polimerização), os diferentes tipos de PVA são classificados como de baixa viscosidade (5 cp), média viscosidade (20-30 cp) e alta viscosidade (40-80 cp) (Aranha & Lucas, 2001).

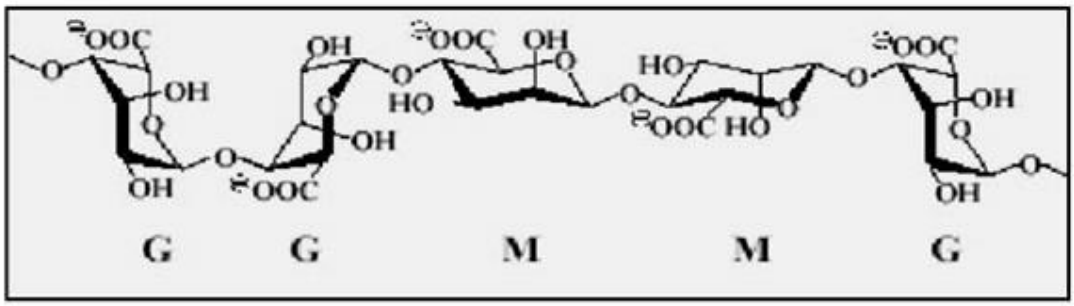
A resistência química e as propriedades físicas do PVA levaram ao seu amplo uso industrial. No entanto, as propriedades físicas do PVA dependem mais do método de preparação do que outros polímeros. É muito difícil atribuir propriedades físicas específicas para o sólido de PVA, pois estas são influenciadas pelas condições de polimerização do acetato de vinila, pelas condições operacionais da etapa de hidrólise e pelos processos de secagem e moagem do produto final (KRUMOVA et al., 2000).

De acordo com (Pham & Tho Bach, 2014), como o PVA é altamente hidrofílico, deve ser reticulado química ou fisicamente para se tornar insolúvel. Ariga et al. (1987) usaram a técnica de congelamento e descongelamento de PVA para formar um gel adequado para imobilização celular. Os autores descobriram que esta técnica produziu um gel de baixo custo com elasticidade de borracha e alta força. Hashimoto e Furukawa (1987) usaram um método mais simples e de menor consumo de energia para imobilização de PVA, reticulando o PVA com uma solução de ácido bórico. Esta técnica constitui um método fácil de imobilização celular, produzindo grânulos elásticos de alta força e durabilidade. No entanto, existem dois potenciais problemas com esta técnica: a solução de ácido bórico usada para reticular o PVA é altamente ácida (pH de aproximadamente quatro), e pode prejudicar a manutenção da viabilidade celular; e o PVA é um material extremamente pegajoso e tem tendência a aglomerar, sendo um problema na aplicação de células imobilizadas com PVA.

2.4.2. Estrutura e Propriedades do Alginato

O alginato é um polissacarídeo natural extraído com álcalis diluídos de várias espécies de algas marrons marinhas (Classe Phaeophyceae, espécies *Fucus serratus, Ascophyllum nodosum, Laminaria digitata, Laminaria cloustonii, Ecklonia maxima e Macrocystis pyrifera*), sendo constituído por resíduos de ácidos α-L-gulurônicos e ácidos β-D-manurônicos (Figura 2.7) unidos por ligações 1→4 de composição e estrutura sequencial amplamente variada. Os alginatos comerciais apresentam um grau de polimerização oscilando entre 100 e 1000 e sua massa molecular costuma encontrar-se no intervalo compreendido entre 32.000 e 200.000 Dalton. Os grupos carboxílicos possuem valores de pKa entre 3,4 e 4,4. A Figura 2.7 exemplifica as unidades constituintes dos alginatos (SHILPA et al., 2003; REIS, 2009).

Figura 2.7. Molécula de alginato (Fonte: ALE BORJA et al., 2015).



De acordo com Ching et al. (2015), o alginato é comumente usado na indústria de alimentos para modificar ou conferir propriedades como reologia (espessamento), capacidade de ligação com a água, formação de emulsão estabilizadora e filmes. Além disto, o alginato também é usado na tecnologia de liberação lenta de substâncias bioativas. Como ingrediente natural, as partículas de gel de alginato são atraentes para a produção biológica, porque são biocompatíveis, não tóxicos, biodegradáveis e de custo relativamente baixo.

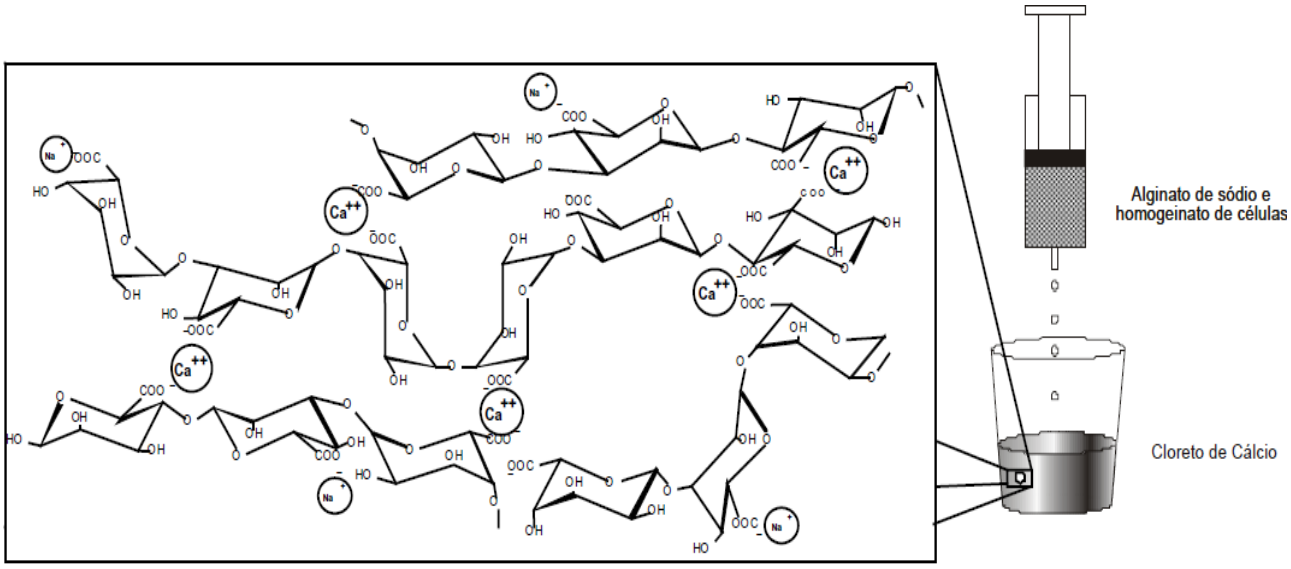
As partículas de gel de alginato têm propriedades químicas e mecânicas ajustáveis que dependem do tipo de agente de reticulação utilizado. Comparado com outros polissacarídeos, tais como gelatina ou ágar, o alginato é capaz de formar gel independente da temperatura. A formação de géis de

alginato pode ser conseguida por dois métodos: reticulação iônica com cátions (géis iónicos) ou precipitação ácida (géis ácidos) (CHING et al., 2015).

Os fatores que podem influenciar a viscosidade das soluções com alginato são a concentração e a massa molar do polímero. Os polímeros com maior massa ou maior concentração de alginato formarão soluções mais viscosas. Considerando a temperatura, a viscosidade diminui com o aumento da mesma (SHILPA et al., 2003).

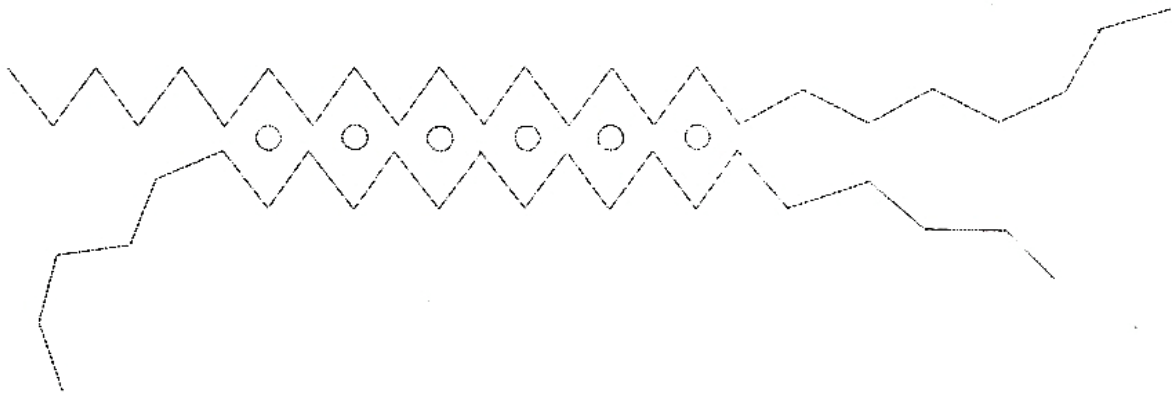
De acordo com Reis (2009), a propriedade mais útil dos alginatos é sua habilidade em reagir com cátions polivalentes, especialmente íons cálcio (como apresentado na Figura 2.8), para produzir géis fortes ou polímeros insolúveis utilizados na indústria de alimentos e em biotecnologia (imobilização de células e enzimas).

Figura 2.8. Formação de gel de alginato de cálcio por imobilização (Fonte: COVIZZI, 2007).



Os cátions polivalentes se ligam ao biopolímero sempre que houver dois resíduos de ácido gulurônico vizinhos, produzindo uma gelação ionotrópica de alginato. O sal de cálcio dos alginatos é insolúvel como resultado da reação auto-cooperativa entre os íons cálcio e as regiões de bloqueio G da cadeia. Os furos formados entre duas cadeias de bloco G são cavidades que se ligam aos íons de cálcio. O resultado é uma zona de junção denominada arranjo de "caixa de ovo" (Figura 2.9) com os íons cálcio sendo comparados aos ovos nos bolsos de uma caixa de ovo. A força do gel depende do conteúdo de blocos G no alginato e da concentração de íons cálcio (SILVA & QUEIROZ, 2004).

Figura 2.9. Estrutura caixa de ovo do alginato (Fonte: REIS, 2009).



A imobilização com alginato é um dos métodos mais simples de se fazer material encapsulado. As microesferas são compostas por uma rede de gel de biopolímero que aprisiona um ativo. O gel de alginato de cálcio é o mais conhecido sistema de gelificação utilizado para a preparação de grânulos de gel para encapsular uma grande variedade de agentes ativos, tais como gotículas de óleo contendo aroma, células microbianas, probióticos, enzimas, etc. (Mishra, 2015).

A imobilização com alginato em presença de cátions divalentes ou trivalentes pode ser facilmente controlada. Os polímeros, como o alginato ou o pectinato, são produzidos pela dissolução do polímero em solução aquosa, seguida da suspensão do ingrediente ativo na mistura e extrusão através de um dispositivo (a ferramenta de gotejamento pode ser simplesmente uma pipeta, seringa, bocal vibratório, bico de pulverização, cortador de jato, disco de atomização) que produz microgotas. Estas microgotas são endurecidas através da ligação cruzada do material da parede ou da cadeia de polímero usando um metal di ou multivalente, como soluções aquosas de cloreto de cálcio. O tamanho de partícula das microesferas pode ser controlado usando vários tipos de extrusoras com tamanhos diferentes, ou variando as taxas de fluxo da solução de polímero (Mishra, 2015).

O alginato também apresenta a capacidade de formar gel sem a presença de tais íons, porém em condições de pH igual ou inferior a 3,0. Entretanto, para a formação homogênea de géis, é necessário que a reação ocorra lentamente (SHILPA et al., 2003).

2.4.3. Métodos de Imobilização com PVA e Alginato

Os polímeros de PVA e alginato de sódio, quando usados separadamente, encontram extensa aplicação na imobilização de enzimas e células, mas suas propriedades precisam ser melhoradas para aplicações industriais. A instabilidade das esferas de alginato em tampões citrato ou fosfato e a baixa transferência de massa em polímeros de PVA limitou a aplicação desses polímeros em biorreatores (SILVA & QUEIROZ, 2004).

Ao contrário dos inúmeros estudos realizados sobre as propriedades físicas e aplicações biotecnológicas de géis de alginato como matriz para imobilização enzimática, existem poucos estudos sobre este polissacarídeo em mistura com outros polímeros sintéticos. A mistura de polímeros é um método importante para a modificação ou melhoria das propriedades físicas dos materiais poliméricos. A hibridação de polímeros naturais com macromoléculas sintéticas pode ser de grande importância para atingir as propriedades físicas desejáveis para aplicações industriais.

A menor resistência à transferência de massa do PVA em comparação com esferas de alginato sugere que sua mistura com alginato de sódio parece ser uma metodologia interessante para obter microesferas estáveis (AlgNa/PVA) e com melhor difusão para uso em processos biotecnológicos (SILVA & QUEIROZ, 2004).

Alguns métodos de imobilização de células utilizando como suporte PVA e alginato têm sido relatados no intuito de melhorar suas propriedades, tais como congelamento e descongelamento, adição de ácido bórico e nitrato de sódio (Chang & Tseng, 1998). Na Tabela 2.3 pode-se verificar que o PVA é utilizado em mistura com vários outros agentes, dos quais os mais utilizados serão brevemente comentados a seguir.

Tabela 2.3. Métodos de imobilização com PVA e/ou alginato de sódio.

Método de Imobilização	Método de Reticulacão	Referência
Lodo ativado imobilizado em gel de PVA, por gotejamento de uma mistura de lodo e PVA em solução saturada de ácido bórico por 24 h.	Com ácido bórico	HASHIIMOTO & FURUKAWA (1987)
Imobilização de lodo ativado em esferas de gel de PVA obtidas pelo gotejamento em solução de ácido bórico e posterior esterificação do PVA com ortofosfato de sódio. O tempo de imersão na solução de ácido bórico foi reduzido de 15-24 h para 10 min e usaram solução de ortofosfato de sódio para aumentar a força do gel.		CHEN & LIN (1994)
Imobilização de *Saccharomyces cerevisiae* em PVA e alginato de sódio utilizando cloreto de cálcio, ácido bórico e sulfato de sódio como agentes gelificantes em tempo menor de formação do gel para diminuir a toxicidade do ácido bórico.		TAKEI et al. (2011)
Células de *Candida guilliermondii* imobilizadas em PVA criogel para produção de xilitol.	Com congelamento e descongelamento	CUNHA (2006)
Imobilização de *Acidithiobacillus ferrooxidans* com PVA e alginato de sódio utilizando cloreto de cálcio e nitrato de cálcio como agentes gelificantes, além de congelamento e descongelamento.		YUJIAN et al. (2006)
Imobilização de lodo ativado e *Escherichia coli* El06 com PVA submetido a sequência de 7 congelamentos e descongelamentos. A atividade de células livres e imobilizadas diminuiu durante a sequência entre congelamento e posterior descongelamento, a adição de crioprotetores como glicerol e leite desnatado foram efetivos para prevenir a diminuição da atividade.		ARIGA et al. (1987)
Imobilização de lodo biológico com a bactéria de decomposição de DMF (N,N-dimetilformamida) preparada através de congelamento e descongelamento foi testado para efluentes contendo DMF.		OKAZAKI et al. (1995)
Alcaligenes eutrophus imobilizados em gel de PVA e alginato de sódio, utilizando cloreto de cálcio e nitrato de sódio como agentes gelificantes em substituição ao ácido bórico	Com nitrato de sódio	CHANG & TSENG (1998)
Três tipos de partículas imobilizadas com PVA de lodo ativado, foram preparadas.		ZHANG et al. (2007)

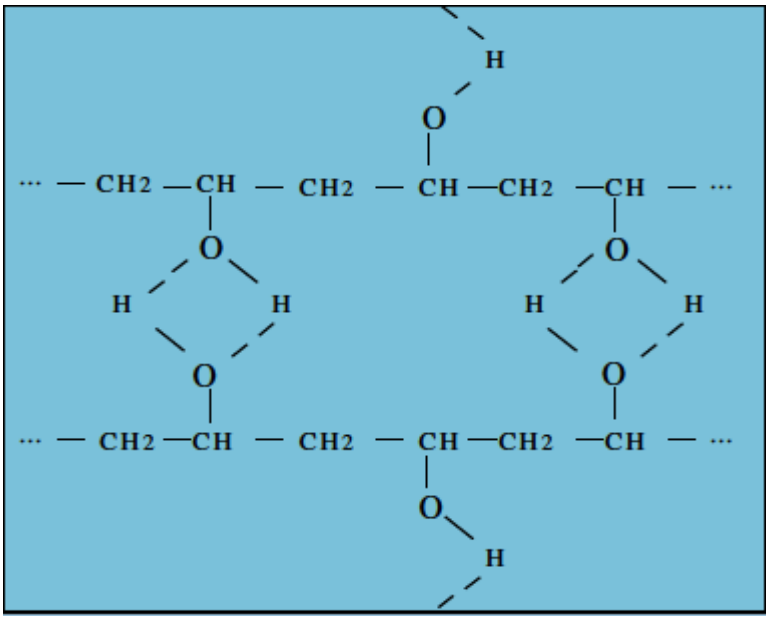
2.5 Métodos de reticulação do álcool polivinílico

2.5.1 PVA Criogel

O mecanismo envolvido no método é a gelificação do PVA puro e a formação de pontos de reticulação que dão origem a uma estrutura tridimensional em que cadeias de polímero individuais são conectadas por ligações de hidrogênio (Figura 2.10) ou interações eletrostáticas (DORIA-SERRANO et al., 2001).

A mistura reacional contendo agentes formadores do gel é congelada a temperaturas de alguns graus centígrados abaixo do ponto de cristalização do solvente. O sistema congelado, apesar de se parecer com um único bloco sólido, permanece essencialmente heterogêneo juntamente com os cristais do solvente congelado. O agente formador do gel encontra-se concentrado na fase líquida. Como esta fase representa apenas uma pequena fração do volume inicial, a concentração do precursor do gel aumenta drasticamente, promovendo a gelificação. Os cristais do solvente congelado funcionam como um agente formador de poros, pois quando fundidos dão origem a cavidades, macroporos preenchidos com o solvente. Durante o congelamento os cristais de solvente crescem até encontrarem as faces de outros cristais e então após o descongelamento um sistema de poros interconectados surge no interior do gel (LOZINSKY et al., 2003).

Figura 2.10. Ligações entre as moléculas de PVA por pontes de hidrogênio (Fonte: CUNHA, 2006).



Lozinsky et al. (1996) descrevem algumas formas de imobilização de biomassa microbiana neste gel, o congelamento de uma mistura de PVA e suspensão celular em um molde especial e posterior sublimação parcial do gelo da mistura congelada, seguida de descongelamento e intumescimento em meio líquido apropriado. Em outro método os autores avaliam vários ciclos de congelamento-descongelamento da mistura PVA-células, que tem como objetivo aumentar a força mecânica do gel. A última forma de imobilização consiste de um único ciclo de congelamento-descongelamento sem procedimento de liofilização. Nesta última, um descongelamento lento leva à obtenção de um gel mais resistente.

De acordo com o estudo de Lozinsky et al. (1996), resumindo os aspectos físicos, químicos e qualidades biológicas de um criogel, pode-se dizer que essas matrizes possuem um conjunto de vantagens em relação a outros hidrogéis conhecidos empregados em aprisionamento celular, tais como:

(I) criogéis de PVA têm micro e macro porosidades muito altas, favorecendo a transferência de massa de substratos e metabólitos;

(II) características reológicas de criogéis não quebradiços são excelentes e permitem que sejam usados na maioria dos tipos de reatores, sendo uma propriedade benéfica em comparação com as matrizes muito menos estáveis com base em géis de alginato ou poli(acrilamida) relativamente frágeis;

(III) a termoestabilidade dos criogéis excede a de outros transportadores de gel termorreversíveis comumente empregados (carragenano, ágar);

(IV) criogéis de PVA são resistentes à degradação biológica;

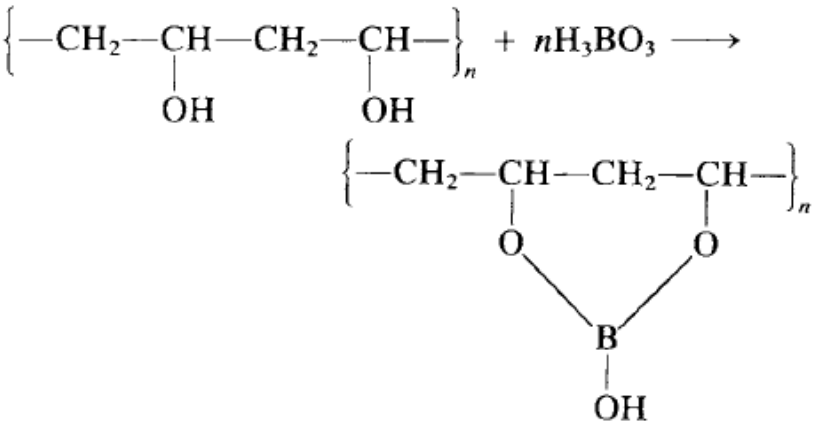
(V) consequentemente, do ponto de vista físico-químico, esses materiais de gel têm alto potencial de uso em células e em tecnologias de aprisionamento.

Alguns pesquisadores realizaram estudos sobre o PVA-criogel como suporte de imobilização, como Cunha (2006), que produziu xilitol imobilizando *Candida guilliermondi.* Ariga (1987) verificou o aumento da atividade de *Escherichia coli El06* quando foi utilizado um crioprotetor. Okazaki et al. (1995) imobilizou lodo biológico com a bactéria de decomposição de DMF (N,N-dimetilformamida) e testou o material imobilizado no tratamento de efluentes contendo DMF.

2.5.2. PVA - Ácido Bórico

Este método de imobilização é caracterizado pela gelificação da biomassa por PVA em uma solução saturada de ácido bórico. Esta reação é uma polimerização, onde as esferas de lodo biológico imobilizado são facilmente formadas. A reação de PVA com ácido bórico é mostrada na Figura 2.11 (HASHIMOTO & FURUKAWA, 1987).

Figura 2.11. Reação de gelificação do PVA e ácido bórico (Fonte: HASHIMOTO & FURUKAWA, 1987).



Hashimoto & Furukawa (1987) demonstraram que uma carga orgânica foi continuamente removida no tratamento de águas residuárias sintéticas com esferas contendo lodo ativado imobilizado em PVA-ácido bórico, sem destruição das esferas ou diminuição de gel. As esferas contendo lodo ativado demonstraram ser úteis por um longo prazo.

2.5.3. PVA - Nitrato de Sódio

De acordo com Chang e Tseng (1998), a aglomeração de pérolas de PVA e a toxicidade do ácido bórico são dois problemas encontrados quando se utiliza o método PVA com ácido bórico. A adição de pequena quantidade de alginato de sódio ao gel de PVA impede a aglomeração de pérolas de PVA e melhora a permeabilidade ao gás da mesma, mas a toxicidade do ácido bórico não é

resolvida. O método PVA com nitrato de sódio é muito simples, sendo o processo de gelificação realizado em uma única etapa, a solução de gelificação (nitrato de sódio) utilizada é de baixa toxicidade e o custo muito baixo. O tempo de imersão para solidificação é muito curto e a resistência mecânica e atividade das células imobilizadas nas esferas obtidas por esta técnica é maior do que a obtida pelos outros métodos estudados.

Uma comparação dos resultados obtidos nos vários métodos utilizados é mostrada na Tabela 2.4.

Tabela 2.4. Comparação entre métodos de reticulação e propriedades do polímero.

Propriedade	Reticulacão		
	Congelamento Descongelamento	Nitrato de sódio	Ácido bórico
Resistência	+	+	+
Toxicidade	-	-	++
Atividade	+	+	-
Economia	-	++	++

Fonte: Própria. (-) = baixo valor, (+) = valor alto, (++) = valor muito alto.

De acordo com os resultados relatados, embora a resistência seja maior quando se congela e descongela o polímero perde-se na economia pela necessidade do uso de energia para realizar o método; o ácido bórico perde na toxicidade do reagente e consequentemente a atividade também é influenciada; o nitrato de sódio parece ser o método mais atrativo, pois apresenta boa resistência do polímero combinado com a economia, por não usar energia para sua realização e ser de baixo custo.

Diante do exposto na revisão bibliográfica, pode-se resumir que:

- os processos biológicos anaeróbios são recomendados para tratamento de efluentes com alto conteúdo orgânico biodegradável, pois apresentam boa eficiência e aumentam a possibilidade de aproveitamento do metano produzido;
- no entanto, uma das dificuldades dos processos anaeróbios é a necessidade de retenção de elevada massa microbiana nos reatores de

alta taxa para superar a baixa taxa de crescimento dos microrganismos anaeróbios;

- uma forma de superar tal dificuldade é a imobilização dos microrganismos através de formação de biofilme ou granulação, que apresentam limitações;
- outro método alternativo é a imobilização de células em géis de PVA, que geralmente é aplicado em mistura com outros agentes para melhorar as propriedades do material imobilizado;
- apesar de alguns estudos na literatura citarem a aplicação de tal método para imobilização de lodo ativado e culturas puras, tal método ainda não foi avaliado com lodo anaeróbio.

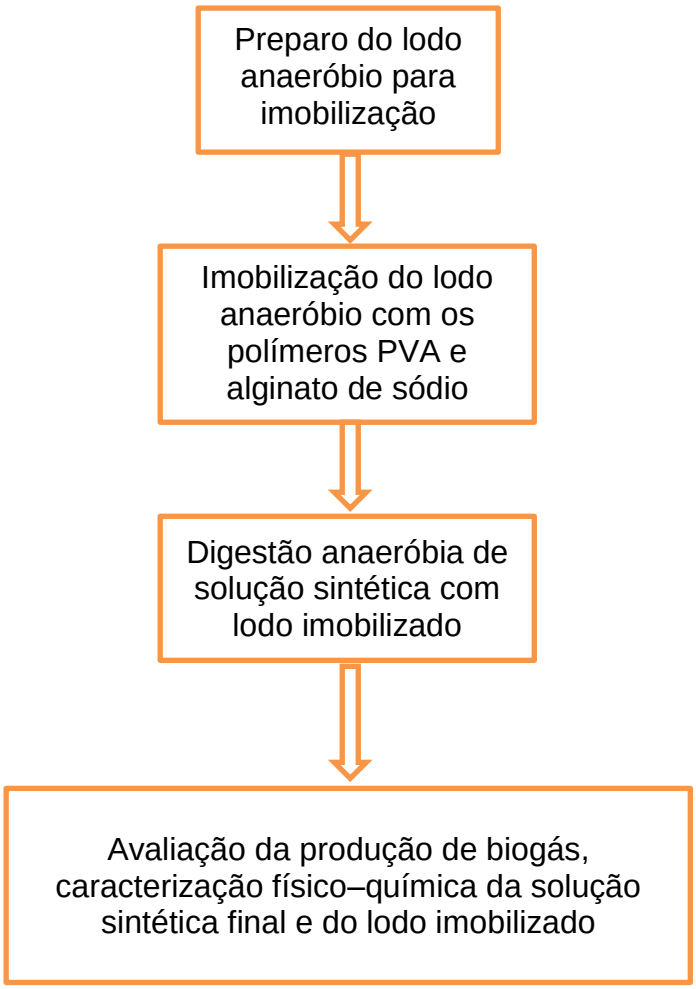
Portanto, o estudo desenvolvido nesta dissertação pretende justamente avaliar este último método de imobilização com a intenção de produzir esferas com lodo anaeróbio imobilizado para semeadura de reatores do tipo UASB. A seguir, são apresentados a metodologia e os resultados obtidos no estudo.

3. MATERIAL E MÉTODOS

Todos os experimentos foram realizados no Laboratório de Tecnologia Ambiental e Laboratório de Microbiologia Industrial, ambos localizados na Escola de Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro. Neste capítulo serão apresentados os materiais e metodologias empregados durante as etapas desta pesquisa.

A Figura 3.1 apresenta um diagrama de blocos dos procedimentos adotados no desenvolvimento da dissertação, desde o preparo do lodo até a caracterização do biogás.

Figura 3.1.Etapas realizadas na pesquisa.



3.1. MATERIAIS

3.1.1. Origem e características do lodo anaeróbio

O lodo anaeróbio utilizado nos experimentos de imobilização foi coletado em reator anaeróbio em operação em indústria de abate de aves localizada no Rio de Janeiro, e selecionado por apresentar boa atividade metanogênica (DAMASCENO, 2013).

No entanto, por se encontrar na forma granular, foi necessário desintegrar os grânulos em liquidificador industrial (marca CEMAF), sendo misturado em velocidade máxima por 30 segundos e armazenado sob refrigeração até o momento de uso.

Este lodo foi caracterizado em termos de sólidos voláteis totais (SVT), apresentando 24120 mg/L.

3.1.2. Reagentes

A imobilização do lodo anaeróbio foi conduzida com álcool polivinílico (PVA) e alginato de sódio. Dois tipos de PVA foram empregados: PVA da marca Proquimios (com grau de hidrólise de 86,5 – 89,5%, grau de polimerização de aproximadamente 600, massa molecular de 124.000-130.000 e viscosidade 4-6 mPas) e PVA da marca Vettel Química (com grau de hidrólise de 86,5 – 89,5%, grau de polimerização de aproximadamente 2450, massa molecular de 27.000-32.000 e viscosidade 38-55 mPas).

O alginato de sódio era P.A., da marca Proquimios. Outros reagentes empregados nos experimentos e análises químicas realizadas foram de grau analítico (P.A.).

3.2. PROCEDIMENTOS DE IMOBILIZAÇÃO DO LODO ANAERÓBIO

3.2.1. Imobilização em PVA, alginato de sódio e cloreto de cálcio

O método de imobilização avaliado envolve a formação de géis (em forma de esferas) produzidos a partir de uma mistura de álcool polivinílico (PVA), alginato de sódio, lodo anaeróbio e solução aquosa de cloreto de cálcio. O método requer a formação de um material insolúvel em água através de uma

reação de troca iônica, na qual o Na^+ do alginato é substituído pelo Ca^{2+} da solução aquosa, seguida de reticulação física do PVA (DORIA-SERRANO et al., 2001).

Foram misturados 5 mL de lodo anaeróbio com 15 mL de solução contendo PVA e alginato de sódio. O PVA foi utilizado em concentrações de 6%, 8%, 10% e 12% (m/v), sendo o alginato de sódio mantido na concentração de 2% (m/v) (NARDI,2014; CUNHA,2006). A mistura de PVA, alginato de sódio e lodo assim obtida foi gotejada em 50 mL de solução aquosa estéril de $CaCl_2$ (7% m/v). Para realizar o gotejamento da mistura de polímeros (PVA e alginato de sódio) com lodo anaeróbio, foi usada uma ponteira plástica e um bécher contendo a solução de $CaCl_2$, que era mantida sob agitação (200 rpm) em agitador magnético (marca Lab 1000) à temperatura ambiente. A Figura 3.2 apresenta a sequência dos procedimentos de formação das esferas de lodo imobilizado.

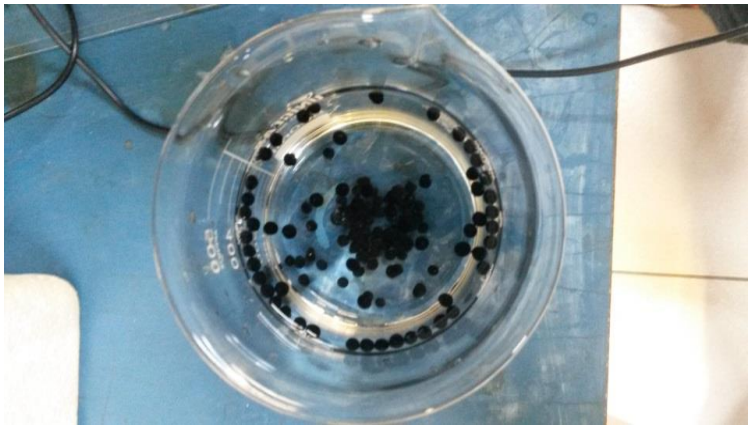
Figura 3.2. Dispositivo para imobilização de lodo com PVA e alginato de sódio (A), mistura de PVA, alginato de sódio e lodo (B) e gotejamento da mistura de polímeros e lodo anaeróbio (na ponteira) em solução de cloreto de cálcio no bécher (C).

(A) **(B)** **(C)**

As esferas com lodo imobilizado (Figura 3.3) foram mantidas na solução de $CaCl_2$ a 5ºC por 2 horas. Logo depois, foram separadas desta solução com o auxílio de uma peneira, lavadas com água destilada e deixadas em repouso

por 2 dias, sob refrigeração, em um bécher contendo água, para posterior utilização em ensaios de biodegradabilidade anaeróbia. (CUNHA, 2006)

Figura 3.3. Aspecto das esferas de PVA, alginato de sódio e lodo anaeróbio.



3.2.2. Imobilização em PVA, alginato de sódio, cloreto de cálcio e nitrato de sódio

De acordo com Chang & Tseng (1998), o método PVA-nitrato de sódio é muito simples, tendo o processo de imobilização somente uma etapa. A solução de nitrato de sódio utilizada é de baixa toxicidade e baixo custo, o tempo de imersão para solidificação é muito curto e a força mecânica das esferas obtidas nesta técnica é maior do que aquelas obtidas com PVA e cloreto de cálcio.

O mesmo procedimento usado no item 3.2.1 foi realizado, com três modificações: a concentração de PVA foi fixada em 10% m/v, a concentração de alginato de sódio em 1% (m/v) e a substituição da solução de cloreto de cálcio (7% m/v) por uma solução de nitrato de sódio (50% m/v) e cloreto de cálcio (4 % m/v)(CHANG&TSENG,1998). As esferas obtidas foram mantidas nesta solução a 5ºC por 2 horas, sendo então coletadas com auxílio de uma peneira, lavadas com água destilada, deixadas em repouso por 2 dias e utilizadas nos ensaios de biodegradabilidade anaeróbia.

Nesta etapa do trabalho, foram também conduzidos experimentos para avaliação do efeito da viscosidade do PVA na formação do polímero.

3.2.3. Imobilização em PVA, alginato de sódio, cloreto de cálcio e nitrato de sódio com congelamento – descongelamento

As esferas obtidas, conforme descrito no item 3.2.2, foram mantidas na solução de cloreto de cálcio e nitrato de sódio a 5ºC por 2 horas, sendo então coletadas com auxílio de uma peneira, lavadas com água destilada, e submetidas ao congelamento. Na etapa de congelamento as esferas foram armazenadas em placa de Petri, espalhadas de forma que ficassem uma ao lado da outra, sem aglomeração das mesmas, e então submetidas à temperatura de -10^{0}C (em congelador) por 10 horas, seguido de descongelamento por 2 horas. Este ciclo de congelamento – descongelamento foi repetido por três vezes (CUNHA et al., 2005).

Em todos os métodos de imobilização estudados, logo após o procedimento de imobilização, as esferas foram caracterizadas quanto ao diâmetro, medido em esferas úmidas com o auxílio de um paquímetro.

3.2.4. Avaliação das melhores condições de imobilização

Para definir as melhores condições de imobilização do lodo anaeróbio na matriz de PVA, foram realizados experimentos de acordo com um planejamento fatorial fracionado 2^{4-1} com três pontos centrais, totalizando 11 condições avaliadas em 2 réplicas ou 22 experimentos. A matriz do planejamento encontra-se na Tabela 3.1.

O delineamento experimental foi analisado utilizando o programa computacional Statistica 7.1. As variáveis independentes estudadas foram concentração de PVA, concentração de alginato de sódio, concentração de cloreto de cálcio e concentração de nitrato de sódio, enquanto as variáveis dependentes foram o volume de biogás produzido e a demanda química de oxigênio final.

Os níveis das variáveis independentes foram definidos com base nos experimentos preliminares de imobilização e em dados da literatura (CHANG & TSENG, 1998; CUNHA, 2006).

Tabela 3.1. Matriz do planejamento fatorial fracionado 2^{4-1} com 3 pontos centrais e 2 réplicas.

Ensaios	Réplicas	Variáveis codificadas				Variáveis reais (% m/v)			
		PVA	Alginato	$CaCl_2$	$NaNO_3$	PVA	Alginato	$CaCl_2$	$NaNO_3$
1	1	-1	-1	-1	-1	5	1	5	30
2	1	-1	-1	1	1	5	1	15	50
3	1	-1	1	-1	1	5	3,5	5	50
4	1	-1	1	1	-1	5	3,5	15	30
5	1	1	-1	-1	1	15	1	5	50
6	1	1	-1	1	-1	15	1	15	30
7	1	1	1	-1	-1	15	3,5	5	30
8	1	1	1	1	1	15	3,5	15	50
9	1	0	0	0	0	10	2,25	10	40
10	1	0	0	0	0	10	2,25	10	40
11	1	0	0	0	0	10	2,25	10	40
1	2	-1	-1	-1	-1	5	1	5	30
2	2	-1	-1	1	1	5	1	15	50
3	2	-1	1	-1	1	5	3,5	5	50
4	2	-1	1	1	-1	5	3,5	15	30
5	2	1	-1	-1	1	15	1	5	50
6	2	1	-1	1	-1	15	1	15	30
7	2	1	1	-1	-1	15	3,5	5	30
8	2	1	1	1	1	15	3,5	15	50
9	2	0	0	0	0	10	2,25	10	40
10	2	0	0	0	0	10	2,25	10	40
11	2	0	0	0	0	10	2,25	10	40

3.3. ENSAIOS DE BIODEGRADABILIDADE ANAERÓBIA COM BIOMASSA LIVRE E IMOBILIZADA

Ensaios de biodegradabilidade anaeróbia foram conduzidos em batelada, em frascos tipo penicilina de 100 mL com um volume útil de 90 mL, composto de lodo anaeróbio proveniente de reator UASB – *upflow anaerobic sludge blanket* em operação em indústria de abate de aves, imobilizado ou não (controle) e solução sintética diluída. O lodo, com concentração de sólidos voláteis totais de 24120 mg/L, foi adicionado aos frascos para uma relação DQO/SVT inicial de 2:1.

A solução sintética foi preparada com a composição apresentada na Tabela 3.2, e apresentava pH 7 e DQO de 35200 mg/L. Esta solução foi diluída para obtenção de uma DQO inicial nos frascos penicilina em torno de 1000 mg/L.

Tabela 3.2. Composição da solução sintética com DQO = 35200 mg/L e pH = 7.

Componente	Concentração (g/L)
Sacarose	32
Bicarbonato de sódio	40
Fosfato de potássio dibásico	24
Fosfato de potássio monobásico	16
Cloreto de amônio	4

Para calcular a quantidade de esferas utilizadas em cada frasco penicilina, foram realizados os seguintes cálculos:

- 15 mL mistura (PVA + alginato de sódio) + 5 mL lodo = rendimento médio de 230 esferas de 4 mm de diâmetro aproximadamente;
- Considerando que o lodo contém 24120 mg SVT/L, um volume de 5 mL contém 120,6 mg SVT. Esta massa de lodo em 20 mL (15 mL mistura + 5 mL lodo), leva a uma concentração de 6030 mg SVT/L. Ou 120,6 mg SVT em 230 esferas leva a uma concentração média de 0,524 mg SVT por esfera;
- Portanto, em cada frasco penicilina de 100 mL foram colocadas 100 esferas, dando aproximadamente 52,4 mg de SVT. Em 90 mL, tem-se 582 mg SVT/L, obtendo-se uma relação DQO / SVT de 2:1.

Após introdução de lodo não imobilizado (controle) ou imobilizado (100 esferas) e solução sintética nos frascos, estes foram fechados com batoques de

borracha e selos de alumínio e incubados em sala climatizada a 30ºC sem agitação. A produção de biogás foi monitorada pelo deslocamento do êmbolo de seringas plásticas conectadas aos frascos (Figura 3.4). Medidas de pH e DQO solúvel foram realizadas no início e ao final dos ensaios, que foram encerrados ao se verificar a estabilização da produção de biogás.

Figura 3.4. Ensaio de biodegradabilidade anaeróbia com esferas de lodo imobilizado e lodo suspenso (controle) em frascos penicilina.

A atividade do lodo livre (nos experimentos controle) e do lodo imobilizado foi avaliada por meio da medida de DQO final no meio sintético e da produção de biogás acumulada no período de incubação. Uma outra forma de avaliar a atividade, relacionada à difusão do substrato nos géis de polímero e lodo, foi através da medida de uma taxa inicial de produção de biogás. Medida através do coeficiente angular de linha reta ajustada aos pontos experimentais da curva de volume de biogás acumulado versus tempo, nos primeiros dois a três dias de incubação.

3.4. MÉTODOS ANALÍTICOS

Foram empregados métodos físico-químicos conduzidos sob condições padrão, segundo o Standard Methods (APHA, 2005).

3.4.1. pH

O pH foi determinado na mistura de solução sintética e lodo no inicio e final da digestão anaeróbia, por leitura direta em potenciômetro de bancada (QUIMIS), de acordo com o método 4500-H+B (APHA, 2005).

3.4.2. Sólidos Voláteis Totais (SVT)

Os sólidos voláteis do lodo foram determinados por gravimetria, utilizando cápsulas de porcelana previamente calcinadas em mufla a 550ºC durante 30 minutos, esfriadas em dessecador e pesadas, sendo este peso denominado P_0. Um determinado volume de lodo foi adicionado em cada cápsula e secas em estufa por 105ºC até peso constante, sendo este peso denominado de P_1. As cápsulas foram, então, novamente levadas à mufla a 550ºC por 30 minutos, esfriadas em dessecador e seu peso identificado como P_2. A concentração de sólidos voláteis totais (SVT) do lodo foi calculada através das Equações 3.1 e 3.2 a seguir (APHA, 2005).

$$SVT\ (\frac{mg}{L}) = (P1 - P2) * \frac{10^6}{V} \quad (3.1)$$

$$SVT\ (g) = P1 - P2 \quad (3.2)$$

Sendo:
P1 = massa após estufa a 105ºC (g)
P2 = massa após mufla a 550ºC (g)
V = volume de lodo (mL)

3.4.3. Demanda Química de Oxigênio (DQO)

A medida da DQO foi determinada por método padrão colorimétrico de refluxo fechado, com $K_2Cr_2O_7$ em meio ácido, contendo Ag_2SO_4 como catalisador e $HgSO_4$ para eliminar a interferência de cloretos presentes na amostra. Dois mL das amostras, diluídas de forma adequada para as faixas de DQO contempladas pelo método, foram acrescentados aos reagentes e a mistura digerida a 150°C durante 2 horas. Após resfriamento, a absorvância foi lida a 600 nm em espectrofotômetro Hach DR 2000, sendo os valores de absorvância obtidos convertidos em DQO por meio de uma curva-padrão previamente preparada, empregando-se biftalato de potássio como substância padrão (APHA, 2005).

Para DQO solúvel o mesmo procedimento é empregado, com diferença no preparo da amostra, que antes da adição das soluções reagentes, é filtrada em membranas de éster de celulose de 0,45 µm. As análises de DQO solúvel da solução sintética antes e após a digestão anaeróbia foram realizadas em

triplicata e o branco reacional foi preparado pela adição de água em substituição à amostra.

3.4.4. Composição do biogás

O biogás produzido foi injetado diretamente em cromatógrafo VARIAN MICRO GC 4900 usando metodologia de referência do Laboratório de Tecnologia Ambiental (LTA/UFRJ), para determinação e quantificação de CH_4, CO_2 e H_2S. As condições utilizadas na cromatografia foram (DUARTE, 2013): Coluna – PPQ – 10 m x 0,32 mm; Temperatura da coluna – 50°C; Detector – Condutividade Térmica; Temperatura do detector – 250°C; Temperatura do injetor – 80°C; Gás de arraste – Hélio; Tempo de análise – 1 minuto. A quantificação de metano, dióxido de carbono e gás sulfídrico foi realizada através da curvas-padrão, conforme descrito por Garcia (2016).

3.4.5. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) / Espectroscopia de Energia Dispersiva de Raios-X (EDS)

Os ensaios de MEV foram realizados em amostras de esferas sem lodo anaeróbio, esferas com lodo anaeróbio estocadas em água destilada e esferas com lodo anaeróbio coletadas do meio sintético após 5 dias de incubação. As amostras estavam úmidas e foram usadas em baixo vácuo, com tensão de 20 kV. Esta análise tem como objetivo verificar as características da superfície do polímero formado. As amostras analisadas tinham composição de 10% (m/v) de PVA, 1% (m/v) de alginato de sódio, gotejada em solução de 4% (m/v) de cloreto de cálcio e 50% (m/v) de nitrato de sódio, escolhidas devido a sua maior resistência mecânica, conforme resultado mostrado na seção 4.2.2. Para tal, foi empregado o equipamento QUANTA 450 marca FEI no laboratório de ensaios mecânicos e microestruturais do SENAI/RJ (Maracanã, Rio de Janeiro). O ensaio EDS foi realizado por detector EDS Bruker x sense em conjunto com o MEV.

3.4.6. Alcalinidade Total

Esta análise foi realizada em amostras do sobrenadante de frascos penicilina ao final da digestão anaeróbia. O pH inicial de uma amostra foi medido quando

50 mL de amostra foi transferida para um bécher de 100 mL. A titulação da amostra foi realizada com solução padrão de H_2SO_4 0,1N até atingir pH 5,75, sendo o volume de ácido anotado e denominado V_1. Essa alcalinidade é chamada parcial, uma vez que compreende 80% de bicarbonato e 20% de sais de ácidos orgânicos voláteis. A titulação continuou até pH 4,3, e o volume da solução titulante foi anotado e denominado V_2. A alcalinidade total é a soma dos dois volumes de H_2SO_4 encontrados ($V_1 + V_2$). Esta metodologia foi adaptada de Ripley et al. (1986) e o cálculo da alcalinidade é descrito na Equação 3.3 (APHA, 1999).

$$Atotal = \frac{V3.N.50000}{Vam} \quad (3.3)$$

Onde:
A_{total} = Alcalinidade Total (mg/L, como $CaCO_3$)
50.000 = equivalente-grama de $CaCO_3$, em mg
N = Normalidade do H_2SO_4 usado na titulação
V_{am} = Volume de amostra (mL)
V_3 = soma dos volumes V_1 e V_2 (mL).

3.4.7. Ácidos Voláteis

Esta análise foi realizada em amostras do sobrenadante de frascos penicilina ao final da digestão anaeróbia. De acordo com Damasceno (2013), o pH 4,3 da amostra utilizada na alcalinidade total é reduzido para 3,3 com H_2SO_4 para eliminar íons bicarbonato. A seguir, a amostra foi aquecida até a temperatura de ebulição por 3 minutos para remoção do ácido carbônico da solução. A solução foi resfriada até temperatura ambiente, e o pH da amostra foi então corrigido para pH 4 com solução de NaOH (0,1N), sendo este volume desprezado. Uma nova titulação foi feita com a mesma solução titulante até pH

7. A concentração de ácidos voláteis presentes na amostra foi calculada pela Equação 3.4 (APHA, 2005).

$$A\ ácidos\ voláteis = \frac{V.N.60000}{Vam} \quad (3.4)$$

Onde:
$A_{ácidos\ voláteis}$ = Ácidos Voláteis (mg/L, como HAc)
V = Volume de NaOH gasto de pH 4 para 7
Vam = Volume de amostra utilizada para analise.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Serão apresentados, neste capítulo, os resultados obtidos na imobilização de lodo anaeróbio e sua atividade em solução sintética. O objetivo principal foi a obtenção de esferas sem aglomeração, com boa distribuição de tamanho e boas características do polímero para a produção de biogás.

4.1. IMOBILIZAÇÃO EM PVA, ALGINATO DE SÓDIO E CLORETO DE CÁLCIO

4.1.1. Características das esferas com lodo imobilizado

A produção das esferas se deu através do gotejamento da suspensão de PVA, alginato de sódio e lodo anaeróbio em solução de cloreto de cálcio, conforme descrito no item 3.2.1.

Um primeiro ensaio foi conduzido com 6% (m/v) de PVA e 2% (m/v) de alginato de sódio na composição do gel, de acordo com o trabalho de Nardi (2014). Nesta concentração de PVA foram obtidos resultados insatisfatórios, obtendo-se esferas visualmente frágeis e pouco estáveis, embora a viscosidade do gel esteja mais relacionada à concentração de alginato de sódio na composição das esferas (DORIA-SERRANO et al., 2001).

Hashimoto & Furukawa (1987) mostraram que a utilização de PVA na formação das esferas serve para melhorar a estabilidade dimensional (resistência mecânica) e obter uma esfera de alto desempenho. Os autores avaliaram concentrações de PVA de 2,5 a 15% e verificaram que a concentração de PVA tem relação com a resistência mecânica do gel, obtendo melhores resultados de resistência mecânica na concentração de 12,5%.

Assim, neste estudo, foram avaliadas, em seguida, maiores concentrações de PVA (8%, 10% e 12% m/v), conforme o trabalho de Cunha (2006). Nestas maiores concentrações de PVA, verificou-se estruturas visualmente mais consistentes e estáveis que, possivelmente, seriam consequência de uma maior resistência mecânica do gel.

Nesta primeira etapa do estudo foram produzidas partículas de gel contendo lodo, com 10% m/v de PVA, na forma de esferas com diâmetro médio entre 3 e 4 mm (Figura 4.1).

Figura 4.1. Aspecto das esferas formadas com 10% (m/v) de PVA, 2% (m/v) de alginato de sódio e 7% (m/v) de cloreto de cálcio, contendo lodo anaeróbio.

4.1.2. Ensaios de biodegradabilidade anaeróbia com esferas de lodo anaeróbio imobilizado em PVA, alginato de sódio e cloreto de cálcio

Foram realizados ensaios de biodegradabilidade anaeróbia com meio sintético à base de sacarose e lodo imobilizado ou não (controle), conforme descrito no item 3.3. Na Figura 4.2 e Tabela 4.1 são apresentados os resultados obtidos nos ensaios de biodegradabilidade anaeróbia.

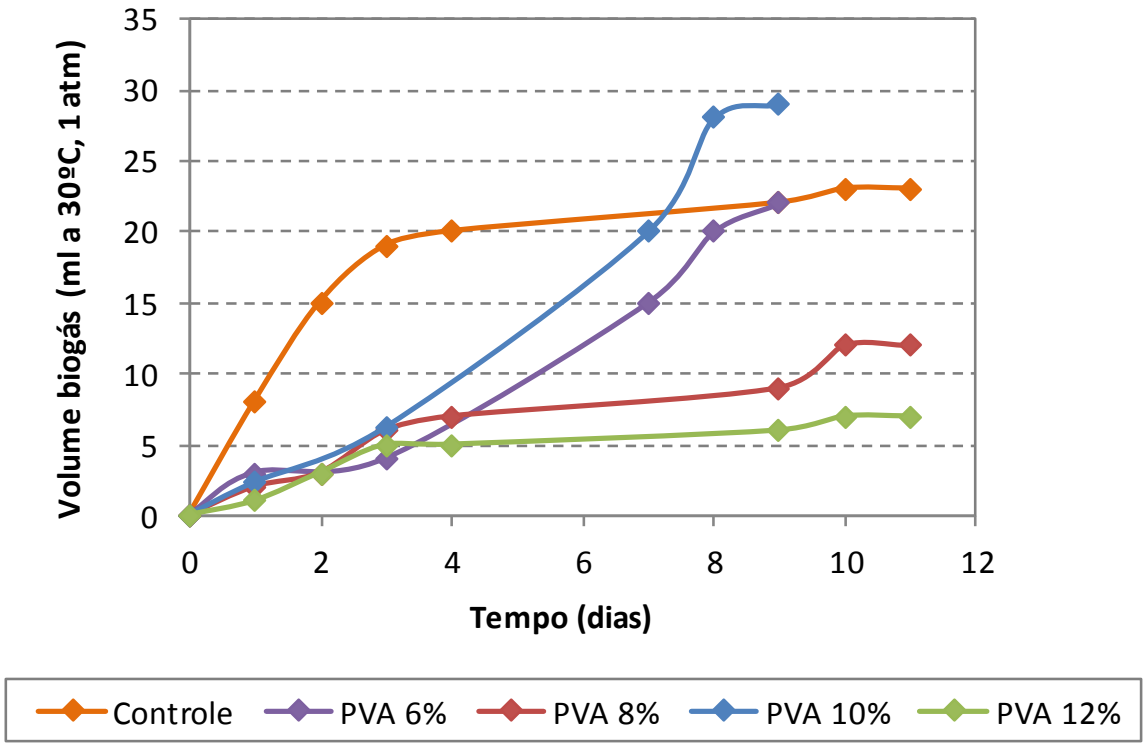
Primeiramente, a atividade do lodo anaeróbio livre sobre o meio sintético foi avaliada, verificando-se uma remoção de DQO de 90,5% (Tabela 4.1). Considerando o volume de biogás produzido e a massa de DQO removida durante o período de incubação (10 dias), obteve-se uma produção específica de biogás de 331,9 mL biogás/g DQO removida. Como nesta etapa não foram determinados os percentuais de metano no biogás, adotou-se o valor normalmente encontrado nos ensaios conduzidos no laboratório com este mesmo meio sintético – 70%. Assim, pôde-se estimar uma Produção Específica de Metano (PEM) de 232,3 mL CH_4/g DQO removida (ou 203,9 NmL CH_4/g DQO removida), que corresponderia a cerca de 60% do valor de referência teórico (350 NmL CH_4/g DQO removida (CHERNICHARO, 2007). Portanto, com base nestes resultados, considerou-se que o lodo anaeróbio utilizado nos ensaios de biodegradabilidade apresentava boa atividade e que menores volumes de biogás nos ensaios com lodo imobilizado poderiam ser

atribuídos a outros fenômenos e não a uma baixa atividade do lodo usado na imobilização.

Tabela 4.1. Resultados dos ensaios de biodegradabilidade anaeróbia com lodo livre (Controle) e lodo imobilizado em alginato de sódio (2% m/v) e diferentes concentrações de PVA.

Experimento	pH inicial	pH final	DQO inicial (mg/L)	DQO final (mg/L)	Volume biogás (mL)	Taxa inicial de produção de biogás (mL biogás/d)
Controle	7,43	6,70	1292	122	23	7,5
PVA (6%)	7,50	6,69	1292	2754	22	3,0
PVA (8%)	7,45	6,45	1285	7845	12	2,0
PVA (10%)	7,50	6,87	1285	6336	29	2,3
PVA (12%)	7,45	6,88	1292	8290	7	1,7

Figura 4.2. Produção acumulada de biogás com lodo livre (Controle) e imobilizado com diferentes concentrações de PVA e 2% (m/v) de alginato de sódio.

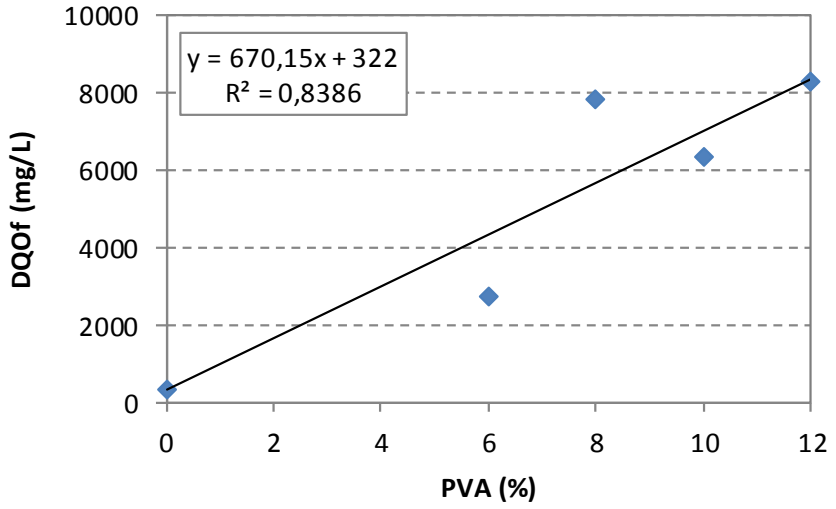


Em seguida, avaliou-se os volumes de biogás produzidos com o lodo imobilizado em diferentes concentrações de PVA, obtendo-se melhores resultados com 6% e 10% (m/v) de PVA, destacando-se a produção de biogás encontrada com 10% de PVA, com volume final de biogás superior ao obtido no experimento controle (Figura 4.2). No entanto, parte do biogás quantificado

pode ter sido formado a partir da atividade dos microrganismos sobre o PVA solubilizado e liberado no meio.

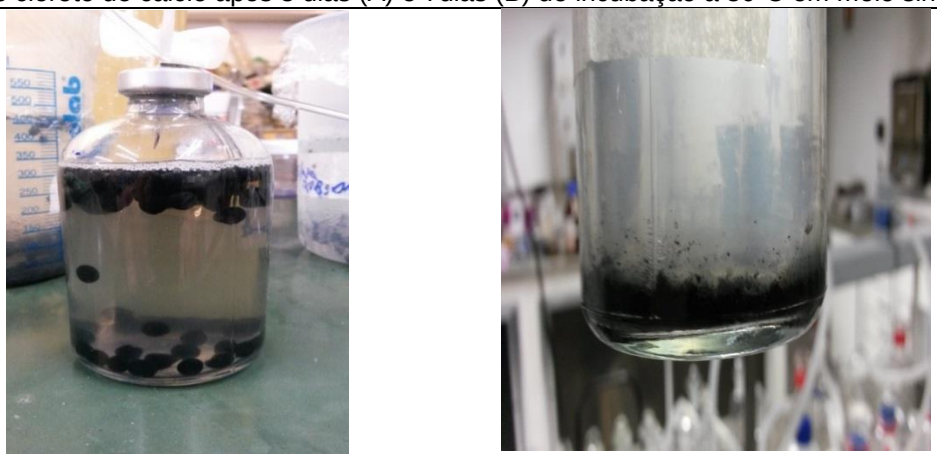
À exceção do experimento Controle, em todos os demais experimentos verificou-se uma DQO final maior que a inicial (Tabela 4.1). A Figura 4.3 mostra a relação entre DQO final e a concentração de PVA nas esferas, verificando-se um aumento da DQO final em função da concentração de PVA, com exceção do experimento com PVA 8%. Isto indica que uma fração considerável da DQO ao final dos experimentos era devido à solubilização e liberação da matriz de imobilização no meio.

Figura 4.3. Relação entre DQO final no meio e concentração de PVA empregada na imobilização.



De fato, foi visualizado ao final dos ensaios que as esferas estavam deterioradas. Em todas as concentrações de PVA avaliadas na formação do polímero de PVA com alginato de sódio e cloreto de cálcio, as esferas se romperam completamente após 7 dias. Na Figura 4.4 é mostrado o aspecto das esferas, íntegras aos 3 dias de incubação no meio sintético a 30ºC e completamente dissolvidas aos 7 dias.

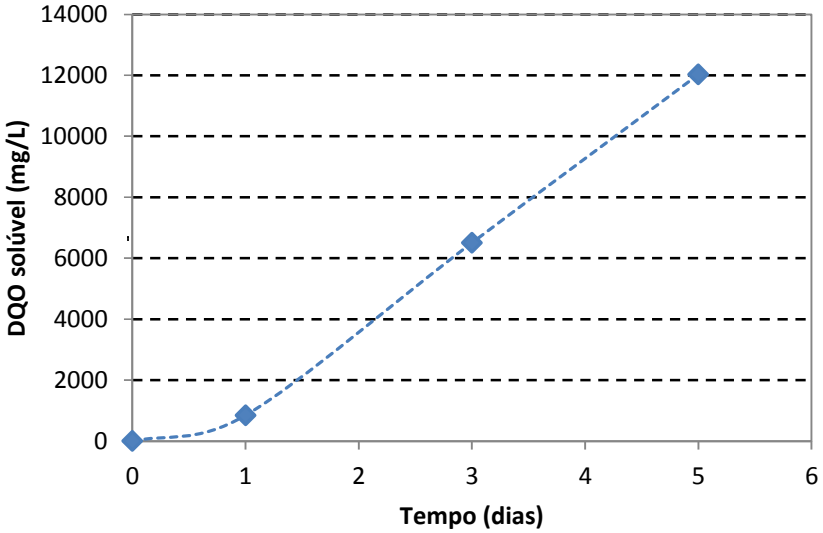
Figura 4.4. Aspecto das esferas com PVA 10% (m/v), 2% (m/v) de alginato de sódio (m/v) e 7% (m/v) de cloreto de cálcio após 3 dias (A) e 7dias (B) de incubação a 30ºC em meio sintético.



(A) **(B)**

A solubilização do polímero em água destilada, a 30ºC, foi confirmada em um experimento com esferas de PVA 10% (m/v), 2% (m/v) de alginato de sódio (m/v) e 7% (m/v) de cloreto de cálcio, sem lodo imobilizado. O aumento da DQO solúvel em água destilada, visualizado na Figura 4.5, confirma a solubilização da matriz de imobilização na água destilada. Após 1 dia, ocorre um aumento menor que, em seguida, passa a ser praticamente linear até 5 dias de experimento. Foi observado também que, embora as esferas não estivessem totalmente danificadas, pareciam apresentar volume menor que o inicial.

Figura 4.5. Aumento da DQO solúvel ao longo do tempo, em experimento com esferas de PVA/Alginato/$CaCl_2$, sem lodo, imersas em água destilada a 30ºC.



Segundo Shindo & Kamimura (1990), neste método, o alginato de sódio tem o papel de apoiar a formação dos géis. As pérolas de gel foram preparadas pelos autores a partir de várias concentrações de alginato de sódio e 8% de PVA. Para concentrações de alginato de sódio ≤ 1,5%, a forma do gel era discoidal (plana e circular) e sua força de ruptura muito baixa (medida por um durômetro como o peso da carga no ponto em que as pérolas começaram a se romper antes do congelamento). Quando a concentração de alginato de sódio foi ≥ 2,0 %, formou-se um gel esférico e a sua força de ruptura era alta. Considerando que a concentração de alginato de sódio nos experimentos realizados na dissertação foi 2% (m/v), e que ainda assim as esferas se deterioraram, reforça-se a hipótese de uma alteração da estrutura das esferas devido ao metabolismo do lodo em seu interior.

Cabe destacar também que nos experimentos com o lodo imobilizado, as taxas iniciais de produção de biogás (medidas até o 3º dia) eram bem menores que no Controle (Tabela 4.1), indicando também a dificuldade de difusão do substrato até os microrganismos imobilizados dentro das esferas e tornando o processo de degradação muito mais lento.

Shindo & Kamimura (1990) imobilizaram células da levedura *Saccharomyces cerevisiae* em esferas de PVA e alginato de sódio por gotejamento em solução de cloreto de cálcio e estudaram sua atividade fermentativa. As esferas foram congeladas a - 40ºC por 30 minutos e liofilizadas por 7h. Os autores testaram concentrações de PVA de 4%, 6%, 8% e 10% (m/v) em 2% (m/v) de alginato de sódio e também observaram alterações da atividade da levedura frente a mudanças na concentração de PVA. Na concentração de 8% PVA, obteve-se atividade máxima. A imobilização com 10% PVA e 6% PVA resultou em 83% e 62% da atividade máxima, respectivamente.

Os resultados do presente estudo foram comparados com os obtidos por Shindo & Kamimura (1990) porque esses autores realizaram uma imobilização de céluas em PVA e alginato de sódio gotejando em solução de cloreto de cálcio. No entanto cabe ressaltar que as esferas nesse trabalho foram congeladas e liofilizadas.

Estes mesmos autores avaliaram a influência do raio (entre 1,0 e 2,5 mm) dos géis de alginato de cálcio e PVA-alginato na difusividade efetiva, verificando

que esta diminuía com o aumento do raio. Portanto, outra explicação para a menor atividade do lodo imobilizado na dissertação poderia estar ligada ao raio médio das esferas, entre 1,5 e 2,0 mm, o que dificultaria a difusão às partes mais internas da esfera.

Dong et al. (2017) imobilizaram bactérias oxidantes de amônia em esferas de PVA (12 % m/v) e alginato de sódio (1,1 % m/v) por gotejamento em solução de cloreto de cálcio (1 % m/v). Os autores estudaram a atividade nitrificante de 1,3 esferas / mL de meio sintético (simulando esgoto) a pH 8,0-8,2 e 30°C, obtendo altas atividades, mesmo após as esferas serem recicladas por quatro vezes. A taxa de remoção de nitrogênio amoniacal das bactérias oxidantes imobilizadas atingiu 90,3% nas condições ótimas de imobilização (12% PVA, 1,1% alginato de sódio e 1 % cloreto de cálcio). Em comparação com bactérias oxidantes de amônia imobilizadas apenas em alginato de sódio, as bactérias imobilizadas em PVA e alginato de sódio foram superiores em termos de resistência ao pH, número de reutilizações, custo de material, resistência ao calor e à capacidade de oxidação de amônia. Os autores, no entanto, não mencionam qualquer degradação das esferas, que poderia diminuir a atividade das bactérias, como aconteceu neste estudo.

No presente estudo, a formação de alginato de cálcio insolúvel no polímero não foi suficiente para evitar a dissolução das esferas no meio. Para conferir uma maior resistência física às esferas faz-se necessário um método que aumente a força mecânica do polímero. Segundo Pham & Tho Bach (2014), o PVA, que é altamente hidrofílico, pode se tornar insolúvel por meio de reticulação química ou física. O método de luz ultravioleta (UV), descrito por Imai et al. (1986), avalia a imobilização de enzimas como amiloglicosidase, invertase e celulase em membrana de PVA reticulado por meio de UV. Ariga et al. (1987) usaram a técnica de congelamento e descongelamento para reticulação de PVA. Enquanto Hashimoto & Furukawa (1987) usaram ácido bórico como agente reticulante para obtenção de esferas de PVA com alta durabilidade.

No presente estudo, decidiu-se aumentar a força mecânica do PVA por reticulação química com adição de nitrato de sódio à mistura de polimerização. Além de ser mais econômico, pois não requer o uso de energia como no

método de congelamento/descongelamento, este método é menos tóxico porque não usa o ácido bórico (CHANG & TSENG, 1998).

4.2. IMOBILIZAÇÃO EM PVA, ALGINATO DE SÓDIO, CLORETO DE CÁLCIO E NITRATO DE SÓDIO

4.2.1. Características das esferas com lodo imobilizado

O acréscimo de nitrato de sódio se deu com base no trabalho de Chang & Tseng (1998), no qual o nitrato de sódio foi utilizado como agente gelificante. Foi observado que, após a adição deste agente, ocorreu uma maior resistência mecânica do gel (verificada através de teste de resistência mecânica relativa), comparada à obtida com outros métodos de imobilização (utilizando ácido bórico como agente reticulante).

A produção das esferas se deu através do gotejamento da suspensão de PVA, alginato de sódio e lodo anaeróbio em solução de cloreto de cálcio e nitrato de sódio, conforme descrito no item 3.2.2. Nas esferas imobilizadas com nitrato de sódio como agente para aumento de resistência física do polímero, verificou-se que estas mantiveram-se íntegras durante 10 dias, tempo maior que os 7 dias da condição anterior com somente cloreto de cálcio, demonstrando uma maior resistência mecânica do polímero PVA/alginato de sódio com a adição de nitrato de sódio, conforme esperado.

4.2.2. Ensaios de biodegradabilidade anaeróbia com esferas de lodo anaeróbio imobilizado em PVA, alginato de sódio, cloreto de cálcio e nitrato de sódio

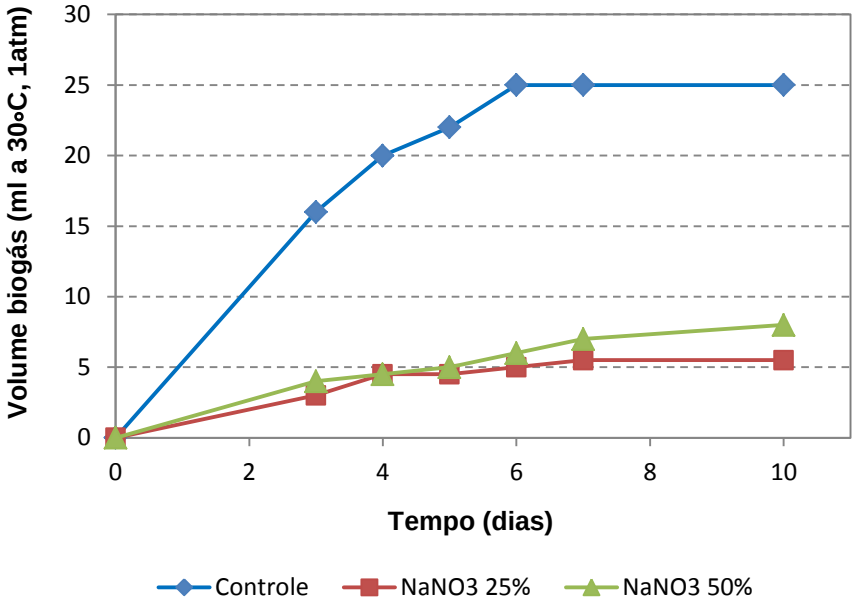
Na Tabela 4.2 e Figura 4.6 são apresentados os resultados obtidos nos ensaios de biodegradabilidade anaeróbia.

Tabela 4.2. Resultados dos ensaios de biodegradabilidade anaeróbia com lodo livre (Controle) e lodo imobilizado em alginato de sódio (1% m/v), PVA (10% m/v) e cloreto de cálcio combinados com diferentes concentrações de nitrato de sódio.

Experimento	pH inicial	pH final	DQO inicial (mg/L)	DQO final (mg/L)	Volume biogás (mL)	Taxa inicial de produção de biogás (mL biogás/d)[a]
Controle	7,55	7,05	1100	122	25,0	5,3
$NaNO_3$ (25%)	7,50	6,19	1100	1080	5,5	1,0
$NaNO_3$ (50%)	7,55	6,41	1100	692	8,0	1,3

[a] medida em 3 d de incubação.

Figura 4.6. Produção acumulada de biogás com lodo livre (Controle) e imobilizado com PVA/alginato e diferentes concentrações de nitrato de sódio.



O experimento controle manteve resultados similares aos obtidos no experimento anterior, com remoção de DQO de 88,9% e produção de biogás de 25 mL (equivalente a 284 mL biogás/ g DQO removida) após 10 dias de incubação a 30ºC. A DQO final diminuiu nos experimentos com lodo imobilizado, em especial com 50% (m/v) de nitrato de sódio. Nesta condição, verificou-se uma remoção de DQO de 37,1%. No entanto, o volume final e a taxa inicial de produção de biogás com lodo imobilizado foram muito baixos comparados ao experimento controle, ainda indicando uma limitação difusional que reduz consideravelmente a assimilação do substrato pelo lodo imobilizado.

Quando se compara com os resultados obtidos na seção 4.1.2 com 10% PVA, nota-se que as esferas ganharam mais resistência, mas tiveram a difusividade reduzida ainda mais, pois tanto o volume de biogás quanto a taxa inicial de produção de biogás (de 29 mL e 2,3 mL/d) foram reduzidos de 4 e 2 vezes, respectivamente (para 6,8 mL e 1,2 mL/d, em média).

No trabalho de Yujian et al. (2006) foram comparadas soluções de cloreto de cálcio e nitrato de cálcio (ambas 1-5% m/v) na formação e reticulação de géis de 9% (m/v) de PVA, 0,9% (m/v) de alginato de sódio e 10^9 células/mL de *Acidithiobacillus ferrooxidans*, combinadas com congelamento e descongelamento. As esferas de PVA-nitrato de cálcio apresentaram maior

força mecânica e eram muito mais difíceis de quebrar em comparação com as esferas de PVA-cloreto de cálcio. Com relação às atividades dos dois géis, verificou-se valores baixos, de 59,1% e 53,9% da atividade obtida com células suspensas, não imobilizadas, para o PVA-nitrato de cálcio e PVA-cloreto de cálcio, respectivamente.

Zhang et al. (2007) imobilizaram lodo ativado com 10% (m/v) de PVA, 1% (m/v) de alginato de sódio e 20 g/L de microrganismos usando três diferentes métodos de reticulação. O primeiro, por gotejamento em solução de ácido bórico saturado e cloreto de cálcio (1% m/v), o segundo com solução de nitrato de sódio (50% m/v) e cloreto de cálcio (1% m/v) e o terceiro com solução de ácido bórico saturado e cloreto de cálcio (1% m/v) e posterior imersão em solução 0,5 mol/L de ortofosfato de sódio. Os autores tinham como objetivo melhorar o método de imobilização de PVA usando diferentes tipos de agentes de reticulação (ácido bórico, nitrato e ortofosfato). A atividade do lodo foi avaliada através da medição da taxa de absorção de oxigênio. O método usando ortofosfato foi o que apresentou melhor resultado em relação à atividade do lodo. No entanto, uma comparação entre ácido bórico e nitrato de sódio revelou que os géis de PVA-nitrato de sódio apresentaram atividade três vezes maior que os de PVA-ácido bórico. No presente estudo, o ortofosfato não foi avaliado, mas a maior atividade do PVA-nitrato de sódio em comparação com PVA-ácido bórico foi o motivo pelo qual o nitrato de sódio foi empregado para reticulação.

Chang & Tseng (1998) empregaram uma mistura de 8% (m/v) de PVA, 0,6% (m/v) de alginato de sódio e 171 mg/L de *Alcaligenes eutrophus* e gotejamento em soluções de 50% (m/v) de nitrato de sódio e 1% (m/v) de cloreto de cálcio para formar esferas de PVA-nitrato de sódio. Estas apresentavam estrutura mais forte e eram difíceis de quebrar. Quando imersas em água aumentavam seu diâmetro de cerca de 4,0 mm antes da imersão para 5,0 mm após 1 h de imersão. As esferas formadas com PVA/alginato combinado com cloreto de cálcio e ácido bórico, no lugar de nitrato de sódio, tinham cerca de 4,5 mm de diâmetro antes da imersão e após 1 h de imersão eram quase completamente dissolvidas devido a uma insuficiente reticulação do PVA pelo ácido bórico. Já as esferas formadas com PVA/alginato combinado com ácido bórico e

ortofosfato de sódio, quando imersas em água, aumentavam seu diâmetro de cerca de 4,5 mm antes da imersão para 6,0 mm após imersão.

A atividade das esferas com nitrato de sódio e PVA contendo *Alcaligenes eutrophus* foi maior do que a das esferas de PVA com ortofosfato de sódio. Este resultado pode ser devido à baixa toxicidade da solução de nitrato de sódio empregada como agente reticulante, enquanto a solução contendo ortofosfato de sódio foi preparada combinada com acido bórico, que é tóxico (CHANG & TSENG, 1998).

Quan et al. (2011) utilizaram concentrações similares às empregadas neste estudo na imobilização de células, sendo as esferas formadas por uma mistura de 7,5% (m/v) de PVA, 1% (m/v) de alginato de sódio e 1,67% (m/v) de lodo biológico. As esferas de PVA-nitrato de sódio foram formadas por gotejamento em soluções de 50% (m/v) de nitrato de sódio e 2% (m/v) de cloreto de cálcio. Foram utilizados como substratos água residuária sintética e água residuária suplementada com nutrientes. Após 22 dias de operação, verificou-se taxas de remoção de nitrogênio estáveis e altas (> 8,0 kg $N/m^3.d$), valores mais altos quando comparados com reatores usando células livres. As esferas de PVA/alginato tinham diâmetro de 4 mm, densidade de 1,1 g/cm^3, boa sedimentação, e apresentavam estrutura macroporosa que poderia facilitar a transferência de substratos e metabólitos. Além disso, as pérolas de gel de PVA mostraram uma excelente resistência mecânica sob condições de agitação durante todo o experimento.

Uma comparação entre os métodos descritos anteriormente pode ser vista na Tabela 4.3. Foram comparadas, qualitativamente, a resistência e a atividade microbiana de sete diferentes tipos de géis de PVA, mostrando a diferença quando se utiliza somente cloreto de cálcio na formação das esferas e quando se utiliza cloreto de cálcio combinado com nitrato de sódio. No caso de Yujian et al. (2006), utilizou-se nitrato de cálcio ao invés de nitrato de sódio. Dong et al. (2017), diferentemente deste estudo, conseguiu uma boa resistência quando utilizou somente cloreto de cálcio na formação das esferas, além de excelente atividade das bactérias imobilizadas. Os resultados mostram que a resistência e a atividade aumentam em todos os casos onde o nitrato foi usado, à exceção de quando se utiliza nitrato de cálcio, em que a atividade diminui.

Tabela 4.3. Comparação da resistência e atividade microbiana do gel formado em diferentes estudos.

Referência	Resistência			Atividade		
	Com $CaCl_2$	Com $CaCl_2$ + $NaNO_3$	Com $CaCl_2$ + $Ca(NO_3)_2$	Com $CaCl_2$	Com $CaCl_2$ + $NaNO_3$	Com $CaCl_2$ + $Ca(NO_3)_2$
Yujian et al. (2006)	+	na	++	-	na	-
Zhang et al. (2007)	+	++	na	+	++	na
Chang & Tseng (1998)	na	++	na	na	++	na
Quan et al. (2011)	na	++	na	na	++	na
Shindo & Kamimura (1990)	+	na	na	+	na	na
Dong et al. (2017)	++	na	na	++	na	na
Neste estudo	-	+	na	+	-	na

Fonte: Própria. Nota: (-) = baixa resistência mecânica ou atividade, (+) = boa resistência mecânica ou atividade, (++) = elevada resistência mecânica ou atividade. na = não avaliado.

4.2.3. Comparação da biodegradabilidade de PVAs de alta e baixa viscosidade

De acordo com Leimann (2008), o grau de hidrólise e a massa molar são responsáveis por algumas características físico-químicas importantes do PVA como, por exemplo, sua solubilidade em água. Para graus de hidrólise elevados, a solubilidade do PVA aumenta com a temperatura.

O PVA pode ser classificado, quanto ao grau de hidrólise, em parcial e completamente hidrolisado. E quanto ao grau de polimerização, em baixa (5cp), média (20-30 cp) e alta viscosidade (40-50 cp) (ARANHA & LUCAS, 2001). Hashimoto & Furukawa (1987) afirmam que a concentração final do PVA foi o fator mais importante na imobilização. Os autores relataram ser muito difícil imobilizar lodo com PVA em alta concentração, devido à alta viscosidade da mistura. Seis misturas de lodo com PVA foram testadas com diferentes concentrações finais de PVA (de 2,5 a 15%), sendo a formação de gel e sua força examinados. A partir dos resultados obtidos, foi observado que a força do gel do lodo imobilizado com esferas de concentração final de PVA abaixo de 7,5% (m/v) foi de baixa intensidade, e que a formação das esferas tornou-se impossível com concentração final de PVA acima de 15% (m/v). A melhor condição para formação das esferas foi possível com concentração final de PVA em 12,5% (m/v). As células foram imobilizadas com sucesso em PVA-ácido bórico sem dissolução ou diminuição do tamanho das esferas e sem perda de atividade biológica do lodo ativado, medido pela remoção de carbono orgânico total (93%) e nitrogênio total (30-40%) de águas residuárias.

A fim de avaliar o efeito da viscosidade do PVA, no presente estudo foi realizado um experimento com esferas formadas com PVAs de viscosidade diferente. Foram fixadas as concentrações de 10% (m/v) de PVA (de alta e baixa viscosidade), 1% (m/v) de alginato de sódio, 4% (m/v) de cloreto de cálcio e 50% (m/v) de nitrato de sódio. Esta última selecionada em função dos melhores resultados em termos de DQO final no experimento anterior. Na Figura 4.7 e Tabela 4.4 são apresentados os resultados obtidos nos ensaios de biodegradabilidade anaeróbia.

Figura 4.7. Produção acumulada de biogás com lodo livre (Controle) e lodo imobilizado em PVA de alta (Av) e baixa (Bv) viscosidade (10% m/v) com alginato de sódio (1% m/v) em solução de cloreto de cálcio combinado ou não com nitrato de sódio.

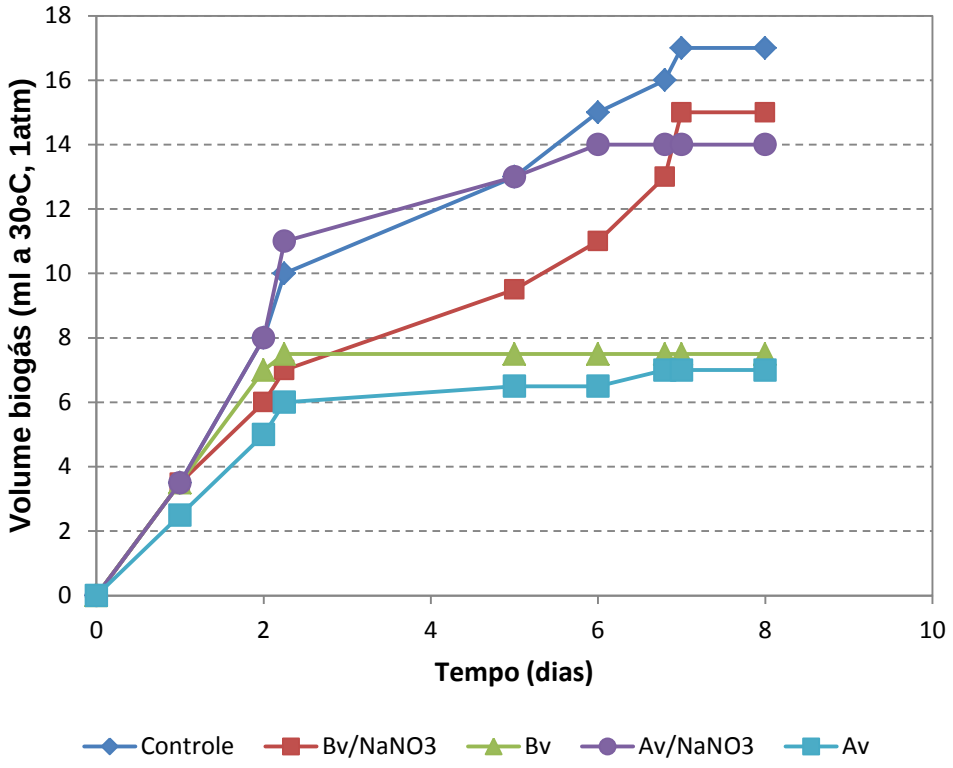


Tabela 4.4. Resultados dos ensaios de biodegradabilidade anaeróbia com lodo livre (Controle) e lodo imobilizado em alginato de sódio (2% m/v), PVA de alta (Av) e baixa (Bv) viscosidade (10% m/v) e cloreto de cálcio combinado ou não com nitrato de sódio.

Experimento	pH inicial	pH final	DQO inicial (mg/L)	DQO final (mg/L)	Volume biogás (mL)	Taxa inicial de produção de biogás (mL biogás/d)[a]
Controle	7,56	6,87	1210	104	17	4,0
PVA Bv c/ $NaNO_3$	7,56	6,51	1210	752	15	3,0
PVA Bvs/ $NaNO_3$	7,56	6,52	1210	992	8	3,5
PVA Av c/ $NaNO_3$	7,56	6,30	1210	1010	14	4,0
PVA Av s/ $NaNO_3$	7,56	6,28	1210	1240	7	2,5

[a] medida em 2 d de incubação.

O experimento controle apresentou remoção de DQO de 91,4% e produção de biogás de 17 mL (equivalente a 170,8 mL biogás/g DQO removida) após 8 dias de incubação a 30ºC. O decaimento do rendimento de biogás (de 331,9 para 284 e 170,8 mL biogás/g DQO removida), assim como da taxa inicial de

produção de biogás (de 7,5 para 5,3 e 4,0 mL/d) ao longo dos três experimentos realizados indica uma alteração da atividade do lodo. No entanto, como a cada lote de experimentos com lodo imobilizado era feito um controle simultâneo com o lodo livre, a comparação dos resultados obtidos ainda é válida.

Em termos de volume final de biogás, verificou-se que a adição de PVA de alta ou baixa viscosidade não fez diferença. Já a adição de nitrato de sódio resultou em maior produção de biogás, verificando-se com PVA de alta e baixa viscosidade sem nitrato valores de 7 e 8 mL após 8 dias de incubação, enquanto com adição de nitrato este valor aumentou para 14-15 mL. Nesta condição, esferas formadas com nitrato de sódio, também se verificou menores valores de DQO final, devido a uma maior resistência do polímero. Enquanto nas esferas formadas sem nitrato de sódio a produção de biogás foi menor provavelmente devido a uma solubilização mais rápida das esferas no meio sintético inibindo as bactérias anaeróbias.

4.3. IMOBILIZAÇÃO EM PVA, ALGINATO DE SÓDIO, CLORETO DE CÁLCIO E NITRATO DE SÓDIO COM CONGELAMENTO – DESCONGELAMENTO

Com a finalidade de aumentar a resistência mecânica das esferas, foi realizado um experimento incluindo o congelamento e descongelamento do gel com o lodo imobilizado, conforme descrito no item 3.2.3. Na Figura 4.8 e Tabela 4.5 são apresentados os resultados (média e desvio padrão) de ensaios conduzidos em duplicata.

Segundo Doria-Serrano et al. (2001), microrganismos oriundos de lodo ativado sedimentado, constituídos por bactérias e fungos, morrem em grande quantidade durante o tratamento de congelamento e descongelamento. No entanto, com um tempo adequado de incubação com glicose como fonte de carbono, a população de bactérias recupera sua atividade e prolifera principalmente dentro do hidrogel.

Figura 4.8. Produção acumulada de biogás com lodo imobilizado em 10% (m/v) PVA $_{Bv,}$ 1% (m/v) de alginato de sódio, 4% (m/v) de cloreto de cálcio e 50% (m/v) de nitrato de sódio com congelamento e descongelamento.

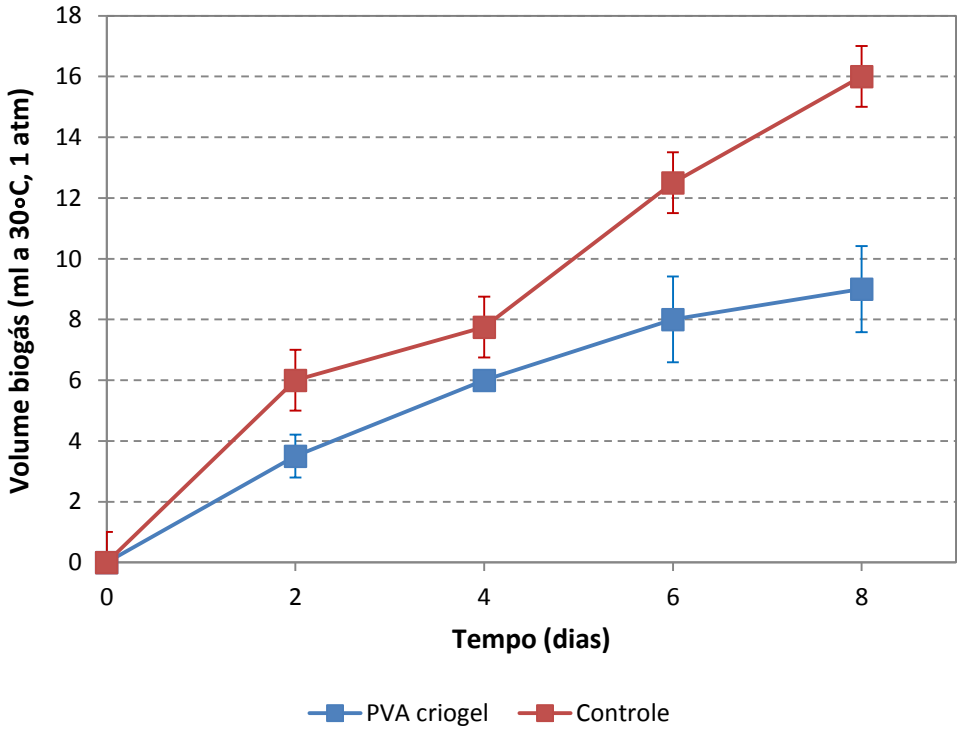


Tabela 4.5. Resultados de ensaios de biodegradabilidade anaeróbia com lodo livre (Controle) e lodo imobilizado com PVA/alginato com congelamento e descongelamento (criogel).

Experimento	pH inicial	pH final	DQO inicial (mg/L)	DQO final (mg/L)	Volume biogás (mL)	Taxa inicial de produção de biogás (mL biogás/d)[a]
Controle	7,53	6,95±0,03	1292	122±7	16,0±1,4	3,0
PVA criogel	7,50	6,69±0,14	1292	1554±37	9,0±1,4	1,8

[a] medida em 2 d de incubação.

No experimento realizado no presente estudo, aparentemente, ocorreu esta recuperação, pois houve produção de biogás. No entanto, as esferas tiveram seu tamanho reduzido a partir do 3º dia até se solubilizarem totalmente no meio sintético a partir do 7º dia, o que se comprova pela elevada DQO final. O resultado esperado, uma maior reticulação do gel de PVA com alginato de cálcio, não foi obtido, verificando-se a dissolução das esferas, uma provável inibição dos microrganismos e a redução da produção de biogás.

Ariga et al. (1987), utilizando somente PVA como uma matriz de gel para a imobilização de microrganismos, submetida a sete ciclos de congelamento-descongelamento, verificaram que a resistência do gel aumentou, mas a atividade das células imobilizadas diminuiu. No presente estudo, a resistência não aumentou, mas a atividade das células também diminuiu.

Cunha (2006) imobilizou *Candida guilliermondii FTI 20037* em matriz de PVA–criogel para bioconversão da xilose presente no hidrolisado hemicelulósico em xilitol e obteve considerável capacidade de obtenção de xilitol em todas as condições experimentais avaliadas, inclusive em temperaturas abaixo de 20ºC, usadas no preparo das esferas. O autor realizou até cinco ciclos de congelamento e descongelamento para obtenção das esferas. Diferentemente do que aconteceu neste estudo, as células não sofreram perda de atividade quando foram expostas às condições de congelamento e descongelamento e a estrutura do criogel não sofreu nenhuma instabilidade.

No estudo de Lozinsky et al. (1996), durante a exposição prolongada a meios aquosos, os criogéis macroporosos de PVA não sofreram alterações indesejáveis significativas. Os géis foram caracterizados pela estabilidade osmótica e mantiveram uma morfologia altamente porosa, apesar do envelhecimento do gel. No presente estudo, ao contrário, os géis de PVA sofreram modificações e dissolução em meio aquoso, que se acentuou com o envelhecimento dos mesmos.

4.4. AVALIAÇÃO DO EFEITO DE VARIÁVEIS DA IMOBILIZAÇÃO

A partir dos resultados obtidos com adição de nitrato – esferas íntegras e menor DQO ao final dos experimentos – foram realizados experimentos de acordo com um planejamento fatorial fracionado 2^{4-1} (conforme Tabela 4.6) para o estudo das condições de imobilização do lodo anaeróbio na matriz de PVA – alginato de cálcio – nitrato de sódio e bioconversão da sacarose do meio sintético em biogás.

Tabela 4.6. Resultados do planejamento fatorial fracionado 2^{4-1} com 3 pontos centrais e 2 réplicas.

Ensaios	Réplicas	Variáveis reais (% m/v)				Variáveis resposta			
		PVA	Alginato	$CaCl_2$	$NaNO_3$	$DQO_{final\ (BV)}$	$DQO_{final\ (AV)}$	Vol. biogás ($_{BV}$)	Vol. biogás ($_{AV}$)
Controle		--	--	--	--	112		17	
1	1	5	1	5	30	1064	1282	8	5
2	1	5	1	15	50	1832	1048	7,5	5
3	1	5	3,5	5	50	2328	1960	9	11
4	1	5	3,5	15	30	2832	1392	7	3
5	1	15	1	5	50	2624	3542	9	4
6	1	15	1	15	30	3032	3514	6	4
7	1	15	3,5	5	30	3544	1109	9	6
8	1	15	3,5	15	50	3416	1235	5,5	3
9	1	10	2,25	10	40	1352	2128	6	6
10	1	10	2,25	10	40	1480	1664	5	7
11	1	10	2,25	10	40	1836	1864	7	9
1	2	5	1	5	30	1184	1136	9	8
2	2	5	1	15	50	2288	1161	7	5
3	2	5	3,5	5	50	2664	2120	7	8
4	2	5	3,5	15	30	3064	1312	5	3
5	2	15	1	5	50	2064	3160	10	4
6	2	15	1	15	30	3312	3392	5	6
7	2	15	3,5	5	30	3496	1096	5	9
8	2	15	3,5	15	50	3408	1240	6	3
9	2	10	2,25	10	40	1520	1754	5	7
10	2	10	2,25	10	40	1245	1736	6	7
11	2	10	2,25	10	40	1488	1584	6	10

A DQO inicial da solução sintética foi de 1255mg/L.

O emprego de ferramentas matemáticas no estudo de bioconversões microbianas é importante porque otimiza o número de experimentos necessários na busca de respostas e permite também avaliar um elevado número de variáveis ao mesmo tempo.

As variáveis independentes estudadas foram concentração de PVA, concentração de alginato de sódio, concentração de cloreto de cálcio e concentração de nitrato de sódio, enquanto as variáveis dependentes foram o volume de biogás produzido e a demanda química de oxigênio final. Os experimentos foram feitos em duplicata, com PVA de alta e baixa viscosidade para comparação de resultados. Os níveis de cada ensaio e os resultados de DQO final e produção de biogás para ambos os PVA avaliados estão na Tabela 4.6.

4.4.1. Análise da produção de biogás

Com o auxílio do programa Statistica 7.0, tendo o nível de significância de 10% ($p \leq 0,1$), a Tabela 4.7 apresenta a significância dos efeitos das variáveis independentes testadas, assim como a natureza dos efeitos, positivos ou negativos, para o planejamento empregando PVA de baixa viscosidade, tendo como variável dependente a produção de biogás.

Tabela 4.7. Análise estatística do efeito das variáveis sobre a produção de biogás com PVA de baixa viscosidade.

	Efeito	Erro Padrão	T(16)	p
Média	7,18750	0,27018	26,60249	0,000000
Curvatura	-2,8750	1,03471	-2,77854	0,013422
PVA BV	-0,5000	0,54036	-0,92530	0,368554
Alginato de sódio	-1,0000	0,54036	-1,85061	0,082778
$CaCl_2$	-2,1250	0,54036	-3,93254	0,001189
$NaNO_3$	0,87500	0,54036	1,61928	0,124927

É possível observar, na Tabela 4.7, que as concentrações de alginato de sódio e cloreto de cálcio apresentaram um efeito significativo negativo. Já a concentração de nitrato de sódio apresentou efeito positivo, marginalmente

significativo. A variável concentração de PVA de baixa viscosidade não mostrou significância.

Conforme a análise de efeitos (Tabela 4.7), maiores valores de produção de biogás serão obtidas quando as concentrações de alginato e cloreto de cálcio estiverem no nível inferior, 1% e 5%, respectivamente. Para a variável nitrato de sódio maiores valores de produção de biogás serão obtidos com a maior concentração de nitrato de sódio empregada, 50% (m/v).

A Tabela 4.8 apresenta os valores obtidos para a variável resposta remoção de DQO. Conforme a análise da tabela, a concentração de alginato de sódio, a concentração de cloreto de cálcio e a concentração de PVA apresentaram efeito positivo, indicando que maior DQO final será obtida com as maiores concentrações de alginato de sódio (3,5%), de cloreto de cálcio (15%) e PVA (15%). Para obter menor DQO final estas variáveis devem ser fixadas no nível inferior. A variável concentração de nitrato de sódio não mostrou significância.

Tabela 4.8. Análise estatística do efeito das variáveis sobre a DQO final com PVA de baixa viscosidade

	Efeito	Erro Padrão	T(16)	p
Média	2634,50	73,5586	35,81500	0,000000
Curvatura	-2295,3	281,707	-8,14792	0,000000
PVA	955,00	147,117	6,49143	0,000007
Alginato de sódio	919,00	147,117	6,24672	0,000012
$CaCl_2$	527,00	147,117	3,58218	0,002491
$NaNO_3$	-113,00	147,117	-0,76810	0,453618

Considerando o estudo estatístico utilizando o PVA de alta viscosidade foram obtidos os resultados apresentados nas Tabelas 4.9 e 4.10. É possível observar na Tabela 4.9 que a concentração de cloreto de cálcio apresentou um efeito significativo negativo. As variáveis concentração de nitrato de sódio, concentração de PVA e concentração de alginato de sódio não mostraram significância. Conforme a análise da Tabela 4.9, maior produção de biogás será obtida com as menores concentrações de cloreto de cálcio (5%).

Tabela 4.9. Análise estatística do efeito das variáveis sobre a produção de biogás com PVA de alta viscosidade.

	Efeito	Erro Padrão	T(16)	p
Média	5,40625	0,47958	11,27279	0,000000
Curvatura	4,52083	1,83666	2,46143	0,025580
PVA AV	-1,0625	0,95916	-1,10773	0,284353
Alginato de sódio	0,68750	0,95916	0,71677	0,483850
$CaCl_2$	-2,9375	0,95916	-3,06255	0,007441
$NaNO_3$	-0,1875	0,95916	-0,19548	0,847477

Conforme a análise da Tabela 4.10, a concentração de PVA AV apresentou efeito positivo, indicando que maior DQO final será obtida com as maiores concentrações de PVA AV (15%). A variável concentração de alginato de sódio apresentou efeito negativo, indicando que a maior DQO final será obtida com as menores concentrações de alginato (1%). Para menores valores de DQO final deverá ser usado PVA no nível inferior e alginato no nível superior. As variáveis concentração de nitrato de sódio e concentração de cloreto de cálcio não mostraram significância.

Tabela 4.10. Análise estatística do efeito das variáveis sobre a DQO final com PVA de alta viscosidade

	Efeito	Erro Padrão	T(16)	p
Média	1856,18	180,237	10,29855	0,000000
Curvatura	-135,70	690,258	-0,19661	0,846612
PVA AV	859,625	360,475	2,38470	0,029813
Alginato de sódio	-846,37	360,475	-2,34794	0,032066
$CaCl_2$	-138,87	360,475	-0,38525	0,705122
$NaNO_3$	154,125	360,475	0,42756	0,674670

No estudo de Dong et al. (2017), quando a concentração de cloreto de cálcio era baixa, as esferas imobilizadas eram macias e facilmente quebradas. À medida que a concentração de cloreto de cálcio aumentou, a atividade celular microbiana das bactérias nitrificantes diminuiu devido à alta pressão osmótica do sal, que causa desidratação celular e reduz a atividade microbiana. A concentração ideal de cloreto de cálcio encontrada no estudo foi de 1 %. O resultado do planejamento experimental deste estudo, tanto para PVA de baixa

quanto para PVA de alta viscosidade, também indica que maiores valores de produção de biogás serão obtidos quando as concentrações de cloreto de cálcio estiverem no nível inferior (5 %), aumentando a atividade microbiana em comparação às condições com valores maiores. Possivelmente, melhores resultados poderiam ser obtidos com concentração menor que 5 %.

No estudo da concentração de alginato de sódio, Dong et al. (2017) observaram que quanto maior a concentração de alginato de sódio, maior a força das esferas com células imobilizadas. Se a concentração fosse muito alta, as células imobilizadas não cresciam, e se a concentração fosse muito baixa, as esferas se rompiam. Os autores apontaram uma concentração ótima de 1,1% (m/v) para alginato de sódio, valor similar ao indicado no presente estudo. O planejamento experimental mostrou um efeito negativo da concentração de alginato de sódio no PVA de baixa viscosidade, sobre a produção de biogás, indicando o uso do valor inferior (1 %).

De acordo com Dong et al. (2017), a concentração ideal de imobilização foi 12% (m/v) de PVA, 1,1% (m/v) de alginato de sódio e 1 % (m/v) de cloreto de cálcio. O autor concluiu que quanto maior a concentração de álcool polivinílico, maior a força das esferas com células imobilizadas. No entanto, o aumento da viscosidade tornou a operação mais difícil e prejudicial à transferência de massa e ao crescimento de bactérias. No presente trabalho, os PVAs de baixa e alta viscosidade não afetaram a produção de biogás, porém, para diminuir a DQO final do sistema, o PVA deve estar no nível inferior (5 %).

O aumento da DQO final com o aumento da concentração de PVA usado ocorre devido a deterioração das esferas ao longo do tempo de digestão anaeróbia, podendo a porção de PVA dissolvido ter inibido as arqueias metanogênicas e reduzido a geração de metano, além de aumentar a DQO final. O planejamento experimental indicou também que deve se manter um valor inferior da concentração de alginato de sódio e cloreto de cálcio quando o PVA é de baixa viscosidade. Pode-se dizer que, como nos casos anteriores, uma alta concentração de cloreto de cálcio exerce uma alta pressão osmótica que inibe os microrganismos. Uma outra contribuição para a diminuição do crescimento dos microrganismos pode ser causada por uma alta concentração de alginato, por aumentar a força da esfera (DONG et al., 2017). Além disto,

caso a esfera sofra degradação, maiores concentrações de compostos orgânicos serão liberadas no meio, aumentando a DQO.

A determinação da composição do biogás por cromatografia em fase gasosa revelou os valores apresentados na Tabela 4.11 para amostras coletadas em algumas condições avaliadas no planejamento com PVA de alta viscosidade e em todas as amostras do planejamento com PVA de baixa viscosidade. Verifica-se que a produção de metano só é percebida na condição controle, com células livres, comprovando a inibição completa das arqueias metanogênicas nas esferas com lodo imobilizado. Com relação ao conteúdo de CO_2 no biogás, que seria produzido durante a fase ácida da digestão anaeróbia, ocorre uma variação entre as condições, verificando-se maiores valores nas condições 7 e 9 do planejamento com PVA AV e nas condições 5 e 9 do planejamento com PVA BV. Nestas condições, provavelmente, as esferas apresentaram maior difusão da fonte de carbono do meio para o seu interior, iniciando a degradação das mesmas na fase ácida, enquanto nas demais condições, praticamente sem CH_4 e sem CO_2, a degradação pode nem ter iniciado por conta da baixa difusão da fonte de carbono. Quanto ao H_2S, este não foi detectado, conforme o esperado, pois a solução sintética não apresentação sulfato em sua composição.

Tabela 4.11. Composição de amostras de biogás (CG) coletadas ao final dos experimentos conduzidos nos planejamentos experimentais com lodo imobilizado em PVA de alta e baixa viscosidade.

Experimentos	Planej. Exp. com PVA AV			Planej. Exp. com PVA BV		
	$\%CH_4$	$\%CO_2$	$\%H_2S$	$\%CH_4$	$\%CO_2$	$\%H_2S$
Controle	29,76	6,23	0,01	25,67	6,33	0
1	0,05	0,56	0,01	0,28	3,48	0
2	--	--	--	0,53	3,39	0
3	0,05	0,91	0,01	0,02	1,12	0
4	--	--	--	0,02	1,59	0
5	0,05	1,91	0,01	0,82	10,18	0
6	0,05	1,35	0,01	0,02	9,37	0
7	0,24	18,66	0,01	0,16	8,25	0
8	--	--	--	0,03	6,89	0
9	2,11	15,62	0,01	0,02	13,88	0
10	--	--	--	0,02	8,53	0
11	--	--	--	0,02	9,13	0

De acordo com Chaikasem et al. (2014), o aumento da concentração de ácidos graxos voláteis no sistema anaeróbio afeta negativamente a atividade dos microrganismos e, em particular, as arqueias metanogênicas, inibindo a produção de metano. A medida de alcalinidade e acidez volátil no meio foi realizada em uma amostra de meio sintético, coletada após sete dias de incubação de esferas imobilizadas em 5% (m/v) de PVA, 1% (m/v) de alginato de sódio, 5% de cloreto de cálcio e 30% de nitrato de sódio e lodo e em uma amostra da solução sintética inicial (meio inicial), para comparação dos resultados (Tabela 4.12). A solução sintética inicial apresentava baixa concentração de ácidos voláteis e maior alcalinidade, resultando em uma relação AV/Alc de 0,46, valor aceitável para condução da digestão anaeróbia. Chernicharo (2007) recomenda valores entre 0,1 e 0,5 para manutenção de uma boa atividade metanogênica. Enquanto a amostra coletada no experimento com esferas imobilizadas apresenta praticamente a mesma alcalinidade inicial, mas um aumento considerável da acidez (4 vezes mais). Este resultado indica que a digestão anaeróbia foi paralisada ainda na fase ácida, com acúmulo de ácidos voláteis, redução do pH do meio e inibição da produção de metano, corroborando os resultados de composição de biogás apresentados na Tabela 4.11.

Tabela 4.12. Concentração de ácidos voláteis e alcalinidade na solução sintética inicial e no meio da condição 1 do planejamento experimental com PVA_{BV}, após 7 dias de incubação a 30ºC.

Experimento	pH	Alcalinidade (mg $CaCO_3$/L)	Acidez volátil (mg HAc/L)	AV/Alc
Solução sintética	7,67	936	426	0,46
Meio após 10 dias de incubação	6,39	1074	1817	1,69

4.5. OBSERVAÇÃO EM MICROSCÓPIO ELETRÔNICO DE VARREDURA (MEV)

A microscopia eletrônica de varredura é uma técnica que produz imagens (micrografias) de alta resolução para investigar a estrutura superficial das amostras (FERNANDES, 2016). Esta técnica foi empregada para avaliação das superfícies de géis de PVA/alginato de sódio em solução de cloreto de cálcio e

nitrato de sódio, na condição usada na seção 4.2.2 que apresentou melhores resultados. O MEV foi realizado a baixo vácuo, de acordo com Hinrichs & Vasconcellos (2014) e conforme descrito na seção 3.4.5.

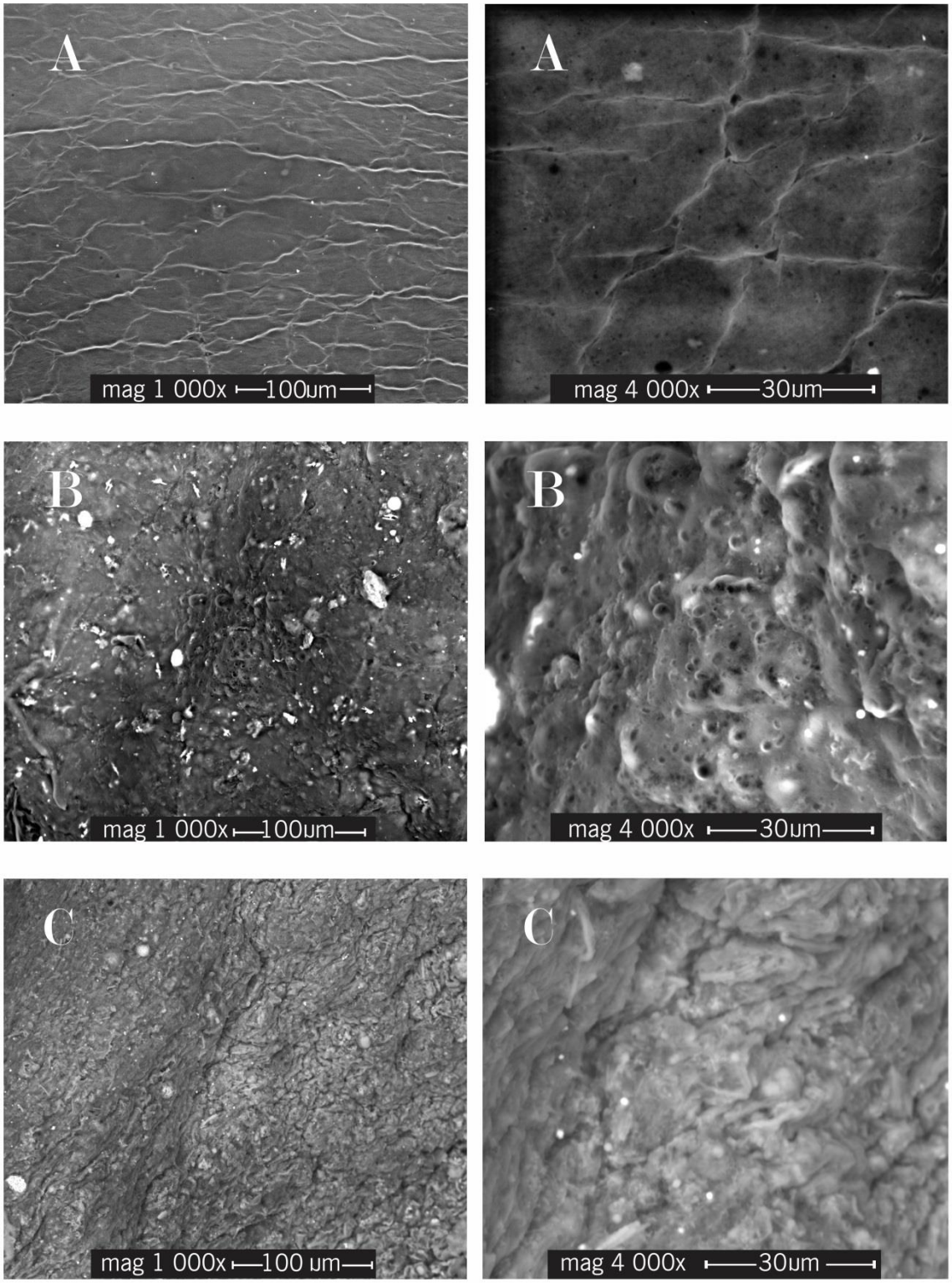
Imagens com aumentos de 1000x e 4000x dos géis estocados em água destilada sem lodo anaeróbio (A), com lodo anaeróbio e sem uso (B) e após cinco dias de incubação (C) a 30ºC em meio sintético são apresentadas na Figura 4.9, para visualização da morfologia externa das esferas. Nota-se que na imagem da esfera pura, sem lodo, aparecem fissuras e uma superfície mais lisa e regular, quando comparada com a superfície da esfera com lodo imobilizado que apresenta alguns pontos escuros que poderiam ser poros. As imagens do gel com lodo imobilizado sem uso apresenta uma superfície rugosa e alguns poros e nas imagens de esferas com lodo após cinco dias de incubação em meio sintético aparece uma superfície mais rugosa, possivelmente devido à perda de água para o meio externo, com poucos poros. Esse dado pode ser significativo, pois uma estrutura mais compacta e menos porosa reduz consideravelmente a assimilação do substrato pelo lodo imobilizado, como descrito na seção 4.2.2, limitando a sua difusividade e dificultando a liberação de biogás para o meio externo.

Os pontos brancos podem ser devido ao excesso de algum componente em determinados pontos da esfera. Foi detectado um pico de enxofre, que deverá ser melhor investigado.

As imagens da Figura 4.9 mostram que a estrutura de PVA tinha poucos microporos, sem tamanho uniforme, na camada externa dos géis. A presença de microporos tornaria o gel adequado para a imobilização de células microbianas, já que esses poros são os responsáveis pela passagem de água do meio externo para o meio interno do gel. A imagem também indicou que lodo anaeróbio foi imobilizado com sucesso em géis de PVA.

No caso dos géis de PVA, pôde-se observar, com o auxílio da microscopia eletrônica de varredura, que as imagens mostram mudanças na estrutura (morfologia) do gel, como resultado da exposição prolongada da amostra ao meio sintético (Figura 4.9 C).

Figura 4.9. Imagens de MEV de baixo vácuo, com aumentos de 1000X e 4000x, de géis contendo PVA, alginato de sódio, cloreto de cálcio e nitrato de sódio. Sem lodo anaeróbio (A), com lodo estocado em água destilada (B) e com lodo, coletados após 5 dias de incubação (C) em meio sintético a 30ºC.



Fernandes (2016) encontrou características adequadas na MEV de hidrogéis de nanocompósitos à base de polissacarídeo. As amostras foram purificadas e foram recobertas com uma fina camada de ouro, aumentando o contraste das imagens. Foram utilizados aumentos de 100x; 500x; 1000x; 5000x; 10000x; 20000x; 30000x. À medida que a magnitude de ampliação das micrografias foi aumentando era possível observar entre as cadeias do hidrogel a presença de cavidades (poros). Tais poros não possuíam tamanho uniforme, ou seja, exibiam tamanhos diferentes uns dos outros. Estes poros são os que fornecem a passagem da água do meio externo para o interior dos hidrogéis e vice-versa.

Idris et al. (2008) utilizou MEV de baixo vácuo com aumentos de 150x, 500x e 650x para análise das estruturas de PVA-alginato reticulados por ácido bórico, sendo as esferas de PVA-alginato cortadas com uma faca cirúrgica. As pérolas foram colocadas posteriormente em um suporte e as imagens em seção transversal foram obtidas. Os resultados mostraram que as estruturas das esferas de PVA-alginato retratavam camadas de polímeros reticulados formados dentro do gel. Uma camada instável na estrutura foi observada, possivelmente devido a uma quantidade insuficiente de reticulante (ácido bórico) na formação do polímero. Com quantidade adequada de reticulante as imagens mostravam uma estrutura estável, com camadas uniformemente distribuídas. Em uma outra amostra, a superfície da esfera parecia ser grosseira e desigual, provavelmente devido à presença de excesso de reticulante. Por fim, quando foi usada uma concentração menor de PVA observou-se poros formados na superfície externa das esferas uniformemente distribuídos com um tamanho médio regular.

Cunha (2006) avaliou as esferas de PVA por MEV e observou uma estrutura altamente porosa característica das esferas de álcool polivinílico, contribuindo para uma maior contenção de células e maior transferência de massa entre o meio e as células situadas em regiões mais internas das esferas.

4.6. ESPECTROSCOPIA DE ENERGIA DISPERSIVA DE RAIOS-X (EDS)

De acordo com Fernandes (2016), a Espectroscopia de Energia Dispersiva de Raios-X (EDS) é uma técnica analítica semiquantitativa utilizada para determinar a fração elementar presente em uma amostra através da interação

entre radiações eletromagnéticas (de comprimentos de onda específicos) com a matéria.

A EDS da superfície das amostras analisadas no presente estudo revelou a composição dos géis em sua superfície. A diferença na porcentagem em massa de cada elemento, quantificada na superfície da amostra, é mostrada na Tabela 4.13. A amostra utilizada na análise EDS era composta de 10% (m/v) de PVA, 1% (m/v) de alginato de sódio, 4% (m/v) de cloreto de cálcio e 50% (m/v) de nitrato de sódio. Nos géis de PVA sem lodo imobilizado verifica-se a presença de carbono e oxigênio em maiores percentuais, uma vez que as estruturas de alginato de sódio e PVA possuem os elementos carbono e oxigênio. Sódio e cálcio estão presentes em menor quantidade devido ao alginato de sódio e às reticulações feitas nas cadeias dos géis. O aparecimento da prata é devido ao material utilizado para fixar o gel na peça do equipamento. Nos géis com lodo imobilizado aparecem carbono, oxigênio, cálcio e prata, e mais ferro, alumínio e enxofre, provavelmente do lodo. No entanto, ao contrário do esperado, nitrogênio e fósforo não foram detectados. Estes macronutrientes também estariam na composição do lodo. Nos géis com lodo imobilizado após 5 dias de incubação verifica-se a presença de carbono, oxigênio, cálcio, ferro, alumínio, prata, enxofre, nitrogênio e fósforo. Alumínio, ferro e enxofre provavelmente estão na composição do lodo anaeróbio imobilizado no gel. Enquanto fósforo e nitrogênio provavelmente foram incorporados do meio sintético.

Tabela 4.13. Composição de cada elemento no gel de PVA, sem lodo imobilizado, com lodo imobilizado estocado em água destilada e após 5 dias de incubação em meio sintético.

Elemento	Massa (%)		
	PVA sem lodo	PVA com lodo estocado em água	PVA com lodo após 5 d incubação
Carbono	41,73	48,52	33,08
Oxigênio	42,31	31,71	42,10
Cálcio	6,11	7,42	7,72
Ferro	nd	4,08	6,42
Alumínio	0,46	3,86	0,26
Prata	2,40	2,42	1,59
Enxofre	nd	1,99	2,14
Nitrogênio	nd	nd	3,41
Silício	nd	nd	0,13
Fósforo	nd	nd	3,16
Sódio	4,58	nd	nd
Cloro	2,42	nd	nd

nd = não detectado.

5. CONCLUSÕES E SUGESTÕES

5.1. CONCLUSÕES

- O gotejamento da suspensão de PVA (6% m/v), alginato de sódio (2% m/v) e lodo anaeróbio em solução de cloreto de cálcio formou hidrogéis na forma de esferas, frágeis e pouco estáveis;
- O aumento da concentração de PVA para 10% (m/v) contribuiu para estruturas uniformes, com diâmetro médio de 3 a 4 mm, sem aglomerações, mais consistentes e estáveis, possivelmente em consequência de uma maior resistência mecânica do gel;
- Nas esferas imobilizadas com nitrato de sódio como agente para aumento de resistência física do polímero, verificou-se que estas mantiveram-se íntegras durante 10 dias, tempo maior que os 7 dias da condição com somente cloreto de cálcio, demonstrando uma maior resistência mecânica do polímero PVA/alginato de sódio com a adição de nitrato de sódio;
- A adição de PVA de alta ou baixa viscosidade não fez diferença nas propriedades do polímero formado ou na produção de biogás;
- O congelamento e descongelamento do gel com o lodo imobilizado não aumentou a resistência mecânica das esferas, verificando-se a dissolução das mesmas, inibição dos microrganismos e redução da produção de biogás;
- O planejamento fatorial fracionado para o estudo das condições de imobilização do lodo anaeróbio na matriz de PVA – alginato de cálcio – nitrato de sódio indicou que, para a produção de biogás, concentrações de alginato e cloreto de cálcio apresentavam efeito negativo, enquanto a variável nitrato de sódio apresentou efeito positivo;
- No entanto, apesar da técnica de planejamento experimental identificar o efeito das variáveis da imobilização, não foi possível obter uma indicação de condições que levassem a resultados semelhantes aos obtidos pela biodegradação com lodo livre em termos de DQO final, volume de biogás e concentração de metano no biogás;
- Nos ensaios de produção de biogás a partir de solução sintética como

fonte de carbono e lodo anaeróbio, as esferas de PVA/alginato de sódio com lodo imobilizado produziram um volume de biogás menor que no controle (com células livres) devido a uma possível limitação difusional provocada pelo método de reticulacão e inibição causada pela dissolução da matriz de PVA/alginato de sódio, comprovada pelo aumento da DQO final;

- A matriz polimérica apresentou, em geral, uma resistência mecânica não prolongada, pouca durabilidade em alguns casos e baixa difusividade, dificultando a assimilação de substratos presentes no meio sintético;
- As análises de microscopia eletrônica de varredura de baixo vácuo permitiram observar a presença de poros na superfície das esferas contendo o lodo anaeróbio e alteração desta estrutura após incubação no meio sintético;
- Os resultados revelaram que o método de imobilização de lodo anaeróbio em matriz de PVA/alginato de sódio não se mostrou uma alternativa viável, devendo ser melhorado para aumentar a resistência e difusividade das esferas.

5.2. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Avaliar outros métodos de preparo da matriz PVA/alginato e de reticulação com nitrato de sódio que permitam sua utilização por longos períodos, sem solubilização, em meios sintéticos e em efluentes reais;
- Avaliar outros métodos de imobilização de lodo anaeróbio;
- Avaliar condições operacionais para utilização da matriz PVA/alginato em reatores anaeróbios, em especial o reator UASB.

REFERÊNCIAS

AHMED, E. M. (2015). **Hydrogel: Preparation, characterization, and applications: a review**. *Journal of Advanced Research*, *6*(2), 105–121. Disponível em <https://doi.org/10.1016/j.jare.2013.07.006> Acesso em Ago 2017.

ALE BORJA, N. et al. (2015). **Estudio de la cinética de biosorción de plomo (II) en alga *Ascophyllum nodosum***. *Rev. Soc. Quím.* 81(3). Disponivel em <http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1810634X2015000300003&lng=es&nrm=iso>. Acesso em set. 2017.

ALI SHAH, F. et al. (2014). **Microbial ecology of anaerobic digesters: The key players of anaerobiosis**. *The Scientific World Journal*. Disponível em <https://doi.org/10.1155/2014/183752> Acesso em Ago 2017.

ANGENENT, L. T. et al. (2004). **Production of bioenergy and biochemicals from industrial and agricultural wastewater**. *Trends in Biotechnology*, *22*(9), 477–485. Disponível em <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2004.07.001> Acesso em Ago 2017.

APHA (2005). **Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater**. Washington DC: American Public Health Association.

ARANHA, I. B. & LUCAS, E. F. (2001). **Poli (Álcool Vinílico) modificado com cadeias hidrocarbônicas : Avaliação do balanço hidrófilo / lipófilo**. Polímeros: Ciência e Tecnologia, vol. 11, nº 4, p. 174-181.Disponivel em <http://www.revistapolimeros.org.br>Acesso em Jul 2017.

ARIGA, O. et al. (1987). **Immobilization of microorganisms with PVA hardened by iterative freezing and thawing.** *Journal of Fermentation Technology*, *65*(6), 651–658. Disponível em <https://doi.org/10.1016/0385-6380(87)90007-0> Acesso em Ago 2017.

CHAIKASEM, S. et al. (2014). **Effect of polyvinyl alcohol hydrogel as a biocarrier on volatile fatty acids production of a two-stage thermophilic anaerobic membrane bioreactor**. *Bioresource Technology*, *168*, 100–105. Disponível em <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.04.023> Acesso em Ago 2017.

CHAN, Y. J. et al. (2009). **A review on anaerobic-aerobic treatment of industrial and municipal wastewater.** *Chemical Engineering Journal*, *155*(1–

2), 1–18. Disponível em <https://doi.org/10.1016/j.cej.2009.06.041> Acesso em Ago 2017.

CHANG, C. C. & TSENG, S. K. (1998). **Immobilization of Alcaligenes eutrophus using PVA crosslinked with sodium nitrate**. *Biotechnology Techniques*, *12*(12), 865–868. Disponível em <https://doi.org/10.1023/A:1008895525476> Acesso em Ago 2017.

CHEN, K.-C. & LIN, Y.-F. (1994). **Immobilization of microorganisms with phosphorylated polyvinyl alcohol (PVA) gel**. *Enzyme and Microbial Technology*, *16*(1), 79–83. Disponível em <https://doi.org/10.1016/0141-0229(94)90113-9> Acesso em Jul 2017.

CHEN, Y. et al. (2008). **Inhibition of anaerobic digestion process: A review. *Bioresource Technology*,** *99*(10), 4044–4064. Disponível em <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2007.01.057> Acesso em Ago 2017.

CHERNICHARO, C. A. L. (2007). **Reatores anaeróbios: Princípios do tratamento biológico de águas residuárias**. 2 ed. Belo Horizonte: DESA/ UFMG, v. 5.

CHING, S. H. et al. (2015). **Alginate gel particles- a review of production techniques and physical properties.** *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, *8398*(September), 00–00. Disponível em <https://doi.org/10.1080/10408398.2014.965773> Acesso em Ago 2017.

COVIZZI, L. G. et al. (2007). **Imobilização de células microbianas e suas aplicações biotecnológicas.** *Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas*, *28*(2), 143. Disponível em <https://doi.org/10.5433/1679-0375.2007v28n2p143> Acesso em Jun 2017.

CUNHA, M. A. A. et al. (2005). **Uso de células imobilizadas em gel de PVA : uma nova estratégia para produção biotecnológica de Xilitol a partir de bagaço de cana-de-açúcar.** *Semina: Ciências Agrárias, Londrina*, *26*(1), 61–70. Disponível em <https://doi.org/10.5433/1679-0359.2005v26n1p61> Acesso em Mai 2017.

CUNHA, M. A. A. (2006) **Bioprodução de xilitol a partir de hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar em sistemas com células de *Candida guillermondii* imobilizadas em hidrogéis de álcool polivinílico**. 105f Tese

doutorado em Biotecnologia Industrial - Universidade de São Paulo. Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo. Disponivel em <https://sistemas.eel.usp.br/bibliotecas/antigas/2006/BIT06008.pdf> Acesso em Jun.2017

DAMASCENO, F. R. C. (2013) **Aplicação de preparado enzimático e biossurfactante no tratamento anaeróbio de efluente com alto teor de gordura**. Tese de doutorado. Universidade Federal do Rio de janeiro, Rio de Janeiro, 178p. Disponivel em < http://186.202.79.107/download/biossurfatante-no-tratamento-anaerobio-de-efluente-com-alto-teor-de-gordura.pdf> Acesso em Jul2017.

DEVI, S. & SRIDHAR, P. (2000) **Production of cephamycin C in repeated batch operations from immobilized *Streptomyces clavuligerus***. *Process Biochemistry*, 36(3), 225-231. Disponivel em <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0032959200001941> Acesso em Ago 2017.

DONG, Y. et al. (2017). **Immobilization of ammonia-oxidizing bacteria by polyvinyl alcohol and sodium alginate**. *Brazilian Journal of Microbiology*, 1–7. Disponível em <https://doi.org/10.1016/j.bjm.2017.02.001> Acesso em Ago 2017.

DORIA-SERRANO, M. C. et al. (2001). **Physical characteristics of poly(vinyl alcohol) and calcium alginate hydrogels for the immobilization of activated sludge.** *Biomacromolecules*, *2*(2), 568–574. Disponível em <https://doi.org/10.1021/bm015514k> Acesso em Ago 2017.

DUARTE, J. G. (2013) **Hidrólise Enzimática e Digestão Anaeróbia Termofílica de Efluente de Indústria de Pescado**. 102 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro. Disponivel em < http://objdig.ufrj.br/61/dissert/803451.pdf>. Acesso em Jul. 2017

FERNANDES, R. da S. (2016) **Síntese e caracterização de hidrogéis nanoestruturados contendo argila e zeólita com potencialidade de aplicação em sistemas de liberação controlada de fármacos** Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista. Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira. Disponivel em < https://repositorio.unesp.br/bitstream/handle/11449/138276/fernandes_rs_me_ilha.pdf?sequence=3>. Acesso em Ago. 2017.

GARCÍA, A. B. (2016) **Produção de biohidrogênio a partir de efluentes da produção de biodiesel.** Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Rio de janeiro, Rio de Janeiro, 178p.

GHANGREKAR, M. M. et al. (1996). **Experience with UASB reactor start-up under different operating conditions.** *Water Science and Technology*, *34*(5–6–6 pt 3), 421–428. Disponível em <https://doi.org/10.1016/0273-1223(96)00674-9> Acesso em Ago 2017.

HASHIMOTO, S. & FURUKAWA, K. (1987). **Immobilization of activated sludge by PVA - boric acid method**. *Biotechnology and Bioengineering*, *30*(1), 52–59. Disponível em <https://doi.org/10.1002/bit.260300108> Acesso em Ago 2017.

HASSAN, C. M., & PEPPAS, N. A. (2000). **Structure and Applications of Poly(vinyl alcohol) Hydrogels Produced by Conventional Crosslinking or by Freezing/Thawing Methods.** *Biopolymers ·PVA Hydrogels, Anionic Polymerisation Nanocomposites*, *153*, 37–65. Disponivel em <https://doi.org/10.1007/3-540-46414-X_2> Disponivel em Jul. 2017.

HINRICHS, Ruth & VASCONCELLOS, M. A.Z. (2014) **Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) em Baixo Vácuo**. In: Técnicas instrumentais não destrutivas aplicadas a gemas do Rio Grande do Sul. Porto Alegre : IGeo/UFRGS, p. 93-106. Disponível em <http://hdl.handle.net/10183/107347> Acesso em Ago. 2017.

HORI, T. et al. (2006). **Dynamic transition of a methanogenic population in response to the concentration of volatile fatty acids in a thermophilic anaerobic digester.** *Applied and Environmental Microbiology*, *72*(2), 1623–1630. Disponível em <https://doi.org/10.1128/AEM.72.2.1623> Acesso em Ago 2017.

HUA, S. et al. (2010). **pH-sensitive sodium alginate/poly(vinyl alcohol) hydrogel beads prepared by combined Ca^{2+} crosslinking and freeze-thawing cycles for controlled release of diclofenac sodium**. *International Journal of Biological Macromolecules*, *46*(5), 517–523. Disponível em <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2010.03.004> Acesso em Ago 2017.

IDRIS, A. et al. (2008). **Immobilization of Baker's yeast invertase in PVA-alginate matrix using innovative immobilization technique**. *Process Biochemistry*, 43(4), 331–338.Disponivel em

<https://doi.org/10.1016/j.procbio.2007.12.008.. Ago. 2017.

IMAI, K., et al (1986) **Immobilization of enzyme into poly(vinyl alcohol) membrane**. Biotechnology and Bioengineering, New York, v. 28, p. 1721-1726.

KISPERGHER, E. M. (2013). **Digestão anaeróbia de efluentes da indústria de alimentos.** Dissertação Programa de Pós- Graduação em Engenharia de Alimentos, Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná, 102p. Disponivel em <http://www.posalim.ufpr.br/Pesquisa/pdf/Disserta%20EDUARDO%20KISPERGHER.pdf>. Acesso em Jul. 2017.

KOURKOUTAS, Y. et al. (2004). **Immobilization technologies and support materials suitable in alcohol beverages production**: A review. *Food Microbiology*, *21*(4), 377–397. Disponível em <https://doi.org/10.1016/j.fm.2003.10.005> Acesso em Ago 2017.

KRUMOVA, M. et al. (2000). **Effect of crosslinking on the mechanical and thermal properties of poly(vinyl alcohol)**. *Polymer*, *41*(26), 9265–9272. Disponível em <https://doi.org/10.1016/S0032-3861(00)00287-1> Acesso em Ago 2017.

LEIMANN, F. V. (2008) **Microencapsulação de óleo essencial de capim-limão utilizando o processo de coacervação simples**. 2008. 120 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florionópolis. Disponivel em < http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_nlinks&ref=000145&pid=S0100-69162014000500017000015&lng=pt> Acesso em Jul. 2017.

LOZINSKY, V. I. et al. (1996). **Swelling behavior of poly(vinyl alcohol) cryogels employed as matrices for cell immobilization**. *Enzyme and Microbial Technology*, *18*(8), 561–569. Disponível em <https://doi.org/10.1016/0141-0229(95)00148-4> Acesso em Ago 2017.

LOZINSKY, V. I. et al. (2003) **Polymeric cryogels as promising materials of biotechnological interest.** *Trends in Biotechnology* 21(10), 445-451. Disponível em <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2003.08.002> Acesso em Ago 2017.

MARIOT, S. C. et al. (2013). **Estimativa de geração de biogás por digestor**

anaeróbio tratando efluente de uma indústria processadora de produtos cárneos. Encontro Latinoamericano de Edificações e Comunidades Sustentáveis. Disponível em <http://www.elecs2013.ufpr.br/inscricoes/index.php/elecs/PRINCIPAL/paper/view/180/2> Acesso em Dez. 2016.

MCCARTY, P. L. (1964). **Anaerobic Waste Treatment Fundamentals.** *Chemistry and microbiology*, *95*(9), 107–112. Disponível em <https://doi.org/10.1300/J118v09n01_08> Acesso em Ago 2017.

MILESSI, T. S. D. S. (2012). **Imobilização de células de Scheffersomyces stipitis para obtenção de etanol de segunda geração em biorreator STR tipo cesta.** Dissertação de Mestrado - Universidade de São Paulo (USP). Escola de Engenharia de Lorena.

MIQUELETO, A. P. (2003). **Comportamento de reator anaeróbio operado em batelada seqüencial, contendo biomassa imobilizada e submetido a aumento progressivo da concentração de substrato de fácil degradação**. *Dissertação* (Mestrado) – Escola de Engenharia de São Carlos da Universidade de São Paulo. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Civil - Hidráulica e Saneamento., 94p.

MISHRA, M. (2015). **Handbook of Encapsulation and Controlled Release**. Disponivel em <https://doi.org/10.1201/b19038> Acesso em Jul. 2017..

MONNET, F. (2003). **An introduction to anaerobic digestion of organic wastes**. *Remade Scotland*, (November), 1–48. Recuperado de <http://www.kumanov.com/docs/Биогазовистанции/introanaerobicdigestion__073323000_1011_24042007.pdf> Acesso em Ago 2017.

NARDI, S. Q. W. (2014). **Imobilização de fontes de nitrogênio em grânulos de PVA e alginato de sódio e estudo da influência de ciclos de congelamento/descongelamento na caracterização e imobilização de nitrogênio**. 118 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Pato Branco.

NGES, I. A. et al. (2012). **Benefits of supplementing an industrial waste anaerobic digester with energy crops for increased biogas production**. *Waste Management*, *32*(1), 53–59. Disponível em <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2011.09.009> Acesso em Ago 2017.

OGUR, E. (2005). **Polyvinyl alcohol: materials, processing and applications.** *Rapra Rev Reports*, *16*(12), 141.

OKAZAKI, M. et al. (1995). **Development of poly(vinyl alcohol) hydrogel for waste water cleaning**. **II. Treatment of N,Ndimethylformamide in waste water with poly(vinyl alcohol) gel with immobilized microorganisms**. *Journal of Applied Polymer Science*, *58*(12), 2243–2249. Disponível em <https://doi.org/10.1002/app.1995.070581213> Acesso em Ago 2017.

OLIVA, L. C. H. V. (1997). **Tratamento de esgotos sanitários com reator anaeróbio de manta de lodo (UASB)**. **Protótipo: desempenho e respostas dinâmicas às sobrecargas hidráulicas**. São Carlos, Tese de Doutorado em Hidráulica e Saneamento, Escola de Engenharia de São Carlos, USP.

PATTANAPIPITPAISAL, P. et al. (2001). **Chromate reduction by *Microbacterium liquefaciens* immobilised in polyvinyl alcohol**. *Biotechnology Letters*, *23*(1), 61–65. Disponível em <https://doi.org/10.1023/A:1026750810580> Acesso em Ago 2017.

PHAM, D. V. & THO BACH, L. (2014). **Immobilized bacteria by using PVA (Polyvinyl alcohol) crosslinked with Sodium sulfate.** *International Journal of Science and Engineering*, *7*(1), 41–47. Disponível em <https://doi.org/10.12777/ijse.7.1.41-47> Acesso em Ago 2017.

PONTES, P. P. & CHERNICHARO, C. A. D. L. (2009). **Efeito do retorno de lodo aeróbio sobre as características da biomassa presente em reatores UASB tratando esgoto sanitário**. *Engenharia Sanitária e Ambiental*, *14*(2), 223–234. Disponível em <https://doi.org/10.1590/S1413-41522009000200010> Acesso em Ago 2017.

QUAN, L. M. et al. (2011). **Reject water treatment by improvement of whole cell anammox entrapment using polyvinyl alcohol/alginate gel**. *Biodegradation*, *22*(6), 1155–1167.

REIS, E. A. (2009) **Produção de cápsulas de liberação controlada para fins de biorremediação de ambientes contaminados por hidrocarbonetos do petróleo**. Rio de Janeiro: Universidade Federal do Rio de Janeiro. Dissertação (Mestrado em Ciências). Escola de Química, Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos.

RIPLEY, L. E. et al. (1986) *Journal (Water Pollution Control Federation)* Vol. 58, No. 5 (May, 1986), pp. 406-411 Disponivel em <http://www.jstor.org/stable/25042933?seq=1#page_scan_tab_contents> Acesso em Ago. 2017.

SALEH, M. & MAHMOOD, U. (2004). **Anaerobic Digestion Technology for Industrial Wastewater Treatment.** *Eighth International Water Technology Conference*, *IWTC8* (Alexandria Egypt), 817–833.Disponivel em < http://www.iwtc.info/2004_pdf/12-5.pdf> Acesso em Jul.2017.

SAYED, S. K. I. (1987). **Anaerobic treatment of slaughterhouse wastewater using the UASB process.**, 135p. Disponivel em <http://library.wur.nl/WebQuery/wurpubs/fulltext/201442> Acesso em Ago. 2017.

SHILPA, A. et al. (2003). **Controlled Delivery of Drugs from Alginate Matrix**. *Journal of Macromolecular Science, Part C: Polymer Reviews*, *43*(2), 187–221. Disponível em <https://doi.org/10.1081/MC-120020160> Acesso em Ago 2017.

SHINDO, S. & KAMIMURA, M. (1990). **Immobilization of yeast with hollow PVA gel beads**. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, *70*(4), 232–234. Disponível em <https://doi.org/10.1016/0922-338X(90)90054-Z> Acesso em Ago 2017.

SILVA, S. & Queiroz, D. (2004). **Alginate-poly (vinyl alcohol) core-shell microspheres for lipase immobilization.** In: XVI Congresso Brasileiro de Engenharia e Ciência dos Materiais. Disponível em < https://www.ipen.br/biblioteca/2004/cbcimat2004/10507.pdf> Acesso em Set. 2017.

SPEECE, R. E. (1983). **Anaerobic biotechnology for industrial wastewater treatment.** *Environmental Science & Technology*, *17*(9), 416A–427A. Disponível em <https://doi.org/10.1021/es00115a725> Acesso em Ago 2017.

SPEECE, R. E. (1996) **Anaerobic biotecnology for industrial wastewaters.** Nashville: Archae Press**.** 394 p.

SUGUMAR, S. et al. (2016). **A review on performance study of anaerobic digestion to enhance the biogas production**. *International Journal of Civil*

Engineering and Technology, *7*(6). Disponivel em <www.researchgate.net/publication/311770203_A_review_on_performance_study_of_anaerobic_digestion_to_enhance_the_biogas_production> Acesso Ago. 2017.

TAKEI, T. et al. (2011). **Fabrication of poly(vinyl alcohol) hydrogel beads crosslinked using sodium sulfate for microorganism immobilization**. *Process Biochemistry*, *46*(2), 566–571. Disponível em <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2010.10.011> Acesso em Ago 2017.

TRAMPUS, B. C. (2016) **Estratégias baseadas em reticulação de polímeros para evitar perdas de circulação em poços de petróleo**. Dissertação (mestrado) UFRJ/COPPE/Programa de Engenharia Química. Disponivel em < http://portal.peq.coppe.ufrj.br/index.php/producao-academica/dissertacoes-de-mestrado/2016/445--25/file> Acesso em Jul. 2017.

VAN HAANDEL & A. C.; LETTINGA, G. (1994). **Tratamento Anaeróbio de Esgotos: Um Manual para Regiões de Clima Quente**, Epgraf, Campina Grande, 240 p.

VERBELEN, P. J. et al. (2006). **Immobilized yeast cell systems for continuous fermentation applications.** *Biotechnology Letters*, *28*(19), 1515–1525. Disponível em <https://doi.org/10.1007/s10529-006-9132-5> Acesso em Ago 2017.

YUJIAN, W. et al. (2006). **Immobilization of Acidithiobacillus ferrooxidans with complex of PVA and sodium alginate.** *Polymer Degradation and Stability*, *91*(10), 2408–2414. Disponível em <https://doi.org/10.1016/j.polymdegradstab.2006.03.015> Acesso em Ago 2017.

ZAIAT, M. & ABREU, S. B (2008). **Desempenho de reator anaeróbio-aeróbio de leito fixo no tratamento de esgoto sanitário**. In: Engenharia Sanitária Ambiental. v. 13, n. 2, p. 181-188. Disponível em <http://www.abes-dn.org.br/publicacoes/engenharia/resaonline/v13n02/_ArtigoTecnico-027_07.pdf> Acesso em Dez 2016.

ZHANG, L. et al. (2007). **Immobilization of activated sludge using improved polyvinyl alcohol (PVA) gel**. *Journal of environmental sciences (China)*, *19*(11), 1293–7.Disponivel em < https://doi.org/10.1016/S1001-0742(07)60211-3> Acesso Jun. 2017.