



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS - RIO CLARO



ECOLOGIA

GABRIELA AMOROZO FRANCISCO

**BIODEGRADAÇÃO DA VINHAÇA RESÍDUO DA
PRODUÇÃO DE ETANOL**

A large, stylized graphic of a globe or sphere, composed of various shades of blue and white, with white lines representing latitude and longitude. It is positioned in the lower half of the page.

Rio Claro
2008

GABRIELA AMOROZO FRANCISCO

BIODEGRADAÇÃO DA VINHAÇA RESÍDUO DA PRODUÇÃO DE
ETANOL

Orientador: Profa. Dra. DEJANIRA DE FRANCESCHI DE ANGELIS

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado
ao Instituto de Biociências da Universidade
Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” -
Câmpus de Rio Claro, para obtenção do grau
de Ecólogo

Rio Claro
2008

604.6 Francisco, Gabriela Amorozo
F818b Biodegradação da vinhaça resíduo da produção de etanol
/ Gabriela Amorozo Francisco. - Rio Claro: [s.n.], 2008
40 f. : il., gráfs., tabs., fots.

Trabalho de conclusão (Ecologia) – Universidade
Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Rio Claro
Orientador: Dejanira de Franceschi de Angelis

1. Resíduos. 2. Cana-de-açúcar. 3. Indústria
sucroalcooleira. 4. Resíduos industriais. 5. Biodegradação. I.
Título.

Ficha Catalográfica elaborada pela STATI - Biblioteca da UNESP
Campus de Rio Claro/SP

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer a todos aqueles que, direta ou indiretamente, contribuíram para que eu conseguisse realizar este trabalho. Bom, vamos lá!

Primeiro de tudo agradeço à minha família, que sempre me apoiou me dando empurrõezinhos quando eu empacava. Mami (principalmente – MEGAempurrões, mas “um de cada vez”, hehe), Mazinha (bito!), Papi e até o Gui (companheiro de TCC pendurado), a Nê e o Zé. À Chri, que me deu um lar simpático e aconchegante (e com Duque!) quando eu voltei com as mãos abanando e até pseudo co-orientadora foi – sem tudo isso jamais teria conseguido! Aos meus avós, pela preocupação e almoços de sábado. São as pessoas mais importantes na minha vida.

Ao Di, que me agüentou estressada e desesperada esse tempo todo, sempre se segurando e sendo o fofo que é. Teve que ouvir todas as minhas crises, coitado! À família do Di, por ter me hospedado e me deixado trabalhar na sua casa e até me incentivado! D. Odila (obrigada pelos bolos), Márcia, Antonio, Guizo, Má, Marcinho, Já, Ted e Toddy.

À Deja, pela oportunidade (acho que ela nunca orientou um TCC tão rápido!). Caí de pára-quedas no colo dela e ela logo me botou pra trabalhar! À Dilza, pelas ajudinhas nos momentos de desespero.

Ao Morcego e ao Prof. Pião, pela ajuda com as estatísticas (valeu mesmo!).

Às meninas: Buh (melhor amiga desde o princípio e até o final!), Y (por me lembrar que eu não sou a única no barco furado), Marcella e Hélid pelas linhas de produção, ajuda e

companhia. À Letícia, ao Rodrigo, à Angela e ao Richard, pelo tanto que me ensinaram no laboratório.

Aos técnicos Márcio, Inês, Eleni e Francisca, que me ajudaram, ensinaram, deram boas idéias e cederam equipamentos.

À Usina Sta Lúcia pela vinhaça.

Espero não ter esquecido ninguém. Com certeza esqueci o aniversário de muita gente nesse período de corre-corre, espero que entendam (viu, João?).

SUMÁRIO

	Página
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. OBJETIVO.....	3
3. REVISÃO DE LITERATURA.....	4
3.1 Produção de cana e seu uso na fabricação de etanol.....	4
3.2 Caracterização da vinhaça da produção de etanol.....	5
3.3 Efeitos da vinhaça no meio ambiente.....	7
3.4 Aplicabilidade e biodegradação da vinhaça.....	9
3.5 Métodos de avaliar a biodegradação.....	13
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	15
4.1 Materiais.....	15
4.1.1 Materiais usuais de laboratório.....	15
4.1.2 Soluções e reagentes.....	15
4.1.3 Equipamentos.....	16
4.1.4 Material biológico.....	17
4.2 Métodos.....	17
4.2.1 Coleta de vinhaça.....	17
4.2.2 Análise de pH.....	18
4.2.3 Análise de condutividade.....	18
4.2.4 Análise da Demanda Química de Oxigênio (DQO).....	18
4.2.5 Análise da Demanda Bioquímica de Oxigênio última (DBOu).....	18
4.2.6 Análise de oxigênio dissolvido (OD).....	18
4.2.7 Análise de sólidos em suspensão.....	18
4.2.8 Análise de DBO acompanhada durante dez dias.....	19
4.2.9 Ensaio biológicos.....	19
4.2.9.1 Teste de toxicidade aguda com <i>Daphnia similis</i>	19
4.2.9.2 Teste de toxicidade aguda com <i>Dugesia tigrina</i>	20
4.2.10 Avaliação de crescimento de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> em vinhaça.....	20
4.2.10.1 Análise de quantificação de nitrogênio na biomassa de <i>S. cerevisiae</i> cultivada em vinhaça.....	21

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	23
5.1 Análises físicas e químicas.....	23
5.2 Análises de DBO e DBOu.....	24
5.2.1 Análise de DBO acompanhada durante dez dias.....	24
5.2.2 Análise de DBOu.....	26
5.3 Análises biológicas.....	29
5.3.1 Teste de toxicidade aguda com <i>Daphnia similis</i>	30
5.3.2 Teste de toxicidade aguda com <i>Dugesia tigrina</i>	30
5.4 Avaliação de crescimento de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> em vinhaça.....	31
6. CONCLUSÃO.....	33
7. RESUMO.....	34
8. SUMMARY.....	35
9. REFERÊNCIAS.....	36

1. INTRODUÇÃO

Estudos visando o aproveitamento de resíduos agroindustriais vêm sendo realizados principalmente após a década de 1950. Com a expansão do parque industrial e a especialização de processos produtivos, houve grande incremento na poluição ambiental – seja por atingir ecossistemas antes não poluídos, ou mesmo pela diversificação de poluentes descartados. Nesse contexto, a preocupação com o meio ambiente é primordial e apresenta-se como um desafio à ciência. O aproveitamento desses resíduos utilizando novas tecnologias que permitam algum retorno econômico apresenta-se como a melhor alternativa para o controle da poluição.

A cultura de cana-de-açúcar possui grande expressão na economia nacional. O Estado de São Paulo - Br é, atualmente, o maior produtor deste cultivar e na safra 2006/2007 foram produzidas 264.336.825 toneladas. Esta matéria-prima correspondeu à produção de 10.953.937 m³ de etanol (União da Indústria de Cana-de-açúcar – UNICA, 2007). Em termos econômicos, representa crescimento para o país, porém, no tocante ao meio ambiente, induz preocupações em diferentes áreas das atividades humanas – destacando-se a ocupação do solo e geração de descartes.

O processo de obtenção do etanol a partir da fermentação e da destilação do açúcar da cana origina resíduos; alguns deles atualmente deixaram de ser considerados sub-produtos, mas sim matéria-prima, a exemplo do melaço e do bagaço. Contudo, outros ainda apresentam-se como empecilho à preservação do meio ambiente, como é o caso da vinhaça. Esse resíduo apresenta basicamente dois aspectos preocupantes quanto à sua composição química. A vinhaça contém certa quantidade de matéria orgânica, além de carga inorgânica com características ácidas e corrosivas. No processo de produção de etanol forma-se, concomitantemente, grande volume de vinhaça, correspondendo em média de 10 a 13

litros/litro de álcool produzido. Em virtude do aumento da produção de etanol, aumenta-se também a geração de vinhaça.

A vinhaça, quando disposta no meio ambiente, apresenta grande potencial de oxidação – devido à sua carga orgânica elevada, a maior parte de fácil biodegradação. Esta característica apresenta alto grau de comprometimento quando atinge corpos hídricos, pois pode ocasionar o consumo total do oxigênio dissolvido (OD), prejudicando todos os organismos aquáticos aeróbios, pois se utilizam dele para viver, além de causar eutrofização e turvação das águas, prejudicando a sua potabilidade e balneabilidade. Além disso, apresenta compostos mais recalcitrantes e ainda a carga inorgânica de persistência permanente que altera a qualidade da água.

O descarte da vinhaça nas coleções hídricas está definitivamente proibido pela portaria nº 323/78 do extinto Ministério do Interior. Diante disto as indústrias foram obrigadas a encontrar outras formas de descarte desse resíduo. Uma vez constatado seu valor como fertilizante devido ao seu teor de matéria orgânica, assim como de potássio, cálcio e magnésio, sua disposição no solo passou a ser a solução mais comumente empregada pelas empresas. Contudo, com este procedimento considera-se a possibilidade de infiltração e contaminação de águas subterrâneas. O método utilizado para tal é chamado de “fertirrigação” – o termo não é muito bem empregado, pois não substitui o sistema de irrigação; trata-se da aplicação do resíduo líquido, o que também causa a hidratação do solo.

Em 2005 a Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental do Estado de São Paulo (CETESB) criou a norma P4.231, que determina a dosagem de vinhaça a ser aplicada no solo assim como as condições em que essa aplicação deverá ser feita e o monitoramento a ser efetuado antes, durante e depois do processo.

O presente estudo visa verificar o tempo necessário para que a vinhaça sofra a biodegradação e deixe de ser um poluente orgânico.

2. OBJETIVO

Acompanhar a biodegradação da vinhaça gerada durante a destilação da produção do etanol de cana-de-açúcar mediante avaliação do consumo de oxigênio até a Demanda Bioquímica de Oxigênio última (DBOu) – executada durante 20 dias e analisar a produção de biomassa de *Saccharomyces cerevisiae* neste resíduo.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Produção de cana e seu uso na fabricação de etanol

A cultura de cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L.) no Brasil teve início em 1532, data em que Martim Afonso de Sousa instalou o primeiro engenho, em São Vicente. Mais tarde, outros engenhos surgiram em Pernambuco e no Recôncavo Baiano, onde a indústria açucareira teve grande desenvolvimento devido à proximidade da Europa e da África e à abundância do solo massapé, muito propício para esse cultivo. Desde então a cana começou a ser cultivada em latifúndios por monocultores. Na segunda metade do século XVI o Brasil era o maior produtor de açúcar do mundo, porém, na segunda metade do século seguinte, devido à concorrência com o açúcar das Antilhas, teve início o declínio da cultura açucareira brasileira (CAMPOS, 1997).

Nesta época, o cultivo de cana já estava estabelecido no Brasil, onde até os dias atuais não mais deixaram de ser produzidos o açúcar e o álcool dela provenientes. O açúcar inicialmente era produzido na sua forma integral, denominado “açúcar redondo”, hoje reconhecido como açúcar mascavo. Mais tarde ele passa a ser processado obtendo-se a forma purificada do açúcar cristal. Parte do açúcar era empregada na fermentação direta do caldo de cana, obtendo principalmente a cachaça. O etanol concentrado era produzido em pequena escala.

Em 1973, com a crise do petróleo trazendo aumento no preço desse combustível, o Brasil obrigou-se a encontrar fontes alternativas de energia – uma vez que os veículos automotores já eram o transporte que predominava no país. O governo brasileiro, mediante o decreto nº 76.553/75, instituiu então o Programa Nacional do Álcool (PRO-ÁLCOOL), visando atender as necessidades dos mercados interno e externo e da política de combustíveis dos automotores (TAUK, 1987). Segundo Dias (1981) *apud* TAUK (1987), foram propostas

diversas matérias-primas para produção do álcool, como mandioca, sorgo, babaçu, entre outras, mas nenhuma além da cana foi economicamente e tecnicamente viável.

Desde a criação do Pró-Álcool aos tempos atuais o consumo do etanol como combustível sofreu um leve declínio, reerguendo-se, porém, nos últimos cinco anos com o desenvolvimento dos veículos bicombustíveis (os chamados carros “flex fuel”), cujos motores são movidos tanto por álcool quanto por gasolina (porém com preferência ao álcool). Com este intenso uso do etanol gera-se concomitantemente grande volume de vinhaça.

Segundo Rezende (1983 *apud* ISEPON, 1990), a partir de uma tonelada de cana-de-açúcar podem ser produzidos, em média, 70 litros de álcool – considerando que todo o caldo extraído tenha sido destinado a essa produção – o que gera em torno de 910 litros de vinhaça.

3.2 Caracterização da vinhaça da produção de etanol

A vinhaça é o resíduo líquido proveniente da destilação de uma solução hidroalcoólica chamada “vinho”, obtida pelo processo de fermentação do caldo de cana, do melaço ou da mistura de caldo e melaço para obtenção do etanol partindo da cana-de-açúcar (Workshop, 2007). Caracteriza-se por um líquido escuro, viscoso e concentrado, de odor desagradável, sem oxigênio dissolvido, alta turbidez e baixo pH (TAUK, 1982), além da elevada temperatura com que sai dos destiladores. Ela pode ser conhecida conforme a região por vinhoto, restilo, caxixe, tiborna, calda de destilaria, entre outros, Almeida (1952) *apud* NEHME (1989). Os primeiros estudos sobre a aplicação da vinhaça nos solos datam da década de 1950 e foram realizados por Jaime Rocha de Almeida e seus colaboradores, em Piracicaba; os primeiros dados sobre a composição química da vinhaça foram obtidos por eles.

A composição da vinhaça é variável em função de diversos fatores, tais como: sua origem (a originada de caldo de cana é sempre menos concentrada que a originada de mosto de melaço ou que a de mosto misto), a usina onde foi produzida, a época da safra, a variedade de cana utilizada na moagem, o índice de maturação da cana, o tipo de solo onde ela foi cultivada, o nível de fertilidade do solo (Workshop, 2007), o sistema de preparo do mosto, o método de fermentação, a linhagem de levedura utilizada, o tipo de aparelho de destilação utilizado, a metodologia e o tipo de flegma separado, entre outros. De acordo com Almeida (1952) *apud* ISEPON (1990), os fatores que exercem ação direta ou indireta na composição do vinho influenciarão a composição da vinhaça.

A proporção de álcool produzido em uma destilaria depende da composição do mosto em açúcares totais fermentescíveis, do tipo de fermentação, do sistema de destilação adotado e do tipo de álcool produzido. Assim, um mosto muito diluído e pobre em açúcares fermentescíveis resultará num vinho pobre em álcool e rico em vinhaça, e vice-versa, Almeida (1952) *apud* ISEPON (1990).

Elia Neto e Nakahondo (1995) *apud* WORKSHOP (2007) realizaram um estudo em 28 usinas do Estado de São Paulo observando a composição química e características físicas da vinhaça produzida em cada uma delas. Partindo destas informações pode-se inferir: no geral, a vinhaça apresenta pH ácido (valores entre 3,5 e 4,9), alta Demanda Bioquímica de Oxigênio (valores entre 6.680 e 75.330 mg/L) – o que indica grande concentração de matéria orgânica biodegradável, alta concentração de potássio (entre 814 e 3.852 mg/L de K₂O), assim como quantidades consideráveis de sulfato, cálcio, magnésio e nitrogênio. Tais características conferem a esse resíduo o caráter de fertilizante, podendo substituir adubações minerais, diminuindo o custo da produção agrícola (ALMEIDA, 2001). O efeito positivo da vinhaça na produtividade da cana-de-açúcar vem sendo relatado por diversos autores desde a década de 1950; assim, atualmente, ela é utilizada principalmente para este fim.

Larrahondo et al. (2000) *apud* VOLL (2005), em estudo a partir de vinhaça de cana-de-açúcar, detectou 15 compostos orgânicos, dentre os quais o glicerol encontrava-se em maior concentração (2,7%), seguido pelo ácido aconítico (1,8%), o sorbitol (1,4%) e o ácido láctico (1,3%). Rodella; Zambello Júnior e Orlando Filho (1983) *apud* CRIVELARO (2005) também verificaram que a maior parte do carbono da vinhaça se encontra na forma de glicerol, proveniente de rotas metabólicas alternativas durante a fermentação alcoólica. Na célula microbiana, este composto pode passar a diidroxicetona, a qual é incorporada à via glicolítica do metabolismo microbiano (LEHNINGER et al., 2002).

Existem três tipos básicos de vinhaça: aquela proveniente da fermentação do caldo de cana que não sofreu tratamento após sua extração; vinhaça de mosto de melaço, onde é encontrado um teor mais elevado de elementos minerais devido à concentração de “não-açúcares” da cana no melaço, bem como à acumulação de produtos usados na fabricação do açúcar; e há a vinhaça originada de mosto misto, obtido a partir de caldo, xarope, méis de pureza variável ou melaço (em proporções das mais variadas), possuindo composição intermediária quanto ao teor de nutrientes quando comparada aos dois outros tipos de vinhaça (Rodella et al. (1981) *apud* VITALI (1995)).

Isepon (1990), em seu trabalho, coloca a origem dos principais componentes minerais da vinhaça: o potássio vem do campo, no próprio vegetal, permanecendo no processo de extração e concentrando-se no melaço; o cálcio, além do campo, provém também da cal que é adicionada ao caldo para neutralizar a acidez e produzir clarificação (a maior parte fica na torta de filtro e o restante no melaço residual); o fósforo é oriundo do campo e de substâncias adicionadas ao cálcio (a maior parte fica retida na torta de filtro e uma pequena quantidade vai para o melaço); e o sódio apresenta um caminho semelhante ao do potássio e os teores mais elevados são encontrados em vinhaça proveniente de canaviais próximos a praias e manguezais.

A vinhaça contém microbiota natural própria e quando cultivada por 96 horas em agitador rotativo, esta foi capaz de reduzir 56% da DBO (De Lamo e Menezes (1978) *apud* LIMA (1996)). A minuciosa investigação desse “pool” de microrganismos permitiu a identificação de alguns grupos de bactérias, sendo estas, no geral, móveis, capazes de aderir a superfícies (Araújo et al. (1978) *apud* LIMA (1996)). Especulou-se que *Saccharomyces cerevisiae* carregaria, em suas paredes, bactérias para o interior do mosto.

Apesar de não ser possível traçar um padrão sobre a composição da vinhaça, algumas características desse resíduo são consenso entre os autores que a estudaram, como: a de ser um resíduo heterogêneo, o potássio é o nutriente mineral encontrado em maior proporção e o carbono é o elemento que apresenta maior percentual na composição química. Quanto à acidez, a vinhaça pode ser considerada como um ácido fraco, tendo em vista as curvas de titulação (VITALI, 1995). Devido a essas semelhanças pode-se concluir que o tratamento e a finalidade a serem dados a este sub-produto podem ser os mesmos, variando-se apenas a quantidade utilizada dele (ISEPON, 1990).

3.3 Efeitos da vinhaça no meio ambiente

Segundo Odum (2001), quando o ritmo de entrada de detritos orgânicos nos solos e nos sedimentos é elevado, as bactérias, fungos, protozoários e outros organismos consomem o oxigênio mais rapidamente do que este pode difundir-se no meio, criando condições anaeróbias; a decomposição não se detém, embora continue em um ritmo mais lento – contanto que esteja presente uma adequada diversidade de microrganismos de metabolismo anaeróbio.

Muitos autores estudaram os efeitos da vinhaça em diferentes tipos de solos e, ao longo do tempo, observaram que o pH torna-se mais alcalino, aumenta a sua capacidade de troca catiônica (CTC), fornece e aumenta a disponibilidade de alguns nutrientes, melhora a estrutura dos solos, aumenta a retenção de água (o que diminui a lixiviação e a suscetibilidade a processos erosivos intensos), melhora a atividade biológica promovendo aumento populacional de pequenos animais (minhocas, besouros, etc), bactérias e fungos (FERREIRA e MONTEIRO, 1987; LEME et al., 1980; CAMARGO et al., 1983; GLÓRIA e ORLANDO FILHO, 1983, *apud* WORKSHOP, 2007). No entanto, constataram-se também efeitos maléficos aos solos e às plantas, tais como: atraso na maturação da cana-de-açúcar, diminuição no teor de sacarose, maior teor de cinzas, acúmulo de amido no caldo, aumento de sais (principalmente de potássio) no solubilizado do solo, como verificado por Cesar et al. (1978); Silva (1981); Santos et al. (1981) *apud* COSTA (1983).

A análise dos efeitos da aplicação da vinhaça na composição química do solo e do lençol freático em função do tempo (entre 0 e 15 anos) apresentou tendência em manter a fertilidade do solo, ocorrendo, no entanto, elevação na concentração de nitratos no lençol freático (Cruz et al., 1991 *apud* LIMA (1996)). O consumo desses compostos através das águas de abastecimento está associado à indução à metemoglobinemia, especialmente em crianças, e à formação potencial de nitrosaminas e nitrosamidas carcinogênicas, colocando em risco as populações que se utilizam de águas de poços e fontes – as quais não recebem tratamento prévio (ALABURDA e NISHIHARA, 1998) – populações rurais, no geral.

De acordo com Neves et al. (1983) *apud* RUEGGER (1995), a vinhaça aplicada no solo estimula visivelmente a população de fungos, principalmente dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium*, além de ocasionar aumento na população de bactérias fixadoras de nitrogênio do gênero *Beijerinckia*, refletindo na maior incorporação deste nutriente ao solo. Segundo Martinez Cruz et al. (1987 *apud* LIMA (1996)), a utilização da vinhaça na fertirrigação de culturas, apesar do aumento na produtividade, promove também o aumento do número de actinomicetos e fungos – predominando os gêneros celulolíticos destes – além do forte odor exalado que atinge as cidades próximas às lavouras na época de safra.

Sabe-se que a aplicação de vinhaça no solo não pode ser excessiva e nem indiscriminada, sob pena de vir a comprometer irremediavelmente a qualidade ambiental da região assim como a sua rentabilidade agrícola. O comprometimento ocorre mediante a salinização dos solos (devido a seus elevados teores de sódio e de potássio), a superação da

precipitação pela evapotranspiração, a compactação do solo, poluição de águas de superfície e subterrâneas com nitrato e, durante toda a safra, a poluição do ar pela emissão de gases com odor desagradável e a proliferação de moscas – que sob o aspecto de saúde sanitária pode constituir fonte de transmissão de doenças cujo vetor é a água (Rezende, 1984, Kosaric et al., 1986 e Szmrecsanyi, 1994 *apud* VITALI (1995)).

Segundo Lukseberg et al. (1980 *apud* GONÇALVES E SILVA (2004)), pode-se comparar que, pela carga química, cada 2 litros de vinhaça equivalem ao esgoto sanitário de um habitante/dia.

3.4 Aplicabilidade e biodegradação da vinhaça

Para evitar o descarte, minimizando impactos ambientais, cientistas passaram a investigar a utilização da vinhaça como um sub-produto – uma vez que pode ser considerada uma matéria-prima de custo nulo (sua geração é mera consequência da produção do álcool etílico) e muito abundante. Muitas das alternativas de utilização também se apresentam como formas de tratamento do resíduo, diminuindo seu potencial poluidor.

O uso principal que tem sido feito da vinhaça atualmente é como adubo, principalmente para a própria cana-de-açúcar. As suas características como fertilizante foram detectadas por Almeida et al. (1952 *apud* VITALI, 1995) quando constataram que dos 25% de substâncias minerais, 63-65% eram potássio. Assim, quando da sua aplicação no solo resultam efeitos benéficos na produtividade agrícola, sendo eles mais pronunciados em solos arenosos, principalmente quando se caracterizam por apresentar baixo conteúdo de nutrientes (Coelho e Azevedo, 1986 *apud* VOLL (2005)). Glória e Orlando (1984 *apud* VITALI (1995)) abordaram a economia de adubos inorgânicos, substituídos pela aplicação de vinhaça no solo, como mostram seus cálculos: 140 milhões de m³ de vinhaça equivaleriam a 49.280 t de nitrogênio ou 234.667 t de sulfato de amônio; a 49.280 t de fósforo ou 151.200 t de superfosfato simples; a 294.840 t de potássio ou 491.400 t de cloreto de potássio.

Com relação à fertirrigação com vinhaça, foram desenvolvidos tecnologias e sistemas para sua distribuição nas plantações de forma a otimizar a aplicação, diminuindo os custos e evitando futuros prejuízos às lavouras e ao meio ambiente. Assim, têm-se hoje grande diversidade de veículos-tanque para o transporte e distribuição do resíduo nas plantações, além de sistemas de canais e tubulações, de gotejamento, veículo distribuidor de vinhaça e sistemas de aspersão; estes são os mais utilizados no Estado de São Paulo atualmente

(COPERSUCAR, 1979; VALSECHI, 2007). No entanto, a maioria desses sistemas é técnica e economicamente viável somente se a distância entre a destilaria e a lavoura onde será feita a aplicação não for muito extensa, do contrário pode gerar altos custos de transporte (geralmente feito em caminhões-tanque) e inviabilizar o aproveitamento da vinhaça. Uma alternativa que se coloca para esses casos é a concentração da vinhaça por evaporação, o que diminui consideravelmente seu volume e aumenta o seu poder fertilizante, tornando menor o número de viagens necessárias. Além disso, possibilita sua utilização para arração animal e para sua queima em caldeiras especiais, gerando energia; se o condensado retirado da evaporação for tratado e reutilizado no processo, pode-se diminuir a captação de água da usina (ALBERS, 2007). Segundo Rolim (1996), a vinhaça concentrada também pode ser usada como agente aglutinante do solo, com efeitos positivos sobre sua resistência mecânica.

Devido à proximidade entre culturas de citros e destilarias, Bataglia et al. (1986 *apud* ALMEIDA (2001)) avaliaram a possibilidade de uso da vinhaça como adubo potássico para os pomares cítricos; não observaram efeitos maléficis à produção nem à qualidade dos frutos, e nem desequilíbrio nutricional nas plantas, concluindo não haver limitação para o uso desse resíduo em área citrícola.

Isepon (1990) verificou que o capim *Brachiaria decumbens* (utilizado em pastagem para gado) respondeu favoravelmente à aplicação de vinhaça, principalmente quando associada à adição de nitrogênio, com aumentos na produção de matéria seca e apresentando, nos primeiros cortes, acréscimos nos teores de proteína bruta, de minerais, de potássio e do coeficiente de digestibilidade da matéria seca.

Estudos sobre a utilização de vinhaça no controle de fitopatógenos vêm demonstrando sua eficiência e aplicabilidade. Voll (2005) verificou efeitos desse resíduo sobre a emergência das plantas daninhas corda-de-viola (*Ipomoea grandifolia* Dammer O'Don), picão-preto (*Bidens pilosa* L.) e capim-colchão (*Digitaria horizontalis* Willd) aos sete dias após semeadura, e aos 15 dias após semeadura para *B. pilosa* e *I. grandifolia*. Pedrosa et al. (2005) avaliaram o efeito da vinhaça sobre a eclosão e reprodução dos nematóides de galhas *Meloidogyne incognita* (Kofoid & White) Chitwood e *M. javanica* (Treub) Chitwood. Constataram redução da eclosão de juvenis das duas espécies quando da exposição dos ovos à vinhaça, assim como redução da densidade de ovos e juvenis com a aplicação do resíduo no solo. O efeito de supressividade foi diretamente proporcional ao volume de vinhaça

adicionado. Sua utilização pode trazer, além da economia de insumos, redução nos impactos ambientais causados pelo uso de produtos químicos defensivos agrícolas.

Inicialmente a produção de proteínas (biomassa microbiana) foi investigada em leveduras devido à prévia disponibilidade de padrões industriais, além do potencial nutricional e da velocidade e magnitude de produção que elas apresentam. No entanto, a quantidade de ácidos nucleicos nestes organismos – compostos que causam efeitos no teor de ácido úrico dos fluidos corporais de quem os ingere – trouxe questionamentos quanto à sua utilização na alimentação humana assim como limitações ao uso em rações animais (LIMA, 1996). Por outro lado, os fungos filamentosos apresentam-se mais vantajosos devido à sua capacidade de adaptação à heterogeneidade da vinhaça, à fácil recuperação da biomassa via filtração, prático manuseio e secagem desta, capacidade de catálise de uma série de substratos complexos, além da rápida conversão da matéria dissolvida em biomassa com certo teor de proteína utilizável para alimentação animal (há possibilidade de utilização da hifa como base na fabricação de alimentos) (Solomons (1985) *apud* LIMA (1996)). Segundo Martelli e Sousa (1978) *apud* LIMA (1996), a aeração pode ser responsável por cerca de 20% dos custos totais do processo de produção de biomassa fúngica.

Ceccato-Antonini e Tauk-Tornisielo (1994) constataram que a utilização de cultura mista de *Aspergillus niger* e *Cryptococcus laurentii* em meio de vinhaça após 72 horas apresentou redução de 80% da DBO e conseqüente produção de biomassa com 40% de proteína. Ceccato (1988) utilizando o mesmo cultivo já havia observado que a biomassa apresentara teor de proteína satisfatório e com qualidade semelhante àquela considerada como padrão internacional quanto à composição de aminoácidos, embora a produção de biomassa tenha sido pequena.

Venturini Filho e Camargo (1987) *apud* LIMA (1996) observaram que a concentração da vinhaça como meio de cultura diminui a porcentagem protéica da biomassa, mas aumenta a produção desta obtendo-se, portanto, uma relação estável entre proteína produzida e vinhaça consumida. Nehme (1989), em suas pesquisas, constatou que o uso da vinhaça concentrada mostrou ser bastante promissor para o crescimento de células de levedura, equiparando-se a outros meios de vinhaça com suplementação.

Ferraz et al. (1986) *apud* CECCATO (1988); LIMA (1996) avaliaram o crescimento da cianobactéria *Spirulina maxima* em cultivo em vinhaça diluída e clarificada durante quatro

dias sob luz artificial. Os pesquisadores quantificaram diminuição de 74% da DQO e de 95% da DBO, além de produção de biomassa semelhante à cepa cultivada em meio mineral definido.

A vinhaça de cana-de-açúcar é um substrato restrito em nitrogênio, elemento essencial na formação de proteínas, por isso muitos autores realizaram a complementação desse resíduo para obtenção de melhores resultados quando da sua utilização para produção de biomassa microbiana. As mais comumente utilizadas foram o melaço, o fosfato ácido de amônia, o NPK, entre outros.

Kobayashi et al. (1978) *apud* CECCATO (1988) e Kobayashi e Kurata (1978) *apud* CECCATO (1988) constataram que bactérias fotossintetizantes em condições de anaerobiose são capazes de assimilar, para seu desenvolvimento, matéria orgânica não facilmente metabolizável por microrganismos quimiotróficos.

Outra utilização de destaque da vinhaça é a sua biodigestão anaeróbia para produção de metano (biogás). Essa produção é realizada em quatro fases – hidrólise, acidificação, acetogênica e metanogênica, sendo que em cada uma atua um agente microbiológico diferente. As populações de bactérias encontram-se misturadas no digestor e apresentam relações de interdependência e sinergia; a sua diversidade depende do tipo de matéria orgânica adicionada ao digestor (não há inóculo). Alguns dos principais fatores que podem influenciar esse processo são: a temperatura (quanto mais alta, maior a produção de metano), pH do meio (ao longo do processo deve ser mantido entre 6 e 8), composição e concentração do resíduo (a produção de metano depende da quantidade de sólidos orgânicos na amostra e é diretamente proporcional à DQO) e agitação (promove melhor distribuição do substrato e do calor). Atualmente há grande diversidade de digestores. O biogás produzido é composto de CO₂; N₂; H₂S e CH₄, com predominância deste último (PINTO, 1999). Segundo Souza (1982) *apud* VITALI (1995), neste processo ocorre diminuição da DBO da ordem de 95% e da DQO de 88% , com rendimento de 13 m³/m³ de vinhaça, com teor de 60% de metano. O biogás pode ser utilizado para produção de calor ou como combustível para motores. O efluente do biogás ainda pode ser aplicado na fertirrigação, promovendo melhoria nos mesmos atributos que a vinhaça *in natura*, porém de maneira menos acentuada, como comprovado por Longo (1995).

Rolim (1996), baseando-se na fabricação de tijolos de mistura solo-cimento (material obtido de solo estabilizado com cimento Portland – considerado o aglomerante mais nobre da construção civil), investigou a possibilidade de utilização da mistura solo-vinhaça concentrada para confecção de tijolos. Verificou valores satisfatórios de resistência à compressão simples, porém os tijolos não resistiram ao ensaio de absorção de água, desagregando-se em poucas horas após sua imersão. Ainda assim, podem ser utilizados em ambientes protegidos ou paredes revestidas e tratadas com produtos hidrofugantes. A utilização de novos materiais para construção civil produzidos a partir de resíduos agroindustriais apresenta-se como possível solução para o problema habitacional.

Rotenberg et al. (1979) *apud* VITALI (1995) estudaram a utilização de colunas de resinas trocadoras de íons para separar a glicerina, o ácido láctico (apresenta maior predominância) e o ácido succínico, como também reter a cor vermelha da vinhaça, identificada como tanino. Esses produtos possuem uma importância como insumos para indústria químico-farmacêutica.

3.5 Métodos de avaliar a biodegradação

A biodegradação consiste na transformação de compostos químicos orgânicos pela atividade metabólica de microrganismos resultando, eventualmente, em dióxido de carbono e água. Há três métodos comumente utilizados para avaliar a degradação de matéria orgânica de efluentes por microrganismos: o método respirométrico, o método da Demanda Bioquímica de Oxigênio (DBO) e o método da evolução de CO₂.

O método respirométrico foi desenvolvido por Bartha e Pramer (1965) e padronizado pela CETESB através da Norma Técnica L6.350 em 1990, que o descreve como um sistema fechado, constituído de duas câmaras interligadas, sendo o CO₂ do substrato de uma das câmaras absorvido pela solução de KOH contida na outra (o ar que circula entre elas é isento de CO₂); para quantificá-lo, essa solução é titulada com HCl depois de decorrido o tempo determinado para o experimento (ALMEIDA, 2001) – tempo necessário para que a matéria orgânica biodegradável seja consumida. Neste método, o CO₂ é o parâmetro utilizado para mensurar a degradação da matéria orgânica do substrato pelos microrganismos ali presentes.

O método da DBO consiste na incubação da amostra com um inóculo microbiano a 20°C durante cinco dias (este é o método mais usualmente aplicado devido ao pouco tempo de teste de laboratório e por possibilitar a comparação de diversos resultados). A concentração de

oxigênio dissolvido (OD) da amostra é medida depois de decorrido o período mencionado; deve ser feito um controle (sem a utilização da amostra) para comparação e cálculos de consumo de oxigênio. A diferença entre as concentrações de OD da amostra e do controle representa o oxigênio consumido para oxidação da matéria orgânica presente na amostra. A DBO fornece uma indicação indireta da quantidade de carbono biodegradável. A oxidação completa da matéria orgânica ao longo dos dias ainda não foi devidamente comprovada e estabelecida para esse ensaio. Uma das possibilidades de se avaliar a biodegradação é acompanhar o consumo do OD durante um período mais longo. O Standard Methods recomenda a DBO última (DBOu), que segue o mesmo procedimento da DBO de cinco dias, porém, com duração de 20 dias.

Outro método é o da evolução de CO_2 , que consiste na utilização de um reator que utiliza a luz infravermelha para quantificar o dióxido de carbono presente na amostra analisada. A amostra é colocada em um compartimento ligado a uma bomba de ar, a qual, por sua vez, leva ao reator (para leitura dos resultados este é ligado a um computador com software específico para tal). Os gases armazenados são succionados pela bomba e fluem para o analisador, que utilizando a espectroscopia de absorção ótica no infravermelho quantifica a concentração de CO_2 (HENCKLEIN, 2008).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Materiais

4.1.1 Materiais usuais de laboratório

- Recipiente de plástico com capacidade para 20 litros;
- Placas de Petri;
- Cadinhos;
- Garrafas âmbar;
- Copos de borracha;
- Barra magnética;
- Pipetas Pasteur;
- Vidraria usual de laboratório.

4.1.2 Soluções e reagentes

- Vinhaça de mosto misto procedente da Usina Santa Lúcia, município de Araras - SP;
- Dicromato de potássio 0,25 N;
- Mistura de ácido sulfúrico e sulfato de prata;
- Sulfato de mercúrio;
- Água destilada;
- Sulfato Ferroso Amoniacal 0,25 N;

- Solução indicadora de ferroína;
- Solução de cloreto férrico 0,25 g/L;
- Solução de sulfato de magnésio 22,5 g/L;
- Solução de cloreto de cálcio 27,5 g/L;
- Solução tampão de fosfato com pH = 7,27;
- Meio bacteriológico “Plate Count Agar” (PCA);
- “Pillows” de nutriente;
- Hidróxido de Lítio;
- Água do Ribeirão Claro;
- Solução de vinhaça degradada resultante da análise de DBOu após quinze dias;
- Solução de vinhaça degradada resultante da análise de DBOu (após vinte dias);
- Meio de caldo de cana a 10° Brix;
- Solução de carbonato de sódio a 0,01 N;
- Solução de ácido sulfúrico a 0,01 N;
- Solução de NaOH a 0,01 N;
- Mistura digestora $\text{CuSO}_4 : \text{K}_2\text{SO}_4$ (1:1) m/m;
- Selenito de sódio;
- Solução de NaOH a 30%;
- Indicador vermelho de metila;

4.1.3 Equipamentos

- Medidor de potencial hidrogeniônico (pH) Digimed modelo DMPH-2;
- Condutivímetro Tecnopon modelo CA150;
- Condensadores;

- Placas de porcelana para aquecimento;
- Frascos de DBO;
- Bomba de ar comprimido MASTER;
- Incubadora de DBO Marconi modelo MA415/S;
- Analisador de oxigênio dissolvido Marconi modelo MA520;
- Centrífuga Sorvall;
- Dissecador;
- Estufa para esterilização e secagem MARTE;
- Balança analítica Adam Equipment Co. Ltd. modelo ADA 210/L;
- Analisador de DBO Hach BODTrak™;
- Shaker Marconi;
- Digestor infravermelho Marconi;
- Destilador de micro Kjeldahl;

4.1.4 Material biológico

- Cápsula contendo “pool” de microrganismos;
- Neonatos de *Daphnia similis* (com até vinte e quatro horas “de idade”);
- Neonatos de *Dugesia tigrina* de até 30 dias “de idade”;

4.2 Métodos

4.2.1 Coleta de vinhaça

Coletou-se a vinhaça ainda quente após a destilação do etanol na Usina Santa Lúcia, município de Araras – SP, de acordo com a Norma CETESB P4.231/2006 (Vinhaça – critérios e procedimentos para aplicação no solo agrícola).

4.2.2 Análise de pH

As análises foram efetuadas segundo a Norma CETESB L5.145/78 (Determinação de pH em águas: método eletrométrico).

4.2.3 Análise de condutividade

As análises foram realizadas de acordo com a Norma CETESB L5.115/93 (Determinação de condutividade em águas: método de condutivímetro: método de ensaio).

4.2.4 Análise da Demanda Química de Oxigênio (DQO)

Para analisar a DQO empregou-se a Norma CETESB L5.121/94 (Método da oxidação por Dicromato de Potássio em refluxo).

4.2.5 Análise da Demanda Bioquímica de Oxigênio última (DBOu)

Essa análise foi executada de acordo com o estabelecido pelo Standard Methods em 1998, com duração de vinte dias. Diluiu-se a vinhaça com água a 1,5% (66,66 vezes) para possibilitar posterior análise de oxigênio dissolvido. Foram utilizadas duas alíquotas diferentes da solução – 3 e 6 mL. A análise foi realizada em sextuplicatas para possibilitar as mensurações de oxigênio dissolvido ao longo do processo. Para o inóculo microbiano, utilizou-se esgoto urbano do bairro Inocoop (Rio Claro – SP) diluído em água a 5% (20 vezes); essa suspensão ficou em aeração durante uma hora antes da montagem do experimento. Da suspensão aerada efetuou-se um plaqueamento por superfície em meio PCA para comprovar a existência de microrganismos.

4.2.6 Análise de oxigênio dissolvido (OD)

As análises foram efetuadas de acordo com a Norma CETESB L5.178/84 (Tratamento biológico de efluentes industriais – determinação de oxigênio dissolvido (OD) em água pelo método eletrométrico: método de ensaio).

4.2.7 Análise de sólidos em suspensão

Distribuiu-se 200 mL de vinhaça decantada após duas horas em oito tubos de centrífuga (25 mL em cada) os quais foram centrifugados durante seis minutos a 6000 rpm e o sobrenadante foi descartado. O conteúdo sólido remanescente foi lavado com água destilada e centrifugado novamente durante seis minutos à mesma rotação, dispensando-se mais uma vez

o sobrenadante. A massa sólida foi transferida para cadinhos previamente pesados com auxílio de água destilada; foi secada em estufa a $105\pm 2^{\circ}\text{C}$ durante 24 horas. Após serem retirados da estufa, os cadinhos foram mantidos em dessecador até sua pesagem em balança analítica. Calculou-se por diferença a massa de sólidos em suspensão contidos na vinhaça decantada.

4.2.8 Análise de DBO acompanhada durante dez dias

Primeiramente preparou-se a suspensão de inóculo microbiano saturando-se um litro de água destilada com oxigênio durante uma hora e adicionando a ela uma cápsula contendo “pool” de microrganismos. A mistura foi agitada.

Colocou-se 160 mL de vinhaça diluída a 1,5% em cada garrafa âmbar (o volume a ser colocado é determinado pela expectativa de DBO do material utilizado – para que ocorra ajuste adequado da curva de consumo de oxigênio no “software” do aparelho) e em seguida uma barra magnética para agitação. Depois de agitados, os “pillows” de nutriente foram abertos e despejados um em cada garrafa. Pipetou-se 3 mL de solução de inóculo microbiano (“semente”) em cada garrafa. Em cada copo de borracha aplicou-se, na parte inferior, pasta vedante e dentro foi colocada pequena quantidade de Hidróxido de Lítio. As garrafas foram fechadas com os copos e conectadas ao aparelho – há um manômetro em cada conector que fecha as garrafas e que mede a pressão do oxigênio dentro delas. O aparelho manteve o conteúdo das garrafas em agitação constante durante os dez dias de análise, realizada dentro de incubadora a $20\pm 2^{\circ}\text{C}$.

4.2.9 Ensaios biológicos

4.2.9.1 Teste de toxicidade aguda com *Daphnia similis*

Foram realizados dois ensaios biológicos, sendo que no primeiro a vinhaça foi diluída com água destilada: 1, 3 e 5% e procedeu-se conforme a Norma CETESB L5.018/91 (Teste de toxicidade aguda com *D. similis* Claus, 1876 (Cladocera; Crustacea)); no controle utilizou-se água do Ribeirão Claro (município de Rio Claro - SP).

No segundo teste utilizou-se a solução de vinhaça degradada resultante da análise de DBOu. Efetuou-se a análise em quadruplicatas. Em cada ensaio colocou-se cinco animais (*D. similis*) neonatos em cada tubo contendo 10 mL da solução de vinhaça degradada. Acompanhou-se o comportamento dos microcrustáceos.

4.2.9.2 Teste de toxicidade aguda com *Dugesia tigrina*

Colocou-se 70 mL da solução de vinhaça degradada após quinze dias em cada recipiente plástico com três orifícios na tampa para permitir a ocorrência de trocas gasosas. Dentro de cada recipiente foram colocados, com o auxílio de um pincel, dez filhotes de *D. tigrina* de até 30 dias de idade. Como controle utilizou-se água aerada do Ribeirão Claro. Cuidados para evitar possíveis contaminações foram tomados e para cada amostra utilizou-se um pincel diferente. Os recipientes contendo *D. tigrina* foram cobertos com um tecido preto, evitando o contato direto com a luz. Acompanhou-se o comportamento dos turbelários durante sete dias mediante contagens dos organismos sobreviventes de dois em dois dias.

4.2.10 Avaliação de crescimento de *Saccharomyces cerevisiae* em vinhaça

Primeiramente preparou-se um pré-inóculo contendo *S. cerevisiae* cultivada em caldo de cana a 10° Brix por 96 horas a $28\pm 2^{\circ}\text{C}$. A cultura foi decantada e o sobrenadante foi dispensado. Adicionou-se 25 mL de água destilada ao conteúdo de células que a seguir foi homogeneizado.

Distribuiu-se igualmente 400 mL de vinhaça decantada após duas horas em 4 erlenmeyers. Em seguida foram inoculados 5 mL da suspensão de *S. cerevisiae* em cada erlenmeyer, que foi colocado em agitação (condição de aerobiose) em agitador rotativo a 190 rpm durante vinte e quatro horas. A seguir as culturas tiveram o seu conteúdo centrifugado durante seis minutos em centrífuga a 6000 rpm e reservou-se o líquido metabólico para posterior análise. A biomassa foi lavada por suspensão em água destilada e centrifugada novamente por seis minutos, dispensando-se o sobrenadante. A seguir a biomassa foi transferida com auxílio de água destilada para cadinhos previamente pesados. A biomassa dos cadinhos foi secada em estufa a $105\pm 2^{\circ}\text{C}$ durante 24 horas. Uma vez retirados os cadinhos da estufa, estes foram mantidos em dissecador até o momento da pesagem em balança analítica. Calculou-se a massa seca produzida pela levedura no cultivo em vinhaça decantada. Com o líquido metabólico analisou-se DQO, pH e condutividade. A biomassa seca foi pulverizada e armazenada.

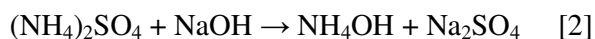
4.2.10.1 Análise de quantificação de nitrogênio da biomassa de *S. cerevisiae* cultivada em vinhaça

Primeiramente padronizaram-se as soluções a serem utilizadas nesta análise. O ácido sulfúrico foi titulado com solução de carbonato de sódio a 0,01 N (padrão primário) e ajustou-se sua concentração até a desejada – 0,01 N. A partir dele pôde-se padronizar a solução de NaOH para garantir que estivesse a 0,01 N também. Preparou-se solução de NaOH a 30% utilizando-se água destilada fervida para evitar a formação de carbonato.

A etapa seguinte foi a digestão da biomassa seca. Foram pesados, em balança analítica, cerca de 40 mg para cada tubo, sendo três no total. Depois de transferida para os tubos, adicionou-se uma pequena quantidade de mistura digestora – composta de $\text{CuSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ e K_2SO_4 na proporção 1:1 (m/m) – e uma pequena quantidade de selenito de sódio, que age como catalisador nessa reação. A mistura foi aquecida em infravermelho em meio ácido (foram colocados 2 mL de ácido sulfúrico puro em cada tubo) até a mineralização dos compostos orgânicos – indicada pela mudança de cor do marrom para o verde claro. A reação de mineralização do nitrogênio (presente nas proteínas da amostra) consiste na ligação do amônio ao íon sulfato do ácido, formando um sal, como se segue:



A seguir efetuou-se a destilação das amostras digeridas em destilador de micro Kjeldahl, onde inicialmente diluiu-se as amostras com água, transferindo-as para o interior do equipamento. A seguir adicionou-se 10 mL da solução de NaOH a 30%. Neste momento intensificou-se o aquecimento para volatilização da amônia (transformação do nitrogênio mineralizado em um composto instável) e posterior captação desta em 25 mL de ácido sulfúrico a 0,01 N. As reações que ocorrem são as seguintes:



O hidróxido de amônio é volátil e evapora, passando pelo condensador – cuja extremidade estava mergulhada no ácido sulfúrico – e tornando-se líquido novamente, voltando à forma de sulfato de amônio, repetindo a reação [1].

O material digerido e destilado foi titulado com a solução de NaOH a 0,01 N. Como indicador utilizou-se três gotas do vermelho de metila. A partir dos volumes gastos nas

titulações calculou-se a quantidade de nitrogênio e a porcentagem deste nas amostras e a porcentagem de proteína bruta na biomassa obtida.



FIGURA 1: Destilador de micro Kjeldahl

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Análises físicas e químicas

O pH é um importante parâmetro na caracterização de despejos industriais, isso porque a faixa de concentração hidrogeniônica adequada para a maior parte da vida é muito estreita e crítica, geralmente entre 6 e 9. Os despejos com concentração inadequada de íons de hidrogênio são mais difíceis de se tratar por métodos biológicos (VITALI, 1995). A vinhaça de cana-de-açúcar analisada neste trabalho apresentou pH ácido, igual a 3,98.

Os sólidos mais grosseiros em suspensão são os responsáveis pela formação de bancos de lodo quando o resíduo é descartado em rios ou lagoas, contribuindo para o assoreamento destes; por isso, os limites estabelecidos para estes no despejo de efluentes pela legislação federal são muito baixos. A vinhaça analisada apresentou 5.246 mg/L de sólidos em suspensão, resultado baixo quando comparado aos encontrados na literatura: Vitali (1995) encontrou 6.280 mg/L, Almeida (1952) *apud* VITALI (1995) obteve 6.722 mg/L e Souza (1982) *apud* VITALI (1995) quantificou 23.700 mg/L de sólidos em vinhaça de mosto misto.

A capacidade de uma solução para conduzir corrente elétrica ocorre em função da quantidade de íons nela presentes; assim, quanto maior for o seu conteúdo mineral, maior será a condutividade. A vinhaça apresenta elevada concentração de minerais, sendo o principal deles o potássio – presente sob a forma de íons K^+ , além dos íons de cálcio (Ca^{++}), magnésio (Mg^{++}), sulfato (SO_4^-), entre outros. Apresenta, portanto, condutividade elevada – de 8,30 mS/cm neste estudo. Esse dado é corroborado pelos estudos de Fontes (1988) *apud* CRIVELARO (2005) e de Cardoso (1988) *apud* CRIVELARO (2005) nos quais constatou-se que a adição da vinhaça ao solo causa elevação da condutividade elétrica deste.

A análise de DQO quantifica o oxigênio necessário para oxidação química da matéria orgânica de um composto; é uma indicação indireta do teor desta. Esta análise superestima o

oxigênio a ser consumido em tratamentos biológicos (indicado pela DBO), pois oxida, além da matéria orgânica biodegradável, compostos inertes; pode ocorrer ainda oxidação de constituintes inorgânicos, causando interferência nos resultados. Ainda assim, seu valor pode ser usado como referência quando se precisa estimar a expectativa de DBO de determinado composto, ou mesmo para verificação de resultados na análise da DBO. A vinhaça analisada apresentou DQO de 25.693,43, valor próximo à média encontrada por Elia Neto e Nakahondo (1995) *apud* WORKSHOP (2007) quando analisaram as vinhaças produzidas em 28 usinas do Estado de São Paulo, como citado anteriormente.

5.2 Análises de DBO e DBOu

Primeiramente foi constatada a presença de bactérias no inóculo microbiano a ser utilizado mediante cultivo em placa de Petri em meio PCA incubado a 28°C por 48 horas. As colônias apresentaram diversidade de cores, texturas e tamanhos, indicando quantidade suficiente de microrganismos para realização da análise de DBO.

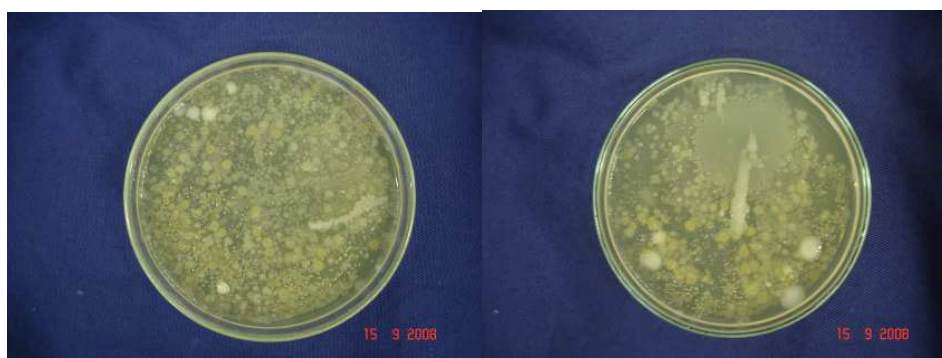


FIGURA 2: Placas indicando a presença de microrganismos no inóculo obtido após diluição e aeração

5.2.1 Análise de DBO acompanhada durante dez dias

As repetições das medidas de OD durante um mesmo dia formaram pseudo-replicações. O problema da pseudo-replicação ocorre quando duas ou mais medições não são estocasticamente independentes, o que fere um dos pressupostos básicos de qualquer teste paramétrico. Desta forma, para um tratamento estatístico mais adequado, utilizou-se a média das repetições dentro do mesmo dia. Pôde ser observada uma tendência decrescente do consumo de oxigênio conforme o decorrer dos dias (Figura 3).

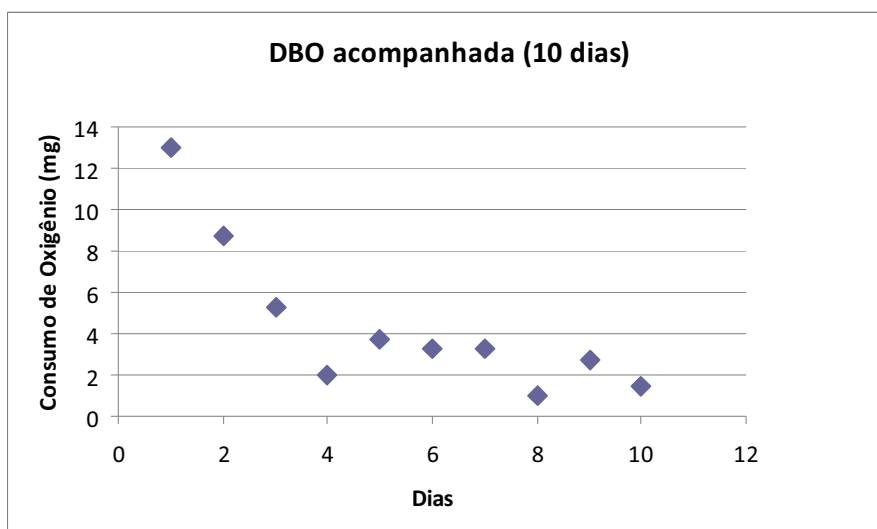


FIGURA 3: Relação entre o consumo de oxigênio (mg) e o número de dias

Para ajuste dos dados a uma regressão linear, foi necessária uma transformação logarítmica destes; aplicou-se o logaritmo natural (base de Euler). A equação da reta obtida (do tipo $y = a + b.x$) se encontra na Figura 4. O valor de “a” (coeficiente linear) indica o ponto onde a reta cruza o eixo das ordenadas, enquanto o valor de “b” (coeficiente angular) indica a inclinação da reta: se ele for negativo, a reta é descendente, se for positivo, a reta é ascendente. O R^2 , obtido a partir da regressão, representa a porcentagem da variabilidade dos dados que é explicada por ela, sendo o seu valor máximo correspondente à situação ideal, onde todos os pontos se sobrepõem à reta e o seu valor mínimo a uma completa ausência de correlação. Obteve-se grande porcentagem de variabilidade explicada pela regressão (75,12%), o que indica bom ajuste ao modelo escolhido. Ao verificar a significância dos resultados obtidos através desse ajuste, obteve-se $p = 0,001$ como probabilidade de significância, o que indica que a análise realizada é estatisticamente significativa.

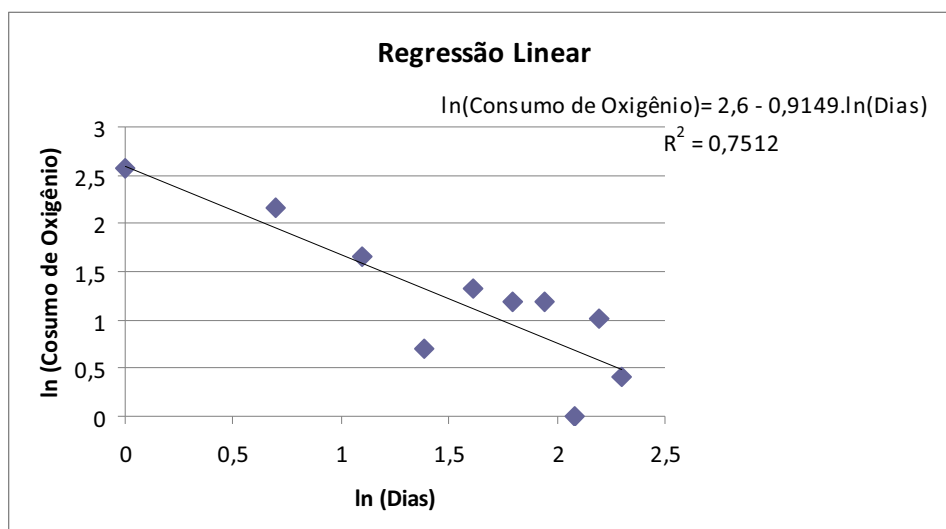


FIGURA 4: Ajuste da regressão linear entre ln(Consumo de oxigênio) e ln(Dias)

Devido à elevada indicação fornecida pelos dados gerados na equação de regressão linear da reta e sua significância alta estatística, pode-se afirmar que o logaritmo natural do consumo de oxigênio dissolvido (indicador da biodegradação da vinhaça pelos microrganismos) apresenta relação negativa e aproximadamente linear com o ln do número de dias. A representação da equação da reta em sua forma original foi dada por: $y = 13,4637 + x^{-0,915}$, que representa uma relação exponencial decrescente que tende ao zero (Figura 3).

5.2.2 Análise de DBOu

A análise de DBO quantifica, indiretamente, a biodegradação de um composto mediante o consumo de oxigênio pelo inóculo microbiano neste ou em uma solução dele. Trata-se de um sistema fechado e, portanto, não há entrada nem saída de gases (o oxigênio consumido é aquele que se encontra dissolvido). No caso de carga orgânica biodegradável muito elevada, recomenda-se a diluição da amostra para que não ocorra consumo total e rápido do oxigênio – o que impossibilita a mensuração deste – daí a diluição a 1,5% da vinhaça realizada neste trabalho.

Foram realizadas cinco mensurações de OD ao longo da análise executada com a vinhaça, nos seguintes dias: 4º; 7º; 11º; 15º e 20º. O oxigênio dissolvido decresceu ao longo do tempo (Tabela 1 e Figura 5), o que indica a atividade dos microrganismos inoculados.

Tabela 1: Decaimento do oxigênio dissolvido durante o teste de Demanda Bioquímica de Oxigênio última (DBOu)

Dia	O.D.(mg/L)		
	Branco	3 mL	6 mL
4	7,97	7,29	7,03
7	8,01	7,44	6,6
11	7,86	6,78	6,03
15	7,85	6,97	5,96
20	7,69	6,74	5,65

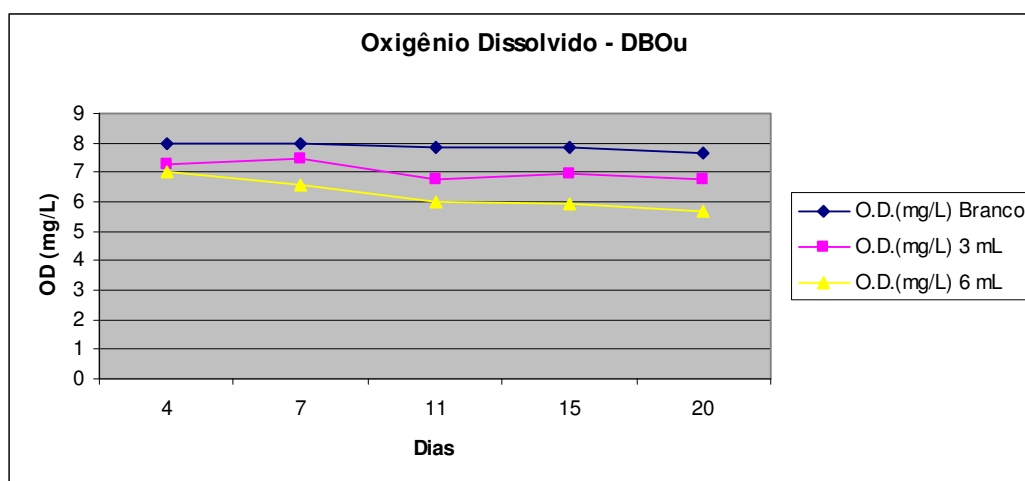


Figura 5: Decaimento do oxigênio dissolvido (mg/L) durante o teste de Demanda Bioquímica de Oxigênio última (DBOu)

Para obtenção do consumo de OD em função da vinhaça, calcula-se a diferença de OD entre o controle e a amostra; em cada dia de mensuração deve-se medir o controle, pois este também apresenta variações. O consumo foi crescente ao longo dos dias de análise, indicando que mesmo após o 5º dia ocorre intensa atividade microbiana de consumo da vinhaça (Tabela 2 e Figura 6).

Tabela 2: Diferença entre o oxigênio dissolvido (mg/L) do controle e o dos frascos nas diferentes alíquotas no teste de Demanda Bioquímica de Oxigênio última (DBOu)

Consumo de Oxigênio (mg/L)		
Dia	3 mL	6 mL
4	0,68	0,94
7	0,57	1,41
11	1,08	1,83
15	0,88	1,89
20	0,95	2,04

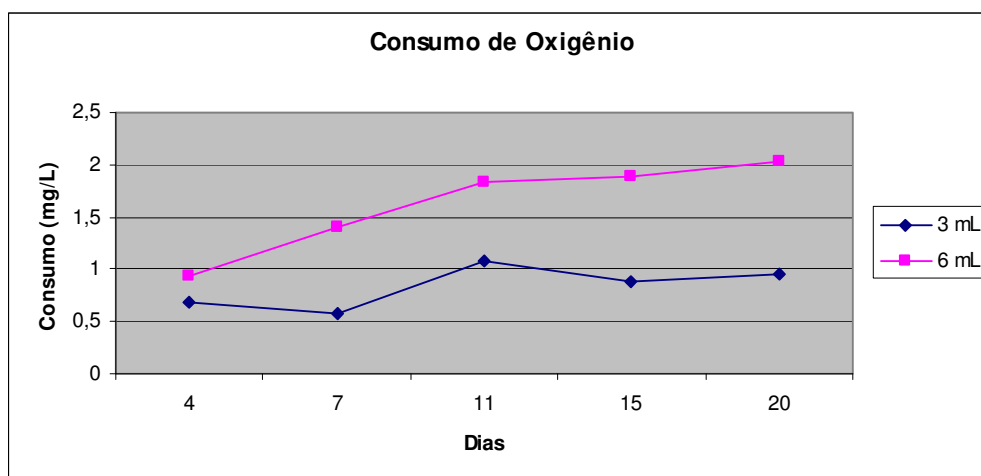


Figura 6: Consumo de oxigênio (mg/L) nas diferentes alíquotas utilizadas em relação ao controle no teste de Demanda Bioquímica de Oxigênio última (DBOu)

Para cada dia de mensuração foi calculada a DBO (Tabela 3 e Figura 7). Os resultados obtidos são, portanto, cumulativos e os encontrados no vigésimo dia – 21 111,11 e 22 666,67 mg O₂/L para as alíquotas de 3 e 6 mL, respectivamente – representam a DBO final do processo para cada alíquota utilizada (DBOu).

Tabela 3: Demanda Bioquímica de Oxigênio (mg O₂/L) calculada para cada dia de mensuração nas diferentes alíquotas utilizadas no teste de Demanda Bioquímica de Oxigênio última (DBOu)

Dia	DBO (mg O ₂ /L)	
	Alíquota (mL)	
	3	6
4	15 111,11	10 444,44
7	12 666,67	15 666,67
11	24 000,00	20 333,33
15	19 555,56	21 000,00
20	21 111,11	22 666,67

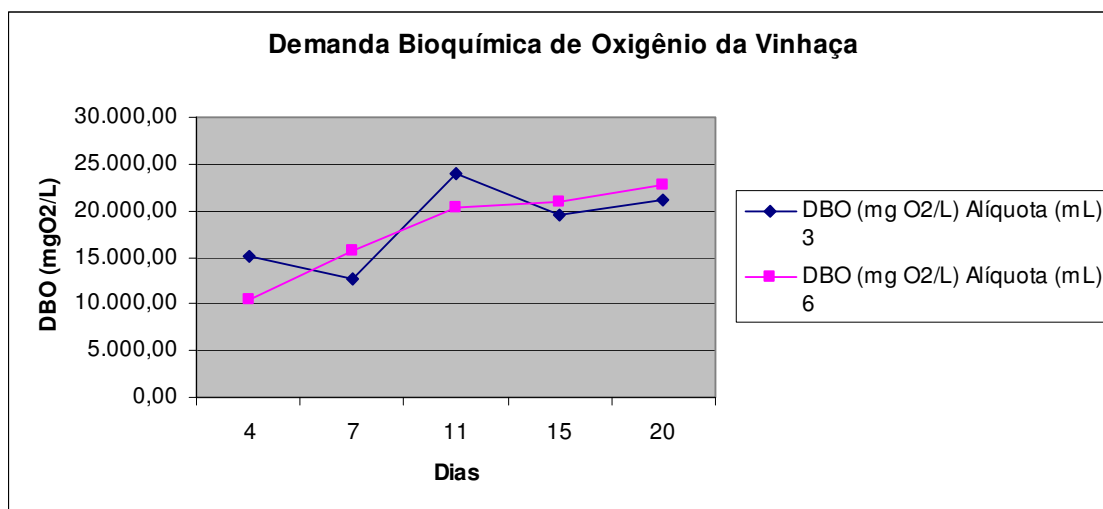


Figura 7: Demanda Bioquímica de Oxigênio (mg O₂/L) calculada para os dias de mensuração para cada alíquota utilizada no teste de Demanda Bioquímica de Oxigênio última (DBOu)

Com a análise foi possível encontrar a DBO₅, utilizada usualmente como indicador de matéria orgânica biodegradável. Foram encontrados os valores de 17 120,89 e 11 833,56 mg O₂/L para as alíquotas de 3 e 6 mL, respectivamente, o que representou 66,64 e 46,06% da DQO (item 5.1) e 81,10 e 52,21% da DBOu, respectivamente. A DBOu, por sua vez, degradou 82,16% da DQO nos frascos com 3 mL de alíquota e 88,22% desta nos frascos de 6 mL de alíquota. São porcentagens elevadas e não comumente encontradas em trabalhos realizados com vinhaça (no trabalho de Vitali (1995), por exemplo, a DBO degradou apenas 11,78% da DQO), demonstrando que a maior parte da carga orgânica da vinhaça pode ser biodegradada e o tempo que isso leva para acontecer é relativamente curto.

Ao se analisar os valores de DBO calculados, nota-se que no 11º dia, no frasco com alíquota de 3 mL, obteve-se um valor atípico, bem acima dos anteriores e dos posteriores (até mesmo da DBOu). Isso provavelmente deve-se a algum erro no procedimento ou de mensuração. A impossibilidade de replicação do experimento devido à falta de tempo e material apresentou-se como empecilho para a verificação dos resultados obtidos, dificultando assim, que eles apresentassem maior coerência.

5.3 Análises biológicas

A simples neutralização ou a decomposição de um resíduo não necessariamente diminuem ou eliminam a toxicidade deste; pelo contrário, podem gerar compostos de

potencial tóxico mais elevado. Por isso, é importante que se realizem bioensaios de toxicidade após o tratamento dos resíduos. Buikema, Aniederlehner e Cairns (1982) *apud* SIVIERO (1995) revelam que os testes de toxicidade são utilizados desde a década de 1940 com a finalidade de estimar o impacto causado por agentes químicos quando lançados em um corpo receptor.

5.3.1 Teste de toxicidade aguda com *Daphnia similis*

Os microcrustáceos possuem grande importância na ligação entre os níveis inferiores e superiores de uma cadeia trófica. Os representantes desse grupo mais utilizados em testes de toxicidade são *Daphnia sp*, *Artemia sp*, *Ceriodaphnia sp* e *Mysidopsis bahia*. O ensaio de toxicidade com *D. similis* constitui hoje um parâmetro importante de avaliação de resíduos para os descartes no meio ambiente (SIVIERO, 1995) e ainda é um parâmetro exigido para o descarte de efluentes tratados de muitas empresas visando preservar o meio ambiente.

No primeiro teste – realizado com a vinhaça bruta diluída a 1; 3 e 5% – constatou-se mortalidade de 100% dos organismos nas primeiras 24 horas, o que indica elevado potencial tóxico do resíduo, mesmo em baixas concentrações. Esta toxicidade pode estar relacionada ao rápido consumo de oxigênio dissolvido a que os organismos aeróbios não sobrevivem.

No segundo teste, realizado com a solução de vinhaça degradada resultante da análise de DBOu, não houve mortalidade em nenhuma das repetições; os microcrustáceos também não apresentaram imobilidade, indicando que a vinhaça após a biodegradação não apresenta efeitos tóxicos para a espécie em questão. Portanto este ensaio indica a importância de se efetuar um tratamento adequado da vinhaça para que o meio ambiente não sofra forte impacto.

5.3.2 Teste de toxicidade aguda com *Dugesia tigrina*

Segundo Calevro et al. (1998) *apud* BARROS (2005), planárias de água-doce têm sido estudadas há algumas décadas como indicador para avaliar os efeitos biológicos de poluentes em testes de toxicidade de curto prazo. Esses organismos são particularmente utilizados no campo da toxicologia aquática por serem sensíveis a uma variedade de agentes farmacológicos e toxicológicos, indicando que podem ser feitas analogias bioquímicas e fisiológicas com a suscetibilidade de animais superiores aos poluentes. Além disso, são facilmente mantidas em laboratório com mínimos custos e cuidados, como apontado por

Guecheva et al. (2001) *apud* BARROS (2005). *D. tigrina* é utilizada pela American Society Protection Agency (ASPM) para estudos ecotoxicológicos (BARROS, 2005).

Segundo as contagens, não houve mortalidade de organismos durante o teste com a vinhaça degradada após quinze dias. Os turbelários mantiveram sua cor e tamanho originais, não apresentando também nenhum comportamento anormal durante as contagens. Esses resultados indicam a ausência de potencial tóxico da vinhaça para as planárias após quinze dias de biodegradação sob as condições aqui estabelecidas.

Pelo fato das planárias serem resistentes à vinhaça tratada pode-se inferir ainda que se houver acidentes com este material estes importantes organismos sapróbios sobreviverão (apresentam importância na remoção de detritos orgânicos).

5.4 Avaliação de crescimento de *Saccharomyces cerevisiae* em vinhaça

Obteve-se 2,75 g/L de biomassa da levedura em meio de vinhaça em agitador rotativo durante vinte e quatro horas – resultado inferior ao de Selim et al. (1991 *apud* LIMA, 1996), que obtiveram 12,75 g/L de biomassa da mesma levedura em meio similar, porém com a utilização de fermentador. Cazetta e Celligoi (2005), ao estudarem a aplicabilidade da vinhaça de cana-de-açúcar e do melaço como substrato para produção de proteína microbiana, constataram maior produção de biomassa de *S. cerevisiae* em meio de melaço (5,46 g/L) do que em meio de vinhaça bruta (4,55 g/L). No entanto, a biomassa produzida na vinhaça apresentou maior conteúdo protéico – 50,35%. Com a análise de nitrogênio realizada neste trabalho, verificou-se 37,23% de proteína bruta na biomassa da levedura, quantidade razoavelmente alta se levada em consideração a ausência de suplementação da vinhaça, porém abaixo quando comparada aos resultados de outros autores. Contudo, o objetivo não foi acrescentar nenhum nutriente, pois se buscava diminuição da DQO.

O cultivo promoveu redução de 37,03% na DQO da vinhaça, além de causar aumento do pH, como indicado na Tabela 4. A condutividade do resíduo também diminuiu com o procedimento.

Tabela 4: Valores de DQO, pH e condutividade da vinhaça antes e depois do cultivo com *S. cerevisiae*

Parâmetros	Vinhaça	Vinhaça após cultivo com <i>S. cerevisiae</i>
DQO (mg O ₂ /L)	25.693,430	16.178,382
pH	3,98	4,56
Condutividade (mS/cm)	8,30	7,80

O aproveitamento da vinhaça tem sido recomendado não tanto pelos benefícios econômicos, mas sobretudo pelo aspecto ambiental, como nos trabalhos de Tauk e Serzedello (1975); Corso et al. (1979) e Angelis et al. (1980).

6. CONCLUSÃO

O teste da Demanda Bioquímica de Oxigênio última (DBOu) com a vinhaça promoveu diminuição de grande parte da sua carga orgânica poluente – demonstrada pelas elevadas porcentagens de biodegradação da DQO (82,16 e 88,22%) – indicando que a maior parte dela é biodegradável; além disso, removeu a sua toxicidade para *Daphnia similis* e *Dugesia tigrina*. Com isso conclui-se que o tratamento prolongado de 20 dias apresenta resultados consideráveis para a preservação do meio ambiente. Uma outra alternativa de tratamento é o cultivo com *Saccharomyces cerevisiae*, que causou consideráveis diminuições na sua DQO (37,03%), na sua condutividade (relacionada à salinização de solos e águas onde ocorra seu despejo) e pequena diminuição da sua acidez, além de apresentar custos relativamente baixos (o principal é a aeração).

7. RESUMO

O Estado de São Paulo é, atualmente, o maior produtor de cana-de-açúcar do Brasil, assim como do etanol proveniente dessa matéria-prima – amplamente utilizado como combustível de veículos automotores. Esta utilização teve início na década de 1970, com a instituição pelo governo brasileiro do Programa Nacional do Álcool (PRO-ÁLCOOL), em virtude da crise do petróleo, e voltou a crescer nos últimos cinco anos, com o desenvolvimento dos veículos bicompostíveis (carros “flex fuel”). O processo de obtenção do etanol origina resíduos; dentre eles, a vinhaça é gerada em maior quantidade (em média, de 10 a 13 litros/litro de etanol produzido). O descarte desse resíduo em corpos hídricos só foi proibido em 1978, porém antes disso, pesquisadores já vinham investigando sua utilização como matéria prima. Este trabalho teve por objetivo acompanhar a biodegradação da vinhaça mediante avaliação do consumo de oxigênio até a Demanda Bioquímica de Oxigênio última (DBOu), realizada em vinte dias, além de analisar a produção de biomassa de *Saccharomyces cerevisiae* neste resíduo. Foram realizadas também análises físicas e químicas do resíduo, assim como testes de toxicidade aguda com *Daphnia similis* e *Dugesia tigrina* antes e depois da sua biodegradação. As análises físicas e químicas indicaram acidez (pH = 3,98), condutividade (8,30 mS/cm) e DQO (25.693,43 mg O₂/L) elevadas e quantidade mediana de sólidos em suspensão (5.246 mg/L). Os testes de toxicidade indicaram ausência de potencial tóxico da vinhaça após a biodegradação para ambas as espécies. A DBOu degradou até 88,22% da DQO, demonstrando a possibilidade de biodegradação da maior parte da carga orgânica do resíduo em tempo relativamente curto. O cultivo de *S. cerevisiae* apresentou diminuição de 37,03% da DQO assim como diminuição da condutividade e pequeno aumento do pH; obteve baixa produção de biomassa (2,75 g/L), porém esta apresentou teor considerável de proteína bruta (37,23%).

8. SUMMARY

The State of São Paulo is responsible for the largest sugar cane production in Brazil, as well as the largest production of ethanol made of this raw material – which is widely used as fuel for automobiles. This utilization began in the 1970's, with the institution by the Brazilian government of the National Alcohol Program (PRO-ÁLCOOL), as a consequence of the petroleum crisis, rising again five years ago, with the development of flex fuel cars. The obtaining process of ethanol originates residues; amongst them, vinasse is the one that's generated in the largest amount (an average of 10 to 13 litres/litre of ethanol produced). The disposal of this residue in waters was only forbidden in 1978, but before that, researchers had already been investigating its utilization as raw material. This paper had the objective of accompany the biodegradation of vinasse by evaluating the oxygen consumption during it until the ultimate Biochemical Oxygen Demand (uBOD), performed in twenty days; another objective was to analyse the biomass production of *Saccharomyces cerevisiae* in this residue. Physical and chemical analyses of the residue were also performed, as well as acute toxicity essays using *Daphnia similis* and *Dugesia tigrina*, before and after its biodegradation. The physical and chemical analyses pointed elevated acidness (pH = 3,98), conductivity (8,30 mS/cm) and COD (25.693,43 mg O₂/L) and mean quantity of suspended solids (5.246 mg/L). The toxicity essays indicated absence of toxic potential in vinasse after biodegradation for both species. The uBOD degraded until 88,22% of the COD, demonstrating the possibility of biodegradation of most of the residue's organic load in a relatively short period of time. *S. cerevisiae* caused a 37,03% COD diminution in vinasse, diminished its conductivity and promoted a slight elevation of the pH; it obtained low biomass production (2,75 g/L), but its protein content was considerable (37,23%).

9. REFERÊNCIAS

- ALABURDA, J.; NISHIHARA, L. Presença de compostos de nitrogênio em águas de poços. **Rev. Saúde Pública**, São Paulo, v. 32, n. 2, p. 160-165, out. 1998.
- ALBERS, M. Tratamento da vinhaça: concentração e outros. In: Workshop Tecnológico sobre Vinhaça, 2007, Jaboticabal. Painel para debate.
- ALMEIDA, S. D. M. de. **Respirômetro de Bartha & Pramer para avaliar a produção de CO₂ do solo impactado por resíduo de indústria processadora de sílica-gel e de vinhaça de destilaria de etanol**. 2001. 72f. Dissertação (Ciências Biológicas, área de Microbiologia Aplicada) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Rio Claro, 2001.
- ANGELIS, D. F.; CORSO, C. R.; KIYAN, C. Vinhaça: obtenção, composição e possibilidade de utilização. **Revista Brasileira de Química**, n. 539, p. 125-130, 1980.
- BARROS, G. S. **Desenvolvimento de ensaio biológico com planárias (*Girardia tigrina*) para a detecção de efeito tóxico de efluente de refinaria de petróleo**. 2005. 65f. Trabalho de Conclusão de Curso (Ecologia) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Rio Claro, 2005.
- CAMPOS, R. C. B. **História do Brasil**. 2ª edição. São Paulo: Atual Editora, 1997.
- CAZETTA, M. L.; CELLIGOI, M. A. P. C. Aproveitamento do melaço e vinhaça de cana-de-açúcar como substrato para produção de biomassa protéica e lipídica por leveduras e bactéria. **Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas**, Londrina, v. 26, n. 2, p. 105-112, jul/dez. 2005.
- CECCATO, S. R. **Produção de biomassa e depuração biológica da vinhaça de cana-de-açúcar por cultura mista de fungos filamentosos e leveduras**. 1988. Dissertação (Ciências

Biológicas, área de Biologia Vegetal) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Rio Claro, 1988.

CECCATO-ANTONINI, S. R.; TAUKE-TORNISIELO, S. M. Optimal conditions for SCP production by mixed cultures of *A. niger* and *Cr. Laurentii* grown in sugar cane vinasse medium. **Revista de Microbiologia**, v. 25, p.129-135, 1994.

CETESB – Companhia de Tecnologia e Saneamento Ambiental. **Determinação de pH em águas: método eletrométrico. Norma Técnica L5.145.** São Paulo, 1978.

CETESB – Companhia de Tecnologia e Saneamento Ambiental. **Tratamento biológico de efluentes industriais – determinação de oxigênio dissolvido (OD) em água pelo método eletrométrico: método de ensaio. Norma Técnica L5. 178.** São Paulo, 1984.

CETESB – Companhia de Tecnologia e Saneamento Ambiental. **Solos – Determinação da biodegradação de resíduos – Método respirométrico de Bartha. Norma Técnica L6.350.** São Paulo, 1990.

CETESB – Companhia de Tecnologia e Saneamento Ambiental. **Teste de toxicidade aguda com *Daphnia similis* Claus, 1876 (Cladocera; Crustacea). Norma Técnica L5.018.** São Paulo, 1991.

CETESB – Companhia de Tecnologia e Saneamento Ambiental. **Determinação de condutividade em águas: método de condutivímetro: método de ensaio. Norma Técnica L5.115.** São Paulo, 1993.

CETESB – Companhia de Tecnologia e Saneamento Ambiental. **Método da oxidação por Dicromato de Potássio em refluxo. Norma Técnica L5.121.** São Paulo, 1994.

CETESB – Companhia de Tecnologia e Saneamento Ambiental. **Vinhaça – critérios e procedimentos para aplicação no solo agrícola. Norma Técnica P4.231.** São Paulo, 2006.

COPERSUCAR – Cooperativa Central dos Produtores de Açúcar e Álcool do Estado de São Paulo. **Aproveitamento da vinhaça: viabilidade técnico-econômica.** 2. ed. 1979.

CORSO, C. R.; ANGELIS, D. F.; KIYAN, C.; TAUKE, S. M. Emprego de leveduras em culturas puras e mistas objetivando o aproveitamento de vinhaça. **Brasil Açucareiro**, Rio de Janeiro, v. 94, n. 6, p. 401-406. 1979.

COSTA, S. M. G. **Efeito da adição de vinhaça na dinâmica da microflora do solo do cerrado de Corumbataí, SP.** 1983. 129f. Dissertação (Ciências Biológicas, área de Biologia Vegetal) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Rio Claro, 1983.

CRIVELARO, S. H. R. **Associação de borra oleosa de refinaria de petróleo e vinhaça visando a biodegradação.** 2005. 62f. Trabalho de Conclusão de Curso (Ecologia) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Rio Claro, 2005.

GONÇALVES, C. A. S.; SILVA, E. L. **Tratamento físico-químico da vinhaça.** In: XXVI Congresso Interamericano de Engenharia Sanitária e Ambiental. Associação Brasileira de Engenharia Sanitária e Ambiental – ABES. Disponível em: <http://www.cepis.org.pe/bvsaidis/aresidua/i-021.pdf>. Acesso em: 04 jul. 2008.

HENCKLEIN, F. A. **Estabilização de “Landfarming” de refinaria de petróleo, mediante metabolismo microbiano, e aplicabilidade em solos pré-desertificados.** 2008. 90f. Dissertação (Ciências Biológicas, área de Microbiologia Aplicada) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Rio Claro, 2008.

ISEPON, O. J. **Efeito da aplicação de vinhaça, do nitrogênio e da idade de corte sobre a produção e valor nutritivo do capim Braquiária (*Brachiaria decumbens* stapf.).** 1990. 137f. Tese (Ciências Biológicas, área de Biologia Vegetal) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Rio Claro, 1990.

LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de bioquímica.** 3. ed. São Paulo: Sarvier, 2002.

LIMA, A. O. de S. **Biodegradação da vinhaça de cana-de-açúcar por linhagens de *Aspergillus nidulans*.** 1997. 102f. Dissertação (Agronomia, área de concentração: Genética e Melhoramento de Plantas) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1996.

LONGO, R. M. **Efeito da vinhaça *in natura* e biodigerida em propriedades de um solo cultivado com cana-de-açúcar.** 1995. 98f. Dissertação (Engenharia Agrícola, área de Água e Solo) – Faculdade de Engenharia Agrícola, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1994.

NEHME, A. R. **Produção de biomassa de *Saccharomyces fragilis* em meios de soro de queijo e vinhaça de cana.** 1989. 64f. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Ciências Biológicas) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Rio Claro, 1989.

ODUM, E. P. **Fundamentos de ecologia.** 6.ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 2001. (Ex. 1). 927p.

PEDROSA, E. M. R. et al. Supressividade de nematóides em cana-de-açúcar por adição de vinhaça ao solo. **R. Bras. Eng. Agríc. Ambiental**, Campina Grande, v. 9 (suplemento), p. 197-201, 2005.

PINTO, C. P. **Tecnologia da digestão anaeróbia da vinhaça e desenvolvimento sustentável.** 1999. 147f. Dissertação (Planejamento de Sistemas Energéticos) – Faculdade de Engenharia Mecânica, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1999.

ROLIM, M. M. **Avaliação físico-mecânica do material solo-vinhaça concentrada e sua utilização para fins de fabricação de tijolos.** 1996. 90f. Dissertação (Engenharia Agrícola, área de concentração: Construções Rurais) – Faculdade de Engenharia Agrícola, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1995.

RUEGGER, M. J. S. **Crescimento de culturas mistas de fungos filamentosos em vinhaça de cana-de-açúcar suplementada com melaço, delineado pela metodologia de superfície de resposta.** 1995. 71f. Dissertação (Ciências Biológicas, área de Microbiologia Aplicada) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Rio Claro, 1995.

SIVIERO, A. R. **Influência da aplicação no solo do resíduo líquido da indústria cítrica sobre fungos e bactérias e avaliação da sua toxicidade sobre *Daphnia similis*.** 1995. 112f. Dissertação (Ciências Biológicas, área de Microbiologia Aplicada) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Rio Claro, 1995.

TAUK, S. M.; SERZEDELLO, A. Estudo preliminar da vinhaça como substrato para leveduras. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA, 1975. **Congresso Brasileiro de Microbiologia.** 1975. p. 173.

TAUK, S. M. Alternative uses for vinasse, an alcohol industry residue. A review. **Environmental Technology Letters**, v. 3, p. 411-414. 1982.

TAUK, S. M. **Efeito de doses cumulativas de vinhaça em algumas propriedades do solo sob cerrado e do solo de culturas de milho e cana-de-açúcar nos municípios de Corumbataí e de Rio Claro, SP.** 1987. 349f. Tese (Livre Docência) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Rio Claro, 1987.

UNICA – União da Indústria de Cana-de-açúcar. **Dados e estatísticas.** Disponível em: <http://www.unica.com.br>. Acesso em: 06 jul. 2008.

VALSECHI, O. A. Manejo de vinaza em Brasil: experiencias y lecciones aprendidas. In: Seminario de vinaza usos y tratamientos, 2007, Ciudad de Guatemala. Apresentação em Microsoft Office PowerPoint.

VITALI, V. M. V. **Cultivo de fungos do gênero *Aspergillus* em vinhaça resultante da produção de etanol a partir de caldo de cana e de resíduos cítricos.** 1995. 100f. Dissertação (Ciências Biológicas, área de Biologia Vegetal) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Rio Claro, 1995.

VOLL, C. E. **Aplicação de vinhaça e do extrato de palhico de cana-de-açúcar no controle de plantas daninhas.** 2005. 45f. Dissertação (Agronomia, área de concentração: Fitotecnia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2005.

Workshop Tecnológico sobre Vinhaça. **Termo de referência para o Workshop Tecnológico sobre Vinhaça.** In: Workshop Tecnológico sobre Vinhaça, 2007, Jaboticabal.