

RESSALVA

Atendendo solicitação da autora, o texto completo desta tese será disponibilizado somente a partir de 17/11/2018.



**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
(MICROBIOLOGIA APLICADA)**

**AVALIAÇÃO DO RESÍDUO DA FERMENTAÇÃO ABE (ACETONA-BUTANOL-
ETANOL) ORIGINADO DO APROVEITAMENTO DA VINHAÇA ETANÓLICA**

MARIANE APARECIDA MESSETTI FERREIRA

Tese apresentada ao Instituto de Biociências do Campus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas (Microbiologia Aplicada).

Novembro 2017

**AVALIAÇÃO DO RESÍDUO DA FERMENTAÇÃO ABE (ACETONA-
BUTANOL-ETANOL) ORIGINADO DO APROVEITAMENTO DA VINHAÇA
ETANÓLICA**

MARIANE APARECIDA MESSETTI FERREIRA

Orientadora: Profa. Dra. Dejanira de Franceschi de Angelis

Co-orientador: Prof. Dr. Ariovaldo José da Silva

Tese apresentada ao Instituto de
Biociências do Campus de Rio Claro,
Universidade Estadual Paulista,
como parte dos requisitos para
obtenção do título de Doutor em
Ciências Biológicas (Microbiologia
Aplicada).

Rio Claro – SP

Novembro 2017

604.6 Ferreira, Mariane Aparecida Messetti
F383a Avaliação do resíduo da fermentação ABE
 (acetona-butanol-etanol) originado do aproveitamento da
 vinhaça etanólica / Mariane Aparecida Messetti Ferreira. - Rio
 Claro, 2017
 98 f. : il., figs., gráfs., tabs.

 Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista,
 Instituto de Biociências de Rio Claro
 Orientadora: Dejanira de Franceschi de Angelis
 Coorientador: Ariovaldo José da Silva

 1. Resíduos. 2. Biodegradação. 3. Vinhaça. 4.
 Fermentação anaeróbia. 5. Toxicidade. I. Título.

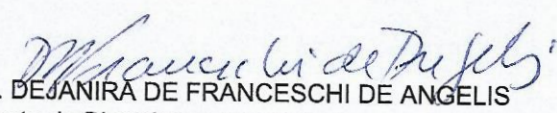
CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

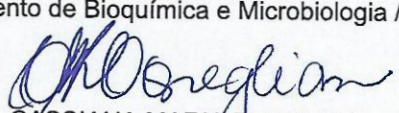
TÍTULO DA TESE: AVALIAÇÃO DO RESÍDUO DA FERMENTAÇÃO ABE (ACETONA-BUTANOL-ETANOL) ORIGINADO DO APROVEITAMENTO DA VINHAÇA ETANÓLICA.

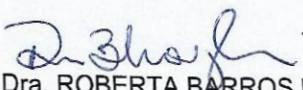
AUTORA: MARIANE APARECIDA MESSETTI FERREIRA

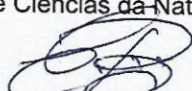
ORIENTADORA: DEJANIRA DE FRANCESCHI DE ANGELIS

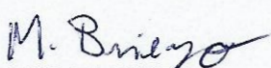
Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em CIÊNCIAS BIOLÓGICAS (MICROBIOLOGIA APLICADA), pela Comissão Examinadora:


Profa. Dra. DEJANIRA DE FRANCESCHI DE ANGELIS
Departamento de Bioquímica e Microbiologia / IB Rio Claro


Profa. Dra. CASSIANA MARIA REGANHAN CONEGLIAN
Faculdade de Tecnologia / UNICAMP


Profa. Dra. ROBERTA BARROS LOVAGLIO
Centro de Ciências da Natureza / Universidade Federal de São Carlos


Prof. Dr. EDERIO DINO BIDOIA
Departamento de Bioquímica e Microbiologia / IB Rio Claro


Prof. Dr. MICHEL BRIENZO
Laboratório de Caracterização de Biomassa / IPBEN - Instituto de Pesquisa em Bioenergia

Rio Claro, 17 de novembro de 2017

Este trabalho é dedicado ao meu filho
Gael, que chegou para dar sentido à
minha vida e alegrar os meus dias.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar agradeço ao soberano Senhor Jeová Deus, criador do universo, por me permitir chegar até aqui.

Agradeço à minha mãe, Maria Aparecida (*in memoriam*) por tudo o que fez por mim. Agora que sou mãe, percebo o quanto ela se sacrificou pelos filhos e lembro com carinho dos muitos momentos em que sempre me incentivou a estudar. Fica a saudade e a certeza que nos encontraremos novamente.

Ao meu pai, Onivaldo, que sempre será meu porto seguro nesse mundo. Exemplo de vida, guiou meus passos até aqui, sempre me incentivando. Não existe melhor pai!

Às minhas irmãs Elaine e Denise, por me ajudarem a cuidar do Gael enquanto terminava a tese.

À Janiel Carlos Ferreira por ter me dado o presente mais valioso da minha vida.

À minha querida orientadora, profa. Dra. Dejanira de Franceschi de Angelis, que me acolheu pela segunda vez quando eu mais precisava e me incentivou a fazer o doutorado. Serei eternamente grata pelo apoio. É um exemplo de trabalho e humildade e por isso é tão querida por todos!

À UNESP campus de Rio Claro por tudo. Uma vez aluna, sei que sempre serei bem acolhida nesta universidade. Agradeço ao programa de Pós-graduação em Microbiologia Aplicada pela oportunidade.

À Faculdade de Engenharia Agrícola (FEAGRI/Unicamp), em nome do meu co-orientador prof. Dr. Ariovaldo José da Silva e à MSc. Graciete Mary dos Santos, pelo fornecimento da vinhaça FA que possibilitou a execução deste trabalho.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa concedida.

À todos do Depto. de Bioquímica e Microbiologia, em especial aos técnicos de laboratório Inês, Maria Luiza, Beto, Carmem e Fátima, sempre prontos a ajudar.

Ao técnico de laboratório Adriano Uemura, pela grande ajuda!

Aos colegas de laboratório Zito, Márcio Ramos, Márcio Rozin, Eduardo Morales, João Paulo e todos os que já passaram por lá. Todos sempre muito dispostos a ajudar e a dar boas risadas!

À Nair Conde, pela amizade nesses 4 anos de doutorado e por toda ajuda.

À Dra. Dilza Nalin, pela ajuda e disponibilidade.

Ao prof. Dr. José Silvio Govone, pelo auxílio nas análises estatísticas.

À profa. Dra. Maria Aparecida Marin Morales e a Lais Sommaggio pelas análises de mutagenicidade.

Ao Oscar pelos ensaios no cromatógrafo gasoso e à Lusiane Pika pelo auxílio na metodologia e discussão dos resultados.

Ao prof. Dr. Jonas Contiero e à Dra. Luciana Fontes Coelho pelas análises de ácidos orgânicos no HPLC.

Ao prof. Dr. André Rodrigues, pelo aprendizado do estágio docência.

À toda equipe de profissionais do Centro de Convivência Infantil (CCI) da Unesp Rio Claro, que cuidaram com tanto carinho do meu pequeno para que eu pudesse concluir meu doutorado.

A todos os quais não citei nomes, pois a memória falha, mas que tiveram participação nesses anos e contribuíram para a realização deste trabalho.

Muito obrigada!

Não lhe ordenei que seja corajoso e forte? Não fique apavorado nem tenha medo, pois Jeová, seu Deus, estará com você aonde quer que você for.”
(Josué 1:9)

RESUMO

Diversos estudos tem avaliado a utilização da vinhaça em uma nova fermentação, visando a obtenção de sub-produtos. Nesta fermentação, chamada acetona-butanol-etanol (ABE), bactérias anaeróbias do gênero *Clostridium* podem converter matéria orgânica presente na vinhaça em acetona, butanol, etanol e ácidos orgânicos, que são recuperados do caldo fermentado mediante técnicas de separação. Após a recuperação dos produtos de interesse e da biomassa bacteriana, o resíduo final é descartado. Este resíduo, denominado vinhaça FA (vinhaça da fermentação anaeróbia) foi o objeto de estudo deste trabalho, bem como o processo fermentativo para a sua obtenção. Desse modo, o objetivo deste trabalho foi avaliar a vinhaça FA com relação às suas características físico-químicas e microbiológicas, bem como avaliar sua biodegradação em solo e sua toxicidade. Além disso, realizou-se fermentação utilizando-se cultura mista anaeróbia em meio de cultura sintético (MCS) suplementado com vinhaça e melaço. Avaliou-se a produção de ácidos orgânicos, acetona, butanol e etanol. A biodegradação da vinhaça FA em amostras de solo na presença e ausência de inóculo comercial foi avaliada mediante a produção de CO₂ durante 57 dias. A quantificação de microrganismos foi realizada no início e no final do ensaio. Foram realizados ensaios de toxicidade aguda utilizando-se o microcrustáceo *Daphnia similis*; fitotoxicidade sobre *Lactuca sativa* e genotoxicidade ambiental com *Allium cepa*. A fermentação foi conduzida por 7 dias, sendo quantificados os teores de acetona, butanol e etanol por cromatografia gasosa, e ácidos orgânicos por CLAE, no início e final do ensaio. A vinhaça FA em solo atingiu 30% de eficiência de biodegradação após 13 dias. Não houve diferenças estatisticamente significativas com a adição de inóculo comercial. Vinhaça FA apresentou elevada toxicidade aguda para *D. similis*, com EC(50)= 9,10%; no entanto ensaios com o solubilizado mostraram que a toxicidade foi removida após o processo de biodegradação em solo. O crescimento relativo de *L. sativa* foi comprometido com o aumento da concentração de vinhaça FA, e a germinação foi inibida na concentração de 50%. Embora a vinhaça FA não tenha induzido efeitos genotóxicos e mutagênicos em *A. cepa*, a citotoxicidade da amostra avaliada pelo índice mitótico foi dose dependente. As amostras mais concentradas (12 e 20%), apresentaram resultados estatisticamente significativos, interferindo no potencial citostático das células de *A. cepa*, levando a diminuição dos índices mitóticos e, conseqüentemente, decréscimo nos índices de germinação e de crescimento radicular. Os ensaios toxicológicos, permitem inferir que o descarte de vinhaça FA não deve ocorrer em rede hídrica, pois pode comprometer os organismos aquáticos; e para uso seguro como fertilizante agrícola, é indicado que esse resíduo passe por tratamento como a biodegradação, para que haja diminuição da sua toxicidade. Nos ensaios de fermentação anaeróbia realizados, não foram detectados acetona e butanol. Verificou-se produção de etanol de 2,32 e de 1,10 g/L nos ensaios contendo MCS suplementado com melaço e MCS suplementado com melaço e vinhaça, respectivamente. No ensaio contendo MCS suplementado somente com a vinhaça não houve produção de etanol. A suplementação com o melaço favoreceu a produção de ácido láctico pela cultura mista, enquanto a produção de ácido butírico foi favorecida pela presença da vinhaça, atingindo valores de até 31,8 e 13,9 g/L, respectivamente.

Palavras-chave: Biodegradação. Vinhaça. Fermentação anaeróbia. Toxicidade.

ABSTRACT

Several studies have evaluated the use of stillage in a new fermentation in order to obtain by-products. In this fermentation, called acetone-butanol-ethanol (ABE), anaerobic bacteria of the genus *Clostridium* can convert organic matter present in the stillage in acetone, butanol, ethanol and organic acids which are recovered from the fermented broth by separation techniques. After recovering the interest products and bacterial biomass, the final residue is discarded. This residue, called AF stillage (stillage from anaerobic fermentation) was the object of study of this work, as well as the fermentation process to obtain it. Thus, the objective of this work was to evaluate AF stillage in relation to its physico-chemical and microbiological characteristics, as well as to evaluate its biodegradation in soil and its toxicity. In addition, fermentation was carried out using anaerobic mixed culture in synthetic culture medium (SCM) supplemented with stillage and molasses. The production of organic acids, acetone, butanol and ethanol was evaluated. The biodegradation of AF stillage was evaluated in soil samples in the presence and absence of commercial inoculum, through the production of CO₂ for 57 days. Microorganisms quantification was performed at the beginning and at the end of the test. Acute toxicity tests using the microcrustacean *Daphnia similis*; phytotoxicity with *Lactuca sativa* and environmental genotoxicity with *Allium cepa* were performed. The fermentation was conducted for 7 days, and the contents of acetone, butanol and ethanol were determined by gas chromatography and organic acids by HPLC at the beginning and end of the test. AF stillage in soil reached 30% biodegradation efficiency after 13 days. There were no statistically significant differences with the addition of commercial inoculum. AF stillage presented high acute toxicity for *D. similis*, with CE(50) = 9.10%; however, the solubilized tests showed that the toxicity was removed after the soil biodegradation process. The relative growth of *L. sativa* was compromised with increasing AF stillage concentration, and germination was inhibited at 50%. Although AF stillage did not induce genotoxic and mutagenic effects in *A. cepa*, the cytotoxicity of the sample evaluated by the mitotic index was dose dependent. The most concentrated samples (12 and 20%) presented statistically significant results, interfering with the cytostatic potential of *A. cepa* cells, leading to a decrease in mitotic indexes and, consequently, a decrease in germination and root growth indexes. The toxicological tests, allow to infer that the disposal of AF stillage should not occur in water supply, as it may compromise aquatic organisms; and for safe use as agricultural fertilizer, it is indicated that such waste passes through treatment such as biodegradation to reduce its toxicity. In the anaerobic fermentation tests, acetone and butanol were not detected. There was an ethanol production of 2.32 and 1.10 g/L in the tests containing SCM supplemented with molasses and SCM supplemented with molasses and stillage, respectively. In the tests containing SCM supplemented with only stillage, there was not ethanol production. The supplementation with molasses favored the production of lactic acid by the mixed culture, while the production of butyric acid was favored by the presence of stillage, reaching values of up to 31.8 and 13.9 g/L, respectively.

Keywords: Biodegradation. Vinasse. Stillage. Anaerobic fermentation. Toxicity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Rotas bioquímicas do metabolismo da glicose por <i>Clostridium acetobutylicum</i>	7
Figura 2 - Fluxograma do ensaio de adaptação do inóculo ao melaço e à vinhaça.....	20
Figura 3 - Frasco reator com adaptação de dispositivo para entrada e saída de gases.....	21
Figura 4 - Respirômetro de Bartha.....	26
Figura 5 - Indicação dos pontos de medição do comprimento da raiz de alface.....	30
Figura 6 – Quantificação final de etanol (g/L) produzido durante os diferentes ensaios de fermentação anaeróbia.....	34
Figura 7 - Quantificação final de ácidos orgânicos (g/L) produzidos durante os diferentes ensaios de fermentação anaeróbia.....	37
Figura 8 - Resultados da quantificação de bactérias anaeróbias presentes no início e no final do ensaio de fermentação, com duração de 7 dias, para produção da vinhaça FA (UNESP), expresso em unidades formadoras de colônias (UFC/mL).....	38
Figura 9 - Resultados das medidas de densidade óptica em função do tempo de fermentação anaeróbia.....	40
Figura 10 - Resultados do valores de pH em função do tempo de fermentação anaeróbia.....	42
ARTIGO 1	
Figure 1 - Cumulative production of CO ₂ in different treatments in the respirometry test with AF stillage.....	55
ARTIGO 2	
Figura 1 - Índices de germinação (%) de sementes de <i>Lactuca sativa</i> desenvolvidas com a adição de diferentes concentrações de vinhaça FA.....	77
Figura 2 - Germinação relativa (%) de sementes de <i>Lactuca sativa</i> desenvolvidas com a adição de diferentes concentrações de vinhaça FA.....	77

Figura 3 - Crescimento relativo (%) de sementes de <i>Lactuca sativa</i> desenvolvidas com a adição de diferentes concentrações de vinhaça FA.....	78
Figura 4 - Porcentagem de germinação das sementes de <i>Allium cepa</i> no ensaio de toxicidade, desenvolvidas com a adição de diferentes concentrações de vinhaça FA.....	80
Figura 5 - Frequência do índice mitótico observado em células meristemáticas de <i>Allium cepa</i> , submetidas ao ensaio de genotoxicidade, utilizando diferentes concentrações de vinhaça FA.....	81
Figura 6 - Frequência de morte celular observado em células meristemáticas de <i>Allium cepa</i> , submetidas ao ensaio de genotoxicidade, utilizando diferentes concentrações de vinhaça FA.....	82
Figura 7 - Frequência dos danos genotóxicos observado em células meristemáticas de <i>Allium cepa</i> , submetidas ao ensaio de genotoxicidade, utilizando diferentes concentrações de vinhaça FA.....	83
Figura 8 - Frequência dos danos mutagênicos observado em células meristemáticas de <i>Allium cepa</i> , submetidas ao ensaio de genotoxicidade, utilizando diferentes concentrações de vinhaça FA.....	83

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Composição do Reinforced Clostridial Medium (RCM).....	14
Tabela 2 - Solução de vitaminas do Reinforced Clostridial Medium (RCM).....	14
Tabela 3 - Solução de micronutrientes utilizada no Meio de Cultura Sintético (MCS).....	15
Tabela 4 - Solução de macronutrientes utilizada no Meio de Cultura Sintético (MCS).....	15
Tabela 5 - Solução de vitaminas utilizada no Meio de Cultura Sintético (MCS).....	15
Tabela 6 - Solução de agente redutor utilizada no Meio de Cultura Sintético (MCS).....	15
Tabela 7 - Solução tampão utilizada no Meio de Cultura Sintético (MCS).....	15
Tabela 8 - Protocolo do ensaio de adaptação do inóculo ao Meio de Cultura Sintético (MCS) suplementado com melaço e vinhaça bruta em concentrações crescentes.....	19
Tabela 9 – Teor de açúcares redutores totais (ART) presentes nas amostras de melaço e vinhaça bruta utilizados no ensaio de fermentação.....	21
Tabela 10 - Protocolo do ensaio de fermentação anaeróbia para obtenção de vinhaça FA (UNESP).....	22
Tabela 11 - Parâmetros físico-químicos analisados baseados na Norma Técnica P4.231 (CETESB, 2006).....	25
Tabela 12 - Parâmetros físico-químicos analisados baseados no Artigo 19-A do Decreto No. 8.468 (SÃO PAULO, 1976).....	25
Tabela 13 - Características físicas do solo controle utilizado no ensaio de respirometria.....	27
Tabela 14 - Características químicas do solo controle, macro e micronutrientes.....	27
Tabela 15 - Quantificação de bactérias e fungos presentes na vinhaça FA expresso em unidades formadoras de colônias (UFC/mL).....	33
Tabela 16 – Quantificação final de ácidos orgânicos (g/L) produzidos durante os diferentes ensaios de fermentação anaeróbia.....	36

Tabela 17 – Rendimento da produção de ácidos orgânicos durante os diferentes ensaios de fermentação anaeróbia.....	38
---	----

Tabela 18 - Resultados das análises físico-químicas da vinhaça bruta utilizada para a fermentação anaeróbia e do seu resíduo final (vinhaça FA/UNESP), baseadas na Norma Técnica P4.231 (CETESB, 2006) para caracterização de vinhaça.....	43
---	----

Tabela 19 - Valores máximos permitidos (VMP) para lançamento de efluentes em esgoto segundo Decreto No. 8.468/76 (SÃO PAULO, 1976) e resultados das análises físico-químicas da vinhaça bruta e de seu resíduo final (vinhaça FA/UNESP).....	44
---	----

ARTIGO 1

Table 1 - Physicochemical composition of the AF stillage.....	52
--	----

Table 2 - Physical characteristics of the control soil.....	52
--	----

Table 3 - Chemical characteristics of control soil (macro and micronutrientes).....	53
--	----

Table 4 - Efficiency of biodegradation of AF stillage in the respirometry test for 57 days.....	57
--	----

Table 5 - Initial and final counts of heterotrophic bacteria and fungi from the respirometry test, expressed in colony forming units per gram of soil (CFU/g).....	57
---	----

Table 6 - Results of the acute toxicity test on <i>D. similis</i> for raw AF stillage.....	58
---	----

Table 7 - Results of the acute toxicity test on <i>D. similis</i> performed with leachate using respirometry test.....	59
---	----

ARTIGO 2

Tabela 1 - Parâmetros físico-químicos analisados, baseados na Norma Técnica P4.231 (CETESB, 2006).....	69
---	----

Tabela 2 - Parâmetros físico-químicos analisados, baseados no Artigo 19-A do Decreto No. 8.468 (SÃO PAULO, 1976).....	69
--	----

Tabela 3 - Resultados das análises físico-químicas da vinhaça bruta utilizada para a fermentação anaeróbia e do seu resíduo final (vinhaça FA), baseadas na Norma Técnica P4.231 (CETESB, 2006) para caracterização de vinhaça.....	73
--	----

Tabela 4 - Valores máximos permitidos (VMP) para Lançamento de efluentes em esgoto segundo Decreto No. 8.468/76 (SÃO PAULO, 1976) e resultados das análises físico-químicas da vinhaça bruta e de seu resíduo final (vinhaça FA).....75

Tabela 5 - Resultado do ensaio de toxicidade aguda em *Daphnia similis*.....76

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABE – acetona-butanol-etanol
ANOVA - Análise de Variância
ART – açúcares redutores totais
AT – ácido térmico
atm - atmosfera padrão
Ba(OH)₂ – hidróxido de bário
C₂H₇NO₂ – acetato de amônio
CE(50) - Concentração Efetiva Média
CETESB - Companhia Ambiental do Estado de São Paulo
CN – controle negativo
CO₂ – gás carbônico
CONAB - Companhia Nacional de Abastecimento
CP – controle positivo
CR – crescimento relativo
DBO - Demanda Bioquímica de Oxigênio
DDGS - *Dried Distiller Grains With Soluble*
DNS - ácido 3,5 dinitrosalicílico
DQO - Demanda Química de Oxigênio
EB – eficiência de biodegradação
FA – fermentação anaeróbia
FEAGRI – Faculdade de Engenharia Agrícola
FeSO₄.7H₂O - sulfato de ferro heptahidratado
FID - Flame Ionization Detector
g – grama
GR – germinação relativa
H₂O – água
HCl – ácido clorídrico
IAC - Índice de Alterações Cromossômicas
IG – índice de germinação
IM - Índice Mitótico
IMC - Índice de Morte Celular
IMt - Índice de Mutagenicidade
K₂CO₃ – carbonato de potássio
K₂HPO₄ – Fosfato (mono)ácido de potássio
KH₂PO₄ - dihidrogenofosfato de potássio
KOH – hidróxido de potássio
Kpa - quilopascal
l – litro
μ - micro
m³ – metro cúbico
MCS – meio de cultura sintético
mg - miligrama
MgSO₄.7H₂O – sulfato de magnésio heptahidratado
min – minuto
mL - mililitro
MMS - metanosulfonato de metilo
MN - micronúcleos

MnSO₄ – sulfato de manganês
(NH₄)₂SO₄ – sulfato de amônio
NaHCO₃ – bicarbonato de sódio
NaOH – hidróxido de sódio
nm – nanômetros
OD – oxigênio dissolvido
OECD - Organization for Economic Cooperation and Development
PCA – *Plate Count Agar*
pH potencial hidrogeniônico
ppm – partes por milhão
q.s.p. – quantidade suficiente para
QC - quebras cromossômicas
R² – coeficiente de determinação
RALF - reator anaeróbio de leito fluidizado
RCM - *Reinforced Clostridial Medium*
rpm – rotações por minuto
TT – tratamento térmico
UFC – unidades formadoras de colônia
UT - Unidades Tóxicas
VMP – valores máximos permitidos
ZnSO₄ – sulfato de zinco

SUMÁRIO

	página
1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	3
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
3.1. Vinhaça da fermentação etanólica	4
3.2. Fermentação Acetona-Butanol-Etanol (ABE)	7
3.3. Avaliação de toxicidade e genotoxicidade de efluentes	10
4. MATERIAL E MÉTODOS	13
4.1. Meios de cultura e soluções	13
4.2. Resíduos	16
4.2.1. Obtenção da Vinhaça FA	16
4.2.1.1. Vinhaça FA (FEAGRI)	16
4.2.1.1.1. Preparação para utilização da Vinhaça FA (FEAGRI)	17
4.2.1.2. Vinhaça FA (UNESP)	18
4.2.1.2.1. Vinhaça bruta	18
4.2.1.2.2. Pré-tratamento do inóculo	18
4.2.1.2.3. Crescimento do inóculo	18
4.2.1.2.4. Adaptação do inóculo ao melaço e à vinhaça	19
4.2.1.2.4.1. Determinação de açúcares redutores totais (ART) presentes no melaço e na vinhaça	20
4.2.1.2.5. Ensaio de fermentação	21
4.2.1.2.5.1. Quantificação de bactérias anaeróbias	22
4.2.1.2.5.2. Densidade óptica	23
4.2.1.2.5.3. Quantificação de solventes	23

4.2.1.2.5.4. Quantificação de ácidos orgânicos.....	24
4.3. Ensaio com a Vinhaça FA (FEAGRI).....	24
4.3.1. Análises físico-químicas.....	24
4.3.2. Análises microbiológicas.....	25
4.3.3. Avaliação de biodegradação em solo.....	26
4.3.3.1. Solo utilizado no ensaio de respirometria.....	27
4.3.3.2. Ensaio de respirometria.....	27
4.3.3.3. Análise microbiológica do ensaio de respirometria.....	28
4.3.3.4. Ensaio de Toxicidade dos solubilizados.....	29
4.3.4. Ensaio toxicológicos.....	29
4.3.4.1. Ensaio de toxicidade com <i>Daphnia similis</i>	29
4.3.4.2. Ensaio de Germinação de sementes.....	29
4.3.4.3. Ensaio de Mutagenicidade com <i>Allium cepa</i>	30
4.4. Análises Estatísticas.....	31
4.4.1. Ensaio de respirometria para avaliação de biodegradação em solo.....	31
4.4.2. Ensaio de toxicidade aguda com <i>D. similis</i>	32
4.4.3. Ensaio de mutagenicidade com <i>A. cepa</i>	32
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	33
5.1. Vinhaça FA (FEAGRI).....	33
5.1.1. Análise Microbiológica.....	33
5.2. Vinhaça FA (UNESP).....	34
5.2.1. Ensaio de fermentação.....	34
5.2.1.1. Quantificação de solventes.....	34
5.2.1.2. Quantificação de ácidos orgânicos.....	36
5.2.1.3. Quantificação de bactérias anaeróbias.....	38

5.2.1.4. Densidade óptica.....	39
5.2.1.5. Acompanhamento do pH.....	41
5.2.2. Análises físico-químicas.....	42
5.3. Artigos.....	45
5.3.1. Artigo 1.....	46
5.3.2. Artigo 2.....	64
6. CONCLUSÕES.....	90
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	92

1 INTRODUÇÃO

O principal efluente da fermentação etanólica é a vinhaça, gerada anualmente no Brasil na proporção de 10 litros de vinhaça por litro de etanol produzido. É uma das grandes preocupações da indústria sucro-alcooleira e sua aplicação como fertilizante em campos agrícolas é amplamente utilizada. Contudo, essa operação a longo prazo pode afetar a qualidade do solo e contaminar as águas superficiais e subterrâneas. Assim, outras aplicações tem sido propostas para o reaproveitamento deste resíduo agroindustrial; e uma das alternativas é sua biodigestão mediante fermentação visando a geração de subprodutos.

A fermentação ABE é realizada por bactérias anaeróbias do gênero *Clostridium*, que convertem açúcares em solventes gerando acetona, butanol e etanol. Com a busca por biocombustíveis como o butanol, este tipo de fermentação tem sido objeto de interesse pelo setor industrial. A utilização da vinhaça etanólica como substrato pode diminuir os custos de produção, uma vez que recicla esse resíduo ambiental. No entanto, para cada litro de butanol produzido são gerados cerca de 80 litros de água residuária. Uma eventual produção de butanol em escala anual de bilhões de litros se tornará um grande problema ambiental.

Assim, o resíduo da fermentação anaeróbia da vinhaça para obtenção de subprodutos é o principal objeto de estudo deste trabalho, sendo denominado “vinhaça da fermentação anaeróbia” (Vinhaça FA). É necessário discutir soluções para o descarte da vinhaça FA, avaliando sua biodegradabilidade, bem como sua toxicidade tanto em ambiente aquático como no solo, para que não acarrete danos ambientais.

Substâncias tóxicas se acumulam no meio, comprometendo a fauna e a flora, e os seres humanos podem ser afetados por meio da transferência dos contaminantes pela cadeia trófica ou pela água de abastecimento. Na biorremediação, que é um processo biológico de tratamento amplamente utilizado, os microrganismos utilizam as substâncias xenobióticas como alimento para seu desenvolvimento e assim degradam contaminantes ambientais. A diversidade microbiana do solo exerce um papel muito importante nos processos de biodegradação de rejeitos industriais.

A interação entre diferentes métodos de avaliação de potenciais tóxicos e genotóxicos fornecem uma visão mais global e abrangente sobre o efeito de um agente químico. Os contaminantes, antes e após passarem por processos de biorremediação, podem ser avaliados mediante ensaios de ecotoxicidade, que levam em consideração o resultado do sinergismo de substâncias presentes em determinado meio sobre os organismos. Ensaios ecotoxicológicos com organismos padronizados são amplamente empregados para estimar o efeito tóxico de determinados compostos, dando subsídios para avaliações de riscos aos diferentes tipos de ambientes. Para o ambiente aquático, destaca-se a utilização de microcrustáceos do gênero *Daphnia* spp para avaliação de toxicidade aguda. Ensaios utilizando plantas superiores como a alface (*Lactuca sativa*) têm sido utilizados em estudos sobre a fitotoxicidade de águas e sedimentos contaminados. Ainda dentre as plantas superiores, a cebola (*Allium cepa*) é rotineiramente utilizada para avaliar contaminações ambientais e os mecanismos de ação de compostos químicos através da avaliação de efeitos citotóxicos, genotóxicos e mutagênicos.

Desse modo, o presente trabalho foi desenvolvido em duas etapas. Na Etapa I avaliou-se a vinhaça FA proveniente do trabalho de Santos (2015). Foram realizados ensaios físico-químicos, microbiológicos, ecotoxicológicos e de biodegradabilidade. Estes resultados foram organizados na forma de dois artigos científicos. Na Etapa II efetuou-se a fermentação ABE com cultura mista para geração de vinhaça FA. A quantificação dos subprodutos da fermentação, bem como os resultados das análises deste segundo resíduo obtido no Laboratório de Toxicidade de Águas do Depto. de Bioquímica e Microbiologia da Unesp/ Rio Claro-SP estão descritos na tese.

6. CONCLUSÕES

Com relação ao processo de fermentação anaeróbia (fermentação ABE):

- pode ser realizado utilizando-se a vinhaça, um resíduo agroindustrial, bem como o melaço, subproduto da fermentação etanólica;
- nas condições experimentais deste trabalho gerou principalmente etanol, ácido succínico, ácido láctico, ácido acético e ácido butírico;
- a adição de melaço ao meio de cultura favoreceu a predominância de *Lactobacillus* sobre as demais espécies da cultura mista utilizada, evidenciada pela produção de ácido láctico, etanol e ácido acético. Espécies de *Clostridium* foram favorecidas na presença de vinhaça, evidenciada pela produção de ácido butírico e isobutírico.

Com relação à vinhaça FA:

- ocorreu diminuição de DQO e DBO após o processo fermentativo, quando comparado com a vinhaça bruta utilizada, diminuindo seu potencial poluidor;
- a presença de sulfato em nível elevado na vinhaça FA, aliada a elevada toxicidade para o microcrustáceo *D. similis* inviabilizam seu descarte em corpos hídricos;
- concentrações de vinhaça FA abaixo de 6% não influenciaram na germinação das sementes e no crescimento das radículas de *L. sativa* (alface). Embora não tenha induzido efeitos genotóxicos e mutagênicos em *A. cepa* (cebola), sua utilização em concentrações acima de 12% mostrou ser citotóxica;

- nos ensaios de biodegradação da vinhaça FA em solo, realizadas mediante o método respirométrico, a eficiência foi superior a 30% ao final de 13 dias de ensaio para todas as concentrações avaliadas, na presença e ausência de inóculo comercial. Ao final de 57 dias, a maior eficiência foi observada para a amostra com solo contendo 3% de vinhaça FA. Apesar de sua adição não ter se mostrado estatisticamente significativa, o inóculo acelerou o processo de biodegradação em todas as amostras avaliadas. Amostras na presença do inóculo atingiram 30% de eficiência de biodegradação em um tempo menor;
- desse modo, são necessários mais estudos para o uso seguro da vinhaça FA como fertilizante agrícola, sendo indicado que esse resíduo passe por tratamento de degradação biológica, como a biodegradação em solo, para que haja a diminuição da sua toxicidade.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AOAC - ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official Methods of Analysis**: 13 ed., Washington, D. C., p. 95, 1995.

AQUINO, S.F.; CHERNICHARO, C.A. Acúmulo de ácidos graxos voláteis (AGVs) em reatores anaeróbios sob estresse: causas e estratégias de controle. **Engenharia Sanitária Ambiental**, v. 10, n. 2, p. 152-161, 2005.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS (ABNT) **NBR 14.283** Resíduos em solo – Determinação da biodegradação pelo método respirométrico, 1999.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS (ABNT) **NBR 12713** Ecotoxicologia Aquática - Toxicidade aguda - Método de ensaio com *Daphnia* spp. (Crustacea, Cladocera), 2009.

AHN, J.H., SANG, B.I, UM, Y. Butanol production from thin stillage using *Clostridium pasteurianum*. **Bioresource Technology** 102:4934-4937, 2011.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2011.01.046>

ALMEIDA, N.C.; TOMASELLA, R.C.; GOVONE, S.; KINJO, S.; ANGELIS, D.F. Study of stillage biodegradation by respirometry in sandy and clay soils. **African Journal of Agricultural Research** 8(35): 4506-4513, 2013. <http://dx.doi.org/10.5897/AJAR12.1555>

APHA. **Standard methods for the examination of water and wastewater**. 20. ed. Washington, DC, USA: American Public Health Association/American Water Works Association / Water Environment Federation, 1998.

APHA. **Standard methods for the examination of water and wastewater**. 22. ed. Washington, DC, USA: American Public Health Association/American Water Works Association / Water Environment Federation, 2012.

ARIENZO, M.; CHRISTEN, E.W.; QUAYLE, W.; KUMAR, A. A review of the fate of potassium in the soil-plant system after land application of wastewaters. **Journal of Hazardous Materials**, v.164, p.415-422, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2008.08.095>

ARNAIZ, R. R. **Las toxinas ambientales y sus efectos genéticos**. Mexico, 2. ed., 267p, 1995.

BARTHA, R.; PRAMER, D. Features of flask and method for measurement of the persistence and biological effects of pesticides in soil. **Soil Science** 100(1): 68-70, 1965.

BENTO, F.M.; CAMARGO, F.A.O.; OKEKE, B. Bioremediation of soil contaminated by diesel oil. **Brazilian Journal of Microbiology**, 34(1): 65-68, 2003.
<http://dx.doi.org/10.1590/S1517-83822003000500022>

BIANCHI, J.; ESPINDOLA, E. L.G.; MARIN-MORALES, M.A. Genotoxicity and mutagenicity of water samples from the Monjolinho River (Brazil) after receiving untreated effluents. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 74, n. 4, p. 826-833, 2011.

BIEBL, H. Fermentation of glycerol by *Clostridium pasteurianum* – batch and continuous culture studies. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, 27(1): 18-26, 2001. <http://dx.doi.org/10.1038/sj.jim.7000155>

BRASIL. Decreto n. 8.468, de 8/9/1976: Regulamento da lei nº 997, de 31 de maio de 1976, que dispõe sobre a prevenção e o controle da poluição do meio ambiente. **Diário Oficial do Estado**, S. Paulo, 9 set. 1976. p. 8-9.

BRITO, M. F. F. **Análise do ciclo de vida da produção do butanol**. Dissertação (Mestrado) – Instituto Politécnico do Porto, Instituto Superior de Engenharia do Porto (ISEP), Depto. de Engenharia Mecânica, Porto, Portugal, 2015.

BRYANT, D. L.; BLASCHEK, H. P. Buffering as a means for increasing growth and butanol production by *Clostridium acetobutylicum*. **Journal of Industrial Microbiology**, v. 3, p. 49–55, 1988.

CABELLO, P.E.; SCOGNAMIGLIO, F.P.; TERÁN, F.J.C. Tratamento de vinhaça em reator anaeróbico de leito fluidizado. **Engenharia Ambiental - Espírito Santo do Pinhal**. 6(1):321-338, 2009.

CAMPOS, C. R. **Monitoramento da microbiota e dos parâmetros físico-químicos em vinhoto**. 2009. 79 p. Tese. (Doutorado em Microbiologia Agrícola) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2009.

COMPANHIA AMBIENTAL DO ESTADO DE SÃO PAULO (CETESB) **Norma técnica L. 6.245** – Coleta e preparação de amostras. Procedimentos, São Paulo, 25p, 1984.

COMPANHIA AMBIENTAL DO ESTADO DE SÃO PAULO (CETESB) **P4.231** - Vinhaça – critérios e procedimentos para aplicação no solo agrícola. São Paulo, 2006. Disponível em: < http://www.cetesb.sp.gov.br/Tecnologia/camaras/P4_231.pdf > Acesso em: 19 abr 2013.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO (CONAB) Acomp. safra bras. cana. **Quarto Levantamento**, Brasília, 2(4): 1-76, 2016.

CORAZZA, R. I. Reflexões sobre o papel das políticas ambientais de ciência e tecnologia na modelagem de opções produtivas ‘mais limpas’ numa perspectiva evolucionista: um estudo sobre o problema da disposição da vinhaça. **Anais do III Encontro Nacional da Sociedade Brasileira de Economia Ecológica**, 1999.

COSTA, C.R.; OLIVI, P.; BOTTA, C.M.; ESPINDOLA, E.L. A toxicidade em ambientes aquáticos: discussão e métodos de avaliação. **Química Nova**, 31(7), 1820-1830, 2008.

DAVIS, L., JEON, Y.-J., SVENSON, C., ROGERS, P., PEARCE, J., PEIRIS, P., Evaluation of wheat stillage for ethanol production by recombinant *Zymomonas mobilis*. **Biomass and Bioenergy**, v.29 (1), p.49–59, 2005. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2005.02.006>

DEWHURST, R. E.; WHEELER, J. R.; CHUMMUN, K. S.; MATHER, J. D.; CALLAGHAN, A.; CRANE, M. The comparison of rapid bioassays for the assessment of

urban ground water quality. **Chemosphere**, v.47, p.547–554, 2002.
[https://doi.org/10.1016/S0045-6535\(02\)00060-7](https://doi.org/10.1016/S0045-6535(02)00060-7)

DOWD, M.K.; JOHANSEN, S.L.; CANTARELLA, L.; REILLY, P.J. Low molecular weight organic composition of ethanol stillage from sugarcane molasses, citrus waste, and sweet whey. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** 42(2): 283-288, 1994.
<http://dx.doi.org/10.1021/jf00038a011>

EPA. ECOLOGICAL EFFECTS TEST GUIDELINES. **OPPTS850.4200**. Seed Germination/ Root Elongation Toxicity Test. EPA712-C-96-154. April 1996.

STEPHENS, G. M.; HOLT, R. A.; GOTTSCHAL, J. C.; MORRIS, J. G. Studies on the stability of solvent production by *Clostridium acetobutylicum* in continuous culture. **Journal of Applied Microbiology**, 58(6), 597-605, 1985.

EZEJI, T.C.; QURESHI, N.; BLASCHEK, H.P. Bioproduction of butanol from biomass: From genes to bioreactors. **Current Opinion in Biotechnology** 18: 220-227, 2007.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.copbio.2007.04.002>

EZEJI, T.; BLASCHEK, H.P. Fermentation of dried distillers' grains and soluble (DDGS) hydrolysates to solvents and value-added products by solventogenic *Clostridia*. **Bioresource Technology**, v.99 (12), p.5232–5242, 2008. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2007.09.032>

FERRAZ, C.A.M.; AQUARONE, E.; KRAUTER, M.; BALLONI, W.; FLORENZANO, G. Utilização de subprodutos da indústria alcooleira na obtenção de biomassa de *Spirulina maxima*. Parte II. Emprego do resíduo da destilação do mosto fermentado (vinhaça). **Revista de Microbiologia**, 17:15-25, 1986.

FISKESJO, G. The *Allium* test. An alternative in environmental studies: the relative toxicity of metal ions. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v.197, n.2, p.243-260, 1988. [https://doi.org/10.1016/0027-5107\(88\)90096-6](https://doi.org/10.1016/0027-5107(88)90096-6)

FREIRE, W.J.; CORTEZ, L.A.B. **Vinhaça de cana-de-açúcar**. Guaíba: Agropecuária, 203p, 2000.

FUESS, L. T.; GARCIA, M. L. Implications of stillage land disposal: A critical review on the impacts of fertigation. **Journal of environmental management**, v. 145C, p. 210–229, 21 jul. 2014.

GOMES, M.T.M.S.; EÇA, K.S.; VIOTTO, L.A. Concentração da vinhaça por microfiltração seguida de nanofiltração com membranas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, 46(6): 633-638, 2011. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-204X2011000600009>

GÓMEZ, J.; RODRÍGUEZ, O. Effects of vinasse on sugarcane (*Saccharum officinarum*) productivity. **Revista de la Facultad de Agronomía**, 17: 318-326, 2000.

GONÇALVES, C.A.S.; SILVA, E.L. Tratamento Físico-Químico da Vinhaça. In: **Congreso Interamericano de Ingeniería Sanitaria y Ambiental**, 27. ABES, Fortaleza, 2000. p. 1-8

GONZALEZ, R.; CAMPBELL, P.; WONG, M. Production of ethanol from thin stillage by metabolically engineered *Escherichia coli*. **Biotechnology Letters**, 32(3): 405–411, 2010. <http://dx.doi.org/10.1007/s10529-009-0159-2>

GREEN, E.M. Fermentative production of butanol - the industrial perspective. **Current opinion in biotechnology**, 22: 1-7, 2011. <http://dx.doi.org/10.1016/j.copbio.2011.02.004>

HAMILTON, M.A.; RUSSO, R.C.; THURFTON, R.B. Trimmed Spearman-Kärber method for estimating median lethal concentration in toxicity bioassays. **Environmental Science and Technology**, 11:714–719, 1977. doi:10.1021/es60130a004

HERKOVITS, J.; CARDELLINI, P.; PAVANATI, C.; PEREZ-COLL, C. S. Susceptibility of early life stages of *Xenopus laevis* to cadmium. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v.16, n.2, p.312-316, 1997. <http://dx.doi.org/10.1002/etc.5620160229>

JARDIM, G. M. **Estudos Ecotoxicológicos da Água e do Sedimento do Rio Corumbataí, SP**. Dissertação. (Mestrado). 2004. 138 f. Universidade de São Paulo, Piracicaba, SP, 2004.

JONES, D.T.; WOODS, D.R. Acetone-butanol fermentation revisited. **Microbiological Reviews**, v.50, p.484–524, 1986.

KIM, Y.; MOSIER, N.S.; HENDRICKSON, R.; EZEJI, T.; BLASCHEK, H.; DIEN, B.; COTTA, M.; DALE, B.; LADISCH, M.R. Composition of corn dry-grind ethanol by-products: DDGS, wet cake, and thin stillage. **Bioresource Technology**, 99(12): 5165-5176, 2008. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2007.09.028>

LELIS NETO, J.A. **Monitoramento de componentes químicos da vinhaça aplicados em diferentes tipos de solo**. 88p. Dissertação de Mestrado em Agronomia, Área de concentração: Irrigação e Drenagem – Escola Superior de Agronomia “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2008.

LEME, D.M.; MARIN-MORALES, M.A. *Allium cepa* test in environmental monitoring: A review on its application. **Mutation Research/Reviews in Mutation Research**, v.682, p.71–81, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2009.06.002>

LINDEN, J.C.; MOREIRA, A.R.; LENZ, T.G. Acetone and butanol comprehensive biotechnology. The principles, application and regulations of biotechnology in industry, agriculture and medicine. In: M.Y. MURRAY, W.B. HARVEY, S. DREW, D.I.C. WANG (Eds): **The practice of biotechnology: current commodity product**, vol.3, Pergamon Press, London, p.915-929, 1985.

LIU, S.; QURESHI, N. How microbes tolerate ethanol and butanol. **New Biotechnology** 26(3-4): 117–21, 2009. <http://dx.doi.org/10.1016/j.nbt.2009.06.984>

LUDOVICE, M.T.F. **Estudo do efeito poluente da vinhaça infiltrada em canal condutor de terra sobre lençol freático**. 143 p. Tese (Mestrado em Engenharia Civil) – Programa de Pós-Graduação em Engenharia Civil, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Campinas, 1997.

MARIANO, A.P.; CRIVELARO, S.H.R.; ANGELIS, D.F.; BONOTTO, D.M. The use of Vinasse as an Amendment to Ex-Situ Bioremediation of Soil and Groundwater Contaminated with Diesel Oil. **Brazilian Archives of Biology and Technology**. 52(4): 1043-1055, 2009. <http://dx.doi.org/10.1590/S1516-89132009000400030>

MARIANO, A.P.; QURESHI, N.; MACIEL FILHO, R.; EZEJI, T.C. Bioproduction of Butanol in Bioreactors: New Insights From Simultaneous In Situ Butanol Recovery to Eliminate Product Toxicity. **Biotechnology and Bioengineering**, 108: 1757–1765, 2011. <http://dx.doi.org/10.1002/bit.23123>

MARIANO, A.P.; MACIEL FILHO, R. Improvements in Biobutanol Fermentation and Their Impacts on Distillation Energy Consumption and Wastewater Generation. **Bioenergy Research**, 5: 504–514, 2012. <http://dx.doi.org/10.1007/s12155-011-9172-0>

MAZZEO, D.E.C.; FERNANDES, T.C.C.; LEVY, C.E.; FONTANETTI, C.S.; MARIN-MORALES, M.A. Monitoring the natural attenuation of a sewage sludge toxicity using the *Allium cepa* test. **Ecological Indicators**, 56: 60, 69, 2015.

MELLO, E.B.; CANEPA, E.L.; COSTA, M.M. Visões Ambientais para o Financiamento de Biocombustíveis no Brasil. In: **Workshop A Expansão da Agroenergia e seus Impactos sobre os Ecossistemas Naturais Brasileiros, Anais**. Rio de Janeiro: FBDS, CIB, BNDES, 2007. Disponível em: http://www.conservation.org.br/publicacoes/files/15_Finaciamento_Biocombust_BNDES.pdf >Acesso em: abr 2013.

MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, Washington, US, v. 31, n. 3, p. 426- 428, Mar. 1959.

MONOT, F.; MARTIN, J.; PETITDEMANGE, H.; GAY, R. Acetone and Butanol Production by *Clostridium acetobutylicum* in a Synthetic Medium. **Applied and Environmental Microbiology**, 44(6): 1318–1324, 1982.

MORAES, D. S. L.; JORDAO, B. Q. Degradação de recursos hídricos e seus efeitos sobre a saúde humana. **Revista de Saúde Pública**, v.36, n.3, p.370-374, 2002.

MOZETO, A. A.; ZAGATTO, P. A. In: ZAGATO, P.A., BERTOLETTI, E. **Ecotoxicologia aquática - Princípios e Aplicações**. São Carlos: Rima Editora, Cap. 2, p.15-38, 2006.

NI, Y.; WANG, Y.; SUN, Z. Butanol production from cane molasses by *Clostridium saccharobutylicum* DSM 13864: batch and semicontinuous fermentation. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 166, n. 8, p. 1896–907, abr. 2012. <http://dx.doi.org/10.1007/s12010-012-9614-y>

NOUR, E.A.A.; CANDELLO, F.P.; DOS SANTOS, E.M.R.; BARRETTO, A.S.; DOMINGUES, L.M. Tratamento biológico de formaldeído: toxicidade residual monitorada por bioensaios com *Daphnia similis*. **Ecotoxicology and Environmental Contamination**, 9(1), 2014. <http://dx.doi.org/10.5132/eec.2014.01.010>

OECD – Organization for Economic Cooperation and Development. **Environmental indicators**. Paris, 159 p., 1994.

OECD - Guideline for the testing of chemicals. **Test No. 307: Aerobic and Anaerobic Transformation in Soil**, OECD Publishing, Paris, 2002.

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

QUITERIO, G.M. **Avaliação do processo de biodegradação da vinhaça no solo mediante adição do biofertilizante**. Dissertação de Mestrado em Tecnologia, Área de concentração: Tecnologia e Inovação - Faculdade de Tecnologia da Universidade Estadual de Campinas, Limeira, 2013.

QURESHI, N.; EZEJI, T.C. Butanol, “a superior biofuel” production from agricultural residues (renewable biomass): recent progress in technology. **Biofuels, Bioproducts and Biorefining**, 2008. <http://dx.doi.org/10.1002/bbb.85>

RODELLA, A. A.; ZAMBELLO JR, E.; FRANCISCO, J. O. Effects of vinasse added to soil on pH and exchangeable aluminium content. In: **18. Congress of the International Society of Sugar Cane Technologists, Ciudad de La Habana (Cuba)**, 21-26 Feb 1983.

RONCO, A.; BAEZ, M. C. D.; GRANADOS, Y. P. Conceptos Generales. In: **MORALES, G. C. (Ed.), Ensayos Toxicológicos y Métodos de Evaluación de Calidad de Agua: estandarización, intercalibración, resultados y aplicaciones**. IMTA: Mexico, 142p, 2004.

SANTOS, M.F.R.F.; BORSCHIVER, S.; COUTO, M.A.P.G. O complexo agroindustrial da cana-de-açúcar no Brasil: uma discussão sobre aspectos atuais relacionados ao etanol biocombustível. **Revista Economia & Tecnologia**, v. 7, n. 1, 2011.

SANTOS, G.M. **Efeito da vinhaça na produção biológica de álcoois e ácidos orgânicos voláteis por meio de consórcio microbiano**. Dissertação de Mestrado em Engenharia Agrícola, Área de concentração: Água e Solo – Faculdade de Engenharia Agrícola da Universidade Estadual de Campinas (FEAGRI), Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2015.

SAURABH CHANDRA, L. K. S.; CHAUHANA, R. C.; MURTHYB, P. N.; SAXENA, P. N.; PANDEC, S. K.; GUPTA, T. Comparative biomonitoring of leachates from hazardous solid waste of two industries using *Allium* test. **Science of the Total Environment**, v.347, p.46-52, 2005. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2005.01.002>

SILVA, N.B. **Avaliação química e ecotoxicológica de lodos e esgoto visando à utilização na agricultura**. Dissertação de Mestrado em Engenharia Civil, área de Saneamento e Ambiente, Faculdade de Engenharia Civil, Arquitetura e Urbanismo, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2012.

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

SYDNEY, E. B. **Valorization of vinasse as broth for biological hydrogen and volatile fatty acids production by means of anaerobic bacteria**. [s.l.] Universidade Federal do Paraná, 2013.

SYDNEY, E.B; LARROCHE, C.; NOVAK, A.C.; NOUAILLE, R.; SARMA, S.J.; BRAR, S. K.; SOCCOL, C.R. Economic process to produce biohydrogen and volatile fatty acids by a mixed culture using vinasse from sugarcane ethanol industry as nutrient source. **Bioresource technology**, v. 159, p. 380–6, maio 2014.

SKINNER, K.A.; LEATHERS, T.D. Bacterial contaminants of fuel ethanol production. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, 31(9): 401–408, 2004.
<http://dx.doi.org/10.1007/s10295-004-0159-0>

TAUK, S.M. **Efeito de doses cumulativas de vinhaça em algumas propriedades do solo sob cerrado e do solo de culturas do milho e cana-de-açúcar no município de Corumbataí, SP.** Tese (Livre-docência), Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, São Paulo, Brazil, 1987.

UNIVERSITY CENTER FOR ENVIRONMENTAL INQUIRY AT CORNELL,
"Environmental Inquiry, Authentic Scientific Research for High School Students", 2009. Disponível em: <http://ei.cornell.edu/index.html>

USEPA (UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY) **Method 6010C**. Inductively coupled plasma-atomic emission spectrometry. Revision 3, 2007.

USEPA (UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY) **Method 7062** Antimony and Arsenic (Atomic Absorption, Borohydride Reduction). Test Methods for Evaluating Solid Waste, Physical/Chemical Methods. Third Edition, 1994

VAN ANDEL, J. G; ZOUTBERG, G. R., CRABBENDAM, P. M.; BREURE, A. M. Glucose fermentation by *Clostridium butyricum* grown under a self generated gas atmosphere in chemostat culture. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 23, n. 1, p. 21–26, 1985.

VIDALI, M. Bioremediation. An overview. **Pure and Applied Chemistry**, 73(7): 1163–1172, 2001.

VISIOLI, L. **Avaliação da produção biotecnológica de butanol a partir de sorgo sacaríneo.** 2014, Tese (Mestrado em Engenharia de Processos) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, 2014.

WILKIE, A.C.; RIEDESEL, K.J.; OWENS, J.M. Stillage characterization and anaerobic treatment of ethanol stillage from conventional and cellulosic feedstocks. **Biomass Bioenergy**, 19: 63-102, 2000. [http://dx.doi.org/10.1016/S0961-9534\(00\)00017-9](http://dx.doi.org/10.1016/S0961-9534(00)00017-9)

ZAR, J.H. **Biostatistical Analysis**, Prentice Hall, EUA, 4ª ed., 1999.