

UNIVERSIDADE FEDERAL FLUMINENSE
ESCOLA DE ENGENHARIA INDUSTRIAL METALÚRGICA DE VOLTA REDONDA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM TECNOLOGIA AMBIENTAL

MARIA MAURA BARROS DUQUE

BIODEGRADAÇÃO DE VINHAÇA POR *Aspergillus niger* e *Rhizopus arrhizus*
ASSOCIADA À APLICAÇÃO DE UM MÉTODO COMPLEMENTAR DE ADSORÇÃO
NO BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR

VOLTA REDONDA
2016

MARIA MAURA BARROS DUQUE

BIODEGRADAÇÃO DE VINHAÇA POR *Aspergillus niger* e *Rhizopus arrhizus*
ASSOCIADA À APLICAÇÃO DE UM MÉTODO COMPLEMENTAR DE
ADSORÇÃO NO BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Tecnologia Ambiental da Universidade Federal Fluminense, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Tecnologia Ambiental.

Orientadora: Prof^o Dra. Patrícia Alves Carneiro
Coorientador: Prof^o Dr. Carlos Eduardo de Souza Teodoro

VOLTA REDONDA, RJ
2016

D946 Duque, Maria Maura Barros.
Biodegradação de vinhaça por *Aspergillus niger* e *Rhizopus arrhizus* associada à aplicação de um método complementar de adsorção no bagaço de cana-de-açúcar /Duque Maria Maura Barros – Volta Redonda, 2016.
138 f. il.

Dissertação (Mestrado em Tecnologia Ambiental) – Universidade Federal Fluminense.

Orientador: Patricia Alves Carneiro.

1. *Aspergillus niger*. 2. Biodegradação. 3. Fungo. 4. Vinhaça.
5. *Rhizopus arrhizus*. I. Carneiro, Patricia Alves. II. Título.

CDD 660

MARIA MAURA BARROS DUQUE

BIODEGRADAÇÃO DE VINHAÇA POR *Aspergillus niger* e *Rhizopus arrhizus*
ASSOCIADA À APLICAÇÃO DE UM MÉTODO COMPLEMENTAR DE ADSORÇÃO
NO BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Tecnologia Ambiental da Universidade Federal Fluminense, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Tecnologia Ambiental.

Aprovada em 11 de março de 2016.

BANCA EXAMINADORA



Prof.^a Dra. Patrícia Alves Carneiro – UFF
Orientadora



Prof. Dr. Ricardo de Freitas Branco – UFF



Prof.^a Dra. Ana Carolina Callegario Pereira - UNIFOA

VOLTA REDONDA

2016

Aos meus pais Maria da Glória e Walter,
pelo amor e alegrias.

AGRADECIMENTOS

À Deus e aos benfeitores espirituais por sempre me ampararem no dia a dia.

Aos meus pais, que a cada momento de minha vida, estiveram presentes, pelo apoio, por tudo que fizeram para me proporcionar essa e outras tantas conquistas.

À UFF, aos professores e funcionários, ao Programa de Pós – Graduação em Tecnologia Ambiental, aos Laboratórios de Química Analítica e Ambiental, Biotecnologia, Análises Químicas, Pós-colheita e Processamento de produtos agrícolas, Digestão de Amostras, Água e Solo, por todo o suporte que me foi oferecido.

À Usina São Martinho, que doou a vinhaça para os experimentos.

O meu muito obrigado a minha orientadora Prof^o Dra. Patrícia, pela paciência, pelos conselhos, pelas contribuições e pela dedicação à pesquisa.

Ao meu co-orientador Prof^o Dr. Carlos Eduardo por todo o conhecimento compartilhado ao longo do trabalho.

Aos técnicos e companheiros de laboratório, que me auxiliaram em alguns ensaios e sempre estiveram dispostos a me ajudar, pela boa convivência, conversas e conselhos nos corredores, e pelo aprendizado durante estes dois anos.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES pela concessão da bolsa de mestrado para o desenvolvimento deste estudo.

À todos os colegas das disciplinas cursadas do programa de pós-graduação, que sempre estiveram ao meu lado dando força para que eu seguisse em frente e enfrentasse cada desafio com perseverança e motivação.

E a todos que de alguma maneira foram importantes nessa trajetória tanto acadêmica quanto pessoal.

Sei que o meu trabalho é uma gota no
oceano, mas sem ela, o oceano seria
menor.
Madre Teresa de Calcutá

RESUMO

O setor sucroalcooleiro é uma importante representação do potencial bioenergético do Brasil. Dados finais da safra 2014/2015 da região Centro-Sul do Brasil apontam que o volume fabricado de etanol aumentou 2,23% no período, totalizando 26,15 bilhões de litros. O aumento da produção do etanol gerou também o aumento de resíduos como bagaço, cinzas, vinhaça, e emissões gasosas. A vinhaça é o principal subproduto na fabricação do etanol e é produzida na proporção de 8 a 15 vezes para cada litro de etanol, além de possuir alto poder poluente e alto valor fertilizante. Seu poder poluente, cerca de 100 vezes maior que o esgoto doméstico, é decorrente de baixo pH, elevados valores de demanda bioquímica de oxigênio (DBO) e demanda química do oxigênio (DQO), além de cor escura e cheiro característico. Atualmente, a principal forma de reaproveitamento da vinhaça é a fertirrigação das lavouras de cana-de-açúcar, mas a aplicação excessiva e mal dimensionada desta no solo pode causar a salinização, lixiviação de metais, desbalanceamento de nutrientes, redução da alcalinidade e alterações na qualidade do solo. Deste modo, busca-se investigar um método eficaz para reduzir sua potencialidade tóxica. O presente trabalho teve como objetivo avaliar o potencial de biodegradação da vinhaça por um consórcio de fungos associado à aplicação de um método complementar de adsorção no próprio bagaço da cana-de-açúcar. Neste trabalho foram estudados os efeitos obtidos para a biodegradação da vinhaça em diferentes concentrações deste resíduo após 6 dias de incubação. Para avaliação da eficiência do processo foram conduzidos ensaios para verificar a remoção de carga orgânica, cor, turbidez, condutividade e nutrientes, sendo estes comparados aos valores encontrados para a amostra bruta. O consórcio de fungos, composto de *Aspergillus niger* e *Rhizopus arrhizus* mostrou que esses microrganismos conseguem adaptar seu metabolismo às substâncias tóxicas presentes na vinhaça. Constatou-se também que valores mais expressivos de massa micelial foram observados com o aumento da concentração de vinhaça. Os microrganismos se desenvolveram melhor em pH ácido e temperatura de 30,0°C. A maior quantidade de remoção de DQO foi observada para os ensaios de biodegradação conduzidos para a vinhaça pura, ao redor de 73%. Após o processo de biodegradação houve uma redução de aproximadamente 10%, 12,5%, 24,7% e 8,24% de potássio, cálcio, sódio e magnésio, respectivamente. Nos experimentos observa-se que o bagaço úmido apresenta uma ligeira capacidade de sorção da matéria orgânica presente na vinhaça comparado ao bagaço seco. Porém, o uso do bagaço seco apresenta melhores resultados para a remoção de cor, turbidez, condutividade, magnésio e potássio quando comparado ao bagaço úmido. Após a etapa de sorção observa-se uma diminuição nos valores de pH, alcançando a proximidade do meio neutro, o que pode ter ocorrido devido a sorção de espécies de caráter básico na fibra do bagaço. A intensidade de cor, a carga orgânica e a turbidez após o processo de sorção no bagaço de cana-de-açúcar ainda se mantêm alta e, portanto, novos estudos são requeridos para minimização destes parâmetros. Após o processo de dessorção houve um aumento da concentração da maioria dos parâmetros químicos estudados, superior ao encontrado pelas espécies sorvidas, o que deve estar associado à liberação desses elementos pelo próprio bagaço. Observa-se que o biotratamento é capaz de diminuir potencial poluidor da vinhaça. O presente estudo conclui que a combinação sistemática de fungos lignocelulolíticos e adsorção em bagaço de cana-de-açúcar pode ser aplicada no processo de redução do poder poluente da vinhaça.

Palavras-chave: *Aspergillus niger*, Biodegradação, Fungo, Vinhaça, *Rhizopus arrhizus*.

ABSTRACT

The sugar and alcohol sector is an important representation of the bioenergetic potential of Brazil. Final data for the season 2014/2015 of the Mid-South region of Brazil indicate that the manufactured volume of ethanol increased 2.23% in the period, totaling 26.15 billion liters. The increased production of ethanol also generated increased waste and bagasse ash, vinasse, and gaseous emissions. The vinasse is the main by-product in the ethanol production and it is produced in the proportion of 8 to 15 times per liter of ethanol, beside having high polluting power and high value fertilizer. The polluting power, about 100 times higher than domestic sewage, is due to low pH, corrosivity, high levels of biochemical oxygen demand (BOD) and chemical oxygen demand (COD), as well as dark color and characteristic smell. Currently, the main form of reuse of vinasse is the fertigation of the sugarcane crops, but the excessive and poorly dimensioned application in the soil can cause salinization, leaching of metals, imbalance of nutrients, reduced alkalinity and changes in soil quality. Thus, we seek to investigate an effective method to reduce its toxic potential. This study aimed to evaluate the potential for biodegradation of vinasse by a fungal consortium associated with the application of an adsorption method in complementary own bagasse sugarcane. Were studied the effects obtained for the degradation of vinasse for different concentrations after 6 days of incubation. To evaluate the efficiency of the process the tests were conducted to verify the removal of organic load, color, turbidity, conductivity and nutrients, which are compared to the values found for the raw sample. The fungal consortium, consisting of *Aspergillus niger* and *Rhizopus arrhizus*, showed that these microorganisms can adapt their metabolism to toxic substances in the vinasse. It was also found that higher values mycelial mass were observed with increasing concentration of the vinasse. The microorganisms grew better at acidic pH and 30,0°C. The greatest amount of COD removal was observed for biodegradation tests conducted for the pure vinasse, around 73%. After the biodegradation process there was a reduction of approximately 10%, 12.5%, 24.7% and 8.24% potassium, calcium, sodium and magnesium, respectively. In the experiments was observed that the wet bagasse has a slight sorption capacity of the organic matter present in the vinasse compared to dry bagasse. However, the use of the dry bagasse is better for removal of color, turbidity, conductivity, magnesium and potassium as compared to the wet bagasse. After the sorption stage is observed a decrease in pH, increasing the proximity of the neutral medium, which may have occurred due to sorption of the species with basic character in bagasse fiber. The color intensity, the organic load and turbidity after sorption in the bagasse sugarcane still remain high and therefore further studies are required to minimize these parameters. After the desorption process there was an increase in the concentration of the most studied chemical parameters, higher than that found by the sorbed species, which should be associated with the release of these elements by itself. It is observed that the biotreatment can reduce pollution potential of vinasse. This study concludes that the combination of systematic lignocellulolytic fungi and adsorption sugarcane bagasse can be applied in the process of reduction of pollutant vinasse power.

Keywords: *Aspergillus niger*, Biodegradation, Fungus, Vinasse, *Rhizopus arrhizus*

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Imagens macro e microscópicas do fungo <i>Aspergillus niger</i> identificado pela Fundação André Tosello.....	24
Figura 2: Imagens macro e microscópicas do fungo <i>Rhizopus arrhizus</i> identificado pela Fundação André Tosello.....	25
Figura 3: Crescimento de massa micelial do fungo na placa de Petri contendo meio BDA após 2 dias de incubação em BOD a 30,0°C.....	63
Figura 4: Crescimento de massa micelial obtido para a degradação da vinhaça em 3 concentrações diferentes (25, 50 e 100%) e meio controle, submetidas ao tratamento com os fungos <i>Aspergillus niger</i> e <i>Rhizopus arrhizus</i> , durante 28 dias de incubação, sem ajustar pH, com amostra autoclavada e crescimento com agitação a 30,0°C.....	65
Figura 5: Espectros de absorção obtidos após 2 horas de digestão em refluxo fechado para DQO alta: 0,0 mg.mL ⁻¹ ; — 100,0 mg.mL ⁻¹ ; — 250,0 mg.mL ⁻¹ ; 500,0 mg.mL ⁻¹ ; — 1000,0 mg.mL ⁻¹ ; 1500,0 mg.mL ⁻¹ . Padrão de hidrogenoftalato de potássio.	68
Figura 6: Curva analítica para DQO alta obtida após 2 horas de digestão em refluxo fechado. Comprimento de onda máximo empregado nas medidas de 600 nm. Faixa de concentração investigada de 0,0 a 1500,0 mg de O ₂ por litro de solução. Padrão de hidrogenoftalato de potássio.	69
Figura 7: Espectros de absorção obtidos após 2 horas de digestão em refluxo fechado para DQO baixa (0,0 mg.mL ⁻¹ ; — 5,0 mg.mL ⁻¹ ; — 25,0 mg.mL ⁻¹ ; 50,0 mg.mL ⁻¹ ; — 100,0 mg.mL ⁻¹ ; 150,0 mg.mL ⁻¹). Padrão de hidrogenoftalato de potássio... ..	69
Figura 8: Curva analítica para DQO baixa obtida após 2 horas de digestão em refluxo fechado. Comprimento de onda máximo empregado nas medidas de 440 nm. Faixa de concentração investigada de 0,0 a 150,0 mg de O ₂ por litro de solução. Padrão de hidrogenoftalato de potássio.	70
Figura 9: Amostra antes (A) e após (B) o processo de biodegradação.....	80
Figura 10: Bagaço seco (A) antes e (B) após o ensaio de 7 dias sorção em vinhaça.	89
Figura 11: Vinhaça após sete dias de sorção com (A) bagaço seco e (B) com bagaço úmido.....	90
Figura 12: Água com bagaço seco após 3 dias de dessorção.	90

Figura 13: Curva analítica para determinação de potássio obtida pelo valor médio da leitura dos padrões. Equação da reta: $A = -0,01043 + 0,4584[K]$, $R^2 = 0,9950$. Faixa linear de trabalho investigada de 0,20 a 1,80 $\mu\text{g.L}^{-1}$	97
Figura 14: Curva analítica para determinação de cálcio obtida pelo valor médio da leitura dos padrões. Equação da reta: $A = 0,02704 + 0,0438[Ca]$, $R^2 = 0,995$. Faixa linear de trabalho investigada de 2,00 a 20,00 $\mu\text{g.L}^{-1}$	100
Figura 15: Curva analítica para determinação de magnésio obtida pelo valor médio da leitura dos padrões. Equação da reta: $A = 0,06088 + 1,1675[Mg]$, $R^2 = 0,99709$. Faixa linear de trabalho investigada de 0,20 a 0,80 $\mu\text{g.L}^{-1}$	103
Figura 16: Curva analítica para determinação de sódio obtida pelo valor médio da leitura dos padrões. Equação da reta: $A = 0,06088 + 1,16754[Na]$, $R^2 = 0,99709$. Faixa linear de trabalho investigada de 0,20 a 0,80 $\mu\text{g.L}^{-1}$	106
Figura 17: Curva Analítica do padrão de Carbono Inorgânico (CI) para as análises de Carbono Orgânico Total (TOC). Equação da curva: $\text{Área} = 4,1307+4,8297[CI] \text{ (mg)}$, $R^2 = 0,99457$	109
Figura 18: Curva Analítica do padrão de Carbono Total (CT) para as análises de Carbono Orgânico Total (TOC). Equação da curva: $\text{Área} = -6,6736+2,53714[CT] \text{ (mg)}$, $R^2 = 0,99973$	109

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Crescimento de massa micelial obtido para a degradação da vinhaça em 3 concentração diferentes (25, 50 e 100%) e meio controle, submetidas ao tratamento com os fungos <i>Aspergillus niger</i> e <i>Rhizopus arrhizus</i> , durante 28 dias de incubação, sem ajustar pH, com amostra autoclavada e crescimento com agitação a 30,0°C.....	64
Tabela 2: Avaliação da cor obtido para a degradação da vinhaça em 3 concentração diferentes (25, 50 e 100%) e meio controle, submetidas ao tratamento com os fungos <i>Aspergillus niger</i> e <i>Rhizopus arrhizus</i> , durante 28 dias de incubação, sem ajustar pH, com amostra autoclavada e crescimento com agitação a 30,0°C. Todas as amostras foram convenientemente diluídas a ¼ para leitura no espectrofotômetro.....	66
Tabela 3: Resultados obtidos a partir das curvas analíticas de DQO alta e DQO baixa.	71
Tabela 4: Avaliação da carga orgânica (DQO) obtido para a degradação da vinhaça em 3 concentração diferentes (25, 50 e 100%) e meio controle, submetidas ao tratamento com os fungos <i>Aspergillus niger</i> e <i>Rhizopus arrhizus</i> , durante 28 dias de incubação, sem ajustar pH, com amostra autoclavada e crescimento com agitação a 30,0°C.....	72
Tabela 5: Crescimento de massa micelial obtido para a degradação da vinhaça 100%, submetidas ao tratamento com os fungos <i>Aspergillus niger</i> e <i>Rhizopus arrhizus</i> , após 7 dias de incubação, sem ajustar pH, com amostra autoclavada e crescimento a 30,0°C.	73
Tabela 6: Crescimento de massa micelial obtido para a degradação da vinhaça 100%, submetidas ao tratamento com os fungos <i>Aspergillus niger</i> e <i>Rhizopus arrhizus</i> , após 7 dias de incubação, com variações de pH, com amostra autoclavada, crescimento a 30,0°C e sem suplementar o meio.	74
Tabela 7: Crescimento de massa micelial obtido para a degradação da vinhaça 100%, submetidas ao tratamento com os fungos <i>Aspergillus niger</i> e <i>Rhizopus arrhizus</i> , após 7 dias de incubação, sem corrigir pH, com amostra autoclavada, crescimento com variações de temperatura e sem suplementar o meio.	75
Tabela 8: Variação de DQO obtida para a degradação da vinhaça para diferentes diluições (25, 50 e 100%), submetidas ao tratamento com os fungos <i>Aspergillus niger</i> e <i>Rhizopus arrhizus</i> , após 6 dias de incubação, sem corrigir pH, com amostra autoclavada, crescimento com agitação, a 30,0°C e sem suplementar o meio.....	77
Tabela 9: Variação de cor obtida para a degradação da vinhaça para diferentes diluições (25, 50 e 100%), submetidas ao tratamento com os fungos <i>Aspergillus niger</i> e <i>Rhizopus arrhizus</i> , após 6 dias de incubação, sem corrigir pH, com amostra autoclavada,	

crescimento com agitação, a 30,0°C e sem suplementar o meio. Todas as amostras foram convenientemente diluídas a ¼ para leitura no espectrofotômetro de absorção UV-Vis.	79
Tabela 10: Variação de turbidez obtida para a degradação da vinhaça para diferentes concentrações (25, 50 e 100%) submetidas ao tratamento com os fungos <i>Aspergillus niger</i> e <i>Rhizopus arrhizus</i> , após 6 dias de incubação, sem corrigir pH, com amostra autoclavada, crescimento com agitação, a 30,0°C e sem suplementar o meio.....	81
Tabela 11: Variação de condutividade obtida para a degradação da vinhaça para diferentes diluições (25, 50 e 100%), submetidas ao tratamento com os fungos <i>Aspergillus niger</i> e <i>Rhizopus arrhizus</i> , após 6 dias de incubação, sem corrigir pH, com amostra autoclavada, crescimento com agitação, a 30,0°C e sem suplementar o meio.	83
Tabela 12: Variação de pH obtida para a degradação da vinhaça para diferentes diluições (25,50 e 100%), submetidas ao tratamento com os fungos <i>Aspergillus niger</i> e <i>Rhizopus arrhizus</i> , após 6 dias de incubação, sem corrigir pH, com amostra autoclavada, crescimento com agitação, a 30,0°C e sem suplementar o meio.	84
Tabela 13: Variação de DQO obtida para o tratamento com o o consórcio de fungos por 6 dias, seguido do tratamento secundário com sorção e dessorção no bagaço de cana-de-açúcar. Ensaio realizado sem correção de pH, com amostra autoclavada, crescimento micelial com agitação, a 30,0°C e sem suplementar o meio.	87
Tabela 14: Variação de DQO obtida para o tratamento com o o consórcio de fungos por 6 dias, seguido do tratamento secundário com sorção e dessorção no bagaço de cana-de-açúcar. Ensaio realizado sem correção de pH, com amostra autoclavada, crescimento micelial com agitação, a 30,0°C e sem suplementar o meio. Todas as amostras foram convenientemente diluídas a ¼ para leitura no espectrofotômetro.	88
Tabela 15: Variação de turbidez da vinhaça pura (100%) obtida para o tratamento com o consórcio de fungos por 6 dias, seguido do tratamento secundário com sorção e dessorção no bagaço de cana-de-açúcar. Ensaio realizado sem correção de pH, com amostra autoclavada, crescimento micelial com agitação, a 30,0°C e sem suplementar o meio.	91
Tabela 16: Variação de condutividade da vinhaça pura (100%) obtida para o tratamento com o consórcio de fungos por 6 dias seguido do tratamento secundário com sorção e dessorção no bagaço de cana-de-açúcar. Ensaio realizado sem correção de pH, com amostra autoclavada, crescimento micelial com agitação, a 30,0°C e sem suplementar o meio.	93

Tabela 17: Variação de pH da vinhaça pura (100%) obtida para o tratamento com o consórcio de fungos por 6 dias seguido do tratamento secundário com sorção e dessorção no bagaço de cana-de-açúcar. Ensaio realizado sem correção de pH, com amostra autoclavada, crescimento fúngico com agitação, a 30,0°C e sem suplementar o meio.	94
Tabela 18: Resultados obtidos na leitura dos padrões analíticos de potássio em 766,50 nm.	96
Tabela 19: Variação da concentração de potássio obtida para o tratamento da vinhaça pura (100%) submetida aos ensaios com o consórcio de fungos por 6 dias, seguido do tratamento secundário com sorção em bagaço por 7 dias e dessorção após 3 dias. Ensaio realizado sem correção de pH, com amostra autoclavada, crescimento micelial com agitação, a 30,0°C e sem suplementar o meio.	98
Tabela 20: Resultados obtidos na leitura dos padrões analíticos de cálcio em 422,70 nm.	99
Tabela 21: Variação da concentração de cálcio obtida para o tratamento da vinhaça pura (100%) submetida aos ensaios com o consórcio de fungos por 6 dias, seguido do tratamento secundário com sorção em bagaço por 7 dias e dessorção após 3 dias. Ensaio realizado sem correção de pH, com amostra autoclavada, crescimento micelial com agitação, a 30,0°C e sem suplementar o meio.	101
Tabela 22: Resultados obtidos na leitura dos padrões analíticos de magnésio em 285,20 nm.	102
Tabela 23: Variação da concentração de magnésio obtida para o tratamento da vinhaça pura (100%) submetida aos ensaios com o consórcio de fungos por 6 dias, seguido do tratamento secundário com sorção em bagaço por 7 dias e dessorção após 3 dias. Ensaio realizado sem correção de pH, com amostra autoclavada, crescimento micelial com agitação, a 30,0°C e sem suplementar o meio.	104
Tabela 24: Resultados obtidos na leitura dos padrões analíticos de sódio em 589,00 nm.	105
Tabela 25: Variação da concentração de sódio obtida para o tratamento da vinhaça pura (100%) submetida aos ensaios com o consórcio de fungos por 6 dias, seguido do tratamento secundário com sorção em bagaço por 7 dias e dessorção após 3 dias. Ensaio realizado sem correção de pH, com amostra autoclavada, crescimento micelial com agitação, a 30,0°C e sem suplementar o meio.	107

Tabela 26: Resultados obtidos para a construção da curva analítica dos padrões de Carbono Inorgânico (CI) e Carbono Total (CT) para as análises realizadas no analisador de Carbono Orgânico Total (TOC).....	108
Tabela 27: Variação da concentração de COT (mg.L^{-1}) obtida para o tratamento da vinhaça pura (100%) submetida aos ensaios com o consórcio de fungos por 6 dias, seguido do tratamento secundário com sorção em bagaço úmido por 7 dias e dessorção após 3 dias. Ensaio realizado sem correção de pH, com amostra autoclavada, crescimento micelial com agitação, a $30,0^{\circ}\text{C}$ e sem suplementar o meio.	110

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

H₂O₂ - Peróxido De Hidrogênio
UV - Ultravioleta
UV-Vis – Ultravioleta-Visível
DQO – Demanda Química de Oxigênio
DBO - Demanda Bioquímica de Oxigênio
% - Porcentagem
°C – Graus Celsius
A – Absorbância
L – Litros
mg – Miligramas
mL – Mililitros
nm – Nanômetros
μL - Microlitros
R² – Coeficiente De Correlação Linear
N₂O - Óxido nitroso
Nb₂O₅ - Óxido de nióbio
TiO₂ - Dióxido de titânio
pH - Potencial hidrogeniônico
ppm - Partes Por Milhão
V - Volts
COT - Carbono Orgânico Total
KH₂PO₄ - Dihidrogenofosfato de potássio
KCl - Cloreto de potássio
MgSO₄ - Sulfato de magnésio
H₂O – Água
W – Watts
NaNO₃ - Nitrato de sódio
M – Molar
MnP - Manganês peroxidase
H₂SO₄ - Ácido sulfúrico
NaOH - Hidróxido de sódio
NADH - Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo
HAP - Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos
La₂O₃ – Óxido de lantânio
HCl – Ácido clorídrico
CI - Carbono Inorgânico
CT - Carbono Total
CO₂ - Dióxido de carbono
Ag₂SO₄ - Sulfato de prata
K₂Cr₂O₇ - Dicromato de potássio
λ= Comprimento de onda
CO₃⁻² - Carbonato
HCO₃⁻ - Bicarbonato ou hidrogenocarbonato
CO - Monóxido de carbono

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	18
2. OBJETIVOS.....	26
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	27
3.1 TOXICIDADE DA VINHAÇA.....	27
3.2 USOS E ALTERNATIVAS PARA A VINHAÇA	30
3.3 TRATAMENTO DA VINHAÇA.....	33
3.3.1 Tratamento da vinhaça por microrganismos	36
3.4 SORÇÃO NO BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR	48
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	54
4.1 DETERMINAÇÃO DE CÁLCIO, MAGNÉSIO, SÓDIO E POTÁSSIO DISPONÍVEL.....	54
4.2 DETERMINAÇÃO DE CARBONO ORGÂNICO TOTAL (COT).....	55
4.3 ANÁLISE DA DEMANDA QUÍMICA DE OXIGÊNIO (DQO)	57
4.4 OBTENÇÃO DO FUNGO	59
4.5 ENSAIOS DE BIODEGRADAÇÃO	61
4.6 ENSAIOS DE SORÇÃO NO BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR.....	62
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	63
5.1 AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO DE MASSA MICELIAL E DOS ENSAIOS DE BIOTRATAMENTO.....	63
5.1.1 Acompanhamento da remoção de cor	65
5.1.2 Acompanhamento da remoção de DQO.....	67
5.2 APRIMORAMENTO DOS ENSAIOS DE BIODEGRADAÇÃO	73
5.2.1 Remoção de DQO	76
5.2.2 Remoção de cor	78
5.2.3 Remoção de Turbidez.....	80
5.2.4 Redução de Condutividade.....	82
5.2.5 Avaliação do pH durante os ensaios de biodegradação	84
5.3 ENSAIO DE SORÇÃO/DESORÇÃO DE VINHAÇA BIODEGRADADA EM BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR	86
5.3.1 Remoção de DQO	86
5.3.2 Remoção de cor	88

5.3.3 Remoção de Turbidez.....	91
5.3.4 Remoção de Condutividade.....	92
5.3.5 Avaliação do pH.....	94
5.4 ANÁLISE DE MICRO E MACRONUTRIENTES DA VINHAÇA	95
5.4.1 Análise da concentração de Potássio.....	96
5.4.2 Análise da concentração de Cálcio.....	99
5.4.3 Análise da concentração de Magnésio	101
5.4.4 Análise da concentração de sódio	105
5.4.5 Avaliação da quantidade de Carbono Orgânico Total (COT).....	107
6. CONCLUSÕES	112
7. PERSPECTIVAS FUTURAS	114
REFERÊNCIAS	115

1. INTRODUÇÃO

A produção de cana-de-açúcar no Brasil iniciou-se no século XVI, começo do período colonial. Na metade do século XVII, o Brasil já se tornava o maior produtor de cana-de-açúcar do mundo, destinando, assim, sua produção ao abastecimento da Europa. A cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum*, L.) é uma planta de grande importância para a economia brasileira, já que devido a sua industrialização e processamento em açúcar e etanol se torna uma grande geradora de empregos, energia e matéria prima (NUSSIO, 1993; CORRÊA *et al.*, 2001).

Em meio à primeira crise do petróleo em 1973, o governo brasileiro passou a buscar formas alternativas para reduzir a dependência do país ao combustível fóssil e amenizar os efeitos do choque na economia brasileira. Dentre vários programas propostos o que obteve maior êxito foi o Programa Nacional do Álcool – Proálcool. A 1ª fase do Programa (1975-1979) foi marcada pela produção de álcool anidro o qual era fabricado em destilarias anexas às usinas de açúcar e utilizado para misturar a gasolina. A 2ª fase (1979-1986) foi iniciada com a 2ª crise do petróleo que aumentou ainda mais o preço no mercado internacional. Essa fase é marcada pela produção de álcool hidratado para atender o consumo incipiente e em ascensão dos veículos movidos exclusivamente a álcool. Nessa fase há uma grande ampliação das destilarias anexas e marca o surgimento de destilarias autônomas, ocorrendo um grande crescimento do volume produzido de etanol, que era de 3.396,4 m³ no início da fase e que no final estava em 10.539,3 m³. Pode-se dizer que essa fase foi o período de consolidação e expansão do Proálcool (EPE, 2008).

Após a expansão do Proálcool, na fase anterior, o programa começou a passar por problemas a partir do final de 1985 e início de 1986, oriundos de fatores como a queda e estabilização do preço petróleo e o aumento do preço do açúcar no mercado internacional. Além desses problemas, o governo também deixou de subsidiar e financiar o programa devido a problemas fiscais e inflacionários. Em meados dos anos 1990 o governo promove a desregulamentação do mercado, liberando os preços para a livre concorrência. O setor sucroalcooleiro, através da formação de entidades como UNICA (UNIÃO DA INDÚSTRIA DE CANA-DE-AÇÚCAR) e Sucroálcool, procura se organizar e buscar formas para dar novo fôlego ao programa. Quando o programa

parecia fadado à estagnação e ao fracasso, surgem novos fatores que vêm dar nova ênfase a este segmento, como por exemplo, o novo aumento do preço do petróleo no mercado internacional e o surgimento dos veículos *flex fuel*, cuja tecnologia permitia o uso de álcool hidratado ou gasolina em qualquer proporção possibilitando ao consumidor final a escolha do combustível para abastecer o seu automóvel (MICHELLON *et al.*, 2008).

Atualmente, a cana-de-açúcar é a matéria-prima de biocombustível mais eficiente disponível, e o etanol derivado dela traz reduções de até 90% nas emissões de gases causadores do efeito estufa em relação aos combustíveis convencionais. Ela também pode ser usada como matéria-prima para a próxima geração de biocombustíveis, como o biobutanol e o diesel derivado do açúcar (PETROBRÁS BIOCMBUSTÍVEL, 2014).

O Brasil é o maior produtor mundial de cana-de-açúcar, e ocupa posição de liderança na tecnologia de sua produção, é também o maior produtor e exportador de açúcar, segundo United States Department of Agriculture (USDA), e o segundo maior produtor de etanol do mundo, segundo a F. O. Licht (MAPA, 2014).

O setor sucroalcooleiro se destaca no âmbito social devido à empregabilidade de mão de obra, tendo contratado cerca de 4,5 milhões de pessoas (ProCana, 2015), e no campo econômico sua importância se deve à renda per capita dos municípios onde estão localizadas as usinas e as divisas geradas para o país a partir do saldo da balança comercial da exportação açúcar e álcool. É notável, portanto, sua participação no PIB brasileiro e também na geração de empregos (CARUSO, 2014).

Entretanto, a industrialização do setor sucroalcooleiro impulsionada principalmente pelo lançamento do Programa Proálcool na década de 1980, assim como a necessidade mundial do uso de fontes renováveis de energia resultou no aumento da produção do etanol e, conseqüentemente, no aumento na geração de resíduos como bagaço, cinzas, vinhaça, e emissões gasosas (VACCARI *et al.*, 2005).

De acordo com Silva (2010), a fase industrial da fabricação do etanol é caracterizada pelos aspectos ambientais de alto consumo de água e de geração de grandes quantidades de resíduos, sendo os principais o bagaço e a vinhaça. Porém, os

resíduos gerados a partir desse processamento podem ser reaproveitados para outros fins.

Desta forma, o setor deverá estabelecer ações para atingir o conceito de desenvolvimento sustentável, no qual recomenda a utilização de tecnologias ecologicamente adaptadas para obter a ecoeficiência, uma vez que demanda de energia para este processo é grande, assim como a utilização de recursos hídricos. Além disso, no processo de fermentação e destilação da cana de açúcar, um dos resíduos gerados é a vinhaça. A vinhaça é também conhecida por vinhoto, restilo, caldo ou garapão, dependendo da região. A grande preocupação da vinhaça advém basicamente de sua decomposição química, devido à quantidade na qual ela é gerada (de 8 a 15 vezes para cada litro de etanol produzido), tornando-se um grande poluidor (MACHADO, 1998).

Dados finais da safra 2014/2015 da região Centro-Sul do Brasil apontam para uma moagem de aproximadamente 571 milhões de toneladas de cana-de-açúcar, com redução de 4,31% sobre os quase 597 milhões de toneladas processadas na safra 2013/2014. A produção de açúcar alcançou quase 32 milhões de toneladas, com retração superior a 2,30 milhões de toneladas sobre o resultado do ciclo agrícola anterior (34 milhões de toneladas). Em contrapartida, o volume fabricado de etanol aumentou 2,23% no período, totalizando mais de 26 bilhões de litros desse combustível. Este aumento decorre da ampliação do mercado de etanol hidratado, cuja produção atingiu mais de 15 bilhões de litros contra 14 bilhões de litros na safra 2013/2014. Em relação ao etanol anidro, o volume fabricado somou próximo de 11 bilhões de litros (UNICA, 2016).

Somado a esta elevada produção de etanol está a geração de resíduos do setor sucroalcooleiro. Sabendo que em usinas brasileiras a cada 1 litro de etanol é gerado de 8 a 15 litros de vinhaça (van HAANDEL, 2005), estima-se que a produção brasileira desta última para as colheitas 2014/2015 deva chegar a valores médios em torno de 392 bilhões de litros deste resíduo (UNICA, 2016).

Segundo Elia Neto (1988) as possíveis origens da vinhaça são: (i) vinhaça de mosto de caldo: produzida de caldo direto para a fermentação alcoólica, ocorrendo normalmente em destilarias autônomas onde se produz apenas etanol, (ii) vinhaça de mosto de melaço: mosto preparado com melaço, subproduto da produção de açúcar,

normalmente em destilarias anexas, (iii) vinhaça de mosto misto: mosto preparado com caldo direto e melaço, normalmente em destilarias anexas. As destilarias anexas produzem tanto açúcar como etanol.

A vinhaça é quimicamente complexa, e em geral, este efluente apresenta cor escura e consiste basicamente de água (93%), de sólidos orgânicos e minerais (7%) (MARQUES, 2006). España-Gamboa *et al.* (2011), revisaram as diferentes composições de vinhaça e tratamentos disponíveis. Segundo os autores, as características da vinhaça dependem da matéria-prima (biomassa). Deste modo, a composição da vinhaça pode variar e muito ao longo do dia, do ano, da variedade, do índice de maturação, do tipo de solo ou até mesmo da sua origem (BARBOSA, 2006).

A coloração escura é proveniente da grande quantidade de matéria orgânica. Essa coloração também é caracterizada pela presença de polímeros de alto peso molecular chamados melanoidinas, que são formados pela reação de Maillard e por compostos fenólicos (ácido tânico e húmico). Estas substâncias são frequentemente tóxicas para os microrganismos propícios aos biotratamentos de efluentes, altamente recalcitrantes, e possuem propriedades antioxidantes (MOHANA *et al.*, 2009; NAIK, 2008). Estes compostos são originados a partir da fermentação do melaço durante o processo industrial (GOKARN; MAYADEVI, 2000). Entre os compostos presentes na matéria orgânica encontram-se o ácido oxálico, ácido láctico, ácido acético e outros compostos alcoólicos. Adicionalmente, também são encontrados hidratos de carbono, cátions tais como K^+ , Ca^{2+} e Mg^{2+} , celulose e hemicelulose (WADT, 2008; PARNAUDEAU *et al.*, 2008).

É um dos resíduos mais difíceis de tratar, devido ao seu pH baixo (entre 3,0 e 4,5), temperatura elevada logo na saída do destilador, alto teor de carga orgânica, com alta DBO (entre 42.000 e 100.000 mg L⁻¹) e DQO (entre 10.000 e 210.000 mg L⁻¹), além de exalar um cheiro forte característico (FREIRE; CORTEZ, 2000).

É comum a prática de aplicação da vinhaça *in natura* na agricultura como fertilizante, através do processo chamado de fertirrigação. Segundo Ribas (2007) esta prática deve ser utilizada quando a matéria orgânica estiver estabilizada. A aplicação de vinhaça como fertirrigação é processo conjunto de irrigação e adubação que consiste na

utilização da própria água para conduzir e distribuir o fertilizante químico ou orgânico na lavoura, podendo ser feita por qualquer sistema de irrigação (SILVA, 2009). Para realização desta atividade, devem ser considerados parâmetros ambientais como o tipo de solo, distância de cursos de água, capacidade de campo do solo (retenção de água) e percentual de sais presentes no solo (LAIME *et al.*, 2011).

Além da geração de vinhaça, a industrialização da cana-de-açúcar produz também grande quantidade de bagaço. O bagaço da cana-de-açúcar é resultado da extração do caldo após esmagamento nas moendas e representa de 24% a 30% do peso inicial da cana-de-açúcar (umidade de 50%) (HUGOT, 1972).

Apesar da utilização deste bagaço como subproduto para a geração de energia, como combustível em caldeiras na própria usina, ainda há um significativo excedente deste material, sendo as vezes empregado para compostagem ou simplesmente depositado como resíduo. Com a otimização de caldeiras e turbinas em algumas usinas já se estima que o excedente de bagaço atinja 20% do total. Dessa forma, o excedente deste resíduo que não é utilizado pode causar sérios problemas de estocagem e de poluição ambiental (TEIXEIRA *et al.*, 2007).

Devido à grande quantidade produzida, e a suas características físicas e químicas, o bagaço encontra um vasto campo de utilização, dentre eles na produção de ração animal, na indústria química, na fabricação de papel, papelão e aglomerados, como material alternativo na construção civil e na produção de biomassa microbiana. Além de tudo isso, estudos têm sido realizados utilizando o bagaço de cana-de-açúcar como biomassa adsorvente de contaminantes orgânicos com resultados satisfatórios (SANTOS, 2005).

Durante os processos de produção do álcool são gerados subprodutos em grande quantidade que quando não reutilizados podem causar impactos ambientais, dentre eles está o bagaço, a torta de filtro e a vinhaça, que podem voltar para a lavoura na forma de fertilizantes (DEMATTE, 1992). Nesse aspecto destacam-se nesse trabalho medidas de reaproveitamento da vinhaça e do bagaço, objetivando evitar esses impactos e ainda gerar lucros para própria usina além de evitar gastos.

O presente estudo teve como objetivo avaliar o potencial de biodegradação de vinhaça por um consórcio de fungos, composto de *Aspergillus niger* Tiegh. e *Rhizopus arrhizus* A. Fisch., associado à aplicação de um método complementar de adsorção no bagaço de cana-de-açúcar para remoção de cor e carga orgânica.

A aceitação crescente no uso de fungos em processos de tratamento e/ou biorremediação se deve por apresentarem um sistema enzimático extracelular capaz de romper uma grande quantidade de ligações químicas (FERREIRA, 2009).

O *Aspergillus niger*, apresentado na Figura 1, está entre os fungos mais comumente reportados entre as contaminações fúngicas em alimentos, é predominante de climas quentes, tanto em produtos de campo quanto armazenados, frequentemente associado a contaminações de frutas frescas, alimentos desidratados e defumados ou curados. Os esporos negros proporcionam uma proteção a luz solar e a luz UV, o que faz com que ele predomine sobre as demais espécies. É um fungo muito utilizado para obtenção de enzimas e subprodutos, é tido como GRAS (*Generally Regarded as Safe*), entretanto já foi detectada a produção de micotoxinas como a Ocratoxina A e Fumonisina B2 em por algumas linhagens (PITT; HOCKING, 1997).

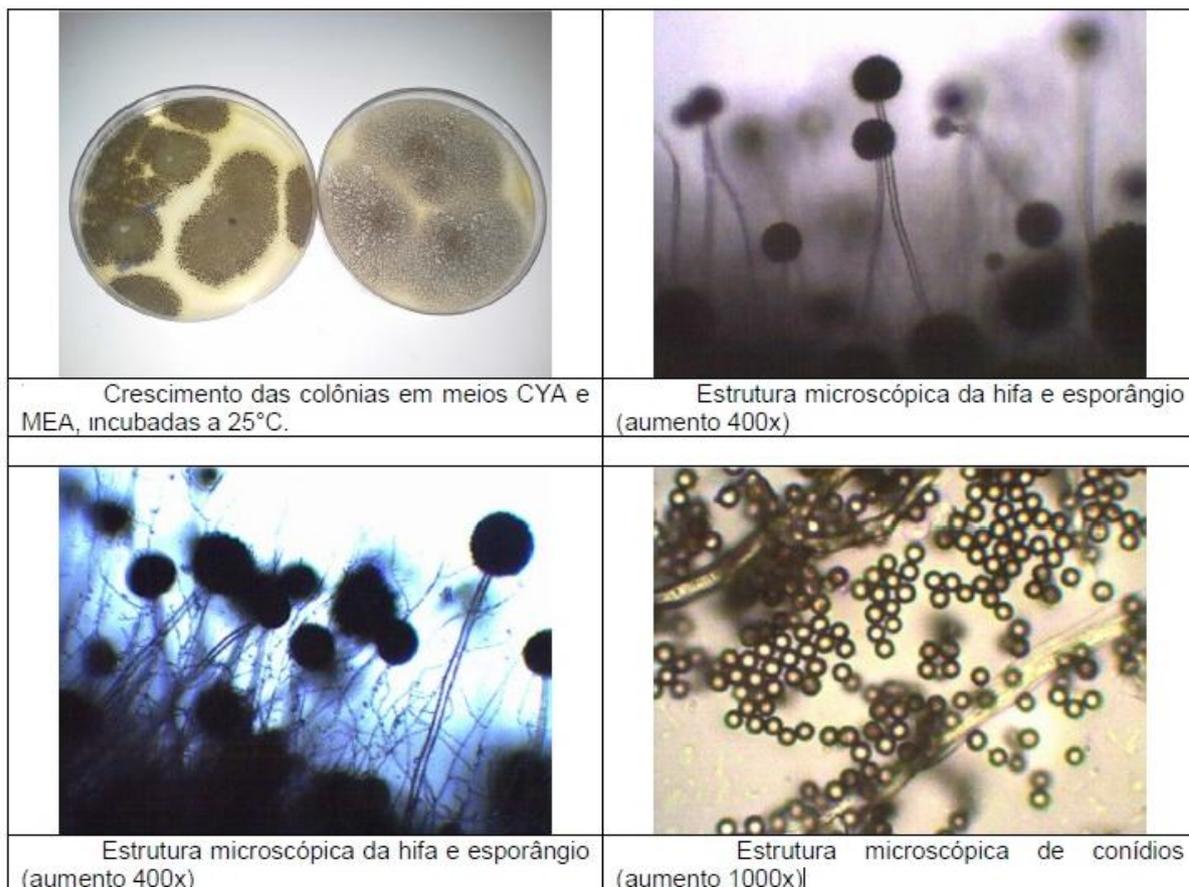


Figura 1: Imagens macro e microscópicas do fungo *Aspergillus niger* identificado pela Fundação André Tosello.

O gênero *Rhizopus* é bastante aplicado na indústria de alimentos em fermentações. O *Rhizopus arrhizus* é um importante agente de zigomicoses humana causando principalmente infecções rinocerebral. Testes realizados com ratos e patos alimentados com milho contaminado com esta espécie mostraram efeitos tóxicos nos animais, causando deficiência no crescimento, porém a toxina responsável não foi elucidada (PITT; HOCKING, 1997). As imagens macro e microscópicas da estrutura do *Rhizopus arrhizus* são apresentadas na Figura 2.

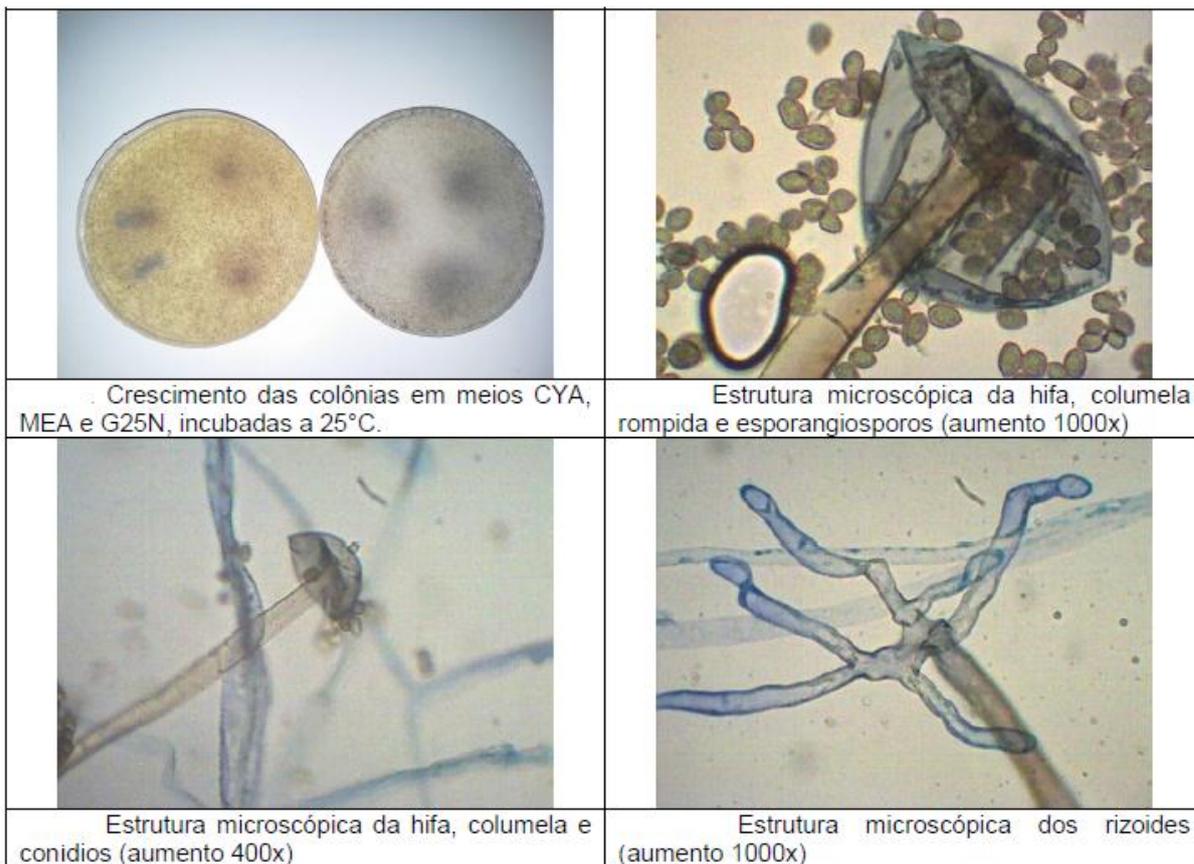


Figura 2: Imagens macro e microscópicas do fungo *Rhizopus arrhizus* identificado pela Fundação André Tosello.

Adicionalmente, o uso de bagaço para o pós tratamento da vinhaça após a biodegradação poderia contribuir para minimizar a carga orgânica e de nutrientes deste efluente. Espera-se que os processos combinados possam ser utilizados de maneira complementar, de tal forma a suprir deficiências apresentadas por estas técnicas quando aplicadas isoladamente.

2. OBJETIVOS

Este trabalho tem como objetivo geral avaliar a eficiência na degradação de vinhaça utilizando um consórcio de fungos composto por *Aspergillus niger* e *Rhizopus arrhizus*, associados à aplicação de um método complementar de sorção no bagaço de cana-de-açúcar.

Como objetivos específicos espera-se com a combinação das técnicas:

- (a) reduzir a carga orgânica da vinhaça (DQO);
- (b) reduzir as espécies inorgânicas como Na^+ , K^+ , Mg^{2+} , e Ca^{2+} ;
- (c) reduzir a turbidez;
- (d) minimizar a condutividade total;
- (e) estudar a viabilidade técnica da utilização do bagaço de cana-de-açúcar como matéria adsorvente e,
- (f) indicar o bagaço como fertilizante fora da planta industrial da usina sucroalcooleira.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Toxicidade da vinhaça

A elevada e crescente geração de etanol produzido no Brasil desde o início do Proálcool gerou a necessidade de se desenvolverem meios viáveis de utilização e tratamento dos resíduos gerados (PEREIRA, 2003).

No passado, quantidades consideráveis de vinhaça foram descarregadas em corpos d'água, causando sérios problemas de poluição (DEMATTÊ *et al.*, 1992). Sua cor castanho escuro decorre principalmente da presença de compostos fenólicos tais como ácido tânico, ácido húmico e melanoidina, dificultando a fotossíntese, bloqueando a luz solar além de constituir-se tóxica para a vida aquática (MOHANA *et al.*, 2009).

A vinhaça possui alto poder poluente, embora possua alto valor fertilizante. O potencial de poluição é cerca de cem vezes maior que esgoto doméstico, devido à alta carga orgânica, baixo pH, alta corrosividade e altos níveis de demanda bioquímica de oxigênio (DBO) (KANNAN & UPRETI, 2008).

Para avaliar o impacto ambiental da vinhaça, Melo e Silva (2001), realizaram um estudo comparativo entre esta e o esgoto doméstico, e concluíram que um litro de vinhaça equivale ao esgoto doméstico não tratado gerado por 1,43 pessoas diariamente. Portanto, para se produzir dez litros de etanol a poluição gerada é equivalente àquela produzida por aproximadamente 172 pessoas em um dia, na forma de esgoto doméstico. O tratamento prévio deste resíduo é, portanto, necessário antes de sua disposição final.

A eliminação direta e mal dimensionada da vinhaça pode causar salinização, lixiviação de íons inorgânicos, sobretudo nitrato, potássio e metais para as águas subterrâneas, mudanças na qualidade do solo, devido ao desequilíbrio de nutrientes, aumento de fitotoxicidade e odor desagradável (MADEJÓN *et al.*, 2001; SANTANA & FERNANDES-MACHADO, 2008).

A adição de vinhaça faz com que ocorra alterações temporárias na população de microrganismos do solo, alterando significativamente a população de bactérias e fungos, resultando em muitas modificações nos processos biológicos e químicos, tais como: a decomposição da matéria orgânica, nitrificação e diminuição do pH (OLIVEIRA *et al.*, 2013 e SANTOS *et al.*, 2009).

A literatura reporta que sucessivas aplicações em solos arenosos podem levar a um desequilíbrio de bases e elementos tais como cálcio, magnésio, potássio, sódio, que são utilizados para análise da fertilidade deste recurso natural (SILVA *et al.*,2007).

Segundo Zolin *et al.*(2011), depois de 2 a 3 anos de aplicação contínua de vinhaça, observou-se um declínio na densidade do solo, enquanto os níveis de carbono orgânico e de potássio, a porosidade capilar e porosidade total aumentou ao arar as camadas de solo.

RIBEIRO *et al.*,2010 detectaram um aumento na lixiviação de chumbo na presença de vinhaça no solo, particularmente devido aos compostos orgânicos solúveis em tais efluentes, que formou entre a matéria orgânica e o chumbo um complexo solúvel. Embora os efeitos da vinhaça nos atributos do solo sejam bem conhecidos, pouco se sabe sobre eles no comportamento sortivo de chumbo (Pb). Avaliaram-se a sorção e a lixiviação de Pb em amostras da camada superficial (0-20 cm) de um Cambissolo Háptico Tb Distrófico típico (CXbd) sob influência da vinhaça. Para o ensaio de sorção, as amostras foram peneiradas em malha de 2,0 mm, tratadas com vinhaça diluída 20,0% e 50,0% e ao natural (100,0%), empregando água destilada nas amostras controle. Em seguida, soluções com 0,05; 0,10; 0,25; 0,50 e 0,75 mmol L⁻¹ de Pb foram adicionadas às amostras de solo. Para o ensaio de lixiviação, foram preparadas colunas de solo em tubos de PVC de 12,0 cm de altura e 4,0 cm de diâmetro interno, contendo 200,0 g de solo. As doses de vinhaça aplicadas sobre as colunas foram correspondentes a 150,0 e 300,0 m³ ha⁻¹. As colunas foram mantidas incubadas com vinhaça por sete dias. Após esse período, foram aplicados sobre cada coluna 5,0 mL de uma solução de concentração 100,0 mmol L⁻¹ de Pb e, posteriormente, realizadas sucessivas lixiviações, coletando-se o percolado para determinação do teor de Pb. A vinhaça aumentou a capacidade máxima de adsorção de Pb e sua energia de ligação com o solo em condições de equilíbrio (ensaio de sorção), mas em condições de não equilíbrio (ensaio de lixiviação em colunas), a vinhaça aumentou a lixiviação de Pb. Com base nesses resultados, atenção especial deve ser dada a áreas que estejam recebendo vinhaça ao longo dos anos e que estejam ocasionalmente sujeitas à contaminação por Pb.

Da mesma forma, Madrid e Díaz-Barrientos (1998) observaram aumento da lixiviação de zinco e cobre, quando os solos foram tratados com vinhaça e indicam que a remoção anterior de compostos orgânicos solúveis nos efluentes é necessária para minimizar lixiviação de metais pesados.

A utilização da vinhaça pode alterar as características do solo promovendo modificações em suas propriedades químicas, favorecendo o aumento da disponibilidade de alguns elementos para as plantas. Por outro lado, a vinhaça também pode promover modificações das propriedades físicas do solo de duas formas distintas: (i) essas alterações podem melhorar a agregação, ocasionando a elevação da capacidade de infiltração da água no solo e, conseqüentemente, aumentar a probabilidade de lixiviação de íons, de forma a contaminar as águas subterrâneas quando em concentrações elevadas, (ii) além de promover a dispersão de partículas do solo, com redução da sua taxa de infiltração de água e elevação do escoamento superficial, com possível contaminação de águas superficiais. Pelo fato de haver diferentes tipos de solo e composições de vinhaça os resultados dos trabalhos são bastante variáveis, contudo, existe consenso de que sua disposição deve ser efetuada de acordo com a capacidade do solo em trocar e reter íons. (SILVA *et al.*, 2007).

A contaminação pode ocorrer devido à textura do solo e das características químicas da vinhaça como altos níveis de potássio, matéria orgânica, cálcio, magnésio, nitrogênio e fósforo, indicando uma possível contaminação das águas como resultado da lixiviação desses compostos (WAAL *et al.*, 2009). A infiltração de vinhaça compromete a qualidade da água subterrânea, uma vez que concentrações elevadas transferem amônia, magnésio, alumínio, ferro, manganês, cloretos e matéria orgânica para o lençol freático (PIACENTE, 2005). Adicionalmente, quando atinge o solo contaminado com a vinhaça, a chuva pode infiltrar ou escoar superficialmente, poluindo corpos d'água (SILVA *et al.*, 2007).

Estudos realizados no Rio Ipojuca, no Nordeste do Brasil, revelaram que fertirrigação das culturas de cana é uma das principais fontes de contaminação do rio, causando um aumento da temperatura da água, acidificação, aumento da turbidez e depleção de oxigênio (GUNKEL, 2007).

Os efeitos deletérios da vinhaça na fauna também foram observadas em estudos realizados por Kumar e Gopal (2001). Estes autores relataram que a contaminação por vinhaça aumentou a produção de muco e redução da quantidade de proteínas em diferentes órgãos tais como o fígado, cérebro, rins e músculos do peixe *Channa punctatus* quando em contato com este efluente.

A vinhaça também pode causar efeitos negativos à atmosfera. A aplicação de vinhaça na fertirrigação resultou em aumentos significativos nas emissões de gases de efeito estufa, especialmente N₂O (CARMO *et al.*, 2012). As emissões podem resultar da decomposição aeróbia e anaeróbia da matéria orgânica da vinhaça que ocorre durante o transporte, o armazenamento temporário ou mesmo após a aplicação ao solo (OLIVEIRA *et al.*, 2013).

3.2 Usos e alternativas para a vinhaça

Alguns métodos têm sido descritos na literatura para o tratamento e a concentração de vinhaça, como o uso na fabricação de ração para animais, método de concentração, incineração, digestão anaeróbia, compostagem etc. (WALISZEWSKI *et al.*, 1997; NAVARRO *et al.*, 2000; MARTÍN *et al.*, 2002; DÍAZ, 2003; GOMES *et al.*, 2011). Porém esses métodos são incompletos, impraticáveis ou inviáveis e requerem melhorias no processo para serem efetivamente aplicados na indústria sucroalcooleira. Deste modo, a busca por métodos mais efetivos é imperativo e outras alternativas tecnológicas deverão ser investigadas.

Entre as alternativas para o uso da vinhaça desenvolvidas em torno do mundo, a fertirrigação é a mais utilizada, pois exige um baixo investimento inicial, baixo custo de manutenção, de aplicação rápida, não necessitando de tecnologias complexas, e que ainda não vêm sofrendo um controle ambiental mais rigoroso (NAVARRO *et al.*, 2000).

Os nutrientes, especialmente potássio e matéria orgânica, presentes na vinhaça foram usados nos campos de cana-de-açúcar em substituição parcial ou total de fertilizantes minerais (FERREIRA, 2009). Em contrapartida, as reduções na alcalinidade do solo, disponibilidade de manganês e inibição da germinação de

sementes foram relatadas pela utilização de vinhaça na agricultura (AGRAWAL & PANDEY, 1994). Porém, em alguns casos observa-se o aumento do rendimento das culturas (SANTANA & FERNANDES-MACHADO, 2008).

De acordo com Silva *et al.* (2007), a adição de vinhaça de cana no solo pode promover efeitos benéficos ou não em ecossistemas terrestres. É importante a preparação prévia e adequada da vinhaça antes do seu descarte ao solo (SIQUEIRA, 2008). A fertirrigação pode ser uma prática paliativa que oferece uma falsa impressão de resolver eficazmente o problema de eliminação da vinhaça, pois pode ocasionar poluição do solo, poluição hídrica e atmosférica (SANTANA & FERNANDES-MACHADO, 2008).

Em virtude da poluição gerada pelo uso mal dimensionado da vinhaça na fertirrigação alguns órgãos ambientais já começam a estabelecer limites para o uso desenfreado deste efluente. A Norma Técnica 4.231/Nº045/2015/C (CETESB, 2015) estabeleceu os critérios e procedimentos para o armazenamento, transporte e aplicação da vinhaça, gerada pela atividade sucroalcooleira no processamento de cana de açúcar. Deste modo, a legislação ambiental caminha para um controle mais efetivo do uso da vinhaça.

Outra possibilidade é o uso da vinhaça como ração de bovinos, suínos e aves, porém esta deve ser previamente tratada para a redução do nível de potássio. Reporta-se que a ração assim produzida não interfere no sabor ou odor do leite e seus derivados, que tem boa aceitação pelos animais e que a taxa de conversão, ganho de peso com relação ao consumo de ração, é adequada. Há, porém, limitações de dosagem que devem ser obedecidas. Em ruminantes, por exemplo, a ração feita da vinhaça não pode ultrapassar 10% da alimentação diária: em suínos, ela não deve ultrapassar de 2 a 3%. As pesquisas, realizadas desde a década de 1970, buscavam a redução de potássio, de DBO e o aumento da aceitabilidade (CORAZZA & SALLES FILHO, 2000).

A produção de levedura, a partir da vinhaça também é uma tecnologia alternativa que permite reduzir a descarga deste efluente. Todavia, dois fatores concorrem para a elevação dos custos desta alternativa. Em primeiro lugar, o fato de ser necessário acrescentar à vinhaça, sais de amônia e de magnésio para se obter o fermento

seco. Em segundo lugar, e talvez o mais importante, o fato de ser elevado o consumo de energia para a evaporação da água da vinhaça, requerida neste processo (CORAZZA & SALLES FILHO, 2000).

Na construção civil a vinhaça pode ser adicionada à massa de cimento. Também existem estudos sobre a fabricação de materiais de construção, principalmente tijolos, a partir da vinhaça, alcançando avanços significativos quanto à resistência do material obtido. A viabilidade econômica desta alternativa deve se restringir às construções próximas ao local de origem da vinhaça, devido ao problema dos custos de transportes (CORAZZA & SALLES FILHO, 2000).

Outra alternativa que está sendo cada vez mais utilizada na indústria de etanol é a biodigestão anaeróbia da carga orgânica da vinhaça. Este processo consiste na biodegradação da carga orgânica da vinhaça para produção de biogás e vinhaça biodigerida. Os compostos são biologicamente oxidados e convertidos em ácidos orgânicos, tais como ácido acético e ácido propiônico por bactérias facultativas e anaeróbias. A redução da carga orgânica do efluente ocorre nesta fase acidogênica. Na fase metanogênica, os ácidos são convertidos em gás metano e dióxido de carbono e a vinhaça biodigerida é usado posteriormente como adubo. Neste caso, embora apresenta uma carga orgânica reduzida, a mesma mantém suas propriedades originais como fertilizante (CORTEZ *et al.*, 2007). A principal vantagem é a grande redução de DBO (70 a 90% no primeiro passo e até 99% no segundo). Os principais problemas derivados dessa opção são associados à necessidade de construção, manutenção e monitoramento de grandes tanques ou lagoas para o tratamento, devido aos grandes volumes do resíduo (CORAZZA & SALLES FILHO, 2000).

No setor sucroalcooleiro, o metano, anteriormente mencionado, pode ser usado para operar turbinas a gás combinado a um gerador elétrico, como peça substituta dos combustíveis utilizados na agroindústria durante a época de colheita, ou no uso em caldeiras para gerar vapor e para moer cana (CORTEZ *et al.*, 2007; SZYMANSKI, 2010). No entanto, a viabilidade econômica desta tecnologia é dificultada por pelo menos dois fatores, a falta de valorização como combustível alternativo e a difusão bem sucedida da fertirrigação (LAIME, 2011).

Outro método de eliminação de vinhaça e que foi integrado nas usinas de etanol foi a recirculação da mesma no processo produtivo, mas esse método ficou conhecido por ter um efeito adverso sobre a produção de etanol, e não é mais utilizado (MOURA & MEDEIROS, 2008).

3.3 Tratamento da vinhaça

A grande preocupação da vinhaça advém basicamente de sua decomposição química, devido à quantidade na qual ela é gerada tornando-se um efluente poluidor (MACHADO, 1998). Deste modo, são necessários incentivos ao desenvolvimento de novas tecnologias de tratamento, redução e usos alternativos da vinhaça, em detrimento da fertirrigação, pois a elevada geração desse efluente não comportará apenas uma forma de destinação (SILVA *et al.*, 2007). A presença de compostos recalcitrantes, em particular os polifenóis e os poliaromáticos tais como, taninos e ácidos húmicos, faz com que seja difícil de degradar a vinhaça (FREITAS, 2009).

Uma abordagem para o tratamento da vinhaça é tratá-la com o ozônio, a fim de eliminar os compostos fenólicos, e em seguida, realizar a aplicação de um tratamento biológico (MARTÍN *et al.*, 2002). O uso de ozônio gerado eletroquimicamente para a degradação da vinhaça revela ser muito eficiente para a remoção da cor da deste efluente bruto (FREITAS, 2009). A remoção da cor já é grande vantagem devido ao fato de permitir a penetração da luz solar no efluente, o que facilita a realização da fotossíntese em um possível tratamento biológico. O estudo de remoção de DQO em função do tempo de ozonização mostrou que houve uma pequena diferença na redução de DQO para degradações conduzidas em meio natural (ácido) e em meio básico, sendo que a redução de DQO em meio natural foi cerca de 23% e em meio básico foi cerca de 27%, sendo um efluente resultante com elevada carga orgânica.

Ensaio de coagulação/floculação/sedimentação utilizando o coagulante natural tanino obtiveram altas remoções de cor e turbidez e médias remoções de DQO. De acordo com os resultados, as maiores remoções dos parâmetros físico-químicos ocorreram na maior concentração de tanino testada, obtendo-se 96, 36 e 98% de

remoção de cor, DQO e turbidez, respectivamente. Assim, comprova-se a existência de uma relação diretamente proporcional entre a eficiência de remoção dos parâmetros físico-químicos com a concentração de coagulante tanino (VIVE *et al.*, 2013).

Souza *et al.* (2013), concentraram a vinhaça por meio da coagulação/floculação, sendo o clarificado tratado por fotocatalise, produzindo resultados satisfatórios na redução de cor, DQO e toxicidade da vinhaça. Segundo os autores, a etapa inicial consistiu de coagulação/floculação e foi realizada em temperatura ambiente. A seguir, testes fotocatalíticos foram realizados com a vinhaça clarificada obtida na etapa anterior. Segundo os autores, o processo fotocatalítico foi mais efetivo na redução da carga orgânica (DQO), mas a degradação permaneceu incompleta. Intermediários mais tóxicos foram formados e precisaram de um período de irradiação mais longo para completa mineralização dos poluentes. Ainda, com o processo de coagulação/floculação foram obtidos 98% de redução da turbidez e 87% de redução de cor. A combinação dos processos resultou em reduções significativas de cor, toxicidade e DQO.

Estudo realizado por Santana e Fernandes Machado (2008) avaliou a eficiência do processo fotocatalítico para o tratamento de vinhaça utilizando a radiação solar. Os resultados mostraram que o Nb₂O₅-TiO₂ (50%) foi o catalisador mais fotoativo (55% de redução de carbono orgânico total). Estes resultados são considerados excelentes, uma vez que a vinhaça é um efluente industrial recalcitrante. Assim, fotocatalise heterogênea pode ser considerado eficaz no tratamento da vinhaça, bem como a possibilidade aplicação de radiação solar é vantajosa, porque reduz os custos do processo. Nb₂O₅-TiO₂ é uma excelente opção como fotocatalisador, uma vez que os resultados obtidos com este material foram maior do que os resultados do TiO₂ puro e ainda é de fácil preparação, já que o Brasil possui 90% das reservas mundiais de Nb₂O₅.

Morimoto (2013), estudou o tratamento da vinhaça por H₂O₂ /UV solar em pH 5,0. Para isso, foi usado um reator composto por vidros curvos de borossilicato e mangueiras de silicone, no qual a vinhaça ficou em circulação, mantendo-se exposta à radiação UV solar. Houve a variação da concentração de H₂O₂ e do tempo de exposição à radiação UV. Cada ensaio teve duração de 180 minutos, nos quais as amostras eram

retiradas a cada 30 minutos. Os principais resultados obtidos foram 41,72 % de remoção de cor após 120 minutos de exposição à luz solar e concentração de 27,02 g.L⁻¹ de H₂O₂; 51,08 % de remoção de turbidez após 180 minutos de exposição à luz solar e concentração de 16,37 g.L⁻¹ e 36,19 % de remoção de DQO, após 180 minutos de exposição à luz solar e concentração de 5,51 g.L⁻¹ de H₂O₂.

Zayas *et al.* (2007), investigou a purificação da vinhaça biologicamente tratada (BT) a partir da aplicação de dois métodos complementares: coagulação/floculação, utilizando como agente coagulante o FeCl₃ e a oxidação eletroquímica (OE), que foi realizada em uma célula eletroquímica, utilizando o eletrodo de Ti/RuPb(40%)O_x como Ânodo e Ti/PtPd(10%) como cátodo. Os experimentos de OE foram realizados com a aplicação de um potencial de 5,0 V. Obteve-se remoção de cor de aproximadamente 99% e de 84% de redução da DQO. De acordo com os autores, o processo de OE seguida do processo de coagulação/floculação mostra resultados de 95% de redução de DQO e quase 100% de redução da cor da vinhaça BT.

Batista *et al.* (2011) propôs a degradação eletroquímica da vinhaça usando eletrodo de diamante dopado com boro. A oxidação eletroquímica da vinhaça foi investigada em diferentes potenciais e a cinética de degradação foi avaliada por meio de um espectrofotômetro UV/Vis. Amostras de vinhaça foram eletrolisadas em soluções de Na₂SO₄ 0,1 mol.L⁻¹ em potenciais controlados de 2,4; 3 e 4 V. Os espectros UV/Vis mostraram que há um decréscimo nos valores de absorvância em função do tempo de eletrólise. Esse decréscimo se mostrou mais atenuado na eletrólise realizada em 3 V. Nesse caso, a reação de desprendimento de oxigênio contribuiu positivamente no processo de oxidação da vinhaça. O tratamento de solução contendo aproximadamente 24,0 ppm de carbono orgânico total levou uma redução de 57% deste teor, quando a eletrólise foi realizada em 3 V durante 5 horas. Utilizando o potencial de 4 V a redução de COT (Carbono Orgânico Total) foi de aproximadamente 85%. A autora confirmou que o método foi aplicado com sucesso.

A literatura reporta que os tratamentos químicos, eletroquímicos e fotoquímicos para este tipo de efluente, e em sua maioria apresentam resultados pouco satisfatórios para remoção da matéria orgânica e cor, requerendo ainda diluição para a

execução dos ensaios e/ou sua aplicação é onerosa, o que torna-se praticamente inviável em escala industrial.

Alguns processos podem ser combinados e utilizados para degradar a matéria orgânica presente na vinhaça. Dentre estes encontra-se a biodegradação da vinhaça por microrganismos capazes de crescer sob condições de estresse ambiental, neste caso apresentando um sistema enzimático extracelular capaz de romper uma grande quantidade de ligações químicas como os fungos por exemplo (DUPONT *et al.*, 1997).

3.3.1 Tratamento da vinhaça por microrganismos

A viabilidade técnica e econômica dos tratamentos disponíveis é de grande importância, levando em conta o volume gerado pelas usinas. Vale ressaltar que o tratamento biológico ou físico-químico deste resíduo ainda é incipiente.

Pelo seu elevado teor de matéria orgânica a vinhaça é um resíduo passível de tratamento biológico. Os mecanismos biológicos reproduzem, de certa maneira, os processos naturais que acontecem em um corpo d'água após o lançamento de despejos. No corpo d'água, a matéria orgânica é convertida em produtos mineralizados inertes por mecanismos puramente naturais, caracterizando o assim fenômeno de autodepuração. A diferença em uma estação de tratamento de efluentes é a introdução, em paralelo, de uma tecnologia, com o objetivo de manter condições controladas para que ocorra o processo da autodepuração (VON SPERLING, 1996). Neste caso, a simulação de atividades microbiológicas pode resultar em resultados satisfatórios para o tratamento deste resíduo.

Mohana *et al.* (2009), isolou e caracterizou um consórcio bacteriano que consistia em *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, *Stenotrophomonas matophila* e *Proteus mirabilis*. Este consórcio conseguiu descolorir a vinhaça, obtendo 67% remoção de cor em 24 horas e reduzir em 51% DQO (Demanda Química de Oxigênio) após 72 horas de ensaio a 37°C, utilizando um efluente suplementado com 0,5 % de glucose, 0,1 % de KH_2PO_4 , 0,05 % KCl e 0,05 % $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$.

Sirianuntapiboon *et al.* (2004) testaram bactérias acetogênicas da estirpe BP103 e alcançou 76% de remoção de cor da vinhaça produzida a partir do melaço de cana-de-açúcar. Neste caso, o efluente foi suplementadas com 3,0% de glucose, 0,5% de extrato de malte, 0,1% de KH_2PO_4 , 0,05% de KCl e 0,05% de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$.

O mesmo efeito foi observado em um reator em batelada utilizando vinhaça tratada anaerobicamente por uma estirpe N° SF9-246 identificado como *Issatchenka orientalis* e suplementada com 30 g.L^{-1} de glucose. A linhagem apresentou um rendimento de descoloração quase constante de 75-80% ao longo de 7 dias (TONDEE & SIRIANUNTAPIBOON, 2008).

Outro estudo empregou *Pseudomonas sp.* para degradação da vinhaça que apresentava-se com um valor inicial de DQO de $146,38 \text{ g.L}^{-1}$ e DBO de $70,84 \text{ g.L}^{-1}$, sendo que 10 % de diluição da vinhaça foi necessário. A cor antes do tratamento era castanho escuro. A cepa foi capaz de remover 56 % de cor e 63% DQO em 72 horas, com a temperatura na faixa de 30-35°C, com pH entre 6,8 e 7,2 e com a composição do meio ideal de 4 g.L^{-1} de glicose, $0,2 \text{ g.L}^{-1}$ de KH_2PO_4 e $0,009 \text{ g.L}^{-1}$ $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$. As remoções de DQO e cor por *Pseudomonas sp.* foram presumivelmente associada com a estimulação da degradação via suplementação com uma outra fonte de carbono, bem como por produção e união da atividade de múltiplas enzimas, que ajudaram no mecanismo de degradação, tais como L-sorbose oxidase, manganês peroxidase e glucose-oxidase (ROBLES-GONZALEZ, 2012).

Siles *et al.* (2010) submeteu a vinhaça a um pré-tratamento de 15 minutos de ozonização, em que observou-se uma redução superior a 50% de fenóis, embora a concentração de carbono orgânico total tenha permanecido aproximadamente estável, indicando que os fenóis foram transformados em outras formas mais simples. Em outro momento o autor inoculou na vinhaça biomassa granular obtida a partir de um reator anaeróbio utilizado no tratamento de águas residuais da cervejaria Heineken S.A. Factory (Jaen, Espanha). O inóculo foi selecionado com base em sua elevada atividade metanogênica. A biodegradabilidade anaeróbia da vinhaça bruta e pré-tratada com ozônio foi semelhante, atingindo valores próximos a 80% de remoção de Demanda Química de Oxigênio. No entanto, quando a vinhaça ozonizada foi biodegradada o

coeficiente de rendimento e a taxa de produção de metano aumentou de 13,6% para 41,16%, respectivamente. Estes resultados indicam que a integração de tratamentos químicos e biológicos poderia ser uma opção viável para a purificação de efluentes industriais, especificamente da vinhaça.

Francisco (2008) cultivou *Saccharomyces cerevisiae* em vinhaça bruta e alcançou uma redução considerável de 37% no valor da DQO e na condutividade, e pequena diminuição da sua acidez, além de apresentar custos relativamente baixos.

Campos *et al.* (2014) avaliaram as comunidades microbianas presentes na vinhaça em diferentes estágios de seu tratamento por métodos tradicionais e moleculares. A análise da eficácia de cada tratamento foi realizado por meio de parâmetros físico-químicos e análise de toxicidade. O tratamento da vinhaça foi realizado nas seguintes etapas: fermentação de fluxo elevado, filtração, flocos químicos, fermentação de baixo fluxo, filtração e neutralização. A análise físico-química em diferentes fases do tratamento indicou que a fase de tratamento da vinhaça influenciou o desempenho dos parâmetros avaliados. Entre os parâmetros analisados houve, especialmente reduções de DBO (96,7%), sólidos em suspensão (99,9%), pH, concentração de cobre (88%), concentração de ferro (92,9%), e concentração de manganês (88%). As bactérias *Lactobacillus brevis* e *Pichia kudriavzevii* estavam presentes em todos fases dos tratamentos, indicando que estes microrganismos são resistentes e podem ser empregado no tratamento da vinhaça. A vinhaça mostrou uma redução significativa da carga de poluição após o tratamento, no entanto ainda não poderia ser descartada em corpos de água porque apresentava valores elevados de sólidos suspensos. Mas os autores sugerem a utilização do efluente no arrefecimento da serpentina durante o processo produtivo.

Mota *et al.* (2013) testou a atividade biológica e o desempenho de uma membrana de filtração em um biorreator para o tratamento de vinhaça. Após a aclimatação o sistema foi operado sob um fluxo contínuo. A eficiência de remoção de DQO e DBO foi $96,9 \pm 0,7\%$ e $95,0 \pm 1,1\%$, respectivamente. Os teores do biogás metano a partir dos reatores acidogênicos e metanogênicos variaram entre 0,1-4,6% e 60,1-70,1%, respectivamente.

Passos (2014) testou uma célula combustível microbiana com um consórcio de microrganismos para o tratamento de vinhaça. Como inóculo da célula combustível microbiana foi utilizado um lodo coletado de um reator de fluxo ascendente utilizado para o tratamento anaeróbio de vinhaça de uma usina de açúcar e etanol da Região de Ribeirão Preto/SP. Nas células a combustível microbianas a eletricidade é gerada a partir da oxidação de compostos orgânicos no ânodo, catalisada por microrganismos, sendo os elétrons transferidos para cátodo em um circuito externo. O que diferencia estas células são os microrganismos utilizados na oxidação e a natureza dos compostos orgânicos oxidados. Foram utilizados reatores com capacidade de 250 mL, aos quais foi introduzido um tecido de carbono para o crescimento dos microrganismos. Os reatores foram alimentados com glicose por 98 dias, aumentando-se a concentração de glicose de 5 até 20 g.L⁻¹. A maior densidade de potência de 2,06 $\mu\text{W cm}^{-2}$ foi obtida com 10 g.L⁻¹ de glicose, sendo que acima desta concentração houve uma diminuição da densidade de potência. Segundo os autores os valores de densidade de potência obtidos neste trabalho foram promissores, em comparação com os resultados publicados em muitos dos recentes trabalhos relacionados a células microbianas à combustível.

3.3.1.1 Tratamento da vinhaça por fungos

Os fungos são reconhecidos por sua habilidade em produzir uma ampla variedade de proteínas extracelulares, ácidos orgânicos e outros metabólicos, além da sua capacidade para se adaptar a vários contaminantes ambientais (COULIBALY *et al.*, 2003).

Com seu crescimento induzido quimiostaticamente em direção à fonte de carbono orgânico, através do alongamento e ramificação das hifas, o contato superficial com o contaminante é otimizado aumentando assim sua biodisponibilidade e conseqüentemente biodegradação (FERREIRA *et al.*, 2010).

González *et al.*, 2000, apontam para o uso de fungos na biodegradação da vinhaça, visando à remoção da carga poluidora deste efluente.

Sirianuntaiboon *et al.*(1995) relatam o mecanismo de descoloração de pigmentos de melanoidina sintéticos e presentes na vinhaça por *Rhizoctonia sp.*- D90. O ensaio foi feito num agitador, a 30° C, após inoculação com 10 mL da suspensão de micélio durante quatro dias. Cada frasco continha 100 mL de uma solução de melanoidina, glicose (2,5%, w/v), NaNO₃ (0,2%), KH₂PO₄ (0,1%), e MgSO₄.7H₂O (0,05%), e o pH foi ajustado para 6,0. Os micélios recolhidos de cada etapa do cultivo foram prefixados em 4% para formaldeído durante 2 horas e em 1% tetróxido de ósmio em tampão de fosfato 0,1 M (pH 7,3) durante 2 horas, e em seguida, eles foram corados com acetato de uranilo aquoso 2% por 1 hora. Os micélios corados foram cuidadosamente lavados com água destilada e desidratados por uma sequência de imersão em 50, 70, 80, 90, 95, e 100% de etanol durante 30 minutos cada. O tratamento com 100% de etanol foi repetido três vezes. Os micélios desidratados foram embebidos em resina durante 10 horas. Em seguida foi utilizado um ultramicrotomo para cortar seções de 60 a 90 nm. Os cortes foram corados com citrato de chumbo e acetato de uranilo e examinadas em um microscópio de transmissão eletrônica. Os resultados mostraram que primeiramente acontece a absorção dos pigmentos pela célula do micélio durante o crescimento do fungo e, finalmente sua acumulação intracelular no citoplasma.

Ferreira (2009) utilizou em ensaios para descoloração da vinhaça com três linhagens de fungos ascomicetos e cinco de basidiomicetos, sendo que o basidiomiceto *Pleurotus sajor-caju* CCB 020 se destacou dos demais. A descoloração foi concomitante com o aumento das atividades de lacase e manganês peroxidase (MnP). Entretanto, ficou evidente que a lacase é a enzima de maior importância na descoloração. A vinhaça desencadeou o processo de estresse oxidativo no fungo, fato observado através da elevação da atividade das enzimas superóxido dismutase, catalase e glutatona redutase, associadas a mecanismos de detoxificação por espécies ativas de oxigênio (EAO's). Quando comparado com o crescimento em meio sintético o cultivo submerso de *P. sajor-caju* em vinhaça demonstrou aumento na produção de biomassa e aumento na atividade das enzimas como a lacase e MnP, alcançado no 9° e 12° dia de cultivo, respectivamente, a 28,0°C e com agitação constante. Nos mesmos tratamentos

foi observada a redução de 82,8% na DQO, de 75,3 da DBO, 99,2% da remoção da coloração e 99,7% da turbidez, indicando a participação dessas enzimas na despolimerização de compostos fenólicos e pigmentos de melanoidinas. Após 15 dias de tratamento com o fungo, foi evidenciada a redução da toxicidade da vinhaça determinada por exposição a organismos como *Pseudokirchneriella subcapitata*, *Daphnia magna*, *Daphnia similis* e *Hydra attenuata*. Foi concluído que o uso do sistema vinhaça e *P. sajour-caju* pode ser aplicado em bioprocessos de remoção de cor e na degradação de compostos complexos da vinhaça, ocorrendo detoxificação e melhora em suas qualidades, podendo ser esta técnica indicada para produção de água de reuso, produção de enzimas lacases e MnP e aproveitamento de biomassa.

Aragão (2012) também estudou os efeitos combinados de temperatura e valor inicial de pH sobre a biodegradação da vinhaça e produção de biomassa pelo fungo *Pleurotus sajour caju*, durante 16 dias de cultivo sob agitação. A temperatura e pH ótimos encontrados para um maior rendimento de descoloração foram a 27,0°C e 5,6 respectivamente. Entretanto, para uma maior biossíntese de biomassa as melhores condições encontradas foram de 20,0°C e pH de 6,8. De forma paralela, foram realizados testes em dois diferentes tipos de biorreatores, tipo *air-lift*, nas condições de 30,0°C e pH inicial de 5,0. Nestas condições obteve-se reduções de 53 e 58% de DBO e 71 e 58 % de DQO nos biorreatores analisados. Conclui-se então que a combinação sistemática de *P. sajour caju* e vinhaça em condições preestabelecidas pode ser aplicada no processo de biodegradação de compostos complexos desse resíduo.

Aguiar Filho (2008) analisou a atividade enzimática de *Pleurotus sajour caju*, *Pleurotus ostreatoroseus*, *Pleurotus ostreatus* e *Trichoderma reesei* cultivados em bagaço pré-tratado com 2% H₂SO₄/1,5% NaOH/2% H₂O₂ e combinação 2% H₂O₂/1,5% NaOH. No trabalho os autores determinaram teor de celulose, lignina e hemicelulose resultante de cada tratamento e as atividades lignolíticas da lacase, da peroxidase e da manganês peroxidase. Os pesquisadores avaliaram ainda as atividades das enzimas celulolíticas exoglicanase e endoglicanase, comparando com um controle sem tratamento químico. A atividade celulolítica foi avaliada com os quatro fungos cultivados em meio de bagaço moído umedecido com vinhaça e bagaço úmido

umedecido com meio mineral. Em relação ao controle foi observado que o pré-tratamento conjunto 2% H₂O₂/1,5% NaOH em autoclave proporcionou maior quebra nas fibras aumentando 1,4 vezes o teor de celulose e diminuindo em 8,5 vezes o da hemicelulose. Esse mesmo tratamento também quantificou a maior atividade lignolítica para as quatro linhagens. O ascomiceto *T. reesei* produziu lacase, peroxidase e manganês peroxidase (MnP) em todos os tratamentos, inclusive no controle, sendo a atividade da MnP de 1,9 a 4,8 vezes maior que os basidiomicetos.

3.3.1.1.1 Aplicação do fungo *Aspergillus niger* Tiegh.

Aspergillus niger é uma espécie bem conhecida do gênero *Aspergillus* (SHARMA, 2012). É amplamente distribuído e tem sido detectado numa vasta gama de ambientes, pois ele pode colonizar uma ampla variedade de substratos (MATEESCU *et al.*, 2011.; SHARMA, 2012).

Os esporos produzidos dentro dos conidióforos são resistentes ao estresse ambiental, o que ajuda o microrganismo a sobreviver durante os períodos inativos. Este organismo é um sapróbio do solo com uma grande variedade de enzimas hidrolíticas e oxidativas envolvidas na quebra de lignocelulose vegetal. Esse recurso, juntamente com a sua capacidade para produzir ácidos orgânicos extracelulares, lhe permite causar deterioração de várias substâncias orgânicas (GAUTAM *et al.*, 2010.; SHARMA, 2012; ARDESTANI & KASEBKAR, 2014).

O *A. niger* também desempenha um papel importante no ciclo global do carbono (SHARMA, 2012). Deve-se mencionar que as espécies de *Aspergillus* são aeróbicas e são encontrados em quase todos os ambientes ricos em oxigênio, eles geralmente crescem na superfície do substrato, devido à alta tensão ao oxigênio (CHEHRI, 2013).

Parâmetros climáticos, tais como umidade e temperatura são extremamente importantes para a propagação dos esporos e quando as condições de umidade e de alimentos são adequados, eles germinam. Algumas pesquisas sobre o transporte de esporos pelo vento relataram que um aumento na concentração de esporos de fungos foi

visto nas temperaturas entre 15,0-25,0°C e relativa umidade do ar em torno de 60% - 70% (ABABUTAIN, 2013).

O volume mínimo de água para o crescimento é de 0,88 mL, o qual é relativamente alto em comparação com outras espécies de *Aspergillus*. Oladiran e Iwu (1993) relataram a faixa de umidade de 70% -90% como condição ideal para o crescimento de *A. niger* e *A. flavus*, e segundo Bonner (1948) a umidade relativa ótima para o crescimento *A. niger* está perto de 93%.

O crescimento de *A. niger* tem uma vasta gama de temperatura (6,0 - 47,0°C) sendo os melhores desenvolvimentos relatados entre 35,0-37,0°C (SCHUSTUR *et al.*, 2002; HASSOUNI *et al.*, 2007; MOGENSEN *et al.*, 2009; ASTORECA *et al.*, 2010; SHEHU & BELLO, 2011).

A. niger é capaz de crescer em uma gama extremamente ampla de pH: 1,4 - 9,8 com níveis ótimos entre 4 e 6,5. Essas capacidades e a produção profusa de conidiósporos, que são distribuídos através do ar, caracteriza a ocorrência ubíqua das espécies, com maior frequência em lugares quentes e úmidos (SCHUSTER *et al.*, 2002; SAMSON *et al.*, 2004;. GAUTAM *et al.*, 2010).

O fungo filamentosso *Aspergillus niger* é um microrganismo muito utilizado pela indústria, pois produz uma variedade de enzimas, tais como a celulase e xilanase (COURI *et al.*, 2000; FARINAS *et al.*, 2010), fitase (BHAYSAR *et al.*, 2011), amilases (MITIDIERI *et al.*, 2006), e peptidases (MORYA *et al.*, 2012).

Enzimas de *A. niger* têm sido utilizados na produção de alimentos durante várias décadas, e mesmo que a sua produção enzimática tenha sido estudada (BASTEN *et al.*, 2003), há poucos relatos sobre a produção queratinase por cepas de *A. niger* (LOPES *et al.*, 2011).

O gênero *Aspergillus* também é usado no processo de biorremediação de remoção de metais pesados, devido à sua alta resistência e tolerância a diferentes íons metálicos (DIJKSTEHUIS & WÖSTEN, 2013; AMINI *et al.*, 2009; ANDERSEN *et al.*, 2011; ABDULLAH-AL-MAHIN *et al.*, 2012; MUDHOO *et al.*, 2012).

A. niger tem sido extensivamente testado quanto à sua capacidade para lixiviar e remediar metais pesados como chumbo, cádmio, níquel, zinco, cobre, com base em a

sua capacidade de adaptação fisiológica, resistência e tolerância (KAPOOR & VIRARAGHAVAN, 1997; KAPOOR *et al.*, 1999; MAGYAROSY *et al.*, 2002; LIU *et al.*, 2006; SANTHIYA & TING, 2006; AMIRI *et al.*, 2011).

A propriedade quelante de ácido oxálico pode assumir um papel na formação de cristais de oxalato, o que resultou na tolerância a níveis elevados de metais pesados para vários fungos, incluindo *A. niger* (MURPHY *et al.*, 1983). O papel do ácido oxálico em *A. niger* ainda não foi totalmente elucidado; no entanto, pode estar relacionado com a degradação dos polissacarídeos da parede celular de plantas, a fim de mobilizar mais nutrientes (KUMAR *et al.*, 2009).

O *A. niger* sintetiza superóxido dismutase, catalase, glutathione peroxidase, glutathione S-transferase e glutathione reductase em resposta ao estresse oxidativo induzido pela presença de peróxido de hidrogênio. A existência da atividade da enzima antioxidante catalase e superóxido dismutase também têm sido relatados na proteção dos conidióforos de *A. niger* submetidos a estresse térmico (ABRASHEV *et al.*, 2005; ABRASHEV *et al.*, 2008).

Silva (2012) investigou a solubilização de fosfato em dois latossolos, por *Aspergillus niger* e por *Glomus clarum* Nicol. & Schenck, e os microrganismos mostraram-se capazes de solubilizar o fósforo não lábil do solo. Como o fósforo é indispensável para as culturas, justificam-se estudos relacionados à maximização do aproveitamento do fósforo não lábil do solo por meio de microrganismos solubilizadores de fosfato.

Fasanella *et al.* (2008) testou a ação das enzimas ligninolíticas produzidas por *Aspergillus niger* e *Penicillium* sp. em bagaço de cana-de-açúcar com o objetivo de avaliar diferentes tratamentos químicos e biológicos. Os autores empregaram bagaço sem tratamento como controle. Para o tratamento químico utilizaram bagaço com solução de Ca(OH)_2 , bagaço com solução de NaOH e bagaço com solução de $\text{Ca(OH)}_2 + \text{NaOH}$, e empregaram *Aspergillus niger* e *Penicillium* sp. para o tratamento biológico. Os frascos contendo o bagaço e as soluções utilizadas foram submetidos à autoclavagem. Os pesquisadores empregaram microscopia óptica, eletrônica de transmissão e de varredura, com o intuito de investigar alteração física na estrutura da

fibra do bagaço de cana-de-açúcar tratados pelos métodos anteriormente citados. Os resultados demonstram que a ação dos tratamentos químicos, principalmente do NaOH+Ca(OH)₂, provocou uma eficiente desestruturação das fibras em comparação aos outros tratamentos. Em relação às atividades enzimáticas, o pré-tratamento do bagaço com NaOH+Ca(OH)₂, associado a *Aspergillus niger*, mostrou ser mais eficiente para a produção de lacase. Para *Penicillium* sp., a atividade enzimática da lacase foi mais eficiente no pré-tratamento separado com NaOH e com Ca(OH)₂ do que quando se utilizou NaOH+Ca(OH)₂ juntos.

De acordo com García *et al.* (1997) o tratamento da vinhaça pode ser facilitado pelos fungos *Aspergillus terreus* e *Geotrichum candidum*, os quais tem a capacidade de biodegradação de compostos fenólicos e de outros resíduos.

Vitali & Kiyon (1996) estudaram a redução de taxa de poluição da vinhaça de cana-de-açúcar por quatro espécies de *Aspergillus*: *A. niger*, *A. oryzae*, *A. japonicus* e *A. sulphureus*. Os microrganismos foram cultivados durante 72 h a 28,0°C. O fungo *A. niger* apresentou um desempenho melhor na redução de sólidos totais, com um resultado superior a 40% de remoção em relação aos outros. Porém, a melhor redução de DQO foi de 74% empregando a espécie *A. sulphureus*.

Salgado *et al.* (2016) selecionou três fungos (*Aspergillus ibericus*, *Aspergillus uvarum*, *Aspergillus niger*) para biorremediar águas residuais da produção de azeite - sem diluir, águas residuais da produção de azeite diluída e suplementada com nutrientes, e uma mistura de águas residuais da produção de azeite e vinhaça na proporção 1:1. Reduções mais elevadas de compostos fenólicos, cor e DQO foram alcançadas ao misturar os 2 resíduos, sendo que *A. uvarum* apresentou os melhores resultados. Além disso, a produção de enzimas também foi avaliada durante o processo de biorremediação. *A. ibericus*, *A. uvarum* e *A. niger* alcançaram o maior valor das atividades de lipase (1253,7 ± 161,2 U/L), protease (3700 ± 124,3 U/L) e tanase (284,4 ± 12,1 U/L), respectivamente. Por conseguinte, este processo é uma alternativa interessante aos processos tradicionais para gerir esses resíduos, proporcionando simultaneamente reaproveitamento, que podem ser empregados nas próprias indústrias.

Somente um trabalho citado anteriormente (VITALI & KIYAN,1996) foi reportado na literatura com a utilização de *Aspergillus niger* para degradação do poder poluente da vinhaça e nenhum outro foi reportado na bases de dados Science Direct, Scielo e Google Acadêmico entre os meses de outubro/2015 e março/2016.

Portanto, pretende-se com o presente trabalho investigar o uso do fungo *Aspergillus niger* devido sua alta atividade enzimática atuando em consócio com *Rhizopus arrhizus* na degradação do poder poluente da vinhaça.

3.3.1.1.2 Aplicação do fungo *Rhizopus arrhizus* A. Fisch.

O *R. arrhizus* é classificado como zigomiceto e é muito usado na produção de várias enzimas e ácidos orgânicos, devido à sua capacidade de utilizar uma variedade de fontes de carbono, tais como farelo de trigo, bagaço, mandioca, grãos de soja, entre outros (BOGAR *et al.*, 2003; RAMACHANDRAN *et al.*, 2005).

A literatura também reporta o uso do *R. arrhizus* na conversão da glicose presente nas células em ácido láctico e etanol, como principais produtos metabólicos (THONGCHUL, 2013). A produção de etanol por *R. arrhizus* pode ser controlada através da adição dos inibidores que regulam a via de álcool na fermentação corroborando na produção de ácido láctico (THITIPRASERT *et al.*, 2011; THITIPRASERT *et al.*, 2014).

O *R. arrhizus* pode fermentar açúcares, amido e biomassa lignocelulósica produzindo ácido láctico, que pode ser utilizado com segurança na alimentação humana ou animal como aditivos (JUODEIKIENE *et al.*, 2015; KUO *et al.*, 2015).

Os sedimentos de cultura de *R. arrhizus* em frascos de agitação são fortemente determinadas pelas condições da pré-cultura, tais como concentração da fonte de carbono, fonte de nitrogênio, concentrações de íons metálicos, pH e temperatura da cultura (LIAO *et al.*, 2007; ZHOU *et al.*, 2000).

Este fungo também é considerado um excelente produtor de ácido fumárico (ROA ENGEL *et al.*, 2008). A preocupação ambiental causada por síntese química dos combustíveis fósseis levou a um aumento no interesse na produção de ácido fumárico a

partir de fermentação usando fungos filamentosos (ZHANG *et al.*, 2013; ROA ENGEL *et al.*, 2008). Neste caso, o controle do crescimento micelial do *R. arrhizus* é um grande desafio técnico para a produção deste ácido em um nível industrial (PAPAGIANNI & MATTEY, 2006). Foi relatado que quanto menor o diâmetro de massa micelial maior a produção de ácido fumárico em fermentação submersa por *R. arrhizus* (ZHOU, *et al.*, 2000). O ácido fumárico é um intermediário do Ciclo de Krebs, mas *R. arrhizus* pode acumular grandes quantidades de ácido fumárico na via redutiva citosólica utilizando NADH (FERREIRA *et al.*, 2013).

No campo de aplicação ambiental o fungo *R. arrhizus*, também apresenta potencial para adsorção de poluentes orgânicos (DAS *et al.*, 2006; FU & VIRARAGHAVAN, 2001). O componente dos biopolímeros (quitosana e quitina) presentes nas paredes celulares contribuem para o comportamento de adsorção do *R. arrhizus* (DAS *et al.*, 2008). A sorção de paredes celulares do *R. arrhizus* desempenha um papel importante no particionamento de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs). A sorção de HPAs nas paredes celulares de *R. arrhizus* geralmente é maior do que nas paredes das células da raiz da planta, demonstrando a vantagem do emprego de fungos na remediação de HPAs (MA *et al.*, 2011).

Os fungos *Rhizopus arrhizus*, *Aspergillus niger*, *Mucor* spp., e muitas outras espécies de fungos filamentosos também foram investigados quanto à sua atividade lipolítica (ELLALIAH *et al.*, 2004; HAMA *et al.*, 2006; OHNISHI *et al.*, 1994). A lipase produzida por *Rhizopus arrhizus* é considerada como um catalisador versátil e é amplamente aplicado em várias campos da biotecnologia, podendo ser utilizada em biocatálise para várias aplicações, especialmente para a modificação de gorduras e óleos, devido as suas regiões de especificidade nos triacilgliceróis (HAMA *et al.*, 2007).

Adicionalmente, o *Rhizopus arrhizus* quando comparado com outras espécies de fungos de podridão branca (*Trametes versicolor*, *Pleurotus ostreatus* e *Pleurotus sajor caju*), demonstrou ser mais eficiente na redução da DQO e cor de efluentes de fábricas de papel (FREITAS *et al.*, 2009). Deste modo, o uso desta espécie de fungo poderia resultar em efeitos positivos no tratamento de resíduos industriais.

Nenhum trabalho envolvendo a utilização do fungo *Rhizopus arrhizus* na degradação do poder poluente da vinhaça foi reportado nas bases de dados Science Direct, Scielo e Google Acadêmico entre os meses de outubro/2015 e março/2016, tornando-se essa pesquisa inovadora e inédita.

3.4 Sorção no bagaço de cana-de-açúcar

Para cada tonelada de cana-de-açúcar processada estima-se que são gerados cerca de 250,0 kg de bagaço (CTC, 2016). Assim como outros materiais lignocelulósicos o bagaço de cana-de-açúcar é constituído principalmente por celulose, hemicelulose e lignina. A composição química do bagaço depende da variedade da cana-de-açúcar, tipo de solo, técnicas de colheita e manuseio (REIN, 2007).

Segundo Santana e Teixeira (1993), o bagaço *in natura* é composto aproximadamente por 44,5% de fibras lignocelulósicas, 50,0% de umidade, 2,5% de sólidos solúveis em água e 3,0% de teor de cinza.

Battistelle *et al.* (2008), verificou ainda que, morfológicamente, o bagaço possui 50% de fibra, 30,0% de tecidos parenquimatosos e 20,0% de vasos e epiderme.

De modo geral, o bagaço consiste de fibras e medula, nas proporções de aproximadamente 65,0 e 35,0%, respectivamente. As células que constituem as frações da fibra e de medula diferem fisicamente. As fibras possuem uma grande razão comprimento/diâmetro e um elevado coeficiente de expansão e contração, sob processos de umedecimento e secagem (CARASCHI, 1997).

Geralmente o bagaço produzido é utilizado como fonte de energia alimentando as caldeiras das indústrias de açúcar e álcool, mas o bagaço da cana-de-açúcar tem se destacado como um sorvente promissor, uma vez que apresenta atividade adsortiva/absortiva para com substâncias apolares à temperatura ambiente e está sendo utilizado na área ambiental para remover ions de metais pesados e poluentes orgânicos (BRANDÃO *et al.*, 2010; CARG *et al.*, 2008; CHRISTA & THOMAS, 2009; TAO *et al.*, 2015).

VALIX *et al.* (2008) preparou carvão ativado a partir de bagaço de cana para aplicação no tratamento de águas residuais contaminadas por cromo. O experimento foi realizado para verificar a remoção e a redução de cromo por adsorção através das propriedades físicas do carvão ativado, tais como área superficial e tamanho dos poros. A influência dos teores dos átomos de enxofre, nitrogênio, hidrogênio e oxigênio, para a remoção também foi investigada. O carvão ativado a partir de bagaço exibiu elevada adsorção de cromo a partir de área superficial elevada, grande tamanho dos poros, grandes quantidades de enxofre, nitrogênio e hidrogênio e teores mínimos de oxigênio.

Soliman *et al.* (2011) testou a remoção de Ca (II) a partir de soluções aquosas utilizando bagaço de cana-de-açúcar (BCA) modificado com ácido tartárico (AT) e ácido cítrico (AC) após digestão por microondas. Foram aplicados com sucesso para diminuir a dureza, condutividade e sólidos totais dissolvidos (STD) em diferentes amostras de água naturais se comparados com resina Dowex 50W-X8. BCA-AT e BCA-AC como extratores naturais em fase sólida tem as seguintes vantagens: i) material polimérico natural lignocelulósico; ii) barato (resíduos da indústria de cana de açúcar); iii) rico em grupos funcionais contendo oxigênio e iv) capacidade para a extração de Ca (II) a partir da solução aquosa em pH 6,0.

Tao *et al.* (2015) testou bagaço de cana-de-açúcar para a remoção de íons de chumbo de águas residuais de tratamento de esgoto. O lodo de esgoto foi misturado ao bagaço de cana-de-açúcar antes da adição de 3 mol/L de KOH. A mistura foi aquecida até 800°C. Depois de permanecer a 800°C por 30 minutos o material foi arrefecido, sob atmosfera de N₂ (300 mL/min) até alcançar a temperatura ambiente. Em seguida, o produto foi fervido e embebido com 3 mol/L HCl durante 1 min, após esse processo o produto foi lavado com água desionizada até um pH neutro e seco a 110°C. Após os tratamentos o bagaço mostrou uma excelente capacidade de adsorção de Pb²⁺ (51,3 mg.g⁻¹), pode-se concluir que o mesmo possui um potencial uso como adsorvente de Pb²⁺ nos tratamentos de águas residuais.

Moubarik e Grimi (2015) estudaram o caroço de azeitona e o bagaço de cana como bioadsorventes para a remoção de cádmio da solução aquosa. O efeito do pH, a concentração inicial de Cd²⁺, o tempo de contato e a temperatura influenciaram na

adsorção. Tanto o caroço de azeitona como o bagaço exibem maior capacidade de adsorção de Cd^{2+} a uma temperatura de aproximadamente 25°C e valor de pH inicial de 7. Os resultados obtidos mostram que, a capacidade máxima de sorção do bagaço e do caroço de azeitona diminuiu com o aumento da temperatura, embora não significativamente. Os estudos cinéticos indicaram que o equilíbrio na biossorção dos íons Cd^{2+} em caroço de azeitona e em bagaço ficou próximo a 25 minutos de tempo de contato. A espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIV) mostrou a ausência de nitrogênio e grupos de enxofre no caroço de azeitona e na estrutura de bagaço. Considerando que há a presença de diferentes grupos de oxigênio, principalmente carbonila, álcool, fenol, éteres e ésteres, considera-se que as propriedades de adsorção do caroço de azeitona e do bagaço em relação aos íons Cd^{2+} pode ser atribuída à presença destes grupos funcionais nas estruturas. Em ambos os biossorventes a sorção aumentou na concentração maior de íons do metal, com uma capacidade máxima de remoção de 96%. O resultado revela o grande potencial do uso de caroço de azeitona e de bagaço de cana-de-açúcar como biossorventes de baixo custo para a remoção de cádmio em tratamento de águas residuais.

Tahir *et al.* (2012) testou bagaço de cana-de-açúcar (BCA), bagaço de cana-de-açúcar quimicamente modificado e cinzas de bagaço de cana-de-açúcar (CBC) como adsorventes para a remoção do corante verde malaquita (VM) a partir de soluções aquosas de efluentes têxteis. O bagaço de cana-de-açúcar quimicamente modificado foi tratado com formaldeído 1:5 a $54 \pm 2^{\circ}\text{C}$ por 24 horas. O conteúdo foi filtrado e o bagaço foi separado, lavado com água destilada e seco por 12 horas a 80°C . Após secagem, foi mergulhado em ácido sulfúrico (98%) numa proporção de 1: 1 de ácido e bagaço e novamente seco a 100°C durante 24 horas. Depois do tratamento com ácido, lavou-se o bagaço com água destilada e novamente o bagaço foi embebido em solução de NaHCO_3 a 1% durante a noite. Em seguida, o conteúdo foi filtrado e novamente lavou-se o bagaço com água destilada até obter pH neutro sendo posteriormente seco por 24 horas a 100°C . A remoção foi efetivada sob as condições otimizadas de concentração de corante, quantidade de adsorvente, temperatura e o tempo de contato. A partir dos resultados, observou-se que o bagaço quimicamente modificado apresentou

melhor capacidade de adsorção devido a área de superfície do adsorvente. O bagaço quimicamente modificado apresentou uma remoção de aproximadamente 89% da cor. Portanto o mesmo pode ser empregado como um método alternativo de baixo custo para a remoção de corantes e purificação de efluentes têxteis.

Silva & Oliveira (2012) estudaram o bagaço de cana-de-açúcar como biossorvente para remoção do corante azul de metileno de soluções aquosas através do método de batelada. Neste estudo, o bagaço foi modificado com ácido sulfúrico com o intuito de aumentar sua capacidade de adsorção. A caracterização foi feita por infravermelho (FTIR), microscopia eletrônica de varredura (MEV) e ponto de carga zero (pH_{pzc}). Foram estudados os efeitos do pH e da concentração do corante na capacidade de adsorção. A adsorção do corante foi favorável em pH 8,0 para o bagaço natural e pH 10,0 para o bagaço modificado. A capacidade máxima de adsorção encontrada para o bagaço natural foi de 31,791 mg.g⁻¹ e de 38,227 mg.g⁻¹ para o bagaço modificado.

Homagai *et al.*(2010) e Velazquez-Jimenez *et al.*(2013) indicaram que adsorventes à base de bagaço de cana de –açúcar são eficientes na remoção de metais pesados de águas residuais.

Homagai *et al.*(2010) testou a capacidade de adsorção do bagaço de cana de açúcar para a separação de cádmio, chumbo, níquel, zinco e cobre a partir de suas soluções aquosas. O material foi caracterizado por FTIR (Espectroscopia Infravermelho com Transformada de Fourier) e análise elementar. As cinéticas de sorção dos metais testados atingiu o equilíbrio dentro de 20-40 min. As capacidades de adsorção máxima avaliadas em termos de moles de gel/kg de massa seca foi 1,95 para Cd (II), 1,58 para Pb (II), 2,52 para Ni (II), 2,40 para Zn (II) e 2,91 para Cu (II). A capacidade de adsorção elevada e a cinética dos resultados indicaram que o bagaço pode ser utilizado como adsorvente seletivo para a remoção destes respectivos ions metálicos da água residual.

Velazquez-Jimenez *et al.*(2013) caracterizaram o bagaço de cana-de-açúcar, antes e depois que eles foram testados para remover cátions metálicos, por titulações ácido-base, análise elementar e ATR-FTIR (Reflectância Total Atenuada - Espectroscopia Infravermelho com Transformada de Fourier). HCl, HNO₃, NaOH,

ácido tartárico, ácido cítrico e ácido oxálico foram usados para modificar o bagaço e para determinar se a concentração de grupos ativos poderia ser melhorada. Estes materiais foram então testados para a remoção de Cd (II), Pb (II) e Zn (II) em pH 5,0 e estudos de dessorção foram realizados em pH 2,0 e 4,0 a 25,0°C. As técnicas de caracterização identificaram principalmente que o bagaço continha carboxila, hidroxila, enxofre e nitrogênio. Ficou claro que, principalmente, os grupos carboxílicos foram responsáveis pela absorção do metal. O bagaço sem tratamento apresentou uma capacidade de adsorção de cerca de 8,0 g⁻¹ para o zinco, 14,0 g⁻¹ para cádmio e 36 mg para chumbo. Essa capacidade foi melhorada cerca de 62% após a modificação com HNO₃ e NaOH. Os tratamentos com ácido cítrico, ácido oxálico e ácido tartárico não tiveram um efeito significativo na capacidade de adsorção.

Pereira *et al.*, (2015) propôs à utilização de um material ferti-liberador, que após a sorção dos nutrientes da vinhaça ou KNO₃(nitrato de potássio) fosse empregado na adubação de culturas agrícolas. Foram então produzidas microesferas utilizando quitosana (Q), um biopolímero, e o bagaço de cana-de-açúcar (B), uma carga natural. A solução de Quitosana (4% em ácido acético) foi adicionada a 10, 25 e 50% em massa de bagaço de cana-de-açúcar e misturada em agitador *Turrax*. As microesferas quitosana/bagaço foram obtidas pelo método de coagulação, lavadas até pH neutro e secas em estufa. O processo de sorção teve duração de oito horas, sendo que nesse tempo ocorreu o ponto máximo de sorção. O teste foi realizado em triplicata. A fim de comparar, as microesferas foram também utilizadas para sorção do fertilizante KNO₃. As microesferas que foram imersas em solução de KNO₃ 15g/L apresentaram melhores resultados de sorção do que as microesferas imersas na vinhaça. Com exceção das microesferas Q.B 25% que sorveu 11,6% de K, as demais apresentaram valores de sorção próximos da quantidade de K sorvida. Esta diferença pode ser explicada tanto pelas diferentes proporções de bagaço utilizado, quanto pela diferença entre a solução de KNO₃ e a vinhaça sendo rica em matéria orgânica, podendo influenciar na capacidade de sorção do material. Verificou-se a potencialidade das microesferas de Q.B em sorver nutrientes da vinhaça e da solução de KNO₃. Este material tem grande

potencial, pois, contribui para diminuir os teores K e pode ser utilizado como um material de liberação de nutrientes para a agricultura.

Mall e Kumar (1997) comparou a remoção de cor usando carvão ativado vendido comercialmente e cinzas de bagaço. A remoção de cor foi de 58% utilizando 30 g/l de cinzas de bagaço e 80,7% utilizando 20 g/l de carvão ativado.

O carvão ativado granular (CAG) feito a partir do bagaço de cana apresentou melhor eficiência para adsorver polifenol do que GAC feita a partir de vários outros produtos agrícolas (PENDYAL *et al.*, 1999). Adsorventes como carvão ativado feito das cinzas do bagaço mostraram resultados promissores na remoção de melanoidina (SIMARATANAMONGKOL & THIRAVETYAN, 2010).

O carvão ativado é um adsorvente muito utilizado para a remoção de poluentes orgânicos em água residual, mas o custo relativamente elevado limita a sua utilização. Descoloração de melanoidina sintéticas usando carvão ativado disponível comercialmente, assim como carvão ativado produzido a partir de bagaço de cana foi investigado por Bernardo *et al.* (1997). Em contraste, outros trabalhos relataram que a adsorção por carvão ativado foi ineficaz no tratamento de efluentes de destilaria (SEKAR & MURTHY, 1998; MANDAL *et al.*, 2003).

Neste trabalho optou-se por um método combinado de sorção após o biotratamento. Deste modo, um método combinado de biodegradação por fungos associado a um pós tratamento com bagaço de cana-de-açúcar poderia refletir em um resíduo final com menor carga orgânica, menor quantidade de macro e micronutrientes e também com coloração menos intensa ao final da combinação dos processos biológico e físico. Adicionalmente, o bagaço após sorção poderia ser matéria prima rica em nutrientes podendo ser empregado como fertilizante na agricultura não ficando apenas restrito a área de produção da usina de cana-de-açúcar.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

A amostra de vinhaça empregada neste estudo é proveniente da região de Araraquara, SP, da safra 2014/2015, e foi devidamente acondicionada em câmara fria a 4,0°C na UFF, apresentava originalmente o pH de 4,84.

Todos os materiais utilizados (inclusive a amostra) foram autoclavados para esterilização a 121,0°C/1 atm, durante 15,0 minutos, antes de iniciar o procedimento.

A vinhaça foi caracterizada quanto ao pH, condutividade elétrica, carbono orgânico total (COT), potássio, sódio, cálcio, magnésio, turbidez e Demanda Química de Oxigênio (DQO).

4.1 Determinação de Cálcio, Magnésio, Sódio e Potássio disponível

Os ensaios para determinação de nutrientes nas amostras de vinhaça foram executados conforme a metodologia descrita no Standard Methods for Examination of Water and Wastewater (APHA, 2012), empregando um espectrômetro de absorção atômica VARIAN/55 B para a determinação destes elementos. Os metais Cálcio, Magnésio, e Potássio foram escolhidos porque segundo a literatura são os elementos que estão presentes em maior quantidade na vinhaça (WADT, 2008).

Para determinação destas espécies foram construídas curvas analíticas de cada um dos elementos individualmente. Os padrões rastreáveis foram obtidos a partir da diluição de volumes adequados das soluções padrão de 1.000 mg.L⁻¹ da marca SpecSol/Quimlab. Os padrões analíticos foram preparados com água ultrapura obtida por Sistema de purificação Milli-q/Millipore modelo Direct-Q.

Para determinação de Ca²⁺ e Mg²⁺ foi necessário diluir 10,0 mL de solução de lantânio em 100,0 mL da amostra e do padrão. Para preparar a solução de lantânio dissolveu 58,65g de La₂O₃, em 250,0 mL de HCl concentrado em um balão volumétrico de 1,0 L e completou o mesmo com água ultrapura. Esse procedimento é para eliminar as interferências químicas.

A seguir, os padrões e as amostras de vinhaça foram então lidos no espectrômetro de absorção atômica nos comprimentos de onda específicos para os elementos: Ca em 422,7 nm, K em 766,5 nm, Na em 589,0 nm e Mg em 285,2 nm. Os

resultados de absorvância foram então substituídos nas equações das retas obtidas para as curvas analíticas individuais de cada elemento e as respectivas concentrações determinadas. Em alguns casos diluições apropriadas das amostras de vinhaça foram requeridas para a determinação de algumas espécies.

4.2 Determinação de carbono orgânico total (COT)

É possível encontrar quatro formas de expressão de carbono na natureza: carbono em sua forma elementar, tal qual carvão e grafite, carbono inorgânico (CI), que é definido como toda espécie de sais de carbonatos (CO_3^{-2} e bicarbonatos HCO_3^-), como dióxido de carbono (CO_2) dissolvido em água, e o carbono orgânico (CO), definido como todo átomo de carbono ligado covalentemente a uma molécula (SCHUMACHER, 2002).

Em amostras aquosas, a quantidade de carbono elementar é desprezível, e somente a quantidade de carbono orgânico e inorgânico é considerada. Somados constituem a totalidade de carbono presente em meio aquoso ou carbono total (CT). Geralmente, a denominação CT refere-se à soma das frações orgânica e inorgânica, uma vez que a quantidade de carbono elementar em amostras é insignificante (BISUTTI *et al.*, 2004). O carbono orgânico total (COT) é uma expressão que denomina toda a matéria orgânica presente em uma amostra aquosa (BISUTTI *et al.*, 2004).

No caso das amostras de vinhaça, espera-se uma alta concentração de carbono total (CT), sendo a maior fração deste parâmetro constituído por carbono orgânico (CO) e uma pequena parcela por carbono inorgânico (CI). Contudo, após os ensaios de biodegradação é esperada uma diminuição da quantidade de CO e eventualmente um aumento da concentração de CI, muito embora esse valor possa também diminuir após os processos de degradação. As observações mencionadas são verdadeiras desde que a degradação tenha sido completa sem a formação de espécies intermediárias.

O equipamento utilizado neste trabalho determinou a concentração de Carbono Orgânico Total (COT) pelo método indireto, combinando reações de

acidificação/oxidação e de oxidação por via térmica, empregando catalisador para análise de Carbono Inorgânico (CI) e Carbono Total (CT), respectivamente.

Para a determinação de Carbono Total (CT), a amostra injetada é carregada para um tubo de combustão contendo platina suportada em alumina a 680,0°C e sofre oxidação catalítica a CO₂. Para a determinação de Carbono Inorgânico (CI) a amostra injetada reage com o reagente (ácido fosfórico 25,0%), sendo que todo carbono inorgânico é convertido a CO₂ e detectado por absorção no infravermelho não dispersivo.

Para a determinação de CI e CT foram construídas curvas analíticas a partir dos padrões de hidrogenocarbonato de sódio e hidrogenoftalato de potássio, respectivamente (ambos Vetec). Os limites da curva analítica foram 0,00 – 1000 mg.L⁻¹.

Para a solução de hidrogenocarbonato de sódio pesou 3,50g do reagente previamente seco por 2 horas e 4,41g de carbonato de sódio previamente seco por uma hora a 290,0°C e esfriado no dessecador. Esses materiais foram transferidos para um balão volumétrico de 1,0L, adicionando-se água ultrapura até completar a marca, protegendo o recipiente com papel alumínio. A concentração de carbono dessa solução padrão foi de 1000µg/L.

Para a solução de hidrogenoftalato de potássio pesou 2,125g do reagente hidrogenoftalato de potássio previamente seco a 120,0°C por uma hora e esfriado no dessecador. O reagente foi transferido para um balão volumétrico de 1,0L, adicionando-se água ultrapura até completar a marca de 1,0L, protegendo a solução com papel alumínio. Ao final, obteve uma solução com concentração de 10.000 mg/L de carbono.

O equipamento de análise foi programado para a diluição automática dessa solução, de acordo com as concentrações requeridas para as curvas de calibração.

Uma vez determinadas as concentrações de CT e CI, o COT foi calculado utilizando-se a equação: $COT = CT - CI$. Para algumas amostras foi requerida a diluição da amostra de vinhaça em virtude da alta concentração de carbono orgânico.

Todos os ensaios de determinação de COT foram realizados utilizando-se um analisador de carbono TOC-L (SHIMADZU) e controlados por *software* TOC Control-V Shimadzu. O gás de arraste utilizado foi ar sintético, grau analítico 5.0 (White

Martins). Os dados foram analisados através *softwares* TOC Control-V Shimadzu, Origin (Microcal) e Microsoft Excel.

Para leitura no analisador foi utilizado aproximadamente 15 mL da amostra convenientemente diluídas.

4.3 Análise da Demanda Química de Oxigênio (DQO)

A carga orgânica da vinhaça foi determinada a partir da construção da curva analítica para a Demanda Química de Oxigênio, partindo-se de um padrão analítico de hidrogenoftalato de potássio (Vetec). O sal, de grau analítico, foi seco por 2 horas em estufa de aquecimento a 110°C e deixado para resfriamento em um dessecador. A seguir uma solução estoque de 10.000 mg.L⁻¹ de O₂ equivalente por litro de solução foi preparada em água deionizada, pesando-se aproximadamente 0,850 g de hidrogenoftalato de potássio, e a partir desta, sucessivas diluições foram efetuadas para construção da curva analítica.

Para a construção da curva de DQO alta as seguintes concentrações de oxigênio equivalente para o padrão de hidrogenoftalato de potássio foram utilizadas: 0,0 mg.L⁻¹; 100,0 mg.L⁻¹; 250,0 mg.L⁻¹; 500,0 mg.L⁻¹; 1.000,0 mg.L⁻¹; 1.500,0 mg.L⁻¹ de DQO. A Solução de Digestão para DQO de faixa alta (100 a 1500 mg.L⁻¹) foi preparada pesando-se 9,9 g de sulfato de prata (Ag₂SO₄ – Vetec), o reagente foi transferido para um béquer de vidro de capacidade de 2,0 L, onde foi preparada a solução digestora. Adicionou-se 50,0 mL de água deionizada e sob agitação e com resfriamento externo, adicionou-se aos poucos 830,0 mL de ácido sulfúrico (Vetec) concentrado. A etapa seguinte da preparação da solução digestora, consistiu em pesar 10,216 g de dicromato de potássio (K₂Cr₂O₇ – Vetec), previamente seco a 150,0°C por 2 horas. Dissolveu-se o dicromato de potássio em 50,0 mL de água deionizada. A dissolução do sal foi realizada com um pouco de aquecimento. Transferiu-se a solução de dicromato para o béquer contendo a mistura de ácido sulfúrico, sulfato de prata e água. Essa transferência foi feita lentamente, com auxílio de bastão de vidro e banho de gelo. Para uma total transferência do reagente, adicionaram-se 70,0 mL de água deionizada que foram

novamente transferidos para um béquer. A solução foi deixada sob agitação e em banho de gelo até completar seu resfriamento. Transferiu-se para frasco âmbar de 1000 mL. Em cada tubo de digestão adicionou-se aproximadamente 0,1 g de sulfato de mercúrio. A Solução de Digestão para DQO de faixa baixa (0 - 150 mg.L⁻¹) foi preparada utilizando-se o mesmo procedimento da solução faixa alta, pesando-se exatamente 1,022 g de dicromato de potássio. Para a construção da curva de DQO baixa foram empregados os seguintes padrões: 0,0 mg.L⁻¹; 5,0 mg.L⁻¹; 25,0 mg.L⁻¹; 50,0 mg.L⁻¹; 100,0 mg.L⁻¹; 150,0 mg.L⁻¹ de DQO (O₂ em mg.L⁻¹).

Foram adicionados 3,0 mL da solução digestora e sulfato de mercúrio sólido aos padrões de hidrogenoftalato de potássio, que variavam de acordo com a curva analítica construída. Uma análise em branco foi também realizada sem a presença do padrão de hidrogenoftalato de potássio, sendo esta conduzida apenas com água deionizada e com os reagentes, a fim de determinar o 0,0 mg.L⁻¹ de concentração de DQO. Após a adição da solução digestora aos padrões de hidrogenoftalato de potássio e ao branco estes foram submetidos à digestão em um bloco digestor para DQO Thermo Digest Policontrol em sistema de tubos fechados por 2 horas a 150°C. Após a digestão e resfriamento procedeu-se a análise espectrofotométrica dos padrões e do branco realizando-se uma varredura na região compreendida entre 190 e 900 nm, porém, fixando-se a leitura da banda de absorção relativa ao dicromato de potássio em 440 nm, para análise da curva de DQO baixa, e em 600 nm para análise da curva de DQO alta. O branco utilizado na análise espectrofotométrica foi água ultra pura. O intuito da análise é observar a banda de absorção do K₂Cr₂O₇ em 440 nm que é referente ao consumo deste reagente proporcionalmente à concentração dos padrões para a reação de oxidação química e o aumento da concentração de Cr³⁺ em 600 nm que é produzido após redução do dicromato e mais evidenciado para altas concentrações de DQO.

O procedimento previamente descrito também foi realizado para amostras de vinhaça afim de estabelecer a concentração equivalente de O₂. L⁻¹, proporcional a carga orgânica desta espécie, para curva de DQO alta. Após os processos de biodegradação e adsorção, foram feitas também as análises de DQO, para isso foram utilizados 3,0 mL da solução digestora alta, 2,0 mL da amostra bruta, após a biodegradação e após a

adsorção e uma ponta de espátula de sulfato de mercúrio. Após a homogeneização, procedeu-se da mesma maneira o método de digestão das amostras de vinhaça similarmente aos padrões. A DQO da vinhaça inicial pôde ser comparada à concentração obtida após as reações de biodegradação e após a adsorção com intuito de estabelecer a eficiência do processo de degradação.

4.4 Obtenção do fungo

A amostra de vinhaça foi deixada em temperatura ambiente destampada no laboratório de Química Analítica e Ambiental no ICEX/UFF para que microrganismos presente no ambiente pudessem colonizá-la. Inicialmente foi feita a coleta e repicagem dos fungos que se desenvolveram naturalmente no meio e o material foi enviado para a Fundação Andre Tosello para isolamento e identificação destas espécies por taxonomia convencional. A identificação dos fungos foi baseada na análise comparativa de características diferenciais de morfologia, fisiologia e metabolismo bioquímico da linhagem desconhecida com dados das espécies de referência descritas na literatura.

Para produzir 1,00L de meio de cultura foi utilizado 200,00 g de batatas cruas, 20,00g de dextrose, 20,00g de Agar e 1,00L de água destilada. Para outros volumes - menores ou maiores, basta preparar os ingredientes proporcionalmente. As batatas foram lavadas e escovadas, retirando todos os resíduos de terra. Em seguida cortadas em fatias finas sem retirar as cascas e fervidas em 0,50 L de água destilada. Filtrou-se o líquido reservando-o e descartou as batatas cozidas. Adicionou ao filtrado a dextrose, o Agar e acertou o volume final para 1,0 L com água destilada. Após esse procedimento o meio foi esterelizado em autoclave. Para o meio BD(batata e dextrose) não utilizou o Agar.

Em Bancada de Fluxo laminar (Pachane - 420) o meio BDA (Batata, Dextrose e Agar) foi vertido em placas de Petri e após o resfriamento os fungos coletados foram aplicados no centro das placas para acompanhar o crescimento dos microrganismos. As placas foram lacradas com Parafilm e mantidas em incubadora B.O.D. (SL 200/334) durante 7 dias para crescimento de massa micelial.

Após o crescimento foram feitos discos de 1,0 cm de diâmetro contendo micélio e esporos. Esses discos foram aplicados no centro das placas e novamente as placas foram lacradas com Parafilm e mantidas em incubadora B.O.D. (SL 200/334) durante 7 dias para crescimento de massa micelial. Após 7 dias foi adicionado 10,0 mL de água destilada sobre a placa de Petri contendo a cultura. Com o auxílio de uma alça de Drigalski estéril de vidro foi feito um esfregão e a suspensão contendo esporos foi vertida para um béquer de 20,0 mL.

A primeira concentração estabelecida foi à vinhaça pura (100%), depois essa concentração foi diluída com água destilada pela metade (50%), e optou-se por fazer uma concentração ainda mais diluída, estabelecendo $\frac{1}{4}$ da vinhaça pura (25%). O meio BD (batata e dextrose), sem vinhaça (0%) e sem Agar foi empregado como controle. Optou-se pelo cultivo líquido e submerso porque, ao contrário do meio sólido, é apropriado para favorecer a extração de substâncias tanto do líquido quanto do próprio micélio.

A suspensão de esporos, foi levada ao microscópio óptico (bel photonics - modelo XJS304/Marca Kozo) e na câmara de Neubauer (Fuchs Rosenthal Dupla) verificou-se a concentração. Optou-se por colocar 1,00 mL de solução de esporos, cuja concentração era de 10^6 em 30,0 mL da amostra de vinhaça autoclavada, sem correção de pH, em erlenmeyer de 125 mL. Os frascos continham 3 concentrações diferentes de vinhaça (25, 50 e vinhaça pura), sendo o meio BD (batata e dextrose) sem vinhaça (0%) empregado como controle. Os frascos foram acondicionados em incubadora com agitação orbital (Tecnal 421) a 150 RPM (ou 15625 G), a $30 \pm 2,0^\circ\text{C}$, no escuro, com coleta em tempo pré-estabelecido para verificação de resultados parciais.

Os testes foram feitos avaliando o crescimento de massa micelial e a redução de parâmetros tais como pH, turbidez, condutividade, carga orgânica, cor, COT e composição química, sendo realizados em triplicata. Os resultados são apresentados como valores médios.

Após o ensaio de biodegradação as amostras de vinhaça com massa micelial foram centrifugadas por 20 minutos para decantar a massa micelial que estava na amostra. O decantado foi transferido para cadinhos de alumínio e secos para

quantificação do crescimento da massa micelial e as análises químicas foram conduzidas no sobrenadante.

4.5 Ensaio de Biodegradação

As amostras obtidas ao longo do processo de tratamento da vinhaça foram inicialmente centrifugadas a 3500 RPM (ou 2401 G) em centrífuga refrigerada (Cientec CT- 6000 R) por 20 minutos, e os sobrenadantes foram transferidos para tubos Falcon de 50,0 mL. A biomassa precipitada foi acondicionada em cadinhos de alumínio e posteriormente verificadas quanto ao seu peso seco em estufa (Tecnal – 394/1) com circulação e renovação de ar a 105,0°C por 24 horas. No sobrenadante foram determinados os parâmetros: pH, turbidez, condutividade, carga orgânica, cor, TOC e composição química, sendo realizados em triplicata.

A degradação da vinhaça foi acompanhada por meio da técnica espectrofotométrica na região do UV-Vis - Spectro 3000 W (Marte), na região de 190 a 900 nm, em cubeta de quartzo de caminho óptico de 1 cm, para avaliação de remoção de cor, sendo as medidas de absorvância obtidas em 605nm. Para todas as medidas a análise do branco (água ultrapura) foi efetuada previamente à análise das amostras.

As análises turbidimétricas para verificar variação na turbidez foram efetuadas em um turbidímetro (MS Tecnoyon Versão 4.0), após prévia calibração do instrumento com padrões de formazina.

As análises de pH foram realizadas em um pHmetro (Tecnoyon, modelo mPa210), acoplado a um eletrodo de vidro combinado após prévia calibração do eletrodo.

As análises de condutometria foram executadas em um condutivímetro (MS Tecnoyon versão 6.2) equipado com célula condutométrica (K= 1,00).

A redução de carga orgânica foi acompanhada pela remoção da Demanda Química de Oxigênio (DQO) empregando dicromato de potássio como agente oxidante.

4.6 Ensaio de sorção no bagaço de cana-de-açúcar

O bagaço de cana-de-açúcar utilizado foi adquirido no comércio local de Volta Redonda de vendedores de caldo de cana. Após a coleta do material, parte do mesmo foi seco em estufa (Tecnal – 394/1) com circulação e renovação de ar a 105,0°C por 24 horas. A seguir, tanto o bagaço seco como o úmido (coletado no mesmo dia) foi triturado antes de seu uso nos experimentos em moinho de facas.

Foram pesados aproximadamente 6,0 g de bagaço (úmido e/ou seco) e colocados em erlenmeyer com 100,0 ml da vinhaça após a biodegradação e deixados em incubadora com agitação orbital (Tecnal 421) a 150 RPM (ou 15625 G), com temperatura constante de 30,0°C. O processo de sorção teve duração de 7 dias. Após esse período a vinhaça foi filtrada em peneira com malha 10 (abertura de 2,00 mm).

O sobrenadante foi separado do bagaço para análise da eficiência do processo de sorção, investigando-se os parâmetros: pH, condutividade elétrica, Carbono Orgânico Total (COT), Potássio, Sódio, Cálcio, Magnésio, Turbidez e Demanda Química de Oxigênio (DQO).

O bagaço separado foi adicionado a 100,0 ml de água em um erlenmeyer e este foi deixado sob agitação e temperatura constante de 30,0°C por 3 dias para dessorção. Novamente os parâmetros anteriormente mencionados foram analisados após processo de dessorção do bagaço.

comparados aos encontrados para a amostra bruta e com os resultados delinear o caminho para os estudos posteriores. Os resultados encontrados para este ensaio são apresentados a seguir.

O primeiro parâmetro avaliado foi o crescimento micelial na amostra de vinhaça coletada na safra de 2014, sendo este um resultado importante a ser correlacionado posteriormente com a eficiência obtida na biodegradação. Os resultados de crescimento de massa micelial dos fungos *Aspergillus niger* e *Rhizopus arrhizus* em vinhaça são apresentados na Tabela 1 a seguir.

Tabela 1: Crescimento de massa micelial obtido para a degradação da vinhaça em 3 concentrações diferentes (25, 50 e 100%) e meio controle, submetidas ao tratamento com os fungos *Aspergillus niger* e *Rhizopus arrhizus*, durante 28 dias de incubação, sem ajustar pH, com amostra autoclavada e crescimento com agitação a 30,0°C.

Concentração de vinhaça (%)	Massa Micelial (mg.L ⁻¹)			
	7 dias	14 dias	21 dias	28 dias
0*	0,39 ± 0,05	0,40 ± 0,19	0,35 ± 0,01	0,36 ± 0,02
25	0,37 ± 0,03	0,63 ± 0,00	0,67 ± 0,01	0,63 ± 0,00
50	0,36 ± 0,01	0,47 ± 0,00	0,48 ± 0,02	0,45 ± 0,01
100	0,35 ± 0,04	0,46 ± 0,01	0,45 ± 0,00	0,44 ± 0,02

Os valores apresentados na tabela são referentes à média e ao desvio padrão (±) das triplicatas.

*meio controle - sem vinhaça (batata e dextrose).

Observa-se um crescimento de massa micelial nos primeiros 14 dias para todas as concentrações de vinhaça ensaiadas, o que demonstra que neste período os microrganismos estavam adaptando seu metabolismo ao meio, e fazendo uso dos nutrientes disponíveis na vinhaça. Nota-se que o emprego de vinhaça pura e diluída a 50,0% apresentou resultados similares. Porém, em vinhaça mais diluída houve um crescimento superior. O que pode ter ocorrido em meios mais concentrados seria a presença ou a formação de espécies tóxicas em maior quantidade que limitariam o

crescimento dos fungos. Observa-se um aumento gradual do crescimento de massa micelial até o 14º dia, porém nenhum crescimento pronunciado foi verificado após esse período, que pode também ter sido ocasionado em função do esgotamento de nutrientes necessários para o crescimento de massa micelial.

Os resultados também podem ser observados na figura a seguir.

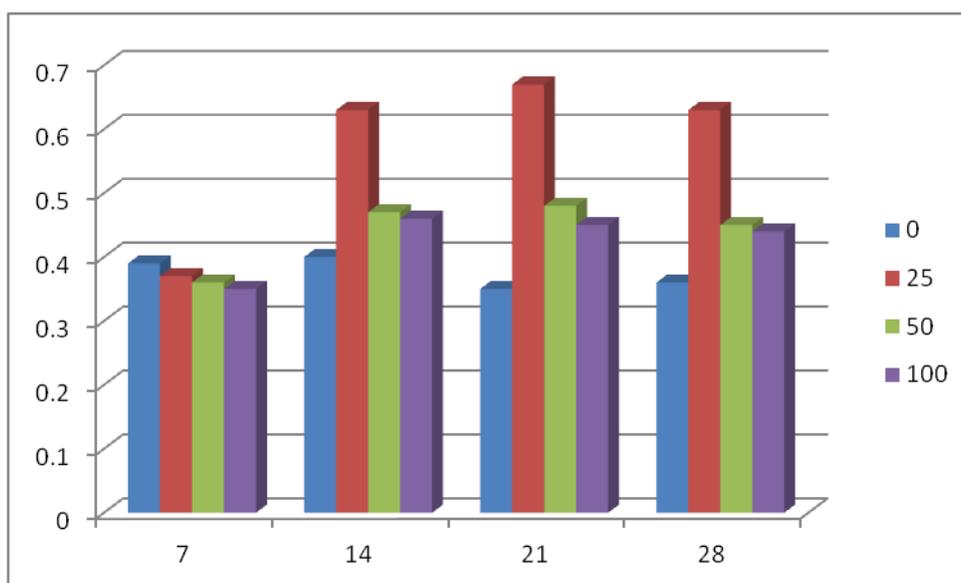


Figura 4: Crescimento de massa micelial obtido para a degradação da vinhaça em 3 concentração diferentes (25, 50 e 100%) e meio controle, submetidas ao tratamento com os fungos *Aspergillus niger* e *Rhizopus arrhizus*, durante 28 dias de incubação, sem ajustar pH, com amostra autoclavada e crescimento com agitação a 30,0°C.

5.1.1 Acompanhamento da remoção de cor

Associado a eficiência do biotratamento e ao crescimento da massa micelial um parâmetro importante a ser investigado neste trabalho foi à remoção de cor. Efluentes altamente coloridos, como é o caso da vinhaça, possuem uma relação direta com a presença de espécies orgânicas e também inorgânicas, que em muitos casos podem ser nocivas ao ecossistema. Deste modo, foi avaliada a remoção de cor através do biotratamento da vinhaça com *Aspergillus niger* e *Rhizopus arrhizus*, com leitura em 605 nm, e os resultados são apresentados na Tabela 2.

Tabela 2: Avaliação da cor obtido para a degradação da vinhaça em 3 concentração diferentes (25, 50 e 100%) e meio controle, submetidas ao tratamento com os fungos *Aspergillus niger* e *Rhizopus arrhizus*, durante 28 dias de incubação, sem ajustar pH, com amostra autoclavada e crescimento com agitação a 30,0°C. Todas as amostras foram convenientemente diluídas a ¼ para leitura no espectrofotômetro.

Concentração de vinhaça	Absorbância				
	0 dias	7 dias	14 dias	21 dias	28 dias
0*	0,05±0,00	0,09±0,00	0,13±0,00	0,09±0,00	0,09±0,00
25	0,23±0,00	0,22±0,01	0,21±0,01	0,21±0,01	0,21±0,01
50	0,45±0,00	0,53±0,01	0,56±0,00	0,57±0,00	0,57±0,00
100	0,74±0,00	0,59±0,00	0,59±0,00	0,55±0,01	0,55±0,00

Os valores apresentados na tabela são referentes à média e ao desvio padrão (\pm) das triplicatas.

*meio controle - sem vinhaça (batata e dextrose).

Como pode ser observado na Tabela 2, não houve alteração na cor para a concentração 25% de vinhaça ao longo dos 28 dias. Para a concentração de 50% de vinhaça após 14 dias a cor aumentou mantendo-se praticamente constante após esse período, o que pode estar associado à transformação das espécies químicas iniciais em espécies com maior absorção ou pela transformação parcial de cromóforos.

Em trabalho empregando fungos Strong e Burgess (2008) monitoraram a produção de lacase por *Trametes pubescens* em água residuárias da produção de vinho. Embora o tratamento com lacase tenha reduzido compostos fenólicos em até 61 % a cor aumentou até 160 %, indicando a formação de compostos intermediários altamente coloridos. Neste caso, o tratamento enzimático reduziu o teor de fenóis mas não melhorou a cor das águas residuais, havendo inclusive aumento da mesma. O mesmo pode ter ocorrido nesse ensaio, sendo necessário posteriormente investigar quais seriam essas espécies capazes de modificar a cor na vinhaça tratada.

Somente para a vinhaça pura foi constatada uma redução maior na cor nos primeiros sete dias, com remoção de cor de 20,3%, que pode ter ocorrido devido à degradação/assimilação de frações de melanoidina ou outras substâncias coloridas pelos

micélios dos microrganismos. Segundo Salgado *et al.*(2016) a descoloração pode ser devido à redução de polifenóis que causam a cor escura desse resíduo. Essa conclusão corrobora com o trabalho de Strong e Burgess (2008) no sentido do consumo de compostos fenólicos pelos fungos empregados, sendo portanto necessária uma investigação posterior da concentração destas substâncias para a conclusão da ação do consórcio de fungos empregados neste trabalho com vinhaça.

Após os processos de biodegradação, foram realizadas também as análises de DQO para verificar a eficiência do processo de degradação da vinhaça relacionando-o com a redução da carga orgânica. Os resultados são explanados a seguir.

5.1.2 Acompanhamento da remoção de DQO

A Demanda Química de Oxigênio é um parâmetro que mede principalmente a quantidade de matéria orgânica que é suscetível à oxidação por meios químicos. A DQO é expressa em quantidade de oxigênio equivalente, produzido após consumo do reagente oxidante empregado na reação, em mg de O₂ por litro de solução. A reação é realizada em condições controladas e o reagente oxidante empregado é o dicromato (K₂Cr₂O₇) que é reduzido a Cr⁺³ gerando uma quantidade de O₂ na reação, mensurado em mg.L⁻¹, como acima mencionado. Essa reação é citada nos procedimentos técnicos do Standard Methods (APHA, 2012). Ambos componentes orgânicos e inorgânicos presentes em uma amostra estão sujeitos à oxidação, mas na maioria dos casos, os componentes orgânicos são predominantes e os de maior interesse também.

Neste método o Cr⁶⁺ proveniente do K₂Cr₂O₇ é reduzido a Cr³⁺, e esta reação, que ocorre em consequência da oxidação da matéria orgânica, fica bem evidenciada no espectro de absorção, pois a banda do dicromato na região de 400 nm decai, enquanto que a banda do Cr³⁺ aumenta na região de 600 nm. O íon dicromato oxida a carga orgânica na amostra quando esta é digerida, levando preferencialmente a formação de CO₂ e H₂O. Como consequência, há mudança do crômio do estado hexavalente (VI) para o estado trivalente (III), pois se trata de uma reação de óxido-redução. O íon dicromato (Cr₂O₇²⁻) absorve fortemente na região de 440 nm e o íon Cr³⁺ absorve

fortemente na região de 600 nm. Ambas são coloridas e absorvidas fortemente na região visível do espectro de absorção, sendo possível o acompanhamento destas transformações por absorção molecular na região do ultravioleta-visível (UV-Vis) (APHA, 2012).

A carga orgânica da vinhaça foi determinada a partir da construção da curva analítica para a Demanda Química de Oxigênio (DQO), partindo-se do padrão analítico de hidrogenoftalato de potássio. Para determinação da DQO da vinhaça empregou-se a curva analítica para DQO alta, ou seja, de 0,0 a 1.500,0 mg de O₂ por litro de solução. Desta forma, procedeu-se a análise dos padrões de hidrogenoftalato de potássio e a construção das respectivas curvas analíticas que são apresentadas nas Figuras 6 e 8. Para efeito de elucidação, nas Figuras 5 e 7 são também apresentados os respectivos espectros de absorção obtidos para as curvas de DQO alta e DQO baixa.

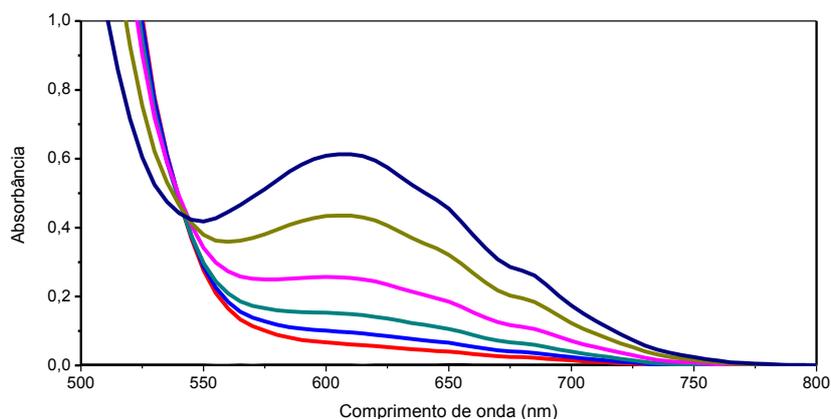


Figura 5: Espectros de absorção obtidos após 2 horas de digestão em refluxo fechado para DQO alta: 0,0 mg.mL⁻¹; 100,0 mg.mL⁻¹; 250,0 mg.mL⁻¹; 500,0 mg.mL⁻¹; 1000,0 mg.mL⁻¹; 1500,0 mg.mL⁻¹. Padrão de hidrogenoftalato de potássio.

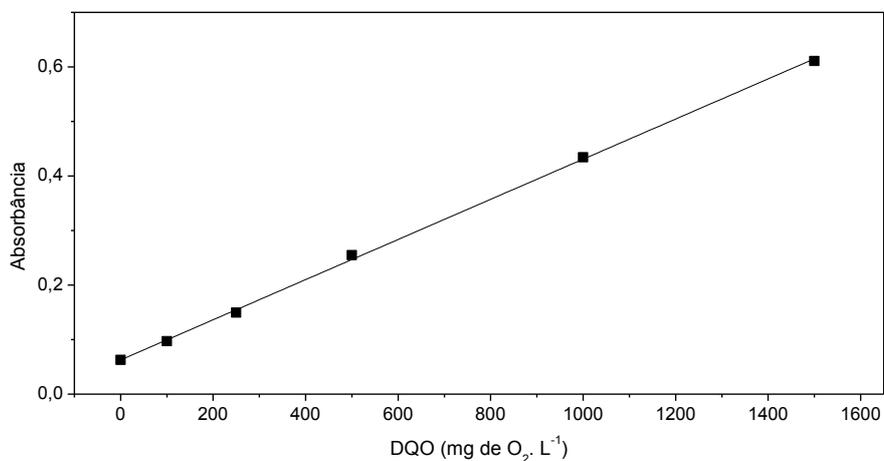


Figura 6: Curva analítica para DQO alta obtida após 2 horas de digestão em refluxo fechado. Comprimento de onda máximo empregado nas medidas de 600 nm. Faixa de concentração investigada de 0,0 a 1500,0 mg de O₂ por litro de solução. Padrão de hidrogenoftalato de potássio.

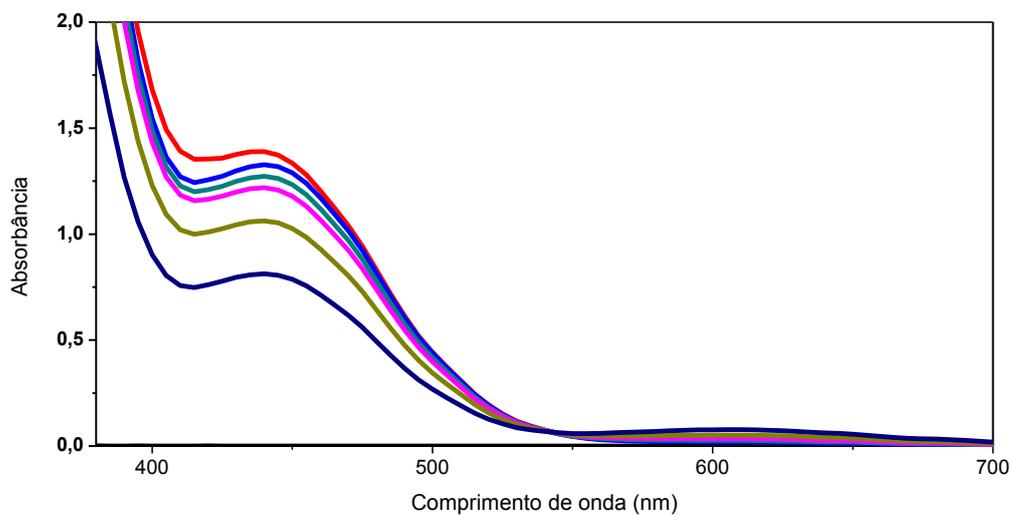


Figura 7: Espectros de absorção obtidos após 2 horas de digestão em refluxo fechado para DQO baixa (0,0 mg.mL⁻¹; 5,0 mg.mL⁻¹; 25,0 mg.mL⁻¹; 50,0 mg.mL⁻¹; 100,0 mg.mL⁻¹; 150,0 mg.mL⁻¹). Padrão de hidrogenoftalato de potássio.

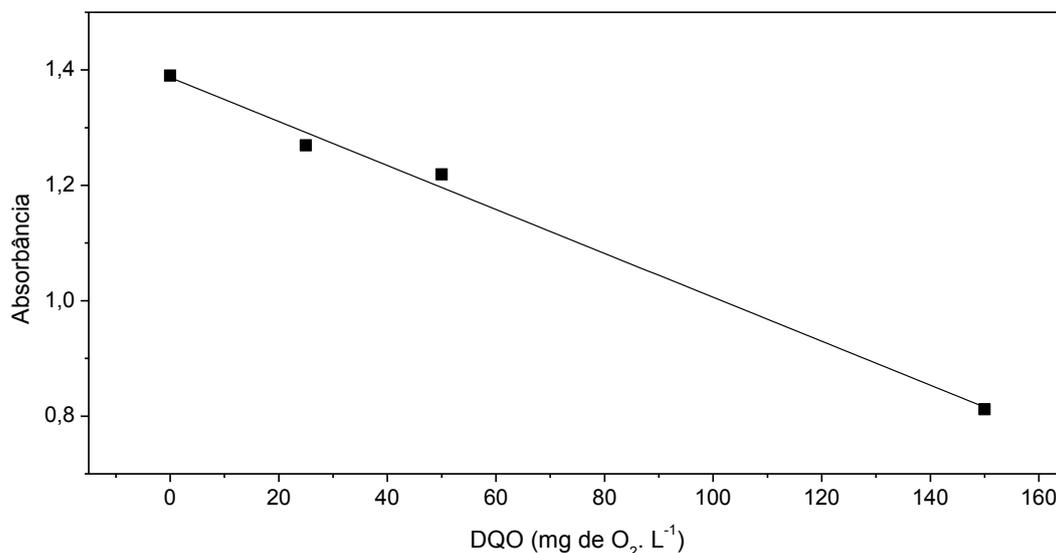


Figura 8: Curva analítica para DQO baixa obtida após 2 horas de digestão em refluxo fechado. Comprimento de onda máximo empregado nas medidas de 440 nm. Faixa de concentração investigada de 0,0 a 150,0 mg de O₂ por litro de solução. Padrão de hidrogenoftalato de potássio.

Analisando as curvas analíticas obtidas nas Figuras 6 e 8 é possível perceber uma relação linear obtida para as faixas de DQO alta e DQO baixa. Na construção da curva de DQO alta observa-se o aumento da banda de absorção em 600 nm, o que era esperado, referente à geração de Cr³⁺ em solução, que aumenta proporcionalmente ao aumento do padrão de hidrogenoftalato de potássio que reage com o dicromato de potássio do meio, como observado no espectro de absorção da Figura 5. A esta reação é atribuída uma quantidade proporcional de O₂ produzido em solução, mensurado em mg.L⁻¹, e chamado de Demanda Química de Oxigênio (DQO).

De forma semelhante, analisando-se a curva de DQO baixa percebe-se o consumo de Cr₂O₇²⁻ do meio através da diminuição da amplitude da banda de absorção medida em 440 nm, efeito este produzido devido à redução do crômio hexavalente a crômio trivalente, como pode ser observado na Figura 7.

As Figuras 6 e 8 exibem, portanto, uma relação linear para a DQO alta e baixa e a partir delas obteve-se as equações das curvas analíticas a partir da regressão linear, como pode ser observado na Tabela 7.

Tabela 3: Resultados obtidos a partir das curvas analíticas de DQO alta e DQO baixa.

Faixa	λ_{\max} (nm)	Equação da curva	R^2	Faixa de Linearidade
DQO Alta	600	$A = 0,06276 + 3,68 \times 10^{-4} \text{DQO}$	0,9993	0 a 1500 mg de $\text{O}_2 \text{L}^{-1}$
DQO Baixa	440	$A = 1,38677 - 3,81 \times 10^{-3} \text{DQO}$	0,9918	0 a 150 mg de $\text{O}_2 \text{L}^{-1}$

A = Absorbância; DQO = Demanda Química de Oxigênio (mg de $\text{O}_2 \cdot \text{L}^{-1}$); R^2 = Coeficiente de Correlação Linear; λ_{\max} = Comprimento de onda máximo da leitura.

A investigação da DQO das amostras de vinhaça foi efetuada a partir da análise espectrofotométrica em 605 nm, através da substituição do valor de absorbância na equação da curva de DQO alta apresentada na Tabela 3. Após a etapa dos tratamentos as soluções foram analisadas empregando a curva de DQO alta, em virtude de ainda permanecer uma alta concentração de carga orgânica, mesmo após a biotratamento.

Os cálculos de percentuais de remoção foram realizados empregando a equação 1.

$$\% \text{ remoção} = \left(1 - \frac{\text{medida final}}{\text{medida inicial}} \right) \times 100 \quad (1)$$

Sendo que 1 corresponde à divisão do valor da medida inicial por ele mesmo, e é a medida da absoluta do valor inicial.

A remoção de carga orgânica é um parâmetro decisivo para a qualidade de um efluente industrial. O excesso de carga orgânica descartado em rios e solos pode comprometer o ecossistema no qual este efluente é descartado. Deste modo, para verificar a eficiência do processo foi realizado o acompanhamento da remoção de DQO

das amostras submetidas ao tratamento de biodegradação e os resultados são apresentados na Tabela 4 a seguir.

Tabela 4: Avaliação da carga orgânica (DQO) obtido para a degradação da vinhaça em 3 concentrações diferentes (25, 50 e 100%) e meio controle, submetidas ao tratamento com os fungos *Aspergillus niger* e *Rhizopus arrhizus*, durante 28 dias de incubação, sem ajustar pH, com amostra autoclavada e crescimento com agitação a 30,0°C.

Concentração de vinhaça	DQO mg O ₂ .L ⁻¹				
	0 dias	7 dias	14 dias	21 dias	28 dias
0	5.943,00±0,00	7.981,00±0,04	7.670,00±0,01	7.543,00±0,00	7.981,00±0,01
25	9.340,33±0,00	5.943,00±0,09	7.242,00±0,1	7.302,00±0,06	7.943,00±0,01
50	16.813,00±0,00	13.416,00±0,03	13.65,00±0,37	18.851,00±0,29	18.307,00±0,03
100	39.984,00±0,00	20.038,00±0,02	26.288,00±0,36	26.114,00±0,14	26.588,00±0,02

Os valores apresentados na tabela são referentes à média e ao desvio padrão (±) das triplicatas.
*meio controle - sem vinhaça (batata e dextrose).

A análise da Tabela 4 demonstrou que em todas as concentrações ensaiadas houve redução da carga orgânica nos primeiros 7 dias, alcançando 49,9% de remoção de DQO para os ensaios com vinhaça pura após 7 dias de tratamento. Os resultados apontam ainda que os valores não apresentam melhora da eficiência do processo após esse período, pois a carga orgânica do meio passa a aumentar a partir do 14º dia, mantendo a ordem dos valores após o 21º dia. Neste caso, o aumento da carga orgânica pode estar associado ao aumento do número de espécies dos microrganismos, pois estes contribuiriam também na análise de DQO, já que não são completamente removidos do meio por centrifugação. Desta forma, ficou constatado que o tempo ótimo de degradação era em torno de sete dias, diante dos parâmetros de remoção de carga orgânica. O resultado para remoção de carga orgânica obtido para os ensaios com vinhaça pura corroboram com os ensaios de remoção de cor, estabelecendo-se a condição de que o aumento da massa micelial não é necessariamente um indicativo da eficiência do processo, pois este foi mais expressivo para a vinhaça diluída a 25%. Contudo, outras avaliações são necessárias para a conclusão desta hipótese.

5.2 Aprimoramento dos Ensaio de Biodegradação

Com o objetivo de aprimorar o processo de biodegradação optou-se por investigar outras condições que pudessem contribuir para o crescimento micelial e, eventualmente para a degradação da vinhaça. Portanto, alguns parâmetros foram variados na incubação dos fungos, como o crescimento com e sem agitação, com variação de temperatura - fixados em 30,0°C e 40,0°C, suplementando ou não o meio (adição de dextrose 20 g.L⁻¹) e ajustando o pH da solução, fixando em 5,5 e 6,0 com auxílio de NaOH 6,0 mol.L⁻¹. Todos os experimentos foram conduzidos por um período de 7 dias e realizados em triplicata. Os resultados são apresentados nas Tabelas abaixo.

Tabela 5: Crescimento de massa micelial obtido para a degradação da vinhaça 100%, submetidas ao tratamento com os fungos *Aspergillus niger* e *Rhizopus arrhizus*, após 7 dias de incubação, sem ajustar pH, com amostra autoclavada e crescimento a 30,0°C.

Suplementação de nutrientes	Massa micelial (mg.L ⁻¹)	
	Com agitação	Sem agitação
Com dextrose	0,80 ± 0,10	0,58 ± 0,03
Sem dextrose	0,59 ± 0,01	0,44 ± 0,00

Os valores apresentados na tabela são referentes à média e ao desvio padrão (±) das triplicatas.

Observa-se na Tabela 5 que quando o meio é suplementado com dextrose ocorre um aumento do crescimento micelial, devido a maior quantidade de nutrientes disponíveis no meio, o que era esperado, pois embora a vinhaça seja um meio rico em carga orgânica e inorgânica, eventualmente condições especiais podem ser requeridas para o crescimento específico de uma determinada espécie e, em alguns casos, a matéria orgânica da vinhaça pode não ser biodegradável.

Outro detalhe importante é que a agitação influencia no crescimento do fungo, pois valores maiores de massa micelial são obtidos para os ensaios conduzidos sob

agitação, mesmo sem suplementação de nutrientes. Acredita-se que seja devido à oxigenação do meio, uma vez que os fungos empregados são aeróbios, contribuindo, portanto, para aumento da população destes microrganismos (CHEHRI, 2013). Outra possibilidade é um maior transporte de massa decorrente da agitação permanente do meio.

A seguir investigou-se o efeito do controle do pH para o crescimento do fungo nos ensaios de biodegradação da vinhaça pura. Os resultados obtidos são demonstrados na Tabela 6.

Tabela 6: Crescimento de massa micelial obtido para a degradação da vinhaça 100%, submetidas ao tratamento com os fungos *Aspergillus niger* e *Rhizopus arrhizus*, após 7 dias de incubação, com variações de pH, com amostra autoclavada, crescimento a 30,0°C e sem suplementar o meio.

pH	Massa micelial (mg.L ⁻¹)	
	Com agitação	Sem agitação
4,84*	0,59 ± 0,01	0,44 ± 0,00
5,50	0,45 ± 0,00	0,43 ± 0,02
6,50	0,31 ± 0,02	0,26 ± 0,01

Os valores apresentados na tabela são referentes à média e ao desvio padrão (±) das triplicatas.

*pH natural da vinhaça (sem ajuste)

Os resultados da Tabela 6 reportam um aumento do crescimento de massa micelial em meio ácido e sob agitação (pH 4,84). Segundo a literatura, os fungos normalmente crescem melhor em ambientes em que o pH é próximo a 5,0 em uma faixa em torno de 30,0°C (SCHUSTER *et al.*, 2002; SAMSON *et al.*, 2004;. GAUTAM *et al.*, 2010). O pH natural da vinhaça pode variar de 4,0 a 5,0, sendo este um ótimo resultado para o tratamento deste efluente em suas condições naturais. A vinhaça empregada neste estudo apresentava originalmente o pH de 4,84.

A próxima etapa do trabalho foi verificar a temperatura na qual ocorre o aumento da população de fungos, acompanhando os valores de massa micelial. Os

ensaios foram conduzidos sob temperatura de 30,0 e 40,0°C e são apresentados a seguir na Tabela 7.

Tabela 7: Crescimento de massa micelial obtido para a degradação da vinhaça 100%, submetidas ao tratamento com os fungos *Aspergillus niger* e *Rhizopus arrhizus*, após 7 dias de incubação, sem corrigir pH, com amostra autoclavada, crescimento com variações de temperatura e sem suplementar o meio.

Temperatura	Massa micelial (mg.L ⁻¹)	
	Com agitação	Sem agitação
40,0°C	0,37 ± 0,00	0,32 ± 0,07
30,0°C	0,59 ± 0,01	0,44 ± 0,00

Os valores apresentados na tabela são referentes à média e ao desvio padrão (±) das triplicatas.

Como pode ser observado o maior crescimento de massa micelial foi obtido em temperaturas de 30,0°C, com aumento da proporção do crescimento micelial sob agitação. Portanto, os resultados encontrados para o crescimento do fungo a temperatura de 30,0°C e sem ajuste de pH apresentam-se promissores para aplicações sob condições naturais e sob agitação.

Desta forma, após a análise desses resultados optou-se por trabalhar com parâmetros fixos. Os ensaios seguintes foram executados sob agitação por causa da oxigenação do meio, a temperatura 30,0°C, sem adição de dextrose e sem ajuste do pH do meio. Embora em meio com dextrose o crescimento micelial seja maior, optou-se por trabalhar com meio não suplementado porque como constatado na Tabela 5 o fungo cresce naturalmente na vinhaça pura. Uma suplementação acarretaria em um aumento de material adicionado ao efluente.

Öngen *et al.* (2007) relataram a necessidade de complementar águas residuais da produção de azeite com nutrientes, como extrato de levedura e sais minerais, para melhorar o crescimento microbiano, porém, o mesmo autor concluiu que a utilização da vinhaça pode substituir a necessidade de suplementação com outras fontes de nutrientes,

reduzindo o custo de processo. Desta maneira, as condições estabelecidas para os próximos ensaios implicariam em assumir as características naturais do meio.

Portanto, os novos ensaios foram conduzidos exatamente como os primeiros experimentos reportados na tabela 1, só que em menor tempo, já que a análise da Tabela 1 indicou que os melhores resultados eram estabelecidos ao redor de 7 dias. Assumindo essa condição, procurou-se investigar a biodegradação da vinhaça em períodos menores de tempo com intuito de minimizar a duração dos experimentos e potencializar o trabalho.

Para ensaios de degradação de efluentes industriais é de extrema importância o acompanhamento de alguns parâmetros inerentes ao processo. Para a degradação da vinhaça foram conduzidos os ensaios para verificar a remoção de carga orgânica a partir da DQO da amostra bruta e da amostra de vinhaça biotratada, além de acompanhar também os valores de remoção de cor, de turbidez, de condutividade e alterações no pH do meio. Estes parâmetros foram medidos no início dos experimentos de degradação com os microrganismos e ao final do tratamento.

Averiguado que a maior quantidade de fungo se reproduzia ao longo de 7 dias, um experimento de biodegradação com os microrganismos foi conduzido ao longo de 6 dias, estabelecendo-se dessa forma um padrão de tempo similar para as análises, com a retirada da amostra em 0, 3 e 6 dias, para as diferentes concentrações de vinhaça. Os experimentos foram realizados com vinhaça autoclavada para verificar a ação do consórcio de fungos, sem a interferência de outros microrganismos.

5.2.1 Remoção de DQO

Os ensaios de biodegradação com os microrganismos foram executados para a amostra de vinhaça em diferentes concentrações e também na ausência da mesma, somente com o meio BD (batata e dextrose), para efeito de controle. Os experimentos foram conduzidos em triplicata para maior precisão dos resultados. As amostras foram coletadas e diluídas convenientemente. A avaliação da remoção de DQO foi investigada para vinhaça pura e também para vinhaça diluída em água destilada a 25 e 50%. Esta

avaliação foi necessária, pois, nem sempre o aumento de massa micelial corresponde ao aumento da eficiência da biodegradação, e eventualmente a matéria orgânica presente no meio poderia não ser biodegradável. Os resultados de remoção de DQO obtidos para o ensaio de biodegradação com o fungo são apresentados na Tabela 8.

Tabela 8: Variação de DQO obtida para a degradação da vinhaça para diferentes diluições (25, 50 e 100%), submetidas ao tratamento com os fungos *Aspergillus niger* e *Rhizopus arrhizus*, após 6 dias de incubação, sem corrigir pH, com amostra autoclavada, crescimento com agitação, a 30,0°C e sem suplementar o meio.

Concentração da Vinhaça (%)	DQO (mg O ₂ .L ⁻¹)			Remoção de DQO (%)
	0 dias	3 dias	6 dias	
0*	27.003,37±0,00	22.247,93±0,01	12.057,71±0,00	56,0
25	9.340,33±0,00	7.981,63±0,01	5.943,59±0,00	37,0
50	18.171,85±0,00	12.057,72±0,00	9.340,32±0,04	49,0
100	35.834,89±0,00	26.324,02±0,01	10.019,67±0,06	73,0

Os valores apresentados na tabela são referentes à média e ao desvio padrão (±) das triplicatas.

*meio controle - sem vinhaça (batata e dextrose).

A maior quantidade de remoção de DQO foi observada para os ensaios de biodegradação conduzidos para a vinhaça pura, obtendo-se ao redor de 73% de remoção de carga orgânica. Estes resultados corroboram com os ensaios anteriores, onde verifica-se que uma maior remoção de carga orgânica foi obtida com o resíduo *in natura*.

Esse resultado também condiz com a literatura porque alguns fungos com capacidade de degradar e descolorir efluentes de destilaria, como *Aspergillus spp.*, *Aspergillus fumigatus* G-2-6, *Aspergillus niger*, *Aspergillus niveus* e *Aspergillus fumigatus* UB260; possui uma média de redução de 70-90% de DQO (OHMOMO *et al.*, 1987; MIRANDA *et al.*, 1996; SHAYEGAN *et al.*, 2004, JIMENEZ *et al.*, 2003; ANGAYARKANNI *et al.*, 2003; MOHAMMAD *et al.*, 2006).

Segundo a literatura Aissam *et al.* (2005) observaram que o fungo *A. niger* foi capaz de remover 80% de DQO em águas residuais da produção de azeite, depois de uma fase de adaptação. Ferreira *et al.* (2011) observou reduções de 82,8% da DQO para a vinhaça de cana-de-açúcar tratada com *Pleurotus sajor-caju* CCB020. Adicionalmente, Strong e Burgess (2008) constataram uma redução de 83% na DQO de águas residuais da produção de vinho com o emprego do fungo *Trametes pubescens*.

A seguir, outros parâmetros foram também avaliados para comprovar a eficiência do tratamento biológico com o consórcio de fungos empregados neste trabalho.

5.2.2 Remoção de cor

A cor é outro parâmetro a ser acompanhado para o descarte de efluentes industriais, neste caso em especial para vinhaça. Efluentes coloridos podem comprometer processos de fotossíntese acarretando em intercorrências ao meio físico e conseqüentemente do meio ambiente. Efluentes altamente coloridos possuem uma relação direta com a presença de espécies orgânicas e também inorgânicas, que em muitos casos podem ser nocivas ao ecossistema.

A vinhaça possui coloração escura que é atribuída principalmente à presença de melanoidina, que são complexos poliméricos as quais são formadas quando aminoácidos reagem com açúcares em meio básico, sob aquecimento, em uma reação não enzimática chamada de reação de Maillard (AMIRI, 2011). A coloração da vinhaça pode também ser proveniente da presença de caramelo, produto da degradação do açúcar em altas temperaturas, e de produtos de degradação em meio alcalino (SUGIURA, 2003). Portanto, é salutar que o processo de biodegradação com os fungos *Aspergillus niger* e *Rhizopus arrhizus* contribua para a diminuição da coloração deste tipo de efluente.

A remoção de cor da vinhaça após o processo de biodegradação foi investigada acompanhando-se o espectro de absorção para a vinhaça bruta e pós-tratamento no comprimento de onda de 605 nm. As amostras foram coletadas e diluídas

convenientemente para leitura apropriada no espectrofotômetro de absorção UV-Vis. Os resultados encontrados são apresentados na Tabela 9.

Tabela 9: Variação de cor obtida para a degradação da vinhaça para diferentes diluições (25, 50 e 100%), submetidas ao tratamento com os fungos *Aspergillus niger* e *Rhizopus arrhizus*, após 6 dias de incubação, sem corrigir pH, com amostra autoclavada, crescimento com agitação, a 30,0°C e sem suplementar o meio. Todas as amostras foram convenientemente diluídas a ¼ para leitura no espectrofotômetro de absorção UV-Vis.

Concentração da Vinhaça (%)	Absorbância			Remoção de Absorbância (%)
	0 dias	3 dias	6 dias	
0*	0,05 ± 0,00	1,11 ± 0,03	0,63 ± 0,00	-
25	0,23 ± 0,00	0,35 ± 0,00	0,34 ± 0,01	-
50	0,45 ± 0,00	0,63 ± 0,07	0,54 ± 0,04	-
100	0,74 ± 0,00	0,68 ± 0,10	0,63 ± 0,00	15,0

Os valores apresentados na tabela são referentes à média e ao desvio padrão (±) das triplicatas.

*meio controle - sem vinhaça (batata e dextrose).

Os resultados da Tabela 9 apontam um aumento da coloração para o meio sem vinhaça e para os ensaios de biodegradação com o consórcio de fungos conduzidos para as concentrações de vinhaça de 25 e 50% após 3 dias de experimento. Este efeito aponta para o surgimento de subprodutos oriundos dessa biodegradação cuja produção é ocasionada pela ação do consórcio de fungos no meio e que comprometem a remoção de cor da vinhaça, como já citado anteriormente.

Por outro lado, a biodegradação da vinhaça pura aponta para a redução gradativa da cor da solução até o período de 6 dias de ensaio. Neste caso, a remoção da cor presente na vinhaça pode ter ocorrido devido à degradação de frações de menor peso molecular da melanoidina (KUMAR *et al.*, 1998), e de compostos fenólicos, também já citado anteriormente (SALGADO *et al.*, 2016). Nota-se ainda que o desenvolvimento

do consórcio de fungos também altera a cor do meio de controle, na ausência de vinhaça, conforme pode ser verificado nas imagens a seguir.



Figura 9: Amostra antes (A) e após (B) o processo de biodegradação.

Adicionalmente, os resultados para a vinhaça pura são próximos aos obtidos nos ensaios anteriores, apresentados na Tabela 2, onde uma remoção de 20% foi alcançada ao fim de 7 dias de experimento.

5.2.3 Remoção de Turbidez

A turbidez é uma medida importante que confere ao efluente critérios de qualidade, uma vez que um aumento de turbidez irá representar um aumento da

dificuldade de um feixe de luz atravessar este efluente, e que conseqüentemente representará em impactos negativos ao meio ambiente. A presença de turbidez também está associada a presença de espécies suspensas em solução, que pode ser de origem orgânica, inorgânica, microbiológica e na forma de gás. Em geral a presença de turbidez está associada a presença de cor e pode estar associada a presença de sabor e odor. No caso da vinhaça a turbidez está associada principalmente a presença de compostos orgânicos e inorgânicos e restos de bagaço. Portanto, a remoção de carga orgânica e cor, já evidenciadas nos ensaios anteriores, poderia representar também uma diminuição da turbidez associada a este efluente da indústria sucroalcooleira.

Desta maneira, ensaios de degradação pelo consórcio de fungos foram investigados quanto a remoção de turbidez do meio e são apresentados na Tabela 10. Os ensaios de turbidez foram realizados no líquido sobrenadante após centrifugação das amostras. As amostras foram diluídas de modo a estarem dentro da faixa analítica de trabalho.

Tabela 10: Variação de turbidez obtida para a degradação da vinhaça para diferentes concentrações (25, 50 e 100%) submetidas ao tratamento com os fungos *Aspergillus niger* e *Rhizopus arrhizus*, após 6 dias de incubação, sem corrigir pH, com amostra autoclavada, crescimento com agitação, a 30,0°C e sem suplementar o meio.

Concentração da Vinhaça (%)	Turbidez (NTU)			Remoção de Turbidez (%)
	0 dias	3 dias	6 dias	
0*	900,00 ± 0,00	37.700,00±140,00	15.000,00±0,00	-
25	4.650,00±0,00	5.000,00±0,00	4.325,00±35,00	7,00
50	7.150,00±0,00	6.500,00±0,00	3.200,00±70,50	56,0
100	15.250,00±0,00	11.500,00±0,00	10.825,00±35,00	30,0

Os valores apresentados na tabela são referentes à média e ao desvio padrão (±) das triplicatas.
*meio controle - sem vinhaça (batata e dextrose).

A análise da Tabela 10 reporta um aumento da turbidez para o meio sem vinhaça e para a amostra mais diluída após 3 dias de tratamento. Entretanto, com o decorrer do período de 6 dias observa-se uma diminuição deste valor. Esses resultados corroboram

com os observados para a cor e apresentados na Tabela 9. A formação de subprodutos do biotratamento pode estar associada ao aumento da cor e da turbidez nessas soluções. Para a vinhaça pura e diluída a 50% com água destilada, observa-se um decaimento gradativo de turbidez ao longo do período de seis dias de tratamento.

Efeito semelhante de redução de turbidez também foi observado na literatura por Ferreira *et al.* (2011); ele avaliou a vinhaça de cana tratada com o fungo *Pleurotus sajor-caju* utilizando organismos aquáticos como indicadores toxicológicos. Nos ensaios para a descoloração da vinhaça utilizando o fungo *Pleurotus sajor-caju* CCB020 ocorreu redução de 99,7% na turbidez.

Neste ensaio para vinhaça diluída a 50% e vinhaça pura foi obtida uma remoção de turbidez de 56 e 30%, respectivamente. Estes resultados, em especial para o obtido com vinhaça pura, corroboram com os valores de remoção de DQO e cor apresentados anteriormente. É natural que com a diminuição de carga orgânica e da cor haja também uma diminuição de turbidez. Neste caso, a diminuição da turbidez implica em um menor impacto ambiental esperado para este efluente industrial tratado com o consórcio de fungos.

5.2.4 Redução de Condutividade

Outro parâmetro que pode ser acompanhado em processos de degradação é a condutividade das soluções, neste caso para a amostra de vinhaça. Em um processo de degradação é possível um aumento da concentração de espécies iônicas no meio. Entretanto, para um biotratamento algumas espécies iônicas podem ser requeridas pelos microrganismos em questão fazendo com que a concentração destas diminua ao longo do processo. Portanto, foi parte deste trabalho avaliar a condutividade do meio para o processo de degradação da vinhaça pelos microrganismos, uma vez que esse resultado é importante também para mensurar a quantidade de sólidos dissolvidos, pois em excesso podem contribuir negativamente em um eventual descarte da vinhaça no meio ambiente causando contaminação e salinização do meio.

Os ensaios de biodegradação de vinhaça para avaliação da condutividade do meio foram conduzidos após 6 dias de incubação, sem corrigir pH, com amostra autoclavada, crescimento com agitação, a 30,0°C e sem suplementar o meio. Os resultados de condutividade para a biodegradação de vinhaça são reportados na Tabela 11.

Tabela 11: Variação de condutividade obtida para a degradação da vinhaça para diferentes diluições (25, 50 e 100%), submetidas ao tratamento com os fungos *Aspergillus niger* e *Rhizopus arrhizus*, após 6 dias de incubação, sem corrigir pH, com amostra autoclavada, crescimento com agitação, a 30,0°C e sem suplementar o meio.

Concentração da Vinhaça (%)	Condutividade (mS.cm ⁻¹)			Redução de Condutividade (%)
	0 dias	3 dias	6 dias	
0*	69,50±0,00	59,00±2,00	52,00±6,00	25,2
25	238,00±0,00	224,00±0,00	181,00±1,00	24,1
50	466,50±0,00	435,50±1,50	349,00±0,00	25,1
100	845,00±0,00	805,00±1,00	615,00± 7,50	26,9

Os valores apresentados na tabela são referentes à média e ao desvio padrão (±) das triplicatas.

*meio controle - sem vinhaça (batata e dextrose).

Como pode ser observado, para todos os meios houve uma diminuição gradativa da condutividade das soluções de vinhaça. Esses resultados estão em conformidade com o padrão esperado para ensaios de biodegradação. Os resultados apontam valores similares para a remoção de condutividade em todos os meios, incluindo o meio controle (sem vinhaça).

Neste caso a diminuição da condutividade ao longo do biotratamento reflete em uma diminuição de sais solúveis no meio, e portanto pode-se concluir que ou o fungo está empregando essas espécies iônicas em sua estrutura celular para o seu crescimento, ou eventualmente poderia estar secretando substâncias complexantes que tornariam

indisponíveis essas espécies no meio. Estudos futuros deverão ser realizados para elucidação deste comportamento aqui observado.

5.2.5 Avaliação do pH durante os ensaios de biodegradação

Concomitante aos experimentos de biodegradação foi avaliado o pH das amostras de vinhaça submetidas ao biotratamento. A vinhaça empregada nos ensaios com o fungo originalmente apresentava um valor de pH ácido, ao redor de 4,9. Ao longo do experimento foi importante avaliar se ocorria a variação deste valor e se esta alteração poderia comprometer os experimentos de biodegradação.

Ao final de cada ciclo de tratamento o pH da amostra foi imediatamente medido após a amostra ser centrifugada e os valores mostrados na Tabela 12.

Tabela 12: Variação de pH obtida para a degradação da vinhaça para diferentes diluições (25,50 e 100%), submetidas ao tratamento com os fungos *Aspergillus niger* e *Rhizopus arrhizus*, após 6 dias de incubação, sem corrigir pH, com amostra autoclavada, crescimento com agitação, a 30,0°C e sem suplementar o meio.

Concentração da Vinhaça (%)	pH		
	0 dias	3 dias	6 dias
0*	6,05 ± 0,00	4,03 ± 0,01	3,67 ± 0,34
25	4,97 ± 0,00	7,15 ± 0,00	8,02 ± 0,03
50	4,84 ± 0,00	7,40 ± 0,19	8,32 ± 0,15
100	4,86 ± 0,00	5,38 ± 0,28	7,78 ± 0,12

Os valores apresentados na tabela são referentes à média e ao desvio padrão (±) das triplicatas.

*meio controle - sem vinhaça (batata e dextrose).

A análise da Tabela 12 mostra que para todos os meios contendo vinhaça houve um aumento significativo do valor de pH ao final de 6 dias de experimento. Este efeito foi observado para a degradação da vinhaça, exceto para o meio controle (ausência de vinhaça). Este é um dado que mostra, que no meio controle os microrganismos agem na

formação de espécies mais ácidas, contudo, em presença de vinhaça o valor do pH aumenta para valores superiores a 7 para todas as concentrações de vinhaça. Partindo da análise do pH inicial da vinhaça ao redor de 5, pode-se concluir que a biodegradação da vinhaça pode ter ocasionado a degradação de espécies ácidas, como ácidos carboxílicos, naturalmente presentes neste efluente. A degradação da vinhaça ainda poderia dar origem a outras substâncias como compostos de amônia, o que explicaria também o aumento do pH (GRANATO, 2002).

Como pode ser observado, os ensaios de biodegradação da vinhaça mostraram-se eficazes e promissores para o tratamento deste efluente, uma vez que a remoção de DQO e também um decaimento gradativo de outros parâmetros como cor, turbidez e condutividade foram registrados para o tratamento de vinhaça pura com o consórcio de fungos empregados.

Entretanto, o efluente após o biotratamento ainda encontrava-se com alta coloração e com altos índices de carga orgânica. Neste caso, ensaios fotocatalíticos e fotoeletrocatalíticos não surtiriam efeito, pois a alta coloração seria um impedimento para a execução destas técnicas. A técnica eletroquímica talvez não atendesse também essa demanda, além de ser requerido o consumo de energia elétrica para este processo.

A alternativa proposta neste trabalho para contribuir na degradação da vinhaça foi o uso do ensaio de sorção em biomassa, no caso em bagaço de cana-de-açúcar, que é resíduo da própria indústria sucroalcooleira. A intenção foi agregar valor a este resíduo de biomassa, sendo que este poderia ser empregado como fertilizante, para ser utilizado em locais distantes da usina e da lavoura de cana-de-açúcar. Em contrapartida, o efluente de vinhaça biotratado supostamente apresentaria melhores resultados para as análises químicas investigadas após o ensaio de sorção, como tratamento combinado a biodegradação. A seguir são apresentados os resultados obtidos para os ensaios de sorção em bagaço.

5.3 Ensaio de sorção/dessorção de vinhaça biodegradada em bagaço de cana-de-açúcar

Embora uma alta quantidade de matéria orgânica tenha sido removida da vinhaça após a biodegradação com o consórcio de fungos empregados um valor relativo de macro e micronutrientes e também uma alta coloração ainda se encontrava presente no resíduo após o biotratamento. Com intuito de minimizar a poluição ambiental associada a este efluente e também de agregar valor a outro resíduo da indústria canavieira, no caso o bagaço, optou-se por trabalhar com um método combinado de sorção após o biotratamento.

Portanto, novos ensaios foram conduzidos com vinhaça pura (100%), já que esta concentração apresentou bons resultados para o biotratamento e manteria as condições naturais do efluente, para verificar a capacidade de sorção do bagaço de cana-de-açúcar. Os parâmetros químicos anteriormente citados (DQO, cor, turbidez, condutividade e pH) e alguns novos (cálcio, potássio, magnésio, sódio e COT) foram investigados. Os ensaios foram conduzidos conforme proposto na metodologia na seção 4 e os resultados são apresentados a seguir.

5.3.1 Remoção de DQO

Como anteriormente mencionado, a remoção de carga orgânica é um parâmetro fundamental para ensaios de degradação de efluentes ambientais. Algumas dessas espécies orgânicas podem não ser biodegradadas, acarretando em poluição ambiental. Ainda, a presença de carga orgânica pode estar correlacionada à presença de substâncias tóxicas que podem causar prejuízos ao solo e aos recursos hídricos, os quais são objetos de descarte da vinhaça.

Desta forma, amostras de vinhaça degradadas após 6 dias de tratamento com o consórcio de fungos composto por *Aspergillus niger* e *Rhizopus arrhizus* foram submetidas a sorção com bagaço de cana-de-açúcar (moído em sistema aberto com moinho de facas) e sob agitação. O tratamento do bagaço para este ensaio é descrito na seção 4 deste trabalho e foi realizado com amostras de vinhaça coletadas de uma nova

safra de 2015. Foi avaliada a capacidade de sorção do bagaço na sua forma seca e úmida.

Após o processo de sorção do bagaço de cana-de-açúcar na vinhaça e de dessorção na água o primeiro parâmetro investigado foi à remoção de carga orgânica através da DQO e os resultados são apresentados na Tabela 13.

Tabela 13: Variação de DQO obtida para o tratamento com o o consórcio de fungos por 6 dias, seguido do tratamento secundário com sorção e dessorção no bagaço de cana-de-açúcar. Ensaios realizados sem correção de pH, com amostra autoclavada, crescimento micelial com agitação, a 30,0°C e sem suplementar o meio.

Ensaio	DQO (mg O ₂ .L ⁻¹)			
	DQO Inicial	Após biodegradação	Após sorção	Após dessorção
Vinhaça com bagaço seco	39.421,84±0,00	19.519,78±0,45	21.478,91±0,14	29.584,89±0,01
Vinhaça com bagaço úmido	39.421,84±0,00	19.519,78±0,45	18.319,49±0,55	31.826,73±0,04

Os valores apresentados na tabela são referentes à média e ao desvio padrão (±) das triplicatas.

Os resultados indicam que após ensaio de biodegradação houve uma redução de aproximadamente 51% da carga orgânica da vinhaça. Esse resultado é similar ao obtido e mostrado na Tabela 4. Esperava-se taxas de 70% de remoção de DQO, como apresentado na Tabela 8, contudo, essa diminuição na proporção de degradação da matéria orgânica pode estar relacionada a quantidade de esporos de cada espécie colocada na amostra, já que verificou-se apenas a concentração total de esporos (10⁶). Somado a isso, ainda tem-se a mudança de amostra de vinhaça, de safras diferentes (2014 e 2015), que apresentaram valores de DQO da vinhaça bruta diferentes.

Os resultados apresentados podem ser comparados aos resultados obtidos por Jimenez *et al.* (2003) que estudou a eficácia da *Penicillium* spp. e *Aspergillus niger* no

tratamento de águas residuais de melaço de beterraba através da fermentação alcoólica. Os fungos testados removeram um máximo de 52% do DQO.

Outra observação é que o bagaço úmido apresenta uma capacidade melhor de sorção da matéria orgânica presente na vinhaça se comparado ao bagaço seco. Outro detalhe é que após o processo de dessorção observa-se que tanto o bagaço úmido quanto o seco liberaram a matéria orgânica que sorveram, somado a liberação de matéria orgânica da sua composição. Neste caso, tanto o bagaço úmido quanto o bagaço seco poderiam ser indicados como fertilizante fora da planta industrial da usina sucroalcooleira, pois haveria a possibilidade de transporte dessa biomassa a uma distância maior que a amostra líquida de vinhaça. Os resultados após a dessorção refletem uma alta carga orgânica, como esperado devido à decomposição da biomassa, sendo neste caso comumente empregada na agricultura para reposição de carbono no solo.

5.3.2 Remoção de cor

O parâmetro cor também foi investigado no tratamento da vinhaça com a combinação dos métodos biológico e físico. Este foi um parâmetro com baixa eficiência no tratamento biológico com o consórcio de fungos, e, portanto, seria salutar que a combinação do método físico proporcionasse melhores resultados para o tratamento da vinhaça. Deste modo, após a biodegradação foram realizados ensaios de sorção em bagaço de cana-de-açúcar para obtenção da melhora da remoção de cor. A variação de remoção de cor foi medida em comprimento de onda de 605 nm e pode ser acompanhada na Tabela 14.

Como constatado anteriormente, os resultados indicam que em vinhaça pura (100%) há uma ligeira redução de cor após o processo de biodegradação, e o mesmo acontece após a sorção. Mesmo o bagaço mudando de coloração, como apresentado na Figura 10, não houve redução de cor significativa da vinhaça após a sorção, segundo os resultados apresentados na Tabela 14. Adicionalmente, o uso do bagaço seco apresentou

uma maior redução de cor, ao redor de 20%, quando comparado ao bagaço úmido que alcançou valores de 13,3%, como constatado na Tabela 14 e visualizado na Figura 11.

Tabela 14: Variação de DQO obtida para o tratamento com o o consórcio de fungos por 6 dias, seguido do tratamento secundário com sorção e dessorção no bagaço de cana-de-açúcar. Ensaios realizados sem correção de pH, com amostra autoclavada, crescimento micelial com agitação, a 30,0°C e sem suplementar o meio. Todas as amostras foram convenientemente diluídas a 1/4 para leitura no espectrofotômetro.

Ensaio	Absorbância			
	Absorção inicial	Após biodegradação	Após sorção	Após dessorção
Vinhaça com bagaço seco	0,75 ± 0,00	0,70 ± 0,02	0,60 ± 0,09	0,56 ± 0,03
Vinhaça com bagaço úmido	0,75 ± 0,00	0,70 ± 0,02	0,65 ± 0,00	0,62 ± 0,05

Os valores apresentados na tabela são referentes à média e ao desvio padrão (\pm) das triplicatas.



Figura 10: Bagaço seco (A) antes e (B) após o ensaio de 7 dias sorção em vinhaça.

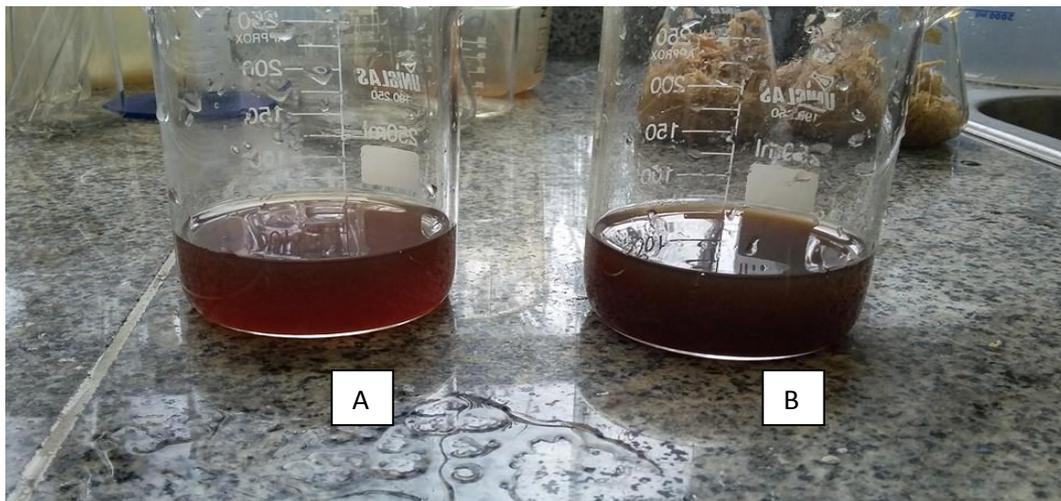


Figura 11: Vinhaça após sete dias de sorção com (A) bagaço seco e (B) com bagaço úmido

Embora seja visível a redução de tonalidade para a amostra de vinhaça tratada com bagaço seco em comparação ao bagaço úmido, a intensidade de cor ainda se mantém alta e, portanto, novos estudos talvez sejam requeridos para minimização deste parâmetro.

O processo de dessorção também produz um sobrenadante colorido, como visto na Figura 12, porém, de tonalidade menos acentuada que a vinhaça bruta e a submetida ao biotratamento com o consórcio de fungos. Desta forma, o uso do bagaço em aplicações posteriores deve ser avaliado com relação à possibilidade de alterar o meio físico que será empregado.



Figura 12: Água com bagaço seco após 3 dias de dessorção.

5.3.3 Remoção de Turbidez

A turbidez é um dos parâmetros de qualidade para avaliação das características físicas dos efluentes brutos e tratados, pois identifica a presença de partículas em suspensão como anteriormente mencionado. Em geral, quanto menor for a turbidez do efluente mais eficiente foi o processo de tratamento.

A variação de turbidez obtida para a degradação da vinhaça pura (100%) submetida ao tratamento com o consórcio de fungos por 6 dias, seguido do tratamento secundário com sorção e dessorção no bagaço de cana-de-açúcar está descrita na Tabela 15.

Tabela 15: Variação de turbidez da vinhaça pura (100%) obtida para o tratamento com o consórcio de fungos por 6 dias, seguido do tratamento secundário com sorção e dessorção no bagaço de cana-de-açúcar. Ensaios realizados sem correção de pH, com amostra autoclavada, crescimento micelial com agitação, a 30,0°C e sem suplementar o meio.

Ensaio	Turbidez (NTU)			
	Turbidez Inicial	Após biodegradação	Após sorção	Após dessorção
Vinhaça com bagaço seco	15.000,00±0,00	10.902,50±30,50	7.564,50±6,50	5.764,50±15,50
Vinhaça com bagaço úmido	15.000,00±0,00	10.902,50±30,50	13.716,50±6,50	12.416,50±0,50

Os valores apresentados na tabela são referentes à média e ao desvio padrão (\pm) das triplicatas.

Após os ensaios de sorção resultados similares aos observados na avaliação do parâmetro cor foram encontrados para os resultados obtidos com o uso do bagaço seco e do bagaço úmido. Ou seja, o uso do bagaço seco apresenta resultados superiores para a remoção de turbidez, quando comparado ao bagaço úmido. Do mesmo modo, a avaliação da dessorção demonstrou que o uso de bagaço seco e bagaço úmido apresentam resultados diferentes ao fim do processo. Os valores de turbidez encontrados

para a vinhaça após o ensaio de sorção com bagaço seco apresentam-se menores comparados ao uso do bagaço úmido. Se esta turbidez estiver associada à presença de matéria orgânica, este resultado corrobora com o ensaio de DQO, que apresenta ao fim do processo de dessorção com o bagaço úmido uma carga orgânica superior à encontrada para o uso do bagaço seco.

Ainda, o uso do bagaço seco e úmido apresentou um valor superior ao esperado após a dessorção, contabilizando a quantidade que supostamente foi sorvida e alguma contribuição da biomassa. Este resultado pode ser explicado pelo processo de decomposição do próprio bagaço, que pode ter sido acelerado pela umidade e agitação.

5.3.4 Remoção de Condutividade

A medida de condutividade é um procedimento muito sensível para concentrações de espécies iônicas no meio. Investigou-se a condutividade da amostra após o processo de sorção, e em especial após a dessorção do bagaço, uma vez que esse último resultado é importante para quantificar os nutrientes que podem ou não ser benéficos para a lavoura se a biomassa do bagaço for utilizada como fertilizante pós tratamento físico da vinhaça.

A variação de condutividade obtida para a degradação da vinhaça pura (100%) submetida ao tratamento com o consórcio de fungos por 6 dias seguido do tratamento secundário com com sorção e dessorção no bagaço de cana-de-açúcar está descrita na Tabela 16.

Tabela 16: Variação de condutividade da vinhaça pura (100%) obtida para o tratamento com o consórcio de fungos por 6 dias seguido do tratamento secundário com sorção e dessorção no bagaço de cana-de-açúcar. Ensaios realizados sem correção de pH, com amostra autoclavada, crescimento micelial com agitação, a 30,0°C e sem suplementar o meio.

Ensaio	Condutividade (mS.cm ⁻¹)			
	Condutividade Inicial	Após biodegradação	Após sorção	Após dessorção
Vinhaça com bagaço seco	930,00 ± 0,00	823,00 ± 12,50	749,00 ± 16,00	575,50 ± 2,00
Vinhaça com bagaço úmido	930,00 ± 0,00	823,00 ± 12,50	819,50 ± 16,00	594,50 ± 1,00

Os valores apresentados na tabela são referentes à média e ao desvio padrão (±) das triplicatas.

Como observado anteriormente, a biodegradação promove uma redução dos valores de condutividade para a vinhaça provavelmente em virtude dos íons presentes no meio serem utilizados pelo consórcio de fungos ou quelados por substâncias secretadas por estes microrganismos. Contudo, essa redução é pouco expressiva, e espécies iônicas ainda estão presentes em quantidades relativamente alta, sendo requerida uma nova etapa de tratamento, aqui representada pela sorção em biomassa. Após o processo de sorção evidenciou-se um ligeiro decaimento nos valores de condutividade empregando bagaço seco e úmido, sendo o efeito mais pronunciado com o uso da primeira opção. Após a etapa de dessorção, evidenciou-se um aumento da condutividade na água empregada para este processo, já que a condutividade inicial da água destilada era 462,4 µS/cm. Deste modo, pode-se concluir que este aumento, superior a quantidade sorvida, deve estar relacionado à liberação de espécies iônicas pela própria biomassa, o que eventualmente pode ser benéfico em uma aplicação deste resíduo na agricultura. Deste modo, para atividades industriais ou mesmo aplicações em rotinas urbanas talvez fosse requerido um processo mais eficiente para extração dessas

espécies iônicas. Entretanto, o uso como água de irrigação da vinhaça tratada por métodos combinados pode ser uma alternativa para o reuso deste resíduo.

5.3.5 Avaliação do pH

O estudo do pH de efluentes que poderão ser utilizados na fertirrigação é uma prática, que se torna necessária, criando melhores condições para a fertilidade do solo. A variação de pH obtida para a degradação da vinhaça pura (100%) submetida ao tratamento com o consórcio de fungos por 6 dias seguido do tratamento secundário com sorção e dessorção no bagaço de cana-de-açúcar está descrita na Tabela 17.

Tabela 17: Variação de pH da vinhaça pura (100%) obtida para o tratamento com o consórcio de fungos por 6 dias seguido do tratamento secundário com sorção e dessorção no bagaço de cana-de-açúcar. Ensaios realizados sem correção de pH, com amostra autoclavada, crescimento fúngico com agitação, a 30,0°C e sem suplementar o meio.

Ensaio	pH			
	pH Inicial	Após biodegradação	Após sorção	Após dessorção
Vinhaça com bagaço seco	4,71 ± 0,00	8,39 ± 0,04	6,55 ± 0,08	5,45 ± 0,21
Vinhaça com bagaço úmido	4,71 ± 0,00	8,39 ± 0,04	7,67 ± 0,12	5,88 ± 0,08

Os valores apresentados na tabela são referentes à média e ao desvio padrão (\pm) das triplicatas.

Como constatado anteriormente, após o processo de biodegradação com o consórcio de fungos há um aumento relativo no valor de pH da amostra de vinhaça biotratada. Após a etapa de sorção observa-se uma diminuição nos valores de pH, alcançando a proximidade do meio neutro, o que pode ter ocorrido devido a sorção de espécies ácidas na fibra do bagaço ou eventualmente a reações de decomposição ou transformações das espécies de caráter ácido. Neste caso, uma avaliação positiva da

vinhaça tratada com bagaço é feita em função da parcial neutralização do meio ter sido alcançada com a sorção em biomassa e deste resíduo apresentar-se próximo a neutralidade com maiores possibilidades de aplicação. Observa-se ainda que após a etapa de dessorção, a água empregada passa a apresentar valores pH inferiores a 7. Ressalta-se que o pH da água empregada inicialmente na etapa de dessorção foi 5,96. Deste modo, segundo os resultados não há dessorção de quantidades significativas de espécies ácidas após a dessorção, já que o pH final está próximo ao pH inicial da água destilada empregada.

O valor de pH 5,7 é o ponto em que a superfície dos grupos funcionais do bagaço não contribuem para o pH da solução (ALOMA *et al.*, 2012; BLAZQUEZ *et al.*, 2011). Acima deste valor de pH, a carga de superfície se torna negativa e o adsorvente vai ocupar os cátions com maior afinidade (MARCILLA *et al.*, 2007).

5.4 Análise de Micro e Macronutrientes da vinhaça

Comparada aos outros resíduos orgânicos produzidos pela indústria sucroalcooleira, a vinhaça é a que mais contém nutrientes em sua composição, predominando o potássio seguido de cálcio, magnésio, manganês e nitrogênio orgânico (WADT, 2008). Portanto, é de fundamental importância avaliar os processos de tratamento empregados neste trabalho com relação à redução da quantidade destas espécies naturalmente presente neste resíduo.

A análise química da vinhaça foi feita empregando a espectroscopia de absorção atômica (AAS). Através da análise das leituras de absorbâncias dos padrões analíticos foi possível construir a curva analítica para cada elemento analisado e, a seguir, avaliar a concentração destas espécies nas amostras de vinhaça bruta e tratada. A amostra da vinhaça foi analisada antes e após do processo de biodegradação e de sorção. Os elementos investigados foram avaliados quando sua disponibilidade direta, ou seja, foi avaliada a concentração solúvel destas espécies, pois era objeto de estudo do presente trabalho o uso da vinhaça tratada e do bagaço como insumo agrícola com efeito de dessorção.

5.4.1 Análise da concentração de Potássio

Após analisarem a composição de diferentes tipos de vinhaça produzida em diferentes regiões do Brasil, Silva e Orlando Filho (1981) constataram que a composição química da vinhaça é muito heterogênea, em função do tipo de matéria-prima e outros aspectos, concluindo que quando se parte de mosto de melaço a vinhaça apresenta maiores concentrações em matéria orgânica, potássio, cálcio e magnésio, ao passo que esses elementos decaem consideravelmente quando se trata de mosto de caldo de cana, como é o caso de destilarias autônomas, sendo o potássio (K) o elemento predominante.

A quantidade grandemente desproporcional de potássio em relação a cálcio e magnésio na vinhaça pode promover um desbalanço desses nutrientes no solo (SENGIK *et al.*, 1988). Lyra *et al.* (2003), concordam com Madejón *et al.* (2001) ao sugerirem que se pode esperar uma elevação na concentração de sais no solo e potencial risco de salinização com a aplicação da vinhaça ao longo dos anos, considerando-se a taxa de absorção de potássio pela planta e sua concentração na vinhaça.

Tabela 18: Resultados obtidos na leitura dos padrões analíticos de potássio em 766,50 nm.

Concentração de K ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	Absorbância
0,20	0,09 \pm 0,00
0,50	0,22 \pm 0,00
1,00	0,42 \pm 0,00
1,50	0,70 \pm 0,00
1,80	0,81 \pm 0,00

Em virtude do exposto acima procedeu-se a análise de potássio nas amostras de vinhaça. Para isso, inicialmente foi construída a curva analítica do mesmo partindo-se das soluções padrão de potássio que foram analisadas no espectrômetro de absorção

atômica em 766,50 nm após calibração do instrumento. Os resultados obtidos na leitura dos padrões analíticos são apresentados na Tabela 18. A curva analítica dos padrões de potássio é apresentada a seguir na Figura 13.

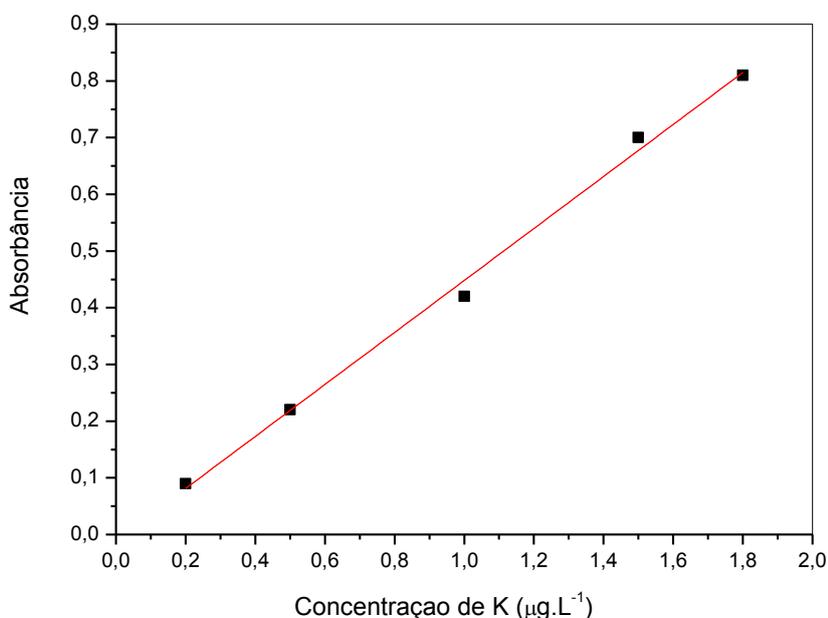


Figura 13: Curva analítica para determinação de potássio obtida pelo valor médio da leitura dos padrões. Equação da reta: $A = - 0,01043 + 0,4584[K]$, $R^2 = 0,9950$. Faixa linear de trabalho investigada de 0,20 a 1,80 µg.L⁻¹.

Como era esperado uma relação linear foi obtida para a curva analítica construída com os padrões de potássio. A faixa linear de trabalho da curva variou de 0,20 a 1,80 µg.L⁻¹, sendo a equação da curva encontrada igual a $A = - 0,01043 + 0,4584[K]$, e o coeficiente de correlação linear de 0,9950, apresentando confiabilidade.

Após a construção da curva analítica foram realizadas as leituras das amostras de vinhaça *in natura* e após os processos de tratamento, e os resultados são apresentados na Tabela 19.

Tabela 19: Variação da concentração de potássio obtida para o tratamento da vinhaça pura (100%) submetida aos ensaios com o consórcio de fungos por 6 dias, seguido do tratamento secundário com sorção em bagaço por 7 dias e dessorção após 3 dias. Ensaios realizados sem correção de pH, com amostra autoclavada, crescimento micelial com agitação, a 30,0°C e sem suplementar o meio.

Ensaio	Concentração de Potássio (mg.L ⁻¹)			
	Concentração Inicial	Após biodegradação	Após sorção	Após dessorção
Vinhaça com bagaço seco	1,15 ± 0,00	1,04 ± 0,06	0,89 ± 0,08	1,06 ± 0,21
Vinhaça com bagaço úmido	1,15 ± 0,00	1,04 ± 0,06	1,04 ± 0,11	1,11 ± 0,08

Os valores apresentados na tabela são referentes à média e ao desvio padrão (±) das triplicatas.

Como pode ser observado, a concentração inicial de potássio encontrada na amostra foi 1,15 mg.L⁻¹, e após o processo de biodegradação houve uma redução para 1,04 mg.L⁻¹, aproximadamente 11% de redução. Após o processo de sorção a redução deste nutriente se manteve praticamente estável no bagaço úmido apresentando uma ligeira diminuição com o emprego do bagaço seco. Verificou-se que o bagaço seco apresenta maior eficiência na remoção de potássio da vinhaça biotratada. Não há indicativo conclusivo se o potássio foi requerido na estrutura celular do fungo ou se este microrganismo secretou substâncias capazes de quelar esta espécie, já que os ensaios de absorção atômica apenas avaliaram a concentração livre deste nutriente. Novos ensaios serão efetuados para elucidação destas observações.

Após dessorção a concentração de potássio voltou a subir, indicando que, além da quantidade de potássio sorvido nas fibras do bagaço, uma outra parcela desta espécie foi liberada pela própria biomassa como parte da sua composição. Este resultado pode ser avaliado beneficentemente, uma vez que parte do objetivo do tratamento com a biomassa é o emprego desta como insumo complementar de valor agregado na

fertilidade de solos e no cultivo de culturas, que não sejam exclusivamente de cana-de-açúcar. Adicionalmente, a remoção de parte da concentração de potássio pelo bagaço seco é outro resultado assertivo, pois a redução desta substância na vinhaça amplia a aplicabilidade deste rejeito em diversas propostas de reuso.

5.4.2 Análise da concentração de Cálcio

A vinhaça apresenta grande quantidade de nutrientes dentre eles o cálcio (WADT, 2008). O conteúdo de cálcio é influenciado pela textura do solo, teor de matéria orgânica e pela remoção das culturas. A sua disponibilidade às plantas, como de outros cátions (potássio e magnésio), é afetada tanto pela quantidade de nutriente disponível no solo, como pelo grau de saturação no complexo de troca e da relação com os outros cátions. Como este elemento também está disponível em grande quantidade na vinhaça, efetuou-se sua quantificação na amostra bruta e após as etapas de tratamento.

Do mesmo modo que o potássio, inicialmente foi construída a curva analítica de cálcio, partindo-se das soluções padrão deste que foram analisadas no espectrômetro de absorção atômica em 422,70 nm após prévia calibração do instrumento. Os resultados obtidos na leitura dos padrões analíticos são apresentados na Tabela 20. A curva analítica dos padrões de cálcio é apresentada a seguir na Figura 14.

Tabela 20: Resultados obtidos na leitura dos padrões analíticos de cálcio em 422,70 nm.

Concentração de Ca ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	Absorbância
2,00	0,09 \pm 0,02
4,00	0,23 \pm 0,00
14,00	0,64 \pm 0,02
20,00	0,90 \pm 0,04

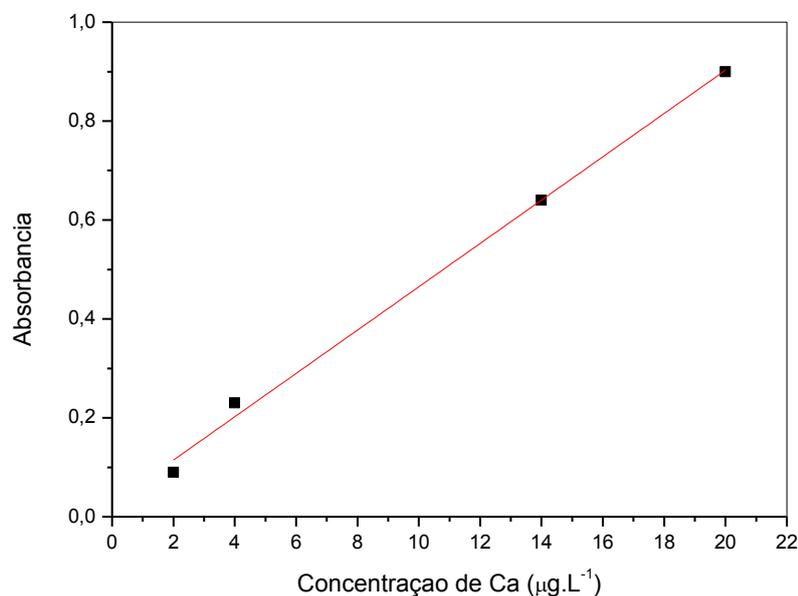


Figura 14: Curva analítica para determinação de cálcio obtida pelo valor médio da leitura dos padrões. Equação da reta: $A = 0,02704 + 0,0438[Ca]$, $R^2 = 0,995$. Faixa linear de trabalho investigada de 2,00 a 20,00 $\mu\text{g.L}^{-1}$.

Como era esperado uma relação linear foi obtida para a curva analítica de cálcio. A faixa linear de trabalho da curva variou de 2,00 a 20,00 $\mu\text{g.L}^{-1}$, sendo a equação da curva encontrada igual a $A = 0,02704 + 0,0438[Ca]$, e o coeficiente de correlação linear de 0,995, apresentando confiabilidade.

Após a construção da curva analítica foram realizadas as leituras das amostras de vinhaça e os resultados são apresentados na Tabela 21.

Observa-se que houve uma redução de aproximadamente 12,5%, nos valores de cálcio após a biodegradação, o que provavelmente pode estar relacionado ao fato do consórcio de fungos ter utilizado esse micronutriente no seu metabolismo ou quelado este elemento após liberação de substâncias quelantes. Após os ensaios de sorção e de dessorção houve um aumento da concentração de cálcio no meio, maior que o esperado, observado tanto para o uso de bagaço seco quanto úmido. Conclui-se que em ambos os ensaios a biomassa esteja liberando este micronutriente, não só sorvido, como também oriundo de sua composição. A utilização do processo de sorção e dessorção para

vinhaça empregando bagaço deve ser avaliado quanto à aplicabilidade, pois estes resultados podem ou não prejudicar atividades industriais e agrícolas.

Tabela 21: Variação da concentração de cálcio obtida para o tratamento da vinhaça pura (100%) submetida aos ensaios com o consórcio de fungos por 6 dias, seguido do tratamento secundário com sorção em bagaço por 7 dias e dessorção após 3 dias. Ensaios realizados sem correção de pH, com amostra autoclavada, crescimento micelial com agitação, a 30,0°C e sem suplementar o meio.

Ensaio	Concentração de Cálcio ($\mu\text{g.L}^{-1}$)			
	Concentração Inicial	Após biodegradação	Após sorção	Após dessorção
Vinhaça com bagaço seco	$7,42 \pm 0,00$	$6,49 \pm 0,27$	$7,11 \pm 0,07$	$37,11 \pm 0,21$
Vinhaça com bagaço úmido	$7,42 \pm 0,00$	$6,49 \pm 0,27$	$7,11 \pm 0,08$	$37,11 \pm 0,08$

Os valores apresentados na tabela são referentes à média e ao desvio padrão (\pm) das triplicatas.

5.4.3 Análise da concentração de Magnésio

Comparada aos outros resíduos orgânicos produzidos pela indústria sucroalcooleira, a vinhaça é a que mais contém nutrientes, dentre eles o magnésio (WADT, 2008).

Como acontece com o potássio e o cálcio, o magnésio é encontrado no solo sob a forma de minerais primários. A aplicação de grandes quantidades de cálcio e magnésio em solos deficientes em potássio ou aplicação em excesso de cálcio em solo deficiente em magnésio pode causar desequilíbrio nutricional e crescimento reduzido da cultura.

A disponibilidade de magnésio frequentemente é relacionada ao pH, em solos ácidos, com baixo pH (pH abaixo de 5,8), o excesso de hidrogênio e o alumínio influenciam a disponibilidade de magnésio e sua absorção pelas plantas. Em altos

valores de pH (acima de 7,4), o excesso de cálcio impede a absorção de magnésio pelas plantas.

Como também é esperada a presença deste elemento na amostra de vinhaça, efetuou-se sua quantificação. Para isso, inicialmente também foi construída a curva analítica do mesmo partindo-se das soluções padrão de magnésio que foram analisadas no espectrômetro de absorção atômica em 285,20 nm após calibração do instrumento. Os resultados obtidos na leitura dos padrões analíticos são apresentados na Tabela 22. A curva analítica dos padrões de magnésio é apresentada a seguir na Figura 15.

Tabela 22: Resultados obtidos na leitura dos padrões analíticos de magnésio em 285,20 nm.

Concentração de Mg ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	Absorbância
0,20	0,30 \pm 0,04
0,40	0,51 \pm 0,00
0,50	0,66 \pm 0,03
0,70	0,87 \pm 0,04
0,80	1,00 \pm 0,00

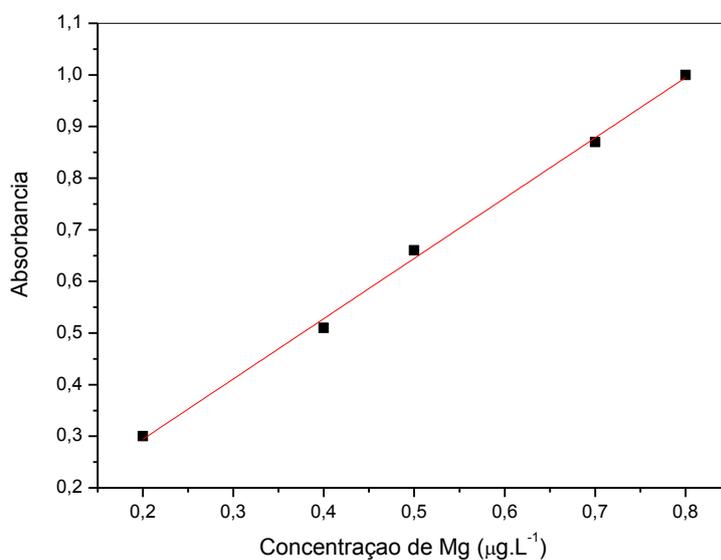


Figura 15: Curva analítica para determinação de magnésio obtida pelo valor médio da leitura dos padrões. Equação da reta: $A = 0,06088 + 1,1675[\text{Mg}]$, $R^2 = 0,99709$. Faixa linear de trabalho investigada de 0,20 a 0,80 $\mu\text{g.L}^{-1}$.

Como era esperado uma relação linear foi obtida para a curva analítica de magnésio. A faixa linear de trabalho da curva variou de 0,20 a 0,80 $\mu\text{g.L}^{-1}$, sendo a equação da curva encontrada igual a $A = 0,06088 + 1,1675[\text{Mg}]$, e o coeficiente de correlação linear de 0,99709, apresentando confiabilidade.

Após a construção da curva analítica foram realizadas as leituras das amostras de vinhaça e os resultados são apresentados na Tabela 23.

Tabela 23: Variação da concentração de magnésio obtida para o tratamento da vinhaça pura (100%) submetida aos ensaios com o consórcio de fungos por 6 dias, seguido do tratamento secundário com sorção em bagaço por 7 dias e dessorção após 3 dias. Ensaios realizados sem correção de pH, com amostra autoclavada, crescimento micelial com agitação, a 30,0°C e sem suplementar o meio.

Ensaio	Concentração de Magnésio ($\mu\text{g.L}^{-1}$)			
	Concentração Inicial	Após biodegradação	Após sorção	Após dessorção
Vinhaça com bagaço seco	$24,64 \pm 0,00$	$22,61 \pm 0,83$	$19,90 \pm 0,22$	$24,82 \pm 0,01$
Vinhaça com bagaço úmido	$24,64 \pm 0,00$	$22,61 \pm 0,83$	$19,05 \pm 0,21$	$23,91 \pm 0,08$

Os valores apresentados na tabela são referentes à média e ao desvio padrão (\pm) das triplicatas.

Os resultados reportam que a redução nos valores de magnésio após o processo de biodegradação e após o processo de sorção foi pouco expressiva, e que talvez a redução após o biotratamento possa ter ocorrido porque este elemento seja requerido no metabolismo do consórcio de fungos empregados, ou que os mesmos sejam complexados eventualmente pela liberação de um agente complexante pelos microrganismos e não estejam mais disponíveis na forma livre na vinhaça biotratada. Após os ensaios de sorção observa-se que uma parcela de magnésio ficou sorvida no bagaço, caracterizando uma remoção de aproximadamente 8,24% e de 22,7% desta espécie ao fim do biotratamento e da etapa de sorção em bagaço úmido, respectivamente. Outro detalhe que pode ser evidenciado é que após o processo de dessorção houve um aumento da concentração de magnésio no meio, superior ao esperado pelas espécies sorvidas, o que deve estar associado à liberação deste elemento pela própria biomassa.

5.4.4 Análise da concentração de sódio

O sódio no solo comporta-se como cátion monovalente (Na^+). Quando em elevadas concentrações este elemento é capaz de deslocar o Ca^{2+} e o K^+ , condição esta que pode afetar, em determinadas situações a estrutura do solo. (OLIVEIRA *et al.*, 2002).

Portanto, foi de interesse deste trabalho quantificar a concentração de sódio na amostra de vinhaça *in natura* e após os tratamentos biológico e físico. Para a quantificação de sódio foi construída a curva analítica partindo-se das soluções padrão de sódio que foram analisadas no espectrômetro de absorção atômica em 589,00 nm após calibração do instrumento. Os resultados obtidos na leitura dos padrões analíticos são apresentados na Tabela 24. A curva analítica dos padrões de sódio é apresentada a seguir na Figura 16.

Tabela 24: Resultados obtidos na leitura dos padrões analíticos de sódio em 589,00 nm.

Concentração de sódio ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	Absorbância
0,20	0,30 \pm 0,04
0,40	0,51 \pm 0,00
0,50	0,66 \pm 0,03
0,70	0,87 \pm 0,04
0,80	1,00 \pm 0,00

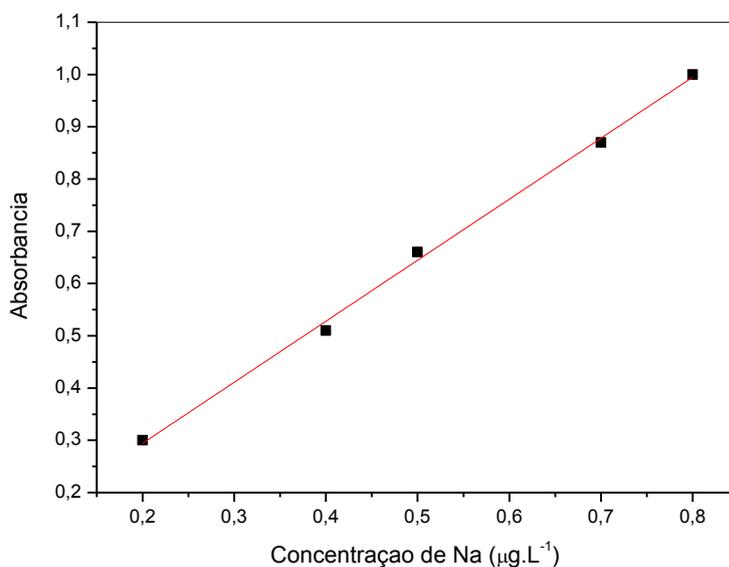


Figura 16: Curva analítica para determinação de sódio obtida pelo valor médio da leitura dos padrões. Equação da reta: $A = 0,06088 + 1,16754[\text{Na}]$, $R^2 = 0,99709$. Faixa linear de trabalho investigada de 0,20 a 0,80 $\mu\text{g.L}^{-1}$.

Como era esperado uma relação linear foi obtida para a curva analítica de sódio. A faixa linear de trabalho da curva variou de 0,20 a 0,80 $\mu\text{g.L}^{-1}$, sendo a equação da curva encontrada igual a $A = 0,06088 + 1,16754[\text{Na}]$, e o coeficiente de correlação linear de 0,99709, apresentando confiabilidade.

Após a construção da curva analítica foram realizadas as leituras das amostras de vinhaça *in natura* e após os tratamentos e os resultados são apresentados na Tabela 25.

Tabela 25: Variação da concentração de sódio obtida para o tratamento da vinhaça pura (100%) submetida aos ensaios com o consórcio de fungos por 6 dias, seguido do tratamento secundário com sorção em bagaço por 7 dias e dessorção após 3 dias. Ensaios realizados sem correção de pH, com amostra autoclavada, crescimento micelial com agitação, a 30,0°C e sem suplementar o meio.

Ensaio	Concentração de Sódio ($\mu\text{g.L}^{-1}$)			
	Concentração Inicial	Após biodegradação	Após sorção	Após dessorção
Vinhaça com bagaço seco	$17,24 \pm 0,00$	$12,98 \pm 0,08$	$13,39 \pm 0,04$	$4,56 \pm 0,00$
Vinhaça com bagaço úmido	$17,24 \pm 0,00$	$12,98 \pm 0,08$	$13,49 \pm 0,04$	$4,76 \pm 0,00$

Os valores apresentados na tabela são referentes à média e ao desvio padrão (\pm) das triplicatas.

Na Tabela 25 observa-se que houve uma redução no teor de sódio após a biodegradação de aproximadamente 24,7%. Entretanto, após o processo de sorção não foi averiguada nenhuma alteração considerável, ou seja, o bagaço aparentemente não sorveu este elemento, pelo contrário, liberou sódio presente na própria biomassa para a amostra. Os parâmetros entre bagaço seco e úmido são equivalentes neste ponto. Acredita-se também que a concentração encontrada para esta espécie após a etapa de dessorção seja exclusivamente oriunda da própria biomassa, não havendo alterações relativas pelo uso desta técnica física de tratamento para este elemento. Portanto, para este elemento o efeito de sorção não é evidenciado.

5.4.5 Avaliação da quantidade de Carbono Orgânico Total (COT)

No analisador de Carbono Orgânico Total (TOC) foram avaliadas as concentrações de Carbono Total (CT) e Carbono Inorgânico (CI), sendo a diferença entre esses valores correspondente a concentração Carbono Orgânico Total (mg.L^{-1}), como observado na equação 2.

$$\text{COT} = \text{CT} - \text{CI} \quad \text{equação 2}$$

As medidas de degradação de COT foram expressas pela normalização apresentada na equação 3.

$$\% \text{ de degradação de COT} = \frac{COT \text{ inicial} - COT \text{ final}}{COT \text{ inicial}} \times 100 \quad \text{equação 3}$$

As curvas analíticas de CT e CI foram construídas a partir de padrões de hidrogenoftalato de potássio e de hidrogenocarbonato de sódio, respectivamente. Os resultados obtidos na leitura dos padrões analíticos para a construção das curvas analíticas de CI e CT são apresentados na Tabela 26. As curvas analíticas dos padrões de CI e CT são apresentadas a seguir nas Figuras 17 e 18, respectivamente.

Tabela 26: Resultados obtidos para a construção da curva analítica dos padrões de Carbono Inorgânico (CI) e Carbono Total (CT) para as análises realizadas no analisador de Carbono Orgânico Total (TOC).

Concentração padrão de IC (mg/L)	Área	Concentração padrão de CT (mg/L)	Área
0	2,416	20,0	45,54
2,0	15,76	50,0	120,6
4,0	23,73	100,0	245,7
6,0	33,03	125,0	306,6
8,0	42,78	175,0	441,2
10,0	51,96	200,0	500,2

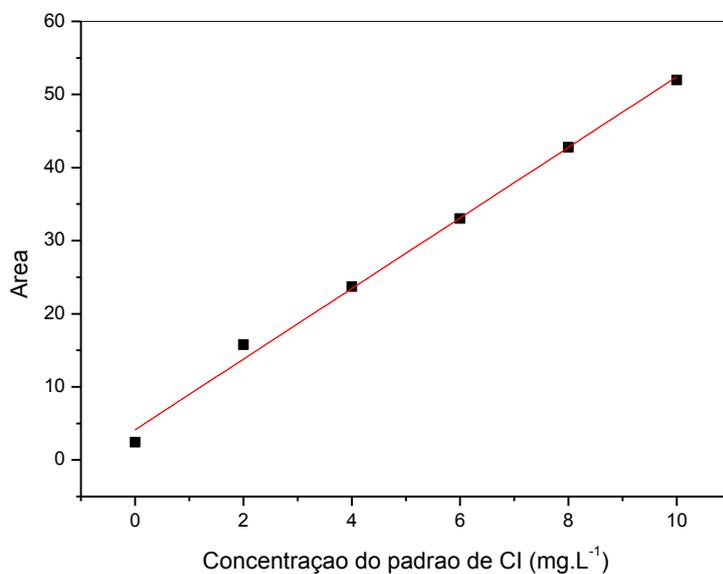


Figura 17: Curva Analítica do padrão de Carbono Inorgânico (CI) para as análises de Carbono Orgânico Total (TOC). Equação da curva: $\text{Área} = 4,1307 + 4,8297[\text{CI}]$ (mg), $R^2 = 0,99457$.

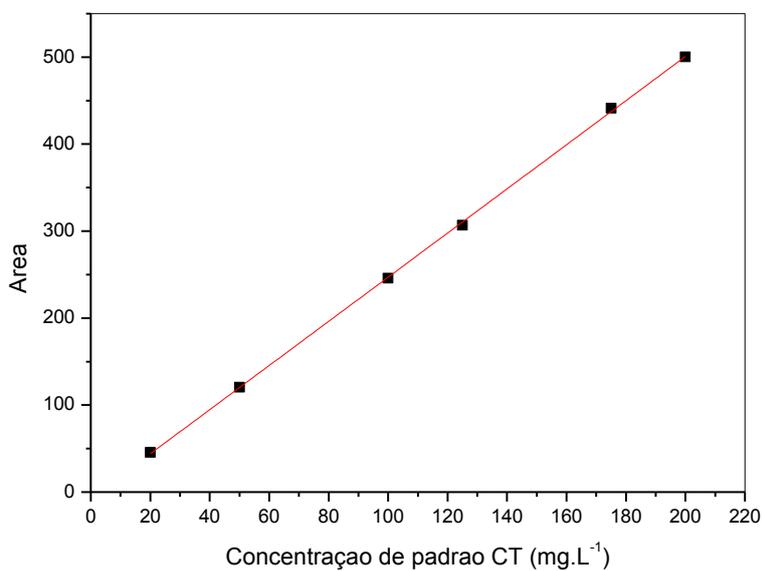


Figura 18: Curva Analítica do padrão de Carbono Total (CT) para as análises de Carbono Orgânico Total (TOC). Equação da curva: $\text{Área} = -6,6736 + 2,53714[\text{CT}]$ (mg), $R^2 = 0,99973$.

Como pode ser observado nas Figuras 17 e 18 as curvas analíticas exibem comportamento linear em ampla faixa de concentração e, portanto, estão apropriadas para o uso com as amostras de vinhaça.

Após a construção das curvas de CI e CT as amostras de vinhaça foram então convenientemente diluídas e analisadas para averiguar especialmente a remoção de carga orgânica na forma de Carbono Orgânico Total (COT). Os resultados das análises são apresentados na Tabela 27.

Tabela 27: Variação da concentração de COT (mg.L^{-1}) obtida para o tratamento da vinhaça pura (100%) submetida aos ensaios com o consórcio de fungos por 6 dias, seguido do tratamento secundário com sorção em bagaço úmido por 7 dias e dessorção após 3 dias. Ensaios realizados sem correção de pH, com amostra autoclavada, crescimento micelial com agitação, a $30,0^{\circ}\text{C}$ e sem suplementar o meio.

	Vinhaça inicial	Após biodegradação	Após sorção	Após dessorção em bagaço seco
COT (mg.L^{-1})	1.178,00±0,98	439,00±0,60	217,00±1,00	52.400,00±0,01
CI (mg.L^{-1})	11.300±0,07	152,00±0,77	195,00±0,28	368,00±1,17
CT (mg.L^{-1})	12.478,00±0,52	591,00±0,68	412,00±0,64	52.768,00±0,59

Como pode ser observado houve uma redução de aproximadamente 62,7% do COT após o processo de biodegradação e de 81,6% após o processo de sorção. Após a análise dos resultados de COT constatou-se que o consórcio de fungos é capaz de degradar a matéria orgânica da vinhaça com remoção de 62,7% e ainda degradar 98,7% de carbono inorgânico. A redução dos valores de CT e COT após a etapa de biodegradação também está de acordo com a ideia de decomposição de espécies ácidas, como ácidos carboxílicos, o que alteraria o pH originalmente ácido da vinhaça para valores de pH mais básicos. Nota-se ainda que a maior parte da matéria orgânica é

biodegradável para esse consórcio de fungos. O processo de sorção do bagaço contribui ainda para minimizar os valores de CT e COT, e, portanto minimizar o potencial poluente da vinhaça. O aumento de CI, CT e COT após a etapa de dessorção sugere que o próprio bagaço esteja contribuindo para liberação de carbono inorgânico e carbono orgânico no meio, sendo carbono orgânico a maior proporção de espécies liberadas.

6. CONCLUSÕES

Observou-se que consórcio de fungos composto por *Aspergillus niger* e *Rhizopus arrhizus* mostrou-se capaz de adaptar às substâncias tóxicas presentes na vinhaça. Essa adaptabilidade à toxicidade pode ser confirmada pelo crescimento de massa micelial em vinhaça pura, apresentando resultados promissores para o uso *in natura* da vinhaça. Estes resultados são motivadores, pois a biodegradação de vinhaça em seu estado *in natura* seria a melhor opção para um processo em escala industrial.

Foi verificado que o aumento da população do fungo é influenciado pela agitação do meio, provavelmente em função da aeração e do transporte de massa, uma vez que os fungos em sua maioria são aeróbios obrigatórios. Observou-se que a temperatura ideal de crescimento foi em torno de 30°C, tanto no meio de cultura contendo BD (batata e dextrose) quanto na vinhaça. Constatou-se que o tempo ótimo de biodegradação foi em torno de 7 dias.

Os fungos cresceram melhor em pH ácido e essa característica é positiva para o tratamento da vinhaça, cujo pH varia entre 4 e 5, sendo este um ótimo resultado para o tratamento deste efluente em suas condições naturais.

Ainda, verificou-se uma redução nos valores de DQO, cor, turbidez, condutividade, COT, potássio, cálcio, magnésio e sódio após o processo de biodegradação, e redução nos valores de DQO, cor, turbidez, condutividade, potássio, cálcio, magnésio e sódio após o processo de biodegradação.

Constatou-se que o bagaço possui capacidade sorvente para os elementos químicos K e Mg além de apresentar redução de turbidez, cor e condutividade. Foi evidenciado que os melhores resultados foram obtidos em geral com o emprego do bagaço seco, provavelmente porque as fibras foram alteradas pelo calor, podendo neste caso essa biomassa após sorção ser indicada como fertilizante.

Deste modo, a biodegradação com o consórcio de fungos *Aspergillus niger* e *Rhizopus arrhizus* combinada à sorção em bagaço de cana-de-açúcar uma técnica promissora para o tratamento deste rejeito da indústria sucroalcooleira, agregando valor à biomassa também proveniente deste setor de produção.

Adicionalmente, a vinhaça biodegradada também pode ser usada como fertilizante, pois apresenta uma redução dos parâmetros químicos ensaiados, reduzindo sua capacidade poluidora, mas mantendo suas propriedades químicas.

7. PERSPECTIVAS FUTURAS

- Ensaiar os microrganismos separadamente para identificar qual deles apresenta maior ação sobre o processo de biodegradação;
- Ensaiar a biodegradação com consórcio de fungos variando a quantidade de esporos de cada espécie;
- Identificar os subprodutos gerados nesta biodegradação que eventualmente poderiam estar contribuindo para o aumento da cor da amostra, inclusive os íons de ferro;
- Acompanhar a quantidade de compostos fenólicos durante a biodegradação;
- Acompanhar a presença de espécies ácidas, como ácidos carboxílicos;
- Avaliar a quantidade de chumbo presente na vinhaça;
- Aprofundar os estudos de sorção no bagaço, definindo se o mecanismo é de adsorção ou absorção;
- Aperfeiçoar os ensaios de biodegradação e de sorção, uma vez amostras de safras diferentes apresentaram resultados diferentes para os mesmos ensaios;
- Verificar a estrutura do bagaço após o tratamento térmico e sua influência na sorção dos elementos químicos;
- Trabalhar com bagaço diretamente da moagem da usina sucroalcooleira e também investigar a influência do tamanho do bagaço empregado
- Estudar a biodegradação da vinhaça suplementada e se isso influenciaria além do crescimento de massa micelial a processo de biodegradação;
- Estudar a biodegradação da vinhaça sem autoclavar para inferir se o aquecimento interfere na degradação da matéria orgânica biodegradável;
- Caracterizar e quantificar as enzimas envolvidas na biodegradação, uma vez que esses microrganismos são produtores de uma gama variada dessas biomoléculas;
- Dosar o açúcar redutor, que também é fonte de nutrientes para crescimentos dos microrganismos;
- Fazer ensaios com bagaço na água para ser possível estimar as quantidades iniciais presentes nesse substrato e sua contribuição nos processos de sorção e dessorção.

REFERÊNCIAS

ABABUTAIN, I.M. Effect of some ecological factors on the growth of *Aspergillus niger* and *Cladosporium sphaerospermum*. American Journal of Applied Sciences, Estados Unidos, 10, 159–163, 2013.

ABRASHEV, R.; DOLASHKA, P.; CHRISTOVA, R.; STEFANOVA, L.; ANGELOVA, M. Role of antioxidant enzymes in survival of conidiospores of *Aspergillus niger* 26 under conditions of temperature stress. Journal of Applied Microbiology, Estados Unidos, 99, 902–9, 2005.

ABRASHEV, R.; PASHOVA, S.B.; STEFANOVA, L.N.; VASSILEV, S.V.; DOLASHKA, P.A.A.; ANGELOVA, M.B. Heat-shock-induced oxidative stress and antioxidant response in *Aspergillus niger*. Canadian Journal of Microbiology, Canada, 54, 977–83, 2008.

BDULLAH-AL-MAHIN; SHARIFUZZAMAN, A.B.M.; FARUK, M.O.; KADER, M.A.; ALAM, J.; BEGUM, R. Improved citric acid production by radiation mutant *Aspergillus niger* using sugarcane bagasse extract. Journal of Biotechnology, Estados Unidos, 11, 44–9, 2012.

AGUIAR FILHO, J.M.M. Análise enzimática de fungos lignocelulolíticos cultivados em vinhaça e cana-de-açúcar. 2008. 79p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola), Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, 2008.

AGRAWAL, C.S., PANDEY, G.S. Soil pollution by spent wash discharge: depletion of manganese (II) and impairment of its oxidation. Journal of Environmental Biology; 15:49-53, 1994.

AISSAM, H.; ERRACHIDI, F.; PENNINCKX, M.J.; MERZOUKI, M.; BENLEMLIH, M. Production of tannase by *Aspergillus niger* HA37 growing on tannic acid and Olive Mill Waste Waters. World Journal of Microbiology and Biotechnology, Estados Unidos, 21, 609-614, 2005.

ALOMA, I.; MARTIN-LARA, M.A.; RODRIGUEZ, I.L.; BLAZQUEZ, G.; CALERO, M. Removal of nickel (II) ions from aqueous solutions by biosorption on sugarcane

bagasse. Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers, Taiwan , 43, 275–281, 2012.

AMIRI,F.;YAGHMAEI,S.;MOUSAVI,S.M.;SHEIBANI,S.Recovery of metals from spent refinery hydrocracking catalyst using adapted Aspergillus niger.Hydrometallurgy,Estados Unidos,109,65–71,2011.

AMINI,M.;YOUNESI,M.;BAHRAMIFAR,N.Statistical modeling and optimization of the cadmium biosorption process in an aqueous solution using Aspergillus niger.Colloids and Surfaces A,Estados Unidos,337:67–73,2009.

ANGAYARKANNI,J.PALANISWAMY,M.;SWAMINATHAN,K.Biotreatment of distillery effluent using Aspergillus niveus.Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology,Estados Unidos,70,268–277,2003.

ANDERSEN,M.R.;SALAZAR,M.P.;SCHAAP,P.J.;VONDERVOORT,P.J.I.;CULLEY,D.; THYKAER,J.Comparative genomics of citric acid-producing Aspergillus niger ATCC 1015 versus enzyme-producing CBS 513.88.Genome Research,Estados Unidos,21,885–97,2011.

APHA-AWWA.Standart methods for examination of water and wastewater.Washington: American Public Health Association – American Water works association,Washington, D.C.2012.

ARAGÃO,M.S.S.Tratamento da vinhaça com P. sajor-caju CCB020 em testes de bancada e reator air-lift. 2012.55p.Dissertação(Mestrado em Biotecnologia Industrial),Universidade de Tiradentes,Sergipe,2012.

ARDESTANI,F.,KASEBKAR,R.Non-structured kinetic model of Aspergillus niger growth and substrate uptake in a batch submerged culture.British Biotechnology Journal, Inglaterra,4,970,2014.

ASTORECA,A.;MAGNOLI,C.;DALCERO,A.Ecophysiology of Aspergillus section Nigri species potential ochratoxin A producers.Toxins, Estados Unidos,2,2593–2605,2010

BARBOSA, V. Novas tecnologias no uso da vinhaça e aspectos legais. In: MARQUES, M. O. et al., (Ed.) Tópicos em tecnologia sucroalcooleira. Jaboticabal: Unesp, 2006, 141-150p.

BASTEN, D. E. J. W., DEKKER, P. J. T., SCHAAPL, P. J. Amino-peptidase C of Aspergillus niger is a novel phenylalanine aminopeptidase. Applied and Environmental Microbiology, Estados Unidos, 69, 1246-1250, 2003.

BATISTA, E. C.; OLIVEIRA, R. T. S.; FERREIRA, R. Q.; MIWA, D.; SANTOS, M. C. Degradação eletroquímica da vinhaça usando eletrodo de diamante dopado com boro. Química Nova, São Paulo, 34(9), 1517-1520, 2011.

BATTISTELLE, R. A. G.; MARCILIO, C.; LAHR, F. A. R. Emprego do bagaço da cana-de-açúcar (Saccharum officinarum) e das folhas caulinares do bambu da espécie Dendrocalamus giganteus na produção de chapas de partículas. Minerva, Rio de Janeiro, 5(3), 297-305, 2008.

BERNARDO, E. C.; EGASHIRA, R.; KAWASAKI, J. Decolorization of molasses wastewater using activated carbon prepared from cane bagasse. Carbon, Estados Unidos, 35(9), 1217-1221, 1997.

BHAYSAR, K., KUMAR, V. R., KHIRE, J. M. High level phytase production by Aspergillus niger NCIM 563 in solid state culture: response surface optimization, upscaling, and its partial characterization. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, Estados Unidos, 38, 1407-1417, 2011.

BISUTTI, I.; HILKE, I.; RAESSLER, M. Determination of total organic carbon – an overview of current methods. Trends in Analytical Chemistry, Estados Unidos 23, 10-11, 716-726, 2004.

BLÀZQUEZ, G.; MARTIN-LARA, M. A.; DIONISIO-RUIZ, E.; TENORIO, G.; CALERO, M. Evaluation and comparison of the biosorption process of copper ions onto olive stone and pine bark. Journal of Industrial and Engineering Chemistry, Estados Unidos, 17, 824-833, 2011.

- BOGAR,B.;SZAKACS,G.;PANDEY,A.;ABDULHAMEED,S.;LINDEN, J.C.;TENDERDY, R.P.Production of phytase by Mucor racemosus in solid-state fermentation.Biotechnology Progress, Estados Unidos,19,312–319,2003.
- BONNER,J.T.A study of the temperature and humidity requirements of Aspergillus niger. Mycologia,Estados Unidos,40(6),728-738,1948.
- BRANDÃO,P.C.;SOUZA,T.C.;FERREIRA,C.A.;HORI,C.E.;ROMANIELO,L.L.Removal of Petroleum hydrocarbons from aqueous solution using sugarcane bagasse as adsorbent.Journal of Hazardous Materials;Estados Unidos,175,1106-1112,2010.
- CAMPOS,C.R;MESQUITA,V.A;SILVA,C.F;SCHWAN,R.F.Efficiency of physicochemical and biological treatments of vinasse and their influence on indigenous microbiota for disposal into the environment. Waste Management, Nova Iorque,34(11), 2036-2046,2014.
- CARG,U.;KAUR,M.P.;JAWA,G.K.; SUD,D.; GARG,V.K.Removal of cadmium (II) from aqueous solutions by adsorption on agriculture waste biomass,Journal of Hazardous Materials;Estados Unidos,154,1149–1157,2008.
- CARASCHI,J.C.Estudo das relações estrutura/propriedade de carboximetilcelulose obtida por derivação de polpa de bagaço de cana-de-açúcar.1997.188p.Tese(Doutorado em química) Instituto de Química de São Carlos,Universidade de São Paulo, São Carlos,1997.
- CARMO,J.B.;FILOSO,S.;ZOTELLI,L.C.;DE SOUZA NETO,E.R.;PITOMBO,L.M.; DUARTE-NETO,P.J.;VARGAS,V.P.;ANDRADE,C.A.;GAVA,G.J.;ROSSETTO,C.R; CANTARELLA,H.;NETO,A.E.;MARTINELLI,L.A.In:Fiel Green house gás emissions from sugarcane soils in Brazil: effects from synthetic and organic fertilizer application and crop trash accumulation. Global Change Biology Bioenergy,Oxford,5,3,267-280,2012.
- CARUSO,R.C.Análise da oferta e demanda de açúcar no estado de São Paulo.2002.79p. Dissertação(Mestrado em Ciências) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz. Universidade de São Paulo,Piracicaba,2002.

- CETESB(Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental).2015.Norma Técnica – P4.231/Nº045/C – Vinhaça Critérios e Procedimentos para Aplicação no Solo Agrícola.
- CHEHRI,J.Factors affecting the growth of biomass of Aspergillus niger.International Journal of Medical Science and Public Health,Estados Unidos,1,1–5,2013.
- CORAZZA,R.I.;SALLES-FILHO,S.Soluções tecnológicas para o problema da vinhaça nos anos 80: um estudo sobre a formação de uma trajetória tecnológica.In:DAGNINO,R.et al.(Org.)Jornadas Latino-Americanas de Estudos Sociais da Ciência e Tecnologia - IV ESOCITE,Campinas,SP:Unicamp,2000.
- CHRISTA,F.B.;THOMAS,B.Sorption of alkaline earth metal ions Ca²⁺ and Mg²⁺ on lyocell fibers,Carbohydrate Polymers;Estados Unidos,76,123–128,2009.
- CORRÊA,M.C.M.;CONSOLINI,F.;CENTURION,J.F.Propriedades químicas de um latossolo vermelho distrófico sob cultivo contínuo de cana-de-açúcar (Saccharum spp.).Acta Scientiarum, Maringá, 23,5,1159-63,2001.
- CORTEZ,L.A.B.;SILVA,A.;LUCAS JUNIOR,J.;JORDAN,R.A.;CASTRO,L.Biodigestão de efluentes.In:CORTEZ,L.A.B.;LORA,E.S.(Coord.).Biomassa para energia.Campinas:Editora da UNICAMP,15,493-529,2007.
- COURI,S.;TERZI,C.;SAAVEDRA,G.A.;PEREIRA,S.;CARLOS,A.Hydrolytic enzyme production in solid-state fermentation by Aspergillus niger 3T5B8.Process Biochemistry,Estados Unidos,36,255-261,2000.
- COULIBALY,L.;GERMAIN,G.;SPIROS,A.Utilization of fungi for biotreatment of raw wastewaters. African Journal of Biotechnology, Nairobi,2,12,620-630,2003.
- COURI,S.,TERZI,S.C.,PINTO,G.S.,FREITAS,S.P.,COSTA,A.C.A.Hydrolytic enzyme production in solid-state fermentation by Aspergillus niger 3T5B8.Process Biochemistry, Estados Unidos,36,255-261,2000.

CTC - Centro de Tecnologia Canavieira. Etanol de segunda geração. Disponível em: <http://<http://www.ctcanavieira.com.br/etanol2g.html>>. Acesso em :17 março 2016.

DAS,S.K.;BHOMAL,J.;DAS,A.R.;GUHA,A.K.Adsorption behavior of rhodamine B on Rhizopus oryzae biomass. Langmuir, Nova Iorque, 22,7265–7272,2006.

DAS,S.K.;GHOSH,P.;GHOSH,I.;GUHA,A.K.Adsorption of rhodamine B on Rhizopus oryzae: role of functional groups and cell wall components. Colloids and Surfaces B, Estados Unidos, 65,30–34,2008.

DEMATTE, J.L.I. O uso agrônômico de resíduos x fertilizantes na cultura de cana-de-açúcar. In: XX Reunião Brasileira de Fertilidade do solo e Nutrição de Plantas. Piracicaba. Anais e Simpósios. São Paulo. Fundação Cargill, 213-251, 1992.

DIAZ,L.F.;SAVAGE,G.M.;EGGERTH,L.I.;GOLUEKE,C.G.Composting and Recycling Municipal Solid Waste. 1st Ed. Boca Raton (USA): Lewis Publishers, 2003, 320p.

DIJKSTEHUIS,J.;WÖSTEN,H.A.B.Development of Aspergillus niger CBS-KNAW Fungal Biodiversity Centre. Colloids and Surfaces A, Estados Unidos, 74, 2013.

DUPONT,R.R.,BRUELL,C.J.MARLEY,M.C.DOWNEY,D.C.,NORRIS,R.D.,HULLIN G,S.;PIVETS,B.Bioremediation. American Academy of Environmental Engineers and USEPA, Annapolis, 596, 1997.

ELLIAIAH,P.;PRABHAKAR,T.;RAMAKRISHNA,B.;TALEB,A.T.;ADINARAYANA ,K.Production of lipase by immobilized cells of Aspergillus niger. Process Biochemistry, Estados Unidos, 5, 525–528, 2004.

ELIA NETO,A.Biodigestão da vinhaça com reator anaeróbio de manta de lodo. São Carlos, EESC/USP, 1988. 30p.

EMPRESA DE PLANEJAMENTO ENERGÉTICO (EPE). Caderno de Energia. Perspectivas para o etanol no Brasil, RJ, 2008.

ESPAÑA-GAMBOA,E.;MIJANGOS-CORTES,J.;BARAHONA-PEREZ,L.;DOMINGUEZ-MALDONADO,J.;HERNÁNDEZ-ZARATE,G.;ALZATE GAVIRIA,L.Vinasses: characterization and treatments.Waste Management & Research,Estados Unidos,29,1235-1250,2011.

FARINAS,C.S.,LOYO,M.M.,JUNIOR,A.B.,TARDIOLI,P.W.,NETO,V.B.,COURI,S.Fi nding stable cellulase and xylanase: evaluation of the synergistic effect of pH and temperature.New Biotechnology,Estados Unidos,27,810-815,2010.

FASANELLA,C.C.Ação das enzimas lignolíticas produzidas por Aspergillus niger e Penicillium sp. em bagaço de cana-de-açúcar tratado quimicamente.Dissertação(mestrado). 80p.Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz,2008.

FERREIRA,L.F.R.Biodegradação de vinhaça proveniente do processo industrial de cana-de-açúcar por fungos.2009.134p.Tese(Doutorado em Agronomia),Universidade de São Paulo, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz,São Paulo,2009.

FERREIRA,L.F.;AGUIAR, M.;POMPEU, G.;MESIAS,T.G.;MONTEIRO,R.R.Selection of vinasse degrading microorganisms.World Journal of Microbiology and Biotechnology,26, 1613-1621,2010.

FERREIRA,L.F.R.;AGUIAR,M.M.;MESSIAS,T.G.;POMPEU,G.B.;LOPEZ,A.M.Q.;SILVA,D.P.MONTEIRO,R.T.Evaluation of sugar-cane vinasse treated with Pleurotus sajor-caju utilizing aquatic organisms as toxicological indicators.Ecotoxicology and Environmental Safety,Estados Unidos,74,132–137,2011.

FERREIRA,J.A.,LENNATTSSON EDEBO,P.R.,TAHERZADEH,L.;Taherzadeh,M.J.Zygomycetesbased biorefinery: present status and future prospects. Bioresource Technology,Estados Unidos,135,523–532,2013.

FRANCISCO,G.A.Biodegradação da vinhaça resíduo da produção de etanol.Trabalho de conclusão(Ecologia).Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Rio Claro,Rio Claro-SP,2008.

FREIRE,W.J.;CORTEZ,L.A.B.Vinhaça de cana-de-açúcar.Guaíra:Livraria e Editora Agropecuária,2000.

FREITAS,A.C.Degradação de Vinhaça bruta com ozônio gerado eletroquimicamente.Uberlândia.2009.70p.Dissertação(Mestrado).Instituto de Química.Universidade Federal de Uberlândia,Uberlândia,2009.

FU,Y.;VIRARAGHAVAN,T.Fungal decolorization of dye wastewaters: a review.Bioresource Technology,Estados Unidos,79,251–262,2001.

GARCÍA,I.C.;VENCESLADA,B.;PEÑA,P.R.J.;GÓMEZ, E.R.Biodegradation of phenol compounds in vinasse using Aspergillus terreus and Geotrichum candidum, Water Research, Estados Unidos,31,8,2005-2011,1997.

GARCIA-GARCIA,I.;JIMENEZ-PEÑA,P.R.;VENCESLADA-BONILLA,J.L.;MARTÍN-MARTÍN,A.;MARTÍN-SANTOS,M.A.;RAMOS-GOMEZ,E.Removal of phenol compounds from olive mill wastewater using Phanerochaete chrysosporium, Aspergillus niger, Aspergillus terreus.Process Biochemistry,Estados Unidos,35,751-758,2000.

GARRIDO-HOYOS,S.E.;MARTINEZ-NIETO,L.;CAMACHO-RUBIO,F.;RAMOS-CORMENZANA,A.Kinetics of aerobic treatment of olive-mill wastewater (OMW) with Aspergillus terreus. Process Biochemistry,Estados Unidos,37,1169-1176,2002.

GAUTAM,A.;AVASTHI,S.;SHARMA,A.;BHADAURIA,R.Efficacy of Triphala Churn ingredients against A. niger and potential of clove extract as herbal fungitoxicant.Biology and Medicine,Estados Unidos,2,1–9,2010.

GOKARN,A.N.;MAYADEVI,S.Active charcoal from agro-waste for colour removal of treated spentwater. In: ANNUAL CONVENTION OF D.S.T.A., Pune.Proceedings.pt.1,p.B1-B10,2000.

GOMES,M.T.M.S.,EÇA,K.S.,VIOTTO,L.A.Concentração da vinhaça por microfiltração seguida de nanofiltração com membranas. Pesquisa Agropecuária Brasileira,Brasilia,46 (6),633-638,2011.

GONZÁLEZ, T.; TERRÓN, M.C.; YAGÜE, S.; ZAPICO, E.; GALLETI, G.C.; GONZÁLEZ, A.E. Pyrolysis/gas chromatography/mass spectrometry monitoring of fungal-biotreated distillery wastewater using *Trametes* sp. I-62(CECT 20197). *Rapid communications in mass spectrometry*, Malden, 14, 15, 1417-1424, 2000.

GRANATO, E.F.; SILVA, L.C. Geração de energia elétrica a partir do resíduo vinhaça. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Industrial - UNESP – Universidade Estadual Paulista, Bauru SP, 2002.

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

HAMA, S.; YAMAJI, H.; FUKUMIZU, T.; NUMATA, T.; TAMALAMPUDI, S. KONDO, A. Biodiesel fuel production in a packed-bed reactor using lipase-producing *Rhizopus oryzae* cells immobilized within biomass support particles. *Biochemical Engineering Journal*, Estados Unidos, 3, 273–8, 2006.

HASSOUNI, H.; ISMAILI-ALAOUI, M.; LAMRANI, K.; GAIME PERRAUD, I.; AUGUR, C., ROUSSOS, S. Comparative spore germination of filamentous fungi on solid state fermentation under different culture conditions. *Mycology Applied International*, Estados Unidos, 19, 7–14, 2007.

HAMA, S.; TAMALAMPUDI, S.; FUKUMIZU, T.; MIURA, K.; YAMAJI, H.; KONDO, A.M. Lipase localization in *Rhizopus oryzae* cells immobilized within biomass support particles for use as whole-cell biocatalysts in biodiesel-fuel production. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, Estados Unidos 4, 328–33, 2006.

HOMAGAI, P.L.; GHIMIRE, K.N.; INOUE, K. Adsorption behavior of heavy metals onto chemically modified sugarcane bagasse. *Bioresource Technology*, Estados Unidos, 101, 2067–2069, 2010.

HUGOT, E. Handbook of Sugar Cane Engineering. 2nd Ed. Amsterdam: Elsevier, 1972, 388p.

JIMENEZ, A.M.; BORJA, R. MARTIN, A. Aerobic–anaerobic biodegradation of beet molasses alcoholic fermentation wastewater. *Process Biochemistry*, Estados Unidos, 38, 1275–1284, 2003.

JUODEIKIENE, G.; VIDMANTIENE, G.; BASINSKIENE, L.; CERNAUSKAS, D.; JUODEIKIENE, G.; VIDMANTIENE, D.; BASINSKIENE, L.; CERNAUSKAS, D.; BARTKIENE, E.; CIZEIKIENE, D. Green metrics for sustainability of biobased lactic acid from starchy biomass vs chemical synthesis. *Catalysis Today*, Maringá, 239, 11–16, 2015.

KANNAN, A.; UPRETI, R.K. Influence of distillery effluent on germination and growth of mung bean (*Vigna radiata*) seeds. *Journal of Hazardous Materials*, Estados Unidos, 153(1-2), 609–615, 2008.

KAPOOR, A.; VIRARAGHAVAN, T. Heavy metal biosorption sites in *Aspergillus niger*. *Bioresource Technology*, Estados Unidos, 61, 221–7, 1997.

KAPOOR, A.; VIRARAGHAVAN, T.; CULLIMORE, D.R. Removal of heavy metals using the fungus *Aspergillus niger*. *Bioresource Technology*, Estados Unidos, 70, 95–104, 1999.

KUMAR, S.; GOPAL, K. Impact of distillery effluent on physiological consequences in the freshwater teleost *Channa punctatus*. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, Estados Unidos, 66, 617–622, 2001.

KUMAR, V.; WATI, L.; NIGAM, P.; BANAT, I.M.; YADAV, B. S.; SINGH, D.; MARCHANT, R. Decolorization and biodegradation of anaerobically digested sugarcane molasses spent wash effluent from biomethanation plants by white-rot fungi. *Process Biochemistry*, Oxford, 33, 83–88, 1998.

KUMAR, P.; BARRETT, D.M.; DELWICHE, M.J.; STROEVE, P. Methods for pretreatment of lignocellulosic biomass for efficient hydrolysis and biofuel production. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, Estados Unidos, 48, 3713 – 3729, 2009.

KUO, Y.C.; YUAN, S.F.; WANG, C.A.; HUANG, Y.J.; GUO, G.L.; HWANG, W.S. Production of optically pure L-lactic acid from lignocellulosic hydrolysate by using a newly

isolated and D lactate dehydrogenase gene-deficient Lactobacillus paracasei strain. Bioresource Technology, Estados Unidos, 198, 651–657, 2015.

LAIME, E.M.O.; FERNANDES, P.D.; OLIVEIRA, D.C.S.; FREIRE, E.A.; Technological possibilities for the disposal of vinasse: a review. Revista Trópica: Ciências Agrárias e Biológicas, Maranhão, 5, 16–29, 2011.

LIU, Y.G.; FAN, T.; ZENG, G.M.; LI, X.; TONG, Q.; YE, F. Removal of cadmium and zinc ions from aqueous solution by living Aspergillus niger. Transactions of Nonferrous Metals Society of China, China, 16, 681–6, 2006.

LIAO, W.; LUI, Y.; FREAR, C.; CHEN, S. A new approach of pellet formation of a filamentous fungus – Rhizopus oryzae. Bioresource Technology, Estados Unidos, 98, 3415–3423, 2007.

LYRA, M.R.C.C.; ROLIM, M.M.; SILVA, J.A.A. Toposequência de solos fertirrigados com vinhaça: contribuição para a qualidade das águas do lençol freático. Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental, Campina Grande, 7, 3, 525–532, 2003.

LOPES, F.C.; DEDAVID & SILVA, L.A.; TICHOTA, D.M.; DAROIT, D.J.; VELHO, R. V.; PEREIRA, J.Q.; CORRÊA, A.P.F.; BRANDELLI, A. Production of proteolytic enzymes by a keratin-degrading Aspergillus niger. Enzyme Research, Estados Unidos, 487093, 2011.

MARCILLA, A.; BELTRÁN, M.I.; NAVARRO, R. Application of TG/FTIR to the study of the regeneration process of HUSY and HZSM5 zeolites. Journal of Thermal Analysis and Calorimetry, Estados Unidos, 87, 325–330, 2007.

MATEESCU, C.; BURUNTEA, N.; STANCU, N. Investigation of Aspergillus niger growth and activity in a static magnetic flux density field. Romanian Biotechnological Letters, Roma, 16, 6364–6368, 2011.

MA, B.; XU, M.; WANG, J.; CHEN, H.; HE, Y.; WU, L.; WANG, H.; XU, J. Adsorption of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) on Rhizopus oryzae cell walls: application of cosolvent models for validating the cell wall-water partition coefficient. Bioresource Technology, Estados Unidos, 102, 10542–10547, 2011.

MACHADO, K.M.G. Biodegradação de Pentaclorofenol por fungos basidiomicetos lignocelulolíticos em solos contaminados com resíduos industriais. 1998. 172p. Tese (Doutorado em Microbiologia Agrícola) – Instituto de Biociências do campus de Rio Claro. Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 1998.

MAGYAROSY, A.; LAIDLAW, R.; KILAAS, R.; ECHER, C.; CLARK, D.S.; KEASLING, J.D.; Nickel accumulation and nickel oxalate precipitation by *Aspergillus niger*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, Estados Unidos, 59, 382–388, 2002.

MADEJÓN, E.; BURGOS, P.; MURILLO, J.M.; CABRERA, F. Phytotoxicity of organic amendments on activities of select soil enzymes. *Communications in soil science and plant analysis*, Estados Unidos, (13-14), 2227-2239, 2001.

MADRID, L.; DÍAZ-BARRIENTOS, E. Release of metals from homogeneous soil columns by wastewater from an agricultural industry. *Environmental Pollution*, Estados Unidos, 101, 43-48, 1998.

MALL, I.D.; KUMAR, V. Removal of organic matter from distillery effluent using low cost adsorbent. *Chemical Engineering World*, Estados Unidos, 7, 89–96, 1997.

MANDAL, A.; OJHA, K.; GHOSH, D.N. Removal of color from distillery wastewater by different processes. *Indian Chemical Engineer Section B* 45, India, 4, 264–267, 2003.

MARQUES, M.O. Aspectos técnicos e legais da produção, transporte e aplicação de vinhaça.

In: SEGATO, S.V.; PINTO, A.S.; JENDIROBA, E.; NÓBREGA, J.C.M. Atualização em produção de cana-de-açúcar. Piracicaba: Editorial 2006, 369-375p.

MAPA – MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. Cana-de-açúcar. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/vegetal/culturas/cana-de-acucar/>. Acesso 17 junho 2014.

MARTÍN, M.A.; RAPOSO, F.; BORJA, R.; MARTÍN, A. Kinetic Study of Anaerobic Digestion of Vinasse Pretreated with Ozone, Ozone plus Ultraviolet Light and Ozone plus Ultraviolet Light in the Presence of Titanium Dioxide. *Process Biochemistry*, Estados Unidos, 37, 699-706, 2002.

MELO,A.S.deA.;SILVA,M.P.Estimando o valor da externalidade positiva do uso da vinhaça na produção de cana-de-açúcar: estudo de caso. In: IV ENCONTRO ECO GESTÃO AMBIENTAL:ESTADOS, EMPRESAS E ONGs, 2001, Belém-PA.Anais da Sociedade Brasileira de Economia Ecológica.Belém-PA,2001.

MICHELLON,E.;SANTOS,A.A.L.;RODRIGUES,J.R.A.Breve descrição do proálcool e perspectivas futuras para o etanol produzido no Brasil.In:XLVI CONGRESSO SOCIEDADE BRASILEIRA DE ECONOMIA, ADMINISTRAÇÃO E SOCIOLOGIA RURAL, 2008, Rio Branco.Anais da Sociedade Brasileira de Economia, Administração e Sociologia Rural. Brasília: SOBER, 2008.

MIRANDA,P.M.;BENITO.G.G.;CRISTOBAL,N.S.;NIETO,C.H.; Color elimination from molasses wastewater by Aspergillus niger. Bioresource Technology,Estados Unidos, 57,229–235, 1996.

MITIDIERI,S.;MARTINELLI,A.H.S.;SCHRANK,A.;VAINSTEIN,M.H.Enzymatic detergent formulation containing amylase from Aspergillus niger: a comparative study with commercial detergent formulations.Bioresource Technology,Estados Unidos,97,1217-1224,2006.

MOHAMMAD,P.;AZARMIDOKHT,H.;FATOLLAH,M.;MAHBOUBEH,B.Application of response surface methodology for optimization of important parameters in decolorizing treated distillery wastewater using Aspergillus fumigatus UB2.60.International Biodeterioration & Biodegradation,Estados Unidos,57,195–199,2006.

OHMOMO,S.;KANEKO,Y;SIRIANUNTAPIBOON,S.;SOMCHAL,P.;ATTHASAMPUNNA,P.;NAKAMURA,I.Decolorization of molasses wastewater by a thermophilic strain, Aspergillus fumigatus G-2-6.Agricultural and Biological Chemistry,51:3339–3346,1987.

MOUBARIK,A.;GRIMI,N.Valorization of olive stone and sugar cane bagasse by-products as biosorbents for the removal of cadmium from aqueous solution.Food Research International, Estados Unidos,73,169–175,2015.

MOHANA,S.;ACHARYA,B.K.;MADAMWAR,D.Distillery spent wash: treatment technologies and potential applications, Journal of Hazardous Materials, Estados unidos,163,12–25,2009.

MORIMOTO,L.H.Aplicação de luz UV solar associada com peróxido de hidrogênio no tratamento da vinhaça.Periódico Eletrônico.Fórum Ambiental da Alta Paulista, São Paulo, 9,11,2013.

MOURA,A.G.;MEDEIROS,J.R.Applying consistent technology for fuel ethanol production. Sugar Tech Journal; Estados Unidos, 10,20–24, 2008.

MOTA,V.T.;SANTOS,F.S;AMARAL,M.C.S.Two-stage anaerobic membrane bioreactor for the treatment of sugarcane vinasse: Assessment on biological activity and filtration performance.Bioresource Technology,Estados Unidos,146,494–503,2013.

MOGENSEN,J.;NIELSEN,K.;SAMSON,R.;FRISVAD,J.;THRANE,U.Effect of temperature and water activity on the production of fumonisins by Aspergillus niger and different Fusarium sp.BMC Microbiology,Estados Unidos,9,281,2009.

MORYA,V.K.;YADAY,S.;KIM,E.;YADAY,D.In silico characterization of alkaline proteases from different species of Aspergillus.Applied Biochemistry and Biotechnology,Estados Unidos,166,243-257,2012.

MURPHY,R.J.;LEVI,J.F.Production of copper oxalate by some copper tolerantfungi, Transactions of the British Mycological Society,Inglaterra,54:165–168,1983.

MUDHOO,A.;GARG,V.K.;WANG,S.Removal of heavy metals by biosorption. Environmental Chemistry Letters,Estados unidos,10,109–11,2012.

NAIK,N.M.;JAGADEESH,K.S.;ALAGAWADI,A.R.Microbial decolorization of spentwash: a review.Indian Journal of Microbiology,Nova Dheli,48: 41-48,2008.

NAVARRO,A.R.;SEPÚLVEDA,M.C.,RUBIO,M.C.Bio-Concentration of Vinasse from the Alcoholic Fermentation of Sugar Cane Molasses.Waste Management,Estados Unidos, 20,581-583, 2000.

NUSSIO, L.G. Efeitos de níveis de concentrado sobre o desempenho de bovinos e digestibilidade de dietas a base de bagaço de cana-de-açúcar (*Saccharum sp L.*) tratado sob pressão de vapor. 1993. 147p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1993.

ÖNGEN, G.; GÜNGÖR, G.; KANBEROĞLU, B. Decolourisation and dephenolisation potential of selected *Aspergillus niger* strains and *Aspergillus tubingensis* in olive mill wastewater. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, Estados Unidos, 23, 519-524, 2007.

OHNISHI, K.; YOSHIDA, Y.; SEKIGUCHI, J. Lipase production of *Aspergillus oryzae*. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, Estados Unidos, 5, 490-495, 1994.

OLADIRAN, A.; IWU, L. Studies on the fungi associated with tomato fruit rots and effects of environment on storage. *Mycopathologia*, Estados Unidos, 121, 157-161, 1993.

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

OLIVEIRA, F.C.; MATIAZZO, M.E.; MARCIANO, C.R.; ROSSETO, R. Efeitos de aplicações sucessivas de lodo de esgoto em Latossolo Amarelo distrófico cultivado com cana-de-açúcar: carbono orgânico, condutividade elétrica, pH e CTC. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, Campinas – SP, 26(3), 505-519, 2002.

PAPAGIANNI, M.; MATTEY, M. Morphological development of *Aspergillus niger* in submerged citric acid fermentation as a function of the spore inoculum level. Application of neural network and cluster analysis for characterization of mycelial morphology. *Microbial Cell Factories*, Estados Unidos, 5, 3, 2006.

PARNAUDEAU, V.; CONDOM, N.; OLIVER, R.; CAZEVIEILLE, P.; RECOUS, S. Vinasse organic matter quality and mineralization potential, as influenced by raw material, fermentation and concentration processes. *Biorecourse Technology*, Estados Unidos, 99, 1553-1562, 2008.

PASSOS,V.F.;AQUINO NETO,S;DE ANDRADE,A.R;REGINATTO,V.Célula a combustível microbiana com um consórcio de microrganismos utilizados no tratamento de vinhaça. In: XX CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA QUÍMICA.Florianópolis-SC,2014.

PENDYAL,B.;JOHNS,M.M.;MARSHALL,W.E.;AHMEDNA,M.;RAO,R.M.Removal of sugar colorants by granular activated carbons made from binders and agricultural by-products. Bioresource Technology Journal, Estados Unidos,69,45-51,1999.

PEREIRA,S.Y.Impactos da aplicação da vinhaça na água subterrânea.In:HAMADA,E.(Ed.). Água, agricultura e meio ambiente no Estado de São Paulo: avanços e desafios. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente,2003.Cap. II.1 CD.

PEREIRA,T.S.;FAEZ,R.;FERRAZ,M.R.Microesferas de Quitosana/Bagaço de cana-de-açúcar aplicadas na sorção de nutrientes.In: 38ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química,2015.Águas de Lindóia,São Paulo. Anais da Sociedade Brasileira de Química,São Paulo, 2015.p.110.

PETROBRÁS BIOCOMBUSTÍVEL.Produção de biocombustível.Disponível em: <// <http://sites.petrobras.com.br/minisite/petrobrasbiocombustivel/>>.Acesso em: 17 junho 2014.

PIACENTE,F.J.Agroindústria Canavieira e o Sistema de Gestão Ambiental: o caso das usinas localizadas nas Bacias Hidrográficas dos rios Piracicaba, Capivari e Jundiaí.2005.181p. Dissertação(Mestrado em Desenvolvimento Econômico) – Universidade Estadual de Campinas,Campinas, 2005.

PITT,J.I.;HOCKING,A.D.Fungi and Food Spoilage(1985), Academic Press,Sydney. 2nd Ed. London: Blackie Academic & Professional Publishers, 1997.

ProCana Brasil. Setor sucroalcooleiro: um dos grandes negócios do País. Disponível em: <//<http://www.jornalcana.com.br/procana-brasil/>>Acesso em:17 jun. 2015.

RAMACHANDRAN,S.;ROOPESH,K.;NAMPOOTHIRI,K.M.;SZAKACS,G.;PANDE Y,A.Mixed substrate fermentation for the production of phytase by Rhizopus spp. using oilcakes as substrates.Process Biochemistry,Estados Unidos,40,1749–1754,2005.

REIN,P.W.Prospects for the conversion of a sugar mill into a biorefinery.In:XXVI International Society of Sugarcane Technologists Congress, South Africa.Proceedings,44-60, 2007.

RIBAS,M.M.F.Tratamento de vinhaça em reator anaeróbio operando em batelada sequencial contendo biomassa imobilizada sob condições termofílicas e mesofílicas.2007.175p.Tese (Doutorado em Hidráulica e Saneamento)Universidade de São Paulo,São Carlos,2007.

RIBEIRO,B.;LIMA,J.;GUILHERME,L.G.;JULIÃO,L.F.;Lead sorption and leaching from an Inceptisol sample amended with sugarcane vinasse.Scientia Agricola, Piracicaba, Brasil, 67,441–7, 2010.

ROBLES-GONZALEZ,V.;GALINDEZ-MAYER,J.;RINDERKNECHT SEIJAS,N.;POGGI-VARALDO,H.M.Treatment of mezcal vinasses: A review.Journal of Biotechnology,Estados Unidos,157,524–546,2012.

ROA ENGEL,C.;STRAATHOF,A.J.;ZIJLMANS,T.;van GULIK,W.;van der WIELEN,L.M; Fumaric acid production by fermentation.Applied Microbiology and Biotechnology,Estados Unidos,78,379–389,2008.

SALGADO,J.M.;ABRUNHOSA,L.;VENÂNCIO,A.;DOMÍNGUEZ,J.M.;BELO,I.Com bined bioremediation and enzyme production by Aspergillus sp. In:OLIVE MILL AND WINERY WASTEWATERS.International Biodeterioration & Biodegradation,Estados Unidos,110,16-23,2016.

SAMSON,R.A.;HOUBRAKEN,J.;KUIJPERS,A.F.;FRANK,J.M.;FRISVAD,J.C.New ochratoxin A or sclerotium producing species in Aspergillus niger section.Studies in Mycology,Estados Unidos,50,45–61,2004.

SANTANA,M.A.E.;TEIXEIRA,D.E.Uso do bagaço de cana-de-açúcar na confecção de chapas de aglomerados. In: CONGRESSO FLORESTAL BRASILEIRO,7.CONGRESSO FLORESTAL PANAMERICANO,1.1993.Curitiba.Floresta para o desenvolvimento: política,

ambiente, tecnologia e mercado. Anais da sociedade brasileira de sociologia/ sociedade brasileira de engenheiros florestais(SBS/SBEF), São Paulo,1993,p.667-672.

SANTANA,V.S.;FERNANDES-MACHADO,N.R.C.Photocatalytic degradation of the vinasse under solar radiation.Catalysis Today Revista Elsevier, Maringá,133:606-610,2008.

SANTHIYA,D.;TING,Y.P.Use of adapted Aspergillus niger in the bioleaching of spent refinery processing catalyst.Journal of Biotechnology,Estados Unidos,121,62–74,2006.

SANTOS,T.M.C.;SANTOS, M.A.L.; SANTOS, C.G.; SANTOS, V.R. Efeito da fertirrigação com vinhaça nos microrganismos do solo.Revista Caatinga,Rio Grande do Norte,22,155–160, 2009.

SCHUMACHER,B.A.Methods for the determination of total organic carbon (TOC) in soils and sediments.Ecological Risk Assessment Support Center.US.Environmental Protection Agency,23,2002.

SCHUSTUR,E.;DUNN-COLEMAN,N.;FRISVAD,J.;VAN DIJCK,P.On the safety of Aspergillus niger a review.Applied Microbiology and Biotechnology,Estados Unidos, 59,426–435,2002.

SENGIK,E.; RIBEIRO,A.C.;CONDÉ,A.R.Efeito da vinhaça em algumas propriedades de amostras de dois solos de Viçosa, MG.Revista Brasileira de Ciência do Solo,Campinas; 12:1,11-15,1988.

SEKAR,D.;MURTHY,D.V.S.Color removal of distillery spentwash by adsorption technique. Indian Chemical Engineer, Section A 40,India,4,176–181,1998.

SHAYEGAN,J.;PAZOUKI,M.;AFSHARI,A.Continuous decolorization of anaerobically digested distillery wastewater.Process Biochemistry,Estados Unidos,40,1323–1329,2004.

SHARMA,R.Pathogenicity of Aspergillus niger in plants.CIB.Tech Journal of Microbiology,Estados Unidos,1,47–51,2012.

SHEHU,K.;BELLO,M.Effect of environmental factors on the growth of Aspergillus species associated with stored millet grains in Sokoto.Nigerian Journal of Basic and Applied Sciences, África,19(2), 218-223,2011.

SIMARATANAMONGKOL,A.;THIRAVETYAN,P.Decolorization of melanoidin by activated carbon obtained from bagasse bottom ash. Journal of Food Engineering 96,14-17, 2010.

SILES,J.A.;MARTÍN,M.A.;CHICA,A.F.;MARTÍN,A.Anaerobic co-digestion of glycerol and wastewater derived from biodiesel manufacturing.Bioresource Technology,Estados Unidos 101,6315–632,2010.

SILVA,G.M.A.;ORLANDO FILHO,J.Caracterização da composição química dos diferentes tipos de vinhaça no Brasil.Boletim Técnico PLANALSUCAR,Piracicaba,3(8),5-22,1981.

SILVA,M.A.S.;GRIEBELER,N.P.;BORGES,L.C.Uso de vinhaça e impactos nas propriedades do solo e lençol freático.Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental, Campina Grande - PB,1(1),108–114,2007.

SILVA,V.L.Estudo econômico das diferentes formas de transporte de vinhaça em fertirrigação na cana-de-açúcar.2009.54p.Dissertação(Mestrado em Agronomia) - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho,Jaboticabal, 2009.

SILVA,C.E.C.Avaliação dos Condicionantes Ambientais na Perspectiva de Expansão da Produção de Etanol no Brasil.Dissertação(Mestrado)112p.Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ, COPPE - Programa de Planejamento Energético,Rio de Janeiro, RJ,2010.

SILVA,W.L.L.;OLIVEIRA,S.P.Modification of the sorptive characteristics of sugarcane bagasse for removing methylene blue from aqueous solutions.Scientia Plena, Sergipe, 8,9,2012.

SILVA,E.A.Aspergillus niger e Glomus clarum incrementam a disponibilidade de fosforo em Latossolos sob Urochloa brizantha.2012.94p.Tese(Doutorado em

Engenharia) Universidade Estadual Paulista. Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira. Especialidade: Sistemas de Produção, 2012.

SIQUEIRA, L.M. Influência da taxa de carregamento orgânico na degradação anaeróbia da vinhaça em reator de leito fluidizado. 2008. 130p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2008.

SIRIANUNTAPIBOON, S.; PHOTHILANGKA, P.; OHMOMO, S. Decolorization of molasses wastewater by a strain No. BP103 of acetogenic bacteria. *Bioresource Technology*, Estados Unidos, 92, 31–39, 2004.

SIRIANUNTAPIBOON, S.; SIHANONTH, P.; SOMCHAI, P.; ATTHASAMPUNNA, P.; HAYASHIDA, S. An Absorption Mechanism for the Decolorization of Melanoidin by Rhizoctonia sp. D-90. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, Estados Unidos, 59 (7), 1185–1189, 1995.

SOLIMAN, E.M.; AHMED, S.A.; FADL, A.A. Removal of calcium ions from aqueous solutions by sugar cane bagasse modified with carboxylic acids using microwave-assisted solvent-free synthesis. *Desalination*, Estados Unidos, 278, 18–25, 2011.

SOUZA, R.P.; GIRARDI, F.; SANTANA, V.S.; FERNANDES MACHADO, N.R.C.; GIMENES, M.L. Vinasse treatment using a vegetable-tannin coagulant and photocatalysis. *Acta Scientiarum*, Maringá, 35, 89–95, 2013.

STRONG, P.; BURGESS, J.E. Fungal and enzymatic remediation of a wine lees and five wine-related distillery wastewaters. *Bioresource Technology*, Estados Unidos, 99, 6134–6142, 2008.

SUGIURA, M.; HIRAI, H.; NISHIDA, T. Purification and characterization of a novel lignin peroxidase from white-rot fungus *Phanerochate sordid* YK-624. *FEMS Microbiology Letters*, Amsterdam, 224, 285–290, 2003.

SZYMANSKI, M.S.E.; BALBINOT, R.; SCHIRMER, W.N. Biodigestão anaeróbica da vinhaça: aproveitamento energético do biogás e obtenção de créditos de carbono – estudo de caso. *Semina: Ciências Agrárias*, Londrina – PR, 31, 901–912, 2010.

TAHIR,H.;SULTAN,M.;AKHTAR,N.;HAMEED,U.;ABID,T.Application of natural and modified sugar cane bagasse for the removal of dye from aqueous solution. Journal of Saudi Chemical Society, Arábia Saudita,2012.

TAO,H.C.;ZHANG,H.R.;LI,J.B.;DING,W.Y.Biomass based activated carbon obtained from sludge and sugarcane bagasse for removing lead ion from wastewater.Bioresource Technology, Estados Unidos,192,611–617,2015.

TEIXEIRA,F.A.;PIRES,A.V.;NASCIMENTO,P.V.N.Bagaçõ de cana-de-açúcar na alimentação de bovinos.REDVET-Revista eletrônica de Veterinária.Volume VIII,Nº6,2007.

THITIPRASERT,S.;SOOKSSAIS;THONGCHUL,N.1,2-Diazole and 2,2,2-trifluoroethanol and their inhibitory effects on ethanol and lactic acid formation in the living culture of Rhizopus oryzae.Applied Biochemistry and Biotechnology,Estados Unidos, 172,1673–1686,2014.

THITIPRASERT,S.;SOOKSSAIS;THONGCHUL,N.The in vivo regulation of alcohol dehydrogenase and lactate dehydrogenase in Rhizopus oryzae to improve lactic acid fermentation.Applied Biochemistry and Biotechnology,Estados Unidos,164,1305–1322, 2011.

THONGCHUL,K.Production of lactic acid and polylactic acid for industrial applications.In: YANG,S.T.;EL ENSHASY,H.A.;THONGCHUL,N.(Eds.).Bioprocessing Technologies in Biorefinery for Sustainable Production of Fuels,Chemicals,and Polymers,John Wiley & Sons, New Jersey,293–316,2013.

TONDEE,T.;SIRIANUNTAPIBOON,S.;OHMONO,S.Decolorization of molasses wastewater by yeast strain, Issatchenkia orientalis N°SF9-246.Applied Biochemistry and Biotechnology, Estados Unidos,99,5511-5519,2008.

UNICA - UNIÃO DA INDÚSTRIA DE CANA-DE-AÇÚCAR.Geração descentralizada de emprego e renda.Disponível em: <http://www.portalunica.com.br/portalunica>. Acesso em: 19 fevereiro de 2016.

VACCARI, G.; TAMBURINI, E.; SGUALDINO, G.; URBANIEE, K.; KLEMES, J. Overview of the environmental problems in beet sugar processing: possible solutions. Journal of Cleaner Production, Estados Unidos, 13, 499-507, 2005.

van HAANDEL, A.C. Integrated energy production and reduction of environmental impact at alcohol distillery plants. Water Science and Technology, Estados Unidos, 52(1-2), 49-57, 2005.

VALIX, M.; CHEUNG, W.H.; ZHANG, K. Textural and surface chemistry of activated bagasse and its role in the removal of chromium ions from solution. Adsorption, Australia, 14, 711-718, 2008.

VELAZQUEZ-JIMENEZ, L.H.; PAVLICK, A.; RANGEL-MENDEZ, J.R. Chemical characterization of raw and treated agave bagasse and its potential as adsorbent of metal cations from water. Estados Unidos, 43:200-206, 2013.

VITALI, V.M.V.; KIYAN, C. Bioconversion of sugar cane and citrus vinasse by four Aspergillus species. International Biodeterioration & Biodegradation, Estados Unidos, 37, 113-113, 1996.

VIVE, V.A.; RIZK, M.C.; ALMEIDA, P.M.A. Aplicação do coagulante tanino no tratamento da vinhaça em pH neutro. Periódico eletrônico Fórum Ambiental da Alta Paulista Saúde Saneamento e Ambiente, São Paulo, 9, 11, 2013.

VON SPERLING, M. Princípios básicos do tratamento de esgotos - Princípios do tratamento biológico de águas residuárias. Belo Horizonte, UFMG, 2, 1996.

WAAL, A.; JIMÉNEZ-RUEDA, J.R.; BONOTTO, D.M.; BERTELLI, C.; HOFFMANN, H.M.; FOBHAG, E.; SANTILLI, M. Influence of the vinasse application in sugar cane fields in Patrocínio Paulista. São Paulo State, Brazil. In: BREBIA, C.A. (Ed.). Environmental Health Risk V. Southampton: WIT Press. p. 113-124. 2009.

WADT, L.C. Cultivo de Pleurotus spp. Em vinhaça visando à produção de biomassa e exopolissacarídeo. 2008. 72p. Dissertação (Mestrado em Biologia na agricultura e no ambiente). Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2008.

WALISZEWSKI,K.N.;ROMERO,A.;PARDIO,V.T.Use of cane condensed molasses solubles in feeding broilers.Animal Feed Science and Technology, Estados Unidos,67,253-258,1997.

ZAYAS,T.;RÓMERO,V.;SALGADO,L.;MERAZ,M.;MORALES,U.Applicability of coagulation/flocculation and electrochemical processes to the purification of biologically treated vinasse effluent.Separation and Purification Technology:Revista Elsevier,Mexico, 57,270-276,2007.

ZHANG,Z. Y.;JIN,B.;KELLY,J.M.Production of lactic acid from renewable materials by Rhizopus fungi. Biochemical Engineering Journal,Estados Unidos,35,251–263,2013.

ZHOU, Y.;DU,J.;TSAO,G.Mycelial pellet formation by Rhizopus oryzae ATCC 20344. Applied Biochemistry and Biotechnology,Estados Unidos,84–86,779–789,2000.

ZOLIN,C.A.;PAULINO,J.;BERTONHA,A.;De FREITAS,P.S.L.;FOLEGATTI,M.V.Estudo exploratório do uso da vinhaça ao longo do tempo. I. Características do solo.Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental,Campina Grande,15(1),22–28,2011.