



LAÍSA MARIA SIMONETTI MENDONÇA

**PRODUÇÃO DE BIOMASSA MICROALGAL CULTIVADA
EM VINHAÇA E ÁGUA
RESIDUÁRIA DE USINA DE CANA-DE-AÇÚCAR**

**LAVRAS – MG
2024**

LAÍSA MARIA SIMONETTI MENDONÇA

**PRODUÇÃO DE BIOMASSA MICROALGAL CULTIVADA EM VINHAÇA E
ÁGUA RESIDUÁRIA DE USINA DE CANA-DE-AÇÚCAR**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental, área de concentração em Mudanças Climáticas, Energia e Poluição Atmosférica, para a obtenção do título de Mestre.

Prof. Dr. Adriano Viana Ensinas
Orientador

Profa. Dra. Paula Peixoto Assemany
Coorientadora

**LAVRAS – MG
2024**

**Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).**

Mendonça, Laísa Maria Simonetti.

Produção de biomassa microalgal cultivada em vinhaça e água
residuária de usina de cana-de-açúcar / Laísa Maria Simonetti
Mendonça. - 2023.

65 p.

Orientador(a): Adriano Viana Ensinas.

Coorientador(a): Paula Peixoto Assemany.

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de
Lavras, 2023.

Bibliografia.

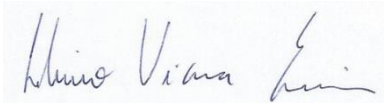
1. Biomassa algal. 2. Vinhaça de cana-de-açúcar. 3. Balanço
Hídrico. I. Ensinas, Adriano Viana. II. Assemany, Paula Peixoto.
III. Título.

LAÍSA MARIA SIMONETTI MENDONÇA

**PRODUÇÃO DE BIOMASSA MICROALGAL CULTIVADA EM VINHAÇA E
ÁGUA RESIDUÁRIA DE USINA DE CANA-DE-AÇÚCAR**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental, área de concentração em Mudanças Climáticas, Energia e Poluição Atmosférica, para a obtenção do título de Mestre.

APROVADA em 27 de outubro de 2023.
Prof. Dr. Eduardo de Aguiar do Couto – UNIFEI
Prof. Dr. Whasley Ferreira Duarte – UFLA



Prof. Dr. Adriano Viana Ensinas
Orientador

Profa. Dra. Paula Peixoto Assemany
Coorientadora

**LAVRAS – MG
2024**

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, à Deus!

A minha mãe e maior incentivadora Lilian e ao meu pai Luiz Antônio que sempre estiveram comigo e sempre me incentivaram nessa jornada. Aos meus irmãos Luiz Paulo e Lucas, que sempre me enchem de amor e carinho.

Ao Júlio meu namorado que ouviu todas as histórias e lamentações sempre acreditando no meu potencial.

Ao meu orientador professor Adriano Ensinas e à minha coorientadora professora Paula Assemany, pela paciência e valiosos ensinamentos até aqui. Por acreditarem na realização do trabalho, sempre incentivando nos momentos difíceis.

Aos colegas do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental (PPGEAMB) e de Lavras-MG, pela amizade e por tornar essa caminhada mais leve e divertida.

Aos técnicos de laboratório, pelo suporte e auxílio nos experimentos em laboratório.

À Universidade Federal de Lavras, por proporcionar a base do conhecimento científico, desenvolvimento pessoal e profissional.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), pelos recursos financeiros providos para a realização do projeto.

RESUMO

O Brasil é um dos maiores produtores mundiais de cana-de-açúcar. Na indústria sucroalcooleira, grande parte do processamento da cana-de-açúcar é destinado para a produção do bioetanol. No entanto, este produto gera grandes quantidades de efluentes com alto potencial poluidor e que comumente retornam à lavoura, sem nenhum tratamento prévio, ocasionando problemas severos ao solo e a água, devido a alta carga orgânica, além da presença de substâncias tóxicas. Para isso, diversos são os estudos que buscam minimizar os impactos oriundos de resíduos da indústria sucroalcooleira, tais como a vinhaça. O cultivo de microalgas em vinhaça da cana-de-açúcar é uma alternativa para o tratamento do resíduo, e, adicionalmente, capazes de alcançar produtividades significativas de serem utilizadas como matéria prima de baixo valor agregado. No entanto, autores evidenciam a necessidade de diluição do meio para a eficiência no cultivo em altas concentrações de vinhaça. A indústria sucroalcooleira é intensiva no uso de água em seus processos, contudo, possui também grande quantidade de água residual do processo industrial, que aliada à vinhaça pode ser uma alternativa estratégica para uso como meio de cultivo. Além disso, a recirculação da água no sistema pode contribuir para adaptação e rendimento de biomassa algal. Assim, este estudo avaliou o cultivo de microalgas em efluentes da indústria sucroalcooleira, bem como no meio recirculado, utilizado para diluição da vinhaça água. As fases de cultivo (P) foram realizadas sob condições controladas. Em P1 foi avaliado o cultivo de microalgas em vinhaça em diluições (1%,5%,10%,15%,20%), P2 testou as melhores diluições (1%,5%,10%) em P1 e avaliou a possibilidade de reaproveitamento do meio de cultura nas diluições de 1% (S1%) e 5% (S5%). Em seguida foram realizadas fases de cultivo P3, P4 e P5. Em P3 foi avaliado o comportamento da inserção da água de reúso da indústria em diferentes diluições (25%, 50%, 75%, 100%) com 5% de vinhaça. Foi contado que a melhor condição pra o cultivo com água residuária ocorreu com 50% de diluição. Em P4 e P5 foi evidenciado que os efluentes do processo industrial juntamente com o sobrenadante da recirculação do cultivo podem ser aproveitados para o atendimento da demanda de água do sistema. Dessa forma, a combinação dos efluentes foi satisfatória, alcançando altas eficiências na remoção dos poluentes assim como altas produtividades de biomassa, garantindo viabilidade na recirculação da água no sistema.

Palavras-chave: Cultivo em vinhaça da cana-de-açúcar. Recirculação de meio de cultivo. Água residual da indústria sucroalcooleira. Balanço hídrico na indústria.

ABSTRACT

Brazil is one of the world's largest producers of sugar cane. In the sugar-alcohol industry, a large portion of sugarcane processing is used to produce bioethanol. However, this product generates large amounts of wastewater with a high pollution potential. This wastewater is often returned to the fields without prior treatment, causing serious problems for soil and water due to the high organic load and the presence of toxic substances. For this reason, several studies have been carried out on the minimization of the impact of wastes from the sugar-alcohol industry, such as vinasse. The cultivation of microalgae in sugarcane vinasse is an alternative way to treat this waste, and is also capable of achieving significant yields and being used as a low value raw material. However, some authors have highlighted the need to dilute the medium in order to cultivate efficiently in high concentrations of vinasse. The sugar-alcohol industry is an intensive user of water in its processes, but it also has a large amount of wastewater from the industrial process, which together with vinasse could be a strategic alternative for use as a growing medium. In addition, the recirculation of water in the system can contribute to the adaptation and yield of algal biomass. Therefore, this study evaluated the cultivation of microalgae in wastewater from the sugar-alcohol industry, as well as in the recirculated medium used to dilute vinasse water. The cultivation phases (P) were carried out under controlled conditions. P1 evaluated the cultivation of microalgae in vinasse in dilutions (1%, 5%, 10%, 15%, 20%), P2 tested the best dilutions (1%, 5%, 10%) in P1 and evaluated the possibility of reusing the culture medium in dilutions of 1% (S1%) and 5% (S5%). Then the cultivation phases P3, P4 and P5 were then carried out. In P3, different dilutions (25%, 50%, 75%, 100%) of industrial wastewater mixed with 5% vinasse were evaluated. The best dilution combined with 5% vinasse was 50%. P4 and P5 showed that the effluent from the industrial process, together with the supernatant from the culture recirculation, can be used to satisfy the water demand of the system. In this way, the combination of effluents was satisfactory, achieving high efficiencies in the removal of pollutants as well as high biomass yields, ensuring the viability of the recirculated water in the system.

Keywords: Cultivation in sugarcane vinasse. Recirculation of cultivation medium. Waste water from the sugar and alcohol industry. Water balance in industry.

LISTA DE FIGURAS

PRIMEIRA PARTE

Figura 1 - Esquema simplificado da produção de açúcar e bioetanol a partir da cana-de-açúcar.....	24
Figura 2 - Uso de água e descarte de efluentes da indústria de açúcar.....	26

SEGUNDA PARTE

Figure 1 - Chla concentrations during cultivation in Phase 3, with the dilution of vinasse in different residual water concentrations.	51
Figure 2 - Chla concentrations during cultivation in Phases 4 and 5, with vinasse diluted in 50% of residual water (RW50%) and 50% of supernatant from the culture with residual water and vinasse (SRW50%).	54
Figure 3 - Water demand according to evaporation rate.	56
Figure 4 - Water balance in the cultivation of microalgae in vinasse from the sugar-alcohol industry.....	57

LISTA DE TABELAS

PRIMEIRA PARTE

Tabela 1 - Estudos de cultivo de microalgas em vinhaça de cana-de-açúcar.....	12
Tabela 2 - Características físicas e químicas da vinhaça de cana-de-açúcar.....	20
Tabela 3 - Caracterização da fração orgânica biodegradável presente na vinhaça.....	22
Tabela 4 - Usos da água em unidades produtoras de açúcar e bioetanol.....	25
Tabela 5 - Características físicas e químicas da água residual na indústria sucroalcooleira.	28

SEGUNDA PARTE

Table 1. Configurations of the different experimental phases.....	45
Table 2. Physical and chemical characterization of the raw sugarcane vinasse used in each experimental phase.....	46
Table 3. Physical and chemical characterization of the sugar-alcohol industry residual water used in the experimental phases.....	47
Table 4. Analytical methods and equipment used to determine variables.....	48
Table 5. Biomass concentration and productivity in the cultivation of microalgae in different dilutions of sugarcane vinasse with distilled water and recirculated supernatant.	49
Table 6. Pollutant removal after growing microalgae in 5% vinasse diluted in different concentrations of residual water in Phase 3.....	52
Table 7. Removal of pollutants after cultivation of microalgae in 5% vinasse diluted in 50% residual water and recirculated supernatant in Phases 4 and 5.....	53
Table 8. Biochemical composition of biomass grown in 5% vinasse diluted in distilled water and residual water and in the recirculated supernatants.....	55

SUMÁRIO

PRIMEIRA PARTE	9
1 INTRODUÇÃO	9
2 OBJETIVOS	10
2.1 Objetivo Geral	10
2.2 Objetivos Específicos	10
3 REFERENCIAL TEÓRICO	11
3.1 INTRODUÇÃO	11
3.2 Cultivo de microalgas em águas residuárias	11
3.3 Fatores que influenciam o cultivo	14
3.3.1 Nutrientes	14
3.3.1.1 Nitrogênio	14
3.3.1.2 Fósforo	15
3.3.1.3 Carbono	16
3.3.2 Matéria Orgânica	17
3.3.3 Iluminação	18
3.3.4 Temperatura	19
3.4 Vinhaça de Cana-de-Açúcar	19
3.4.1 Caracterização da vinhaça de cana-de-açúcar	19
3.5 Água Residual da Indústria Sucroalcooleira	23
3.5.5 Água Residual da Indústria Sucroalcooleira – Açúcar	26
3.5.6 Água Residual da Indústria Sucroalcooleira – Bioetanol	28
3.6 Conclusão	29
REFERÊNCIAS	30
SEGUNDA PARTE	42
PRODUCTION OF MICROALGAL BIOMASS CULTIVATED IN VINASSE AND RESIDUAL WATER FROM SUGAR-ALCOHOL INDUSTRY: SEARCHING FOR A CLOSED-LOOP WATER DEMAND	42
Abstract	42
1 Introduction	43
2 Materials and methods	44
2.1 Experimental phases	44
2.2 Preparation of the inoculum	45
2.3 Vinasse and residual water preparation	46

2.4	Microalgae growth and monitoring	47
2.5	Statistical analysis	48
3	Results and discussion	48
3.1	Determination of vinasse concentration	48
3.2	Determination of residual water concentration	50
3.3	Water balance in the sugarcane industry	55
4	Conclusions.....	57
	Acknowledgments.....	58
	Supplementary Material	58
	References.....	59

PRIMEIRA PARTE

1 INTRODUÇÃO

No panorama do setor agroindustrial, a indústria sucroalcooleira se destaca como uma das mais predominantes em mais de 130 países, especialmente em países em desenvolvimento. Atualmente, a indústria sucroalcooleira desempenha um importante papel em questões econômicas sendo uma das principais geradoras de empregos em muitas regiões da Ásia, África e América do Sul (PODDAR; SAHU, 2017).

A fabricação de bioetanol, como um produto industrial, é amplamente disseminada entre as usinas de cana-de-açúcar, frequentemente associada às destilarias autônomas ou anexas à fabricação do açúcar, sendo a fermentação usada para a sua produção a partir do caldo o do melaço da cana..

Atualmente, biorrefinarias estão ganhando destaque com a integração de diversas indústrias baseadas na biomassa da cana-de-açúcar como matéria-prima. A expansão e promoção da produção de bioetanol têm gerado uma concorrência crescente por recursos hídricos em várias partes do mundo (FITO *et al.*, 2023). Na biorrefinaria, espera-se que a biomassa seja submetida a processos físico-químicos e biológicos para produção de biocombustíveis, energia, materiais e produtos químicos contribuindo significativamente para a melhoria do meio ambiente além dos benefícios econômicos associados à indústria sucroalcooleira.

No entanto, o crescimento rápido da indústria sucroalcooleira em todo o mundo também tem resultado na produção de um volume significativo de efluentes líquidos, muitas vezes descartados de forma inadequada no ambiente. Esses efluentes causam danos ambientais severos ao solo e à água. As características físicas e químicas da vinhaça, como a elevada carga orgânica e presença de nutrientes, e seu elevado potencial poluidor são comumente evidenciados em pesquisas afim de evitar práticas inadequadas, minimizando assim os impactos ambientais significativos (CALIXTO *et al.*, 2016; ENGIN *et al.*, 2018; SIQUEIRA *et al.*, 2022) .

A produção de bioetanol e a gestão adequada de resíduos industriais sucroalcooleiros representam desafios na busca por alternativas energéticas sustentáveis e práticas ambientalmente corretas. Diante do exposto, o cultivo de microalgas em vinhaça, um subproduto da indústria sucroalcooleira, é uma prática promissora (MARQUES *et*

al.,2013; CALIXTO *et al.*, 2016; ENGIN *et al.*, 2018; SOTO *et al.*, 2021). O cultivo de microalgas utilizando a vinhaça como meio de cultura contribui para a remoção eficaz de nutrientes e poluentes da vinhaça, assim como permite a produção simultânea de biomassa microalgal, que pode ser transformada em biocombustíveis, bioplásticos e outros produtos de valor agregado. Neste contexto, este estudo busca explorar alternativas e inovações no cultivo de microalgas em vinhaça da cana-de-açúcar.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar a produção de microalgas cultivadas em vinhaça e água residuária de usina de cana-de-açúcar

2.2 Objetivos Específicos

- Avaliar a viabilidade de crescimento de microalgas em vinhaça e a necessidade de diluição do meio de cultivo;
- Avaliar a recirculação do meio e a mistura da água residual do processo industrial como agente diluidor da vinhaça no cultivo de microalgas;
- Avaliar a produtividade da biomassa algal e o potencial de tratamento da vinhaça em diferentes diluições;
- Determinar a composição bioquímica da biomassa produzida em diferentes diluições;
- Avaliar o balanço hídrico do meio de cultivo considerando a recirculação da água residuária do processo sucroalcooleiro como agente diluidor da vinhaça.

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 INTRODUÇÃO

A busca por soluções sustentáveis para lidar com os resíduos industriais e a produção de energia renovável têm se tornado uma prioridade global. Nesse contexto, a relação entre microalgas e vinhaça tem despertado grande interesse devido ao seu potencial para abordar desafios ambientais e energéticos de forma integrada e inovadora. As microalgas, apresentam uma notável capacidade de crescimento e têm sido exploradas em diversas aplicações, incluindo a purificação de águas residuais e a produção de biomassa rica em nutrientes. Por outro lado, a vinhaça, um subproduto da indústria sucroalcooleira, representa um desafio ambiental significativo para seu tratamento e minimização do potencial poluidor, devido principalmente à sua alta carga orgânica. Dessa forma, configurações diferentes de cultivo de microalgas em vinhaça têm sido alvo de estudos e pesquisas, afim de identificar melhores eficiências de produtividade e remoção de poluentes e, conseqüentemente tornar-se-a uma prática sustentável.

3.2 Cultivo de microalgas em águas residuárias

As microalgas tem sido largamente estudadas devido ao potencial de aplicação comercial em diferentes áreas e sua importancia ambiental. São microrganismos fotossintetizantes e heterotróficos com alta capacidade de assimilação de CO₂, crescimento acelerado e conseqüentemente alta eficiencia na produção de biomassa. A partir da biomassa, esses microrganismos podem apresentar altas concentrações de lipídeos, proteínas, amido, glicerol e pigmentos naturais (WANG *et al.*, 2016). Autores indentificam as microalgas, como microrganismos que apresentam diversas inovações ambientais e aplicações, como: alimentação animal e humana, indústria farmacéutica, tratamento de águas residuais, geração de biocombustíveis, dentre outras (DERNER *et al.*, 2016; SCHMITZ *et al.*, 2012; LOPES *et al.*, 2012).

Águas residuais são identificadas para o cultivo de microalgas por muitas das vezes possuírem características de alta concentração de nutrientes, que favorecem o crescimento da biomassa algal. Dessa forma, a utilização de resíduos com características que favorecem o crescimento algal, é uma possibilidade, principalmente pela remoção de carga orgânica e nutrientes diminuindo do alto potencial poluidor, representando conseqüentemente uma alternativa de tratamento (ZHANG *et al.*, 2018).

Com base nos efluentes domésticos, agrícolas e industriais, o tratamento primário e

secundário, ainda que em condições favoráveis, removem somente sólidos suspensos e a carga orgânica, respectivamente. Alguns compostos orgânicos continuam presentes e com isso são lançados em corpos d'água causando inúmeros prejuízos a biota aquática daquele ambiente (MOUCHET, 1986; ABDEL-RAOUF *et al.*, 2012). No Brasil, o tratamento secundário é o nível mais empregado. Para a remoção de carga inorgânica, é necessário o tratamento terciário, geralmente com a utilização de agentes químicos, que são tratamentos complexos (ABDEL-RAOUF *et al.*, 2012). Contudo, existem biotecnologias com alto desempenho e baixo custo que viabilizam o tratamento terciário (WANG *et al.*, 2016), como o processo de cultivo de microalgas nas águas residuais. Nesse tipo de tratamento há a possibilidade de biorremediação dos efluentes, assim como a produção de biomassa algal.

O Brasil, sendo um dos maiores produtores de bioetanol de cana-de-açúcar no mundo, deve-se atentar as práticas de biorremediação da vinhaça. O cultivo de microalgas em vinhaça é uma alternativa a fim de reduzir os efeitos negativos ambientais que a prática comum de fertirrigação sem tratamento prévio provoca no solo, ar e água. Muitos autores, sugerem a vinhaça como meio de cultura alternativo para o cultivo de microalgas como exemplificado na Tabela 1 (OLIVEIRA; CÁCERES, 1986; KADIOGLU; ALGUR, 1992; MITRA *et al.*, 2012; BUDIYONO *et al.*, 2014; COCA *et al.*, 2015; SANTANA *et al.*, 2016; JIANG *et al.*, 2018; SIQUEIRA *et al.*, 2022).

Tabela 1 - Estudos de cultivo de microalgas em vinhaça de cana-de-açúcar.

Espécies	Concentração de Vinhaça (%(v/v))	Eficiência de remoção	Biomassa (mg. (L.d)')	Composição bioquímica	Referências
<i>Chlorella</i> sp.	100		40,3	Proteína: ~45% Carboidrato: ~30% Lipídio: ~7% Proteína: ~32%	Calixto <i>et al.</i> (2016)
<i>Chlamydomonas</i> sp.	100		53,3	Proteína: ~32% Carboidrato: ~45% Lipídio: ~14%	Calixto <i>et al.</i> (2016)

<i>Lagerheimia longiseta</i> (D133wC)	100			1,4	Proteína: ~50% Carboidrato: ~35% Lipídio: ~14%	Calixto <i>et al.</i> (2016)
<i>Pediastrum tetras</i> (D121WC)	100			4,2	Proteína: ~55% Carboidrato: ~26% Lipídio: ~14%	Calixto <i>et al.</i> (2016)
<i>Chlorella vulgaris</i>	100	(vinhaça digerida)	DQO: 40,5% PO ₄ ³⁻ : 100% N-NH ₄ ⁺ : 100%	70,0	Proteína: ~63% Carboidrato: ~14% Lipídio: ~23%	Marques <i>et al.</i> (2013)
<i>Chlorella vulgaris</i>	20	(vinhaça diluída com esgoto tratado)	DQO: 74,5% PO ₄ ³⁻ : 100% N-NH ₄ ⁺ : 100%	3,0	Proteína: 63% Carboidrato: 16% Lipídio: ~20%	Quintero-Dallos <i>et al.</i> (2019)
<i>Chlorella vulgaris</i>	10 25 75		COT: 85% PO ₄ ³⁻ : 25% TKN: 38%	50.0 ± 20.0 150.0 ± 40.0 240.0 ± 60.0	Protein: ~47% Carboidrato: ~4.21% Lipídio: ~1.73%	Ruas <i>et al.</i> (2018)
<i>Chlorella vulgaris</i>	30 40 60 90		Para concentração de 90%: DQO: 49% DBO: 70%	28.0 ± 15.0 47.0 ± 32.0 168.0 ± 97.0 337.0 ± 64.0	Para concentração de 60%: Proteína: ~25.16 % Carboidrato: ~74.41% Lipídio: ~0.42%	Soto <i>et al.</i> (2021)

Fonte: Siqueira et al. (2022).

Estudos identificam o cultivo de microalgas em vinhaça e relatam resultados interessantes. Na Tabela 1 são identificados valores significativos de remoção em relação as variáveis ambientais, além de ressaltar a composição bioquímica das microalgas no cultivo. Vale salientar a presença de altas quantidades de proteínas nas microalgas encontradas nesses estudos, podendo estas ser alvos de processos de conversão para demais produtos, principalmente voltados para a alimentação animal e humana.

3.3 Fatores que influenciam o cultivo

A relação entre fatores químicos, físicos e biológicos tem fundamental importância para o crescimento algal, podendo otimizar ou inibir seu desenvolvimento (DERNER, 2006). Efeitos como a luz, temperatura, pH e nutrientes são abordados a seguir.

3.3.1 Nutrientes

Os nutrientes que influenciam o crescimento das microalgas podem ser classificados em macronutrientes e em micronutrientes. Os macronutrientes influenciam no processo de troca de energia, regulação da atividade metabólicas, entre outras importantes funções ao crescimento da microalgas. São caracterizados por elementos químicos como oxigênio, hidrogênio, nitrogênio, carbono, sódio, cálcio, fósforo, potássio, ferro, enxofre e silício (LOURENÇO, 2006; ANDRADE; FILHO, 2014). Os micronutrientes que influenciam nos arranjos das organelas como os ribossomos e nas estruturas das enzimas metabólicas, podem ser caracterizados pelos elementos como cobre, zinco, manganês, boro e molibdênio (ANDRADE; FILHO, 2014). No entanto, vale ressaltar a matéria orgânica, o nitrogênio e o carbono, como elementos essenciais para a produtividade de microalgas.

3.3.1.1 Nitrogênio

O nitrogênio é um elemento essencial para o desenvolvimento microalgal e produção da biomassa. Baixas concentrações do elemento podem acarretar a sintetização de carboidratos e lipídios no meio de cultivo (RIGANO *et al.*, 1998).

O nitrogênio na água ou efluentes é encontrado principalmente na forma de nitrogênio amoniacal ($N-NH_4^+$), nitrato ($N-NO_3^-$) e uréia. O pH do meio, afetará a assimilação de nitrato ou nitrogênio amoniacal. Para microalgas, é preferível a assimilação na forma de nitrogênio amoniacal ($N-NH_4^+$) (KAPLAN *et al.*, 1986; GROBBELAAR,

2013).

Microalgas quando cultivadas em meios que possuem nitrogênio em forma de nitrato, devem realizar redução do nitrato por meio das enzimas nitrato-redutase e nitrito-redutase, para a formação de amônia, havendo gasto de energia celular (CORNET;DUSSAP;GROS, 1998). No entanto, através da fotossíntese, a liberação de oxigênio pode favorecer o aparecimento de bactérias nitrificantes que podem converter nitrogênio amoniacal em nitrito e nitrato.

A redução de CO₂ é evidenciada em função do desenvolvimento da biomassa algal pela fotossíntese, tornando o pH mais básico e formando a amônia livre (NH₃) pela dissociação do íon amônio (ANDRADE; FILHO, 2014). Esse cenário pode ser inibidor ao crescimento microalgal (AZOV; GOLDMAN, 1982). Em ambientes aquáticos, o NH₃ é considerado tóxico para o sistema de osmorregulação por ser um elemento que inibe as trocas gasosas entre a microalga e o meio de cultivo.

A vinhaça, em relação as formas encontradas de nitrogênio, possui N-NO₃⁻ variando de 441 - 650 mg.L⁻¹, N-NH₄⁺ variando de 24 - 45 mg.L⁻¹ e nitrogênio total Kjeldahl (NTK) variando de 40 - 4.000 mg.L⁻¹ (DEL NERY *et al.*, 2018; PARSAAE; KIANI; KARIMI, 2019).

3.3.1.2 Fósforo

O fósforo é um elemento responsável pelas partes estruturais e funcionais da célula, importante para a reprodução e desenvolvimento microalgal assim como atividades metabólicas (HU, 2013).

O fósforo é encontrado em meio aquoso na forma de fósforo total, sendo orgânico e inorgânico. O fósforo orgânico é formado por matéria orgânica e o inorgânico pelas frações solúvel e insolúvel do fósforo (ARANTES, 2019). Frações solúveis, são formadas por fosfatos orgânicos, fosfatos condensados e ortofosfatos (PO₄³⁻, H₂PO₄⁻ HPO₄²⁻, que podem ser de diferentes formas, conforme a variação de pH do meio (CHAO, 2006). Em meios de pH mais baixos, o fósforo é encontrado na forma de H₂PO₄⁻, e em meios de altos valores de pH, as formas são PO₄³⁻ e HPO₄²⁻ (FAQUIN, 2005; NUVOLARI, 2011; PARRON; MUNIZ; PEREIRA, 2011). A precipitação do fósforo ocorre em condições de pH elevado (GARCÍA; MUJERIEGO; HERNANDEZ-MARINE, 2000; CRAGGS, 2005).

Em meio com teores de cálcio e alumínio, o fósforo pode sofrer precipitação em forma de fosfato ferroso ou fosfato de cálcio, limitando a disponibilidade e interferindo na produção microalgal (BELAY, 2013). A remoção do fósforo está diretamente ligada a

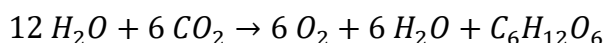
concentração de nutrientes, luminosidade e variabilidade de espécie (ASLAN; KAPDAN, 2006).

O processo de remoção do fósforo em um meio de cultivo, ocorre através da absorção na biomassa frente à capacidade de armazenamento do fósforo em forma de fosfato e posteriormente, utilização desse elemento em condições limitantes (VIEIRA *et al.*, 2012). A assimilação do fósforo pelas microalgas, geralmente ocorre logo na fase inicial do crescimento microalgal e posteriormente é liberado ao meio na fase de crescimento exponencial. Com o nitrogênio, a assimilação ocorre gradativamente ao longo do crescimento do microrganismo (WATANABE; TANABE, 2013).

A composição da vinhaça em relação ao fósforo é diversa, variando de 1 a 190 mg.L⁻¹ (PARSAEE; KIANI; KARIMI, 2019; LYRA *et al.*, 2003).

3.3.1.3 Carbono

O carbono é um macronutriente essencial para o desenvolvimento das microalgas (LOURENÇO, 2006). Em meio aquoso, o carbono inorgânico é encontrado de diferentes formas, como carbonato (CO₃⁻), bicarbonato (HCO₃⁻) e dióxido de carbono (CO₂), sendo essencial ao crescimento algal (MOHEIMANI, 2012). A reação a seguir, mostra a relação estequiométrica da fotossíntese (SASI, 2009; LIANG; SARKANY; CUI, 2009).



As microalgas possuem diferentes capacidades da degradação do carbono orgânico. Espécies heterotróficas assimilam o carbono orgânico como fonte energia, além de fonte de carbono (CHOJNOCKA; MARQUEZROCHA, 2004). Espécies mixotróficas assimilam o carbono orgânico como fonte de carbono e realizam fotossíntese (MATA; MARTINS; CAETANO, 2010), e as espécies fotoheterotróficas assimilam compostos orgânicos como fonte de carbono e carecem de luz como fonte de energia (CHOJNOCKA; MARQUEZROCHA, 2004).

Microalgas são espécies que normalmente utilizam o dióxido de carbono como fonte de carbono em condições em que valores de pH são mais baixos, e que a disponibilidade de CO₂ é maior (ANDRADE, 2014). Em condições em que a faixa de pH é em torno de 6,5 a 10, utilizam o bicarbonato, devido ser a forma de carbono com maior disponibilidade no meio (HOH; WATSON; KAN, 2016).

Em períodos com luminosidade, as microalgas tendem ao processo de fotossíntese e conseqüentemente acontece o aumento do pH do meio, devido a assimilação do CO₂ (BERENGUEL *et al.*, 2004). No entanto, o aumento do pH também pode ser ocasionado

devido a desidratação do íon bicarbonato para a formação de CO_2 e íons OH^- . O aumento do pH por esses fatores são consequências do metalismo autotrófico das microalgas (SHIRAIWA *et al.*, 1993).

3.3.2 Matéria Orgânica

Para identificar a quantidade de compostos orgânicos em um meio, é utilizada a demanda química de oxigênio (DQO), uma variável ambiental frequentemente usada no monitoramento das águas oriundas de estações de tratamento de esgoto (AQUINO; SILVA; CHERNICHARO, 2006). No Brasil, a Resolução CONAMA 430/11 dispõe sobre os padrões de lançamento de efluentes, porém não é estabelecido parâmetro para DQO. No entanto, em legislações ambientais estaduais, existem valores parametrizados que determinam o limite máximo de DQO para o lançamento de efluente em corpos d'água (AQUINO; SILVA; CHERNICHARO, 2006). Em Minas Gerais, segundo a deliberação normativa conjunta COPAM/CERH-MG 01 de 2022, os efluentes de qualquer fonte poluidora somente poderão ser lançados, direta ou indiretamente, nos corpos de água até 180 mg.L^{-1} . Ou ainda, para outros sistemas que não sejam efluentes de indústria têxtil, fabricação de celulose Kraft branqueada, sistemas de lixiviados de aterros sanitários municipais, é necessária a redução de no mínimo 80% e média anual igual ou superior a 85%. Já na Europa, o Conselho das Comunidades Europeias - Council of the European Communities determinou a partir da Deliberação nº 91/271/EEC de 21 de maio de 1991, que a concentração de DQO para efluentes domésticos e industriais tratados seja inferior a 125 mg.L^{-1} ou eficiência de remoção de 75%.

A DQO é obtida a partir da concentração de oxigênio dissolvido consumido ou não para a oxidação química da matéria orgânica (VALENTE; PADILHA; SILVA, 1997), e geralmente determinada em laboratório através de métodos colorimétricos ou titulométricos pela medição indireta dos elementos que apresentam baixo teor de oxidação no meio (AQUINO; SILVA; CHERNICHARO, 2006).

A DQO é uma variável ambiental que pode ser classificada em solúvel rapidamente biodegradável, composta por pequenas partículas biodegradáveis metabolizadas em um curto tempo; solúvel lentamente biodegradável; particulada biodegradável, composta por partículas maiores sendo necessária a hidrólise extracelular para a metabolização; e solúvel não biodegradável, composta por elementos dissolvidos acessíveis no interior da célula microbiana não biodegradável (HENZE, 1992; HENZE *et al.*, 1987; WENTZEL *et al.*, 1999; DULEKGURGEN *et al.*, 2006).

As microalgas interagem em uma relação de simbiose com as bactérias no meio aquoso. Elas produzem oxigênio, atuando como reservatório para a fixação de CO₂, para que haja a respiração das bactérias heterotróficas e degradação de matéria orgânica durante o tratamento de efluentes (JIA; YUAN, 2016). Com essa interação, as concentrações de DQO podem ser reduzidas devido a mineralização do carbono orgânico com o consumo de oxigênio dissolvido (OD), além de que o crescimento das microalgas converte o carbono inorgânico em orgânico (SHEN; GAO; LI, 2017). Além disso, o crescimento das bactérias, devido ao ambiente ser adequado ao metabolismo heterotrófico, como aqueles com altas concentrações de matéria orgânica, pode inibir o crescimento de microalgas.

3.3.3 Iluminação

Um dos fatores mais importantes no crescimento microalgal é a iluminação, sendo a principal fonte de energia em crescimentos autotrófos (SOLETTO *et al.*, 2005). A iluminação é um fator associado a produção, desenvolvimento e consumo de carbono (DERNER, 2006). A iluminação pode ser classificada quanto a intensidade e tempo de exposição (fotoperíodo) conforme comprimento de onda (DUBINSKY, 1990).

As microalgas são favorecidas em condições em que a faixa espectral de luminosidade e absorção pelos pigmentos fotossintetizantes estão entre 400 nm a 700 nm (ANDRADE; FILHO, 2014).

Segundo Walker (2009), a eficiência máxima de conversão fotossintética das microalgas é de 1,3% a 2,4% devido ao efeito de fotoinibição.

A vinhaça é um efluente caracterizado com alta turbidez e coloração escura (CHRISTOFOLETTI *et al.*, 2013). Essa característica pode inibir o desenvolvimento algal devido a dificuldade da penetração da luz para o processo fotossintético (VELOSO *et al.*, 1991).

A alta intensidade luminosa, por outro lado, pode acarretar em danos aos receptores de luz e diminuição na taxa produtividade fotossintética (BOUTERFAS; BELKOURA; DAUTA, 2002; MACEDO; DUARTE; FERREIRA, 2002; TORZILLO *et al.*, 2003; RICHMOND, 2004). Essa condição no cultivo, pode acarretar nas microalgas o estresse fotoinibidor, o que reduz a clorofila e elementos responsáveis pela captura de luz, e acúmulo de carotenoides secundários que são responsáveis pela proteção contra o excesso de luz (HU, 2013).

Além dos fatores de alta luminosidade, pode ocorrer o autossombreamento, um inibidor na absorção da luz pela microalga. Com o aumento na concentração microalgal no

meio, essas podem reduzir a luminosidade e conseqüentemente haverá a redução da atividade fotossintética e produção microalgal (SOARES, 2010). Outros bloqueadores de luminosidade são a concentração de matéria orgânica e sólidos suspensos que podem acarretar no bloqueio da incidência luminosa quando em altas concentrações (ZHU *et al.*, 2013), o que é o caso da vinhaça.

3.3.4 Temperatura

Um dos fatores importantes no crescimento microalgal é a temperatura (RAS; STEYER; BERNARD, 2013), visto que pode afetar taxa metabólica, composição celular e crescimento (ANDRADE; FILHO, 2014).

O crescimento microalgal pode sofrer alterações com mudanças bruscas de temperatura, quando já adaptado a uma certa temperatura (HARRIS, 1978). Assim, a produtividade microalgal está diretamente atrelada a constância na temperatura (ANDRADE; FILHO, 2014).

Em temperaturas acima do ideal as microalgas sofrem o estresse térmico e conseqüentemente são alteradas as funções enzimáticas da atividade fotossintética, ocasionando assim a inibição do crescimento microalgal (RATKOWSKY *et al.*, 1983; SALVUCCI; CRAFTS-BRANDNER, 2004).

A variação da temperatura no cultivo de microalgas pode acarretar efeitos na composição química das microalgas. Quando a temperatura é aumentada há um aumento na quantidade de proteínas e diminuição nos lipídios e carboidratos. Algumas espécies também sofrem alterações lipídicas que ocasionam na redução de ácidos graxos insaturados e aumento nos ácidos graxos saturados (MORTENSEN *et al.*, 1988).

3.4 Vinhaça de Cana-de-Açúcar

3.4.1 Caracterização da vinhaça de cana-de-açúcar

A vinhaça advinda da cana-de-açúcar apresenta altas concentrações de matéria orgânica, em termos de DQO, com valores que variam de 14,500 a 55,200 mg.L⁻¹. Além de potássio, cálcio, sódio e magnésio, como mostrado na Tabela 2.

A vinhaça é constituída por altas concentrações de substâncias de baixo peso molecular caracterizados por ácidos orgânicos, álcoois e açúcares, assim como compostos fenólicos, melanoidinas e caramelos que são responsáveis pela coloração escura (HATANO *et al.*, 2008). Além disso, a vinhaça possui altas concentrações de metais

pesados como cobre, zinco, cromo e níquel, que são substâncias que podem ser identificadas no processo produtivo do bioetanol, abrangendo desde a composição da matéria prima, instalações, até o uso de produtos químicos, dentre outros (WILKIE *et al.*, 2000).

Tabela 2 - Características físicas e químicas da vinhaça de cana-de-açúcar.

Parâmetro	Unidade	Valores	Referências
pH	-	3.25-4.97	Parsaee, Kiani Deh Kiani e Karimi (2019)
Demanda Química de Oxigênio Solúvel (DQO _S)	mg.L ⁻¹	14,517-55,167	Parsaee, Kiani Deh Kiani e Karimi (2019)
Demanda Química de Oxigênio Total (DQO _T <small>Erro! Indicador não definido.</small>)	mg.L ⁻¹	27,500-299,250	Santos <i>et al.</i> (2019)
			Del Nery <i>et al.</i> (2018) –
Demanda Bioquímica de Oxigênio (DBO)	mg.L ⁻¹	5,046-47,636	Parsaee, Kiani Deh Kiani e Karimi (2019)
Nitrogênio <i>Kjeldahl</i> total (NTK)	mg.L ⁻¹	40-4,004	Parsaee, Kiani Deh Kiani e Karimi 2019.
Fósforo Total	mg.L ⁻¹	1-190	Parsaee, Kiani Deh Kiani e Karimi (2019)
Potássio (K)	mg.L ⁻¹	40-7,830	Parsaee, Kiani Deh Kiani e Karimi (2019)
Sulfatos (SO ₄ ⁻²)	mg.L ⁻¹	14-6,400	Parsaee, Kiani Deh Kiani e Karimi (2019)
			Del Nery <i>et al.</i> (2018) –
Sólidos Totais (ST)	g.L ⁻¹	14.57-81.5	Parsaee, Kiani Deh Kiani e Karimi (2019)
			Del Nery <i>et al.</i> (2018) –
Sólidos Voláteis Totais (SVT)	g.L ⁻¹	9.34-22.00	Parsaee, Kiani Deh Kiani e Karimi (2019)
			Del Nery <i>et al.</i> (2018) –
Sólidos Totais Suspensos (STS)	g.L ⁻¹	1,888-4,639	Parsaee, Kiani Deh Kiani e Karimi (2019)
Sólidos Suspensos Voláteis (SSV)	g.L ⁻¹	1,620-15,860	Parsaee, Kiani Deh Kiani e Karimi (2019)
Fenóis	mg.L ⁻¹	450-469	Parsaee, Kiani Deh Kiani e Karimi (2019)
			Del Nery <i>et al.</i> (2018) –
Ortofosfatos (PO ₄ ³⁻)	mg.L ⁻¹	102.00-161.92	Parsaee, Kiani Deh Kiani e Karimi (2019)

Razão carbono-nitrogênio (C/N)		~20	Johnson <i>et al.</i> (2019)
			Del Nery <i>et al.</i> (2018) –
Nitrogênio amoniacal (N-NH ₄ ⁺)	mg.L ⁻¹	24.18-45.00	Parsaee, Kiani Deh Kiani e Karimi (2019)
			Del Nery <i>et al.</i> (2018) –
Nitrato (N-NO ₃ ⁻)	mg.L ⁻¹	441.00-648.36	Parsaee, Kiani Deh Kiani e Karimi (2019)
			Del Nery <i>et al.</i> (2018) –
Ácidos graxos voláteis (AGV)	mg.L ⁻¹	433-5,882	Siqueira, Damiano, Silva (2013)
			Del Nery <i>et al.</i> (2018) –
Alcalinidade Total (CaCO ₃)	mg.L ⁻¹	0-295	Parsaee, Kiani Deh Kiani e Karimi (2019)
			Parsaee, Kiani Deh Kiani e Karimi (2019)
Cálcio (Ca)	mg.L ⁻¹	8–5,180	Parsaee, Kiani Deh Kiani e Karimi (2019)
			Parsaee, Kiani Deh Kiani e Karimi (2019)
Ferro (Fe)	mg.L ⁻¹	2,792	Parsaee, Kiani Deh Kiani e Karimi (2019)
			Parsaee, Kiani Deh Kiani e Karimi (2019)
Sódio (Na)	mg.L ⁻¹	50–3,820	Parsaee, Kiani Deh Kiani e Karimi (2019)
			Parsaee, Kiani Deh Kiani e Karimi (2019)
Magnésio	mg.L ⁻¹	16–1,529	Parsaee, Kiani Deh Kiani e Karimi (2019)
			Parsaee, Kiani Deh Kiani e Karimi (2019)
Proteínas	mg.L ⁻¹	2,750–6,894	Parsaee, Kiani Deh Kiani e Karimi (2019)
			Parsaee, Kiani Deh Kiani e Karimi (2019)
Lipídios	mg.L ⁻¹	250–6894	Parsaee, Kiani Deh Kiani e Karimi (2019)
			Santos <i>et al.</i> (2019)
Carboidratos	mg.L ⁻¹	3,933–4,733	Parsaee, Kiani Deh Kiani e Karimi (2019)
Condutividade Elétrica	μS.cm ⁻¹	8,294–15,110	Parsaee, Kiani Deh Kiani e Karimi (2019)

Fonte: Siqueira *et al.* (2022)

A vinhaça é caracterizada por altas concentrações de sólidos, forte odor, e altas temperaturas (90-100° C) quando gerada na etapa de destilação (SILVA *et al.*, 2021). Possui altas concentrações de matéria orgânica e nutrientes, caracterizados por nitrogênio (N), fósforo (P) e potássio (K) (BARROS *et al.*, 2020), alta corrosividade e baixo pH (SILVA *et al.*, 2021) e altas concentrações de SO₄⁻² advindo da inserção do produto químico (H₂SO₄) na etapa de fermentação do caldo da cana para que não haja contaminação de microrganismos (WU *et al.*, 2018).

Na prática, a produção de efluente varia consideravelmente em termos de taxas e características, dependendo de diversos fatores, como o tipo de matéria-prima utilizada, a

técnica de fermentação empregada e as operações unitárias no processamento do melão e na recuperação do bioetanol. Tais fatores desempenham um papel fundamental na determinação da carga poluente dos efluentes provenientes das destilarias. Em geral, a destilação é a principal fonte de águas residuais no processo de destilação, sendo estas submetidas a processos de tratamento adequados (PANT; ADHOLEYA, 2007).

Adicionalmente, a coloração da vinhaça é principalmente ocasionada por melanoidinas (resultantes da reação de Maillard entre açúcares - carboidratos - e grupos amino de proteínas), caramelos (resultantes da caramelização de açúcares submetidos a altas temperaturas), compostos fenólicos (originados a partir de ácidos tânicos e húmicos presentes na matéria-prima) e furfurais (resultantes da hidrólise ácida) (DOS REIS, 2015). A caramelização representa um processo químico que envolve a transformação de açúcares sob elevadas temperaturas, podendo ser influenciada por soluções ácidas e alcalinas. Em geral, a gestão desta água residual com coloração característica proveniente da destilaria representa um desafio considerável em termos de tratamento (ARIMI *et al.*, 2014).

Tabela 3 - Caracterização da fração orgânica biodegradável presente na vinhaça.

Parâmetros	Concentração (mg.L ⁻¹)					
Carboidratos	-	-	6292		4300	5880
Glicose	-	-	-	410	-	-
Sacarose	-	-	-	1280	-	-
Glicerol	-	-	-	-	2598	3476
Etanol	21007	1259- 1626	-	250	154	-
Metanol	-	-	2315	-	0	-
Fénois	-	-	-	-	609	1610
Ácido Fórmico	-	-	2463	-	-	-
Ácido Acético	2237	931- 942	9928	220	153	-
Ácido Propriônico	4304	39,7 – 120	3557	-	0	-
Ácido Lático	-	682-1304	7516	10130	917	747
Ácido Butírico	-	-	-	610	0	-
Ácido Isobutírico	-	-	3755	3410	-	-
Ácido Cítrico	-	-	7482	-	-	-
Ácido Málico	-	-	6191	10460	-	-
Ácido Succínico	-	-	2806	3720	-	-
Ácido Caproico	-	-	809	-	-	-
Referências	España Gamboa <i>et al.</i> <i>al.</i>	Janke <i>et al.</i> (2016)	Ramos e Silva (2019)	Moraes <i>et al.</i> (2019)	Santos <i>et al.</i> (2019)	Borges <i>et al.</i> (2021)

A composição de frações orgânicas e inorgânicas da vinhaça varia principalmente a partir das tecnologias utilizadas no processo produtivo do bioetanol e no decorrer do tempo (CARRILHO; LABUTO; KAMOGAWA, 2016). As frações orgânicas são principalmente oriundas dos processos de fermentação, devido aos açúcares que não são convertidos, aos ácidos orgânicos e glicerol. Na Tabela 3, são identificadas concentrações das frações orgânicas da vinhaça de cana-de-açúcar.

Diante das características e substâncias presentes na vinhaça são identificadas diversas alternativas, a fim de minimizar os impactos ambientais decorrentes desse resíduo, como por exemplo a digestão anaeróbia e o cultivo de microalgas abordado anteriormente. Em relação ao pré tratamento da vinhaça em favorecimento de recuperação de energia nas alternativas identificadas para o seu tratamento, como a digestão anaeróbia e o cultivo de microalgas, tecnologias são identificadas a fim de garantir condições adequadas ao cultivo. Nesse sentido, as dificuldades encontradas nesse processo são relacionadas à composição da vinhaça, devido a altos teores de açúcares, pH ácido e ausência de alcalinidade.

Dessa forma, fazem-se necessários tratamentos da vinhaça para o controle de alcalinidade e pH. São recomendados na literatura aplicação de dosagens de NaOH **Erro! Indicador não definido.**, NaHCO_3 , uréia, reciclagem de efluentes (SIQUEIRA; DAMIANO; SILVA, 2013; SIQUEIRA *et al.*, 2022). A adição desses compostos torna as condições adequadas para melhor biorremediação da vinhaça através do cultivo das microalgas e digestão anaeróbia, principalmente o aumento do pH.

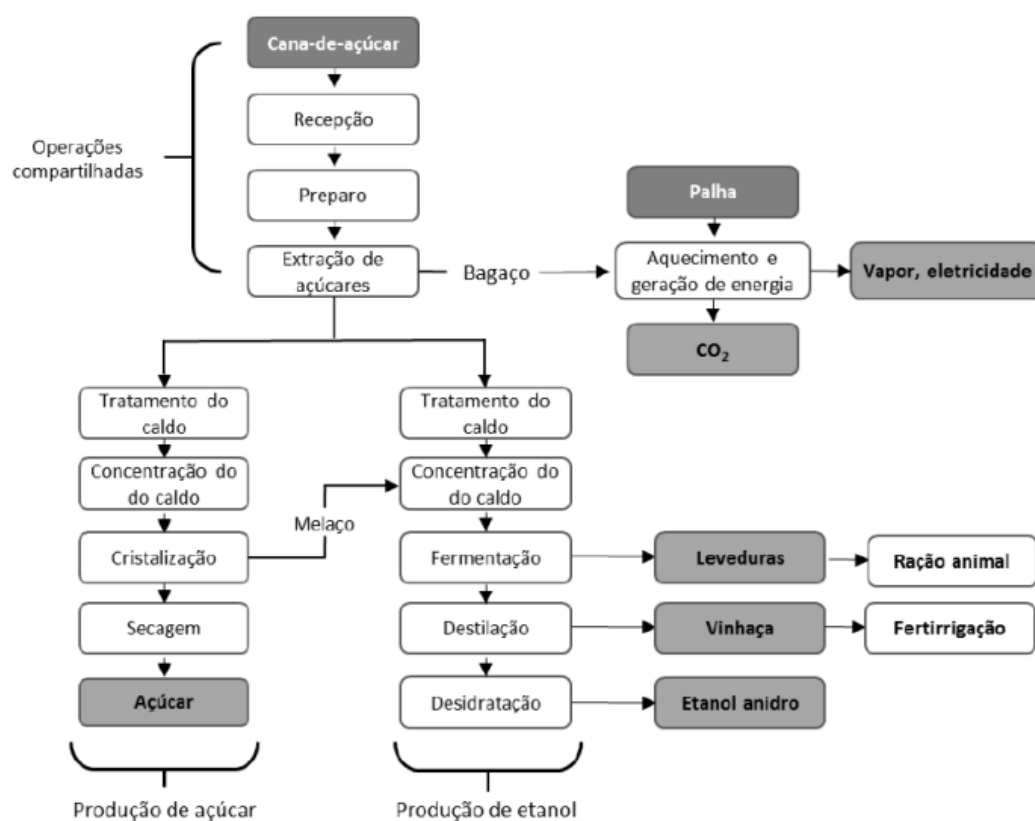
3.5 Água Residual da Indústria Sucroalcooleira

A indústria sucroalcooleira pode ser amplamente categorizada em três segmentos: (1) aquelas que exclusivamente produzem açúcar bruto, (2) aquelas que se dedicam exclusivamente à produção de bioetanol, e (3) as operações integradas que englobam tanto a produção de açúcar bruto quanto de bioetanol, como esquema mostrado na Figura 1. Muitas das instalações industriais sucroalcooleiras estão associadas a destilarias de bioetanol, com cerca de 80% das fábricas pertencendo aproximadamente à terceira categoria (GOPAL; KAMMEN, 2009).

Essa tendência é particularmente prevalente no Brasil e em várias outras nações ao

redor do mundo, sendo que a agroindústria sucroalcooleira é uma das grandes consumidoras de água e conseqüentemente produtora de grandes quantidades de efluentes advindo dessa produção. Portanto, é necessária uma gestão adequada e eficiente para a destinação dos efluentes, visando mitigar impactos ambientais e garantir a sustentabilidade dessa importante indústria. Isso inclui o tratamento adequado dos efluentes para reduzir a poluição hídrica, a reutilização de água e a implementação de tecnologias mais limpas e sustentáveis em todo o processo de produção. Além disso, a conscientização e o cumprimento de regulamentações ambientais são essenciais para garantir a preservação dos recursos hídricos afetados pela agroindústria sucroalcooleira.

Figura 1 - Esquema simplificado da produção de açúcar e bioetanol a partir da cana-de-açúcar.



Fonte: Santana (2016).

No entanto, vale ressaltar que a captação de água vem diminuindo consideravelmente nas últimas décadas devido à adoção de práticas eficientes de reúso de água no processo industrial (FITO; TEFERA; VAN HULLE, 2018). Além disso, ao contrário da maioria dos países produtores, a produção de cana no Brasil, especialmente na região canavieira

Centro-Sul, não depende de irrigação extensiva, sendo utilizada apenas a irrigação de resgate e, em algumas áreas específicas, a irrigação suplementar com baixas quantidades de água, geralmente utilizando efluentes do processo industrial (FNS, 2013). Na Tabela 4, os usos da água na indústria sucroalcooleira são listados.

Tabela 4 - Usos da água em unidades produtoras de açúcar e bioetanol.

SETOR	FINALIDADE
Alimentação, preparo e extração (moendas e difusores)	Lavagem de cana
	Embebição
	Resfriamento de mancais
	Resfriamento de óleo
Tratamento de caldo	Resfriamento da coluna de sulfitação
	Preparo de leite de cal
	Preparo de polímero
	Aquecimento do caldo
	Lavagem de torta
	Condensadores dos filtros
Fábrica de açúcar	Vapor para evaporação
	Condensadores/multijatos evaporação
	Vapor para cozimento
	Condensadores/multijatos cozedores
	Diluição de méis e magmas
	Retardamento do cozimento
	Lavagem de açúcar (1/3 água e 2/3 vapor)
	Retentor de pó de açúcar
Fermentação	Preparo do mosto
	Resfriamento do caldo
	Preparo do pé-de-cuba
	Lavagem gases CO ₂ fermentação
	Resfriamento de dornas
Destilaria	Aquecimento (vapor)
	Resfriamento dos condensadores
Geração de Energia	Produção de vapor direto
	Dessuperaquecimento
	Lavagem de gases da caldeira
	Limpeza dos cinzeiros
	Resfriamento de óleo e ar dos turbo geradores
	Água torres de condensação
Outros	Limpeza de pisos, equipamentos

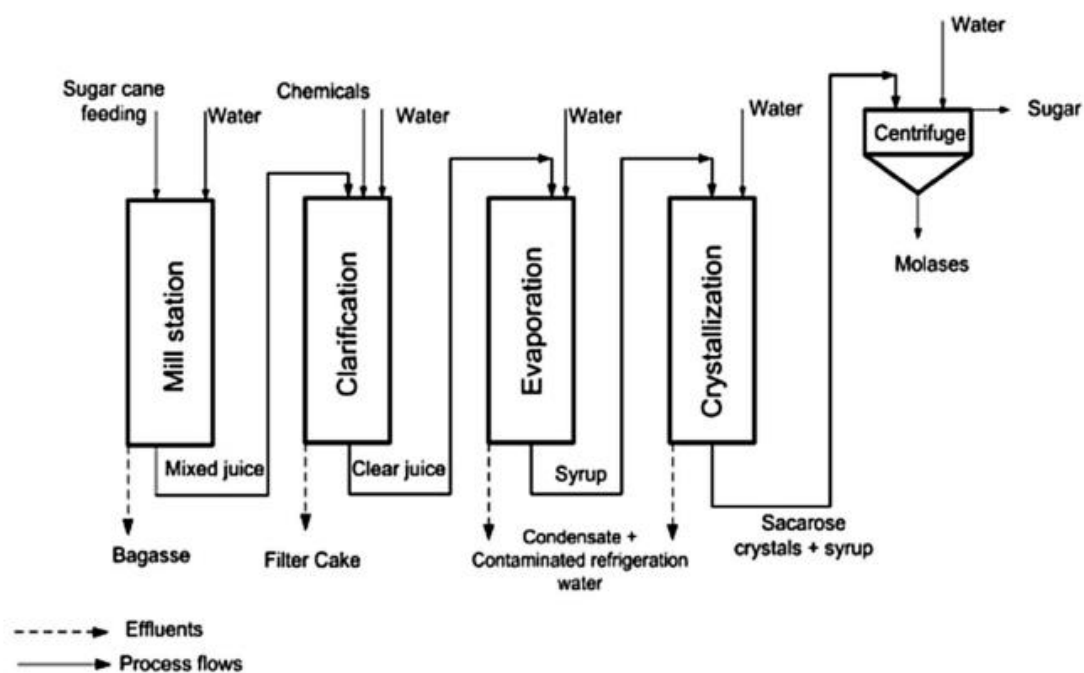
	Uso potável
--	-------------

Adaptada: (FNS,2013)

3.5.5 Água Residual da Indústria Sucroalcooleira – Açúcar

O setor agrícola representa uma das principais áreas de demanda por água doce, impulsionadas pelas características inerentes à produção de açúcar, que requerem quantidades significativas de água doce. A água captada é empregada em diversas fases do ciclo produtivo, subsequente à qual uma fração é submetida a processos apropriados e reintegrada aos corpos hídricos, enquanto outra parcela é direcionada concomitantemente com a vinhaça para a atividade agrícola. A discrepância entre a água obtida e a água descarregada corresponde à água consumida internamente (ELIA NETO, 2016).

Figura 2 - Uso de água e descarte de efluentes da indústria de açúcar.



Fonte: Fito, Tefera, Van Hulle (2018).

A água doce ao ser empregada em diversas unidades do processo produtivo de açúcar dentro da usina sucroalcooleira, gera efluentes líquidos que exibem considerável variabilidade em termos de volume e qualidade (Figura 2). Essa variabilidade está diretamente relacionada às matérias-primas utilizadas, aos produtos obtidos e aos produtos químicos empregados no processo (INGARAMO *et al.*, 2009). Assim, as águas residuais provenientes do setor sucroalcooleiro resultam da combinação de diversos efluentes industriais originados em várias etapas do processo de produção.

Uma curiosidade na indústria sucroalcooleira é que a cana-de-açúcar apresenta teores de umidade da ordem de 70-80% antes de ser processada na indústria. Logo, há um excedente de aproximadamente 0,7 m³ de água residuária por tonelada de cana-de-açúcar processada (MEMON, SUHAI AHMED, ABDUL KHALIQ, 2006; SOLOMON, 2005).

A indústria sucroalcooleira em diversos países gera, em média, 1 m³ de água residuária é por cada tonelada de cana-de-açúcar processada. Além disso, estudos indentificaram, em relação a fábrica de açúcar, que o processamento de 1 tonelada de cana-de-açúcar consome aproximadamente de 1,5 a 2 m³ de água, gerando conseqüentemente, 1 m³ de água residuária (SAHU; CHAUDHARI, 2015).

Um dos processamentos em que são geradas águas residuais é a limpeza nas distintas áreas da fábrica. Vale ressaltar que a limpeza é em relação a toda a usina, sobretudo, áreas como o piso da seção de moagem e diversas instalações: evaporadores, clarificadores, painéis de vácuo, centrífugas, entre outras. O processo de limpeza periódica dos equipamentos, como o sistema de água de cal e a planta produtora de SO₂, também contribui significativamente para o considerável volume de águas residuais. Além disso, a descalcificação periódica de trocadores de calor e evaporadores mediante o uso de substâncias químicas como NaOH, Na₂CO₃ e HCl, para a remoção de depósitos de calcário e a neutralização de resíduos ácidos, também representa uma fonte relevante de águas residuais na indústria sucroalcooleira (INGARAMO *et al.*, 2009).

A casa de moagem e a casa de processo representam também fontes de geração de águas residuais no processamento de açúcar. As águas residuais provenientes das instalações da fábrica apresentam contaminação primordialmente constituída por óleos, gorduras e sólidos suspensos. Em contrapartida, as águas residuais originadas na casa de processo possuem característica como alto teor de matéria orgânica (MEMON; SUHAI AHMED; ABDUL KHALIQ, 2006).

Diferentes processos na usina da cana de açúcar, geram diferentes propriedades físicas e químicas dos efluentes da indústria sucroalcooleira, coletados e submetidos à avaliação nas áreas da casa de moagem, casa de processo e nas águas residuais finais combinadas (Tabela 5). As diferentes características dos efluentes podem ser provenientes de tipos de produtos químicos, do cultivo da cana-de-açúcar assim como pelas características físicas, químicas e biológicas do solo (JADHAV; VAIDYA; DETHE, 2013).

Tabela 5 - Características físicas e químicas da água residual na indústria sucroalcooleira.

Parâmetro	Unidade	Valores	Referências
Ph	-	6.7-8.4	Jadhav, Vaidya, Dethé (2013)
Demanda Química de Oxigênio Total (DQO)	mg.L ⁻¹	1,100.3-2,148.9	Jadhav, Vaidya, Dethé (2013)
Demanda Bioquímica de Oxigênio 5 dias (DBO ₅)	mg.L ⁻¹	654.6-1,968.5	Jadhav, Vaidya, Dethé (2013)
Nitrogênio total (NTK)	mg.L ⁻¹	11.1-40.6	Jadhav, Vaidya, Dethé (2013)
Temperatura	°C	29.3-44.3	Jadhav, Vaidya, Dethé (2013)
Sulfatos (SO ₄ ²⁻)	mg.L ⁻¹	21,5-51,7	Jadhav, Vaidya, Dethé (2013)
Sólidos Totais (ST)	mg.L ⁻¹	2,452.3-3,050.6	Jadhav, Vaidya, Dethé (2013)
Sólidos Dissolvidos Totais (SDT)	mg.L ⁻¹	1,480.2-1,915.1	Jadhav, Vaidya, Dethé (2013)
Sólidos Suspensos Totais (STS)	mg.L ⁻¹	220.3-790.7	Jadhav, Vaidya, Dethé (2013)
Cloretos	mg.L ⁻¹	30.5-866.6	Jadhav, Vaidya, Dethé (2013)
Fosfatos	mg.L ⁻¹	1.2-9.6	Jadhav, Vaidya, Dethé (2013)
Nitrogênio amoniacal (N-NH ₄ ⁺)	mg.L ⁻¹	0.0-4.2	Jadhav, Vaidya, Dethé (2013)
Nitrato (NNO ₃ ⁻)	mg.L ⁻¹	0.4-0.9	Jadhav, Vaidya, Dethé (2013)
Óleos e graxas	mg.L ⁻¹	88.7-134.4	Jadhav, Vaidya, Dethé (2013)
Cálcio (Ca)	mg.L ⁻¹	365.4-468.0	Jadhav, Vaidya, Dethé (2013)
Magnésio	mg.L ⁻¹	214.8-341.0	Jadhav, Vaidya, Dethé (2013)
Dureza Total	mg.L ⁻¹	356.2-2,493.1	Jadhav, Vaidya, Dethé (2013)
Condutividade Elétrica	µS.cm ⁻¹	540.3-925.9	Jadhav, Vaidya, Dethé (2013)

Um dos desafios ambientais, em países em desenvolvimento, é em relação a gestão inadequada dessas águas residuais industriais, principalmente em relação à complexidade inerente aos resíduos gerados e à limitação das tecnologias disponíveis para a remoção completa de todos os poluentes de forma eficiente. A problemática do setor agroindustrial sucroalcooleiro é em relação ao tratamento eficiente dos subprodutos caracterizados por elevadas concentrações de sulfato, nitrato, cloretos, cálcio e magnésio, elevadas concentrações de sólidos, DBO₅, DQO, que podem ser contaminantes do solo e água (FITO; TEFERA; VAN HULLE, 2018).

3.5.6 Água Residual da Indústria Sucroalcooleira – Bioetanol

Na indústria sucroalcooleira, a destilaria de bioetanol se destaca como a principal consumidora de água bruta, com consumo variando entre 25 e 175 litros por litro de álcool produzido, incluindo tanto finalidades não relacionadas ao processo, como resfriamento e geração de vapor, quanto o próprio processamento, englobando atividades como a propagação de levedura e a preparação de melaço (NATARAJ; HOSAMANI; AMINABHAVI, 2006).

As principais fontes de águas residuais em destilarias de melaço baseiam-se nos seguintes elementos: lodo de fermentação, efluentes de lavagem e borras gastas. O efluente da lavagem fermentada representa o principal subproduto resultante do processo de fermentação, podendo ser passível de decantação. O resíduo restante é conhecido como lodo de levedura, derivado do fermentador. Este efluente é descarregado da parte inferior dos fermentadores, contribuindo assim para a carga de poluição nas instalações de destilação. Portanto, o lodo de fermentador consiste no efluente gerado após a fermentação, que é separado da solução de bioetanol por meio de processos de filtração. Já as borras gastas são os resíduos provenientes da coluna retificadora e, normalmente, essas são recicladas. Essas borras gastas comumente assumem a forma de líquidos quentes e incolores, com uma taxa de geração aproximada de 1,7 a 2,0 litros por litro de álcool retificado (KHARAYAT, 2012; TEWARI; BATRA; BALAKRISHNAN, 2007).

Seguindo as diferentes categorias de águas residuais da indústria sucroalcooleira no processamento do bioetanol, a destilação é identificada como a etapa principal de geração de efluente em destilarias de bioetanol, tanto em termos de quantidade quanto de qualidade.

3.6 Conclusão

O cultivo de microalgas em vinhaça representa uma estratégia promissora, podendo ser inovadora em questões de recirculação e reúso da água residual da usina sucroalcooleira na diluição da vinhaça e superação das principais limitações desse efluente para o cultivo de microalgas. Busca-se assim por soluções sustentáveis, aliando a produção de biocombustíveis e tratamento de resíduos agroindustriais. Além disso, destaca-se a partir desta prática, a redução de impactos ambientais negativos oriundos dos subprodutos da indústria sucroalcooleira, e a oportunidade de produção de biomassa algal com inúmeras aplicações, desde biocombustíveis até bioplásticos e produtos químicos de valor agregado.

Portanto, torna-se possível solucionar um desafio ambiental em uma oportunidade econômica, criando um ciclo de produtividade e tratamento de resíduos. A busca por

práticas sustentáveis reduz os impactos negativos pelo tratamento adequado de subprodutos da indústria sucroalcooleira, assim como contribui significativamente para a geração de produtos de alto valor agregado.

Além disso, estudos nesse seguimento possuem grande potencial de aprimoramento, com objetivo de tornar o processo ainda mais eficaz e viável economicamente, tornando-o um importante assunto em relação ao panorama energético sustentável do futuro.

REFERÊNCIAS

ABDEL-RAOUF, N.; AL-HOMAIDAN, A. A.; IBRAHEEM, I. B. M. Microalgae and wastewater treatment. **Saudi Journal of Biological Sciences**, 2012, v.19, n.3, p. 257-275. DOI: 10.1016/j.sjbs.2012.04.005

ANDRADE, D. S.; FILHO, A. C. Microalgas de águas continentais – Potencialidades e desafios do cultivo. Londrina: **IAPAR**, 2014 v.1, cap. 6.

AQUINO, S. F.; SILVA, S.; Q; CHERNICHARO, C. A. L. Considerações práticas sobre o teste de demanda química de oxigênio (DQO) aplicado à análise de efluentes anaeróbios. **Engenharia Sanitaria e Ambiental**, 2006, v. 11, p. 295-304. DOI: 10.1590/S1413-41522006000400001

ARIMI, M. M. *et al.* Antimicrobial colorants in molasses distillery wastewater and their removal technologies. **International Biodeterioration & Biodegradation**, 2014; v. 87, p. 34-43. DOI: 10.1016/j.ibiod.2013.11.002

ASLAN, S.; KAPDAN, I. K. Batch kinetics of nitrogen and phosphorus removal from synthetic wastewater by algae. **Ecological Engineering**, v. 28, p. 64-70, 2006. DOI: 10.1016/j.ecoleng.2006.04.003

AZOV, Y.; GOLDMAN, J. C. Free ammonia inhibition of algal photosynthesis in intensive cultures. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 43, p. 735–739, 1982. DOI: 10.1016/j.biortech.2020.123046

BELAY, A. Biology and Industrial Production of *Arthrospira* (Spirulina). In: Richmond, A.; Hu, Q. Handbook of microalgal culture: applied phycology and biotechnology. 2 ed. **Wiley-**

Blackwell, 2013, p. 339-358. DOI: 10.1002/9781118567166.ch17

BERENGUEL, M. *et al.* Model predictive control of pH in tubular photobioreactors. **Jornal of Process Control**, v. 14, p. 377-387, 2004. DOI: 10.1016/j.jprocont.2003.07.001

BORGES, A. V. *et al.* Co-digesting sugarcane vinasse and distilled glycerol to enhance bioenergy generation in biofuel-producing plants. **Energy Conversion and Management**, v. 250, n. 114897, 2021. DOI: 10.1016/j.enconman.2021.114897

BOUTERFAS, R.; BELKOURA, M.; DAUTA, A. Light and temperature effects on the growth rate of three freshwater algae isolated from a eutrophic lake. **Hydrobiologia**, v. 489, p. 207–217, 2002. DOI : 10.1023/A:1023241006464

BUDIYONO, I. S.; SUMARDIONO, S.; SASONGKO, S. B. Production of *Spirulina platensis* biomass using digested vinasse as cultivation medium. *Trends in Applied Sciences Research*, v. 9, p. 93-102, 2014. DOI: =tasr.2014.93.102

CALIXTO C. D. *et al.* Biochemical compositions and fatty acid profiles in four species of microalgae cultivated on household sewage and agro-industrial residues. **Bioresource Technology**, v. 221, p. 438-446, 2016. DOI: 10.1016/j.biortech.2016.09.066

CARRILHO, E. N.; LABUTO, G.; KAMOGAWA, M. Y. Destination of vinasse, a residue from alcohol industry. **Environmental Materials and Waste**, p. 21–43, 2016. DOI: 10.1016/B978-0-12-803837-6.00002-0

CHAO, I. R. S. **Remoção de fósforo de efluentes de estações de tratamento biológico de esgoto utilizando lodo de estação de tratamento de água**. Dissertação (mestrado acadêmico) – Escola Politécnica da Universidade de São Paulo, 2006. Disponível em: 10.11606/D.3.2006.tde-14122006-145950. Acesso em: 25 nov. 2022.

CHRISTOFOLETTI, C. A. *et al.* Sugarcane vinasse: Environmental implications of its use. **Waste Management**, v. 33, p. 2752–2761, 2013. DOI: 10.1016/j.wasman.2013.09.005

COCA, M. *et al.* Protein production in *Spirulina platensis* biomass using beet vinasse-

supplemented culture media. **Food and Bioproducts Processing**, v. 94, p. 306-312, 2015. DOI: 10.1016/j.fbp.2014.03.012

CORNET, J. F.; DUSSAP, C. G.; GROS, J. B. Kinetics and energetics of photosynthetic microorganisms in photobioreactors. Application to *Spirulina* growth. **Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology**, v. 59, p. 155-223, 1998. DOI: 10.1007/BFb0102299

CRAGGS, R. J. Advanced integrated wastewater ponds. In: Shilton, A. (Ed.), *Pond Treatment Technology*, **IWA Scientific and Technical Report Series**, London, UK, p.282–310, 2005.

DEL NERY V. et al. Hydraulic and organic rates applied to pilot scale UASB reactor for sugar cane vinasse degradation and biogas generation. **Biomass and Bioenergy**, v. 119, p. 411-417, 2018. DOI: 10.1016/j.biombioe.2018.10.002

DERNER, R. B. **Efeito de fontes de carbono no crescimento e na composição bioquímica das microalgas *Chaetoceros muellei* e *Thalassiosira fluviatilis*, com ênfase no teor de ácidos graxos poli-insaturados**. Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2006, p. 158. Disponível em: repositorio.ufsc.br/handle/123456789/88993. Acesso em: 10 jun. 2022.

DERNER, R. B. *et al.* Microalgas, produtos e aplicações. **Ciência Rural**, v. 36, n. 6, p. 1959-1967, 2016. DOI: 10.1590/S0103-84782006000600050

DOS REIS C. M. et al.. Evaluation of hydrogen and methane production from sugarcane vinasse in an anaerobic fluidized bed reactor. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 40, p. 8498-8509, 2015. DOI: 10.1016/j.ijhydene.2015.04.136

DUBINSKY, Z. Productivity of algae under natural conditions: algal mass culture and water blooms in nature. In: RICHMOND, A. (Ed.). **Handbook of microalgal mass culture**. Boca Raton: CRC, p. 101-116, 1990.

DULEKGURGEN, E. *et al.* Size distribution of wastewater COD fractions as an index for biodegradability. **Water Research**, v. 40, p. 273-282, 2006. DOI:

10.1016/j.watres.2005.10.032

ELIA NETO, A. **Estado da arte da vinhaça**. In: ÚNICA (União da Indústria da Cana de Açúcar), 2º Workshop “Resíduos urbanos e agrícolas: energia, reciclagem de nutrientes e produção de fertilizantes”, Campinas - SP, 2016. Disponível em: <https://docplayer.com.br/51075325-Estado-da-arte-da-vinhaca.html>. Acesso em: 25 abr. 2022.

ENGIN, I. K. *et al.* Evaluation of heterotrophic and mixotrophic cultivation of novel *Micractinium* sp. ME05 on vinasse and its scale up for biodiesel production. **Bioresource Technology**, v. 251: p. 128-134, 2018. DOI: 10.1016/j.biortech.2017.12.023

ESPAÑA-GAMBOA, E. I. *et al.* Methane production by treating vinasses from hydrous ethanol using a modified UASB reactor. **Biotechnology for Biofuels**, v. 5, n. 82, 2012. DOI: 10.1186/1754-6834-5-82

FAQUIN, V. Nutrição mineral de plantas. Lavras: Ed. **UFLA/FAEPE**, 2005.

FITO J, TEFERA N, VAN HULLE SWH. Anaerobic treatment of blended sugar industry and ethanol distillery wastewater through biphasic high rate reactor. **Journal of Environmental Science and Health**, v. 53, p. 676–685, 2018. DOI: 10.1080/10934529.2018.1438826

FITO, J. I. *et al.* Evaluation of water footprint in sugar industries and bioethanol distilleries in two different water basins toward water sustainability. **International Journal of Environmental Science and Technology**, v. 20, p. 2427–2440, 2023. DOI: 10.1007/s13762-022-04182-z

GARCÍA, J.; MUJERIEGO, R; HERNANDEZ-MARINE, M. High rate algal pond operating strategies for urban wastewater nitrogen removal. **Journal of Applied Phycology**, v. 12, p. 331-339, 2000. DOI: 10.1023/A:1008146421368

GOPAL, A. R.; KAMMEN, D. M. Molasses for ethanol : the economic and environmental impacts of a new pathway for the lifecycle greenhouse gas analysis of sugarcane ethanol. **Environmental Research Letters**, v. 4, p. 1-5, 2009. DOI: 10.1088/1748-9326/4/4/044005

GROBBELAAR, J. U. Inorganic Algal Nutrition. **Applied Phycology and Biotechnology**, p. 359-368, 2013. DOI: 10.1002/9781118567166.ch18

HATANO, K. *et al.* Separation and characterization of the colored material from sugarcane molasses. **Chemosphere**, v. 71, p. 1730-1737, 2008. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2007.12.019.

HARRIS, G. P. Photosynthesis, productivity and growth: the physiological ecology of phytoplankton. **Ergebnisse der limnologie**, v. 10, p. 1-171, 1978.

HENZE, M. Characterization of wastewater for modeling of activated-sludge processes. **Water Science Technology**, v. 25, p. 1-15, 1992. DOI: 10.2166/wst.1992.0110.

HENZE, M. *et al.* A general model for single-sludge wastewater treatment systems. **Water Research**, v.21, p. 505-515, 1987. DOI: 10.1016/0043-1354(87)90058-3

HOH, D.; WATSON, S.; KAN, E. Algal biofilm reactors for integrated wastewater treatment and biofuel production: a review. **Chemical Engineering Journal**, v. 287, p. 466-473, 2016. DOI: 10.1016/j.cej.2015.11.062.

HU, Q. Environmental Effects on Cell Composition. In: RICHMOND, A.; HU, Q. Handbook of microalgal culture : applied phycology and biotechnology. 2 ed. **Wiley-Blackwell**, 2013, p.114-122, 2013.

INGARAMO, A. *et al.* Water and wastewater eco-efficiency indicators for the sugar cane industry. **Journal of Cleaner Production**, v. 17, p. 487-95, 2009. DOI: 10.1016/j.jclepro.2008.08.018

JADHAV, P. G.; VAIDYA, N. G.; DETHE, S. B. Characterization and comparative study of cane sugar industry waste water. *International Journal of Chemical and Physical Sciences*, v. 2, p. 19-25, 2013. DOI: bf58009f1a121d9b7f6f80468026934abb9c3cb7

JANKE, L. *et al.* Enhancing biogas production from vinasse in sugarcane biorefineries:

- effects of urea and trace elements supplementation on process performance and stability. **Bioresource Technology**, v. 217, p. 10-20, 2016. DOI: 10.1016/j.biortech.2016.01.110
- JIA, H.; YUAN, Q. Removal of nitrogen from wastewater using microalgae and microalgae-bacteria consortia. **Cogent Environmental Science**, v. 2, 2016. DOI: 10.1080/23311843.2016.1275089
- JIANG, Y. *et al.* Establishment of stable microalgal-bacterial consortium in liquid digestate for nutrient removal and biomass accumulation. **Bioresource Technology**, v. 268, p. 300-307, 2018. DOI: 10.1016/j.biortech.2018.07.142
- JOHNSON, I. *et al.* Cyanobacteria/microalgae for distillery wastewater treatment-past, present and the future. **Microbial Wastewater Treatment**, p. 195-236, 2019. DOI: 10.1016/B978-0-12-816809-7.00010-5.
- KAPLAN D. *et al.* Algal nutrition. In: **Handbook of Microalgal Mass Culture** (ed. A. Richmond), p. 147–198. CRC Press, Boca Raton, FL, 1986.
- KHARAYAT, Y. Distillery wastewater: bioremediation approaches. **Journal of Integrative Environmental Sciences**, v. 9, p. 69-91, 2012. DOI: 10.1080/1943815X.2012.688056
- LIANG, Y.; SARKANY, N.; CUI, Y. Biomass and lipid productivities of *Chlorella vulgaris* under autotrophic, heterotrophic and mixotrophic growth conditions. **Biotechnology Letters**, v. 31, p. 1043-1049, 2009. DOI: 10.1007/s10529-009-9975-7
- LOPES, T. S. A. *et al.* Estudo cinético do desenvolvimento da microalga *Chlorella Vulgaris* em efluentes de tratamento anaeróbico de esgoto doméstico para fins de produção de biodiesel. **Revista Ciência e tecnologia**, v. 8, p. 25-33, 2012. DOI: 10.6008/CBPC2179-6858.2018.008.0007
- LOURENÇO, S. O. Cultivo de microalgas marinhas: princípios e aplicações. São Carlos: **RiMa**, p.588, 2006.
- LYRA, M. R. C. C.; ROLIM, M. M.; SILVA, J. A. A. Topossequência de solos fertigados

com vinhaça: contribuição para a qualidade das águas do lençol freático. **Revista brasileira de engenharia agrícola e ambiental**, 2003, v. 7, p. 525-531, 2003. DOI: 10.1590/S1415-43662003000300020

MACEDO, M. F; DUARTE, P.; FERREIRA, J. The influence of incubation periods on photosynthesis–irradiance curves. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v. 274, p. 101–120, 2002. DOI: 10.1016/S0022-0981(02)00202-2.

MARQUES, S. S. I. *et al.* Growth of *Chlorella vulgaris* on sugarcane vinasse: the effect of anaerobic digestion pretreatment. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 171, p. 1933-1943, 2013. DOI: 10.1007/s12010-013-0481-y

MEMON, A. R.; SUHAIL AHMED, S.; ABDUL KHALIQ, A. Sugar industry effluent characteristics and chemical analysis. **Journal of Applied and Emerging Sciences**, v. 1 p. 156-157, 2006. DOI: 10.36785/jaes.1264

MITRA, D.; VAN LEEUWEN, J.; LAMSAL, B. Heterotrophic/mixotrophic cultivation of oleaginous *Chlorella vulgaris* on industrial co-products. **Algal Research**, v. 1, p. 40-48, 2012. DOI: 10.1016/j.algal.2012.03.002

MOHEIMANI, N. R. Inorganic carbon and pH effect on growth and lipid productivity of *Tetraselmis suecica* and *Chlorella* sp (Chlorophyta) grown outdoors in bag photobioreactors. **Journal of Applied Phycology**, v. 25, p. 387–398, 2012. DOI: 10.1007/s10811-012-9873-6

MORAES, B. S. *et al.* Enriched microbial consortia for dark fermentation of sugarcane vinasse towards value-added short-chain organic acids and alcohol production. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 127, p. 594-601, 2019. DOI: 10.1016/j.jbiosc.2018.10.008

MORTENSEN, K. Y. B.; RAINUZZO, J. K.; KNUTSEN, G. Fatty acid and elemental composition of the marine diatom *Chaetoceros gracilis* Schiitt. **Journal of experimental Marine Biology and Ecology**, v. 122, p. 173-185, 1988. DOI: 10.1016/0022-0981(88)90183-9.

MOUCHET, P. Algal reactions to mineral and organic micropollutants, ecological consequences and possibilities for industrial scale application; a review. **Water Research**, v. 20, p. 399–412, 1986. DOI: 10.1016/0043-1354(86)90186-7

NATARAJ, S. K.; HOSAMANI, K. M.; AMINABHAVI, T. M. Distillery wastewater treatment by the membrane-based nanofiltration and reverse osmosis processes. **Water Research**, v. 40, p. 2349-2356, 2006. DOI: 10.1016/j.watres.2006.04.022

NUVOLARI, A. Esgoto sanitário: coleta, transporte, tratamento e reuso agrícola. 2.ed. São Paulo: **Blucher**, 2011. 562 p.

OLIVEIRA, H. T.; CÁCERES, O. Resultados preliminares sobre o uso de vinhoto como meio de cultura para 8 espécies de microalgas de água doce. **Acta Limnologica Brasiliensia**, v. 1, p. 601-610, 1986. DOI: 10.1016/j.bcab.2019.101438

PANT, D.; ADHOLEYA, A. Biological approaches for treatment of distillery wastewater: a review. **Bioresource Technology**, v. 98, p. 2321-2334, 2007. DOI: 10.1016/j.biortech.2006.09.027

PARRON, L.; M.; MUNIZ, D. H. F.; PEREIRA, C. M. Manual de procedimentos de amostragem e análise físico-química da água. Colombo: **EMBRAPA Florestas**, 2011. Disponível em: ainfo.cnptia.embrapa.br. Acesso em: 21 jun. 2022.

PARSAEE, M.; KIANI DEH KIANI, M.; KARIMI, K. A review of biogas production from sugarcane vinasse. **Biomass Bioenergy**, v. 122, p. 117–125, 2019; DOI: 10.1016/j.biombioe.2019.01.034.

PODDAR P. K.; SAHU, O. Quality and management of wastewater in sugar industry. **Applied Water Science**, v. 7, p. 461-468, 2017. DOI: 10.1007/s13201-015-0264-4

RAMOS, L. R.; SILVA, E. L. Thermophilic hydrogen and methane production from sugarcane stillage in two-stage anaerobic fluidized bed reactors. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 45, p. 5239-5251, 2019. DOI: 10.1016/j.ijhydene.2019.05.025

RAS, M.; STEYER, J. P.; BERNARD, O. Temperature effect on microalgae: a crucial factor for outdoor production. **Environmental Science and Bio/Technology**, v. 12, p. 153–164, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11157-013-9310-6>

RATKOWSKY, D. A. *et al.* Model for bacterial culture growth rate throughout the entire biokinetic temperature range. **Journal of Bacteriology**, v. 154, p. 1222-1226, 1983. DOI: 10.1128/jb.154.3.1222-1226.1983

RIGANO, V. D. M. *et al.* The physiological significance of light and dark NH₄⁺ metabolism in *Chlorella sorokiniana*. **Phytochemistry**, v. 47, p. 177-181, 1998. DOI: 10.1016/S0031-9422(97)00569-4

RICHMOND, A. Principles for attaining maximal microalgal productivity in photobioreactors: an overview. **Hydrobiologia**, v. 512, p. 33-37, 2004. DOI: 10.1007/978-94-007-0944-7_5.

SAHU, O. P.; CHAUDHARI, P. K. Electrochemical treatment of sugar industry wastewater: COD and color removal. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 739, p. 122-129, 2015. DOI: 10.1016/j.jelechem.2014.11.037

SALVUCCI, M. E.; CRAFTS-BRANDNER, S. J. Inhibition of photosynthesis by heat stress: the activation state of Rubisco as a limiting factor in photosynthesis. **Physiology Plant**, v. 120, p. 179-186, 2004. DOI: 10.1111/j.0031-9317.2004.0173.x.

SANTANA, H. *et al.* Microalgae cultivation in sugarcane vinasse: Selection, growth and biochemical characterization. **Bioresource Technology**, v. 228, p. 133-140, 2016. DOI: 10.1016/j.biortech.2016.12.075

SANTOS P. S. *et al.* Does sugarcane vinasse composition variability affect the bioenergy yield in anaerobic systems? A dual kinetic-energetic assessment. **Journal of Cleaner Production**, v. 240, n. 118005, 2019. DOI: 10.1016/j.jclepro.2019.118005.

SASI, D. Biokinetic behaviour of *Chlorella vulgaris* in a continuous stirred bioreactor and a novel circulating loop photobioreactor. Diss. University of Saskatchewan, 2009. Disponível

em: <http://hdl.handle.net/10388/etd-09172009-091508>. Acesso em: 25 abr. 2022.

SCHMITZ, R.; MAGRO, C. D.; COLLA, L. M. Aplicações ambientais de microalgas. **Revista CIATEC–UPF**, v. 4, p. 48-60, 2012. DOI: 10.5335/ciatec.v4i1.2393

SHEN, Y.; GAO, J.; LI, L. Municipal wastewater treatment via co-immobilized microalgal bacterial symbiosis: Microorganism growth and nutrients removal. **Bioresource Technology**, v. 243, p. 905–913, 2017. DOI: 10.1016/j.biortech.2017.07.041.

SHIRAIWA, Y.; GOYAL, A.; TOLBERT, N. E. Alkalization of the medium by unicellular green during uptake of dissolved inorganic carbon. **Plant and Cell Physiology**, v. 34, p. 649-657, 1993. DOI: 10.1093/oxfordjournals.pcp.a078467.

SILVA, A. F. R. *et al.* Resource recovery from sugarcane vinasse by anaerobic digestion – A review. **Journal of Environmental Management**, v. 295; n. 113137, 2021. DOI: 10.1016/j.jenvman.2021.113137

SIQUEIRA, J. C. *et al.* Recovery of vinasse with combined microalgae cultivation in a conceptual energy-efficient industrial plant: Analysis of related process considerations. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 155, n. 11904, 2022. DOI: 10.1016/j.rser.2021.111904

SIQUEIRA, L. M.; DAMIANO, E. S.; SILVA, E. L. Influence of organic loading rate on the anaerobic treatment of sugarcane vinasse and biogás production in fluidized bed reactor. **Journal of Environmental Science and Health**, v. 48, p. 1707-1716, 2013. DOI: 10.1080/10934529.2013.815535

SOTO, M. F. *et al.* BOD and COD removal in vinasses from sugarcane alcoholic distillation by *Chlorella vulgaris*: environmental evaluation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 176, n. 108191, 2021. DOI: 10.1016/j.bej.2021.108191

SOARES, D. Avaliação do crescimento celular e da produtividade de lipídeos de microalgas marinhas em diferentes regimes de cultivo. Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal do Paraná, UFP. Curitiba, 2010. Disponível em:

<https://educapes.capes.gov.br/handle/1884/22075>. Acesso em: 24 abr. 2022.

SOLETTO, D. *et al.* Batch and fedbatch cultivations of *Spirulina platensis* using ammonium sulphate and urea as nitrogen sources. **Aquaculture**, v. 243, p. 217-224, 2005. DOI: 10.1016/j.aquaculture.2004.10.005.

SOLOMON, S. K. Environmental pollution and its management in sugar industry in India: an appraisal. **Sugar Tech**, v. 7, p. 77-81, 2005. DOI: 10.1007/BF02942422

TEWARI, P. K.; BATRA, V. S.; BALAKRISHNAN, M. Water management initiatives in sugarcane molasses based distilleries in India. **Resources, Conservation and Recycling**, v. 52, p. 351-367, 2007. DOI: 10.1016/j.resconrec.2007.05.003

TORZILLO, G. *et al.* Biological constraints in algal biotechnology. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, v. 8, p. 338–348, 2003. DOI: 10.1007/BF02949277

VALENTE, J. P. S.; PADILHA, P. M.; SILVA, A. M. M. Oxigênio dissolvido (OD), demanda bioquímica de oxigênio (DBO) e demanda química de oxigênio (DQO) como parâmetros de poluição no ribeirão Lavapés/Botucatu - SP. **Eclética Química**, v. 22, p. 49-66, 1997. DOI: 10.1590/S0100-46701997000100005.

VELOSO, V. *et. al.* Lipid production by *Phaeodactylum tricornutum*. **Bioresource Technology**, v. 38, p. 115-119, 1991. DOI: 10.1016/0960-8524(91)90141-6.

VIEIRA, J. G. *et al.* Uptake of phosphorus from dairy wastewater by heterotrophic cultures of cyanobacteria. **Desalination and Water Treatment**, v. 40, p. 1-3, 2012. DOI: 10.1080/19443994.2012.671249.

WALKER, D .A. Biofuels, facts, fantasy and feasibility. **Journal of Applied Phycology**, v.21, p. 509-517 , 2009. DOI: 10.1007/s10811-009-9446-5 .

WANG, Y. *et al.* Perspectives on the feasibility of using microalgae for industrial wastewater treatment. **Bioresource Technology**, v. 222, p. 485-497, 2016. DOI: 10.1016/j.biortech.2016.09.106

WATANABE, M. M.; TANABE, Y. Biology and Industrial Potential of *Botryococcus braunii*. In: RICHMOND, A.; HU, Q. Handbook of microalgal culture: applied phycology and biotechnology. 2 ed. **Wiley-Blackwell**, 2013, p. 369-387. DOI: 10.1002/9781118567166.ch19

WENTZEL, M. C. *et al.* Batch test for characterization of the carbonaceous materials in municipal wastewater. **Water SA**, v. 25, p. 327-335, 1999. DOI: /publication/279890250

WILKIE, A. C.; RIEDESEL, K. J.; OWENS, J. M. Stillage characterization and anaerobic treatment of ethanol stillage from conventional and cellulosic feedstocks. **Biomass Bioenergy**, v. 19, p. 63–102, 2000. DOI: 10.1016/S0961-9534(00)00017-9

WU, J. *et al.* A gradual change between methanogenesis and sulfidogenesis during a long-term UASB treatment of sulfaterich chemical wastewater. **Science Total Environment**, v. 636, p. 168–176, 2018. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2018.04.172

ZHANG, L. *et al.* Cultivation of microalgae using anaerobically digested effluent from kitchen waste as a nutrient source for biodiesel production. **Renewable Energy**, v. 115, p. 276-287, 2018. DOI: 10.1016/j.renene.2017.08.034

ZHU, J.; RONG, J.; ZONG, B. Factors in mass cultivation of microalgae for biodiesel. **Chinese Journal of Catalysis**, v. 34, p. 80–100, 2013. DOI: 10.1016/S1872-2067(11)60497-X.

SEGUNDA PARTE

PRODUCTION OF MICROALGAL BIOMASS CULTIVATED IN VINASSE AND RESIDUAL WATER FROM SUGAR-ALCOHOL INDUSTRY: SEARCHING FOR A CLOSED-LOOP WATER DEMAND

Abstract

Growing microalgae in sugarcane vinasse is an alternative for integrated biomass production and wastewater treatment. One of the challenges is the high organic load of vinasse, requiring dilution of this wastewater for better microalgal productivity. However, the use of natural resources may impair the technology application on a large scale, justifying the search for sustainable alternatives. Therefore, this study evaluated microalgae growth in vinasse, as well as in the recirculated water (supernatant of the growth media separated after cultivation) used to dilute vinasse. The residual water from the sugar-alcohol industry was used as a dilution medium to scale up the proposition technically and environmentally and get a closed-loop water demand in the industrial plant. Firstly, experimental phases (P) were carried out to identify the best concentration of vinasse for microalgae growth. Two cultivation phases (P1 and P2) were carried out under a 12h photoperiod, aeration of 3 L.min⁻¹ at 0.012 Mpa, 11,000 lux, and 28°C. P1 tested vinasse dilutions in 1, 5, 10, 15, and 20% of distilled water, and P2 evaluated, for better conditions defined in P1, the recirculation of the culture supernatant. The best condition for microalgae growth was vinasse diluted to 5%, with yields in P1 and P2, respectively, of 0.42, 0.77 mgChla.L⁻¹.d⁻¹ and 43.75, 58.48 mgVSS.L⁻¹.d⁻¹. Secondly, in P3, P4, and P5, residual water from the sugar-alcohol industry was tested to dilute the vinasse. In P3, 50% of residual water was indicated as the best dilution for biomass productivity in 5% vinasse. In P4, algal growth was confirmed, making it possible to analyze the biomass composition in 50% containing residual water from the sugarcane industry and P5 verified the possibility of reusing this medium in cultivation. In P4 and P5, cultivation productivity was 1.30, 1.69 mgChla.L⁻¹.d⁻¹ and 20.62, 55.63 mgVSS.L⁻¹.d⁻¹, respectively. The biomass composition was similar in P4 and P5, with ash contents of 34.26% in P5 and 28.61% in P4. For proteins, carbohydrates, and neutral lipids, the values were 5.3-8%, 15.3-16.2%, and 19.4-22.4%, respectively. High organic matter removal efficiencies of 73% were found in P5, demonstrating that the effluent from the industrial process, together with the supernatant from the recirculation of the culture medium, can be used to close the system's water demand.

Keywords: Algal biomass; Sugarcane vinasse; Recirculation of cultivation medium; Water balance.

1 Introduction

Waste valorization combined with energy recovery can be environmentally and economically sustainable strategies in sugarcane processing, especially in the use of by-products from ethanol production by the sugar and alcohol agroindustry. The transformation of sugarcane into ethanol is a process of fermentation and distillation, and vinasse is the main effluent from this process, specifically from the fermentation of sugarcane juice. Around 10 to 12 liters of vinasse are generated for every liter of ethanol produced (SIQUEIRA et al., 2022). This wastewater is often used directly on crops without any treatment, as fertilizer (BULLER et al., 2021; FUESS et al., 2021), creating a risk of soil and water contamination.

Environmental alternatives such as anaerobic digestion and microalgae cultivation are indicated for treating this wastewater, given its physical and chemical characteristics (HURTADO et al., 2021; KIANI DEH KIANI et al., 2021). However, one difficulty in cultivating microalgae in vinasse is the high concentration of organic matter, which can be harmful to microalgae as it favors the growth of heterotrophic microorganisms by increasing competition with microalgae for space and nutrients. Also, vinasse high turbidity and toxic compounds may impair microalgae growth. In view of this, studies have identified the cultivation of microalgae in diluted vinasse as a more effective possibility for biomass productivity and consequent treatment (ENGIN et al., 2018; SOTO et al., 2021). However, the use of a natural resource such as water to dilute vinasse can be an environmentally and economically unsustainable strategy, requiring other fronts of action.

The sugar and alcohol agroindustry necessarily requires a lot of water consumption, generating significant amounts of liquid effluents, mainly in processes at the sugar factory, such as fermentation and distillery. The high water consumption in the sugarcane production process results in a significant freshwater demand (FITO et al., 2023). Sugarcane cultivation accounts for approximately 29% of total agricultural water consumption on a global scale (DEL JORRAT et al., 2018). In addition, bioethanol production is associated with considerable depletion of water resources and pollution problems. Therefore, studies present strategies related to sustainable water management as complex tasks in the sugar-alcohol industry, as discussed by Chooyok et al. (2013) Scarpate et al. (2016), Pina et al. (2017) Mota-lópez et al. (2019) and Deepa et al. (2021).

In terms of world sugarcane production, the top five countries are Brazil with 39%, India with 19%, and China with 7%, followed by Thailand and Pakistan with 4% (DEL JORRAT et al., 2018). Regarding the water footprint of bioethanol derived from sugar cane, specific data has been presented for Peru (1670 L/L), Cuba (6355 L/L), Brazil (2450 L/L), India (2995 L/L) and the United States (2775 L/L), with a global average of 2855 liters of water per liter of bioethanol (GERBENS-LEENES; HOEKSTRA, 2012; SCHOLTEN, 2009). Actions aimed at reusing agroindustry residual water are therefore necessary, and reuse in microalgal cultivation as a diluting agent for vinasse is a sustainable and innovative alternative.

Therefore, in an effort to better define sustainable and optimized practices in the cultivation of microalgae in vinasse, this study evaluated biomass productivity and pollutant removal efficiencies during the cultivation of microalgae in different dilutions of vinasse, also verifying the feasibility of recirculating industrial residual water as a diluting agent for vinasse. This research aims to develop sustainable methods for growing microalgae, using industrial by-products, and promoting efficiency in the treatment of vinasse and residual water.

2 Materials and methods

2.1 Experimental phases

The proposed methodology aims to evaluate the productivity of algal biomass and the treatment efficiency of microalgae cultivation in different dilutions of vinasse and residual water from the sugarcane industry (Table 1). Firstly, two phases (P) were tested with different dilutions of vinasse in distilled water to determine the best condition for the growth and biomass productivity of the microalgae. The experiment was then divided into more three phases. In phases 3, 4, and 5, the microalgae were cultivated in vinasse diluted with residual water from the sugar-alcohol industry instead of distilled water. In phases P2 and P5, the culture supernatant obtained after microalgae growth and biomass settling in previous phases was used to simulate water recirculating within the system. In P3, different dilutions of residual water and 5% vinasse were tested. In P4, cultivation was carried out with residual industry water diluted in distilled water, and the supernatant was removed after 16 days. Finally, in P5, this supernatant was used to grow microalgae, demonstrating the viability of reusing residual industrial water.

Table 1. Configurations of the different experimental phases.

Phases	Culture medium*	Inoculum (mL)	Vinasse (mL)	Distilled water (mL)	Supernatant (mL)	Residual water (mL)
P1	C	100	-	900	-	-
	V1%		10	890	-	-
	V5%		50	850	-	-
	V10%		100	800	-	-
	V15%		150	750	-	-
	V20%		200	700	-	-
P2	C	50	-	450	-	-
	V1%		5	445	-	-
	V5%		25	425	-	-
	V10%		50	400	-	-
	SV1%		5	-	445	-
	SV5%		25	-	425	-
P3	RW25%	100	50	637.5	-	212.5
	RW50%			425	-	425
	RW75%			212.5	-	637.5
	RW100%			0	-	850
P4	RW50%	100	50	425	-	425
P5	SRW50%	100	50	-	850	-

*C = control; V = vinasse diluted with distilled water; SV = supernatant from the culture with vinasse and distilled water; RW = vinasse diluted with residual water from the sugar-alcohol industry; SRW = supernatant from the culture with residual water and vinasse.

Phase 1 was prepared only with the addition of distilled water to obtain the dilutions of vinasse (C, V1%, V5%, V10%, V15% and V20%) previously prepared as described in Table 1. Phase 2 operated with the addition of distilled water (C, V1%, V5% and V10%), and the supernatant from the Phase 1 culture in the aforementioned dilutions (SV1%, SV5%). Phase 3 was carried out with the addition of distilled water and residual water from the sugar and ethanol industry (RW25%, RW50%, RW75% and RW100%) in a 5% dilution of previously prepared vinasse. Phase 4 operated only with the addition of distilled water and residual water from the sugar and ethanol industry at a concentration of 50% (AR50%), totaling 18 1L Erlenmeyers to produce a sufficient volume of supernatant for use in Phase 5. Finally, Phase 5 was prepared with the addition of the supernatant from the cultivation of Phase 4 (SAR50%), totaling 7 1L Erlenmeyers. All experiments were carried out in triplicate.

2.2 Preparation of the inoculum

In an experimental fiberglass culture tank, 50 L of sanitary effluent from the Upflow Anaerobic Reactor (UASB) of the Wastewater Treatment Plant of the Federal University of Lavras (WWTP/UFLA) were stored for about 15 days under external conditions (Table S1 of the Supplementary Material).

Afterward, around 600 mL of the culture was transferred to three 1L Erlenmeyer flasks (20% v/v), and 800 mL of a solution previously prepared in the laboratory (BG-11

culture medium with sodium bicarbonate as an additional carbon source) was added to each Erlenmeyer flask, according to Andersen (2013). The Erlenmeyer flasks were kept under 11,000 lux lighting, at a temperature of 30° C, with a 12-hour photoperiod in a BOD chamber. The cultures were monitored every two days for 7 days, with cell counts taken using an optical microscope and a Neubauer chamber. The genera of microalgae identified according to specialized literature (BICUDO and MENEZES, 2006) in the inoculum were *Chlorella* sp. and *Scenedesmus* sp.

2.3 Vinasse and residual water preparation

Sugarcane vinasse was obtained from the Monte Alegre - Adecoagro plant in Monte Belo, Minas Gerais. Samples of vinasse were subjected to gravitational sedimentation for 2 hours to remove suspended solids and debris, and the supernatant was collected. Sterilization was then carried out by autoclaving at 121 °C for 15 min. Then, after cooling, the pH was adjusted to around 7.0 with sodium hydroxide solution (NaOH), and the culture medium was prepared by adding distilled water and/or the supernatant from the culture of previous phases to the dilutions indicated for each experimental phase. Table 2 shows the sugarcane vinasse used in each experimental phase.

Table 2. Physical and chemical characterization of the raw sugarcane vinasse used in each experimental phase.

Variable	Phase 1	Phase 2	Phase 3	Phase 4	Phase 5
COD (mgCOD.L ⁻¹)	17871.8	35567.8	37583.8	31759.8	33327.8
FSS (gFSS.L ⁻¹)	0.02	0.00	0.01	0.01	0.02
TSS (gTSS.L ⁻¹)	0.20	0.13	0.30	0.19	0.19
VSS (gVSS.L ⁻¹)	0.18	0.13	0.29	0.25	0.3
P _T (mgP.L ⁻¹)	14.15	46.25	24.21	38.67	28.57
TKN (mgTKN.L ⁻¹)	95.17	297.73	172.79	285.52	283.67
N-NH ₄ ⁺ (mgN-NH ₄ ⁺ .L ⁻¹)	12.94	22.18	16.63	13.86	19.40
pH	4.46	4.44	4.26	5.06	4.42

* COD = Chemical oxygen demand; FSS = Fixed suspended solids; TSS = Total suspended solids; VSS = Volatile suspended solids P_T = Total phosphorus; TKN = Total *Kjeldahl* nitrogen; N-NH₄⁺ = Ammonia nitrogen

The residual water from the sugar-alcohol industry was obtained from the Monte Alegre - Adecoagro plant in Monte Belo, Minas Gerais. Samples of residual water were

gravitationally sedimented for 2 hours to remove suspended solids and debris and the supernatant was collected. The culture medium was then prepared with or without the addition of distilled water, depending on the experimental phase. In Table 3, the residual water used in each experimental phase is characterized.

Table 3. Physical and chemical characterization of the sugar-alcohol industry residual water used in the experimental phases.

Variable	Phase 3	Phase 4	Phase 5
COD (mgCOD.L ⁻¹)	1879.19	1431.19	1600.95
FSS (mgFSS.L ⁻¹)	0.00	1	0.00
TSS (mgTSS.L ⁻¹)	100	141	100
VSS (mgVSS.L ⁻¹)	100	140	100
P _T (mgP.L ⁻¹)	7.63	1.84	1.39
TKN (mgTKN.L ⁻¹)	24.95	10.16	5.54
N-NH ₄ ⁺ (mgN-NH ₄ ⁺ .L ⁻¹)	2.77	2.77	2.77
pH	5.06	4.77	5.52

* COD = Chemical oxygen demand; FSS = Fixed suspended solids; TSS = Total suspended solids; VSS = Volatile suspended solids P_T = Total phosphorus; TKN = Total *Kjeldahl* nitrogen; N-NH₄⁺ = Ammonia nitrogen.

2.4 Microalgae growth and monitoring

For all experimental phases, the cultures were kept for 16 days in an incubator at a controlled temperature of 28 °C, with aeration of 3 L.min⁻¹ at 0.012 Mpa, 11,000 lux, and a 12-hour photoperiod. 1L Erlenmeyer flasks were used as a growth reactor and all the cultures received 10% inoculum (10% v/v), according to item 2.1.

Phases were monitored every two days with pH measurements, cell counts, and microscopic observations. In P1 and P2, samples were collected from each flask on the 8th day of cultivation for Chla analysis, and on the 16th day for Chla analysis, and total suspended solids (TSS), volatile suspended solids (VSS) and fixed suspended solids (FSS). In P3, P4, and P5, samples were collected on the 1st and 16th day to characterize the variables of total chemical oxygen demand (COD), FSS, TSS, VSS, total phosphorus (P), total Kjeldahl nitrogen (TKN) and total ammoniacal nitrogen (N-NH₄⁺). For these phases, during cultivation, Chla was monitored every 3 days. After 16 days, cultivation was stopped, the cultures were sedimented for 24 hours and the supernatant was removed. The harvested biomass was dried in an oven at 40°C for analytical determinations of the

biochemical composition of the biomass (moisture content, ash, carbohydrates, lipids, and proteins). Table 4 describes the methodologies used in the laboratory analyses.

Table 4. Analytical methods and equipment used to determine variables.

Variable	Analytical Method/Equipment	References
pH	Multi-sensor probe (model HI98196, HANNA)	-
TSS	2540D	
VSS	Gravimetric method	2540E
FSS		-
COD	Colorimetric method (5220B)	APHA, AWWA e WEF (2012)
N-NH ₄ ⁺	Titrimetric method	
TKN	Micro-Kjeldahl method	
P _T	Modified ascorbic acid method (4500 - P.E)	
Chlorophyll-a (Chla)	Spectrophotometry	APHA, AWWA e WEF (2012), Nush (1980) e Nederlands Norm (NEN 6520) (1981)
Ash		Couto et al. (2018)
Humidity		Couto et al. (2018)
Proteins	Micro Kjeldahl method	Matos (2012)
Carbohydrates	Quantitative acid hydrolysis	Couto et al. (2018)
Neutral and polar lipids	Soxhlet extraction with hexane and ethanol	Ramluckan et al. (2014)

2.5 Statistical analysis

The normality of the data was checked using the Anderson-Darling test, and ANOVA/Tukey (parametric data) was used to test for significant differences at 5% probability between each experimental phase. The statistical analyses were carried out using MiniTab Statistical software.

3 Results and discussion

3.1 Determination of vinasse concentration

In P1 and P2, the growth of microalgae was evaluated in different concentrations of vinasse diluted with distilled water and with the supernatant of the recirculated culture, respectively. Regarding the monitoring carried out by analyzing Chla and VSS, microalgae growth was observed mainly in vinasse dilutions of 1%, 5%, and 10% (Table

5).

Table 5. Biomass concentration and productivity in the cultivation of microalgae in different dilutions of sugarcane vinasse with distilled water and recirculated supernatant.

		Chla (mg.L ⁻¹)		Productivity Chla (mg.L ⁻¹ .d ⁻¹)		VSS (mg.L ⁻¹)	Productivity VSS (mg.L ⁻¹ .d ⁻¹)
		8th day	16th day	8th day	16th day		16th day
Phase 1	C	2.20 ^{ac}	1.58 ^a			364.00 ^a	
		(0.78)	(0.54)			(113.00)	
	V1%	5.88 ^{bc}	5.37 ^b	0.28	0.10	605.00 ^a	22.75
		(0.93)	(1.55)	0.74	0.34	(151.00)	37.81
	V5%	7.82 ^b	6.70 ^b	0.98	0.42	761.00 ^a	47.56
		(2.20)	(2.31)	0.44	0.52	(128.00)	49.88
	V10%	3.51 ^{ac}	8.26 ^b			798.00 ^b	
		(1.54)	(2.68)			(299.00)	
V15%	4.18 ^c	4.45 ^a	0.52	0.28	792.00 ^b	49.50	
	(0.31)	(1.27)			(273.00)		
V20%	3.50 ^c	2.91 ^a	0.44	0.18	1008.00 ^{bc}	63.00	
	(0.43)	(1.15)			(175.00)		
Phase 2	C	2.46 ^a	0.98 ^a			188.89 ^a	
		(1.15)	(0.41)			(48.07)	
	V1%	11.56 ^{bcd}	11.97 ^b	0.31	0.06	831.57 ^b	11.81
		(0.43)	(1.44)	1.45	0.75	(261.21)	51.97
	V5%	10.21 ^{bcd}	12.28 ^b	1.28	0.77	939.64 ^b	58.73
		(1.33)	(2.31)	0.96	0.56	(163.92)	65.17
	V10%	7.67 ^{bcd}	9.04 ^b			1042.72 ^{bc}	
		(1.13)	(0.55)			(71.02)	
	SV1%	11.66 ^{bcde}	12.46 ^c	1.46	0.78	679.35 ^b	42.46
		(3.03)	(1.12)			(120.31)	
SV5%	6.22 ^{abcd}	8.38 ^{cd}	0.78	0.52	1505.64 ^{bd}	94.10	
	(3.79)	(4.53)			(151.16)		

Mean values and standard deviation in brackets. Letters in the same column indicate a 5% statistical difference between the values, according to Tukey's test. C = control; V = vinasse diluted with distilled water; SV = supernatant from the culture with vinasse and distilled water.

On the 8th day, the 1% and 5% treatments showed higher concentrations of Chla, with a significant difference ($p < 0.05$) compared to the control. On the 16th day, the 5% dilution showed a higher concentration than the others, and the 10% dilution showed a considerable increase in microalgae growth compared to the 8th day. This may be related to the adaptation phase of microalgae cultivation to higher concentrations of vinasse.

In P2, the growth of the microalgae was higher, mainly in the 1% and 5% cultures, with the addition of distilled water and the addition of the supernatant from Stage 1. On the 16th day of cultivation, the cultures with the addition of distilled water showed no significant difference, while the cultures with the addition of supernatant showed a significant difference ($p < 0.05$). The culture with the addition of 5% distilled water (V5%) and the culture with the addition of supernatant (SV5%) showed a significant difference

($p < 0.05$) between them, with higher concentrations of Chla when supernatant was not used. According to Engin et al. (2018), the productivity of *Micractinium* sp. in 5% diluted vinasse ranged from 170 to 240 $\text{mg.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$, values higher than those found in the present study with the cultivation of microalgae of different species.

Considering the results of P2, the 5% dilution of vinasse was considered the best cultivation condition for algal growth and development, regardless of whether the supernatant was used as a diluting agent.

3.2 Determination of residual water concentration

Once possible dilutions of vinasse for microalgae cultivation had been verified, as well as the use of supernatant water from the cultivation, in P3, P4, and P5, the dilution of vinasse in residual water from the sugar-alcohol industry was tested to make cultivation even more productive, and sustainable with the aim of reusing this effluent. In P3, dilutions of vinasse (5% v/v) with 25%, 50%, 75% and 100% of the residual water were tested.

During cultivation, higher productivity of microalgae was observed in the 50% and 75% dilutions from the 9th day of cultivation, reaching the highest values of 7.3 and 6.9 mgChla.L^{-1} on the 12th day, respectively (Figure 1). The highest pH value of 9.4 was also recorded on the 12th day of cultivation, thus corroborating the Chla analysis, since the growth of microalgae contributes to the elimination of carbon substances that cause acidification of the environment, resulting in a considerable increase in the pH level (CHISTI, 2007).

In P3, the increase in pH value up to the 12th day of cultivation can also be explained by the reduction in TKN and N-NH_4^+ concentrations at 25 and 50% (Table 6). This phenomenon is mainly due to the volatilization of ammonia and the reduction of the nitrification process in a more alkaline environment. It is worth noting that despite many studies on microalgae cultivation in sugarcane vinasse, there is still a gap between the conditions required to obtain a consolidated result, mainly due to the different physical and chemical characteristics found in the effluent.

Valderrama et al. (2002) documented a growth rate of *Chlorella vulgaris* of 0.46 day^{-1} when cultivated in a medium containing 10% vinasse. However, the media used was a combination of two effluents from a sugar-alcohol industry, with different characteristics: i) untreated washing water from all the processes in the industry; ii) vinasse, an effluent produced during the purification of citric acid from sugar, domestic sewage from the industry. In this study, removal efficiencies of *C. vulgaris* of COD, N-NH_4^+ , and P_T were approximately 61%, 72%, and 28%, respectively, which differ from those found in Table 6.

The difference can be explained by the different concentrations and physical and chemical characteristics of the medium, in addition to the selection of the microalgal species. Also, the insertion of a greater volume of inoculum in the culture (20% v/v) was provided, as an aid to greater productivity in relation to time.

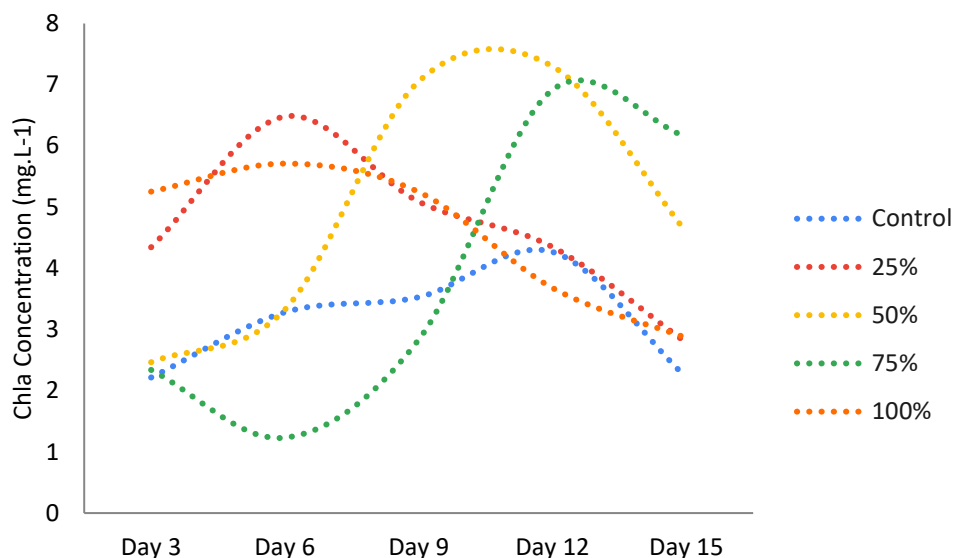


Figure 1 - Chla concentrations during cultivation in Phase 3, with the dilution of vinasse in different residual water concentrations.

In terms of defining the best amount of residual water added using algal biomass production (Chla) as a criterion, the values for the 50% and 75% dilutions were statistically the same ($p > 0.05$). Also, the final VSS concentrations were 330 and 340 mgVSS.L⁻¹, respectively. Even though the greater the amount of wastewater added, the lower the use of water resources, which is a significant environmental advantage, the best dilution was defined based on the treatment efficiencies of each experimental condition.

Table 7 shows the removal efficiencies of COD, TKN, N-NH₄⁺, and P_T at different concentrations of residual water. Therefore, the best dilution in P3 was the addition of 50% residual water in the 5% dilution of vinasse.

Compared to the other concentrations, the treatment with 25% residual water did not show good pollutant removal results. It was also observed that from 50% onwards, the greater the amount of residual added to the culture, the lower the treatment efficiency. In addition, when 100% of the residual water was used, there was no growth of microalgae, as well as the appearance of an unpleasant odor, which can be explained by the more acidic pH of the residual water from the sugar-alcohol industry (around 5 – Table 3), and the high

organic load of the medium, factors which directly influence microalgal growth.

Table 6. Pollutant removal after growing microalgae in 5% vinasse diluted in different concentrations of residual water in Phase 3.

		COD (mg.L ⁻¹)	TKN (mg.L ⁻¹)	N-NH ₄ ⁺ (mg.L ⁻¹)	P _T (mg.L ⁻¹)	
Phase 3	25%	Start	1811.99	15.71	1.85	2,94
		Cultivation	(193.99)	(1,60)	(1.60)	(0,06)
		Final	1274.39	13.86	0.00	1.66
		Cultivation	(158.99)	(0.00)	(0.00)	(0.10)
		Removal (%)	29.67	11.76	100	43,53
	50%	Start	1890.39	24.95	1.85	4.72
		Cultivation	(303.02)	(0.00)	(1.60)	(0,17)
		Final	277.59	14.28	0.09	1.64
		Cultivation	(158.79)	(1.60)	(0,00)	(0.14)
		Removal (%)	85.32	42.77	95.14	65.25
	75%	Start	2730.39	31.42	2.77	7.23
		Cultivation	(135.79)	(1,60)	(0.00)	(0.59)
Final		579.99	23.10	1.77	3.78	
Cultivation		(213.39)	(1.70)	(0.00)	(0.20)	
Removal (%)		78.76	26.48	36.10	47.72	
100%	Start	3510.52	35.56	3.56	8.85	
	Cultivation	(271.59)	(1.60)	(1.60)	(0.27)	
	Final	-	-	-	-	
	Cultivation	-	-	-	-	
	Removal (%)	-	-	-	-	

Mean values and standard deviation in brackets.

Phases 4 and 5 were carried out in larger quantities to highlight and consolidate the values found in P3, as well as produce enough biomass to analyze its biochemical composition. Comparing the results in Table 7 and Table 8 for P4 (RW50%) and P5 (RW50%), respectively, there was no statistically significant difference, showing that the results were reliable. A discrepancy was observed in relation to P_T removal, which may be due to the appearance of a new *Scenedesmus* sp. species in the culture, observed through

monitoring by an optical microscope, in addition to the vinasse used in P4 having greater availability of the nutrient (Table 1). Attention should be paid to the different physical and chemical characteristics due to the different industrial processes used to obtain the by-products (vinasse and wastewater), which can vary, directly affecting microalgal growth.

In P5, the recirculation of the supernatant from P4, with the addition of vinasse (5% v/v) and inoculum (10% v/v) showed higher Chla results than those seen in Phases 3 and 4. This can be explained by the fact that biomass sedimentation was not as efficient in 24 hours, which may have resulted in greater availability of biomass in the medium in addition to the inoculum, with values varying throughout cultivation from 22.15 to 31.67 mgChla.L⁻¹ (Figure 2).

It was observed that in P4, compared to P5, the treatment efficiencies in terms of COD, N-NH₄⁺, and P_T were very similar (Table 8), showing no influence of residual water on the treatability of vinasse. Quintero et al. (2019) reported TKN removal of 38%, different from that found in the present study, given the different dilutions and cultivation systems. Marques (2013) and Quintero et al. (2019) observed 100% ammonia removal, equal to the removal value found in P4 and P5.

Table 7. Removal of pollutants after cultivation of microalgae in 5% vinasse diluted in 50% residual water and recirculated supernatant in Phases 4 and 5.

		COD (mg.L ⁻¹)	TKN (mg.L ⁻¹)	N-NH ₄ ⁺ (mg.L ⁻¹)	P _T (mg.L ⁻¹)
Phase 4 (RW50%)	Start Cultivation	1119.45 (100.80)	23.72 (1.60)	2.77 (0.00)	4.00 (0,26)
	Final Cultivation	171.19 (69.94)	16.32 (1.60)	0.00 (0.00)	2.61 (0.23)
	Removal (%)	84.71	31.20	100	34.75
Phase 5 (SRW50%)	Start Cultivation	1663.59 (135.69)	37.88 (1.60)	2.77 (0.00)	3.96 (0.04)
	Final Cultivation	446.80 (29.10)	19.87 (1.60)	0.00 (0.00)	2.69 (0.01)
	Removal (%)	73.02	47.54	100	32.07

Mean values and standard deviation in brackets. *RW50% = culture with vinasse diluted in 50% of residual water; SRW50% = culture with 50% of supernatant from the culture with residual water and vinasse

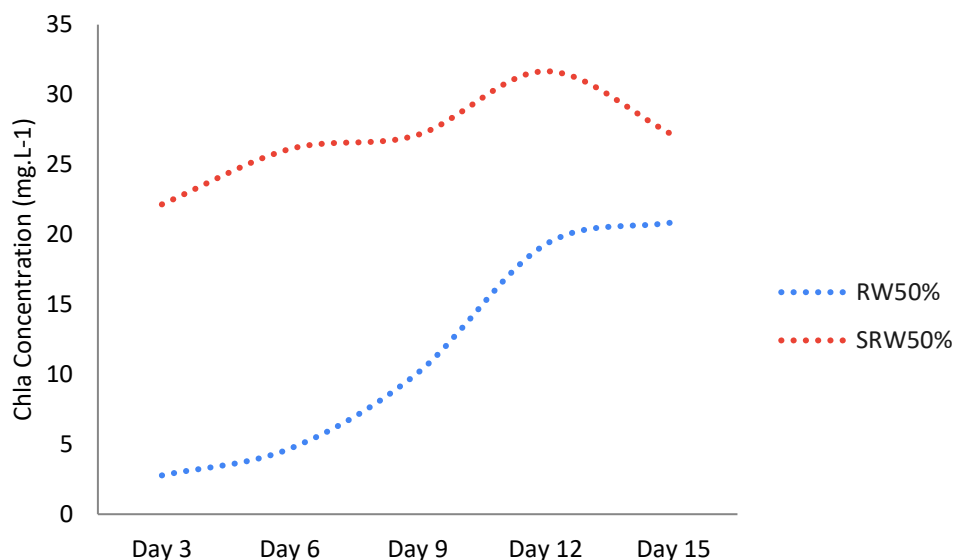


Figure 2 - Chla concentrations during cultivation in Phases 4 and 5, with vinasse diluted in 50% of residual water (RW50%) and 50% of supernatant from the culture with residual water and vinasse (SRW50%).

For P4 and P5, the biochemical composition of the produced biomass was analyzed (Table 9). In both phases, significant levels of ash were observed, showing that cultivation in residual water and recirculation of the water in 5% diluted vinasse may have accumulated large quantities of inorganics in the cultivation. A justification for the large amount of ash in the biomass is also reported by Assis et al. (2020), due to the use of effluents as a culture medium and an increase in the concentration of fixed solids from the raw domestic sewage. The high ash content in the biomass may indicate a potential agricultural use of the biomass, depending on the composition of micronutrients present in the ash.

The content of neutral lipids stands out, being the compound with the highest accumulation by biomass after ash. This suggests that biomass cultivated with residual water from the sugar-alcohol industry has the potential to produce bioenergy via biodiesel.

In general, the literature relates the biochemical content of biomass to the chemical characteristics of the growing medium (CHOUDHARY et al., 2020). However, for the present study, this relationship was not very clear, given the discrete variations in composition between the different phases.

The literature reports different values depending on the different cultivation configurations, such as dilutions and cultivated species. Calixto et al. (2016) cultivating *Chlorella* sp. in 100% vinasse, found values close to 30% carbohydrate, 45% protein, and

7% lipid. Marques et al. (2013) cultivated *Chlorella vulgaris* in 25% vinasse diluted in treated sewage and found values of 16% carbohydrate, 63% protein and 20.53% lipids.

Table 8. Biochemical composition of biomass grown in 5% vinasse diluted in distilled water and residual water and in the recirculated supernatants.

	Moisture (%)	Ash (%)	Proteins (%)	Carbohydrates (%)	Neutral Lipids (%)	Polar Lipids (%)
Phase 4 (RW50%)	6.01	28.61	8.03	16.18	19.38	15.16
Phase 5 (SRW50%)	4.51	34.26	5.29	15.31	22.82	11.10

Mean values. * RW50% = culture with vinasse diluted in 50% of residual water; SRW50% = culture with 50% of supernatant from the culture with residual water and vinasse.

3.3 Water balance in the sugarcane industry

Microalgae production is notable for its significant demand for water (TU et al., 2016), mainly due to the low concentrations of microalgal biomass reported in the literature. The study by Murph and Allen (2011) showed that 1000 liters of water are required for every kilogram of microalgae biomass produced. However, these values can vary depending on the conditions established previously, as well as the physical and chemical characteristics of the environment. Therefore, attention must be paid to the availability of water or wastewater to make cultivation efficient and sustainable.

In addition, the existence of water losses during cultivation, such as evaporation, must be considered in the design of biorefineries to optimize and highlight the water costs required in the process, especially considering the type of reactor, wind speed, solar incidence, and humidity. The study by Davis et al. (2011) shows that closed reactors retain more than 50% of the water that would normally evaporate in open systems.

Water scarcity has made processes in the sugar and alcohol industry increasingly innovative and challenging, making them less and less water-intensive. In order to reduce the amount of water consumed in cultivation, water recycling plays a key role in the economic viability and environmental responsibility of industrial plant operations.

It is worth noting that the water footprint of bioethanol from sugar cane can vary significantly depending on the irrigation system used in cultivation. Chico et al. (2015) indicated values of 1229 - 1646 L/L in different configurations of sugarcane cultivation in

Brazil. However, large quantities of effluent are generated in the ethanol production process (10-12 L vinasse/L ethanol) (SIQUEIRA et al., 2022). However, most sugarcane processing is not entirely destined for ethanol but is integrated into the sugar factory (GOPAL; KAMMEN, 2009).

Sugarcane has a moisture content in the range of 70 - 80% before entering the industrial process. This results in a surplus of approximately 0.7 m³ of residual water per ton of sugar cane processed (MEMON et al., 2006; SOLOMON, 2005).

In several countries, the sugar-alcohol industry, on average, generates around 1 m³ of residual water for every ton of sugarcane processed. In addition, studies have shown that, in terms of sugar production, processing 1 ton of sugar cane consumes approximately 1.5 to 2 m³ of water, which in turn results in the generation of 1 m³ of residual water (SAHU; CHAUDHARI, 2015).

According to the literature, the reported surplus of residual water in the sugar-alcohol industry and the favorable results of the present study, strategies in the cultivation of microalgae combined with the dilution of 5% vinasse proved to be efficient, making the recirculation of culture media a viable alternative. Figure 3 shows the amount of freshwater consumed per ton of sugarcane according to the variation in the evaporation rate. The lower the evaporation rate, the lower the amount of water required in the system, which is an important factor to consider. In the system (Figure 4), the evaporation rate in the crop was considered to be 4% (REIN, 2007).

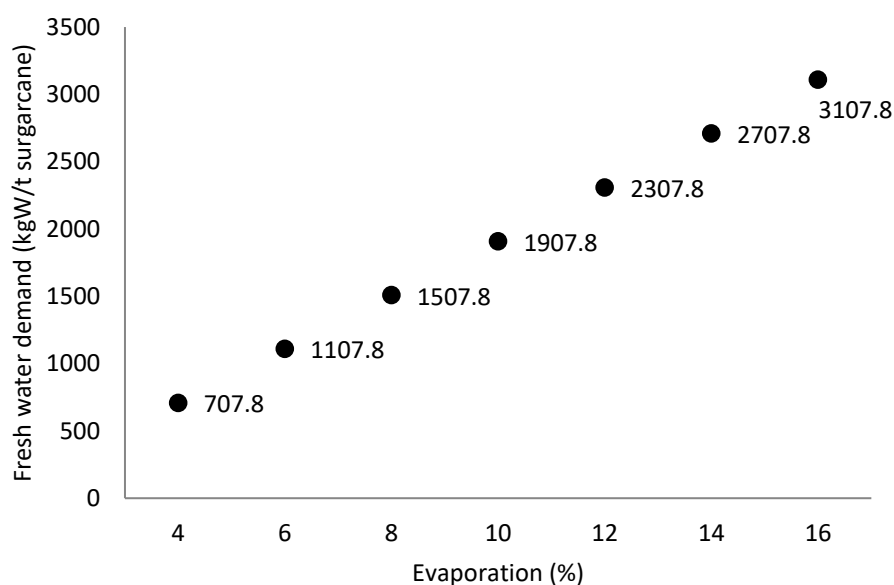


Figure 3 - Water demand according to evaporation rate.

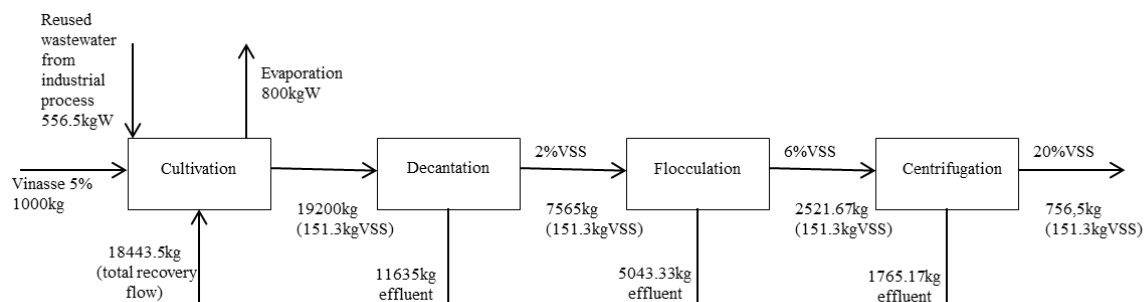


Figure 4 - Water balance in the cultivation of microalgae in vinasse from the sugar-alcohol industry.

Considering the water balance in Figure 4, the ratio between the water demand of industry in relation to the sugarcane processed will be 1:0.56, close to the values found (1:0.8) by Pina et al. (2017). Chooyok et al. (2013) reported in their study that for molasses-based production of 1104.5 m³/t (1:1.1) and 876 (1:0.88) m³/t, ensuring the viability of the system and consequently of the present study, demonstrating that by recirculating the crop water and using the industry residual water to dilute the vinasse, a possibly zero water balance is potentially achieved. In the Brazilian scenario, the São Paulo State defines a maximum limit of 1 m³ of water per ton of processed sugarcane for new sugar and ethanol plants that are installed in appropriate areas according to agri-environmental zoning (SMA, 2008). This resolution also requires industries to present a plan to reduce water consumption, with a timetable for reaching the maximum limit of 1 m³ per ton of processed cane, in the case of expansions of existing industries.

4 Conclusions

The best growth condition for microalgae was with vinasse diluted to 5%, resulting in high biomass yields. When using residual water from the sugar-ethanol industry, the dilution of vinasse with 50% residual water was better for biomass productivity. In addition, the COD and N-NH₄⁺ removal efficiencies reached high values, showing the potential for microalgae growth as a treatment option.

The use of the cultivation supernatant in the growth of microalgae in diluted vinasse (5%) is a technically viable alternative, given the advantages of microalgae productivity, effluent treatment, and avoiding the need to use drinking water.

The biomass characterization was not influenced by using the supernatant as a vinasse dilution agent. Regarding potential biomass utilization routes, the high ash content must be

considered, indicating the potential application of the biomass for agricultural purposes. In addition, the low phosphorus content in the culture media tested may have been a limiting factor for algal growth, and alternative low-impact sources of this nutrient could be explored to supplement cultivation.

This study contributes to the management of sugarcane processing waste through the cultivation of microalgae, especially regarding the use of residual water in the sugar and alcohol industry.

Acknowledgments

This work was funded by the Minas Gerais State Research Foundation (FAPEMIG) [grant number 37738768/2021] and the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq).

Supplementary Material

Table S1. Climatic data for the municipality of Lavras - Minas Gerais for the year 2022.

Date	Humi. (%)	Vel. Vento (m/s)	Dir. Vento (m/s)	Insolation (h)	Temp. Max. (h)	Temp. Min. (h)	Rain (mm)
13/abr	78	0	90	8	30	18	0
14/abr	72	1	107	8	30	19	0
15/abr	71	0	0	5	27	18	0
16/abr	65	1	47	11	27	12	0
17/abr	58	1	77	11	27	11	0
18/abr	62	2	107	10	27	13	0
19/abr	63	2	170	11	29	13	0
20/abr	63	1	137	10	29	15	0
21/abr	65	1	107	10	29	16	0
22/abr	59	1	90	10	29	16	0
23/abr	54	2	197	10	30	15	0
24/abr	60	1	77	10	32	15	0
25/abr	65	3	123	8	28	19	0

26/abr	72	1	30	7	29	18	0
27/abr	69	0	17	7	30	18	0

References

Andersen, R.A., 2013. The Microalgal Cell. In: RICHMOND, A.; HU, Q. Handbook of microalgal culture: applied phycology and biotechnology. 2 ed. **Wiley-Blackwell**, p. 3-20.

Assis, L.R. et al. Innovative hybrid system for wastewater treatment: High-rate algal ponds for effluent treatment and biofilm reactor for biomass production and harvesting. **Journal of Environmental Management**, v. 274, n. 111183, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2020.111183>

Bicudo, C.E.M., Menezes, M. Gêneros de algas de águas continentais do Brasil: chave para identificação e descrições. **RIMA**, São Carlos. 2006.

Buller, L.S. et al., 2021. A spatially explicit assessment of sugarcane vinasse as a sustainable

by-product. **Science of The Total Environment**, v. 765, n. 142717. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.142717>

Calixto, C. D. et al., 2016. Biochemical compositions and fatty acid profiles in four species of microalgae cultivated on household sewage and agro-industrial residues. **Bioresource Technology**, v. 221, p. 438-446. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.09.066>

Chico, D.; Santiago, A.D.; Garrido, A., 2015. Increasing efficiency in ethanol production: water footprint and economic productivity of sugarcane ethanol under nine different water regimes in northeastern Brazil. **Spanish Journal of Agricultural Research**, v.13, p. 1-10. <https://doi.org/10.5424/sjar/2015132-6057>

Chisti, Y., 2007. Biodiesel from Microalgae. **Biotechnology Advances**, v. 25, p. 294-306. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2007.02.001>

Chooyok, P.; Pumijumnog, N.; Ussawarujikulchai, A., 2013. The water footprint assessment of ethanol production from molasses in Kanchanaburi and Supanburi Province of Thailand. **APCBEE Procedia**, v. 5, p. 283–287. <https://doi.org/10.1016/j.apcbee.2013.05.049>

Choudary et al., 2020. A review of biochemical and thermochemical energy conversion routes of wastewater grown algal biomass. **Science of The Total Environment**, v. 726, n. 137961. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.137961>

Davis, R.; Aden, A.; Pienkos, P.T., 2011. Techno-economic analysis of autotrophic microalgae for fuel production. **Applied Energy**, v. 88: p. 3524–3531. <https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2011.04.018>

Deepa, R.; Anandhi, A.; Alhashim, R., 2021. Volumetric and impact-oriented water footprint of agricultural crops: a review. **Ecological Indicators**, v. 130, n. 108093. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2021.108093>

Del Jorrat, M.; Araujo, P.Z.; Mele, F.D., 2018. Sugarcane water footprint in the province of Tucumán, Argentina. Comparison between different management practices. **Journal of Cleaner Production**, v. 188, p. 521-529, 2018.

<https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2018.03.242>

Engin, I.K. et al., 2018. Evaluation of heterotrophic and mixotrophic cultivation of novel *Micractinium* sp. ME05 on vinasse and its scale up for biodiesel production. **Bioresource Technology**, v. 251: p. 128-134. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.12.023>

Fito, J.I. et al., 2023. Evaluation of water footprint in sugar industries and bioethanol distilleries in two different water basins toward water sustainability. **International Journal of Environmental Science and Technology**, v. 20, p. 2427–2440. <https://doi.org/10.1007/s13762-022-04182-z>

Fuess, L.T. et al., 2021. Pros and cons of fertirrigation with in natura sugarcane vinasse: Do improvements in soil fertility offset environmental and bioenergy losses?. **Journal of Cleaner Production**, v. 319, n. 128684. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2021.128684>

Gerbens-Leenes, P.W.; Hoekstra, A.Y. The water footprint of sweeteners and bio-ethanol from sugar cane, sugar beet and maize. **Environment International**, v. 40, p. 202-21, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2011.06.006>

Gopal, A.R., Kammen, D.M. Molasses for ethanol: the economic and environmental impacts of a new pathway for the lifecycle greenhouse gas analysis of sugarcane ethanol. **Environmental Research Letters**, v. 4, p. 1-5, 2009. 10.1088/1748-9326/4/4/044005

Hurtado, A., Arroyave, C., Peláez, C., 2021. Effect of using effluent from anaerobic digestion of vinasse as water reuse on ethanol production from sugarcane-molasses. **Environmental Technology & Innovation**, v. 23, n. 101677. <https://doi.org/10.1016/j.eti.2021.101677>

Jadhav, P.G.; Vaidya, N.G.; Dethe, S.B., 2013. Characterization and comparative study of cane sugar industry waste water. *International Journal of Chemical and Physical Sciences*, v. 2, p. 19-25. bf58009f1a121d9b7f6f80468026934abb9c3cb7

Kadioglu, A.; Algur, O.F., 1992. Tests of media with vinasse for *Chlamydomonas reinhardtii* for possible reduction in vinasse pollution. **Bioresource Technology**, v. 42, p. 1-5.

[https://doi.org/10.1016/0960-8524\(92\)90080-H](https://doi.org/10.1016/0960-8524(92)90080-H)

Kiani Deh Kiani, M., Parsaee, M., MahdaviFar, Z., 2021. Biogas production from sugarcane vinasse at mesophilic and thermophilic temperatures by static granular bed reactor (SGBR). **Sustainable Energy Technologies Assessments**, v. 48, n 101569. <https://doi.org/10.1016/j.seta.2021.101569>

Marques, S.S.I. *et al.*, 2013. Growth of *Chlorella vulgaris* on sugarcane vinasse: the effect of anaerobic digestion pretreatment. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 171, p. 1933-1943. <https://doi.org/10.1007/s12010-013-0481-y>

Memon, A.R., Suhail Ahmed, S., Abdul Khaliq, A., 2006. Sugar industry effluent characteristics and chemical analysis. **Journal of Applied and Emerging Sciences**, v. 1 p. 156-157. <http://dx.doi.org/10.36785/jaes.1264>

Mota-López, D.R. *et al.*, 2019. Evaluation of the impact of water supply disruptions in bioethanol production. **Computers & industrial engineering**, v. 127, p.1068–1088. <https://doi.org/10.1016/j.cie.2018.11.041>

Murphy, C.F., Allen, D.T., 2011. Energy-water nexus for mass cultivation of algae. **Environmental Science & Technology**, v. 45, p. 5861-5868. <https://doi.org/10.1021/es200109z>

Pina, E.A. *et al.*, 2017. Reduction of process steam demand and water-usage through heat integration in sugar and ethanol production from sugarcane – Evaluation of different plant configurations. **Energy**, v. 138, p. 1263–1280. <https://doi.org/10.1016/j.energy.2015.06.054>

Quintero, V. *et al.*, 2019. Vinasse as a sustainable medium for the production of *Chlorella vulgaris* UTEX 1803. **Water**, v. 11, n. 1526, 2019. <https://doi.org/10.3390/w11081526>

Rein P., 2007. Handbook of Cane sugar Engineering. 1st ed. Berlin: **Verlag Dr Albert Bartens KG**.

Sahu, O.P., Chaudhari, P.K., 2015. Electrochemical treatment of sugar industry wastewater: COD and color removal. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 739, p. 122-129. <https://doi.org/10.1016/j.jelechem.2014.11.037>

Scholten, W., 2009. The water footprint of sugar and sugar-based ethanol. Thesis report to Department of Water Engineering and Management Enschede. **University of Twente Enschede**, 2009. Disponível em: utwente.nl/en/et/cem/research/wem/education/msc-thesis/2009/scholten.pdf. (accessed 23 October 2023).

Scarpore, F. et al., 2016. Sugarcane water footprint under different management practices in Brazil: Tietê/Jacaré watershed assessment. **Journal of Cleaner Production**, v. 112, p. 4576–4584. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2015.05.107>

SMA – Secretaria do Estado do Meio Ambiente do Estado de São Paulo. Resolução 088 de 19 de dezembro de 2008. Define as diretrizes técnicas para o licenciamento de empreendimentos do setor sucroalcooleiro no Estado de São Paulo [*State Secretariat for the Environment of the State of São Paulo. Resolution 088 of December 19, 2008. Defines the technical guidelines for licensing projects in the sugar and alcohol sector in the State of São Paulo*]. 2008. [in Portuguese]

Solomon, S.K., 2005. Environmental pollution and its management in sugar industry in India: an appraisal. **Sugar Tech**, v. 7, p. 77-81. <https://doi.org/10.1007/BF02942422>

Soto, M.F. et al., 2021. BOD and COD removal in vinasses from sugarcane alcoholic distillation by *Chlorella vulgaris*: environmental evaluation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 176, n. 108191. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2021.108191>

Siqueira, J.C. et al., 2022. Recovery of vinasse with combined microalgae cultivation in a conceptual energy-efficient industrial plant: Analysis of related process considerations. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 155, n. 11904. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2021.111904>

Valderrama, L.T. et al., 2002. Treatment of recalcitrant wastewater from ethanol and citric acid production using the microalga *Chlorella vulgaris* and the macrophyte *Lemna*

minuscula. **Water Research**, v.36, p. 4185-4192. [https://doi.org/10.1016/S0043-1354\(02\)00143-4](https://doi.org/10.1016/S0043-1354(02)00143-4)