UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA DE ENGENHARIA DE SÃO CARLOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA HIDRÁULICA E
SANEAMENTO

THAÍLA DE MELLO FLORÊNCIO

Degradação anaeróbia de efluente têxtil simulado com corante azo Direct Black 22 na presença de íons sulfato em reator anaeróbio de leito estruturado com fluxo ascendente

VERSÃO CORRIGIDA
São Carlos
2018

(Esta página foi intencionalmente deixada em branco)

THAÍLA DE MELLO FLORÊNCIO

Degradação anaeróbia de efluente têxtil simulado com corante azo Direct Black 22 na presença de íons sulfato em reator anaeróbio de leito estruturado com fluxo ascendente

Tese apresentada à Escola de Engenharia de São Carlos da Universidade de São Paulo como parte dos requisitos para obtenção de título de Doutor em Ciências: Engenharia Hidráulica e Saneamento.

Orientadora: Profa. Dra. Márcia Helena Rissato Zamariolli Damianovic

VERSÃO CORRIGIDA
São Carlos
2018

AUTORIZO A REPRODUÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTA TRABALHO,
POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS
DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Prof. Dr. Sérgio Rodrigues Fontes da
EESC/USP com os dados inseridos pelo(a) autor(a).

F632d Florêncio, Thaíla de Mello
Degradação anaeróbia de efluente têxtil simulado
com corante azo Direct Black 22 na presença de íons
sulfato em reator anaeróbio de leito estruturado com
fluxo ascendente / Thaíla de Mello Florêncio;
orientadora Márcia Helena Rissato Zamariolli
Damianovic. São Carlos, 2018.

Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em
Engenharia Hidráulica e Saneamento e Área de
Concentração em Hidráulica e Saneamento -- Escola de
Engenharia de São Carlos da Universidade de São Paulo,
2018.

1. Tratamento biológico anaeróbio. 2. Tratamento
biológico de águas residuárias. 3. Toxicologia
ambiental. 4. Corantes. 5. Microbiologia. 6. Aminas
aromáticas. 7. Citotoxicidade in vitro. I. Título.

Eduardo Graziosi Silva - CRB - 8/8907

FOLHA DE JULGAMENTO

Candidata: Engenheira **THAÍLA DE MELLO FLORÊNCIO**.

Título da tese: "Degradação anaeróbia de efluente têxtil simulado com corante *azo direct black 22* na presença de íons sulfato em reator anaeróbio de leito estruturado com fluxo ascendente".

Data da defesa: 26/06/2018.

Comissão Julgadora:

Resultado:

Profa. Dra. **Márcia Helena Rissato Zamariolli Damianovic**
(Orientadora)
(Escola de Engenharia de São Carlos/EESC)

Aprovada

Profa. Dra. **Sávia Gavazza dos Santos Pessoa**
(Universidade Federal de Pernambuco/UFPE)

Aprovada

Dra. **Eloisa Pozzi**
(Escola de Engenharia de São Carlos/EESC - Especialista)

Aprovada

Dra. **Valéria Del Nery**
(Bioproj Tecnologia Ambiental)

Aprovada

Prof. Dr. **Vinícius Carvalho Rocha**
(Universidade Federal do Triângulo Mineiro/UFTM)

Aprovada

Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Hidráulica e Saneamento:
Prof. Dr. **Eduardo Mario Mendiando**

Presidente da Comissão de Pós-Graduação:
Prof. Associado **Luís Fernando Costa Alberto**

(Esta página foi intencionalmente deixada em branco)

A meus pais, esposo, irmã, sobrinho e avós.

(Esta página foi intencionalmente deixada em branco)

AGRADECIMENTOS

A Deus,

À minha orientadora e professora Márcia Helena Rissato Zamariolli Damianovic, pela maravilhosa pessoa que é! Foram muitos os desafios, mas você sempre acreditou em mim e neste estudo.

À banca examinadora pela colaboração com o refinamento desta tese.

Aos professores e colegas do PPG-SHS,.

Aos meus pais Vanda e Elvio, meu esposo Pedro, minha irmã Thaísa e meu sobrinho-afilhado Emílio; pelos abraços de apoio, pelas tardes passadas me ajudando a montar e cuidar do reator, por me ouvirem, pela companhia nas análises de 24 horas, pelas “engenhocas” que facilitaram o desenvolvimento do experimento, pela companhia nas viagens, por enxugarem todas as minhas lágrimas.

Aos meus avós Delmi e Anníbal, pelas orações constantes e confiança na minha capacidade; e aos meus avós *in memoriam* Áurea e José.

Aos colegas de trabalho Maíra e Andréia (apoio nos horários de trabalho para realizar análises), Vanessa (por ficar no laboratório por exigência superior enquanto eu realizava análises), Rhéltheer, Flávio e Geraldo (auxiliar na adaptação do laboratório de Bioquímica às minhas necessidades).

Aos chefes e gestores da Universidade Federal do Triângulo Mineiro, que foram compreensivos e prestativos durante este período.

Aos amigos Danielle, Bruno, Monique, Rejane, André, Paula, Marianna, Vinícius, Aline.

Aos professores: Ana Cristina Souza e César Reis (auxílio com isotermas), Vinícius Carvalho Rocha e Julio César de S. I. Gonçalves (permissão e apoio para instalar reator e utilizar

laboratório pertencente ao curso de engenharia ambiental da UFTM), Karina Ferrazzoli D. Vicentine (auxílio e apoio com análises de citotoxicidade pelo método de Borenfreund e Puerner).

À professora Sávia Gavazza e seus alunos, que me receberam de braços abertos no campus da UFPE em Caruaru, por terem me elucidado dúvidas que afetaram positivamente todo o andamento do experimento.

À “Liz”, “Charlotte”, “Miu” e “Chimbinha”, por suas devidas contribuições.

Aos servidores e técnicos: Laboratório de Processos Biológicos (LPB/SHS/EESC/USP), Laboratório de Microscopia Eletrônica e Análise do Instituto de Física de São Carlos (LMEA/IFSC/USP), ao Núcleo de Apoio à Pesquisa em Materiais Avançados, no Departamento de Engenharia de Materiais da Universidade de São Paulo, Campus de São Carlos, ao Laboratório de Saneamento Ambiental (UFPE e UFTM), à TECLAB e principalmente ao Laboratório de Bioquímica do Instituto de Ciências Biológicas e Naturais da UFTM, sem o qual nada disso teria sido possível.

Os dias prósperos não vêm por acaso. São granjeados, como as searas, com muita fadiga e com muitos intervalos de desalento.

Camilo Castelo Branco

(Esta página foi intencionalmente deixada em branco)

RESUMO

FLORÊNCIO, T. M.: **Degradação anaeróbia de efluente têxtil simulado com corante azo Direct Black 22 e adição de íons sulfato em reator anaeróbio de leito estruturado com fluxo ascendente.** 2018. 175 f. Tese (Doutorado) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos.

Avaliou-se o emprego de sistema biológico de tratamento em reator anaeróbio de leito estruturado em fluxo ascendente (RAnLE) para remoção do corante Direct Black 22 (DB22) e íons sulfato (65 e 200 mg.L⁻¹, respectivamente), principais constituintes de efluente têxtil de indústrias de jeans da região de Caruaru, PE. Etanol foi utilizado como doador de elétrons na concentração de 1000 mg.DQO.L⁻¹. As médias de remoção de DQO, sulfato e corante foram respectivamente $80,28 \pm 6,62\%$, $78,66 \pm 4,04\%$ e $68 \pm 5\%$. Cerca de 3% do sulfeto produzido foi identificado em solução, 10% esteve presente na forma gasosa e aproximadamente 87% precipitou em forma de cristais metálicos inorgânicos ou em enxofre elementar por exposição ao ar atmosférico ou por ação redutora do corante DB22, contribuindo para remoção de cor na transformação do corante em aminas aromáticas. Os ácidos graxos presentes no efluente tratado totalizaram 121 ± 34 mg.L⁻¹, com predominância de ácido acético (95 ± 17 mg.L⁻¹), sem prejuízo da capacidade tamponante do sistema, que apresentou aumento na alcalinidade pela ocorrência da sulfetogênese e pela característica básica das aminas aromáticas, produzidas por meio da quebra da ligação azo do corante, revelando absorção em diferentes comprimentos de onda na região do ultravioleta, denotando a produção de diferentes estruturas aromáticas. O efluente têxtil simulado foi mais tóxico do que seu correspondente tratado para ambas as situações (crônico e agudo) nos testes de toxicidade com *Ceriodaphnia dubia* (crônica) e *Daphnia magna* (aguda), atestando o potencial dos reatores anaeróbios na destoxificação do corante azo Direct Black 22 para as espécies abordadas. Os testes de citotoxicidade *in vitro* empregando células McCoy (linhagem contínua de fibroblastos) em exposição ao efluente têxtil sintético tratado no RAnLE apresentaram um comportamento dose-dependente. O efluente diluído 3 vezes inibiu 50% das células. Por outro lado, não foi possível verificar um comportamento dose-dependente considerando as diferentes concentrações de DB22. Entretanto, houve diferença estatística significativa na viabilidade celular para as concentrações de DB22 de 0,016, 0,065, 0,2 e 0,26 mg.mL⁻¹. Os resultados demonstram a necessidade do uso de diferentes testes de toxicidade a vários organismos, de

forma a complementar os resultados obtidos pelos testes convencionais. Eletromicrografias da biomassa revelaram a presença de arqueias metanogênicas, demonstrando a capacidade de coexistência de comunidades sulfetogênicas e metanogênicas, dado o valor observado de DQO/sulfato de 5. O sequenciamento metagenômico em apontou grande abundância relativa de bactérias redutoras de sulfato (BRS), superior a 50%. Os bioensaios em batelada com o lodo de fundo e o lodo em suspensão do RAnLE apontaram que a biomassa aderida foi mais apta a suportar a carga tóxica proveniente do corante e das aminas aromáticas. A estrutura do RAnLE permitiu o estabelecimento de biomassa aderida e biomassa suspensa, concorrendo ambas para melhor desempenho do sistema.

Palavras-chave: Efluente têxtil. Tratamento anaeróbio. Reator anaeróbio de leito estruturado em fluxo descendente. Aminas aromáticas. Corante azo. Citotoxicidade *in vitro*. Toxicidade a *Daphnia magna* e *Ceriodaphnia dubia*.

ABSTRACT

FLORÊNCIO, T. M.: Anaerobic biodegradation of simulated textile effluent with azo dye Direct Black 22 and sulphate ions in anaerobic down-flow fixed structured bed reactor. 2018. 175 f. Tese (Doutorado) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de Paulo, São Carlos.

The present work assessed the employment of an anaerobic up-flow fixed-structured bed (AUFFSB) reactor, which aimed to remove the main constituents of a simulated textile effluent with azo dye Direct Black 22 (DB22) and sulphate ions (65 and 200 mg.L⁻¹, respectively), main constituents in residual waters generated by denim industry in Caruaru, PE. Ethanol was employed as electron donor (1000 mg.COD.L⁻¹). Medium removals for COD, sulphate and dye concentration were respectively $80.28 \pm 6.62\%$, $78.66 \pm 4.04\%$ and $68 \pm 5\%$. Circa 3% of produced sulphide was identified in the effluent, 10% in gaseous state and approximately 87% precipitated either as metallic inorganic crystals, as elemental sulphur due to exposition to atmosphere, or due to the azo bound reduction of DB22, which contributed to colour removal in the generation of aromatic amines from the azo dye. The volatile fatty acids totalized 121 ± 34 mg.L⁻¹ while acetic acid was the predominant one (95 ± 17 mg.L⁻¹). Nevertheless, such concentrations did not impair the buffering capacity of the system, which had increased alkalinity due to the occurrence of sulphidogenesis and of the alkaline characteristic of the aromatic amines, which were produced from azo bound cleavage, revealing absorption in different wavelengths in the UV zone, inferring that different aromatic structures were formed. As for the toxicity, the simulated textile effluent was more toxic before treatment than after treatment for both bioassays employing *Ceriodaphnia dubia* and *Daphnia magna*, (chronic and acute toxicity), attesting the potential of anaerobic reactors to detoxify azo dye DB22. The *in vitro* cytotoxicity tests using McCoy cells (fibroblasts of a continuous lineage) exposed to simulated textile effluent treated on the anaerobic bioreactor presented a dose-dependent behaviour. The effluent diluted 3 times showed inhibition to 50% of the cells. On the other hand, it was not possible to verify a dose-dependent behaviour considering the different concentrations of DB22. However, there was significant statistical difference on cell viability for DB22 concentrations of 0.016, 0.065, 0.2 and 0.26 mg.mL⁻¹. The results pointed to the need of diverse toxicity tests to various organisms in order to complement the results obtained by conventional used ones. Micrographs revealed the

presence of methanogenic archeas, denoting the possibility of coexistence between sulphidogenic and methanogenic communities, considering the observed COD/sulphate ration of 5. Metadata obtained from metagenomic sequencing revealed high relative abundance of sulphate-reducing bacteria (SRB), which was superior to 50%. Batch bioassays showed that biomass in supporting material is more capable of enduring the toxic load from DB22 and aromatic amines. The AUFFSB structure enabled that suspended biomass developed along with fixed biomass, thus both collaborated for a better system performance.

Keywords: Textile effluent. Anaerobic treatment. Anaerobic down-flow fixed-structured bed reactor. Aromatic amines. Azo dye. *In vitro* cytotoxicity. Toxicity to *Daphnia magna* and *Ceriodaphnia dubia*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Estrutura química do corante C.I. Direct Black 22.....	43
Figura 2 – Padrão sequencial da degradação microbiológica de matéria orgânica complexa em ambientes anaeróbios na ausência de outros aceptores finais de elétrons.....	47
Figura 3 – Transformações do enxofre.....	49
Figura 4 – Padrão sequencial da degradação microbiológica de matéria orgânica complexa em ambientes anóxicos na presença de sulfato.....	50
Figura 5 – Formas de espécies de sulfeto e sua prevalência de acordo com o pH.....	51
Figura 6 – Visão geral do destino de corantes azo e aminas aromáticas durante o tratamento anaeróbio e aeróbio.....	60
Figura 7 – Fêmea adulta da espécie <i>Daphnia magna</i>	62
Figura 8 – Representante da espécie <i>Ceriodaphnia dubia</i>	63
Figura 9 – Esquema de reator anaeróbio com medidas em centímetros.....	68
Figura 10 – Varredura em UV-Visível do corante Direct Black 22 em diferentes concentrações (mM).....	72
Figura 11 – Curva de concentração do corante Direct Black 22.....	72
Figura 12 – Variação de Demanda Química de Oxigênio ($\text{mg.O}_2\cdot\text{L}^{-1}$) durante 400 dias de tratamento.....	82
Figura 13 – Box Plot da variação de Demanda Química de Oxigênio ($\text{mg.O}_2\cdot\text{L}^{-1}$) para entrada e saída do RAnLE.....	82
Figura 14 – Perfil de remoção de DQO por rota biológica: sulfetogênica e metanogênica e/ou com DB22 comoceptor final.....	89
Figura 15 – Box Plot da variação de sulfato ($\text{mg SO}_4^{2-}\cdot\text{L}^{-1}$).....	90
Figura 16 – Variação da concentração de sulfato ($\text{mg SO}_4^{2-}\cdot\text{L}^{-1}$) durante 400 dias de tratamento.....	91
Figura 17 – Precipitado formado no recipiente coletor (PRC) presente na saída do reator.....	93
Figura 18 – Formação de precipitados no <i>headspace</i> do reator (PHR), acumulado durante o período integral de operação.....	93
Figura 19 – Eletromicrografia do precipitado do recipiente coletor na saída do reator	

(PCR). (a) panorâmica da amostra. (b) identificação de seus compostos.....	94
Figura 20 – Eletromicrografia do precipitado do recipiente coletor na saída do reator (PCR). (a) análise pontual de A e B. (b) identificação de seus compostos.....	95
Figura 21 – Eletromicrografia do composto precipitado presente no <i>headspace</i> do reator (PHR). (a) análise pontual de 1 e 2. (b) identificação de seus compostos.....	96
Figura 22 – Eletromicrografia do composto precipitado presente no <i>headspace</i> do reator (PHR). (a) panorâmica da amostra. (b) identificação de seus compostos.....	97
Figura 23 – Perfil de produção de sulfeto por sulfato reduzido durante 400 dias de tratamento.....	99
Figura 24 – Balanço de massa das espécies de sulfeto, de acordo com a rota metabólica.....	99
Figura 25 – Variação da adsorção do corante Direct Black 22 por espuma de poliuretano, em bloco, em variação do pH de 2 a 9.....	103
Figura 26 – Isoterma de adsorção do corante Direct Black 22 no meio suporte de espuma de poliuretano em pH 7,7.....	104
Figura 27 – Ajuste da isoterma para o corante Direct Black 22 em pH 7,7 para (a) modelo de Langmuir e (b) Freundlich.....	105
Figura 28 – Concentração de DB22 afluenta e efluente e remoção durante 400 dias de operação.....	106
Figura 29 – Box Plot da variação de corante no afluenta e efluente do RanLE.....	107
Figura 30 – Variação de cor da água residuária antes e após o tratamento anaeróbio.....	107
Figura 31 – Ordem de atração de elétrons para espécies presentes em efluentes com corante azo.....	115
Figura 32 – Varredura do efluente: remoção de corante e produção de aminas em 115 dias de operação do reator.....	116
Figura 33 – Varredura do efluente: remoção de corante e produção de aminas em 268 dias de operação do reator.....	117
Figura 34 – Varredura do efluente: remoção de corante e produção de aminas em 394 dias de operação do reator.....	117
Figura 35 – Curva dose-resposta para viabilidade celular de fibroblastos em exposição ao corante DB22 em diferentes concentrações (mg.mL ⁻¹).....	122

Figura 36 – Curva dose-resposta para viabilidade celular de fibroblastos em exposição ao efluente tratado em RAnLE.....	123
Figura 37 – Produção de aminas aromáticas de acordo com disponibilidade de biomassa (STV) (F/M 19 e 0,5) após 24h.....	126
Figura 38 – Modelos cinéticos para decaimento de matéria orgânica (DQO) conforme disponibilidade de biomassa (STV).....	128
Figura 39 – Eletromicrografias do lodo de fundo (LF) do RAnLE. (a) cadeias de bacilos, formando filamentos. (b) e (c) seta indica a presença de cocos irregulares arranjados em cachos.....	130
Figura 40 – Eletromicrografias do lodo de fundo (LF). (a) presença de bactérias na forma de bacilos arredondados. (b) bacilos arredondados e bacilos longos formando filamentos.....	131
Figura 41 – Eletromicrografias do lodo aderido ao material suporte (LM) do RAnLE. (a) cadeias de bacilos, formando filamentos. (b) setas indicam presença de cristais inorgânicos. (c) espectro de EDX de pontos sobre a superfície das formas esféricas com aspecto cristalino destacadas.....	132
Figura 42 – Curvas de Rarefação. a) Lodo do meio suporte (LM) e b) Lodo de fundo (LF).....	133
Figura 43 – Famílias de espécies do domínio Bactéria encontradas em sequenciamento metagenômico com maior abundância relativa para as amostras de lodo do meio suporte e de lodo de fundo.....	135

(Esta página foi intencionalmente deixada em branco)

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Relação dos constituintes de um efluente têxtil, seu papel no processo e relevância ambiental.....	35
Tabela 2 – Classificação de corantes.....	40
Tabela 3 – Composição de solução macronutriente.....	69
Tabela 4 – Composição de solução micronutriente.....	69
Tabela 5 – Composição em concentração para 18L de efluente sintético.....	70
Tabela 6 – Lista de equipamentos.....	71
Tabela 7 – Composição para preparação da amostra para análise em cromatografia gasosa.....	77
Tabela 8 – Valores para remoção de DQO para tratamento anaeróbio de efluentes têxteis encontrado na literatura, considerando apenas a parte anaeróbia do sistema.....	83
Tabela 9– Valores médios para parâmetros físico-químicos.....	101
Tabela 10 – Valores dos parâmetros para as isotermas de Langmuir e Freundlich obtidos através da linearização das curvas e seus respectivos valores para R^2	104
Tabela 11 – Valores para remoção de cor (redução da concentração de corante) encontrado na literatura, considerando apenas a parte anaeróbia do sistema.....	108
Tabela 12 – Bioensaio de toxicidade crônica com <i>Ceriodaphnia dubia</i>	119
Tabela 13 – Bioensaio de toxicidade aguda com <i>Daphnia magna</i> (inibição da capacidade natatória)	120
Tabela 14 – Parâmetros dos sólidos totais voláteis (STV) e carga orgânica disponível no RAnLE.....	125
Tabela 15 – Remoções de DQO, sulfato e corante para abordagem de F/M 0,5 e 19 (ensaio de LM e LF, respectivamente) após 24h.....	126
Tabela 16 – Parâmetros obtidos para o modelo com residual da cinética de remoção da matéria orgânica.....	127
Tabela 17 – Índices de diversidade alfa para as amostras de lodo aderido ao meio suporte (LM) e de lodo de fundo (LF).....	134
Tabela 18 – Microrganismos de filos candidatos, observados no sequenciamento metagenômico de LM e LF e suas principais características.....	138

(Esta página foi intencionalmente deixada em branco)

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABIT	Associação Brasileira da Indústria Têxtil e de Confecção
ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas
AGV	Ácidos Graxos Voláteis
AI	Alcalinidade Intermediária
AP	Alcalinidade Parcial
APHA/AWWA/WEF	American Public Health Association, American Water Works Association, Water Environment Federation
ATP	Adenosina trifosfato
BCRJ	Banco de Células do Rio de Janeiro
BRS	Bactérias redutoras de sulfato
CE ₅₀	Concentração efetiva que acarreta efeito adverso em 50% dos organismos-teste
CL ₅₀	Concentração efetiva letal em 50% dos organismos-teste
IC ₅₀	Concentração que acarreta inibição em 50% dos organismos-teste, índice citotóxico
cm	Centímetro
DB22	Direct Black 22
DQO	Demanda química de oxigênio
EC ₂₀	Concentração efetiva que acarreta efeito adverso em 20% dos organismos-teste
F/M	Relação alimento/microrganismo, “ <i>food/microorganism</i> ”
FT	Fator de Toxicidade
FT _D	Fator de Toxicidade para espécies <i>Daphnia</i>
g	Grama
h	Hora
L	Litro
LF	Lodo de Fundo
LM	Lodo aderido ao meio suporte
mg	Miligrama
mL	Mililitro
mM	Milimolar

mmol	Milimol
NA	Não se aplica
pH	Potencial hidrogeniônico
PHR	Precipitado no <i>headspace</i> do reator
PCR	Precipitado no recipiente coletor do reator
RAnLE	Reator anaeróbio de leito estruturado
TDH	Tempo de detenção hidráulica
UASB	Reator anaeróbio de fluxo ascendente em manto de lodo
USEPA	United States Environmental Protection Agency

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	29
2 OBJETIVOS	31
2.2 GERAL.....	31
2.2 ESPECÍFICOS.....	31
3 REVISÃO DA LITERATURA.....	33
3.1 A CADEIA TÊXTIL E A GERAÇÃO DE EFLUENTES LÍQUIDOS	33
3.2 PRINCIPAIS FIBRAS TÊXTEIS	34
3.3 PRINCIPAIS CONSTITUINTES DO EFLUENTE TÊXTIL	34
3.3.1 Corantes presentes no efluente têxtil	37
3.3.2 Corantes azo.....	41
3.4 SISTEMAS DE TRATAMENTO DE EFLUENTES LÍQUIDOS DE INDÚSTRIA TÊXTIL	43
3.5 MECANISMOS DOS PROCESSOS BIOLÓGICOS DE DEGRADAÇÃO.....	44
3.5.1 Rota metanogênica	46
3.5.2 Rota sulfetogênica.....	48
3.5.3 Imobilização da biomassa	54
3.5.4 Adsorção de corantes por uso de meio suporte.....	57
3.5.5 Aminas Aromáticas	58
3.6 EFEITOS TOXICOLÓGICOS DE EFLUENTES TÊXTEIS	61
3.7 CONSIDERAÇÕES	65
4 MATERIAL E MÉTODOS	67
4.1 SISTEMA EXPERIMENTAL	67
4.2 OPERAÇÃO DO REATOR.....	68
4.3 COMPOSIÇÃO DO EFLUENTE TÊXTIL SINTÉTICO	69
4.4 DETERMINAÇÃO ANALÍTICA DOS COMPOSTOS DE INTERESSE PARA MONITORAMENTO DO PROCESSO	70
4.4.1 Temperatura, pH e vazão	71
4.4.2 Concentração de corante.....	71
4.4.2.1 Obtenção da curva de concentração do corante e cálculo de concentração	71
4.4.2.2 Adsorção de corante na espuma	73
4.4.3 Demanda química de oxigênio (DQO)	75
4.4.4 Espectros de absorbância de aminas aromáticas.....	76

4.4.5 Sulfato e sulfeto	76
4.4.6 Alcalinidade e Ácidos graxos voláteis	76
4.4.7 Toxicidade	77
4.4.8 Análise da composição dos precipitados do recipiente coletor de saída e <i>headspace</i> do reator e dos cristais presentes no lodo aderido ao material suporte (LM) e ao lodo de fundo (LF)	78
4.4.9 Análise de morfologia celular	78
4.4.10 Análise de diversidade microbiana	79
4.4.11 Bioensaios em batelada com o lodo extraído	80
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	81
5.1 DQO, CARGA ORGÂNICA VOLUMÉTRICA APLICADA E VIAS DE REMOÇÃO	81
5.2 SULFATO E SULFETO	89
5.3 ÁCIDOS GRAXOS VOLÁTEIS, ALCALINIDADE E pH	100
5.4 REMOÇÃO DE COR POR REDUÇÃO DO CORANTE E FORMAÇÃO DE AMINAS AROMÁTICAS	102
5.4.1 Isotermas de adsorção do corante Direct Black 22 ao meio suporte de espuma de poliuretano	102
5.4.2 Remoção global de corante Direct Black 22 do efluente simulado têxtil e produção de aminas aromáticas	106
5.5 TOXICIDADE AGUDA E CRÔNICA	118
5.5.1 Bioensaios de toxicidade aguda e crônica com <i>Ceriodaphnia dubia</i> e <i>Daphnia magna</i>	118
5.5.2 Bioensaios de toxicidade determinada <i>in vitro</i> por alterações morfológicas e absorção em vermelho neutro	121
5.6 BIOENSAIOS EM BATELADA COM O LODO DE FUNDO (LF) E O LODO ADERIDO AO MEIO SUPORTE (LM)	124
5.7 ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS	129
5.7.1 Morfologia por Microscopia Eletrônica de Varredura	129
5.7.2 Sequenciamento Metagenômico	132
6 CONCLUSÃO	141
REFERÊNCIAS	145
APÊNDICE A - Testes estatísticos referentes aos testes de citotoxicidade <i>in vitro</i> do corante Direct Black 22 e do efluente tratado	167
ANEXO A - Determinação da citotoxicidade basal <i>in vitro</i>	173

ANEXO B - Descrição de meio de cultura RPMI.....	175
---	------------

(Esta página foi intencionalmente deixada em branco)

1 INTRODUÇÃO

A Associação Brasileira da Indústria Têxtil e de Confecção (ABIT) aponta que o faturamento da cadeia têxtil e de confecção no país alcançou em dezembro de 2017 cerca de US\$ 45 bilhões, com investimentos no setor de R\$ 1,9 milhão, produção média de confecção de 5,9 bilhões de peças e produção média têxtil em 1,7 milhão de toneladas. São 1,479 milhão de empregados diretos, 8 milhões de empregados indiretos, contando com 75% desta mão de obra como feminina. O Brasil apresenta atualmente participação ativa em produção e importação de produtos têxteis confeccionados. Trata-se do segundo maior gerador do primeiro emprego e segundo empregador da indústria de transformação, perdendo para alimentos e bebidas juntos. Somam-se a este setor 29 mil empresas formais em todo o país, que é o quinto maior produtor têxtil do mundo, segundo maior produtor e terceiro maior consumidor de jeans do mundo. A influência da indústria da moda no país reflete na participação brasileira entre as cinco maiores Semanas de Moda do mundo. O Brasil possui uma cadeia têxtil completa do ocidente, englobando desde a produção das fibras até os desfiles de moda.

Boa parte do processo produtivo da cadeia têxtil depende do uso de água para dissolução e dispersão dos produtos químicos empregados nas várias etapas, principalmente na de tingimento. Por conseguinte, o volume final de efluente resultante chama a atenção para os métodos de tratamento visando lançamento adequado ao meio ambiente. No Brasil, não é incomum o lançamento de efluentes industriais em corpos d'água receptores sem qualquer tipo de tratamento prévio, contando apenas com a capacidade de diluição dos resíduos. O descarte de relevantes quantidades de corantes sintéticos no meio ambiente desperta a preocupação da população, principalmente devido à alteração de cor e qualidade nas mananciais de água; acarreta problemas com o descumprimento da legislação e configura sério desafio aos cientistas ambientais (FORGACS; CSERHÁTI; OROS, 2004).

Vários processos físico-químicos e de processos oxidativos avançados foram estudados para o tratamento de efluentes da indústria têxtil (MARTINÉZ-HUTTLE; BRILLAS, 2009; ROBINSON et al., 2001; FORGACS; CSERHÁTI; OROS, 2004; HAO et al., 2000). Os resultados dos referidos trabalhos apontaram que dependendo do processo de tratamento e do tipo de corante utilizados, os produtos gerados foram tão prejudiciais quanto, ou até mais do que, os originais.

A literatura ressalta enfaticamente as vantagens do tratamento anaeróbio para águas residuárias contendo corantes, já que as condições redutoras dos reatores anaeróbios permitem a descoloração do efluente, considerada a primeira etapa para a degradação completa do corante. Tendo em conta a evolução nos tratamentos de efluentes têxteis, a capacidade dos processos anaeróbios os torna uma das mais promissoras tecnologias para tratamento integrado dentro da indústria têxtil (DELÉE et al., 1998, FORGACS; CSERHÁTI; OROS, 2004). O lodo granular característico de reatores UASB é capaz de descolorir uma ampla gama de corantes azo, devido a reações extracelulares não específicas (van der ZEE; LETTINGA; FIELD, 2001).

Ainda assim, é preciso averiguar as condições ideais para obter a eficiência máxima possível que tais processos podem oferecer. A microbiota anaeróbia é sensível a concentrações tóxicas e os efeitos adversos englobam não somente o retardamento na remoção da cor, mas também o aumento de ácidos graxos voláteis, perda da capacidade tamponante do sistema e até a falência do reator como um todo (SILVA, 2016).

Dentre as substâncias geralmente presentes no efluente têxtil, os sais de sulfato se destacam dado a alteração que provocam na rota de degradação anaeróbia da matéria orgânica. A presença do íon sulfato é capaz de estimular a competição entre as bactérias redutoras de sulfato (BRS) dentro do meio metanogênico pelos substratos em comum, como hidrogênio, acetato, ácidos graxos e álcoois (SILVA, 2016). O sulfeto produzido, que comumente é um problema nestes sistemas, está atrelado à remoção de cor devido a sua capacidade redutora, gerando interesse no aproveitamento do mesmo dentro do reator para fins de descoloração.

É necessário, portanto, aprimorar e desenvolver técnicas que gerem as condições adequadas aos microrganismos para a ocorrência do processo biológico. A geração de conhecimento dos processos de biodegradação de compostos sintéticos, a resposta dos microrganismos frente a substâncias recalcitrantes e a avaliação da toxicidade dos mesmos e de seus produtos é de extrema importância para construção do arcabouço para proposição de tecnologias de mitigação dos problemas associados ao descarte desses efluentes no ambiente. O presente trabalho aborda o tratamento de um efluente têxtil sintético submetido às condições de operação de um reator anaeróbio de leito estruturado, configuração ainda não empregada nos sistemas de tratamento já existentes, visando o comportamento de remoção de DQO, sulfato e corante além dos principais microrganismos envolvidos no sistema, bem como verificar o insulto tóxico de afluente e efluente frente a exposição a pessoas e ao meio ambiente, por meio de ensaios indicados pela literatura.

2 OBJETIVOS

2.1 GERAL

A presente pesquisa visou avaliar a biotransformação de corante azo Direct Black 22 e sulfato, constituintes de águas residuárias geradas na indústria têxtil, por processo anaeróbio em reator de leito estruturado (RAnLE).

2.2 ESPECÍFICOS

- Verificar a influência dos íons sulfato e sulfeto na descoloração redutiva do corante Direct Black 22,
- Avaliar a remoção de matéria orgânica presente no efluente sintético têxtil,
- Verificar o desempenho do reator considerando a acidez produzida e a alcalinidade consumida,
- Analisar a remoção de corante bem como a produção das aminas aromáticas envolvidas no processo de quebra da ligação azo do Direct Black 22,
- Identificar as bactérias envolvidas nos processos de conversão em estudo,
- Identificar materiais precipitados no efluente e lodo,
- Entender os caminhos de biotransformação decorrentes das condições operacionais e microrganismos presentes,
- Analisar a toxicidade aguda e crônica a *Ceriodaphnia dubia* e *Daphnia magna* e comparar com ensaios de toxicidade *in vitro* empregando linhagem contínua de fibroblastos (células McCoy provenientes de mamíferos da espécie *Mus musculus*), tanto para afluente quanto para efluente têxtil sintético quando tratado anaerobiamente no RAnLE.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 A CADEIA TÊXTIL E A GERAÇÃO DE EFLUENTES LÍQUIDOS

A cadeia têxtil é composta pelos processos de fiação, beneficiamento, tecelagem/malharia, enobrecimento, confecções e mercado (fios, tecidos e peças). Na fiação, obtém-se o fio a partir das fibras têxteis, sendo este posteriormente enviado tanto para beneficiamento ou diretamente para a tecelagem e/ou malharias. O beneficiamento compreende a preparação dos fios: tingimento, engomagem, retorção e outras operações e processos estão inseridos nesta etapa. Na etapa de tecelagem e/ou malharias elaboram-se os tecidos, os quais podem ser planos, de malha circular ou de malha retilínea. O enobrecimento é uma etapa de preparação, na qual ocorre o tingimento, estamparia e o acabamento de malhas, tecidos ou dos artigos confeccionados. Por fim, nas confecções as atividades são variadas, com aplicação diversificada da tecnologia para o produto final, além da adição de acessórios às peças (BASTIAN; ROCCO, 2009). Os processos de beneficiamento dos fios e enobrecimento das malhas e tecidos participam na constituição principal dos efluentes líquidos têxteis. O consumo de água em indústrias têxteis é intenso dado ao processamento úmido dos tecidos (ROBINSON et al., 2001).

A água consumida é sempre incorporada ao efluente final, e determinadas etapas são mais relevantes neste aspecto. Além disso, parte dos compostos químicos adicionados em cada uma dessas etapas também se incorpora no efluente, sendo os corantes os compostos mais recalcitrantes e mais visíveis. Tendo em conta esses fatores, Khelifi et al. (2008) consideram o efluente industrial têxtil um dos mais poluidores dentre todos os setores industriais.

No processo de tingimento, fator fundamental no sucesso comercial dos produtos têxteis, ressaltam-se a montagem, a fixação e o tratamento final. Atinge-se a fixação do corante à fibra por meio de reações químicas, insolubilizando-se o corante ou os derivados gerados, o que pode ocorrer em diferentes subetapas entre a montagem e a fixação, propriamente dita. Todavia, todo processo de tintura envolve uma operação final de lavagem para remover o excesso de corante ou corante hidrolisado que não se fixou previamente à fibra (GUARATINI; ZANONI, 2000). A problemática do efluente têxtil derivado do processo de lavagem é global e, no Brasil, é observado na indústria têxtil de Caruaru, PE.

3.2 PRINCIPAIS FIBRAS TÊXTEIS

Entende-se como fibra têxtil ou filamento têxtil materiais naturais bem como a matéria artificial ou sintética que está apta para aplicações têxteis devido à: i) alta relação entre seu comprimento e diâmetro e, ii) características de flexibilidade, suavidade, elasticidade, resistência, tenacidade e finura. Produtos têxteis são aqueles compostos unicamente por fibras têxteis, filamentos têxteis ou ambos, que estejam em estado bruto, beneficiado ou semibeneficiado, manufaturado ou semimanufaturado, confeccionado ou semiconfeccionado. Ainda, são considerados produtos têxteis aqueles que possuam ao menos 80% de sua massa constituída por fibras/filamentos têxteis (ou ambos) e revestimentos de bens que não são têxteis, mas que contenham produtos têxteis em no mínimo 80% da massa (BRASIL, 2008).

As fibras naturais provêm de fontes minerais, animais ou vegetais, enquanto que as fibras manufaturadas ou químicas são artificiais ou sintéticas, obtidas pela transformação química de matéria-prima natural (BASTIAN; ROCCO, 2009). Os processos de tingimento podem ocorrer em fibras têxteis naturais ou em fibras fabricadas industrialmente (referidas como químicas, manufaturadas ou sintéticas). A partir da década de 1980 a produção mundial de fibras sintéticas se equiparou à de fibras naturais, pelo que se observa consumo similar entre ambos os tipos (GUARATINI; ZANONI, 2000; BASTIAN; ROCCO, 2009).

Pela vasta possibilidade de produtos têxteis, dispõe-se no mercado milhares de corantes e várias combinações a fim de se obter determinada tonalidade na fibra, atendendo as demandas e tendências da indústria da moda.

3.3 PRINCIPAIS CONSTITUINTES DO EFLUENTE TÊXTIL

Conforme Delée et al. (1998), efluentes têxteis podem apresentar carga orgânica alta devido à presença de graxas, agentes tensoativos, surfactantes, enzimas, gorduras, resinas e amido, provenientes principalmente nos passos de engomagem, enobrecimento do tecido e lavagem. A relação de constituintes principais do efluente têxtil real se encontra na Tabela 1. A composição em quantidade de DQO é variável e elevada (ISIK; SPONZA, 2006; LU et al., 2009). Por não ser rapidamente biodegradado, o componente corante traz pouca contribuição

ao parâmetro de Demanda Bioquímica de Oxigênio e geralmente a concentração de corantes como ingrediente ativo está na faixa de 10 a 50 mg.L⁻¹ (CLARKE; ANLIKER, 1980), embora outros autores reportaram valores em até 200 mg.L⁻¹ (DOBLE; KUMAR, 2005).

Boa parte dos poluentes na água residuária têxtil consistem de sais de cloreto e sulfato, ácidos, bases e corantes (ISIK; SPONZA, 2006). De fato, corantes residuais e os auxiliares químicos respondem pelas características de cor, sólidos dissolvidos e DQO em águas residuárias dos processos de tingimento. Por ser peculiar a cada processo, a coloração do efluente têxtil é bastante acentuada (seja o corante único ou mistura de vários corantes), há expressivo valor de sólidos suspensos e biotoxicidade preocupante (LU et al., 2009).

Tabela 1 – Relação dos constituintes de um efluente têxtil, seu papel no processo e relevância ambiental

Composto	Uso	Importância ambiental	Referência
Corante	Conferir cor	Pode conter metais; podem ter propriedades tóxicas; mutagênicas; carcinogênicas e bactericidas; confere cor ao efluente; esteticamente desagradável; xenobiótico; acumulação; biodisponibilidade; afetam a saúde humana; 24 a 35% da DQO total; 90 a 95% da cor total (absorbância total); afeta a vida aquática; eutrofização; formação de aminas aromáticas; recalcitrância.	Guaratini e Zandoni (2000), Hao et al. (2000), Prigione et al. (2008), Pekakis; Xekoukoulotakis e Mantzavinos (2006) Martínez-Huitle e Brillas (2009)
Agentes de nivelamento	<i>Dye carriers</i> (transportadores do corante)	Aumentam carga orgânica e inorgânica, afetam a vida aquática.	Gonçalves et al. (2009)
Eletrólitos (sais)	Promover exaustão do corante no algodão	Aumentam carga orgânica e inorgânica, alteram condutividade e pH, afetam a vida aquática, aumentam salinidade.	Gonçalves et al. (2009), Cho et al. (2009), Pekakis; Xekoukoulotakis e Mantzavinos (2006), Fersi e Dhahbi (2008)
Agentes dispersantes	Auxiliar na fixação de corantes insolúveis, agentes redutores, estabilizam a suspensão do corante	Aumentam carga orgânica e inorgânica, altamente contaminante, afetam a saúde humana, afetam a vida aquática.	Guaratini e Zandoni (2000), Gonçalves et al. (2009), O'Neill et al. (1999)
Soluções tamponadas	Atingir pH adequado para o processo de tingimento	Aumentam carga inorgânica, afetam pH, afetam a vida aquática.	Gonçalves et al. (2009)
Agentes anti-espuma	Reduz/impede formação de espuma	Aumentam carga orgânica e inorgânica, afetam a vida aquática, DQO.	Gonçalves et al. (2009)

(continua)

(conclusão)

Composto	Uso	Importância ambiental	Referência
Surfactantes	Solubilizar, dispersar, melhor espalhamento do corante e melhora das propriedades da mistura	Aumentam carga orgânica e inorgânica, afetam a vida aquática, promovem toxicidade, turbidez, DQO.	Gonçalves et al. (2009), Nitschke e Pastore (2002), Fersi e Dhahbi (2008), Aloui, Kchaou e Sayadi (2009)
Amaciante	Lubrificar a fibra	Aumentam carga orgânica e inorgânica, afetam a vida aquática, eutrofização, turbidez, DQO.	Cho et al. (2009), Fersi e Dhahbi (2008)
Alvejantes	Remoção de cor	Aumentam carga orgânica (no caso de lacases) e inorgânica, afetam a vida aquática.	Monje et al. (2010), Antošová et al. (2018), Cho et al. (2009)

Os danos ambientais prováveis não dependem apenas da quantidade liberada em descarte, mas também das propriedades e aspectos ecotoxicológicos dos produtos envolvidos e das suas características de transporte no meio ambiente. Gonçalves et al. (2009) ressaltam a influência dos outros compostos empregados (tanto os de praxe quanto os empregados para melhorar o desempenho no processo têxtil) nos valores de DQO e toxicidade.

Efluentes têxteis reais podem conter concentrações elevadas de sulfato. Bisschops e Spanjers (2003) apontam até $2,69 \text{ g.L}^{-1}$ de sulfato e Carliell, Barcklay e Buckley (1996) relatam concentrações de $20\text{-}40 \text{ g.L}^{-1}$. Sulfato é empregado nos banhos de tingimento como um aditivo (BISSCHOPS; SPANJERS, 2003) ou pode ser formado pela oxidação de espécies mais reduzidas de enxofre empregadas no processo, como sulfeto e hidrossulfito (SILVA, 2016).

O emprego de matéria orgânica serve de substrato para a comunidade de microrganismos, viabilizando o emprego do tratamento biológico de reatores. O emprego de co-substratos (como etanol, tapioca, sacarose, amido, entre outros) tende a acelerar e proporcionar efeito sinérgico no meio de digestão e provoca uma melhoria no balanço de nutrientes (PINTO et al., 2003). Efeitos positivos sinérgicos (quando a associação dos efeitos é mais significativa do que os efeitos individuais) geralmente observados na digestão oferecem potencial para maiores rendimentos na produção de metano, devido ao balanceamento de vários parâmetros na mistura do co-substrato (MATA-ALVAREZ et al., 2000).

3.3.1 Corantes presentes no efluente têxtil

Definem-se como corantes e pigmentos as substâncias as quais, quando aplicadas em algum substrato, levam à reflexão (seletiva) ou transmissão da luz solar incidente. Ainda, substâncias que criam a sensação do preto ou do branco também são vistas como corantes ou pigmentos (CLARKE; ANLIKER, 1980). O corante a ser utilizado geralmente é escolhido de acordo com o material a ser tingido, portanto a composição de um efluente dito “colorido” varia de acordo com o têxtil a ser produzido (O’NEILL et al., 1999); sendo 1) a aparência da cor uma característica única, 2) difícil a identificação dos compostos responsáveis pela variedade das cores, 3) alta a resistência à degradação por via biológica, alcançando pouca remoção de cor em biossistemas (HAO et al., 2000).

Estima-se que a produção de corantes gire em torno de 10.000 toneladas ao ano, entretanto valores de 280.000 toneladas são reportados (FORGACS; CSERHÁTI; OROS, 2004). Por sua vez, são consideradas perdas para o meio ambiente de 1 a 2% durante a produção e 1 a 10% durante uso (FORGACS; CSERHÁTI; OROS, 2004). Adicionalmente, grande parte dos corantes comerciais e pigmentos disponíveis no mercado são misturas nas quais o conteúdo do componente colorido representa de 10 a 98% do total do composto corante/pigmento. De forma abrangente, corantes são empregados sem purificação prévia (JONSTRUP et al., 2011). O restante da composição representa os constituintes que conferem as propriedades físicas necessárias e podem fundamentalmente influenciar seu comportamento ecotoxicológico (CLARKE; ANLIKER, 1980). Por exemplo, corantes Remazol em geral possuem em sua composição 50 a 60% de componente colorido, 30 a 40% de sais inorgânicos e até 5% de aditivos funcionais (CLARKE; ANLIKER, 1980).

Muito embora o visível no efluente têxtil seja um “resíduo colorido” devido aos corantes não fixados à fibra, ele na verdade se consiste de vários tons ou nuances (PEKAKIS; XEKOUKOULOTAKIS; MANTZAVINOS, 2006; HAO et al., 2000).

A cor residual nos efluentes têxteis se deve à baixa fixação do corante à fibra, com perdas de ao menos 50% e devido à presença de corantes hidrolisados não-reativos. A hidrólise do corante ocorre quando a molécula reage com a água e não com os grupos hidroxila da celulose (PEARCE; LLOYD; GUTHRIE, 2003; CHINWETKITVANICH et al., 1999)

A estrutura química de corantes sintéticos salienta sua estabilidade e resistência ao enfraquecimento e desbotamento em exposição a intempéries como luz intensa e água, e a outros compostos químicos (ROBINSON et al., 2001).

Há variadas opções de classificação de corantes, baseadas em estrutura, cor e método de aplicação e carga da partícula dissolvida em meio aquoso. É dada preferência pela classificação por aplicação e pela classificação de acordo com a estrutura química do composto (CLARKE, ANLIKER, 1980; ALI, 2010; MISHRA; TRIPATHY, 1993; PURKAIT et al., 2005). Todavia, os corantes são comumente classificados por seu grupo cromóforo (MARTÍNEZ-HUITLE; BRILLAS, 2009; FORGACS; CSERHÁTI; OROS, 2004), que são o grupo de átomos responsável por conferir cor ao corante. Além do grupo cromóforo, os corantes possuem em sua estrutura grupos substituintes doadores ou removedores de elétrons denominados auxocromos (CHRISTIE, 2014). As classes de corantes mais frequentemente empregadas em escala industrial abrangem o azo, antraquinona, de enxofre, indigóide, trifenilmetil e derivados de ftalocianina (FORGACS; CSERHÁTI; OROS, 2004), carbonila ($-C=O$), metino ($-CH=$), nitro ($-NO_2$) e grupos quinoide (DOS SANTOS; CERVANTES; van LIER, 2007). Os auxocromos mais importantes por sua vez são aminas ($-NH_3$), carboxila ($-COOH$), sulfonatos ($-SO_3H$) e hidroxila ($-OH$). Os sulfonatos conferem alta solubilidade aquosa para os corantes. Os auxocromos podem pertencer às classes de corantes reativo, ácido, direto, básico, mordante, disperso, pigmento, à tina, aniônico, sulfúrico, solvente e disperso (DOS SANTOS; CERVANTES; van LIER, 2007, WELHAM, 2000). Tais características podem ser observadas na Tabela 2.

A informalidade de produção e comercialização de corantes é observada. Devido à quantidade de corantes disponibilizados, estudos completos sobre os efeitos individuais de cada um não são considerados práticos pela indústria, de forma que aproximações eficazes envolvem (i) concentrar os recursos na redução do lançamento no ambiente, (ii) monitorar o ambiente para detectar quaisquer concentrações altas e seus possíveis efeitos adversos, (iii) caracterizar algumas propriedades ecológicas de membros selecionados de importantes classes químicas de compostos das quais pode-se prever seu comportamento ambiental e, (iv) desenvolver testes para rastreamento em produtos individuais a fim de servir como base para identificar possíveis produtos problemáticos e para sua avaliação intensiva (CLARKE; ANLIKER, 1980).

Enquanto a grande diversidade em corantes justifica-se pela variedade de fibras aos quais podem ser aplicados, a forma genérica pela qual a molécula do corante se fixa à fibra é realizada geralmente em solução aquosa, através de ligações iônicas, ligações de hidrogênio,

interações de Van der Waals e ligações covalentes (GUARATINI; ZANONI, 2000); explicadas por atrações hidrofóbicas e eletrostáticas; em que tanto a força iônica (cujo efeito não é ainda claro) quanto o pH da solução afetam a adsorção do corante, este último por meio do ajustamento das interações eletrostáticas entre corante e substrato (HU et al., 2013). No caso do tingimento de jeans, cuja base é composta por fibras de algodão, as interações são covalentes, se formando através de ligação covalente da molécula do corante – com seu grupo reativo ou eletrofílico – e resíduos nucleofílicos da fibra (GUARATINI; ZANONI, 2000).

Tabela 2 – Classificação de corantes

Corantes e Pigmentos													
Solúveis em água							Insolúveis em água						
Catiônicos			Aniônicos				Solúveis em solventes orgânicos				Baixa solubilidade em solventes orgânicos		
	Básicos	Ácidos	Mordantes	Diretos	Reativos	À Tina	A base de Enxofre	Dispersos	Solventes	Mordantes	À Tina	A base de Enxofre	Pigmentos
Azo	x	x	x	x	x			x	x	x			x
Estilbeno				x									
Di e trifenilmetano	x	x							x	x			x
Xanteno	x	x							x	x			x
Acridino	x												x
Quinolino	x	x		x					x				x
Metino	x			x				x					x
Azina	x	x							x				
Oxazina	x			x						x			x
Tiazina	x								x	x	x		
Enxofre							x					x	
Antraquinona	x	x	x		x	x		x	x	x	x		x
Indigóide		x			x	x					x		x
Ftalocianina		x		x					x	x			x
Substratos têxteis de tingimento	PAC	P	P	C	C	C	C	PE		P	C	C	Impressão Têxtil
	PE	PAm		P	P	P		PP, PVC		C	P		
	PAm	PAC		PAm	PAm			CE					
	P							CE					
	C							PAm					
Outros substratos	Papel	Papel Couro	Papel Couro	Couro								Couro	
Outros usos	Básico:	Tintas, sistemas de registros múltiplos											
	Ácido:	Alimentos, medicamentos, cosméticos, vernizes, tintas, plásticos, resinas											
	Disperso:	Plásticos											
	Solvente:	Tons de madeira, vernizes, lacas, tintas, polimentos, plásticos, fumaças coloridas											
	Pigmento:	Tintas, lacas, plásticos, cosméticos, ceras, utensílios para escrita, papel carbono											

Legenda: C = celulose; CE = éster de celulose (acetato, triacetato); P = proteína (lã, seda); PAC = poliacrílicos; PAm = poliamida; PE = poliéster; PP = polipropileno; PVC = polivinilcloreto

Fonte: Adaptado de Clarke e Anliker (1980)

3.3.2 Corantes azo

Expressiva porcentagem de corantes sintéticos atualmente em uso na indústria são derivados de azo (FORGACS; CSERHÁTI; OROS, 2004). Corantes azo podem se encaixar a várias classificações, como reativos, ácidos, diretos, entre outros. Observa-se uso extensivo de corantes azo reativos, empregados no tingimento do algodão (ØLLGAARD et al., 1999). Sua preferência se justifica por abranger ampla gama de tons brilhantes, pelo emprego em variados métodos de aplicação e por apresentar grande resistência à exposição à água (PEARCE; LLOYD; GUTHRIE, 2003).

Corantes azo são moléculas aromáticas complexas e coloridas com notável diversidade estrutural, capazes de formar uma ligação covalente entre a molécula do corante e a fibra, geralmente celulósica (SOLÍS et al., 2012; CHINWETKITVANICH et al., 1999). Os tipos mais proeminentes são 1) os corantes ácidos para poliamida e substratos de proteína como náilon, lã e seda; 2) corantes dispersos para substratos hidrofóbicos como poliéster e acetato e 3) corantes diretos e reativos para substratos celulósicos como algodão e papel (IARC, 2010). Caracterizados pelo grupo cromóforo azo ($-N=N-$), conectam-se a átomos de carbono com hibridização sp^2 . De um lado, está ligado a um núcleo aromático ou heterocíclico e por outro a uma molécula insaturada cíclica, um heterocíclico ou grupo alifático (CHUDGAR, 2000). Os grupos reativos dos corantes azo formam ligações covalentes com grupos $-OH$, $-NH$ ou $-SH$ em fibras nas quais é possível sua atuação, como algodão, lã, seda e náilon (DOS SANTOS; CERVANTES; van LIER, 2007).

Ligações azo não são encontradas em circunstâncias normais na natureza, o que por consequência as torna de difícil degradação (CHENGALROYEN; DABBS, 2013). Ainda, corantes azo também apresentam substituintes como radicais amino, cloro, hidroxila, metil, nitro, e sais de sódio de ácido sulfônico (respectivamente $-NH_2$, $-Cl$, $-OH$, $-CH_3$, $-NO_2$ e $-SO_3Na$) (SHAUL et al., 1991). As taxas de fixação do corante à fibra são baixas de acordo com a literatura, mas podem variar de 90 a 50% devido à hidrólise do corante na água, resultando em um efluente altamente colorido (JONSTRUP et al., 2011).

A síntese de corantes azo, em geral, envolve dois passos: O primeiro é a conversão de uma amina aromática a um composto di-azo (por exemplo $Ar - NH_2 \rightarrow Ar - N^{2+}$), um processo conhecido como diazotização; e o segundo passo é a reação do composto diazo com um fenol, naftol, amina aromática ou algum composto que possua um grupo ativo metileno; para produzir o corante azo correspondente, um processo conhecido como acoplamento diazo

(por exemplo $Ar - N^{2+} + Ar - OH \rightarrow Ar - N = N - Ar' - OH$). Tal processo serve para formar tanto corantes quanto pigmentos do tipo azo (IARC, 2010).

Os corantes são projetados para ter afinidade a um substrato em específico, e devido a isso, os corantes devem ter maior afinidade ao substrato do que ao meio em que são aplicados (geralmente água) e maior grau de permanência sob as condições de exposição, como umidade ou luz solar (IARC, 2010).

Corantes desenvolvidos para poliésteres são *reativos*, pelo qual o mecanismo de coloração envolve a dissolução do corante na matriz polimérica a fim de formar uma solução sólida-sólida. Eles são hidrofóbicos e não possuem afinidade por polímeros hidrofílicos, sendo adequados para polietileno tereftalato e acetato de celulose (IARC, 2010; SILVA, 2016).

Corantes para poliamidas e proteínas, conhecidos como corantes *ácidos*, formam ligações iônicas dentro da matriz polimérica. Assim, os corantes carregam uma carga aniônica e as poliamidas carregam uma carga positiva (catiônica), especialmente durante o processo de tingimento. Por outro lado, os corantes para polímeros catiônicos, conhecidos como *básicos*, também formam ligações iônicas com a matriz, mas o corante possui uma carga positiva e os polímeros, como poliácritonitrila, possuem uma carga negativa, fazendo o processo reverso do descrito acima (IARC, 2010; SILVA, 2016).

Os substratos celulósicos são polímeros bastante hidrofílicos e requerem corantes que sejam solúveis em água para que ocorra o tingimento do substrato, durante o processo de tingimento. Além disso, devem manter a afinidade ao substrato quando este for exposto à água (por exemplo, procedimento de lavagem). De fato, a facilidade na qual os substratos celulósicos perdem sua cor durante as lavagens levou ao desenvolvimento de mais famílias de corantes para tais fibras do que qualquer outro substrato. Os corantes para tais tipos de polímeros podem ser diretos, azóicos, à tina, sulfurosos e reativos. Os corantes *diretos* foram os primeiros corantes que apresentaram afinidade para o algodão na ausência de um agente de ligação conhecido como mordente. Por serem hidrofílicos, a maior parte possui boa solidez. A mesma necessidade de manter a fixação frente à exposição à água levou à geração dos corantes *sulfurosos* ou à *tina*. Por fim, os *reativos* devem ser submetidos a uma reação química com a celulose a fim de formar uma ligação covalente (IARC, 2010; SILVA, 2016).

O corante alvo do estudo foi o tetra-azo Direct Black 22 (Figura 1, $C_{44}H_{32}N_{13}Na_3O_{11}S_3$; peso molecular 1083,97 g.mol⁻¹), classificado como direto e reativo, sendo amplamente utilizado nas indústrias têxteis e presente nos efluentes das lavanderias na região de Caruaru, Pernambuco.

Figura 1 – Estrutura química do corante C.I. Direct Black 22

Fonte: Silva (2016).

3.4 SISTEMAS DE TRATAMENTO DE EFLUENTES LÍQUIDOS DE INDÚSTRIA TÊXTIL

O tratamento para efluentes têxteis varia entre processos físicos, químicos (inclui-se processos oxidativos avançados) e biológicos. Embora seja almejada a mineralização das substâncias-alvo, a degradação a compostos menos perigosos é mais recorrente. A simples perda de cor do efluente não implica em resultados benignos para o meio ambiente.

A descoloração é o desaparecimento da cor sem a quebra das moléculas complexas do corante; nesse aspecto (i) qualquer alvejante pode descolorir a água residual e ainda assim esta possuiria conteúdo de orgânicos tóxicos ainda maior do que previamente à sua adição; (ii) uma simples redução, seja biológica, química ou fotoquímica formaria um composto sem cor; e (iii) até certos compostos tornam-se incolores sob mudanças de pH (como no caso da fenolftaleína). Desta forma, a descoloração não indica que houve degradação das moléculas dos compostos. Frequentemente, a descoloração ocorre quando há quebra da ligação do grupo cromóforo, permanecendo intactos alguns fragmentos da molécula original (HAO et al., 2000).

A mineralização, por sua vez, ocorre quando há conversão dos compostos orgânicos a compostos inorgânicos, preferencialmente inertes. Por isso, métodos analíticos adequados são necessários para averiguar a real eficiência do método. Enquanto a mineralização completa dos compostos de interesse é de difícil ocorrência, a degradação das substâncias

presentes nos efluentes em substâncias mais simples e, potencialmente menos difíceis de degradar, pode ser de grande auxílio para as operações finais de polimento do efluente.

Em geral, os processos de tratamentos utilizados atualmente são classificados em físico-químicos, químicos, processos oxidativos avançados (POA), biológicos, de decomposição enzimática e métodos eletroquímicos. Os métodos físicos e/ou químicos apresentam vantagens e desvantagens. Em geral, tais processos são onerosos, geram subprodutos perigosos e podem criar depositórios volumosos de lodo. Já os métodos como ozonização, fotocatalise e reagente de Fenton são observados como potenciais no desenvolvimento da tecnologia para tratamento de efluentes recalcitrantes, com possível inconveniente de envolver técnicas complicadas de operação ou altos custos. Métodos biológicos são observados como alternativas preferenciais, menos dispendiosas e naturais (PEARCE; LLOYD; GUTHRIE, 2003; FORGACS; CSERHÁTI; OROS, 2004).

3.5 MECANISMOS DOS PROCESSOS BIOLÓGICOS DE DEGRADAÇÃO DE EFLUENTES TÊXTEIS

Efluentes compostos por corantes podem ser degradados por meio de processos anaeróbios e aeróbios. Os processos anaeróbios podem ocorrer em temperaturas mesofílicas e termofílicas e o consórcio microbiano pode ser adaptado com sucesso aos diferentes tipos de substrato fornecidos ao sistema, contribuindo para aumentar os caminhos de degradação dos compostos complexos e recalcitrantes (ZISSI; LYBERATOS, 1996; SYUTSUBO et al., 2001; AKARSUBASI et al., 2005; GONÇALVES et al., 2009). Embora haja diferentes condições de operação e variadas espécies de microrganismos, a eficiência dos processos anaeróbios de descoloração é consideravelmente maior do que os processos aeróbios (BANAT et al., 1996; FORGACS; CSERHÁTI; OROS, 2004).

Van der Zee e Villaverde (2005) ressaltam que a redução de corantes azo se dá por meio de uma reação de oxidação-redução, na qual o corante atua como o receptor final de elétrons. A sequência de processos anaeróbio-aeróbio é vantajosa na remoção de amina aromáticas tóxicas, provenientes da biodegradação de corantes azo. Condições aeróbias são requeridas para haver completa mineralização da molécula e a sequência anaeróbia-aeróbia é vantajosa para remoção dos compostos aromáticos produzidos na redução inicial (KAPDAN; OZTEKIN, 2006). Tais produtos são degradados via hidroxilação e abertura de anel na

presença de oxigênio (van der ZEE; VILLAYERDE, 2005). De fato, a literatura ostensivamente aponta que o processo aeróbio é necessário após a digestão anaeróbia para que a qualidade final do efluente seja melhorada (SUPAKA et al., 2004; KAPDAN et al., 2003; SPONZA; ISIK, 2002).

Em suma, para a completa degradação de corantes azo e seus subprodutos, um processo de dois estágios é necessário, no qual se fornece oxigênio após a redução anaeróbia da ligação azo (DOS SANTOS; CERVANTES; van LIER, 2007; van der ZEE; VILLAYERDE, 2005; BRAÚNA; MOTA; DOS SANTOS, 2009; DOS SANTOS et al., 2005). A redução de uma ligação azo $-N=N-$ gera as previamente mencionadas aminas aromáticas, incolores e nocivas à saúde humana e ao meio ambiente que também demandam degradação (van der ZEE, VILLAYERDE, 2005).

O primeiro passo para a degradação do corante azo é a descoloração, que envolve a quebra da ligação azo $-N=N-$. A redução requer um doador de elétrons e, para os corantes azo em geral, o doador é inespecífico, variando de substratos simples como acetato, etanol e glicose até compostos complexos, como polivinilálcool e carboximetilcelulose. Em alguns casos, substratos determinados se mostram mais adequados do que outros. A quantidade de substrato primário doador de elétrons é considerada pequena (32 mg DQO para cada mmol.L^{-1} de corante monoazo). Caso haja outros aceptores de elétrons, esse valor será maior devido à disputa de equivalentes redutores (van der ZEE; VILLAYERDE, 2005).

A clivagem da ligação $-N=N-$ não se aplica a um mecanismo em específico e rotas diferentes já foram descritas pela literatura, tais como mecanismos enzimáticos, mecanismos com mediadores redox de baixo peso molecular, redução química por redutores biogênicos, gerados ou adicionados ao meio (como o sulfeto, para ambos os casos) ou, ainda, uma combinação dos mesmos (SILVA, 2016; CARVALHO, 2016a). Isto pode ocorrer intra ou extracelularmente, mecanismo pelo qual os equivalentes redutores são transferidos para o corante, seja de fontes químicas ou biológicas (van der ZEE; VILLAYERDE, 2005).

A eficiência na descoloração do efluente dependerá se há presença de aeração, temperatura (preferencialmente entre 30 e 45°C), pH (próximo da região de neutralidade) e potencial redox. Notadamente, a concentração do corante afetará a taxa de biodegradação devido às características tóxicas do composto e de seus metabólitos formados durante a sua degradação, além da habilidade da enzima em reconhecer o corante de maneira eficaz tanto em concentrações altas como em concentrações baixas (PEARCE; GUTHRIE; LLOYD,

¹ 1 mmol.L^{-1} = 1 mM

2004). Em situações de redução não-enzimática, a taxa de redução seria independente da concentração dos corantes (DOBLE; KUMAR, 2005). O número de ligações azo e de grupos funcionais em adição com seu arranjo estrutural podem dificultar significativamente o processo de degradação (CHENGALROYEN; DABBS, 2013).

3.5.1 Rota metanogênica

O sistema ecológico da digestão anaeróbia é determinado pelo equilíbrio entre processos bioquímicos envolvidos. Cada sequência dos processos metabólitos é dependente de uma etapa anterior, de forma que estas, inter-relacionadas, são subordinadas da atividade de diferentes grupos de microrganismos com funções peculiares: as bactérias fermentativas (acidogênicas), bactérias sintróficas (acetogênicas) e microrganismos metanogênicos (arqueias metanogênicas).

A Figura 2 descreve a rota metanogênica de degradação da matéria orgânica. Simplificadamente, o primeiro grupo, composto pelas bactérias acidogênicas, fermenta ou hidrolisa compostos orgânicos mais complexos (como por exemplo o etanol) em compostos mais simples, a citar hidrogênio, dióxido de carbono e ácidos orgânicos. Os ácidos orgânicos são convertidos pelo grupo de microrganismos sintróficos acetogênicos a acetatos, hidrogênio e dióxido de carbono. Por fim, a conversão de acetatos e hidrogênio é realizada por arqueias metanogênicas, procariotas estritamente anaeróbios. Devido à interação sintrófica com as bactérias acidogênicas e por ocuparem a posição final do processo, tais microrganismos apresentam lenta taxa de crescimento, constituindo por muitas vezes o fator limitante do processo de digestão anaeróbia como todo. As arqueias metanogênicas produzem o metano e mantém a pressão parcial de hidrogênio no meio em níveis baixos o suficiente, o que permite ao grupo de bactérias fermentativas a produção de produtos mais oxidados.

Figura 2 – Padrão sequencial da degradação microbiológica de matéria orgânica complexa em ambientes anaeróbios na ausência de outros aceptores finais de elétrons

Fonte: Adaptado de Lens et al. (1998) e Muyzer e Stams (2008).

No consórcio anaeróbio, os redutores equivalentes são formados pelas bactérias fermentativas, sendo consumidos pelas arqueias metanogênicas, gerando metano. A literatura apontou que, muito embora as arqueias metanogênicas possam contribuir com a redução dos corantes azo em presença de mediadores redox (MR), em geral tal processo é conduzido pelas bactérias acidogênicas fermentativas (DOS SANTOS et al., 2006; CHINWEKITVANICH; TUNTOOLVEST; PANSWAD, 1999). Os mecanismos biológicos diretos e indiretos são descritos respectivamente pelas Equações 1 e 2 (SILVA, 2016), onde DE é o doador de elétrons (oxidado ou não):

Assim, há uma transferência direta de elétrons aos corantes azo, que aqui agem como aceptores finais de elétrons via enzimática durante o catabolismo bacteriano, ligado à geração de ATP e, por conseguinte, à conservação de energia. Sob condições anaeróbias, certas bactérias reduzem a ligação azo do corante, a qual é altamente eletrofílica, através da atividade de azo-redutases citoplasmáticas de baixa especificidade (PEARCE; LLOYD; GUTHRIE, 2003; KECK et al., 1997; DOBLE; KUMAR, 2005; KAPDAN; OZTEKIN, 2006).

A produção de metano pode ser parcialmente comprometida pela presença das aminas aromáticas provenientes do tratamento anaeróbio, devido ao seu caráter tóxico e à sensibilidade da comunidade de arqueias metanogênicas. Variadas cargas orgânicas aplicadas já reduziram, comprovadamente, produções de metano (até 45% menor do que o calculado estequiometricamente) (KARATAS; DURSUN; ARGUN, 2011).

3.5.2 Rota sulfetogênica

O ciclo do enxofre (Figura 3) é complexo por envolver faixas de oxidação que variam do -2 (completamente reduzido) ao +6 (completamente oxidado) e poder ser transformado tanto quimicamente quanto biologicamente. Ao empregar SO_4^{2-} comoceptor final de elétrons na degradação de matéria orgânica, os microrganismos produzem H_2S , que pode ser oxidado aerobiamente por meio de bactérias quimiolitotróficas ou anaerobiamente por bactérias fototróficas a S^0 e SO_4^{2-} (MUYZER; STAMS, 2008).

carbono. Os microrganismos do grupo 2 também podem usar acetato como substrato de crescimento, empregando dois caminhos diferentes para a oxidação, uma modificação do ciclo do ácido cítrico ou a rota da acetil-CoA (MUYER; STAMS, 2008).

Figura 4 – Padrão sequencial da degradação microbiológica de matéria orgânica complexa em ambientes anóxicos na presença de sulfato

Fonte: Adaptado de Lens et al. (1998) e Muyzer e Stams (2008).

A redução biológica de sulfato ocorrida em ambiente anaeróbico, suplementado com etanol e mediado pelas BRS pode ser representada a seguir (Equação 3), considerando o balanço de massa entre etanol e sulfato, suficiente para a redução do íon (SILVA, 2016).

De acordo com a presença de sulfato no meio, uma competição entre as BRS e as arqueias metanogênicas pode ocorrer, levando à inibição de produção de metano e a

consequente produção de sulfeto de hidrogênio (CARLIELL et al., 1995). Em geral, a redução do sulfato nos ambientes anóxicos é limitada pela disponibilidade do íon no meio e presença de doadores de elétrons (MUYZER; STAMS, 2008). Entretanto, tal competição aparentemente ocorre em concentrações limitantes de doadores de elétrons, conforme observado na literatura, dado que uma inibição da metanogênese não foi observada em razões DQO/SO₄²⁻ acima de 2,5 (DAMIANOVIC; FORESTI, 2007; GODOI; DAMIANOVIC; FORESTI, 2015), sugerindo que existe uma associação sintrófica entre as comunidades sulfetogênica e metanogênica em razões DQO/ SO₄²⁻ mais altas. Ressalta-se que, para haver uma redução completa de sulfato no meio, requer-se uma razão DQO/ SO₄²⁻ de 0,67 (LENS et al., 1998).

A produção de sulfeto em solução é associada coletivamente às formas S²⁻, HS⁻ e H₂S (em gás e em solução) e em alguns casos, também é associado a sulfetos metálicos insolúveis de acordo com o equilíbrio físico e químico do sistema (LENS, 1998; MUYZER; STAMS, 2008, MADIGAN et al., 2014). A especiação do sulfeto ocorre dependendo do pH, conforme Figura 5, podendo estar até 90% na forma HS⁻ e 10% na forma H₂S em pH 8, desprezando a participação em S²⁻.

Figura 5 – Formas de espécies de sulfeto e sua prevalência de acordo com o pH. A faixa mais zebraada corresponde ao pH ótimo para digestão metanogênica, entre ela estão as correspondências para a faixa de atuação da digestão anaeróbia

Fonte: Rintala e Puhakka (1994).

A oxidação incompleta do sulfeto (Equação 4) pode ocorrer química ou biologicamente (SILVA, 2016). Plas et al. (1992) verificaram condições de culturas mistas na

relevância da oxidação química e biológica de sulfeto em meio aquoso. Enquanto que em concentrações muito baixas de sulfeto a rota química de oxidação do sulfeto pode ser considerada insignificante, a atividade biológica está presente. Dentro de uma faixa de 0,005 e 3,0 mM (0,16 e 96,2 mg.L⁻¹) de sulfeto, a oxidação química aumentou de forma constante de 0 a 18% considerando a conversão total. A concentração de 3,0 mM (96,2 mg.L⁻¹) provocou máxima atividade biológica e o aumento sistemático desta concentração causou efeitos tóxicos (PLAS et al., 1992). Os autores definiram temperatura mesofílica, pH 7 e 3 mM (96,2 mg.L⁻¹) de sulfeto como condições adequadas para atividade biológica. Algumas bactérias quimiolitotróficas de maioria aeróbias catalisam a reação, cuja oxidação é significativa onde o H₂S emerge de ambientes anóxicos e encontra o ar (MADIGAN et al., 2014). O enxofre elementar também pode ser formado em condições limitantes de oxigênio. A oxidação parcial de sulfeto a S⁰ requer uma concentração de oxigênio dissolvida abaixo de 0,1 mg.L⁻¹ em reatores (LENS et al., 1998). Em condições anóxicas, quando há incidência de luz, a oxidação de sulfeto pode ser mediada por bactérias verdes e púrpuras sulfurosas (MADIGAN et al., 2014).

Por sua vez, o sulfeto age no corante, reduzindo-o a compostos estáveis na forma das aminas aromáticas (Equação 5), caracterizando um mecanismo químico direto. A redução livre de corantes azo por produtos finais do catabolismo bacteriano não está relacionado à geração de ATP, enquanto que a transferência direta de elétrons ao corante azo, que atua como umceptor final de elétrons durante o catabolismo bacteriano, está conectado à geração de ATP e, portanto, à conservação de energia (PEARCE; LLOYD; GUTHRIE, 2003).

Rasool, Woo e Lee (2013) observaram que, em estudo para descoloração de Direct Red 80, uma cultura mista de BRS foi capaz de remover corante mesmo sob concentrações elevadas de sulfato. Os autores provaram que a remoção não foi influenciada pela concentração de sulfato ou ação do sulfeto no meio, pois ao aumentar-se as concentrações de sulfato, a eficiência de remoção de cor não aumentou. Foi sugerido que as bactérias redutoras de sulfato (BRS) em associação com *Methanomethylovorans hollandica* contribuem consideravelmente no sucesso do processo de tratamento com a metabolização de grupos

sulfonados associados ao corante e subsequente conversão de compostos de enxofre a dióxido de carbono, metano e sulfeto de hidrogênio, que reduzem quimicamente o corante azo (PLUMB et al., 2001).

Carliell et al. (1995) em seu estudo afirma que o corante Reactive Red 141 foi preferencialmente reduzido em detrimento ao sulfato presente, sugerindo que o corante é o aceptor de elétrons mais favorável. A presença de sulfatos poderia estimular, ao invés de suprimir competitivamente, a descoloração de corantes azo, devido à redução do íon a sulfeto em meio anaeróbico, o qual é um redutor conhecido de corantes azo. Foi observada redução acentuada na eficiência de descoloração de corantes azo, em um reator anaeróbico, quando molibdato (inibidor de redução de sulfato) foi adicionado no efluente (ALBUQUERQUE et al., 2005; van der ZEE; VILLAYERDE, 2005, OZDEMIR et al., 2013). Entretanto, relatos atuais na literatura também demonstram que o sulfato pode comprometer a rota redutiva do corante azo em ambiente sulfetogênico (AMARAL et al., 2014). Ozdemir et al. (2013) assumem que o efeito causado pelo íon sulfato na redução de corantes azo difere consideravelmente na literatura.

Em caso de reatores compartimentados, a sulfetogênese pode ser favorecida em uma ou outra região. Sabe-se que os compostos usados como aceptores finais de elétrons pelas BRS incluem, além de sulfatos e sulfitos, outros íons inorgânicos, como nitrito, nitrato e cromato, além de moléculas orgânicas como fumarato e o ácido sulfônico (LAUE; DINGER, COOK, 1997; LIE; LEADBETTER; LEADBETTER, 1998; LIE et al., 1999). O metabolismo de redução de compostos sulfonatos ($R-SO_3^-$) é importante para os ecossistemas, aonde sedimentos e constituintes dos solos contêm até 50% de seu enxofre na forma de sulfonatos – os quais também estão presentes em boa parte dos corantes existentes em efluentes industriais. Desta forma, corantes hidrolisados podem fornecer uma fonte considerável de sulfonatos, os quais por sua vez podem ser utilizados como aceptores finais de elétrons (KERTESZ, 1999; PLUMB et al., 2001). Todavia, a literatura considera que o principal fator limitante ao potencial de degradação dos metabólitos do corante nos sistemas biológicos é justamente a natureza altamente sulfonada dos compostos, pois a sulfonação tende a aumentar a recalcitrância de compostos por diminuir sua habilidade de permear através das paredes celulares (CARLIELL et al., 1995; MECHSNER; WUHRMANN, 1982; HAUG et al., 1991). Diniz et al. (2002) verificaram que as BRS descoloriram o corante sulfonado Congo Red por meio de um processo extracelular e não-enzimático, empregando o sulfeto para redução da ligação $-N=N-$. Desta forma, sugere-se para as BRS um papel indireto na descoloração de corantes sulfonados, como é o caso do Congo Red e Direct Black 22.

Ainda, Chinwekitvanich, Tuntoolvest e Panswad (1999) reportaram aumento de alcalinidade nos tanques de acidificação e reatores anaeróbios, cuja produção se deve às BRS. Entretanto, não houve correlação entre a quantidade de sulfetos produzida e a eficiência de remoção de cor, significando de acordo com os autores que as BRS estavam presentes; todavia não eram os principais microrganismos participantes no processo de descoloração tanto no tanque de acidificação quanto no reator UASB.

Desta forma, para se obter um melhor desempenho de reatores anaeróbios na descoloração de corantes azo sob condições sulfetogênicas, é preciso fornecer condições adequadas para que o papel das BRS neste processo seja estimulado, tendo em conta as características oxidantes do sulfeto. Para maximizar a redução de sulfato, pode-se estimular um potencial redutor negativo no ambiente (CIRIK; KITIS; CINAR, 2013). Deve-se ter em conta que o sulfato é comumente presente no efluente têxtil dado o seu uso no processo de tingimento. Adicionalmente, a presença de íons sulfato pode ocorrer na fase anaeróbia devido à própria característica do corante que, caso sulfonado, causa liberação do íon devido à sua biodegradação (CIRIK; KITIS; CINAR, 2013).

Considerando ainda que a descoloração anaeróbia de corantes azo é baseada em reações de oxido-redução nas quais o corante pode atuar com um acceptor final de elétrons, é necessária uma diferença de potencial redox entre os doadores e aceptores de elétrons. Assim, dentro das condições anaeróbias, deseja-se um potencial redox baixo. Para os corantes azo, os valores se encontram entre -430 e -180 mV (DUBIN; WRIGHT, 1975). O potencial redox para a redução de sulfato é -220 mV ($\text{SO}_4^{2-}/\text{H}_2\text{S}$), -116 mV para sulfito ($\text{SO}_3^{2-}/\text{H}_2\text{S}$) e -280 mV para enxofre elementar ($\text{S}^0/\text{H}_2\text{S}$) (DOS SANTOS; CERVANTES; van LIER, 2007; YOO; LIBRA; ADRIAN, 2001). Desta forma, a faixa de potencial redox da redução de ligações azo é próximo ao da redução de sulfato (CIRIK; KITIS; CINAR, 2013). Portanto, um ambiente sulfato-redutor pode ser benéfico à redução de corantes azo.

3.5.3 Imobilização da biomassa

A imobilização de comunidades balanceadas de microrganismos é importante no tratamento anaeróbio, pois a concentração de produtos intermediários pode ser mantida a níveis baixos (LETTINGA, 1995). Reatores com biomassa imobilizada podem manter um ambiente de condições favoráveis para as condições operacionais impostas, principalmente

nos processos nos quais a transferência de elétrons entre espécies é crucial e nos casos de tratamento biológico integrado (por exemplo, empregando redutores de sulfato, desnitrificantes, metanogênicos e acidogênicos) (LETTINGA, 1995). A configuração de leitos fixos promove melhor retenção celular do que reatores de leito fluidizado ou de leito expandido, pois a biomassa se adere à uma matriz imobilizada (RATUSZNEI et al., 2000). A forma de estruturação do leito é importante, pois o empacotamento aleatório pode provocar problemas hidrodinâmicos como caminhos preferenciais, pontos de pressão e entupimento (*clogging*) (MOCKAITIS et al., 2014).

Os reatores com biomassa imobilizada podem manter constantes as condições de operação, fornecem meio e suporte para a comunidade microbiológica de ação, observado que os mesmos apresentam cinética de crescimento lenta (SPEECE, 1996). Reatores de leito estruturado compensam tal desvantagem ao aumentar tanto a concentração de biomassa em suporte quanto o tempo de residência celular ainda que a baixas taxas de detenção hidráulica (CHAPARRO, 2010; SARTI et al., 2001; MOURA; DAMIANOVIC; FORESTI, 2012).

Sabe-se que os efeitos adversos da presença de elementos com toxicidade crônica nos efluentes podem ser minimizados com controle adequado do tempo de detenção de sólidos, o que também proporciona adaptação da população de microrganismos à referida toxicidade (PARKIN; OWEN, 1986). A configuração de biomassa imobilizada em reatores anaeróbios demonstra melhor desempenho para suportar choques de carga orgânica e alimentação com teor tóxico (SINGH; PRERNA, 2009). Assim, o emprego de biomassa imobilizada apresenta maior resistência a constituintes tóxicos de efluentes podendo tolerá-los em concentrações mais elevadas sem apresentar falha do reator em comparação aos reatores com leitos suspensos, os quais teriam maior taxa de *washout* (lavagem da biomassa do reator) e necessidade de recirculação dos sólidos (PARKIN; OWEN, 1986).

Considerando a descoloração e degradação de efluentes têxteis, o tempo de detenção hidráulica (TDH) interfere na eficiência do processo. Segundo Van der Zee e Villaverde (2005), devido à recalcitrância do composto, aconselha-se que sejam utilizados TDHs maiores, sendo observadas eficiências de remoção de cor de mais de 90% quando o TDH é da ordem de 24h ou mais (chegando a até 48 horas).

A configuração de reatores de leito estruturado como modelo inovador para remoção de matéria orgânica e redução de sulfato foi apresentada por Camiloti et al. (2013) e Mockaitis et al. (2014), sendo utilizados para diferentes fins, como produção de hidrogênio e avaliação da interferência da sulfetogênese na produção de metano em águas residuárias ricas em carboidrato em configuração descendente (GODOI; FORESTI; DAMIANOVIC, 2017;

ANZOLA-ROJAS; ZAIAT, 2016) e também ascendente (GODOI; DAMIANOVIC, FORESTI; 2015).

Reatores de leito estruturado foram descritos na literatura como adequados para substituir sistemas convencionais de leito empacotado para tratar águas residuárias ricas em sólidos, não apresentando limitação operacional (AQUINO; FUESS; PIRES, 2017). A robustez desse sistema foi confirmada por Aquino, Fuess e Pires (2017) ao verificar que o reator de leito estruturado absorveu altas cargas orgânicas volumétricas aplicadas (até 18,0 kg.DQO.m⁻³.d⁻¹) mesmo com concentração menor de biomassa quando comparado a um reator de leito empacotado (42,0 g.SSV.L⁻¹ e 70,0 g.SSV.L⁻¹, respectivamente).

A configuração do referido reator apresenta vantagens como a manutenção de uma área livre na transversal no leito, que evita acumulação excessiva de biomassa; uma zona de sedimentação no fundo do reator sem material suporte, que aumenta o potencial do sistema para separar precipitados, a manutenção do volume de trabalho do reator, a prevenção de caminhos preferenciais e a prevenção de acumulação de sólidos suspensos no efluente de saída (MOCKAITIS et al., 2014; GODOI; FORESTI; DAMIANOVIC, 2017; CAMILOTI et al., 2013).

Reatores com suporte de biomassa apresentam recuperação mais rápida quando submetidas a períodos de instabilidade, como no caso de Damianovic e Foresti (2007), que observaram o pronto restabelecimento de um reator anaeróbio de fluxo horizontal com carvão como meio suporte após ter sido submetido a altas concentrações de sulfato e baixas razões DQO/SO₄²⁻ (que variaram, respectivamente, de 500 a 2.000 mg.L⁻¹ e de 1,0 a 5,0).

Para Silva et al. (2006), o sucesso de um reator anaeróbio pode estar diretamente associado ao material utilizado para aderência do biofilme. O emprego de suportes de espuma de poliuretano já foi demonstrado como mais eficaz para fixação de microrganismos do que anéis plásticos, em tratamento para remoção conjunta de nitrogênio e matéria orgânica (NOCKO, 2008). Huysman et al. (1983) aponta que a espuma de poliuretano é uma matriz de excelente colonização para filtros anaeróbios. Silva et al. (2006) estudaram diversos materiais suporte para a imobilização de BRS e arqueias metanogênicas. Em seu experimento, a espuma de poliuretano apresentou maior concentração específica de biomassa (872 mg.STV.g⁻¹) em comparação com carvão vegetal (84 mg.STV.g⁻¹), polietileno de baixa densidade (23 mg.STV.g⁻¹) e cerâmica de alumina (47 mg.STV.g⁻¹). Os autores concluíram que a quantidade de biomassa retida no reator é dependente do tipo de material suporte. Cada material, por sua vez, promove diferentes níveis de equilíbrio microbiano, afetando a estabilidade e o desempenho do reator. A espuma de poliuretano e o carvão vegetal apresentaram melhor

aderência para BRS, enquanto que cerâmicas de alumina beneficiou o enriquecimento de micro-ambientes metanogênicos e o polietileno de baixa densidade foi colonizado principalmente por bactérias hidrolíticas e fermentativas (SILVA et al., 2006). Levando as informações em consideração, a espuma de poliuretano é indicada para reatores cujo objetivo seja a redução de sulfato.

Dentre as várias configurações possíveis para reatores anaeróbios, não se observou ainda na literatura a aplicação de reatores de leito estruturado em espumas de poliuretano e alimentação em fluxo ascendente para o tratamento anaeróbio de corantes azo, sendo esta a proposta do presente trabalho.

Independentemente da configuração de reator escolhida, a operação dos reatores para o tratamento de efluentes têxteis requer o cuidado com a exposição da biomassa aos elementos recalcitrantes do efluente, o monitoramento da toxicidade, a utilização de tempos de detenção hidráulica maiores que os utilizados para o tratamento de efluentes prontamente biodegradáveis e a observação do limite de carga orgânica aplicada nos reatores, associado à necessidade da adição de co-substrato.

3.5.4 Adsorção de corantes por uso de meio suporte

Tendo em conta a natureza do meio estrutural para suporte da biomassa, o fenômeno de adsorção pode ocorrer, colaborando na remoção de cor. O processo de adsorção é um fenômeno de superfície no qual um fluido composto por uma mistura de vários componentes, gases ou líquidos, é atraído à superfície de um adsorvente sólido e forma ligações químicas ou físicas com o mesmo (FOO; HAMEED, 2010). A adsorção pode ser favorecida ou não pelo pH do meio. O comportamento do adsorvente pode ser previsto através de correlações de equilíbrio de adsorção, conhecidas como isotermas de adsorção (THOMPSON et al., 2001). A isoterma é uma curva que descreve a retenção de uma substância em um sólido em várias concentrações (LIMOUSIN et al., 2007). Elas descrevem a interação do material adsorvente com o poluente, revelando propriedades e a capacidade do material, bem como beneficiam um sistema que favoreça a reação (THOMPSON et al., 2001).

A isoterma de adsorção pode se encaixar nos dados experimentais com precisão sob uma gama de condições e, ainda assim, falhar completamente sob outras, pois nenhum

modelo foi reportado como comumente aplicável para todas as situações (ALLEN; MCKAY; PORTER, 2004).

Dentre os modelos de isotermas existentes para a adsorção de corantes, o de Langmuir e o de Freundlich são amplamente citados (ATHALATHIL et al., 2014; YAGUB et al., 2014). No modelo de Langmuir, o modelo empírico assume uma adsorção em monocamada, ou seja, a camada adsorvida apresenta “uma molécula de espessura”. A adsorção pode ocorrer apenas em um número fixo de sítios localizados que são idênticos e equivalentes, sem interação lateral ou obstáculos entre as moléculas adsorvidas, mesmo nos sítios adjacentes (FOO; HAMEED, 2010; VIJAYARAGHAVAN et al., 2006).

A isoterma de Freundlich se trata da mais antiga descrição conhecida relatando a adsorção não-ideal e reversível, não restrita à formação de uma monocamada. O modelo empírico é aplicado à adsorção de multi-camada, com distribuição não-uniforme de calor de adsorção e afinidade sobre a superfície heterogênea. Assim, a quantidade adsorvida é a soma da adsorção em todos os sítios, cada qual com sua energia de ligação, no qual os sítios mais fortes sendo ocupados primeiramente até que a energia de adsorção decresce exponencialmente devido à conclusão do processo de adsorção (FREUNDLICH, 1906; FOO; HAMEED, 2010).

3.5.5 Aminas Aromáticas

Aminas são compostos com até 3 grupos arila ou alquila ligados ao átomo de nitrogênio. Elas podem ser classificadas em primárias, secundárias ou terciárias, de acordo com o número de ligações aos átomos de carbono; alifáticas ou aromáticas de acordo com a natureza do carbono ligado ao nitrogênio; e heterocíclica ou homocíclica, conforme a participação do nitrogênio no sistema cíclico. As aminas aromáticas são compostos químicos comumente identificados por possuírem um ou mais anéis aromáticos ligados a um ou mais substituintes do grupo amina na sua estrutura molecular, englobando desde simples anilinas até estruturas heterocíclicas com múltiplos substituintes (PINHEIRO; TOURAUD; THOMAS, 2004).

Aminas possuem caráter básico, explicado pela teoria ácido-base de Lewis, pela qual se determina que ácido é toda espécie química receptora de elétrons e base é toda espécie

química doadora de elétrons. Como as aminas apresentam um par de elétrons isolado, o par atua como uma base ao formar ligações covalentes com algum ácido de Lewis.

Aminas aromáticas, ou arilaminas, estão presentes nos efluentes industriais da indústria de corantes, em pesticidas, tinturas para cabelo, na fumaça de cigarros ou expelida por automóveis e mesmo em carnes muito bem-passadas (WEISBURGER, 2002; PINHEIRO; TOURAUD; THOMAS, 2004).

Estudos pioneiros mostraram que trabalhadores da indústria de corantes do século XIX na Alemanha desenvolveram câncer urinário na bexiga, posteriormente observado em trabalhadores do mesmo setor na Grã-Bretanha. As aminas aromáticas geradas pela quebra das ligações azo em tais corantes também promoveram câncer urinário em bexiga (CLAYSON, 1962; SABBIONI; RICHTER; 1990).

A literatura aponta que bactérias presentes na pele humana, a microflora do trato intestinal e as enzimas hepáticas são capazes de metabolizar corantes azo à suas correspondentes aminas aromáticas. As aminas aromáticas são facilmente absorvíveis pela pele (PLATZEK et al., 1999). O conhecimento atual aponta para a hipótese de que, se não todas, a maioria das aminas aromáticas apresenta potencial carcinogênico (IARC, 2010).

A toxicidade crônica e aguda de aminas aromáticas aparentemente dependem da ativação metabólica do grupo amina, e a reação chave responsável por todas as atividades biológicas é a N-oxidação para aril-N-hidroxilaminas. Tanto a amina livre quanto a acetamida podem ser N-oxidadas. Existe, assim, um equilíbrio entre ambas, determinado pela atividade competitiva entre N-acetiltransferases e N-deacetilases. A atividade biológica depende da biodisponibilidade de um íon nitrônio, um metabólito final reativo que reage com DNA, RNA e proteínas. Os metabólitos finais da maior parte das aminas aromáticas reagem *in vitro* e *in vivo* com a C-8 da guanina e tal adição é apontada como responsável pelas mutações pontuais (IARC, 2010).

Aminas aromáticas sulfonadas, que constituem muitos dos corantes azo hidrossolúveis são de difícil degradação. Sua baixa biodegradabilidade ocorre devido à natureza hidrofílica do grupo sulfonado, o qual causa obstrução do transporte na membrana (van der ZEE; VILLAYERDE, 2005).

Boa parte das aminas aromáticas derivadas de corantes azo podem sofrer auto-oxidação quando expostas ao oxigênio, especialmente aquelas com grupos hidróxi orto-substituídos. Os compostos obtidos podem ser oligômeros, polímeros escuros de baixa solubilidade, ou mesmo compostos hidrossolúveis, estáveis e muito coloridos (KUDLICH et al., 1997).

As aminas aromáticas são bons substratos para degradação aeróbia (Figura 6). Podem ser mineralizadas por caminhos de hidroxilação via abertura de anel, produzindo compostos como CO_2 , H_2O e, conforme a rota de degradação e característica do corante, gerando NH_3 ou H_2S (PEARCE; LLOYD; GUTHRIE, 2003; YAGUB et al., 2014; SALLEH et al., 2011).

Figura 6 – Visão geral do destino de corantes azo e aminas aromáticas durante o tratamento anaeróbio e aeróbio

Fonte: Adaptado de Van der Zee e Villaverde (2005).

Weisburger (2002) resumiu as conclusões gerais da literatura por um período de cem anos quanto à toxicidade de aminas aromáticas e aminas aromáticas heterocíclicas observados em mamíferos e humanos. Elas incluem:

- a indução do câncer em modelos de animais vivos e em humanos;
- grupos metil ou orto ligados a grupos amino podem aumentar a carcinogenicidade e alterar organotropismo;
- aminas aromáticas ou derivados de n-acetil geram efeitos próximos, dado que a acetilação ou desacetilação podem ocorrer *in vivo*;
- oxidação bioquímica para formar compostos de n-hidróxi (principalmente pelo citocromo P450 1A2 mas também por outras enzimas do mesmo citocromo e por prostaglandina H. sintase) é necessária para desencadear não somente a carcinogenicidade mas também outras ações como a formação de metemoglobina;

- redução bioquímica por enzimas (como a xantina oxidase redutase) de compostos nitro-amino-aromáticos podem gerar o provável intermediário n-hidróxi, em função da estrutura;
- os compostos n-hidroxilaminas requerem um segundo passo na ativação bioquímica via orto-acetilação, formação de sulfato de éster (geralmente quando o alvo é o fígado), ou outra biossíntese de ésteres;
- os compostos reativos são genotóxicos (ou seja, reagem com o DNA e genes em códons específicos, gerando um gene mutante);
- os mesmos compostos também aumentam a taxa de duplicação celular através de mecanismos específicos, introduzindo um gene mutante nas células-filhas;
- alguns agentes quimiopreventivos diminuem a taxa de duplicação de células, permitindo a reparação celular e restaurando a integridade do DNA e genes normais das células;
- outros quimiopreventivos aumentam os níveis de enzimas de fase II (como glucuronosiltransferases ou glutathione transferases), que atuam na eliminação de carcinógenos reativos na forma de metabólitos inativos;
- a microflora intestinal pode quebrar conjugados de enzimas de fase II e o composto n-hidróxi liberado pode ser acetilado, formando um metabólito reativo e genotóxico de DNA, afetando o cólon. O composto liberado pode também entrar no ciclo e metabolismo enteropáticos, ou ser reduzido a amina que também pode ser reabsorvida ou, se formada no trato intestinal inferior, excretada.

3.6 EFEITOS TOXICOLÓGICOS DE EFLUENTES TÊXTEIS

Os ensaios de toxicidade apresentam empregabilidade como parâmetro complementar às análises físico-químicas e microbiológicas do monitoramento de águas residuárias, auxiliando a identificar a contaminação sempre que possível (HIGA, 2008). Os bioensaios (testes de toxicidade com organismos) determinam o efeito deletério de substâncias em culturas de células vivas ou em organismos-teste em função do tempo. Os efeitos podem ser agudos ou crônicos.

A toxicidade aguda define-se por qualquer efeito adverso produzido dentro de um curto período (em geral 24 a 96h) após exposição a uma substância, quer seja em uma única exposição, quer seja em várias dosagens (USEPA, 2017). No caso de organismos aquáticos, os efeitos incluem letalidade e prejuízo da capacidade natatória (AMARAL, 2012).

Por sua vez, a toxicidade crônica se refere aos efeitos deletérios advindos de uma exposição prolongada à substância-teste, podendo abranger parte ou todo o ciclo de vida do organismo-teste (USEPA, 2017; SANTOS et al., 2010). Geralmente as concentrações não são fatais aos organismos, mas seus efeitos afetam as funções biológicas como reprodução e crescimento, bem como outros impactos fisiológicos (USEPA, 2017)

A *Daphnia* é um microcrustáceo planctônico de classe Branchiopoda e ordem Cladocera, conhecida como pulga d'água, comum em águas doces. Seu corpo apresenta uma concha não calcificada conhecida como carapaça, feita de quitina. O comprimento é variável de 0,5 mm a 6 mm. Machos se diferenciam de fêmeas pelo seu tamanho diminuto, maiores antênulas, pós-abdômem modificado e pernas dianteiras armadas com um gancho (BETHESDA, 2005). A Figura 7 ilustra uma representante da espécie *Daphnia magna*.

Figura 7 – Fêmea adulta da espécie *Daphnia magna*

Fonte: Bethesda (2005).

Sua atuação na cadeia alimentar é de consumidor primário entre os metazoários. Reproduz-se por partenogênese, gerando apenas fêmeas, em condições ambientais satisfatórias (LAITANO; MATIAS, 2006; HIGA, 2008). Dentre as vantagens para o uso em bioensaios, incluem-se: é fácil e econômica para cultivo em laboratórios, é relativamente

pequena, apresenta curto ciclo de vida, possui alta fecundidade e reprodução via partenogênese (ADEMA, 1978; KOIVISTO, 1995). Dáfnias já são histórica e rotineiramente usadas em testes de toxicidade e com metodologias padronizadas (VESELA et al., 2006; VERMA, 2008). Além disso, a toxicidade aguda de poluentes aos crustáceos planctônicos é bastante discutida dado que espécies planctônicas formam a base da estrutura ecológica em ambientes aquáticos (SÁNCHEZ-BAYO, 2006).

A *Ceriodaphnia dubia* (Figura 8) é um dafnídeo menor do que a *Daphnia magna* que apresenta um tempo de geração mais curto bastante acessível para cultivo em laboratório. Taxonomicamente, a *Ceriodaphnia* se parece com a *Daphnia*, com exceção de que as primeiras são mais rotundas e não possuem a projeção rostral proeminente típica das últimas. São microcrustáceos também pertencentes à ordem Cladocera que apresentam sensibilidade a uma ampla gama de agentes tóxicos, adequados para testes de toxicidade crônica por serem executáveis em menor tempo - até sete dias, em contraste com os testes crônicos com *Daphnia magna*, que podem levar de 21 a 28 dias para serem concluídos (BERNER, 1986; BURATINI-MENDES, 2002).

Figura 8 – Representante da espécie *Ceriodaphnia dubia*

Fonte: Berner (1986).

O bioensaio de toxicidade aguda para *Daphnia magna* incide na exposição dos indivíduos jovens (6 a 24h de vida) a meios diluídos de uma amostra por um período de 24 a 48h. Posteriormente é verificado o efeito da substância sobre a capacidade natatória (mobilidade) dos organismos-testes. Após suave estímulo, registra-se o número de indivíduos

imóveis em cada solução teste e no controle (HIGA, 2008). Obtém-se o fator de toxicidade para espécies de dáfias (FT_D), correspondente à menor diluição da amostra na qual não houve imobilidade em mais de 10% dos organismos. Esse valor é expresso em números inteiros e corresponde ao fator de diluição da solução-teste (ABNT, 2009). O bioensaio de toxicidade crônica para *Ceriodaphnia dubia* consiste na exposição individual dos organismos jovens (menos de 24h de idade) à amostra ou às diluições da amostra durante um período de sete dias, não ultrapassando o oitavo. O efeito observado é a inibição da reprodução e a sobrevivência dos organismos-teste (ABNT, 2005).

A expressão de Fator de Toxicidade (FT) define a maior concentração da amostra na qual não se observa efeito adverso no organismo-teste, de acordo com as condições de cada método. O valor de FT não é calculável e é expresso pelo fator de diluição correspondente (ABNT, 2005; AMARAL, 2012).

É possível verificar a concentração efetiva que acarreta efeito adverso ou inibição em 50% dos organismos-teste (CE_{50} , IC_{50}). Esta representa a concentração nominal da amostra no início do ensaio que ocasionará o efeito agudo (representado pela imobilidade) a 50% dos organismos-teste durante o tempo de exposição, entre 24 e 96h. Quanto mais baixo o valor de CE_{50} ou IC_{50} , maior a toxicidade (HAMILTON; RUSSO; THURSTON, 1977; USEPA, 2002; HIGA, 2008; ARENZON, PEREIRA NETO, GERBER, 2011).

Efluentes têxteis são fontes importantes de descarte de substâncias tóxicas no ambiente aquático, portanto a investigação toxicológica de corantes azo e aminas aromáticas geradas, presentes nos efluentes da indústria têxtil, pode ser bastante benéfica para estudos posteriores envolvendo o risco para seres aquáticos (primeiros receptores a nível trófico) quanto para seres humanos, que estão em contato com as substâncias na indústria. (WEISBURGER, 2002).

Muito embora análises químicas sejam importantes na caracterização do grau de poluição de uma água residuária, elas não são suficientes para avaliar a toxicidade aos organismos e predizer os possíveis efeitos. Há, portanto, uma importância conjunta desses parâmetros. Estudos realizados em águas residuárias contendo corantes indicaram que testes de toxicidade são uma ferramenta viável no monitoramento de qualidade da água como um todo (VERMA, 2008; SPONZA; ISIK, 2002).

Todavia, é preciso pontuar que é difícil extrapolar os resultados dos bioensaios para outras espécies, comunidades e ecossistemas, pois nem todas as espécies respondem identicamente aos mesmos poluentes, demonstrando sensibilidade variada (VERMA, 2008). Desta forma, sugere-se a comparação dos efeitos deletérios observados nos testes de

toxicidade com os microcrustáceos com outras espécies, tais como mamíferos, a fim de observar as possíveis reações em células que respondem a efeitos adversos de forma semelhante às células humanas.

O uso de alternativas para o emprego de testes em animais vivos é reconhecido e, como recomendação, sugere-se por exemplo o emprego do teste de determinação de citotoxicidade *in vitro* obtido por alterações morfológicas empregando absorção, em células, de corante vermelho neutro de Borenfreund e Puerner (1985) (ROGERO et al., 2003). O ensaio *in vitro* com a leitura espectrofotométrica de absorção de vermelho neutro pelas células vivas, padronizado, contabiliza os danos celulares e determina o número de células remanescentes após o insulto tóxico. O bioensaio é rápido, não-oneroso, sensível e reprodutível, possibilitando ainda a varredura automatizada e rápida da placa de teste em leitores de microplacas (BORENFREUND; PUERNER, 1985).

3.7 CONSIDERAÇÕES

Dado os relatos demonstrados, ambientes anaeróbios são promissores para a redução do corante azo, parte inicial e indispensável para a subsequente degradação dos subprodutos obtidos. Entender como o processo de descoloração ocorre sob condições metanogênicas-sulfetogênicas provê as bases pelas quais o tratamento de efluentes têxteis por rotas biológicas pode acontecer. O emprego de reatores com configuração inovadora, em leito estruturado de poliuretano, pode ser interessante para o tratamento de compostos de difícil biodegradação. Tendo em conta os pontos expostos, o presente projeto propõe o uso de reator anaeróbio de leito estruturado visando à redução das ligações azo presentes no corante em estudo, o Direct Black 22, observando a influência dos íons sulfato no meio. A hipótese abordada é a da degradação eficiente do corante tetra-azo Direct Black 22 a aminas aromáticas, por meio da atuação de uma comunidade complexa de microrganismos e da ação redutora do íon sulfeto, produzido pela redução do íon sulfato presente na constituição do efluente têxtil sintético.

(Esta página foi intencionalmente deixada em branco)

4 MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi instalado no Campus I do Instituto de Ciências Tecnológicas e Exatas, na Universidade Federal do Triângulo Mineiro (ICTE/UFTM). O procedimento analítico foi realizado nos Laboratórios de Saneamento Ambiental, Campus II (Departamento de Engenharia Ambiental – ICTE/UFTM), de Bioquímica e Biofísica e de Farmacologia do Instituto de Ciências Biológicas e Naturais, na supracitada Universidade (Departamento de Bioquímica, Biofísica e Fisiologia – DBBF/ICBN/UFTM). Amostras foram coletadas três vezes por semana para as análises. Para o tratamento estatístico descritivo dos dados, foram utilizados os programas computacionais *Microsoft Office Excel®*, *Statistica10 Statsoft ®* e *OriginPro8®*.

4.1 SISTEMA EXPERIMENTAL

Um reator construído em material acrílico transparente foi utilizado para a execução do experimento. A Figura 9 esquematiza o reator biológico anaeróbio de leito estruturado (RAnLE), cujo fluxo de alimentação foi ascendente. O diâmetro interno do reator era de 8 cm; altura 51 cm, com volume útil aproximado de 3,5 L. O meio suporte foi composto por 7 tiras de espuma de poliuretano para fixação e crescimento da biomassa, verticalmente fixados dentro do reator às extremidades. A porosidade da espuma foi de 98% e a porosidade do leito foi de 99,7%. O reator foi instalado dentro de uma capela, protegida para evitar exposição à luz.

Figura 9 – Esquema de reator anaeróbico com medidas em centímetros (a) 1 – entrada do efluente, 2 – bomba, 3 – zona de biomassa em suspensão, 4 – matriz de imobilização, 5 – saída do efluente, 6 – saída de gás (b) seção horizontal revelando leito estruturado

4.2 OPERAÇÃO DO REATOR

O RAnLE operou com tempo de detenção hidráulica de 24h, com vazão aferida e quando necessário corrigida. A temperatura do sistema operacional foi controlada e mantida na faixa de 30 – 35°C. A partida do reator se deu em um período de 50 dias, com concentração de corante a 0,015 mM (16,25 mg. L⁻¹). Após tal período, verificou-se maior estabilidade na eficiência de remoção dos parâmetros averiguados. O inóculo utilizado para o lodo anaeróbico granular foi proveniente de reator UASB de uma estação de tratamento de efluentes de abatedouro de aves. O método de inoculação baseou-se em Zaiat et al (1994) e consistiu na maceração do lodo em solução aquosa com sua posterior recirculação durante sete dias, de forma a conferir a aderência da biomassa no material suporte. Após este período, a solução aquosa de biomassa foi descartada e foi dado prosseguimento com alimentação do reator por efluente sintético, conforme seção 4.3.

4.3 COMPOSIÇÃO DO EFLUENTE TÊXTIL SINTÉTICO

A composição do efluente sintético se baseou nos estudos de Amorim et al. (2013) e Ferraz Júnior et al. (2011), consistindo de co-substrato, um acceptor final de elétrons, corante, solução macro e micronutriente.

Etanol 99% foi empregado como co-substrato e para o acceptor final de elétrons, utilizou-se Na_2SO_4 , estimulando a ocorrência da sulfetogênese dentro do reator anaeróbio.

A solução estoque de corante Direct Black 22 foi submetida à hidrólise simulando as condições reais do efluente têxtil. A hidrólise consiste no aumento do pH da solução para 11 com solução de NaOH (utilizou-se concentração 10%), seguido por aumento da temperatura com agitação até atingir 80°C. Após alcançar tal temperatura, o procedimento é mantido por 1h. Posteriormente, o aquecimento é desligado e a solução deve atingir a temperatura ambiente. Seu pH deve ser corrigido para 7 com solução de HCl (utilizou-se concentração 6 N) (GAVAZZA et al., 2015). Para a composição do efluente sintético, empregou-se concentração de 0,06 mM, o que corresponde a aproximadamente 65 mg.L⁻¹.

As composições das soluções macro e micronutriente são apresentadas, respectivamente, nas Tabelas 3 e 4.

Tabela 3 – Composição de solução macronutriente

Composto Químico	Concentração (g.L ⁻¹)
NH_4Cl	0,280
K_2HPO_4	0,252
$\text{MgSO}_4.7\text{H}_2\text{O}$	0,100
CaCl_2	0,070
NaHCO_3	0,400

Fonte: Amaral (2015)

Tabela 4 – Composição de solução micronutriente

Composto químico	Concentração (g.L ⁻¹)*
$\text{FeCl}_2.4\text{H}_2\text{O}$	2,000
ZnCl_2	0,050
$\text{MnCl}_2.4\text{H}_2\text{O}$	0,500

(continua)

(conclusão)

NiCl ₂ .6H ₂ O	0,142
NaSeO ₃ .5H ₂ O	0,164
H ₃ BO ₃	0,050
CuCl ₂ .2H ₂ O	0,038
CoCl ₂ .6H ₂ O	2,000
AlCl ₃ .6H ₂ O	0,090
(NH ₄) ₆ .Mo ₇ O ₂₄ .4H ₂ O	0,050
EDTA	1,000
HCl	1,000 ^a

^a Exceto concentração de HCl, cuja unidade é mL.L⁻¹.

Fonte: Amaral (2015)

O efluente foi produzido para totalizar um volume final de 18L sendo constantemente produzido para alimentação do RAnLE, para o qual os volumes e concentrações de seus constituintes são apresentados abaixo (Tabela 5). Uma vez produzido, este era armazenado em geladeira com temperatura de $8 \pm 2^{\circ}\text{C}$.

Tabela 5 – Composição em concentração para 18L de efluente sintético

Componente	Valor	Unidade
Solução macronutriente	300	mL
Solução micronutriente	4,5	mL
Corante	0,06	mM
Bicarbonato de sódio	1000	mg
Na ₂ SO ₄	296	mg
Etanol	1000	mg.DQO.L ⁻¹

4.4 DETERMINAÇÃO ANALÍTICA DOS COMPOSTOS DE INTERESSE PARA MONITORAMENTO DO PROCESSO

Conforme Tabela 6, constam os equipamentos empregados para as análises de monitoramento do sistema operacional.

Tabela 6 – Lista de equipamentos

Equipamento	Modelo e Marca
pHmetro	HI 9321 microprocessor pH meter, Hanna Instruments
Centrífuga	CD 4000, Colidef CZ
Espectrofotômetro	Ultrospec 8000, GE Healthcare Life Sciences
Agitador	BR2000 2D rocker, Benchmark Scientific
Bloco digestor a seco	Dry Block SL – 16/25, SOLAB
Espectrofotômetro	SpectroDirect, Lovibond
Cromatógrafo gasoso	GC-2010, Shimadzu
Espectrômetro de difração de raios-x	Sigma, Zeiss
Microscópio eletrônico de varredura	INSPECT F50, FEI

4.4.1 Temperatura, pH e vazão

A temperatura e o pH foram obtidos por meio de pHmetro. A vazão foi mensurada manualmente com proveta, com tempo de coleta cronometrado e, após cálculos, corrigida. A temperatura foi mantida através de uma faixa aquecedora com controlador por termostato. Tais verificações foram realizadas *in loco*, aonde o RAnLE com fluxo ascendente estava instalado, no Laboratório de Hidrologia do Instituto de Ciências Exatas e Tecnológicas I da Universidade Federal do Triângulo Mineiro.

4.4.2 Concentração de corante

4.4.2.1 Obtenção da curva de concentração do corante e cálculo de concentração

Soluções com diferentes concentrações do corante foram feitas (Figura 10) para serem submetidas à varredura em espectrofotômetro UV-Visível a fim de identificar o comprimento de onda com pico máximo de absorção de luz ($\lambda_{\max}$) e de dispor as absorbâncias obtidas de acordo com a concentração de corante utilizada para obtenção da curva do corante (Figura 11). Após centrifugação e varredura das amostras, o $\lambda_{\max}$ foi identificado em 475 nm,

com absorção máxima para todas as concentrações analisadas de corante. O mesmo pico de detecção para o DB22 foi identificado por Amaral (2015). Em contrapartida, van der Zee, Lettinga e Field (2001) reportaram λ_{max} de 484 nm para o mesmo corante. Variações podem ocorrer em diferentes aparelhos por motivos variados, como por exemplo devido ao grau de pureza do corante.

Figura 10 – Varredura em UV-Visível do corante Direct Black 22 em diferentes concentrações (mM)

Figura 11 – Curva de concentração do corante Direct Black 22

Amostras da entrada e saída do reator anaeróbio de leito estruturado foram coletadas, centrifugadas e posteriormente submetidas à leitura no comprimento de onda de pico, sendo a concentração inicial e final calculadas de acordo com a curva obtida anteriormente.

4.4.2.2 Adsorção de corante na espuma

A fim de determinar a concentração de corante adsorvido na espuma, foram realizados ensaios de verificação do pH ótimo de adsorção e de ensaios de adsorção em si, os quais foram baseados em Silveira Neta (2009). O mecanismo de adsorção foi avaliado de forma a verificar sua contribuição na remoção de cor e o potencial adsorptivo do material, considerando a faixa de pH verificada no reator anaeróbio de leito estruturado, e assim não creditar erroneamente a remoção somente à ação dos microrganismos no meio.

Para a verificação do pH ótimo de adsorção, 0,05g de espuma em soluções com corante (65 mg.L^{-1}) foram acondicionados em tubos Falcon com capacidade para 50 mL de solução de corante, em uma faixa de pH variando de 2 a 9. Os tubos com a solução de corante e a espuma foram mantidos sob agitação por sete dias em um agitador. Após o período do ensaio, a concentração de corante adsorvido na espuma foi calculada através da curva do corante, utilizando um espectrofotômetro.

Para os ensaios de adsorção, as espumas de poliuretano foram utilizadas em bloco, cortadas no formato retangular com 1,0 cm de altura, 1,0 cm de largura e comprimento variável de forma a obter peso 0,2000g. As espumas foram higienizadas com água destilada e mantidas em temperatura ambiente por 24h para secagem, sendo utilizadas logo em seguida. A fim de simular as condições reais observadas, o pH do ensaio foi mantido similar ao pH de entrada do reator, o que não reflete o pH ótimo de adsorção da espuma.

Para o ensaio, seis soluções com variadas concentrações de corante Direct Black 22 foram armazenados em balões volumétricos (100 mL) juntamente com 0,2000g de espuma de poliuretano em bloco. Os balões foram mantidos sob suave agitação em um agitador por sete dias a $30 \pm 5^\circ\text{C}$. As amostras foram retiradas com auxílio de uma pipeta de Pasteur e centrifugadas a $4000\times G$, para posterior leitura em espectrofotômetro na faixa de absorção do corante.

Por meio da absorbância obtida e da curva de concentração do corante, obteve-se a concentração final do corante presente em meio líquido e, por sua vez, a concentração do

soluto adsorvido na espuma de poliuretano pode ser determinada através da Equação 6, que representa um balanço de massa do adsorvato, onde q_e é a quantidade de soluto adsorvido na fase sólida (mg.g^{-1}), C_0 é a concentração de adsorvato inicial (mg.L^{-1}), C_{eq} é a concentração de equilíbrio do adsorvato (mg.L^{-1}), V é o volume da solução (L) e W massa de adsorvente (g).

$$q_e = \frac{(C_0 - C_{eq})V}{W} \quad (\text{Equação 6})$$

Os valores foram ajustados de acordo com as isotermas de Langmuir e Freundlich, conforme Equações 7 e 8, onde C_e é a concentração do adsorvato na solução após o equilíbrio do sistema ser atingido (mg.L^{-1}), Q_{max} é a capacidade máxima de adsorção do material (mg.g^{-1}), K_L é a constante de afinidade de Langmuir (L.mg^{-1}), K_F é a constante de Freundlich característica do sistema e indicadora da capacidade de adsorção e n é a constante de Freundlich, indicadora da intensidade de adsorção (SILVEIRA NETA, 2009). A fim de determinar seus parâmetros, optou-se pela linearização dos dados através de *software Microsoft Office Excel*.

$$q_e = \frac{(Q_{max} \cdot K_L \cdot C_e)}{(1 + K_L \cdot C_e)} \quad (\text{Equação 7})$$

$$q_e = K_F \cdot C_e^{1/n} \quad (\text{Equação 8})$$

Linearizando (7):

$$q_e(1 + K_L \cdot C_e) = Q_{max} K_L \cdot C_e$$

$$(1 + K_L \cdot C_e) = \frac{Q_{max} K_L \cdot C_e}{q_e}$$

$$\frac{1 + K_L \cdot C_e}{Q_{max} K_L \cdot C_e} = \frac{1}{q_e}$$

$$\frac{1}{q_e} = \frac{1}{Q_{max} K_L \cdot C_e} + \frac{K_L \cdot C_e}{Q_{max} K_L \cdot C_e}$$

$$\frac{1}{q_e} = \frac{1}{Q_{max} K_L \cdot C_e} + \frac{1}{Q_{max}} \quad (\text{Equação 9})$$

Linearizando (8):

$$\log q_e = \log K_F + \frac{1}{n} \log C_e \quad (\text{Equação 10})$$

A partir da Equação 7, apresenta-se a constante adimensional comumente conhecida como fator de separação R_L , definida por Webber e Chakkravorti (1974) na Equação 11, onde K_L se refere à constante de Langmuir e C_0 é a concentração inicial do corante na solução (mg.L^{-1}). Observa-se, através de R_L , se a adsorção é mais ou menos favorável. R_L pode ser desfavorável ($R_L > 1$), linear ($R_L = 1$), favorável ($0 < R_L < 1$) ou irreversível ($R_L = 0$). Por sua vez, o valor n da Equação (8) também indica se a isoterma é favorável ($1 < n < 10$) ou desfavorável à adsorção ($n < 1$ ou $n > 10$), nas condições observadas do ensaio (FOO; HAMEED, 2010; SILVEIRA NETA, 2009)

$$R_L = \frac{1}{1 + K_L \cdot C_0} \quad (\text{Equação 11})$$

4.4.3 Demanda química de oxigênio (DQO)

A obtenção de concentração de matéria orgânica pelo método da DQO ($\text{mg O}_2 / \text{L}$) foi realizado conforme estabelecido no método 5220D – Método colorimétrico em refluxo fechado (APHA/AWWA/WEF, 2012), com leitura realizada em espectrofotômetro. A curva de calibração com KHP (biftalato de potássio) em variadas concentrações foi refeita a cada reposição dos reagentes. As amostras de entrada e saída do reator foram previamente centrifugadas a 4000xG para separação de matéria em suspensão e, caso necessário, diluídas para posterior adição dos reagentes (as amostras de saída do reator tiveram conteúdo de H_2S dissolvido removido pela adição de ZnSO_4 , sendo centrifugadas logo em seguida). A digestão do material foi feita em bloco digestor a seco a $150 \pm 2^\circ\text{C}$ por duas horas. Com a obtenção dos dados de DQO e vazão, calculou-se a carga volumétrica aplicada (COV aplicada). Baseado em Godoi, Damianovic e Foresti (2015), a fração de DQO removida pela via sulfetogênica foi calculada pela Equação 12, dado que 0,67g de DQO são oxidados por cada grama de sulfato reduzido (LENS et al., 1988). A fração restante foi atribuída à rota metanogênica e/ou por rota de redução de DB22 como acceptor final de elétrons, conforme a Equação 13:

$$COD_{SO_4^{2-}} (\text{mg. d}^{-1}) = 0,67 \times SO_4^{2-} \text{ removido } (\text{mg. d}^{-1}) \quad (\text{Equação 12})$$

$$COD_{\text{remanescente}} (\text{mg. d}^{-1}) = COD_{\text{removido}} - COD_{SO_4^{2-}} \quad (\text{Equação 13})$$

4.4.4 Espectros de absorbância de aminas aromáticas

Amostras de entrada e saída do reator foram centrifugadas a 4000xG e o sobrenadante foi colhido para ser submetido a varredura em faixa de 200 – 500 nm com leitura realizada em espectrofotômetro para obtenção de espectros de absorbância. As aminas aromáticas foram avaliadas qualitativamente conforme Pinheiro, Touraud e Thomas (2004), por meio de varredura em faixa do UV (200 – 300 nm).

4.4.5 Sulfato e sulfeto

As análises de concentração de sulfato e sulfeto foram realizadas no Laboratório de Saneamento Ambiental do Instituto de Ciências Exatas e Tecnológicas, Unidade II da Universidade Federal do Triângulo Mineiro. Para concentração de sulfato, amostras de entrada e saída foram coletadas, centrifugadas a 4000xG e diluídas para análise de sulfato inicialmente com kit de análises AccuVac Sulfaver (Hach) e posteriormente kit Sulfa Vac (Lovibond). Ambos os métodos são compatíveis para leitura em espectrofotômetro modelo SpectroDirect (Lovibond).

De maneira análoga, para conteúdo de sulfeto, amostras de saída do reator eram coletadas, fixadas com $\text{ZnC}_4\text{H}_6\text{O}_4$ 0,1 M, centrifugadas para análise de sulfeto com kit de análise da Hach e posterior leitura em espectrofotômetro modelo SpectroDirect (Lovibond). Os valores também foram calculados estequiometricamente, dado que 32g de sulfeto são geradas pela redução de 96g de sulfato. Os valores obtidos estequiometricamente foram comparados com os valores obtidos em análise.

4.4.6 Alcalinidade e Ácidos Graxos Voláteis

A alcalinidade parcial, intermediária, total e alcalinidade a bicarbonato foi calculada conforme metodologia de Ripley, Boyle e Converse (1986) através de titulação, com padronização semanal da solução de H_2SO_4 0,05 M utilizando KHP como padrão primário.

Os ácidos voláteis totais foram obtidos de acordo com o método apresentado por Dilallo e Albertson (1961) após fervura e titulação, com padronização semanal da solução de NaOH 0,005 M utilizando tetraborato de sódio deca-hidratado como padrão primário.

Ainda, a identificação dos ácidos na saída do reator e suas respectivas concentrações foram obtidas através de método cromatográfico no Laboratório de Processos Biológicos, na Escola de Engenharia de São Carlos da Universidade de São Paulo. As amostras foram previamente centrifugadas a 4000 xG, armazenadas em *eppendorfs* de 2 mL e congeladas para sua posterior análise. Utilizou-se cromatógrafo gasoso equipado com FID, conforme método do *Headspace* automático desenvolvido e validado por Adorno, Hirasawa e Varesche (2014). A preparação da amostra se deu conforme Tabela 7.

Tabela 7 – Composição para preparação da amostra para análise em cromatografia gasosa

Conteúdo	Quantidade	Unidade
Amostra	2	mL
Isobutanol	70	µL
Ácido crotônico	100	µL
Ácido sulfúrico - 2M	200	µL
NaCl	2	g

4.4.7 Toxicidade

Amostras da água residuária bruta e do efluente tratado foram coletadas em diversos dias, homogeneizadas e enviadas para bioensaio de toxicidade crônica com *Ceriodaphnia dubia* (ABNT NBR 13373/2005) e toxicidade aguda com *Daphnia magna* (ABNT NBR 12713/2009 – teste de inibição de capacidade natatória). Tais bioensaios foram realizados em parceria com o laboratório TECLAB, localizado no estado do Paraná, Brasil.

A determinação de citotoxicidade *in vitro* por alterações morfológicas e absorção em vermelho neutro (BORENFREUND; PUERNER, 1985) foi realizada no laboratório de Farmacologia da Universidade Federal do Triângulo Mineiro com o corante DB22 e o efluente tratado no RAnLE. A descrição do método por Devienne (2000) se encontra no Anexo A. A origem de células utilizada é a McCoy (McCoy B, código BCRJ 0160, linhagem contínua de fibroblastos, provenientes do Instituto Adolfo Lutz) da espécie *Mus musculus*, conhecido como camundongo doméstico. As amostras foram autoclavadas e, no caso do

efluente, liofilizadas e ressuspensas em meio RPMI, conforme Anexo B (DEVIIENNE, 2004) de forma a ficar mais concentrado. As vantagens desse método incluem, conforme os autores, o fato de ser uma alternativa aceitável para averiguação de toxicidade ao invés do uso de animais vivos.

4.4.8 Análise da composição dos precipitados do recipiente coletor de saída e *headspace* do reator e dos cristais presentes no lodo aderido ao material suporte (LM) e ao lodo de fundo (LF)

Amostras de lodo (aderido ao material suporte e do fundo), bem como o conteúdo precipitado no recipiente coletor de saída e o conteúdo encontrado no *headspace* do reator foram coletados, armazenados e enviados ao Laboratório de Microscopia Eletrônica e Análise do Instituto de Física de São Carlos (LMEA/IFSC/USP), para análise química qualitativa de espectroscopia de difração em raios-x para detecção de elementos entre Boro e Urânio, por meio de equipamento com canhão de elétrons por emissão de campo (MEV-FEG).

4.4.9 Análise de morfologia celular

A análise morfológica das células do reator foi realizada por meio de técnica de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV). Para isso, duas amostras de biofilme foram coletadas de diferentes locais do reator: lodo de fundo (LF) e lodo aderido ao material suporte (LM). As amostras de biofilme foram preparadas para a MEV de acordo com procedimento descrito por Murtey e Ramasamy (2016), com modificações. Resumidamente, o pellet (células) foi lavado e mantido por 1 hora em solução de glutaraldeído 2,5% (v/v) preparada em tampão fosfato 0,1 M pH 7,3. Na sequência, o pellet foi lavado e submetido a procedimento de desidratação em série com concentrações crescentes de etanol em água (50-100%).

Após a secagem, as amostras LF e LM foram enviadas ao Laboratório de Microscopia Eletrônica (LME) do Núcleo de Apoio à Pesquisa em Materiais Avançados –

IFSC/SMM. As amostras foram recobertas por platina com espessura de 5-10 mm e analisadas em equipamento MEV-FEG.

4.4.10 Análise de diversidade microbiana

Amostras do lodo de fundo e do lodo aderido à espuma foram recolhidas, lavadas e centrifugadas com tampão salina-fosfato (PBS 1X pH 7,2) três vezes, descartando-se o sobrenadante. Após o procedimento, foram acondicionadas sob refrigeração em freezer -10°C. A extração do DNA foi realizada com kit PowerSoil da MO BIO Laboratories, Inc. As amostras devidamente acondicionadas foram enviadas para sequenciamento metagenômico em plataforma Ion Torrent PGM (Life Technologies) do Biological Research Institute Clemente Estable, em Montevideu, Uruguai, com primers que cobrem a região 16S, v4, 520F (5'-AYTGGGYDTAAAGNG-3') e 802R (5'-TACNNGGGTATCTAATCC-3') (CLAESSON et al., 2009).

As curvas de rarefação e índices de diversidade alfa foram obtidos por meio de software *PAST3*. Foram considerados os seguintes índices, conforme as respectivas características (BUTTURI-GOMES et al., 2017; MELO, 2008; MOREIRA, 2014; MASTRORILLI, 2014):

- Dominância (D): Refere-se à preponderância de uma espécie dentro da amostra.
- Simpson (1-D): Define um valor de variedade de espécies, sendo que quanto maior o valor de 1-D, maior a diversidade de espécies da amostra.
- Shannon (H): Caracteriza uma medida que considera riqueza e uniformidade, considera o número de indivíduos observados para cada espécie na amostra. O valor de H aumenta conforme riqueza e uniformidade aumentam.
- Equitabilidade (J): Estabelece comparação entre o valor obtido de H e a distribuição das espécies encontradas que pode aumentar a variedade.
- Chao 1: Estima a riqueza de espécies. Refere-se a uma estimativa do número absoluto de espécies presentes na comunidade baseando-se no número de espécies raras encontradas na amostra.

4.4.11 Bioensaios em batelada com o lodo extraído

Ao desligamento do reator, foram recolhidas as sete tiras de espuma de poliuretano com biomassa aderida ao material suporte (LM) bem como o conteúdo líquido do lodo de fundo (LF), totalizando 250 mL deste último, em recipientes separados. Os recipientes foram armazenados sob refrigeração. Testou-se, em duplicata, a cinética de remoção de carga orgânica (DQO) de 20 mL de lodo de fundo recolhido em 250 mL de efluente sintético com DB22. As remoções de corante e sulfato também foram avaliadas. Considerando LM, os testes em duplicata avaliaram a cinética de remoção de DQO para 21 cm de espuma com biomassa em 200 mL de efluente sintético com DB22. Este último ensaio refletiu as condições observadas no reator com relação à carga orgânica e biomassa, pela qual a reprodução em batelada foi possível verificando-se a concentração total de sólidos totais voláteis (STV) no reator e a concentração de DQO total do volume útil do reator. Analogamente ao ensaio de LF, remoção de corante e redução de sulfato também foram avaliados. A verificação da quantidade de STV foi realizada em triplicatas por gravimetria e foram extrapoladas para o número de tiras de espuma de poliuretano presentes no reator.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 DQO, CARGA ORGÂNICA VOLUMÉTRICA APLICADA E VIAS DE REMOÇÃO

As Figuras 12 e 13 apontam os resultados monitorados de carga orgânica, representados pela DQO de entrada (afluente), DQO de saída (efluente) e remoção em percentual para o sistema durante 400 dias de tratamento no RAnLE. Valores para DQO encontrados na literatura, comparados com os resultados obtidos pelo presente trabalho, estão apresentados na Tabela 8. A média de DQO da água residuária de entrada foi de 1113 ± 136 mg O₂.L⁻¹, bastante similar à observada em efluente real têxtil, variando em três fases diferentes em 1043 ± 730 ; 1143 ± 478 e 1103 ± 426 mg O₂.L⁻¹, com diversos corantes incluindo o DB22 (AMARAL et al., 2014). A média de carga orgânica volumétrica aplicada (COV, kg.m⁻³.d⁻¹) foi de $1,29 \pm 0,17$ kg.m⁻³.d⁻¹. Após tratamento, o efluente apresentou DQO média de 216 ± 81 mg O₂.L⁻¹. A média de eficiência de remoção verificada foi de $80,28 \pm 6,62\%$. As condições foram controladas, com pH na faixa de neutralidade, temperatura a $30 \pm 5^{\circ}\text{C}$ e alcalinidade corrigida, pela adição de bicarbonato de sódio na proporção de 1g.g⁻¹ DQO.

Méndez-Paz et al. (2005) estudaram a redução de (Acid Orange 7) a 0,08 mM.d⁻¹ em UASB sob diferentes TDHS (79,2h – 9,6h) e COVs (1,3 e 7,7 kg.m⁻³.d⁻¹). As médias de remoção de DQO variaram entre 77 e 95%, respectivamente, para cada TDH. Para COV de 1,3 kg.m⁻³.d⁻¹, a remoção observada foi de 96%, enquanto para COV de 7,7 kg.m⁻³.d⁻¹, houve queda para 92%. Ainda que a diminuição nas remoções médias tenha sido pequena, pressupõe-se que ao aumentar a COV aplicada, obtêm-se menor eficiência de remoção de corante e DQO, a não ser que o reator esteja adaptado a grandes variações de COV aplicada e do corante em solução, conforme observado em Spagni et al. (2012).

A COV aplicada no presente trabalho foi relativamente próxima à observada por Amaral et al. (2014) para o reator UASB na primeira fase de tratamento de efluentes têxteis reais (1,84 kg.m⁻³.d⁻¹). Os autores aplicaram ainda duas COVs diferentes nas duas fases seguintes (2,42 para F2 e 2,7 kg.m⁻³.d⁻¹ para F3). As características do trabalho foram apresentadas na Tabela 8. Os autores apontam que as flutuações observadas entre as fases refletem as variações na composição do efluente têxtil real tratado e que também se deram ao baixo coeficiente de rendimento celular. Os autores verificaram que não houve diferença

estatística no desempenho de remoção de carga orgânica (DQO) durante as duas primeiras fases, as quais apresentavam mesmo TDH (12h).

Figura 12 – Variação de Demanda Química de Oxigênio ($\text{mg. O}_2\text{.L}^{-1}$) durante 400 dias de tratamento

Figura 13 – Box Plot da variação de Demanda Química de Oxigênio ($\text{mg. O}_2\text{.L}^{-1}$) para entrada e saída do RAnLE

Tabela 8 – Valores para remoção de DQO para tratamento anaeróbio de efluentes têxteis encontrado na literatura, considerando apenas a parte **anaeróbia** do sistema

DQO média afluente (mg. O ₂ .L ⁻¹)	DQO média efluente (mg. O ₂ .L ⁻¹)	Maior remoção	Menor remoção	Remoção média	Corante	Reator	Fonte	Observação
1113 ± 136	216 ± 81	92,90%	50,61%	80,28 ± 6,62%	Direct Black 22	Reator anaeróbio de leito estruturado	A autora	TDH 24 h, 200 mg.SO ₄ ²⁻ .L ⁻¹ e etanol Efluente têxtil sintético Resultados após partida do reator
1043 ± 730	-	-	-	40%	Diversos compostos azo solúveis em água (incluindo o Direct Black 22)	UASB	Amaral et al., 2014	Fase 1: TDH 12h
1143 ± 478	-	-	-	43%				Fase 2: TDH 12h
1103 ± 426	-	-	-	34%				Fase 3: TDH 8h Efluente têxtil real, sem adição de co-substrato. Salinidade (4.4) Sulfatos (>300 mg.L ⁻¹)
608 ± 37	-	-	-	70% (reator A) 59% (reator B)	Remazol Red	UASB	Punzi et al. (2015)	Reatores A e B iguais
								B apresentou alteração no TDH
								Efluente têxtil simulado, amido (465 mg.L ⁻¹). Fosfato (35,6 e 145 mg.L ⁻¹ , respectivamente) NaCl (0,3 a 1 g.L ⁻¹)
6750	-	95%	10%	90-95%	Reactive Orange 16	Biorreator anaeróbio de membrana submersa	Spagni et al. (2012)	TDH: 2,5 dias. Fase de período de adaptação do lodo
				50-65%				TDH: 2,5 dias. Fase final do experimento (a partir do 120º dia até o 150º dia) Efluente têxtil sintético, sacarose (6,75 g.O ₂ .L ⁻¹)

(continua)

(continuação)

DQO média afluente (mg. O ₂ .L ⁻¹)	DQO média efluente (mg. O ₂ .L ⁻¹)	Maior remoção	Menor remoção	Remoção média	Corante	Reator	Fonte	Observação
-	-	-	-	83,07 ± 0,52%	Acid Red 18	Reator anaeróbio sequencial	Koupaie et al. (2012)	100 mg.L ⁻¹ de corante
-	-	-	-	81,59 ± 0,34				500 mg.L ⁻¹ de corante
-	-	-	-	81,76 ± 0,69				1000 mg.L ⁻¹ de corante Efluente têxtil sintético Glicose e lactose (1500 mg.L ⁻¹ cada)
800	-	-	-	59%	Diversos	UASB	Ferraz Júnior et al., 2011	Fase 1: TDH 24h
				50%				Fase 2: TDH 16h
				48%				Fase 3: TDH 12h Efluente têxtil real, sem adição de co-substrato
1000	239 ± 50 (sobrenadante) e 207 ± 54 (permeato)	-	-	76% (sobrenadante) e 80 (permeato)	Remazol Brilliant Violet 5R	Biorreator anaeróbio sulfetogênico de membrana	Yurtsever et al. (2016)	Fase 1: 500 mg.SO ₄ ²⁻ .L ⁻¹ . TDH 1,75-2 dias
1000								Fase 2: 1000 mg.SO ₄ ²⁻ .L ⁻¹ . TDH 1,75-2 dias
1000								Fase 3: 1500 mg. SO ₄ ²⁻ .L ⁻¹ . TDH 1,75-2 dias
2000	635 ± 126 sobrenadante e 328 ± 115 permeato	-	-	68% (sobrenadante) e 84% (permeato)				Fase 4: 1000 mg.SO ₄ ²⁻ .L ⁻¹ . TDH 1,75-2 dias, Efluente têxtil sintético, glicose
-	464,5							TDH: 24h
-	863,9							TDH: 12h Efluente têxtil sintético, co-substrato não identificado

(continua)

A máxima remoção de DQO se deu após o 334º dia, com 92,9%, em contraste com Spagni et al. (2012), cujas remoções mais eficientes ocorreram no período de adaptação do lodo com o corante Reactive Orange 16. Tal diferença explica-se pelo fato do reator dos referidos autores já estar em operação anteriormente e adaptado para cargas orgânicas volumétricas mais altas, embora não houvesse qualquer adição de corante nessa primeira instância. Entretanto, perto da fase final do experimento, Spagni et al. (2012) relataram uma queda de eficiência, justificado pelo acúmulo de metabólitos tóxicos aromáticos advindos da redução do corante, que inibiram a microbiota. O reator do presente experimento operou ininterruptamente por 400 dias, sem necessidade de pausas para recuperação da microbiota.

As eficiências de remoção de matéria orgânica, quantificada como DQO por Amaral et al. (2014) e Punzi et al. (2015) foram de 43% e 59-70%, respectivamente. Os autores de ambos os trabalhos creditam as baixas eficiências dos sistemas à presença de elevadas concentrações de NaCl na água residuária. No caso de Amaral et al. (2014), a falta de adição de um co-substrato (apesar da presença de amido advindo da fase de desengomagem), a alta concentração de sulfatos (Tabela 8) e as variações de composição da água residuária têxtil real também colaboraram para a baixa remoção. A variabilidade dos corantes, de seu peso molecular, bem como de seus produtos de degradação podem causar respostas mais adversas pela microbiota devido à toxicidade (SILVA et al., 2012). No trabalho de Punzi et al. (2015), os autores afirmam que a DQO residual foi composta pelos metabólitos do amido (doador de elétrons) e pelo corante tratado (Remazol Red).

Koupaie et al. (2012) obtiveram remoções de cerca de 80% para reatores sequenciais em batelada, em três sistemas anaeróbio-aeróbio adaptados em 30 dias. Os autores afirmam que a taxa de remoção de DQO foi maior para o sistema com maior concentração de corante (1000 mg.L^{-1} , Acid Red 18), o qual apresentou remoção de $81,76 \pm 0,69\%$. Pelo estudo, os autores concluíram que a maior parte da DQO é removida no estágio anaeróbio, o que é desejável em sistemas anaeróbio-aeróbio, a fim de recuperar energia na forma de biogás, reduzir a produção de biomassa e minimizar os custos de aeração no estágio subsequente. Já estudos em efluentes reais de lavanderias de jeans em experimento piloto resultaram em remoção mínima de 69 e máxima de 77% de carga orgânica, para sistema UASB seguido de biofiltração submersa aerada. A fase aeróbia do sistema complementou a remoção de DQO do UASB, que variou de 48 a 59% (FERRAZ JÚNIOR et al., 2011).

Uma faixa de remoção entre 80 e 84% foi obtida por Yurtsever et al. (2016) para água residuária têxtil sintética em biorreator sulfetogênico de membrana, com TDH variando

de 36 a 48h, com DQO variando de 1000 a 2000 mg.O₂.L⁻¹, SO₄⁻² de 500 a 1000 mg.L⁻¹ e NaCl de 500 a 1000 mg.L⁻¹.

Em contrapartida, resultados antagônicos de remoção de DQO no estágio anaeróbio também são encontrados na literatura. Águas residuárias com o corante Reactive Black 5 tiveram baixa remoção de DQO (28,1%) quando comparado à água residuária com corante Congo Red (60%) (SILVA et al., 2012). Os autores apontam que o último suprime quase totalmente a atividade metanogênica e sulfetogênica quando parcialmente hidrolisado, enquanto que a supracitada ação não ocorreu com o corante totalmente hidrolisado. Assim, no caso do presente estudo, observa-se que a microbiota em leito anaeróbio estruturado conseguiu se adaptar ao corante DB22, mas poderia não ser aplicável no caso de outros corantes.

O efeito inibitório dos corantes na remoção de DQO pela microbiota foi observado por Seshadri, Bishop e Agha (1994). Os autores compararam a remoção de DQO de águas residuárias têxteis sintéticas (DQO 165-185 mg.L⁻¹), cada uma com um corante diferente (Acid Orange 7, 8 e 10) em variadas concentrações. Para os corantes Acid Orange 7 e 10 não houve alteração na eficiência de remoção de DQO, independente da concentração de corante no meio. Porém, houve redução de remoção da DQO para a água residuária com o corante Acid Orange 8 conforme a sua concentração no meio aumentava. Sugere-se que características estruturais no corante podem dificultar a remoção de DQO do efluente têxtil. Ainda, nem sempre um aumento de concentração de corante no meio afetará negativamente o desempenho do reator na degradação da carga orgânica.

Baêta et al. (2015) operaram reatores à temperatura de 35°C, pH entre 6,5 e 7,5 e TDH de 24h. Os autores observaram remoções de carga orgânica de até 83% para reator anaeróbio operando com 4g.L⁻¹ de carvão ativado em pó junto a efluente contendo extrato de levedura (mediador redox e fonte de carbono), solução macro e micronutriente e corante Remazol Golden Yellow RNL (50 mg.L⁻¹). A presença de carvão ativado em pó contribuiu para uma boa remoção ao adsorver componentes tóxicos inibitórios no meio, como as aminas aromáticas ou ácidos graxos voláteis em excesso. Tal substância também pode adsorver o corante. O reator anaeróbio de controle de Baêta et al. (2015) operava sob as mesmas condições porém sem a adição de carvão ativado em pó. Ainda assim, a eficiência do reator controle para remoção de DQO foi de 68,2%. Valores referentes à remoção via adsorção de aminas aromáticas, corante, ácidos graxos voláteis ou outros compostos pelo carvão ativado em pó não foram discriminados.

As variáveis de operação de Baêta et al. (2015) são similares às do presente estudo, no entanto o RanLE apresenta melhor eficiência de remoção do que apresentou o reator de controle dos autores supracitados (Tabela 8). Uma provável explicação para isso recai no uso do meio suporte para fixação da biomassa, contribuindo para a remoção de DQO observada, já que microbiotas fixas são mais resistentes a meios recalcitrantes. O reator de Baêta et al. (2015) não apresentava meio suporte para a aderência de microrganismos.

A Figura 14 apresenta a remoção de DQO pelas rotas de sulfetogênese e metanogênese + redução de DB 22 como acceptor final, estimada pelas Equações 12 e 13. Teoricamente, os valores de DQO aplicados ao reator são suficientes para promover a sulfetogênese e a metanogênese no presente experimento. Considerando que 0,67g de O_2 são necessários para promover a redução de 1g de SO_4^{2-} , há DQO por litro de efluente suficiente para reduzir até 1,6 g de SO_4^{2-} . Consequentemente, cerca de 933 mg de O_2 estavam disponibilizados para a metanogênese, eliminando a DQO residual dos ácidos e contribuindo também para a redução do corante.

Em média, $13,87 \pm 3,24\%$ da DQO removida ocorreram pela via sulfetogênica, enquanto que $86,13 \pm 3,24\%$ da DQO se deu por via metanogênica e/ou utilizando DB22 como acceptor final de elétrons. A literatura aponta resultados benéficos em termos de remoção de DQO quando há uma associação entre arqueias metanogênicas e BRS (VILELA et al., 2014; GODOI; DAMIANOVIC; FORESTI, 2015). As BRS podem oxidar parcialmente os ácidos graxos voláteis produzidos na acidogênese e as arqueias metanogênicas acetoclásticas utilizam o acetato gerado como substrato (DAMIANOVIC; FORESTI, 2009). Além disso, a literatura aponta que em reatores sulfetogênicos, as BRS podem consumir propionato de forma mais eficiente do que os outros microrganismos (BARRERA et al., 2014), o que poderia impedir o acúmulo de ácidos no meio, reduzindo as chances de o reator apresentar falhas e gargalos nas rotas de degradação.

Figura 14 – Perfil de remoção de DQO por rota biológica: sulfetogênica e metanogênica e/ou com DB22 comoceptor final

Considerando o exposto (Tabela 8 e Figura 13), observa-se que o RAnLE foi capaz de remover de maneira eficiente a maior parte da carga orgânica do afluente têxtil sintético (cerca de 80%) por via sulfetogênica, metanogênica e/ou com DB22 comoceptor final associadas.

5.2 SULFATO E SULFETO

A concentração média de sulfato no afluente do reator foi de $217 \pm 13 \text{ mg.L}^{-1}$ (Figura 15) caracterizando uma relação média DQO/sulfato de 5 e indica não haver aparente limitação de carbono para a remoção de sulfato no meio, dado $\text{DQO/sulfato} > 0,67$.

No presente estudo, a DQO média empregada para a remoção total de sulfato presente na água residuária (média de 217 mg) seria, por litro, de 145 mg O_2 , restando ainda uma DQO de entrada de 968 mg $\text{O}_2.\text{L}^{-1}$. Desta forma, a quantidade de carbono orgânico disponibilizado teoricamente não seria um fator limitante para a redução total do íon sulfato.

Considerada a relação DQO/sulfato, a remoção adicional de matéria orgânica só pode ser alcançada caso a metanogênese também ocorra. Presumindo-se que a toxicidade no meio não seja alta, a metanogênese não é inibida. Choi e Rim (1991) apontam que para

DQO/sulfato maior que 2,8 as arqueias metanogênicas prevalecem sobre as BRS. Entretanto, uma associação entre os dois tipos de microrganismos não é prejudicial para o meio. Godoi, Damianovic e Foresti (2015) aplicaram uma razão DQO/sulfato de 5 em seu experimento e observaram uma contribuição positiva para remoção de matéria orgânica e maior produção de metano, sem prejudicar a remoção de sulfato.

A concentração média de sulfato na saída do reator foi de $46 \pm 9 \text{ mg.L}^{-1}$ (Figura 15), gerando eficiência média de remoção de $78,66 \pm 4,04\%$. A eficiência de remoção de sulfato foi em geral superior a 70%, com exceção do período de adaptação do lodo, em que a biomassa sulfetogênica foi desenvolvida a partir de lodo de reator metanogênico. A Figura 16 apresenta a distribuição temporal de remoção de sulfato durante o período do experimento, bem como a sua concentração no afluente e efluente.

Figura 15 – Box Plot da variação de sulfato ($\text{mg SO}_4^{2-} \cdot \text{L}^{-1}$)

Figura 16 – Variação da concentração de sulfato ($\text{mg SO}_4^{2-}\cdot\text{L}^{-1}$) durante 400 dias de tratamento

Ozdemir et al. (2013) avaliaram o desempenho de um reator sulfetogênico na remoção de corante Remazol Brilliant Violet 5R (Reactive Violet 5) em 8 condições diferentes, variando a concentração de co-substrato (etanol, 1340 e 1600 $\text{mg.O}_2\cdot\text{L}^{-1}$), a concentração de corante (20, 50, 100 e 200 mg.L^{-1}) e a relação DQO/sulfato (0,67 e 0,8). A concentração de sulfato foi mantida constante (2000 mg.L^{-1}) em todas as condições operacionais. Os autores observaram que, no ambiente sulfetogênico com razão DQO/sulfato de 0,67 e 200 mg.L^{-1} de corante sulfonado azo Reactive Violet 5, a eficiência de remoção de sulfato diminuiu (de 83 para 80%) e a de DQO aumentou (de 85 para 87%), quando comparado à condição anterior (que apresentava 100 mg.L^{-1} de corante no meio). Assim, com a presença de outro aceptor final de elétrons, houve divisão na transferência de elétrons para o corante azo. Os autores também apontam que a redução do corante sulfonado pode ter liberado íons sulfato no meio. Para verificar a influência da disponibilidade de DQO na redução de sulfato, os autores aumentaram a relação DQO/sulfato para 0,8, o que beneficiou a rota sulfetogênica (eficiência de remoção de 91%). A eficiência de remoção de DQO, por sua vez, permaneceu relativamente estável (89%).

A eficiência de remoção de sulfato do presente trabalho (aproximadamente 78%) deveria ser potencialmente maior, porém a diferença observada entre o presente trabalho e as

eficiências da literatura apresentada pode ter sido causada pela competição entre os aceptores finais sulfato e DB22 pelos elétrons disponíveis.

Amorim et al. (2013) estudaram o comportamento da redução do corante DB22 utilizando sacarose ou etanol como doador de elétrons e riboflavina e lawsone, em efluentes sintéticos (com adição de sulfato) e reais (com sulfato já presente em composição), gerando 14 combinações diferentes de ensaios. O efluente real apresentou velocidade de remoção de corante maior na ausência de mediadores redox. A DQO foi removida com mais eficiência com etanol como doador de elétrons e riboflavina como mediador redox. Quando o etanol foi empregado como doador de elétrons, o sulfato foi removido em um intervalo menor do que o corante e a DQO (42h para sulfato, 264h para cor e DQO). Assim, a taxa de remoção de corante não foi alterada pela depleção de sulfato no meio. A remoção de 68% sulfato na presença de sacarose aconteceu em 10h, porém, após 31h de experimento, altas concentrações foram detectadas nas triplicatas. Segundo os autores, a ressurgência do sulfato aconteceu no momento da remoção máxima de cor, cerca de 36h. Os autores atribuíram o efeito à dessulfonação das estruturas das aminas aromáticas, ocorrida durante a clivagem da molécula do DB22. A transferência dos grupos sulfônicos presentes no corante formaria $17,3 \text{ mg.L}^{-1}$ de sulfato, que foi compatível com o valor encontrado pelos autores ($18,63 \text{ mg.L}^{-1}$). O fenômeno só foi observado quando a sacarose era a doadora de elétrons, e os autores supuseram que sua metabolização gerou e disponibilizou oxigênio. No caso do etanol, ocorre geralmente a formação do acetato e hidrogênio, não havendo a disponibilização da espécie oxidativa. Desta forma, infere-se no presente estudo que o fenômeno de dessulfonação pode não ter ocorrido e que o sulfato presente no efluente após o tratamento seja oriundo do Na_2SO_4 adicionado. Amorim et al. (2013) afirmam que o sulfato presente não afetou a remoção do corante.

Comparando-se os resultados de Amorim et al. (2013) para remoção de sulfato nos ensaios sem a presença de mediadores redox, os valores obtidos pelo presente trabalho foram maiores (68% contra aproximadamente 79%). Os autores observaram que os mediadores redox não causaram efeito no efluente têxtil real.

Observou-se a formação de precipitado durante todo o decorrer do experimento, na saída do reator e em seu *headspace* (Figuras 17 e 18). Foi possível recolher 4,43g desse composto (peso seco). Amostras foram enviadas para identificação de seus compostos, conforme descrito na seção 4.4.8. Os resultados obtidos estão apresentados nas Figuras 19 a 22, representando as eletromicrografias e os principais compostos de composição encontrados.

Figura 17 – Precipitado formado no recipiente coletor (PRC) presente na saída do reator

Figura 18 – Formação de precipitados no *headspace* do reator (PHR), acumulado durante o período integral de operação

Figura 19 – Eletromicrografia do precipitado do recipiente coletor na saída do reator (PCR). (a) panorâmica da amostra. (b) identificação de seus compostos

Figura 20 – Eletromicrografia do precipitado do recipiente coletor na saída do reator (PCR). (a) análise pontual de A e B. (b) identificação de seus compostos

Figura 21 – Eletromicrografia do composto precipitado presente no *headspace* do reator (PHR). (a) análise pontual de 1 e 2. (b) identificação de seus compostos

Figura 22 – Eletromicrografia do composto precipitado presente no *headspace* do reator (PRH). (a) panorâmica da amostra. (b) identificação

de seus compostos

Conforme as Figuras 19 e 20, o precipitado presente na saída do reator apresentou conteúdo de compostos de enxofre associado com oxigênio, conforme análises pontuais em A e B. Amaral (2015) também observou a formação de precipitado no interior de reatores sulfetogênicos tratando corante DB22 (tanto no de controle quanto o microareado), cuja determinação por fluorescência de raios X apontou a presença de sulfetos de metal. Destaca-se que as análises apresentadas pelas Figuras 19 a 22 fornecem informação qualitativa, ou seja, no ponto amostrado houve a verificação da presença de enxofre, o que não exclui outros compostos na amostra como um todo. O carbono apontado pelos espectros é referente à preparação da amostra para visualização da imagem, sendo apenas o revestimento. As Figuras 21 e 22 também apontam para a presença de oxigênio e enxofre presentes no precipitado existente no *headspace* do reator. Após a redução de sulfato a sulfeto, este pode ser oxidado a enxofre elementar (S^0), insolúvel, em ambientes microaerados, e removido das correntes líquidas e gasosas (SILVA, 2011; LENS et al., 1988).

A Figura 23 mostra o sulfeto produzido por sulfato reduzido, de acordo com dois fatores: um foi calculado estequiometricamente e o outro foi obtido em análise. Considerando que foi disponibilizado em afluente, em média, $217 \text{ mg. SO}_4^{2-} \cdot \text{L}^{-1}$ haveria possibilidade para geração de até $72 \text{ mg. S}^{2-} \cdot \text{L}^{-1}$ (consumo de cerca de 145 mg. O_2).

Observa-se grande diferença entre o sulfeto calculado e o obtido em análise, a verificar pela média dos valores de $57 \pm 5 \text{ mg. L}^{-1}$, para redução média calculada estequiometricamente e aproximadamente $2 \pm 1 \text{ mg. L}^{-1}$ de sulfeto observado em análise. Para um pH final próximo de 8, a maior parte do sulfeto produzido pelas BRS está na forma de HS^- (sulfeto iônico monoácido, conforme Figura 5). Ainda, de acordo com as variações para mais ou para menos, uma fração pode estar em forma de H_2S (sulfeto de hidrogênio), que se desprende para o meio gasoso do reator. Além disso, a diferença entre o valor calculado estequiometricamente e o valor obtido em análise pode ser explicado devido ao efeito redutor do sulfeto dissolvido no corante azo, fato conhecido pela literatura (CERVANTES et al., 2007; AMORIM et al., 2013; ALBUQUERQUE et al., 2005). Amaral (2015) operou dois reatores (R1 e R2) sendo o primeiro um UASB convencional e o segundo um UASB com microaeração. Para concentrações de sulfato de 90 ± 16 , 97 ± 10 e $400 \pm 99 \text{ mg. L}^{-1}$, foram obtidos em forma de sulfeto para R1 30 ± 5 , 19 ± 2 e $37 \pm 2 \text{ mg. L}^{-1}$, respectivamente. Para R2, foram obtidos 32 ± 4 , 19 ± 4 e $30 \pm 1 \text{ mg. L}^{-1}$. A partir da relação entre sulfato removido e sulfeto estequiométrico e sulfeto obtido em solução, bem como o percentual provável da especiação do sulfeto, é apresentado na Figura 24 os valores médios possíveis relacionados à rota do sulfeto no afluente (desprendido em forma de H_2S , oxidado pela ação redutora do

corante DB22 ou do oxigênio e o remanescente em solução). Assim, tem-se que aproximadamente 3% do sulfeto total está em solução no efluente tratado, 10% se encontra em forma de gás e cerca de 87% precipitou em cristais inorgânicos (precipitados metálicos) ou em forma de enxofre elementar (por meio da ação do oxigênio ou por redução do corante DB22).

Figura 23 – Perfil de produção de sulfeto por sulfato reduzido durante 400 dias de tratamento

Figura 24 – Balanço de massa das espécies de sulfeto, de acordo com a rota metabólica

Portanto, considera-se que a remoção de sulfato pelo RAnLE foi satisfatória, tendo em conta a disponibilidade de outro aceptor final de elétrons na forma do corante DB22. A produção de sulfeto foi baixa comparada à calculada estequiometricamente e foi atribuída à especiação do sulfeto (liberado em gás por equilíbrio) devido ao pH (Figura 5), à precipitação de metais de sulfeto, à oxidação incompleta do enxofre e à redução do corante DB22 via oxidação do sulfeto.

5.3 ÁCIDOS GRAXOS VOLÁTEIS, ALCALINIDADE E pH

As médias de ácidos graxos voláteis (AGV), alcalinidades, AI/AP, temperatura e pH estão apresentadas na Tabela 9. Houve produção de AGV ($121 \pm 34 \text{ mg.L}^{-1}$) e também aumento de alcalinidade, característica dos processos sulfetogênicos – além do sulfeto, a alcalinidade é produzida como um resultado da redução de sulfato em conjunto com a oxidação do carbono orgânico, que proporcionam liberação e dissolução de CO_2 e HCO_3^- no meio (SAHINKAYA et al., 2011). Adicionalmente, a produção de aminas aromáticas contribui para o aumento da alcalinidade, dado que as aminas atuam como bases de Lewis por meio dos pares de elétrons não ligantes nos átomos de nitrogênio e enxofre. Aminas relativamente simples já foram reportadas há algum tempo na literatura por possuírem alta basicidade (ALDER et al., 1968; ALDER et al., 1978). Algumas aminas aromáticas por apresentarem basicidade excepcional foram denominadas esponjas de prótons. Como exemplo, verifica-se a anilina e 1,8-diaminonaftaleno, que possuem basicidade típica de uma amina aromática ($\text{pK}_a \approx 4,6$), o 1,8-bis(dimetilamino) naftaleno apresenta uma basicidade dez milhões de vezes maior ($\text{pK}_a \approx 12,1$) do que a N,N-dimetilanilina ($\text{pK}_a \approx 5,1$) (RODRIGUES, 2000).

Conforme Ripley, Boyle e Converse (1986), a alcalinidade intermediária (AI), causada pelo efeito dos ácidos graxos voláteis no meio, e a alcalinidade parcial (AP) estabelecem importante relação entre produção e consumo de ácidos orgânicos para monitoramento de possíveis problemas durante o tratamento anaeróbio de efluentes. Alterações na relação indicam distúrbios na digestão anaeróbia, enquanto que estabilidade e valores baixos da relação apontam boa capacidade tamponante do sistema. Os valores médios encontrados para o efluente (Tabela 9) indicam que não houve problemas para a biomassa em

empregar os ácidos presentes como substrato e houve em geral equilíbrio no sistema do RanLE para o uso dos ácidos gerados e a alcalinidade consumida e produzida.

Tabela 9 – Valores médios para os parâmetros físico-químicos

	Unidade	Afluente do RanLE	Efluente do RanLE
Temperatura	°C	8 ± 2	30 ± 5
Ácidos graxos voláteis	mg HAc. L ⁻¹	-	121 ± 34
pH	-	$7,74 \pm 0,13$	$8 \pm 0,15$
Alcalinidade parcial	mg CaCO ₃ . L ⁻¹	421 ± 111	445 ± 159
Alcalinidade total	mg CaCO ₃ . L ⁻¹	476 ± 127	518 ± 127
Alcalinidade a bicarbonato	mg CaCO ₃ . L ⁻¹	-	427 ± 130
AI/AP	-	-	$0,18 \pm 0,1$

Os ácidos orgânicos mais frequentes no efluente do RanLE foram o ácido acético (95 ± 17 mg. L⁻¹) e o propiônico (4 ± 2 mg. L⁻¹), cujo valor diminuto indica não haver acumulação. Em raros momentos, foram detectados n-Butanol, ácido isobutírico e ácido isovalérico. A maior presença de ácido acético demonstra ação das bactérias acetogênicas na degradação do etanol, fato observado também por Amaral et al. (2014). Além disso, as BRS atuam principalmente como oxidadoras incompletas, excretando acetato como produto final do metabolismo, atuando como acetogênicas.

Ainda que o pH do afluente fosse controlado para que estivesse sempre próximo de 7, o pH inicial médio esteve próximo de 7,74. Segundo Silva (2016) o DB22 possui grupos com pares de elétrons não compartilhados, os quais se comportam como bases de Lewis, proporcionando um valor de pH inicial ligeiramente maior.

Ozdemir et al. (2013) observaram que o pH do efluente do reator anaeróbio sulfetogênico com chicanas esteve próximo de 8,0 a 8,2 durante todo o período de operação do mesmo, ainda que o pH de entrada fosse ajustado para valores de até 6,8, refletindo na produção de alcalinidade advinda da redução do sulfato. Inicialmente, os valores obtidos de alcalinidade pelos autores foram baixos, aumentando gradativamente com o aumento na redução de sulfato.

Spagni et al. (2012) relataram que, mesmo com aumento da disponibilidade de AGV, os valores de pH nunca estiveram menores do que 6,6. Neste experimento, em dois momentos o pH diminuiu para valores entre 6 e 5. Isto foi causado por problemas na manutenção da bomba de alimentação do reator, provocando alteração da vazão e sobrecarregando o sistema

com AGV. Após a correção do problema da bomba e consequentemente da manutenção da vazão, o pH foi restabelecido bem como a concentração de AGV. Não houve prejuízo do sistema como um todo, dado a diminuição dos valores de AGV e reestabelecimento da alcalinidade, bem como os valores menores médios menores que 0,3 de AI/AP.

Spagni et al. (2012) observaram aumento na concentração de AGV quando a concentração de corante Reactive Orange 16 (RO 16) aumentou, embora sempre fosse menor do que as relatadas no período de adaptação do lodo, com concentração de RO 16 em 60 mg.L⁻¹. O aumento da concentração do corante sobrecarregou a biomassa da membrana do reator, gerando um aumento na concentração de AGV e diminuindo a eficiência de remoção de COV, que de 94-95% passou a ser de 10%. Foi constatado que a comunidade metanogênica do reator anaeróbio de membrana submersa foi afetada com o aumento da concentração de RO 16, pois a produção de metano foi inibida em até 80% quando a maior concentração de corante estava empregada (3,2 g.L⁻¹).

Considerando os valores obtidos (Tabela 9), houve equilíbrio na produção e consumo de alcalinidade, com valores baixos de AGV, indicando que houve boa adequação da biomassa às características recalcitrantes do efluente. O pH se manteve levemente alcalino, atribuído à atividade das BRS.

5.4 REMOÇÃO DE COR POR REDUÇÃO DO CORANTE E FORMAÇÃO DE AMINAS AROMÁTICAS

5.4.1 Isotermas de adsorção do corante Direct Black 22 ao meio suporte de espuma de poliuretano

Sabe-se que o pH pode influenciar a adsorção (YAGUB et al., 2014). Para verificar essa influência e observar se o pH apresentado pelo RAnLE propiciou melhor desempenho no processo adsorptivo do corante DB22 à espuma de poliuretano, procedeu-se à realização de ensaio de influência do pH na adsorção. Os resultados estão apresentados na Figura 25. No pH 2, observou-se polimerização do corante DB22, assim não foi possível determinar o valor removido por adsorção. O potencial adsorptivo do meio suporte cresce conforme o pH aumenta até 6, decrescendo em seguida, indicando que em meios neutros e alcalinos o

material suporte não atua em sua mais alta capacidade de adsorção, não interferindo de forma significativa na remoção de corante do meio líquido. Na literatura, comportamento semelhante foi observado com o corante Direct Red 80, pelo qual abaixo do pH 4 teve sua adsorção em espuma de poliuretano menos favorecida devido à protonação de grupamentos do corante, gerando cargas positivas na molécula, causando repulsão ao adsorvente que também se encontrava com a superfície positiva (SILVEIRA NETA, 2009).

Figura 25 – Variação da adsorção do corante Direct Black 22 por espuma de poliuretano, em bloco, em variação do pH de 2 a 9

Dado o pH obtido no efluente de entrada do reator pelas experimentações, optou-se por realizar os cálculos das isotermas de adsorção nas mesmas condições operacionais do reator e não no pH ideal para adsorção no material suporte, a fim de encontrar a real influência exercida pela espuma de poliuretano na remoção do corante DB22. Desta forma, os ensaios foram realizados com pH 7,7. Os dados obtidos são apresentados na Figura 26.

Figura 26 – Isoterma de adsorção do corante Direct Black 22 no meio suporte de espuma de poliuretano em pH 7,7

O ajuste às isotermas se deu via linearização das Equações 7 e 8, sendo os parâmetros obtidos e o valor de R^2 apresentados conforme Tabela 10. Substituindo os valores nas equações de ambos os modelos, temos as Equações 14 e 15, sendo respectivamente os ajustes para a adsorção do corante DB22 em espuma de poliuretano para os modelos de Langmuir ($R^2 = 0,99$) e Freundlich ($R^2 = 0,98$) conforme Figura 27 (a e b).

Tabela 10 – Valores dos parâmetros para as isotermas de Langmuir e Freundlich obtidos através da linearização das curvas e seus respectivos valores para R^2

Isoterma	Parâmetros	R^2	Equação
Langmuir	$Q_{\max} = 7,0028$ $K_L = 0,0069$	0,99	$q_e = \frac{(0,04831C_e)}{(1+0,0069 \cdot C_e)} \quad (14)$
Freundlich	$n = 1,4349$ $K_F = 0,1153$	0,98	$q_e = 0,1153 \cdot C_e^{0,7} \quad (15)$

Figura 27 – Ajuste da isoterma para o corante Direct Black 22 em pH 7,7 para (a) modelo de Langmuir e (b) Freundlich

Conforme seção 4.4.2.2, foram calculados os parâmetros RL e n para verificação da favorabilidade da adsorção do sistema. Por meio de Langmuir, obtém-se que a capacidade máxima de adsorção da espuma de poliuretano para o corante DB22 é 7,00 mg.g⁻¹ e que o processo foi favorável para todas as concentrações do ensaio, dado que RL (Equação 11) esteve entre 0,501 e 0,889. No caso do efluente simulado têxtil, cuja concentração era de 65 mg.L⁻¹, o processo também é favorável, com RL de 0,690. Silveira Neta (2009) encontrou valores máximos de adsorção para corantes Direct Red 80 e Reactive Blue 21 em espuma de poliuretano de, respectivamente, 4,50 mg.g⁻¹ e 8,31 mg.g⁻¹. A afinidade com a espuma é maior caso as cargas do corante e da espuma sejam diferentes, o que por sua vez não causaria uma repulsão. Uma adsorção mais efetiva também está relacionada com o pH do meio, que pode ser mais ou menos favorável para o processo adsorptivo. O parâmetro n (Equação 10) de Freundlich obtido de 1,4349 indica também uma condição de adsorção favorável, estando entre os valores referenciados de 1 a 10.

Considerando o peso em gramas das tiras que compunham o meio suporte do reator (7,2488g), o efeito total da adsorção da espuma de poliuretano foi de aproximadamente 0,051 gramas de corante DB22, o que pode ser desprezado tendo em conta o período de duração do experimento (cerca de 91 gramas de DB22 foram usados em 400 dias). Gavazza et al. (2015) observaram haver remoção de corante Direct Black 22 por adsorção em trabalho envolvendo sistemas eletroquímicos com ânodo de grafite e cátodo de aço inoxidável inseridos em reatores anaeróbios de bancada, sendo a eficiência de remoção por adsorção de até 80% nos 3 primeiros dias de operação do reator e saturação em até 15 dias de operação. Murali et al. (2013) encontraram valores menores para adsorção de Methyl Orange em fibra de coco (1,2

mg.g⁻¹), provando que boa parte da remoção se deu pela contribuição microbiana. Além disso, a adsorção se satura com o tempo e, no caso de operação de reatores por longos períodos, a adsorção no meio e mesmo na biomassa pode ser considerada desprezível (MURALI et al., 2013). A mesma observação foi feita por Spagni et al. (2012), que relataram que a adsorção de Reactive Orange 16 foi menor que 10% na membrana submersa empregada em seu reator anaeróbio, sendo que o valor foi desprezado na contribuição global, dado o longo período de retenção dos sólidos (200 dias).

5.4.2 Remoção global de corante Direct Black 22 do efluente simulado têxtil e produção de aminas aromáticas

A concentração média de corante DB22 verificada no afluente têxtil sintético foi de $0,058 \pm 0,005$ mM (62 ± 5 mg.L⁻¹). O comportamento de remoção temporal é ilustrado na Figura 28. A média de remoção de cor obtida foi de $68 \pm 5\%$ e média de corante residual no efluente de $0,018 \pm 0,004$ mM (19 ± 4 mg.L⁻¹) (Figura 29). Valores para o parâmetro de concentração de corante, relacionado à cor observada, estão apresentados na Tabela 11, comparados com alguns resultados observados na literatura. A Figura 30 ilustra uma amostra da água residuária antes do tratamento anaeróbio e o efluente após seu tratamento.

Figura 28 – Concentração de DB22 afluente e efluente e remoção durante 400 dias de operação

Figura 29 – Box Plot da variação de corante no afluente e efluente do RAnLE

Figura 30 – Variação de cor da água residuária antes e após o tratamento anaeróbio

Tabela 11 – Valores para remoção de cor (redução da concentração de corante) encontrado na literatura, considerando apenas a parte **anaeróbia** do sistema

Concentração inicial de corante (mg.L ⁻¹)	Concentração final de corante (mg.L ⁻¹)	Concentração inicial de corante (mM)	Concentração final de corante (mM)	Maior remoção	Menor remoção	Média de remoção de corante	Corante	Reator	Fonte	Observação
62 ± 5	19 ± 4	0,058 ± 0,004 mM	0,018 ± 0,004 mM	78,04%	40,36%	68 ± 5%	Direct Black 22	Reator anaeróbio de leito estruturado	A autora	TDH 24 h, 200 mg.SO ₄ ²⁻ .L ⁻¹ e etanol Efluente têxtil sintético
-	-	-	-	77%	-	30,00%	Diversos compostos azo (incluindo Direct Black 22)	UASB	Amaral et al. (2014)	Fase 1: TDH 12h
-	-	-	-	89%	-	37,00%				Fase 2: TDH 12h
-	-	-	-	88%	-	52,00%				Fase 3: TDH 8h
										Efluente têxtil real, sem adição de co-substrato
60		-	-	95%	-	≥90%	Reactive Orange 16	Biorreator anaeróbio de membrana submersa	Spagni et al. (2012)	TDH: 2,5 dias. Fase de período de adaptação do lodo
	-									
3200		-	-	99%	-	-				TDH: 2,5 dias. Fase final do experimento (a partir do 120º dia até o 150º dia)
(continuação)										
Concentração inicial de corante (mg.L ⁻¹)	Concentração final de corante (mg.L ⁻¹)	Concentração inicial de corante (mM)	Concentração final de corante (mM)	Maior remoção	Menor remoção	Média de remoção de corante	Corante	Reator	Fonte	(continua)

										Reatores A e B iguais	
										B apresentou alteração no TDH	
100	-	-	-	-	-	≥96%	Remazol Red	UASB	Punzi et al. (2015)	Efluente têxtil simulado, amido (465 mg.L ⁻¹), 608 ± 37 mg.O ₂ .L ⁻¹	
										Fosfato (35,6 e 145 mg.L ⁻¹ , respectivamente) NaCl (0,3 a 1 g.L ⁻¹),	
100 – 1000	-	-	-	-	-	≥97%	Acid Red 18	Reator anaeróbio sequencial	Koupaie et al. (2012)	Efluente têxtil sintético, glicose e lactose (1500 mg,O ₂ .L ⁻¹ cada).	
					-	64,00%					Fase 1: TDH 24h
					40%	55,00%					Fase 2: TDH 16h
-	-	-	-	61-86%	10%	50,00%	Diversos	UASB	Ferraz Júnior et al., 2011	Fase 3: TDH 12h	
										Efluente têxtil real, sem adição de co-substrato	
<i>(continuação)</i>											
Concentração inicial de corante (mg.L ⁻¹)	Concentração final de corante (mg.L ⁻¹)	Concentração inicial de corante (mM)	Concentração final de corante (mM)	Maior remoção	Menor remoção	Média de remoção de corante	Corante	Reator	Fonte	Observação	
<i>(continua)</i>											
200	2,5 ± 1,5 sobrenadante e 0,84 ± 0,27 permeato	-	-	-	-	98,7% sobrenadante e 99,6% permeato	Remazol Brilliant Violet 5R	Biorreator anaeróbio de membrana redutor de	Yurtsever et al. (2016)	Fase 1: 500 mg.SO ₄ ²⁻ .L ⁻¹ . TDH 1,75-2 dias, 1000 mg.O ₂ .L ⁻¹	

								sulfato		<p>Fase 2: 1000 mg.SO₄²⁻.L⁻¹. TDH 1,75-2 dias, 1000 mg.O₂.L⁻¹.</p> <p>Fase 3: 1500 mg. SO₄²⁻.L⁻¹. TDH 1,75-2 dias.</p> <p>Fase 4: 1000 mg. SO₄²⁻.L⁻¹. TDH 1,75-2 dias, 2000 mg.O₂.L⁻¹.</p> <p>Efluente têxtil sintético, glicose.</p>
400	-	-	-	-	-	96,30%	Congo Red			TDH: 24h
200						75,20%	Reactive Black 5	UASB	Silva et al. (2012)	TDH: 12h
<i>(conclusão)</i>										Efluente têxtil sintético, co-substrato não identificado
Concentração inicial de corante (mg.L ⁻¹)	Concentração final de corante (mg.L ⁻¹)	Concentração inicial de corante (mM)	Concentração final de corante (mM)	Maior remoção	Menor remoção	Média de remoção de corante	Corante	Reator	Fonte	<i>(continua)</i> Observação
50	-	-	-	-	-	80,60%	Remazol Golden Yellow RNL	Reator anaeróbio em batelada, sem carvão ativado	Baêta et al. (2015)	TDH: 24h. Fase 2: glicose (500 mg.L ⁻¹)
						90,40%		Reator anaeróbio em batelada, com carvão ativado		TDH: 24h. Fase 3: levedura (500 mg.L ⁻¹)
						78,20%				TDH: 24h. Fase 2: glicose (500 mg.L ⁻¹)
						86,10%				TDH: 24h. Fase 3: levedura (500 mg.L ⁻¹)

Estudos envolvendo a remoção de outros corantes com lodo granular anaeróbio resultaram em eficiências maiores para van der Zee, Lettinga e Field (2001). Dentre os valores listados a menor remoção observada foi de 73% para o corante Reactive Yellow 22 e a maior foi de 100% para os corantes Direct Blue 71 e Reactive Red 22. Para o DB22, a remoção máxima obtida pelos autores foi de 99%. Deve-se observar, porém, que os autores relataram dissolução insatisfatória do corante em água. No presente trabalho, a máxima remoção obtida foi de 78% no 202º dia de operação.

A capacidade de adaptação da microbiota anaeróbia a efluentes recalcitrantes como o têxtil é notada neste trabalho, pois não houve problemas com acúmulo de ácidos graxos voláteis ou redução de alcalinidade. O desempenho favorável da microbiota frente à recalcitrância e toxicidade do efluente foi corroborada por outros autores, como Punzi et al. (2015). Os autores observaram remoção de cor de Remazol Red de 96% independente das concentrações de fósforo e de NaCl estudadas (Tabela 11). Em outras palavras, a limitação de nutriente fósforo para o lodo e a concentração alta de cloretos não impediram que o corante fosse reduzido. Cloretos podem inibir microrganismos por meio do aumento da pressão osmótica, causando plasmólise e morte da célula (PUNZI et al., 2015). Embora diversos relatos na literatura apontem ou sugiram inibição da biomassa para reduzir corantes azo e degradar a carga orgânica relacionada ao aumento na concentração de cloretos (KOKABIAN; BONAKDARPOUR; FAZEL, 2013; DOBLE; KUMAR, 2005; AMARAL et al., 2014), Punzi et al. (2015) afirmam que a presença de sódio também é capaz de inibir a atividade microbiológica nos reatores anaeróbios. Uma forma de se evitar o efeito inibitório de sais na microbiota é a formação de biofilmes homogêneos e o aumento gradual da exposição da biomassa ao sal (PUNZI et al., 2015).

Ozdemir et al. (2013) obtiveram até 98% de remoção de cor para o corante Remazol Brilliant Violet 5r (RBV 5R), em reator anaeróbio sulfetogênico com chicanas. Os autores observaram que a maior parte da descoloração ocorreu logo na primeira chicana, dado a disponibilidade de alta DQO na entrada. O desempenho na remoção de sulfato aumentou de 68 para 80% (respectivamente, relativos ao efluente sem corante azo e após, com corante azo a 20 mg.L⁻¹), implicando na remoção de cor concomitante à sulfetogênese. Entretanto, a eficiência na remoção de sulfato caiu para 65% após aumento na concentração de RBV 5R para 50 mg.L⁻¹, o que os autores relacionaram à transferência de elétrons do etanol para o corante azo e não ao sulfato, causando remoção de cor mas eficiência reduzida na redução de sulfato.

Cor também pode ser gerada através da auto-oxidação de aminas aromáticas na presença de oxigênio (van der ZEE; LETTINGA; FIELD, 2001). Em estudo envolvendo 20 corantes diferentes (incluindo o DB22) apenas o Direct Yellow 12, Direct Yellow 50 e Reactive Yellow 2 não desenvolveram cor após o processo de exposição ao ar (van der ZEE; LETTINGA; FIELD, 2001). A auto-oxidação ocorre rapidamente, em poucos minutos, e depois se estabiliza (tanto na formação de compostos quanto na intensidade dos mesmos), não afetando o espectro de absorção ao longo do tempo. A exceção a essa observação aconteceu com os corantes Mordant Orange 1 e Acid Orange 7, que formaram flocos visíveis ao longo do tempo, separáveis por centrifugação (van der ZEE; LETTINGA; FIELD, 2001). Yurtsever et al. (2016) também relataram que houve uma leve colorização do efluente devido à auto-oxidação das aminas aromáticas presentes. Assim, no presente trabalho é possível que a presença de oxigênio possa ter colaborado para acrescentar cor residual observada na amostra, coletada no recipiente de saída do reator, o qual ficava exposto ao ar livre.

Quanto ao processo de descoloração (provocado pela redução da ligação azo presente no corante), o mesmo ocorre pela combinação de mecanismos de reações enzimáticas (azoredutase produzida pela biomassa) e reações extra-celulares não específicas, com o sulfeto agindo como agente redutor químico (van der ZEE; LETTINGA; FIELD, 2001). A atuação do sulfeto como redutor químico do corante azo é variada. Dos Santos, Cervantes e van Lier (2007) observaram em seu trabalho que a contribuição do sulfeto gerado via sulfetogênese pouco contribuiu para a descoloração como um todo, indicando que a remoção de cor foi causada principalmente pelos processos biológicos. Por outro lado, o aumento na concentração de sulfato em reator anaeróbio estimulou a redução de RBV 5R (CIRIK; KITIS, CINAR, 2013). Yoo (2002) e Kim; An e Kim (2008) obtiveram êxito na remoção de corantes azo em ambiente anaeróbio quando sulfeto foi adicionado no meio. Embora Silva (2016) relatasse uso “ineficiente” dos elétrons pelos microrganismos quando sulfeto estava presente no meio, o mesmo atuou na remoção do corante azo DB22, em seu experimento.

Rasool, Shahzad e Lee (2016) observou que azo compostos sulfonatos altamente polares mostram pouca permeabilidade celular e assim, a descoloração do corante estudado Cotton Red B ocorreu devido a enzimas extracelulares não específicas, geradas por BRS presentes em reator. Os autores apontam que a atividade enzimática na biotransformação de corantes azo é pouco conhecida e os resultados obtidos indicam que a descoloração e degradação de corantes azo sulfonados por culturas anaeróbias de BRS ocorre sinergicamente através da ação de várias enzimas oxidativas e redutivas.

Segundo Silva (2016), a oxidação anaeróbia do etanol com redução do corante azo DB22 pode ser postulada pela Equação 16, considerando apenas o balanço de massa para a redução do corante:

Logo, 0,12 g O₂ são requeridos para reduzir 1 g de corante tetra-azo DB22. Considerando a concentração aplicada de DB22 (cerca de 62 mg.L⁻¹), teoricamente até 12 mg de O₂ seriam suficientes para a redução de todo o DB22 presente por litro de água residuária.. Similarmente, Dos Santos et al. (2005) observaram que 3,2 mg de O₂ são necessários para reduzir 0,1 mM de Reactive Red 2, e, por isso, não houve falta de redutores equivalentes para as bactérias termofílicas testadas.

Muito embora a DQO seja teoricamente satisfatória para reduzir o DB22 disponível, quantidades de 60 até 300 vezes maiores do que isso foram necessárias para a quebra de corantes azo em outros estudos (OZDEMIR et al., 2013; O'NEILL et al., 1999). Além disso, há competição junto às BRS na redução de sulfato, a qual é beneficiada pelo aumento da DQO conforme já relatado na literatura mesmo na presença de um corante azo (OZDEMIR et al., 2013). Silva (2016) também reporta que a presença do sulfato em meio é preferencial na rota oxidativa do carbono orgânico em detrimento do corante azo DB22, causando em consequência competição pelos elétrons disponíveis. Conforme Silva (2016) e Dos Santos (2005), grande parte dos corantes azo possuem potencial redox na mesma faixa dos íons sulfato, corroborando a possibilidade de competição (Figura 31).

A literatura aborda que o lodo anaeróbio pode contribuir com parcela da redução do corante sem uma fase lag aparente (van der ZEE, LETTINGA, FIELD, 2001). Isso ocorreria devido à sua constituição, a qual apresenta sulfeto em abundância, segundo os autores. O sulfeto, por sua vez, não precisa ser biogênico para atuar na redução de corantes azo. De acordo com os autores, em um reator anaeróbio a redução de corantes azo por sulfeto acontece mais rapidamente devido à natureza do lodo. Os autores associam tal fato à possibilidade da regeneração de agentes redutores (como o próprio sulfeto, Fe²⁺ e cofatores bioquímicos) e à presença de substâncias húmicas, as quais aceleram processos redutivos via mediação redox (van der ZEE; LETTINGA; FIELD, 2001).

Figura 31 – Ordem de atração de elétrons para espécies presentes em efluentes com corante azo

Fonte: Dos Santos, 2005

A melhor eficiência do sulfeto biogênico do que sulfeto químico foi observada quando Prato-Garcia et al. (2013) compararam a descoloração do corante azo em ambas as condições. Também foi concluído que não houve competição entre os equivalentes redutores, pois a descoloração ocorreu ao mesmo tempo que a redução de sulfato, sendo resultado de um mecanismo abiótico. Ou seja, para os corantes estudados pelos autores Acid Orange 7, Acid Red 151 e Acid Blue 113 a descoloração ocorreu por redução química extracelular onde o sulfeto produzido via BRS proveu os elétrons equivalentes para a redução da ligação azo.

Com a quebra da ligação azo do DB22 e consequente redução do corante, a produção de aminas aromáticas foi avaliada, apresentada nas Figuras 32, 33 e 34 para diferentes momentos do monitoramento operacional do RanLE. A geração das aminas aromáticas é observada na faixa do ultra-violeta, com formação de picos observada numa faixa entre 240 e 330 nm.

Figura 32 – Varredura do efluente: remoção de corante e produção de aminas em 115 dias de operação do reator

Inicialmente, na Figura 32, observa-se baixa produção de aminas e mesmo baixa concentração inicial de corante se comparados com as Figuras 33 e 34, os quais são ambos justificados por problemas na etapa de hidrólise do DB22 (manutenção de temperatura e agitação), o que disponibilizou pouca concentração do mesmo em solução. A literatura aponta problemas similares na dissolução do corante DB22. De acordo com van der Zee, Lettinga e Field (2001), em seu estudo o referido corante não se dissolveu de forma adequada e a sua alta taxa de remoção (99%) pode ter sido devido a uma combinação de adsorção no lodo, redução e precipitação, impossibilitando mesmo o cálculo da taxa de remoção em termos cinéticos.

Após a correção da execução da hidrólise do DB22, observou-se a existência de diferentes picos, ainda que suaves. Estes fazem referência a diferentes compostos aromáticos, conforme Silva (2016). O autor observou que o subproduto gerado dependerá da rota pela qual a ligação azo foi reduzida e ainda qual delas foi quebrada, dado o fato de o DB22 ser um composto tetra-azo.

Figura 33 – Varredura do efluente: remoção de corante e produção de aminas em 268 dias de operação do reator

Figura 34 – Varredura do efluente: remoção de corante e produção de aminas em 394 dias de operação do reator

Avaliando-se o exposto, a degradação do corante pelo RAnLE é considerada boa se comparado a outras configurações anaeróbias que degradaram o mesmo corante (Tabela 11 e comentários), mas ligeiramente abaixo do que o encontrado na literatura para outros corantes. Parte dos elétrons advindos da degradação do etanol no metabolismo bacteriano foram aplicados na redução de sulfato e, por sua vez, o sulfeto gerado também age na redução do corante, havendo duas rotas previsíveis no caso, a via química direta (redução via oxidação do sulfeto) e a via biológica direta (aceptor final de elétrons pelo metabolismo dos microrganismos). A degradação do corante pode ser observada pela produção de aminas

aromáticas e pela redução na concentração do corante no meio. Picos de absorção em diferentes pontos da região do UV indicaram a produção de aminas aromáticas diversificadas. Após estabelecimento correto do procedimento de hidrólise, observou-se aparente comportamento similar na produção de aminas aromáticas em função do tempo decorrido de operação (conforme Figuras 33 e 34).

5.5 TOXICIDADE AGUDA E CRÔNICA

5.5.1 Bioensaios de toxicidade aguda e crônica com *Ceriodaphnia dubia* e *Daphnia magna*

A Tabela 12 mostra os resultados obtidos para a toxicidade crônica do afluente e efluente do RanLE. Tanto o afluente quanto o efluente apresentam toxicidade crônica com *C. dubia*. Todavia, o afluente (água residuária bruta com o corante DB22) apresentou maior toxicidade na concentração de 0,06 mM do que seu correspondente tratado, que possui em sua constituição aminas aromáticas e corante residual. Assim, nas condições apresentadas, o afluente com corante DB22 a 0,06 mM (65 mg.L⁻¹) apresenta toxicidade aguda maior do que o efluente tratado, com aminas aromáticas como subprodutos e algum corante residual. Com relação a toxicidade a *C. dubia*, o tratamento provido pelo RanLE foi benéfico e as aminas aromáticas geradas pela redução das ligações azo do DB22 são menos tóxicas do que o DB22 a 0,06 Mm (65 mg.L⁻¹) propriamente dito.

Os valores de IC₅₀ (bem como os de CE₅₀) exprimem relações inversas, de forma que, quanto maior o valor, menor a toxicidade apresentada. Assim, 18,50% do afluente em uma solução (v/v) são capazes de inibir em 50% a produção de neonatos, enquanto que são necessários 42,60% do efluente em solução (v/v), para apresentar a mesma inibição.

Tabela 12 – Bioensaio de toxicidade crônica com *Ceriodaphnia dubia*

	Afluente	Efluente	Unidade
Toxicidade crônica com <i>Ceriodaphnia dubia</i>	8	4	FT
IC ₅₀	18,50%	42,60%	
Densidade da amostra	1,003	1,003	g.mL ⁻¹
Salinidade da amostra	4,00	4,00	‰
pH da amostra	7,50	7,50	
Oxigênio dissolvido	0,90	1,00	mg.L ⁻¹
Apresenta toxicidade crônica para <i>C. dubia</i>	Sim	Sim	

A Tabela 13 apresenta os resultados do teste de inibição da capacidade natatória de *Daphnia magna*. Não foi possível determinar a CE₅₀ nas condições observadas, isto é, ambos o afluente (DB22 65 mg.L⁻¹) e o efluente não foram capazes de causar efeito agudo (imobilidade) em 50% dos organismos-teste.

Analogamente aos resultados observados com a *C. dubia*, o afluente com 0,06 mM de DB22 foi mais tóxico do que o efluente (com aminas aromáticas resultantes da redução do corante DB22 mais algum corante residual). Os FT_D para espécies de *Daphnias* para o afluente e efluente foram respectivamente 32 e 8.

Os testes de toxicidade aguda trabalham com multi-concentrações que geram uma gama de respostas em função das concentrações do efluente estudado. Devido ao fato de que a ecotoxicologia foca nos efeitos adversos de substâncias químicas no meio ambiente, a toxicidade aguda é descrita em termos de CE₅₀/CL₅₀. Obviamente, esses valores não são indicativos de concentrações aceitáveis dos compostos químicos em questão no meio ambiente. De fato, permitir a concentração de um agente que presumivelmente mata 50% dos organismos expostos é dificilmente um exemplo de boa administração ambiental (VERMA, 2008). Desta forma, a averiguação dos valores em termos de FT e FT_D indicam concentrações aceitáveis dos compostos frente a um descarte.

Embora a toxicidade das aminas aromáticas seja conhecida na literatura, sabe-se que as variadas estruturas dos corantes formam aminas aromáticas diversas, as quais pela sua estrutura e disposição do anel aromático podem ser mais ou menos inibidoras para determinado tipo de biomassa (SPAGNI et al., 2012).

Tabela 13 – Bioensaio de toxicidade aguda com *Daphnia magna* (inibição da capacidade natatória)

	Afluentes	Efluentes	Unidade
Toxicidade aguda com <i>Daphnia magna</i>	32	8	FT _D
CE ₅₀	NA	NA	
Densidade da amostra	1,003	1,003	g.mL ⁻¹
Salinidade da amostra	4,00	4,00	‰
pH da amostra	7,50	7,50	
Oxigênio da amostra	0,90	1,00	mg.L ⁻¹
Apresenta toxicidade aguda para <i>D. magna</i>	Sim	Sim	

Punzi et al. (2015) estudaram a degradação de Remazol Red (100 mg.L⁻¹) com diferentes concentrações de NaCl. Os autores relataram que, independente do microrganismo empregado nos testes de toxicidade aguda (Microtox® ou *Artemia salina*), o padrão observado foi o mesmo – a toxicidade foi maior para o efluente têxtil tratado do que para a água residuária têxtil bruta. Maiores concentrações de NaCl também influenciaram a toxicidade do efluente final. Para Microtox®, a água residuária bruta é moderadamente tóxica (EC₂₀ 16%), enquanto que para *A. salina* o EC₂₀ não pode ser determinado e a água residuária foi considerada pouco tóxica, mesmo na presença de 10 g.L⁻¹ de NaCl. O efluente tratado Punzi et al. (2015) apresentou EC₂₀ de 7% (5-10 g.L⁻¹ de NaCl). Para a *A. salina*, o EC₂₀ foi de 57-80%. Assim como Punzi et al. (2015), Menezes (2016) obteve toxicidade excessiva (FT 256) a *Vibrio fischeri* no efluente têxtil sintético com Direct Black 22 tratado anaerobiamente, porém a toxicidade não foi detectável quando processos aeróbios foram combinados ao anaeróbio.

Analogamente aos resultados apresentados (Tabela 13), Silva et al. (2012) demonstraram que para o corante diazo Congo Red (também referido como Direct Red 28, 400 mg.L⁻¹), não foi possível determinar o CE₅₀ para *Daphnia magna*. Após tratamento anaeróbio, o efluente apresentou CE₅₀ de 2,12%. Depois de receber tratamento aeróbio, o CE₅₀ aumentou para 6,17%, indicando que houve diminuição da toxicidade, embora baixa degradação das aminas geradas, dada a pequena diferença entre os valores de CE₅₀.

O aumento de toxicidade após redução anaeróbia do corante azo é esperado devido às aminas aromáticas. Entretanto, também é esperado que tratamentos aeróbios promovam uma degradação mais expressiva dessas aminas. Para o corante Reactive Black (200 mg.L⁻¹), diazo, os valores de CE₅₀ de entrada e após tratamento anaeróbio foram de 23,02% e 40,34%, indicando que o corante é mais tóxico do que as aminas geradas. Após degradação aeróbia, o

CE₅₀ foi reduzido a zero (SILVA et al., 2012). Portanto, vê-se a necessidade de verificar as associações entre unidades de operação de tratamento biológico para cada corante.

As respostas entre os organismos-teste também apresentam variações. Hernández-Zamora et al. (2016) testaram a toxicidade do corante Congo Red para a *Ceriodaphnia dubia*, verificando que o mesmo apresenta efeitos tóxicos na reprodução e sobrevivência, mesmo na baixa concentração de 0,94 mg.L⁻¹. Os autores pontuam a necessidade de estudar os efeitos de intoxicação nos produtores primários pois os organismos-teste (*C. dubia*) que consumiram microalgas contaminadas com corante Congo Red apresentaram efeitos tóxicos significativos na sua reprodução e sobrevivência. Portanto, mesmo em concentrações que seriam consideradas aceitáveis em ecossistema aquático, os efeitos adversos observados na reprodução e taxa de sobrevivência do microcrustáceo foram relevantes.

5.5.2 Bioensaios de citotoxicidade determinada *in vitro* por alterações morfológicas e absorção em vermelho neutro

Na primeira parte da aplicação do método de Borenfreund e Puerner (1985), realizou-se a contagem das células de fibroblastos de linhagem McCoy, na amostra homogeneizada e aliquoteada em câmara de Neubauer. Após diluição em meio RPMI, alíquotagem desta solução na placa de cultura e armazenagem em estufa de 36°C/24h, observou-se a boa aderência das mesmas. Após 24h, a parte líquida dos micropoços da placa de cultura de 96 orifícios são desprezadas e as células permanecem aderidas no fundo dos poços. O efluente sintético tratado, liofilizado e ressuspenso em meio RPMI foi aliquoteado em diluições seriadas. As soluções de DB22 não foram liofilizadas. As variadas concentrações empregadas foram obtidas concentrando-se as soluções e/ou por diluições seriadas.

A Figura 35 representa a viabilidade celular sob exposição ao corante DB22 em diferentes concentrações (mg.mL⁻¹). Pelo gráfico, não se observa uma relação dose-dependente quando as células foram expostas ao corante DB22. Entretanto, os resultados demonstram diminuição de viabilidade celular significativa com relação ao controle na concentração de DB22 de 0,016, 0,065, 0,20 e 0,26 mg.mL⁻¹ (marcados com asterisco na Figura 35, valores p no Apêndice A). De acordo com a *Ecological and Toxicological Association of Dyes and Organic Pigments Manufacturers*, de 4.000 corantes avaliados para toxicidade em mamíferos, mais de 90% apresentam concentração letal para 50% dos

organismos-teste (CL_{50}) de menos de $2.10^3 \text{ mg.kg}^{-1}$, sendo as mais tóxicas os corantes diazo básicos e diretos (SHORE, 1996; ROBINSON et al., 2001, HERNANDÉZ-ZAMORA et al., 2016).

Figura 35 – Curva dose-resposta para viabilidade celular de fibroblastos em exposição ao corante DB22 em diferentes concentrações (mg.mL^{-1})

Com relação ao efluente tratado, a Figura 36 apresenta a curva de viabilidade celular com a dose-resposta ($R^2 = 0,97742$). Como não é possível traçar informações quantitativas de concentração de aminas aromáticas, definiu-se a unidade de concentração do efluente (cuja apresentação após tratamento traduz “100%” de concentração ou o efluente em sua condição “in natura” na saída do RAnLE). Pelos dados apresentados, foi verificada 50% de diminuição da viabilidade celular (IC_{50}) na presença do efluente, quando diluído 3 vezes (diluição seriada), sendo $1/8$ de sua concentração inicial. Os valores p obtidos apontaram diminuição de viabilidade celular significativa para todas as situações testadas (marcados na Figura 36 com asterisco, valores p no Apêndice A).

Figura 36 – Curva dose-resposta para viabilidade celular de fibroblastos em exposição ao efluente tratado em RAnLE

Compostos específicos, como 4-aminobifenil e benzidina induziram câncer urinário em pacientes trabalhadores da indústria de corantes, enquanto que compostos análogos ao 4-aminobifenil (como o 2',3-dimetil-4-aminobifenil) foram mais carcinogênicos do que o próprio 4-aminobifenil e induziram câncer de cólon, de mama e de próstata (WEISBURGER, 2002; REDDY E MORI, 1981; KATAYAMA et al., 1982; WALPOLE, WILLIAMS, 1958; GARNER; MARTIN; CLAYSON, 1984). O composto 3-metil-2-naftilamina induziu câncer de cólon e de mama em ratos, o que gerou a hipótese de que orto-metilarilaminas poderiam ser carcinogênicas. Isso foi verificado por meio do composto ortotoluidina, o mais simples da classe, que a literatura provou ser carcinogênico (HECHT et al., 1982; KULKARNI; FIALA; WEISBURGER, 1983). Ressalta-se que o corante DB22 pode originar aminas aromáticas com compostos n-hidróxi, como sugerido por Silva (2016), o ácido 3,6-diamino-4-hidróxinaftaleno-2-sulfônico, para o qual podemos sugerir potencial carcinogênico, conforme apontado na literatura para os compostos de mesma classe. Investigações em ratos e camundongos administrados com aminas aromáticas derivadas de corantes azo ou derivados causaram câncer nos indivíduos, principalmente no fígado (WEISBURGER, 2002). Verifica-se a necessidade da separação e identificação dos compostos gerados na redução do DB22 e o estudo dos efeitos tóxicos de cada um, os quais podem ser mais ou menos adversos conforme a estrutura apresentada.

Ainda que para os bioensaios com *D. magna* não houvesse indicação de CE_{50} para a *D. magna* tanto para afluentes quanto para efluentes, foi possível conferir o potencial inibidor da viabilidade celular no caso dos bioensaios citotóxicos, o que aponta diferentes respostas para cada organismo. Verifica-se a necessidade de realizar bioensaios com células *in vitro* de mamíferos, já que tais testes podem trazer uma resposta mais sensível com relação à toxicidade e seus efeitos para o ser humano.

Considerando o exposto, observa-se maior efeito tóxico do afluente (com corante DB22) em comparação com o efluente (aminas aromáticas) para organismos aquáticos *C. dubia* e *D. magna*, de posições iniciais nos níveis tróficos, sugerindo que o corante azo DB22 é mais tóxico do que as aminas aromáticas por ele geradas e atestando a capacidade do RAnLE em remover toxicidade de afluente com DB22. Entretanto, bioensaios citotóxicos *in vitro* com fibroblastos comprovam a necessidade de um pós-tratamento no efluente, o qual foi capaz de promover inibição em 50% das células a uma concentração de 1/8 da inicial. Para o afluente, não foi possível estabelecer uma relação dose-dependente, embora tenha sido observado resposta adversa à exposição a variadas concentrações de corante DB22. Sugere-se que ensaios de citotoxicidade com células de fibroblastos sejam empregados para detectar a toxicidade próxima a seres humanos, sendo bastante reprodutíveis, sensíveis, rápidos e economicamente acessíveis. Assim, o emprego de bioensaios de toxicidade com diferentes organismos-alvo promove complementação de informações sobre o potencial adverso do material em questão, promovendo informações corretas sobre como lidar com o descarte da água residuária, evitando problemas de saúde pública.

5.6 BIOENSAIOS EM BATELADA COM O LODO DE FUNDO (LF) E O LODO ADERIDO AO MEIO SUPORTE (LM)

A razão F/M é um parâmetro operacional importante no tratamento de águas residuárias, afetando o crescimento da biomassa, sedimentação do lodo e remoção dos poluentes (WU et al., 2018). Conforme Lobos et al. (2005) e Liu et al. (2012), razões F/M elevadas beneficiam atividade metabólica, crescimento microbiano e taxas altas de conversão a metano, valores muito elevados podem afetar o equilíbrio entre a hidrólise e a metanogênese, destruir a eficiência do processo e a ecologia microbiana e causar a desfloculação do lodo. Por outro lado, razões F/M baixas pode beneficiar a eficiência de

remoção orgânica e a floculação do lodo, aumentando a sedimentação da biomassa no reator. Mas, se a razão F/M se torna muito baixa, o crescimento celular é limitado e a desfloculação do lodo também pode ocorrer. A razão F/M ideal depende do objetivo do estudo e de suas características.

O bioensaio de batelada com LF contou com $0,65 \text{ gSTV.L}^{-1}$ em 20 mL de lodo de fundo utilizado, contando 13 mg de STV disponibilizados para 250 mL de efluente sintético, a fim de se evitar uma sobrecarga aos microrganismos. A relação obtida entre a carga orgânica (DQO) disponibilizada e o STV foi de 19.

Os valores obtidos de biomassa total (sólidos totais voláteis – STV) para o RAnLE e a relação entre carga orgânica (DQO) disponibilizada e STV (F/M) se encontram na Tabela 14. Para o bioensaio de batelada 21 cm de espuma com biomassa foram colocados em frascos com 200 mL de efluente sintético.

Tabela 14 – Parâmetros dos sólidos totais voláteis (STV) e carga orgânica disponível no

	RAnLE	
	Valores	Unidade
Volume do reator	3,5	L
Massa STV	7,542	g STV
DQO	1,078	g.L^{-1}
F/M	0,5	gDQO.gSTV^{-1}

As eficiências de remoção de DQO, corante e sulfato estão na Tabela 15, para as duas situações abordadas. Em ambas as situações, a biomassa se mostrou adaptada ao processo sulfetogênico, dado os valores de remoção de sulfato. Conforme há mais disponibilidade de substrato inicial, há uma melhora na remoção de DQO, o que também é facilitado pelo fato de que a biomassa se encontrava em suspensão e, portanto, foi favorecida na troca de massas. Entretanto, o aumento de F/M (DQO/STV) provocou diminuição de remoção de sulfato e corante. Razões baixas de F/M, provenientes do bioensaio com lodo aderido ao leito estruturado aparentemente beneficiaram a remoção de corante, provavelmente devido ao fato de que biomassas aderidas suportam melhor a toxicidade do efluente. Ainda que a relação F/M de 19 apresente melhor remoção de DQO, a remoção de corante decai, provavelmente devido ao aumento dessa carga tóxica sobre o lodo em suspensão e ao desvio para rotas que não beneficiam a remoção do corante.

Tabela 15 – Remoções de DQO, sulfato e corante para abordagem de F/M 0,5 e 19 (ensaio de LM e LF, respectivamente) após 24h

F/M	0,5	19
DQO %	49,50	70,47
Sulfato %	80,00	76,93
Corante %	49,43	25,15

A Figura 37 mostra os picos de absorção das amins aromáticas para os ensaios com LF e LM. Observa-se que os picos se apresentam em diferentes comprimentos de onda, o que poderia indicar que a atividade da biomassa, comparada aqui em termos de localização dentro do reator, complementa uma à outra quanto à remoção do corante, podendo gerar diferentes compostos de amins aromáticas. Assim, tanto a ação redutora do sulfeto biogênico no corante quanto a ação do corante como acceptor final de elétrons geraria a quebra de ligação -N=N- ao longo do corante, que é tetra-azo, em posições preferenciais dessa ligação, gerando amins aromáticas diversas.

Figura 37 – Produção de amins aromáticas de acordo com disponibilidade de biomassa (STV) (F/M 19 e 0,5) após 24h

Aparentemente, a presença de sulfato não prejudicaria a remoção de corante, mas seria preferencial dado que a pressão sobre sistema causada pela toxicidade do corante/amins aromáticas e a disposição estrutural da biomassa provocou desvio para rotas mais favoráveis, como a sulfetogênica, não contribuindo para a remoção do corante. Ressalta-se que a biomassa de fundo deve ter contribuído com a remoção de DQO do sistema como um todo,

indicando que a configuração do leito fixo-estruturado possibilita o estabelecimento de biomassa em crescimento aderido e suspenso, concorrendo ambas para melhor performance do sistema.

Os valores dos parâmetros obtidos para o modelo com residual da cinética de remoção da DQO estão apresentados na Tabela 16. O modelo aplicado para o ajuste de decaimento da matéria orgânica se baseou em uma adaptação (Equação 17) do modelo de Monod, considerando uma concentração remanescente de DQO e baixo rendimento celular (MOCKAITIS et al., 2014), em primeira ordem com residual. Não foi possível traçar o modelo de decaimento de corante pois o mesmo não mostra tendência de estabilização.

Tabela 16 – Parâmetros obtidos para o modelo com residual da cinética de remoção da matéria orgânica

matéria orgânica			
F/M		0,5	19
Parâmetros	$C_{DQO}^{Residual}$	521,98	221,26
	C_{DQO}^0	1162,69	1135,60
	k1	0,08615	0,10379
	R ²	0,9791	0,9858

$$C_{DQO}(t) = C_{DQO}^{Residual} + (C_{DQO}^0 - C_{DQO}^{Residual}) \cdot \exp.(-k_1^{DQO} \cdot t) \quad (\text{Equação 17})$$

Onde $C_{DQO}(t)$ é a concentração do substrato de interesse (mg.L⁻¹) medida no tempo t ; C_{DQO}^0 é a concentração inicial ($t = 0$) do substrato de interesse (mg.L⁻¹); k_1^{DQO} o coeficiente cinético aparente de primeira ordem (h⁻¹) e t é o tempo do ensaio (h). Os modelos obtidos estão ilustrados na Figura 38.

Reyes III e Dague (1995) relatam boa retenção de biomassa e partida estável e rápida em reatores anaeróbios com baixos valores de F/M, sendo o valor 0,5 o melhor entre razões F/M avaliadas que variaram de 0,09 a 1,00 gDQO.gSV⁻¹. Assim, no presente trabalho a razão F/M encontrada foi considerada adequada para o funcionamento do RAnLE. Souto et al. (2010) avaliaram testes de atividade metanogênica específica em diferentes razões F/M e encontraram que a melhor razão variou entre 0,125 a 0,750 gDQO.gSV⁻¹ sob temperatura sugerida de 35°C. Liu et al. (2012) avaliaram duas razões F/M (0,1 e 3,8 gDQO.gSV⁻¹) em reator de membrana anaeróbio, concluindo que a razão de 3,8 causou acúmulo na membrana, indesejável nesse tipo de reator. Os autores recomendaram razões F/M mais baixas para essa configuração, bem como avaliar métodos para remover a camada acumulada na membrana.

Figura 38 – Modelos cinéticos para decaimento de matéria orgânica (DQO) conforme disponibilidade de biomassa (STV)

Experimentos com efluentes têxteis em razão F/M baixa (0,15) em reator sequencial anaeróbio/aeróbio em batelada resultou em remoção de até 66% da carga orgânica total aplicada, com até 94% de remoção de cor (SHAW; CARLIELL; WHEATLEY, 2002). Os autores relataram instabilidade no sistema anaeróbio/aeróbio causado pela ação inibitória das aminas aromáticas.

Silva (2016) observou competição entre íons sulfato com o corante azo pelos elétrons, alterando os mecanismos de redução dos mesmos. O autor ainda afirma que íons sulfeto biogênicos ou sintéticos podem reduzir as ligações azo pelas rotas bioquímicas ou químicas, entretanto a cinética de remoção de cor é alterada e sua eficiência é reduzida. A possibilidade de formação de diferentes aminas aromáticas aqui sugerida também é abordada, dado que o autor afirma que há alteração na formação dos subprodutos de degradação, possivelmente parcialmente degradados.

Rasool, Shahzad e Lee (2016) estudaram remoção de corante diazo Cotton Red B (CTB, 50 - 2500 mg.L⁻¹) em presença de sulfato (1 g.L⁻¹) e com lactato como doador de elétrons (2000 mg.DQO.L⁻¹). Após 24h, na presença de 50 a 200 mg.L⁻¹, a redução do corante azo CTB foi preferencial (próximo a 98%) e a redução de sulfato atingiu valores próximos de

80%. Para concentração de CTB de 500 a 2500 mg.L⁻¹, a remoção de corante e de sulfato foram próximas a 80%. Valores próximos a 100% de remoção de corante e sulfato foram obtidos em 42h. Em bioensaios sem lodo com sulfeto químico adicionado, apenas 8% de remoção de corante foi obtido para 500 mg.L⁻¹ de sulfeto. Os autores observaram dominância do mecanismo biológico sobre a redução química por sulfeto.

5.7 ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS

5.7.1 Morfologia por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A análise morfológica das células presentes no lodo de fundo (LF) e lodo aderido ao material suporte (LM) foi realizada por MEV. Em ambas as amostras foi observada a presença de cadeias longas de bacilos, formando filamentos (Figuras 39 a 41). Tal tipo de arranjo é bastante comum em reatores metanogênicos, sendo normalmente associado às arqueias metanogênicas semelhantes a *Methanosaeta*, que utilizam o acetato como substrato na respiração anaeróbia (MADIGAN et al., 2014). A presença de ácido acético foi acusada no efluente do RAnLE por meio de análise cromatográfica de AGV, reforçando a hipótese de que se tratariam de arqueias. Cocos irregulares arranjados em cachos também foram observados na amostra LF, conforme indicado nas Figuras 39b e 39c. Bacilos arredondados, morfologia observada em algumas bactérias e em BRS, são observados na amostra de LF, conforme indicações na Figura 40 a e b.

Na amostra LM, observou-se aparente predominância de formas esféricas com precipitados amorfos e de aspecto cristalino, conforme indicado na Figura 41. O espectro de difração de raios X de pontos na superfície apontou a presença dos elementos Ca, P, N, O, S e Na (Figura 41c), sugerindo que os precipitados poderiam conter minerais como o sulfeto de cálcio (CaS) e fosfato de cálcio (Ca₃(PO₄)₂). Sabe-se que o H₂S produzido em reatores sulfetogênicos pode reagir com metais divalentes, formando precipitados insolúveis (REMOUNDAKI et al., 2008). Isto sugere que o sulfeto em gás produzido pelas BRS reagiu com o Ca²⁺ introduzido como macronutriente, gerando precipitados de CaS. Os elementos identificados no precipitado presente na biomassa não são deletérios para o solo, conforme lista estipulada pela FAO (PESCOD, 1992).

Figura 39 – Eletromicrografias do lodo de fundo (LF) do RAnLE. (a) cadeias de bacilos, formando filamentos. (b) e (c) seta indica a presença de cocos irregulares arranjados em cachos

Figura 40 – Eletromicrografias do lodo de fundo (LF). (a) presença de bactérias na forma de bacilos arredondados. (b) bacilos arredondados e bacilos longos formando filamentos

Lu et al. (2016) observaram arranjos de cocos formados nos grânulos de reator UASB alimentado com metanol, com relação $\text{DQO}/\text{SO}_4^{2-}$ de 20 em imagens de MEV. Os autores sugeriram que a razão $\text{DQO}/\text{SO}_4^{2-}$ estudada proporcionou o selecionamento da microbiota. Por outro lado, a visualização da microflora de grânulos de outro reator UASB (também alimentado com metanol) com razão $\text{DQO}/\text{SO}_4^{2-}$ de 2, revelou maior diversidade morfológica. Além de alguns cocos, observou-se bacilos curtos com bordas arredondadas similares a BRS. Arqueias metanogênicas também foram visualizadas na mesma amostra submetida à MEV. Os autores justificaram o crescimento sintrófico das comunidades metanogênica e sulfetogênica ao menor valor de $\text{DQO}/\text{SO}_4^{2-}$. Similarmente ao presente trabalho, a amostra de $\text{DQO}/\text{SO}_4^{2-}$ de 2 revelou, por meio de MEV-EDX, a existência de precipitados de minerais contendo metais (CaCO_3 , $\text{Ca}_5\text{OH}(\text{PO}_4)_3$ e FeS). Na razão $\text{DQO}/\text{SO}_4^{2-}$ de 20, a principal arqueia caracterizada pela biologia molecular foi *Methanomethyllovorans* sp. (correspondendo a 73,42% do total do gene sequenciado), que convertem metanol a metano e apresentam colônias com formas de cocos. Na razão $\text{DQO}/\text{SO}_4^{2-}$ de 2, predominaram as bactérias homoacetogênicas *Acetobacterium* sp. (74,37%), as quais convertem metano a acetato. Entre as BRS, a presença de *Desulfovibrio* sp., indica a utilização de uma maior variedade de substratos (piruvato, lactato, H_2 , metanol, etanol e glicerol, quando há presença de sulfato). Assim, a comunidade sulfetogênica possivelmente é favorecida em relações $\text{DQO}/\text{SO}_4^{2-}$ menores.

Figura 41 – Eletromicrografias do lodo aderido ao material suporte (LM) do RAnLE. (a) cadeias de bacilos, formando filamentos. (b) setas indicam presença de cristais inorgânicos. (c) espectro de EDX de pontos sobre a superfície das formas esféricas com aspecto cristalino destacadas

5.7.2 Sequenciamento Metagenômico

Dado o interesse em verificar os microrganismos envolvidos na degradação do corante azo DB22, o sequenciamento metagenômico foi especificado para integrantes do Domínio Bacteria. Os metadados obtidos estão disponibilizados no NIH Short Read Archive database sob número de acesso SRP131853, incluindo os arquivos FASTq referentes ao lodo do meio suporte LM (SRX3633731, SRR6656387) e ao lodo de fundo LF (SRX3633736,

SRR6656392). O número de observações foi 773, um total de 90.158 contagens e média de 45079, considerado uma similaridade de 97% entre as sequências encontradas e o banco de dados. As Figuras 42 a e b apresentam as curvas de rarefação para as amostras LM e LF respectivamente, as quais indicaram a suficiência para a análise de diversidade e a riqueza total obtidas nos dois casos.

Figura 42 – Curvas de Rarefação. a) Lodo do meio suporte (LM) e b) Lodo de fundo (LF)

As amostras foram analisadas quanto aos índices de diversidade alfa (Tabela 17), para os parâmetros de dominância, riqueza e diversidade de espécies. A partir do exposto, observa-se que a amostra LM apresenta menor dominância (D) dentro da comunidade quando comparada com LF. O índice de Simpson (1-D) e o índice de Shannon (H'), maiores para LM, corroboram a maior variedade de espécies dessa amostra. Se o valor (1-D) for mais alto, maior a diversidade da amostra (considerando D a dominância e o valor de 1 como mais próximo de uma cultura pura) e, quanto maior o valor de H mais diversificada é a amostra. Assim, observa-se que houve maior dominância em LF, indicando que a toxicidade do corante logo na entrada do reator provocou uma pressão seletiva mais intensa nas espécies microbianas presentes (PUNZI et al., 2015).

O índice de Chao 1 corrige os valores para riqueza de acordo com as espécies raras, sendo que quanto maior este valor, mais rica a amostra (MASTRORILLI, 2014). Assim, a riqueza é maior para LM do que para LF.

Com relação à igualdade de abundância entre espécies (índice de Equabilidade J) a amostra LM foi superior à amostra LF, de forma que não houve preponderância de uma

espécie sobre a outra. Observa-se a equabilidade de LM também pela Figura 43 que aponta as maiores abundâncias relativas obtidas para as principais famílias encontradas em LM e LF, dentro do Domínio Bactéria.

Tabela 17 – Índices de diversidade alfa para as amostras de lodo aderido ao meio suporte (LM) e de lodo de fundo (LF)

Índices	Lodo aderido ao meio suporte (LM)	Lodo de fundo (LF)
Dominância (D)	0,09257	0,2649
Simpson (1-D)	0,9074	0,7351
Shannon (H')	2,766	2,008
Equabilidade (J)	0,6367	0,4925
Chao -1	99	61,63

Pela Figura 43, verificou-se a presença de *Syntrophobacteraceae*, *Desulfobulbaceae*, *Desulfovibrionaceae* e *Dethiosulfovibrionaceae*, as quais estão ligadas à redução de sulfato. *Desulfovibrio mexicanus* e *Desulfovibrio aminophilus* (família *Desulfovibrionaceae*) foram as espécies mais abundantes. *Desulfobulbaceae*, *Desulfovibrionaceae* e *Dethiosulfovibrionaceae* foram as famílias mais abundantes na amostra LF (totalizando mais de 50% da abundância relativa). *D. aminophilus* também é capaz de utilizar sulfeto e tiosulfato como aceptores finais de elétrons (KUEVER, 2014a; BAENA et al., 1998; HERNANDEZ-EUGENIO et al., 2000, OOSTERKAMP et al., 2016). A presença de BRS na biomassa na entrada do reator poderia indicar a possibilidade da preferência pelo sulfato comoceptor final de elétrons do que o DB22 no primeiro contato com a biomassa. Estudos de outros autores apontam que *Desulfovibrio* sp. apresenta potencial na descoloração e degradação de corantes azo (XIE et al., 2016; PLUMB et al., 2001; RASOOL; SHAHZAD; LEE, 2016).

Sulfobactérias verdes (*Chlorobiaceae*) foram identificadas predominantemente na amostra LM e são um indicativo de passagem de luz no reator, dado sua característica anaeróbia fotoautótrofa. Organelas denominadas clorossomos possibilitam que os membros desta família cresçam em ambientes com intensidades mínimas de luz. Além disso, seu metabolismo é associado à oxidação de sulfeto, sendo o doador de elétrons mais importante, envolvendo a deposição de glóbulos de enxofre elementar externamente às células (IMHOFF, 2014, LUO; LIN; GUO, 2010; FRIEDRICH et al., 2005). Cristais compostos por enxofre e material associado ao enxofre elementar foram encontrados nos precipitados presentes no recipiente de coleta, na saída do reator, conforme Figuras 19 e 41.

Figura 43 – Famílias de espécies do domínio Bactéria encontradas análise de diversidade microbiana com maior abundância relativa para as amostras de lodo do meio suporte e de lodo de fundo

Além da *Chlorobiaceae*, as famílias *Halothiobacillaceae* e *Hydrogenophilaceae*. identificadas na amostra LM também participam no processo de oxidação do sulfeto. Os elétrons derivados do processo são empregados pelas bactérias aeróbias quimiotróficas na transformação de energia na cadeia respiratória e para a redução autotrófica de dióxido de carbono (LUO; LIN; GUO, 2010; FRIEDRICH et al., 2005). A presença predominante de famílias de bactérias oxidadoras de sulfeto no meio LM apontaria para uma diferenciação dentro do reator, no qual na zona observada logo após a entrada predominaria a sulfetogênese e, seguindo o fluxo ascendente, a oxidação de sulfetos, o que explicaria a concentração baixa de sulfetos no efluente tratado.

Syntrophobacteraceae (representada pelo gênero *Syntrophobacter*), *Desulfovibrionaceae*, estritamente anaeróbios (abundância relativa maior em LF, associando a redução de sulfato com a acetogênese) e *Acidaminobacteraceae* (presença maior em LM) estão associadas à oxidação incompleta de substratos orgânicos a acetato (KUEVER, 2014a; LIPUS et al., 2017). A família *Geobacteraceae*, representada pelo gênero *Geobacter*, também oxida acetato e pode metabolizar ácidos orgânicos de menor cadeia e álcoois. Seu metabolismo é considerado não-fermentativo e várias espécies oxidam hidrocarbonetos

monoaromáticos como tolueno e benzeno (RÖLING, 2014). Além disso, organismos pertencentes ao gênero *Geobacter* possuem metabolismo dissimilativo redutor de enxofre, reduzindo enxofre elementar e suas outras formas oxidadas a H_2S , mas não são capazes de reduzir sulfato (MADIGAN et al., 2014). Liu et al. (2013) mostraram que *Geobacter metallireducens* reduz corantes azo com estruturas variadas e sugerem que o gênero *Geobacter* pode ser potencial para biorremediação de efluentes poluídos por corantes azo.

Brachyspiraceae não foi ainda formalmente descrita, sendo de interesse filogenético devido à sua localização isolada dentro do filo *Sphirochaetes*. Sua presença é observada em ambientes intestinais de vários animais (PATI et al., 2010).

Os componentes da família *Caulobacteraceae* são bactérias mesofílicas que se associam em biofilmes, podendo ser aeróbias ou facultativamente anaeróbias. Elas se adaptam a ambientes de potencial redox flutuantes, em concentrações altas ou baixas de nutrientes e são responsáveis por boa parte da mineralização de matéria orgânica em ambiente aquático (SONG et al., 2013).

Oxalobacteraceae, representados pelo gênero *Janthinobacterium*, foi identificada em ambas amostras LF e LM (mais abundante nesta última). Muito embora as bactérias deste gênero sejam aeróbias, *Janthinobacterium* sp. foi isolado em condições anaeróbias e aeróbias. O gênero *Janthinobacterium* foi identificado em lodos anaeróbios presentes em reatores tratando clorofórmio, descrito como uma comunidade microbiana favorável na produção anaeróbia de hidrogênio (BALDANI et al., 2014a; NING et al., 2012). *Janthinobacterium* também foi encontrado em reatores anaeróbios para remoção de nitrogênio com atividade ANAMMOX (VIANCELLI et al., 2011). Organismos com 99% de similaridade com o *Janthinobacterium* também foram encontrados em comunidades microbianas assimiladoras de amônia em sistemas de tratamento de dejetos de animais (SASAKI; SASAKI; NAKAI, 2005; VIANCELLI et al., 2011). O efluente simulado do presente experimento contém NH_4Cl em sua composição macronutriente, sendo possivelmente assimilado pelo microrganismo em questão.

Microrganismos da família *Pseudomonadaceae*, identificados pelo gênero *Pseudomonas*, são aeróbios. Porém, foi reportado pela literatura atividade em anaerobiose, pela qual a espécie *P. veronii* demonstrou ser capaz de degradar contaminantes orgânicos como o pentaclorofenol (PCP) na presença de baixas concentrações de fósforo (WANG et al., 2017). Os autores afirmam que os microrganismos desta espécie são competentes na degradação de compostos contaminantes e sugerem seu uso em biorremediação. *Pseudomonas* sp. L1 foram associadas à remoção anaeróbia de corante azo Reactive Blue

(51,96 a 86,88% de eficiência de remoção) por Lin et al. (2010). Não foi observada remoção quando condições aeróbias foram disponibilizadas. *Pseudomonas* sp. também foi identificado no lodo de reator anaeróbio sulfetogênico em batelada tratando corante Cotton Red B (RASOOL; SHAHZAD; LEE, 2016).

Rhodospirillaceae (presente no LF) foi representada pelo gênero identificado *Telmatospirillum*. Este organismo é anaeróbio facultativo e quimio-heterotrófico (BALDANI et al., 2014b). O gênero *Telmatospirillum* e o *Syntrophobacter* (anaeróbio restrito da família *Syntrophobacteraceae*, presente em LF e LM) estão relacionados ao metabolismo sintrófico da oxidação de butirato. *Syntrophobacter* sp. também metaboliza propionato e etanol (SCHIMIDT et al., 2016), o qual foi utilizado como doador de elétrons neste trabalho. O gênero *Syntrophobacter* vive em associação sintrófica com organismos que utilizam H₂ e formato (KUEVER, 2014b).

Comamonadaceae é ampla e bastante versátil e seus membros podem ser aeróbios, anaeróbios, desnitrificantes, oxidadores de hidrogênio, fermentativos, foto-autotróficos ou foto-heterotróficos. A maioria é mesofílica (WILLEMS, 2014).

O gênero *Treponema*, identificado dentro da família *Spirochaetaceae*, é anaeróbio e conhecido por causar várias doenças em seres humanos, como a sífilis e, em digestores anaeróbios, são bactérias acetogênicas (RADOLF, 1996; GUO et al., 2015). Foi proposto que a classe *Spirochaetes* poderiam realizar a oxidação sintrófica de acetato em reatores anaeróbios, principalmente em pressão parcial de hidrogênio menor que 20 Pa (LEE et al., 2013; LEE et al., 2015).

Thermotogaceae é quimiolitototrófica e presente em ambientes de oxidação de hidrogênio, redução de nitrato ou redução de sulfato (JI et al., 2015). O gênero identificado *Kosmotoga* é um produtor de hidrogênio de alto rendimento, mas seu papel e importância em reatores anaeróbios produtores de hidrogênio ainda não foram abordados (ETCHEBEHERE et al., 2016).

Muito embora *Xanthomonadaceae* seja descrita como aeróbia obrigatória, a literatura aponta que organismos dessa família possuem metabolismo envolvendo respiração com nitrato ou sulfato como aceptores finais, dado a sua abundância em reatores com lodo proveniente de esgoto biológico (HAO et al., 2016). *Pseudoxanthomonas mexicana*, identificada em LF e LM, foi observada em reatores anaeróbios com presença de nitrato (THIERRY et al., 2004). Um clone filogeneticamente muito próximo à essa espécie, com 99,7% de similaridade na sequência de gene 16S rRNA, foi detectado em reator anaeróbio

tratando 1,2-dicloropropano (DCP), um composto tóxico e carcinogênico (SCHLÖTELBURG, 2001).

Embora pouco abundantes, *Sphingomonas* sp foram identificadas em LM. Bactérias desta espécie foram associadas à redução de corantes azo em outros estudos (DOS SANTOS et al., 2006; KUDLICH et al., 1997). Assim como no presente estudo, *Acinetobacter* sp., *Sedimentibacter* sp., *Desulfobulbus* sp., *Kosmotoga* sp., *Thiobacillus* sp., e *Xanthomonadales* foram identificados no lodo anaeróbio sulfetogênico tratando corante azo Cotton Red B (RASOOL; SHAHZAD; LEE, 2016). Os autores ressaltam que *Acinetobacter* sp.; é capaz de reduzir corantes azo. *Desulfobulbus* sp. também foi encontrado em amostras de lodo de reatores UASB tratando efluente sintético com Direct Black 22 (CARVALHO, 2016b).

Parte dos resultados do sequenciamento metagenômico de LM e LF mostram bactérias não-cultivadas, pertencentes a “filos candidatos” (Tabela 18). O termo significa filos propostos de microrganismos, ainda a serem caracterizados e cuja principal informação se dá pela presença em sequenciamentos metagenômicos, são denominados desta forma pela falta de representantes isolados e cultivados (BROWN et al., 2015). A principal característica em comum entre as famílias encontradas (Figura 43) e os microrganismos dos filos candidatos (Tabela 18) é a capacidade de crescer em ambientes poluídos com hidrocarbonetos de cadeia aberta ou fechada e em ambientes com presença de compostos sulfurados, compondo uma comunidade com capacidade de degradação de substâncias tóxicas e recalcitrantes.

Tabela 18 – Microrganismos de filos candidatos, observados na análise de diversidade genômica de LM e LF e suas principais características

Novo Filo	Características	Fonte
AC1	Encontrado em ambientes redutivos. Alta estabilidade e especificidade relativas sugerem que preenchem um nicho especializado em biorreatores metanogênicos	Werner et al., 2011
BRC1	Ambientes anóxicos de plantações de arroz inundados	Derakshani, Lukow e Liesack, 2001
GN04	Zonas anóxicas, metabolismo anaeróbio; reservatórios contendo hidrocarbonetos e ambientes com enxofre; Reatores de oxidação de amônia	Wong, Ahmed-Cox e Burns, 2016; Piceno et al., 2014; Costa et al., 2014

(continua)

(continuação)

Novo Filo	Características	Fonte
LD1	Fontes de sedimentos em zonas de gêiseres ricos em enxofre e sulfetos	Youssef; Steidley, Elshahed, 2012
MAT-CR-M4-B07	Sedimentos do Rio Elk, Virgínia do Oeste, degradando 4-metilciclohexanometanol	Cozzarelli et al., 2017
NC10	Bactérias fazem mediação do processo de oxidação anaeróbica de metano ligada à redução de nitrito	He et al., 2016
NKB19	Atual Hydrogenedentes. Associadas a ambientes metanogênicos e metabolização de ácidos graxos de longa cadeia, porém seu papel ecológico ainda não foi elucidado.	Nobu et al., 2015
OD1	Atual Parcubacteria. Identificadas em vários ambientes anóxicos.	Nelson e Stegen, 2015
OP11*	Ambientes e zonas anóxicas. Grupo polifilético.	Harris, Kelley e Pace, 2004
OP3*	Encontrados em ambientes anóxicos como sedimentos marinhos, mares profundos hipersalinos, lagos de água doce, aquíferos, ambientes inundados para cultivo de arroz, águas de infiltração em cavernas e reatores metanogênicos. Metabolismo anaeróbio foi sugerido.	Kumar, Saravanan, 2010
OP8*	Atual Aminicenantes. Encontrados em ambientes contaminados por hidrocarbonetos, anaerobiose, altos níveis de sulfeto).	Farag et al., 2014
OP9*	Atual Atribacteria (antigo JS1). Encontrado em sedimentos marinhos anaeróbios, ambientes geotérmicos, digestores e reatores anaeróbios e reservatórios de petróleo.	Nobu et al, 2016
TM7	Atual Saccharibacteria. Abundante, filogeneticamente diversificado e espalhado pela natureza. Ambientes aeróbios, redutores de nitrato e anaeróbios.	Kindaichi et al., 2016
TPD-58	Encontrado em grânulos de reatores UASB e também em gêiseres contendo enxofre e apresentando baixa acidez.	Kuroda et al., 2016, Colman, 2009
WPS-2	Encontrado em um local poluído por bifenil policlorado (PCB) em Wittenberg, Alemanha. Posição filogenética incerta.	Nogales et al., 2001
WS1	Encontrados no aquífero Wurtsmith, contaminado por hidrocarbonetos e submetido à processo de biorremediação. Ainda estão em fase de estudo para	Dojka et al., 1998
WS3	determinar seu nível de divisão (de WS1 a WS6).	

(continua)

(conclusão)

Novo Filo	Características	Fonte
WWE1	Presente em reator anaeróbio mesofílico (35 ± 5 °C) tratando celulose; sugere-se que atuam em uma hidrólise extracelular da celulose ou uso de seus produtos de fermentação.	Liman et al., 2014

*Filo OP foi criado dentro do domínio *Bacteria*, baseado no grupo de sequências genômicas 16S rRNA inicialmente obtidas da Obsidian Pool, Yellow Stone National Park, ambiente rico em ferro, sulfeto, dióxido de carbono e hidrogênio. Pela falta de representantes cultivados, é referido como filo candidato. (KUMAR, SARAVANAN, 2010)

6 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos mostram que o reator anaeróbio de leito estruturado (RAnLE) desempenhou de forma satisfatória as transformações pretendidas para o tratamento de efluente têxtil sintético. A remoção de carga orgânica apresentou eficiência de $80,28 \pm 6,62\%$. A maior remoção observada foi de 92,9% de DQO, no 334º dia de operação. A matéria orgânica foi removida por rotas sulfetogênica e metanogênica, apontando para a capacidade de coexistência entre as comunidades microbiológicas, mesmo que metabolizem substratos semelhantes. A remoção de corante DB22 foi de $68 \pm 5\%$, sendo o DB22 um dos aceptores finais de elétrons. A redução de sulfato apresentou eficiência de $78,66 \pm 4,04\%$.

Foram encontrados valores de sulfeto muito inferiores ao potencialmente produzido a partir da redução do sulfato, permitindo se inferir que a remoção de sulfeto do meio ocorreu pelos fatores: a) especiação no meio em forma gasosa devido ao pH do sistema; b) reação do sulfeto gerado com alguns metais presentes na solução macronutriente, gerando precipitados de cristais inorgânicos no lodo; e c) possibilidade de haver participação do íon na redução de DB22. Assim, 10% de sulfeto foi liberado em gás, cerca de 3% esteve presente no efluente e aproximadamente 87% precipitou em forma de enxofre elementar por oxidação em contato com o ar, por ação redutora do corante DB22 e em forma de precipitados metálicos inorgânicos.

Frente à exposição ao ar, houve formação de precipitado na saída do reator, posteriormente identificado como enxofre elementar. Também foi observado a formação de compostos com oxigênio e enxofre em sua composição no *headspace* do RAnLE.

Houve a produção de diferentes aminas aromáticas durante a operação do RAnLE, corroborado pelas análises obtidas nos bioensaios em batelada o lodo de fundo (LF) e o lodo aderido ao meio suporte (LM). Isto se deve à ação de redutores diferentes nas quatro ligações existentes do corante, gerando composições químicas com absorção variada ao longo do UV. A cinética de decaimento de matéria orgânica para F/M (0,5), realizado com biomassa aderida ao meio suporte e refletindo as condições de disponibilidade de carga orgânica (DQO) e biomassa (STV) foi de primeira ordem com residual. A remoção de corante foi maior para F/M 0,5 do que para a condição de F/M 19, implicando numa melhor resistência à toxicidade pela biomassa aderida.

O meio suporte utilizado no RAnLE apresentou capacidade máxima de adsorção de 7 mg.g⁻¹. Estima-se que a absorção de corante no suporte como um todo tenha sido de aproximadamente 50 mg de DB22, em pH 7,7, observado no reator. Os processos foram

favoráveis mas sua contribuição pode ser desprezada dado o longo período de operação do RAnLE. Assim, o principal mecanismo na remoção de cor não foi o adsorptivo. A remoção de corante DB22 pode ter ocorrido via química direta por ação redutora do sulfeto gerado pela redução de sulfato, e via biológica direta, com ação enzimática das bactérias na redução da ligação azo.

Houve certo equilíbrio na produção e consumo de alcalinidade, sendo o efluente tratado pouco mais alcalino ($518 \pm 127 \text{ mg.CaCO}_3\text{.L}^{-1}$) que o afluente ($476 \pm 127 \text{ mg.CaCO}_3\text{.L}^{-1}$) e não houve acúmulo de ácidos graxos voláteis ($121 \pm 34 \text{ mg.HAc.L}^{-1}$), evidenciado por relação AI/AP próximo de 0,2. O pH ficou levemente alcalino, atribuído à atividade das BRS. O aumento observado na alcalinidade também pode ser atribuído às aminas aromáticas, as quais agem como bases de Lewis. O ácido mais predominantemente detectado foi o acético, com $95 \pm 17 \text{ mg.L}^{-1}$.

Nas eletromicrografias realizadas para as amostras de lodo de fundo (LF) e de lodo do meio suporte (LM), foram observados cocos irregulares arranjados em cachos, bacilos arredondados e cadeias longas de bacilos. Este último arranjo é comum em reatores metanogênicos normalmente associados à arqueias semelhantes às *Methanosaetas*. Presentes na biomassa analisada, precipitados amorfos de aspecto cristalino foram identificados. Sua composição apontou Ca, P, N, O, S.

O sequenciamento metagenômico apontou que a amostra LF teve maior dominância, causada por pressão seletiva nas espécies provavelmente pela toxicidade do corante. A amostra LM mostrou maior equabilidade, variabilidade e riqueza. *Syntrophobacteraceae*, *Desulfobulbaceae*, *Desulfovibrionaceae* e *Dethiosulfovibrionaceae*, bactérias redutoras de sulfato, foram identificadas mais abundantemente em LF. *Chlorobiaceae*, *Halothiobacillaceae* e *Hydrogenophilaceae*, associadas à oxidação do sulfeto, estiveram presentes em LM. Bactérias associadas à oxidação incompleta de substratos orgânicos a acetato, cujo ácido correspondente foi o mais preponderante, foram representadas pela presença de *Syntrophobacteraceae*, *Desulfovibrionaceae*, *Geobacteraceae* *Acidaminobacteraceae*. “Filos candidatos” relacionados ao crescimento em ambientes poluídos com hidrocarbonetos de cadeia longa aberta ou fechada e ambientes com compostos sulfurados também foram identificados. Gêneros de bactérias relacionadas à degradação de corantes azo (*Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Desulfovibrio*) foram identificados nas amostras LM e LF.

O efluente após tratamento no RAnLE teve menor toxicidade do que seu afluente nos testes de toxicidade com microcrustáceos. Assim, na concentração de 0,06 mM a toxicidade a

Daphnia magna e *Ceriodaphnia dubia* foi maior para afluente do que para efluente, indicando menor toxicidade associada às aminas aromáticas para tais organismos. Não foi possível determinar o valor de CE_{50} para *Daphnia magna*. Os testes de citotoxicidade *in vitro* empregando células McCoy em exposição ao efluente têxtil sintético tratado no RAnLE apresentaram um comportamento dose-dependente. O efluente diluído 3 vezes inibiu 50% das células. Por outro lado, não foi possível verificar um comportamento dose-dependente considerando as diferentes concentrações de DB22. Entretanto, houve diferença estatística significativa na viabilidade celular para as concentrações de DB22 de 0,016, 0,065, 0,2 e 0,26 $mg.mL^{-1}$. Frente aos resultados, o uso de bioensaios adicionais pode revelar mais informações sobre a toxicidade dos compostos presentes em efluentes recalcitrantes. Considerando as concentrações baixas finais de DQO, corante, sulfato e sulfeto, o equilíbrio na produção e consumo de AGV e alcalinidade e os valores obtidos para a toxicidade ambiental, o RAnLE foi capaz de tratar e destoxificar o efluente têxtil, sendo proposto a sua aplicação em projetos piloto em situações reais. Ainda assim, os valores citotóxicos e a presença de aminas aromáticas apontam para a recomendação de um pós-tratamento para redução da toxicidade final do efluente.

REFERÊNCIAS

ABIT – ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA TÊXTIL E DE CONFECÇÃO. Perfil do setor (2017). Disponível em: <http://www.abit.org.br/cont/perfil-do-setor> . Acesso em: 04 jan 2018.

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

ABNT - ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 13373**: Ecotoxicologia aquática – Toxicidade crônica – Metodo de ensaio com *Ceriodaphnia* spp (Crustacea, Cladocera). 2005.

ADEMA, D.M.M. *Daphnia magna* as a test animal in acute and chronic toxicity tests. **Hydrobiologia**, v.59, p. 125-134, 1978.

ADORNO, M.; HIRASAWA, J.; VARESCHE, M. Development and validation of two methods to quantify acids (C2-C6) by GC/FID: Headspace (automatic and manual) and liquid-liquid extraction (LLE). **American Journal of Analytical Chemistry**, v.5, p.406-414, 2014. doi:10.4236/ajac.2014.57049

AKARSUBASI, A.T.; INCE, O.; KIRDAR, B.; OZ, N.A.; ORHON, D.; CURTIS, T.P.; HEAD, I.M.; INCE, B.K. Effect of wastewater composition on archeal population diversity. **Water Res.**, v.39, p.1576–1584. 2005.

ALBUQUERQUE, M.G.E.; LOPES, A.T.; SERRALHEIRO, M.L.; NOVAIS, J.M.; PINHEIRO, H.M. Biological sulphate reduction and redox mediator effects on azo dye decolourisation in anaerobic-aerobic sequencing batch reactors. **Enzyme and Microbial Technology**, v.36, p.790-799, 2005.

ALDER, R. W.; BOWMAN, P. S.; STEELE, W. R. S.; WINTERMAN, D. R.. The remarkable basicity of 1,8-bis(dimethylamino)naphthalene. **Chemical Communications (London)**, p.723-724, 1968. Disponível em: <<http://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/1968/c1/c19680000723#!divAbstract>> .

ALDER, R. W.; GOODE, N. C.; MILLER, N.; HIBBERT, F.; HUNTE, K. P. P.; ROBBINS, H. J. Extremely strong but sluggish amine bases. **Journal of the Chemical Society, Chemical Communications**, p. 89-90, 1978. Disponível em: <http://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/1978/c3/c39780000089#!>

ALLEN, S.J.; MCKAY, G.; PORTER, J.F. Adsorption isotherm models for basic dye adsorption by peat in single and binary component systems. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 280, p.322-333, 2004. doi:10.1016/j.jcis.2004.08.078

ALI, Hazrat. Biodegradation of synthetic dyes – a review. **Water, Air and Soil Pollution**, v.213, p.251-273, 2010.

ALLOUI, F.; KCHAOU, S.; SAYADI, S. Physicochemical treatments of anionic surfactants wastewater: effect on aerobic biodegradability. **Journal of Hazardous Materials**, v.164, p.353-359, 2009. doi:10.1016/j.jhazmat.2008.08.009

AMARAL, K. G. C. **Correlação entre fator de toxicidade e parâmetros físico-químicos para efluentes domésticos tratados**. 2012. 105 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia da Área de Concentração Ciência e Tecnologia Ambiental) – Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Paraná, 2012.

AMARAL, F.M.; KATO, M.T.; FLORÊNCIO, L.; GAVAZZA, S. Color, organic matter and sulfate removal from textile effluents by anaerobic and aerobic processes. **Bioresource Technology**, v.163, p. 364-369, 2014. doi:10.1016/j.biortech.2014.04.026 09

AMARAL, F.M. **Remoção de corantes azo em sistema de reator anaeróbio/aeróbio e em reator UASB micro-aerado**. 2015. 103 f. Tese (Doutorado em Engenharia Civil) – Departamento de Engenharia Civil, Universidade de Pernambuco, Pernambuco, 2015.

AMORIM, S.M.; KATO, M.T.; FLORÊNCIO, L.; GAVAZZA, S. Influence of redox mediators and electron donors on the anaerobic removal of color and chemical oxygen demand from textile effluent. **Clean - Soil, Air, Water**, v.41, n.9, p.928-933, 2013.

ANTOŠOVA, Z.; HERKOMMEROVÁ, K.; PICHOVÁ, I.; SYCHROVÁ, H. Efficient secretion of three fungal laccases from *Saccharomyces cerevisiae* and their potential for decolorization of textile industry effluent – A comparative study. **Biotechnology Progress**, v.34, p.69-80, 2018. doi:10.1002/btpr.2559

ANZOLA-ROJAS, M.P.; ZAIAT, M. A novel anaerobic down-flow structured-bed reactor for long-term stable H₂ energy production from wastewater. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v.91, p.1551-1561, 2016.

APHA/AWWA/WEF. **Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater**. American Public Health Association, American Water Works Association, Water Environment Federation, 2012.

AQUINO, S.; FUESS, L.T.; PIRES, E.C. Media arrangement impacts cell growth in anaerobic fixed-bed reactors treating sugarcane vinasse: Structured vs. randomic biomass immobilization. **Bioresource Technology**, v.253, p.219-228, 2017. doi:10.1016/j.biortech.2017.03.120

ARENZON, A.; PEREIRA NETO, T.J.; GERBER, W. **Manual sobre toxicidade em efluentes industriais**. Porto Alegre: CEP SENAI de Artes Gráficas Henrique d'Ávila Bertaso, 2011.

ATHALATHIL, S.; STÜBER, F.; BENGUA, C.; FONT, J.; FORTUNY, A.; FABREGAT, A. Characterization and performance of carbonaceous materials obtained from exhausted sludges for the anaerobic biodecolorization of the azo dye Acid Orange II. **Journal of Hazardous Materials**, v.267, p.21-30, 2014. doi:10.1016/j.jhazmat.2013.12.031

BAENA, S.; FARDEAU, M-L.; LABAT, M.; OLLIVIER, B.; GARCIA, J-L.; PATEL, B.K.C. *Desulfovibrio aminophilus* sp. nov., a novel amino acid degrading and sulfate

reducing bacterium from an anaerobic dairy wastewater lagoon. **Systematic and Applied Microbiology**, v.21, n.4, p.498-504, 1998. doi:10.1016/S0723-2020(98)80061-1

BAÊTA, B.E.L.; LIMA, D.R.S.; SILVA, S.Q.; AQUINO, S.F. Evaluation of soluble microbial products and aromatic amines accumulation during a combined anaerobic/aerobic treatment of a model azo dye. **Chemical Engineering Journal**, v.259, p.936-944, 2015. doi:10.1016/j.cej.2014.08.050

BALDANI, J.I.; ROUWS, L.; CRUZ, L.M.; OLIVARES, F.L.; SCHMID, M.; HARTMANN, A. The Family *Oxalobacteraceae*. In: ROSENBERG, E.; DELONG, E.F.; LORY, S.; STACKEBRANDT, E.; THOMPSON, F. (eds) **The Prokaryotes**. Springer, Berlin, Heidelberg. 2014a.

BALDANI, J.I.; VIDEIRA, S.S.; TEIXEIRA, K.R.S.; REIS, V.M.; DE OLIVEIRA, A.L.M.; SCHWAB, S.; DE SOUSA, E.M.; PEDRAZA, R.O.; BALDANI, V.L.D.; HARTMANN, A. The Family *Rhodospirillaceae*. In: ROSENBERG, E.; DELONG, E.F.; LORY, S.; STACKEBRANDT, E.; THOMPSON, F. (eds) **The Prokaryotes**. Springer, Berlin, Heidelberg. 2014b.

BANAT, I.M.; NIGAM, P.; SINGH, D., MARCHANT, R. Microbial decolorization of textile-dye-containing effluents. **Bioresources Technology**, v.58, p.217-227. 1996.

BARILE, F. A. Introduction to in vitro cytotoxicology: mechanisms and methods. Boca Raton: CRC Press, Inc 1992. Cap. 4, p.37-52.

BARRERA, E.L.; SPANJERS, H.; ROMERO, O.; ROSA, E.; DEWULF, J. Characterization of the sulfate reduction process in the anaerobic digestion of a very high strength and sulfate rich vinasse. **Chemical Engineering Journal**, v.248, p.383-393, 2014.

BASTIAN, Elza Y. Onishi; ROCCO, Jorge Luiz Silva. **Guia técnico ambiental da indústria têxtil**. São Paulo: Cetesb/ Sinditêxtil, 2009. (Série P + L) Disponível em: <http://www.cetesb.sp.gov.br/Tecnologia/producao_limpa/documentos/guia_textil.pdf>. Acesso em: 11 maio 2015.

BERNER, D.B. **Taxonomy of Ceriodaphnia (Crustacea: Cladocera) in U.S. Environmental Protection Agency Cultures**. U.S. Environmental Protection Agency, Report EPA/600/4 – 86/032, Cincinnati, OH. 1986. 34 p.

BETHESDA, Ebert D. **Ecology epidemiology and evolution of parasitism in Daphnia**. [S.l.] 2005. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK2042/>. Acesso em: 18 novembro 2017.

BISSCHOPS, I.; SPANJERS, H. Literature review on textile wastewater characterisation. **Environmental Technology**, v.24, n.11, p.1399-1411. 2003.

BOETIUS, A.; RAVENSCHLAG, K; SCHUBERT, C.J.; RICKERT, D.; WIDDEL, F.; GIESEKE, A.; AMANN, R.; JØRGENSEN, B.B.; WITTE; U. PFANNKUCHE, O. A marine microbial consortium apparently mediating anaerobic oxidation of methane. **Nature**, v.407, p.623-626, 2000.

BORENFREUND, E.; PUERNER, J.A. Toxicity determined in vitro by morphological alterations and neutral red absorption. **Toxicology Letters**, v.24, p.119-124, 1985.

BRASIL. **Resolução CONMETRO de 02 de junho de 2008**. Dispõe sobre a aprovação do regulamento técnico Mercosul sobre etiquetagem de produtos têxteis. Disponível em: < 0>. Acesso em: 11 maio 2015.

BRAÚNA, C.H.C.; MOTA, S.; DOS SANTOS, A.B. Descoloração redutiva do corante azo RR2 na ausência e presença de mediador redox e aceptor de elétrons nitrato. **Engenharia Sanitária e Ambiental**, v.14, n.2, p.275-284, 2009.

BROWN, C.T.; HUG, L.A.; THOMAS, B.C.; SHARON, I.; CASTELLE, C.J.; SINGH, A.; WILKINS, M.J.; WRIGHTON, K.C.; WILLIAMS, K.H.; BANFIELD, J.F. Unusual biology across a group comprising more than 15% of domain Bacteria. **Nature**, v.523, p.208-211, 2015. doi: 10.1038/nature14486

BURATINI-MENDES, S.V. **Efeitos do meio de cultivo sobre a sobrevivência, reprodução e sensibilidade de *Ceriodaphnia dubia***. 2002. 104 f. Dissertação (Mestrado em Ciências da Engenharia Ambiental) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2002.

BUTTURI-GOMES, D.; PETRERE JÚNIOR, M.; GIACOMINI, H.C.; ZOCCHI, S.S. Statistical performance of a multicomparison method for generalized species diversity indices under realistic empirical scenarios. **Ecological indicators**, v.72, p.545-552, 2017.

CAMILOTI, P.R.; MOCKAITIS, G.; RODRIGUES, J.A.D.; DAMIANOVIC, M.H.R.Z.; FORESTI, E.; ZAIAT, M. Innovative anaerobic bioreactor with fixed-structured bed for simultaneous sulfate reduction and organic matter removal. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v.89, p.1044-1050, 2013.

CARLIELL, C.M.; BARCLAY, S.J.; BUCKLEY, C.A. Treatment of exhausted reactive dyebath effluent using anaerobic digestion: Laboratory and full-scale trials. **Water SA**, v.22, n.3, p.225-233, 1996.

CARLIELL, C.M.; BARCLAY, S.J.; NAIDOO, N.; BUCKLEY, C.A.; MULHOLLAND, D.A.; SENIOR, E. Microbial decolourisation of a reactive azo dye under anaerobic conditions. **Water SA**, v.21, n.1, p.61-69, 1995.

CARVALHO, M. G. P. **Interferência da presença de sulfato sobre o tratamento de efluente têxtil sintético em reatores UASB e compartimentado de leito fixo**. 2016. 99 f. Tese (Doutorado em Engenharia Civil) – Departamento de Engenharia Civil, Universidade Federal de Pernambuco, Pernambuco, 2016a.

CARVALHO, J.R.S. **Ecologia microbiana de reatores UASB submetidos a diferentes condições de operação para tratar efluente têxtil**. 2016. 77 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Civil) – Departamento de Engenharia Civil, Universidade Federal de Pernambuco, Pernambuco, 2016b.

CERVANTES, F.J.; ENRIQUEZ, J.E.; GALINDO-PETATAN, E.; ARVAYO, H.; RAZO-FLORES, E.; FIELD J.A. Biogenic Sulphide plays a major role on the riboflavin-mediated

decolourisation of azo dyes under sulphate-reducing conditions. **Chemosphere**, v.68, n.1082, 2007.

CHAPARRO, R.T. **Tratamento de efluentes de branqueamento de polpa celulósica em reator anaeróbico seguido de processo oxidativo avançado**. Tese (Doutorado em Ciências – Engenharia Hidráulica e Saneamento) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2010.

CHENGALROYEN, M.D.; DABBS, E.R. The microbial degradation of azo dyes: minireview. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.29, p.389-399, 2013.

CHINWEKITVANICH, S.; TUNTOOLVEST, M.; PANSWAD, T. Anaerobic decolorization of reactive dyebath effluents by a two-stage UASB system with tapioca as a co-substrate. **Water Research**, v.34, p.2223-2232. 1999.

CHO, S.H.; SHIM, J.; MOON, S.H. Detoxification of simulated textile wastewater using a membraneless electrochemical reactor with immobilized peroxidase. **Journal of Hazardous Materials**, v.162, p.1014-1018, 2009.

CHOI, E.; RIM, J.M. Competition and inhibition of sulfate reducers and methane producers in anaerobic treatment. **Water Science and Technology**, v.23, n.7-9, p.1259-1264, 1991.

CHRISTIE, R. **Colour Chemistry**. 2nd ed. Cambridge: The Royal Society of Chemistry United Kingdom, 2014. 360p.

CHUDGAR, R. J. Azo Dyes. In: KIRK-OTHMER (Ed.). **Encyclopedia of Chemical Technology**. 5^a Edição: John Wiley & Sons, Inc., 2000. ISBN 9780471238966.

CIRIK, K.; KITIS, M.; CINAR, O. The effect of biological sulfate reduction on anaerobic color removal in anaerobic-aerobic sequencing batch reactors. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v.36, p.579-589, 2013.

CLARKE, E.A.; ANLIKER, R. Organic dyes and pigments. **The Handbook of Environmental Chemistry**, v.3, p.181-215, 1980.

CLAESSON, M.J.; O'SULLIVAN, O.; WANG, Q.; NIKKILÄ, J.; MARCHESI, J.R.; SMIDT, H.; DE VOS, W.M.; ROSS, R.P.; O'TOOLE, P.W. Comparative analysis of pyrosequencing and a phylogenetic microarray for exploring microbial community structures in the human distal intestine. *PLoS One* 4, v.4, n.8, p.1-15. 2009
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0006669>

CLAYSON, D.G. **Chemical Carcinogenesis**. Boston: Little, Brown and Company, 1962. 467 p.

COLMAN, D.R. **Diversity of understudied archaeal and bacterial populations from Yellowstone National Park: from genes to genomes**. 2015. 150 p. Tese (Doutorado) University of New Mexico, Albuquerque, New Mexico, 2015. Disponível em: http://digitalrepository.unm.edu/cgi/viewcontent.cgi?article=1017&context=biol_etds. Acesso em: 15 mar 2018.

COSTA, M.C.; CARVALHO, L.; LEAL, C.D.; DIAS, M.F.; MARTINS, K.L.; GARCIA, G.B.; MANCUELO, I.D.; HIPÓLITO, T.; CONELL, E.F.; OKADA, D.; ETCHEBEHERE, C.; CHERNICHARO, C.A.; ARAUJO, J.C. Impact of inocula and operating conditions on the microbial community structure of two anammox reactors. **Environmental Technology**, v.35, n.14, p.1811-1822, 2014. doi:10.1080/09593330.2014.883432 .

COZZARELLI, I.M.; AKOB, D.M.; BAEDECKER, M.J.; SPENCER, T.; JAESCHKE, J.; DUNLAP, D.S.; MUMFORD, A.C.; PORET-PETERSON, A.T.; CHAMBERS, D.B. Degradation of Crude 4-MCHM (4-methylcyclohexanemethanol) in sediments from Elk River, West Virginia. **Environmental Science and Technology**, v.51, n.21, p.12139-12145, 2017. doi:10.1021/acs.est.7b03142 .

DAMIANOVIC, M.H.R.Z.; FORESTI, E. Anaerobic degradation of synthetic wastewaters at different levels of sulfate and COD/sulfate ratios in horizontal-flow anaerobic reactors (HAIB). **Environmental Engineering Science**, v.24, n.3, p.383-393, 2007. doi:10.1089/ees.2006.0067

DELÉE, W.; O'NEILL, C.; HAWKES, F.R.; PINHEIRO, H.M. Anaerobic treatment of textile effluents: a review. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v.73, p.323-335, 1998.

DERAKSHANI, M.; LUKOW, T.; LIESACK, W. Novel bacterial lineages at the (sub)division level as detected by signature nucleotide-targeted recovery of 16S rRNA genes from bulk soil and rice roots of flooded rice microcosms. **Applied and Environmental Microbiology**, v.67, n.2, p.623-631, 2001. doi:10.1123/AEM.67.2.623-631.2001 .

DEVIIENNE, K. F. **Análise in vitro de alguns parâmetros envolvidos na citotoxicidade e resposta imune induzidos para isocumarinas**. 2004. 136 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia). Instituto de Química de Araraquara, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, São Paulo, 2004.

DEVIIENNE, K. F. **Avaliação da atividade biológica in vitro de isocumarinas naturais e semi-sintéticas obtidas de *Paepalanthus bromelioides***. 2000. 136 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia). Instituto de Química de Araraquara, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, São Paulo, 2000.

DILALLO, R.; ALBERTSON, O.E. Volatile acids by direct titration. **Journal of the Water Pollution Control Federation**, v.33, n.4, p.356-365, 1961.

DINIZ, P. E.; LOPES, A.T.; LINO, A.R.; SERRALHEIRO, M.L. Anaerobic reduction of a sulfonated azo dye, Congo Red, by sulfate-reducing bacteria. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.97, p.147-163. 2002.

DOBLE, M.; KUMAR, A. **Biotreatment of industrial effluents**. 1st ed. Oxford: Butterworth-Heinemann, 2005. 336p.

DOJKA, M.A.; HUGENHOLTZ P.; HAACK, S.K.; PACE, N.R. Microbial diversity in a hydrocarbon- and chlorinated-solvent-contaminated aquifer undergoing intrinsic bioremediation. **Applied and Environmental Microbiology**, v.64, n.10, p.3869-3877, 1998.

DOS SANTOS, A.B.; CERVANTES, F.J.; VAN LIER, J.B. Review paper on current technologies for decolourisation of textile wastewaters: perspectives for anaerobic biotechnology. **Bioresource Technology**, v.98, n.12, p.2369-2385, 2007.

DOS SANTOS, A.B.; MADRID, M.P.; BOK, F.A.M.; STAMS, A.J.M.; VAN LIER, J.B.; CERVANTES, F.J. The contribution of fermentative bacteria and methanogenic archaea to azo dye reduction by a thermophilic anaerobic consortium. **Enzyme and Microbial Technology**, v.39, p.38-46, 2006.

DOS SANTOS, A.B.; TRAVERSE, J.; CERVANTES, F.J.; VAN LIER, J.B. Enhancing the electron transfer capacity and subsequent color removal in bioreactors by applying thermophilic anaerobic treatment and redox mediators. **Biotechnology and Bioengineering**, v.89, n.1, p.42-52, 2005.

DUBIN, P.; WRIGHT, K.L. Reduction of azo food dyes in cultures of *Proteus vulgaris*. **Xenobiotica**, v.5, n.9, p.563-571, 1975.

ETCHEBEHERE, C.; CASTELLÓ, E.; WENZEL, J.; ANZOLA-ROJAS, M.P.; BORZACCONI, L.; BUITRÓN, G.; CABROL, L.; CARMINATO, V.M.; CARRILLO-REYES, J.; CISNEROS-PÉREZ, C.; FUENTES, L.; MORENO-ANDRADE, I.; RAZO-FLORES, E.; FILIPPI, G.R.; TAPIA-VENEGAS, E.; TOLEDO-ALARCÓN, J.; ZAIAT, M. Microbial communities from 20 different hydrogen-producing reactors studied by 454 pyrosequencing. **Applied Microbiology Biotechnology**, v.100, p.3371-3384, 2016. doi: 10.1007/s00253-016-7325-y .

FARAG, I.F.; DAVIS, J.P.; YOUSSEF, N.H.; ELSHAHED, M.S. Global patterns of abundance, diversity and community structure of the *Aminicenantes* (Candidate phylum OP8). AZIZ, R.K. (Ed). **PLoS ONE**, v.9, n.3, e92139, 2014. doi:10.1371/journal.pone.0092139 .

FERRAZ JÚNIOR, A.D.N.; KATO, M.T.; FLORENCIO, L.; GAVAZZA, S. Textile effluent treatment in a UASB reactor followed by submerged aerated biofiltration. **Water Science and Technology**, v.64, n.8, p.1581-1589, 2011.

FERSI, C.; DHABBI, M. Treatment of textile plant effluent by ultrafiltration and/or nanofiltration for water reuse. **Desalination**, v.222, p.263-271. 2008.

FOO, K.Y.; HAMEED, B.H. Insights into the modeling of adsorption isotherm systems. **Chemical Engineering Journal**, v.156, p.2-10, 2010. doi:10.1016/j.cej.2009.09.013

FORGACS, E.; CSERHÁTI, T.; OROS, G. Removal of synthetic dyes from wastewaters: a review. **Environment International**, v.30, p.953-971. 2004.

FRIEDRICH, C.G.; BARDISCHEWSKY, F.; ROTHER, D.; QUENTMEIER, A.; FISCHER, J. Prokaryotic sulfur oxidation. **Current Opinion in Microbiology**, v.8, p.253-259, 2005.

FREUNDLICH, H.M.F. Over the adsorption in solution. **The Journal of Physical Chemistry**, v.57, p.385-471, 1906.

GARNER, R.C.; MARTIN, C.N.; CLAYSON, D.B. Carcinogenic aromatic amines and related compounds. SEARLE, C.E. (Ed.) **Chemical Carcinogens**, 2. Ed. (revised and expanded) v.1, ACS Monograph 182, Washington: ACS, p.175-276, 1984.

GAVAZZA, S.; GUZMAN, J.J.L.; ANGENENT, L.T. Electrolysis within anaerobic bioreactors stimulates breakdown of toxic products from azo dye treatment. **Biodegradation**, v.26, p.151-160, 2015. doi:10.1007/s10532-015-9723-8

GODOI, L.A.G.; DAMIANOVIC, M.H.R.Z.; FORESTI, E. Sulfidogenesis interference on methane production from carbohydrate-rich wastewater. **Water Science and Technology**, v.72, n.9, p.1644-1652, 2015. doi:10.2166/wst.2015.383

GODOI, L.A.G.; FORESTI, E.; DAMIANOVIC, M.H.R.Z. Down-flow fixed structured bed reactor: an innovative reactor configuration applied to acid mine drainage treatment and metal recovery. **Journal of Environmental Management**, v.197, p.597-604, 2017. doi: 10.1016/j.jenvman.2017.04.027

GONÇALVES, I.C.; LOPES, L.; PINHEIRO, H.M.; FERRA, M.I.A. Behaviour of different anaerobic populations on the biodegradation of textile chemicals. **Journal of Hazardous Materials**, v.172, p.1236-1243. 2009.

GUARATINI, C.I.; ZANONI, M.V.B. Corantes têxteis. **Química Nova**, v.23, n.1, p.71-78. 2000.

GUO, J.; PENG, Y.; NI, B.-J.; HAN, X.; FAN, L.; YUAN, Z. Dissecting microbial community structure and methane-producing pathways of a full-scale anaerobic reactor digesting activated sludge from wastewater treatment by metagenomic sequencing. **Microbial Cell Factories**, v.14, n.33, p.1-11, 2015. doi: 10.1186/s12934-015-0218-4

HAMILTON, M. A., R. C. RUSSO, R. V. THURSTON. Trimmed Spearman-Kärber Method for Estimating Median Lethal Concentrations in Toxicity Bioassays. **Environmental Science and Technology**, v.11, n. 7, p. 714-719, 1977.

HAO, L.; BIZE, A.; CONTEAU, D.; CHAPLEUR, O.; COURTOIS, S.; KROFF, P.; QUÉMÉNER, D.-L.; BOUCHEZ, T.; MAZÉAS, L. New insights into the key microbial phylotypes of anaerobic sludge digesters under different operational conditions. **Water Research**, v.102, n.1, p.158-169, 2016. doi: 10.1016/j.watres.2016.06.014

HAO, O.J.; KIM, H.; CHIANG, P.C. Decolorization of wastewater. **Critical Reviews in Environmental Science and Technology**, v.30, n.4, p.449-505. 2000.

HARRIS, J.K.; KELLEY, S.T.; PACE, N.R. New perspective on uncultured bacterial phylogenetic division OP11. **Applied and Environmental Microbiology**, v.70, n.2, p.845-849, 2004. doi:10.1128/AEM.70.2.845-849.2004.

HAUG, W.; SCHMIDT, A.; NORTEMANN, B.; HEMPEL, D.C.; STOLZ, A.; KNACKMUSS, H.J. Mineralisation of the sulphonated azo dye Mordant Yellow 3 by a 6-aminonaphthalene-2-sulphonate degrading bacterial consortium. **Applied and Environmental Microbiology**, v.57, p.91-94. 1991.

HE, Z.; CAI, C.; WANG, J.; XU, X.; ZHENG, P.; JETTEN, M.S.M.; HU, B. A novel denitrifying methanotroph of the NC10 phylum and its microcolony. **Scientific Reports**, v.6, n.32241, 2016. doi:10.1038/srep32241 .

HECHT, S.S.; EL-BAYOUMY, K.; RIVENSON, A.; FIALA, E. Comparative carcinogenicity of ortho-toluidine hydrochloride and ortho-nitrosotoluene in F344 rats. **Cancer Letters**, v.16, p.103-108, 1982.

HEIJS, S.K.; HAESE, R.R.; VAN DER WIELEN, P.W.; FORNEY, L.J.; VAN ELSAS, J.D. Use of 16S Rrna gene based clone libraries to assess microbial communities potentially involved in anaerobic methane oxidation in a Mediterranean cold seep. **Microbial Ecology**, v.53, p.384-398, 2007.

HERNANDEZ-EUGENIO, G.; FARDEAU, M-L.; PATEL, B.K.C.; MACARIE, H.; GARCIA, J-L.; OLLIVIER, B. *Desulfovibrio mexicanus* sp. nov., a sulfate-reducing bacterium isolated from an upflow anaerobic sludge blanket (UASB) reactor treating cheese wastewaters. **Anaerobe**, v.6, p.305-312, 2000. doi:10.1006/anae.2000.0354

HERNANDÉZ-ZAMORA, M.; MARTÍNEZ-JERÓNIMO, F.; CRISTIANI-URBINA, E.; CAÑIZARES-VILLANUEVA, R.O. Congo red dye affects survival and reproduction in the cladoceran *Ceriodaphnia dubia*. Effects of direct and dietary exposure. **Ecotoxicology**, v.25, p.1832-1840, 2016. doi:10.1007/s10646-016-1731-x

HIGA, M. **Aplicação de ensaios de toxicidade na avaliação da eficiência da radiação ionizante e da adsorção em zeólitas para o tratamento de efluentes coloridos**. 2008. 93 f. Dissertação (Mestrado em Ciências na Área de Tecnologia Nuclear) – Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

HU, Y.; GUO, T.; YE, X.; LI, Q.; GUO, M.; LIU, H.; WU, Z. Dye adsorption by resins: Effect of ionic strength on hydrophobic and electrostatic interactions. **Chemical Engineering Journal**, v.228, p.392-397. 2013.

HUYSMAN, P.; van MEENEN, P.; van ASSCHE, P.; VERSTRAETE, W. Factors affecting the colonization of non-porous and porous packing materials in model upflow methane reactors. **Biotechnology Letters**, v.5, n.9, p.643-648, 1983. doi:10.1007/BF00130849

IARC. Some aromatic amines, organic dyes and related exposures. **IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans**. Lyon, France: World Health Organization Press, 2010, 658p. Disponível em: <http://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/vol99/mono99.pdf> . Acesso em 10 dezembro 2017.

IMHOFF, J.F. The Family *Chlorobiaceae*. In: ROSENBERG, E.; DELONG, E.F.; LORY, S.; STACKEBRANDT, E.; THOMPSON, F. (eds) **The Prokaryotes**. Springer, Berlin, Heidelberg. 2014.

ISIK, M.; SPONZA, D.T. Biological treatment of acid dyeing wastewater using a sequential anaerobic/aerobic reactor system. **Enzyme and Microbial Technology**, v.38, p.887-892, 2006.

JI, S-Q.; MENG, D-D.; ZHANG, K-D.; LI, F-L. Diversity of thermophilic microorganisms and their roles in carbon cycle. In: LI, F-L (eds) **Thermophilic Microorganisms**. Caister Academic Press, Qingdao. 2015. doi: 10.21775/9781910190135.01

JONSTRUP, M.; KUMAR, N.; MURTO, M.; MATTIASSON, B. Sequential anaerobic-aerobic treatment of azo dyes: decolourisation and amine degradability. **Desalination**, v.280, p.339-346, 2011. doi:10.1016/j.desal.2011.07.022

KAPDAN, I.K.; OZTEKIN, R. The effect of hydraulic residence time and initial COD concentration on color and COD removal performance of the anaerobic-aerobic SBR system. **Journal of Hazardous Materials**, B136, p.896-901. 2006.

KAPDAN, I.K.; TEKOL, M.; SENGUL, F. Decolorization of simulated textile wastewater in an anaerobic aerobic sequential treatment system, **Process Biochem.**, v.38, p.1031–1037. 2003.

KARATAS, M.; DURSUN, S.; ARGUN, M.E. Anaerobic-aerobic sequential system treatment of azo dye Reactive Red 24. **Environmental Progress & Sustainable Energy**, v.30, n.1, p50-58, 2011. doi: 10.1002/ep.10449

KATAYAMA, S.; FIALA, E.; REDDY, B.S.; RIVENSON, A.; SILVERMAN, J.; WILLIAMS, G.M.; WEISBURGER, J.H. Prostate adenocarcinoma in rats: induction by 3,2'-dimethyl-4-aminobiphenyl. **Journal of the National Cancer Institute**, v.68, p.867-873, 1982.

KECK, A.; KLEIN, J.; KUDLICH, M.; STOLZ, A.; KNACKMUSS, H-J.; MATTES, R. Reduction of azo dyes by redox mediators originating in the naphthalenesulfonic acid degradation pathway of *Sphingomonas* sp. Strain BN6. **Applied and Environmental Microbiology**, v.63, n.9, 1997.

KERTESZ, M.A. Riding the sulfur cycle – metabolism of sulfonates and sulfate esters in gram-negative bacteria. **FEMS Microbiology Reviews**, v.24, p.135-175, 1999.

KHELIFI, E.; GANNOUN, H.; TOUHAMI, Y.; BOUALLAGUI, H.; HAMDI, M. Aerobic decolorization of the indigo dye-containing textile wastewater using continuous combined bioreactors. **Journal of Hazardous Materials**, v.152, p.683-689. 2008.

KIM, S-Y.; AN, J-Y.; KIM, B-W. The effects of reductant and carbon source on the microbial decolorization of azo dyes in an anaerobic sludge process. **Dyes and Pigments**, v.76, p.256-263, 2008. doi: 10.1016/j.dyepig.2006.08.042

KINDAICHI, T.; YAMAOKA, S.; UEHARA, R.; OZAKI, N.; ALBERTSEN, M.; NIELSEN, P.H.; NIELSEN, J.L. Phylogenetic diversity and ecophysiology of candidate phylum Saccharibacteria in activated sludge. **FEMS Microbiology Ecology**, v.92, n.6, fiw078, 2016. doi:10.1093/femsec/fiw078 .

KOIVISTO, S. Is *Daphnia magna* an ecologically representative zooplankton species in toxicity tests? **Environmental Pollution**, v.90, n.2, p.263-267, 1995

KOKABIAN, B.; BONAKDARPOUR, B.; FAZEL, S. The effect of salt on the performance and characteristics of a combined anaerobic-aerobic biological process for the treatment of synthetic wastewaters containing Reactive Black 5. **Chemical Engineering Journal**, v.221, p.363-372, 2013. doi: 10.1016/j.cej.2013.01.101

KOUPAIE, E.H.; MOGHADDAM, M.R.A.; HASHEMI, S.H. Investigation of decolorization kinetics and biodegradation of azo dye Acid Red 18 using sequential process of anaerobic sequencing batch reactor/moving bed sequencing batch biofilm reactor. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v.71, p.43-49, 2012. doi:10.1016/j.ibiod.2012.04.002

KUDLICH, M.; KECK, A.; KLEIN, J.; STOLZ, A. Localization of the enzyme system involved in anaerobic reduction of azo dyes by *Sphingomonas* sp. Strain BN6 and effect of artificial redox mediators on the rate of azo dye reduction. **Applied and Environmental Microbiology**, v.63, n.9, p.3691-3694, 1997.

KUEVER, J. The Family *Desulfovibrionaceae*. In: ROSENBERG E., DELONG E.F., LORY S., STACHEBRANDT E., THOMPSON F. (eds) **The Prokaryotes**. Berlin: Springer, Heidelberg. 2014a.

KUEVER, J. The Family *Syntrophobacteraceae*. In: ROSENBERG, E.; DELONG, E.F.; LORY, S.; STACHEBRANDT, E.; THOMPSON, F. (eds) **The Prokaryotes**. Springer, Berlin, Heidelberg. 2014b.

KULKARNI, B.; FIALA, E.S.; WEISBURGER, J.H. Estimation of N-hydroxy-ortho-toluidine, a urinary metabolite of ortho-toluidine and ortho-nitrosotoluene, by high performance liquid chromatography with electrochemical detection. **Carcinogenesis**, v.4, p.1275-1279, 1983.

KUMAR, M.R.; SARAVANAN, V.S.; Candidate OP phyla: Importance, ecology and cultivation prospects. **Indian Journal of Microbiology**, v.50, n.4, p.474-477, 2010. doi:10.1007/s12088-011-0144-z

KURODA, K.; NOBU, M.K.; MEI, R.; NARIHIRO, T.; BOCHER, B.T.W.; YAMAGUCHI, T.; LIU, W-T. A single-granule-level approach reveals ecological heterogeneity in an upflow anaerobic sludge blanket reactor. QUAN, Z-X. (Ed). **PLoS ONE**, v.11, n.12, e0167788, 2016. doi:10.1371/journal.pone.0167788 .

LAITANO, K. S.; MATIAS, W. G.; Testes de Toxicidade com *Daphnia magna*: Uma Ferramenta para Avaliação de um Reator Experimental UASB. **Journal of the Brazilian Society of Ecotoxicology**, v. 01, n.1, p. 43-47, 2006.

LAPPONI, J.C. Estatística: usando Excel 5 e 7. São Paulo: Lapponi, 1997. 420p.

LAUE, H.; DENGGER, K.; COOK, A.M. Taurine reduction in anaerobic respiration of *Bilophila wadsworthia* RZATAU. **Applied and Environmental Microbiology**, v.63, p.2016-2021, 1997.

LEE, S.H.; PARK, J-H.; KIM, S.H.; YU, B.J.; YOON, J.J.; PARK, H.D. Evidence of syntrophic acetate oxidation by *Spirochaetes* during anaerobic methane production. **Bioresource Technology**, v.190, p.543-549, 2015. doi:10.1016/j.biortech.2015.02.066

LEE, S.H.; PARK, J.H.; KANG, H.J.; LEE, Y.H.; LEE, T.J.; PARK, H.D. Distribution and abundance of *Spirochaetes* in full-scale anaerobic digesters. **Bioresource Technology**, v.145, p.25-32, 2013. doi: 10.1016/j.biortech.2013.02.070

LELOUP, J.; LOY, A.; KNAB, N.J.; BOROWSKI, C.; WAGNER, M.; JØRGENSEN, B.B. Diversity and abundance of sulfate-reducing microorganisms in the sulfate and methane zones of a marine sediment, Black Sea. **Environmental Microbiology**, v.9, n.1, p.131-142, 2007. doi:10.1111/j.1462-2920.2006.01122.x

LENS, P.N.L.; VISSER, A.; JANSSEN, A.J.H.; HULSHOFF POL, L.W.; LETTINGA, G. Biotechnological treatment of sulfate-rich wastewaters. **Critical Reviews in Environmental Science and Technology**, v.28, n.1, p.41-88, 1988. doi:10.1080/10643389891254160

LETTINGA, G. Anaerobic digestion and wastewater treatment systems. **Antoine van Leeuwenhoek**, v.67, p.3-28, 1995. doi: 10.1007/BF00872193

LIE, T.J.; CLAWSON, M.J.; GODCHAUX, W.; LEADBETTER, E.R. Sulfidogenesis from 2-aminoethanesulfonate (taurine) fermentation by a morphologically unusual sulfate-reducing bacterium, *Desulforhopalus singaporensis* sp. nov. **Applied and Environmental Microbiology**, v.65, n.8, p.3328-3334, 1999.

LIE, T.J.; LEADBETTER, J.R.; LEADBETTER, E.R. Metabolism of sulfonic acids and other organosulfur compounds by sulfate-reducing bacteria. **Geomicrobiology Journal**, v.15, p.135-149, 1998.

LIMAN, R.D.; CHOUARI, R.; MAZÉAS, L.; WU, T.-D.; LI, T.; GROSSIN-DEBATTISTA, J.; GUERQUIN-KERN, J.-L.; SAIDI, M.; LANDOULSI, A.; SGHIR, A.; BOUCHEZ, T. Members of the uncultured bacterial candidate division WWE1 are implicated in anaerobic digestion of cellulose. **MicrobiologyOpen**, v.3, n.2, p.157-167, 2014. doi:10.1002/mbo3.144

LIMOUSIN, G.; GAUDET, J.-P.; CHARLET, L.; SZENKNECT, S.; BARTHÈS, V.; KRIMISSA, M. Sorption isotherms: A review on physical bases, modelling and measurement. **Applied Geochemistry**, v.22, p.249-275, 2007. doi:10.1016/j.apgeochem.2006.09.010

LIN, J.; ZHANG, X.; LI, Z.; LEI, L. Biodegradation of Reactive blue 13 in a two-stage anaerobic/aerobic fluidized beds system with a *Pseudomonas* sp. isolate. **Bioresource Technology**, v.101, p.34-40, 2010. Doi:10.1016/j.biortech.2009.07.037

LIPUS, D.; VIKRAM, A.; ROSS, D.; BAIN, D.; GULLIVER, D.; HAMMACK, R.; BIBBY, K. Predominance and Metabolic Potential of Halanaerobium spp. in Produced Water from Hydraulically Fractured Marcellus Shale Wells. *Applied and Environmental Microbiology*, v.83, n.8, e02659-16, 2017. doi:10.1128/AEM.02659-16

LIU, G.; ZHOU, J.; CHEN, C.; WANG, J.; JIN, R.; LV, H. Decolorization of azo dyes by *Geobacter metallireducens*. **Environmental Biotechnology**, v.97, p.7935-7942, 2013. doi: 10.1007/s00253-012-4545-7

LIU, Y.; LIU, H.; CUI, L.; ZHANG, K. The ratio of food-to-microorganism (F/M) on membrane fouling of anaerobic membrane bioreactors treating low strength wastewater. **Desalination**, v.297, p.97-103, 2012. doi:10.1016/j.desal.2012.04.026

LOBOS, J.; WISNIEWSKI, C.; HERAN, M.; GRASMICK, A. Effects of starvation conditions on biomass behavior for minimization of sludge production in membrane bioreactors. **Water Science and Technology**, v.51, p.35-44, 2005.

LÖSEKANN, T.; KNITTEL, K.; NADALIG, T.; FUCHS, B.; NIEMANN, H.; BOETIUS, A.; AMANN, R. Diversity and abundance of aerobic and anaerobic methane oxidizers at the Haakon Mosby Mud Volcano, Barents Sea. **Applied and Environmental Microbiology**, v.73, n.10, p.3348-3362, 2007. doi:10.1128/AEM.00016-07

LU, X.; ZHEN, G.; NI, J.; HOJO, T.; KUBOTA, K.; LI, Y-Y. Effect of influente COD/SO₄²⁻ ratios on biodegradation behaviors of starch wastewater in an upflow anaerobic sludge blanket (UASB) reactor. **Bioresource Technology**, v.214, p.175-183, 2016. doi: 10.1016/j.biortech.2016.04.100

LU, X.; LIU, L.; YANG, B.; CHEN, J. Reuse of printing and dyeing wastewater in processes assessed by pilot-scale test using combined biological process and sub-filter technology. **Journal of Cleaner Production**, v.17, p.111-114, 2009. doi:10.1016/j.jclepro.2008.03.003

LUO, J-F.; LIN, W-T.; GUO, Y. Functional genes based analysis of sulfur-oxidizing bacteria community in sulphide removing bioreactor. **Applied Microbiology Biotechnology**, v.90, p.769-778, 2010. doi:101007/s00253-010-3061-x

MADIGAN, M.T.; MARTINKO, J.M.; BENDER, K.S.; BUCKLEY, D.H.; STAHL, D.A. **Brock Biology of Microorganisms**. 14th ed. London: Pearson Education, 2014. 1032p.

MAH, R.A.; SMITH, M.R. The methanogenic bacteria. In: STARR, M.P.; STOLP, H.; TRUEPER, H.G.; BELOWS, A.; SCHLEGEL, H.G (Eds.). **The Procaryotes. A Handbook of Habitats, Isolation and Identification of Bacteria**. Berlin: Springer Verlag, 1981. p.948-977.

MARTÍNEZ-HUITLE, C.A.; BRILLAS, E. Decontamination of wastewaters containing synthetic organic dyes by electrochemical methods: A general review. **Applied Catalysis B: Environmental**, v.87, p.105-145. 2009.

MASTRORILLI, E. **Diversity indices and normalization approaches in microbiome studies**. 2014. 116 f. Dissertação (Mestrado em Bioengenharia). Universidade de Pádua, Itália, 2014.

MATA-ALVAREZ, J.; MACE, S.; LLABRES, P. Anaerobic digestion of organic solid wastes: An overview of research achievements and perspectives. **Bioresource technology**, v.74, p.3-16. 2000.

MECHSNER, K.; WUHRMANN, K. Cell permeability as a rate limiting factor in the microbial reduction of sulphonated azo dyes. **European Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.38, p.123-126. 1982.

MELO, A.S. O que ganhamos “confundindo” riqueza de espécies e equabilidade em um índice de diversidade? **Biota Neotropica**, v.8, n.3, p.21-27, 2008.

MENDÉZ-PAZ, D.; OMIL, F.; LEMA, J.M. Anaerobic treatment of azo dye Acid Orange 7 under batch conditions. **Enzyme and Microbial Technology**, v.36, p.264-272, 2005. doi:10.1016/j.enzmictec.2004.08.039

MENEZES, O.L.M.P.F. **influência da microaeração descontínua sobre a remoção de cor e matéria orgânica de efluentes contendo corante azo**. 2016. 72 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Civil) – Departamento de Engenharia Civil, Universidade Federal de Pernambuco, Pernambuco, 2016.

MISHRA, G.; TRIPATHY, M. A critical review of the treatments of decolorization of textile effluent. **Colourage**, v.40, p.35-38, 1993.

MOCKAITIS, G.; PANTOJA, J.L.R.; RODRIGUES, J.A.D.; FORESTI, E.; ZAIAT, M. Continuous anaerobic bioreactor with a fixed-structure bed (ABFSB) for wastewater treatment with low solids and low applied organic loading content. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v.37, p.1361-1368, 2014.

MONJE, P.G.; GONZÁLEZ-GARCIA, S.; MOLDES, S.; VIDAL, T.; ROMERO, J.; MOREIRA, M.T., FEIJOO, G. Biodegradability of kraft mill TGF biobleaching effluents: application of enzymatic laccase-mediator system. **Water Research**, v.44, p.2211-2220, 2010. doi:10.1016/j.watres.2009.12.047

MOREIRA, R.L. **Fungos endofíticos e epifíticos associados às folhas de cacauzeiro**. 2014. 47 f. Trabalho de conclusão de curso (bacharelado - Ciências Biológicas) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Rio Claro, 2014.

MOURA, R.B.; DAMIANOVIC, M.H.R.Z.; FORESTI, E. Nitrogen and carbon removal from synthetic wastewater in a vertical structured-bed reactor under intermittent aeration. **Journal of Environmental Management**, v.98, p.163-167, 2012.

MURALI, V.; ONG, HO, L-N.; WONG, Y-S. Evaluation of integrated anaerobic-aerobic biofilm reactor for degradation of azo dye methyl orange. **Bioresource Technology**, v.143, p.104-111, 2013. doi: 10.1016/j.biortech.2013.05.122

MURTEY, M.D.; RAMAMSAMY, P. Sample preparations for scanning electron microscopy - Life Sciences, Modern Electron Microscopy in Physical and Life Sciences. JANECEK, M. (Ed). **InTech**, 2016. doi:10.5772/61720

MUYZER, G.; STAMS, A.J.M. The ecology and biotechnology of sulphate-reducing bacteria. **Nature Reviews Microbiology**, v.6, p.441-454, 2008. doi:10.1038/nrmicro1892

NELSON, W.C.; STEGEN, J.C. The reduced genomes of Parcubacteria (OD1) contain signatures of a symbiotic lifestyle. **Frontiers in Microbiology**, v.6, 713, 2015. doi:10.3389/fmicb.2015.00713

NING, Y-Y.; JIN, D-W.; SHENG, G-P.; HARADA, H.; SHI, X-Y. Evaluation of the stability of hydrogen production and microbial diversity by anaerobic sludge with chloroform treatment. **Renewable Energy**, v.38, n.1, p.253-257, 2012.

NITSCHKE, M.; PASTORE, G.M. Biosurfactantes: Propriedades e aplicações. **Química Nova**, v.25, p.772-776. 2002.

NOBU, M.K.; DODSWORTH, J.A.; MURUGAPIRAN, S.K.; RINKE, C.; GIES, E.A.; WEBSTER, G.; SCHWIENTEK, P.; KILLE, P.; PARKES, R.J.; SASS, H.; JØRGENSEN, B.B.; WEIGHTMAN, A.J.; LIU, W.T., HALLAM, S.J.; TSIAMIS, G.; WOYKE, T.; HEDLUND, B.P. Phylogeny and physiology of candidate phylum ‘Atribacteria’ (OP9/SJ1) inferred from cultivation independent genomics. **The ISME Journal**, v.10, n.2, p.273-289, 2016. doi:10.1038/ismej.2015.97 .

NOBU, M.K.; NARIHIRO, T.; RINKE, C.; KAMAGATA, Y.; TRINGE, S.G.; WOYKE, T.; LIU, W-T. Microbial dark matter ecogenomics reveals complex synergistic networks in a methanogenic bioreactor. **The ISME Journal**, v.9, n.8, p.1710-1722, 2015. doi:10.1038/ismej.2014.256 .

NOCKO, L.M. **Remoção de carbono e nitrogênio em reator de leito móvel submetido a aeração intermitente**. Dissertação (Mestrado em Ciências – Área de Engenharia Hidráulica e Saneamento) - Escola de Engenharia de São Carlos, Departamento de Hidráulica e Saneamento, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2008.

NOGALES, B.; MOORE, E.R.B.; LLOBET-BROSSA, E.; ROSSELLO-MORA, R.; AMANN, R. TIMMIS, K.N. Combined use of 16S ribosomal DNA and 16S rRNA to study the bacterial community of polychlorinated biphenyl-polluted soil. **Applied and Environmental Microbiology**, v.67, n.4, p.1874-1884, 2001. doi:10.1128/AEM.67.4.1874-1884.2001 .

ØLLGAARD, H.; FROST, L.; GALSTER, J.; HANSEN, O.C. **Survey of azo-colorants in Denmark**. Miljøprojekt 509. Danish EPA. 1999.

O’NEILL, C.; HAWKES, F.R.; HAWKES, D.L.; LOURENÇO, N.D.; PINHEIRO, H.M.; DELÉE, W. Review colour in textile effluent – sources, measurement, discharge consents and simulation: a review. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v.74, p.1009-1018. 1999.

OOSTERKAMP, M.J.; MÉNDEZ-GARCIA, C.; KIM, C-H.; BAUER, S.; IBÁÑEZ, A.B.; ZIMMERMAN, S.; HONG, P-Y.; CANN, I.K.; MACKIE, R.I. Lignocellulose-derived thin stillage composition and efficient biological treatment with a high-rate hybrid anaerobic bioreactor system. **Biotechnology for biofuels**, v.9, n.1, p.1-15. 2016. doi: dx.doi-org.ez33.periodicos.capes.gov.br/10.1186/s13068-016-0532-z

OZDEMIR, S.; CIRIK, K.; AKMAN, D.; SAHINKAYA, E.; CINAR, O. Treatment of azo dye-containing synthetic textile dye effluent using sulfidogenic anaerobic baffled reactor. **Bioresource Technology**, v.146, p.135-143, 2013. doi:10.1016/j.biortech.2013.07.066 .

PARKIN, Gene F.; OWEN, William F. Fundamentals of anaerobic digestion of wastewater sludges. **Journal of Environmental Engineering**, v.112, n.5, p.867-920. 1986.

PATI, A.; SIKORSKI, J.; GRONOW, S.; MUNK, C.; LAPIDUS, A.; COPELAND, A.; TIO, T.G.D.; NOLAN, M.; LUCAS, S.; CHEN, F.; TICE, H.; CHENG, J-F.; HAN, C.; DETTER, J.C.; BRUCE, D.; TAPIA, R.; GOODWIN, L.; PITLUCK, S.; LIOLIOS, K.; IVANOVA, N.; MAVROMATIS, K.; MIKHAILOVA, N.; CHEN, A.; PALANIAPPAN, K.; LAND, M.; HAUSER, L.; CHANG, Y-J.; JEFFRIES, C.D.; SPRING, S.; ROHDE, M.; GÖKER, M.; BRISTOW, J.; EISEN, J.Q.; MARKOWITZ, V.; HUGENHOLTZ, P.; KYRPIDES, N.C.; KLENK, H.-P. Complete genome sequence of *Brachyspira murdochii* type strain (56-150^T). **Standards in Genomic Sciences**, v.2, n.3, p.260–269, 2010. doi:10.4056/sigs.831993

PEARCE, C.I.; GUTHRIE, J.T.; LLOYD, J.R. The reduction of coloured compounds using whole bacterial cells (*Shewanella* strain J18 143). **Environmental Biotechnology ESEB 2004**. Taylor & Francis Group: London. p. 277-280. 2004. Disponível em: <https://goo.gl/9uXXNj>. Acesso em: 14 agosto 2015.

PEARCE, C.I.; LLOYD, J.R.; GUTHRIE, J.T. The removal of colour from textile wastewater using whole bacterial cells: a review. **Dyes and Pigments**, v.58, p.179-196, 2003. doi:10.1016/S0143-7208(03)00064-0

PEKAKIS, P.A.; XEKOUKOULOTAKIS, N.P.; MANTZAVINOS, D. Treatment of textile dyehouse wastewaters by TiO₂ photocatalysis. **Water Research**, v.40, p.1276-1286. 2006.

PESCOD, M. Wastewater treatment and use in agriculture – FAO irrigation and drainage paper 47. Roma: Food and Agriculture Organization of the United Nations, 1992. Disponível em: <http://www.fao.org/docrep/t0551e/t0551e00.htm#Contents> . Acesso em: 09 abril 2018.

PICENO, Y.M.; REID, F.R.; TOM, L.M.; CONRAD, M.E.; BILL, M.; HUBBARD, C.G.; FOUKE, B.W.; GRAFF, C.J.; HAN, J.; STRINGFELLOW, W.T.; HANLON, J.S.; HU, P.; HAZEN, T.C.; ANDERSEN, G.L. Temperature and injection water source influence microbial community structure in four Alaskan North Slope hydrocarbon reservoirs. **Frontiers in Microbiology**, v.5, n.409, 2014. doi:10.3389/fmicb.2014.00409

PINHEIRO, H.M.; TOURAUD, E.; THOMAS, O. Aromatic amines from azo dye reduction: status review with emphasis on direct UV spectrophotometric detection in textile industry wastewaters. **Dyes and Pigments**, v.61, p.121-139, 2004.

PINTO, R.O.; BELLI FILHO, P.; SOARES, H.M.; MEDEIROS, N.R.; MATIAS, W.G.; WESTPHAL, R.M. Tratamento anaeróbio de resíduos sólidos urbanos e lodos de tanques sépticos utilizando reator em fase semi-sólida seguido de reator anaeróbio fluxo ascendente com manta de lodo. In: **Anais 22º Congresso Brasileiro de Engenharia Sanitária e Ambiental**, Joinville, Santa Catarina. 2003. Disponível em: <http://www.bvsde.paho.org/bvsacd/abes22/dlxxvi.pdf>. Acesso em 12 maio 2015.

PLAS, C.; HARANT, H.; DANNER, H.; JELINEK, E.; WIMMER, K.; HOLUBAR, P.; BRAUN, R. Ratio of biological and chemical oxidation during the aerobic elimination of sulphide by colourless sulphur bacteria **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.36, p.817-822. 1992.

PLATZEK, T.; LANG, G.; GROHMANN, G.; GI, U-S; BALTES, W. Formation of a carcinogenic aromatic amine from an azo dye by human skin bacteria. **Human and Experimental Toxicology**, v.18, p.552-559, 1999.

PLUMB, J.J.; BELL, J.; STUCKEY, D. Microbial populations associated with treatment of an industrial dye effluent in an anaerobic baffled reactor. **Applied and Environmental Microbiology**, v.67, n.7, p.3226-3235. 2001.

PRATO-GARCIA, D.; CERVANTES, F.J.; BUITRÓN, G. Azo dye decolorization assisted by chemical and biogenic sulfide, **Journal of Hazardous Materials**, v.250-251, p.462-468, 2013. doi:10.1016/j.hazmat.2013.02.025 .

PRIGIONE, V.; TIGINI, V.; PEZZELLA, C.; ANASTASI, A.; SANNIA, G.; VARESE, G.C. Decolourisation and detoxification of textile effluents by fungal biosorption. **Water Research**, v.42, p.2911-2920. 2008.

PUNZI, M.; ANBALAGAN, A.; BÖRNER, R.A.; SVENSOON, B-T.; JONSTRUP, M.; MATTIASSON, B. Degradation of a textile azo dye using biological treatment followed by photo-fenton oxidation: Evaluation of toxicity a microbial community. **Chemical Engineering Journal**, v.270, p.290-299, 2015. doi:10.1016/j.cej.2015.02.042 .

PURKAIT, M.; DASGUPTA, S.; DE, S. Adsorption of eosin dye on activated carbon and its surfactant based desorption. **Journal of Environmental Management**, v.76, n.2, p.135-142, 2005. doi:10.1016/j.jenvman.2005.01.012

RADOLF J.D. Treponema. In: BARON S, editor. **Medical Microbiology**. 4th edition. Galveston (TX): University of Texas Medical Branch at Galveston; 1996. Chapter 36. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK7716/>. Acesso em: 20 fev 2018

RASOOL, K.; SHAHZAD, A.; LEE, D.S. Exploring the potential of anaerobic sulfate reduction process in treating sulfonated diazo dye: Microbial community analysis using bar-coded pyrosequencing. **Journal of Hazardous Materials**, v.318, p.641-649, 2016. Doi: 10.1016/j.jhazmat.2016.07.052

RASOOL, K.; WOO, S.H.; LEE, D.S. Simultaneous removal of COD and Direct Red 80 in a mixed anaerobic sulfate-reducing bacteria culture. **Chemical Engineering Journal**, v.223, p.611-616, 2013. doi:10.1016/j.cej.2013.03.031

RATUSZNEI, S.M.; RODRIGUES, J.A.D.; CAMARGO, E.F.M.; ZAIAT, M.; BORZANI, W. Feasibility of a stirred anaerobic sequencing batch bioreactor containing immobilized biomass for wastewater treatment. **Water Science and Technology**, v.75, p.127-132, 2000.

REDDY, B.S.; MORI, H.; Effect of dietary wheat bran and dehydrated citrus fiber on 2'-3'-dimethyl-4-aminobiphenyl- induced intestinal carcinogenesis in F344 rats. **Carcinogenesis**, v.2, p.21-25, 1981.

REMOUNDAKI, E.; KOUSI, P.; JOULIAN, C.; BATTAGLIA-BRUNET, F.; HATZIKIOSEYIAN, A.; TSEZOS, M. Characterization, morphology and composition of biofilm and precipitates from a sulphate-reducing fixed-bed reactor. **Journal of Hazardous Materials**, v.153, p.514-524, 2008. doi:10.1016/j.hazmat.2007.08.094 .

REYES III, F.L.; DAGUE, R.R. Effects of initial seed concentration on the startup of the anaerobic sequencing batch reactor. In: 50th Purdue Industrial Waste Conference Proceedings. Chelsea: Ann Arbor Press, p.449-459, 1995.

RINTALA, J.A.; PUHAKKA, J.A. Anaerobic treatment in pulp- and paper-mill waste management: a review. **Bioresource Technology**, v.47, p.1–18, 1994.

RIPLEY, L.E.; BOYLE, W.C.; CONVERSE, J.C. Improved alkalimetric monitoring for anaerobic digestion of high-strength wastes. **Journal of the Water Pollution Control Federation**, v.58, n.5, p.406-411, 1986.

ROBINSON, T.; McMULLAN, G.; MARCHANT, R.; NIGAM, P. Remediation of dyes in textile effluent: a critical review on current treatment technologies with a proposed alternative. **Bioresource Technology**, v.77, P.247-255. 2001.

RODRIGUES, J.A.R. Ligações hidrogênio fortes em ácidos dicarboxílicos e diaminas aromáticas. **Química Nova**, v.23, n.6, p.812-817, 2000.

ROGERO, S.O.; LUGÃO, A.B.; IKEDA, T.I.; CRUZ, A.S. Teste in vitro de citotoxicidade: Estudo comparativo entre duas metodologias. **Materials Research**, v.6, n.3, p.317-320, 2003. doi: 10.1590/S1516-14392003000300003

RÖLING, W.F.M. The Family Geobacteraceae. In: ROSENBERG, E.; DELONG, E.F.; LORY, S.; STACKEBRANDT, E.; THOMPSON, F. (eds) **The Prokaryotes**. Springer, Berlin, Heidelberg. 2014.

SABBIONI, G.; RICHTER, E. Aromatic amines, nitarenes and heterocyclic aromatic amines. In: MARQUARDT, H.; SCHAFER, S.G.; McCLELLAN, R.; WELSCH, F. (Eds.). **Toxicology**. San Diego: Academic Press, 1990, p.729-741.

SAHINKAYA, E.; HASAR, H.; KAKSONEN, A.H.; RITMANN, B.E. Performance of a sulfide-oxidizing, sulfur-producing membrane biofilm reactor treating sulfide-containing bioreactor effluent. **Environmental Science and Technology**, v.45, p.4080-4087, 2011. doi:10.1021/es201140c

SALLEH, M.A.M.; MAHMOUD, D.K.; KARIM, W.A.W.A.; IDRIS, A. Cationic and anionic dye adsorption by agricultural solid wastes: a comprehensive review. **Desalination**, v.280, p.1-13, 2011. doi:10.1016/j.desal.2011.07.019

SÁNCHEZ-BAYO, F. Comparative acute toxicity of organic pollutants and reference values for crustaceans. I. Branchiopoda, Copepoda and Ostracoda. **Environmental Pollution**, v.139, p.385-420, 2006.

SANTOS, L. H. M. L. M., ARAÚJO, A. N., FACHINI, A., PENA, A., DELERUE-MATOS, C.; MONTENEGRO, M. C. B. S. M. Ecotoxicological aspects related to the presence of pharmaceuticals in the aquatic environment. **Journal of Hazardous Materials**, v.175, n.1-3, p.45 - 95, 2010.

SARTI, A.; POZZI, E.; CHINALIA, F.A.; ONO, A.; FORESTI, E. Microbial processes and bacterial populations associated to anaerobic treatment of sulfate-rich wastewater. **Process Biochemistry**, v.45, p.164-170, 2010.

SASAKI, H.; SASAKI, T.; NAKAI, Y. Ammonia-assimilating microbes in the animal waste treatment systems. **Journal of integrated Field Science**, v.2, pag.95-106, 2005.

SCHIMIDT, O.; HINK, L.; HORN, M.A.; DRAKE, H. Peat: home to novel syntrophic species that feed acetate- and hydrogen- scavenging methanogens. **The ISME Journal**, v.10, p.1954-1966, 2016.

SCHLÖTELBURG, C. Microbial diversity and dynamic in a 1,2-dichloropropane dechlorinating mixed culture. 2001. 126 f. Tese (Doutorado) – Humboldt-University, Berlin, Alemanha. Disponível em: <https://edoc.hu-berlin.de/handle/18452/15330> Acesso em: 20 fev 2018.

SESHADRI, S.; BISHOP, P.L.; AGHA, A.M. Anaerobic/aerobic treatment of selected azo dyes in wastewater. **Waste Management**, v.14, n.2, p.127-137, 1994.

SHAUL, G.M.; HOLDSWORTH, T.J.; DEMPSEY, C.R.; DOSTAL, K.A. Fate of water soluble azo dyes in the activated sludge process. **Chemosphere**, v.22, p.107-119, 1991.

SHAW, C.B.; CARLIELL, C.M.; WHEATLEY, A.D. Anaerobic/aerobic treatment of coloured textile effluents using sequencing batch reactors. **Water Research**, v.36, p.1993-2001, 2002.

SHORE, J. Advances in direct dyes. **Indian Journal of Fibre and Textile Research**, v.21, p.1-29, 1996.

SILVA, C.P. **Tratamento anaeróbio de efluente têxtil: Toxicidade a organismos metanogênicos e interferência dos íons sulfato e sulfeto no processo de descoloração**. 2016. 163 f. Tese (Doutorado em Engenharia Civil) – Departamento de Engenharia Civil, Universidade Federal de Pernambuco, Pernambuco, 2016.

SILVA, M. E. R.; FIRMINON, P.I.M.; SOUSA, M.R.; DOS SANTOS, A.B. Sequential anaerobic/aerobic treatment of dye-containing wastewaters: Colour and COD removals, and ecotoxicity tests. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.166, p.1057-1069, 2012. Doi:10.1007/s12010-011-9493-7 .

SILVA, R. B. **Oxidação biológica de sulfeto visando a recuperação de enxofre elementar, a partir de águas residuárias sulfurosas**. 2011. 47 p. Monografia (Trabalho de Graduação). Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

SILVA, A.J.; HIRASAWA, J.S.; VARESCHE, M.B.; FORESTI, E.; ZAIAT, M. Evaluation of support materials for the immobilization of sulfate-reducing bacteria and methanogenic archaea. **Anaerobe**, v.12, p.93-98, 2006. doi:10.1016/j.anaerobe.2005.12.003

SILVEIRA NETA, J. J. **Remoção de corantes em efluentes têxteis utilizando espumas de poliuretano e resíduos de sementes de *Mabea fistulifera* Mart.** 2009. 92f. Dissertação (Mestrado em Agroquímica) Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, 2009.

SINGH, S.P.; PRERNA, P. Review of recent advances in anaerobic packed-bed biogas reactors. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v.13, n.6-7, p.1569-1575, 2009. doi: 10.1016/j.rser.2008.08.006

SÓLIS, M.; SOLÍS, A. PÉREZ, H.I.; MANJARREZ, N.; FLORES, M. Microbial decolouration of azo dyes: A review. **Process Biochemistry**, v.47, p.1723-1748, 2012.

SONG, N.; CAI, H-Y.; YAN, Z-S.; JIANG, H-L. Cellulose degradation by one mesophilic strain *Caulobacter* sp. FMC1 under both aerobic and anaerobic conditions. **Bioresource Technology**, n.131, p.281-287, 2013.

SOUTO, T.F.; AQUINO, S.F.; SILVA, S.Q.; CHERNICHARO, C.A.L. Influence of incubation conditions on the specific methanogenic activity test. **Biodegradation**, v.21, p.411-424, 2010. doi:10.1007/s10532-009-9311-x .

SPAGNI, A.; CASU, S.; GRILLI, S. Decolourisation of textile wastewater in a submerged anaerobic membrane bioreactor. **Bioresource Technology**, v.117, p.180-185, 2012. doi:10.1016/j.biortech.2012.04.074

SPEECE, R.E. **Anaerobic Biotechnology for Industrial Wastewaters**. Nashville: Archae Press. 1996

SPONZA, D.T.; ISIK, M. Decolorization and azo dye degradation by anaerobic/aerobic sequential process, **Enzyme Microb. Technol.**, v.31, p.102–110. 2002.

SUPAKA, N.; JUNTONGJIN, K.; DAMRONGLERD, S.; DELIA, M.L.; STREHAIANO, P. Microbial decolorization of reactive azo dyes in a sequential anaerobic–aerobic system, **Chem. Eng. J.**, v. 99 p.169–176. 2004.

SYUTSUBO, K.; SINTHURAT, N.; OHASHI, A.; HARADA, H. Population dynamics of anaerobic microbial consortia in thermophilic granular sludge in response to feed composition change. **Water Sci. Technol.**, v.43, p.59–66. 2001.

THIERRY, S.; MACARIE, H.; LIZUKA, T.; GEIßDÖRFER, W.; ASSIH, E.A.; SPANEVELLO, M.; VERHE, F.; THOMAS, P.; FUDOU, R.; MONROY, O.; LABAT, M.; OUATTARA, A.S. *Pseudoxanthomonas mexicana* sp. nov. and *Pseudoxanthomonas janponensis* sp. nov., isolated from diverse environments, and emended descriptions of the genus *Pseudoxanthomonas* Finkmann et al. 2000 and of its type species. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.54, p.2245-2255, 2004. doi: 10.1099/ijs.0.02810-0

THOMPSON, G.; SWAIN, J.; KAY, M.; FORSTER, C.F. The treatment of pulp and paper mill effluent: a review. **Bioresource Technology**, v.77, o.275-286, 2001.

USEPA – UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. **Vocabulary Catalog**. 2017 Disponível em: < <https://www.epa.gov/>> . Acesso em 20 nov. 2017.

USEPA – UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. **Methods for measuring the acute toxicity of effluents and receiving waters to freshwater and marine organisms**. 5th ed. Pub. 4303. Duluth, MN, USEPA, 2002. doi:10.1080/14756360500381194

VAN DER ZEE, F.P.; VILLAVARDE, S. Combined anaerobic-aerobic treatment of azo dyes – A short review of bioreactor studies. **Water Research**, v.39, p.1425-1440. 2005.

VAN DER ZEE, F.P. LETTINGA, G.; FIELD, J.A. Azo dye decolourisation by anaerobic sludge. **Chemosphere**, v.44, p.1169-1176. 2001.

VERMA, Y. Acute toxicity assessment of textile dyes and textile and dye industrial effluents using *Daphnia magna* bioassay. **Toxicology and Industrial Health**, v.24, p.491-500, 2008.

VESELA, S.; ONDRUSKA, V.; KUČA, K.; PATOCKA, J. Tests with *Daphnia magna*: A new approach to prescreen toxicity of newly synthesized acetylcholinesterase reactivators. **Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry**, v.4, p.427-432, 2006.

VIANCELLI, A.; KUNZ, A.; ESTEVES, P.A.; BAUERMANN, F.V.; FURUKAWA, K.; FUJII, T.A.; VASCONCELOS, R.; MATIAS, VANOTTI. Bacterial biodiversity from an anaerobic up flow bioreactor with ANAMMOX activity inoculated with swine sludge. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 54, n. 5, p. 1035-1041, 2011.

VILELA, R.S.; DAMIANOVIC, M.H.R.Z.; FORESTI, E. Removing organic matter from sulfate-rich wastewater via sulfidogenic and methanogenic pathways. **Water Science and Technology**, v.69, n.8, p.1669-1675, 2014.

VIJAYARAGHAVAN, K.; PADMESH, T.V.N.; PALANIVELU, K.; VELAN, M. Biosorption of nickel (II) ions onto *Sargassum wightii*: Application of two-parameter and three-parameter isotherm models. **Journal of Hazardous Materials**, v.133, n.1-3, p.304-308, 2006.

WALPOLE, A.L.; WILLIAMS, M.H.C. Aromatic amines as carcinogens in industry. **British Medical Bulletin**, v.14, p.141-145, 1958.

WANG, Y.; LIU, X.; HUANG, J.; XIAO, W.; ZHANG, J.; YIN, C. Effect of phosphorus addition on the reductive transformation of pentachlorophenol (PCP) and iron reduction with microorganism involvement. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 24, n. 29, p.22852-22860, 2017.

WEBBER; T.W.; CHAKKRAVORTI, R.K. Pore and solid diffusion models for fixed-bed adsorbers. **American Institution of Chemical Engineers Journal**, v.20, p.228-238, 1974.

WEISBURGER, J.H. Comments on the history and importance of aromatic and heterocyclic amines in public health. **Fundamental and molecular mechanisms of mutagenesis**, v.506-507, p.9-20, 2002.

WELHAM, A. The theory of dyeing (and the secret of life). **Journal of the Society of Dyers and Colourists**, v.116, p.140-143, 2000.

WERNER, J.J.; KNIGHTS, D.; GARCIA, M.L.; SCALFONE, N.B.; SMITH, S.; YARASHESKI, K.; CUMMINGS, T.A.; BEERS, A.R.; KNIGHT, R.; ANGENENT, L.T. Bacterial community structures are unique and resilient in full-scale bioenergy systems. **Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.108, n.10, p.4158-4163, 2011. doi:10.1073/pnas.1015676108.

WILLEMS, A. The Family *Comamonadaceae*. In: Rosenberg E., DeLong E.F., Lory S., Stackebrandt E., Thompson F. (eds) . Springer, Berlin, Heidelberg. 2014.

WU, D.; ZHANG, Z.; YU, Z.; ZHU, L. Optimization of F/M ratio for stability of aerobic granular process via quantitative sludge discharge. **Bioresource Technology**, v.252, p.150-156, 2018. doi:10.1016/j.biortech.2017.12.094

WONG, H. L.; AHMED-COX, A.; BURNS, B.P. Molecular ecology of hypersaline microbial mats: current Insights and new directions. AMILS, R.; TORIL, E.G. (Eds). **Microorganisms**, v.4, n.1, 2016. doi:10.3390/microorganisms4010006 .

XIE, X.; LIU, N.; YANG, B.; YU, C.; ZHANG, Q.; ZHENG, X.; XU, L.; LI, R.; LIU, J. Comparison of microbial community in hydrolysis acidification reactor depending on different structure dyes by Illumina MiSeq sequencing. **International Bioremediation and Biodegradation**, v.111, p.14-21, 2016. doi: 10.1016/j.ibiod.2016.04.004

YAGUB, M.T.; SEN, T.K.; AFROZE, S.; ANG, H.M. Dye and its removal from aqueous solution by adsorption: A review. **Advances in Colloid and Interface Science**, v.209, p.172-184, 2014.

YOO, E.S. Kinetics of chemical decolorization of the azo dye C.I. Reactive Orange 96 by sulphide. **Chemosphere**, v.47, p.925-931, 2002. doi: 10.1016/S0045-6535(02)00068-1

YOO, E.S.; LIBRA, J.; ADRIAN, L. Mechanism of decolorization of azo dyes in an anaerobic mixed culture. **Journal of Environmental Engineering**, v.127, p.844-849, 2001.

YOUSSEF, N.; STEIDLEY, B.L.; ELSHAHED, M.S. Novel high-rank phylogenetic lineages within a sulfur spring (Zodletone Spring, Oklahoma), revealed using a combined pyrosequencing-sanger approach. **Applied and Environmental Microbiology**, v.78, n.8, p.2677-2688, 2012. doi:10.1128/AEM.00002-12 .

YURTSEVER, A.; ÇINAR, Ö.; SAHINKAYA, E. Treatment of textile wastewater using sequential sulfate-reducing anaerobic and sulphide-oxidizing aerobic membrane bioreactors. **Journal of Membrane Science**, v.511, p.228-237, 2016. doi:10.1016/j.memsci.2016.03.044

ZAIAT, M.; CABRAL, A.K.A.; FORESTI, E. Reator anaeróbio horizontal de leito fixo para tratamento de águas residuárias: Conceção e avaliação preliminar de desempenho (Fixed horizontal anaerobic reactor for wastewater treatment bed: design and preliminary performance evaluation). **Revista Brasileira de Engenharia – Caderno de Engenharia Química, São Carlos**, v.11, n.2, p.33-42, 1994.

ZISSI, U.; LYBERATOS, G. Azo dye biodegradation under anoxic conditions. **Water Science and Technology**, v.34, p.495-500, 1996.

APÊNDICE A

Testes estatísticos referentes aos testes de citotoxicidade *in vitro* do corante Direct Black 22 e do efluente tratado

Tabela A.1 – Valores estatísticos para controle e solução de DB22 0,16 mg.mL⁻¹

RESUMO

<i>Grupo</i>	<i>Contagem</i>	<i>Soma</i>	<i>Média</i>	<i>Variância</i>
0	5	501,65	100,33	44,1885
0,16	5	395,02	79,004	10,74978

ANOVA

<i>Fonte da variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor-P</i>	<i>F crítico</i>
Entre grupos	1136,996	1	1136,996	41,39175	0,000202	5,317655
Dentro dos grupos	219,7531	8	27,46914			
Total	1356,749	9				

Tabela A.2 – Valores estatísticos para controle e solução de DB22 0,065 mg.mL⁻¹

RESUMO

<i>Grupo</i>	<i>Contagem</i>	<i>Soma</i>	<i>Média</i>	<i>Variância</i>
0	5	501,65	100,33	44,1885
0,065	5	413,25	82,65	80,56955

ANOVA

<i>Fonte da variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor-P</i>	<i>F crítico</i>
Entre grupos	781,456	1	781,456	12,52754	0,007626	5,317655
Dentro dos grupos	499,0322	8	62,37903			
Total	1280,488	9				

Tabela A.3 – Valores estatísticos para controle e solução de DB22 0,2 mg.mL⁻¹

RESUMO

<i>Grupo</i>	<i>Contagem</i>	<i>Soma</i>	<i>Média</i>	<i>Variância</i>
0	5	501,65	100,33	44,1885
0,2	4	316,06	79,015	115,7442

(continua)

(conclusão)

100

ANOVA						
<i>Fonte da variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor-P</i>	<i>F crítico</i>
Entre grupos	1009,621	1	1009,621	13,48764	0,007937	5,591448
Dentro dos grupos	523,9865	7	74,85521			
Total	1533,607	8				

Tabela A.4 – Valores estatísticos para controle e solução de DB22 0,26 mg.mL⁻¹

RESUMO				
<i>Grupo</i>	<i>Contagem</i>	<i>Soma</i>	<i>Média</i>	<i>Variância</i>
0	5	501,65	100,33	44,1885
0,26	5	370,48	74,096	565,364

ANOVA						
<i>Fonte da variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor-P</i>	<i>F crítico</i>
Entre grupos	1720,557	1	1720,557	5,645312	0,044826	5,317655
Dentro dos grupos	2438,21	8	304,7762			
Total	4158,767	9				

Tabela A.5 – Valores estatísticos para controle e solução de DB22 0,33 mg.mL⁻¹

RESUMO				
<i>Grupo</i>	<i>Contagem</i>	<i>Soma</i>	<i>Média</i>	<i>Variância</i>
0	5	501,65	100,33	44,1885
0,33	4	360,16	90,04	164,1337

ANOVA						
<i>Fonte da variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor-P</i>	<i>F crítico</i>
Entre grupos	235,298	1	235,298	2,461442	0,16066	5,591448
Dentro dos grupos	669,155	7	95,59357			
Total	904,453	8				

Tabela A.6 – Valores estatísticos para controle e solução de DB22 0,008 mg.mL⁻¹

RESUMO

<i>Grupo</i>	<i>Contagem</i>	<i>Soma</i>	<i>Média</i>	<i>Variância</i>
0	5	501,6504	100,3301	44,17941
0,008	5	495,6936	99,13871	31,08941

ANOVA

<i>Fonte da variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor-P</i>	<i>F crítico</i>
Entre grupos	3,548394	1	3,548394	0,094286	0,766638	5,317655
Dentro dos grupos	301,0753	8	37,63441			
Total	304,6237	9				

Tabela A.7 – Valores estatísticos para controle e solução de DB22 0,65 mg.mL⁻¹

RESUMO

<i>Grupo</i>	<i>Contagem</i>	<i>Soma</i>	<i>Média</i>	<i>Variância</i>
0	5	501,6504	100,3301	44,17941
0,65	4	368,1973	92,04932	677,3795

ANOVA

<i>Fonte da variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor-P</i>	<i>F crítico</i>
Entre grupos	152,3801	1	152,3801	0,482902	0,509512	5,591448
Dentro dos grupos	2208,856	7	315,5509			
Total	2361,236	8				

Tabela A.8 – Valores estatísticos para controle e solução de DB22 0,013 mg.mL⁻¹

RESUMO

<i>Grupo</i>	<i>Contagem</i>	<i>Soma</i>	<i>Média</i>	<i>Variância</i>
0	5	501,6504	100,3301	44,17941
0,13	4	379,789	94,94725	106,2281

ANOVA

<i>Fonte da variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor-P</i>	<i>F crítico</i>
(conclusão)	8856	1	64,38856	0,909806	0,371935	5,591448
Dentro dos grupos	770,4021	7	70,77172			
Total	559,7906	8				

Tabela A.9 – Valores estatísticos para controle e efluente – 2

(continua)

RESUMO

<i>Grupo</i>	<i>Contagem</i>	<i>Soma</i>	<i>Média</i>	<i>Variância</i>
0	5	500	100	26,2759
2x	6	71,8063	11,9677	36,0445

ANOVA

<i>Fonte da variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor-P</i>	<i>F crítico</i>
Entre grupos	21135,5	1	21135,5	666,674	9,45003E-10	5,11736
Dentro dos grupos	285,326	9	31,7029			
Total	21420,8	10				

Tabela A.10 – Valores estatísticos para controle e efluente – concentração original

RESUMO

<i>Grupo</i>	<i>Contagem</i>	<i>Soma</i>	<i>Média</i>	<i>Variância</i>
0	5	500	100	26,2759
1x	6	80,4356	13,4059	23,7286

ANOVA

<i>Fonte da variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor-P</i>	<i>F crítico</i>
Entre grupos	20450,5	1	20450,5	822,605	3,70831E-10	5,11736
Dentro dos grupos	223,746	9	24,8607			
Total	20674,3	10				

Tabela A.11 – Valores estatísticos para controle e efluente – ½ concentração

RESUMO

<i>Grupo</i>	<i>Contagem</i>	<i>Soma</i>	<i>Média</i>	<i>Variância</i>
0	5	500	100	26,2759
0,5x	6	181,375	30,2292	76,6249

(conclusão)

<i>Fonte da variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor-P</i>	<i>F crítico</i>
Entre grupos	13276,3	1	13276,3	244,735	7,82641E-08	5,11736
Dentro dos grupos	488,228	9	54,2476			(continua)
Total	13764,5	10				

Tabela A.12 – Valores estatísticos para controle e efluente – ¼ concentração

RESUMO

<i>Grupo</i>	<i>Contagem</i>	<i>Soma</i>	<i>Média</i>	<i>Variância</i>
0	5	500	100	26,2759
0,25x	4	168,869	42,2173	40,4584

ANOVA

<i>Fonte da variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor-P</i>	<i>F crítico</i>
Entre grupos	7419,64	1	7419,64	229,326	1,31689E-06	5,59145
Dentro dos grupos	226,479	7	32,3541			
Total	7646,12	8				

Tabela A.13 – Valores estatísticos para controle e efluente – 1/8 concentração

RESUMO

<i>Grupo</i>	<i>Contagem</i>	<i>Soma</i>	<i>Média</i>	<i>Variância</i>
0	5	500	100	26,2759
0,12x	4	200,897	50,2243	5,18021

ANOVA

<i>Fonte da variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor-P</i>	<i>F crítico</i>
Entre grupos	5505,83	1	5505,83	319,458	4,23674E-07	5,59145
Dentro dos grupos	120,644	7	17,2349			
Total	5626,47	8				

Tabela A.14 – Valores estatísticos para controle e efluente – 1/16 concentração

RESUMO

<i>Grupo</i>	<i>Contagem</i>	<i>Soma</i>	<i>Média</i>	<i>Variância</i>
0	5	500	100	26,2759
0,06x	6	434,247	72,3746	63,3294

ANOVA

<i>Fonte da variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor-P</i>	<i>F crítico</i>
Entre grupos	2081,36	1	2081,36	44,4154	9,21976E-05	5,11736
Dentro dos grupos	421,751	9	46,8612			
Total	2503,11	10				

Tabela A.15 – Valores estatísticos para controle e efluente – 1/32 concentração

RESUMO

<i>Grupo</i>	<i>Contagem</i>	<i>Soma</i>	<i>Média</i>	<i>Variância</i>
0	5	500	100	26,2759
0,03x	6	454,094	75,6823	73,4238

ANOVA

<i>Fonte da variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor-P</i>	<i>F crítico</i>
Entre grupos	1612,78	1	1612,78	30,7377	0,00035912	5,11736
Dentro dos grupos	472,223	9	52,4692			
Total	2085	10				

Tabela A.16 – Valores estatísticos para controle e efluente – 1/64 concentração

RESUMO

<i>Grupo</i>	<i>Contagem</i>	<i>Soma</i>	<i>Média</i>	<i>Variância</i>
0	5	500	100	26,2759
0,015x	4	317,002	79,2504	65,6855

ANOVA

<i>Fonte da variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor-P</i>	<i>F crítico</i>
Entre grupos	956,767	1	956,767	22,165	0,002188055	5,59145
Dentro dos grupos	302,16	7	43,1657			
Total	1258,93	8				

ANEXO A

Determinação da citotoxicidade basal *in vitro*

A.1 Meio de cultivo e soluções

- Meio de cultivo para células McCoy: constituído por meio RPMI adicionado de 7,5% de soro fetal bovino (Cultilab).
- Tampão PBS: Solução A: 0,908g de KH_2PO_4 /100mL. Solução B: 0,9475g de Na_2HPO_4 /100mL. Misturar 28,5mL de solução A para 71,5mL de solução B. Acrescentar 0,85g de NaCl. Ajustar pH 7,2-7,4. Esterilizar a 121°C por 15 minutos.
- Solução de Vermelho Neutro: Solução estoque do corante vermelho neutro (0,4% em tampão PBS) (Neutralrot Redox-indikator – Riedel-De-Haën AG Seelze-Hannover – cod.326.60) foi diluída a 50 $\mu\text{g/mL}$ em meio Eagle sem soro. Após 24 horas de incubação, a 37°C, a solução foi submetida a centrifugação (1500 rpm – 10 minutos), para remoção dos cristais remanescentes.
- Mistura ácido acético/etanol (1:50): Inicialmente, foi preparado álcool etílico 50%. Para a preparação da mistura, adicionou-se 1mL de ácido acético glacial a 99,0 mL de álcool 50%.

A.2 Procedimento

Células McCoy B (ATCC 1696) foram mantidas em meio RPMI. Após tripsinização (2mL de solução de tripsina 0,2% + Versene 0,02%, Instituto Adolfo Lutz), as células foram contadas em câmara de Neubauer e 200 μL do meio contendo aproximadamente $10^4 - 10^5$ células/mL foram inoculados em microplacas (96 orifícios) para cultura de tecido (Corning cod.25860) as quais foram incubadas a 35-37°C. Após 24 horas o meio foi removido e cada orifício tratado com diferentes concentrações das substâncias-teste. Após incubação por 24 horas, as placas foram preparadas para o teste do Vermelho Neutro (VN) (BORENFREUND;

PUERNER, 1985). Os testes foram acompanhados de crescimento controle, realizados em triplicata e repetidos no mínimo por 3 vezes.

- Técnica do VN

200 μ L da solução de Vermelho Neutro foram adicionados aos orifícios das microplacas, as quais foram incubadas a 35-37°C, por 3 horas. Após esse período, os orifícios foram lavados rapidamente com solução tampão PBS e 200 μ L da mistura ácido acético/etanol foram adicionados a cada orifício. As placas foram deixadas em repouso por 10 minutos para extração do corante, homogeneizadas e lidas em espectrofotômetro multicanal Spectra (Shell) & Rainbow (Shell) Readers da Tecan Áustria Ges.m.b.H., em comprimento de onda de 540 nm e filtro de referência 620 nm (BORENFREUND; PUERNER, 1985).

A.3 Determinação do Índice Citotóxico (IC₅₀)

Os IC₅₀ para as substâncias-teste foram determinados através da análise de regressão linear, juntamente com outros conceitos estatísticos. Esse índice significa a concentração do agente que diminui em 50% a absorbância espectrofotométrica.

A.4 Análise estatística

Os dados da análise estatística de regressão, juntamente com os apresentados na tabela ANOVA (análise de variância), podem avaliar se o modelo de regressão linear é adequado para a compilação, validação e significância dos resultados. A curva dose-resposta das substâncias foi obtida através do gráfico de dispersão xy contendo as observações (concentração x absorbância) e a reta de regressão (BARILE, 1994; LAPPONI, 1997).

ANEXO B

Descrição de meio de cultura RPMI

Meio RPMI: Constituído por 10,3g de RPMI – 1640 (sigma cód. R-7755)/1000 mL de água Milli-Q acrescido de 2,38g de HEPES (Sigma cód. H-0763) e 2,0g de bicarbonato de sódio. O pH foi ajustado a 7,2 com HCl 5N, esterilizado em membrana Millipore 0,22 µm e acrescido de 5% soro fetal bovino inativado (Cultilab). No momento do uso, 100 U/mL de penicilina (Sigma cód. P-3414/0, 100 µg/mL de estreptomicina (Sigma cód. S-9137), 2 mM de glutamina (Sigma cód. G-5763) e 50 mM de mercaptoetanol (Merck cód. 805740) foram adicionados.