UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

PAULA MORAIS DE OLIVEIRA SILVA

IMPLEMENTAÇÃO DE MÉTODO COLORIMÉTRICO PARA DETERMINAÇÃO DE SUBSTÂNCIAS TENSOATIVAS PRESENTES EM ÁGUAS RESIDUÁRIAS SINTÉTICAS

Araraquara
2020

PAULA MORAIS DE OLIVEIRA SILVA

IMPLEMENTAÇÃO DE MÉTODO COLORIMÉTRICO PARA DETERMINAÇÃO DE SUBSTÂNCIAS TENSOATIVAS PRESENTES EM ÁGUAS RESIDUÁRIAS SINTÉTICAS

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Engenharia Química.

Orientadora: Prof. Dra. Lorena Oliveira Pires

Araraquara

2020

PAULA MORAIS DE OLIVEIRA SILVA

Implementação De Método Colorimétrico Para Determinação De Substâncias Tensoativas Presentes Em Águas Residuárias Sintéticas

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Engenharia Química.

Araraquara, ___ de _____ de 2020

BANCA EXAMINADORA

_____

Profa. Dra. Lorena Oliveira Pires

Instituto de Química – UNESP, Araraquara

_____

Prof. Dr. Arnaldo Sarti

Instituto de Química – UNESP, Araraquara

_____

Profa. Dra. Fernanda Zanolli Freitas

Instituto de Química – UNESP, Araraquara

Agradecimentos

A Deus pelo dom da vida e por proporcionar tamanhas bençãos ao longo do caminho.

À universidade, todo corpo docente, direção e administração, por tornarem real a oportunidade da graduação.

À minha querida orientadora Prof. Dra. Lorena, por todo suporte à pesquisa e pelas conversas descontraídas.

Aos colaboradores do prédio da Engenharia Química, em especial ao Dr. Gabriel Fontes Pereira, à Sra. Rosana e ao Sr. Rogerio Carrara.

Aos colegas da universidade, que nos últimos cinco anos se mostraram amigos fiéis.

Aos meus pais e irmão, pelo amor, incentivo e apoio incondicional.

Às minhas amigas de longa data, que apesar da distância sempre se fizeram presentes.

Resumo

Águas residuárias com elevada carga de matéria orgânica contribuem para o problema global de poluição. Uma possibilidade para remoção dessa carga poluidora é o tratamento de efluentes pelo processo de digestão anaeróbia, no qual moléculas maiores e complexas são transformadas em substâncias mais simples e não poluidoras pela ação de microrganismos na ausência de oxigênio. Como exemplo de compostos tóxicos quando abundantes tem-se os surfactantes, amplamente usados em produto de limpeza doméstica e industrial e, consequentemente, presentes em estações de tratamento de água residuárias onde são parcialmente degradados e parcialmente adsorvido no lodo que será disposto no solo ou em aterros sanitários. A necessidade pela redução do potencial tóxico de águas residuárias é cada vez maior. Assim, esse trabalho teve como principal objetivo aplicar um método de quantificação de substâncias tensoativas para avaliar a degradação do surfactante LAS em reator biológico anaeróbio operado em bateladas sequenciais. Foi realizado monitoramento por meio de análises frequentes no afluente e efluente do reator, tais como: pH, alcalinidade, ácidos voláteis e Demanda Química de Oxigênio (DQO) a fim de avaliar a performance, estabilidade e atividade metabólica da microbiota, assim como análises da remoção de LAS. A remoção da DQO teve média de 87,86±7,90%. A remoção do LAS teve média de 75,26±8,61%.

Palavras-Chave: Águas residuárias. Digestão anaeróbia. Microrganismos.

Abstract

Wastewater with high organic matter loading contribute to the global pollution problem. A solution for the loading removal is wastewater treatment by anaerobic digestion, in which larger and more complex molecules are transformed into simpler and non-toxic substances by microorganisms in the absence of oxygen. Consider a toxic substance when in abundance, surfactants are widely used in both household and industrial cleaning products and present in wastewater treatment stations where they are partially degraded and partially adsorbed in the sludge that will be disposed in soil or landfills. The need for toxic potential reduction of wastewater is growing each year. Thus, this paper had as main goal to apply a quantifying method for surfactants to evaluate the removal of Linear Alkylbenzene Sulfonate in biological anaerobic sequencing batch reactor. Frequent analysis were made in affluent and effluent of the reactor, such as: pH, alkalinity, volatile acids and Chemical Oxygen Demand (COD) to keep track of the stability and the metabolic activity of the microbiota, as well as LAS removal analysis. The COD removal averaged 87,86±7,90%. The LAS removal averaged 75,26±8,61%.

Keywords: Wastewater. Anaerobic digestion. Microorganism.

Lista de Ilustrações

Figura 1: Estrutura do Alquilbenzeno Linear Sulfonado (LAS) 11
Figura 2: Sequências metabólicas e grupos microbianos envolvidos na digestão anaeróbia. 13
Figura 3: Esquema da reação entre o surfactante e o azul de metileno. 14
Figura 4: Fluxograma do método colorimétrico aplicado para quantificação de LAS. 18
Figura 5: Esquema do reator operado em bateladas sequenciais. 19
Figura 6: Variação temporal da DQO do afluente e do efluente, juntamente com a eficiência de remoção. 24
Figura 7: Perfil temporal da degradação da DQO sem adição de LAS. 25
Figura 8: Perfil temporal da degradação da DQO com adição de 10 mg/L de LAS. 26
Figura 9: Perfil temporal da degradação da DQO com adição de 20 mg/L de LAS. 27
Figura 10: Curva de calibração do LAS para a fase II. 28
Figura 11: Curva de calibração do LAS para as fases III e IV. 29
Figura 12: Variação temporal do LAS do afluente e do efluente, juntamente com a eficiência de remoção. 30
Figura 13: Perfil temporal da remoção de LAS com concentração inicial de 10 mg/L. 32
Figura 14: Perfil temporal da remoção de LAS com concentração inicial de 20 mg/L. 32

Lista de Tabelas

Tabela 1: Composição do substrato sintético simulando esgoto sanitário. 20
Tabela 2: Análises de perfil temporal de degradação de LAS e DQO no reator. 21
Tabela 3: Valores médios de parâmetros de monitoramento do biorreator: pH, alcalinidade total e ácidos voláteis referentes a todos os ciclos. 23
Tabela 4: Concentração e absorbância de soluções-padrão de LAS para fase II. 28
Tabela 5: Concentração e absorbância de soluções-padrão de LAS para as fases III e IV. 29
Tabela 6: Resultados de remoção média de LAS em cada fase de operação. 30

Sumário

1. Revisão Bibliográfica 10
1.1 Alquilbenzeno Linear Sulfonados 10
1.2 Reator Operado em Bateladas Sequenciais 11
1.3 Métodos de Quantificação de Surfactantes 13
1.3.1 Colorimétrico com Azul de Metileno 13
1.3.2 Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrômetro de Massa 14
1.3.3 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência 15
1.3.4 Métodos Alternativos 15
1.4 Revisão da literatura 15
2 Objetivos 17
2.1 Objetivo Geral 17
2.2 Objetivos Específicos 17
3 Materiais e Métodos 18
3.1 Método do Azul de Metileno 18
3.2 Aplicação do Método em Reator Biológico 19
3.2.1 Substrato sintético 19
3.2.2 Lodo Anaeróbio 20
3.2.3 Caracterização do Lodo 20
3.2.4 Análises Físico-Químicas e Cromatográficas 20
3.2.5 Análise de DQO 21
3.2.6 Curva Padrão de LAS 22
4 Resultados e Discussão 23
4.1 DQO 24
4.1.1 Perfil da remoção da DQO 25
4.2 LAS 27
4.2.1 Perfil da remoção de LAS 31

5 Conclusão 34
6 Sugestões Para Trabalhos Futuros 35
7 Referências Bibliográficas 36

1. Revisão Bibliográfica

Há algumas décadas, a necessidade pela redução do potencial poluidor de águas residuárias é crescente e tem atraído atenção da sociedade como um todo. A elevada carga de matéria orgânica presente nos esgotos sanitários, municipais e industriais, contribui para o problema global de poluição que afeta a qualidade das águas superficiais e subterrâneas.

Segundo Neto e Costa (2011), no Brasil há grande dificuldade de remoção de matéria orgânica carbonácea e outros nutrientes nas Estações de Tratamento de Efluentes (ETEs). Compostos tais como nitrogênio e fósforo são os principais responsáveis pela deterioração dos corpos hídricos, causando rápida eutrofização do ambiente que recebe o efluente. Como solução a este problema ambiental, muitas ETEs têm implementado um sistema de remoção conjunto para matéria orgânica, nutrientes e materiais suspensos, em apenas uma unidade operacional.

Surfactantes são um dos maiores poluentes detectados em águas superficiais, sedimentos, lodo e solos. Graças a sua ocorrência excessiva e contínua, surge um grande interesse por parte dos estudiosos em tratamento de surfactantes no ambiente (JARDAK, 2015).

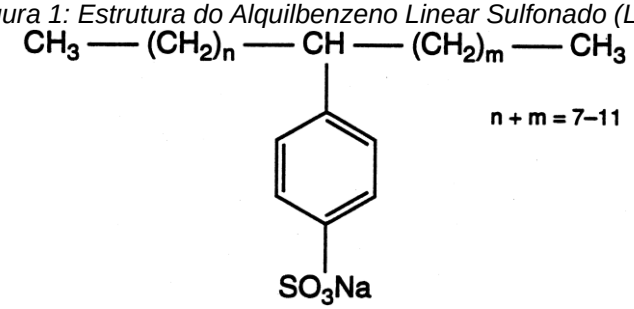
1.1 Alquilbenzeno Linear Sulfonados

Os Alquilbenzeno Linear Sulfonados (LAS – sigla em inglês para *Linear Alkylbenzene Sulphonate*) são um grupo de surfactantes aniônicos com diferentes homólogos e isômeros de posição de cadeias alquiladas lineares, conforme ilustra a Figura 1. Sua estrutura molecular básica conta com um anel benzeno ligado a uma cadeia alquila – extremidade hidrofóbica - e a um grupo sulfato de sódio – extremidade hidrofílica. O LAS comercial é uma mistura destes homólogos. Foi introduzido no mercado nos anos 1960 como substituto do Alquilbenzeno Sulfonado (ABS) (JENSEN, 1999).

O ABS surgiu na década de 1940 como principal surfactante aniônico disponível no mercado por ter uma melhor eficácia tensoativa quando comparado ao sabão. É derivado de frações do petróleo – benzeno e tetrâmero de propileno. Os problemas com este produto surgiram em estações de tratamento de esgoto acumulando grandes e densas quantidades de espuma, que dificultavam o processo

de aeração do tratamento de efluentes. Após estudos, notou-se que os carbonos quaternários tornavam a molécula de ABS resistente à biodegradação. Assim, surge a necessidade de um novo surfactante com mesma capacidade tensoativa e facilmente degradável. Novos estudos sobre biodegradação de surfactantes lineares mostram que sua estrutura, principalmente o tamanho da cadeia linear e a posição do grupo fenila na cadeia alquílica, possibilitam maior coeficiente de biodegradação quando comparados a cadeias isômeras, como do antigo ABS (PENTEADO *et al.*, 2006).

Figura 1: Estrutura do Alquilbenzeno Linear Sulfonado (LAS)



Fonte: Jensen, 1999.

A biodegradação do LAS pode ser dividida em duas etapas. Primeiro, ocorre a quebra da cadeia alquílica, aumentando a tensão micelar crítica do meio. Esta etapa é responsável por diminuir o efeito da formação de espuma característica. Por fim, as moléculas formadas como subproduto de degradação continuam a ser quebradas até transformarem-se em CO_2, água, sais minerais, entre outros (PENTEADO *et al.*, 2006).

Embora a maioria dos sistemas de tratamento de águas residuárias seja aeróbio, o lodo que surge a partir destes tratamentos são usualmente submetidos à digestão anaeróbia. Assim, surfactantes adsorvidos nos lodos que não sofreram degradação são submetidos a bioprocessos fermentativos em sistemas anaeróbios com microrganismos metanogênicos (GARCÍA *et al.*, 2005).

1.2 Reator Operado em Bateladas Sequenciais

Por volta de 1960, experimentos realizados avaliaram o crescimento populacional de microrganismos em reatores anaeróbios com alimentação em bateladas. Como resultado, o lodo anaeróbio era capaz de atingir maiores tempos de

retenção (em inglês, *sludge retention time* – SRT*)* com tempos de retenção hidráulica (em inglês, *hydraulic retention time* – HRT) relativamente menores. Desenvolveu-se então o método de Reator Anaeróbio de Bateladas Sequenciais (*Anaerobic Sequencing Batch Reactor* – ASBR) (SUNG, 1995).

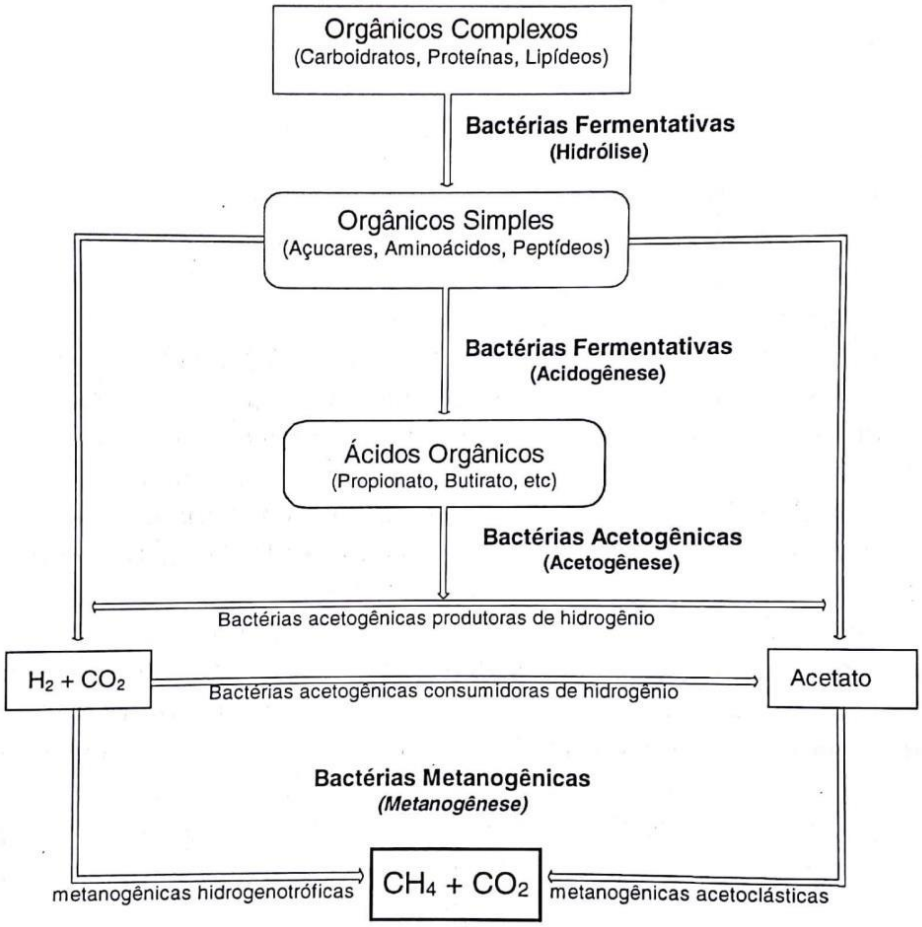
O ciclo de operação de um ASBR possui cinco etapas: alimentação, reação, sedimentação, descarga e repouso. A alimentação envolve a adição de um substrato ao reator. A composição do substrato e o volume do reator variam de acordo com o HRT e a carga orgânica do lodo. A etapa de reação consiste na agitação e mistura do lodo e substrato. O início da agitação logo após a alimentação representa taxas metabólicas mais altas devido às altas concentrações de substrato. A agitação deve ser contínua o suficiente para que parâmetros como temperatura, pH e concentração de substrato sejam mantidos uniformes. Na etapa de sedimentação, a agitação é desligada para possibilitar a separação da biomassa sólida, fazendo com que o reator funcione como um decantador. Por fim, descarrega-se do reator todo líquido restante, geralmente de mesmo volume que a alimentação (SUNG, 1995).

O principal objetivo do ASBR é a remoção de compostos indesejáveis no tratamento de águas residuárias de pequeno fluxo. O tempo de cada ciclo varia principalmente conforme a necessidade da microbiota presente em degradar o composto desejado. Os ciclos, o tempo de reação e o tempo de retenção do lodo podem variar. Por esses fatos, o ASBR se adapta a diversos tipos de tratamento, tornando-o um método vantajoso (JAFARINEJAD, 2017).

Esta configuração teve seu sucesso consolidado na aplicação do tratamento de águas residuárias domésticas e industriais em países como Estados Unidos, China e na Europa (JAFARINEJAD, 2017).

No processo de digestão anaeróbia ocorre degradação de matéria orgânica através de microrganismos, na ausência de oxigênio. Os produtos do processo anaeróbio são compostos inorgânicos como metano, gás carbônico, água, gás sulfídrico e amônia, além de novas células bacterianas. Uma ilustração genérica do processo está representada na Figura 2. Por meio destes produtos são analisados parâmetros de degradação e de estabilidade do reator como pH, alcalinidade a bicarbonato e ácidos voláteis no meio, a fim de assegurar a atividade da microbiota presente no lodo.

Figura 2: Sequências metabólicas e grupos microbianos envolvidos na digestão anaeróbia.



Fonte: Chernicharo et al., 1997.

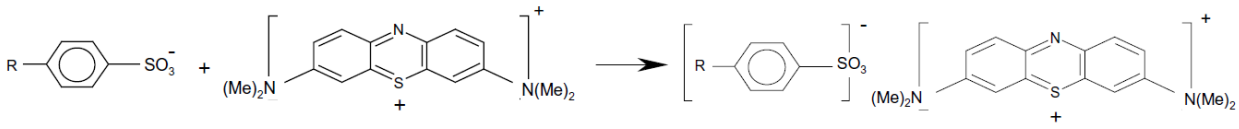
1.3 Métodos de Quantificação de Surfactantes

1.3.1 Colorimétrico com Azul de Metileno

Os agentes tensoativos aniônicos são geralmente determinados por espectrofotometria, utilizando-se o azul de metileno. Esta metodologia está baseada no fato de que o azul de metileno, quando em solução, ioniza-se e, seu cátion, forma compostos estáveis com substâncias que possuem um grupo aniônico forte e outro hidrofóbico, podendo ser extraído em clorofórmio, conforme norma técnica NBR 10738, (ABNT, 1989). O método baseado na formação de um par iônico entre o surfactante aniônico (SA) e o azul de metileno (AM) está esquematizado na Figura 3.

Os Alquilbenzenosulfonatos lineares (LAS) são os mais utilizados como padrão para construção da curva de calibração.

Figura 3: Esquema da reação entre o surfactante e o azul de metileno.



Fonte: Adaptado de Jurado, et al., 2006.

Tendo em vista que este método se baseia na interação iônica entre pares, durante sua realização e para uma correta análise, deve-se evitar interferentes que possam competir na interação entre o surfactante e o azul de metileno, como sulfonatos, sulfatos, fosfatos, cianeto, nitrato, tiocianato, aminas, proteínas, compostos quaternários de amônia, entre outros (ABNT, 1989).

No entanto, esta metodologia requer uma grande quantidade de reagentes para três extrações sucessivas de 100 mL de amostra AS-AM com 15,10 e 10 mL de clorofórmio. A fim de evitar o uso de solventes, a extração líquido-líquido pode ser substituída por extração em fase sólida. Neste método, há sorção do par iônico corante-surfactante à vidraria, seguido da dissolução por etanol e leitura da absorbância (SHYICHUK e ZIÓŁKOWSKA, 2016).

1.3.2 Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrômetro de Massa

Espectrometria de massa é uma técnica analítica usada para identificar compostos desconhecidos, quantificar compostos conhecidos e elucidar a estrutura e as propriedades químicas de moléculas. A detecção de compostos pode ser efetuada com quantidades muito pequenas de amostras. A cromatografia gasosa, seguida por espectrometria de massa (GC-MS) é uma técnica bastante utilizada para determinação e quantificação de compostos complexos (moléculas grandes) ou ainda compostos desconhecidos de uma degradação. Com esse método é possível determinar os homólogos e isômeros dos surfactantes, individualmente, com elevada especificidade e sensibilidade. No entanto, como surfactantes são, invariavelmente, espécies de baixa volatilidade, faz-se necessário intensivo pré-tratamento da amostra e a conversão do surfactante em derivados voláteis, o que dificulta o uso dessa técnica (DUARTE, 2006).

1.3.3 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

Também conhecida como HPLC (sigla em inglês *para High Performance Liquid Chromatography*), a cromatografia líquida de alta eficiência é um método amplamente usado para determinação de LAS em diversos ambientes. Entretanto, este método se aplica apenas a amostras límpidas, caso contrário, são necessárias etapas de purificação e concentração (DUARTE, 2006).

O procedimento para separação e determinação do LAS utiliza colunas C8 ou C18 e fases móveis contendo solventes orgânicos e água, caracterizando a HPLC em fase reversa. Este método pode ser acoplado a alguns tipos de detector como espectrometria ultravioleta (UV), fluorescência e espectrometria de massa (MS) (DUARTE, 2006).

1.3.4 Métodos Alternativos

Shyichuk e Ziółkowska (2016) estudaram um método de determinação de surfactantes aniônicos a partir da titulação com solução de azul de metileno. Soluções de Dodecilsulfato de Sódio (SDS) foram tituladas enquanto monitoradas por espectrofotômetro por meio de uma sonda de imersão. O método se mostrou exato e preciso, com a grande vantagem de não utilizar solventes orgânicos tóxicos.

Coll *et al.* (2010) propuseram também um método livre de solventes para detecção de surfactantes com azul de metileno, utilizando sorção. Provou-se forte afinidade de surfactantes aniônicos com sílica gel. No procedimento analítico, há adsorção do surfactante com posterior adsorção do azul de metileno. Assim, sinais analíticos do esgotamento de azul de metileno na solução são observados por leitura espectrofotométrica.

1.4 Revisão da literatura

Ghaderpoori e Dehghani (2016), realizaram um estudo da eficiência de radiação ultravioleta e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) na remoção de LAS em soluções aquosas. Soluções de LAS com H_2O_2 preparadas em laboratório foram expostas à radiação UV e mantidas em agitação. O método colorimétrico com azul de metileno foi usado para determinar as concentrações do surfactante aniônico. A remoção

atingiu taxas de 96,5%, provando a eficiência da combinação UV/H_2O_2 para degradação de detergentes.

Em Eslami (2015), foi estudo um sistema de tratamento de águas residuárias em Yazd (Irã), composto por reatores operados em bateladas sequenciais em meio aeróbio. A vazão média de 31950 m^3/dia tratava-se de águas residuárias reais com afluente contendo em média 3,29±0,92 mg/L de detergente, baseado em LAS. O tempo de reação foi 3,4 horas em cada um dos seis reatores presentes. Durante os 8 meses de operação, foi atingida uma remoção média de LAS de 81,6% e remoção de DQO de 90,06%. O método utilizado para quantificação de surfactante foi colorimétrico com azul de metileno semelhantes ao presente trabalho. Os resultados deste estudo possibilitaram o aumento da eficiência de remoção de detergentes na planta de Yazd ao concluir que era necessário aumentar o tempo de retenção nos reatores.

Duarte *et al.* (2015), apresenta um estudo sobre a degradação de LAS em reator anaeróbio em bateladas sequenciais (ASBR). O volume do reator foi de 5 L e o tempo de ciclo de 24 h. A temperatura do experimento foi controlada a 30 °C. Nos 67 dias de operação com surfactante, a remoção de LAS atingiu 87% enquanto a remoção da DQO foi de 86%. O método utilizado para quantificação do surfactante foi HPLC com detector de fluorescência.

Holt *et al.* (1995) monitorou o serviço de tratamento de esgoto com lodo ativado de Owlwood, no condado de Yorkshire (Reino Unido). O sistema conta com reatores aerados e, posteriormente, tanques de sedimentação. Após tratamento, o efluente passa por filtros e é descartado no riacho Sheffield. O intuito do estudo foi observar o consumo de LAS da população daquela região, assim como as condições de lançamento do efluente. Para determinação de LAS, foram coletadas amostras de hora em hora durante 7 dias. As análises para quantificação de LAS foram realizadas a partir de HPLC em fase reversa, eluido com metanol em coluna C18, com detector de fluorescência.

2 Objetivos

2.1 Objetivo Geral

O presente trabalho teve como principal objetivo testar e aplicar um método de quantificação de substâncias tensoativas em fase líquida.

2.2 Objetivos Específicos

Como objetivos específicos do trabalho, pode ser citado:

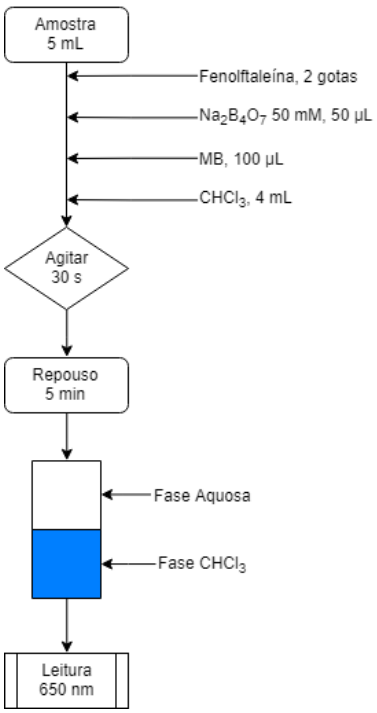
- ✓ Operar reator biológico em batelada alimentado com substrato sintético simulando esgoto sanitário;
- ✓ Avaliar a eficiência do reator na remoção de LAS, quantificando o tensoativo antes e após o ciclo de tratamento biológico.
- ✓ Avaliar a degradação da matéria orgânica pelo processo biológico anaeróbio.

3 Materiais e Métodos

3.1 Método do Azul de Metileno

O método utilizado para quantificar o surfactante presente em amostras do afluente e efluente de reator anaeróbio operado em bateladas sequenciais foi adaptado de Jurado *et al*., (2006). Este método consiste em adicionar-se 2 gotas de fenolftaleína a 5 mL de amostra. Em seguida, adiciona-se 50,0 µL de uma solução tampão de $Na_2B_4O_7$ 50 Mm, 100,0 µL de uma solução de azul de metileno de concentração 1,0 g/L e 4,0 mL de solução de $CHCl_3$. A mistura é agitada e deixada em repouso por 5 minutos em temperatura ambiente. Sendo que ao final resulta em separação de duas fases: aquosa e orgânica, contendo $CHCl_3$, surfactante e o azul de metileno. A leitura da cor é feita em espectrofotômetro no comprimento de onda de 650 nm. Uma curva padrão da concentração de LAS é usada para determinar a quantidade de LAS presente na amostra.

Figura 4: Fluxograma do método colorimétrico aplicado para quantificação de LAS.

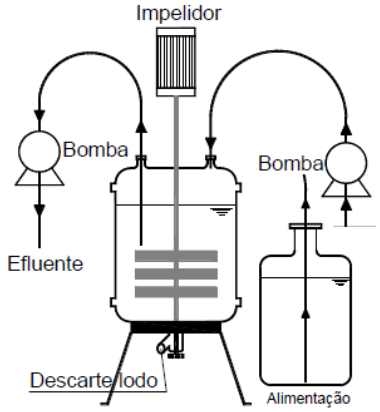


Fonte: Autora adaptado de Jurado *et al.* (2006).

3.2 Aplicação do Método em Reator Biológico

A Figura 5 apresenta o esquema de operação do reator operado em bateladas sequenciais. O reator apresenta um volume de aproximadamente 5,0 litros e é construído em vidro borossilicato.

Figura 5: Esquema do reator operado em bateladas sequenciais.



Fonte: Duarte *et al.*, 2015.

O tempo de ciclo da batelada foi de 24 horas, sendo aproximadamente 23 horas de tempo de reação. Todos os parâmetros e análises foram realizadas em decorrência de ciclos de operação. Este trabalho conta com 249 ciclos, dos quais foram divididos em quatro fases:

I. Adaptação, onde não houve adição de LAS ao afluente - duração: 45 ciclos;
II. Adição de 10 mg/L de LAS ao afluente - duração: 103 ciclos;
III. Adição de 15 mg/L de LAS ao afluente - duração: 34 ciclos;
IV. Adição de 20 mg/L de LAS ao afluente - duração: 67 ciclos.

3.2.1 Substrato sintético

O substrato sintético foi adaptado de Duarte (2006) simulando esgoto sanitário. Para alimentação de 3,0 litros, o substrato foi composto de água, extrato de levedura (1500,0 mg), sacarose (240,0 mg), bicarbonato de sódio (1200,0 mg) e solução de sais (15,0 mL), de modo a apresentar as concentrações apresentadas na

Tabela 1.

Tabela 1: Composição do substrato sintético simulando esgoto sanitário.

Nutrientes	***Concentração (mg/L)***
Extrato de levedura	500
Sacarose	80
Bicarbonato de sódio	400
Solução de sais	5,0 ml/L
Solução de sais	***Concentração (g/L)***
NaCl	50,0
$MgCl_2.6H_2O$	1,4
$CaCl_2.\ 2H_2O$	0,9

Fonte: Duarte (2006) modificado de Torres (1992).

3.2.2 Lodo Anaeróbio

A biomassa utilizada foi proveniente de reator UASB (*Upflow Anaerobic Sludge Blanket*) empregado no tratamento de rejeitos de abatedouro de aves em Rio Claro - SP. Este lodo vem sendo usado com sucesso em estudos sobre a degradação de tóxicos por processos anaeróbios (LAZARO et al., 2014).

3.2.3 Caracterização do Lodo

O lodo foi submetido à determinação da quantidade de sólidos totais voláteis (SV) de acordo com metodologia descrita em APHA (2005). Tal análise foi realizada no momento da inoculação do sistema.

3.2.4 Análises Físico-Químicas e Cromatográficas

Amostras do afluente e efluente do reator foram analisadas seguindo a frequência e parâmetros apresentados no Quadro 1.

Quadro 1: Análises para monitoramento do reator.

Parâmetro	***Método***	***Frequência das análises***	***Referência***
Temperatura (°C)	Termômetro	2x semana	-
pH (unidade)	Potenciométrico	2x semana	APHA (2005)
Ácidos voláteis totais (mg HAc/L)	Titulométrico	2x semana	Dilalo & Albertson (1969)
Alcalinidade (mg $CaCO_3$/L)	Titulométrico	2x semana	Ripley *et al*. (1986)
DQO (mg/L)	Espectrofotométrico	2x semana	APHA (2005)
LAS (mg/L)	Colorimétrico	2x semana	Jurado *et al*. (2006)

Fonte: Autora, 2020.

Além das análises frequentes de afluente e efluente, foram realizados três perfis temporais de consumo da DQO e do LAS ao longo do ciclo. Ao final das fases I, II e IV houve monitoramento do meio com análises espaçadas de hora em hora por 6 horas e, posteriormente, análise do efluente ao final das 24 horas de ciclo. As análises foram realizadas conforme metodologia mencionada anteriormente. As datas e respectivos ciclos são apresentados na Tabela 2.

Tabela 2: Análises de perfil temporal de degradação de LAS e DQO no reator.

Fase	*Ciclo*
I	38
II	145
IV	261

Fonte: Autora, 2020.

3.2.5 Análise de DQO

O afluente alimentado no reator apresentava concentração de 600 mg O_2/L, representando carga similar a águas residuárias sanitárias.

A análise de DQO ocorre em condições extremamente ácidas ($H_2SO_{4_{conc}}$), em altas temperaturas, com o auxílio de um agente químico oxidante forte e na presença de íons prata que atuam como catalisadores, e de mercúrio(II) que atua como

complexante e eliminador de cloretos. Embora a demanda química do oxigênio possa ser medida com vários oxidantes, o mais comum é com o dicromato, conforme a reação descrita por Zuccari (2005):

$$10C_xH_yO_z + nCr_2O_7^{2-} + 4nH^+ \rightarrow 10xCO_2 + 2nCr^{3+} + (2n + 5y)H_2O$$

onde $n = 4x + y - 2z$.

No caso deste trabalho, foi utilizado dicromato de potássio. A 1,25 mL de amostra adicionam-se 0,75 mL de solução de dicromato de potássio e sulfato de mercúrio e 1,75 mL de solução de ácido sulfúrico com sulfato de prata. Após agitação, digere-se os tubos a 150 °C por 2 horas. Após o resfriamento das amostras, os tubos são lidos em espectrofotômetro a 620 nm. Uma curva padrão de absorbância mostra a concentração de DQO presente em casa tubo.

3.2.6 Curva Padrão de LAS

A partir de uma solução de 4000 mg/L de LAS, foram retiradas alíquotas que foram diluídas para obter soluções de LAS nas concentrações 1,0, 1,5, 2,0, 3,0 e 5,0 mg/L. Para leitura de absorbância destes padrões, seguiu-se a metodologia conforme método descrito por Jurado *et al* (2006). As leituras foram feitas em duplicata. A equação da reta e o coeficiente de correlação foram calculados por análise de regressão linear pelo programa Microsoft Excel (2016). Estes dados foram utilizados durante a fase II de operação.

Para as fases III e IV de operação, uma nova solução padrão foi utilizada, contendo 2000 mg/L de LAS. Alíquotas foram diluídas para obter soluções com 0,5, 1,5, 2,0, 3,0 e 4,0 mg/L de LAS. Pelo mesmo método descrito acima referente à fase II, a equação da reta e o coeficiente de correlação foram calculados por análise de regressão linear pelo programa Microsoft Excel (2016).

4 Resultados e Discussão

A temperatura média foi de 24,2 °C. Considerando que a temperatura durante a operação do reator não fora controlada, esta variou entre 17,6 °C e 29,5 °C.

A quantidade inicial de sólidos totais foi de 43,54 g/L, divididos em 37,13 g/L de sólidos voláteis e 6,41 g/L de sólidos fixos. Ao final da operação, a quantidade de sólidos totais foi de 39,29 g/L, sendo 33,57 g/L de sólidos voláteis e 5,71 g/L de sólidos fixos. Nota-se queda de biomassa devido a morte celular e perdas durante o bombeamento de descarga do líquido no reator.

Durante a operação, houve monitoramento de parâmetros que dizem respeito à performance e saúde da microbiota presente no reator. Foram analisados pH, alcalinidade e ácidos voláteis tanto do afluente como do efluente e os valores estão apresentados na Tabela 3

Tabela 3: Valores médios de parâmetros de monitoramento do biorreator: pH, alcalinidade total e ácidos voláteis referentes a todos os ciclos.

	pH	*Alcalinidade Total (mg CaCO3/L)*	*Ácidos Voláteis (mg HAc/L)*
Afluente	7,73 ± 0,20	263,24 ± 6,19	64,96 ± 14,93
Efluente	6,88 ± 0,13	410,37 ± 10,23	61,52 ± 22,01

Fonte: Autora, 2020.

Sabe-se que durante o ciclo, compostos ácidos são gerados no meio de cultivo como resultado da decomposição da matéria orgânica por microrganismos fermentativos. Estes ácidos, por sua vez, são consumidos por microrganismos acetogênicos. Desta forma, compostos gerados diminuem o pH do meio quando a velocidade de consumo (ou degradação) dos microrganismos fermentativos não corresponde à velocidade e degradação dos microrganismos acetôgenicos e metanogênicos. Assim, subprodutos ácidos do ciclo degradativo da matéria orgânica estão dispostos no meio, o que justifica o fato de o pH do efluente ser menor do que o pH do afluente (CHERNICHARO, 1997).

Na produção de ácidos orgânicos, a alcalinidade do sistema deve ser suficiente para efeitos de neutralização por meio da formação de sais. Porém, quando há desequilíbrio do biossistema, o bicarbonato gerado por meio do consumo de

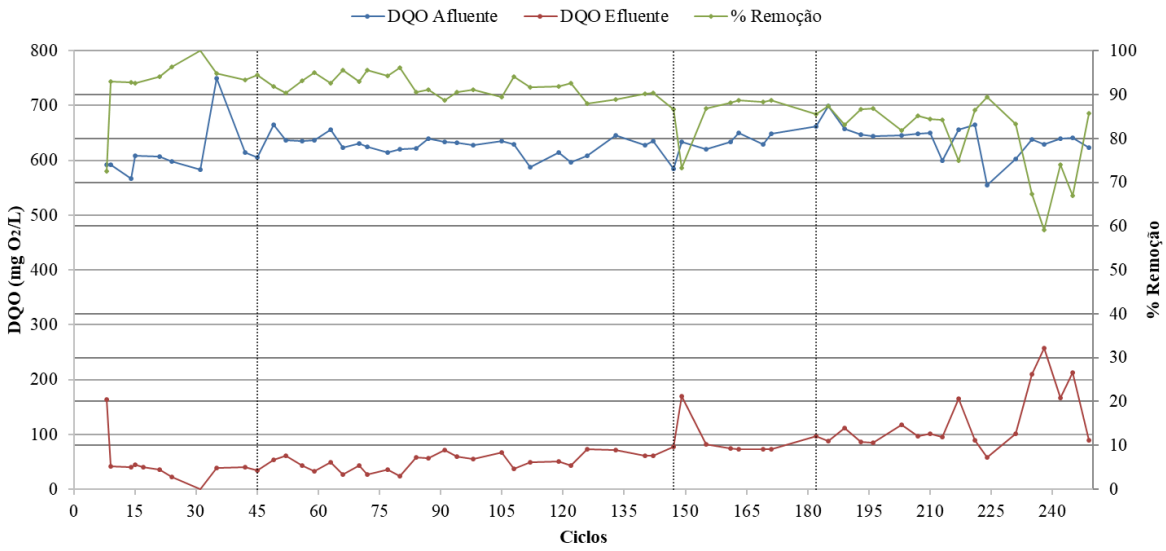
compostos inorgânicos continua a se decompor até a formação de gás carbônico, podendo também contribuir para a acidificação do meio (DILLALO, 1969; RIPLEY, 1986).

Nota-se alto desvio padrão atrelado à média de ácidos voláteis, este valor faz referência a instabilidade apresentada no sistema durante os ciclos finais da quarta fase de operação.

4.1 DQO

Analisando a variação temporal da DQO do afluente e do efluente, apresentada na Figura 6, é possível observar o consumo de matéria orgânica disponível durante o ciclo de operação, uma vez que valores de DQO do afluente são maiores que valores do efluente. A eficiência de remoção da DQO teve média de 87,86±7,90%. O valor máximo de remoção foi 96,25%, enquanto o valor mínimo foi 59,16% de remoção da DQO.

Figura 6: Variação temporal da DQO do afluente e do efluente, juntamente com a eficiência de remoção.



Fonte: Autora, 2020.

Pode-se observar também que a DQO do efluente atingiu valores reduzidos durante as primeiras fases do projeto, mostrando que a matéria orgânica fora quase totalmente consumida pela biomassa. Na quarta fase, observa-se pequena queda na porcentagem de remoção da matéria orgânica. Esta alteração demonstra queda na

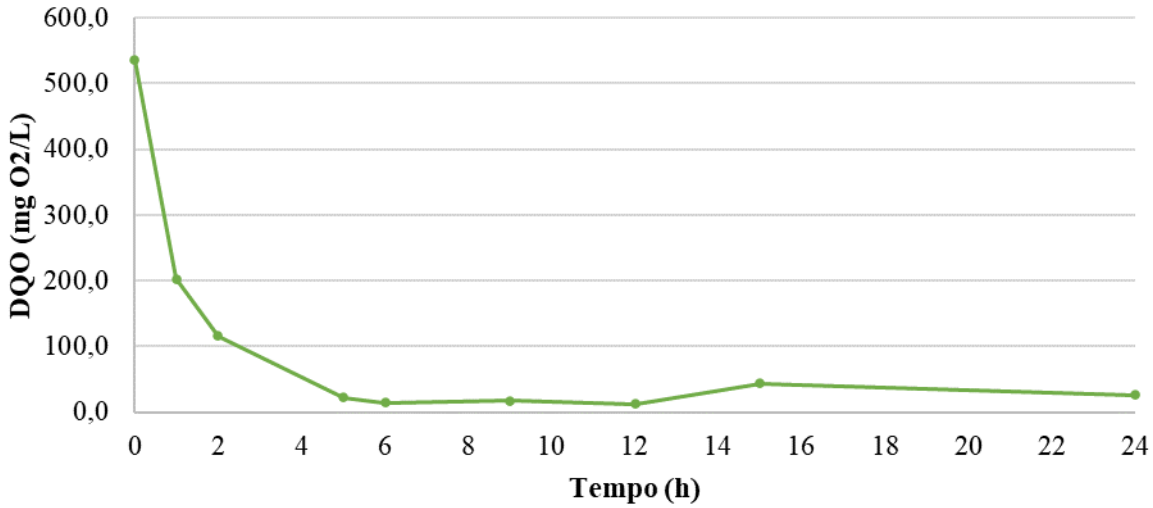
atividade metabólica da microbiota, já observada na instabilidade dos resultados de ácidos voláteis mencionados acima.

Comparando os resultados de degradação biológica com outros trabalhos, nota-se que a operação do reator ASBR com lodo proveniente de rejeitos de abatedouro avícola gerou alta remoção da DQO. Com alimentação de água residuárias proveniente da indústria têxtil com cerca de 810,0 mg/L de DQO disponível, Haroun e Idris (2009) removeu cerca de 75% da DQO alimentada em seu reator de leito fluidizado. Oliveira (2010) apresentou valores superiores a 90% de remoção da DQO também em reator de leito fluidizado para alimentação de cerca de 600,0 mg/L de DQO, com lodo proveniente dos resíduos de suinocultura. Duarte *et al*. (2010) trata de um reator ASBR com lodo proveniente de resíduos de suinocultura e alimentação de cerca de 150,0 mg/L de DQO, constatando remoção de cerca de 74% da carga orgânica.

4.1.1 Perfil da remoção da DQO

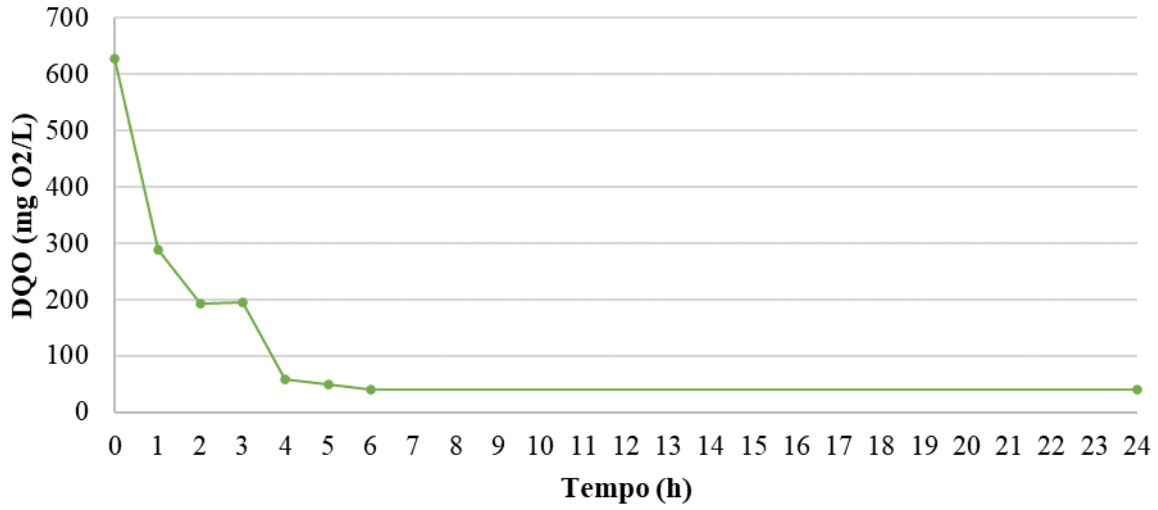
Foram realizados perfis temporais da remoção de DQO no ciclo de operação. Assim, observa-se o comportamento do consumo da matéria orgânica durante as 24 horas de ciclo.

Figura 7: Perfil temporal da degradação da DQO sem adição de LAS.



Fonte: Autora, 2020.

Figura 8: Perfil temporal da degradação da DQO com adição de 10 mg/L de LAS.

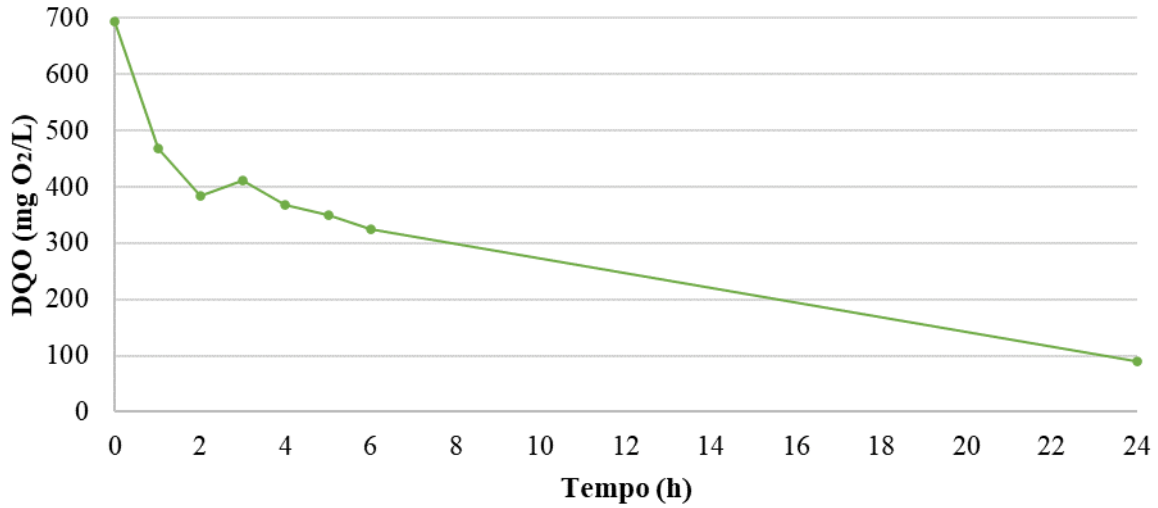


Fonte: Autora, 2020.

As Figuras 7 e 8 apresentam as análises de perfil realizadas durante a primeira e segunda etapa de experimento, ou seja, sem adição de LAS e com adição de 10,0 mg/L de LAS ao afluente, respectivamente. Ambos mostram que a degradação da matéria orgânica é mais intensa entre as 4 e 6 primeiras horas do ciclo, após esse tempo a degradação não apresenta decréscimo expressivo.

Na Figura 9, observa-se o comportamento da degradação de matéria orgânica quando são alimentados 20,0 mg/L de LAS ao reator. Nestes ciclos, a DQO decai de maneira mais lenta, não correspondendo à queda brusca observada anteriormente nas primeiras horas de experimento. Nota-se também que o valor da DQO ao final do ciclo é algo em torno de 90,0 mgO_2/L, valor maior do que havia se observado em outras fases do experimento. Segundo Penteado *et al.* (2006), na presença de LAS, microrganismos anaeróbios têm suas atividades acetogênicas e metanogênicas inibidas, o que explica a menor degradação da matéria orgânica com o aumento na concentração de surfactante.

Figura 9: Perfil temporal da degradação da DQO com adição de 20 mg/L de LAS.



Fonte: Autora, 2020.

Este mesmo comportamento foi observado no estudo de Duarte *et al*. (2010), conforme o acréscimo na quantidade de LAS no ciclo, a eficiência da remoção da DQO decai. Conclui-se que a adição de LAS causa um excesso de nutrientes disponíveis no meio, o que afeta diretamente a fração de degradação da microbiota.

4.2 LAS

Para efeitos da quantificação do LAS em amostras coletadas no reator, curvas de calibração foram ajustadas a partir da leitura da absorbância de soluções-padrão de concentração conhecida de LAS.

Na figura é observada uma equação da reta que correlaciona as duas grandezas linearmente. Assim, é possível o cálculo da concentração de LAS em uma solução a partir de sua absorbância, conforme método proposto para este estudo

Para a fase II de operação, as médias das absorbâncias referentes a cada solução são apresentadas na Tabela 4.

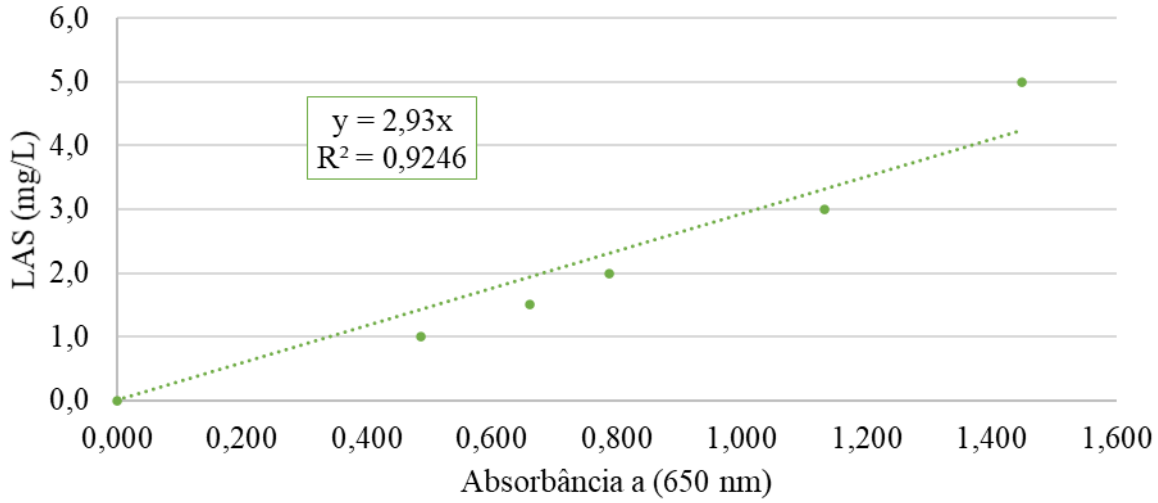
Tabela 4: Concentração e absorbância de soluções-padrão de LAS para fase II.

Concentração (mg/L)	*Absorbância$_{média}$*
0,0	0,000
1,0	0,487
1,5	0,661
2,0	0,788
3,0	1,133
5,0	1,447

Fonte: Autora, 2019.

Utilizou-se a equação $y = 2{,}93x$, onde y é a concentração de LAS em mg/L e x é a absorbância da amostra lida a 650 nm conforme ilustra a Figura 10.

Figura 10: Curva de calibração do LAS para a fase II.



Fonte: Autora, 2019.

É importante ressaltar que o limite desta curva é 5,0 mg/L, observado a partir do coeficiente d correlação $R^2 = 0{,}9246$, que diminui conforme acrescentam-se ponto de maior concentração, ou seja, a equação da reta perde representatividade.

Para as fases de operação III e IV, as leituras de absorbância para cada solução são apresentadas na Tabela 5.

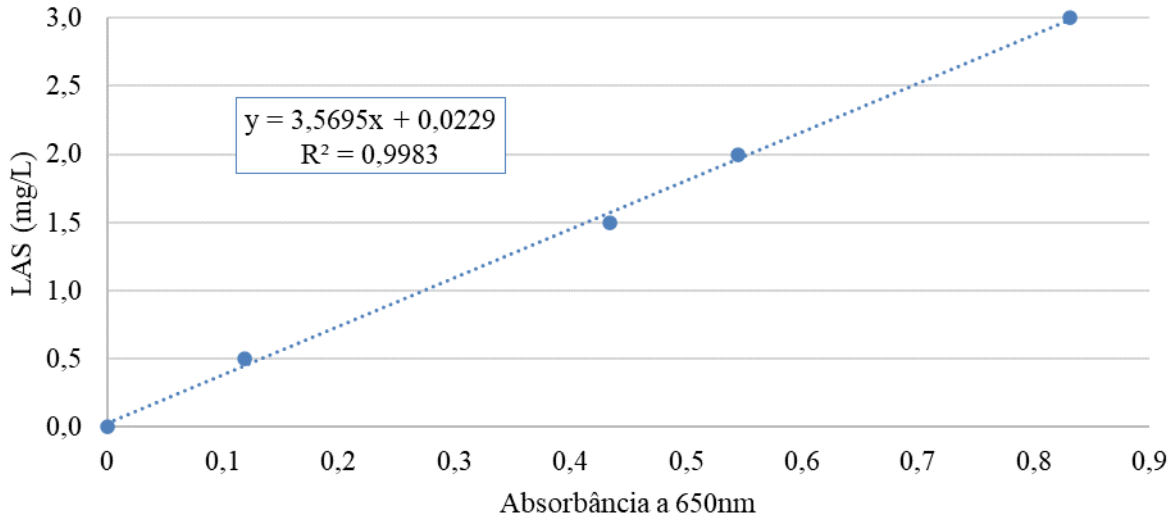
Tabela 5: Concentração e absorbância de soluções-padrão de LAS para as fases III e IV.

Concentração (mg/L)	*Absorbância$_{média}$*
0,0	0,000
0,5	0,119
1,5	0,434
2,0	0,545
3,0	0,832
4,0	0,925

Fonte: Autora, 2019.

Utilizou-se a equação $y = 3{,}5695x + 0{,}0229$, como observado na Figura 11. Para esta reta, o limite é 4 mg/L e o coeficiente de correlação é $R^2 = 0{,}9983$.

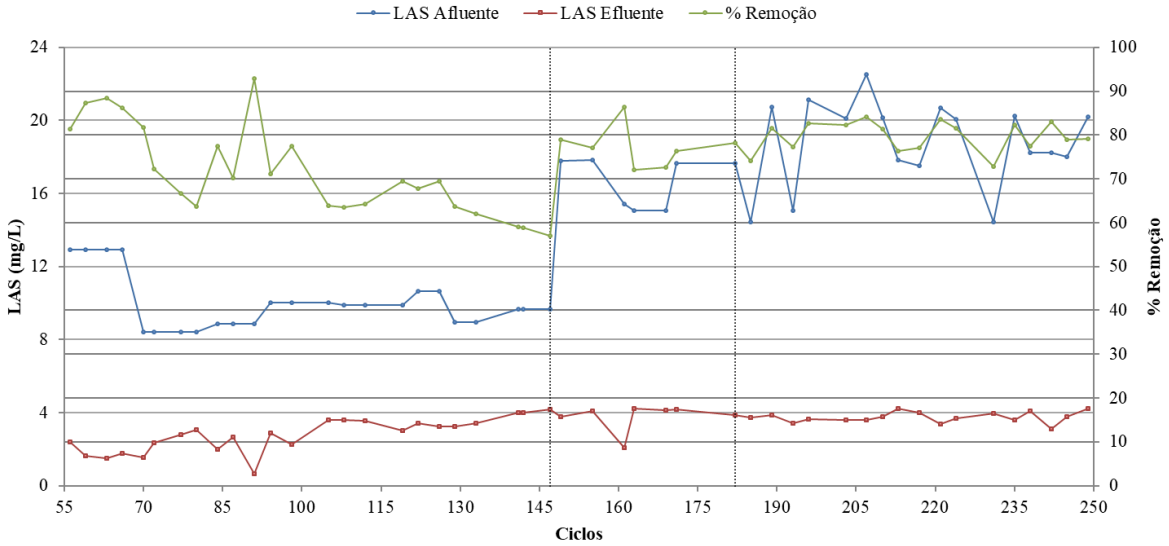
Figura 11: Curva de calibração do LAS para as fases III e IV.



Fonte: Autora, 2019.

O surfactante foi adicionado ao afluente a partir do ciclo 46 (fase II), com concentração inicial de 10,0 mg/L, posteriormente sendo aumentada para 15,0 mg/L e finalmente para 20,0 mg/L. Na Figura 12, observa-se a variação de concentração do LAS no afluente e no efluente, assim como a porcentagem de remoção do mesmo durante as fases de operação.

Figura 12: Variação temporal do LAS do afluente e do efluente, juntamente com a eficiência de remoção.



Fonte: Autora, 2020.

A eficiência de remoção do LAS teve média de 75,26±8,61%, ponderando-se a quantidade de ciclos presentes em cada fase de operação. O valor mínimo de remoção foi de 56,99%, enquanto o valor máximo foi de 92,86%. Na Tabela 6, apresenta-se os resultados de remoção média em cada fase de operação.

Tabela 6: Resultados de remoção média de LAS em cada fase de operação.

Fase	*Amostra*	*LAS (mg/L)*	*Remoção (%)*
I	Afluente	-	-
	Efluente		
II	Afluente	9,99 ± 1,50	71,48 ± 10,31
	Efluente	2,78 ± 0,92	
III	Afluente	16,64 ± 1,36	77,36 ± 4,77
	Efluente	3,76 ± 0,75	
IV	Afluente	18,80 ± 2,40	79,75 ± 3,42
	Efluente	3,74 ± 0,30	

Fonte: Autora, 2020.

Segundo a norma CONAMA n°357, a concentração de tensoativos que reagem ao azul de metileno na disposição de efluentes domésticos e industriais pode atingir valores de 0,5 mg/L de LAS para todas classes de água doce e 0,2 mg/L de LAS para águas salinas, havendo exceções para indústrias específicas. Segundo a CETESB (Companhia Ambiental do Estado de São Paulo), considera-se o LAS como padrão para determinação analítica de tensoativos que reagem ao azul de metileno. Dados da CETESB de 2018 mostram que esgotos sanitários contam com concentrações entre 5,0 e 6,0 mg/L de surfactantes, enquanto dejetos da indústria de detergentes chegam a descarregar cargas com 2000 mg/L de surfactantes.

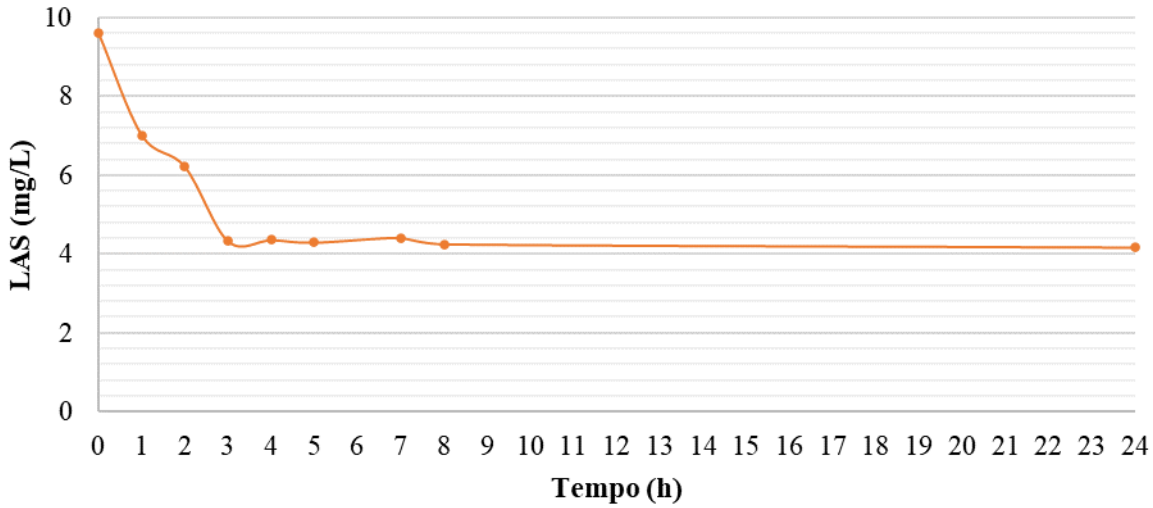
Embora o descarte de efluentes em um ponto possa exceder valores de concentração máxima de LAS permitida, deve-se levar em conta parâmetros como largura e profundidade do corpo d'água em que está sendo feito o descarte, vazão média, entre outros parâmetros que dão a classificação destes corpos d'água segundo a legislação. Após o descarte, a tendência é que a concentração do surfactante diminua de forma a atingir as concentrações permitidas previstas por legislação.

Além do problema da formação de espuma em corpos d'água, altas concentrações de LAS são responsáveis pela aceleração da eutrofização. Homólogos de LAS podem estar conjugados à composto fosforosos na composição de detergentes comerciais, sendo tóxicos para zooplanctons (CETESB, 2019).

4.2.1 Perfil da remoção de LAS

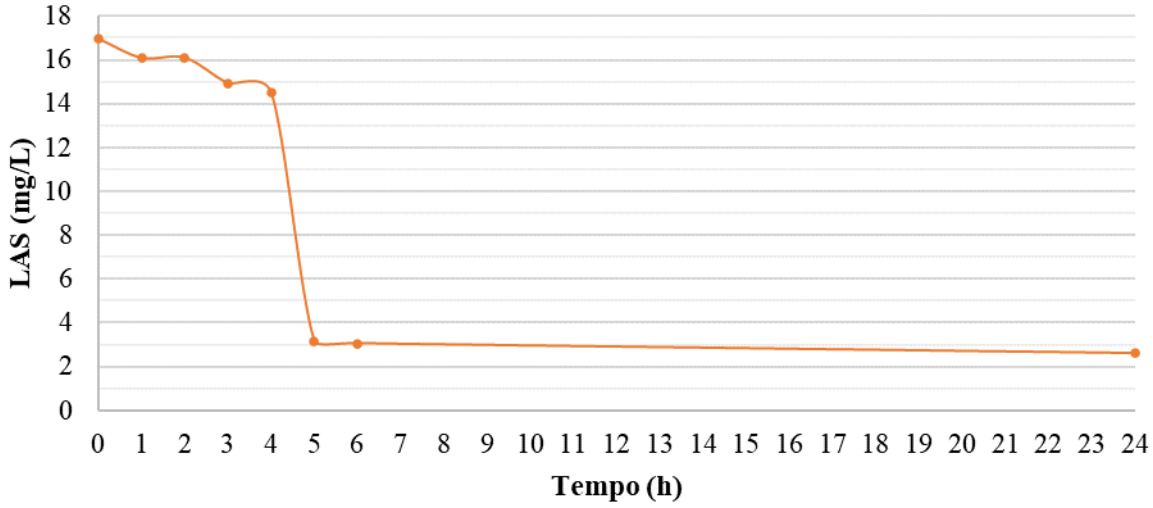
Foram realizados perfis temporais da remoção de LAS do sistema ao longo de um ciclo de operação nas fases II e IV. Os resultados estão apresentados nas Figuras 13 e 14.

Figura 13: Perfil temporal da remoção de LAS com concentração inicial de 10 mg/L.



Fonte: Autora, 2020.

Figura 14: Perfil temporal da remoção de LAS com concentração inicial de 20 mg/L.



Fonte: Autora, 2020.

Na Figura 13, observa-se o perfil referente à fase II da operação. Houve degradação rápida do LAS nas primeiras 3 horas do ciclo, onde o valor da concentração de LAS diminuiu o suficiente para que seu consumo nas próximas horas ser pequeno a ponto de parecer nulo.

A Figura 14 apresenta o perfil referente à fase IV da operação. O consumo do LAS acontece significantemente nas primeiras 5 horas de operação. A partir daí, a concentração de LAS permanece praticamente constante, demonstrando degradação extremamente lenta.

Sabe-se que altas concentrações de substrato levam a taxas metabólicas mais rápidas da microbiota. Tal comportamento é claramente observado nos perfis de remoção de LAS e da DQO, onde as primeiras horas apresentam retas decrescentes bastante inclinadas. Porém, altas taxas metabólicas não são sempre eficazes, sobretudo quando se pretende obter uma biota adaptada ao meio reacional. Não há tempo suficiente para a reprogramação celular, e isto reflete diretamente nos resultados.

Assim como na DQO, na fase IV de operação a remoção ocorre mais lentamente nas primeiras horas do ciclo. Segundo Jurado *et al*. (2006), a quantidade de LAS alimentada influencia diretamente no tempo necessário para que que todo o surfactante seja degradado. O tempo de retenção no reator de 24 horas se mostrou suficiente para degradação de nutrientes, uma vez que esta ocorre nas primeiras 6 horas de ciclo. Sabendo que o tempo não é o principal fator determinante da remoção final neste caso, acredita-se que o excesso de nutrientes no meio e subprodutos de degradação gerados levam à uma sobrecarga da microbiota presente. Neste efeito, observa-se que as atividades metabólicas praticamente cessam até que haja nova alimentação no próximo ciclo. Conclui-se então que a concentração de 20mg/L de LAS é inibitória nas configurações deste trabalho.

Estudo dos anos 1990, mostra eficiência de remoção de 99% do LAS com concentração inicial de 15,0 mg/L em condições reais do lodo em etapa biológica de tratamento de esgoto (HOLT, 1995). Trabalhos mais recentes, mostram reatores de bateladas sequenciais com remoção biológica de LAS em torno de 85% (DUARTE, 2015; ESLAMI, 2015) Há estudos da biodegradação do LAS por fungos, onde Costa (2019) atingiu níveis de 99% de remoção do LAS, colocando o *Penicillium chrysogenum* como importante alternativa a bactérias.

5 Conclusão

O método do Azul de Metileno empregado neste trabalho foi adequado para quantificar e calcular a remoção de surfactante aniônico por processo biológico. A principal vantagem deste método sobre outros propostos na literatura foi evitar o uso excessivo de reagentes por análise, como clorofórmio.

Além disso, quanto à operação do reator biológico, as análises de pH, de alcalinidade, de ácidos voláteis e de DQO comprovaram que a biomassa do reator se adaptou à alimentação fornecida, tendo seus resultados satisfatórios em relação ao esperado. A remoção da DQO teve média de 87,86±7,90%. A remoção do LAS teve média de 75,26±8,61%. Conforme acréscimo da concentração de LAS no afluente, notou-se incapacidade da microbiota em consumir todos nutrientes disponíveis no meio.

6 Sugestões Para Trabalhos Futuros

O problema de geração de resíduos sólidos foi levantado ao final do experimento, uma vez que o lodo do reator possui uma biota específica e pode conter traços de substâncias tóxicas. O método aeróbio do tratamento biológico, pela presença de oxigênio, faz com que a biota cresça de forma rápida sendo necessário o descarte de lodo constantemente. Ao optar pelo método anaeróbio, o descarte do lodo é feito ao final do experimento ou quando a biota presente mostra disfunção de sua capacidade de digestão. Portanto, como sugestão para trabalhos futuros, é válido estudar o tratamento e o descarte apropriado do lodo como resíduo sólido.

O método simplificado proposto por Jurado *et al.* (2006), apesar de evitar uso excessivo de reagentes, ainda tem como solvente orgânico o clorofórmio ($CHCl_3$). Esta substância, além de provocar danos ao meio ambiente, tem efeito cancerígeno aos seres humanos O descarte correto de soluções contendo clorofórmio se dá por meio de separação e incineração. Como sugestão para trabalhos futuros, recomendo o estudo de solventes orgânicos menos agressivos que substituam a função do clorofórmio no método.

7 Referências Bibliográficas

ABNT - Associação Brasileira De Normas Técnicas. **NBR 10738: Água - Determinação de surfactantes aniônicos pelo método espectrofotométrico do azul de metileno - Método de ensaio**. Rio de Janeiro, 1989.

APHA Awwa Wef. **Standard methods for the examination of water and wastewater**. 21st ed. Washington, DC, USA, 2005.

CETESB – Companhia Ambiental do Estado de São Paulo. **Relatório de Qualidade das Águas Interiores do Estado de São Paulo de 2018**. Governo do Estado de São Paulo, 2019.

CHERNICHARO, C.A.L. **Princípios do Tratamento Biológico de águas residuárias: Reatores Anaeróbicos**; Vol 5. Belo Horizonte: Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental – UFMG, 1997.

COLL, Carmen et al. **A new approach for the selective and sensitive colorimetric detection of ionic surfactants in water**. Journal of Materials Chemistry, v. 20, n. 8, p. 1442-1451, 2010.

CONAMA N° 357: **Classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais.** Diário Oficial da União (DOU) n°053, 2005 p. 59-63.

COSTA, Mayara Franco; DE OLIVEIRA, Ana Maria; DE OLIVEIRA JUNIOR, Enio Nazaré. **Biodegradation of linear alkylbenzene sulfonate (LAS) by Penicillium chrysogenum**. Bioresource Technology Reports, v. 9, p. 100363, 2020.

DILLALO R, ALBERTSON OE. **Volatile acids by direct titration**. Journal WPCF; v. 33, p. 356-365, 1969.

DUARTE, I.C.S., OLIVEIRA, L.L., BUZZINI, A.P., ADORNO, M.A.T., VARESCHE, M.B.A. **Development of a Method by HPLC to Determine LAS and its Application in Anaerobic Reactors**. Journal of the Brazilian Chemical Society, v. 17, n. 7, p. 1360-1367, 2006.

DUARTE, I.C.S., OLIVEIRA, L.L., MAYOR, M.S., OKADA, D.Y., VARESCHE, M.B.A. **Degradation of detergent (linear alkylbenzene sulfonate) in an anaerobic stirred sequencing batch reactor containing granular biomass**. Biodeterioration and Biodegradation, v. 64, p. 129 - 134, 2010.

DUARTE, I.C.S, OLIVEIRA, L.L., OKADA, D.Y., PRADO, P.F., VARESCHE, M.B.A. **Evaluation of the Microbial Diversity in Sequencing Batch Reactor Treating Linear Alkylbenzene Sulfonate under Denitrifying and Mesophilic Conditions Using Swine Sludge as Inoculum**. Brazilian Archives of Biology and Technology, 2015.

ESLAMI, Hadi et al. **The performance of advanced sequencing batch reactor in wastewater treatment plant to remove organic materials and linear alkyl benzene sulfonates**. Jundishapur Journal of Health Sciences, v. 7, n. 3, 2015.

GARCÍA, M. T. et al. **Anaerobic digestion of linear alkyl benzene sulfonates: biodegradation kinetics and metabolite analysis**. Chemosphere, v. 60, n. 11, p. 1636-1643, 2005.

GHADERPOORI, Mansour; DEHGHANI, Mohammad Hadi. **Investigating the removal of linear alkyl benzene sulfonate from aqueous solution by ultraviolet irradiation and hydrogen peroxide process**. Desalination and Water Treatment, v. 57, n. 32, p. 15208-15212, 2016.

HAROUN, Mahdi; IDRIS, Azni. **Treatment of textile wastewater with an anaerobic fluidized bed reactor.** Desalination, v. 237, n. 1-3, p. 357-366, 2009.

HOLT, M. S. et al. **AIS/CESIO environmental surfactant monitoring programme. SDIA sewage treatment pilot study on linear alkylbenzene sulphonate (LAS**). Water Research, v. 29, n. 9, p. 2063-2070, 1995.

JARDAK, Karama; DROGUI, Patrick; DAGHRIR, Rimeh. **Surfactants in aquatic and terrestrial environment: occurrence, behavior, and treatment processes**. Environmental Science and Pollution Research, v. 23, n. 4, p. 3195-3216, 2016.

JAFARINEJAD, Shahryar. **Recent developments in the application of sequencing batch reactor (SBR) technology for the petroleum industry wastewater treatment**. Chem. Int, v. 3, n. 3, p. 241, 2017.

JENSEN, John. **Fate and effects of linear alkylbenzene sulphonates (LAS) in the terrestrial environment**. Science of the total environment, v. 226, n. 2-3, p. 93-111, 1999.

JURADO, E. et al. **Simplified spectrophotometric method using methylene blue for determining anionic surfactants: Applications to the study of primary biodegradation in aerobic screening tests**. *Chemosphere*, 2006, v. 65, p. 278-285.

LAZARO, C.Z., PERNA, V., ETCHEBEHERE, C., VARESCHE, M.B.A. **Sugarcane vinasse as substrate for fermentative hydrogen production: The effects of temperature and substrate concentration**, v. 39, p. 6407-6418, 2014.

MORITA, Dione Mari; SANTANA, José Marcos. **Comparação entre o método do azul de metileno e cromatografia líquida de alta pressão (HPLC) para determinação das concentrações de surfactantes aniônicos em esgotos sanitários**. In: 23 Congresso Brasileiro de Engenharia Sanitária e Ambiental. Saneamento ambiental Brasileiro: Utopia ou realidade. 2005. p. 1-11.

NETO, Luiz Gonzaga Lamego; COSTA, Rejane Helena Ribeiro. **Tratamento de esgoto sanitário em reator híbrido em bateladas sequenciais: eficiência e estabilidade na remoção de matéria orgânica e nutrientes (N, P)**. Eng. sanit. ambiental, v. 16, n. 4, 2011.

OLIVEIRA, Lorena Lima de. **Remoção de Alquilbenzeno linear sulfonado (LAS) e caracterização microbiana em reator anaeróbio de leito fluidificado**. 2010. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

PENTEADO, José Carlos P.; EL SEOUD, Omar A.; CARVALHO, Lilian RF. **Alquilbenzeno sulfonato linear: uma abordagem ambiental e analítica**. Química nova, v. 29, n. 5, p. 1038-1046, 2006.

RIPLEY LE, BOYLE WC, CONVERSE LC. **Improved alkalimetric monitoring for anaerobic digestion of high-strength wastes**. Journal WPCF. v. 58, p. 106-111, 1986.

SHYICHUK, Alexander; ZIÓŁKOWSKA, Dorota. **Determination of anionic surfactants by means of photometric titration with methylene blue dye**. Journal of Surfactants and Detergents, v. 19, n. 2, p. 425-429, 2016.

SUNG, Shihwu; DAGUE, Richard R. **Laboratory studies on the anaerobic sequencing batch reactor**. Water Environment Research, v. 67, n. 3, p. 294-301, 1995.

ZUCCARI, M. L., GRANER, C. A. F., LEOPOLDO, P. R. **Determinação da demanda química de oxigênio (DQO) em águas e efluentes por método colorimétrico alternativo**. Energ. Agric., Botucatu, vol. 20, n. 4, 2005, p. 69-8