

Uso de extrato de levedura como fonte de carbono e de mediadores redox, para a degradação anaeróbia de corante azo

Use of yeast extract as source of carbon and redox mediators for the anaerobic degradation of azo dyes

Cássia Aparecida Rabelo Corrêa

Engenheira Civil pela Universidade Federal de Ouro Preto (UFOP). Mestranda do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental (PPGEA) pela UFOP

Sérgio Francisco de Aquino

Professor Adjunto II do Departamento de Química (Dequi) da UFOP

Paula Cristina de Paula Caldas

Graduanda em Química Industrial da UFOP. Bolsista do Programa de Iniciação à Pesquisa (PIP) da UFOP

Silvana de Queiroz Silva

Pesquisadora. Bolsista da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) de Pós-Doutorado do PPGEA/UFOP

Resumo

O trabalho investigou a influência do uso do extrato de levedura, fonte dos mediadores redox riboflavina e nicotinamida, na remoção de cor de solução de corante azo Drimaren Azul HF-RL em condições anaeróbias. O trabalho envolveu a execução de ensaios em batelada, em frascos-reatores mantidos a 25 °C, incubados com o azo-corante e lodo anaeróbio na presença e ausência de fontes de carbono (extrato de levedura ou glicose) e de mediadores redox (riboflavina ou extrato de levedura). O monitoramento da variação temporal de cor, a demanda química de oxigênio (DQO) e ácidos graxos voláteis (AGV) mostraram que a adição de extrato de levedura (0,5 g/L) resultou em eficiências de remoção de cor de 80 a 85% nas primeiras 24 horas de incubação, e que os produtos da degradação do azo-corante foram tóxicos para todo o consórcio anaeróbio, o que resultou em baixas eficiências de remoção de DQO na presença e ausência do extrato de levedura. Os resultados indicaram, ainda, que as eficiências de remoção de cor foram inferiores a 30% na presença de apenas glicose (fonte de carbono) ou riboflavina (mediador redox), indicando que o extrato de levedura atuou simultaneamente como fonte de carbono e de mediadores redox.

Palavras-chave: extrato de levedura, mediadores redox, corantes azo, ácidos graxos voláteis, tratamento anaeróbio, efluente industrial.

Abstract

This paper investigated the influence of using yeast extract, which is the source of redox mediators riboflavin and nicotinamide, in the decolorization of solutions containing the azo dye Drimaren Blue HF-RL in anaerobic conditions. It involved the incubation of serum bottles kept at 25 °C and inoculated with the azo-dye, and anaerobic sludge in the presence and absence of carbon source (glucose or yeast extract) and redox mediators (riboflavin and yeast extract). The monitoring of color, chemical oxygen demand (COD) and volatile fatty acids (VFA) showed that the addition of yeast extract (0.5 g/L) resulted in 80 to 85% color removal in the first 24 hours of incubation; and that the metabolites of dye degradation were toxic to the anaerobic microorganisms, which led to low COD removal efficiencies either in the presence or absence of yeast extract. The results also showed that the efficiencies of color removal were below 30% in the presence of only glucose or riboflavin, indicating that the yeast extract acted simultaneously as source of carbon and redox mediators.

Keywords: yeast extract, redox mediators, azo-dyes, volatile fatty acids, anaerobic treatment, industrial effluent.

INTRODUÇÃO

A indústria têxtil representa um importante setor da economia brasileira e mundial, tendo experimentado considerável crescimento nos últimos anos. Como consequência, esta indústria tem aumentado a produção de efluentes líquidos altamente poluidores, contendo elevada carga orgânica, cor acentuada e compostos químicos tóxicos ao homem e ao meio ambiente. Segundo Braile e Cavalcanti (1993), despejos gerados pela indústria têxtil variam à medida que a pesquisa e o desenvolvimento produzem novos reagentes, processos, maquinários, novas técnicas e, também, conforme a demanda do consumidor por outros tipos de tecidos e cores.

Numerosas operações são necessárias a fim de dar ao tecido o máximo de propriedades, gerando assim, em cada etapa, diferentes despejos. Dentre estas etapas, distingui-se a de tingimento, responsável pela alta coloração dos efluentes têxteis, uma vez que estima-se que de 10 a 15% dos corantes aplicados nesta etapa não se aderem às fibras do tecido. Estima-se que existam mais de três mil tipos de corantes para o tingimento de tecidos utilizados comercialmente, sendo 70% destes classificados como corantes azo, caracterizados pela ligação dupla entre átomos de nitrogênio (-N=N-) e, em grande parte, responsáveis pela absorção da radiação eletromagnética e exibição da cor (TUNUSSI; ALEM SOBRINHO, 2002; DOS SANTOS *et al*, 2007a).

Embora os processos de tratamento físico-químicos de coagulação, flotação e sedimentação sejam eficientes na remoção de material particulado de efluentes têxteis, eles são, de forma geral, ineficientes na remoção de cor e de compostos orgânicos dissolvidos (KUNZ *et al*, 1999). Em função desse inconveniente, existe uma predileção pela utilização de processos que realmente possam degradar os compostos de interesse, como os corantes têxteis. Dentro do contexto dos processos destrutivos, cabe aos processos biológicos lugar de destaque, principalmente em função da relativa facilidade encontrada na implantação de sistemas que operam em grande escala e, principalmente, do baixo custo de operação.

Geralmente o processo biológico mais utilizado para o tratamento de efluentes de indústrias têxteis é o sistema de lodos ativados (LEÃO *et al*, 2002), e isso provavelmente ocorre devido ao baixo tempo de residência (quatro a oito horas), à menor área requerida e à maior flexibilidade operacional. Entretanto, o processo tem alguns inconvenientes como o de ser bastante suscetível à composição do efluente (cargas de choque), de produzir um grande volume de lodo, e ter um elevado custo de operação (VON SPERLING, 2005). Além disso, a remoção de corantes azo por bactérias aeróbias é normalmente baixa (10 a 30%), uma vez que tais bactérias preferem usar o oxigênio dissolvido, ao invés dos corantes azo, como aceptor final de elétrons (DOS SANTOS, 2005a). Consequentemente, a maior parte do corante removido no sistema aeróbio é associada, principalmente, à adsorção do corante ao lodo ativado, removido do sistema por sedimentação. Por outro lado, sob condições anaeróbias, tais corantes são usualmente os únicos

aceptores finais de elétrons, possibilitando a descoloração redutiva pela redução do grupo cromóforo com consequente formação de aminas. Dessa forma, melhores eficiências de remoção de cor (60 a 80%) são normalmente alcançadas durante o tratamento anaeróbio de corantes azo (DOS SANTOS *et al*, 2007b; MÉNDEZ-PAZ *et al*, 2005).

Segundo Dos Santos (2005a), uma estratégia para melhorar a eficiência de cor no tratamento anaeróbio envolve o uso de mediadores redox, que atuam aumentando a velocidade de transferência de elétrons entre o doador (fonte de carbono) e o aceptor (azo-corante), resultando assim em melhoria da cinética de descoloração, principalmente em condições mesofílicas (DOS SANTOS, 2005b). Dessa forma, o processo de redução dos corantes azo ocorreria em duas fases: a primeira consistiria na redução enzimática do mediador redox por meio de elétrons gerados nos processos oxidativos e a segunda fase na transferência química destes elétrons para os corantes azo (DOS SANTOS, 2005a).

De acordo com diferentes pesquisadores (RAU *et al*, 2002; CERVANTES *et al*, 2001; FIELD; BRADY, 2003), vitaminas como a riboflavina (vitamina B2), e outras substâncias como as quinonas (por exemplo, antraquinosa sulfonada – AQS) podem funcionar como mediadores redox, sendo que pesquisas realizadas por Dos Santos *et al* (2003, 2006) mostraram que na presença destes compostos, em condições termofílicas (55 °C), as taxas de descoloração foram aumentadas em 2,7 vezes (AQS) e 6,1 vezes (vitamina B2) usando-se um reator anaeróbio com leito de lodo granular expandido (EGSB). Vale ressaltar que tal estudo foi realizado com mediadores redox adquiridos na forma ‘purificada’ e em condições controladas de temperatura, sendo importante, do ponto de vista prático de engenharia, avaliar a eficiência de remoção de cor à temperatura ambiente e com produtos comerciais que contenham tais mediadores redox.

Com base no exposto, o objetivo deste trabalho foi avaliar se a adição de extrato de levedura, fonte dos mediadores redox riboflavina (vitamina B2) e niacina (vitamina B3), resulta no aumento da velocidade de degradação de corantes azo e no consequente aumento da eficiência de remoção de cor em frascos-reatores anaeróbios mantidos à temperatura de 25 °C e inoculados na presença e ausência de glicose. O uso de extrato de levedura foi avaliado em função de tal material ser de baixo custo e facilmente encontrado no mercado. Além disso, a confirmação da efetividade do extrato de levedura abriria a possibilidade de utilização do resíduo de indústrias de fermentação, que descartam leveduras utilizadas na produção de cerveja e cachaça, como fonte de mediadores redox.

Metodologia

Condições de incubação

Os ensaios em batelada foram realizados com o corante azo Azul Drimaren HF-RL, de grande uso na indústria têxtil, sendo que em um ensaio foi utilizado ainda o corante não-azo Vermelho Sidercron VS-

RB (composto à base de vinilsulfona), sempre na concentração de 400 mg/L. Os corantes foram obtidos de uma indústria têxtil mineira e foram utilizados diretamente sem qualquer etapa de purificação ou hidrólise. Infelizmente as estruturas dos corantes não foram disponibilizadas pelos fabricantes e não puderam ser encontradas no *Chemical Abstract Service* (CAS). Todos os ensaios em batelada foram realizados em frascos de vidro de 250 mL, os quais foram devidamente vedados com tampas de borracha e lacre de alumínio. As condições anaeróbias foram estabelecidas por meio de purga do *headspace* com gás nitrogênio, sendo os frascos mantidos sob constante agitação (100 rpm) e temperatura controlada (25 °C), em incubadora *shaker* por um período que variou de 7 a 11 dias, até a estabilização da remoção de cor. O pH foi monitorado e mantido dentro da faixa ideal (6,8 a 7,2) para o crescimento dos micro-organismos anaeróbios (SPEECE, 1996) por meio da adição de 2.500 mg/L de tampão bicarbonato (NaHCO₃) à solução nutricional.

Os frascos-reatores foram inoculados com lodo anaeróbio proveniente de um reator Upflow Anaerobic Sludge Blanket (UASB), alimentado com esgoto sanitário e operado em escala de demonstração no Centro de Treinamento e Pesquisas em Saneamento (CeTPS) da Companhia de Saneamento de Minas Gerais da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG-COPASA), localizado na Estação de Tratamento de Esgotos (ETE) Arrudas, na cidade de Belo Horizonte, Minas Gerais. A concentração de biomassa dentro dos frascos-reatores foi mantida em ~ 4.000 mg/L para manter a relação corante/micro-organismo (C/M) igual a 0,1 – determinada em ensaios preliminares como a melhor relação C/M para trabalho. Para fixar a relação C/M em 0,1, optou-se por fixar a concentração do corante utilizado em 400 mg/L e introduzir dentro dos frascos-reatores um volume também fixo de 20 mL de solução corante. O volume de micro-organismos introduzido em cada frasco-reator dependia da concentração de micro-organismos presente no lodo, que era definido pela análise prévia dos sólidos suspensos voláteis (SSV), de forma que o volume de solução de nutrientes era variável para completar o volume final em 200 mL.

A solução nutricional utilizada continha macro e micronutrientes, conforme as sugestões de Aquino *et al* (2007), e a relação DQO:N:P mínima de 350:5:1, sugerida por Chernicharo (2007). Todos os frascos-reatores continham solução nutricional em excesso, preparada para uma demanda química de oxigênio (DQO) de 5.000 mg/L.

A remoção abiótica de cor no sistema anaeróbio foi avaliada incubando-se frascos-reatores com corante na ausência de lodo, ao passo que a remoção de cor por adsorção do corante à biomassa foi avaliada incubando-se frascos-reatores com lodo autoclavado a 121 °C por 20 minutos. Em alguns ensaios utilizou-se, além do corante, a glicose como fonte de carbono (cossustrato) em concentração de 200 ou 500 mg/L, e extrato de levedura (da Biosystems, Marca Himedia) como fonte de mediadores redox.

O extrato de levedura foi utilizado em concentrações que variaram de 5 a 500 mg/L para avaliar o seu efeito na cinética de degradação dos corantes. O extrato de levedura usado apresenta em sua composição diversas vitaminas, entre elas destacam-se os mediadores redox riboflavina (vitamina B2) e a niacina (vitamina B3), que estão presentes em maior quantidade (50 e 300 µg/g, respectivamente), conforme Figura 1.

No presente estudo, para fins de comparação com o extrato de levedura, em alguns ensaios utilizou-se riboflavina pura (Sigma-Aldrich) como mediador redox em concentrações que variaram de 0,025 mg/L (concentração encontrada em 500 mg/L de extrato de levedura) a 18,8 mg/L (concentração utilizada por Dos Santos (2007a, 2005a,b, 2003) em suas pesquisas.

A Tabela 1 apresenta um resumo das condições operacionais impostas em cada conjunto de frascos-reatores durante os quatro ensaios executados. Em todos os ensaios cada frasco-reator foi incubado em duplicata, sendo os resultados apresentados uma média obtida para os dois frascos.

O primeiro ensaio avaliou, além do comportamento das três concentrações de extrato de levedura, a contribuição da adsorção do corante ao lodo na remoção de cor, o que foi feito incubando-se dois frascos com lodo autoclavado. Dois frascos-reatores com corante e na ausência de lodo também foram incubados (frascos “sem lodo”) para avaliar a remoção abiótica de cor (fotodegradação e/ou degradação do corante pelos reagentes do meio nutricional). Os frascos denominados “Azul HF-RL” continham lodo fresco, corante e solução nutricional, e referem-se ao controle positivo. Neste ensaio foram incubados 20 frascos, sendo que a metade continha glicose como substrato. Os frascos que não continham glicose permitiram avaliar a real influência do doador de elétrons externo (glicose) na remoção de cor.

Tabela 1 – Condições operacionais dos ensaios dos ensaios em batelada

Variável	Ensaio			
	1º	2º	3º	4º
Corante (400 mg/L)	Azul HF-RL	Azul HF-RL ou Vermelho VSRB	Azul HF-RL	Azul HF-RL
Biomassa no estoque (mg/L)	24.440	26.036	24.336	25.879
Biomassa no frasco (mg/L)	~ 4.000	~ 4.000	~ 4.000	~ 4.000
Substrato (mg/L)	sem ou com glicose (200 mg/L)	sem glicose	sem glicose	sem ou com glicose (500 mg/L)
Mediador redox	extrato de levedura (5; 50 e 500 mg/L)	extrato de levedura (5; 50 e 500 mg/L)	extrato de levedura (50; 100 e 500 mg/L) ou riboflavina (0,025 mg/L)	extrato de levedura (500 mg/L) ou riboflavina (0,25; 2,5 e 18,8 mg/L)

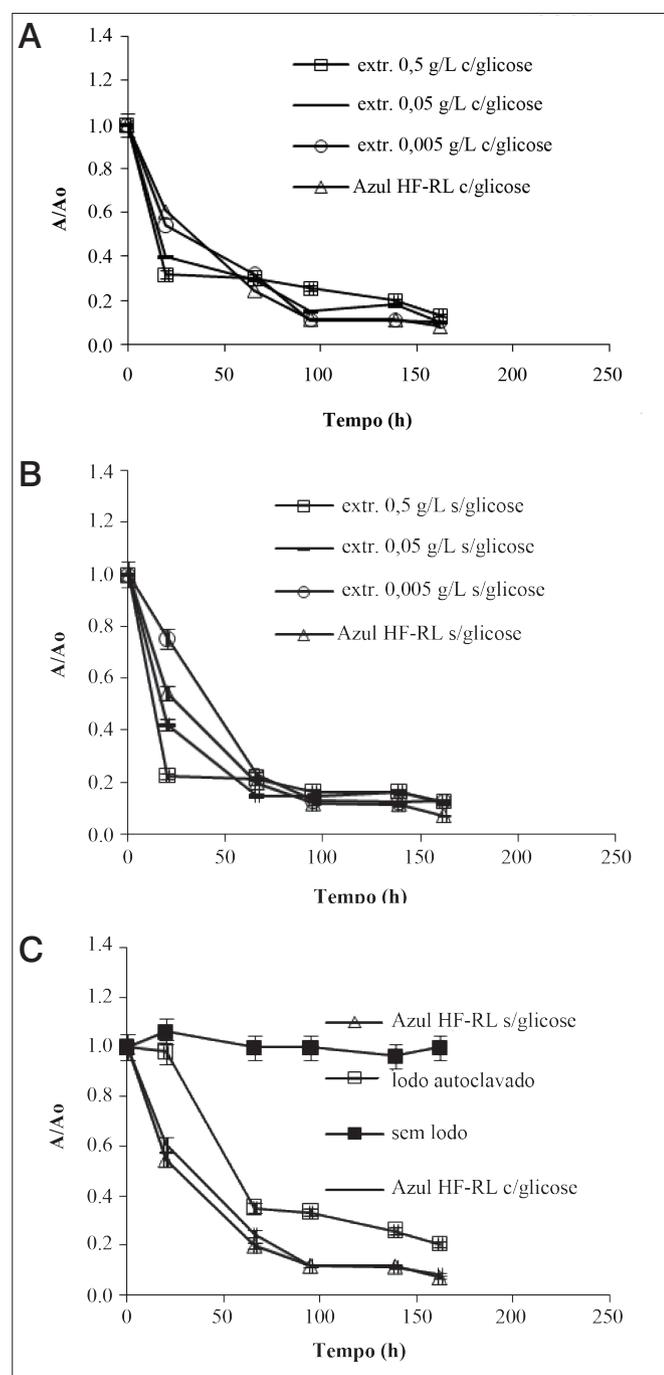


Figura 1 – Variação temporal da absorbância durante o primeiro ensaio nos frascos incubados com glicose (A) e sem glicose (B) e para avaliar remoção abiótica do corante (C)

O segundo ensaio foi realizado sem a adição de glicose, e permitiu avaliar a repetição dos dados obtidos no primeiro ensaio bem como o comportamento do extrato de levedura na degradação do corante não-azo Vermelho Sidercron VSRB. Da mesma forma que no primeiro ensaio, frascos-reatores denominados “sem lodo” e “lodo autoclavado” também foram inoculados para avaliar a remoção de cor por, respectivamente, degradação abiótica e adsorção do corante.

No terceiro ensaio avaliou-se a ação da riboflavina (vitamina B2), adicionada na forma pura, como mediador redox. Portanto, além dos frascos de controle já descritos, dois frascos-reatores foram incubados ainda com concentração de riboflavina correspondente ao valor desta vitamina presente no extrato de levedura. No quarto e último ensaio avaliou-se o efeito de três diferentes concentrações de riboflavina, além do efeito da adição de glicose e extrato de levedura na concentração de 0,5 g/L. As três concentrações de riboflavina utilizadas corresponderam a 10 e a 100 vezes o valor desta vitamina presente no extrato de levedura, bem como a concentração de riboflavina utilizada por Dos Santos (2007a, 2005a, b) em sua pesquisa.

Após a coleta diária de amostras, estas eram centrifugadas por cerca de 15 minutos a 5.000 rpm para remoção de sólidos suspensos, sendo o sobrenadante resultante preparado para análise dos parâmetros pH, cor, DQO e ácidos graxos voláteis (AGV). O monitoramento da cor foi realizado em espectrofotômetro 600 Plus da FEMTO no comprimento de onda de máxima absorvância dos corantes-modelo utilizados ($\lambda_{\text{máx}} = 600 \text{ nm}$ para o azul HF-RL; $\lambda_{\text{máx}} = 475 \text{ nm}$ para o vermelho VSRB), ao passo que as análises de pH, DQO e de SSV foram realizadas de acordo com os procedimentos descritos no *Standard Methods* (APHA, 1998). No caso da DQO, foi utilizado o método colorimétrico com o sobrenadante das amostras centrifugadas, de forma que a DQO reportada nesse trabalho refere-se àquela centrifugada.

Para análise dos AGV, intermediários da digestão anaeróbia, foi utilizada uma coluna de troca iônica Aminex HPX-874 da Bio-Rad, conectada a um cromatógrafo da HP (Hewlett Packard), série 1050, com detector UV-Vis (ultravioleta- visível) no comprimento de onda (λ) de 210 nm. A fase móvel (H_2SO_4 0,01 M) foi mantida em regime isocrático (0,6 mL/minuto), a coluna foi mantida à temperatura de 55 °C e o volume de injeção empregado foi o de 10 μL . A quantificação dos AGV foi feita por padronização externa com curva de calibração na faixa de 12,5 a 400 mg/L, tendo sido analisados os ácidos fórmico, acético, propiônico, isobutírico, butírico, isovalérico e valérico, conforme detalhes apresentados por Mesquita (2009) que fez a validação do método de análise.

Os resultados cromatográficos obtidos permitiram calcular a concentração individual de cada ácido orgânico acumulado no meio, a qual foi convertida em DQO por meio da Equação 1:

$$\text{DQO}_{\text{AGV}} = 0,35 \text{ ácido fórmico} + 1,07 \text{ ácido acético} + 1,51 \text{ ácido propiônico} + 1,81 (\text{ácido butírico} + \text{ácido isobutírico}) + 2,04 (\text{ácido valérico} + \text{ácido isovalérico})$$

Equação 1

Desta forma, as figuras apresentadas neste artigo fazem referência à $\text{DQO}_{\text{total}}$, que refere-se à DQO centrifugada medida, e à DQO AGV, calculada conforme a Equação 1 e referente aos AGV presentes. Subtraindo-se a DQO AGV da DQO total tem-se a DQO não-AGV, que indica a matéria orgânica causadora daquela proveniente do substrato não-degradado somado aos produtos microbianos solúveis (SMP) acumulados no meio.

Resultados e discussão

Os resultados apresentados na Figura 1 e Tabela 2 mostram que a remoção anaeróbia de cor foi possível na temperatura de 25 °C, tendo sido obtidas eficiências médias de ~39 a 45% após as primeiras 24 horas de incubação. A Figura 1C mostra que nos frascos-reactores denominados “sem lodo”, ou seja, sem a presença de biomassa, praticamente não houve remoção de cor, indicando que processos abióticos (fotodegradação e/ou degradação pelos reagentes do meio nutricional) não contribuíram significativamente para a degradação do corante. Contudo, a Tabela 2 e Figura 1C mostram que houve uma considerável remoção final de cor (79%) nos frascos-reactores denominados “lodo autoclavado”, indicando que parte do corante foi adsorvida pelos biosólidos presentes no meio, fato este também observado nos outros ensaios. A adsorção do corante ao lodo autoclavado não foi significativa nas primeiras 24 horas, como mostra a Tabela 2, sendo que foi justamente nesse período que o extrato de levedura parece ter desempenhado seu papel como fonte de mediadores redox, favorecendo a aceleração de biodegradação do corante. Tal fato pode indicar que o processo de transferência de elétrons do mediador redox reduzido para o corante azo ocorre extracelularmente, conforme hipotetizado por Van der Zee *et al* (2001). A adsorção do corante aos biosólidos é até desejável em sistemas contínuos, uma

vez que potencializaria a remoção de cor em baixos valores de tempo de detenção hidráulica (TDH), desde que o reator anaeróbio seja bem operado e não perca sólidos pelo efluente. A redução dos corantes azo adsorvidos resultaria em produção de amins aromáticas com consequente regeneração dos sítios de adsorção.

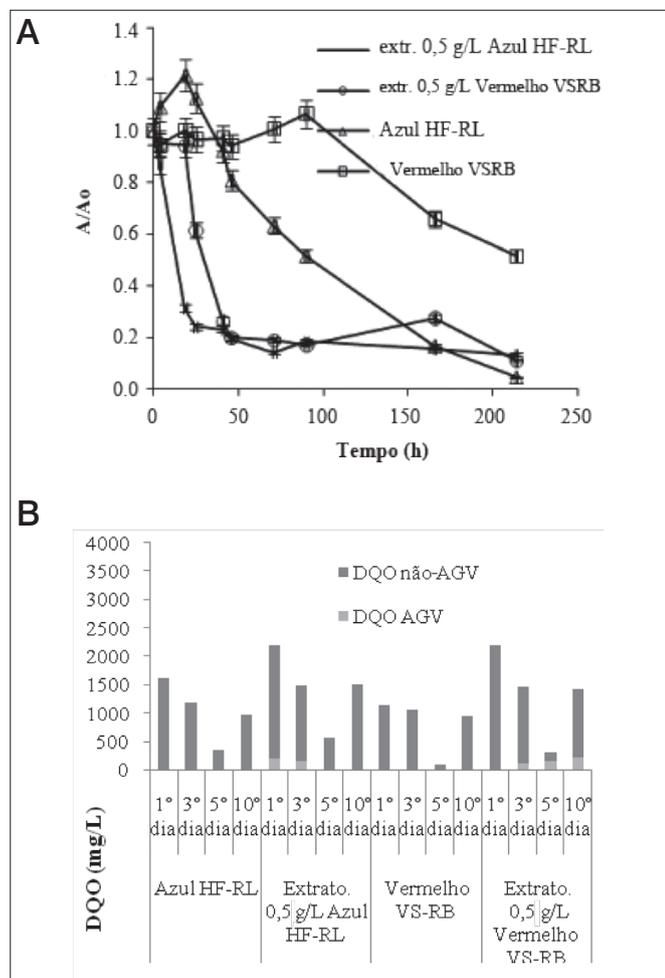
Os resultados da Figura 1 e Tabela 2 mostram que eficiências de degradação semelhantes, tanto nas primeiras 24h de incubação quanto no final do ensaio, foram obtidas entre os frascos-reactores denominados “Azul HF-RL sem glicose” (45% e 93%), e os frascos-reactores denominados “Azul HF-RL com glicose” (39% e 91%). Tais resultados indicam que adição de glicose aos frascos-reactores na concentração de 0,2 g/L não influenciou na capacidade de remoção de cor sugerindo que a lise celular, acentuada em ensaios de batelada devido a limitação nutricional ou de substrato, ou ainda ao acúmulo de intermediários tóxicos, pode ter resultado no acúmulo de produtos microbianos solúveis (SMPs) que foram utilizados como fonte de carbono e energia no meio. Outra hipótese seria a de que os subprodutos da degradação do Azul HFLR, provavelmente amins aromáticas, foram utilizados pelos micro-organismos anaeróbios como fonte de carbono e energia. Contudo tal hipótese é pouco provável tendo em vista o grau de toxicidade observado (ver dados de AGVs a partir do segundo ensaio) que resultou inclusive em baixa eficiência de remoção de DQO.

Tabela 2 – Eficiência média de remoção de cor* obtida após 24 horas e no final da incubação em todos os ensaios de batelada realizados

Ensaio	Frascos-reactores	% remoção de cor (após 24 h)	% remoção de cor (final ensaio)
1°	Extrato 0,005 g/L sem glicose	24 ± 3	87 ± 9
	Extrato 0,05 g/L sem glicose	58 ± 5	88 ± 7
	Extrato 0,5 g/L sem glicose	77 ± 4	87 ± 11
	Extrato 0,005 g/L com glicose	45 ± 2	89 ± 6
	Extrato 0,05 g/L com glicose	60 ± 7	90 ± 10
	Extrato 0,5 g/L com glicose	68 ± 6	86 ± 12
	2°	Azul HF-RL	0 ± 1
Sem lodo azul HF-RL		2 ± 2	7 ± 4
Lodo autoclavado azul HF-RL		0 ± 2	77 ± 3
Extrato 0,5 g/L azul HF-RL		76 ± 8	87 ± 8
Vermelho VSRB		3 ± 4	48 ± 5
Sem lodo vermelho		0 ± 3	37 ± 2
Lodo autoclavado vermelho		2 ± 1	53 ± 4
Extrato 0,5 g/L vermelho		38 ± 9	89 ± 11
3°	Azul HF-RL	10 ± 1	85 ± 8
	Lodo autoclavado azul HF-RL	7 ± 2	74 ± 9
	Sem lodo azul HF-RL	0 ± 0	4 ± 3
	Sem corante com extrato 0,5 g/L	0 ± 1	45 ± 2
	Extrato 0,05 g/L	30 ± 3	76 ± 7
	Extrato 0,1 g/L	70 ± 5	88 ± 9
	Extrato 0,5 g/L	87 ± 6	93 ± 12
	Riboflavina 0,025 mg/L	17 ± 2	90 ± 15
4°	Azul HF-RL	9 ± 2	16 ± 8
	Azul HF-RL com glicose (0,5 g/L)	25 ± 3	93 ± 13
	Sem lodo Azul HF-RL	12 ± 1	13 ± 3
	Sem corante com extrato (0,5 g/L)	31 ± 7	64 ± 7
	Lodo autoclavado	15 ± 3	16 ± 2
	Extrato (0,5 g/L)	68 ± 5	92 ± 9
	Riboflavina 0,25 mg/L	11 ± 6	18 ± 3
	Riboflavina 2,5 mg/L	17 ± 6	59 ± 6
	Riboflavina 18,8 mg/L	17 ± 4	65 ± 7

*A remoção de cor foi calculada subtraindo-se da absorbância (no máximo comprimento de onda do corante) inicial do sobrenadante (amostra centrifugada coletada logo após a incubação), a absorbância da amostra centrifugada coletada após determinado tempo de incubação (24 horas ou final do ensaio).

A Tabela 2 mostra ainda que a concentração de extrato de levedura de 0,5 g/L resultou em maior eficiência de remoção de cor, promovendo 77% de descoloração do sobrenadante nas primeiras 24 horas de incubação, valor que superou os 68% observados, também nas primeiras 24 horas, nos frascos-reatores incubados com extrato de levedura (0,5 g/L) e com glicose (0,2 g/L). Como esperado, os frascos-reatores incubados com extrato de levedura na concentração de 0,5 g/L obtiveram melhores resultados do que aqueles com extrato de levedura na concentração de 0,05 g/L, que por sua vez resultaram em maior eficiência que os frascos-reatores incubados com extrato de levedura 0,005 g/L; tanto na ausência quanto na presença de glicose (Tabela 2). Tais resultados mostram que o aumento da concentração de extrato de levedura aumenta a eficiência de remoção de cor nas primeiras 24 horas de incubação, sendo que no final do ensaio os resultados de eficiência se igualam, provavelmente devido ao fenômeno de adsorção. Estes confirmam a hipótese de que o extrato de levedura fornece mediadores redox para os micro-organismos anaeróbios, e que o aumento da velocidade de degradação de corantes azo está associado à presença de tais compostos no meio reacional, conforme proposto por diferentes pesquisadores (MÉNDEZ-PAZ, 2005; DOS SANTOS, 2005a).



Os resultados do segundo ensaio (Figura 2 e Tabela 2) mostram que na presença ou ausência do extrato de levedura, a solução de corante azo Drimaren Azul HF-RL foi descolorida mais rapidamente que a do corante não-azo Vermelho VSRB. Nos frascos-reatores “Azul HF-RL” obteve-se eficiência de remoção final de cor de 95%, enquanto que nos “Vermelho VSRB” a remoção não passou de 48%. O mesmo efeito foi observado na presença do extrato de levedura, com melhores eficiências de remoção de cor alcançadas nas primeiras 24 horas de incubação também nos frascos-reatores incubados com o corante azo Drimaren Azul HF-RL (76%), quando comparado com o corante não-azo Vermelho VSRB (38%). Contudo, no final do experimento, a eficiência de remoção de cor das soluções dos dois corantes foi praticamente a mesma (Figura 3), confirmando os resultados do primeiro ensaio e indicando que a adsorção, embora desprezível nas primeiras 24 horas, é importante para a descoloração do efluente em tempos de contato maiores. De fato, a Tabela 2 mostra que nos frascos-reatores incubados com lodo autoclavado e na presença do corante azo Drimaren Azul HF-RL, 77% da remoção de cor ocorreu devido à adsorção do corante, ao passo que para o corante não-azo Vermelho Sidercron VSRB a remoção por adsorção foi de 53%. Os resultados do segundo ensaio também confirmaram que a remoção de corantes por fatores abióticos (frascos sem lodo) é muito pequena, muito embora tenha sido maior para o corante não-azo.

Os dados do monitoramento de AGV no segundo ensaio são apresentados na Figura 2B, e referem-se aos resultados dos frascos incubados com extrato de levedura ou incubados para controle (“Azul HF-RL”

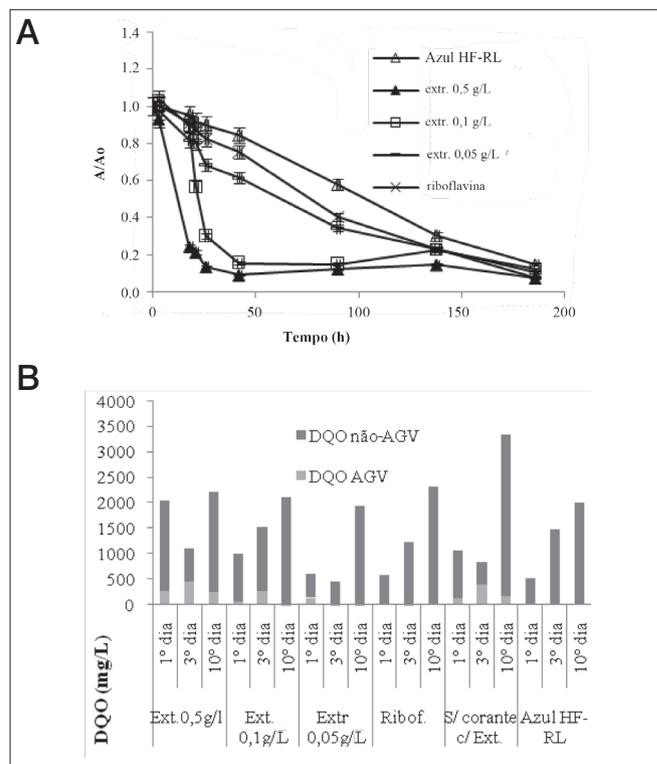


Figura 2 – Variação temporal da absorbância (A) e AGV (B) durante o segundo ensaio

Figura 3 – Variação temporal da absorbância (A) e AGV (B) durante o terceiro ensaio

e “Vermelho VSRB”), sendo que somente nos frascos incubados com extrato de levedura houve acúmulo de AGV. Percebe-se que, mesmo nestes frascos incubados com maior carga orgânica (devido à DQO extra causada pelo extrato de levedura), houve pouco acúmulo de AGV, sendo a maior parte da DQO devido a outros compostos (corante não-degradado; subprodutos da degradação do corante e SMP). Percebe-se, ainda, que a DQO diminuiu gradativamente de ~ 2.000 mg/L (frascos incubados com extrato de levedura) e ~1.500 mg/L (frascos incubados sem a presença de extrato de levedura) do primeiro dia até ~ 500 mg/L no quinto dia, indicando a degradação de grande parte do extrato de levedura. A partir do quinto dia a DQO aumentou, o que pode ter ocorrido devido à liberação de SMP no meio, resultante da lise celular acentuada no final do ensaio de batelada. A liberação de SMP pode contribuir para o aporte de fonte de carbono no meio, que pode ser usada por micro-organismos para geração de equivalentes redutores.

Os resultados do terceiro ensaio (Tabela 2) confirmaram aqueles obtidos nos ensaios anteriores, ou seja, o aumento da concentração de extrato de levedura resulta em aumento na eficiência de remoção de cor nas primeiras 24 horas; sendo que na sua ausência a remoção anaeróbia de cor só é efetiva para elevados tempos de incubação (> 100 horas). A eficiência de descoloração nos frascos-reatores incubados com 0,5 g/L de extrato de levedura foi maior que nos incubados com 0,1g/L de extrato de levedura, sendo maior do que nos frascos incubados com 0,05 g/L de extrato de levedura, confirmando a tendência observada no primeiro ensaio. Além disso, no terceiro ensaio confirmou-se que a adsorção de corante ao lodo só é significativa após as primeiras 24 horas de incubação; que sem lodo não há remoção significativa de cor por fatores abióticos; e que o extrato de levedura não causou cor significativa no comprimento de onda usado para monitorar o corante (Tabela 2).

O terceiro ensaio mostrou ainda que a riboflavina foi menos eficiente que o extrato de levedura durante as primeiras 24 horas de incubação. Os dados apresentados na Figura 3A e Tabela 2 mostram que, enquanto nos frascos-reatores incubados com o extrato de levedura (0,5 g/L) a eficiência de degradação foi de 87% antes de se atingir as primeiras 24 horas de incubação, naqueles incubados com a riboflavina na concentração equivalente àquela presente no extrato de levedura (“riboflavina”), essa eficiência não passou de 20% no mesmo período de tempo; valor este inferior ao obtido (30%) nos frascos incubados com extrato de levedura na concentração de 0,05 g/L (Tabela 2). Esses resultados indicam que outros compostos presentes no extrato de levedura (além da riboflavina) parecem auxiliar na degradação do corante, atuando como fonte de carbono e/ou como nutrientes, ou fornecendo ainda outros mediadores redox. Vale salientar que o extrato de levedura contém grande quantidade de niacina (ácido nicotínico) que pode ser utilizada pelas células na produção de nicotinamida. A nicotinamida faz parte da estrutura da coenzima conhecida como nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD⁺), a qual transporta elétrons do doador primário (substrato) para aceptores de elétrons intracelulares

como as flavinas (FAD) que, por sua vez, contém em sua estrutura a riboflavina como sítio ativo. Dessa forma, a adição de extrato de levedura pode ter contribuído para acelerar a síntese de tais carreadores de elétrons intracelulares, aumentando assim a velocidade de biodegradação do corante.

A Figura 3B apresenta os resultados da análise cromatográfica realizada nos frascos incubados no terceiro ensaio e mostra que somente nos frascos incubados com extrato de levedura houve acúmulo de AGV. Os resultados confirmam que a adição de extrato de levedura causa aumento da DQO no início do ensaio, e que em todos os frascos há uma elevação desta no final do ensaio. Tais resultados parecem indicar que o aumento de DQO no final do ensaio não é devido ao extrato de levedura não degradado, mas sim aos SMP liberados como resultado da lise celular que ocorre em maior intensidade no final dos ensaios em batelada. Esse aspecto é positivo tendo em vista que o uso de extrato de levedura acelera a remoção de cor e, muito embora resulte em aumento da DQO, pode não comprometer a qualidade do efluente anaeróbio devido à sua natureza biodegradável. De fato, resultados de experimentos, com alimentação contínua, apresentados por Correa (2009), mostram que a adição de extrato de levedura aumentou a DQO afluente, mas não comprometeu a qualidade do efluente de reator UASB em escala de bancada. Tal reator apresentou eficiências superiores a 90% na remoção de cor na presença do extrato de levedura (0,5 g/L), mas apenas 50% na remoção de DQO (na presença ou ausência de extrato de levedura), o que ocorreu devido a efeitos tóxicos causados, provavelmente, pelo acúmulo de aminas aromáticas.

O efeito da riboflavina foi reavaliado no quarto ensaio, no qual foram incubados frascos com tal vitamina em concentrações maiores que àquela encontrada no extrato de levedura 0,5 g/L. A Figura 4A e a Tabela 2 mostram que nas primeiras 24 horas houve remoção de cor quatro vezes maior nos frascos-reatores incubados com 0,5 g/L de extrato de levedura, quando comparado aos incubados com 0,0188 g/L de riboflavina, concentração esta usada por Dos Santos (2007a) e equivalente a 750 vezes a concentração presente em 0,5g/L de extrato de levedura. Os resultados da Figura 4A mostram ainda que houve maior remoção de cor durante as primeiras 24 horas de incubação nos frascos-reatores incubados com extrato de levedura quando comparado com a glicose, confirmando a hipótese de que o extrato de levedura age simultaneamente como fonte de carbono (doador de elétrons) e como fonte de vitaminas e mediadores redox.

Vale ressaltar que, apesar de no quarto ensaio os frascos-reatores terem sido incubados com concentrações maiores de riboflavina, os resultados de remoção final de cor no meio foram diferentes daqueles obtidos no terceiro ensaio. Isso porque no terceiro ensaio a remoção final de cor chegou a 90% nos frascos-reatores incubados com riboflavina 0,025 mg/L (concentração equivalente àquela presente em 0,5 g/L de extrato de levedura); ao passo que durante o quarto ensaio a remoção de cor nos frascos incubados com riboflavina a 0,0188 g/L

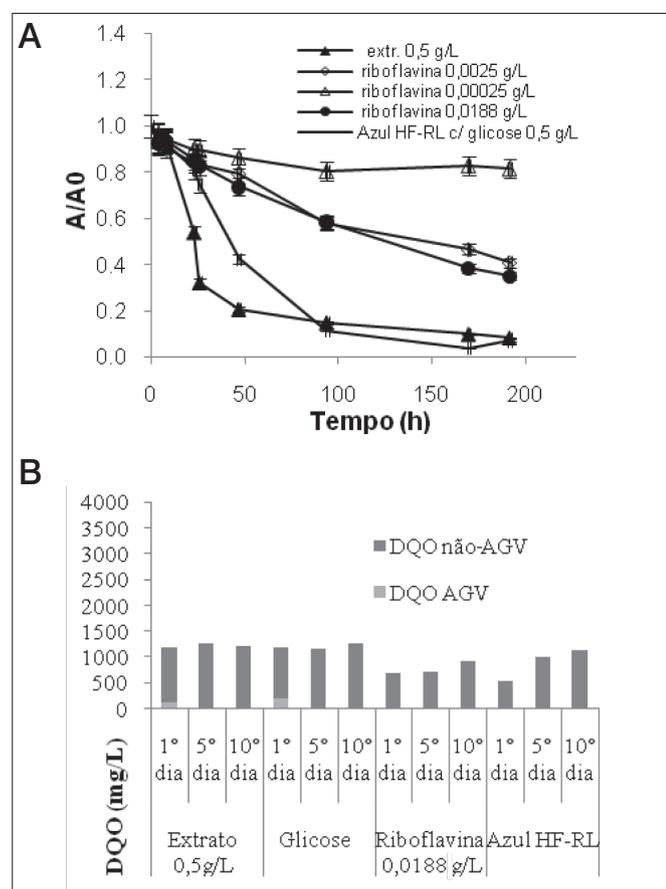


Figura 4 – Variação temporal da remoção de cor (A) e AGV (B) durante o quarto ensaio

(concentração 750 vezes maior) foi de apenas 65%. Como o lodo utilizado não foi o mesmo, é possível que tal divergência tenha sido a utilização de um lodo menos ativo no quarto ensaio. As eficiências de remoção de cor na presença de riboflavina obtidas neste estudo são menores, comparadas àquelas obtidas por outros pesquisadores (por exemplo, por Dos Santos *et al*, 2003), e isso se deve provavelmente à menor temperatura de trabalho (25 °C) utilizada neste trabalho em comparação com aquelas empregadas (35 e 55 °C) empregadas na maioria dos trabalhos reportados na literatura internacional. É importante salientar que um dos objetivos do presente trabalho foi avaliar a remoção de cor em sistemas anaeróbios em temperaturas inferiores à faixa mesofílica, tendo em vista que a maioria dos reatores anaeróbios é operada no Brasil à temperatura ambiente.

Por fim, observando os resultados finais das eficiências alcançadas no quarto ensaio (Tabela 2) para os frascos-reatores incubados com glicose na concentração de 0,5 g/L (“Azul HF-RL com glicose”), e os frascos controle incubados sem a presença da glicose ou extrato de levedura (“Azul HF-RL”), observa-se que ao contrário dos resultados apresentados no terceiro ensaio, quando a glicose foi adicionada aos frascos em concentração 0,2 g/L, o aumento da concentração de glicose para 0,5 g/L melhorou a eficiência de remoção de cor no final do ensaio. Contudo, eficiências ainda maiores foram obtidas só com o extrato de levedura

(0,5 g/L) nas primeiras 24 horas, o que justifica a dispensa do uso de glicose como cossubstrato. A Figura 4B apresenta os resultados da análise cromatográfica realizada com as amostras coletadas durante o quarto ensaio, com os valores convertidos em concentração de DQO. Os dados mostram que, da mesma forma que observado nos ensaios anteriores, somente os frascos-reatores incubados com extrato de levedura e glicose acumularam AGV. Também mostraram que tanto o extrato de levedura quanto a glicose adicionados a 0,5 g/L causam aumento da DQO no início do ensaio, quando comparado com o frasco controle (Azul HFRL), e que os frascos incubados com riboflavina ou só com o corante Azul HF-RL resultam em elevação da DQO no final do ensaio. Tais resultados confirmam que a DQO remanescente no final do ensaio, nos frascos incubados com extrato de levedura ou glicose, não é necessariamente devido a tais materiais não-degradados, mas sim, devido a outros produtos gerados durante a degradação (SMP e subprodutos do corante).

A elevada concentração de DQO não-AGV em todos os frascos indica toxicidade aos micro-organismos anaeróbios, e como não há acúmulo significativo de AGV, parece que o efeito tóxico ocorre também nos acidogênicos. É possível que tal inibição seja devido às aminas aromáticas produzidas após a redução do corante azo, conforme discutido por diferentes autores (VAN DER ZEE *et al*, 2001; STOLZ, 2001; MÉNDEZ-PAZ *et al*, 2005; e ISIK E SPONZA, 2007). A presença de compostos tóxicos pode induzir à lise celular e à liberação de polímeros extracelulares, ou seja, resultar no aumento de SMP, conforme demonstrado por Aquino e Stuckey (2004). Tal fato parece ter contribuído para a baixa eficiência de remoção de DQO e até mesmo para o aumento da DQO ao longo do ensaio em alguns frascos.

A Tabela 3 apresenta um resumo da modelagem cinética feita com os dados obtidos ao longo dos quatro ensaios realizados. Os frascos-reatores incubados com lodo autoclavado e os sem a presença de lodo ou corante não foram listados na Tabela 3 por apresentarem valores de R^2 muito pequenos, em função de a remoção de cor ser negligenciável (na ausência de lodo) ou não-modelada pelas cinéticas de ordem 1 e 2 (na presença de lodo autoclavado). Tal estudo cinético foi feito na tentativa de verificar se havia alguma tendência na ordem cinética de remoção de cor com o uso de mediadores redox.

Percebe-se que a maior parte dos resultados foi ajustada de acordo com a cinética de segunda ordem, principalmente nos frascos incubados com extrato de levedura ou riboflavina. Tais resultados indicam que a velocidade de remoção de cor depende não só da concentração residual do corante, mas também de outro fator.

O fato de a maioria dos dados terem se ajustado à cinética de ordem 2 pode corroborar a hipótese de que a biodegradação de azo-corantes na presença de mediadores redox é uma mescla de mecanismos biótico (produção de equivalentes reduzidos e redução do mediador redox) e abiótico (redução do corante pelo mediador redox reduzido e reciclagem do mesmo). Os dados apresentados sugerem que a velocidade da reação é dependente não só da concentração residual de corante, mas possivelmente da concentração residual de

Tabela 3 – Determinação* da constante (k), coeficiente de ajuste (R²) e a classificação quanto à ordem da cinética de remoção de cor que resultou em melhor ajuste

Ensaio	Frascos-reatores	k (d ⁻¹)	R ²	Ordem
1°	Azul HF-RL sem glicose	0,362	0,919	1°
	Azul HF-RL com glicose	0,359	0,926	1°
	Lodo autoclavado azul HF-RL	0,241	0,916	1°
	Extrato 0,5 g/L com glicose	1,422	0,866	2°
	Extrato 0,05 g/L com glicose	1,973	0,846	2°
	Extrato 0,005 g/L com glicose	2,506	0,876	2°
	Extrato 0,5 g/L sem glicose	1,461	0,821	2°
	Extrato 0,05 g/L sem glicose	1,76	0,788	2°
	Extrato 0,005 g/L sem glicose	2,188	0,899	2°
2°	Azul HF-RL extrato 0,5 g/L	2,208	0,79	2°
	Vermelho com extrato 0,5 g/L	2,817	0,877	2°
	Extrato 0,5 g/L	1,709	0,56	2°
3°	Extrato 0,1 g/L	1,366	0,643	2°
	Extrato 0,05 g/L	0,305	0,977	1°
	Riboflavina	0,289	0,988	1°
4°	Azul HF-RL	0,241	0,964	1°
	Extrato 0,5 g/L	2,059	0,981	2°
	Riboflavina 0,00025 g/L	0,035	0,696	2°
	Riboflavina 0,0025 g/L	0,234	0,989	2°
	Riboflavina 0,0188 g/L	0,395	0,99	2°
	Glicose	0,4	0,931	1°
	Azul HF-RL	0,03	0,838	2°

*Os valores de K e R² foram obtidos após linearização dos dados experimentais para se obter gráficos do tipo ln (Absorbância) versus t para ajuste de 1ª ordem ou do tipo 1/(Absorbância) versus t para ajuste de 2ª ordem.

mediador redox. Isso é plausível uma vez que os mediadores redox são biodegradáveis, podendo ser utilizados como fonte de carbono e energia por micro-organismos do consórcio anaeróbio.

Por fim, a análise dos valores de k (d⁻¹) determinados em cada ensaio confirmou a interpretação feita anteriormente, ou seja, a presença de extrato de levedura no meio resultou em significativo aumento no valor de k, sendo que o valor de k foi proporcional à concentração de extrato de levedura presente.

Conclusões

Os resultados mostraram que a presença da glicose nas concentrações de 0,2 g/L, adicionada juntamente com o extrato de levedura nas concentrações de 0,005, 0,05 e 0,5 g/L não resultou em melhoria da cinética de remoção de cor, quando comparada ao extrato de levedura adicionado nas mesmas concentrações sem a presença da glicose. Por sua vez, a presença de 0,5 g/L de glicose na ausência do extrato de levedura resultou na remoção de apenas 25% de cor nas primeiras 24 horas, ao passo que o extrato de levedura na mesma concentração foi capaz de remover 87% da cor do meio durante o mesmo período de tempo. Os resultados do trabalho mostraram que a adição de extrato de levedura na concentração de 0,5 g/L resultou nos melhores resultados de remoção de cor, quer seja com a adição conjunta de glicose, quer seja na sua ausência. Dessa forma, pode-se dispensar o uso de glicose como doador de elétrons e utilizar apenas o extrato de levedura, que parece ter atuado como fonte de mediadores redox e de carbono/energia.

A presença da riboflavina (vitamina B2) também acelerou a degradação do corante, mas tais resultados foram muito inferiores aos obtidos com o extrato de levedura, mesmo quando a riboflavina estava presente em concentração 750 vezes maior que aquela presente em 0,5 g/L de extrato de levedura. Tais resultados indicam que outros compostos, além da riboflavina, presentes no extrato de levedura (por exemplo, vitamina niacina e outros nutrientes) influenciaram positivamente na degradação do azo-corante estudado.

A adição de extrato de levedura contribuiu para a elevação da DQO do meio líquido, contudo tal material possui elevada biodegradabilidade, podendo ser removido com facilidade do meio, seja pela escolha de tempo de residência apropriado ou com o uso de sistemas de pós-tratamento aeróbio. Os resultados das análises de AGV mostraram que os intermediários da degradação do azo-corante foram tóxicos para todo o consórcio anaeróbio, sendo este fato o principal causador da baixa eficiência de remoção de DQO observada nos frascos-reatores monitorados.

Agradecimentos

Os autores gostariam de agradecer à estudante Maria Beatriz Cardoso Ferreira Monteiro pelo apoio na realização de alguns experimentos; à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) pela concessão de bolsa de Pós-doutorado para a pesquisadora Silvana de Queiroz Silva; e à Universidade Federal de Ouro Preto (UFOP) pela concessão da bolsa de Programa de Iniciação à Pesquisa (PIP) à estudante de graduação.

Referências

- AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION (APHA) *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*. 20 Ed. Washington, EUA: APHA, 1998.
- AQUINO, S.F.; STUCKEY, D.C. Soluble microbial product formation in anaerobic chemostats in the presence of toxic compounds. *Water Research*, v. 38, n. 2, p. 255-266, 2004.
- AQUINO, S.F. et al. Metodologias para determinação da atividade metanogênica específica (AME) em lodos anaeróbios. *Engenharia Sanitária Ambiental*, v. 12, p. 192-201, 2007.
- BRAILE, PM.; CAVALCANTI, J. E. W. A. *Manual de tratamento de águas residuárias industriais*. São Paulo: Cetesb, 1993.
- CERVANTES, F.J. et al. Enhanced decolourisation of Acid Orange 7 in a continuous UASB reactor with quinones as redox mediators. *Water, Science and Technology*, v. 44, p. 123-128, 2001.
- CHERNICHARO, C.A.L. *Princípios do tratamento biológico de águas residuárias "Reatores Anaeróbios"*. 2 ed. Belo Horizonte: SEGRAC, v. 5, 2007.
- CORREA, C.A.R. *Efeito da adição do extrato de levedura na degradação de corante azo em reator UASB*. Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental) – Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, 2009.
- DOS SANTOS, A.B. Aplicação conjunta de tratamento anaeróbio termofílico por lodo granular e de mediadores redox na remoção de cor de águas residuárias têxteis. *Engenharia Sanitária e Ambiental*, v. 10, n. 3, p. 253-259, 2005a.
- _____. *Reductive decolourisation of dyes by thermophilic anaerobic granular sludge*. Tese (Doutorado) – Wageningen University, Wageningen, The Netherlands, 2005b.
- 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, p. 2369-2385, 2007a.
- _____. Impacto dos mediadores redox na remoção de cor de corantes azo e antraquinônico por lodo granular anaeróbio sob condições mesofílicas e termofílicas. *Engenharia Sanitária Ambiental*, v. 12, n. 1, p. 102-108, 2007b.
- _____. Potentials of high-temperature anaerobic treatment and redox mediators for the reductive decolourisation of azo dyes from textile wastewaters. *Water, Science and Technology*, v. 54, n. 2, p. 151-156, 2006.
- DOS SANTOS, A.B. et al. Effect of redox mediator, AQDS, on the decolourisation of a reactive azo dye containing triazine group in a thermophilic anaerobic EGSB reactor. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 33, n. 7, p. 942-951, 2003.
- FIELD, J.A.; BRADY, J. Riboflavin as a redox mediator accelerating the reduction of the azo dye Mordant Yellow 10 by anaerobic granular sludge. *Water, Science and Technology*, v. 48, n. 6, p. 187-193, 2003.
- ISIK, M.; SPONZA, D.T. Fate and toxicity of azo dye metabolites under batch long-term anaerobic incubations. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 40, n. 4, p. 934-939, 2007.
- KUNZ, A.P.G. et al. *Descoloração de Corantes Têxteis por Meio de HRP Imobilizada em IRA-400*. In: WORKSHOP SOBRE BIODEGRADAÇÃO, Campinas, 1999.
- LEÃO, M. D. et al. *Controle ambiental na indústria têxtil: acabamento de malhas*. 1 ed, Belo Horizonte: Projeto Minas Ambiente, Editora Segrac, 2002.
- MÉNDEZ-PAZ, D.; OMIL, F.; LEMA, J. M. Anaerobic treatment of azo dye Acid Orange 7 under batch conditions. *Water Research*, v. 39, n. 5, p. 771-778, 2005.
- MESQUITA, PL. *Caracterização de Produtos Microbianos Solúveis (SMPs) em reatores aeróbio e anaeróbio de bancada em diferentes condições operacionais*. Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental) – Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, 2009.
- RAU, J.; KNACKMUSS, H.J.; STOLZ, A. Effects of different quinoid redox mediators on the anaerobic reduction of azo dyes by bacteria. *Environmental Science and Technology*, v.36, n. 7, p. 1497-1504, 2002.
- SPEECE, R. E. *Anaerobic biotechnology for industrial wastewaters*. Archae Press., Nashville, USA, 1996.
- STOLZ, A. Basic and applied aspects in the microbial degradation of azo dyes. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 56, n. 1-2, p. 69-80, 2001.
- TUNISSI, J. L.; ALEM SOBRINHO, P. Remoção de cor e nitrificação de efluentes de tinturaria têxtil através de processos biológicos anaeróbio-aeróbio. In: XXVIII CONGRESSO INTERAMERICANO DE INGENIERIA SANITARIA Y AMBIENTAL, 2002, Cancun. CD XXVIII CONGRESSO INTERAMERICANO DE INGENIERIA SANITARIA Y AMBIENTAL, 2002.
- VAN DER ZEE, F.P. et al. Application of redox mediators to accelerate the transformation of reactive azo dyes in anaerobic bioreactors. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 75, n. 6, p. 691-701, 2001.
- VON SPERLING, M. *Princípios do tratamento biológico de águas residuárias*. Vol. 1. Introdução à qualidade das águas e ao tratamento de esgotos. 3. ed. Belo Horizonte: Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental - UFMG, 2005. v. 1. 452 p.