

Degradação dos homólogos do alquilbenzeno linear sulfonato em lodo anaeróbico disperso

Degradation of the homologues of linear alkylbenzene sulfonate by dispersed anaerobic sludge

**Luiz Galdino Silva¹, Daniele Campos Silva², Leticia Maria Oliveira³,
Lourdinha Florencio⁴, Savia Gavazza⁵, Mario Takayuki Kato⁴**

RESUMO

Avaliou-se a degradação anaeróbica do alquilbenzeno linear sulfonato (LAS) e seus homólogos em experimento em escala de laboratório. Foi usado lodo disperso para minimizar o efeito da adsorção. Em primeiro lugar, determinaram-se a maior concentração de LAS (substrato) e a menor concentração de etanol (co-substrato) que manteriam os micro-organismos ativos, resultando em 25 e 200 mg.L⁻¹, nessa ordem. Posteriormente, o experimento (90 dias) foi realizado em um reator somente com etanol (controle) e outro (reator teste, triplicata) com ambos os substratos nas concentrações anteriores. Os micro-organismos apresentaram crescimento exponencial em 48 h para os 2 reatores; não ocorreu toxicidade pelo LAS no reator teste durante esse período inicial, quando o etanol foi todo consumido. Após então, houve decréscimo de micro-organismos, indicando possível toxicidade por LAS ou intermediários. Observou-se também a diminuição ou ausência da produção de ácidos graxos voláteis e de metano. Portanto, com lodo disperso, a maior parcela da remoção foi por conta da biodegradação, porém, com formação de intermediários que não o acetato nem o metano, apontando a inibição à acidogênese e à metanogênese. Ao final, a remoção do LAS foi de 35% por biodegradação e apenas 0,35% por adsorção ao lodo. A ordem preferencial de biodegradação para os homólogos foi de C₁₃ para C₁₂, C₁₁ e C₁₀, com percentual de degradação em relação à massa inicial de 49, 31, 24 e 17%, respectivamente. A mesma ordem deu-se para a adsorção, da maior para a menor cadeia alquílica, sendo a remoção por adsorção de 0,85; 0,32; 0,13 e 0,01%, respectivamente.

Palavras-chave: adsorção; biodegradação aeróbia e anaeróbica; homólogos; inibição; surfatante.

ABSTRACT

The anaerobic degradation of linear alkylbenzene sulfonate (LAS) and its homologues was evaluated in batch experiment. Dispersed sludge was used to minimize the effect of adsorption. Initially, the highest concentration of LAS (substrate) and the lowest concentration of ethanol (co-substrate) were determined to maintain the microorganisms active; the results were 25 and 200 mg.L⁻¹, respectively. Afterwards, a 90-day period experiment was conducted with one reactor with only the addition of ethanol (control) and the other (test reactor in triplicate) with both substrates and the previous concentrations found. The microorganisms showed exponential growth in the first 48 h for both reactors; LAS toxicity has not occurred in the test reactor during the first 4 days, during which ethanol was consumed. After that, the microorganisms decreased, indicating possible toxicity due to LAS or intermediates; a decrease or absence of volatile organic acids and methane production was also observed. Therefore, with dispersed sludge the largest removal was due to biodegradation, but with formation of intermediates other than acetate or methane, indicating inhibition of acidogenesis and methanogenesis. At the end, the removal was 35% by biodegradation and only 0.35% by adsorption to the biomass. The preferential order of the biodegradation for the homologues was from C₁₃ to C₁₂, C₁₁ and C₁₀; and the removal in relation to the initial mass of each was 49, 31, 24 and 17%, respectively. The same order occurred to adsorption, from the higher to the lower alkyl chain, with removal of 0.86, 0.32, 0.13 and 0.01%, respectively.

Keywords: adsorption; aerobic and anaerobic biodegradation; homologues; inhibition; surfactant.

¹Laboratório de Saneamento Ambiental do Departamento de Engenharia Civil da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) - Recife (PE), Brasil.

²Bolsista de Desenvolvimento Tecnológico e Industrial (DTI) do Laboratório de Saneamento Ambiental do Departamento de Engenharia Civil da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) - Recife (PE), Brasil.

³Mestre em Tecnologia Ambiental pela UFPE - Recife (PE), Brasil.

⁴Pós-doutora em Tecnologia Ambiental na UFPE - Recife (PE), Brasil.

⁵Ph.D em Tecnologia Ambiental pela Universidade de Wageningen - Holanda.

⁶Pós-Doutora pela Universidade de Cornell - Nova York, Estados Unidos.

Endereço para correspondência: Mario Takayuki Kato - Avenida Acadêmico Hélio Ramos, s/n - Cidade Universitária - 50740-530 - Recife (PE), Brasil -

E-mail: mariotk_kato@yahoo.com.br

Recebido em: 03/09/15 - **Aceito em:** 29/06/16 - **Reg. ABES:** 153982

INTRODUÇÃO

O alquilbenzeno linear sulfonato (LAS) é o tensoativo aniônico de maior produção e consumo mundial. A sua produção representa 45% do total de tensoativos aniônicos produzidos anualmente (MOLDOVAN *et al.*, 2011). Sua aplicação é como o princípio ativo da maioria dos detergentes e sabões para lavar roupas. O produto comercial consiste em uma mistura de homólogos e seus isômeros de posição, com cadeias alquílicas lineares variando de 10 a 14 átomos de carbono (homólogos C_{10} a C_{14} , respectivamente), entretanto, nos produtos atuais de limpeza predomina o LAS com uma mistura dos homólogos C_{10} , C_{11} , C_{12} e C_{13} (NAKAE; TSUJI; YAMANAKA, 1981).

O elevado consumo de LAS tornou a substância um dos tensoativos mais estudados ambientalmente. Em geral, são atribuídos aos tensoativos vários impactos, embora nem sempre verdadeiros ou corretamente avaliados (MUNGRAY & KUMAR, 2011; PENTEADO; EL SEOUD; CARVALHO, 2006). Já foram relatados, por exemplo, que concentrações de LAS até $0,27 \text{ mg.L}^{-1}$ ou 35 mg.kg^{-1} de matéria seca não causam efeito tóxico aos ecossistemas aquáticos nem aos terrestres (HERA, 2013). Uma das principais causas dos problemas nos cursos de água atribuídos ao LAS pode ser creditada ao lançamento de efluentes não tratados, uma vez que diversos exemplos mostram a sua alta remoção em estações de tratamento e em estudos realizados, de até 99% (BERNA *et al.*, 1989; CLARA *et al.*, 2007; LEÓN *et al.*, 2006; TEMMINK & KLAPWIJK, 2004).

A degradação do LAS por micro-organismos aeróbios é bem definida. Jiménez *et al.* (1991) trabalharam com um consórcio de bactérias aeróbias em suspensão e LAS com o anel aromático marcado com carbono 14 (^{14}C). Constataram que 25% do ^{14}C foram convertidos em $^{14}\text{CO}_2$. Já Dong *et al.* (2004) avaliaram a degradação do LAS por bactérias aeróbias heterotróficas *Parvibaculum lavamentivorans*, e houve a formação do ácido sulfofenil carboxilato (SPC) e do ácido sulfofenil dicarboxilato (SPdC) como produtos intermediários da degradação primária e ao final, da formação de H_2O , CO_2 e SO_4^{2-} .

Em ambiente anaeróbio, embora vários trabalhos apontem para uma taxa pouco significativa e demorada do LAS, não há consenso sobre a sua biodegradação. São destacadas a sua precipitação, como sais de cálcio e magnésio, e a sua adsorção ao lodo e sólidos suspensos como os principais mecanismos de sua remoção (BERNA *et al.*, 1989; GARCÍA *et al.*, 2005; JANSEN, 1999; TEMMINK & KLAPWIJK, 2004; WATERS; HOLT; MATTHIJS, 1989; WOLF & FEIJTEL, 1998). García *et al.* (2005) quantificaram a mineralização de 5% dos homólogos C_{10} , C_{12} e C_{14} em ambiente anaeróbio, além da formação de SPC em concentração de $0,25 \text{ mg.L}^{-1}$; entretanto, esses resultados foram atribuídos à difusão de oxigênio na biomassa durante a preparação dos reatores, que provocou uma pequena degradação aeróbia do LAS. Lara-Martín *et al.* (2007) e Lara-Martín *et al.* (2010) quantificaram a degradação primária de 66 a 79% do LAS e a formação de 3 mg.L^{-1} de SPC; também

foram identificados outros intermediários para a degradação primária do LAS em ambiente anóxico/anaeróbio, o ácido metil sulfofenil carboxilato (Me-SPC) e o ácido 4-metil dicarboxilato (Me-SPdC).

Também são relatados na literatura efeitos tóxicos ou inibitórios do LAS para os micro-organismos anaeróbios. García *et al.* (2005) e García *et al.* (2006) quantificaram a inibição de 15 e 5% na produção de biogás para concentrações de 30 mg.L^{-1} dos homólogos C_{10} e C_{12} , respectivamente; e para o homólogo C_{14} ocorreu aumento na produção do biogás. Para a mistura comercial do LAS, o qual contém quase que predominantemente os homólogos C_{10} a C_{13} , a concentração de 14 mg.L^{-1} induziu à inibição de 50% da produção do biogás pelos micro-organismos anaeróbios (IC_{50}), e concentrações menores ou iguais a 10 mg.L^{-1} estimularam a produção de biogás. No entanto García-Morales *et al.* (2001) relataram que concentrações de 6,3 e $18,9 \text{ mg.L}^{-1}$ de LAS foram suficientes para inibir em 50% a produção de biogás pelos micro-organismos metanogênicos e acetogênicos, respectivamente. Essa diferença nos resultados sobre biodegradação e toxicidade do LAS para os micro-organismos anaeróbios mostra, portanto, a existência de contradições. Assim, seria importante o aprofundamento do tema para elucidar o comportamento do LAS em ambiente anaeróbio.

Este trabalho teve como objetivo avaliar a biodegradação dos homólogos do LAS utilizando reatores em escala de bancada com biomassa em suspensão e adaptada a altas concentrações de LAS, acima dos valores de IC_{50} , para micro-organismos anaeróbios.

METODOLOGIA

Reagentes

O padrão do LAS foi obtido na CEPISA Química (San Roque, Espanha), cujas características eram: percentual de matéria ativa de 25,5% e composição de homólogos C_{10} , C_{11} , C_{12} e C_{13} , de 14,1; 31,6; 30,2 e 23,0%, respectivamente. Os padrões dos ácidos graxos voláteis (AGV) e dos álcoois etanol e n-propanol foram adquiridos na Merck; e os padrões dos gases com pureza de 99,99% (mol.mol^{-1}), na White Martins.

Os reagentes utilizados, próprios para as análises cromatográficas, acetoneitrila, ácido etanoico e trietilamina, também foram obtidos na Merck. A água usada em todo o trabalho foi purificada em sistema Milli-Q® Reference da Merck Millipore.

Inóculo

O lodo utilizado como inóculo foi obtido de um reator anaeróbio tipo UASB (fluxo ascendente e manta de lodo) em escala plena, de uma estação de tratamento de esgotos localizada no bairro Manguieira, no Recife, Pernambuco. A sua concentração de sólidos suspensos voláteis era de 30 g.L^{-1} . Esse lodo foi utilizado no experimento inicial na forma dispersa (1%) em frascos de 100 mL (volume útil de 70 mL), para diminuir o efeito da adsorção do LAS e melhor quantificar a degradação biológica do composto.

Equipamentos

A quantificação do LAS foi realizada em um cromatógrafo líquido Agilent series 1100 com injetor de amostras automático, compartimento termostaticado para a coluna, detector de fluorescência e coluna analítica Agilent ChromSep-C₁₈ SS de 250 mm × 4,6 mm × 5 µm. A extração do LAS da biomassa suspensa ocorreu mediante um aparato soxhlet. CH₄, CO₂, AGV e álcoois foram quantificados em um cromatógrafo gasoso Agilent 7890A, com detector de condutividade térmica (CH₄ e CO₂) e ionização de chama (AGV e álcoois). As colunas analíticas utilizadas foram HP-PLOT/Q de 30 m × 0,535 mm × 40 µm, para CO₂ e CH₄; DB-WAXetr de 30 m × 0,53 mm × 1 µm, para etanol; e TR-WAX de 30 m × 0,25 mm × 0,25 µm, para AGV. O crescimento microbiano foi medido por espectrofotometria em um equipamento HACH DR 2010.

Métodos analíticos

As condições cromatográficas para a separação e quantificação dos homólogos do LAS consistiram de fase móvel composta de um solvente A e um solvente B, compostos de água e acetonitrila, respectivamente. Para o solvente A foi acrescido trietilamina e ácido etanoico para concentração de 5 mM. A separação do LAS foi realizada com eluição gradiente, que se iniciou com 30% do solvente B até atingir 60% ao final de 20 min, com fluxo de 1 mL.min⁻¹. A temperatura da coluna foi de 40°C; o volume de amostra injetada, de 100 µL; e a detecção ocorreu por fluorescência, com comprimento de onda de excitação de 230 nm e de emissão de 290 nm. O método de separação cromatográfico foi o usado por Silva *et al.* (2009), adaptado de Berna *et al.* (1989). Antes da introdução no cromatógrafo para a quantificação do LAS, as amostras foram filtradas em membrana de náilon de 0,45 µm. A extração do LAS da biomassa suspensa foi realizada durante 8 h usando 150 mL de metanol como solvente de extração, em um aparato soxhlet.

Para a quantificação do biogás, foi empregada a padronização externa, na qual os percentuais de biogás nos reatores foram comparados com as concentrações percentuais de uma mistura padrão desses gases. Na cromatografia, utilizou-se hidrogênio como gás de arraste ao fluxo de 2 mL.min⁻¹. As temperaturas do injetor, detector e forno da coluna foram fixadas em 250, 300 e 70°C, respectivamente. O volume de amostra injetada foi de 500 µL à razão de *split* de 30:1. O método foi adaptado do ASTM D1945-03 (ASTM, 2003).

Para a quantificação dos álcoois se empregou hidrogênio como gás de arraste ao fluxo de 2 mL.min⁻¹. As temperaturas do injetor e detector foram fixadas em 150 e 250°C, respectivamente. Para o forno da coluna foi aplicado um gradiente de temperatura que se iniciou em 40°C e depois de 6 minutos passou para 180°C a 50°C.min⁻¹ e permaneceu dessa maneira por 5 minutos. O volume injetado foi de 1 µL da amostra aquosa no modo *splitless*. A preparação da amostra se deu pela adição de 35 µL de n-propanol (padrão interno) a 1 mL da amostra filtrada em filtro de náilon de 0,45 µm. O método (8501 D) foi adaptado de USEPA (2003).

Para a quantificação de AGV foi usado hidrogênio como gás de arraste ao fluxo de 1,34 mL.min⁻¹. As temperaturas do injetor e detector foram de

250 e 300°C, nessa ordem. Para o forno da coluna, aplicou-se um gradiente de temperatura que começou em 100°C e depois de 1 minuto passou para 150°C a 8°C.min⁻¹ e permaneceu assim por 1 minuto, voltando a subir para 200°C a 35°C.min⁻¹, permanecendo nessa condição por 1 minuto. O volume de amostra injetada foi de 1 µL no modo *split* à razão de 10:1. A preparação da amostra consistiu em adicionar em um tubo de vidro de 10 mL 1 g de cloreto de sódio, 2 mL da amostra, 100 µL de ácido sulfúrico a 2 mol.L⁻¹, 200 µL de ácido crotônico (padrão interno) e 0,6 mL de éter dietílico. A amostra foi agitada em vórtex por 5 minutos, e 1 µL da fase etérea foi injetada no cromatógrafo a gás (MORAES *et al.*, 2000).

O crescimento microbiano foi avaliado pela retirada de uma alíquota de 3 mL da amostra, a qual foi transferida para um tubo Falcon de 10 mL e centrifugada para a separação do *pellet*. O sobrenadante foi descartado, e o *pellet*, redissolvido em 3 mL de água ultrapurificada e homogeneizado. Em seguida, o crescimento microbiano foi quantificado por espectrofotometria no comprimento de onda de 600 nm (APHA; AWWA; WEF, 2005).

Procedimentos experimentais

Ensaio 1 e 2: adaptação, seleção e crescimento dos micro-organismos em diferentes concentrações de alquilbenzeno linear sulfonato e etanol

Antes da avaliação da remoção do LAS em reatores em escala de bancada, foram realizados ensaios de adaptação e seleção dos micro-organismos para concentrações de LAS (substrato) acima de IC₅₀ para os micro-organismos anaeróbios (6,3 a 18,9 mg.L⁻¹ de LAS), na presença de diferentes concentrações de etanol (cossustrato). Para isso, foram feitos ensaios preliminares para determinar a concentração de LAS acima de IC₅₀ (Ensaio 1A) e a mínima concentração de etanol (Ensaio 1B), que manteriam os micro-organismos ativos durante a sua adaptação ao meio contendo concentrações de LAS acima de IC₅₀. Determinadas as concentrações-limite de ambos, que não resultassem em inibição da atividade ou em retardamento do crescimento dos micro-organismos, aconteceria em seguida o ensaio de crescimento dos micro-organismos (Ensaio 2).

As concentrações-limite de LAS (acima de IC₅₀) e etanol (necessárias para manter os micro-organismos ativos) que promovessem a seleção, a adaptação e o crescimento dos micro-organismos foram determinadas usando-se a técnica das diluições decimais seriadas (BROUWER, 1991). Essa técnica consistiu em diluir (% em v/v) em um frasco de 100 mL 1% do inóculo bruto em uma solução contendo 15% de nutrientes, 54% de LAS e mais etanol, deixando 30% como *headspace* para acúmulo de biogás (FLORENCIO *et al.*, 1993; LUCENA *et al.*, 2011). Desse frasco, foi retirada uma nova alíquota de 1% e novamente diluída em um novo frasco com volume e composição iguais ao primeiro, entretanto sem o inóculo bruto. Assim aconteceu sucessivamente por mais quatro vezes consecutivas, totalizando seis diluições.

Para o Ensaio 1A foram realizadas sete determinações (sete concentrações de LAS), e para o Ensaio 1B, três determinações (três concentrações de

etanol), com cada determinação realizada em triplicata. Como o objetivo do Ensaio 1A era determinar a máxima concentração de LAS, manteve-se fixa a concentração de etanol em 460 mg.L⁻¹, como proposto por Gusmão (2005), para o crescimento inicial de micro-organismos; e utilizaram-se 7 diferentes concentrações de LAS: 5, 10, 15, 20, 25, 30 e 40 mg.L⁻¹. Essas concentrações de LAS abrangem as faixas comumente encontradas em efluentes domésticos (BERNA *et al.*, 1989; FEIJTEL *et al.*, 1996) e as utilizadas em trabalhos realizados em escala de laboratório (GARCÍA *et al.*, 2005; GARCÍA *et al.*, 2006; MÖSCHER & MEYER, 2002).

No Ensaio 1B, procurou-se determinar a mínima concentração de etanol, que, associada à máxima concentração de LAS obtida no Ensaio

1A, manteria os micro-organismos ativos. Para tal propósito, os micro-organismos foram submetidos a condições mais drásticas, com a diminuição da concentração de etanol (cossubstrato). A menor concentração foi determinada testando-se três concentrações de etanol: 50, 100 e 200 mg.L⁻¹.

A atividade dos micro-organismos nas diferentes concentrações de LAS e etanol foi baseada na metodologia de Liu (1981) e Liu, Thomson e Kaiser (1982). A mudança de cor da resazurina indicou a faixa de potencial redox para que a desidrogenase microbiana se mostrasse ativa.

Depois de selecionadas as concentrações-limite de LAS e etanol, foi feito o Ensaio 2, de aumento da biomassa celular (Figura 1). Esse ensaio foi necessário para obter maior quantidade de biomassa para o Ensaio 3,

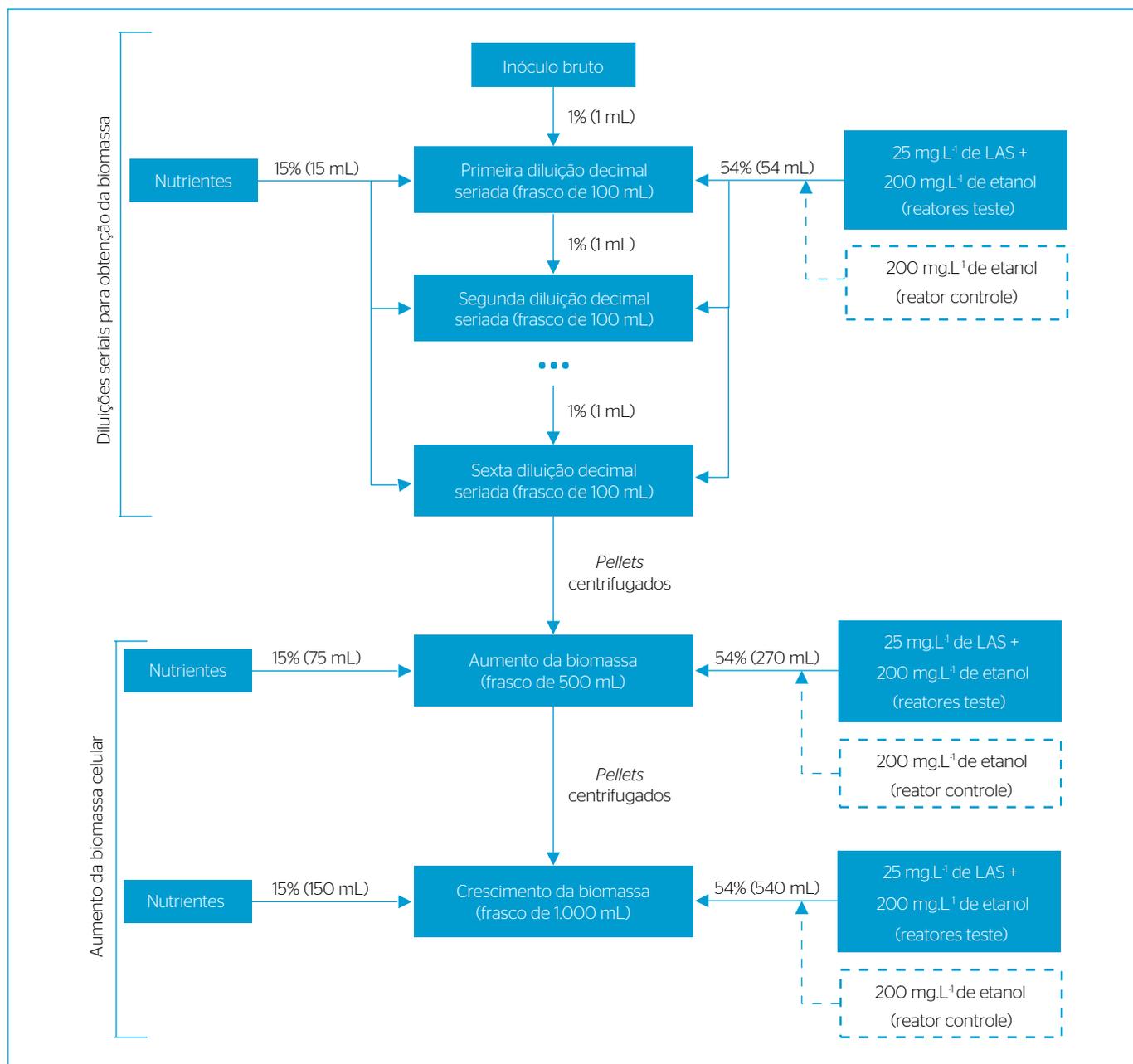


Figura 1 - Procedimento de diluições seriadas do Ensaio 2 para obtenção de biomassa para os reatores.

de modo que novas diluições decimais seriadas fossem realizadas, seguindo procedimento semelhante ao dos ensaios 1A e 1B. Com as concentrações de LAS e etanol definidas, quatro novos procedimentos de diluições decimais seriadas ocorreram, em triplicata. Um deles foi para obter biomassa suficiente para o reator controle e três para os reatores teste. Todos seguiram exatamente os mesmos procedimentos anteriores, com 6 diluições em frascos de 100 mL. Nesses quatro procedimentos, a biomassa da última diluição decimal seriada de cada um foi separada da fase líquida por centrifugação, e os *pellets* de cada triplicata foram colocados juntos, homogeneizados e transferidos gradativamente para 4 frascos com volume de 500 mL cada e, em seguida, para 4 frascos de 1.000 mL cada. Esses tinham composição percentual idêntica à dos frascos de 100 mL, entretanto, sem o inóculo bruto e agora com a maior e menor concentrações de LAS e etanol, respectivamente.

Depois, os *pellets* dos 4 frascos de 1.000 mL foram mais uma vez transferidos para 4 garrafas de vidro com volume total de 4 L cada (volume útil de 2.800 mL), utilizadas como reatores, sendo 3 (reatores teste, triplicata) com composição percentual idêntica à dos frascos de 100 mL, mas também sem o inóculo bruto e com a maior e a menor concentrações definidas de LAS e etanol, respectivamente; e um quarto reator (controle) idêntico, diferindo apenas por não ter recebido a adição de LAS. Esse foi utilizado como controle para avaliar um eventual efeito tóxico do LAS sobre os micro-organismos. O experimento com os 4 reatores de 4 L cada constituíram o Ensaio 3.

Ensaio 3: avaliação da degradação do alquilbenzeno linear sulfonato em reatores em batelada

Para a avaliação da degradação primária dos homólogos do LAS (Ensaio 3), foi realizado o monitoramento do crescimento dos micro-organismos na presença de LAS e do cossustrato etanol enquanto presente, da formação de ácidos graxos voláteis, do consumo do etanol e do potencial redox. Esse monitoramento, tanto nos reatores teste quanto no reator controle, foi realizado diariamente. Ao final dos 90 dias do experimento, foi medido o percentual de biogás acumulado no *headspace* de todos os 4 reatores de 4 L cada. Os reatores foram mantidos à temperatura controlada a $30 \pm 2^\circ\text{C}$ e sem realimentação de substrato ou cossustrato.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Adaptação e crescimento dos micro-organismos em diferentes concentrações de alquilbenzeno linear sulfonato e etanol

A concentração máxima de LAS acima de sua IC_{50} para micro-organismos anaeróbios e a mínima concentração de etanol, entre as que foram testadas no Ensaio 1A e que mantiveram os micro-organismos ativos, foram de 25 e 200 mg.L^{-1} , respectivamente. Nas concentrações de 50 e

100 mg.L^{-1} de etanol, não foi observado o crescimento dos micro-organismos para quaisquer concentrações de LAS. Esses resultados foram constatados pela mudança de cor do corante resazurina, indicador de potencial redox.

Quando a desidrogenase microbiana se mostra ativa, o indicador passa de azul a rosa e, por fim, incolor. Logo, isso indica atividade microbiana e também mudança do potencial redox do meio (LIU, 1981; LIU; THOMSON; KAISER, 1982). Desse modo, foi possível determinar as concentrações-limite de LAS e etanol nas quais os micro-organismos se mantiveram ativos.

Nas concentrações de 50 e 100 mg.L^{-1} de etanol não ocorreu mudança da coloração rosa do meio, sugerindo que essas concentrações de cossustrato eram muito baixas para permitir desidrogenase microbiana significativa. É possível também que tenha acontecido influência do LAS na toxicidade do meio para os micro-organismos anaeróbios. Esses resultados mostraram que nesse ambiente deve haver proporção maior do que 4:1 entre a mínima concentração de cossustrato de fácil degradação e a máxima concentração de LAS, respectivamente, para permitir a atividade dos micro-organismos.

O aumento dos micro-organismos para o Ensaio 3 foi realizado em frascos de 500 mL e 1.000 mL. Os micro-organismos apresentaram crescimento satisfatório após 30 h, quantificados a partir da absorbância da suspensão em 600 nm. Com esse resultado, os micro-organismos foram transferidos dos frascos de 500 mL para os de 1.000 mL após 30 h, e desses para os de 4 L, também após mais 30 h.

Avaliação da degradação do alquilbenzeno linear sulfonato nos reatores em escala de laboratório (Ensaio 3)

Monitoramento do crescimento microbiano

Na Figura 2 é apresentado o crescimento microbiano na presença de etanol durante os quatro primeiros dias, comparando-se os resultados do reator controle, sem adição de LAS, com os dos reatores teste de 4 L (triplicata), com adição de 25 mg.L^{-1} de LAS. Tal monitoramento ocorreu com maior frequência de análises nesses 4 primeiros dias do experimento total, de 90 dias, em função do rápido consumo do cossustrato (200 mg.L^{-1} de etanol). Nesse período também foi observado o crescimento exponencial dos micro-organismos nos reatores com e sem LAS. Para avaliar se houve diferença significativa entre ambos os tipos de reatores, os resultados do período foram submetidos ao teste t de *Student* ($n=7$). O valor de t-calculado (0,389) foi menor do que o de t-tabelado (1,782), o que quer dizer que não houve diferença significativa ($p=0,05$ e 12 graus de liberdade).

O crescimento exponencial nos dois tipos de reatores ocorreu entre 24 e 48 h e foi associado ao rápido consumo do etanol no período; ao final do quarto dia, a degradação atingiu 100%. Os resultados nos reatores teste sugeriram que, em princípio, não se deu toxicidade pela presença

do LAS no meio durante os primeiros quatro dias. Para o período do quinto ao nonagésimo dia sem a presença de etanol, mas somente de LAS nos reatores teste, o crescimento microbiano (em unidades de absorvância) desenvolveu-se conforme mostra a Figura 3. Nos reatores teste, a biomassa decresceu acentuadamente do quinto ($0,14 \pm 0,02$) ao décimo nono dia ($0,11 \pm 0,01$) (patamar I), permanecendo relativamente constante até o quinquagésimo quarto dia ($0,10 \pm 0,01$) (patamar II). Isso pode ser explicado, em primeiro lugar, por efeito tóxico ou inibitório do LAS e/ou intermediários na atividade dos micro-organismos anaeróbios. No reator controle, esse decaimento foi menos expressivo, e a quantidade de micro-organismos permaneceu maior do que a dos reatores teste. A toxicidade do LAS para micro-organismos anaeróbios tem sido relatada por alguns autores (GARCÍA *et al.*, 2005; GARCÍA *et al.*, 2006; MÖSCHER & MEYER, 2002), entretanto Khleifat (2006) apontou a biodegradação primária do LAS por cocultura anaeróbia facultativa constituída de *Pantoea agglomerans* e *Serratia odorifera* 2.

Em segundo lugar, o decaimento microbiano nos reatores teste do quinto dia em diante pode ser explicado pela difícil degradabilidade do LAS, especialmente para os micro-organismos ainda não adaptados, favorecendo a predominância e o crescimento somente daqueles mais adaptados e capazes de utilizá-lo como fonte de energia. De qualquer modo, essa população era pequena e, associado à dificuldade de degradação do LAS, o seu crescimento ocorreu de forma lenta. Do quinquagésimo quarto dia ($0,10 \pm 0,01$) ao sexagésimo primeiro dia ($0,12 \pm 0,02$) (patamar III), aconteceu mais uma vez um pequeno crescimento microbiano, que pode ser vinculado à liberação de substrato por lise celular nos dias que o antecederam, de maneira particular acetato, e que foi rapidamente consumido (Figura 4). Após o sexagésimo primeiro dia (patamar IV) observou-se novamente decaimento dos micro-organismos.

Toxicidade do alquilbenzeno linear sulfonato para os micro-organismos

Na Figura 4 são apresentadas as concentrações de acetato no reator controle (Figura 4A) e nos reatores teste (Figura 4B). No reator controle, a concentração de acetato nos primeiros 4 dias de experimento, nos quais ainda havia etanol, atingiu o máximo de $20,9 \text{ mg.L}^{-1}$, ao passo que nos reatores teste o máximo foi de $6,7 \pm 0,7 \text{ mg.L}^{-1}$. Após o total consumo do etanol, a concentração de acetato no reator controle

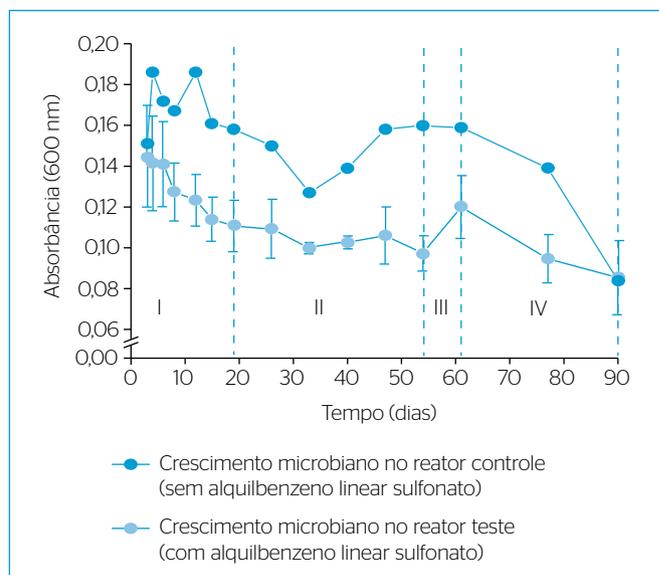


Figura 3 - Crescimento microbiano na presença de etanol com concentração inicial de 200 mg.L^{-1} nos reatores teste com adição de 25 mg.L^{-1} de alquilbenzeno linear sulfonato ($n=3$, barras significam erros padrões das triplicatas) e no reator controle (sem adição de alquilbenzeno linear sulfonato), durante o período do quinto ao nonagésimo dia (Ensaio 3).

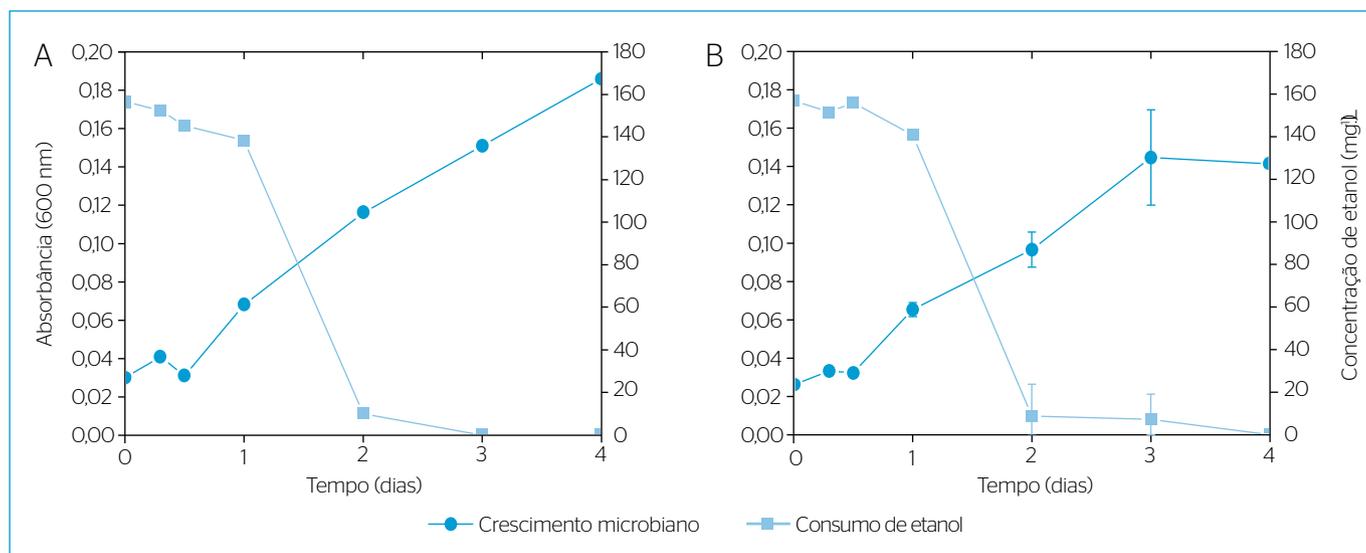


Figura 2 - Crescimento microbiano na presença de etanol com concentração inicial de 200 mg.L^{-1} (A) no reator controle sem adição de alquilbenzeno linear sulfonato; e (B) nos reatores teste com adição de 25 mg.L^{-1} de alquilbenzeno linear sulfonato ($n=3$, barras significam erros padrões das triplicatas), durante os primeiros quatro dias do período experimental de 90 dias (Ensaio 3).

foi detectada no período do quadragésimo ao nonagésimo dia com máximo de $21,9 \text{ mg.L}^{-1}$ no septuagésimo sétimo dia. Nos reatores teste não se pode afirmar que, após o período de quatro dias iniciais, ocorreu a formação de acetato, pois os desvios padrões das medidas foram altos e sempre incluíram o valor zero. Portanto, observou-se que o LAS presente nos reatores teste afetou negativamente a atividade dos micro-organismos acetogênicos. Esses resultados corroboram os descritos por García-Morales *et al.* (2001), os quais constataram inibição de 29% da atividade acidogênica em estudo com concentração de 10 mg.L^{-1} de LAS.

Os micro-organismos metanogênicos também foram afetados pela presença do LAS. O percentual de biogás acumulado ao final dos 90 dias de experimento no *headspace* do reator controle (sem LAS) foi de 5,64% (mol.mol^{-1}) de CH_4 e 5,13% (mol.mol^{-1}) de CO_2 ; enquanto nos reatores teste (com LAS) não foi detectada a presença de CH_4 , sendo quantificado apenas CO_2 , com percentual de $7,5 \pm 0,2\%$ (mol.mol^{-1}). Esses resultados confirmam os descritos por García-Morales *et al.* (2001), García *et al.* (2005) e García *et al.* (2006), que constataram que a metanogênese e a acidogênese podiam ser reduzidas em até 50% quando a concentração de LAS era de $6,3 \text{ mg.L}^{-1}$ e $18,9 \text{ mg.L}^{-1}$ (IC_{50}), respectivamente. A concentração de LAS utilizada no presente experimento foi de cerca de 30 mg.L^{-1} , muito acima do IC_{50} determinado nos trabalhos citados, o que levou unicamente à produção de CO_2 nos reatores teste, por conta do efeito tóxico do LAS sobre os micro-organismos metanogênicos e acidogênicos.

O CO_2 acumulado nos reatores com LAS e no controle resultou no consumo do etanol e na endogenia microbiana — é possível ainda que tenha ocorrido a degradação do LAS por processo aeróbio (GARCÍA *et al.*, 2005) e anóxico/anaeróbio (LARA-MARTÍN *et al.*, 2010), já

que nos dois primeiros dias ambos os tipos de reatores apresentaram potencial redox positivos, o que indicou alguma presença de oxigênio no interior dos reatores. A presença de oxigênio residual aconteceu durante a preparação dos reatores, permitindo a entrada e a difusão pela biomassa e a solução de nutrientes antes da inoculação. A presença de oxigênio residual nos reatores só foi mensurada nos dois primeiros dias e, a partir desse, o ambiente tornou-se estritamente anaeróbio, com potenciais redox condizentes com tal ambiente. No entanto, outros filos de bactérias podem ter atuado de forma a degradar primariamente o substrato (LAS) e mineralizar o cossustrato (etanol) em CO_2 , sobretudo nos reatores teste, já que no inóculo utilizado foi identificada, em outros trabalhos, a existência de seis diferentes filos de bactérias (LUCENA *et al.*, 2011).

Degradação dos homólogos do alquilbenzeno linear sulfonato

Na Figura 5 é apresentada a variação da concentração de cada homólogo constituinte do LAS ao longo dos 90 dias de experimento, em termos percentuais em relação à concentração inicial. A Tabela 1 exhibe um balanço de massa para a degradação biológica dos homólogos, para diferentes subperíodos do Ensaio 3. A degradação de cada homólogo foi distinta em termos de massa e tempo. Os subperíodos expostos referem-se àqueles nos quais houve diferença significativa de massa entre o início e o fim, resultando-os diferentes para cada homólogo. A remoção somente por biodegradação anaeróbia, de $25 \pm 4 \text{ mg}$ ($8,6 \text{ mg.L}^{-1}$) de LAS (homólogos e isômeros), correspondeu a $35 \pm 4\%$ da massa inicial em 90 dias, no qual o processo de adsorção da biomassa foi reduzido significativamente pelo uso de lodo disperso. Para os homólogos, o percentual de degradação no tocante à

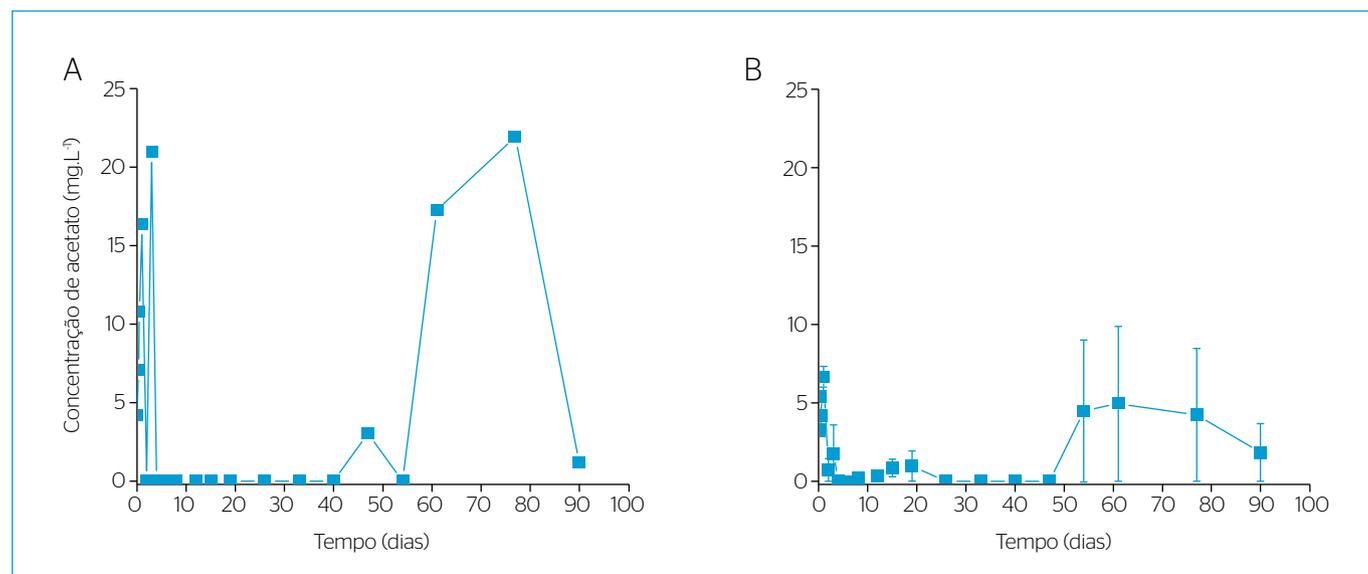


Figura 4 – Concentração de acetato (A) no reator controle sem adição de alquilbenzeno linear sulfonato; e (B) nos reatores teste com adição de 25 mg.L^{-1} de alquilbenzeno linear sulfonato ($n=3$, barras significam erros padrões das triplicatas), durante os 90 dias de experimento (Ensaio 3).

massa inicial de cada um deles foi de 17 ± 5 ; 24 ± 3 ; 31 ± 14 e $49\pm4\%$, para C_{10} , C_{11} , C_{12} e C_{13} , respectivamente.

A remoção do LAS total e de cada homólogo ocorreu claramente mais por degradação biológica do que por adsorção, contudo, uma

pequena parcela da biodegradação pode ter acontecido aerobicamente, por conta da difusão do oxigênio molecular atmosférico na biomassa e da solução de nutrientes durante a preparação dos reatores, ocorrida antes da inoculação da biomassa. No primeiro dia do

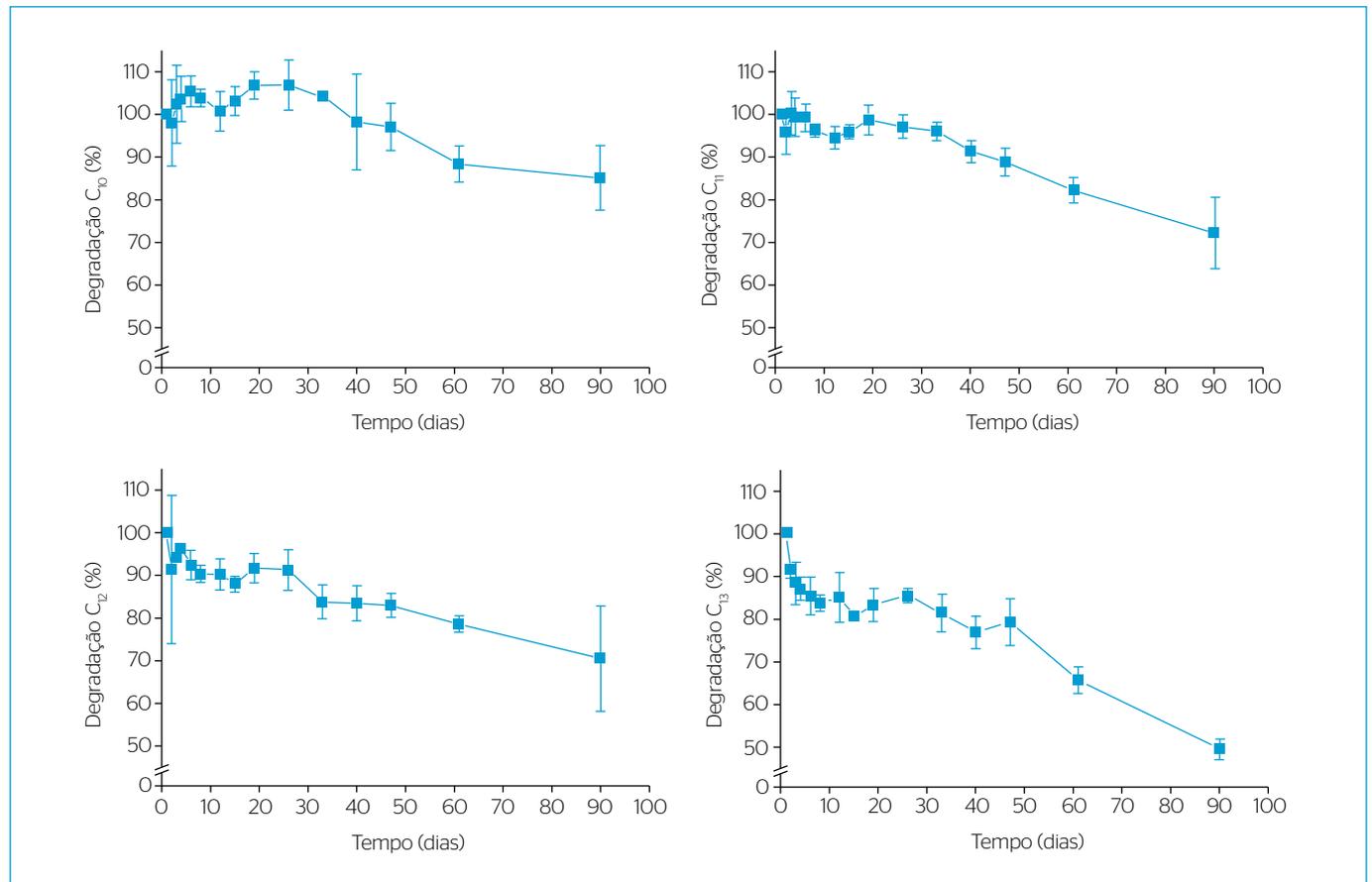


Figura 5 - Variação percentual em relação à concentração inicial de cada homólogo do alquilbenzeno linear sulfonato nos 90 dias de experimento (Ensaio 3) (n=3, barras significam erros padrões das triplicatas).

Tabela 1 - Balanço de massa (mg) para alquilbenzeno linear sulfonato total e homólogos durante o período experimental (Ensaio 3) (n=3).

Composto	Período (dias)	Fase aquosa (mg)		Fase sólida (lodo) (mg)	Degradação (mg)	Degradação (%)
		Inicial	Final	Adsorvida		
C_{10}	1-90	$10,4\pm0,3$	$8,6\pm0,4$	0,01	$1,8\pm0,4$	17 ± 5
C_{11}	1-40	$22,7\pm0,2$	$19,2\pm0,5$		$3,5\pm0,6$	
	40-61	$19,2\pm0,5$	$17,2\pm0,6$		$1,9\pm0,8$	
C_{11}	1-90	$22,7\pm0,2$	$17,2\pm0,6$	0,03	$5,5\pm0,6$	24 ± 3
C_{12}	1-90	$21,9\pm0,8$	$15,0\pm3,0$	0,07	$7,0\pm3,0$	31 ± 14
C_{13}	1-2	$16,4\pm0,4$	$15,3\pm0,3$		$1,2\pm0,5$	
	2-8	$15,3\pm0,3$	$14,0\pm0,3$		$1,3\pm0,4$	
	8-40	$14,0\pm0,3$	$13,5\pm0,0$		$0,5\pm0,3$	
	40-61	$13,5\pm0,0$	$11,0\pm0,5$		$2,5\pm0,5$	
	61-90	$11,0\pm0,5$	$8,2\pm0,4$		$2,7\pm0,7$	
	1-90	$16,4\pm0,4$	$8,3\pm0,4$	0,14	$8,0\pm1,0$	49 ± 4
LAS	1-90	$71,0\pm1,0$	$46,0\pm3,0$	0,25	$25,0\pm4,0$	35 ± 4

Ensaio 3, o potencial redox nos reatores teste e no reator controle foi de 68 ± 10 e 53 mV, respectivamente, corroborando, portanto, a hipótese levantada. Do segundo até o nonagésimo dia, o potencial caiu para -322 ± 81 e -366 ± 73 mV, nessa ordem, apontando condição estritamente anaeróbia nesse período. A indicação de remoção por degradação aeróbia de pequena parcela do LAS também pode ser deduzida pelo balanço de massa (Tabela 1) — somente o homólogo C_{13} apresentou diminuição de massa significativa entre o primeiro e o segundo dia, período em que o potencial redox foi positivo, com percentual de degradação de $7 \pm 3\%$ ($1,2 \pm 0,5$ mg). A biodegradação para cada subperíodo foi confirmada pelo teste t de Student, aplicado para o nível de confiança de 95% e 4 graus de liberdade. Esse foi aplicado comparando a massa dos homólogos do LAS do dia antecessor com o sucessor.

A degradação dos homólogos do LAS seguiu a ordem de preferência descrita: $C_{13} > C_{12} > C_{11} > C_{10}$. Essa ordem preferencial da degradação é decorrente do efeito do impedimento estérico, ocasionado pelo grupo fenilsulfonato, que por possuir densa nuvem eletrônica dificulta a transferência de elétrons entre o composto e os mediadores redox. Esse é maior para os homólogos com cadeias carbônicas lineares menores, pois o grupo fenilsulfonato está localizado muito próximo do grupo metil, situado no fim da cadeia alquílica, em que é iniciada a degradação dos homólogos. Esses resultados corroboram os encontrados por García *et al.* (2005) e García *et al.* (2006), que trabalhando com os homólogos do LAS C_{10} , C_{12} e C_{14} constataram que a maior degradação foi para o homólogo C_{14} e a menor para o C_{10} , indicando, por conseguinte, preferência da degradação para os homólogos com cadeia alquílica maior.

Adsorção dos homólogos do alquilbenzeno linear sulfonato à biomassa dispersa

Uma pequena parcela de 0,35% do LAS inicial foi removida por adsorção ao lodo disperso, alcançando um dos objetivos do experimento. Isso correspondeu à adsorção de 0,01; 0,13; 0,32 e 0,85%, em relação à concentração inicial de cada um dos homólogos C_{10} , C_{11} , C_{12} e C_{13} , respectivamente. A adsorção seguiu a mesma ordem preferencial da biodegradação dos homólogos: $C_{13} > C_{12} > C_{11} > C_{10}$, entretanto, a adsorção vem a comprometer a degradabilidade do composto em sistemas de tratamento de efluentes anaeróbios em escala plena por conta da presença maciça de lodo, passando o processo de adsorção a ser o mais eficiente na sua remoção nesses sistemas. Somado a isso, os homólogos com maiores cadeias alquílicas, que são os mais facilmente degradáveis, também são os mais adsorvidos no lodo, em função da diminuição da sua solubilidade na fase aquosa, na qual suas constantes de biodegradação são consideravelmente maiores do que as da fase sólida. Tais fatos

são amplamente difundidos na literatura para lodo anaeróbio e diferentes tipos de sedimento (GARCÍA *et al.*, 2005; HERA, 2013; LARSON *et al.*, 1989).

CONCLUSÕES

As concentrações máxima de LAS e mínima de etanol com as quais os micro-organismos se mantiveram ativos e em crescimento foram 25 e 200 mg.L⁻¹, respectivamente. O etanol foi totalmente consumido em quatro dias, período no qual o crescimento dos micro-organismos foi exponencial. Após o seu consumo, ocorreu diminuição no crescimento microbiano, que foi associada a efeitos inibitórios e/ou tóxicos do LAS, homólogos e intermediários.

A formação de acetato foi inferior ao do reator controle e com produção apenas de CO₂, confirmando que concentração de LAS de 25 mg.L⁻¹ causa efeito inibitório e/ou tóxico aos micro-organismos acetogênicos e metanogênicos, quando em lodo suspenso disperso.

A ordem preferencial de biodegradação anaeróbia para os homólogos do LAS foi de C_{13} para C_{12} , C_{11} e C_{10} , com percentuais de degradação em relação à massa inicial de 49, 31, 24 e 17%, respectivamente. O percentual de adsorção à biomassa dispersa, que seguiu a mesma ordem preferencial da degradação, corroborou o objetivo do experimento e foi de apenas 0,85; 0,32; 0,13 e 0,01%; nessa ordem. O fato mostrou que, quanto menor a adsorção do composto ao lodo, mais eficiente é a remoção por degradação biológica, ainda que demorada nesses sistemas. No entanto, em sistemas de tratamento anaeróbio em escala plena, a degradação desse composto é comprometida pela quantidade maciça de lodo, e o processo de adsorção torna-se o principal mecanismo de sua remoção.

AGRADECIMENTOS

À Deten Química S.A. (Camaçari/BA, Brasil) e à Cepsa Química (San Roque, Espanha), o apoio à pesquisa sobre LAS; à Companhia Pernambucana de Saneamento (Compesa), à Odebrecht Ambiental e à Fibra Revestimentos Ltda., o apoio aos trabalhos de campo na estação experimental da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) na Estação de Tratamento de Esgoto (ETE) Mangueira; às agências de fomento Financiadora de Estudos e Projetos (Finep), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) e Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (Facepe), o auxílio financeiro e as bolsas concedidas; e a todos os técnicos e bolsistas do Laboratório de Saneamento Ambiental (LSA-UFPE) que colaboraram neste trabalho.

REFERÊNCIAS

- AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION/AMERICAN WATER WORKS ASSOCIATION/WATER ENVIRONMENTAL FEDERATION - APHA/AWWA/WEF. (2005) *Standard methods for examination of water and wastewater*. 21. ed. Washington, DC. American Public Health Association, American Water Works Association and Water Environmental Federation.
- AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS - ASTM. (2003) *ASTM D1945-03*: standard test method for analysis of natural gas by gas chromatography. ASTM International, West Conshohocken, PA.
- BERNA, J.L.; FERRER, J.; MORENO, A.; PRATS, D.; RUIZ, B. F. (1989) The fate of LAS in the environment. *Tenside Surfactants Detergents*, v. 26, n. 2, p. 101-107.
- BROUWER, H. (1991) Testing for chemical toxicity using bacteria: an undergraduate laboratory experiment. *Journal of Chemical Education*, v. 68, n. 8, p. 695-697.
- CLARA, M.; SCHARF, S.; SCHEFFKNECHT, C.; GANS, O. (2007) Occurrence of selected surfactants in untreated and treated sewage. *Water Research*, v. 41, n. 19, p. 4.339-4.348.
- DONG, W.; EICHHORN, P.; RADAJEWSKI, S.; SCHLEHECK, D.; DINGER, K.; KNEPPER, T.P.; MURRELL, J.C.; COOK, A.M. (2004) *Parvibaculum lavamentivorans* converts linear alkylbenzene sulphonate surfactant to sulphophenyl carboxylates, α,β -unsaturated sulphophenyl carboxylates and sulphophenyl dicarboxylates, which are degraded in communities. *Journal of Applied Microbiology*, v. 96, p. 630-640. DOI: 10.1111/j.1365-2672.2004.02200.x.
- FEIJTEL, T.; VITS, H.; MURRAY-SMITH, R.; VAN WIJK, R.; KOCH, V.; SCHRODER, R.; BIRCH, R.; TEN BERGE, H. (1996) Fate of LAS in activated sludge wastewater treatment plants: a model verification study. *Chemosphere*, v. 32, n. 7, p. 1.413-1.426.
- FLORENCIO, L.; JENICEK, P.; FIELD, J.; LETTINGA, G. (1993) Effect of cobalt on the anaerobic degradation of methanol. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, v. 75, n. 5, p. 368-374.
- GARCÍA, M.T.; CAMPOS, E.; RIBOSA, I.; LATORRE, A.; SÁNCHEZ-LEAL, J. (2005) Anaerobic digestion of linear alkylbenzene sulfonates: biodegradation kinetics and metabolite analysis. *Chemosphere*, v. 60, n. 11, p. 1636-1643.
- GARCÍA, M.T.; CAMPOS, E.; SÁNCHEZ-LEAL, J.; RIBOSA, I. (2006) Effect of linear alkylbenzene sulphonates (LAS) on the anaerobic digestion of sewage sludge. *Water Research*, v. 40, n. 15, p. 2958-2964.
- GARCÍA-MORALES, J.L.; NEBOT, E.; ROMERO, L.I.; SALES, D. (2001) Comparison between acidogenic and methanogenic inhibition caused by linear alkylbenzene-sulfonate (LAS). *Chemical and Biochemical Engineering Quarterly*, v. 15, n. 1, p. 13-19.
- GUSMÃO, V.R. (2005) Caracterização microbiológica de cultura desnitrificante de reator anaeróbio horizontal de leito fixo utilizado na remoção de BTEX. Tese (Doutorado) - Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil.
- HUMAN AND ENVIRONMENTAL RISK ASSESSMENT - HERA. (2013) Linear alkylbenzene sulphonates, LAS. CAS No. 68411-30-3. Disponível em: <<http://www.heraproject.com/RiskAssessment.cfm>>. Acesso em: 10 ago. 2015.
- JANSEN, J. (1999) Fate and effects of linear alkylbenzene sulphonates (LAS) in the terrestrial environment. *Science Total Environment*, v. 226, n. 2-3, p. 93-111.
- JIMÉNEZ, L.; BREEN, A.; THOMAS, N.; FEDERLE, T.W.; SAYLER, G.S. (1991) Mineralization of linear alkylbenzene sulfonate by a four-member aerobic bacterial consortium. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 57, n. 5, p. 1566-1569.
- KHLEIFAT, K.M. (2006) Biodegradation of linear alkylbenzene sulfonate by a two-member facultative anaerobic bacteria consortium. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 39, n. 5, p. 1030-1035.
- LARA-MARTÍN, P.A.; GÓMEZ-PARRA, A.; KÖCHLING, T.; SANZ, J.L.; GONZÁLEZ-MAZO, A. (2007) Monitoring the primary biodegradation of linear alkylbenzene sulfonates and their coproducts in anoxic sediments using liquid chromatography-mass spectrometry. *Environmental Science and Technology*, v. 41, n. 10, p. 3580-3586.
- LARA-MARTÍN, P.A.; GÓMEZ-PARRA, A.; SANZ, J.L.; GONZÁLEZ-MAZO, A. (2010) Anaerobic degradation pathway of linear alkylbenzene sulfonates (LAS) in sulfate-reducing marine sediments. *Environmental Science and Technology*, v. 44, n. 5, p. 1670-1676.
- LARSON, R.J.; FEDERLE, T.W.; SHIMP, R.J.; VENTULLO, R.M. (1989) Behaviour of linear alkylbenzene sulfonate (LAS) in soil infiltration and groundwater. *Tenside Surfactants Detergents*, v. 26, n. 2, p. 116-121.
- LEÓN, V.M.; LÓPEZ, C.; LARA-MARTÍN, P.A.; PRATS, D.; VARÓ, P.; GONZÁLEZ-MAZO, E. (2006) Removal of linear alkylbenzene sulfonates and their degradation intermediates at low temperatures during activated sludge treatment. *Chemosphere*, v. 64, n. 7, p. 1.157-1.166.
- LIU, D. (1981) A rapid biochemical test for measuring chemical toxicity. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, v. 26, p. 145-149.
- LIU, D.; THOMSON, K.; KAISER, K. L. E. (1982) Quantitative structure-toxicity relationship of halogenated phenols on bacteria. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, v. 29, p. 130-136.
- LUCENA, R.M.; GAVAZZA, S.; FLORENCIO, L.; KATO, M.T.; MORAIS, M.A. (2011) Study of the microbial diversity in a full-scale UASB reactor treating domestic wastewater. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, v. 27, p. 2893-2902.
- MOLDOVAN, Z.; AVRAM, V.; MARINCAS, O.; PETROV, P.; TERNES, T. (2011) The determination of the linear alkylbenzene sulfonate isomers in water samples by gas-chromatography/mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, v. 1218, n. 2, p. 343-349.

- MORAES, E.M.; ADORNO, M. A. T.; ZAIAT, M.; FORESTI, E. (2000) Determinação de ácidos voláteis por cromatografia gasosa em efluentes de reatores anaeróbios tratando resíduos líquidos e sólidos. *In: Oficina e Seminário Latino-Americano de Digestão Anaeróbia, 6 Anais...* Recife: USP-UFMG-UFPE. p. 2813-2823.
- MÖSCHER, M. & MEYER, U. (2002) Toxicity of linear alkylbenzene sulfonate in anaerobic digestion: influence of exposure time. *Water Research*, v. 36, n. 13, p. 3253-3260.
- MUNGRAY, A.K. & KUMAR, P. (2009) Fate of linear alkylbenzene sulfonates in the environment: a review. *International Biodeterioration and Biodegradation*, v. 63, n. 8, p. 981-987.
- NAKAE, A.; TSUJI, K.; YAMANAKA, M. (1981) Determination of alkyl chain distribution of alkylbenzenesulfonates by liquid chromatography. *Analytical Chemistry*, v. 53, p. 1818-1821.
- PENTEADO, J.C.P.; EL SEOUD, O.A.; CARVALHO, L.R.F. (2006) Alquilbenzeno sulfonato linear: uma abordagem ambiental e analítica. *Química Nova*, v. 29, n. 5, p. 1038-1046.
- SILVA, L.G.; OLIVEIRA, L. M.; GAVAZZA, S.; FLORENCIO, L.; KATO, M. T. (2009) Avaliação das concentrações de LAS em uma estação de tratamento anaeróbio de esgoto e no corpo receptor. *In: Congresso Brasileiro de Engenharia Sanitária e Ambiental, 25 Anais...* Recife: ABES.
- TEMMINK, H. & KLAPWIJK, B. (2004) Fate of linear alkylbenzene sulfonate (LAS) in activated sludge plants. *Water Research*, v. 38, n. 4, p. 903-912.
- UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY - USEPA (2003) *Method 8015 D: Nonhalogenated organics using GC/FID*. Revision 4, Boston: United States Environmental Protection Agency.
- WATERS, J.; HOLT, M.S.; MATTHIJS, E. (1989) Fate of LAS in sludge amended soils. *Tenside Surfactants Detergents*, v. 26, p. 129-135.
- WOLF, W. & FEIJTEL, T. (1998) Terrestrial risk assessment for linear alkyl benzene sulfonate (LAS) in sludge-amended soils. *Chemosphere*, v. 36, n. 6, p. 1319-1343.