

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA E DE ENGENHARIA
DE ALIMENTOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

SIMONE PERAZZOLI

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DAS NANOPARTICULAS DE ÓXIDO
DE FERRO SOBRE UMA COMUNIDADE DE BACTÉRIAS
OXIDADORAS DE AMÔNIA (BOAs)**

Florianópolis – SC
2015

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA E
ENGENHARIA DE ALIMENTOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA
QUÍMICA

Simone Perazzoli

**AValiação DO EFEITO DAS NANOPARTICULAS DE ÓXIDO
DE FERRO SOBRE UMA COMUNIDADE DE BACTÉRIAS
OXIDADORAS DE AMÔNIA (BOAs)**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de Santa Catarina, para obtenção do Grau de Mestre em Engenharia Química.

Orientador:
Prof. Dr. Hugo Moreira Soares

Florianópolis – SC
2015

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Perazzoli, Simone

Avaliação do efeito das nanopartículas de óxido de ferro sobre uma comunidade de bactérias oxidadoras de amônia (BOAs) / Simone Perazzoli ; orientador, Hugo Moreira Soares - Florianópolis, SC, 2015.
100 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro Tecnológico. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química.

Inclui referências

1. Engenharia Química. 2. Bactérias Oxidadoras de Amônia. 3. Nanopartículas de Óxido de Ferro. 4. Nanotecnologia. 5. Toxicidade. I. Soares, Hugo Moreira. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química. III. Título.

Avaliação do efeito das nanopartículas de óxido de ferro sobre uma comunidade de bactérias oxidadoras de amônia (BOAs)

Por

Simone Perazzoli

Dissertação julgada para obtenção do título de **Mestre em Engenharia Química**, área de Concentração de **Desenvolvimento de Processos Químicos e Biotecnológicos**, e aprovada em sua fase final pelo Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de Santa Catarina.

Prof. Dr. Hugo Moreira Soares
Orientador

Prof. Dr. Ricardo Antônio Francisco Machado
Coordenador

Banca Examinadora:

Regina de Fátima Peralta Muniz Moreira
Universidade Federal de Santa Catarina

Cléo Rodrigo Bressan
Universidade Federal do Oeste do Pará

Estela de Oliveira Nunes
Embrapa

Florianópolis, 23 de abril de 2015.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela vida e pelas oportunidades que nela surgiram.

Aos meus familiares, pois com eles aprendi a ser forte e superar os desafios dessa etapa.

Ao Professor Orientador PhD. Hugo Moreira Soares pela oportunidade, disponibilidade e orientação.

À Dra. Estela Nunes, pelo apoio, disponibilidade e, sobretudo, amizade.

Aos amigos e colegas do Laboratório de Tratamento Biológico de Resíduos – LTBR (não cito aqui nomes, para que não corra o risco de esquecer alguém). À Michaela e Diego pelas conversas, informações trocadas, pela amizade e apoio na reta final. Ao amigo e colega Wellington, pelo apoio durante essa jornada.

Aos Laboratórios LEMA, LABMASSA pela disponibilidade dos equipamentos, quando foi necessário e ao LCME pela disponibilidade e possibilidade de realização das análises de microscopia.

À Universidade Federal de Santa Catarina, pela disponibilidade do espaço físico e dos recursos necessários para o desenvolvimento da pesquisa, e a CAPES pela concessão da bolsa.

*“É bom ter um fim para uma jornada,
mas é a jornada que importa, no fim.”*

(Usula K. LeGuin)

RESUMO

Com a difusão da aplicação das nanotecnologias, a liberação de nanomateriais (NMs) para o meio ambiente é inevitável, podendo afetar negativamente os processos de tratamento de águas residuais. Dentre os NMs, as nanopartículas de óxido de ferro (IONPs) vêm atraindo grande interesse comercial, pois apresentam propriedades superparamagnéticas, alta capacidade catalítica e atividade antimicrobiana. Contudo, poucos estudos têm avaliado o potencial efeito no tratamento biológico de efluentes. Esse trabalho buscou investigar o efeito de duas IONPs, nomeadamente, hematita ($\text{Fe}_2\text{O}_3\text{NP}$) e magnetita ($\text{Fe}_3\text{O}_4\text{NP}$), sobre a atividade de uma comunidade de bactérias oxidadoras de amônia (BOAs). Essas bactérias são conhecidas pela alta sensibilidade à presença de compostos tóxicos. Para isso, as IONPs foram inicialmente caracterizadas quanto a composição química, estrutura cristalográfica e tamanho através de análises de difração de raio-X (DRX) e microscopia eletrônica de transmissão (MET). Para avaliar o efeito das NPs sobre a comunidade de BOAs, as bactérias foram expostas por um período de 14 horas a diferentes concentrações (0,2 a 1,0 g. L⁻¹) de $\text{Fe}_2\text{O}_3\text{NP}$ (20-30 nm) e $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{NP}$ (30-40 nm), respectivamente. Os resultados mostram que a atividade das BOAs é dependente da concentração de NP. Expressiva redução na velocidade formação de nitrito foi observada para ambas NPs estudadas. Na presença de 0,2 a 1,0 g Fe_2O_3 NP. L⁻¹ a redução na velocidade formação de nitrito foi de 24,74% para 61,33%, comparado com o controle. Enquanto que para as mesmas concentrações de Fe_3O_4 , a redução na velocidade formação de nitrito foi de 28,74% para 70,94%, respectivamente. O coeficiente de inibição, no qual a concentração de um composto que reduz atividade de um microrganismo em 50% (KI_{50}) calculado foi equivalente a 0,579 g.L⁻¹, para a Fe_2O_3 NP. A $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{NP}$ apresentou um valor de KI_{50} 20% superior, sendo equivalente a 0,483 g.L⁻¹. A formação de agregados das IONPs com a biomassa microbiana (lodo) foi observada através de imagens obtidas por MEV. Esse dado é relevante, pois, estando incorporadas no lodo, as nanopartículas passam para o meio ambiente, em função dos métodos de disposição final de lodo, tal como reuso na fertilização de solos.

Palavras – chave: Bactérias Oxidadoras de Amônia, Nanopartículas de Óxido de Ferro, Nanotecnologia, Toxicidade.

ABSTRACT

With the nanotechnology dissemination, the nanomaterials (NMs) release into the environment is inevitable and may adversely affect the wastewater treatment processes. Among the NMs, the iron oxide nanoparticles (IONPs) have a considerable commercial potential, mainly because their superparamagnetic properties, high catalytic ability and antimicrobial activity. However, few studies have examined their potential effect on the biological wastewater treatment. This study investigated the effect of two IONPs, in particular, hematite ($\text{Fe}_2\text{O}_3\text{NP}$) and magnetite ($\text{Fe}_3\text{O}_4\text{NP}$), on the activity of an ammonium-oxidizing bacteria (AOBs) community, known for its high sensitivity to the presence of toxic compounds. Initially, the NPs were characterized in terms of chemical composition, crystallographic structure and size through analysis of X-ray diffraction (XRD) and electron microscopy transmission (TEM). To assess the effect of NPs on the AOB community, the bacteria were exposed in a short-term period (14 hours) to different amounts (0.2 to 1.0 g L^{-1}) of $\text{Fe}_2\text{O}_3\text{NP}$ (20-30 nm) and $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{NP}$ (30-40 nm), respectively. The results showed that AOB activity was dependent of the NP concentration. Significant reduction in the nitrite production rate was observed for both NPs studied. In the presence of 0.2 to $1.0 \text{ gFe}_2\text{O}_3 \text{ NP.L}^{-1}$ the reduction of the nitrite production rate was 24.74% to 61.33% compared with the control. Whereas in the presence of 0.2 to $1.0 \text{ gFe}_3\text{O}_4\text{NP.L}^{-1}$, the reduction in the nitrite production rate was 28.74% to 70.94% compared with the control. $\text{Fe}_2\text{O}_3\text{NP}$ showed lower toxicity than $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{NP}$. While The concentration that reduces 50% of $\text{NO}_2\text{-N}$ production rate (IK_{50}) was 0.579 g.L^{-1} to $\text{Fe}_2\text{O}_3 \text{ NP}$; $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{NP}$ showed a IK_{50} value 20% higher (0.483 g.L^{-1}). SEM images showed that NPs remained incorporated in the biomass (sludge). Regarding this, it is possible to say that NPs can reach the environment through to the methods of sludge disposal, mainly in cases of the reuse as soil fertilizer.

Keywords: Ammonium-oxidizing bacteria, iron oxide nanoparticles, nanotechnology, toxicity.

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 - Esquema representativo do Ciclo do Nitrogênio	27
Figura 2 - Presença de nanomateriais no meio ambiente	36
Figura 3 - Esquema Ilustrativo do Reator Nitritante	50
Figura 4 - Concentração das formas nitrogenadas durante o período de operação do reator	59
Figura 5 - Difratoograma para Fe ₂ O ₃ NP (a) e Fe ₃ O ₄ NP (b).....	61
Figura 6 - Micrografias de MET, onde: (a) e (b) Fe ₂ O ₃ NP (c) e (d) Fe ₃ O ₄ NP	62
Figura 7 - Distribuição do tamanho das nanopartículas: (a) Fe ₂ O ₃ NP e (b) Fe ₃ O ₄ NP	62
Figura 8 - Acúmulo de nitrito em função da concentração de Fe ₂ O ₃ NP (a) e Fe ₃ O ₄ NP (b) realizado com BOAs	63
Figura 9 - Produção N-NO ₂ ⁻ em ao longo do tempo em função concentração de Fe ₂ O ₃ NP (a) e Fe ₃ O ₄ NP (b) realizado com BOAs....	64
Figura 10 - Correlação entre a redução da velocidade de produção de N-NO ₂ ⁻ e a concentração de Fe ₂ O ₃ NP (a) e Fe ₃ O ₄ NP (b).....	65
Figura 11 - Comunidade bacteriana presente no Reator Nitritante	68
Figura 12 - Imagens de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), onde: (a), (b), (c): exposição a 0,2, 0,6 e 1,0 gFe ₂ O ₃ NP.L ⁻¹ ; (d), (e), (f): exposição a 0,2, 0,6 e 1,0 gFe ₃ O ₄ NP.L ⁻¹	69

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1- Principais fatores que interferem nas culturas de BOAs e BONs e que podem ser utilizados como estratégia para seleção de BOAs.....	32
Tabela 2 – Regulamentações e/ou Recomendações existentes acerca do assunto nanotecnologias.....	35
Tabela 3 - Estudos encontrados na literatura que reportam os efeitos de FeNPs, bem como do Fe em suas formas ionizadas.....	46
Tabela 4 - Composição do meio de cultura.....	49
Tabela 5 - Composição da Solução de Microelementos*.....	50
Tabela 6 - Condições operacionais do reator nitritante.....	51
Tabela 7 - Características das NPs, de acordo com o fabricante (SkySpring nanomaterials®).....	52
Tabela 10 - Etapas de preparo das amostras para realização de MEV. .	56
Tabela 11 - Tamanho do cristalino, de acordo com a Equação de Scherrer.....	61
Tabela 12 - Percentuais médios de inibição encontrados nos experimentos de toxicidade aguda para as IONPs estudadas.....	66
Tabela 14 - Concentração de Ferro solúvel total após período de exposição de 14 horas.....	70

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- amoA – Amônia Monooxigenase
ANAMMOX – *Anaerobic Ammonium Oxidation*
ANL – Ácido Nitroso Livre
BOAs – Bactérias Oxidadoras de Amônio
BONs – Bactérias Oxidadoras de Nitrito
EC₅₀ - Concentração média efetiva de um composto que dá 50% da resposta máxima
FeNP – Nanopartículas de Ferro
Fe₂O₃NP – Nanopartículas de Hematita
Fe₃O₄NP – Nanopartículas de Magnetita
HAO - Hidroxilamina oxidoreductase
HMDS - Hexametildisilaxano
IONP – Nanopartículas de Óxido de Ferro
KI₅₀ – Coeficiente de inibição, no qual a concentração de um composto que reduz atividade de um microrganismo em 50%.
LC₅₀ - Concentração de um composto que é letal para 50% de uma população
MBC - Concentração mínima bactericida;
MET – Microscopia Eletrônica de Transmissão
MEV - Microscopia Eletrônica de Varredura
NM - Nanomaterial
NP – Nanopartícula
NirS - Nitrito Redutase
N-NH₄⁺ – Nitrogênio na forma de íon amônio
N-NO₂⁻ – Nitrogênio na forma de nitrito
N-NO₃⁻ – Nitrogênio na forma de nitrato
OD – Oxigênio dissolvido (mgO₂.L⁻¹)
q – Carga (g.L⁻¹.d⁻¹)
Q – Vazão (L dia⁻¹)
RBS – Reator de Batelada Sequencial
ROS – Espécies Reativas de Oxigênio
SST – Sólidos Suspensos Totais (mg L⁻¹)
SSV – Sólidos Suspensos Voláteis (mg L⁻¹)
TRH – Tempo de Retenção Hidráulico
 $-r_{N-NO_2^-}$ – Velocidade de consumo de nitrito (mgN-NO₂⁻.L⁻¹.h⁻¹)
 $-\mu_{N-NO_2^-}$ – Velocidade específica de consumo de nitrito (mgN-NO₂⁻.gSSV⁻¹.h⁻¹)

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	23
2	OBJETIVOS.....	25
2.1	OBJETIVO GERAL.....	25
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	25
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	27
3.1	CICLO DO NITROGÊNIO E O MEIO AMBIENTE.....	27
3.1.1	NITRIFICAÇÃO.....	28
3.1.1.1	Variáveis que influenciam no desempenho das populações de bactérias nitrificantes.....	29
3.1.2	Bactérias Oxidadoras de Amônia	31
3.2	NANOTECNOLOGIA.....	33
3.2.1	Definições.....	33
3.2.2	Regulação do uso de nanomateriais.....	34
3.2.3	Presença de nanopartículas no meio ambiente e suas implicações	36
3.2.3.1	Ocorrência de NPs em sistemas de tratamento de efluentes .	37
3.2.4	Nanopartículas de Óxido de Ferro (IONPs)	39
3.2.4.1	Síntese e Caracterização.....	40
3.2.4.2	Toxicidade.....	40
3.2.4.2.1	Íons de Fe	41
3.2.4.2.2	Nanopartículas de Ferro	43
4	MATERIAL E MÉTODOS	49
4.1	CULTIVO DE BOAs	49
4.1.1	Inóculo.....	49
4.1.2	Meio de Cultura.....	49
4.1.3	Operação do Reator	50
4.1.4	Monitoramento do Reator.....	52
4.2	NANOPARTÍCULAS.....	52
4.2.1	Caracterização das Nanopartículas	52
4.2.1.1	Difração de Raio-X (DRX)	52
4.2.1.2	Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)	53
4.3	ENSAIOS CINÉTICOS DE ATIVIDADE	54
4.3.1	Ensaio de Toxicidade Aguda para Nanopartículas de Hematita e Magnetita.....	54

4.3.2	Velocidade de Produção de Nitrito	54
4.3.3	Inibição.....	55
4.3.4	Microscopia Eletrônica de Varredura.....	55
4.4	DETERMINAÇÕES FÍSICO-QUÍMICAS	56
4.4.1	Íons Nitrogenados	56
4.4.2	Sólidos.....	57
4.4.3	Ferro Solúvel total.....	57
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	59
5.1	REATOR NITRITANTE	59
5.2	CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS	60
5.2.1	Difração de Raio-X	61
5.2.2	Microscopia Eletrônica de Transmissão.....	61
5.3	ENSAIOS CINÉTICOS DE ATIVIDADE	63
5.3.1	Exposição das BOAs às Nanopartículas	63
5.3.2	Presença de NPs no lodo e possíveis implicações.....	68
	CONCLUSÕES	73
	SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	75
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	77

1 INTRODUÇÃO

O número de produtos contendo nanomateriais manufaturados (NMs) tem crescido rapidamente nas últimas décadas. De acordo com os dados do Inventário de Produtos de Consumo contendo Nanotecnologias (*Nanotechnology Consumer Products Inventory*) existem mais de 1.600 produtos comerciais contendo nanotecnologias disponíveis no mercado (The Project on Emerging Nanotechnologies, 2013). Segundo dados da Agência Brasileira de Desenvolvimento Industrial (ABDI) a produção global de nanomateriais foi estimada em 11 milhões de toneladas em 2013, representando um valor de mercado de aproximadamente 20 bilhões de euros. As áreas de aplicação da nanotecnologia abrangem diversos setores industriais e de serviços. Como exemplos desse atual cenário, tem-se a aplicação de nanopartículas (NPs) metálicas, semicondutoras e nanotubos de carbono (ABDI, 2011).

Porém, com a difusão da nanotecnologia, a liberação de NMs para o meio ambiente é inevitável e pode ocorrer através de fontes pontuais, difusas ou via introdução direta no meio ambiente, quando utilizados para fins de remediação (EPA, 2014). O pequeno tamanho das NPs (1-100 nm) facilita o transporte e sua difusão na atmosfera, água e solo, ao passo que dificulta sua remoção por técnicas usuais de filtração, facilitando a entrada e acúmulo em células vivas (QUINA, 2004; WIESNER *et al.*, 2006; SOM *et al.*, 2010, SOM *et al.*, 2011). Quando presentes em sistemas de tratamento de efluentes, se estáveis, as NPs são liberadas para o ambiente aquático; enquanto que, se incorporadas no lodo de esgoto, podem afetar o ambiente terrestre (BRAR *et al.*, 2010).

Além disso, a presença das próprias NPs pode afetar negativamente os processos de tratamento de águas residuais, deteriorando a qualidade da água efluente (HWANG *et al.*, 2011). Também podem apresentar efeitos ecotoxicológicos relevantes após descarga em corpos hídricos (REIJNDERS, 2006). Essa perspectiva levanta uma série de questionamentos sobre os possíveis impactos ambientais causados por esses compostos. Assim, para um melhor entendimento, se faz necessário o delineamento da interação entre nanomateriais e microrganismos, uma vez que a modificação da composição e atividade microbiana - na presença de nanomateriais - pode ter consequências em escala local, regional e global.

Dentre os NMs, as nanopartículas de óxido de ferro (IONPs), as quais têm a hematita ($\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$) maghemita ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) e magnetita (Fe_3O_4) como principais representantes, vêm atraindo grande interesse comercial, devido às propriedades superparamagnéticas e alta capacidade catalítica (HUBER, 2005; KÁDÁR *et al.*, 2010). Estas têm sido empregadas recentemente em áreas como biomedicina e remediação ambiental (ZHU *et al.*, 2012). IONPs também são conhecidas por exercer atividade antibacteriana, sendo responsáveis por causar estresse oxidativo nas células através da geração de espécies reativas de oxigênio (ROS), danos físicos na superfície celular, além de impactos via bioacumulação (STOIMENOV *et al.*, 2002; OBERDORSTER *et al.*, 2005, NEL *et al.*, 2006; KLAINE *et al.*, 2008; APTE *et al.*, 2009). Contudo, apesar da crescente aplicação das IONPs e sua ocorrência em receptores ambientais, poucos estudos têm sido realizados para avaliar o seu impacto no tratamento biológico de efluentes (ZHU *et al.*, 2012, Ni *et al.*, 2013).

Em ambientes biológicos, os efeitos tóxicos desses materiais são dependentes das propriedades morfológicas, composição, tamanho, presença de aditivos e método de síntese utilizados, além da interação com o meio ambiente. Recentemente, a presença de alguns tipos de NPs tem sido reportada em estações de tratamento de efluentes (LIMBACH *et al.*, 2008; KISER *et al.*, 2009). Em processos biológicos de tratamento de águas residuais, devido à sensibilidade a presença de compostos tóxicos, as bactérias oxidadoras de amônia (BOAs) têm sido empregadas em diversos estudos de inibição, atuando como biosensores na presença desses compostos. Trabalhos recentes têm mostrado que a atividade de BOAs pode ser afetada pela presença de nanomateriais (CHOI & HU, 2008; RADNIECKI *et al.*, 2011; ARNAOUT & GUNSCH, 2012; ALITO & GUNSCH, 2014; MA *et al.*, 2015). No entanto, estudos que avaliaram o efeito de IONPs são escassos na literatura. Assim, esse trabalho avaliou efeito da presença de IONPs sobre a atividade das BOAs, isoladas a partir de um sistemas de lodos ativados tratando esgoto sanitário.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito da adição de nanopartículas de óxido de ferro (hematita e magnetita) sobre uma comunidade bactérias oxidadoras de amônia.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

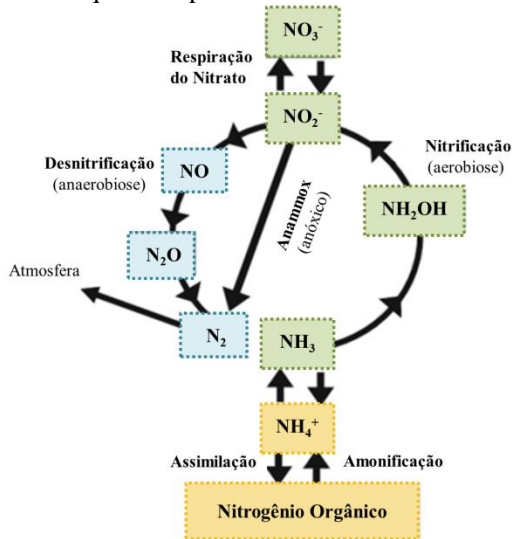
- Estabelecer uma cultura mista de bactérias oxidadoras de amônia em um reator operado em bateladas sequenciais (RBS) em escala de bancada, visando à obtenção de biomassa nitritante;
- Caracterizar os as nanopartículas estudadas;
- Avaliar o efeito agudo das nanopartículas de hematita e magnetita sobre bactérias oxidadoras de amônia (BOAs), utilizando testes cinéticos de atividade;
- Avaliar a adesão das nanopartículas estudadas a biomassa bacteriana.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 CICLO DO NITROGÊNIO E O MEIO AMBIENTE

O nitrogênio é um elemento essencial, fazendo parte da constituição de proteínas, ácidos nucleicos em todos os seres vivos (BITTON, 2005). Na natureza, é encontrado nos mais diversos estados de oxidação, sendo que sua valência varia entre -3 (NH_4^+) a +5 (NO_3^-) e as reações que levam a oxidação ou redução do nitrogênio do ciclo são realizadas principalmente por microrganismos. Esse ciclo (Figura 1) tem sido alterado pela ação do homem ao longo dos últimos anos, principalmente devido ao aumento da produtividade agrícola, o uso de fertilizantes nitrogenados e a queima de combustíveis fósseis para geração de energia (CANFIELD *et al.*, 2010).

Figura 1 - Esquema representativo do Ciclo do Nitrogênio



Dentre as etapas envolvidas no Ciclo do Nitrogênio, a nitrificação e a desnitrificação estão presentes nos sistemas de biológicos de tratamento de efluentes, objetivando a remoção desse composto. Na nitrificação, o nitrogênio amoniacal é convertido a nitrito (NO_2^-) por bactérias oxidadoras de amônia (BOAs) e, sequencialmente, a nitrato (NO_3^-), pela ação de bactérias oxidadoras de nitrito (BONs), tendo o

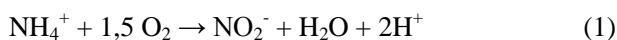
oxigênio (O₂) comoceptor de elétrons. Posteriormente, ocorre a desnitrificação, onde o NO₃⁻ é transformado em nitrogênio gasoso (N₂). Em ambos os processos pode ocorrer à produção de óxido nitroso (N₂O), um gás de efeito estufa. No caso da nitrificação, a presença de N₂O é reportada na chamada “desnitrificação nitrificante” decorrente de condições como variação na concentração de oxigênio ou alta salinidade, por exemplo (CHANDRAN *et al.*, 2011; ZHAO *et al.*, 2014).

3.1.1 Nitrificação

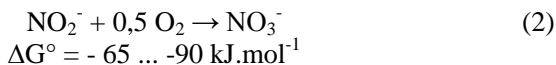
O processo de nitrificação pode ocorrer em ambientes naturais, pela ação de bactérias presentes no solo, águas marinhas e continentais (BERNET & SPÉRANDIO, 2009), bem como em plantas de tratamento de efluentes, sendo a chave para a remoção de nitrogênio amoniacal. É realizado principalmente por bactérias aeróbias, quimiolitotróficas obrigatórias (VON SPERLING, 1996), ocorrendo em duas etapas consecutivas (SANT’ANNA JUNIOR, 2010): nitrificação (ação de BOAs, onde a amônia é convertida a nitrito) e nitratação (ação de BONs, onde o nitrito é convertido a nitrato).

A nitrificação é realizada essencialmente pelas bactérias do gênero *Nitrosomonas*. No entanto, também pode ser realizada por outras espécies de proteobactérias pertencentes aos gêneros *Nitrosospira*, *Nitrosococcus*, *Nitrosovibrio* e *Nitrosolobus*. Já na nitratação, as principais espécies envolvidas pertencem aos gêneros *Nitrobacter* e, em muitos casos, *Nitrospira*. Além disso, espécies dos gêneros *Nitrospina*, *Nitrococcus* e *Nitrocystis* tem sido relatadas por realizar a oxidação do nitrito a nitrato (RITTMANN & MCCARTY, 2001).

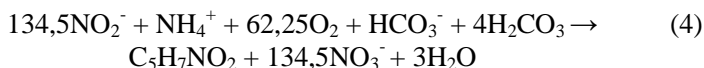
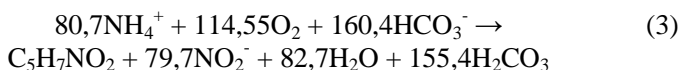
As transformações ocorridas durante a nitrificação são descritas por Wiesmann *et al.* (2007). Do ponto de vista energético, a reação global da nitrificação (Equação 1) favorece as bactérias oxidadoras de amônia (BOAs) em relação às oxidadoras de nitrito (BON), uma vez que há maior quantidade de energia disponível (Equação 2) (SANT’ANNA JUNIOR, 2010). Estequiometricamente, para cada mol de amônia a ser oxidado, uma BOA usa 1,5 mol de oxigênio enquanto que uma BON utiliza 0,5 mol de oxigênio. Isso implica em uma redução de 25% do oxigênio demandado na nitrificação comparado à nitrificação completa (PAREDES *et al.*, 2007), favorecendo que as BOAs tenham maior crescimento em relação às BONs (AHN *et al.*, 2008).



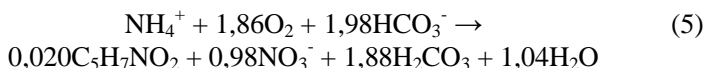
$$\Delta G^\circ = -240 \dots -350 \text{ kJ.mol}^{-1}$$



Quanto ao crescimento celular, Henze *et al.* (1997) propõem as seguintes equações estequiométricas, para as etapas de nitrificação (Equação 3) e nitratação (Equação 4), respectivamente:



Resultando na equação final:



Analisando as equações 3, 4 e 5, verifica-se:

a) *Consumo de alcalinidade*: $11,88 \text{ mg NaHCO}_3 \cdot (\text{mgN-NH}_4^+)^{-1}$ (Equação 4);

b) *Baixo crescimento celular*: $0,145 \text{ mg C}_5\text{H}_7\text{O}_2\text{N} \cdot (\text{mgN-NH}_4^+)^{-1}$ oxidado na nitrificação e $0,020 \text{ mg}$ de célula é formada na etapa de nitratação.

c) *Consumo de O₂*: na oxidação da amônia é de $3,158 \text{ mg O}_2 \cdot (\text{mgN-NH}_4^+)^{-1}$, e na oxidação do nitrito, $1,114 \text{ mg O}_2 \cdot (\text{mgN-NO}_2^-)^{-1}$.

3.1.1.1 Variáveis que influenciam no desempenho das populações de bactérias nitrificantes

A nitrificação é conhecida por ser a etapa limitante em processos biológicos de remoção de N e são diversas as variáveis que influenciam no desempenho das populações bacterianas nitrificantes. Devido à baixa velocidade de crescimento específico, as bactérias nitrificantes necessitam de longos tempos de retenção de sólidos nos reatores (>15 dias), podendo necessitar de tempos ainda maiores na presença de compostos tóxicos, baixa concentração de oxigênio ou temperatura

baixa, por exemplo. Ainda, essas bactérias são sensíveis à inibição por uma série de compostos orgânicos e inorgânicos, tal como a presença amônia livre (NH_3), o ácido nitroso (HNO_2), surfactantes aniônicos, metais pesados e compostos organoclorados (RITTMANN & MCCARTY, 2001).

A alcalinidade também exerce grande influência no desempenho dessas bactérias. Considerando que durante o processo ocorre a liberação de íons H^+ para meio externo, caso a alcalinidade fornecida (expressa em termos equivalentes ao carbonato de cálcio - CaCO_3) seja inadequada pode haver queda do pH, atingindo valores que podem levar à interrupção do processo. De acordo com as relações estequiométricas, cerca de 7,4 kg de alcalinidade (CaCO_3) são consumidos por kg de amônia oxidada (SANT'ANNA JUNIOR, 2010).

O pH do meio apresenta três efeitos sobre a nitrificação: ativação e/ou inativação das bactérias, efeitos nutricionais associados à alcalinidade e carbono inorgânico e, ainda, inibição por amônia livre e ácido nitroso livre. As concentrações de amônia livre e ácido nitroso livre são dependentes do pH e da temperatura, podendo ser determinadas através das Equações 6 e 7 (ANTHONISEN *et al.*, 1976)

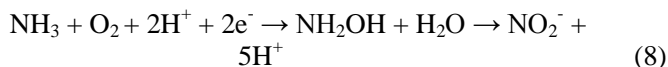
$$[\text{NH}_3] = \frac{17}{14} \times \left(\frac{[\text{N} - \text{NH}_3] + [\text{N} - \text{NH}_4^+] \times 10^{\text{pH}}}{e^{\left(\frac{6,344}{273} + ^\circ\text{C}\right)} \times 10^{\text{pH}}} \right) \quad (6)$$

$$[\text{HNO}_2] = \frac{46}{14} \times \left(\frac{[\text{N} - \text{NO}_2^-]}{e^{\left(\frac{-2,300}{273} + ^\circ\text{C}\right)} \times 10^{\text{pH}}} \right) \quad (7)$$

A presença de íons OH^- ou H^+ pode afetar as enzimas presentes no metabolismo das bactérias, bloqueando o sítio ativo de forma reversível e causando certa inibição. Além disso, em baixos valores de pH, o CO_2 pode ser removido do sistema por *stripping*, gerando uma deficiência de carbono inorgânico para as bactérias autotróficas (FERRETTI, 2009). Quanto à presença de oxigênio dissolvido (OD), as populações de BON são facilmente inibidas por sua limitação. Para que haja uma completa nitrificação, o OD deve ser mantido a uma concentração superior a 2,0 $\text{mg O}_2 \cdot \text{L}^{-1}$ no reator (SCHIERHOLT NETO, 2007; BORTOLI, 2010).

3.1.2 Bactérias Oxidadoras de Amônia

Conforme já afirmado, na etapa de nitrificação, as BOA realizam a oxidação de NH_4^+ , via hidroxilamina (NH_2OH), tendo NO_2^- produto da reação (CHAIN *et al.*, 2003), como pode ser observado na Equação 8.



A formação de NH_2OH ocorre através da redução de O_2 , pela ação da enzima amônia monooxigenase (AMO). Sequencialmente, a NH_2OH é oxidada a NO_2^- via hidroxilamina oxidoreductase (HAO). Ainda, nesse processo, pode ocorrer a formação óxido nitroso (N_2O), através de 2 rotas metabólicas (CHANDRAN *et al.*, 2011; ZHAO *et al.*, 2014):

a) Oxidação incompleta de NH_2OH para NO_2^- (a formação do N_2O é catalisada pela ação da HAO, tendo o óxido nítrico (NO) como intermediário);

b) Redução do NO_2^- a NO e N_2O .

Diferentes abordagens têm sido usadas como estratégias para o estabelecimento do processo de nitrificação, tais como controle de temperatura, o pH, concentração de OD no reator e presença de N-NH_4^+ (PAREDES *et al.*, 2007). A Tabela 1 resume os principais fatores que interferem nas culturas de BOAs e BONs e que podem ser utilizados como estratégia para seleção de BOAs.

Tabela 1- Principais fatores que interferem nas culturas de BOAs e BONs e que podem ser utilizados como estratégia para seleção de BOAs.

Fator	BOA	BON	Referência
<i>Amônia Livre</i>	Favorecidas por altas concentrações; Inibição: entre 10 e 150 mg NH ₃ .L ⁻¹	Maior sensibilidade; Inibição: entre 0,1e 1,0 mg NH ₃ .L ⁻¹	Anthonisen <i>et al.</i> (1976).
<i>Temperatura</i>	Velocidade de crescimento aumenta com o aumento da temperatura (a partir de 15°C)	Velocidade de crescimento decresce com aumento da temperatura	ZHU <i>et al.</i> (2008)
<i>Oxigênio Dissolvido</i>	Se sobressaem em baixas concentrações, ocorrendo acúmulo de N-NO ₂ ⁻	Apresentam maior sensibilidade em baixas concentrações	Schmidell, Reginatto (2007); Wiesmann <i>et al.</i> (2007); Ruiz <i>et al.</i> (2006); Ciudad <i>et al.</i> (2005)

No estabelecimento da nitrificação, a partir de culturas nitrificantes mistas, geralmente mantêm-se a temperatura do reator em aproximadamente 35°C e o pH na faixa de 8,0-8,2, favorecendo a lavagem (*wash-out*) das BON (HELLINGA *et al.*, 1998). Após a seleção das BOAs, linhagens de *Nitrosomonas* geralmente são predominantes no reator (LOGEMANN *et al.*, 1998). A limitação da transferência de oxigênio através de períodos aerados, intercalados por períodos sem aeração, favorece as BOA, uma vez que reduz a disponibilidade de O₂ no meio (ZDRADEK 2005; FERRETI, 2009, BRESSAN *et al.*, 2013).

Devido à susceptibilidade a compostos tóxicos, BOA têm sido empregadas em diversos estudos de inibição, atuando como biosensores, na presença dessas substâncias, mesmo quando presentes em baixas concentrações. Os testes podem ser feitos com bactérias isoladas (GRUNDITZ & DALHAMMAR, 2001; WANG & GUNSCH, 2011) ou então culturas mistas, tal como nitrificantes presentes em lodos ativados (CARUCCI *et al.*, 2006). Trabalhos recentes, tem mostrado que a atividade de BOAs pode ser afetada pela presença de nanomateriais (DIAO & YAO, 2009; MA *et al.*, 2015). No entanto, estudos que avaliaram o efeito de nanopartículas de óxido de ferro (FeNPs) são escassos na literatura.

3.2 NANOTECNOLOGIA

3.2.1 Definições

Nanotecnologia é o termo utilizado para descrever a habilidade de manipulação dos átomos na escala compreendida entre 0,1 e 100 nm, visando criar estruturas maiores fundamentalmente com nova organização estrutural e normalmente com fins comerciais (CADIOLI & SALLA, 2006). As áreas de aplicação abrangem praticamente todos os setores industriais e de serviços, demandando conhecimentos multidisciplinares, baseados na física, química, biologia, ciência e engenharia de materiais, computação, entre outras áreas, que visam estender a capacidade humana de manipular a matéria até os limites do átomo (BORSCHIVER *et al.*, 2005).

A Comissão Europeia (EC, 2011) define nanomateriais (NMs) como aqueles materiais de origem natural ou manufaturados que contém partículas, em estado desagregado, agregado ou aglomerado em que 50% ou mais das partículas apresentam em uma ou mais dimensões externas tamanho de 1-100nm. De acordo com o Projeto de Nanotecnologias Emergentes¹, o número de produtos contendo NMs manufaturados tem crescido rapidamente nas últimas décadas, com mais de 1.800 produtos comerciais já disponíveis no mercado. Segundo dados da ABDI (2013), no mercado global, a produção total anual de nanomateriais foi estimada em 11 milhões de toneladas, representando um valor de mercado de aproximadamente 20 bilhões de euros.

Os autores Ju-Nam & Lead (2008) citam que os NMs podem ser classificados em materiais a base de carbono (ex. fulereno, nanotubos de carbono) e nanopartículas (NPs) inorgânicas, incluindo óxidos metálicos (ex. óxido de zinco, óxido de ferro, dióxido de titânio), metais (ouro, prata e ferro) e *quantum dots* (ex. sulfeto de cádmio e seleneto de cádmio). Nessa categoria, as NPs são os agregados de átomos ligados com pelo menos uma dimensão entre 1-100 nm (BHUSHAN, 2010). Isso resulta em novas características físicas, químicas e biológicas, permitindo aplicação em áreas como eletrônica, óptica, tecnologia da informação, saúde, biotecnologia, alimentos e agricultura e biorremediação ambiental (PRASAD *et al.*, 2011).

¹ Disponível em <http://www.nanotechproject.org>

3.2.2 Regulação do uso de nanomateriais

Apesar das vantagens e aplicações esperadas para as nanotecnologias, é crescente a preocupação com os possíveis efeitos deletérios aos humanos e ao meio ambiente decorrentes da presença de NMs. Sendo que a necessidade de diretrizes para o uso seguro está relacionada à minimização da exposição dos pesquisadores, trabalhadores e consumidores, bem como, do meio ambiente (MARTINEZ & ALVES, 2013). Comparado aos investimentos em desenvolvimento de novos produtos, apenas 5% é voltado aos estudos que avaliam o impacto da presença de NMs (ARCURI, 2014).

Além disso, a pesquisa com nanopartículas, por exemplo, é muito complexa, pois cada tipo de NP tem uma toxicidade e um comportamento diferentes, inclusive quando se utiliza um mesmo produto químico. Em consulta à base de dados do Portal de Periódicos CAPES (levantamento realizado em fevereiro de 2015, *grifo do autor*), usando como palavras-chave os tópicos *nanotecnologia*, *nanomateriais* ou *nanopartículas*, foi observado que apenas em torno de 3,0% dos trabalhos desenvolvidos nessa área estão relacionados com estudos de toxicidade ou ecotoxicidade.

Quanto à normalização no campo da nanotecnologia, há a necessidade do melhor entendimento e controle de matérias e processos em escala nanométrica, bem como da utilização das propriedades de NMs. Uma vez que esses diferem das propriedades dos átomos individuais, moléculas e matéria (*bulk matter*), permitindo criar melhores materiais, dispositivos e sistemas que explorem estas novas propriedades (ISO, 2005). Desde 2003 o tema sobre riscos dos NMs vem sendo abordado em vários países, tais como aqueles pertencentes à Comunidade Europeia, Estados Unidos, Canadá e Austrália. No Brasil, as preocupações com a regulação das nanotecnologias começam a fazer parte mais efetiva da agenda do governo, uma vez que a ausência de regulamentações cria gargalos para a sua efetiva introdução nos diferentes setores industriais. Do ponto de vista social, há muito a ser feito em relação a melhorar a percepção da sociedade sobre os riscos e benefícios das nanotecnologias.

Atualmente, tramita na Câmara dos Deputados o Projeto de Lei nº 5.133/2013 que visa regulamentar a rotulagem de produtos das nanotecnologias e de produtos que fazem uso das nanotecnologias (BRASIL, 2013). A Tabela 2 resume as principais recomendações e ou regulamentações sobre o assunto ao redor do mundo.

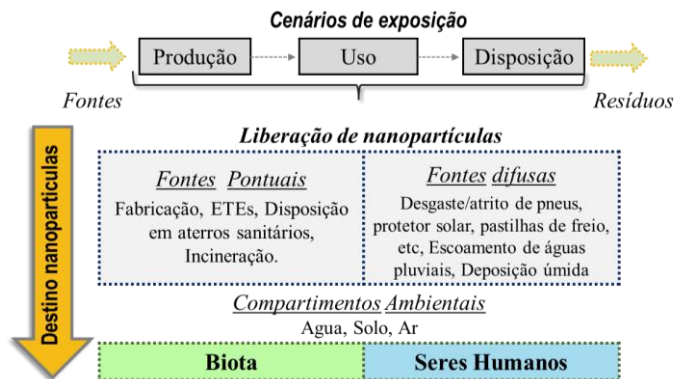
Tabela 2 – Regulamentações e/ou Recomendações existentes acerca do assunto nanotecnologias.

Regulamento/Recomendação	Fonte
ISO/TC 229 Nanotecnologias – Comitê Técnico Internacional para a padronização no campo das nanotecnologias (35 países participantes, incluindo Brasil – ABNT e 13 países observadores); responsável pela publicação de 42 normativas ISO sobre o tema.	ISO (2005)
<i>Safe Drinking Water Act</i> – Aplicável à presença de NMs em água potável ou quando injetados em poços.	EPA (2007)
<i>Comprehensive Environmental Response, Compensation and Liability Act (CERCLA)</i> e <i>Resource Conservation and Recovery Act (RCRA)</i> - Aplicável aos riscos decorrentes da presença de NMs em locais de disposição de resíduos.	EPA (2007)
<i>Clean Water Act</i> – Aplicável ao lançamento de águas contendo NMs nos Estados Unidos	EPA (2007)
<i>Clean Air Act</i> – Aplicável às emissões de NMs listados como poluentes ou poluentes perigosos do ar.	EPA (2007)
Plano para coleta de informações sobre NMs presentes nos produtos agrotóxicos e seus efeitos potenciais sobre os seres humanos ou o meio ambiente.	EPA (2011)
Limite de exposição para TiO ₂ NPs (100- 3000nm) e nanotubos de carbono	NIOSH (2011, 2013a)
Orientações sobre aplicações e implicações dos NMs na saúde e segurança ocupacional, incluindo o uso de tecnologias de controle eficaz, práticas de trabalho e equipamentos de proteção individual.	NIOSH (2009a, 2009b, 2012)
Projeto de Lei n.º 5.133/2013 - Regulamenta a rotulagem de produtos da nanotecnologia e/ou que fazem uso da nanotecnologia.	Brasil (2013)
Orientações para o setor industrial que faz uso de nanotecnologias quando há envolvimento de produtos regulamentados pelo FDA	FDA (2014a)
Segurança de NMs em produtos cosméticos	FDA (2014b)
Avaliação dos efeitos decorrentes de significativas mudanças no processo de produção, sobre a segurança e <i>status</i> regulatório dos ingredientes de alimentos bem como substâncias em contato com os alimentos.	FDA (2014c)
Estratégias para controle na produção e processos de tratamento <i>downstream</i> de NMs	NIOSH (2014)
Decreto Lei n.º 644/2014 - Regras para o Inventário de nanoproductos da Dinamarca	DEPA (2014)

3.2.3 Presença de nanopartículas no meio ambiente e suas implicações

Com a difusão da nanotecnologia, a liberação de nanomateriais para o meio ambiente tende a ser inevitável, uma vez que as mesmas características que tornam as NPs interessantes do ponto de vista tecnológico podem ser indesejáveis ao meio ambiente. De acordo com a Agência Proteção Ambiental dos Estados Unidos (do inglês *Environmental Protection Agency*, EPA), os nanomateriais podem atingir o meio ambiente através de fontes pontuais, difusas ou por *via* direta, quando utilizados para fins de remediação (EPA, 2014). O pequeno tamanho das NPs, por exemplo, facilita o transporte e difusão na atmosfera, água e solo, ao passo que dificulta sua remoção por técnicas usuais de filtração, facilitando a entrada e acúmulo das NPs em células vivas (QUINA, 2004; WIESNER *et al.*, 2006; SOM *et al.*, 2010, SOM *et al.*, 2011). Os possíveis cenários de exposição aos nanomateriais são apresentados na Figura 2.

Figura 2 - Presença de nanomateriais no meio ambiente



Fonte: Adaptado de WIESNER *et al.* (2006), SOM *et al.* (2010, 2011)

Considerando o cenário apresentado na Figura 2, o corpo humano está exposto a NPs através de quatro rotas possíveis: (a) inalação de NPs no ar; (b) ingestão de água ou alimentos; (c) penetração cutânea por contato com a pele, e (d) injeção de nanomateriais artificiais (OBERDÖRSTER *et al.*, 2005). Já em relação ao meio ambiente, os NMs podem potencialmente afetá-lo de três maneiras: (a) causando efeito tóxico direto sobre a biota; (b) alterando a biodisponibilidade de

agentes tóxicos e de nutrientes; e (c) causando efeitos indiretos, ao interagir com compostos orgânicos naturais (SIMONET & VALCÁRCEL, 2009; BAALOUSHA & LEAD, 2009).

De modo geral, sabe-se muito pouco sobre a disponibilidade, biodegradabilidade e toxicidade dos NMs. Estudos relacionados à exposição humana mostram que as NPs podem ser perigosas (HOET *et al.*, 2004; HADRUP & LAM, 2014; JING *et al.*, 2015). Além disso, NPs podem apresentar efeitos ecotoxicológicos relevantes após descarga em corpos hídricos (REIJNDERS, 2006). Fato esse que eleva a preocupação sobre os possíveis impactos decorrentes da inserção desses compostos no meio ambiente. Assim, há a necessidade da condução de estudos sobre a interação entre os nanomateriais e microrganismos, uma vez que a modificação da composição e atividade microbiana - na presença de nanomateriais - pode ter consequências em escala local, regional e global.

3.2.3.1 Ocorrência de NPs em sistemas de tratamento de efluentes

A principal rota de liberação das NPs metálicas para o meio ambiente ocorre através da descarga em sistemas de tratamento de efluentes e posterior acúmulo no lodo gerado durante o processo de tratamento (KAEGI *et al.* 2011). A presença de NPs tem sido reportada em estações de tratamento de águas residuais (LIMBACH *et al.*, 2008; KISER *et al.*, 2009). Isso é um motivo de preocupação, pois sem o conhecimento prévio do tipo tratamento adequado para esses resíduos, o efluente é descartado no ambiente de forma inadequada, causando perturbação e desequilíbrio nos ecossistemas aquáticos.

As concentrações da maioria das NPs presentes no meio ambiente ainda são desconhecidas. Esse fato se deve à falta de métodos específicos para distinguir e quantificar os materiais em nanoescala que ocorrem naturalmente no ambiente daqueles engenheirados (PUAY *et al.*, 2015).

Modelos de exposição sugerem que sejam maiores no solo do que no ar e água. Keller *et al.* (2010) estimaram que entre 63-91% da produção global de NPs (260.000 a 309.000 toneladas) teve como destino final aterros sanitários, com um balaço de liberação no solo entre 8–28 %, corpos hídricos (0,4 a 7,0 %), e atmosfera (0,1 a 1,5 %). De acordo com dados da *Royal Commission on Environmental Pollution* (2008), durante o processo de produção de fulereno, apenas 10% do

material é utilizável e o restante é disposto em aterros. Países como China e Taiwan, por exemplo, NPs de sílica são comumente utilizadas como agente abrasivo na fabricação circuitos integrados e chips eletrônicos. O efluente gerado nessas fábricas tem essas NPs como principal composto, cujas concentrações variam de 1,3 a 8,5 g.L⁻¹ com um tamanho médio de 100 nm (LIU *et al.*, 2014). Resultados bem sucedidos de aplicação em campo usando Fe⁰NP foram publicados, com a injeção de 1,7 e 400 kg de NP para remediação das águas subterrâneas (ELLIOTT & ZHANG, 2001; QUINN *et al.*, 2005).

Uma vez presentes em sistemas de tratamento de efluentes, as NPs podem interagir com as comunidades microbianas presentes através de diversos mecanismos, tais como difusão, aglomeração ou sedimentação gravitacional. Conforme Brar *et al.* (2010), quando em contato com microrganismos, as partículas podem ser aderidas à superfície celular ou absorvidas, criando um gradiente de concentração na camada sem agitação, que se encontra imediatamente acima das células microbianas. Este gradiente direciona o transporte difusional das partículas. Considerando que as taxas desse transporte são função do tamanho de partícula e da viscosidade do meio (neste caso, águas residuais e lodos), tem-se que as partículas menores se difundem mais rapidamente do que as partículas grandes.

O mecanismo de aglomeração envolve a aderência de partículas simples ou *clusters* em massas maiores, devido à ação de forças atrativas ou ligações químicas e/ou mecânicas (MAEAKIN, 1988). Quando as partículas primárias formam aglomerados irreversíveis, esses são chamados de agregados, a exemplo do que ocorre com NPs de óxidos metálicos (LIMBACH *et al.*, 2005), fulerenos (FORTNER *et al.*, 2005), e nanotubos de carbono (LISUNOVA *et al.*, 2006). Quanto à sedimentação, no caso das NPs, o efeito gravitacional é desprezível, contudo pode se tornar de significativo quando as NPs estão ligadas a outras partículas coloidais presentes nas águas residuais.

Limbach *et al.* (2008) estudaram o comportamento de NP de óxido de cério em uma planta modelo de tratamento de águas residuais. Os resultados demonstraram que a maioria das NPs foi capturada através do lodo (aderidas aos microrganismos). No entanto, há de se considerar que uma quantidade representativa dessas NPs (6% em massa) foi encontrada na fração líquida do efluente final.

Quanto às tecnologias utilizadas para a remoção de NMs em sistemas de tratamento de água e/ou efluentes, ainda são poucos os dados disponíveis na literatura. Wiesner *et al.* (2006) apresentam os métodos de floculação, sedimentação e/ou de filtração (areia ou por

membrana) como alternativa. Por outro lado, Reijnders (2006), supõe que os sistemas convencionais de tratamento são inadequados para a captura de nanomateriais. Leppard *et al.* (2003), reportaram a presença de NPs em pontos de descarga de estações de tratamento de águas residuais, indicando esta como uma possível rota de liberação destes produtos no meio ambiente. Portanto, deve ser considerado que após o tratamento, grande parte das NPs fica no lodo, o qual pode servir de fertilizante para solos ou simplesmente ser incinerado. Assim, como método de deposição final, o destino do lodo pode afetar a quantidade de NPs presente em cada compartimento ambiental, seja solo, água ou ar.

3.2.4 Nanopartículas de Óxido de Ferro (IONPs)

O interesse pelas nanopartículas de ferro (FeNPs) decorre, principalmente, das suas propriedades magnéticas, alta área superficial e alta reatividade. São agrupadas em nanopartículas de ferro com valência zero (Fe^0NPs) e nanopartículas de óxido de ferro (IONPs), tendo a hematita (Fe_2O_3) maghemita ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) e magnetita (Fe_3O_4) como principais representantes. Podem ser encontradas naturalmente no meio ambiente como material particulado proveniente de poluentes atmosféricos e erupções vulcânicas, ou podem ser sintetizadas quimicamente, para aplicações específicas.

Óxidos de ferro (Fe_xO_y), juntamente com sílica (SiO_2), titânio (TiO_2), ferro (Fe_xO_y), zinco (ZnO) e alumínio (Al_2O_3) dominam o mercado global de produção de NMs. São inúmeras as possibilidades de uso dessas IONPs. Em áreas como biomedicina, por exemplo, podem ser empregadas como agentes de contraste em imagens de ressonância magnética (QIAO *et al.*, 2009; CHAUGHULE *et al.*, 2012), ou tratamento de células cancerígenas ou tumorais (YU *et al.*, 2013).

No caso da remediação ambiental, devido ao seu custo efetivo, grandes volumes podem ser utilizados na recuperação de superfícies, águas subterrâneas, sedimentos e solos contaminados com metais pesados, tricloroetileno, dioxinas, tetracloreto de carbono (ZHU *et al.*, 2012). Neste caso, grandes quantidades de FeNPs são liberadas para o meio ambiente, devido à sua capacidade de processar um grande número de contaminantes (KARN *et al.*, 2009). Fe^0NPs , por exemplo, são facilmente oxidadas no ar e, na água, hidrolisadas para a forma de óxidos (KHIN *et al.*, 2012). No entanto, esta tecnologia ainda é

experimental e há pouco conhecimento sobre a sua eficiência, destino e comportamento dessas NPs, quando liberadas para o meio ambiente (GRIEGER *et al.*, 2010; NOUBACTEP *et al.*, 2012; BAUMANN *et al.*, 2014).

3.2.4.1 Síntese e Caracterização

Nas últimas décadas, muitos estudos voltados à síntese de IONPs foram desenvolvidos e as metodologias são bem descritas na literatura. Métodos convencionais como a co-precipitação, decomposição térmica, síntese hidrotérmica, microemulsão, síntese sonoquímica e/ou por rota sonoquímica proporcionam a síntese de alta qualidade (WU *et al.*, 2008). Outros métodos alternativos incluem a síntese eletroquímica (CABRERA *et al.*, 2008; PASCAL *et al.*, 1999), técnicas de pirólise a laser (BOMATÍ-MIGUEL *et al.*, 2008) e síntese bacteriana, especialmente as bactérias magnetostáticas e bactérias ferro-redutoras (ROH *et al.*, 2006; BHARDE *et al.*, 2008).

Quanto à caracterização das NPs, esta é essencial, principalmente quando são conduzidos ensaios toxicológicos. Pois como ainda não há padronização para as metodologias de avaliação da toxicidade das NPs, os estudos ainda são controversos e variam de acordo com o tamanho e tipo de revestimento da NPs, bem como o tipo celular estudado. Os métodos de caracterização estrutural e físico-química das IONPs são bem descritos na literatura (LODHIA *et al.*, 2010) e incluem técnicas de difração de raios-X (composição química e estrutura cristalográfica), microscopia eletrônica de transmissão (tamanho e distribuição das partículas), espalhamento de luz (diâmetro hidrodinâmico das partículas), espectroscopia de infravermelho FT-IR (identificação dos grupos funcionais presentes na superfície adsorvente das NPs), espectroscopia UV-visível (estabilidade das dispersões de NPs), dentre outros.

3.2.4.2 Toxicidade

Como descrito anteriormente (item 3.2.3) as IONPs podem ocorrer naturalmente no meio ambiente ou artificialmente. Considerando o aumento da utilização dessas NPs em uma série de aplicações, é importante avaliar e entender os efeitos sobre o meio ambiente e saúde humana. Isso tem motivado a comunidade científica a investigar o impacto causado em diversos organismos, impulsionando os

esforços na identificação dos mecanismos que efetivamente levam a toxicidade das NPs, os quais ainda não são completamente entendidos.

Uma das características do estudo da toxicidade de NPs é que os materiais, que muitas vezes não são prejudiciais na sua forma aglomerada, podem apresentar toxicidade quando se apresentam em escala nanométrica (POOLE & OWENS, 2003). O dióxido de titânio (TiO_2), por exemplo, é um dos elementos mais abundantes e geralmente inerte. Contudo, NPs de TiO_2 são amplamente utilizadas por apresentarem grandes áreas superficiais e sítios catalíticos altamente reativos (CHO *et al.*, 2004; CHOI & HU, 2008). Considerando isso, Metzler *et al.* (2011) avaliaram a toxicidade de NPs de TiO_2 (30nm) em algas. Os ensaios de exposição demonstraram forte inibição do crescimento celular, uma vez que, devido ao recobrimento da superfície das células (em função da elevada área superficial das NPs) há interrupção da transferência de nutrientes, ocasionando estresse físico celular.

Estudos recentes têm demonstrado que FeNPs apresentam efeito citotóxico em células bacterianas, e podem, por consequência, ter um impacto negativo sobre as comunidades microbianas expostas (BARNES *et al.*, 2010b). A toxicidade pode ocorrer de diversas maneiras, seja pela liberação de íons para o meio ou pela ação das próprias NPs (WILLIAMS *et al.*, 2006). Para um melhor entendimento, serão apresentados nos itens abaixo os mecanismos de toxicidade relacionados exposição direta aos íons de ferro (item 3.2.4.2.1) e às FeNPs (item 3.2.4.2.2).

3.2.4.2.1 Íons de Fe

O Fe está presente no solo e em minerais, principalmente sobre a forma de óxido férrico insolúvel. Além disso, é considerado um elemento essencial para a realização do processo metabólico de todos os organismos vivos. Apesar de sua importância, altas concentrações deste metal podem ser tóxicas, devido geração de espécies reativas de oxigênio - ROS (HOLDEMAN *et al.*, 1999; DE FREITAS & MENECHINI, 2001; CHAO *et al.*, 2005; LAMERS *et al.*, 2012).

Diversos estudos têm demonstrado que os metais afetam a cinética de crescimento microbiano (JIANG *et al.*, 2009; ICONARU *et al.*, 2013). Em processos de lodo ativado quando o Fe está disponível na forma de íons, pode reagir química ou biologicamente, com outros

compostos, interferindo na biologia desse processo. A reação de Fe^{2+} com NO_2^- (quimiodesnitrificação), produz o Fe_3^+ e $\text{NO}/\text{N}_2\text{O}$, que é tóxico para os microrganismos. Em condições anóxicas, o NO_3^- também serve como aceptor de elétrons na oxidação de Fe_2^+ a Fe_3^+ (RAKSHIT *et al.*, 2008; COBY & PICARDAL, 2005; PHILIPS *et al.*, 2003).

Dentre as BOAs presentes em lodos ativados, a *Nitrosomonas europaea* é conhecida por requerer uma significativa quantidade de Fe para seu crescimento, apresentando 90 genes dedicados à aquisição de Fe (WEI *et al.*, 2006). Keyer *et al.* (1995) estudaram o efeito de íon de Fe sobre o crescimento de essa bactéria e reportam crescimento normal na presença de 10 a 250 μM de Fe. No entanto, o crescimento foi inibido com 1200 μM (67,2 mg), provavelmente, devido à toxicidade do Fe, causando danos oxidativos às células. Em trabalho realizado por Bengtsson *et al.* (2002) foram estudados a cinética e o mecanismo de oxidação de hidroxilamina, um produto intermediário da oxidação da amônia a nitrito (Equação 8), na presença de Fe^{3+} . Os resultados obtidos apontam para um mecanismo dependente da concentração relativa: quando a relação estequiométrica $\text{Fe}^{3+}/\text{NH}_2\text{OH}$ foi 2:1, observou-se a formação de N_2O como produto da oxidação, ao passo que para uma relação estequiométrica 1:1 ($\text{Fe}^{3+}/\text{NH}_2\text{OH}$), N_2 foi o produto principal.

A redução da atividade nitrificante na presença de altas concentrações de Fe também foi observada por Reising (2013). Ao investigar presença de Fe biodisponível em sedimentos do rio *White River* (Indiana, USA) esse autor reportou concentrações de Fe na faixa de 0,65-1,98 g $\text{Fe}\cdot\text{kg}^{-1}$. No entanto, a máxima concentração de Fe solúvel encontrada na coluna d'água foi de 0,1 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$. Ainda, o mesmo autor observou redução na atividade de nitrificação quando o Fe estava presente em maior quantidade.

Em estações de tratamento de efluentes os sais de Fe são frequentemente utilizados, visando melhorar as propriedades de sedimentação (BOWEN & DEMPSEY, 1992) ou o desempenho do sistema, através da remoção de compostos orgânicos (LEFEBVRE & LEGUBE, 1990) bem como outros nutrientes (CROZES *et al.*, 1995). Contudo, estudos tem demonstrado um decréscimo significativo na desaguabilidade do lodo e aumento da turbidez (produção de pequenos flocos de lodo) com a dosagem de Fe^{2+} e/ou Fe^{3+} (LEES *et al.*, 2001; PHILIPIS *et al.*, 2003).

No que se refere à toxicidade direta do próprio Fe, Carter e McKinney (1973) sugerem que, embora as formas de Fe precipitem rapidamente e já não estejam biodisponíveis para os microrganismos na forma solúvel, os precipitados de Fe podem de recobrir as células

bacterianas, formando uma espécie de barreira e, conseqüentemente, bloquear a transferência de nutrientes. Kalantari & Ghaffari (2008) avaliaram o efeito do Fe sobre o crescimento de *E. Coli*. Os autores demonstraram o crescimento foi inibido em 31.3 % (comparado ao controle) na presença de 1 mM Fe³⁺.L⁻¹. Esses resultados sugerem que o Fe, em altas concentrações, tem efeito inibitório sobre o crescimento bacteriano, sendo que o Fe³⁺ também é uma substância tóxica que aparentemente atua sobre um alvo extracitoplasmático em bactérias gram-negativas (HARRISON *et al.*, 1992; CHAMNONGPOL *et al.*, 2002; KALANTARI & GHAFFARI, 2008). Ainda, Saralaya *et al.* (2004) demonstraram que o aumento das concentrações de Fe³⁺ associada a outros elementos traço reduz significativamente a hidrofobicidade superficial de *E. Coli*.

3.2.4.2.2 Nanopartículas de Ferro

Com a crescente produção e utilização de NPs em uma grande variedade de produtos de consumo, as agências reguladoras em todo o mundo estão abordando o risco que estas substâncias podem representar para o meio ambiente e à saúde humana. A maioria dos estudos têm investigado o efeito ou potencial de toxicidade das nanopartículas de óxido de Fe (IONPs) em mamíferos e/ou em diferentes linhagens de células (ZHU *et al.*, 2008; MAHMOUDI *et al.*, 2011). No entanto, são poucos os trabalhos que avaliaram a toxidade em sistemas ambientais (GARCÍA *et al.*, 2011).

Ao analisar a toxicidade de NPs em organismos biológicos, a questão crítica é a determinação de quais fatores influenciam o efeito dose-resposta. Com base em uma extensa investigação na literatura, observou-se que efeitos tóxicos atribuídos as NPs são dependentes de fatores como: propriedades físico-químicas (ex.: composição, tamanho, aditivos, área superficial específica, carga superficial, método de síntese), fatores ambientais, os organismos alvo e métodos experimentais empregados (BRUNNER *et al.*, 2006; CHOI *et al.*, 2010).

Os mecanismos de toxicidade dos nanomateriais incluem os danos devido ao estresse oxidativo e injúrias na superfície celular, além de impactos via bioacumulação. O estresse oxidativo, por exemplo, está relacionado à habilidade que muitas NPs apresentam para a geração de ROS - íons de oxigênio, peróxidos e radicais livres (OBERDORSTER *et al.*, 2005, NEL *et al.*, 2006). Já os danos físicos na membrana celular

podem ocorrer devido natureza abrasiva de algumas NPs (STOIMENOV *et al.*, 2002). Ainda, a adesão de NPs na superfície celular e a dissociação de espécies tóxicas solúveis também pode permitir a entrada de NPs para o interior da célula (KLAINÉ *et al.*, 2008; APTE *et al.*, 2009). Na bioacumulação, vários mecanismos estão envolvidos, podendo ocorrer ao longo dos diferentes níveis tróficos:

a) *Organismos unicelulares*: interação (direta ou via endocitose) das NPs com a superfície celular (HAJIPOUR *et al.*, 2012)

b) *Organismos superiores*: absorção através das brânquias e/ou outros tecidos epiteliais presentes na superfície externa (MOORE, 2006; NOWACK & BUCHELI, 2007).

c) *Cadeia alimentar*: ingestão direta (ROBERTS *et al.*, 2007) ou indireta (BOULDIN *et al.*, 2008).

FeNPs têm sido associadas a efeitos tóxicos (TROUILLER *et al.*, 2009; GOMAA *et al.*, 2013), sendo que os principais mecanismos da toxicidade estão relacionados ao recobrimento físico das células bacterianas, o rompimento da membrana celular e a geração de ROS (BARNES *et al.*, 2010b). Diversos estudos têm demonstrado que essas NPs são citotóxicas para *Escherichia coli*, *Pseudomonas fluorescens*, *Bacillus subtilis* var. *niger* (AUFFAN *et al.*, 2008; LEE *et al.*, 2008; DIAO & YAO, 2009; DENG *et al.*, 2014).

Quando presentes em ambientes aquáticos, por exemplo, as NPs se encontram altamente agregadas aos sedimentos (receptor final), aumentando o risco de exposição dos organismos bentônicos a esses contaminantes. Em estudo realizado por García *et al.* (2011) foram conduzidos diversos testes para avaliar a toxicidade aguda de Fe₃O₄ NPs em *Daphnia magna* e *Vibrio fischeri*. Enquanto Saravanan *et al.* (2011) avaliaram os efeitos de Fe₂O₃ NPs sobre *Labeo rohita*, observando alterações em parâmetros hematológicos, bioquímicos, enzimológicos e na regulação de íons. Os resultados de ambos os trabalhos demonstraram extrema sensibilidade dos organismos avaliados (Tabela 3), indicando alto potencial de toxicidade das NPs em ambientes aquáticos.

Mahmoudi & Serpooshan (2012) estudaram o efeito de NPs de Fe com propriedades superparamagnéticas (SPIONs) contendo diferentes recobrimentos superficiais (ex.: ouro e prata) em biofilmes bacterianos. Os autores relataram dois pontos importantes: a alta ação biocida sobre biofilmes bacterianos e a capacidade que NPs magnéticas têm para penetrar em biofilmes usando campos magnéticos externos.

Prucek e colaboradores (2011) investigaram as propriedades antibacterianas e antifúngicas de nanocompósitos magnéticos contendo

IONPs e AgNPs em organismos procariotos (bactérias e fungos) e eucariotos (fibroblastos embrionários). Nesse caso, os autores concluíram que os nanocompósitos avaliados destroem efetivamente os microrganismos em concentrações muito baixas, as quais não são tóxicas para células eucarióticas. Barnes *et al.* (2010b) avaliaram o efeito de FeNPs na biodegradação de hidrocarbonetos alifáticos clorados por comunidades bacterianas nativas. Os resultados obtidos mostraram que essas NPs foram inibitórias em concentrações superiores a $0,3 \text{ g.L}^{-1}$ para as comunidades bacterianas desclorinantes e redutoras de sulfato.

Já os autores Ni *et al.* (2013) avaliaram o efeito de IONPs no desempenho de um reator de lodos ativados, sob operação em regime de batelada alimentada sequencial (escala de laboratório). Em ensaios de exposição de curto prazo (7 dias), os autores relataram que as NPs impactaram negativamente no processo. Contudo, quando a exposição em longo prazo (50 mg NPs.L^{-1}) foi avaliada, evidenciou-se melhora na remoção de nitrogênio total, maior abundância de bactérias nitrificantes e melhora na atividade enzimática.

Em trabalho realizado por Hwang *et al.* (2011), foi investigado o efeito de IONPs revestidas com surfactantes sobre a qualidade de efluente de um SBR na simulação do tratamento secundário de águas residuais. Os resultados mostraram que 8,7% das NPs aplicadas permaneceram no efluente e, que as NPs pioraram a qualidade do efluente em relação aos parâmetros de DQO, turbidez e cor aparente. Isso implica no fato de que as NPs podem ser inseridas no meio ambiente através do lançamento de águas residuais.

Os principais estudos encontrados na literatura que reportam os efeitos de FeNPs, bem como do Fe em suas formas ionizadas (Fe^{2+} e Fe^{3+}) são apresentados resumidamente na Tabela 3. É importante destacar que, até o presente momento, após busca exaustiva na literatura, não foram encontrados relatos de trabalhos que avaliaram o efeito das IONPs em comunidades de BOAs.

Tabela 3 - Estudos encontrados na literatura que reportam os efeitos de FeNPs, bem como do Fe em suas formas ionizadas

Composto	Diâmetro (nm)	Concentração (mg.L ⁻¹)	Organismo Teste	Tempo Exposição	Efeito	Autor
Íon Fe2+	-	20,0	<i>Nitrosomonas</i>	7 dias	Inibição de atividade: 20%	Seyfried <i>et al.</i> (1988)
Íon Fe2+	-	560	<i>N. europea.</i>	7 dias	Retarda produção de NO ₂ ⁻	Meiklejohn (1953)
Fe ³⁺ residual (tratamento primário) ^a	-	1,68	Lodo Ativado	-	Inibição de atividade: 20-34%	Lees <i>et al.</i> (2001)
FeCl ₃	-	30,0 – 150,0	Lodo Ativado	Aplicação em longo prazo	Não Reportado	Crawford <i>et al.</i> (2006)
Fe ₃ O ₄ NPs	~5,2	50,7	<i>D. magna</i>	96 h	EC ₅₀ ^b	Daigger <i>et al.</i> (2010)
Fe ₃ O ₄ NPs	~5,2	68,4	<i>D. magna</i>	96 h	EC ₅₀	Garcia <i>et al.</i> (2011)
Fe ₃ O ₄ NPs	~5,2	27,9	<i>D. magna</i>	96 h	EC ₅₀	Baumann <i>et al.</i> (2014)
Íon Fe2+	-	20,0	<i>Nitrosomonas</i>	7 dias	Inibição de atividade: 20%	Baumann <i>et al.</i> (1988)
Fe ₃ O ₄ NPs	~ 6,1	>100	<i>D. magna</i>	96 h	EC ₅₀	Baumann <i>et al.</i> (2014)
Fe ₃ O ₄ NPs	6,0	240,0	<i>Vibrio fischeri</i>	5 min 15min	EC ₅₀	Garcia <i>et al.</i> (2011)

Tabela 3 – Continuação

Composto	Diâmetro (nm)	Concentração (mg.L ⁻¹)	Organismo Teste	Tempo Exposição	Efeito	Autor
----------	---------------	------------------------------------	-----------------	-----------------	--------	-------

Fe ₃ O ₄ NPs	~30	200	<i>Oryzias latipes</i>	7 dias	Mortalidade: Filhotes: 12,3	Chen <i>et al.</i> (2012)
Fe ₂ O ₃ NPs	-	24,0	<i>Escherichia coli</i>	20 min	Taxa de sobrevivência: 1%	Schwegmann <i>et al.</i> (2010)
Fe ₂ O ₃ NPs	-	50,0	Lodo Ativado	7 dias	Redução de 7,94% na Remoção N _{total}	Ni <i>et al.</i> (2013)
Fe ₂ O ₃ NPs	-	100,0	Lodo Ativado	7 dias	Redução de 12,2% na Remoção N _{total}	Ni <i>et al.</i> (2013)
Fe ₂ O ₃ NPs	-	200,0	Lodo Ativado	7 dias	Redução de 29,9 na Remoção N _{total}	Ni <i>et al.</i> (2013)
Fe ₂ O ₃ NPs	-	200,0	<i>Ceriodaphnia dúbia</i>	24 - 48 h	Não foi observada mortalidade; Bioacumulação	Hu <i>et al.</i> (2012)
Fe ₂ O ₃ NPs	26,0	~120,0	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	24 h	MBC	Azam <i>et al.</i> (2012)
Fe ₂ O ₃ NPs	26,0	~65,0	<i>Escherichia coli</i>	24 h	MBC	Azam <i>et al.</i> (2012)
Fe ₂ O ₃ NPs	26,0	~80,0	<i>Staphylococcus aureus</i>	24 h	MBC	Azam <i>et al.</i> (2012)
Fe ₂ O ₃ NPs	26,0	~78,0	<i>Bacillus subtilis</i>	24 h	MBC	Azam <i>et al.</i> (2012)
Fe ₂ O ₃ NPs	-	100,0 (em Fe)	<i>Escherichia coli</i>	45 min	Deformação da célula, disrupção dos flagelos; superfície celular mais rígida	Zhang <i>et al.</i> (2012)

Tabela 3 – Continuação

Composto	Diâmetro (nm)	Concentração (mg.L ⁻¹)	Organismo Teste	Tempo Exposição	Efeito	Autor
Fe ₂ O ₃ NPs	30,0	~53,4	<i>Danio rerio</i> (embriões e larvas)	168 h	LC ₅₀	Zhu <i>et al.</i> (2012)
Fe ₂ O ₃ NPs	30,0	~36,1	<i>Danio rerio</i> (embriões)	168 h	EC ₅₀	Zhu <i>et al.</i> (2012)
Fe ₂ O ₃ NPs		1,0 – 25,0	<i>Labeo rohita</i>	96 h	Alteração de parâmetros hematológicos, bioquímicos, enzimológicos e na regulação de fons	Saravanan <i>et al.</i> (2011)
SPIONs	30	25,0	Macrófagos murinos	3 h	Índice apoptose celular: 1,9 ± 0,6	Naqvi <i>et al.</i> (2010)
SPIONs	30	200,0	Macrófagos murinos	3 h	Índice apoptose celular: 2,5 ± 1,2	Naqvi <i>et al.</i> (2010)
SPIONs	30	500,0	Macrófagos murinos	3 h	Índice apoptose celular: 26,8 ± 3,5	Naqvi <i>et al.</i> (2010)
SPIONs	30	25,0	Macrófagos murinos	6 h	Índice apoptose celular: 2,1 ± 0,8	Naqvi <i>et al.</i> (2010)
SPIONs	30	200,0	Macrófagos murinos	6 h	Índice apoptose celular: 25,6 ± 2,5	Naqvi <i>et al.</i> (2010)
SPIONs	30	500,0	Macrófagos murinos	6 h	Índice apoptose celular: 39,4 ± 6,3	Naqvi <i>et al.</i> (2010)

Notas: LC₅₀: Concentração de um composto que é letal para 50% de uma população; EC₅₀: Concentração média efetiva de um composto que dá 50% da resposta máxima; MBC: Concentração mínima bactericida

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 CULTIVO DE BOAs

Visando verificar como as IONPs agem sobre uma cultura enriquecida com bactérias oxidadoras de amônia (BOAs), a primeira etapa deste trabalho compreendeu a operação de um reator biológico para produção celular (biomassa nitrificante) destinadas à realização dos ensaios cinéticos de atividade.

4.1.1 Inóculo

Um reator cilíndrico de batelada sequencial (RBS) com volume útil de 5 L foi usado para o cultivo de BOAs. O inóculo ($1,6 \text{ g SSV.L}^{-1}$, 10% v/v) foi obtido a partir de uma cultura nitrificante mantida em um reator RBS em escala de bancada, originalmente enriquecido a partir de biomassa proveniente de um sistema de lodos ativados de uma planta municipal de tratamento de efluentes (CASAN, Florianópolis/SC).

4.1.2 Meio de Cultura

Os cultivos foram realizados com meio modificado de Campos *et al.* (1999) (Tabelas 4 e 5). A principal modificação do meio refere-se à concentração de nitrogênio ($1,0 \text{ g N-NH}_4^+.\text{L}^{-1}$). A alcalinidade foi ajustada para fornecer apenas a quantidade estequiométrica necessária para a oxidação da amônia, conforme Equação 5.

Tabela 4 - Composição do meio de cultura

Nutriente	Concentração (g.L^{-1})
NH_4Cl	1,9107
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	2,459
KH_2PO_4	0,25
$\text{MgSO}_4.7\text{H}_2\text{O}$	0,046
NaCl	0,5
NaHCO_3	11,962
*Microelementos	$1,0 \text{ mL.L}^{-1}$

Fonte: adaptado de CAMPOS *et al.* (1999)

Tabela 5 - Composição da Solução de Microelementos*

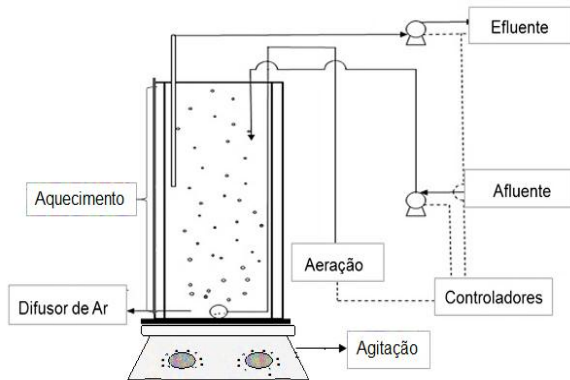
Nutriente	Concentração (g.L ⁻¹)
ZnSO ₄	12,354
MnCl ₂	3,220
CuSO ₄	1,004
FeSO ₄	2,728
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄	1,036
CoCl ₂	0,880
CaCl ₂	5,540
EDTA	50,000

* Adaptado de Vishniac and Santer (1957)

4.1.3 Operação do Reator

Para produção de biomassa nitritante (BOA) foi utilizado um reator cilíndrico (Figura 3), confeccionado no LTBR/UFSC, com volume útil de 5 L, diâmetro de 17,7 cm e altura total de 26 cm, operando em sistema de bateladas sequenciais (RBS).

Figura 3 - Esquema Ilustrativo do Reator Nitritante



Agitador magnético (IKA[®] mod. C-Mag HS7, 200 rpm) foi empregado para manter a biomassa em suspensão. Um banho termostatzado foi empregado para manutenção da temperatura do sistema (31±1 °C). Para o aquecimento do banho termostatzado foi empregado um aquecedor de resistência elétrica (Atman 200 Eletronic Heater) e a água foi recirculada por uma motobomba submersa (Sarlobetter[®] Bomba 520). A aeração foi realizada com uso de bomba

compressora de ar (BIG AIR[®], A420) conectada por mangueira de silicone a uma pedra difusora. Foram utilizadas bombas peristálticas para alimentação do reator (MILAN[®] 202) e descarte do efluente (MILAN[®] 626). O controle dos equipamentos (bomba de alimentação, bomba de descarte, agitador e aerador) foi feito por meio de temporizadores (Foxlux[®], 127/220 V, 16A).

Como o objetivo do reator era produzir uma cultura celular enriquecida com BOAs, a estratégias de operação adotadas foram:

a) *Limitação de oxigênio Dissolvido (OD)*: O reator operou em ciclos de 6 h, sendo 5 horas de reação e 1 hora para decantação e descarte. Durante as 5 horas, a cada hora, o reator foi aerado por 15 minutos e deixado em anaerobiose por 45 minutos (Tabela 6). Essa estratégia foi utilizada para limitar a concentração de OD presente para a oxidação da amônia, e reduzir a oxidação de nitrito para nitrato (ZDRADEK, 2005).

b) *Distribuição da alimentação ao longo do ciclo*: Para otimizar a atuação do sistema de tamponamento com bicarbonato, optou-se pela distribuição da alimentação em etapas. A alimentação de cada ciclo subdividida em 4 etapas de alimentação adicionadas ao longo das aerações (4 primeiras horas do ciclo). Essa estratégia permitiu que a alcalinidade e o substrato fossem distribuídos ao longo do ciclo, evitando a ocorrência de períodos sem amônia no final da etapa de reação, o que poderia levar a oxidação do nitrito. Além disso, a adição de alcalinidade em uma única vez pode ocasionar perdas, devido ao arraste de CO₂ pela aeração no início de cada ciclo (BRESSAN *et al.*, 2013). A Tabela 6 apresenta as condições operacionais do Reator Nitritante.

Tabela 6 - Condições operacionais do reator nitritante

Volume	5 L
Vazão	1,0 L.d ⁻¹
TRH	5 dias
[N-NH ₄]	1000 mgN-NH ₄ .L ⁻¹
Carga	200 mgN-NH ₄ .L ⁻¹ .d ⁻¹
* Concentração celular	0,6 – 0,7 g SSV. L ⁻¹
Agitação	Magnética (200 rpm)

*Variável devido à retirada de células

4.1.4 Monitoramento do Reator

Para o monitoramento do reator foram coletadas três amostras periódicas (3 vezes/semana), medindo-se a concentração de nitrogênio nas formas de N-NH_4^+ , N-NO_2^- , N-NO_3^- . O pH foi monitorado com pHmetro portátil (LT Lutron[®] PH221). OD foi mensurado por meio de um oxímetro (Oxi 340/SET, WTW[®]), visando acompanhar a concentração de O_2 durante o ciclo. A concentração de biomassa foi monitorada semanalmente através de análises de sólidos suspensos totais e voláteis (SST e SSV).

4.2 NANOPARTÍCULAS

Para a realização deste trabalho, optou-se pela aquisição de nanopartículas já disponíveis comercialmente. Para tanto, nanopartículas de hematita ($\text{Fe}_2\text{O}_3\text{NP}$) e magnetita ($\text{Fe}_3\text{O}_4\text{NP}$) foram adquiridas a partir do fabricante SkySpring Nanomaterials[®] (Houston, Texas, USA). As especificações fornecidas pelo fabricante são descritas na Tabela 7.

Tabela 7 - Características das NPs, de acordo com o fabricante (SkySpring nanomaterials[®])

Características	$\text{Fe}_2\text{O}_3\text{NP}$	$\text{Fe}_3\text{O}_4\text{NP}$
Diâmetro	20 – 40 nm	20 – 30 nm
Pureza	99%	98%
Aparência	Pó Vermelho	Pó Negro
Morfologia	Esférica	Esférica
Densidade (bulk)	$1,2 \text{ g} \cdot (\text{cm}^3)^{-1}$	$0,84 \text{ g} \cdot (\text{cm}^3)^{-1}$
Densidade (verdadeira)	$5,24 \text{ g} \cdot (\text{cm}^3)^{-1}$	$4,8-5,1 \text{ g} \cdot (\text{cm}^3)^{-1}$
Área superficial	$40-60 \text{ m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$	$40-60 \text{ m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$

4.2.1 Caracterização das Nanopartículas

4.2.1.1 Difração de Raio-X (DRX)

A técnica de difração de raios X (DRX) é versátil e não destrutiva, revelando informações detalhadas sobre a composição química e estrutura cristalográfica das NPs. Nesse trabalho, as análises de DRX foram conduzidas a temperatura ambiente utilizando difratômetro de raios X (Philips X'Pert[®], radiação $\text{CuK}\alpha$ a 40 kV e 30 mA, geometria $\theta - 2\theta$ e $\lambda = 1,54056 \text{ \AA}$). As análises foram realizadas no Laboratório de Materiais pertencente ao Departamento de

Engenharia Mecânica, da Universidade Federal de Santa Catarina (LabMat, UFSC).

Diversas informações podem ser obtidas de difratogramas de materiais cristalinos. Neste trabalho, o tamanho de cristalito foi estimado de acordo com a Equação 9 (SCHERRER, 1918). Para isso, utilizou-se como referência o pico de maior intensidade em 2θ , sendo que os parâmetros ângulo de pico e FWHM foram calculados utilizando o software OriginPro 8.

$$D = \frac{0,9 \lambda}{FWHM \cos\theta} \quad (9)$$

Onde:

D : tamanho médio de cristalito;

$FWHM$: largura dos picos na metade de sua intensidade;

λ : comprimento de onda incidente;

θ : ângulo de incidência em radianos.

4.2.1.2 Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

O método de MET é bastante versátil e um dos mais importantes na caracterização de sistemas nanoestruturados, possibilitando atingir uma resolução capaz de avaliar a rede cristalina dos materiais. Nesse trabalho, a morfologia das NPs foi investigada através de micrografias obtidas por microscópio eletrônico de transmissão (JEOL JEM-1011[®] TEM 100K), sendo as análises realizadas no Laboratório Central de Microscopia Eletrônica da Universidade Federal de Santa Catarina (LCME, UFSC).

Para a obtenção das micrografias, as amostras foram inicialmente diluídas em iso-propanol e ultrassonicadas por 20 minutos. A solução contendo as nanopartículas desagregadas foi gotejada em uma grade (*grid*) de cobre recoberta com película de carbono (modelo CF200-Cu), pelo método de gotejamento. Após 48 horas de secagem à temperatura ambiente, as amostras foram encaminhadas para análise no MET.

4.3 ENSAIOS CINÉTICOS DE ATIVIDADE

4.3.1 Ensaios de Toxicidade Aguda para Nanopartículas de Hematita e Magnetita

Teve como objetivo a verificação do efeito das NPs de Fe_2O_3 e Fe_3O_4 , bem como, a concentração que inibe 50% da atividade (IC_{50}) quando as BOAs são expostas às NPs. Para este ensaio, as BOAs foram expostas a diferentes concentrações de NPs em frascos agitados (150 rpm) em um shaker orbital, com temperatura controlada em $31 \pm 1^\circ\text{C}$. Cada frasco foi inoculado com $0,5\text{g SSV}\cdot\text{L}^{-1}$ de biomassa proveniente do reator nitritante, com um volume útil de 200 mL. O meio nutritivo utilizado para este ensaio foi o mesmo do reator, porém, a concentração de amônia foi de $150\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, assim como a alcalinidade (em termos de bicarbonato de sódio) foi reduzida proporcionalmente.

As concentrações de IONPs testadas ($0,2$ a $1,0\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) foram definidas de acordo com estudos reportados pela literatura. Preparou-se uma solução estoque de $4,0\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de NPs, a qual foi ultrassonicada por 1 hora. E, a partir dessa solução estoque, foram preparadas as soluções de trabalho.

A duração do teste foi definida durante ensaios prévios, acompanhando a degradação do substrato. Durante as cinéticas, realizadas em três repetições, foi acompanhado a formação de nitrito e nitrato. Para isso, uma alíquota de amostra foi coletada em cada reator, em um intervalo de tempo de 2 horas. As amostras foram centrifugadas com frascos com membrana filtrante de celulose regenerada, específicos para centrifugação (Centrifugal Filters Units, Amicon Ultra®), visando remover as nanopartículas das amostras e quantificadas para N-NO_2^- e N-NO_3^- . Análises de Fe solúvel total e sólidos suspensos (SST, SSF, SSV) foram conduzidas ao final dos ensaios.

4.3.2 Velocidade de Produção de Nitrito

As velocidades de produção de nitrito foram calculadas a partir dos dados obtidos nos ensaios cinéticos de atividade. Foram considerados diferentes períodos de tempo, escolhendo a tangente da reta a qual apresentou a maior inclinação, a partir do ponto máximo de produção de N-NO_2^- , conforme a Equação 10.

$$r_{\text{NO}_2^-} = \frac{[N - \text{NO}_2^-]_{t-} - [N - \text{NO}_2^-]_{t_0}}{\Delta t} \quad (10)$$

Onde:

$r_{N-NO_2^-}$: Velocidade de produção de nitrito ($mgN-NO_2L^{-1}.h^{-1}$);

$[N-NO_2^-]_t$: Concentração final de nitrito;

$[N-NO_2^-]_{t_0}$: Concentração inicial de nitrito;

Δt : intervalo de tempo ($t - t_0$).

4.3.3 Inibição

A inibição foi calculada pela análise da velocidade de produção de $N-NO_2^-$, conforme descrito na Equação 11:

(11)

$$Inibição (\%) = \left(\frac{r_{N-NO_2^- contole} - r_{N-NO_2^- amostra}}{r_{N-NO_2^- contole}} \right) \times 100$$

Onde:

$r_{N-NO_2^- contole}$: Velocidade de produção de nitrito da amostra de controle ($mgN-NO_2L^{-1}.h^{-1}$);

$r_{N-NO_2^- amostra}$: Velocidade de produção de nitrito da amostra contendo nanopartículas ($mgN-NO_2L^{-1}.h^{-1}$);

4.3.4 Microscopia Eletrônica de Varredura

Com o intuito de investigar a morfologia das BOAs bem como sua interação com as nanopartículas, foram realizadas análises de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV). As micrografias de foram obtidas pelo microscópio eletrônico de varredura JEOL JSM-6390LV no Laboratório Central de Microscopia Eletrônica da Universidade Federal de Santa Catarina.

O preparo das amostras foi adaptado da metodologia descrita por Ferretti (2009), inicialmente proposta por Nation (1983) e adaptada por Varesche *et al.* (1997) e teve as seguintes etapas descritas na Tabela 10.

Tabela 8 - Etapas de preparo das amostras para realização de MEV.

Etapa	Descrição
Concentração	Centrifugação (15 min, 7,500 rpm) de uma alíquota de amostra, (~10 mL), em tubo falcon de maneira a formar um <i>pallet</i> homogêneo;
Fixação (I)	Adição de solução contendo tampão fosfato 0,1M pH 7,3/ glutaraldeído (97,5:2,5, v/v). Nessa etapa, o volume da solução utilizado foi 5 vezes superior ao volume do <i>pellet</i> de amostra; Após, as amostras foram acondicionadas a 4,0°C, por um período de 12 horas, para a fixação;
Lavagem	Lavagem das amostras com solução tampão fosfato 0,1M pH 7,3, por 3 vezes. Nessa etapa, adotou-se um intervalo de tempo de 30 minutos entre uma lavagem e outra.
Desidratação	Desidratação gradual das amostras em etanol 50, 70, 80, 90, 95%. Nessa etapa, adotou-se um intervalo de tempo de 10 minutos entre uma lavagem e outra. Em seguida, as amostras foram lavadas, por 3 vezes, com etanol 100% (grau PA).
Fixação (II)	Fixação em fita de carbono dupla face e adição hexametildisilazano (HMDS) sobre a amostra fixada
Secagem	Secagem a temperatura de 30°C por, no mínimo, 2 horas.
Metalização	Recobrimento das amostras com ouro.

4.4 DETERMINAÇÕES FÍSICO-QUÍMICAS

4.4.1 Íons Nitrogenados

a) $N-NH_4^+$: Método colorímetro de Nessler ($\lambda=525$ nm), conforme descrito por Vogel (1981);

b) $N-NO_2^-$: Método colorimétrico ($\lambda=585$ nm), utilizando kit analítico Nitriver 2 (Hach[®]);

c) $N-NO_3^-$: Método colorimétrico do ácido salicílico ($\lambda=410$ nm), conforme descrito por Cataldo et al. (1975).

4.4.2 Sólidos

a) *Sólidos suspensos totais (SST)*: foram determinados com o uso de forno micro-ondas, conforme Zdradek (2005).

b) *Sólidos suspensos fixos (SSF) e sólidos suspensos voláteis (SSV)*: foram determinados conforme APHA (1995).

4.4.3 Ferro Solúvel total

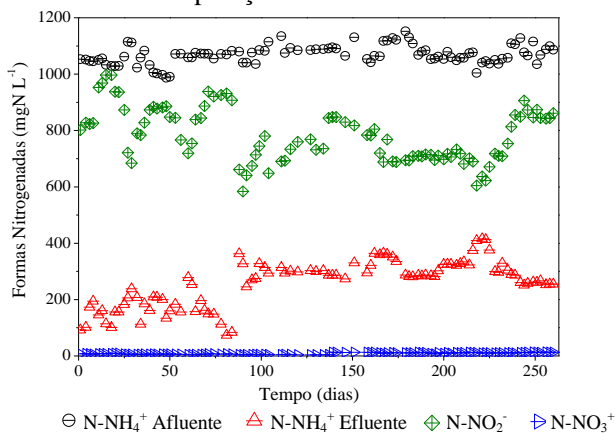
A quantificação de Fe solúvel total foi realizada utilizando o método colorimétrico da 1,10-fenantrolina ($\lambda=510$ nm), utilizando kit analítico FerroVer (Hach[®], Método 8008).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 REATOR NITRITANTE

A operação do reator foi conduzida de forma a evitar o consumo total de N-NH_4^+ durante cada ciclo e de quedas excessivas de pH ao final do ciclo, uma vez que o objetivo deste reator era a produção de biomassa de BOAs sob condições de carga relativamente elevadas, e por consequência, a estabilidade e manutenção da inibição sobre as BON. Conforme Bressan *et al.* (2013), quando ocorre queda excessiva do pH nas fases finais do ciclo e/ou a falta de nitrogênio amoniacal há um aumento das concentrações de oxigênio dissolvido nas horas finais do ciclo. Isso mantém o OD elevado por tempo maior que o previsto pelo padrão de aeração, possibilitando o desenvolvimento das BONs durante estes momentos. A Figura 4 mostra o comportamento das formas nitrogenadas durante o período de operação do reator.

Figura 4 - Concentração das formas nitrogenadas durante o período de operação do reator



Durante a fase anóxica, o nível médio de OD foi de $0,1 \text{ mgOD.L}^{-1}$. Já na fase aerada, os níveis de OD se mantiveram na faixa de $1,5 \text{ mgOD.L}^{-1}$. O pH manteve-se entre 7,6 a 8,2 durante todo o período de operação, faixa considerada ideal para o estabelecimento do processo de nitrificação.

A variação no desempenho do reator em relação à oxidação N-NH_4^+ (Figura 4) não é aqui considerada uma característica negativa, uma vez que o propósito do reator era a produção de células para a realização dos ensaios de atividade. Concentrações excedentes de N-NH_4^+ ao final dos ciclos favorecem a inibição de BON através da aeração intermitente (BRESSAN *et al.*, 2013) . Além disso, muitas destas ocorrências de perda de desempenho no reator foram ocasionadas pela retirada de células, ao passo que foi mantida a mesma carga na alimentação. A estratégia de aeração intermitente demonstrou-se efetiva para manutenção do processo. Operado desta maneira, os níveis de conversão de nitrito a nitrato se mantiveram durante todo o período na ordem de 1% apenas, com conversão de nitrogênio amoniacal média de $75,0 \pm 2,5$ %.

A biomassa obtida no reator pode ser considerada uma comunidade estável e provavelmente diversificada de BOA, adaptadas ao crescimento sob cargas relativamente elevadas de nitrogênio amoniacal ($\sim 200 \text{ mg N-NH}_4^+ \cdot \text{L}^{-1}$), resultantes de um longo período de operação do reator sob a condição de nitrificação parcial. Conforme Bressan *et al.* (2013), a obtenção de um processo estável com idade de lodo avançada, resulta em maior diversidade biológica e estabilidade em termos de composição de espécies se comparado a um lodo com idade reduzida. Essa é uma característica amplamente desejável quando se objetiva uma maior padronização em relação à biomassa utilizada como inóculo para a realização de ensaios cinéticos de atividade.

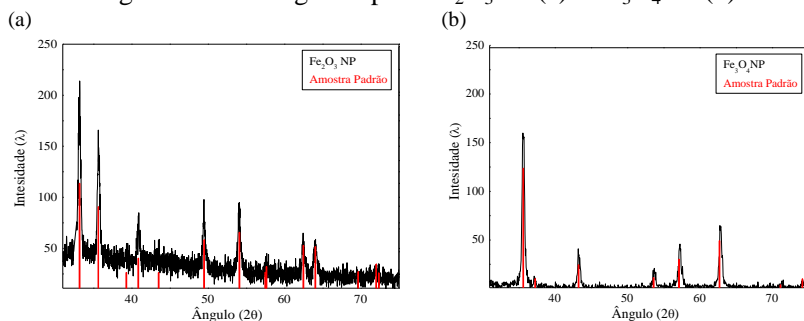
5.2 CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS

A caracterização das NPs é essencial, principalmente quando são conduzidos ensaios toxicológicos, uma vez que os efeitos tóxicos são dependentes de características como propriedades físico-químicas do NM (composição, tamanho, aditivos, área superficial, carga, método de síntese), fatores ambientais, tipo de organismo teste empregado, e métodos experimentais. Além disso, como ainda não há padronização para as metodologias de avaliação da toxicidade quando se trata de NMs, os estudos são controversos e variam de acordo com o tamanho e tipo de revestimento da NPs, bem como o tipo celular estudado (NOGUEIRA *et al.*, 2013).

5.2.1 Difração de Raio-X

A difração de raios X foi utilizada neste trabalho para identificar qualitativamente a composição e as fases cristalinas presentes nas amostras. Os difratogramas das NPs estudadas são apresentados na Figura 5. A comparação dos difratogramas com a base de dados AMCSD - *American Mineralogist Crystal Structure Database* confirma a presença de óxido de ferro nas amostras.

Figura 5 - Difratograma para Fe_2O_3 NP (a) e Fe_3O_4 NP (b)



A Figura 5(a) Fe_2O_3 NP apresentou estrutura amorfa, comparada com a Fe_3O_4 NP (Figura 5(b)), a qual apresentou estrutura cristalina. O tamanho de cristalito foi estimado de acordo com a Equação de Scherrer (Equação 9), utilizando como referência o pico de maior intensidade em 2θ . Os parâmetros ângulo do pico e FWHM foram calculados utilizando o software OriginPro8 e os resultados são apresentados na Tabela 11.

Tabela 9 - Tamanho do cristalino, de acordo com a Equação de Scherrer

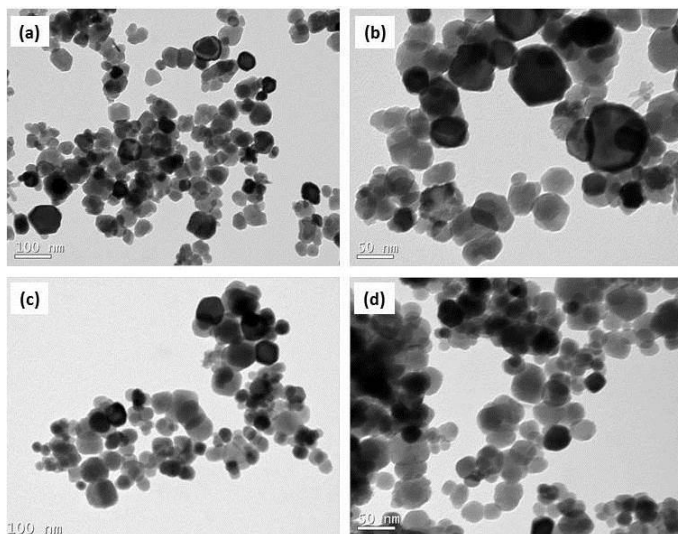
Nanopartícula	FWHM	Ângulo (2θ)	Diâmetro (nm)
Fe_2O_3	33,21	0,42	19,52
Fe_3O_4	35,63	0,41	20,30

5.2.2 Microscopia Eletrônica de Transmissão

A morfologia e o tamanho das nanopartículas foi esclarecida pelas microfotografias obtidas no MET. A partir da Figura 6 nota-se que as partículas apresentam formato esférico, estando em acordo com

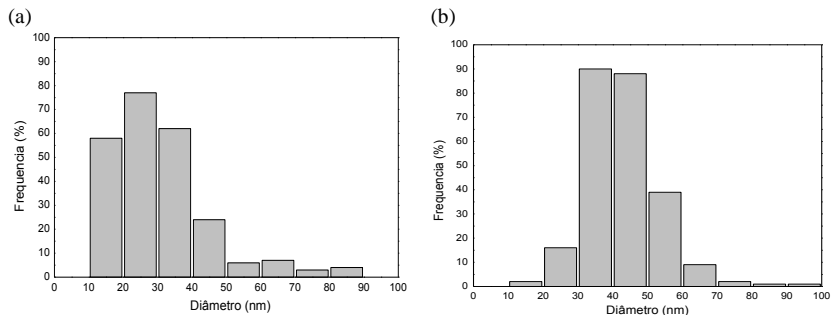
as especificações fornecidas pelo fabricante. Além disso, as imagens mostram a ocorrência do efeito de agregação das partículas. Esse efeito já foi reportado em trabalhos prévios, tal como o realizado por Zhu et al.(2012) Chen *et al.* (2013) e pode ser função da concentração de NPs em solução, ou seja, com o aumento da concentração da solução de NPs, mais agregadas elas se tornam e por consequência, maior será a velocidade de sedimentação.

Figura 6 - Micrografias de MET, onde: (a) e (b) $\text{Fe}_2\text{O}_3\text{NP}$ (c) e (d) $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{NP}$



A partir das imagens de MET, a distribuição do tamanho das NPs foi mensurada. Os histogramas (Figura 7) mostram uma frequência de distribuição de tamanho entre 20-30 nm em torno de 80% para a $\text{Fe}_2\text{O}_3\text{NP}$ (Figura 7a). Já para a $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{NP}$ uma frequência de distribuição de tamanho entre 30-50 nm em torno de 85-90% (Figura 7b). O diâmetro médio encontrado para as partículas foi de aproximadamente 29,89 nm ($\text{Fe}_2\text{O}_3\text{NP}$) e 40,43 nm ($\text{Fe}_3\text{O}_4\text{NP}$).

Figura 7 - Distribuição do tamanho das nanopartículas: (a) $\text{Fe}_2\text{O}_3\text{ NP}$ e (b) $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{ NP}$



5.3 ENSAIOS CINÉTICOS DE ATIVIDADE

A presença de NPs em estações de tratamento de efluentes pode causar a inibição de algumas espécies de bactérias responsáveis pela etapa de tratamento biológico, tal como aquelas presente em lodos ativados, resultando na perda da eficiência do processo (WANG *et al.*, 2012).

Nanomateriais a base de óxidos de ferro e zinco, juntamente como o dióxido de titânio, representam o grupo com maiores emissões reportadas no solo, água e ar (KELLER *et al.*, 2010). Nesse trabalho, visando avaliar o impacto das IONPs, as BOA foram expostas a diferentes concentrações de IONPs e avaliada em relação à sua cinética de nitrificação. Como a biomassa era essencialmente composta por BOA, com rara ocorrência de BON, a formação de nitrato em todos os experimentos foi inexpressiva durante os ensaios, ficando abaixo do limite de detecção. De modo a avaliar o impacto das NPs, ao longo da cinética foi monitorada a formação de $N-NO_2^-$, produto da oxidação de $N-NH_4^+$.

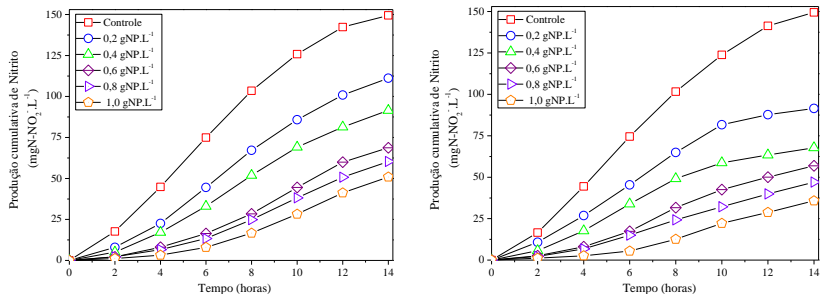
5.3.1 Exposição das BOAs às Nanopartículas

A influência de Fe_2O_3 NPs e Fe_3O_4 NPs sobre a atividade de bactérias oxidadoras de amônia foi avaliada após 14 h de exposição. O acúmulo de $N-NO_2^-$ ($mg.L^{-1}$) em função da concentração de Fe_2O_3 NP ($g.L^{-1}$) estudada é mostrado na Figura 8.

Figura 8 - Acúmulo de nitrito em função da concentração de Fe_2O_3 NP (a) e Fe_3O_4 NP (b) realizado com BOAs

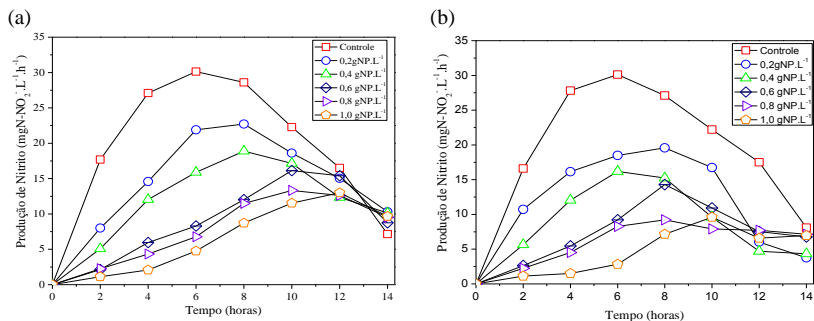
(a)

(b)



Para o cálculo das velocidades de produção de N-NO_2^- , considerou-se diferentes períodos de tempo, dependendo de onde se localiza a tangente com maior inclinação de cada curva, considerando o ponto máximo de produção de N-NO_2^- , de acordo com a Figura 9.

Figura 9 - Produção N-NO_2^- em ao longo do tempo em função concentração de Fe_2O_3 NP (a) e Fe_3O_4 NP (b) realizado com BOAs.



Conforme pode ser observado na Figura 9, não houve fase lag para os ensaios avaliados (controle e amostras contendo NPs). O que ocorreu foi uma redução da velocidade de formação de nitrito desde o início do ensaio, retardando o período que se deu a fase exponencial, com concomitante diminuição da concentração máxima de nitrito produzido.

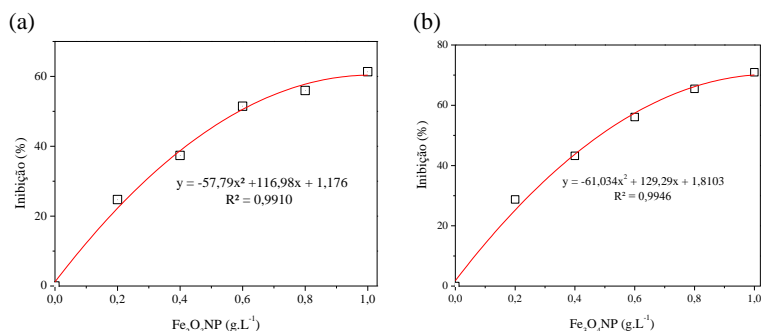
Para a amostra controle, o ponto máximo de produção de N-NO_2^- foi observado após um período de 6 horas ($30,12 \text{ mg N-NO}_2^- \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$). Em relação às amostras expostas às Fe_2O_3 NPs (Figura 9a), aquelas que continham 0,2 e 0,4 $\text{gFe}_2\text{O}_3 \cdot \text{NP} \cdot \text{L}^{-1}$ apresentaram um ponto máximo de produção de N-NO_2^- após um período de 8 horas de incubação, sendo de 22,72 e 18,88 $\text{mgN-NO}_2^- \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$, respectivamente. Já as amostras que

continham 0,6 e 0,8 gFe₂O₃NP.L⁻¹ apresentaram ponto máximo de produção de N-NO₂⁻ de 16, 22 e 13,32 mg N-NO₂⁻.L⁻¹, respectivamente, após um período de 10 horas de incubação. Já a amostra que continha 1,0 gFe₂O₃NP.L⁻¹ o ponto máximo de produção de N-NO₂⁻ foi observado após um período de 12 horas de incubação (13,00 mg N-NO₂⁻.L⁻¹).

Quanto às amostras expostas às Fe₃O₄NPs (Figura 9b), aquelas que continham 0,2, 0,6 e 0,8 g Fe₃O₄NP.L⁻¹ apresentaram o ponto máximo de produção de N-NO₂⁻ após um período de 8 horas de incubação, sendo de 19,58, 14,30 e 9,22 mg N-NO₂⁻.L⁻¹, respectivamente. Para a amostra que continha concentração de 0,4 g Fe₃O₄NP.L⁻¹, o ponto máximo de produção de N-NO₂⁻ foi observado após um período de 6 horas de incubação, sendo de 16,18 mg N-NO₂⁻.L⁻¹. Já a amostra que continha 1,0 g Fe₃O₄NP.L⁻¹ a máxima de produção de N-NO₂⁻ foi observada após um período de 10 horas de incubação (9,60 mg N-NO₂⁻.L⁻¹).

Para modelagem dos dados, utilizou-se o polinômio de 2ª ordem, a partir do qual foi possível estimar a concentração necessária para reduzir em 50% a atividade celular (KI₅₀). Através da equação do modelo ajustado (Figura 10), o coeficiente de inibição KI₅₀ da Fe₂O₃NP foi estimado em 0,580 g.L⁻¹. Enquanto a Fe₃O₄NP apresentou KI₅₀ estimado em 0,483 g.L⁻¹.

Figura 10 - Correlação entre a redução da velocidade de produção de N-NO₂⁻ e a concentração de Fe₂O₃ NP (a) e Fe₃O₄ NP (b).



Com o aumento da concentração de Fe₂O₃ NPs, de 0,2 para 1,0 g.L⁻¹ observou-se um decréscimo de 24,74 % ($\mu = 22,10 \pm 0,4$ mgN-NO₂. gSSV⁻¹.h⁻¹) para 61,33 % ($\mu = 11,35 \pm 0,3$ mgN-NO₂. gSSV⁻¹.h⁻¹) na velocidade específica de produção de N-NO₂⁻. O coeficiente de

determinação foi de 0,991 onde apenas 0,9% desta variação não pode ser explicada, sugerindo uma forte eficiência na predição da inibição pelas NPs.

Para as Fe_3O_4 NPs, com o aumento da concentração de 0,2 para $1,0 \text{ g.L}^{-1}$ observou-se um decréscimo de 28,74 % ($\mu = 19,67 \pm 0,5 \text{ mgN-NO}_2 \cdot \text{gSSV}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$) para 70,94 % ($\mu = 8,32 \pm 0,2 \text{ mgN-NO}_2 \cdot \text{gSSV}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$) na velocidade específica de produção de N-NO_2 (Tabela 12). O coeficiente de determinação foi de 0,994 onde apenas 0,6% desta variação não pode ser explicada, sugerindo uma forte eficiência na predição da inibição pelas NPs.

Tabela 10 - Percentuais médios de inibição encontrados nos experimentos de toxicidade aguda para as IONPs estudadas

Tipo de NP	Concentração de NP (g.L^{-1})	Velocidade específica de produção de N-NO_2 ($\text{mg N-NO}_2 \cdot \text{gSSV}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$)	Inibição (%)	Conversão de N (%)
-	Controle	$29,3 \pm 0,5$	-	$99,6 \pm 0,2$
Fe_2O_3	0,2	$22,1 \pm 0,4$	$24,7 \pm 0,9$	$74,1 \pm 0,1$
	0,4	$18,8 \pm 0,4$	$37,4 \pm 0,8$	$61,0 \pm 0,2$
	0,6	$14,2 \pm 0,6$	$51,5 \pm 0,6$	$45,8 \pm 0,4$
	0,8	$12,9 \pm 0,3$	$55,9 \pm 0,7$	$40,2 \pm 0,1$
	1,0	$11,3 \pm 0,3$	$61,3 \pm 1,0$	$33,9 \pm 0,1$
Fe_2O_3	0,2	$19,6 \pm 0,5$	$28,7 \pm 0,3$	$61,0 \pm 0,1$
	0,4	$16,8 \pm 0,4$	$43,2 \pm 1,2$	$45,1 \pm 0,1$
	0,6	$13,7 \pm 0,6$	$56,1 \pm 0,8$	$37,9 \pm 0,1$
	0,8	$11,0 \pm 0,3$	$65,4 \pm 0,9$	$31,3 \pm 0,9$
	1,0	$8,3 \pm 0,2$	$70,9 \pm 1,1$	$23,8 \pm 0,4$

Em estudo realizado por Ni *et al.* (2013), os autores avaliaram o efeito de Fe_2O_3 NPs no desempenho de um reator de lodos ativados operando em batelada sequencial em escala de laboratório. Em ensaios de exposição de curto prazo (sete dias), os autores relataram que as NPs impactaram negativamente no processo. Com choques de carga de 0,05 a $0,2 \text{ g.L}^{-1}$ ficou evidenciado um decréscimo de eficiência na remoção de N total de 6,3 % a 24%, respectivamente, comparado ao controle (72,4%), indicando inibição da atividade microbiana. Nesse trabalho 99,6% do N-NH_4^+ foi convertido em N-NO_2^- para a amostra controle. No entanto, houve uma redução significativa nessa conversão para as

amostras que continham $\text{Fe}_2\text{O}_3\text{NPs}$, sendo que na maior concentração estudada ($1,0 \text{ g.L}^{-1}$) a conversão de N-NH_4^+ em N-NO_2^- foi de apenas 33,9%. Ainda, nota-se que na presença de $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{NPs}$, a conversão de N-NH_4^+ em N-NO_2^- também foi prejudicada, sendo que na maior concentração de $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{NPs}$ estudada ($1,0 \text{ g.L}^{-1}$) apenas 23,8% do substrato adicionado foi convertido em N-NO_2^- (Tabela 12).

Nanopartículas de ferro têm sido associadas a efeitos tóxicos (GOMAA *et al.*, 2013; TROUILLER *et al.*, 2009), sendo que os principais mecanismos da toxicidade estão relacionados ao recobrimento físico das células bacterianas, o rompimento da membrana celular e a geração de ROS oxigênio (BARNES *et al.*, 2010b). $\text{Fe}_2\text{O}_3\text{NP}$ apresentou menor toxicidade em relação a Fe_3O_4 . Enquanto o KI_{50} calculado para a $\text{Fe}_2\text{O}_3\text{NP}$ foi equivalente a $0,579 \text{ g.L}^{-1}$, a $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{NP}$ apresentou um valor de KI_{50} 20% superior, sendo equivalente a $0,483 \text{ g.L}^{-1}$. A explicação para isso provavelmente é devido ao estado de oxidação que se encontra o ferro. As $\text{Fe}_2\text{O}_3\text{NPs}$ são compostas somente por Fe^{3+} (último estado de oxidação do Fe e, portanto, o mais estável), $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{NP}$ são compostas por íons de Fe^{2+} e Fe^{3+} (estado de oxidação intermediário). Philips *et al.* (2003) observaram perdas na atividade de nitrificação na presença de sais de Fe^{2+} e Fe^{3+} , impactando negativamente na estrutura dos flocos biológicos. Em processos de oxidação química e/ou biológica, quando o Fe^{2+} reage com o NO_2^- pode ocorrer a formação de óxido nítrico (NO), o qual apresenta um potencial efeito bacteriostático e pode desse modo, intensificar a toxicidade do Fe (MORAGHAN & BURESH, 1977; BRONS *et al.*, 1991; PHILIPS *et al.*, 2003).

A partir da Figura 10 pode-se inferir que os efeitos inibitórios aumentam, com o aumento da concentração de NP, contudo há uma relação dose-resposta não linear. Essa relação é observada para a toxicidade da maioria das substâncias: em doses pequenas, não são observados impactos adversos quando a mesma substância excede certo limite, ocorrem impactos adversos negativos. Ainda, conforme Bressan *et al.* (2013) essa relação não linear também pode ser resultado do fato de ter sido utilizada uma cultura mista de microrganismos. Neste caso, as inúmeras espécies que compõem a biomassa podem apresentar diferentes sensibilidades as NPs, distorcendo a linearidade da faixa de inibição.

No estudo conduzido por Diao & Yao (2009), a toxicidade da Fe^0NP sobre culturas *B. Subtilis* e *P. Fluorescens* foi atribuída pelo fato

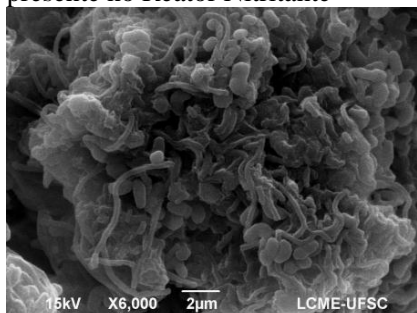
de as NPs bloquearem os poros da membrana externa e, conseqüentemente, a entrada de nutrientes, uma vez que permaneceram adsorvidas à superfície das células. Os autores Kafayati *et al.* (2013) avaliaram o efeito de $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{NPs}$ sobre o crescimento de uma cultura geneticamente modificada de *P. aeruginosa* (PTSOX 4). Os resultados obtidos mostram que as bactérias não apresentaram crescimento na presença de concentrações de NP superiores a 5000 ppm. Isso pode ser explicado devido à saturação das células bacterianas com a $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{NP}$ e aumento do contato da NP com a membrana celular, danificando a mesma.

5.3.2 Presença de NPs no lodo e possíveis implicações

Em sistemas biológicos de tratamento de efluentes, o lodo gerado (biomassa) é composto por um conjunto de células vivas e inativas, detritos orgânicos e inorgânicos, precipitados inorgânicos, material orgânico adsorvido e outros materiais de origem não biológica. Estudos têm mostrado que os NMs interagem e se anexam à superfície das células bacterianas, bem como, na biomassa de águas residuais (WESTERHOFF *et al.*, 2013).

Com o objetivo de investigar a morfologia dos flocos bacterianos e de avaliar qualitativamente a exposição das NPs sobre a as células de BOA, experimentos de MEV foram conduzidos (Figura 11).

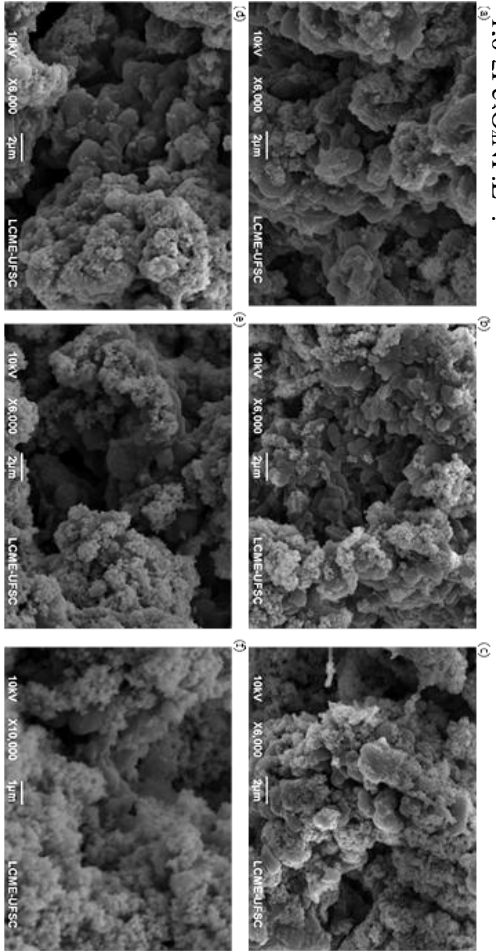
Figura 11 - Comunidade bacteriana presente no Reator Nitritante



A Figura 11 mostra a coexistência de bactérias filamentosas e não filamentosas nos grânulos. Conforme Ferretti (2009), pelo fato dos flocos bacterianos apresentarem uma estrutura maior e mais compacta, muitas vezes, são esperadas limitações de transferência de massa, proporcionando a existência de camadas internas que favorecem o

estabelecimento e a interação de determinados consórcios bacterianos. Um exemplo típico seria o caso de grânulos aeróbios, onde podem ocorrer simultaneamente os processos de nitrificação e desnitrificação.

Figura 12 - Imagens de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), onde: (a), (b), (c): exposição a 0,2, 0,6 e 1,0 $\text{gFe}_2\text{O}_3\text{NP.L}^{-1}$; (d), (e), (f): exposição a 0,2, 0,6 e 1,0 $\text{gFe}_3\text{O}_4\text{NP.L}^{-1}$.



A adição de IONPs ao meio de cultura (Figuras 12) resultou na formação de agregados que sedimentaram facilmente através da coluna d'água, permanecendo aderidos à biomassa ao invés de se manterem suspensos.

O fenômeno de agregação e sedimentação já foi previamente reportado (ZHU *et al.*, 2012) e é similar ao que ocorre com outras NPs, incluindo Cu, Ag, TiO_2 , ZnO, Al_2O_3 e fulerenos (ZHANG *et al.*, 2012). Esse fenômeno pode ser explicado devido às interações eletrostáticas que ocorrem entre as NPs e a membrana

celular bacteriana e/ou proteínas da membrana celular, podendo resultar em injúrias na parede celular, o que pode conduzir à morte das células bacterianas. Ainda, a formação de agregados foi mais pronunciada com o aumento da concentração de NP no meio e provavelmente decorre da maior probabilidade de colisões de partículas (BAALOUSHA, 2009). As concentrações de Fe solúvel observadas no efluente, após 14 h de exposição às NPs de Fe_2O_3 e Fe_3O_4 são apresentadas na Tabela 14.

Tabela 11 - Concentração de Ferro solúvel total após período de exposição de 14 horas

Concentração de NP (g.L ⁻¹)	Ferro Solúvel Total (mgFe.L ⁻¹)	
	Fe ₂ O ₃ NP	Fe ₃ O ₄ NP
0,2	0,037± 0,01	0,045± 0,01
0,4	0,037± 0,01	0,045± 0,02
0,6	0,037± 0,02	0,045± 0,01
0,8	0,045± 0,02	0,047± 0,01
1,0	0,045± 0,01	0,047± 0,02

A partir dos resultados mostrados Tabela 14 fica evidente que a liberação de Fe solúvel foi muito baixa. No trabalho realizado por Hwang *et al.* (2011) os autores avaliaram o efeito de IONPs revestidas com surfactantes sobre a qualidade de efluente de um SBR simulando tratamento secundário de águas residuais. Os resultados mostraram que 8,7% das NPs aplicadas permaneceram no efluente e que a presença de NPs influenciou negativamente na qualidade do efluente em relação aos parâmetros de DQO, turbidez e cor aparente. Tiede *et al.* (2010) avaliaram o comportamento de NP de prata em lodo ativado. Após 6 h de agitação e 30 min de sedimentação os autores observaram que mais de 90% das NPs encontravam-se presentes no lodo ativado. Isso implica que as NPs podem ser inseridas no meio ambiente através do lançamento de águas residuais.

Estudo realizado por Keller *et al.* (2010) mostra que as estações de tratamento de efluentes aparecem como uma rota intermediária para a entrada de alguns NMs no solo ou água. Segundo esses autores entre 17-34% dos NMs produzidos passam por esses sistemas. Desse montante, entre 3-25% serão liberados nos corpos hídricos via efluente tratado e entre 44-47% no solo, via biosólidos. Esses dados são relevantes, pois, estando incorporadas no lodo, as NPs podem atingir o meio ambiente (YANG *et al.*, 2014, HENNEBERT *et al.*, 2013). Isso ocorre em função dos métodos de destino final de lodo: reuso como fertilizante de solos, disposição em aterros sanitários ou incineração (BLASER *et al.*, 2008; BRAR *et al.*, 2010). Se aplicadas no solo, as NPs podem ser transportadas juntamente com a água utilizada em sistemas de irrigação ou permanecerem adsorvidas no solo (WESTERHOFF *et al.*, 2013).

O trabalho realizado por Yang *et al.* (2012) mostrou que minhocas ingerem NPs de Cu presentes no solo, indicando que NPs presentes no solo podem entrar na cadeia alimentar. A disposição do

lodo em aterros sanitários pode resultar em contaminação do solo e águas subterrâneas através geração de lixiviados. A incineração, por outro lado, parece ser a técnica que representa menor risco de exposição (BLASER *et al.*, 2008). Walser *et al.* (2012) analisaram biosólido contendo NP de CeO₂ após incineração. Os autores relataram que esse NM não foi liberado para atmosfera, contudo, foi recuperado nos resíduos, que geralmente são dispostos em aterros sanitários, após esse processo.

Também, deve ser aqui considerado, que após a entrada no ambiente, as NPs podem sofrer uma variedade de modificações de suas propriedades, as quais influenciam no seu comportamento no meio ambiente como transporte, destino e potencial de toxicidade. Essas modificações precisam ser consideradas durante avaliação do grau de impacto ambiental que esses NMs podem causar.

CONCLUSÕES

A liberação dos nanomateriais no ambiente tende a ser inevitável e ainda se sabe muito pouco sobre os efeitos relacionados biodisponibilidade, biodegradabilidade e toxicidade.

Neste trabalho uma cultura mista de bactérias oxidadoras de amônia (BOAs) foi exposta a diferentes concentrações de IONPs (magnetita e hematita), evidenciando que há uma diminuição na atividade das BOAs na presença de elevadas quantidades dessas nanopartículas.

Os testes de inibição mostraram que as BOAs apresentaram baixa sensibilidade as NPs avaliadas, apresentando nos experimentos valores de KI_{50} equivalente a $0,579 \text{ g.L}^{-1}$, para a $\text{Fe}_2\text{O}_3\text{NP}$ e $0,483 \text{ g.L}^{-1}$ para $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{NP}$, respectivamente. As NPs formaram agregados com a biomassa bacteriana e as concentrações de Fe solúvel no meio líquido foram baixas.

Cabe destacar que, até este momento, são poucos os estudos que avaliaram os efeitos de nanopartículas de hematita e magnetita sobre as comunidades de BOAs.

SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Avaliação da toxicidade crônica das nanopartículas de hematita e magnetita sobre as BOAs.

Análise das variações ocasionadas na população microbiana (biodiversidade, desenvolvimento de resistência, etc.) em função da exposição prolongada às IONPs.

Verificação da capacidade de adsorção das IONPs aos biosólidos para melhor entendimento dos possíveis mecanismos de remoção da mesma nos sistemas de tratamento;

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGÊNCIA BRASILEIRA DE DESENVOLVIMENTO INDUSTRIAL (ABDI). **Nanotecnologias**: subsídios para a problemática dos riscos e regulação. Centro de Gestão e Estudos Estratégicos. Brasília, 2011, 52 p.

ABDI. Relatório de Acompanhamento Setorial - Nanotecnologia na área da saúde: mercado, segurança e regulação, 2013, 50 p.

AHN, J. H.; YU, R.; CHANDRAN, K. Distinctive Microbial Ecology and Biokinetics of Autotrophic Ammonia and Nitrite Oxidation in a Partial Nitrification Bioreactor. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 100, n° 6, 2008.

ALITO, C.L.; GUNSCH, C.K. Assessing the effects of silver nanoparticles on biological nutrient removal in bench-scale activated sludge sequencing batch reactors. **Environmental Science & Technology**, v. 48, p. 970-976, 2014.

AMERICAN MINERALOGIST CRYSTAL STRUCTURE DATABASE (AMCSD). Disponível em: <http://ruff.geo.arizona.edu/AMS/amcsd.php>. Acesso: 02/02/2015

AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION (APHA). **Standard methods for the examination of water and wastewater**. 22 ed. Washington, DC: American Public Health Association, 2012.

ANTHONISEN, A. C.; LOEHR R.C.; PRAKASAM, T. B. S.; SRINATH, E. G. Inhibition of nitrification by ammonia and nitrous acid. **Journal of the Water Pollution Control Federation**, v. 48, p.835-852, 1976.

APTE, S.C.; ROGERS, N.T.; BATLEY, G.E. Ecotoxicology of manufactured nanomaterials. **In**: LEAD, J.R.; SMITH, E. (eds). Environmental and human health effects of nanotechnology. John Wiley and Sons, Chichester, p. 267-305, 2009.

ARCURI, A.S.A. Nanotecnologia e segurança do trabalho: impactos toxicológicos e psicológicos (Entrevista). Instituto Humanitas Unisinos. Quarta, 22 de outubro de 2014.

ARNAOUT, C.L.; GUNSCH, C.K. Impacts of silver nanoparticle coating on the nitrification potential of *Nitrosomonas europaea*. **Environmental Science & Technology**, v. 46, p. 5387-5395, 2012.

AUFFAN, M.; ACHOUAK, W.; ROSE, J.; RONCATO, M.-A.; CHANEAC, C.; WAITE, D.T.; MASON, A.; WOICIK, J.C.; WIESNER, M.R.; BOTTERO, J.-V. Relation between the redox state of iron-based nanoparticles and their cytotoxicity toward *Escherichia coli*. **Environmental Science & Technology**, v. 42, p. 6730-6735, 2008.

AZAM, A.; AHMED, A.S.; OVES, M.; KHAN, M.S.; HABIB, S.S.; MEMIC, A. Antimicrobial activity of metal oxide nanoparticles against Gram-positive and Gram-negative bacteria: a comparative study. **International Journal of Nanomedicine**, v.7, p. 6003-6009, 2012.

BAALOUSHA, M. 2009. Aggregation and disaggregation of iron oxide nanoparticles: Influence of particle concentration, pH and natural organic matter. **Science of the Total Environment**, v. 407, p. 2093-2101, 2009.

BAALOUSHA, M. & LEAD, J.R. **Overview of nanoscience in the environment**. In: LEAD, J.R. & SMITH, E. Environmental and Human Health Impacts of Nanotechnology, Wiley & Sons, Ltd, Chichester, 2009.

BARNES, R.J.; VAN DER GAST, C.J.; RIBA, O.; LEHTOVIRTA, L.E.; PROSSER, J.I.; DOBSON, P.J.; THOMPSON, I.P. The impact of zero-valent iron nanoparticles on a river water bacterial community. **Journal of Hazardous Materials**, v. 184, p.73-80, 2010a.

BARNES, R.J.; RIBA, O.; GARDNER, M.N.; SINGER, A.C.; JACKMAN, S.A.; THOMPSON, I.P. Inhibition of biological TCE and sulphate reduction in the presence of iron nanoparticles. **Chemosphere**, v. 80, p. 554-562, 2010b.

BAUMANN, J.; KÖSER, J.; ARNDT, D.; FILSER, J. The coating makes the difference: Acute effects of iron oxide nanoparticles on *Daphnia magna*. **Science of the Total Environment**, v. 484, p.176-184, 2014.

BENGTSSON, G.; FRONAEUS, S.; BENGTSSON-KLOO, L. The kinetics and mechanism of oxidation of hydroxylamine by iron(III). **Journal of the Chemical Society**, p. 2548-2552, 2002.

BERNET, N. & SPÉRANDIO, M. Principles of nitrifying processes. In: Environmental Technologies to Treat Nitrogen Pollution: Principle and Engineering. IWA Publishing. London, UK, 2009.

BHARDE, A.A.; PARIKH, R.Y.; BAIDAKOVA, M.; JOUEN, S.; HANNOYER, B.; ENOKI, T.; PRASAD, B.L.; SHOUCHE, Y.S.; OGALE, S.; SASTRY, M. Bacteria-mediated precursor-dependent biosynthesis of superparamagnetic iron oxide and iron sulfide nanoparticles. **Langmuir**, v. 24, p. 5787-5794, 2008.

BHUSHAN, B. Introduction to Nanotechnology. In: Springer Handbook of Nanotechnology, Bhushan, B., Ed. Springer Berlin Heidelberg, p. 1-13. 2010.

BITTON, G. **Wastewater Microbiology**. John Wiley & Sons, 2005, 765 p.

BLASER, S.A.; SCHERINGER, M.; MACLEOD, M.; HUNGERBÜHLER, K. Estimation of cumulative aquatic exposure and risk due to silver: Contribution of

nano-functionalized plastics and textiles. **Science of the Total Environment**, v. 390, p. 396-409, 2008.

BOMATÍ-MIGUEL, O.; MAZEINA, L.; NAVROTSKY, A.; VEINTEMILLAS-VERDAGUER, S. Calorimetric Study of Maghemite Nanoparticles Synthesized by Laser-Induced Pyrolysis. **Chemistry of Materials**, v.20, 591-598, 2008.

BORSCHIVER, S.; GUIMARÃES, M.O.C.; DOS SANTOS, T.N.; DA SILVA, F.C.; BRUM, P.R.C. Patenteamento em nanotecnologia: estudo do setor de materiais poliméricos nanoestruturados. **Polímeros**, v. 15, n°4, p. 245-248, 2005.

BORTOLI, M. Partida, operação e otimização de um sistema de nitrificação/desnitrificação visando à remoção de nitrogênio de efluente da suinocultura pelo processo Ludzack-Ettinger modificado. Dissertação de Mestrado. departamento de Engenharia Química e de Alimentos. Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, 2010.

BOULDIN, J.L.; INGLE, T.M.; SENGUPTA, A.; ALEXANDER, R.; HANNIGAN, R.E.; BUCHANAN, R.A. Aqueous toxicity and food chain transfer of quantum dots in freshwater algae and *Ceriodaphnia dubia*. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 27, p.1958-1963, 2008.

BOWEN, R.B.; DEMPSEY, B.A. Improved performance of activated sludge without addition of inorganic solids. **Water Science and Technology**, v. 26, p. 2511-2514, 1992.

BRAR, S.K.; VERMA, M.; TYAGI, R.D.; SURAMPALLI, R.Y. Engineered nanoparticles in wastewater and wastewater sludge - Evidence and impacts. **Waste Management**, v. 30, p. 504-520, 2010.

BRASIL. Projeto de Lei n° 5.133/2013. Regulamenta a rotulagem de produtos da nanotecnologia e de produtos que fazem uso da nanotecnologia. Disponível em: <http://www.camara.gov.br/proposicoesWeb/fichadetramitacao?idProposicao=567257>. Acesso em: nov./2014.

BRESSAN, C.R.; KUNZ, A.; SCHMIDELL, W.; SOARES, H.M. Toxicity of the Colistin Sulfate Antibiotic Used in Animal Farming to Mixed Cultures of Nitrifying Organisms. **Water, Air, & Soil Pollution**, v. 224, p. 1-9, 2013.

BRUNNER, T.J.; WICK, P.; MANSER, P.; SPOHN, P.; GRASS, R.N. In vitro cytotoxicity of oxide nanoparticles: comparison to asbestos, silica and the effect of particle solubility. **Environmental Science and Technology**, v.40, p. 4374-438, 2006.

BRONS, H.J.; HAGEN, W.R.; ZEHNDER, A.J.B. Ferrous iron dependent nitric oxide production in nitrate reducing cultures of *Escherichia coli*. **Archea Microbiology**, v. 155, p.341–347, 1991.

BORSCHIVER, S.; GUIMARÃES, M.J.O.C.; DOS SANTOS, T.N.; DA SILVA, F.C.; BRUM, P.R.C. Patenteamento em nanotecnologia: estudo do setor de materiais poliméricos nanoestruturados. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 15, p. 245-248, 2005.

CABRERA, L.; GUTIERREZ, S.; MENENDEZB N.; MORALES, M.P.; HERRASTI, P. Magnetite nanoparticles: Electrochemical synthesis and characterization. **Electrochimica Acta**, v. 53, 3436-3441, 2008.

CADIOLI, L.P & SALLA, L.D. Nanotecnologia: um estudo sobre seu histórico, definição e principais aplicações desta inovadora tecnologia. **Revista de Ciências Exatas e Tecnologia**, v.1, p.98-105, 2006.

CAMPOS, J. L., GARRIDO-FERNÁNDEZ, J. M., MÉNDEZ R. e LEMA J. M. Nitrification at high ammonia loading rates in an activated sludge unit. **Bioresource Technology**, v.68, p. 141-148, 1999.

CANFIELD, D.E.; GLAZER, A.N. E FALKOWSKI, P.G. The evolution and future of Earth's nitrogen cycle. **Science**, v. 330, p. 192–96, 2010.

CARUCCI, A.; CAPPAL, G. e PIREDDA, M. Biodegradability and toxicity of pharmaceuticals in biological wastewater treatment plants. **Journal of Environmental Science and Health Part a-Toxic/Hazardous Substances & Environmental Engineering.**, v.41, p.1831-1842, 2006.

CARTER, J.L.; MCKINNEY, R.E. 1973. Effects of iron on activated sludge treatment. **Journal of the Environmental Engineering Division**, v. 99, p. 135-152, 1973.

CATALDO, D. A.; HAROON, M.; SCHRADER, L. E.; YOUNGS, V. L. Rapid colorimetric determination of nitrate in plant tissue by nitration of salicylic acid. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, v. 6, p.71-80, 1975.

CHAIN, P.; LAMERDIN, J.; LARIMER, F.; REGALA, W.; LAO, V.; LAND, M.; HAUSER L.; HOOPER, A.; KLOTZ, M.; NORTON, J.; SAYAVEDRA-SOTO, L.; ARCIERO, D.; HOMMES, N.; WHITTAKER, M.; ARP, D. Complete Genome Sequence of the Ammonia-Oxidizing Bacterium and Obligate Chemolithoautotroph *Nitrosomonas europaea*. **Journal of Bacteriology**, v. 185, p. 2759–2773, 2003.

CHAMNOGPOL, S.; DODSON, W.; CROMIE, M.J.; HARRIS, Z.L.; GROISMAN, E. A. Fe (III) mediated cellular toxicity. **Molecular Microbiology**, v.45, p. 711-719, 2002.

CHANDRAN, K.; STEIN, L. Y.; KLOTZ, M. G. e VAN LOOSDRECHT, M. C.M. Nitrous oxide production by lithotrophic ammonia-oxidizing bacteria and implications for engineered nitrogen-removal systems. **Biochemical Society Transactions**, v.39, p. 1832-1837, 2011.

CHAO, T.-C.; BUHRMESTER, J.; HANSMEIER, N.; PÜHLER, A.; WEIDNER, S. Role of the regulatory gene *rirA* in the transcriptional response of *Sinorhizobium meliloti* to iron limitation. **Applied and environmental microbiology**, v. 71, p. 5969-5982, 2005.

CHAUGHULE, R.S.; PURUSHOTHAM, S.; RAMANUJAN, R.V. Magnetic nanoparticles as contrast agents for magnetic resonance imaging. **In: Proceedings of the National Academy of Sciences, India Section A: Physical Sciences**, v. 82, p. 257-268, 2012.

CHEN, P.J.; TAN, S.W.; WU, W.L. Stabilization or oxidation of nanoscale zerovalent iron at environmentally relevant exposure changes bioavailability and toxicity in medaka fish. **Environmental Science & Technology**, v.46, p. 8431-8439, 2012.

CHEN, P.-J.; WU, W.-L.; WU, K.C.-W. The zerovalent iron nanoparticle causes higher developmental toxicity than its oxidation products in early life stages of medaka fish. **Water Research**, v. 47, p. 3899-3909, 2013.

CHO, M.; CHUNG, H.; CHOI, W.; YOON, J. Linear correlation between Inactivation of *E. coli* and OH radical concentration in TiO₂ photocatalytic disinfection. **Water Research**, v. 38, p. 1069-1077, 2004.

CHOI, O.; HU, Z. Size dependent and reactive oxygen species related nanosilver toxicity to nitrifying bacteria. **Environmental Science & Technology**, v. 42, p. 4583-4588, 2008.

CHOI, J.Y.; LEE, S.H.; NA, H.B.; AN, K.; HYEON, T.; SEO, T.S. In vitro cytotoxicity screening of water-dispersible metal oxide nanoparticles in human cell lines. **Bioprocess and Biosystem Engineering**, v. 33, p. 21-30, 2010.

CIUDAD, G; RUBILAR, O.; MONÓZ, P.; RUIZ, G.; CHAMY, R.; VERGARA, C.; JEISON, D. Partial nitrification of high ammonia concentration wastewater as a part of a shortcut biological nitrogen removal process. **Process Biochemistry**, v. 40, p. 1715-1719, 2005.

COBY, A.J.; PICARDAL, F.W. Inhibition of NO₃⁻ and NO₂⁻ reduction by microbial Fe (III) reduction: Evidence of a reaction between NO₂⁻ and cell surface-bound Fe₂⁺. **Applied and Environmental Microbiology**, v.71, p.5267-5274, 2005.

CRAWFORD, G.; DAIGGER, G.; ERDAL, Z. Enhanced biological phosphorus removal within membrane bioreactors. **Water Environment Foundation**, p. 1856-1866, 2006.

CROZES, G.; WHITE, P.; MARSHALL, M. Enhance coagulation-Its effect on NOM removal and chemical costs. **Journal of American Water Works Association**, v. 87, p.78-89, 1995.

DAIGGER, G.T.; CRAWFORD, G.V.; JOHNSON, B.R. Full-scale assessment of the nutrient removal capabilities of membrane bioreactors. **Water Environmental Research**, v. 82, p. 806-818, 2010.

DANISH ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (DEPA). Statutory Order n°. 644. Guideline for the Danish Inventory of Nanoproducts. Environmental Project n°. 5, jun./2014.

DENG, C.H.; GONG, J.L.; ZENG, G.M.; NIU, C.G.; NIU, Q.Y.; ZHANG, W.; LIU, H.Y. Inactivation performance and Mechanism of Escherichia coli in aqueous system exposed to iron oxide loaded graphene nanocomposites. **Journal of Hazardous Materials**, v. 276, p. 66-76, 2014.

DE FREITAS, J.M., MENEGHINI, R.. Iron and its sensitive balance in the cell. **Mutation Research**, v. 475, p. 153-159, 2001.

DIAO, M.; YAO, M. Use of zero-valent iron nanoparticles in inactivating microbes. **Water Research**, v. 43, p. 5243-5251, 2009.

ELLIOTT, D.W.; ZHANG, W.X. Field assessment of nanoscale biometallic particles for groundwater treatment. **Environmental Science & Technology**, v. 35, p. 4922-4926, 2001.

ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (EPA). *Safe Drinking Water Act*, 2007. Disponível em: <http://water.epa.gov/lawsregs>. Acesso em: nov/2014.

EPA. **Clean Water Act**, 2007. Disponível em: <http://water.epa.gov/lawsregs/rulesregs/>. Acesso em: nov/2014.

EPA. **Clean Air Act**, 2007. Disponível em: <http://www.epa.gov/air/caa/index.html>. Acesso em: nov/2014.

EPA. **Comprehensive Environmental Response, Compensation and Liability Act**, 2007. Disponível em: <http://www2.epa.gov/laws-regulations/laws-and-executive-orders>. Acesso em: nov/2014.

EPA. **Resource Conservation and Recovery Act**, 2007. Disponível em: <http://www2.epa.gov/laws-regulations/laws-and-executive-orders>. Acesso em: nov/2014.

EPA. **Control of Nanoscale Materials under the Toxic Substances Control Act**, 2011. Disponível em: www.epa.gov/oppt/nano/

EPA. **Nanomaterials** - Solid Waste and Emergency Response (5106P). Technical Fact Sheet, 2014. Disponível em: <http://www2.epa.gov/>. Acesso em: nov/2014.

EUROPEAN COMMISSION – EC. Commission Recommendation of 18 October 2011 on the definition of nanomaterial - 2011/696/EU. **Official Journal of the European Union**, p. 38-40, 2011.

FDA – Food and Drug Administration. Draft Guidance for Industry: Considering Whether an FDA - Regulated Product Involves the Application of Nanotechnology. 2014a. Disponível em: <http://www.fda.gov/RegulatoryInformation/Guidances>. Acesso em: nov/2014.

FDA. Guidance for Industry Safety of Nanomaterials in Cosmetic Products. 2014b. Disponível em: <http://www.fda.gov/Cosmetics/GuidanceRegulation/>. Acesso em: nov./2014.

FDA. Guidance for Industry: Assessing the Effects of Significant Manufacturing Process Changes, Including Emerging Technologies, on the Safety and Regulatory Status of Food Ingredients and Food Contact Substances, Including Food Ingredients that Are Color Additives. 2014c. Disponível em: <http://www.fda.gov/FoodGuidance>. Acesso em: nov./2014

FERRETTI, E. C. Remoção de nitrogênio via nitrito de efluentes com elevadas concentrações de nitrogênio e baixas relações DQO/N em reator operado na forma de bateladas sequenciais (SBR). Tese de Doutorado. Departamento de Engenharia Química e de Alimentos. Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, 2009.

FORTNER, J.D.; LYON, D.Y.; SAYES, C.M.; BOYD, A.M.; FALKNER, J.C.; HOTZE, E.M.; ALEMANY, L.B.; TAO, Y.J.; GUO, W.; AUSMAN, K.D. C₆₀ in water: nanocrystal formation and microbial response. **Environmental Science & Technology**, v. 39, p. 4307-4316, 2005.

GARCÍA, A.; ESPINOSA, R.; DELGADO, L.; CASALS, E.; GONZÁLEZ, E.; PUNTES, V.; BARAT, C.; FONT, X.; SANCHÉZ, A. Acute toxicity of cerium oxide, titanium oxide and iron oxide nanoparticles using standardized tests. **Desalination**, v. 269, p. 136-141, 2011.

GOMAA, I.O.; KADER, M.H.; SALAH, T. A.; HEIKAL, O. A. Evaluation of in vitro mutagenicity and genotoxicity of magnetite nanoparticles. **Drug Discoveries & Therapeutics**, v.7, p. 116-123, 2013.

GRIEGER, K.D.; FJORDBOGE, A.; HARTMANN, N.B.; ERIKSSON, E.; BJERG, P.L.; BAUN, A. Environmental benefits and risks of zero-valent iron nanoparticles (nZVI) for in situ remediation: risk mitigation or trade-off? **Journal of Contaminant Hydrology**, v.118, p.165-183, 2010.

GRUNDITZ, C. & DALHAMMAR, G. Development of nitrification inhibition assays using pure cultures of *Nitrosomonas* and *Nitrobacter*. **Water Research**, v. 35, p. 433-440, 2001.

HADRUP, N & LAM, H.R. Oral toxicity of silver ions, silver nanoparticles and colloidal silver – A review. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 68, p.1-7, 2014.

HAIPOUR, M.J.; FROMM, K.M.; ASHKARRAN, A.A.; DE ABERASTURI, D.J.; DE LARRAMENDI, I.R.; ROJO, T.; SERPOOSHAN, V.; PARAK, W.J.; MAHMOUDI, M. Antibacterial properties of nanoparticles. **Trends in Biotechnology**, v. 30, p. 499-511, 2012.

HARRISON, G. A.; DAWSON, K. A.; HEMKENM, R. W. Effects of high iron and sulfate ion concentrations on dry matter digestion and volatile fatty acid production by ruminal microorganisms. **Journal of Animal Science**, v. 70, p.1188-1194, 1992.

HELLINGA, C.; SCHELLEN, A.A.J.C.; MULDER, J.W. The SHARON process: An innovative method for nitrogen removal from ammonium-rich wastewater. **Water Science & Technology**, v. 37, p. 135, 1998.

HENNEBERT, P.; AVELLAN, A.; YAN, J.; AGUERRE-CHARIOL, O. Experimental evidence of colloids and nanoparticles presence from 25 waste leachates. **Waste Management**, v.33, p. 1870-1881, 2013.

HENZE. M.; HARREMOES, P.; JANSEN, J. C.; ARVIN, E. **Wastewater treatment: biological and chemical process**. 2. ed. Germany: Springer Verlag, 1997.

HOET, P.H.M.; BRÜSKE-HOHLFELD, I.; SALATA, O.V. Nanoparticles – known and unknown health risks. **Journal of Nanobiotechnology**, v. 2, p. 01-12, 2004.

HOLDEMAN, M.A.; GIBSON, S.C.; MCFALL, J.L.; BECKMAN, T.J.; CHRISTENSEN, C.C.; ERWIN, V.A. **1997 Synoptic Sampling Surveys in the Whitewater River Basin**. Indiana Department of Environmental Management, IDEM, 1999.

HU, J.; WANG, D.; FORTHAUS, B.E.; WANG, J. Quantifying the effect of nanoparticles on As(V) ecotoxicity exemplified by nano-Fe₂O₃ (magnetic) and nano-Al₂O₃. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 31, p. 2870-2876, 2012

- HUBER, D.L. Synthesis, properties, and applications of nanoparticles. **Small**, v.1, p. 482-501, 2005.
- HWANG, S.; MARTINEZ, D.; PEREZ, P.; RINALDI, C. Effect of surfactant-coated iron oxide nanoparticles on the effluent water quality from a simulated sequencing batch reactor treating domestic wastewater. **Environmental Pollution**, v.159, p. 3411-3415, 2011.
- INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION (ISO). ISO/TC 229 Nanotechnologies. 2005.
- ICONARU, S.L.; PRODAN, A.M.; LE COUSTOMER, P.; PREDOI, D. Synthesis and antibacterial and antibiofilm activity of iron oxide glycerol nanoparticles obtained by coprecipitation method. **Journal of Chemistry**, v. 2013, p. 6, 2013.
- JIANG, W.; MASHAYEKHI, H.; XING, B. Bacterial toxicity comparison between nano- and micro-scaled oxide particles. **Environmental Pollution**, v. 157, p. 1619-1625, 2009.
- JING, X.; PARK, J.H.; PETERS, T.M.; THORNE, P.S. Toxicity of copper oxide nanoparticles in lung epithelial cells exposed at the air-liquid interface compared with in vivo assessment. **Toxicology in Vitro**, v.29, p. 502-511, 2015.
- JU-NAM, Y.; LEAD, J. R. Manufactured Nanoparticles: An Overview of Their Chemistry, Interactions and Potential Environmental Implications. **Science of the Total Environment**, v. 400, p. 396-414, 2008
- KÁDÁR, E.; LOWE, D.M.; SOLÉ, M.; FISHER, A.S.; JHA, A.N.; READMAN, J.W.; HUTCHINSON, T.H. Uptake and biological responses to nano-Fe versus soluble FeCl₃ in excised mussel gills. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 396, p. 657-666, 2010.
- KAEGI, R.; VOEGELIN, A.; SINNET, B.; ZULEEG, S.; HAGENDORFER, H.; BURKHARDT, M.; SIEGRIST, H. Behavior of metallic silver nanoparticles in a pilot wastewater treatment plant. **Environmental Science & Technology**, v.45, p. 3902-3908, 2011.
- KAFAYATI, M.E.; RAHEB, J.; TORABI, A.M.; ALIZADEH, S.; BARDANIA, H. The effect of magnetic Fe₃O₄ nanoparticles on the growth of genetically manipulated bacterium, *Pseudomonas aeruginosa* (PTSOX 4). **Iran Journal of Biotechnology**, v.11, p. 41-46, 2013.
- KALANTARI, N.; GHAFFARI, S. Evaluation of Toxicity of Heavy Metals for Escherichia coli Growth. **Iranian Journal of Environmental Health Science & Engineering**, v. 5, p. 173-178, 2008.

KARN, B.; KUIKEN, T.; OTTO, M. Nanotechnology and in situ remediation: a review of the benefits and potential risks. **Environmental Health Perspectives**, v.117, p.1813-1831, 2009.

KELLER, A.A.; WANG, H.; ZHOU, D.; LENIHAN, H.S.; CHERR, G.; CARDINALE, B.J.; MILLER, R.; JI, Z. Stability and aggregation of metal oxide nanoparticles in natural aqueous matrices. **Environmental Science & Technology**, v.44, p.1962-1967, 2010.

KEYER, K.; GORT, A.S.; IMLAY, J.A. Superoxide and the production of oxidative DNA damage. **Journal of Bacteriology**, v. 177, p. 6782-6790, 1995.

KHIN, M. M.; NAIR, A. S.; BABU, V. J.; MURUGAN, R.; RAMAKRISHNA, S. A review on nanomaterials for environmental remediation. **Energy Environmental Science**, v.5, p. 8075-8109, 2012.

KISER, M.A.; WESTERHOFF, P.; BENN, T.; WANG, Y.; PEREZ-RIVERA, J.; HRISTOVSKI, K. Titanium nanomaterial removal and release from wastewater treatment plants. **Environmental Science and Technology**, v.43, p.6757-6763, 2009.

KLAINE, S.J.; ALVAREZ, P.J.J.; BATLEY, G.E.; FERNANDES, T.F.; HANDY, R.D.; LYON, D.; MAHENDRA, S.; MCLAUGHLIN, M.J.; LEAD, J.R. Nanomaterials in the environment: behaviour, fate, bioavailability and effects. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 27, p. 1825-1851, 2008.

LAMERS, L.P.M.; VAN DIGGELEN, J.M.H.; DEN CAMP, .H.J.M.O.; VISSER, E.J.W.; LUCASSEN, E.C. H. E. T.; VILE, M.A.; JETTEN, M.S.M.; SMOLDERS, A.J.P.; ROELOFS, J.1.G.M. Microbial transformations of nitrogen, sulfur, and iron dictate vegetation composition in wetlands: a review. **Frontiers in Microbiology**, v. 3, p. 1-12, 2012.

LEE, C.; KIM, J.Y.; LEE, W.I.; NELSON, K.L.; YOON, J.; SEDLAK, D.L. 2008. Bactericidal effect of zero-valent iron nano-scale particles on *Escherichia coli*. **Environmental Science & Technology**, v.42, p. 4927- 4933, 2008.

LEES, E.J.; NOBLE, B.; HEWITT, R.; PARSONS, S.A. The impact of residual coagulant on the respiration rate and sludge characteristics of an activated microbial biomass. **Process Safety and Environmental Protection**, v. 79, p. 283–290, 2001a.

LEES, E.J., NOBLE, B., HEWITT, R., PARSONS, S.A. The impact of residual coagulant on downstream treatment processes. **Environmental Technology**, v. 22, p.113-122, 2001b.

LEFEBVRE, E., LEGUBE, B. Coagulation par Fe (III) de substances humiques extrêmes d'eaux de surface: effect in pH de la concentration en substances humiques. **Water Research**, v. 24, p.591-606, 1990.

LEPPARD, G.G.; MAVROCORDATOS, D.; PERRET, D. **Electron-optical characterization of nano- and micro-particles in raw and treated waters: an overview**. In: BOLLER, M. (Ed.). Proceedings nano and microparticles in water and wastewater treatment. 22 e 24 September. Zurich, Switzerland: IWA; 2003.

LIMBACH, L.K.; LI, Y.; GRASS, R.N.; BRUNNER, T.J.; HINTERMANN, M.A.; MULLER, M.; GUNTHER, D.; STARK, W.J. Oxide nanoparticle uptake in human lung fibroblasts: effects of particle size, agglomeration, and diffusion at low concentrations. **Environmental Science and Technology**, v. 9, p. 9370-9376, 2005.

LIMBACH, L.K.; BEREITER, R.; MULLER, E.; KREBS, R.; GALLI, R.; STARK, W.J. Removal of oxide nanoparticles in a model wastewater treatment plant: influence of agglomeration and surfactants on clearing efficiency. **Environmental Science and Technology**, v. 42, p.5828-5833, 2008.

LISUNOVA, M.O.; LEOVKA, N.I.; MELEZHYK, O.V.; BOIKO, Y.P. Stability of the aqueous suspensions of nanotubes in the presence of nonionic surfactant. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 299, p. 740-746, 2006.

LIU, Y.; TOURBIN, M.; LACHAIZE, S.; GUIRAUD, P. Nanoparticles in wastewaters: Hazards, fate and remediation. **Powder Technology**, v. 255, p.149-156, 2014.

LODHIA, J.; MANDARANO, G.; FERRIS, N.; EU, P.; COWELL, S. Development and use of iron oxide nanoparticles (Part 1): Synthesis of iron oxide nanoparticles for MRI. **Biomedical Imaging and Intervention Journal**, v.6, e.12, 2010.

LOGEMANN, S.; SCHANTL, J.; BIJVANK, S.; VAN LOOSDRECHT, M.; KUENEN, J. G.e JETTEN, M. Molecular microbial diversity in a nitrifying reactor system without sludge retention. **FEMS Microbiology Ecology**, v27, p.239-249, 1998.

MA, Y.; METCH, J.W.; VEJERANO, E.P.; MILLER, I.J.; LEON, E.C.; MARR, L.C.; VIKESLAND, P.J.; PRUDEN, A. Microbial community response of nitrifying sequencing batch reactors to silver, zero-valent iron, titanium dioxide and cerium dioxide nanomaterials. **Water Research**, v. 68, p. 87-97, 2015

MAEKIN, P. Fractal aggregates. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 28, p. 249-331, 1988.

MAHMOUDI, M.; LAURENT, S.; SHOKRGOZAR, M.A.; HOSSEINKHANI, M. Toxicity evaluations of superparamagnetic iron oxide nanoparticles: cell "vision"

versus physicochemical properties of nanoparticles. **ACS Nano**, v.5, p. 7263-7276, 2011.

MARTINEZ, D.S.T.; ALVES, O.L. Interação de nanomateriais com biosistemas e a nanotoxicologia: na direção de uma regulamentação. **Ciência e Cultura**, v. 65, p. 32-36, 2013.

MEIKLEJOHN, J. Iron and the Nitrifying Bacteria. **Journal of general microbiology**, v.8. p. 58-65, 1953.

METZLER, D. M.; LI, M.; ERDEM, A.; HUANG, C.P. Responses of algae to photocatalytic nano-tio(2) particles with an emphasis on the effect of particle size. **Chemical Engineering Journal**, v. 170, p. 538-546, 2011.

MOORE, M.N. Do nanoparticles present ecotoxicological risks for the health of the aquatic environment? **Environment International**, v. 32, p. 967-976, 2006.

MORAGHAN, J.T.; BURESH, R.J. Chemical reduction of nitrite and nitrous oxide by ferrous iron. **Journal of American Soil Society**, v. 47-50, 1977.

NAQVI, S.; SAMIM, M.; ABDIN, M.Z.; AHMED, F.J.; MAITRA, A.N.; PRASHANT, C.K.; DINDA, A.K. Concentration-dependent toxicity of iron oxide nanoparticles mediated by increased oxidative stress. *International Journal of Nanomedicine*, v. 5, p. 983-989, 2010.

NATION, J. L. A new method using hexamethyldisilazane for preparation of soft tissues for scanning electron microscopy. **Stain Technology**, v. 58, p. 347-351, 1983.

NEL, A.; XIA, T.; MADLER, L.; LI, N. Toxic potential of materials at the nanolevel. *Science*, v. 311, p.622-627, 2006.

NI, S.-Q.; NI, J.; YANG, N.; WANG, J. Effect of magnetic nanoparticles on the performance of activated sludge treatment system. **Bioresource Technology**, v.143, p. 555-561, 2013.

NIOSH - National Institute for Occupational Safety and Health. Approaches to safe nanotechnology. Managing the health and safety concerns associated with engineered nanomaterials. 104 p., 2009a.

NIOSH. Interim guidance for medical screening and hazard surveillance for workers potentially exposed to engineered nanoparticles. **Current Intelligence Bulletin 60**, 26 p., 2009b.

NIOSH. Occupational exposure to titanium dioxide. **Current Intelligence Bulletin 63**, 119 p., 2011.

NIOSH. General safe practices for working with engineered nanomaterials in research laboratories. 60 p., 2012.

NIOSH. Occupational exposure to carbon nanotubes and nanofibers. **Current Intelligence Bulletin** 65, 156 p., 2013a.

NIOSH. Current strategies for engineering controls in nanomaterial production and downstream handling processes. 95 p. 2014.

NOGUEIRA, P.F.M.; PAINO, I.M.M.; ZUCOLOTTO, V. Nanosilver: Propriedades, Aplicações e impactos na Saúde Pública e Meio Ambiente. **Vigilância Sanitária em Debate**, v. 1, p. 59-71, 2013.

NOUBACTEP, C.; CARE, S.; CRANE, R. Nanoscale metallic iron for environmental remediation: prospects and limitations. **Water, Air & Soil Pollution**, v. 223, p. 1363-1382, 2012.

NOWACK, B.; BUSCHELLI, T.D. Occurrence, behaviour and effects of nanoparticles in the environment. **Environmental Pollution**, v.150, p. 05-22, 2007.

OBERDORSTER, G.; OBERDÖRSTER, E.; OBERDÖRSTER, J. Nanotoxicology: an emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles. **Environmental Health Perspective**, v.113, p. 823-839, 2005.

PAREDES, D.; KUSCHK, P.; MBWETTE, T.S.A.; STANGE, F.; MÜLLER, R.A.; KÖSER, H. New Aspects of Microbial Nitrogen Transformations in the Context of Wastwater Treatment – A Review. **Engineering in Life Sciences**, v. 7, n. 1, p. 13-15, 2007.

PASCAL, C.; PASCAL, J.L.; FAVIER, F.; MOUBTASSIM, M.LE.; PAYEN, C. Electrochemical Synthesis for the Control of γ -Fe₂O₃ Nanoparticle Size. Morphology, Microstructure, and Magnetic Behavior. **Chemistry of Materials**, v. 11, p.141-147, 1999.

PHILIPS, S.; RABAEY, K.; VERSTRAETE, W. Impact of iron salts on activated sludge and interaction with nitrite or nitrate. **Bioresource Technology**, v. 88, p. 229–239, 2003.

POOLE, C. P.; OWENS, F.J. **Introductions to the physics of the solid state. In:** Introduction to Nanotechnology. Hoboken, NJ: Wiley, John & Sons, 2003.

PRASAD, T.; KAMBALA, V. S. R.; NAIDU, R. A Critical Review on Biogenic Silver Nanoparticles and their Antimicrobial Activity. **Current Nanoscience**, v. 7, p. 531-544, 2011.

PRUCEK, R.; TUČEK, J.; KILIANOVÁ, M.; PANÁČEK, A.; KVÍTEK, L.; FILIP, J.; KOLÁŘ, M.; TOMÁNKOVÁ, K.; ZBOŘIL, R. The targeted antibacterial and antifungal properties of magnetic nanocomposite of iron oxide and silver nanoparticles. **Biomaterials**, v. 32, p. 4704-4713, 2011.

PUAY, N.-Q.; QIU, G.; TING, W.-P. Effect of Zinc oxide nanoparticles on biological wastewater treatment in a sequencing batch reactor. **Journal of Cleaner Production**, v.88, p.139-145, 2015.

QIAO, R.R.; YANG, C.H.; GAO, M.Y. Superparamagnetic iron oxide nanoparticles: from preparations to in vivo MRI applications. **Journal of Materials Chemistry**, v.19, p. 6274-6293, 2009.

QUINN, J.; GEIGER, C.; CLAUSEN, C.; BROOKS, K.; COON, C.; O'HARA, S.; KRUG, T.; MAJOR, D.; YOON, W.S.; GAVASKAR, A.; HOLDSWORTH, T. Field demonstration of NAPL dehalogenation using emulsified zero-valent iron. **Environmental Science & Technology**, v. 39, p.1309-1318, 2005.

QUINA, F. H., Nanotecnologia e o meio ambiente: perspectivas e riscos. **Química Nova**, v. 27, p. 1028-1029, 2004

RAKSHIT, S.; MATOCHA, C.J.; COYNE, M.S. Nitrite reduction by siderite. **Soil Science Society of America Journal**, v.72, p. 1070-1077, 2008.

RADNIECKI, T.S.; STANKUS, D.P.; NEIGH, A.; NASON, J.A., SEMPRINI, L. Influence of liberated silver from silver nanoparticles on nitrification inhibition of *Nitrosomonas europaea*. **Chemosphere**, v.85, p.43-49, 2011.

REIJNDERS, L. Cleaner nanotechnology and hazard reduction of manufactured nanoparticles. **Journal of Cleaner Production**, v. 14, 124-133, 2006.

REISING, N.C. **The influence of copper, lead and iron on stream sediment nitrification**. Master's Thesis. Department of Biology. Ball State University. Muncie, Indiana, 2013.

RITTMANN, B. E.; MCCARTY, P. L. **Environmental biotechnology: principles and applications**. New York: McGraw Hill Book Co, 2001.

ROBERTS, A.P.; MOUNT, A.S.; SEDA, B.; SOUTHER, J.; QIAO, R.; LIN, S.; KE, P.C.; RAO, A.M.; KLAINE, S.J. In vivo biomodification of lipid-coated carbon nanotubes by *Daphnia magna*. **Environmental Science & Technology**, v.41, p.3025-3029, 2007.

ROH, Y.; VALI, H.; PHELPS, T.J.; MOON, J.W. Extracellular synthesis of magnetite and metal-substituted magnetite nanoparticles. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, v.11, 3517-3520, 2006.

ROYAL COMMISSION ON ENVIRONMENTAL POLLUTION. **Novel Materials in the Environment**: The case of nanotechnology 27th Report, UK, 2008.

RUIZ, G.; JEISON, D.; CHAMY, R. Nitrification with high accumulation for the treatment of wastewater with high ammonia concentration. **Water Research**, v. 37, p. 1371-1377, 2003.

SANT'ANNA JUNIOR, G. L. **Tratamento biológico de efluentes**: fundamentos e aplicações. Rio de Janeiro: Interciência, 2010.

SARALAYA, V.; BHAT, G.; KAMATH, A.; SHIVANANDA, P. G. Effect of trace elements on surface hydrophobicity and adherence of *Escherichia coli* to uroepithelial cells. **Indian Journal of Experimental Biology**, v. 42, p. 681-685, 2004.

SARAVANAN, M.; SUGANYA, R.; RAMESH, M. Toxicity of iron oxide nanoparticles to Indian major carp, *Labeo rohita* on haematological, biochemical, ionoregulatory and enzymological alterations. **In**: 8th International Symposium on Recent Advances in Environmental Health Research. Jackson, USA. Sep.18-21, 2011.

SCHERRER, P. Bestimmung der grosse und der inneren struktur von colloid teil chenmittel sront gestahlen. **Nachr Ges Wiss Göttingen Math Phys**, v.26, p.98-100, 1918.

SCHIERHOLT NETO, G. F. Desenvolvimento de uma Flora de Microrganismos Oxidadores Anaeróbios de Amônia Utilizando Inoculo Proveniente de Dejetos de Suínos. Dissertação de Mestrado. Departamento de Engenharia Química e de Alimentos. Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, 2007.

SCHWEGMANN, H.; FEITZ, A.J.; FRIMMEL, F.H. Influence of the zeta potential on the sorption and toxicity of iron oxide nanoparticles on *S. cerevisiae* and *E. coli*. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 347, p. 43-48, 2010.

SEYFRIED, C.F. Influence of sludge from chemical biological wastewater treatment on nitrification and digestion. **In**: Proceeding of Pretreatment in Chemical Water and Wastewater Treatment Conference, p.307-317, 6.1-6.3, Gothenburg, Germany, 1988.

SIMONET, B.M.; VALCÁRCEL, M. Monitoring nanoparticles in the environment. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 393, p. 17-21, 2009.

SOM, C.; BERGES, M.; CHAUDHRY, Q.; DUSINSKA, M; FERNANDES, T.F.; OLSEN, S.I.; NOWACK, B. The importance of life cycle concepts for the development of safe nanoproducts. **Toxicology**, v. 269, p. 160-169, 2010.

SOM, C.; WICK, P.; KRUG, P.; NOWACK, B. Environmental and health effects of nanomaterials in nanotextiles and façade coatings. **Environment International**, v.37, p.1131-1142, 2011.

STOIMENOV, P.K.; KLINGER, R.L. Metal oxide nanoparticles as bactericidal agents. **Langmuir**, v. 18, p. 6679-6686, 2002.

TIEDE, K., BOXALL, A.B.A., WANG, X.M., GORE, D., TIEDE, D., BAXTER, M., DAVID, H., TEAR, S.P., AND LEWIS, J. Application of hydrodynamic chromatography-ICP-MS to investigate the fate of silver nanoparticles in activated sludge. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, v. 25, p. 1149-1154, 2010.

TROUILLER, B.; RELIENE, R.; WESTBROOK, A.; SOLAIMANI, P.; SCHIESTL, R. H. Titanium dioxide nanoparticles induce DNA damage and genetic instability in vivo in mice. **Cancer Research**, v. 69, p. 8784-8789, 2009.

VARESCHE, M. B., ZAIAT, M., VIEIRA, L. G. T., VAZOLLER, R. F., FORESTI, E. Microbial colonization of polyurethane foam matrices in horizontal-flow anaerobic immobilized-sludge reactor. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 48, pp. 534-538, 1997.

VISHNIAC, W., SANTER, M. The thiobacilli. **Bacteriology Review**, v. 21, p.199-200, 1957.

VOGEL, A. I. **Análise Inorgânica Quantitativa**. 4^a ed. Rio de Janeiro: Guanabara, 1981.

VON SPERLING, M. **Princípios básicos do tratamento de esgotos**. Ed.FCO, v.2.. UFMG. Belo Horizonte. Minas Gerais. 1996.

YANG, Y.; XU, M.; WALL, J.D.; HU, Z. Nanosilver impact on methanogenesis and biogas production from municipal solid waste. **Waste Management**, v.32, p. 816-825, 2012.

YANG, Y.; WANG, Y.; WESTERHOFF, P.; HRISTOVSKI, K.; JIN, V.L.; JOHNSON, M.-V.V.; ARNOLD, J.G. Metal and nanoparticle occurrence in biosolid-amended soils. **Science of The Total Environment**, v. 485-486, p. 441-449, 2014.

YU, J.; HUANG, D.Y.; YOUSAF, M.Z.; HOU, Y.L.; GAO S. Magnetic nanoparticle-based cancer therapy. **Chinese Physics B**, v. 22, p. 1-13, 2013.

WALSER, T., LIMBACH, L.K., BROGIOLI, R., ERISMANN, E., FLAMIGNI, L., HATTENDORF, B., JUCHLI, M., KRUMEICH, F., LUDWIG, C., PRIKOPSKY, K., ROSSIER, M., SANER, D., SIGG, A., HELLWEG, S., GUNTHER, D., AND STARK, W.J. Persistence of engineered nanoparticles in a municipal solid-waste incineration plant. **Nature Nanotechnology**, v.7, 520, 2012.

- WANG, S. & GUNSCH, C.K. Effects of selected pharmaceutically active compounds on the ammonia oxidizing bacterium *Nitrosomonas europaea*. **Chemosphere**, v.82, p. 565–572, 2011.
- WANG, Y.; WESTERHOFF, P.; HRISTOVSKI, K.D. Fate and biological effects of silver, titanium dioxide, and C-60 (Fullerene) nanomaterials during simulated wastewater treatment processes. **Journal of Hazardous Materials**, v. 201, p. 16-22, 2012.
- WEI, X.; VAJRALA, N.; HAUSER, L.; SAYAVEDRA-SOTO, L.A.; ARP, D.J. Iron nutrition and physiological responses to iron stress in *Nitrosomonas europaea*. **Archives Microbiology**, 186, p. 107-118, 2006.
- WESTERHOFF, P.K.; KISER, M.S.; HRISTOVSKI, K. Nanomaterial removal and transformation during biological wastewater treatment. **Environmental Engineering Science**, v. 30, p. 109-117, 2013.
- WIESMANN, U.; CHOI, I. S.; DOMBROWSKI, E. M. **Fundamentals of Biological Wastewater Treatment**. Berlin: Wiley-Vch. 2007.
- WIESNER, M. R.; LOWRY, G. V.; ALVAREZ, P.; DIONYSIOU, D.; BISWAS, P. Assessing the risks of manufactured nanomaterials. **Environmental and Science and Technology**, v.40, p. 4336-4345, 2006.
- WILLIAMS, D. N.; EHRMAN, S. H.; HOLOMAN, T. R. P. Evaluation of the microbial growth response to inorganic nanoparticles. **Journal of Nanobiotechnology**, 4, p. 1-8, 2006.
- WU, W.; HE, Q.; JIANG, C. Magnetic iron oxide nanoparticles: synthesis and surface functionalization strategies. **Nanoscale Research Letters**, v. 3, p. 397-415, 2008.
- WU, D.; SHEN, Y.; DING, A.; MAHMOOD, Q.; LIU, S.; TU, Q. Effects of nanoscale zero-valent iron particles on biological nitrogen and phosphorus removal and microorganisms in activated sludge. **Journal of Hazardous Materials**, v. 262, p. 649-655, 2013.
- ZDRADEK, C. P. **Seleção de linhagens oxidadoras de amônio e remoção de nitrogênio via nitrato em reator descontínuo alimentado (SBR), sob condições de limitação de oxigênio**. Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina 2005.
- ZHANG, W.; HUGHES, J.; CHEN, Y. Impacts of hematite nanoparticle exposure on biomechanical, adhesive, and surface electrical properties of *escherichia coli* cells. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 78, p. 3905-3915, 2012.

ZHAO, W.; WANG, Y.; LIN, X.; ZHOU, D.; PAN, M. E.; YANG, J. Identification of the salinity-effect on N₂O production pathway during nitrification: using stepwise inhibition and 15N isotope labeling methods. **Chemical Engineering Journal**, v. 253, p. 418-426, 2014.

ZHENG, X.; WU, R.; CHEN, Y. Effects of ZnO nanoparticles on wastewater biological nitrogen and phosphorus removal. **Environmental Science & Technology**, v.45, p. 2826-2832, 2011.

ZHU, G.; PENG, Y.; LI, B.; GUO, J.; YANG, Q.; WANG, S.. Biological Removal of Nitrogen from Wastewater. **Reviews of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 192, p. 159-195, 2008.

ZHU, X.; TIAN, S; CAI, Z. Toxicity assessment of iron oxide nanoparticles in Zebrafish (*Danio rerio*) early life stages. **PLOS ONE**, v.7, p. 1-6, 2012.

APÊNDICE A - Dados de Monitoramento do Reator

Dias de operação	N-NH ₄ ⁺ afluente	Desvio padrão	N-NH ₄ ⁺ efluente	Desvio padrão	N-NO ₂ ⁻ efluente	Desvio Padrão	N-NO ₃ ⁻ efluente	Desvio padrão	pH	T (°C)
1	1053,31	1,54	92,19	0,51	801,57	1,34	7,56	0,08	7,50	32,00
4	1051,78	2,05	101,80	1,28	827,67	1,34	7,91	0,04	7,20	31,00
6	1050,24	2,05	243,29	0,51	822,65	1,67	7,47	0,10	7,10	34,00
8	1051,01	3,08	242,14	0,51	826,17	0,67	6,22	0,10	8,05	32,00
11	1050,24	2,05	242,52	0,51	825,67	1,34	7,53	0,04	7,70	30,90
13	1055,62	1,54	241,75	0,77	804,01	2,01	8,57	0,12	7,80	31,00
15	1033,32	2,05	242,91	0,77	806,02	3,35	8,30	0,00	8,00	32,00
18	1028,71	1,03	243,29	1,28	801,00	2,01	8,09	0,04	8,10	32,00
20	1027,94	1,54	242,91	0,77	804,01	2,01	9,39	0,04	8,00	32,00
22	1028,71	2,05	242,14	0,51	807,02	2,01	9,45	0,06	8,10	32,20
25	1061,77	2,05	252,52	0,51	803,01	2,68	7,20	0,04	8,40	32,00
27	1093,99	4,63	244,06	0,77	804,01	4,02	6,13	0,08	8,38	30,00
29	1113,98	2,90	272,13	0,51	806,02	5,35	6,34	0,06	8,58	31,00
32	1090,51	4,06	245,22	0,77	805,01	3,35	5,33	0,10	7,95	31,00
34	1058,36	0,00	222,53	4,36	806,02	5,35	6,22	0,04	8,05	31,10

APÊNDICE A - Dados de Monitoramento do Reator (Continuação)

Dias de operação	N-NH ₄ ⁺ afluente	Desvio padrão	N-NH ₄ ⁺ efluente	Desvio padrão	N-NO ₂ ⁻ efluente	Desvio Padrão	N-NO ₃ ⁻ efluente	Desvio padrão	pH	T (°C)
36	1093,99	4,63	225,22	2,56	808,03	2,68	7,17	0,14	8,90	34,00
39	1032,29	5,21	204,08	1,28	803,01	2,68	6,40	0,10	8,00	31,50
41	1083,56	4,63	230,99	1,28	814,05	2,68	6,61	0,06	8,20	32,00
43	1055,76	3,48	234,07	1,03	808,03	1,34	6,49	0,04	8,20	31,00
46	1083,56	4,63	239,06	1,03	812,04	2,68	6,58	0,04	8,10	31,30
48	1032,29	5,21	179,85	1,03	816,06	2,01	5,93	0,04	7,90	31,00
50	1023,60	7,53	203,31	1,03	783,93	2,68	6,67	0,08	7,60	33,00
53	1071,40	1,74	223,68	1,03	816,06	2,01	6,02	0,04	7,93	34,30
56	1072,27	1,16	199,46	1,03	814,05	2,68	6,08	0,06	7,30	28,00
60	1059,23	2,32	223,68	1,03	818,07	4,69	4,77	0,10	8,02	31,70
62	1059,23	2,32	201,77	1,03	804,01	6,02	5,07	0,10	8,03	31,00
64	1075,74	1,16	200,62	0,51	803,01	4,69	5,42	0,10	7,67	34,50
67	1073,13	1,16	235,60	0,51	773,89	2,01	5,78	0,14	7,85	33,40
69	1072,27	1,16	204,84	0,77	817,06	1,34	6,22	0,10	7,85	33,30
71	1072,27	2,32	193,31	0,77	868,26	1,34	7,35	0,10	7,46	34,70
74	1054,89	1,16	192,93	1,03	850,19	2,68	7,65	0,04	7,63	31,70

APÊNDICE A - Dados de Monitoramento do Reator (Continuação)

Dias de operação	N-NH ₄ ⁺ afluente	Desvio padrão	N-NH ₄ ⁺ efluente	Desvio padrão	N-NO ₂ ⁻ efluente	Desvio Padrão	N-NO ₃ ⁻ efluente	Desvio padrão	pH	T (°C)
78	1071,40	1,74	161,40	1,28	856,22	2,68	6,40	0,08	7,55	31,20
81	1069,66	2,90	126,79	1,28	861,24	2,01	7,41	0,06	7,63	31,70
84	1082,69	1,16	235,60	0,51	837,14	2,01	6,88	0,12	7,98	31,30
88	1080,09	2,32	235,60	0,51	817,06	1,34	4,74	0,12	8,10	31,20
90	1040,98	4,06	204,84	0,77	840,15	4,02	3,85	0,08	8,40	31,00
92	1040,98	4,06	193,31	0,77	850,19	2,68	5,07	0,08	8,07	31,00
95	1076,61	6,95	204,84	0,77	856,22	2,68	4,86	0,08	8,05	31,00
97	1035,77	2,90	193,31	0,77	817,06	1,34	5,63	0,06	8,15	30,00
99	1085,30	2,90	204,84	0,77	868,26	1,34	5,66	0,22	8,12	33,70
102	1082,69	2,90	215,99	1,28	850,19	2,68	5,25	0,32	8,10	30,50
104	1114,84	1,16	321,73	2,82	856,22	2,68	4,80	0,08	8,19	31,90
111	1134,83	72,41	339,03	1,79	856,22	2,68	4,59	0,08	8,27	32,00
113	1074,87	5,79	321,73	2,82	818,07	30,79	5,19	0,12	8,25	31,00
116	1093,12	4,06	327,88	1,28	663,46	2,68	5,19	0,12	8,30	31,00
120	1084,43	5,21	325,57	2,05	689,56	4,02	3,88	0,04	8,11	30,00

APÊNDICE A - Dados de Monitoramento do Reator (Continuação)

Dias de operação	N-NH ₄ ⁺ afluente	Desvio padrão	N-NH ₄ ⁺ efluente	Desvio padrão	N-NO ₂ ⁻ efluente	Desvio Padrão	N-NO ₃ ⁻ efluente	Desvio padrão	pH	T (°C)
127	1085,30	5,79	329,42	2,31	698,60	18,07	4,30	0,18	8,13	30,40
130	1087,91	4,06	326,34	1,28	661,45	2,68	3,97	0,22	8,30	31,00
134	1088,78	2,32	329,80	1,79	665,47	4,02	4,15	0,10	8,19	29,50
137	1090,51	4,63	315,19	2,05	773,89	4,02	5,07	0,08	7,67	31,00
139	1094,86	5,21	315,19	0,51	777,91	3,35	13,08	0,20	7,25	29,80
141	1090,51	2,90	314,81	1,28	777,91	6,69	13,14	0,12	7,78	29,50
146	1064,44	2,90	303,27	1,28	759,84	2,68	12,48	0,16	7,90	32,00
151	1130,49	11,59	353,64	0,77	747,79	1,34	13,14	0,12	7,78	29,70
158	1054,02	2,32	322,11	0,51	713,96	2,09	12,96	0,12	7,91	28,00
160	1041,85	1,16	345,95	1,03	712,08	1,67	12,42	0,12	7,91	29,00
162	1064,44	2,32	383,66	2,22	735,29	15,48	12,78	0,24	7,90	30,00
165	1063,58	1,74	379,56	1,03	649,96	1,67	11,33	0,24	7,90	30,00
167	1117,45	2,90	384,68	0,34	698,27	2,51	9,94	0,32	7,90	30,00
169	1119,19	4,63	380,84	0,68	698,27	2,51	11,27	0,08	8,20	30,00
172	1127,88	2,32	372,12	1,37	698,27	2,51	11,75	0,16	8,20	31,00
174	1121,80	2,90	358,28	1,37	727,76	0,84	10,91	0,32	8,00	30,00

APÊNDICE A - Dados de Monitoramento do Reator (Continuação)

Dias de operação	N-NH ₄ ⁺ afluente	Desvio padrão	N-NH ₄ ⁺ efluente	Desvio padrão	N-NO ₂ ⁻ efluente	Desvio Padrão	N-NO ₃ ⁻ efluente	Desvio padrão	pH	T (°C)
179	1152,21	8,69	357,26	1,54	724,00	0,84	11,27	0,32	8,20	28,20
181	1130,49	2,90	351,36	1,71	724,00	0,84	11,09	0,20	8,20	30,00
183	1108,76	2,90	350,85	0,85	695,14	2,09	11,03	0,40	8,00	30,00
186	1067,92	4,63	355,46	0,34	640,55	3,35	12,90	0,16	8,00	30,00
188	1079,22	3,48	353,92	2,22	643,68	2,51	11,87	0,24	8,00	30,00
190	1084,43	1,74	357,00	1,37	644,94	1,67	11,81	0,08	8,00	30,00
193	1053,15	1,74	354,69	1,37	643,68	2,51	9,22	0,16	8,18	27,00
195	1054,89	4,06	351,87	1,03	624,86	2,51	6,62	0,24	8,17	28,00
197	1061,84	4,06	372,38	1,20	641,18	2,09	11,57	0,20	8,40	30,00
200	1053,58	3,05	348,54	1,20	628,00	5,44	8,79	0,12	7,78	28,00
202	1079,17	3,66	349,05	0,68	646,82	5,44	11,75	0,32	8,00	28,00
204	1059,98	7,31	348,29	0,68	636,16	2,51	9,88	0,24	8,10	29,00
207	1049,01	1,83	345,47	0,85	663,14	7,95	11,39	0,20	8,10	30,00
209	1058,15	4,27	350,85	0,34	648,08	1,67	11,21	0,16	8,10	30,00
211	1058,15	4,27	355,97	0,34	648,70	4,60	11,39	0,08	8,20	31,00
214	1074,60	4,27	346,75	0,68	631,14	5,44	13,26	0,16	8,00	30,00

APÊNDICE A - Dados de Monitoramento do Reator (Continuação)

Dias de operação	N-NH ₄ ⁺ afluente	Desvio padrão	N-NH ₄ ⁺ efluente	Desvio padrão	N-NO ₂ ⁻ efluente	Desvio padrão	N-NO ₃ ⁻ efluente	Desvio padrão	pH	T (°C)
216	1077,34	1,22	390,07	2,39	619,84	2,09	12,05	0,36	8,20	28,20
218	1004,23	2,44	346,75	0,68	663,14	7,95	11,45	0,16	8,20	30,00
221	1040,79	14,62	390,07	2,39	648,08	1,67	10,24	0,24	8,00	30,00
223	1046,27	3,66	390,07	2,39	663,14	7,95	11,03	0,40	8,00	30,00
225	1037,13	4,87	391,35	0,68	659,37	6,69	11,15	0,24	8,00	30,00
228	1049,93	1,22	327,01	3,76	648,08	0,84	10,55	0,08	8,00	30,00
230	1036,22	8,53	324,45	0,34	639,92	1,25	10,73	0,32	8,00	30,00
232	1054,50	1,83	352,13	0,68	638,67	2,09	10,85	0,16	8,18	27,00
235	1058,15	3,05	330,86	1,37	683,84	3,35	10,73	0,16	8,17	28,00
237	1109,33	3,66	318,30	0,34	743,45	5,02	11,81	0,08	8,40	30,00
239	1105,68	4,87	315,99	0,68	784,86	1,25	10,55	0,08	7,78	28,00
242	1127,61	2,44	294,20	1,54	779,22	2,51	11,63	0,20	8,00	28,00
244	1077,34	46,31	286,51	2,05	835,69	2,51	12,36	0,32	8,10	29,00
246	1066,38	3,05	291,64	1,37	803,06	1,67	12,90	0,16	7,90	30,00
249	1115,73	4,87	296,00	1,71	776,08	1,67	13,50	0,24	7,90	30,00
251	1035,30	5,48	294,46	0,34	803,69	1,25	13,08	0,20	7,90	30,00

APÊNDICE A - Dados de Monitoramento do Reator (Continuação)

Dias de operação	N-NH ₄ ⁺ afluente	Desvio padrão	N-NH ₄ ⁺ efluente	Desvio padrão	N-NO ₂ ⁻ efluente	Desvio Padrão	N-NO ₃ ⁻ efluente	Desvio padrão	pH	T (°C)
253	1068,21	3,66	299,07	1,37	774,20	2,09	12,05	0,24	7,90	30,00
256	1088,31	4,87	287,54	1,88	772,31	1,67	13,44	0,40	8,20	30,00
258	1099,28	2,44	289,59	1,03	774,20	2,09	12,96	0,36	8,20	31,00
260	1086,48	2,44	289,59	1,03	791,14	1,67	12,96	0,12	8,00	30,00