



Universidade Federal de Ouro Preto
Programa de Pós-Graduação Engenharia Ambiental
Mestrado em Engenharia Ambiental

Patrícia da Luz Mesquita

**“Caracterização de Produtos Microbianos Solúveis (SMPs) em Reatores
Aeróbio e Anaeróbio de Bancada em Diferentes Condições Operacionais”**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Engenharia Ambiental, Universidade Federal de Ouro
Preto, como parte dos requisitos necessários para a
obtenção do título: “Mestre em Engenharia Ambiental –
Área de Concentração: Saneamento Ambiental”

Orientador: Prof. Dr. Sérgio Francisco de Aquino

Ouro Preto, MG

2009

Esta dissertação é dedicada ao meu esposo, Leonardo, meu “porto-seguro” e principal incentivador desta etapa de minha vida e aos meus pais e irmã, por todo o carinho e investimento em minha educação básica, que me permitiram chegar até aqui. Que Deus os retribua em bênçãos os imensuráveis amor e apoio que sempre me fizeram seguir adiante, apesar dos atropelos da vida.

“Um dos grandes desafios atuais da humanidade é transformar toda a informação disponível em conhecimento e, por fim, todo o conhecimento em verdadeira sabedoria.”

AGRADECIMENTOS

Senhor, já não me recordo quantas vezes chamei por Ti todo este tempo. Clamei Teu nome de várias formas, cada dia de uma maneira.... E Tu, ali, comigo. Companheiro firme, fiel. Estendendo a mão nas horas aflitas. Encorajando para a batalha. Sorrindo junto com as vitórias. Senhor, já nem me lembro quantos foram os momentos alegres. Poucos ou muitos, foram sempre intensos. Tu me mostravas portas abertas, caminhos múltiplos, soluções iluminadas, amizades eternas. Recordações inumeráveis! Senhor, me falha a mente ao relembrar o quanto tenho a agradecer. Mas, me é clara, é transparente, Tua importância até aqui. Elevo agora todo o meu ser para Te louvar , para bendizer, quem com certeza esteve a cada instante, ao meu lado dizendo: “Filha, segue em frente, você vai vencer!”.

Primeiramente, agradeço ao Senhor, meu Deus, e à minha amada Nossa Senhora, que me guiaram e protegeram a cada dia de atividades e de estrada, me abençoando com Sua companhia sempre.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Sérgio Aquino, toda a minha gratidão e respeito, pela confiança ao me aceitar como mestrande e pela enorme amizade e contribuição ao meu aprendizado com disposição em ajudar e dividir seu conhecimento sempre.

Agradeço ao meu co-orientador, Prof. Dr. Robson Afonso, por toda a confiança no meu trabalho, amizade e carinho, desde sempre, que me permitiram crescer pessoal e profissionalmente de maneira gigantesca e apostar mais em meu potencial.

Gostaria de agradecer à FAPEMIG, pelo completo suporte financeiro ao projeto, sem o qual sua conclusão teria sido impossível.

Agradeço à UFOP, por ceder suas instalações e infra-estrutura ao nosso aprendizado e ao PROAGUA, seus professores e funcionários, que agregaram conhecimento ou auxiliaram com sua experiência, formação e opiniões diante dos mais variados problemas e assuntos. De forma especial, agradeço aos Professores Maurício Coutrim, Jorge Adílio, Cornélio e

Silvana, que mesmo sem vínculo formal com este projeto, contribuíram sobremaneira dividindo seu espaço, conhecimento e experiência em sua área de atuação.

Agradeço a todos os colegas de laboratório, sem exceção, cuja ajuda foi muito além de treinamentos e resolução de problemas e que com seu sorriso e amizade, proporcionaram um ambiente leve e alegre, onde boas idéias e conversas puderam surgir. Gratidão muito especial aos meus colegas da iniciação científica que compartilharam esta pesquisa comigo em alguma etapa ou por completo, Amália, Mark, Miriany, Emanuel e Nathália, cujo esforço e dedicação foram fundamentais na conclusão do meu mestrado e sem os quais eu jamais teria conseguido. Gostaria de expressar toda a minha enorme gratidão e apreço ao Júlio, cujo auxílio foi ímpar para as análises cromatográficas e por espectrometria de massas e sem o qual a etapa final do projeto não teria sido concluída no prazo. Mesmo na sobrecarga, ele tinha sempre uma incomparável boa vontade e um “calma, Patrícia!” para me ajudar. Deus te pague, Júlio! Ao Anselmo, ao Carlúcio, à Fernanda, à Lorena, ao Gustavo, ao Davi e ao Aniel, meus agradecimentos por compartilharem seu conhecimento e me treinarem em algumas análises fundamentais para esta pesquisa. À Cássia e à Débora, todo o meu carinho, por toda a ajuda e pela grande amizade construída, por cada sorriso e palavra de apoio e incentivo! Aos colegas do laboratório de espectrometria de massas, que me acolheram tão bem em seu espaço e agregaram muito com cada “troca de idéias”, meu “muito obrigado”!

Gostaria de agradecer à minha mãe, Rosângela, e à minha irmã, Fernanda, pelo ombro amigo sempre, por todo o apoio, preocupação e incentivo para mais este desafio. Agradeço ao meu pai, Léo, que, mesmo de longe, não cansou de torcer por mais esta vitória. A eles, agradeço também pela base de caráter e comprometimento e por todo o investimento num ensino básico de qualidade, que me preparou para “vôos mais altos”.

Finalmente, agradeço enormemente ao meu esposo, Leonardo, meu “anjo e porto-seguro”, que tantas vezes abdicou da minha companhia e presença em função das minhas atividades, pela enorme paciência, por acreditar tanto em mim e apostar na minha capacidade, por ter sido o grande incentivador desta etapa da minha vida e por dividir comigo todos os momentos, por mais difíceis que sejam. Esta vitória é nossa!

SUMÁRIO

Resumo	xv
Abstract.....	xvii
1. Introdução.....	1
2. Objetivos.....	4
2.1. Objetivo geral	4
2.2. Objetivos específicos.....	4
3. Revisão da Literatura.....	5
3.1. Bioenergética e microbiologia do tratamento biológico.....	5
3.2. A DQO residual e os Produtos Microbianos Solúveis - SMPs	11
3.3. Fatores que afetam a produção de SMPs.....	15
3.4. Consequências da produção de SMPs	22
3.5. Caracterização da DQO efluente de reatores biológicos.....	25
3.6. Conclusões da revisão de literatura	30
4. Material e Métodos.....	32
4.1. Aparato experimental	32
4.2. Condições operacionais dos reatores de bancada.....	34
4.3. Técnicas analíticas.....	35
4.3.1. Preparação geral das amostras.....	35
4.3.2. pH e Oxigênio Dissolvido (OD).....	36
4.3.3. Demanda Química de Oxigênio (DQO).....	36
4.3.4. Sólidos Suspensos Voláteis (SSV).....	37
4.3.5. Ácidos Graxos Voláteis (AGVs) e glicose.....	37
4.3.6. Análise de Proteínas	38
4.3.7. Análise de Carboidratos	39
4.4. Cálculo da concentração de SMPs	40
4.5. Análise por espectrometria de massas.....	40
4.6. MALDI-ToF-MS.....	43
4.7. Lise Celular e Extração de EPS de Amostras de Lodo.....	44
4.7.1. Preparação das amostras para os procedimentos de lise celular e extração de EPS de amostras de lodo.....	44
4.7.2. Extração de EPS	45
4.7.3. Lise Celular	46

5. Resultados e Discussão.....	47
5.1. Quantificação dos SMPs em diferentes condições operacionais.....	47
5.1.1. Tipo de tratamento: aeróbio x anaeróbio.....	47
5.1.2. Condições operacionais.....	65
5.2. Caracterização dos SMPs.....	75
5.2.1. Proteínas e carboidratos.....	75
5.2.1. Espectrometria de massas.....	83
6. Conclusões e sugestões para trabalhos futuros.....	96
7. Referências Bibliográficas.....	100
Anexo.....	107
Apêndice.....	117

Lista de Figuras

Figura 3.1 - Esquema ilustrativo do ciclo de Krebs

Figura 3.2 - Etapas de degradação anaeróbia da matéria orgânica

Figura 3.3 – Classificação da DQO residual de tratamento biológico de águas residuárias

Figura 3.4 – Produção de SMPs em função da idade do lodo. Fonte: Aquino (2003)

Figura 4.1 - Foto da montagem experimental

Figura 4.2 – Critérios utilizados para a escolha das relações m/z a serem consideradas para identificação

Figura 5.1 - Variação da DQO no afluente e efluente dos reatores aeróbio e anaeróbio ao longo das fases operacionais estudadas (valores expressos como mediana)

Figura 5.2 – Interação entre o tipo de reator e as fases operacionais para o parâmetro DQO

Figura 5.3 – Variação do teor de sólidos suspensos totais (SST) e voláteis (SSV) nos reatores aeróbio e anaeróbio ao longo das fases operacionais estudadas (valores expressos como medianas)

Figura 5.4 – Interação entre o tipo de reator e as fases operacionais para o parâmetro SSV

Figura 5.5 – Variação do pH nos reatores, antes de sua correção para a faixa neutra

Figura 5.6 – Composição da DQO residual para o reator aeróbio nas diferentes fases operacionais: (a) fase I, (b) fase II, (c) fase III, (d) fase IV, (e) fase V, (f) fase VI

Figura 5.7 – Composição da DQO residual para o reator anaeróbio nas diferentes fases operacionais: (a) fase I, (b) fase II, (c) fase III, (d) fase IV, (e) fase V, (f) fase VI

Figura 5.8 – Variação do oxigênio dissolvido no reator aeróbio (valores expressos em medianas)

Figura 5.9 – Acúmulo de ácidos graxos voláteis (AGVs) nos reatores aeróbio e anaeróbio nas diferentes fases operacionais (valores expressos em medianas).

Figura 5.10 – Estimativa de acúmulo dos SMPs nos reatores aeróbio e anaeróbio para as diferentes condições operacionais (valores expressos em medianas)

Figura 5.11 – Interação entre o tipo de reator e as fases operacionais para o parâmetro SMPs

Figura 5.12 – Produção de SMPs normalizada em relação à DQO afluente (SMP/S_o) nos reatores anaeróbio e aeróbio durante as fases operacionais estudadas (valores expressos como medianas)

Figura 5.13 – Interação entre o tipo de reator e as fases operacionais para a produção normalizada (SMP/So) de SMPs

Figura 5.14 – Estimativa da conversão diária de biomassa a SMPs nos reatores aeróbio e anaeróbio durante as fases operacionais estudadas (valores expressos como medianas)

Figura 5.15 – Interação entre o tipo de reator e a razão entre o acúmulo de SMPs e a biomassa presente no sistema

Figura 5.16 – Temperatura das fases operacionais

Figura 5.17 – Interação da temperatura na produção normalizada de SMPs em relação à DQO afluente (SMP/So), por reator

Figura 5.18 – Interação da temperatura na razão entre a quantidade de SMPs acumulada e a quantidade de biomassa presente no sistema

Figura 5.19 – Efeito do TDH no acúmulo de SMPs nos reatores aeróbio e anaeróbio

Figura 5.20 – Efeito do TDH na taxa de conversão da DQO afluente em SMPs, por reator.

Figura 5.21 – Interferência do TDH na razão entre o acúmulo de SMPs e a biomassa presente no sistema

Figura 5.22 – Efeito do substrato na produção de SMPs, por reator

Figura 5.23 – Efeito do tipo de substrato na taxa de conversão da DQO afluente em SMPs, por reator

Figura 5.24 – Efeito do tipo de substrato na razão entre o acúmulo de SMPs e a biomassa presente no sistema

Figura 5.25 – Composição acumulada da DQO residual, dos polímeros extracelulares e dos produtos de lise celular em termos de proteínas e carboidratos – Reator Aeróbio

Figura 5.26 – Composição acumulada da DQO residual, dos polímeros extracelulares e dos produtos de lise celular em termos de proteínas e carboidratos – Reator Anaeróbio

Figura 5.27 – Composição percentual da DQO residual (porcentagens das contribuições dos teores de proteínas, carboidratos e porcentagem indeterminada da DQO) para o reator aeróbio

Figura 5.28 – Composição percentual da DQO residual (porcentagens das contribuições dos teores de proteínas, carboidratos e porcentagem indeterminada da DQO) para o reator anaeróbio

Figura 5.29 – Efeitos principais para análise de carboidratos por amostra, reator e fase operacional

Figura 5.30 – Interação entre o tipo de reator, fases operacionais e amostras para análise de carboidratos

Figura 5.31 – Efeitos principais para análise de proteínas por amostra, reator e fase operacional

Figura 5.32 – Interação entre o tipo de reator, fases operacionais e amostras para análise de proteínas

Figura 5.33 – Análise de componentes principais das relações m/z obtidas por espectrometria de massas, por amostra

Figura 5.34 – Análise de componentes principais das relações m/z obtidas por espectrometria de massas nas amostras dos afluentes e efluentes a cada fase operacional, nas amostras de extratos de polímeros extracelulares (EPS) e de produtos de lise celular para as fases IV, V e VI

Figura 5.35 – Gráfico dinâmico para a contagem das relações m/z presentes nos efluentes e ausentes nos afluentes

Figura 5.36 – Espectro de massas para o efluente anaeróbico da fase VI, para as relações massa/carga $m/z=339,20$ e $m/z=325,18$

Figura 5.37 – Espectro de massas obtido para análise de massa segunda da relação massa/carga $m/z=339,1987$. Amostra do efluente anaeróbico da fase VI

Figura 5.38 – Espectro de massas obtido para análise de massa segunda da relação massa/carga $m/z=325,1832$. Amostra do efluente anaeróbico da fase VI

Figura 5.39 – Estrutura química típica do alquilbenzeno sulfonado de cadeia linear (LAS)

Figura A.1 – Ajustes para a determinação da faixa de aplicação para os AGVs (a) fórmico; (b) acético; (c) propiônico; (d) isobutírico; (e) butírico; (f) isovalérico; (g) valérico

Figura A.2 – Linearidade e análise de regressão para o ácido fórmico

Figura A.3 – Linearidade e análise de regressão para o ácido acético

Figura A.4 – Linearidade e análise de regressão para o ácido propiônico

Figura A.5 – Linearidade e análise de regressão para o ácido isobutírico

Figura A.6 – Linearidade e análise de regressão para o ácido butírico

Figura A.7 – Linearidade e análise de regressão para o ácido isovalérico

Figura A.8 – Linearidade e análise de regressão para o ácido valérico

Figura A.9 – Seletividade e análise de regressão para o ácido fórmico

Figura A.10 – Seletividade e análise de regressão para o ácido acético

Figura A.11 – Seletividade e análise de regressão para o ácido propiônico

Figura A.12 – Seletividade e análise de regressão para o ácido isobutírico

Figura A.13 – Seletividade e análise de regressão para o ácido butírico

Figura A.14 – Seletividade e análise de regressão para o ácido isovalérico

Figura A.15 – Seletividade e análise de regressão para o ácido valérico

Figura A.16 – Resultado da exatidão do método de análise de AGVs para o ácido fórmico

Figura A.17 – Resultado da exatidão do método de análise de AGVs para o ácido acético

Figura A.18 – Resultado da exatidão do método de análise de AGVs para o ácido propiônico

Figura A.19 – Resultado da exatidão do método de análise de AGVs para o ácido isobutírico

Figura A.20 – Resultado da exatidão do método de análise de AGVs para o ácido butírico

Figura A.21 – Resultado da exatidão do método de análise de AGVs para o ácido isovalérico

Figura A.22 – Resultado da exatidão do método de análise de AGVs para o ácido valérico.

Lista de Tabelas

Tabela 3.1 – Reações químicas envolvidas no processo de degradação de acetato e glicose em sistemas aeróbios e anaeróbios

Tabela 3.2 - Fatores que dão origem à produção de compostos microbianos

Tabela 4.1 - Composição da solução nutricional para DQO afluente de 5.000mg/L

Tabela 4.2 – Fases operacionais dos reatores de bancada

Tabela 5.1 – Estatística descritiva para o parâmetro DQO

Tabela 5.2 – Resultados dos testes de medianas para as diferentes fases operacionais nos reatores aeróbio e anaeróbio

Tabela 5.3 – Amostras mais frequentemente consideradas para investigação, presentes nos efluentes e ausentes nos afluentes das fases operacionais

Tabela 5.4 – Novas relações m/z para investigação, presentes nos efluentes e ausentes nos afluentes das fases operacionais estudadas

Tabela A.1 – Resultados da relação sinal/ruído (*signal/noise*) para a determinação dos limites de detecção e quantificação da metodologia de análise de AGVs

Tabela A.2 – Dados de áreas de picos para a concentração de 200mg/L da mistura de AGVs para a avaliação da precisão do método

Tabela A.3 – Valores dos coeficientes angulares, em ordem crescente, para os AGVs, revelando a sensibilidade de cada ácido

Lista de Notações

A/M - relação alimento/microrganismo
ABR - reator anaeróbio compartimentado
AFAE – afluentes aeróbios
AFAN – afluentes anaeróbios
AGV – ácidos graxos voláteis
ASM 3 – modelo de lodos ativados nº 3 (*activated sludge model 3*)
ATP - trifosfato de adenosina
BAP – SMPs produzidos como resultado do decaimento endógeno
CABR - reator anaeróbio compartimentado com carreador
CLP - produtos de lise celular
CMD - concentração média determinada
CST - tempo de sucção capilar
CV - coeficiente de variação
DBO - demanda bioquímica de oxigênio
DP – desvio padrão
DQO – demanda química de oxigênio
DQO:N:P – relação DQO:nitrogênio:fósforo
EFAE – efluentes aeróbios
EFAN – efluentes anaeróbios
EI – impacto por elétrons
EPS – substâncias poliméricas extracelulares
EPSAE – substâncias poliméricas extracelulares extraídas do lodo aeróbio
EPSAN – substâncias poliméricas extracelulares extraídas do lodo anaeróbio
ETE – estação de tratamento de esgoto/efluente
FI a FVI – fases operacionais, de I a VI
FIA - análise por injeção de fluxo
GC-MS - cromatografia a gás acoplada a espectrometria de massa
HPLC – cromatografia líquida de alta eficiência
IT – armadilha de íons
LAS - alquilbenzeno sulfonados de cadeia linear
LC - cromatografia de fase líquida

LD - limite de detecção
LISE – amostras de lisados
LISEAE – amostras de lisados de células do lodo aeróbio
LISEAN – amostras de lisados de células do lodo anaeróbio
LQ - limite de quantificação
M/Z – relação massa/carga
MALDI-ToF-MS - técnica de espectrometria de massas por ionização e dessorção assistida por laser
MBR - bioreator a membranas
MS – espectrômetro de massas
MS2 – massa segunda
OD – oxigênio dissolvido
PCA – análise estatística por componentes principais
 r^2 - coeficiente de determinação
 r_{ut} - taxa de utilização do substrato
SAB – proteína soro-albumina-bovina
SBR - reatores seqüenciais a batelada
SMP – produtos microbianos solúveis
SMP/S₀ - produção normalizada, em relação à DQO afluente, de SMPs
S₀ – DQO afluente
SST – sólidos suspensos totais
SSV – sólidos suspensos voláteis
TDC – tempo de detenção celular
TDH – tempo de detenção hidráulica
TOF – tempo de voo
UAP – SMPs produzidos como resultado da utilização do substrato
UASB – reator anaeróbio de manta de lodo de fluxo ascendente
Vd - valor desejado
Vr - valor real

Resumo

O tratamento biológico é caracterizado pela utilização de bactérias, aeróbias e/ou anaeróbias, para a degradação da matéria orgânica poluente. A análise da demanda química de oxigênio (DQO) é frequentemente utilizada para quantificar a matéria orgânica nos efluentes e medir a eficiência do tratamento biológico. A DQO efluente de reatores biológicos é compreendida não apenas por compostos afluentes que não foram degradados, mas também por compostos produzidos pelos microrganismos durante o tratamento, denominados na literatura internacional de SMPs (*Soluble Microbial Products*). Acredita-se que a minimização da DQO residual de sistemas biológicos operados na ausência de estresse e alimentados com esgoto tipicamente biodegradável pode estar diretamente relacionada à minimização da produção de SMPs e, muito embora a importância dos SMPs já tenha sido reconhecida, a revisão da literatura mostra que poucas pesquisas tentaram identificar sua estrutura química bem como relacionar sua produção a parâmetros de operação dos reatores. Portanto, o principal objetivo desta pesquisa foi caracterizar, do ponto de vista quantitativo e qualitativo, os compostos microbianos presentes na fração centrifugada do efluente de reatores aeróbio e anaeróbio de mistura completa operados em escala de bancada e alimentados com glicose e acetato. Conforme esperado, a produção de SMPs no reator aeróbio foi superior à do anaeróbio (a produção normalizada em relação à DQO afluente para as diferentes condições operacionais – SMP/So - variou de 2 a 68% no reator aeróbio e de 9 a 27% no reator anaeróbio). No reator anaeróbio, a carga orgânica aplicada não apresentou interferência significativa na conversão da DQO afluente a SMPs sugerindo que os SMPs acumulados podem ter origem principal no decaimento da biomassa ao invés da utilização do substrato. Já no reator aeróbio parece ter ocorrido o contrário. Considerando o tipo de substrato, a utilização de acetato contribuiu para uma maior produção normalizada de SMPs em ambos os reatores, comparativamente à glicose (no reator aeróbio, SMP/So de 41,9% para o acetato *versus* 14,1% para a glicose; no reator anaeróbio, 21,9% e 16,6% para o uso de acetato e de glicose, respectivamente). Já a temperatura parece não ter interferido significativamente na relação SMP/So no reator anaeróbio (18,1% a 15°C e 18,3% a 25°C). Por outro lado, no reator aeróbio, a produção normalizada de SMPs foi superior à temperatura de 15°C (33,8% contra 18,7% a 25°C). No reator aeróbio, a DQO relacionada ao teor de proteínas representou de 5 a 34% da DQO residual e o teor de carboidratos (também em termos de DQO) não ultrapassou 16%; já para o reator anaeróbio, o teor de proteínas atingiu seu máximo em 17% da DQO residual,

o que confirma que a maior parte da DQO residual não foi proveniente de proteínas e carboidratos. Em relação aos resultados de espectrometria de massas, os SMPs produzidos em cada fase operacional não pareceram provenientes de lise celular ou de EPS. A ocorrência predominante de SMPs de baixas massas molares indicou produtos associados à utilização do substrato ou provenientes da degradação e/ou hidrólise de SMPs de alta massa molar.

Abstract

Biological wastewater treatment is characterized by aerobic and/or anaerobic bacteria that degrade pollutant organic matter and parameters such as chemical oxygen demand (COD) are usually used to assess these treatments efficiency. Biological reactors effluent COD is comprised not only of influent compounds that have not been degraded, but also of some compounds produced by microorganisms during treatment, known as SMPs (*Soluble Microbial Products*) in the literature. It is believed that the decrease of effluent COD in non-stressed conditions biological systems fed with typically biodegradable sewage can be straightly connected to minimizing SMP production and, even though SMP importance had already been recognized, literature review shows that only few researches were dedicated to identifying their chemical structure, as well as to relating their production to reactors operational parameters. Therefore, the main goal of this research was to characterize, through quantitative and qualitative approaches, the microbial products present in the supernatant of aerobic and anaerobic bench scale CSTR fed with glucose and acetate. As expected, SMP production in the aerobic CSTR was higher than in the anaerobic one (normalized production of SMP concerning influent COD in different operational conditions – SMP/So – varied from 2 to 68% in the aerobic reactor and from 9 to 27% in the anaerobic reactor). In the anaerobic CSTR, the organic load did not seem to have interfered to the conversion from influent COD to SMP (SMP/So ratio), what suggests that accumulated SMP can have come mainly from biomass decay, rather than from substrate use. However, in the aerobic CSTR the opposite seems to have happened. Concerning substrate kind, acetate use contributed to a higher normalized production of SMP in both reactors, compared to glucose (in the aerobic reactor, SMP/So was 41,9% for acetate versus 14,1% for glucose; in the anaerobic reactor, 21,9% and 16,6% for acetate and glucose, respectively). Temperature did not seem to have significantly interfered to SMP/So rate in the anaerobic reactor (18,1% at 15°C and 18,3% at 25°C). On the other hand, in the aerobic CSTR, normalized SMP production was higher at 15°C (33,8% against 18,7% at 25°C). In the aerobic reactor, COD related to protein amount represented 5 to 34% of effluent COD and carbohydrates COD was not higher than 16%; in the anaerobic CSTR, protein amount achieved its maximum at 17% of effluent COD, what confirms that the majority of effluent COD had not come from proteins and carbohydrates. As far as mass spectrometry results are concerned, SMP produced by each operational phase did not

seem to have come from cell lysis or EPS. The predominance of low molecular weight SMP indicated products related to substrate use or to degrading/ hydrolysis of high molecular weight SMP.

1. Introdução

Embora haja uma ampla variedade de processos disponíveis para o tratamento de águas residuárias, o emprego de sistemas biológicos para o tratamento de esgotos sanitários já é consolidado no mundo. Durante o tratamento biológico, seja ele aeróbio, facultativo ou anaeróbio, microrganismos utilizam a matéria orgânica presente na água residuária como fonte de carbono e energia. Sendo assim, o crescimento de microrganismos nos reatores biológicos é acompanhado pela redução na quantidade de matéria orgânica, geralmente expressa como demanda química de oxigênio (DQO), afluente ao reator. Com base na premissa de que o aumento da massa microbiana nos reatores biológicos causa aumento na degradação da matéria orgânica afluente, acreditava-se que o aumento do tempo de retenção dos microrganismos (TDC – tempo de detenção celular ou idade do lodo) e/ou do tempo de detenção hidráulica (TDH) no reator biológico resultaria em maiores eficiências de remoção e conseqüentemente redução da DQO efluente. Entretanto, estudos feitos por Chudoba e seu grupo, ainda na década de 60 (Chudoba, 1967; Chudoba *et al.*, 1968; Chudoba *et al.*, 1968 *apud* Aquino, 2004), mostraram que o aumento exagerado da idade do lodo em sistemas de lodos ativados, ao invés de resultar em aumento da eficiência de remoção, causou um aumento na DQO efluente dissolvida.

Pode-se dizer que os resultados controversos de Chudoba lançaram as bases para a teoria dos produtos microbianos solúveis (SMPs – do inglês *Soluble Microbial Products*). Tal teoria surgiu da constatação de que a interação dos microrganismos com o meio de cultivo resulta na liberação de compostos orgânicos que causam DQO, tanto na forma solúvel quanto particulada. Assim, a DQO efluente de reatores biológicos é compreendida não apenas por compostos afluentes que não foram degradados, mas também por compostos produzidos pelos microrganismos durante o tratamento. De fato, estudos sobre a caracterização da DQO residual em sistemas de tratamento biológico, feitos por diferentes grupos de pesquisa, demonstraram que a maioria dos compostos dissolvidos efluentes de sistemas aeróbios e anaeróbios não estava presente no afluente, mas foram produzidos durante o tratamento (Grady Jr e Williams 1975; Siber e Eckenfelder 1980; Parkin e McCarty 1981 *apud* Aquino 2004; Namkung e Rittmann 1986; Noguera *et al.* 1994; Barker *et al.* 1999; Barker e Stuckey 1999). Tais compostos oriundos do decaimento endógeno, do metabolismo do substrato e/ou deliberadamente excretados para

desempenhar alguma função microbiana, são agrupados no conjunto de compostos comumente denominado de SMPs que, segundo Jarusutthirak e Amy (2007), constituem a maioria da matéria orgânica solúvel em efluentes biológicos.

Para a maioria dos sistemas de tratamento bem operados, os fatores que afetam a produção de SMPs são os fatores que também afetam a concentração da DQO residual (Barker e Stuckey, 2001). Em outras palavras, foi mostrado que em sistemas alimentados com afluente biodegradável, em que não há acúmulo de intermediários, tais como os ácidos graxos voláteis (AGVs) formados durante a digestão anaeróbia, a DQO residual efluente será determinada pela produção dos SMPs (Noguera *et al.* 1994; Aquino e Stuckey 2004). Desta forma, alguns pesquisadores acreditam que a minimização da DQO residual de sistemas biológicos operados na ausência de estresse e alimentados com esgoto tipicamente biodegradável pode estar diretamente relacionada à minimização da produção de SMPs (Barker e Stuckey 1999; Barker e Stuckey 2001).

Além do impacto na qualidade dos efluentes biológicos, a produção de SMPs também é um aspecto importante nos reatores biológicos acoplados a membranas. Vários pesquisadores têm demonstrado que a colmatação interna de membranas tem sido atribuída em grande parte a tais compostos microbianos (Wang, 2007; Drews *et al.*, 2007; Fonseca *et al.*, 2007). De fato, os SMPs já têm sido incorporados à modelagem de reatores biológicos (com ou sem membranas, aeróbios e anaeróbios) (Aquino e Stuckey, 2008; Oliveira-Esquerre *et al.*, 2006; Le-Clech *et al.*, 2006; Rittmann e McCarty, 2001). Como exemplo, Oliveira-Esquerre *et al.* (2006) adaptaram um modelo matemático de plantas MBR já consolidado (ASM 3 – *Activated Sludge Model n° 3*), incorporando o conceito da formação de produtos microbianos. Segundo os autores, tais produtos foram incluídos na descrição do processo de biotransformação por constituírem a maioria da matéria orgânica no efluente, pelo papel que desempenham no fornecimento de substrato orgânico aos heterótrofos e pela crítica influência que exercem na taxa de fluxo da filtração das membranas. Entretanto, é difícil determinar estas interferências, devido à complexidade química, ao potencial de biodegradação e da carência de informações quanto à natureza dos SMPs.

Há vários fatores envolvidos na geração de produtos microbianos. Alguns deles foram observados trabalhando-se com culturas puras, enquanto outros foram demonstrados em sistemas de tratamento aeróbios e anaeróbios. Diferentes estudos mostraram que alguns SMPs desempenham uma função metabólica, seja pela propriedade quelante que pode ajudar na assimilação de metais nutrientes ou proteção contra toxicidade (Kuo e Parkin, 1996; Aquino e Stuckey, 2003; Aquino e Stuckey, 2004), seja para desempenhar outras funções, tais como para comunicação intercelular em sistemas de biofilmes (*quorum sensing*). Os SMPs podem ser excretados como resultado de uma deficiência nutricional, como no caso de excreção de compostos orgânicos no meio como mecanismo de ‘descarga’ de elétrons que não puderam ser utilizados no crescimento celular (Rittmann e McCarty, 2001). Finalmente, os SMPs podem advir ainda da hidrólise de substâncias poliméricas extracelulares (EPS) ou do decaimento endógeno (lise celular).

Embora a comunidade científica internacional já tenha reconhecido a importância dos SMPs para a definição da DQO residual em sistemas de tratamento biológico, pouco se avançou no conhecimento da identidade química desses compostos e nos fatores que afetam sua produção em sistemas aeróbios e anaeróbios. Dessa forma, o objetivo principal deste trabalho foi investigar os fatores operacionais e ambientais que afetam a produção de SMPs em reatores de bancada aeróbio e anaeróbio efetuando ainda uma caracterização química mais detalhada de tais compostos.

2. Objetivos

2.1. Objetivo geral

A pesquisa teve como objetivo principal caracterizar os compostos microbianos (SMPs) presentes nos sobrenadantes (fração centrifugada) do efluente de reatores aeróbio e anaeróbio de mistura completa operados em escala de bancada e alimentados com substrato sintético biodegradável e de fácil detecção.

2.2. Objetivos específicos

- Avaliar o efeito do tipo de tratamento (aeróbio x anaeróbio) na produção (quantidade e tipo) de compostos microbianos solúveis (SMP) durante o tratamento biológico, em escala de bancada, de substrato biodegradável e de fácil detecção.
- Avaliar o efeito das diferentes condições operacionais (tempo de detenção hidráulica , tipo de substrato, temperatura) na produção (quantidade e tipo) de compostos microbianos solúveis (SMP) durante o tratamento biológico, em escala de bancada, de substrato biodegradável e de fácil detecção.
- Efetuar uma caracterização química, usando técnicas de espectrometria de massas, para tentar identificar os principais compostos causadores da DQO residual no sobrenadante de efluentes de reatores anaeróbio e aeróbio de mistura completa operados em escala de bancada sob diferentes condições.

3. Revisão da Literatura

3.1. Bioenergética e microbiologia do tratamento biológico

O crescimento dos microrganismos no tratamento biológico ocorre devido à energia interna (energia potencial) armazenada em compostos reduzidos que, ao serem oxidados, perdem elétrons para agentes oxidantes. É essa movimentação de elétrons que fornece energia para a manutenção e o crescimento celular. A transformação de compostos químicos por reações de oxi-redução é responsável pela obtenção de energia, que desencadeia na célula processos metabólicos e reprodutivos. Os elétrons são removidos do doador primário e transferidos para carreadores de elétrons intracelulares (dispersos no citoplasma ou ligados a enzimas na membrana citoplasmática). Estes transportam os elétrons ao receptor final, que é, então, reduzido de forma a regenerar o carreador. A energia livre liberada ao longo de tal transferência é, pois, capturada pelas células e a quantidade de energia liberada por elétron transferido depende das propriedades químicas do doador e do receptor de elétrons. A energia produzida é obtida a partir das semi-reações envolvidas no processo. O metabolismo é a soma total de todos os processos químicos da célula e pode ser dividido em catabolismo e anabolismo. O catabolismo engloba todos os processos envolvidos na oxidação do substrato para a obtenção de energia; já o anabolismo está relacionado aos processos para a síntese de componentes celulares a partir das fontes de carbono (Rittmann e McCarty, 2001).

As reações apresentadas na Tabela 3.1 a seguir (Eq. 3.1 a 3.12), extraídas de Rittmann e McCarty (2001), mostram a energia envolvida em processos aeróbios e anaeróbios de degradação de dois substratos simples, a glicose e o acetato.

Observa-se que a metanogênese, que é um processo anaeróbio, fornece muito menos energia comparativamente à oxidação aeróbia da glicose e do acetato. De fato, em reatores aeróbios, o crescimento microbiano se dá muito mais rapidamente e favoravelmente que em reatores anaeróbios. Além disto, comparando-se o tipo de substrato, a glicose é capaz de fornecer mais energia que o acetato, em quaisquer dos processos (aeróbio ou anaeróbio), e isso ocorre devido à maior energia armazenada (potencial) na molécula de glicose.

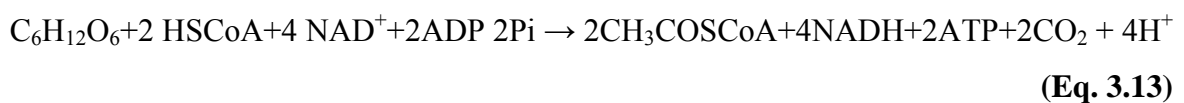
Tabela 3.1 – Reações químicas envolvidas no processo de degradação de acetato e glicose em sistemas aeróbios e anaeróbios

Metanogênese do acetato usando dióxido de carbono como acceptor final de elétrons:	
Doador: $1/8 \text{ CH}_3\text{COO}^- + 3/8 \text{ H}_2\text{O} = 1/8 \text{ CO}_2 + 1/8 \text{ HCO}_3^- + \text{H}^+ + \text{e}^-$	$\Delta G^0 = -27,40 \text{ kJ}$ (Eq. 3.1)
Aceptor: $1/8 \text{ CO}_2 + \text{H}^+ + \text{e}^- = 1/8 \text{ CH}_4 + 1/4 \text{ H}_2\text{O}$	$\Delta G^0 = 23,53 \text{ kJ}$ (Eq. 3.2)
Global: $1/8 \text{ CH}_3\text{COO}^- + 1/8 \text{ H}_2\text{O} = 1/8 \text{ CH}_4 + 1/8 \text{ HCO}_3^-$	$\Delta G^0 = -3,87 \text{ kJ}$ (Eq. 3.3)
Metanogênese da glicose usando dióxido de carbono como acceptor final de elétrons:	
Doador: $1/24 \text{ C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6 + 1/4 \text{ H}_2\text{O} = 1/4 \text{ CO}_2 + \text{H}^+ + \text{e}^-$	$\Delta G^0 = -41,35 \text{ kJ}$ (Eq. 3.4)
Aceptor: $1/8 \text{ CO}_2 + \text{H}^+ + \text{e}^- = 1/8 \text{ CH}_4 + 1/4 \text{ H}_2\text{O}$	$\Delta G^0 = 23,53 \text{ kJ}$ (Eq. 3.5)
Global: $1/24 \text{ C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6 = 1/8 \text{ CH}_4 + 1/8 \text{ CO}_2$	$\Delta G^0 = -17,82 \text{ kJ}$ (Eq. 3.6)
Oxidação aeróbia do acetato usando oxigênio molecular como acceptor final de elétrons:	
Doador: $1/8 \text{ CH}_3\text{COO}^- + 3/8 \text{ H}_2\text{O} = 1/8 \text{ CO}_2 + 1/8 \text{ HCO}_3^- + \text{H}^+ + \text{e}^-$	$\Delta G^0 = -27,40 \text{ kJ}$ (Eq. 3.7)
Aceptor: $1/4 \text{ O}_2 + \text{H}^+ + \text{e}^- = 1/2 \text{ H}_2\text{O}$	$\Delta G^0 = -78,72 \text{ kJ}$ (Eq. 3.8)
Global: $1/8 \text{ CH}_3\text{COO}^- + 1/4 \text{ O}_2 = 1/8 \text{ CO}_2 + 1/8 \text{ HCO}_3^- + 1/8 \text{ H}_2\text{O}$	$\Delta G^0 = -106,12 \text{ kJ}$ (Eq. 3.9)
Oxidação aeróbia da glicose usando oxigênio molecular como acceptor final de elétrons:	
Doador: $1/24 \text{ C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6 + 1/4 \text{ H}_2\text{O} = 1/4 \text{ CO}_2 + \text{H}^+ + \text{e}^-$	$\Delta G^0 = -41,35 \text{ kJ}$ (Eq. 3.10)
Aceptor: $1/4 \text{ O}_2 + \text{H}^+ + \text{e}^- = 1/2 \text{ H}_2\text{O}$	$\Delta G^0 = -78,72 \text{ kJ}$ (Eq. 3.11)
Global: $1/24 \text{ C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6 + 1/4 \text{ O}_2 = 1/4 \text{ CO}_2 + 1/4 \text{ H}_2\text{O}$	$\Delta G^0 = -120,07 \text{ kJ}$ (Eq. 3.12)

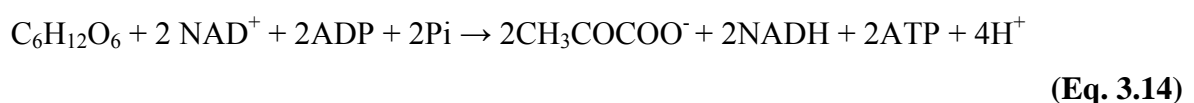
Os ácidos graxos voláteis (AGVs) são ácidos orgânicos advindos da fermentação da matéria orgânica, principalmente em sistemas anaeróbios. São referidos como produtos

intermediários do tratamento biológico anaeróbio. O processo de fermentação acontece quando compostos orgânicos são usados por microrganismos tanto como doadores quanto como aceptores de elétrons. Neste caso, parte da molécula é oxidada e outra parte é reduzida. Em processos anaeróbios de degradação da matéria orgânica que contém carboidratos, a formação de AGVs é notada preferencialmente à de etanol. Isto se deve ao fato de os microrganismos serem, na maioria dos casos, aqueles que encontraram as melhores rotas para a extração da energia disponível a partir dos carboidratos nas condições impostas. A energia disponível para a fermentação da glicose a etanol, por exemplo, é de $\Delta G^0 = -10 \text{ kJ/e- eq}$. Todavia, para a fermentação de glicose a acetato, a energia fornecida seria maior ($\Delta G^0 = -14 \text{ kJ/e- eq}$) (Rittmann e McCarty, 2001).

Os carboidratos são polissacarídeos, tais como celulose, amido e açúcares complexos. A hidrólise enzimática de carboidratos normalmente produz 6-carbonos (hexoses) ou 5-carbonos (pentoses). Estes açúcares simples possuem um conteúdo de energia maior do que o acetato ou a maioria de outras moléculas orgânicas simples. Por esta razão, os microrganismos frequentemente podem obter energia dos carboidratos por rotas fermentativas anaeróbias que levam a produtos finais menos energéticos (Rittmann e McCarty, 2001). Entretanto, quando um acceptor final de elétrons (como o oxigênio ou gás carbônico exemplificados nas Equações 3.1 a 3.12, por exemplo) está disponível, os carboidratos seguem as rotas de formação de acetil-coenzima A (CH_3COSCoA ou acetilCoA), que então entra no ciclo de ácido cítrico ou ciclo de Krebs, ilustrado na Figura 3.1. A Eq. 3.13 mostra a reação de conversão da glicose em acetil-CoA:



Se um acceptor final de elétrons não está disponível, muitos microrganismos facultativos podem obter energia da glicose usando este substrato orgânico como o doador e o acceptor de elétrons. Este processo fermentativo termina na etapa de produção de piruvato ou antes da formação de acetil-CoA:



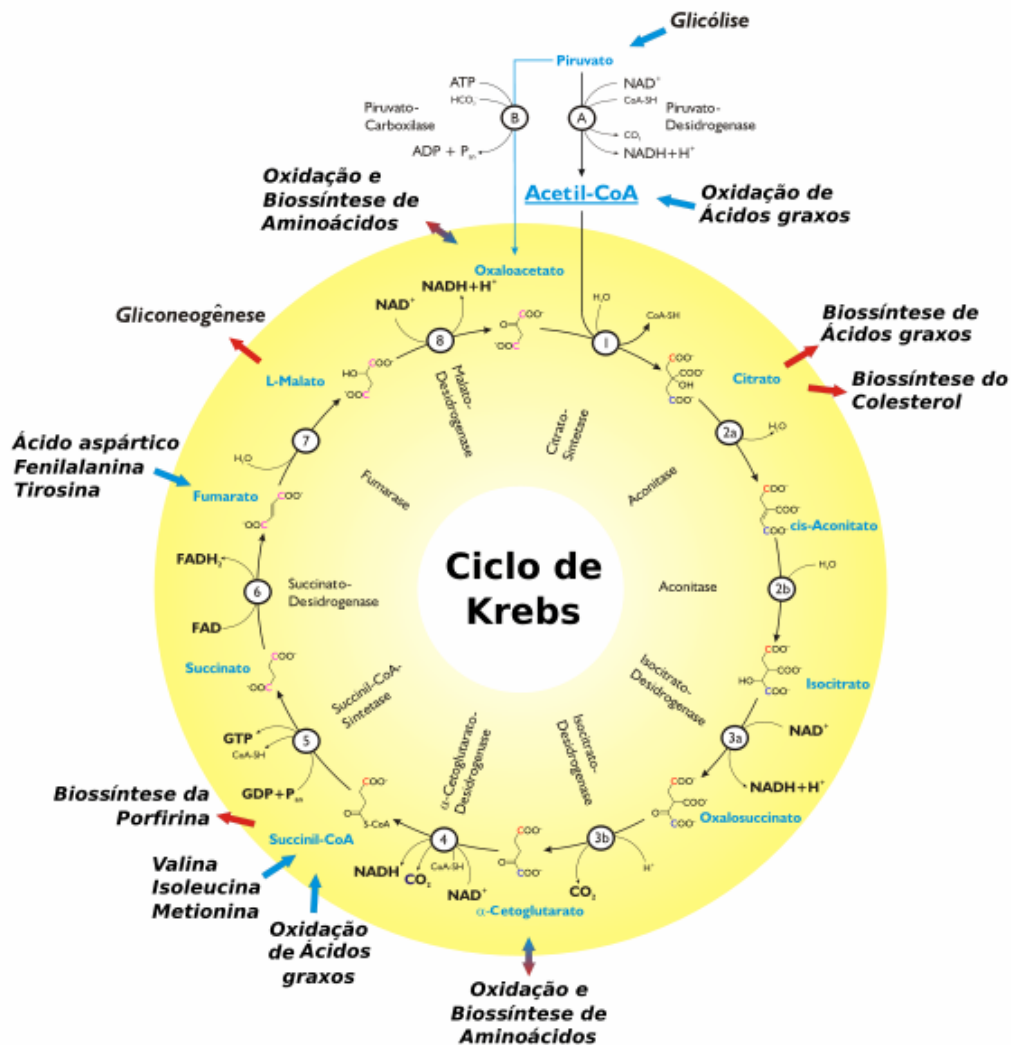


Figura 3.1- Esquema ilustrativo do ciclo de Krebs.¹

A energia liberada da transformação da glicose em piruvato é usada para produzir duas moléculas de trifosfato de adenosina (ATP), que é usada dentro da célula como moeda energética. Entretanto, duas moléculas de NADH (carreador orgânico reduzido, ou seja, com elétrons) também são formados. Uma vez que o microrganismo não tem aceptor final de elétrons para regenerar a molécula de NAD^+ (carreador orgânico oxidado, ou seja, sem elétrons) necessária para completar a reação, a célula precisa expulsar os elétrons presentes nos dois mols de NADH, e isto é conseguido por meio da transferência destes elétrons de volta para o piruvato, levando à formação de uma variedade de possíveis compostos. Produtos finais possíveis são etanol, acetato ou ainda uma mistura de compostos orgânicos simples, tais como propanol, butanol, formiato, propionato, butirato. Estes produtos finais

¹Fonte: http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Ciclo_de_Krebs.svg, consultado em 26/05/09

formados dependem dos microrganismos envolvidos e das condições ambientais/operacionais presentes (Rittmann e McCarty, 2001).

Três grupos distintos de microrganismos são essenciais no tratamento anaeróbio de águas residuárias: (i) bactérias fermentativas (acidogênicas); (ii) bactérias sintróficas (acetogênicas) e (iii) microrganismos metanogênicos. A maioria dos microrganismos acidogênicos fermenta açúcares, aminoácidos e ácidos graxos resultantes da hidrólise da matéria orgânica complexa, produzindo ácidos orgânicos (principalmente acético, propiônico e butírico), álcoois (etanol), cetonas (acetona), dióxido de carbono e hidrogênio. A Figura 3.2 adaptada de Gujer e Zehnder (1983) apresenta um esquema da degradação anaeróbia da matéria orgânica.

Os microrganismos fermentativos são os primeiros a atuar na degradação do substrato e são os que mais se beneficiam energeticamente. Portanto, as bactérias acidogênicas possuem as mais elevadas taxas de crescimento do consórcio microbiano, com tempo mínimo de geração (cerca de 30 minutos). Os microrganismos sintróficos acetogênicos convertem compostos orgânicos intermediários (propionato, butirato...) em acetato, hidrogênio e dióxido de carbono. Entretanto, as reações acetogênicas não são termodinamicamente favoráveis em condições padrão, ocorrendo apenas graças à interação de microrganismos acetogênicos e metanogênicos. Mesmo assim, a energia obtida no processo é baixa (56,6 kJ/mol propionato) e tem que ser dividida entre as três espécies de microrganismos envolvidas (acetogênicos, metanogênicos acetoclásticos e metanogênicos hidrogenotróficos). Portanto, esta etapa é fundamental em reatores anaeróbios e as baixas taxas de crescimento de determinadas espécies do consórcio microbiano contribuem para problemas relacionados à sua estabilidade (Aquino e Chernicharo, 2005).

Os microrganismos metanogênicos acetoclásticos são os mais importantes no consórcio microbiano, uma vez que a remoção de DQO da fase líquida depende da conversão de acetato a gás metano. Conforme discutido em Aquino e Chernicharo (2005), os microrganismos metanogênicos possuem lento crescimento (tempo de geração mínimo de 2 a 3 dias) e é provável que a acumulação de acetato ocorra no meio pela limitação de tais microrganismos. De qualquer forma, o acúmulo de AGVs ocorre em sistemas de escala real como resultado do não atendimento às condições cinéticas e termodinâmicas ótimas, refletindo ou indicando uma condição de instabilidade (Aquino e Chernicharo, 2005).

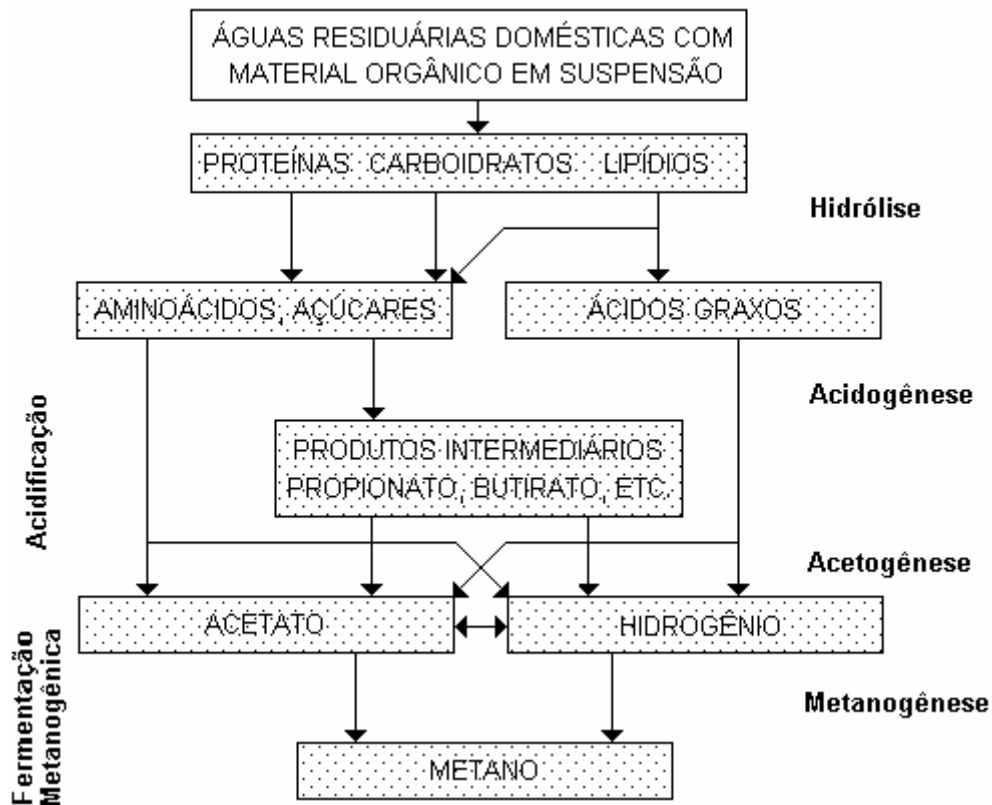


Figura 3.2 - Etapas de degradação anaeróbica da matéria orgânica Fonte: Gujer e Zehnder (1983).

Em sistemas aeróbios, existe disponibilidade de oxigênio (para atuar como acceptor de elétrons) e os microrganismos que podem usá-lo preferem esta rota, uma vez que é desejável a obtenção do máximo de energia possível (o que se dá quando se dispõe de oxigênio, conforme descrito anteriormente). Portanto, “microrganismos aeróbios precisam dispor de poucos elétrons do doador para fornecer ao oxigênio e gerar a energia requerida para sintetizar uma determinada quantidade de biomassa, o que os permite ter uma taxa de crescimento muito superior (quando as células crescem rapidamente em condições favoráveis, o investimento da energia para a síntese é máximo)” (Rittmann e McCarty, 2001). Além disto, esta conversão acontece “em paralelo”, uma vez que, apesar da diferença populacional presente em sistemas aeróbios em diferentes condições operacionais, há uma forte redundância funcional destes microrganismos (muitos atuam da mesma forma e fazem a mesma coisa); desta forma, uma estabilidade maior no consórcio microbiano aeróbio é verificada e condições adversas não comprometem a população tão seriamente quanto aconteceria em sistemas anaeróbios.

A conversão de substrato a produto final leva à formação de intermediários que, juntamente com o substrato não degradado, causam DQO residual. Contudo, outros compostos advindos diretamente da morte de células ou excretados para desempenhar alguma função microbiana também são produzidos e um dos objetivos deste trabalho é avançar na caracterização desse material.

3.2. A DQO residual e os Produtos Microbianos Solúveis - SMPs

A demanda química de oxigênio (DQO) é definida como a quantidade de oxigênio necessária para oxidar os componentes de uma amostra que sejam oxidáveis por um agente oxidante forte (geralmente dicromato de potássio) em uma solução ácida (APHA, 1998). Uma vez que as reações de oxi-redução envolvem a transferência de elétrons, a DQO quantifica, indiretamente, a quantidade de elétrons que pode ser potencialmente transferida da matéria orgânica não estabilizada (poluente e doador) para um aceptor final que esteja disponível (Aquino, 2003).

Dessa forma, a DQO residual mede a matéria passível de oxidação que aparece no efluente e que não é removida nas condições operacionais/ambientais impostas durante o tratamento. Como a transferência de elétrons é responsável pela obtenção de energia necessária aos microrganismos, conforme descrito anteriormente, a DQO residual dissolvida constitui-se, em última instância, em elétrons não investidos na produção energética ou em elétrons convertidos em compostos intermediários e produtos microbianos solúveis (do inglês *soluble microbial products* – SMPs) (Aquino, 2003). De fato, Barker e Stuckey (1999) definem DQO residual dissolvida como sendo o “conjunto” formado por substrato residual degradável, compostos refratários do afluente, compostos intermediários (ácidos graxos voláteis – AGVs) formados no tratamento e SMPs produzidos durante o tratamento. A Figura 3.3, adaptada de Aquino (2003), apresenta um esquema da DQO residual efluente ao tratamento biológico de águas residuárias.

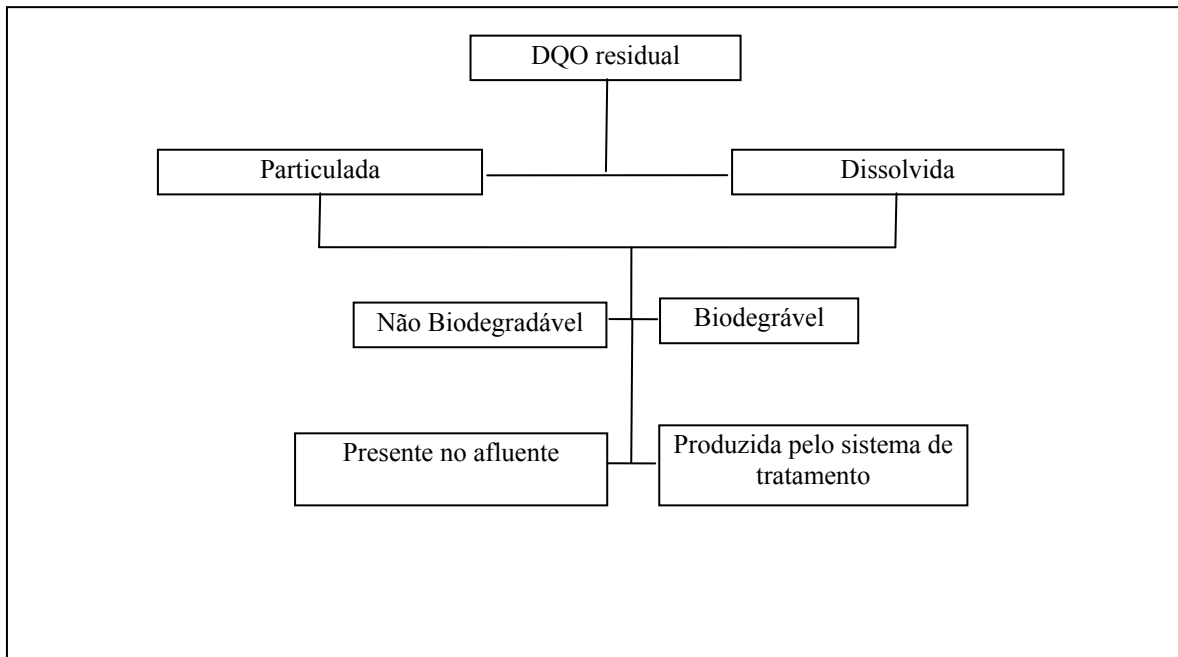


Figura 3.3 - Classificação da DQO residual de tratamento biológico de águas residuárias

Vários pesquisadores têm demonstrado que, em sistemas de tratamento bem operados, a maior parte da DQO residual não é proveniente do substrato não degradado ou de intermediários produzidos, mas sim de SMPs (Chudoba, 1967; Grady e Williams, 1975; Siber e Eckenfelder, 1980 *apud* Aquino, 2004; Parkin e McCarty, 1981; Namkung e Rittmann, 1986; Noguera *et al.*, 1994; Barker e Stuckey, 2001; Aquino e Stuckey, 2004; Jarusutthirak e Amy, 2007; Aquino e Stuckey, 2008). Drewes e Fox (1999) *apud* Jarusutthirak e Amy (2006) demonstraram que a matéria orgânica efluente a sistemas de tratamento de água residuária consiste de (i) matéria orgânica natural refratária contida nas fontes naturais de água potável, (ii) compostos orgânicos sintéticos em níveis-traço produzidos durante o uso doméstico e subprodutos de desinfecção gerados durante os processos de desinfecção da água e do tratamento de águas residuárias, e (iii) produtos microbianos solúveis (SMPs) produzidos durante processos biológicos de tratamento de águas residuárias. Segundo Liang *et al.* (2007), a concentração de SMPs no efluente determina efetivamente os níveis de DQO residual em águas residuárias tratadas, sendo necessário um melhor entendimento sobre os SMPs e fatores que levem à sua minimização, com vistas a melhorar o desempenho do tratamento biológico .

Boero *et al.* (1991), estudando sistemas aeróbios, definiram SMPs como “intermediários e produtos finais da degradação do substrato e produtos originários do decaimento endógeno”. Noguera *et al.* (1994), abordando sistemas anaeróbios, consideraram SMPs como “compostos orgânicos resultantes do decaimento endógeno e da completa mineralização do substrato”. Aquino (2003) sugere que, na prática, “SMPs seja qualquer matéria orgânica dissolvida causadora de DQO que aparece no efluente e que não estava originalmente presente no afluente”.

Os ácidos graxos voláteis (AGVs) também são intermediários presentes na degradação anaeróbia da matéria orgânica. Contudo, não são considerados SMPs. A exclusão dos AGVs do *pool* de SMPs parece um contra-senso; contudo Nogueira *et al.* (1994) esclarecem que os AGVs podem ser convertidos posteriormente a metano e gás carbônico se condições operacionais forem propícias, ao passo que com os SMPs isso não necessariamente acontece uma vez que alguns podem ser recalcitrantes. Além disso, a conversão dos SMPs a metano e gás carbônico passa necessariamente pela sua conversão inicial (pelos microrganismos acidogênicos) a AGVs, que são então usados pelos microrganismos acetogênicos e/ou metanogênicos.

Os SMPs são classificados como UAPs (*utilization-associated products* - produtos decorrentes do metabolismo associados à utilização do substrato e ao crescimento da biomassa) e BAPs (*biomass-associated products* – produtos gerados a partir da biomassa como parte do decaimento e morte celular) (Namkung e Rittmann, 1986; Laspidou e Rittmann, 2002). Os UAPs são compostos carbonáceos predominantemente pequenos advindos do substrato original, ao passo que os BAPs seriam macromoléculas celulares contendo carbono e nitrogênio (Urbain *et al.*, 1998 *apud* Jarusutthirak e Amy, 2006). Foi verificado que a taxa de produção de UAPs é proporcional à taxa de utilização do substrato e que na produção de BAPs, as células consomem substratos doadores de elétrons para a formação de biomassa ativa, produzindo, concomitantemente, substâncias poliméricas extracelulares (EPS) e UAPs (Jarusutthirak e Amy, 2006).

Em 2002, Laspidou e Rittmann propuseram uma teoria “unificadora”, estudando sistemas aeróbios, associando a produção e a degradação dos SMPs à formação de EPS. Contudo, um ponto fraco de tal teoria seria assumir que todos os EPS solúveis seriam UAPs e BAPs, sugerindo que os SMPs são, de fato, EPS solubilizados (Aquino e Stuckey, 2008). Em um

estudo para caracterizar os SMPs e EPS produzidos em um reator anaeróbio de mistura completa alimentado com glicose, Aquino e Stuckey (2004) sugeriram, a partir de dados de cromatografia por exclusão de tamanho, que parte dos compostos orgânicos de alta massa molar e presentes no efluente poderiam ser consequência dos EPS liberados da matriz celular. Contudo, Ramesh *et al.* (2006) verificaram que amostras de SMPs e EPS obtidas a partir de diferente lodos não apresentaram todas as características físico-químicas avaliadas idênticas, confirmando que SMPs e EPS solubilizados não são a mesma coisa.

Aquino *et al.* (2006) definem EPS como materiais poliméricos ligados à superfície celular que são extraídos por métodos físicos e químicos e diferenciam EPS e SMPs pelo caráter extracelular do primeiro. Segundo Jang *et al.* (2007), “EPS são de origem biológica, participam na formação de agregados microbianos e consistem de materiais insolúveis”, ao passo que os SMPs seriam considerados “EPS solúveis (macromoléculas solúveis e colóides)”. Wingender *et al.* (1999) *apud* Jang *et al.* (2007) caracterizam EPS, de modo geral, como proteínas, carboidratos, ácidos nucleicos e substâncias húmicas.

Aquino e Stuckey (2008) apresentam um modelo para a predição de SMPs em reatores anaeróbios de mistura completa, incorporando o conceito de produção e degradação de EPS. De acordo com o modelo, em condições estacionárias, cerca de 58% dos SMPs seriam UAPs e 42%, BAPs. Dentre os últimos, aproximadamente 7% seriam EPS solúveis. Os autores afirmam ainda que, mediante condições de estresse (ex. choque de carga orgânica), a importância de BAPs e de EPS solúveis diminui, sendo que UAPs passam a constituir mais de 95% dos SMPs.

O interesse na determinação da composição química e propriedades físico-químicas dos SMPs vêm crescendo pelo papel fundamental que desempenham em agregados microbianos tais como o lodo de tratamento biológico. Segundo Jang *et al.* (2007), a investigação das características dos SMPs e EPS em reatores a membranas é fundamental para o propósito de reuso da água. De fato, Jarusutthirak e Amy (2006) afirmam que a presença de SMPs em efluentes não só afeta sua qualidade no que se refere à presença de compostos orgânicos como também se torna um fator limitante para seu reuso.

Segundo Wingender *et al.* (1999) *apud* Sheng e Yu (2006), os SMPs, envolvidos na formação de agregados microbianos, na aderência a superfícies e na floculação, contêm grandes quantidades de estruturas aromáticas e cadeias de gorduras insaturadas com vários tipos de grupos funcionais, sendo os principais componentes as proteínas, as substâncias húmicas e os carboidratos. Portanto, sua produção gera DQO residual podendo, pois, afetar a qualidade do efluente.

Bilgili *et al.* (2008) mencionam que, às vezes, as concentrações dos poluentes de lixiviados tratados biologicamente excedem os padrões de descarte devido à não inclusão dos SMPs como parâmetro de projeto. Portanto, segundo os autores, seria muito importante considerar os SMPs no projeto de tratamento biológico de lixiviados para a otimização do processo e dos parâmetros operacionais bem como para a estimativa da DQO residual.

3.3. Fatores que afetam a produção de SMPs

Há vários fatores envolvidos na geração de produtos microbianos. Alguns deles foram observados trabalhando-se com culturas puras, enquanto outros foram demonstrados em sistemas de tratamento aeróbios e anaeróbios de tratamento de efluentes. Diferentes estudos mostraram que alguns SMPs desempenham uma função metabólica, seja pela propriedade quelante que pode ajudar na assimilação de metais nutrientes ou proteção contra toxicidade (Kuo e Parkin, 1996; Aquino e Stuckey, 2003; Aquino e Stuckey, 2004), seja para desempenhar alguma outra função, tais como *quorum sensing* em sistemas de biofilmes, por exemplo (Hastings e Greenberg 1999; Nies 2003). Estudos usando culturas puras sugeriram que produtos microbianos podem ser produzidos tanto como o resultado de escassez de substrato ou de excesso de fonte energética (Boylen e Ensign, 1970; Neijssel e Tempest, 1976 *apud* Huajun *et al.*, 2008). A Tabela 3.2, extraída de Aquino (2003), apresenta os principais fatores que levam microrganismos a produzir SMPs.

A literatura sugere que a produção de SMPs está intimamente relacionada à concentração de biomassa presente no sistema. À luz dessa hipótese é de se esperar que o tipo de reator, por determinar maior ou menor retenção de biomassa, também afete a quantidade de SMPs produzidos. De fato, algumas pesquisas (Barker *et al.*, 2000; Aquino e Stuckey, 2002) mostraram que a produção de SMPs em reatores anaeróbios seguiu a ordem: reator

membrana (MBR) > reator compartimentado (ABR) > reator mistura completa (CSTR). O reator de membranas estudado usava membranas submersas, cuja função era reter a biomassa no sistema. Como não havia descarte de lodo, a não ser durante o processo esporádico de limpeza da membrana, o tempo de detenção celular (TDC) era bastante elevado, e Aquino (2003) sugeriu que os elevados tempos de retenção celular associados ao MBR e ao ABR tenham contribuído significativamente para a maior produção de SMPs naqueles reatores.

Desta forma, de valiosa importância é a avaliação dos parâmetros operacionais e fatores ambientais para a produção dos SMPs. Entretanto, estudos abrangendo este assunto são escassos na literatura. Um dos fatores mais importantes para projeto e operação dos sistemas de tratamento biológico é o tempo de detenção celular (conhecido como idade do lodo e definido como o tempo médio de permanência da biomassa no reator biológico) e é de se esperar que ele influencie significativamente a produção de SMPs. Jarusutthirak e Amy (2006) de fato afirmaram que o tempo de detenção celular possivelmente afeta significativamente não só a quantidade, mas também as características dos SMPs produzidos.

Kuo *et al.* (1996), trabalhando com reatores anaeróbios de mistura completa, mostraram que a produção normalizada de SMPs (SMP/S_0) decresceu com o aumento da idade do lodo até atingir um valor mínimo, quando a idade do lodo era de aproximadamente 25 dias, e depois aumentou novamente. Vale salientar que os autores determinaram a concentração de SMPs com base na diferença entre a DQO residual dissolvida e a DQO causada pelo substrato não degradado e pelos ácidos graxos intermediários presentes. O comportamento de “variação em U”, mostrado na Figura 3.4, também foi observado para sistemas aeróbios e um tempo de retenção entre 2 a 15 dias foi reportado como ideal para a produção mínima de SMPs (Baskir e Hansford 1980; Rittmann *et al.* 1987; Hao e Lau 1988; Pribyl *et al.* 1997 *apud* Aquino, 2003).

Essa “variação em U” foi modelada e explicada baseando-se no fato de que SMPs podem ser produzidos como resultado da utilização do substrato (UAP) ou como resultado do decaimento endógeno (BAP), conforme discutido anteriormente. Dessa forma, quando a idade do lodo é alta, maior será a produção de BAPs devido à maior propensão ao

decaimento endógeno e consequente lise celular. Além disso, na medida em que a idade do lodo aumenta, maior é a remoção de compostos de fácil biodegradação (substrato original e intermediários) e a DQO residual, nesse caso, seria representada pelo acúmulo de compostos microbianos de difícil biodegradabilidade (Kuo *et al.* 1996). Por outro lado, nas condições em que o tempo de retenção é pequeno e as taxas de carregamento orgânico elevadas, a taxa de utilização do substrato (r_{ut}) será maior e, por causa disso, maior será a produção de UAPs, uma vez que tal produção é diretamente proporcional à r_{ut} (Rittmann e McCarty, 2001). Em outras palavras, o lodo é “saturado” com substrato biodegradável, resultando em acúmulo de compostos intermediários e metabólitos excretados pela biomassa devido à elevada relação A/M (relação alimento/microrganismo).

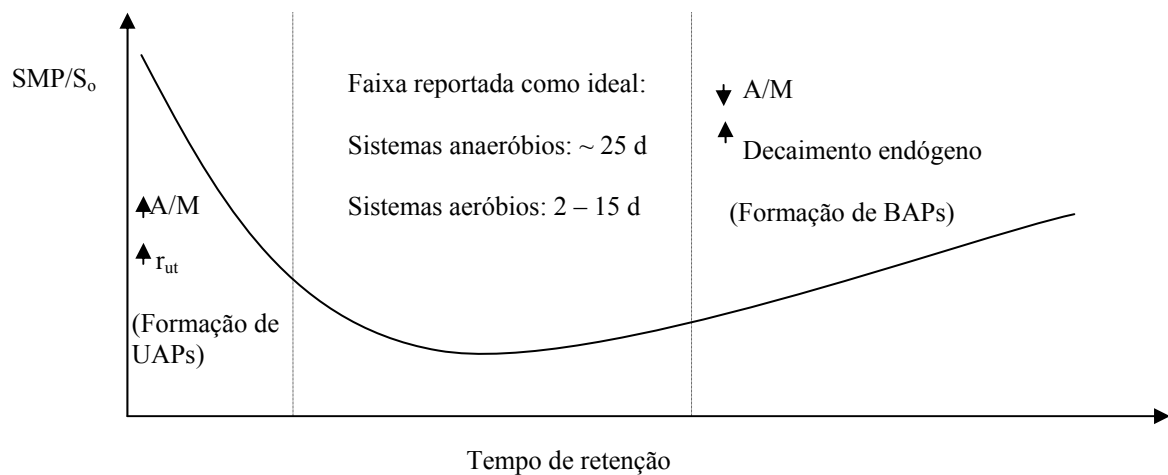


Figura 3.4 – Produção de SMPs em função da idade do lodo. Fonte: Aquino (2003).

Liang *et al.* (2007), avaliaram a influência do tempo de detenção celular (TDC) na produção de SMPs em um bioreator a membranas (MBR), estudando os tempos de detenção celular de 10, 20 e 40 dias para uma concentração afluente de 600 mgDQO/L, substrato acetato de sódio. Com o estudo, verificaram um acúmulo de SMPs mais pronunciado em baixos valores de TDC, e que a diminuição do TDC levou ao aumento do potencial de colmatação da membrana. Além disso, os autores relacionaram a percentagem de compostos aromáticos no efluente com o valor de TDC, sugerindo que a produção de compostos aromáticos foi mais favorecida em altos valores de TDC (baixa relação A/M).

Tabela 3.2 - Fatores que dão origem à produção de compostos microbianos

Fator	Comentário	Referências
Concentração de equilíbrio	Organismos podem excretar SMPs para estabelecer a concentração de equilíbrio através da membrana.	Parkin e McCarty (1981)
Deficiência nutricional	SMPs podem ser produzidos para auxiliar na absorção de metais nutrientes ou devido ao mecanismo de ‘descarga’ de elétrons que não puderam ser utilizados no crescimento devido à ausência de nutrientes essenciais.	Emery (1982); Rittmann e McCarty (2001)
Toxicidade	SMPs possuem propriedades quelantes e podem estar envolvidos no processo de mitigação da toxicidade causada por metais pesados. Compostos microbianos podem ainda ser produzidos como consequência direta da lise celular causada pelas substâncias tóxicas.	Kuo e Parkin (1996); Aquino e Stuckey (2004)
Crescimento biomassa	Durante o crescimento da biomassa, enzimas extracelulares são produzidas para a hidrólise de biopolímeros, e algumas estruturas celulares, ao serem renovadas, são excretadas em solução. Além disso, polímeros extracelulares são produzidos para auxiliar na granulação e na floculação da biomassa, e quando liberados em solução constituem parte dos SMPs.	Hejzlar e Chudoba (1986); Laspidou e Rittmann (2002)
<i>Quorum sensing</i>	Um mecanismo de comunicação entre células, denominado <i>quorum sensing</i> foi descoberto em bactérias gram-negativas, e envolve a excreção de lactonas no meio de cultivo.	Hasting and Greenberg (1999); Fuqua and Greenberg (1998)
Decaimento endógeno	Durante a morte e lise celulares uma miríade de SMPs é lançada em solução, e enquanto alguns SMPs podem ser prontamente biodegradáveis, outros podem ser mais refratários e escapar com o efluente secundário.	Barker <i>et al.</i> (1999)

Jarussuthirak e Amy (2006) também avaliaram a influência do TDC na produção de SMPs em reatores a batelada seqüenciais de bancada (SBR – *sequencing batch reactors*) - para simular o processo de lodos ativados – com testes subsequentes de filtração por

membranas e concentração inicial de carbono orgânico dissolvido de 100mgC/L, observando uma baixa produção de colóides hidrofílicos e macromoléculas, comparativamente a TDC mais elevados.

Para TDCs longos, a variação do conteúdo orgânico residual pode ser atribuída à ocorrência de mudanças na composição de componentes degradáveis dos SMPs acumulados (Chipasa e Medrzycka, 2004). Longos TDCs poderiam causar uma queda no número de células viáveis na biomassa, de forma que uma maior quantidade de material celular de menor biodegradação ou de metabolismo mais lento seria retida no meio (Shin e Kang, 2003). Jarusutthirak e Amy (2006) mencionam que um aumento no TDC leva a um acúmulo de biomassa no sistema, o que levaria a um aumento na quantidade de SMPs.

A mudança na composição das comunidades microbianas em sistemas de tratamento com o aumento do TDC é reportada na literatura, e podem ser relacionadas com a produção de SMPs (Kucnerowicz e Verstraete, 1983; Madoni, 1994; Wanner, 1994 *apud* Chipasa e Medrzycka, 2008). Chipasa e Medrzycka (2004) estudaram a influência dos SMPs na concentração de biomassa e na remoção de DQO e DBO em dois experimentos com bioreatores aeróbios de batelada alimentados por 16 dias com soja e peptona (DQO afluente de ~860 mg/L). O primeiro experimento permitia o acúmulo de SMPs e, no segundo, os SMPs eram removidos por meio da lavagem diária da biomassa. Uma vez que a concentração de SMPs aumentou proporcionalmente ao TDC, os autores concluíram que microrganismos superiores (protozoa, flagelados heterótrofos, amebas, ciliados) proliferavam mediante concentrações elevadas de SMPs, e que a presença de SMPs causou um acúmulo irregular da biomassa devido a possíveis mudanças de espécies e populações microbianas. De fato, o estudo de Chipasa e Medrzycka (2008) mostrou que mudanças de espécies microbianas ocorreram rapidamente com o aumento do TDC.

Alguns trabalhos mostram que o aumento do TDC levou ao decréscimo da proporção de compostos orgânicos de alta massa molar (>10.000 Da) e, em contrapartida, à elevação de compostos de baixa massa molar e facilmente degradáveis (<1.000 Da) (Shin e Kang, 2003 e Huang *et al.*, 2000 *apud* Liang *et al.*, 2007). Por outro lado, Liang *et al.* (2007), estudando reatores de membrana, reportaram distribuições de massas molares similares em diferentes TDC.

Huajun *et al.* (2008) avaliaram os efeitos da carga orgânica aplicada, do tempo de detenção hidráulica (TDH) e da temperatura na produção de SMPs em um reator anaeróbio compartimentado com carreador (CABR). O CABR era um reator retangular com seis câmaras de igual volume e preenchido com carreadores esféricos ocos feitos de bambu, possibilitando a retenção da biomassa por aderência, combinando, portanto, as vantagens de um reator anaeróbio compartimentado com as características de um reator de biofilme. A alimentação usada tinha como substrato uma solução sintética tamponada de proteína-carboidrato (contendo açúcar e peptona) com nutrientes e metais-traço. As concentrações utilizadas foram de 300, 450 e 600 mgDQO/L, às temperaturas de 10, 18 e 28°C e valores de TDHs de 9, 12 e 18 horas. A concentração de SMPs foi calculada subtraindo-se as contribuições medidas de glicose e dos ácidos acético, propiônico, isobutírico e butírico da DQO residual filtrada. Considerando o efeito da carga orgânica aplicada, em geral, a produção de SMPs respondeu de forma proporcional, ou seja, o aumento da carga orgânica levou ao aumento da produção de SMPs, controversamente aos resultados de Jarussuthirak e Amy (2006), Chipasa e Medrzycka (2008) e Chipasa e Medrzycka (2004).

Os resultados de Huajun *et al.* (2008) mostraram ainda que a diminuição da temperatura levou ao aumento da produção de SMPs, fato este atribuído à diminuição do metabolismo bacteriano (menor taxa de degradação de SMPs e de substrato) e à condição de estresse da biomassa (que produziria maior quantidade de SMPs para proteção celular). Os picos na concentração de SMPs foram obtidos nas temperaturas de 18 e 10° C e no TDH intermediário de 12 horas. A relação SMP/DQO filtrada efluente foi alta à maior temperatura (28°C) e maior TDH, fato este atribuído à completa degradação de AGVs. Os autores reportaram ainda uma participação de SMPs de 50 a 70% na DQO filtrada efluente.

A produção e a caracterização de SMPs em reatores anaeróbios compartimentados (ABR) com carga orgânica aplicada de 0,5 g/L também foi estudada por Barker *et al.* (1999) que avaliaram a influência do TDH, concentração de biomassa e temperatura na produção de SMPs. Os autores mostraram que a produção de SMPs diminuiu com a redução do TDH, em desacordo com trabalho anterior feito com o mesmo tipo de reator usado (ABR) (Schienner *et al.*, 1998 *apud* Barker *et al.* 1999). Contudo, esta observação foi justificada pelo elevado decaimento da biomassa e, conseqüentemente, elevada produção de BAPs nos ABRs em questão. A diminuição da temperatura fez com que a produção de SMP

crecesse, justificada pela condição de estresse gerada e pela desaceleração da taxa de degradação. Além disso, foi observado que a produção de SMPs aumentou quando a concentração inicial de biomassa era elevada.

Outro parâmetro relevante na produção de SMPs é a relação alimento/microrganismo (A/M). Jang *et al.* (2007), estudando reatores de membrana, verificaram que a qualidade do efluente melhorou com o decréscimo da relação alimento/microrganismo. Além disto, os autores verificaram que a concentração total de carboidratos diminuiu com o decréscimo de A/M e que a concentração de EPS aumentou com o aumento de A/M. Estes resultados parecem concordar com as observações de Huajun *et al.* (2008); todavia, são contraditórios a outros estudos reportados (Jarussuthirak e Amy, 2006; Chipasa e Medrzycka, 2008; Chipasa e Medrzycka, 2004; Aquino, 2003; Shin e Kang, 2003).

O principal efeito de algum tipo de adversidade no sistema (mudanças bruscas de temperatura, choques osmóticos, deficiência nutricional ou ainda presença de compostos tóxicos) é a produção de AGVs e SMPs (Aquino e Stuckey, 2004). Contudo, a alta biodegradabilidade dos AGVs é clara e, tão logo as condições de estresse (causadoras de limitações cinéticas e termodinâmicas) sejam minimizadas, eles são metabolizados. Por outro lado, os SMPs possuem uma lenta cinética de biodegradação, contribuindo, pois, para o aumento da DQO residual (Barker e Stuckey, 1999).

O efeito da toxicidade (adição de clorofórmio e cromo) em reatores anaeróbios de mistura completa alimentados com glicose (10gDQO/L) foi estudado por Aquino e Stuckey (2004). De acordo com o estudo, cerca de 82 a 98% da DQO efluente foi devida a SMPs e de 0,9 a 2% da DQO afluyente foi convertida a SMPs. O acúmulo final de SMPs aumentou mediante condições de estresse, apesar da sua diminuição percentual devido à produção de AGVs. O aumento de SMPs pareceu proporcional à carga tóxica aplicada, indicando que parte significativa dos SMPs acumulados advém provavelmente de lise celular. Aquino e Stuckey (2004) mostraram ainda que as condições de estresse impostas contribuíram ainda para a produção de polímeros extracelulares (EPS), que contribuíram, em parte, para a produção de SMPs e formação de DQO residual.

3.4. Consequências da produção de SMPs

Os efeitos da produção de SMPs podem ser interessantes na determinação do comportamento das comunidades microbianas presentes no meio. Alguns estudos abordam o efeito dos SMPs nas atividades biológicas, desde potencial ecotoxicidade produzida por microrganismos em biofilmes (Ross *et al.*, 1998) até atividade mutagênica aumentada (Rappaport *et al.*, 1979). Estudos recentes têm sido realizados para o aprofundamento destas interferências (Ichihashi *et al.*, 2006; Chipasa e Medrzycka, 2004; Chipasa e Medrzycka, 2008). Como exemplo, Ichihashi *et al.* (2006), estudando dois reatores anaeróbio-aeróbio com lodos ativados de fluxo contínuo, em escala de bancada (um com TDH=48h e o outro com TDH=6,4h), alimentados com esgoto sintético contendo acetato e peptona, avaliaram o efeito de SMPs sobre o metabolismo microbiano para a remoção de fosfato e nitrogênio e verificaram o efeito inibitório dos SMPs na nitrificação.

Segundo Chipasa e Medrzycka (2004), as diferenças nas taxas de consumo de substrato podem ser atribuídas a diferenças nas atividades microbianas e à concentração de SMPs presente. Seu estudo, realizado em sistemas aeróbios, indica que as comunidades microbianas desenvolvidas na presença de SMPs englobam microrganismos que dependem dos metabólitos de outros microrganismos, capazes de utilizar os componentes da alimentação. Já as comunidades microbianas desenvolvidas em níveis reduzidos de SMPs apresentaram maior eficácia e rapidez no consumo da alimentação sintética. Portanto, a presença e o acúmulo de SMPs no meio retardaria a degradação do substrato, fato este atribuído pelos autores à redução na atividade microbiana.

Em outro estudo Chipasa e Medrzycka (2008) avaliaram a interferência dos SMPs na composição e sucessão da comunidade microbiana de lodos ativados em bioreatores a batelada em escala de bancada alimentados com esgoto sintético. Os autores observaram e compararam a ocorrência dos microrganismos desenvolvidos em níveis significativos de SMPs e também em níveis reduzidos de SMPs. A composição da comunidade microbiana (principalmente protozoários e metazoários) foi monitorada e na medida em que a concentração de SMPs crescia, a comunidade microbiana se modificava rapidamente favorecendo a presença de microrganismos de dimensões bem maiores, tais como invertebrados. Os autores confirmaram microscopicamente a mudança de espécies

microbianas que passaram de ciliados fixos (12 – 175µm) a ciliados livre-natantes (35 – 330µm) e, por fim, a invertebrados, tais como rotíferos (0,2 – 1mm) e nematóides (1 – 50mm). Por outro lado, tais mudanças não foram observadas mediante baixas concentrações de SMPs, onde foi verificada a proliferação de microrganismos pequenos tais como ciliados fixos, ciliados livre-natantes, bactérias formadoras de flocos e flagelados. Portanto, a mudança de tamanho da população foi reportada como uma das influências mais relevantes da presença de SMPs no meio. Chipasa e Medrzycka (2008) sugeriram ainda que o acúmulo de SMPs seria um dos mecanismos regulatórios intrínsecos que controlariam a viabilidade e a atividade microbiana no sistema de lodos ativados.

Esta interferência dos SMPs na atividade microbiana interfere diretamente no desempenho do tratamento biológico. Os resultados obtidos por Chipasa e Medrzycka (2004) sugerem que o ajuste do acúmulo de SMPs poderia servir como um método operacional para a estabilização da comunidade microbiana bem como do processo de biodegradação. Reforçam, pois, a necessidade de um maior esclarecimento acerca dos SMPs e sua interferência na determinação da população microbiana e suas variações ao longo do tratamento.

Atualmente, os SMPs têm sido de particular interesse em sistemas de tratamento que dispõem de reatores biológicos de membranas (MBR). A difusão cada vez maior dos processos de membranas impõe restrições quanto à diminuição do fluxo através da membrana e sua durabilidade. Grande parte dos estudos recentes sobre SMPs é dedicada a avaliar a influência de sua produção no desempenho de tais reatores, uma vez que estes compostos são considerados os principais responsáveis pela biocolmatação (*biofouling*) das membranas (Drews *et al.*, 2007; Fonseca *et al.*, 2007; Holakoo *et al.*, 2006, Jarusutthirak e Amy, 2007, Le-Clech *et al.*, 2006, Rosenberger *et al.*, 2006, Trussell *et al.*, 2006; Oliveira-Esquerre *et al.*, 2006).

O fenômeno de colmatação pode advir de adesão das células microbianas à superfície da membrana, adsorção de compostos orgânicos ou ainda de precipitação de espécies inorgânicas (Aquino *et al.*, 2006). Shin e Kang (2003) *apud* Aquino *et al.* (2006) reportam o estreitamento dos poros da membrana pela formação de uma camada gelatinosa, diminuindo seu *cut-off* nominal. A colmatação reduz o fluxo de permeado, fator determinante para definir a viabilidade econômica deste tipo de tratamento. A literatura

reporta uma contribuição de 26 a 52% dos SMPs para a colmatação de membranas de microfiltração ou ultrafiltração normalmente usadas em reatores MBR (Wisniewski e Grasmick, 1998; Bouhabila *et al.*, 2001 *apud* Liang, 2007).

Trussell *et al.* (2006) mostraram que as taxas de colmatação estavam correlacionadas com a concentração total de SMPs. Os resultados de Fonseca *et al.* (2007) sugeriram que, mesmo na ausência de atividades microbianas significativas e de formação de biofilmes, os SMPs podem ter propriedades intrínsecas para a colmatação de membranas em níveis operacionais. Na mesma linha, Drews *et al.* (2007) reportam que mudanças repentinas de temperatura levam à produção de SMPs e elevam a taxa de colmatação das membranas.

Le-Clech *et al.* (2006) usaram alginato para modelar a colmatação de membranas por SMPs-carboidratos, por acreditarem que dentre os SMPs, os desta natureza são os principais responsáveis pelo *biofouling*. Segundo Grelier *et al.* (2006), o parâmetro mais relevante para a colmatação da membrana é a concentração de polissacarídeos coloidais e solúveis. De fato, Liang *et al.* (2007) verificaram que carboidratos e proteínas parecem ser os principais componentes dos SMPs a acumular nos reatores de membrana, comparativamente aos compostos aromáticos.

Reid *et al.* (2008), estudando as características bioquímicas de SMPs e EPS de lodos de reatores de membranas, observaram que as proteínas foram os componentes dominantes destes compostos para as cinco plantas estudadas. Entretanto, apesar dos carboidratos estarem presentes em menores concentrações do que as proteínas, os primeiros pareceram ter um maior impacto tanto na capacidade de filtração da membrana, quanto na sua colmatação. Os autores verificaram que o tempo de sucção capilar - CST (medida quantitativa, em tempo, de liberação de água pelo lodo, particularmente interessante em processos de secagem de lodo, na avaliação de sua dosagem e acondicionamento) estava positivamente correlacionado aos SMP-carboidratos e que o índice volumétrico de lodo (SVI), com a presença de EPS-proteínas. Portanto, a tentativa de elucidação das características químicas dos SMPs e EPS torna-se particularmente relevante para o entendimento das interações físico-químicas destes compostos com as membranas dos reatores. De fato, Li *et al.* (2000) afirmam que se os compostos não eliminados pelo tratamento de águas residuárias e presentes na DQO residual fossem conhecidos, sua

retenção no reator poderia ser melhorada por adaptação e otimização das membranas de acordo com os tipos de moléculas presentes no efluente.

As propriedades quelantes dos SMPs já foram estudadas em sistemas anaeróbios e também têm sido de interesse em reatores aeróbios de membranas. A produção de SMPs aconteceria para seqüestrar metais nutrientes em sistemas onde ocorre precipitação de metais, como nos anaeróbios (MeS , $\text{Me}(\text{OH})_2$, MeCO_3) (Kuo e Parkin, 1996). Holakoo *et al.* (2006) estudaram estas propriedades para o metal cobre e, neste caso, os SMPs demonstraram ser quelantes moderados. Os autores verificaram ainda que a adição de cobre reduziu significativamente a capacidade de complexação dos SMPs acumulados, devido à maior massa molar apresentada pelos compostos microbianos ($\text{MM} > 100.000$ Da). Do ponto de vista de distribuição de massas molares dos SMPs, aqueles com tamanho entre 1.000 e 10.000 Da se mostraram com maior capacidade de complexação com o metal cobre. A adição de cobre aumentou o acúmulo de SMPs de alta massa molar (> 100.000 Da) – 76% do total de SMPs, reduzindo, pois, a capacidade de complexação dos SMPs acumulados.

Holakoo *et al.* (2006) também avaliaram a interferência das condições operacionais na produção de SMP em sistemas aeróbios de reatores de membranas alimentados com esgoto sintético na ausência de cobre (condição normal) e após a adição de cobre à alimentação. Os resultados mostraram que elevados valores de TDCs e baixa relação A/M (alimento/microrganismo) parecem levar ao acúmulo de SMPs de alta massa molar (> 100.000 Da), associado, pois, ao decaimento da biomassa.

3.5. Caracterização da DQO efluente de reatores biológicos

A caracterização da DQO residual pode subsidiar a adoção mais racional de sistemas de pós-tratamento e facilitar o entendimento acerca dos processos biológicos envolvidos, com vistas ao aumento de eficiência de remoção de matéria orgânica. Além disto, é fundamental para a avaliação dos riscos impostos pela disposição do efluente tratado no ambiente.

Segundo Aquino (2003), a caracterização de efluentes biológicos pode ser efetuada em três níveis: i) identificação de compostos individuais, ii) identificação das principais classes de compostos presentes, iii) determinação de parâmetros indiretos e globais (demanda química de oxigênio – DQO; toxicidade; distribuição de tamanho). Embora haja trabalhos publicados contemplando os três níveis, a caracterização de efluentes usando parâmetros indiretos é, em geral, preferida devido à maior conveniência e utilidade prática da informação. Parâmetros como biodegradabilidade (importante para se avaliar a DBO e o uso de sistemas biológicos para pós-tratamento), toxicidade (importante para se considerar a disposição do efluente tratado) e distribuição de tamanho (importante para avaliar a eficiência e subsidiar a escolha de técnicas de remoção a serem empregadas) são amplamente citados na literatura (Amy *et al.* 1987; Barcelo *et al.* 1999; Galassi e Benfenati 2000 *apud* Aquino, 2003). Contudo, a caracterização química destes compostos tem sido pouco estudada e há poucos trabalhos na literatura. Isso talvez ocorra devido ao fato de tal caracterização não ser trivial, demandando técnicas mais sofisticadas e de custo mais elevado.

Um dos primeiros resultados publicados sobre a caracterização química da DQO residual de sistemas anaeróbios foi feito por Reemtsma e Jekel (1997). Os autores usaram cromatografia a gás acoplada a espectrometria de massa (GC-MS) para identificar compostos de baixo peso molecular de uma água residual de curtume tratada anaerobiamente seguida por pós-tratamento aeróbio. Os compostos orgânicos presentes foram agrupados em 12 classes, de acordo com seu comportamento em relação à separação físico-química empregada. Nenhuma das 12 classes foi completamente removida durante o tratamento anaeróbio e 25% da DQO efluente desse processo era compreendida de substâncias que não estavam originalmente presentes no efluente do curtume. Digno de nota é o fato de que a concentração de compostos aromáticos (principalmente fenóis, ácidos carboxílicos aromáticos e hidroxilados carboxílicos aromáticos) aumentou significativamente durante o tratamento anaeróbio. O pós-tratamento aeróbio, por outro lado, mostrou-se eficiente na remoção dos compostos originalmente presentes no efluente do curtume e refratários ao tratamento anaeróbio, bem como dos compostos aromáticos produzidos pelo processo anaeróbio.

Dignac *et al.* (2000) realizaram um trabalho de caracterização no afluente e efluente de um sistema de lodos ativados tratando esgoto sanitário. As análises permitiram a identificação de 41% do carbono orgânico solúvel afluente ao sistema e 22% do carbono orgânico solúvel efluente. Contudo, 67% do nitrogênio afluente ao sistema não pode ser caracterizado, e após o tratamento a fração não caracterizada aumentou para 90%, sendo os 10% do nitrogênio efluente caracterizado constituídos predominantemente por proteínas. A análise individual de aminoácidos, carboidratos, lipídios e compostos fenólicos no esgoto bruto contribuiu para a identificação de 46% do carbono orgânico presente. As classes químicas proteínas e lipídios foram as mais removidas durante o tratamento, e como consequência a maior fração do carbono orgânico total efluente era desconhecida. A fração conhecida era composta por apenas 13% de proteínas e menos que 1% de lipídios. A fração de matéria orgânica efluente que não pôde ser caracterizada é, segundo os autores, provavelmente constituída de compostos recalcitrantes e de estrutura mais complexa formados durante o tratamento biológico.

Dois estudos de caracterização foram feitos em efluentes anaeróbios utilizando-se técnicas analíticas mais sofisticadas. Em um deles, Barker *et al.* (2000) mostraram que proteínas e carboidratos representavam menos que 10% da DQO efluente de um reator de bancada alimentado com esgoto sintético, e que a maioria da DQO residual permanecia não identificada. Usando ressonância magnética nuclear, os autores sugeriram ainda a presença de álcoois, compostos carboxilados e significativa quantidade de compostos aromáticos (6%) nos efluentes anaeróbios caracterizados. No outro estudo, Aquino e Stuckey (2002) caracterizaram efluentes de reatores CSTR de bancada alimentados com glicose, usando extração líquido-líquido seguido de GC-MS. Alguns compostos identificados - compostos fenólicos, ftalatos e outros aromáticos – parecem ter sido produzidos pelo sistema de tratamento uma vez que não foram identificados no afluente. É sabido que microrganismos podem sintetizar variedade enorme de compostos a partir de monômeros básicos e acredita-se que os compostos aromáticos identificados tenham sido produzidos a partir de aminoácidos que contêm o anel benzeno. Devido à característica refratária exibida por compostos aromáticos perante a degradação anaeróbia não é de todo surpreendente a identificação desses compostos em efluentes anaeróbios.

Li *et al.* (2000) usaram diferentes técnicas analíticas para tentar avaliar a eficiência de remoção de poluentes de difícil degradação, bem como identificar e comparar compostos individuais presentes na DQO residual em sistemas reais convencionais de tratamento biológico e em tratamento biológico assistido por membranas alimentados com esgoto sanitário. As técnicas utilizadas no estudo foram GC-MS (cromatografia gasosa - espectrometria de massas), FIA (análise por injeção de fluxo) e LC (cromatografia líquida). As duas últimas técnicas foram utilizadas acopladas a detectores de massa (MS) e massa *tandem* (MS-MS). Os resultados obtidos mostraram taxas favoráveis de eliminação dos poluentes, principalmente no sistema com membrana, e nenhuma diferença foi observada dispondo de micro ou ultrafiltração com porosidade nominal (*cut-off*) da membrana de 200.000 Da. Os autores verificaram que poluentes não eliminados nos efluentes, observados por GC-MS e FIA-MS e identificados por GC-EI-MS (EI – impacto por elétrons), FIA-MS-MS e por LC-MS-MS, eram predominantemente ftalatos. Contudo, poliéteres não voláteis polares e seus precursores (éteres aril e alquilpoliglicóis) foram observados no modo positivo de ionização. No modo negativo, observou-se a presença de surfactantes aniônicos tais como os alquilbenzeno sulfonados de cadeia linear ou LAS (*linear-alkyl-sulfonates*), compostos de difícil degradação anaeróbia. Os métodos analíticos utilizados na pesquisa mostraram ser as ferramentas mais poderosas para monitoramento dos processos de tratamento bem como para sua otimização, uma vez que abordam substâncias específicas.

Especificamente sobre a caracterização dos SMPs, a literatura reporta como sendo uma ampla gama de compostos de massas molares altas e baixas, incluindo proteínas, polissacarídeos, ácidos húmicos e fúlvicos, ácidos nucléicos, enzimas e compostos estruturais (DeWalle e Chian, 1974; Hejzlar e Chudoba, 1986a,b *apud* Liang *et al.*, 2007; Rittmann *et al.*, 1987; Chudoba *et al.*, 1980 *apud* Aquino, 2004; Parkin e McCarty, 1981). Drews *et al.* (2007) e Liang *et al.* (2007) caracterizaram SMPs em reatores de membranas (MBR) como proteínas e polissacarídeos. No estudo de Jang *et al.* (2007), de 83 a 91% da DQO no permeado de um MBR aeróbio em escala piloto alimentado com esgoto sanitário era constituída de SMPs-carboidratos e de SMPs-proteínas, sendo que os primeiros apresentaram concentrações superiores. Controversamente, Barker *et al.* (2000) mostraram que proteínas e carboidratos representavam menos que 10% da DQO efluente e que sua maioria permanecia não identificada. Segundo Aquino e Stuckey (2004), proteínas e

carboidratos somaram menos de 50% dos compostos orgânicos presentes em solução. De acordo com Liang *et al.* (2007), a maioria dos SMPs seriam substâncias húmicas aquáticas hidrofóbicas.

Alguns resultados de uma caracterização química mais detalhada feita com efluentes de reatores de manta de lodo (UASB) em escala de demonstração e alimentados com esgoto sanitário demonstram que de fato a maioria dos compostos que constituem a DQO filtrada efluente tem baixa massa molar (Elisiário *et al.* 2006), sendo, portanto, passíveis de análise por cromatografia gasosa. Além disso, inúmeros estudos de distribuição de tamanho foram realizados na tentativa de obter mais informações acerca do perfil dos compostos presentes na DQO residual (Klinkow *et al.*, 1998; Confer e Logan, 1997a, 1997b; Boero *et al.*, 1996 *apud* Aquino, 2003; Parkin e McCarty, 1981; Kuo e Parkin, 1996; Barker *et al.*, 1999; Barker e Stuckey, 1999). A revisão de literatura sugere que a maioria dos compostos causadores de DQO residual tem massas molares baixas, inferiores a 1.000 Da (Aquino, 2003).

Mais recentemente, Jang *et al.* (2007) reportam que mais de 86% dos SMPs-carboidratos presentes no permeado de MBR tinham massas molares inferiores a 1.000 Da. Todavia, é significativa a quantidade de compostos de massas molares elevadas (> 50.000 Da) em efluentes biológicos. Além disto, observa-se que a distribuição de massas molares está intimamente relacionada às condições operacionais adotadas no tratamento (Confer e Logan, 1997a, 1997b; Boero *et al.*, 1996; Klinkow *et al.*, 1998 *apud* Aquino, 2003; Kuo e Parkin, 1996; Barker e Stuckey, 1999; Barker *et al.*, 1999; Aquino *et al.*, 2006).

Jarusutthirak e Amy (2007), tentando elucidar as características da matéria orgânica efluente ao tratamento biológico, observaram uma distribuição bimodal de compostos de alta e baixa massa molar. Em análise por cromatografia por exclusão de tamanho (HPSEC), os compostos orgânicos foram segregados em três grupos de acordo com a massa molar apresentada: massas molares inferiores a 1.000 Da, entre 1.000 e 10.000 Da e maiores que 10.000 Da. Cerca de 30 a 50% dos SMPs apresentaram massas molares inferiores a 1.000 Da e 25 a 45%, superiores a 10.000 Da. Ainda segundo este estudo, compostos de alta massa molar (>10.000 Da) – SMPs-BAP - apresentaram características hidrofílicas e baixa aromaticidade. Moléculas de massas molares inferiores a 500 Da

podem indicar pequenos ácidos orgânicos, aminoácidos ou açúcares simples provavelmente produzidos durante o crescimento da biomassa. Os autores afirmam, pois, que a matéria orgânica efluente consiste da composição SMP-BAP e matéria húmica advinda de processos biológicos, uma vez que a fração de baixa massa molar (< 1.000 Da) – SMP-UAP - é prontamente biodegradada.

No estudo de Barker (1999) para reatores ABR, DQO de alimentação de 0,5g/L, utilizaram-se técnicas de ultrafiltração e de cromatografia por exclusão de tamanho, para a caracterização dos SMPs. Notou-se que compostos de alta massa molar ficaram concentrados nos compartimentos intermediários do reator sendo, provavelmente, produtos de lise celular. Já os compostos retidos no primeiro compartimento do reator, e também no efluente, apresentaram-se como sendo de baixa massa molar. Foram, pois, caracterizados como UAPs ou produtos da degradação dos compostos de alta massa molar. O trabalho de Schiener *et al.* (1998) *apud* Barker *et al.* (1999), utilizando carga orgânica inicial de 4 g/L de DQO também para reatores ABR alimentados com solução sacarose-nutrientes, sugeriu uma distribuição bimodal de massas molares para os SMPs efluentes, pelos resultados de ultrafiltração. Cerca de 25% dos SMPs teriam massas molares maiores que 100.000 Da, enquanto 30% apresentaram massas molares inferiores a 1.000 Da. Os autores identificaram a fração hidrolisada de elevada massa molar como heteropolissacarídeos consistindo de glicose, fucose e N-acetilgalactoseamina, que são constituintes da parede celular. Barker *et al.* (1999) também sugeriram que a fração de alta massa molar de efluentes anaeróbios era composta por açúcares (glicose, galactose, fucose, ramnose), conhecidos constituintes dos polissacarídeos encontrados em envólucros capsulares e paredes celulares.

3.6. Conclusões da revisão de literatura

- Estudos feitos por diversos pesquisadores em reatores aeróbios e anaeróbios alimentados com esgoto sintético concluíram que a maior parte da DQO residual efluente não era devido ao substrato não degradado ou intermediários formados (AGVs no caso dos anaeróbios), mas sim de compostos produzidos por microrganismos e chamados de SMPs (compostos microbianos solúveis).

- A literatura mostra que os SMPs são importantes porque, em sistemas operados na ausência de estresse, constituem a maior parte da matéria orgânica efluente ao tratamento biológico, sendo, em última instância, os responsáveis pela DQO residual. Possuem também crítica influência no fluxo de filtração e biocolmatação em bioreatores de membrana. Além disto, considerando suas interferências microbiológicas, desempenham papel fundamental no fornecimento de matéria orgânica aos heterótrofos, na absorção de metais nutrientes (propriedades quelantes), na proteção contra toxicidade, deficiência nutricional e comunicação intercelular, na formação de agregados microbianos e na população microbiana (tipo e função) do sistema de tratamento.
- A produção de SMPs é afetada por vários fatores, sendo os principais a concentração da biomassa presente, o tempo de detenção celular (e, conseqüentemente, a relação alimento/microrganismo), cargas tóxicas aplicadas ao sistema e a temperatura.
- Em relação à identificação química de efluentes biológicos, em particular dos SMPs, percebe-se que há poucos trabalhos publicados. Dos trabalhos publicados, verifica-se que os SMPs não são idênticos a EPS, e são constituídos em parte de proteínas e carboidratos; contudo, outros compostos têm sido sugeridos com igual relevância, tais como, ácidos húmicos e fúlvicos, álcoois, compostos carboxilados e aromáticos, compostos fenólicos e ftalatos.
- Em relação à distribuição de tamanhos ou massa molar, a literatura assume que a distribuição de massas molares está relacionada às condições operacionais adotadas no tratamento; contudo, percebe-se uma tendência em admitir uma distribuição predominantemente bimodal de massas molares para os compostos constituintes da DQO residual (<1.000Da e >10.000Da), e que UAPs são sempre associados à baixa massa molar e os BAPs, à alta massa molar.
- Os trabalhos publicados divergem acerca da caracterização (quantitativa e qualitativa) da DQO residual, uma vez que as condições ambientais e operacionais adotadas são distintas, bem como as metodologias empregadas.

4. Material e Métodos

4.1. Aparato experimental

A pesquisa foi desenvolvida utilizando-se reatores de mistura completa (volume útil de 6L) mantidos sob condições aeróbias e anaeróbias, e alimentados com substrato biodegradável de fácil detecção (glicose ou acetato). Os reatores foram construídos em PVC e foram alimentados continuamente por meio de bomba peristáltica de dois canais, mantidos sob constante agitação com o uso de placas de agitação magnética e à temperatura constante com o uso de um banho termostatizado. O reator anaeróbio foi vedado com um *cap* para impedir a entrada de ar e o gás produzido foi descartado na água do banho. O reator aeróbio foi mantido aberto e teve sua aeração garantida por meio da utilização de compressores de ar. A Figura 4.1 ilustra o aparato experimental construído.

As soluções nutricionais foram sempre autoclavadas antes de serem introduzidas nos reatores para evitar crescimento microbiano no meio de cultura e na linha de alimentação. O substrato (glicose ou acetato) era, então, injetado na solução autoclavada após seu resfriamento usando filtros de tamanho de poro 0,22 μ m, evitando assim sua caramelização pela alta temperatura da autoclavagem e garantindo a esterilização do meio. O mesmo afluente (substrato e solução nutricional) alimentava simultaneamente, no mesmo TDH, os dois reatores, por meio da bomba de dois canais.

A solução nutricional utilizada foi adaptada às condições operacionais adotadas e tiveram como base as sugestões de Aquino *et al.* (2007) e a relação DQO:N:P mínima de 100:5:1, conforme Chernicharo (2007) (a relação DQO:N:P adotada foi de 100:6,33:1,03). A Tabela 4.1 mostra a composição nutricional adotada para os afluentes dos reatores.

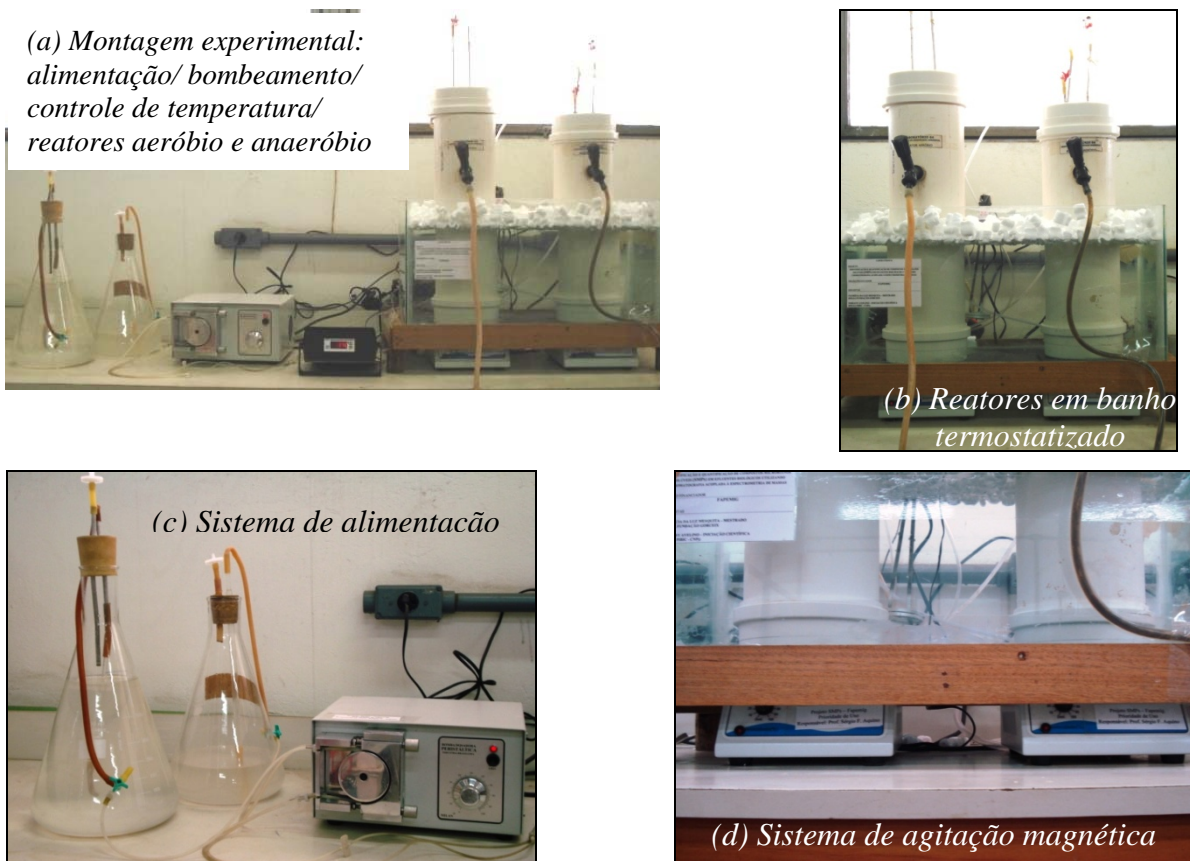


Figura 4.1: Foto da montagem experimental

Tabela 4.1 - Composição da solução nutricional para DQO afluyente de 5.000mg/L.

MACRONUTRIENTES (mg/L)	
NH ₄ Cl	1.112
(NH ₄) ₂ H ₂ PO ₄	153,2
(NH ₄) ₂ HPO ₄	44,5
MgCl ₂	250
CaCl ₂	189
NaHCO ₃	2.500
MICRONUTRIENTES (mg/L)	
Extrato de levedura	125
FeCl ₃ .6H ₂ O	5
ZnCl ₂	0,13
MnCl ₂ .4H ₂ O	1,25
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ .4H ₂ O	1,60
AlCl ₃ .6H ₂ O	0,13
CoCl ₂ .6H ₂ O	5
NiCl ₂ .6H ₂ O	13
H ₃ BO ₃	3
CuCl ₂ .2H ₂ O	8
HCl	1 mL/L

4.2. Condições operacionais dos reatores de bancada

A operação dos reatores de bancada foi feita observando-se as fases descritas na Tabela 4.2. Uma faixa ótima de tempos de detenção hidráulica (TDHs) de 2 a 15 dias foi reportada por Barker e Stuckey (1999) para sistemas de tratamento aeróbios e de aproximadamente 25 dias para sistemas anaeróbios, em que a produção de SMPs seria mínima. Diante disto, optou-se por conduzir o experimento avaliando os TDHs de 4, 10 e 16 dias, o que resultou em cargas orgânicas volumétricas aplicadas de 1,25, 0,5 e 0,31 kgDQO/m³.d, respectivamente. Ressalta-se, contudo, que em processos de lodos ativados, os TDHs normalmente adotados são muito inferiores (da ordem de apenas algumas horas).

Os reatores foram inoculados e operados continuamente por um período mínimo de 3 vezes o tempo de detenção hidráulica, para garantir que a condição de equilíbrio dinâmico aparente (*steady-state*) fosse atingida. O sistema aeróbio foi inoculado com lodo de retorno coletado na planta de lodos ativados da ETE-Arrudas, que trata os esgotos de Belo Horizonte - MG. Para o sistema anaeróbio, o lodo foi coletado de reator UASB operado em escala de demonstração e alimentado com esgoto sanitário após tratamento preliminar. Tal reator encontra-se em operação no Centro de Treinamento e Pesquisas em Saneamento (CTpS) da UFMG-COPASA.

Tabela 4.2 – Fases operacionais dos reatores de bancada

Fases	Aeróbio			Anaeróbio			Temp (°C)
	TDH (d)	S ₀ (gDQO/L)	Tipo Substrato	TDH (d)	S ₀ (gDQO/L)	Tipo Substrato	
Fase I	4	5	Glicose	4	5	Glicose	25
Fase II	10	5	Glicose	10	5	Glicose	25
Fase III	16	5	Glicose	16	5	Glicose	25
Fase IV	10	5	Glicose	10	5	Glicose	15
Fase V	10	5	Acetato	10	5	Acetato	15
Fase VI	10	5	Acetato	10	5	Acetato	25

A escolha da temperatura de 25°C se deu pelo fato ser esta a temperatura ambiente predominante no Brasil. A temperatura de 15°C simularia a operação de reatores em

regiões mais frias (como Ouro Preto e sul país). Portanto, desejou-se simular temperaturas em que sistemas reais são operados.

Para a avaliação do substrato, a glicose representaria um substrato mais completo e o acetato, mais simples. O uso de substrato mais complexo (tais como ração animal, esgoto bruto) dificultaria a interpretação dos resultados de identificação, uma vez que não se teria informações precisas acerca dos compostos presentes no afluente (difícil distinção entre o que estava no afluente e o que realmente seria produzido pelo sistema de tratamento).

A concentração da DQO foi fixada em 5.000mg/L em função de os reatores serem de mistura completa (não há imobilização de biomassa) favorecendo o sistema anaeróbio (maior DQO de entrada significa maior crescimento microbiano, mesmo no menor TDH). Além disso, maior concentração de substrato resultaria em maior produção de SMPs, o que facilitaria o trabalho de quantificação e identificação. Os TDHs foram escolhidos em função do sistema anaeróbio (4 dias é o menor TDH para o crescimento suspenso de bactérias anaeróbias). O sistema aeróbio até poderia ser operado com TDH menor (1 dia ou menos), contudo a intenção foi comparar a produção de SMPs nos dois sistemas nas mesmas condições. Além disso, havia também a limitação técnica de a bomba ser de dois canais, o que não permitia adoção de vazões diferentes.

4.3. Técnicas analíticas

4.3.1. Preparação geral das amostras

Os reatores eram monitorados até atingir o *steady-state* por meio de medições esporádicas de pH e DQO. Uma vez estabilizada a DQO efluente, as amostras eram coletadas com mais frequências para quantificação dos SMPs e caracterização do efluente.

Durante a condição de *steady-state*, amostras de efluente foram coletadas para análise de DQO (para o acompanhamento da degradação da matéria orgânica), sólidos suspensos totais e sólidos suspensos voláteis (monitoramento da biomassa no interior do reator) e ácidos graxos voláteis (AGVs), de forma que a quantidade de SMPs produzida pudesse ser

estimada para cada condição operacional. Também foram monitorados o pH, a temperatura e o oxigênio dissolvido (para o reator aeróbio).

As amostras dos efluentes dos reatores eram centrifugadas numa centrífuga *Fanem Centrífuga Excelsa II 206 BL*, a 5.000rpm durante 15 a 30 minutos, até completa remoção de sólidos do sobrenadante. O sobrenadante era, então, encaminhado para as análises que serão descritas a seguir. Vale ressaltar que, para as análises cromatográficas, os sobrenadantes eram ainda filtrados através de filtros de membrana de 0,45µm para a completa remoção de sólidos.

4.3.2. pH e Oxigênio Dissolvido (OD)

O pH dos reatores foi medido diariamente usando um pHmetro da *Analion*, modelo *PM 608*, calibrado ao uso. Por sua vez, o oxigênio dissolvido foi medido no reator aeróbio usando um oxímetro *CG 867*, da *Schott Gerate*, calibrado ao uso. Como a aeração era permanente, as medições eram realizadas com a sonda diretamente no interior do reator.

4.3.3. Demanda Química de Oxigênio (DQO)

As medidas de DQO foram feitas de acordo com o método colorimétrico de refluxo fechado, descrito em APHA (1998). A solução ácida era preparada adicionando Ag_2SO_4 e HgSO_4 a H_2SO_4 concentrado. A solução de $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ era preparada secando-se previamente o dicromato em estufa e resfriando-o em dessecador.

O protocolo para a análise de DQO consistia em adicionar, nesta ordem, 3mL da solução ácida de ácido sulfúrico, 1,5mL da solução de dicromato de potássio 0,03mol/L e 3mL da amostra (diluída de 20 vezes para as amostras de afluente e efluente e de 2 vezes para as amostras de EPS e lisados) em frascos de vidro próprios para esta análise. Os frascos eram, então, cuidadosamente fechados e seu conteúdo agitado apropriadamente. Em seguida, as misturas eram aquecidas em termoreator *Dry Block MA 4004* da *Marconi* por 2 horas, à temperatura de 148°C. Após seu completo resfriamento, as amostras eram decantadas ou centrifugadas para eliminação de sólidos em suspensão e, posteriormente, encaminhadas

para análise em espectrofotômetro *FEMTO 600 PLUS*, no comprimento de onda de 585nm. As análises de DQO foram feitas sempre em triplicata. Solução estoque de biftalato de potássio 1.000mg/L, cuja DQO pode ser calculada, foi usada para preparação dos padrões para a curva analítica.

4.3.4. Sólidos Suspensos Voláteis (SSV)

A análise de SSV foi realizada para estimar a concentração de biomassa no interior dos reatores aeróbio e anaeróbio. Cadinhos de porcelana eram levados à estufa *315 SE* da *Fanem* de um dia para o outro à temperatura de 105° C. No dia seguinte, após resfriamento em dessecador, os cadinhos eram pesados em balança analítica *Mettler Toledo*, modelo *AB 204*, até estabilização da leitura. Em seguida, 10mL de amostras coletadas do interior dos reatores eram centrifugados e os sobrenadantes eram adicionados aos cadinhos e encaminhados para estufa novamente para evaporação de água. Após a completa secagem da amostra e de novo resfriamento em dessecador, a nova massa era registrada. A seguir, os cadinhos com as amostras eram encaminhados a uma mufla (*Coel, TLK 49*) à 550°C por, no mínimo, 1,5 horas, para combustão e evaporação da fração orgânica. Novamente, as amostras resfriavam em um dessecador e a massa final era registrada. Efetuando-se os cálculos descritos em APHA (1998), por diferença de massas, estimava-se a concentração de SSV em cada sistema. Todas as análises foram realizadas em duplicata.

4.3.5. Ácidos Graxos Voláteis (AGVs) e glicose

A análise de AGVs e glicose residual nos efluentes dos dois reatores foi feita para permitir o cálculo da produção de SMPs, conforme as equações 4.1 e 4.2 apresentadas no item 4.4 deste capítulo.

O preparo inicial das amostras para análise cromatográfica consistia na sua centrifugação e remoção de material particulado residual por filtração usando membranas de porosidade 0,45µm. A fração filtrada era, então, congelada a -10°C até análise, que era feita em no máximo 40 dias.

A análise de cromatografia líquida de alta eficiência foi feita em cromatógrafo HPLC da *Shimadzu* (nas fase I e VI) ou da *Hewlett Packard Series 1050* (nas demais fases), utilizando-se uma coluna de troca iônica *Aminex HPX-87H* da *Bio-Rad*. A fase móvel empregada foi ácido sulfúrico 0,01mol/L, com uma vazão de 0,6mL/min. A temperatura da coluna foi mantida em 55°C e o volume de injeção empregado foi o de 10µL. Os AGVs foram detectados por ultravioleta no comprimento de onda de 210nm, enquanto que a detecção da glicose foi feita empregando-se um detector de índice de refração *HP 1047A* da *Hewlett Packard*. Foram feitas curvas analíticas com padrões dos principais ácidos orgânicos (fórmico, acético, propiônico, butírico, isobutírico, valérico e isovalérico) e com padrão de glicose utilizada na alimentação dos reatores, nas faixas de 12,5 a 400mg/L para os AGVs e de 10 a 160mg/L para a glicose.

O método foi validado para as condições descritas e este detalhamento é apresentado no Apêndice.

4.3.6. Análise de Proteínas

O teor de proteínas foi medido usando o método *Lowry* modificado descrito em Pontes (2003), tendo como padrão da curva analítica a proteína SAB (soro albumina bovina) na faixa de concentração de 0 a 800mg/L.

O método de *Lowry* se baseia na reação do cobre com a proteína, em meio alcalino, e pela posterior redução do reagente de fosfomolibdato-fosfotungstenato no reagente *Folin-ciocalteau*. Quando o reagente *Folin-ciocalteau* é adicionado à amostra contendo proteínas e previamente tratada com o cobre, ocorre sua redução, resultando em uma cor mais intensa, com absorção máxima em 550nm. Desta forma, as amostras foram analisadas colorimetricamente a um comprimento de onda de 550nm num espectrofotômetro *FEMTO 600 PLUS*.

Todas as análises foram feitas em triplicata com a presença de um ‘branco’, constituído de 0,5mL de água destilada em substituição à amostra. Os procedimentos da análise são apresentados a seguir:

- adição de 0,5mL de amostra e 5mL de solução “D” em tubos de ensaio e agitação dos tubos;
- incubação dos tubos por 10 minutos, à temperatura ambiente, e acréscimo de 0,5mL do reagente Folin 1N. O reagente Folin é preparado pela diluição do reagente *Folin - ciocalteau* na proporção de 1:2, com água deionizada;
- agitação dos tubos e, em seguida, incubação por 30 minutos, à temperatura ambiente;
- leitura da absorvância em espectrofotômetro *FEMTO 600 PLUS* a 550 nm.

A solução “D” foi preparada a partir da mistura de:

- 98mL da solução A: 20g de carbonato de sódio e 4g de hidróxido de sódio em 1000mL de água destilada.
- 1mL da solução B: 1g de sulfato de cobre pentahidratado em 100mL de água destilada.
- 1mL da solução C: 2g de tartarato de sódio e potássio em 100mL de água.

4.3.7. Análise de Carboidratos

O método utilizado para a determinação de carboidratos foi o método do fenol e ácido sulfúrico, baseado na metodologia descrita por Dubois *et al.* (1956) *apud* Blundi e Gadêlha (2001), que consiste na adição de fenol e ácido sulfúrico concentrado que, em presença de carboidratos, resultam em uma cor laranja.

Para a análise de carboidratos, toma-se 0,5 ml da amostra a ser analisada, adiciona-se 0,5 ml de solução de fenol a 5%p/v e 2,5 ml de H₂SO₄. O ácido deve ser adicionado rapidamente, com jato direcionado para a superfície do líquido, de modo a se obter uma boa mistura. Os tubos de ensaio são deixados em repouso por 10 minutos, período após o qual são agitados e depois colocados em um banho de água entre 25 e 30°C por 15 minutos. A absorvância foi lida a 488 nm em espectrofotômetro *FEMTO 600 Plus*. Deve ser preparada uma amostra em branco, substituindo-se a amostra por água destilada. A concentração de carboidratos nas amostras foi determinada usando glicose para a curva de calibração (faixa de 0 a 400mg/L) e as análises foram realizadas em triplicata.

4.4. Cálculo da concentração de SMPs

A quantificação dos principais ácidos orgânicos (C1 a C5) e o uso de relações estequiométricas possibilita o cálculo da contribuição dos AGVs para a DQO residual efluente dos reatores, principalmente o anaeróbio, de bancada. O conhecimento da DQO filtrada efluente, da DQO devido aos AGVs e da DQO devido ao substrato não degradado (glicose ou acetato) possibilitou estimar a DQO devido a compostos microbianos solúveis (SMPs) produzidos durante o tratamento biológico, conforme as equações a seguir (Aquino, 2004):

$$DQO_{AGV} = 0,35 \times [\text{formiato}] + 1,07 \times [\text{acetato}] + 1,51 \times [\text{propionato}] + 1,82 \times [\text{butirato} + \text{isobutirato}] + 2,04 \times [\text{valerato} + \text{isovalerato}] \quad (\text{Eq. 4.1})$$

$$DQO_{SMP} = [DQO_{Cent}] - [DQO_{AGV} + DQO_{SubRes}] \quad (\text{Eq. 4.2})$$

onde,

DQO_{AGV} = DQO devido aos ácidos graxos voláteis

DQO_{SMP} = DQO devido aos compostos microbianos solúveis

DQO_{SubRes} = DQO do substrato (glicose ou acetato) não degradado

DQO_{Cent} = DQO centrifugada efluente

Vale ressaltar que, para a determinação de SMPs, os AGVs são ‘subtraídos’ da DQO residual porque eles são os principais metabólitos intermediários da digestão anaeróbia que se acumulam no meio devido a um desbalanço entre os microrganismos acidogênicos (rápido crescimento) e acetogênicos e metanogênicos (de crescimento mais lento). Os AGVs também são produtos microbianos, mas são normalmente excluídos do *pool* de SMPs porque se têm interesse em quantificar os produtos microbianos não-intermediários.

4.5. Análise por espectrometria de massas

Testes com injeção direta das amostras de efluentes (previamente centrifugados e filtrados por membrana de 0,22 μm) no espectrômetro de massas foram realizados, sem êxito.

Portanto, verificou-se a necessidade de se dispor de uma técnica de concentração das amostras destinadas às análises por espectrometria de massas. Foi escolhida a técnica de liofilização, pela sua característica de preservação do ter orgânico da amostra e, para tal, foi utilizado o equipamento *L101* da *Liotop*.

Ao fim de cada fase operacional, amostras dos efluentes e afluentes aos reatores foram centrifugadas em centrífuga *Fanem Centrífuga Excelsa II 206 BL*, a 5000rpm por 15 a 30 minutos até completa eliminação de sólidos no sobrenadante. O volume de 50mL de sobrenadante era, então, congelado em vidraria apropriada. Após seu completo congelamento, as amostras eram encaminhadas ao liofilizador, onde permaneciam até completa sublimação da água (1 a 2 dias). Os liofilizados (amostra seca) eram, então, preservados de umidade e luz (os frascos foram completamente cobertos com papel alumínio e acondicionados em dessecadores, onde permaneceram até a preparação das amostras para injeção no espectrômetro de massas).

Testes de solventes (para ressuspensão dos liofilizados e fase móvel durante a análise) foram conduzidos com metanol, acetonitrila e solução aquosa de metanol 30%v/v. A definição da condição ótima de resposta foi embasada na solubilidade dos sólidos e no número de picos de relação m/z / obtidos nas amostras em cada solvente testado. Portanto, a solução de metanol a 30%v/v foi empregada como solvente para ressuspensão dos sólidos e preparação das amostras e esta mesma proporção foi mantida na composição da fase móvel durante a análise no espectrômetro de massas. Após sua preparação, as amostras foram congeladas (-10°C) até sua injeção no equipamento.

Procedeu-se, pois, em uma única batelada, a injeção direta das amostras provenientes de todas as fases operacionais previamente descongeladas. O volume de injeção foi 5 μ l, o fluxo de 0,2mL/min e as análises por espectrometria de massas para a identificação dos SMPs foram realizadas no equipamento *Shimadzu LC-IT-TOF*. Os cromatogramas de íons foram divididos em segmentos contendo eventos de varredura completa, seleção de íons específicos e massa segunda (MS2) usando argônio como gás de colisão. O espectro obtido no modo MS2 permite obter a “impressão digital” do composto detectado o que possibilita, em alguns casos, a sua identificação. Com este procedimento, foi possível obter os cromatogramas de íons específicos para as amostras dos liofilizados. Os liofilizados foram analisados no modo de íons negativo e positivo, varrendo as relações m/z de 100 a

4.000Da, com a fase móvel consistindo de (A) H₂O e (B) Metanol. As análises ocorreram em modo isocrático com 70% de A e 30% de B, por um tempo de 5 minutos.

De posse de todas as relações m/z presentes em cada amostra, os dados foram extraídos do equipamento e analisados por análise estatística multivariada de componentes principais (PCA), bem como por contagem de ocorrências no programa *Excel*[®]. A seleção das relações m/z para reinjeção e análise no modo MS2 foi realizada segundo critérios de priorização, conforme descrito a seguir:

- dentre todas as relações m/z, foram excluídas aquelas cujas intensidades apareciam também no afluente da fase considerada;
- determinou-se a frequência de ocorrência de m/z ao longo das diferentes fases e selecionaram-se as relações m/z mais frequentes ;
- os espectros das amostras cujas relações m/z tinham sido consideradas prioritárias foram avaliados e quando os picos eram viáveis (boas intensidades e eliminadas as hipóteses de ruídos), procedeu-se a reinjeção das amostras para análise no modo MS2;
- no caso de picos inviáveis, novas relações m/z foram escolhidas, segundo os critérios de frequência nos efluentes e intensidade nos espectros de massas.

A Figura 4.2 apresenta os critérios utilizados para a escolha das relações m/z a serem consideradas para identificação.

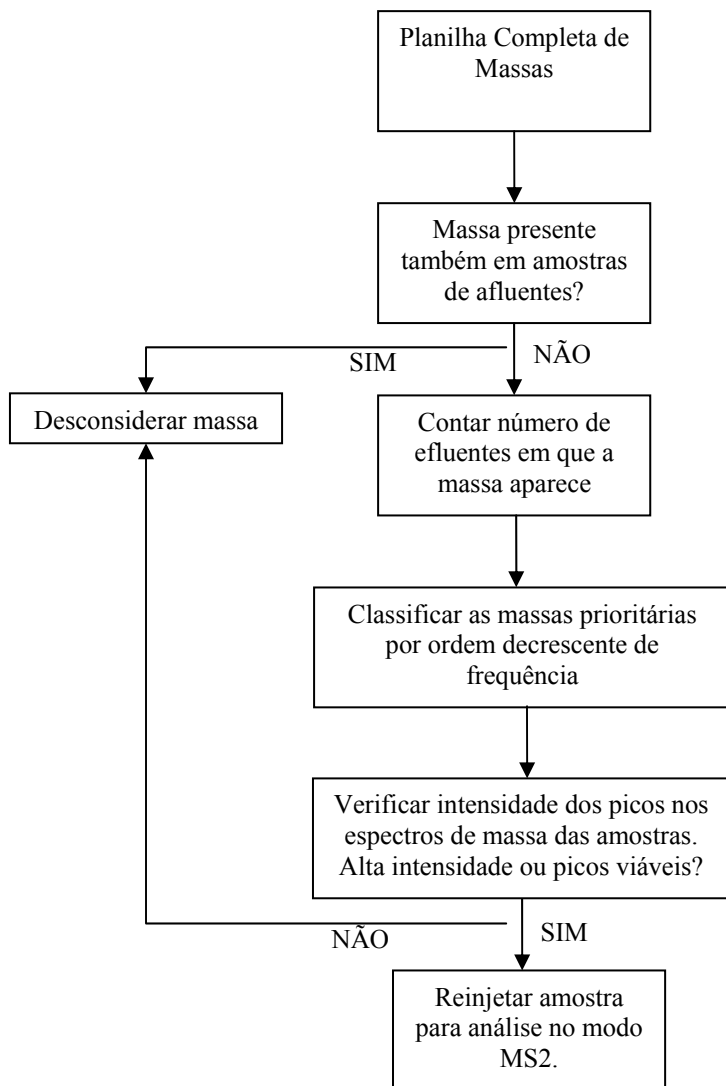


Figura 4.2 – Critérios utilizados para a escolha das relações m/z a serem consideradas para identificação

4.6. MALDI-ToF-MS

Amostras de efluentes de duas fases (I e II) foram encaminhadas para análise em equipamento MALDI-ToF-MS (*Matrix Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight-Mass Spectrometry* - técnica de espectrometria de massas por ionização e dessorção assistida por laser) da Shimadzu em São Paulo, SP. O objetivo de tal análise era obter informações acerca do perfil de elevadas massas molares que pudessem estar presentes nestes efluentes, uma vez que o espectrômetro de massas da UFOP analisava relações m/z até 4.000 Da (1 Dalton equivale ao peso molecular do átomo de hidrogênio).

A preparação das amostras seguiu o mesmo protocolo estabelecido para a espectrometria de massas. Ao fim de cada fase operacional (I e II), as amostras dos efluentes aos reatores foram centrifugadas (*Fanem Centrífuga Excelsa II 206 BL*), a 5000rpm por 15 a 30 minutos até completa remoção de sólidos no sobrenadante. O volume de 50mL de sobrenadante foi, então, congelado em vidraria apropriada. Após seu completo congelamento, as amostras eram encaminhadas para concentração, em liofilizador *L101* da *Liotop*, onde permaneciam até completa sublimação da água (1 a 2 dias). Os liofilizados foram, então, preservados de umidade e luz (os frascos foram completamente cobertos com papel alumínio e acondicionados em dessecadores). A massa de 10,0 mg dos liofilizados foi acondicionada em *vials* e encaminhada para a *Shimadzu*, em São Paulo. Os procedimentos específicos adotados para esta análise estão descritos em detalhes no relatório gerado pela empresa, apresentado em anexo.

4.7. Lise Celular e Extração de EPS de Amostras de Lodo

Segundo Jarusutthirak e Amy (2007), substâncias orgânicas tais como substâncias poliméricas extracelulares (EPS) e produtos de lise celular (CLP) são produzidas e liberadas concomitantemente ao consumo de substrato. Desta forma, o monitoramento destes parâmetros foi feito para tentar entender a principal origem dos SMPs, comparando-se o perfil químico dos EPS e dos CLP com o perfil químico dos SMPs. Para tal, as amostras de EPS e CLP foram analisadas no espectrômetro de massas, nas mesmas condições adotadas para as amostras de efluentes (item 4.5), e incluídas na análise estatística por componentes principais (PCA).

4.7.1. Preparação das amostras para os procedimentos de lise celular e extração de EPS de amostras de lodo

Anteriormente aos procedimentos de extração de EPS e lise celular, as amostras foram lavadas e preparadas conforme a descrição a seguir.

- o volume de 100mL de amostra dos efluentes aos reatores foram coletados nas Fases IV, V e VI e acondicionados em 2 tubos *Falcon* de 50mL ;

- as amostras foram, então, centrifugadas em centrífuga *Fanem Centrífuga Excelsa II 206 BL*, a 5.000rpm durante 15 minutos, até completa remoção de sólidos do sobrenadante;
- o sobrenadante era, então, descartado e o *pellet*, ressuspenso no mesmo volume original em uma solução fosfato de potássio (K_2HPO_4) estéril (previamente autoclavada), 120mmol/L, pH 8 para lavagem do lodo;
- após a agitação do tubo contendo a solução fosfato e o lodo, a amostra era novamente encaminhada à centrifugação, de forma idêntica à descrita anteriormente. Este procedimento foi repetido por 2 vezes, de modo a garantir a eficácia na lavagem da biomassa;
- após a última centrifugação, o *pellet* era novamente ressuspenso no mesmo volume original (50mL) na solução de tampão-fosfato e, só então, encaminhado aos procedimentos específicos.

4.7.2. Extração de EPS

O procedimento para a extração de EPS foi embasado no estudo de Frolund *et al.* (1996) adaptado às condições operacionais/ambientais do laboratório. A extração foi feita com a resina de troca catiônica *Dowex[®] Marathon[®] C, Na⁺-Form*, da *Sigma-Aldrich*. Com base nos resultados obtidos pelos autores, foram adotadas as condições reportadas para extração efetiva, quais sejam, tempo mínimo de extração de 12 horas em alta intensidade de agitação, utilizando de 65 a 80g resina/gSSV. Portanto, 100mL de amostra de biomassa e solução fosfato preparadas conforme descrito no item 4.7.1 foram encaminhadas em um béquer para agitação, após a adição de 70g resina/gSSV. Este cálculo era feito com base na média de SSV de cada fase operacional (da Fase IV em diante), uma vez que os reatores são de mistura completa. Esta agitação foi feita com agitadores magnéticos *Fisatom*, modelo 752, na maior intensidade possível, à temperatura ambiente, de um dia para o outro, por 12 a 14 horas. Após este período, as amostras foram centrifugadas numa centrífuga *Fanem Centrífuga Excelsa II 206 BL*, a 5.000rpm durante 15 a 30 minutos, até completa remoção de sólidos do sobrenadante. O sobrenadante, contendo os EPS extraídos, foi então congelado para posterior liofilização e preparação para análise por espectrometria de massas.

4.7.3. Lise Celular

Zhang *et al.* (2007), Wang *et al.* (2006) e Tiehm *et al.* (2001) usaram em seus estudos a técnica de ultrassom para lisar as células e estabilizar lodos de tratamento biológico (sistemas de lodos ativados nos primeiros dois estudos e lodo anaeróbio, no último). Guerlava *et al.* (1998) compararam diferentes métodos de lise celular em *Clostridium perfringens* e indicam a sonicação (ultrassom) como um dos métodos mais eficazes para este fim. Os autores observaram que 3 a 5 minutos de sonicação foram suficientes para a lise completa das células. Portanto, com base neste estudo, 100mL de amostra de biomassa e solução fosfato preparadas conforme descrito no item 4.7.1 foram encaminhadas em um béquer para um banho de ultrassom da *Unique*, modelo *Maxiclean 1600*, por 1 hora, de modo a garantir tempo suficiente para a completa lise das células da biomassa. Após este tempo, as amostras foram centrifugadas numa centrífuga *Fanem Centrífuga Excelsa II 206 BL*, a 5.000 rpm durante 15 minutos, até completa remoção de sólidos do sobrenadante. O sobrenadante, contendo os produtos da lise (CLP) foi então congelado para posterior liofilização e preparação para análise por espectrometria de massas.

5. Resultados e Discussão

5.1. Quantificação dos SMPs em diferentes condições operacionais

5.1.1. Tipo de tratamento: aeróbio x anaeróbio

O tratamento empregado deve ser avaliado pela diferença da microbiota presente em cada tipo de reator. Conforme abordado no Capítulo 3, as diferentes características da população microbiana interferem sobremaneira no desempenho do tratamento da água residuária. Para a avaliação da interferência do tipo de tratamento na produção/acúmulo dos SMPs, estão sendo apresentados e discutidos os resultados obtidos para a DQO centrifugada, série de sólidos, ácidos graxos voláteis (AGVs) e SMPs.

A Figura 5.1 mostra a variação de DQO no afluente e efluente dos reatores aeróbio e anaeróbio para as diferentes condições operacionais estudadas (ver Tabela 4.2). Um resumo da estatística descritiva deste parâmetro é apresentado na Tabela 5.1. Conforme esperado, verifica-se para todas as fases operacionais, uma maior eficiência de remoção da matéria orgânica afluente pelo reator aeróbio. A Figura 5.2 confirma a melhor eficiência no reator aeróbio por meio do gráfico de interação por reator. Para a mesma DQO afluente, resultados consideravelmente distintos foram obtidos para a DQO residual.

Esta observação era prevista, uma vez que há, no processo aeróbio, uma maior disponibilidade de energia a ser canalizada para a multiplicação da população microbiana, por ser o oxigênio o aceptor final de elétrons (Rittmann e McCarty, 2001). Na ausência de oxigênio, ocorre a fermentação do substrato, ou seja, parte da molécula de substrato é oxidada enquanto outra parte reduzida. Isso implica em menos liberação de energia para a síntese de ATPs, o que traduz nas baixas taxas de crescimento dos microrganismos anaeróbios. Em reatores aeróbios, o crescimento microbiano se dá muito mais rapidamente e favoravelmente do que em reatores anaeróbios, o que pode ser verificado na Figura 5.3, com os resultados de sólidos suspensos voláteis (SSV). Enquanto o reator aeróbio apresentou um aumento ou manutenção da biomassa em condições operacionais não estressantes, o reator anaeróbio mostra um declínio sistemático da biomassa (Figura 5.4), principalmente em condições adversas (fases IV e V, operadas a baixa temperatura, 15°C).

Vale ressaltar que a Figura 5.3 mostra que há mais sólidos no reator anaeróbio do que no aeróbio pelo fato de a quantidade de lodo inoculada ter sido diferente.

Tabela 5.1 – Estatística descritiva para o parâmetro DQO

Fases	Reator	Tipo DQO	Média	Desvio Padrão	Mín	Mediana	Máx
I	Aeróbio	Afluentes	4700	538	3700	4700	5967
		Efluentes	1646	594	767	1433	3100
	Anaeróbio	Afluentes	4740	540	3567	4700	5767
		Efluentes	3410	816	1833	3500	4833
II	Aeróbio	Afluentes	4822	824	3367	5033	6300
		Efluentes	1106	518	167	1167	2100
	Anaeróbio	Afluentes	5004	693	3633	4900	6567
		Efluentes	2719	621	1367	2967	3700
III	Aeróbio	Afluentes	5596	604	4790	5390	6790
		Efluentes	452	252	90	390	990
	Anaeróbio	Afluentes	5423	579	4590	5290	6590
		Efluentes	1317	458	390	1390	2090
IV	Aeróbio	Afluentes	5808	662	4690	5890	7190
		Efluentes	536	364	90	540	1290
	Anaeróbio	Afluentes	5999	581	4690	6090	7190
		Efluentes	4419	290	3890	4440	5090
V	Aeróbio	Afluentes	5109	734	3713	5047	6647
		Efluentes	3229	900	1713	3347	5247
	Anaeróbio	Afluentes	5040	713	3513	5080	6380
		Efluentes	4613	781	2980	4513	5913
VI	Aeróbio	Afluentes	5069	589	4113	5113	6047
		Efluentes	1358	526	447	1513	2247
	Anaeróbio	Afluentes	4882	805	3113	4947	6647
		Efluentes	3475	705	2313	3580	4513

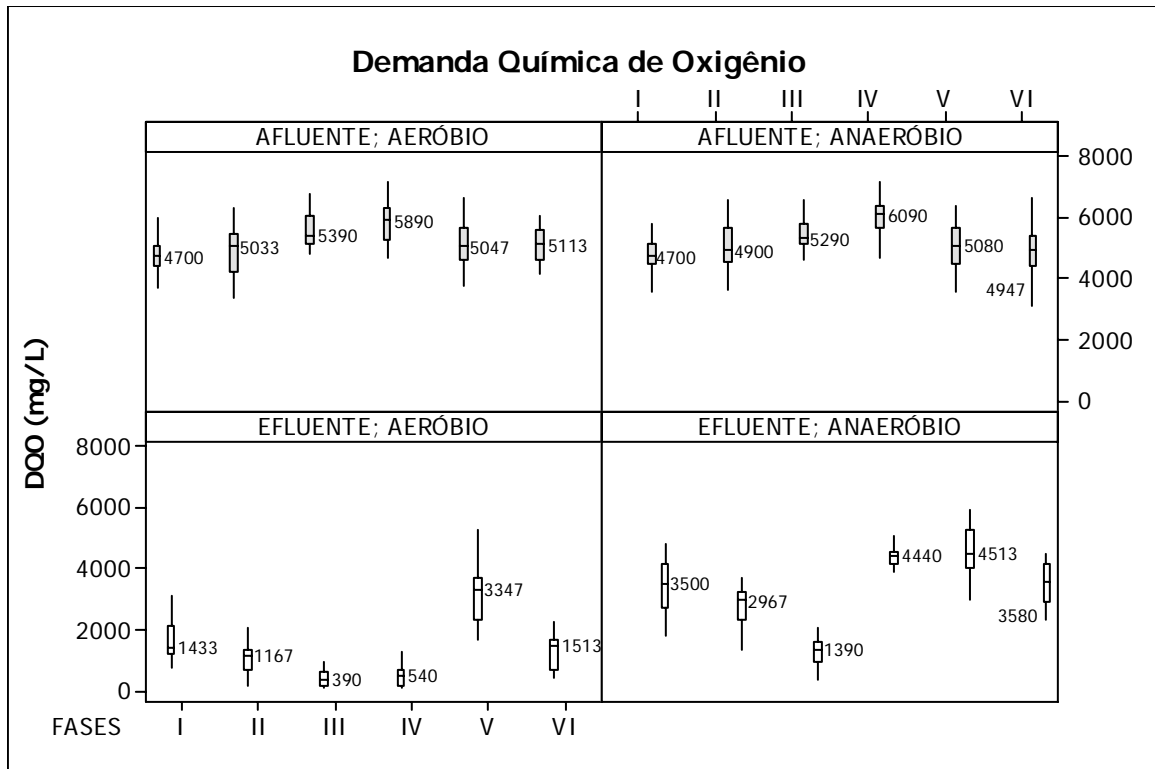


Figura 5.1 - Variação da DQO no afluente e efluente dos reatores aeróbio e anaeróbio ao longo das fases operacionais estudadas (valores expressos como mediana)

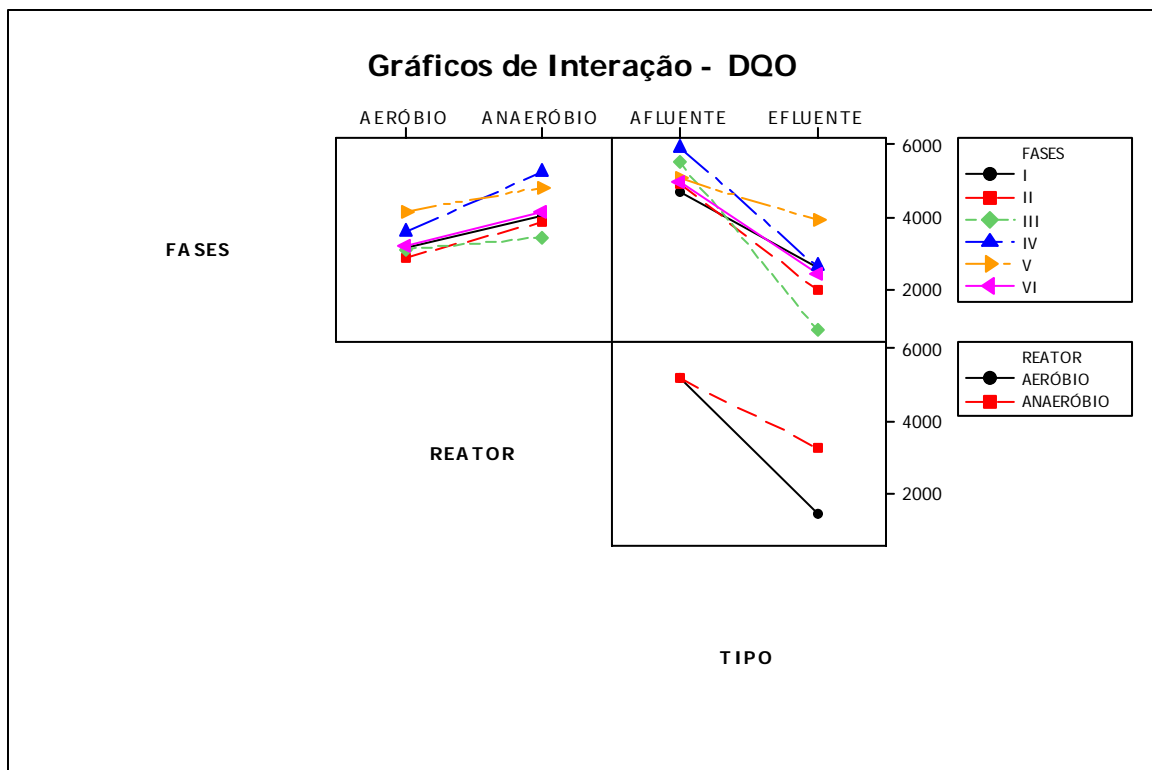


Figura 5.2 – Interação entre o tipo de reator e as fases operacionais para o parâmetro DQO

O reator anaeróbio, na fase VI, mesmo operando a 25°C, apresentou menor acúmulo de biomassa, devido ao substrato utilizado (acetato), que suportava apenas o crescimento dos microrganismos metanogênicos. Para o reator aeróbio, a mudança de 25°C para 15°C (comparação das fases II e IV, para o mesmo TDH), parece ter favorecido o crescimento de biomassa, a despeito da redução na eficiência de remoção de DQO. Isto poderia ser atribuído à maior solubilização de oxigênio em temperaturas menores. Contudo, os dados de OD não revelaram tal tendência.

No reator anaeróbio, a principal causa de abaixamento do pH é a produção de CO₂ pelos microrganismos acidogênicos de rápido crescimento. Entretanto, a literatura prevê o acúmulo de acetato em reatores anaeróbios durante condições de estresse, provavelmente devido às limitações cinéticas dos microrganismos metanogênicos, que é acentuada com a redução de pH (Aquino e Chernicharo, 2005). Portanto, apesar de a degradação de acetato também produzir CO₂, o acetato se acumulou no meio devido à condição adversa. De fato, a Figura 5.5 mostra a redução expressiva do pH do reator anaeróbio em duas fases operacionais que impuseram condições adversas à biomassa (fase I, TDH de 4 dias e fase IV, com temperatura de 15°C). Na fase V (reatores alimentados com acetato), em que também se operou em condição adversa de temperatura, houve uma elevação do pH. Isto se explica devido à redução da produção de CO₂ decorrente na mudança do substrato ($1C_6H_{12}O_6 \Rightarrow 3CO_2 + 3CH_4$; $1CH_3COO^- + H_2O \Rightarrow 1HCO_3^- + 1CH_4$), e também devido à reação de hidrólise do acetato (ácido fraco, ou seja, base forte) com a água ($CH_3COO^- + H_2O \rightleftharpoons CH_3COOH + OH^-$). Além disto, observou-se que a biomassa nesta fase estava muito escassa e que a remoção de DQO foi seriamente comprometida, o que levou à necessidade de aclimação de novo lodo para a operação da fase subsequente (fase VI).

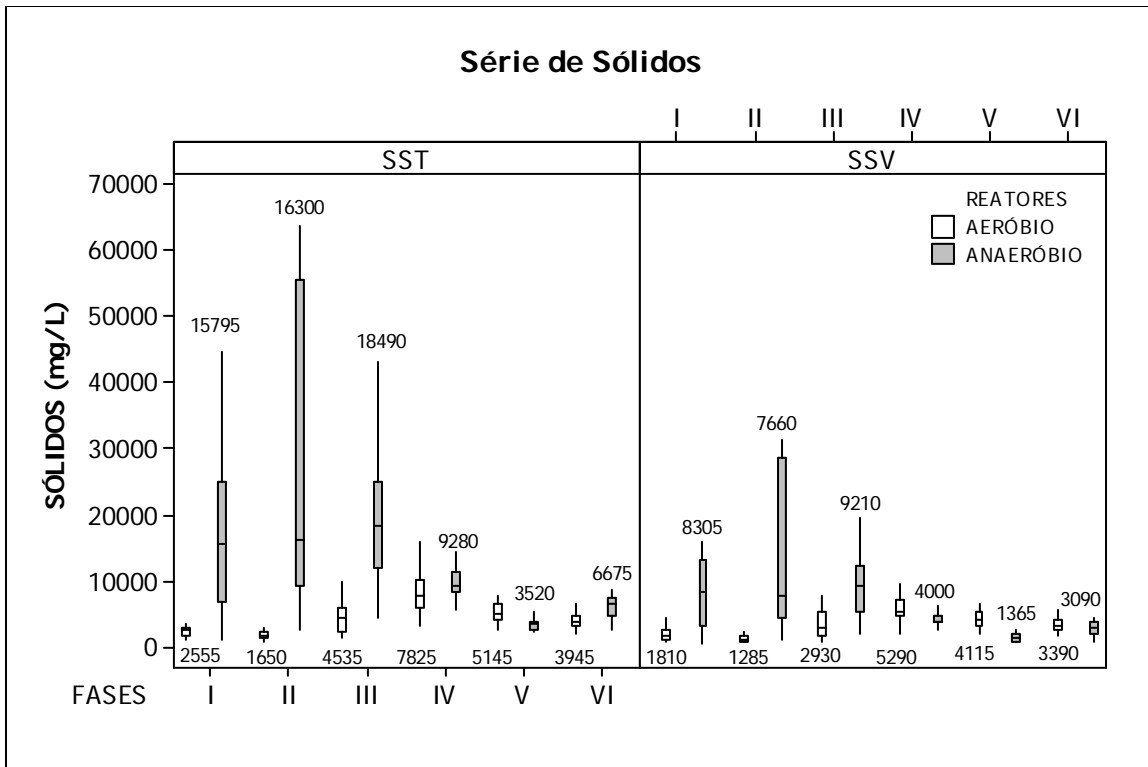


Figura 5.3 – Variação do teor de sólidos suspensos totais (SST) e voláteis (SSV) nos reatores aeróbio e anaeróbio ao longo das fases operacionais estudadas (valores expressos como medianas)

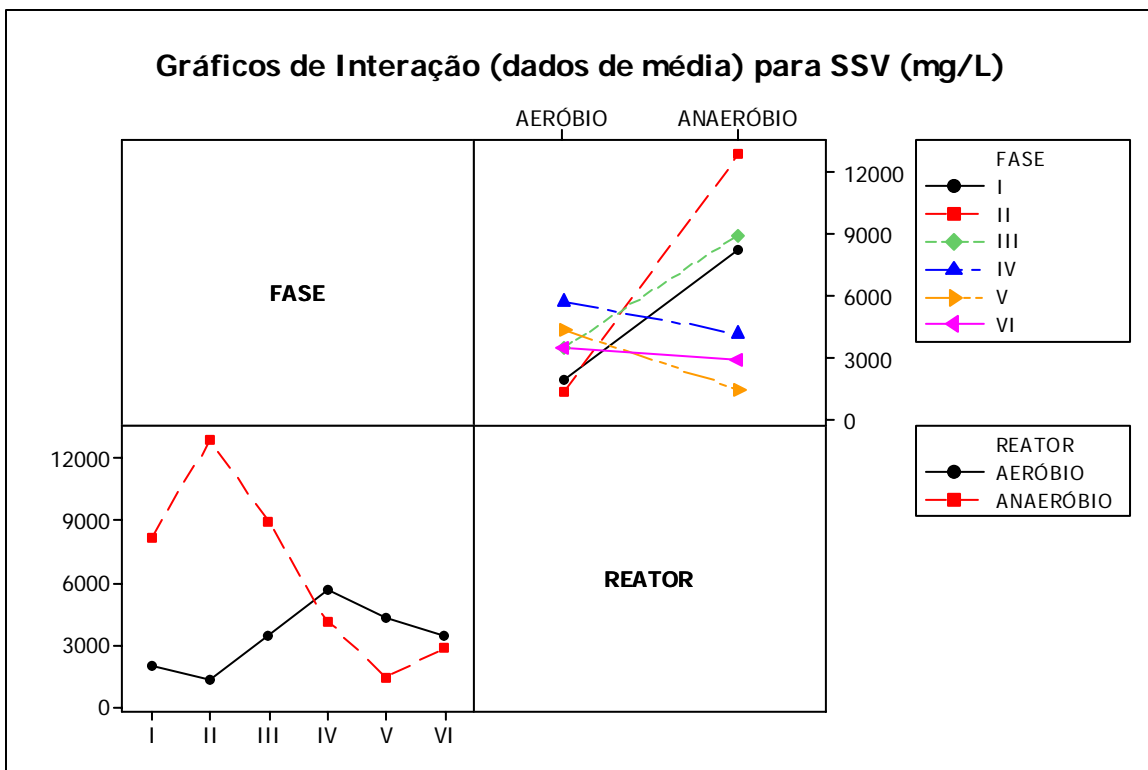


Figura 5.4 – Interação entre o tipo de reator e as fases operacionais para o parâmetro SSV

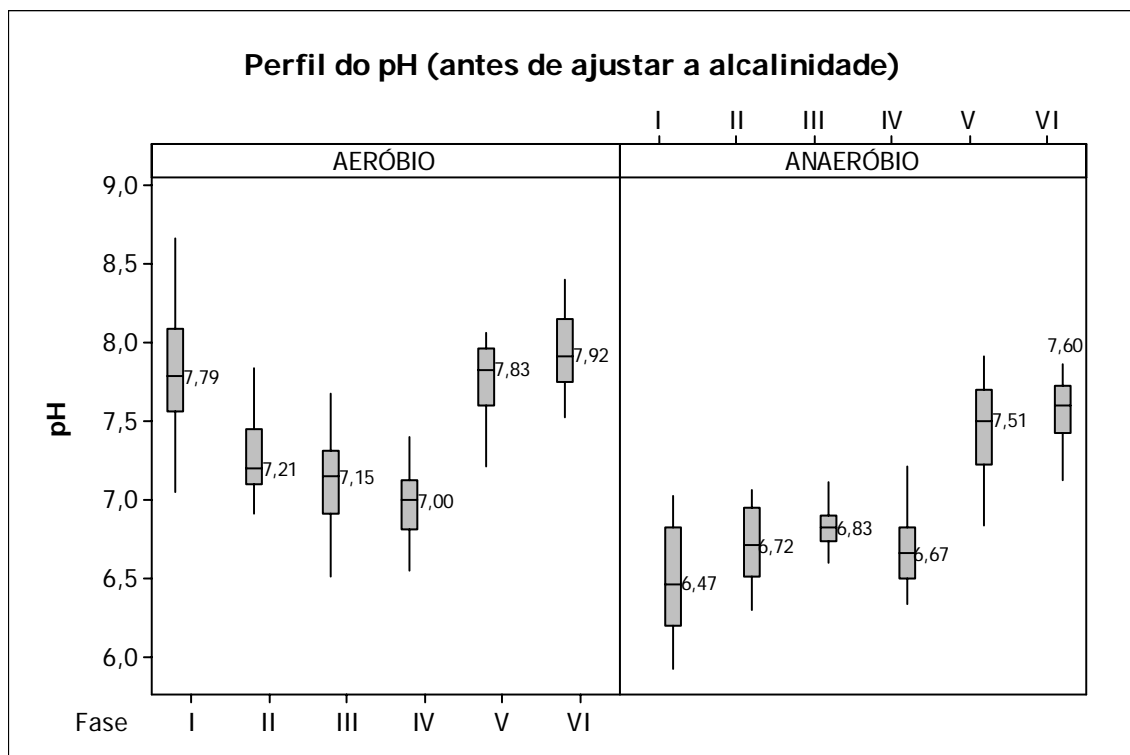


Figura 5.5 – Variação do pH nos reatores, antes de sua correção para a faixa neutra

No reator aeróbio, a mesma tendência de elevação de pH nas fases V e VI, que utilizaram acetato como substrato, e da fase I (de baixo TDH) foi observada. Além disto, houve uma redução na eficiência de remoção de DQO nestas fases. Portanto, estes resultados podem sugerir que, como o acetato é um substrato mais simples e contém menos energia potencial armazenada em sua molécula, ele pode apresentar uma situação menos favorável à atividade da população microbiana aeróbia (condição adversa). O mesmo seria válido para TDHs baixos, que levaria também a uma condição operacional desfavorável.

Para avaliação da quantidade de substrato residual nos reatores, foi utilizada cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) para detecção de glicose e acetato (nas fases V e VI), conforme descrito no Capítulo 4. Em todas as amostras analisadas (principalmente na pior condição de operação, ou seja, na fase I onde o TDH foi o menor e a carga orgânica diária aplicada de 1,25kgDQO/m³.d) verificou-se a completa degradação deste substrato (nenhum pico foi observado no tempo de retenção típico de 9,45 min). Portanto, pode-se afirmar que não há contribuição de substrato residual para a DQO efluente (ver equação 4.2) nas fases I a IV e, por isto, a quantificação de SMPs nessas fases foi feita utilizando a concentração de glicose igual a zero. De fato, Jarusutthirak e Amy (2007) confirmam o desaparecimento dos picos de glicose em efluentes de reatores aeróbios sequenciais a batelada (SBR –

sequencing batch reactors) em escala de bancada dentro de, no máximo, 1 hora de tratamento. Da mesma forma, Chipasa e Medrzycka (2004), estudando reatores aeróbios a batelada em escala de bancada, reportaram o aumento da DQO residual como sendo unicamente devido ao acúmulo de SMPs e não devido ao substrato não degradado.

No caso das fases V e VI houve acúmulo de acetato e outros AGVs no meio, sendo que o acetato acumulado pode se originar do substrato não degradado ou do metabolismo de outros AGVs, que foram formados no meio a partir da degradação de SMPs. As Figuras 5.6 e 5.7 mostram o perfil de acúmulo de AGVs nas diferentes fases operacionais para os reatores aeróbio e anaeróbio, respectivamente (os resultados de validação do método de quantificação de AGVs encontram-se dispostos no Apêndice).

Com base na quantificação de AGVs, foi realizada a quantificação dos SMPs, segundo a equação 4.2, descrita no capítulo 4. O valor da DQO residual é, pois, a soma dos parâmetros AGV e SMP em cada gráfico. Nota-se que, no reator aeróbio, na grande maioria dos casos, praticamente toda a DQO residual é advinda da produção de SMPs, conforme reportado por outros pesquisadores (Grady Jr e Williams 1975; Siber e Eckenfelder 1980; Parkin e McCarty 1981; Namkung e Rittmann 1986; Noguera *et al.* 1994; Barker *et al.* 1999; Barker e Stuckey 1999, *apud* Aquino 2004; Laspidou e Rittmann, 2002; Jarusutthirak e Amy, 2007).

Na fase III, no reator aeróbio, houve, inesperadamente, um acúmulo expressivo de AGVs. As amostras foram analisadas cromatograficamente mais de uma vez, inclusive com sua fortificação (*spike*), para a confirmação dos resultados controversos. Contudo, a presença de AGVs no sistema aeróbio foi de fato detectada. Apesar de o reator ter operado com média de oxigênio dissolvido de 6,4 mg/L, conforme mostra a Figura 5.8, foi decidido aumentar sua aeração. De fato, após esta interferência, os AGVs produzidos reduziram ou desapareceram. Nas demais fases, apesar de a observação de AGVs ter sido mais esporádica, há que se considerarem também quedas de energia que ocorreram em épocas chuvosas, interrompendo, ainda que por pouco tempo, o funcionamento do compressor de ar do reator aeróbio. Portanto, os resultados de AGVs obtidos podem ser explicados pelo fato de que, em condições de microaerofilia, há mudança de metabolismo e os microrganismos aeróbios facultativos passam a fermentar e a produzir AGVs. Ressalta-se ainda que, conforme descrito no Capítulo 4, a calibração do oxímetro ocorreu ao uso,

sendo pouco provável a hipótese de insuficiente oxigenação no meio. A Figura 5.8 mostra o monitoramento de oxigênio dissolvido neste reator nas diferentes fases operacionais.

Já no reator anaeróbio, grande parte da DQO residual é constituída por AGVs. Observa-se que as situações de estresse das fases I, IV e V (baixo TDH e/ou baixa temperatura) contribuíram substancialmente para que a maior parte da DQO residual se devesse aos AGVs. Em outras palavras, durante situações de estresse (baixo TDH e baixa temperatura) a maior parte da DQO afluente é canalizada para a produção de AGVs. O acúmulo de AGVs ocorre em sistemas de escala real como resultado do não atendimento às condições cinéticas e termodinâmicas ótimas, podendo refletir ou indicar uma condição de instabilidade (Aquino e Chernicharo, 2005). Com o baixo TDH, ocorre maior *washout* de microrganismos de lento crescimento e em baixas temperaturas, os microrganismos de lento crescimento não conseguem acompanhar o passo dos organismos fermentativos. O acúmulo de acetato no meio desencadeia mudanças metabólicas e induz formação de outros AGVs (propiónico, butírico, valérico...) e o acúmulo de tais subprodutos inibem, termodinamicamente, a conversão de AGVs a acetato (o substrato principal da metanogênese). A Figura 5.9 apresenta o *boxplot* para o parâmetro AGVs, onde esta avaliação pode ser mais bem visualizada.

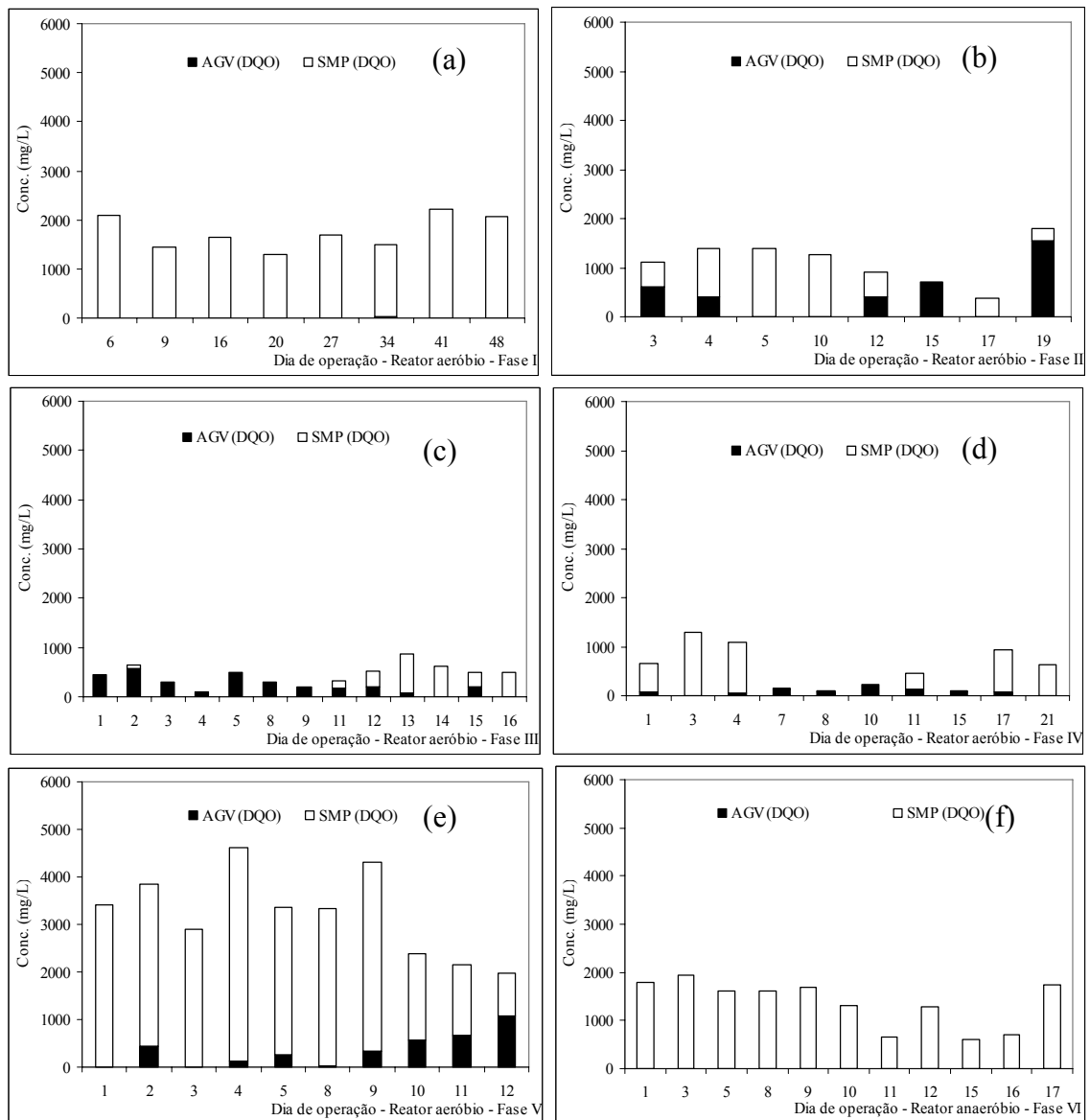


Figura 5.6 – Composição da DQO residual para o reator aeróbio nas diferentes fases operacionais: (a) fase I, (b) fase II, (c) fase III, (d) fase IV, (e) fase V, (f) fase VI.

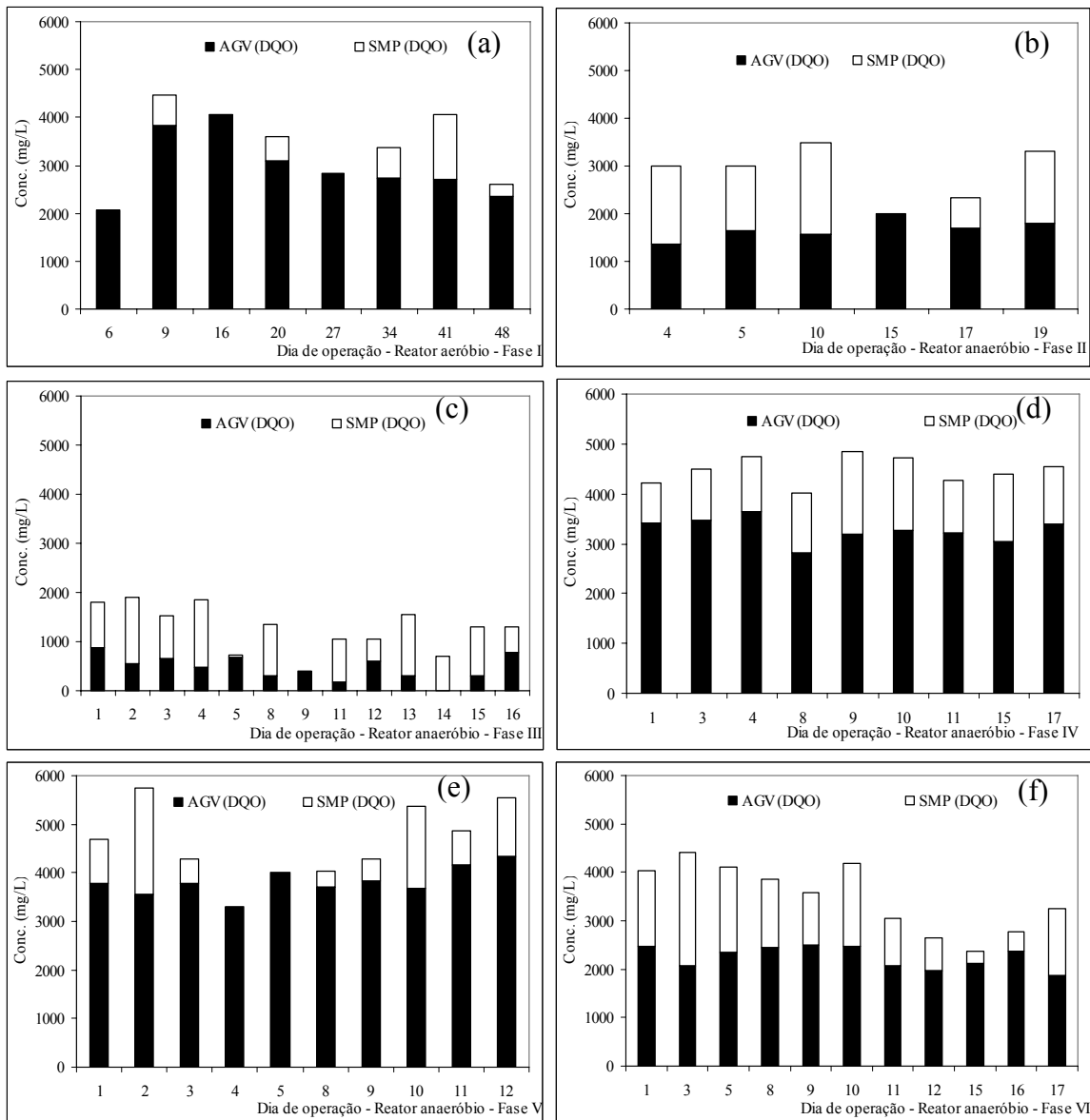


Figura 5.7 – Composição da DQO residual para o reator anaeróbico nas diferentes fases operacionais: (a) fase I, (b) fase II, (c) fase III, (d) fase IV, (e) fase V, (f) fase VI.

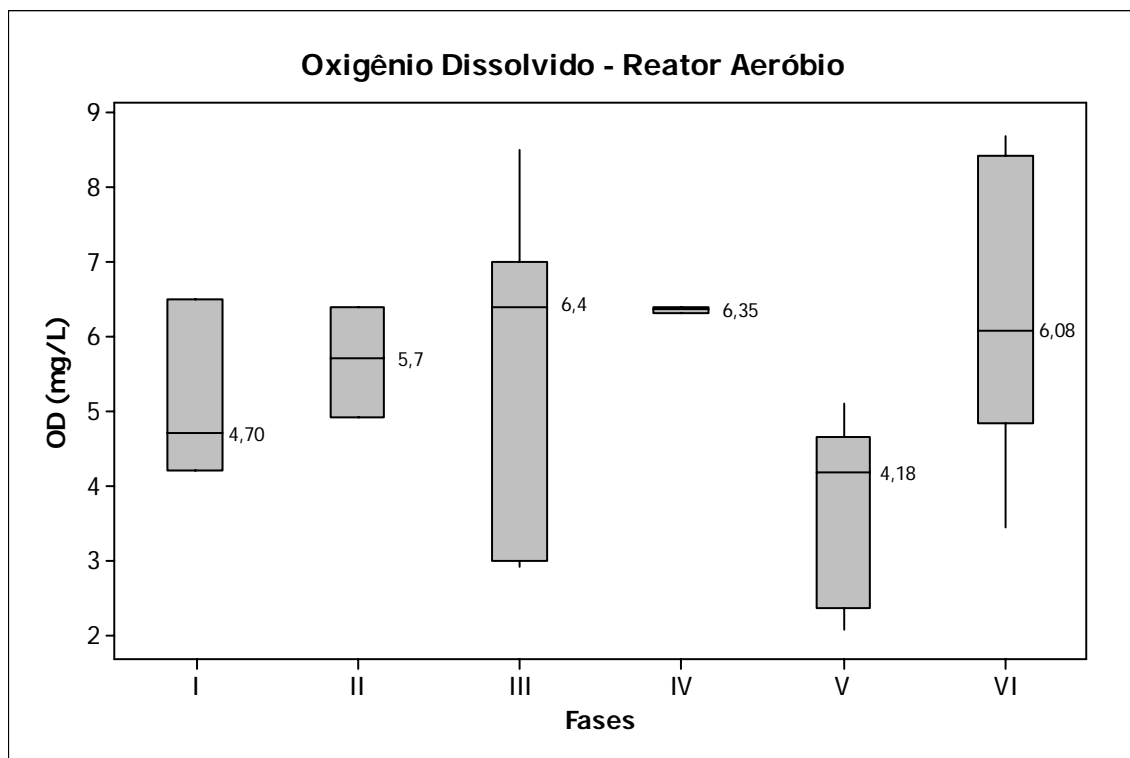


Figura 5.8 – Variação do oxigênio dissolvido no reator aeróbio (valores expressos em medianas)

O monitoramento feito mostrou que a produção de SMPs, em termos da DQO residual, no reator aeróbio foi superior à do anaeróbio. Este resultado era previsto, uma vez que no reator anaeróbio, os elétrons do doador (substrato) são canalizados tanto para a produção de SMPs quanto para a de AGVs que se acumulam no meio devido a limitações de ordem cinética e termodinâmica. Microrganismos aeróbios crescem mais rápido e degradam substrato em velocidade maior. Se há mais microrganismos no meio, pode haver mais SMP-BAPs e se há mais degradação de substrato há mais SMP-UAPs. Se os SMPs desempenharem um papel ecológico no meio (para seqüestrar metais nutrientes, para comunicação entre células), os microrganismos que crescem mais rápido precisam produzir mais SMPs, por isso esperar-se-ia, de fato, que o aeróbio produzisse mais SMPs. A menor produção de SMPs verificada para o reator anaeróbio comparativamente ao aeróbio, quando avaliada a DQO residual, indica que os elétrons do doador (no caso, a glicose ou acetato) foram utilizados preferencialmente na produção de intermediários (AGVs), e que a elevada produção de AGVs foi o principal indicador de situações de estresse (baixo TDH e baixa temperatura). Estas condições comprometem significativamente o consórcio microbiano do reator anaeróbio, interferindo, principalmente, nas taxas de crescimento da população metanogênica e acetogênica. Com

menos microrganismos acetogênicos e metanogênicos, os ácidos orgânicos produzidos pelos microrganismos acidogênicos se acumularam no sistema. Em outras palavras, condições adversas no reator anaeróbio resultaram em um descompasso entre os microrganismos produtores de ácidos (acidogênicos) e os consumidores de ácido (metanogênicos) resultando no acúmulo de compostos reduzidos no meio, causadores de DQO (Aquino, 2004).

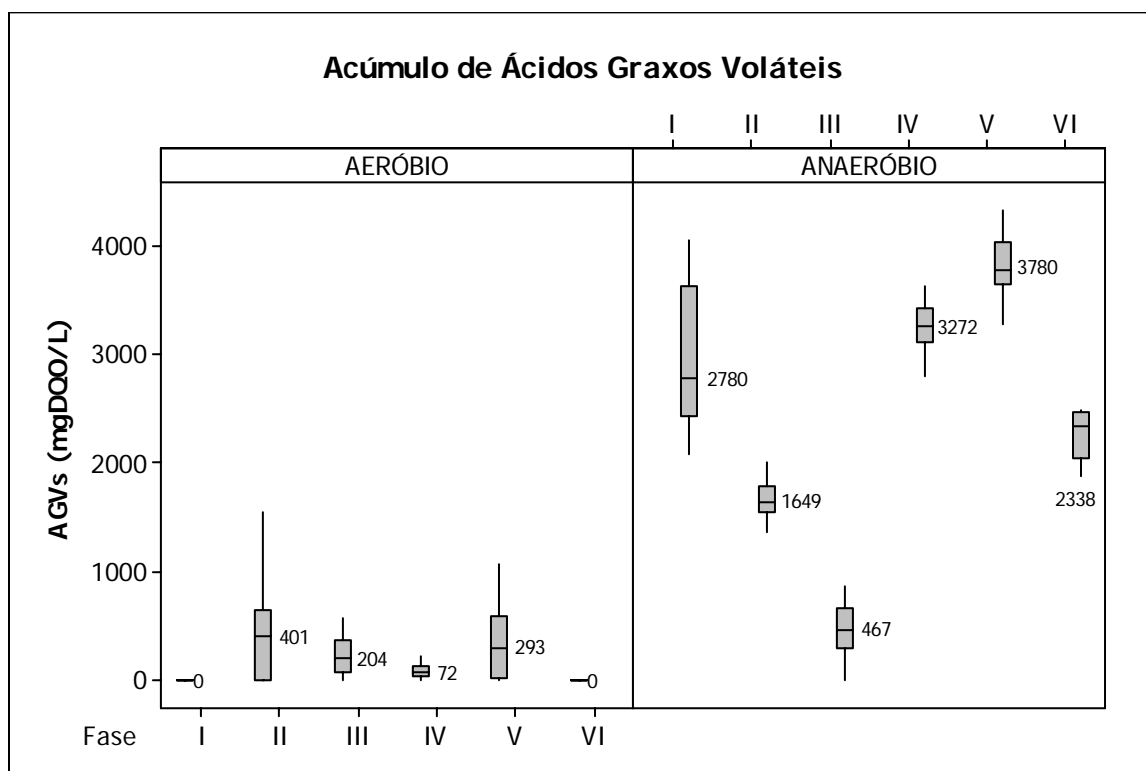


Figura 5.9 – Acúmulo de ácidos graxos voláteis (AGVs) nos reatores aeróbio e anaeróbio nas diferentes fases operacionais (valores expressos em medianas)

Vale ressaltar que nas fases V e VI (que empregaram o acetato como substrato), para o reator anaeróbio, o acúmulo de ácido acético representou 99 e 98% do total da DQO relacionada a AGVs, respectivamente. Na fase V, para o reator aeróbio, o acetato representou 88% deste valor. Para as demais fases, de I a IV (utilizando glicose), outros AGVs também foram produzidos; contudo, os principais AGVs acumulados foram o ácido acético (39%, 35%, 36% e 47% da concentração total de AGVs para as fases I, II, III e IV, respectivamente) e o propiônico (26%, 28%, 41% e 38% da concentração total de AGVs para as fases I, II, III e IV, respectivamente).

As Figuras 5.10 e 5.11 apresentam os resultados da estimativa de acúmulo de SMPs feita para ambos os reatores em todas as fases operacionais.

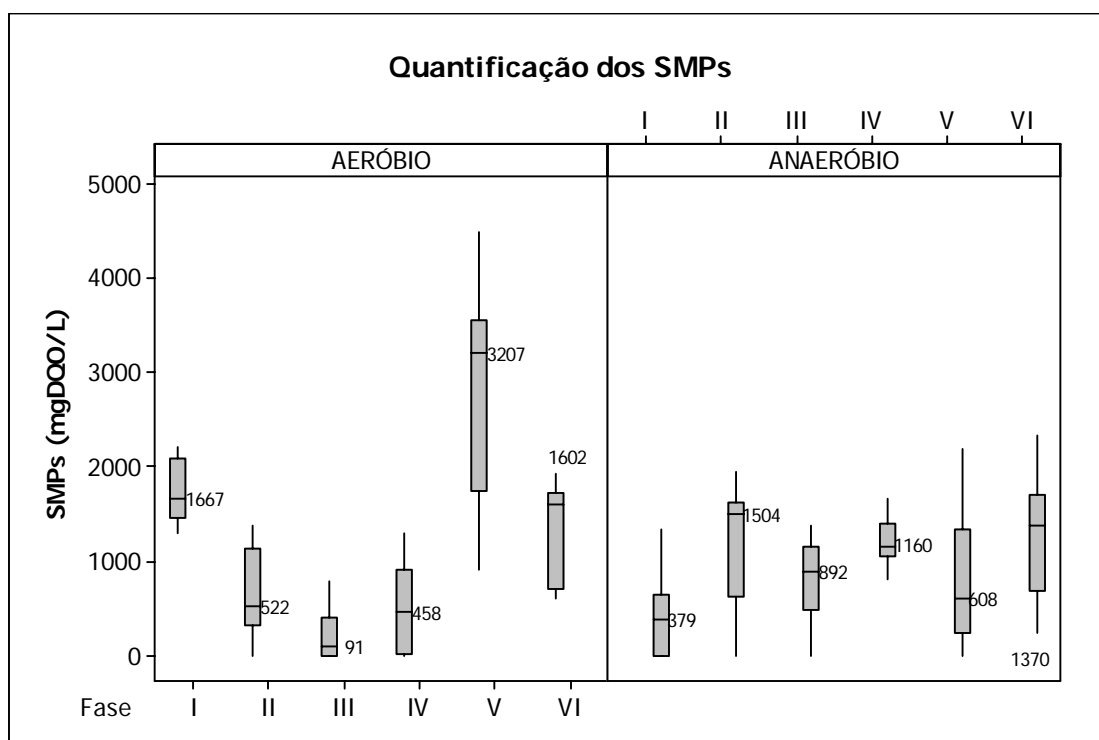


Figura 5.10 – Estimativa de acúmulo dos SMPs nos reatores aeróbio e anaeróbio para as diferentes condições operacionais (valores expressos em medianas)²

Os valores de SMPs apresentados na Figura 5.11 permitem estimar a contribuição de tais compostos para a DQO residual. No reator aeróbio os SMPs representaram de 23% (fase III) a 100% (fases I e VI) da DQO centrifugada efluente, sendo que no reator anaeróbio essa variação foi de 11% (fase I) a 64% (fase III), em termos de medianas.

As Figuras 5.12 e 5.13 exibem as taxas de conversão da matéria orgânica afluyente em SMPs para os reatores aeróbio e anaeróbio. Elas mostram a relação entre os SMPs formados e a concentração de substrato afluyente a cada reator (S_0) a fim de se estimar a porcentagem da DQO afluyente que é convertida em SMPs.

² Os poucos valores de concentração aparentemente divergentes entre SMPs (Fig. 5.10) e DQO residual (Fig. 5.1), em termos de medianas, se devem ao diferente volume de dados disponíveis e utilizados para o cálculo de medianas e obtenção dos gráficos para um e outro parâmetro, não representando, de forma alguma, qualquer contrasenso.

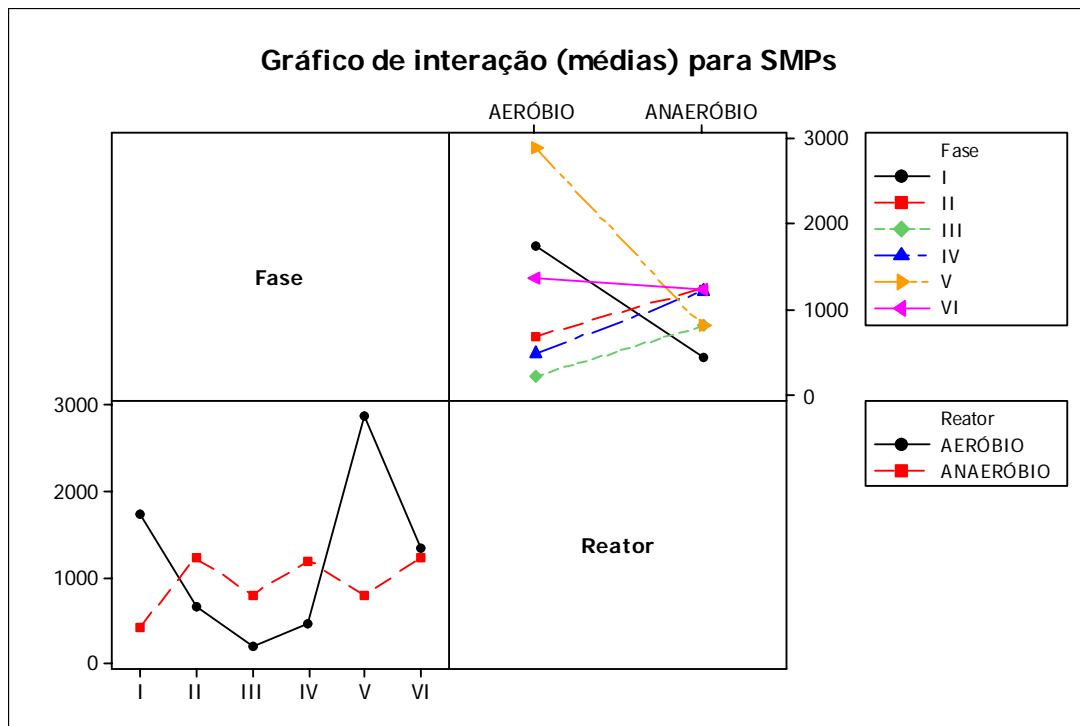


Figura 5.11 – Interação entre o tipo de reator e as fases operacionais para o parâmetro SMPs

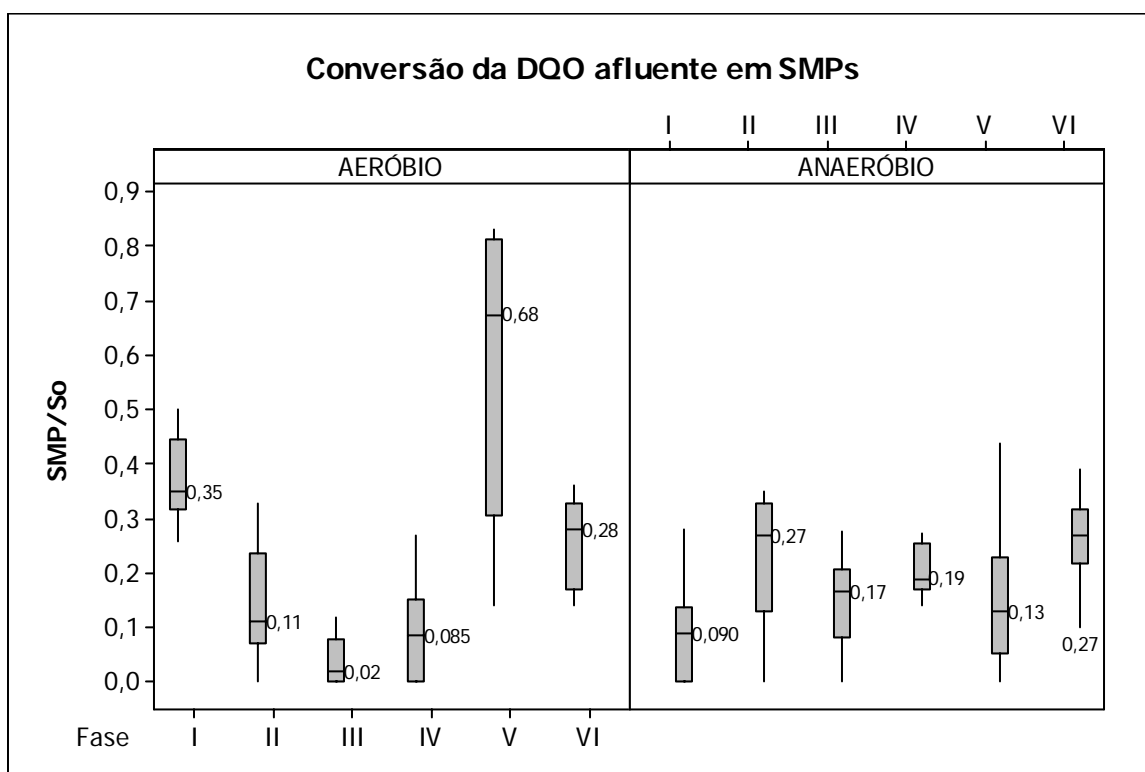


Figura 5.12 – Produção de SMPs normalizada em relação à DQO afluyente (SMP/So) nos reatores anaeróbico e aeróbico durante as fases operacionais estudadas (valores expressos como medianas)

Na avaliação da produção normalizada de SMPs, comportamentos distintos foram apresentados pelos dois reatores. Enquanto os resultados do tratamento aeróbio divergem substancialmente entre as fases operacionais, variando de 2 a 68% da matéria orgânica afluyente, em termos de mediana, o tratamento anaeróbio pareceu seguir uma tendência similar, exceto para a fase I, de menor TDH (em que apenas 9% da matéria orgânica afluyente foi convertida a SMPs). A Figura 5.13 revela que, de modo geral, a produção normalizada de SMPs foi menor para o reator anaeróbio (de 9 a 27%), o que confirma dados observados por outros pesquisadores (Barker e Stuckey, 2001; Kuo e Parkin, 1996; Aquino e Stuckey, 2004). Boero *et al.* (1991), estudando reatores aeróbios de mistura completa mostraram que a produção de SMPs (normalizada em relação à concentração de substrato afluyente, só que em termos de carbono orgânico) variou de 3,1% a 14,7% quando utilizados glicose e fenol como substratos, respectivamente. Ressalta-se que o TDH utilizado em sua pesquisa foi de 48 horas, bem inferior a todos os TDHs adotados neste trabalho. A maior produção de SMPs observada nesse estudo em relação aos resultados, para a glicose, apresentados por Boero *et al.* (1991) podem ser explicados pelo maior TDH adotado nesse trabalho (4 a 20 d), o que provavelmente resultou em maior lise celular e produção de SMPs.

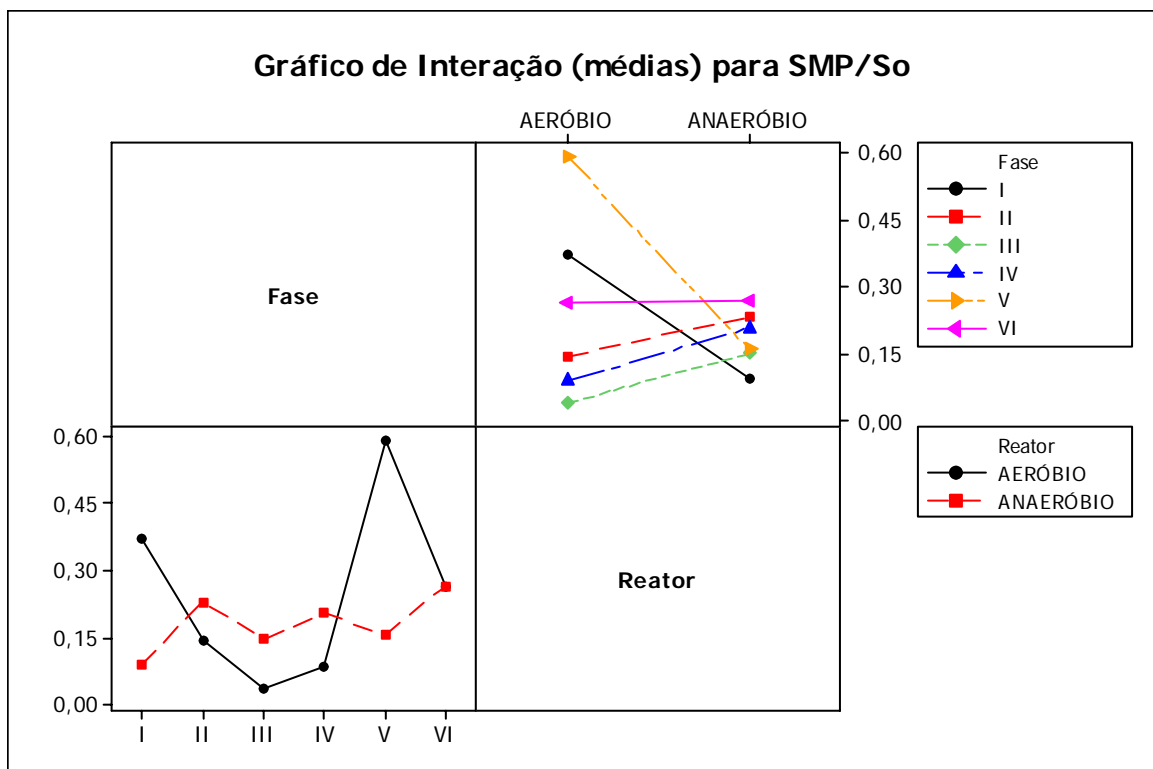


Figura 5.13 – Interação entre o tipo de reator e as fases operacionais para a produção normalizada (SMP/So) de SMPs

As fases I e V foram aquelas que apresentaram maior discrepância entre as taxas de conversão da DQO afluente em SMPs entre os reatores aeróbio e anaeróbio (na fase I, 35% do aeróbio contra 9% do anaeróbio; na fase V, 68% do aeróbio contra 13% do anaeróbio). Estes resultados são particularmente interessantes quando associados às condições operacionais adversas de baixo TDH e baixa temperatura. Nestes casos, para o reator anaeróbio, há um comprometimento dos microrganismos metanogênicos e acetogênicos no meio, levando a um acúmulo de AGVs, conforme discutido anteriormente. Como os SMPs são quantificados a partir da DQO residual e da DQO atribuída ao acúmulo dos ácidos, taxas menores de conversão a SMPs realmente seriam esperadas. Da mesma forma, caso os AGVs fossem englobados no “pool” de SMPs, sua maior produção normalizada (SMP/So) também teria acontecido nas fases I e V (80% e 94%, respectivamente, para o reator anaeróbio).

Portanto, os resultados confirmam que, em condições de estresse, a produção de SMPs é minimizada em função do acúmulo de produtos intermediários (AGVs) não incluídos na classe dos produtos microbianos solúveis.

Já para o reator aeróbio, condições adversas podem colaborar para o acúmulo de SMPs no meio, uma vez que o metabolismo na presença de oxigênio dissolvido não resulta em acúmulo de intermediários. A população microbiana poderia responder às condições adversas alterando seu metabolismo, excretando SMPs no meio, ou ainda, caso as condições levassem ao aumento do decaimento endógeno, liberando produtos de lise celular. Variando-se apenas o TDH (avaliação das fases I, II e III), percebe-se que a produção de SMPs no reator aeróbio foi inversamente proporcional ao TDH, ou seja, quanto maior a carga orgânica aplicada maior a produção de SMPs, sendo o máximo de produção observado na fase I (carga orgânica máxima de 1,25kgDQO/m³.d). Tais resultados sugerem que os SMPs produzidos no reator aeróbio foram mais associados à degradação do substrato (UAPs – *utilization associated products*) do que à lise celular (BAPs – *biomass associated products*), conforme discutido por Aquino e Stuckey (2004).

Para as fases II e III, operadas com glicose na ausência de estresse, a quantidade de SMPs produzida no reator aeróbio foi menor que no anaeróbio (11 e 2% contra 27 e 17%, respectivamente). Contudo, a diferença não é discrepante como os resultados das fases I e

V, reportados anteriormente. Isto demonstra que o aumento do TDH nas fases II e III propiciou uma situação mais favorável à degradação dos AGVs no reator anaeróbio. Na ausência de estresse, sem acúmulo de AGVs, parte significativa dos elétrons disponíveis na matéria orgânica afluyente foi destinada à produção dos produtos microbianos. Na fase III, a porcentagem de SMPs produzida nos dois reatores diminuiu comparativamente à fase II. De fato, uma vez que ambos operaram com uma melhor eficiência, as DQOs efluentes foram consideravelmente menores, para um valor aproximado de alimentação - DQO afluyente ao reator aeróbio de 5.596 ± 604 mg/L e ao reator anaeróbio de 5.423 ± 579 mg/L. O baixo valor de SMPs acumulado no reator aeróbio parece ter sido decorrente da aeração deficiente nos momentos de 'picos de energia', que levou à produção de AGVs (conforme discutido anteriormente), bem como da melhor eficiência de remoção de DQO.

Finalmente, na fase VI, os resultados obtidos para ambos os reatores foram equivalentes (28% para o aeróbio e 27% para o anaeróbio). Contudo, para o reator aeróbio, esta foi a terceira maior produção normalizada de SMPs em relação à DQO afluyente. Isto pode sugerir que o acetato utilizado como substrato, por ser uma molécula mais simples e por prover menos energia que a molécula de glicose para a população microbiana, possa ocasionar uma maior produção normalizada de SMPs (por exemplo, provenientes de lise celular devido ao menor fornecimento de energia no reator). No reator anaeróbio, a produção de AGVs também foi intensa (mantendo a taxa de produção de SMPs relativamente baixa) e pode ser justificada da mesma forma (acetato é uma molécula mais simples, fornece menos energia e interfere no consórcio microbiano por suportar o crescimento apenas dos microrganismos metanogênicos acetoclásticos).

A Figura 5.14 apresenta a estimativa da conversão diária de biomassa a SMPs nos reatores aeróbio e anaeróbio durante as fases operacionais estudadas.

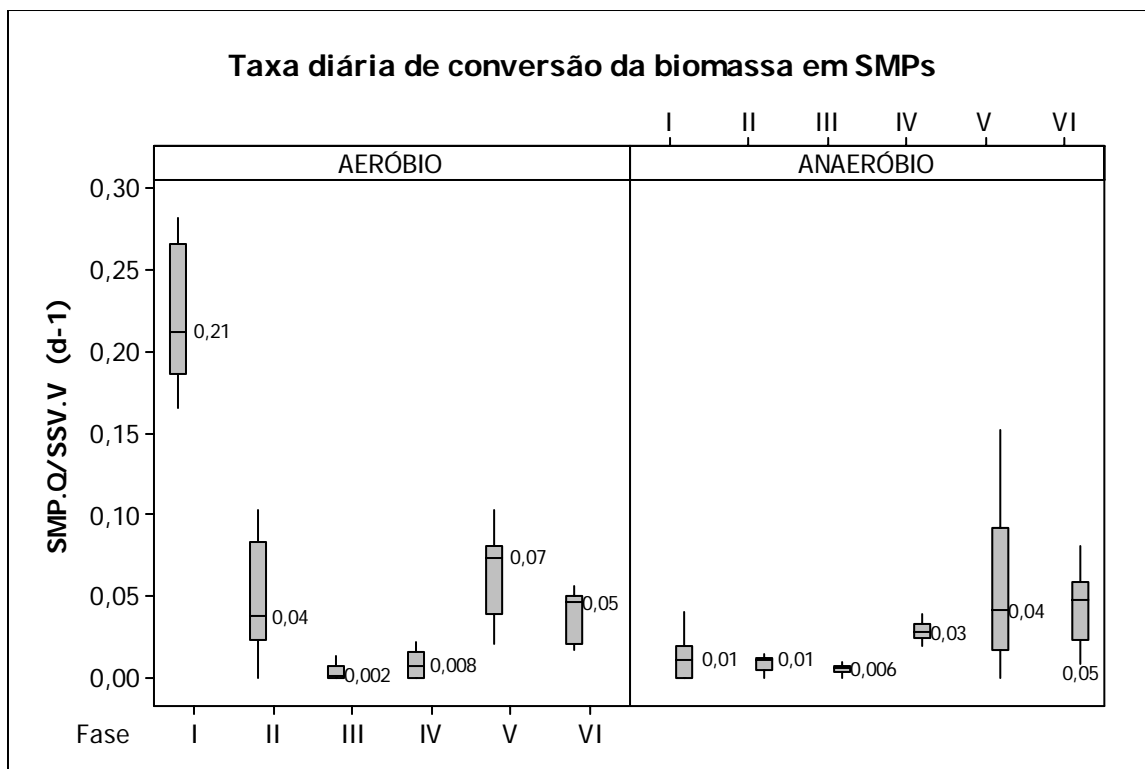


Figura 5.14 – Estimativa da conversão diária de biomassa a SMPs nos reatores aeróbio e anaeróbio durante as fases operacionais estudadas (valores expressos como medianas)

Na Figura 5.15, observa-se, no reator aeróbio, a mesma tendência de decréscimo sistemático obtida para o parâmetro SMP/S_o , comparando-se os diferentes TDHs (fases I, II e III). Já no reator anaeróbio, esta taxa permaneceu praticamente constante nas três primeiras (0,6 a 1%) e três últimas fases operacionais (3 a 5%). Esses resultados podem indicar que, no reator anaeróbio, a produção de SMPs esteve mais relacionada à biomassa presente, sugerindo que a lise celular pode ter contribuído mais para a produção de SMPs quando comparado à degradação de substrato. Em outras palavras, o fato de a carga orgânica aplicada não ter tido interferência significativa na conversão da DQO afluente a SMPs sugere que, provavelmente, os SMPs acumulados são principalmente advindos da biomassa (SMPs-BAP), ao invés da utilização do substrato (SMPs-UAP).

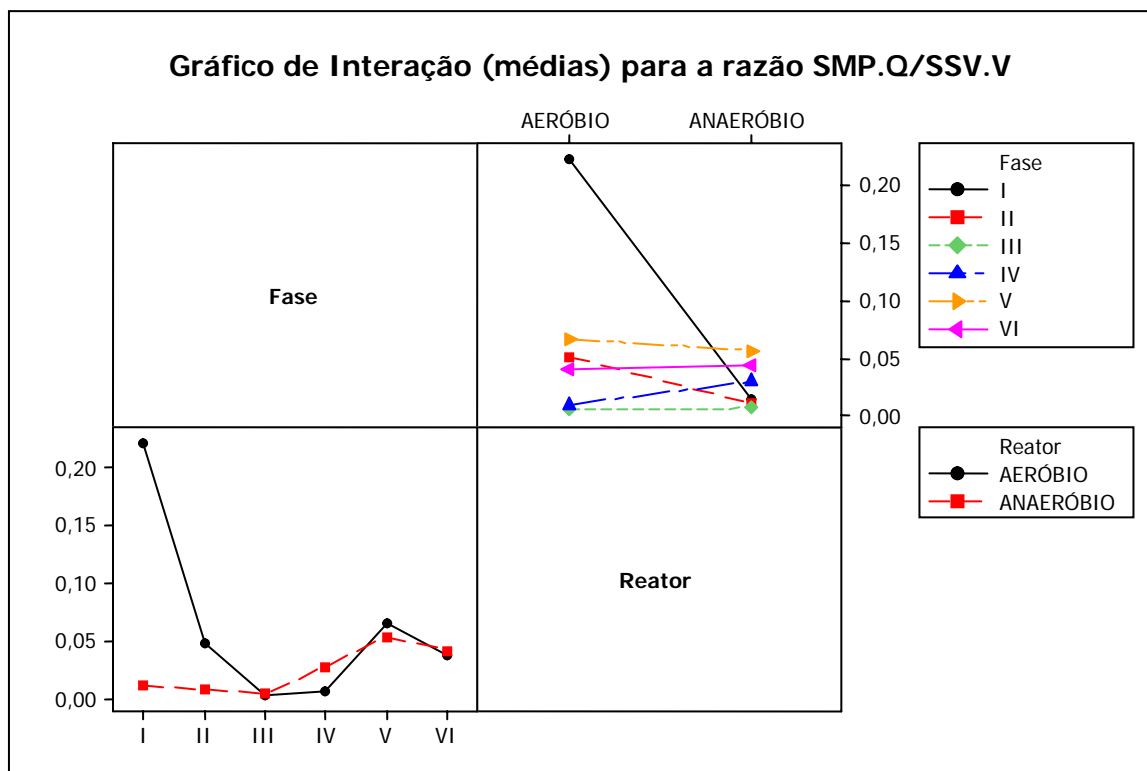


Figura 5.15 – Interação entre o tipo de reator e a razão entre o acúmulo de SMPs e a biomassa presente no sistema

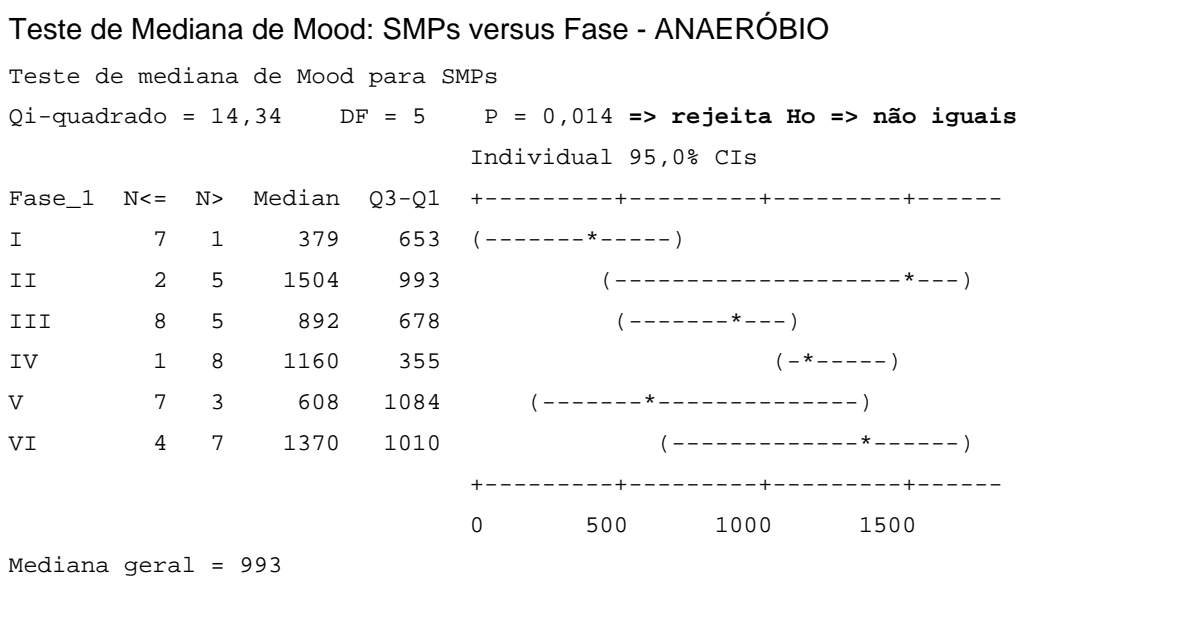
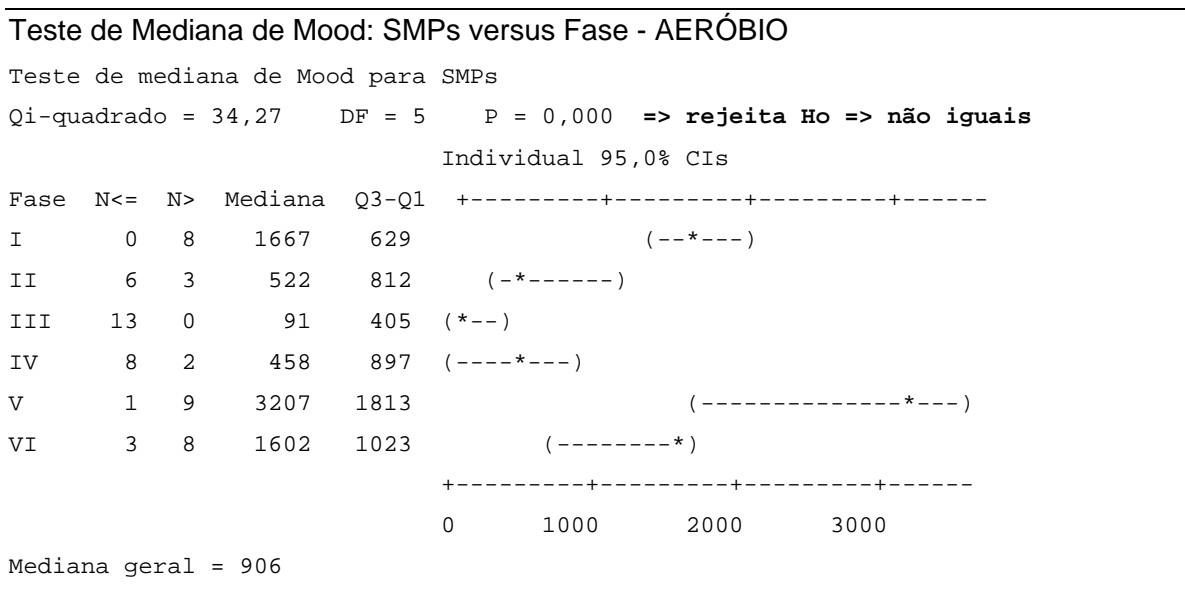
5.1.2. Condições operacionais

Conforme descrito no capítulo 4, as condições operacionais testadas para a produção de SMPs foram a temperatura, o tempo de detenção hidráulica (TDH, que, neste caso, é assumido igual à idade do lodo devido ao emprego de reatores de mistura completa) e o tipo de substrato (acetato e glicose). Por meio do teste estatístico não paramétrico de medianas (*Mood's median test*) realizado no *software Minitab*[®] e transcrito a seguir na Tabela 5.2, pode-se afirmar com 95% de confiança que, em ambos os reatores, as diferentes condições operacionais influenciaram a quantidade produzida/acumulada de SMPs no meio (o valor p obtido foi inferior a 0,05, o que indica a não igualdade entre os valores testados – no caso, as fases operacionais).

Para avaliar o efeito da temperatura, deve-se comparar as fases II e IV (glicose como substrato e TDH de 10 dias, a 25 e 14°C, respectivamente) e as fases V e VI (acetato como substrato e TDH de 10 dias, a 15 e 25°C, respectivamente). Para a avaliação do TDH, cabe

a comparação das três primeiras fases operacionais (I – TDH de 4 dias, carga orgânica aplicada de 1,25kgDQO/m³.d; II – TDH de 10 dias, carga orgânica aplicada de 0,5kgDQO/m³.d; e III – TDH de 16 dias, carga orgânica aplicada de 0,32kgDQO/m³.d), em que todas as demais condições operacionais foram mantidas constantes em cada reator (glicose como substrato, temperatura de 25°C). Finalmente, para avaliar o efeito do tipo de substrato, as fases II e VI (TDH de 10 dias e temperatura de 25°C) e as fases IV e V (TDH de 10 dias e temperatura de 10°C) foram comparadas entre si.

Tabela 5.2 – Resultados dos testes de medianas para as diferentes fases operacionais nos reatores aeróbio e anaeróbio.



Temperatura

Conforme descrito no capítulo 4, a temperatura foi um dos parâmetros controlados para monitoramento da produção de SMPs. As fases I, II, III e VI empregaram a mesma temperatura de 25 °C. Nas fases IV e V, a temperatura desejada foi de 15 °C, para a qual se empregou banho de água resfriada com adição periódica de gelo. A Figura 5.16 mostra o *boxplot* das temperaturas medidas nas fases operacionais. Portanto, pode-se dizer que ambas as fases operadas para temperaturas inferiores à ambiente (e que simularam o comportamento dos reatores biológicos em regiões de clima mais frio), o fizeram praticamente à mesma temperatura (15 ± 3 °C na fase IV e 16 ± 4 °C na fase V).

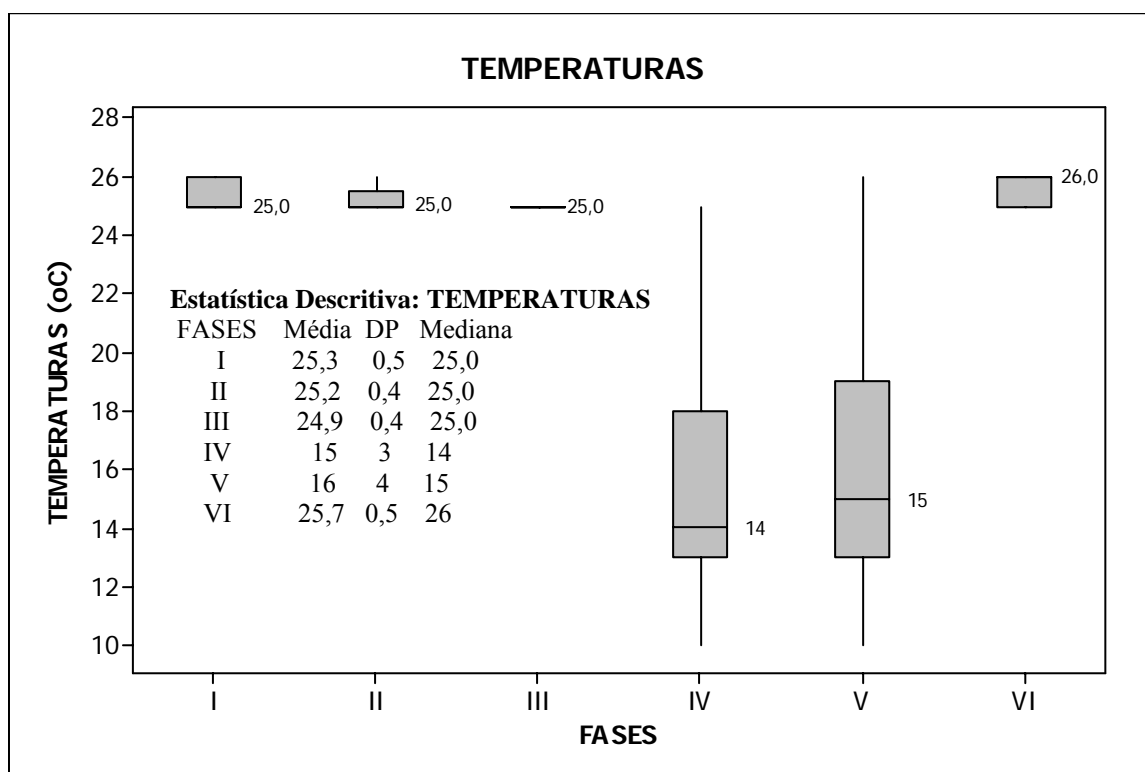


Figura 5.16 – Temperaturas efetivamente medidas ao longo das fases operacionais

De modo geral, a temperatura interfere inversamente na produção de SMPs. Em outras palavras, os resultados sugerem que, a temperaturas mais baixas, a produção de SMPs é maior. Observando-se o gráfico da Figura 5.17, pode-se verificar que esta tendência é bem acentuada para o reator aeróbio, o que corrobora a discussão feita anteriormente para este reator, de que condições adversas de baixa temperatura contribuiriam para a elevação da produção/acúmulo de SMPs no meio. De fato, a Figura 5.17, que mostra a interferência da

temperatura na taxa de conversão do substrato a SMPs, mostra que, a 15°C, cerca de 33,8% da DQO afluente foi convertida a SMPs, enquanto que 18,7% foi a proporção obtida a 25°C. Portanto, é possível que a DQO residual de efluentes de reatores operados em climas mais frios seja devida a substrato não degradado por causa do baixo metabolismo, bem como ao maior acúmulo de SMPs.

Os SMPs podem se acumular mais em temperaturas menores devido à combinação de fatores: maior produção e menor degradação. A maior produção pode ser devido à maior lise celular, ou então devido à maior excreção de metalóforos (pequenos peptídeos excretados em situações de deficiência nutricional) que teriam a função de quelar e solubilizar mais metais nutrientes cuja solubilidade teria sido diminuída pela redução na temperatura. Para o reator anaeróbico, essa tendência não foi verificada, e a Figura 5.17 que a conversão da DQO afluente a SMPs ficou praticamente constante com a mudança de temperatura (18,1% para temperatura de 15°C e 18,3% a 25°C). Isto se deveu ao fato de que, mediante condições adversas, a rota metabólica caminha preferencialmente no sentido de acúmulo de AGVs, pelo comprometimento das etapas de acetogênese e metanogênese, conforme discutido anteriormente.

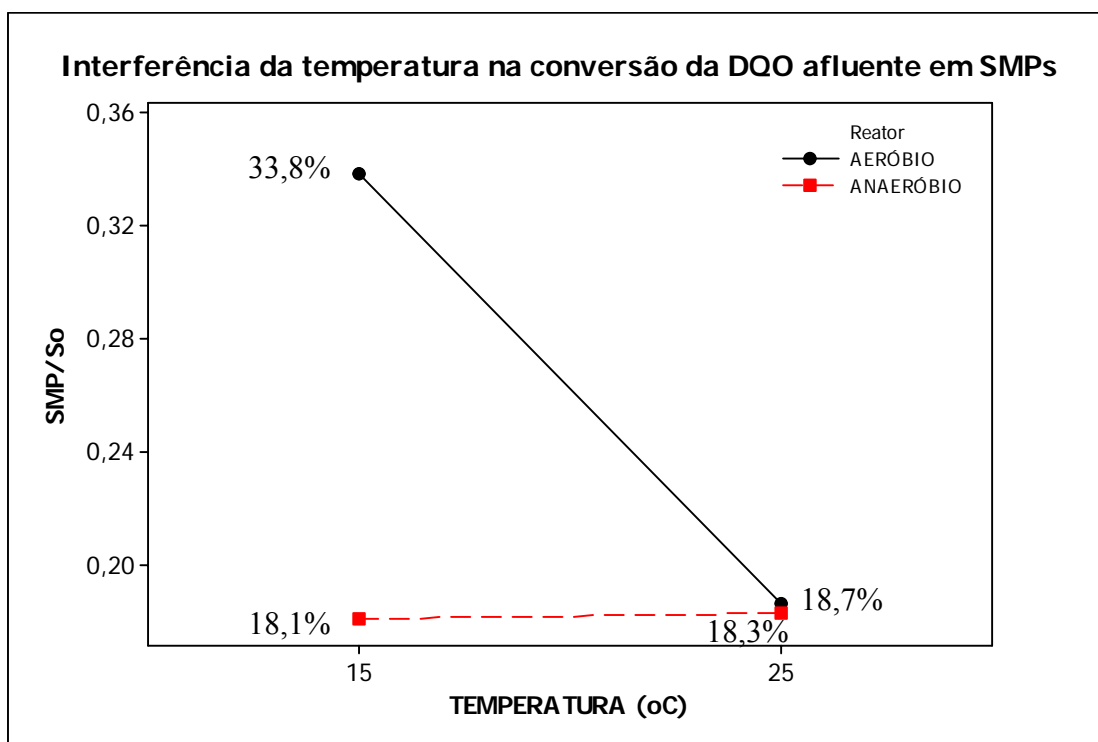


Figura 5.17 – Interação da temperatura na produção normalizada de SMPs em relação à DQO afluente (SMP/So), por reator

A Figura 5.18 mostra a interação da temperatura na razão entre a quantidade de SMPs acumulada e a quantidade de biomassa presente no sistema (SMP.Q/SSV.V). Os resultados obtidos sugerem que, no tratamento aeróbio, a elevação da temperatura aumenta a porcentagem de conversão da biomassa a SMPs, o que pode ser um indício do aumento da proporção de SMPs-BAP (decaimento endógeno). Tal resultado é condizente com o aumento dos valores do coeficiente de decaimento endógeno (elevado nos aeróbios em relação aos anaeróbios) com o aumento da temperatura. Já no tratamento anaeróbio, o inverso é observado, indicando que são as baixas temperaturas que favorecem a produção de SMPs-BAP. Tal resultado está de acordo com o que foi observado por Feng *et al.* (2008) que, em um estudo com reator anaeróbio compartimentado com carreador (CABR), verificaram o maior acúmulo de SMPs em menores temperaturas. Os autores sugeriram que baixas temperaturas podem levar à redução na taxa de degradação de substrato e dos SMPs ou inibir o crescimento microbiano.

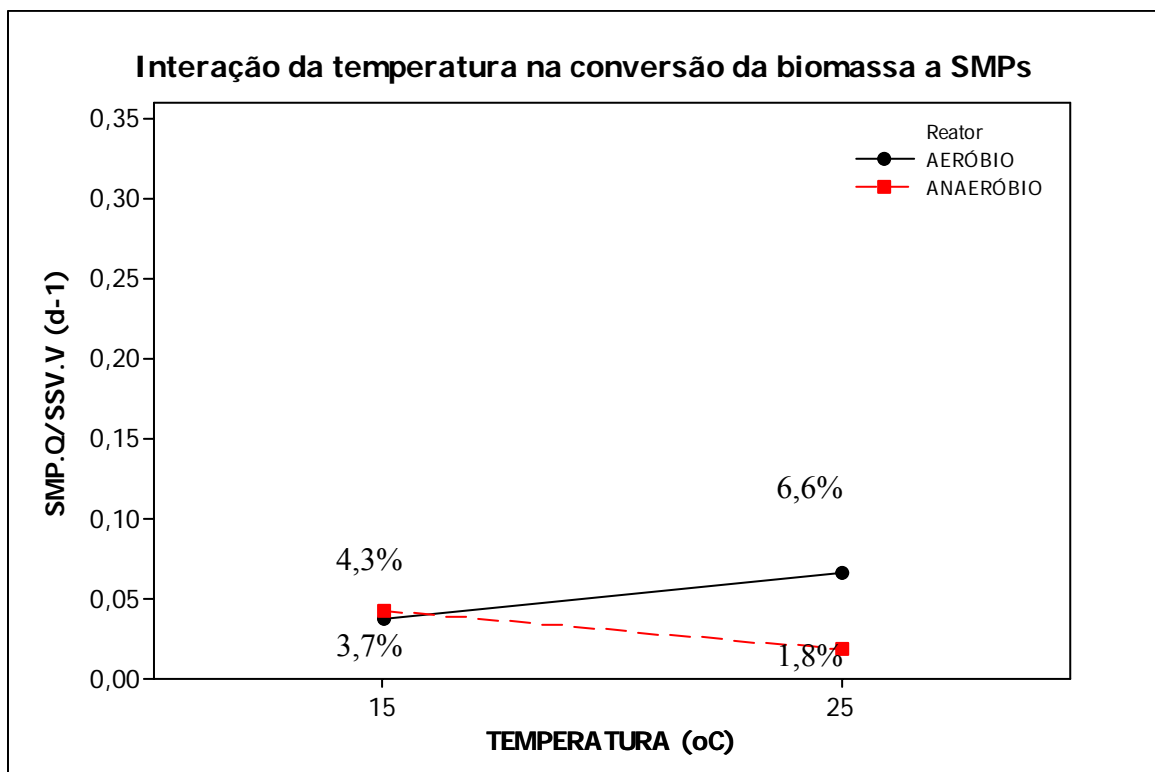


Figura 5.18 – Interação da temperatura na razão entre a quantidade de SMPs acumulada e a quantidade de biomassa presente no sistema

Tempo de detenção hidráulica

A variação no tempo de detenção hidráulica (TDH) ocorreu nas três primeiras fases da pesquisa, conforme mostrado no Capítulo 4, na tabela 4.2. Os resultados da análise de interferência deste parâmetro na produção de SMPs estão expostos na Figuras 5.19.

Observa-se que, no tratamento aeróbio, o aumento do TDH leva a uma diminuição sistemática na produção/acúmulo de SMPs, para a faixa estudada de 4 a 16 dias (próxima da faixa ideal de 2 a 15 dias reportada por Baskir e Hansford 1980; Rittmann *et al.* 1987; Hao e Lau 1988; Pribyl *et al.* 1997 *apud* Aquino, 2003). De fato, tempos de detenção muito baixos impõem uma carga orgânica aplicada mais elevada, o que poderia desencadear um excesso de atividade metabólica e excreção de SMPs para o consumo do substrato. Além disto, esta relação pode ser um indicativo de que, no reator aeróbio, há uma maior produção de SMPs-UAP, conforme discutido no item 5.1.1.

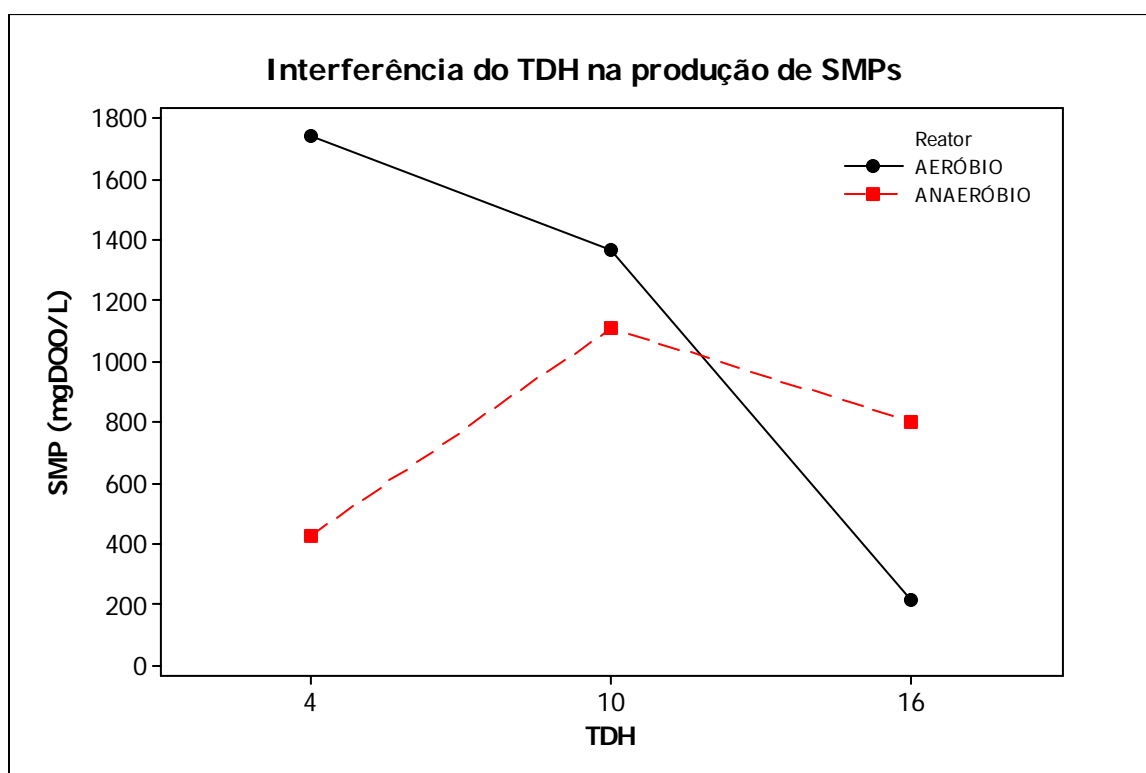


Figura 5.19 – Efeito do TDH no acúmulo de SMPs nos reatores aeróbio e anaeróbio

Para o reator anaeróbio, a mesma tendência é observada, exceto para o menor TDH (4 dias). Isto pode ser explicado pela elevada produção de AGVs diante da situação de

estresse imposta nesta condição, confirmada pelo monitoramento do pH. A análise da série de sólidos da fase I confirmou a hipótese de arraste (*washout*) de microrganismos que têm baixas taxas de crescimento específico (microrganismos metanogênicos e acetogênicos), uma vez que pôde-se verificar uma diminuição sistemática dos sólidos suspensos voláteis no reator. Como a quantificação de SMPs é obtida por meio dos resultados de AGVs, explica-se o baixo resultado no menor TDH.

Huajun *et al.* (2008), estudando reatores anaeróbios compartimentados, confirmam os resultados obtidos, pois também verificaram que, em geral, o aumento da carga orgânica levou ao aumento da produção de SMPs. Da mesma forma, Aquino *et al.* (2009), estudando a produção de SMPs em reatores UASB, também verificaram um maior acúmulo de SMPs em menores TDHs (maiores cargas orgânicas). De fato, estudos usando culturas puras sugeriram que produtos microbianos podem ser produzidos tanto como resultado de falta ou de excesso de fonte energética, que seria o caso (Boylen e Ensign, 1970; Neijssel e Tempest, 1976 *apud* Huajun *et al.*, 2008). Kuo *et al.*, trabalhando com reatores anaeróbios de mistura completa, mostraram que a produção normalizada de SMPs (SMP/S₀) decresceu com o aumento da idade do lodo até atingir um valor mínimo, quando a idade do lodo era de aproximadamente 25 dias, e depois aumentou novamente. As Figuras 5.20 e 5.21 mostram esta relação para os resultados obtidos e as mesmas observações são confirmadas, exceto pelo TDH de 4 dias no reator anaeróbio (condição de estresse – *washout* do lodo e acúmulo de AGVs).

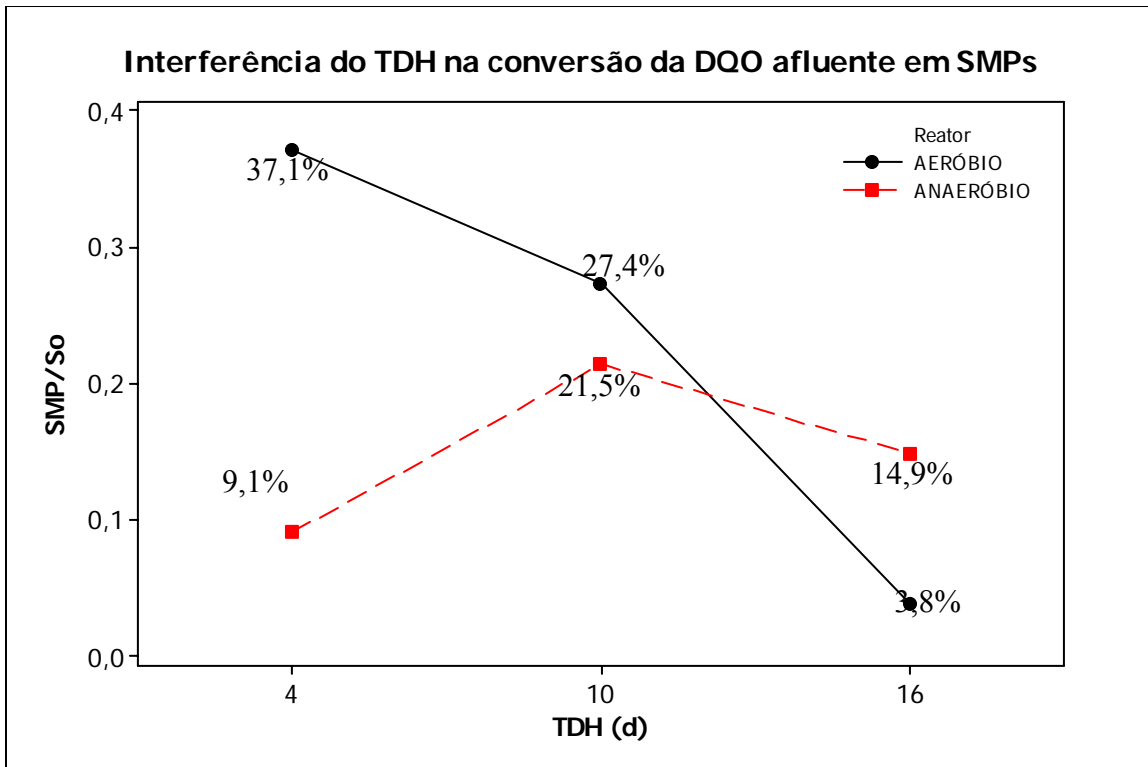


Figura 5.20 – Efeito do TDH na taxa de conversão da DQO afluente em SMPs, por reator

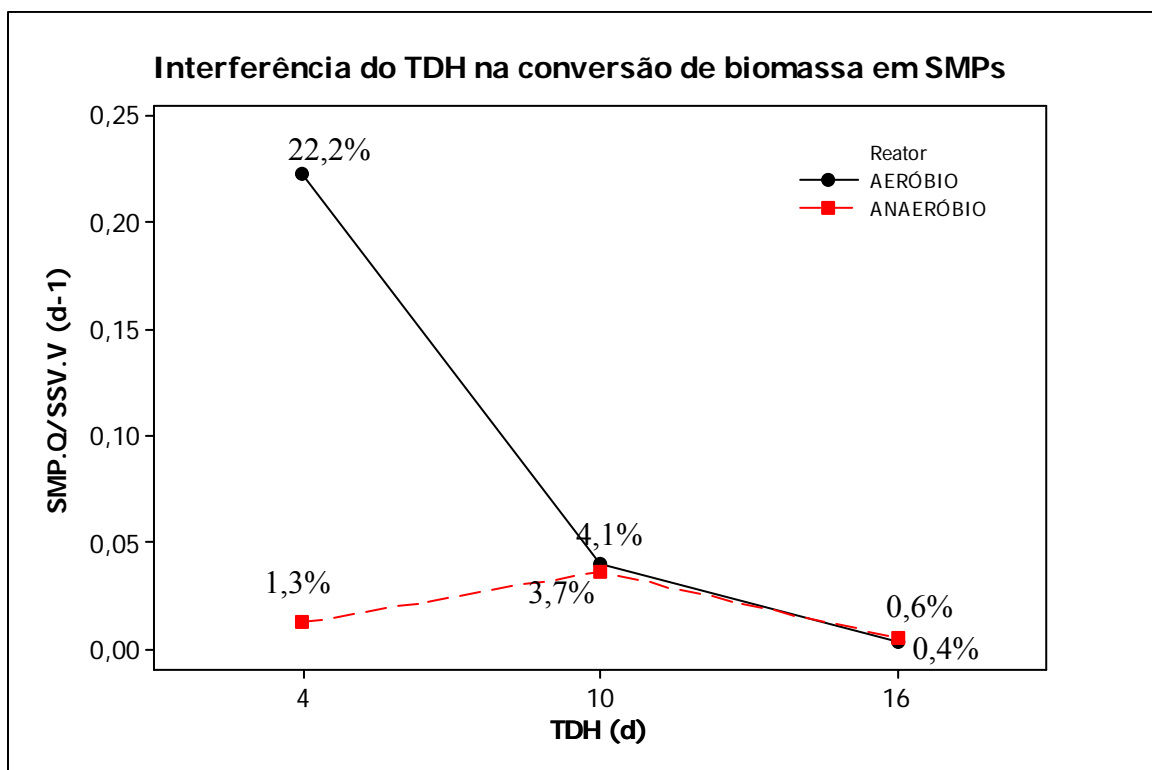


Figura 5.21 – Interferência do TDH na razão entre o acúmulo de SMPs e a biomassa presente no sistema.

Tipo de substrato

De modo geral, quando a glicose foi utilizada como substrato, a produção de SMPs diminuiu, comparativamente ao emprego do acetato. As Figuras 5.22 e 5.23 descrevem este efeito por reator, inclusive para a taxa de conversão da DQO afluente. Isto pode sugerir que o acetato utilizado como substrato, por ser uma molécula mais simples e por prover menos energia que a molécula de glicose para a população microbiana, possa ocasionar uma maior produção normalizada de SMPs (por exemplo, provenientes de lise celular). Isto justificaria, inclusive, a interferência do substrato bem mais pronunciada no reator aeróbio que, mediante condições adversas, praticamente não produzem AGVs. Contudo, tais resultados contradizem o observado por Kuo *et al.* (1996), que afirmaram que a produção de SMPs em sistemas anaeróbios de mistura completa alimentados com glicose é maior que naqueles alimentados com acetato.

A Figura 5.24 apresenta o efeito do tipo de substrato na razão de produção de SMPs em função da biomassa presente no sistema. No reator aeróbio, o substrato parece não interferir significativamente na produção de SMPs-BAP, uma vez que a taxa de conversão da biomassa a SMPs ficou praticamente constante. Já no reator anaeróbio, a taxa inferior obtida para a glicose no reator anaeróbio pode indicar que, em condições operacionais em que este substrato é utilizado, a maior produção de SMPs estaria relacionada à utilização do substrato (SMP-UAP) e não ao decaimento endógeno, comparativamente a situações dispostas de acetato.

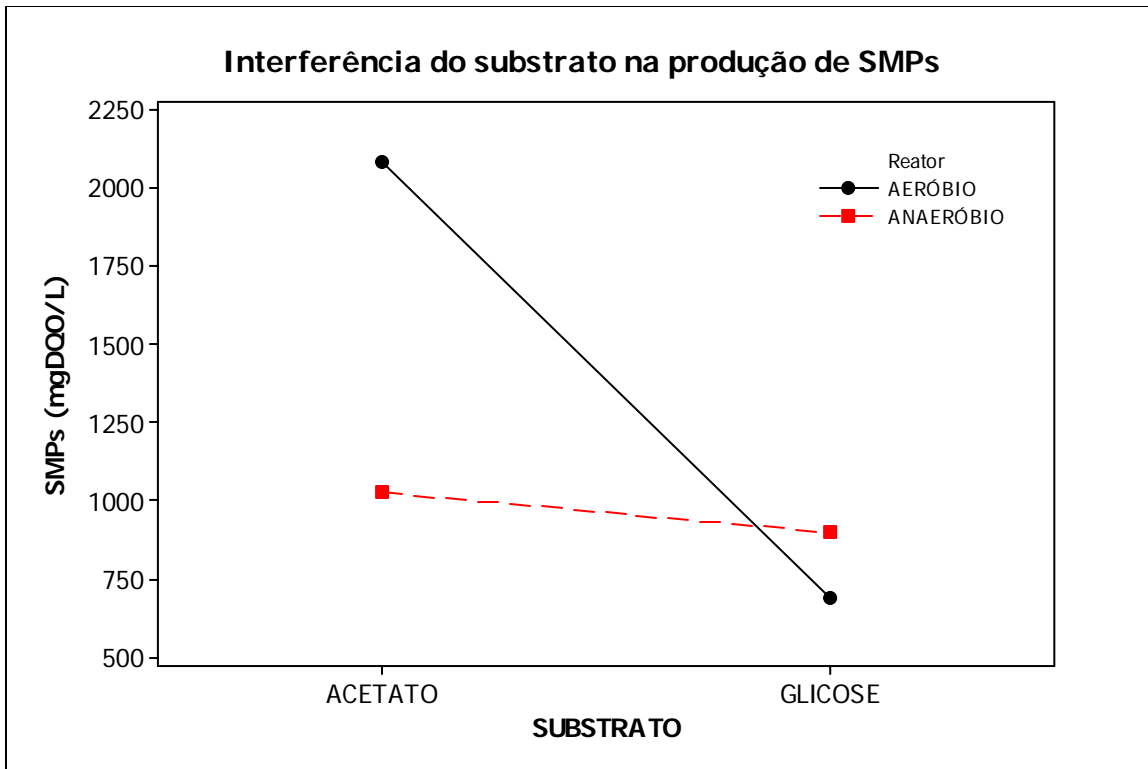


Figura 5.22 – Efeito do substrato na produção de SMPs, por reator

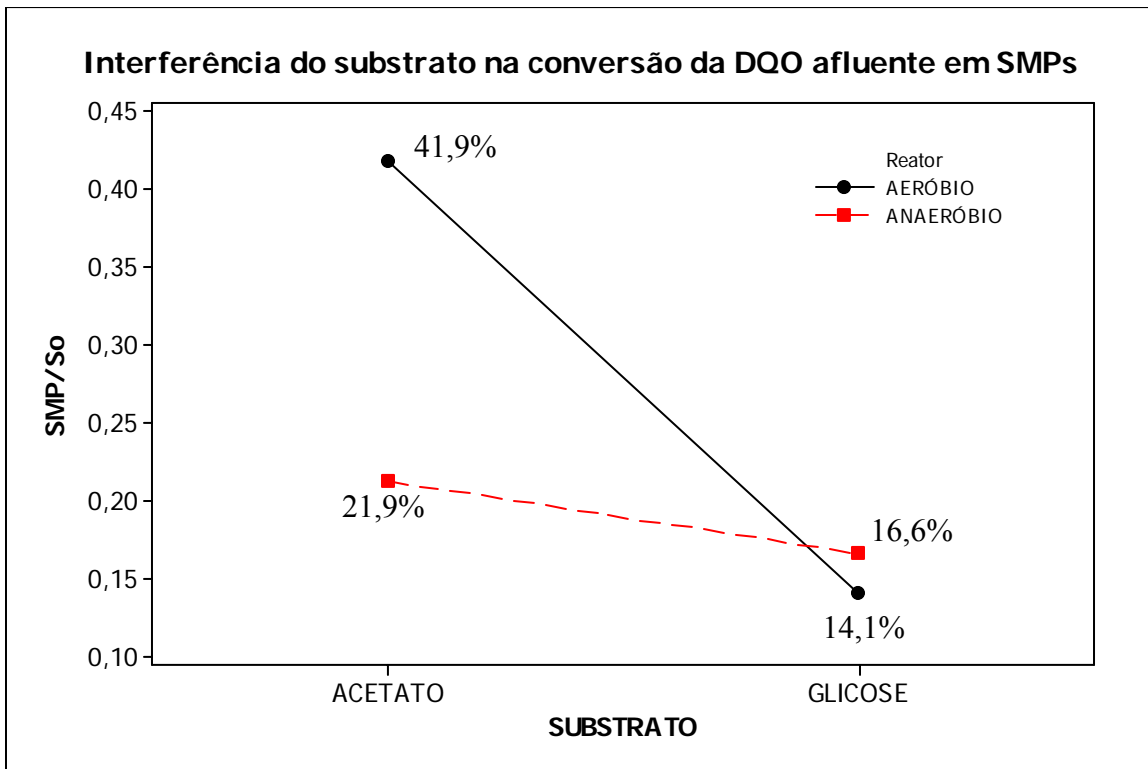


Figura 5.23 – Efeito do tipo de substrato na taxa de conversão da DQO afluente em SMPs, por reator

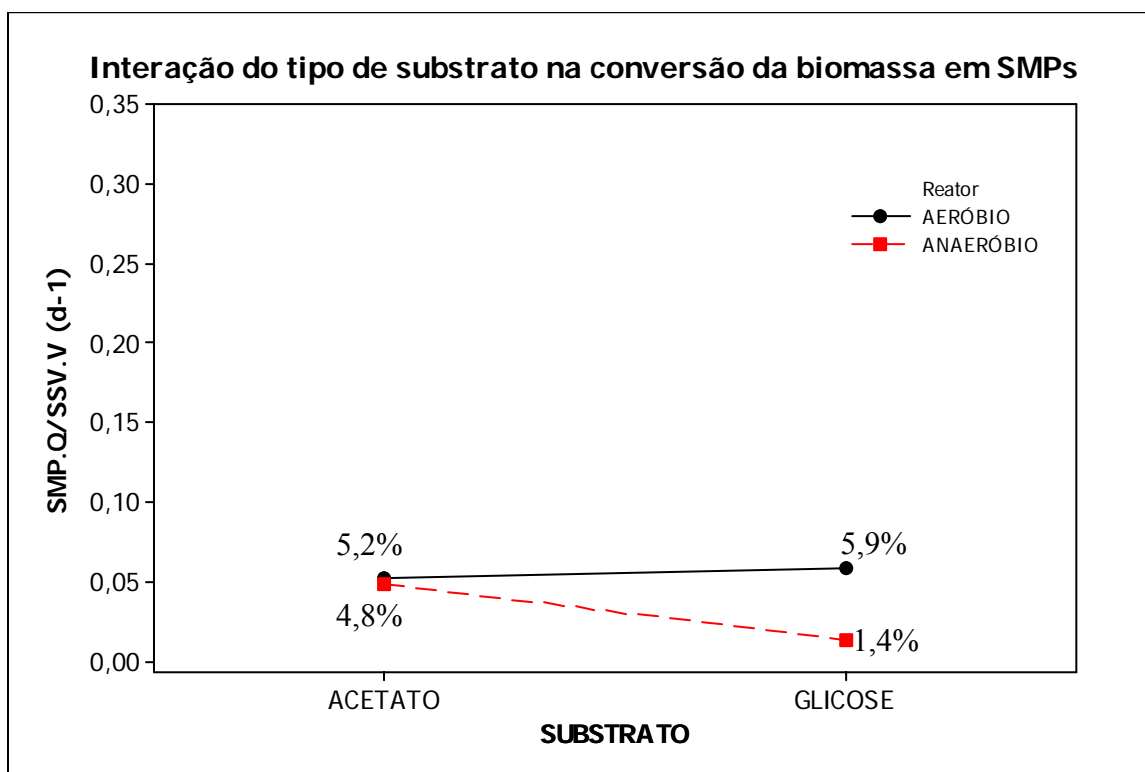


Figura 5.24 – Efeito do tipo de substrato na razão entre o acúmulo de SMPs e a biomassa presente no sistema.

5.2. Caracterização dos SMPs

5.2.1. Proteínas e carboidratos

Conforme descrito no Capítulo 4, ensaios de proteínas e carboidratos foram realizados na tentativa de caracterizar a DQO residual das diferentes fases operacionais. Além disto, os mesmos testes foram feitos nas amostras de polímeros extracelulares e lisados, após a fase IV, quando estes protocolos foram adotados. Os resultados estão reportados em termos de DQO para que a comparação seja adequada. Para a conversão da concentração de proteínas e carboidratos em DQO, foram usados os fatores 1,5 e 1,2, respectivamente, que são coeficientes estequiométricos derivados da fórmula química típica de cada tipo de composto ($C_{16}H_{24}O_5N_4$ para proteínas $C_6H_{10}O_5$ para carboidratos). As Figuras 5.25 e 5.26 apresentam a composição da DQO residual nas amostras e fases descritas, nos reatores aeróbio e anaeróbio, respectivamente.

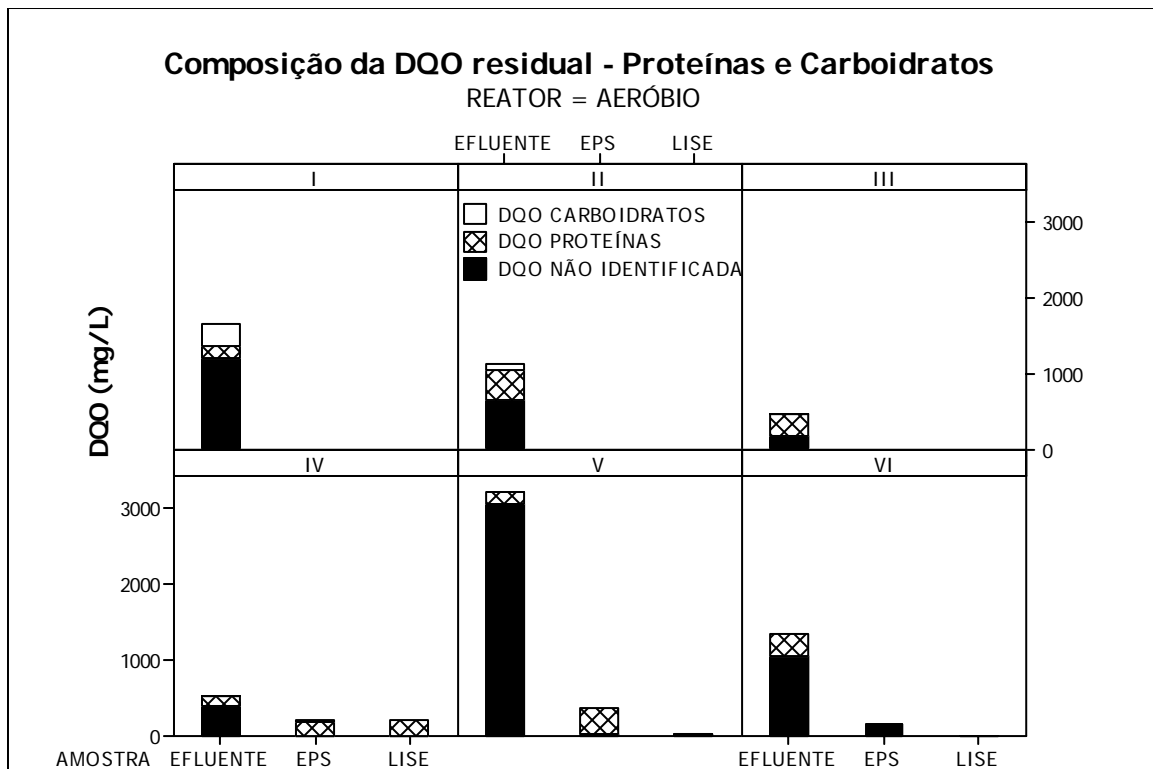


Figura 5.25 – Composição acumulada da DQO residual, dos polímeros extracelulares e dos produtos de lise celular em termos de proteínas e carboidratos – Reator Aeróbio

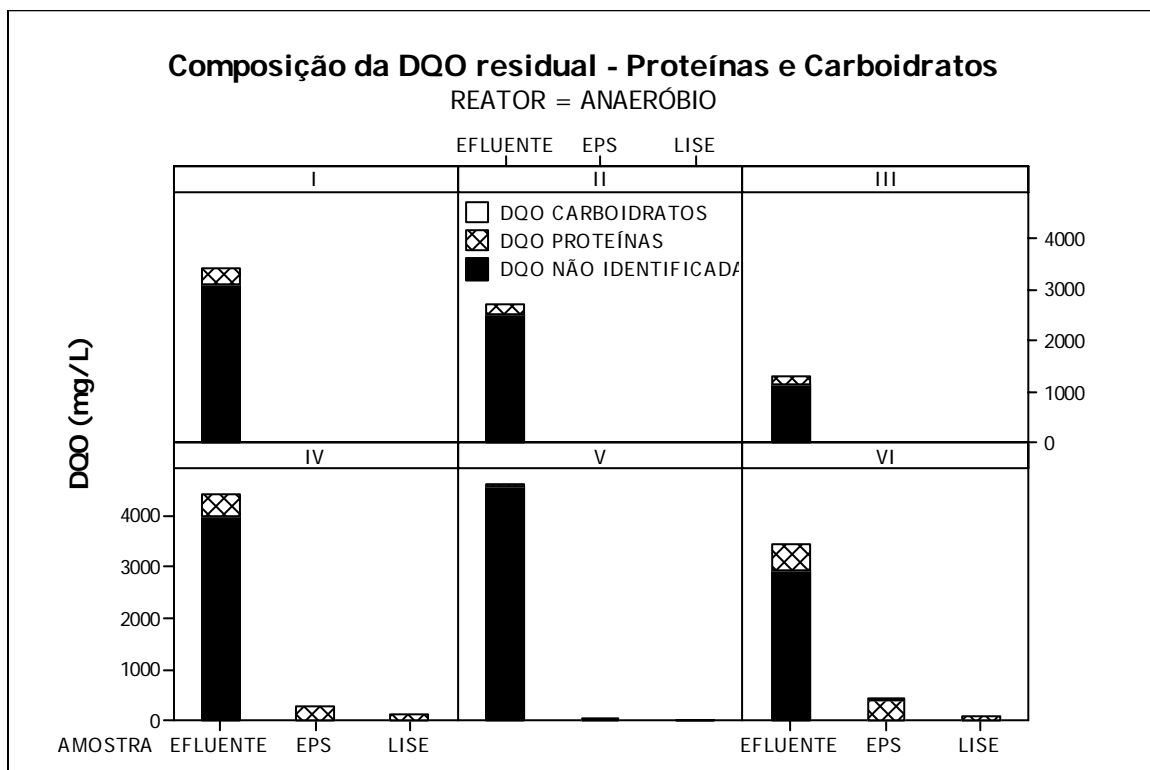


Figura 5.26 – Composição acumulada da DQO residual, dos polímeros extracelulares e dos produtos de lise celular em termos de proteínas e carboidratos – Reator Anaeróbio

Os resultados indicam que o conteúdo protéico e de carboidratos nas amostras de efluentes são baixos e que a maior parte da DQO residual em todas as fases operacionais permanece não identificada. Esta avaliação é válida exceto para a fase II no reator aeróbio, em que se verificou que o conteúdo protéico representou 63% da DQO residual. Nas demais fases ainda no reator aeróbio, a DQO relacionada ao teor de proteínas representou de 5 a 34% da DQO residual e o teor de carboidratos (também em termos de DQO) não ultrapassou 16%. Já para o reator anaeróbio, o teor de proteínas em termos de DQO atingiu seu máximo na fase I, de TDH igual a 4 dias, representando 17% da DQO residual. Já para avaliação do teor de carboidratos, nenhuma amostra analisada advinda deste reator apresentou contribuição de carboidratos para a DQO residual.

O baixo conteúdo protéico e de carboidratos das amostras condiz com os resultados obtidos para as amostras de efluentes das fases I e II encaminhadas para análise de MALDI-TOF-MS (técnica de espectrometria de massas por ionização e dessorção assistida por laser ideal para a identificação de macromoléculas como as proteínas), cujo relatório encontra-se em Anexo. Os ensaios feitos não indicaram presença de macromoléculas compreendidas na faixa de massa molar de 20.000 a 80.000 Da.

As Figuras 5.27 e 5.28 apresentam os dados de proteínas e carboidratos em termos percentuais com relação à DQO residual, em cada fase, para os reatores aeróbio e anaeróbio, respectivamente.

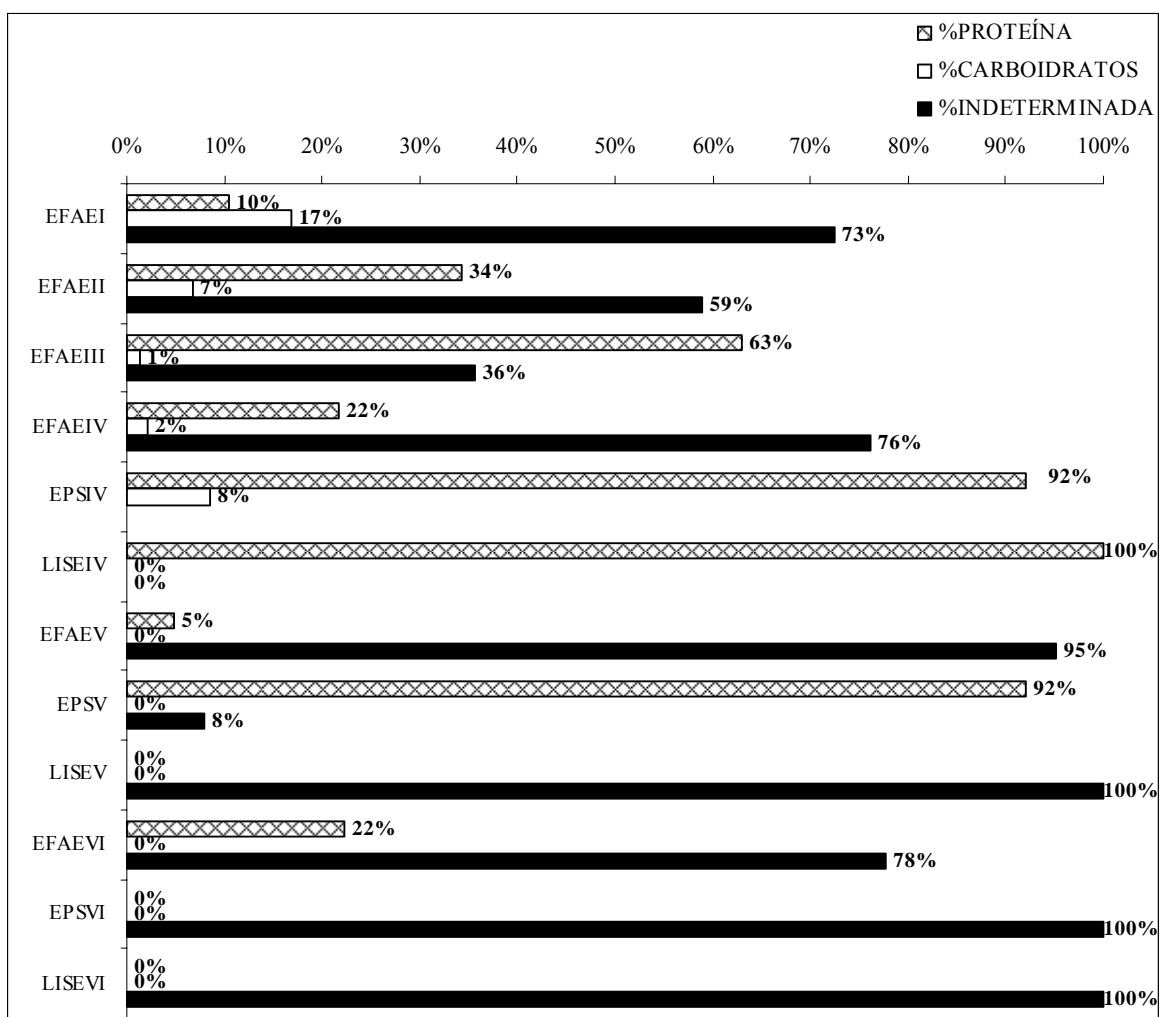


Figura 5.27 – Composição percentual da DQO residual (porcentagens das contribuições dos teores de proteínas, carboidratos e porcentagem indeterminada da DQO) para o reator aeróbio. EFAE – efluentes aeróbios; FI a FVI – fases operacionais, de I a VI; LISE – amostras de lisados; EPS – amostras de polímeros extracelulares.

Nas amostras de lise e EPS, praticamente todo o seu conteúdo pode ser caracterizado como protéico. A concentração de carboidratos é nula em praticamente todas as amostras, aparecendo apenas nas amostras de EPS provenientes do lodo aeróbio na fase IV e do lodo anaeróbio na fase VI, nas baixas concentrações de 18 e 29 mgDQO/L, respectivamente. Os valores baixos das concentrações de carboidratos obtidos nas amostras de EPS estão de acordo com a literatura especializada. Her *et al. apud* Sheng e Yu (2006), utilizando a técnica de fluorescência por matriz excitação-emissão (EEM), afirmaram que, “comparativamente a proteínas e substâncias húmicas, a intensidade do espectro de carboidratos poderia ser desprezada”. Portanto, os principais sinais de fluorescência para EPS seriam os correspondentes a proteínas e substâncias húmicas (Sheng e Yu, 2006).

Dois dos picos obtidos no estudo de Sheng e Yu (2006) para EPS foram associados a proteínas (a fluorescência seria associada ao aminoácido aromático triptofano).

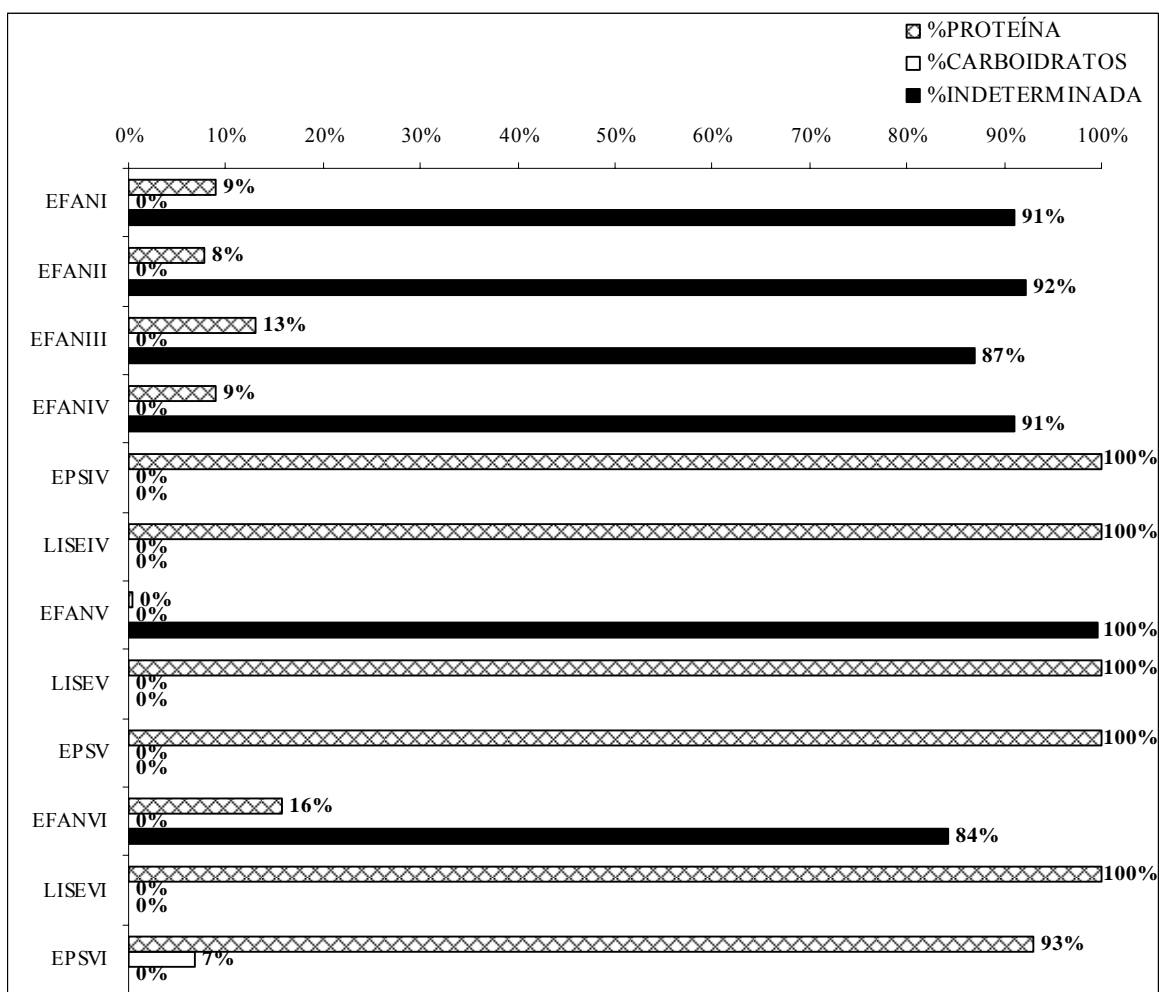


Figura 5.28 – Composição percentual da DQO residual (porcentagens das contribuições dos teores de proteínas, carboidratos e porcentagem indeterminada da DQO) para o reator anaeróbio. EFAN – efluentes anaeróbios; FI a FVI – fases operacionais, de I a VI; LISE – amostras de lisados; EPS – amostras de polímeros extracelulares.

A Figura 5.29 apresenta o gráfico de efeitos principais para a avaliação da DQO proveniente de carboidratos e a Figura 5.30, o de interação entre fases, amostras e reator. Observa-se que nenhuma amostra de produtos de lise celular apresentou carboidratos. Em uma análise conjunta das Figuras 5.29 e 5.30 verifica-se que, de modo geral, o conteúdo de carboidratos nas amostras de efluentes foi maior que em amostras de EPS, destaque dado às fases I e II, para o reator aeróbio. Isto pode indicar que, nas amostras de efluentes em que apareceram carboidratos, estes não eram exclusivamente advindos de polímeros

extracelulares. Como em amostras de lise verificou-se sua completa ausência, parte destes carboidratos presentes no efluente poderiam ser talvez advindos de SMPs-UAP. Isso é coerente com os relatos da literatura de que BAPs seriam de difícil degradação e de maior peso molecular, ao passo que UAPs são de mais fácil degradação e de baixo peso molecular.

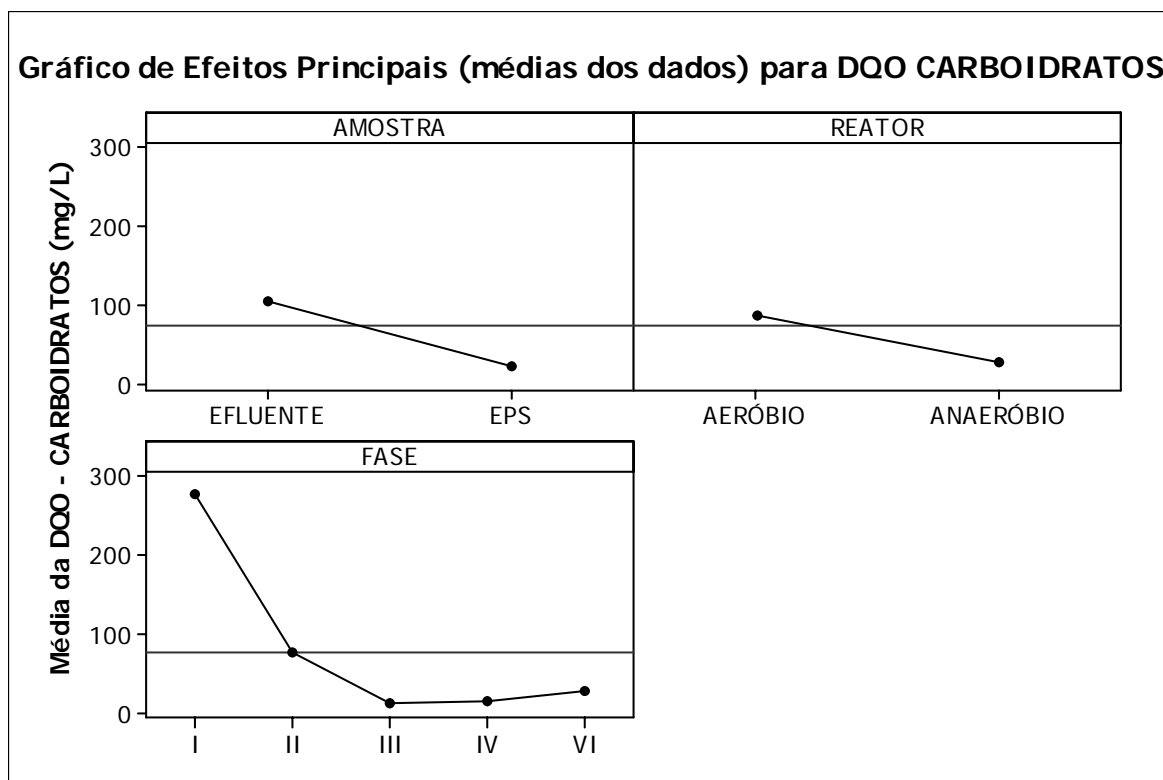


Figura 5.29 – Efeitos principais para análise de carboidratos por amostra, reator e fase operacional

A Figura 5.31 apresenta o gráfico de efeitos principais para a avaliação da DQO proveniente de proteínas e a Figura 5.32, o de interação deste parâmetro entre fases, amostras e reator. De modo geral, as amostras provenientes do reator anaeróbio apresentaram maior concentração de proteínas. Os resultados indicam que o maior conteúdo protéico é observado nas amostras de EPS. Contudo, aumentou consideravelmente na fase VI, empregando-se acetato como substrato a 25°C, especialmente no reator aeróbio. Em uma avaliação deste resultado e daqueles apresentados no item 5.1, pode-se levantar a hipótese de que, nesta fase, teria ocorrido a liberação de polímeros extracelulares no meio e seu conteúdo protéico solubilizado no efluente teria contribuído consideravelmente para o aumento observado na concentração de

SMPs. Em outras palavras, parte do conteúdo de SMPs na fase VI para o reator aeróbio seria constituída de proteínas provenientes de polímeros extracelulares.

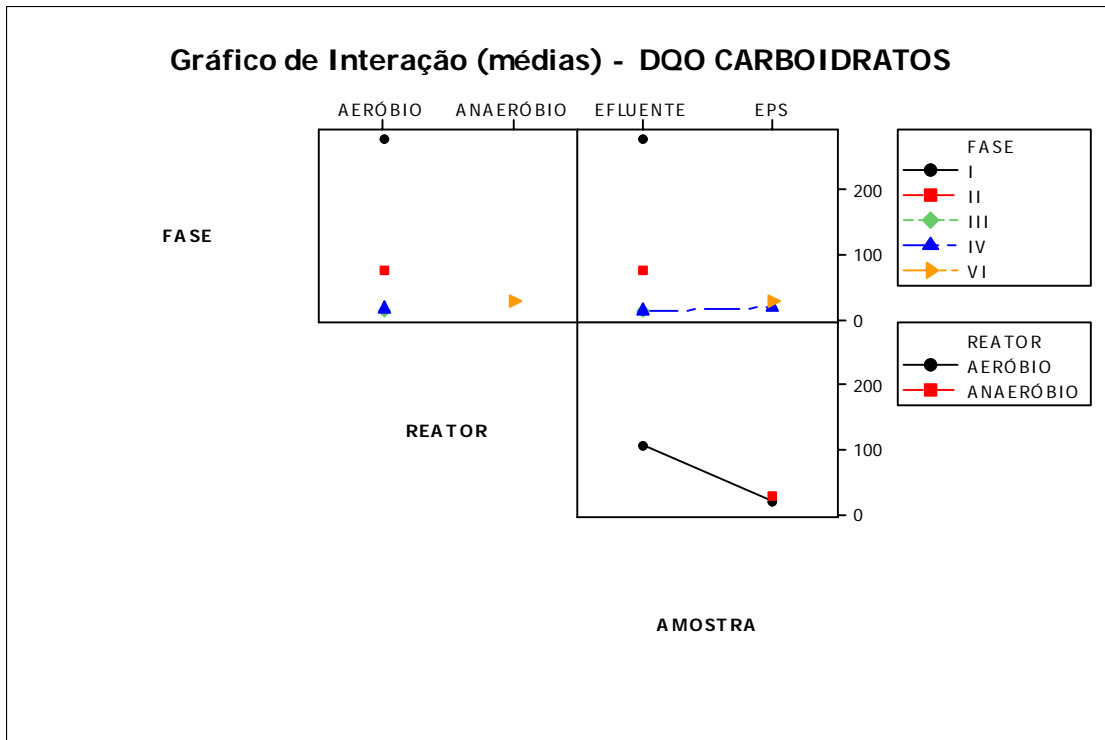


Figura 5.30 – Interação entre o tipo de reator, fases operacionais e amostras para análise de carboidratos

Portanto, diante da observação de que, em todos os efluentes aeróbios (36% a 95%) e anaeróbios (87% a 100%), há uma considerável fração da DQO que não parece ser proteína e carboidratos, permanecendo não-identificada, optou-se pela utilização da técnica de espectrometria de massas na tentativa de identificar tais compostos.

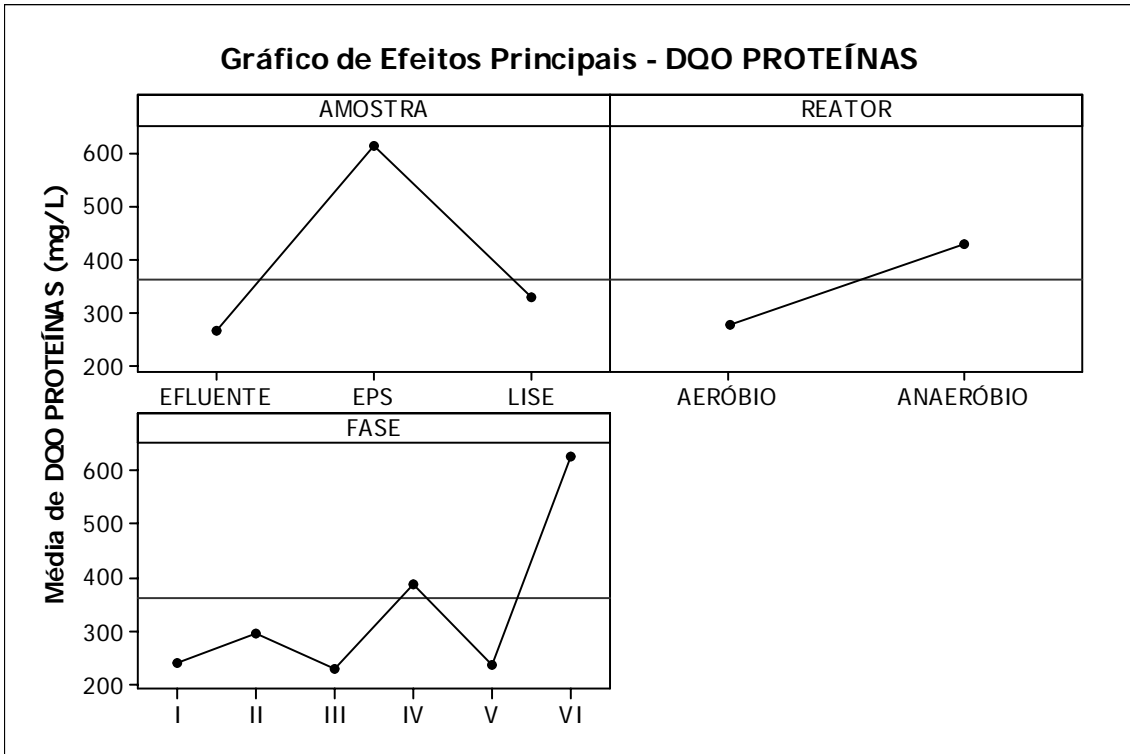


Figura 5.31 – Efeitos principais para análise de proteínas por amostra, reator e fase operacional

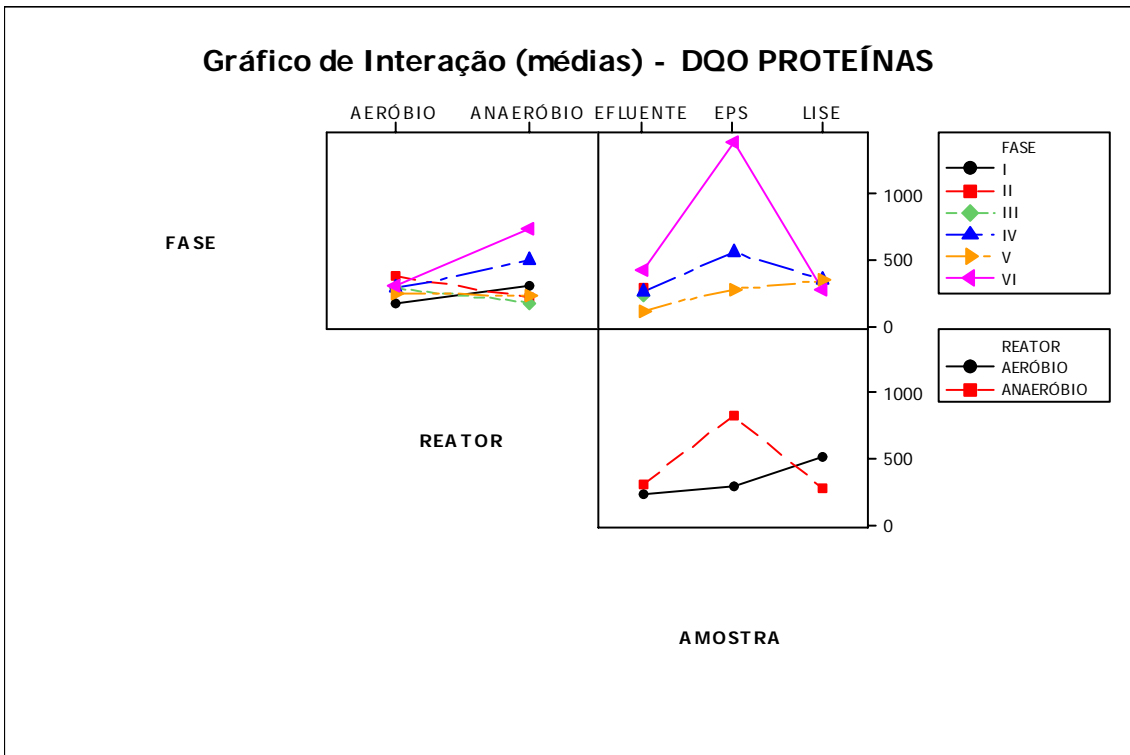


Figura 5.32 – Interação entre o tipo de reator, fases operacionais e amostras para análise de proteínas

5.2.1. Espectrometria de massas

Como os resultados obtidos nas análises de MALDI-TOF não indicaram presença de macromoléculas até 80.000Da, conforme mostra o relatório do Anexo II, tentou-se utilizar outra técnica de espectrometria de massas (LC-IT-TOF-MS), em que a ionização da amostra se dá por *eletronspray*, na tentativa de identificação dos SMPs que possuem massas molares menores (100 a 4.000 Da). Na avaliação das relações massa/carga (m/z) obtidas por espectrometria de massas, foi utilizada a análise estatística de componentes principais (PCA) e o *software Excel®*, conforme descrito no Capítulo 4.

A análise por componentes principais (PCA) foi descrita originalmente por Karl Pearson, em 1901, e consolidada por Hotelling, em 1931, com o propósito de analisar estruturas de correlações. Na Química ela foi introduzida por Malinowski, cerca de 30 anos depois. O PCA é um dos métodos mais frequentemente usados na extração e interpretação de dados multivariados. A análise permite: (i) transformar as variáveis originais em novos eixos (componentes principais), que são ortogonais, de tal maneira que os dados expressos como os “*scores*” naqueles eixos não apresentam correlação entre si; (ii) expressar, tanto quanto possível, a variação total dos dados em poucos componentes, agrupando dados similares, mediante exames visuais em dispersões gráficas no espaço bi ou tridimensional; (iii) expressar quantidades decrescentes da variação por cada componente principal derivado sucessivamente. Os dados químicos multivariados podem ser arranjados na forma de uma matriz, cujos objetos são dispostos em linhas e as variáveis em colunas. Numa representação geométrica, a matriz dos dados originais pode ser considerada como m pontos colocados em um gráfico em um espaço p -dimensional, em que os eixos originais sofreram rotação para um novo conjunto de eixos ortogonais. As coordenadas dos pontos originais nesse novo espaço são dadas pela matriz dos “*scores*”, e a orientação dos novos eixos no espaço dos eixos originais é dada pelos autovetores. Portanto, diante do gráfico de PCA, é possível interpretar a distribuição dos pontos e identificar as variáveis originais com maior peso na combinação linear das componentes principais mais importantes.³

A Figura 5.33 mostra um perfil obtido por análise de componentes principais com os resultados dos espectros de massas obtidos por amostras. Esta figura é particularmente

³ Fonte: <http://www.posgraduacao.ufla.br/gauss/congresso/47rbras/p2-4.pdf>, consultado em 25/05/09.

interessante para a avaliação da formação de *clusters*, que representariam amostras com certa semelhança química.

Três grupos podem ser destacados e encontram-se realçados na Figura 5.33. Observa-se claramente a formação do *cluster* para os produtos de lise celular. Este grupo é bem distinto dos demais, principalmente das amostras de efluentes. Isto sugere que, na caracterização química, os SMPs produzidos em cada fase operacional não parecem ser, em sua maioria, provenientes de lise celular. Portanto, nos casos em que SMPs-BAP fossem produzidos, estes produtos teriam sido degradados/hidrolisados em compostos de menores massas molares, conforme discutiram Shin e Kang (2003).

Outro grupo que pode ser destacado, ainda que menos intensamente que os listados, é o formado pelas amostras de EPS. Portanto, da mesma forma, em termos de relação m/z , os polímeros extracelulares diferem dos efluentes dos reatores nas fases operacionais estudadas. Curioso é o comportamento da amostra proveniente do reator UASB que, apesar de não constituir objeto deste estudo, indica que grande parte das massas no seu efluente pode ser advinda de polímeros extracelulares. Isso talvez ocorra porque o reator é de fluxo ascendente e operado em TDH bem menor (19 horas). Isso pode ter favorecido a formação de flocos no lodo resultando na maior liberação de polímeros extracelulares. Além disto, é interessante observar que na fase IV, quando foi imposta a condição de declínio de temperatura, os polímeros extracelulares extraídos parecem ser de natureza química um pouco diferente (a amostra de EPS desta fase encontra-se claramente separada das demais).

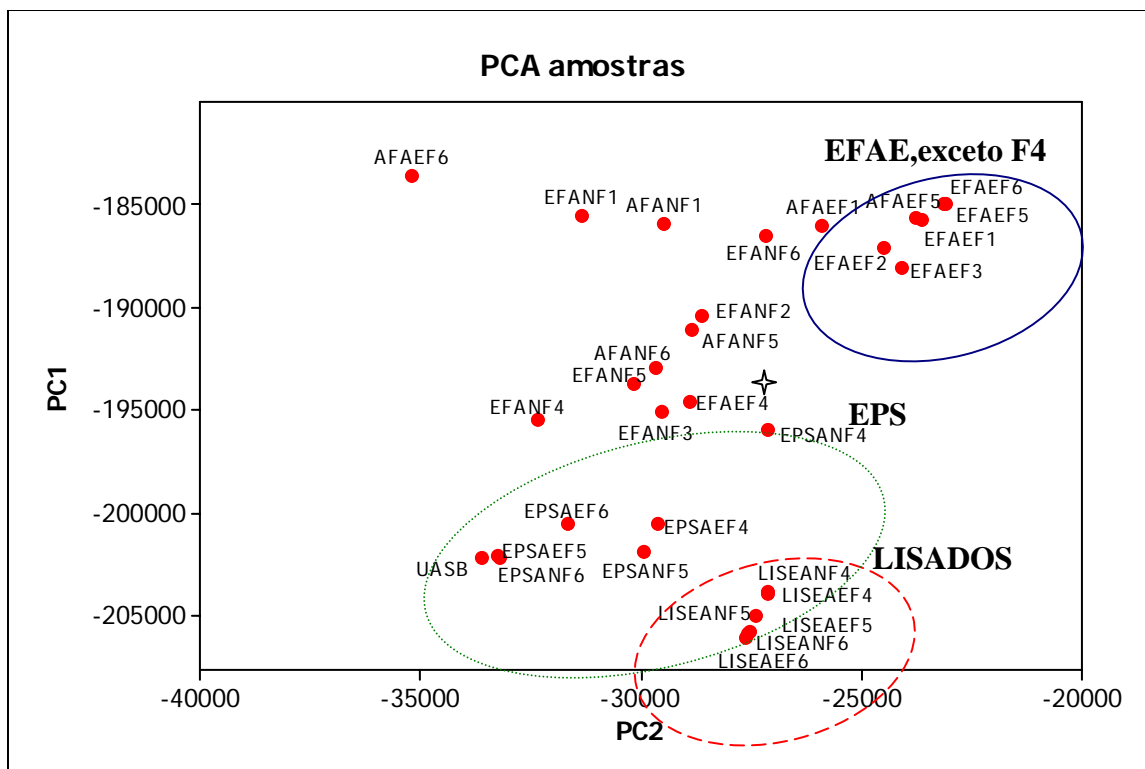


Figura 5.33 – Análise de componentes principais das relações m/z obtidas por espectrometria de massas, por amostra (AFAE – afluentes aeróbios; AFAN – afluentes anaeróbios; EFAE – efluentes aeróbios; EFAN – efluentes anaeróbios; EPSAE – substâncias poliméricas extracelulares extraídas do lodo aeróbio; EPSAN – substâncias poliméricas extracelulares extraídas do lodo anaeróbio; LISEAE – amostras de lisados de células do lodo aeróbio; LISEAN – amostras de lisados de células do lodo anaeróbio; F – fase operacional; UASB – amostra de um efluente de um reator de manta de lodo de fluxo ascendente alimentado com solução de glicose e nutrientes na concentração de DQO afluente de 500mg/L)

O mesmo é observado quando se avaliam as amostras de efluentes ao reator aeróbio. A amostra referente à fase IV destoa completamente das demais, se aproximando inclusive da amostra de EPS desta mesma fase. Ressalta-se, contudo, que, na fase V, em que a temperatura continuou baixa, o efluente aeróbio parece apresentar características químicas similares às demais fases (distintas, pois, dos polímeros extracelulares). Portanto, estas observações podem sugerir que, em termos químicos, condições de choque (por exemplo, baixa temperatura) podem contribuir para SMPs advindos de polímeros extracelulares liberados e solubilizados no meio em resposta ao estresse imposto. Além disto, tais resultados sugerem também que, à medida que a biomassa se adequa a esta nova condição,

estes SMPs seriam degradados e os SMPs produzidos voltariam a ser produtos de natureza química diferente de polímeros extracelulares. Em outras palavras, a produção de SMPs advindos de EPS em reatores aeróbios de mistura completa aconteceriam mediante choques de condições ambientais/operacionais e, na medida em que a biomassa fosse se adequando a esta nova condição, os SMPs não possuiriam mais característica química de polímeros extracelulares.

Para os efluentes do reator anaeróbio, nenhuma característica específica foi observada. Os SMPs produzidos foram quimicamente distintos de amostras de lise e EPS, bem como distintos entre si, avaliando-se cada fase operacional. Este resultado sugere que, pela complexidade da bioquímica do consórcio microbiano presente neste reator, cada condição operacional imporá características químicas distintas para os produtos microbianos produzidos e que estes não são provenientes de lise celular e nem da extração de polímeros extracelulares. Ressalta-se também a importância de se realizar, em trabalhos futuros, testes para avaliação da metodologia de lise celular aplicada aos lodos de tratamento biológico.

A Figura 5.34 apresenta o PCA para a análise das relações m/z nas amostras injetadas no LC-MS, agrupados os modos positivo e negativo. Ressalta-se que foram rastreadas relações m/z de 100 a 4.000 Da.

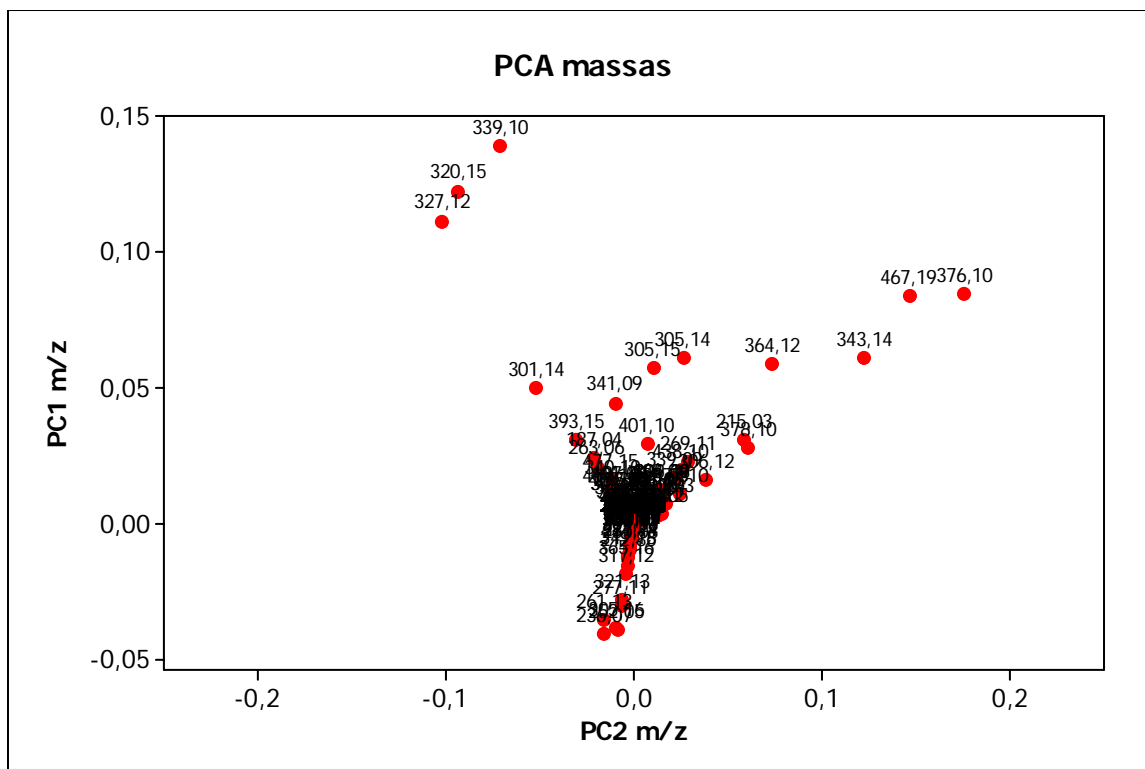


Figura 5.34 – Análise de componentes principais das relações m/z obtidas por espectrometria de massas nas amostras dos afluentes e efluentes a cada fase operacional, nas amostras de extratos de polímeros extracelulares (EPS) e de produtos de lise celular para as fases IV, V e VI.

Os espectros das amostras destoantes no gráfico de PCAs foram verificados em relação à ocorrência nos afluentes, uma vez que tais relações m/z seriam relacionadas a compostos já provenientes da alimentação, o que não seria interessante na caracterização de SMPs. Diante da verificação desta ocorrência para tais amostras e do fato de o PCA não prover diretamente esta informação, houve uma mudança na estratégia para a seleção das relações m/z de interesse, conforme o fluxograma apresentado no Capítulo 4, na Figura 4.1. Portanto, a priorização de m/z se deu segundo os critérios de (i) frequência de aparecimento no efluente e ausência no afluente; (ii) intensidade de picos e (iii) viabilidade dos picos. A Figura 5.35 mostra os resultados de m/z obtidos por meio de tabela dinâmica do *software Excel*, com os mesmos dados extraídos do espectrômetro de massas e usados na confecção do gráfico de PCA.

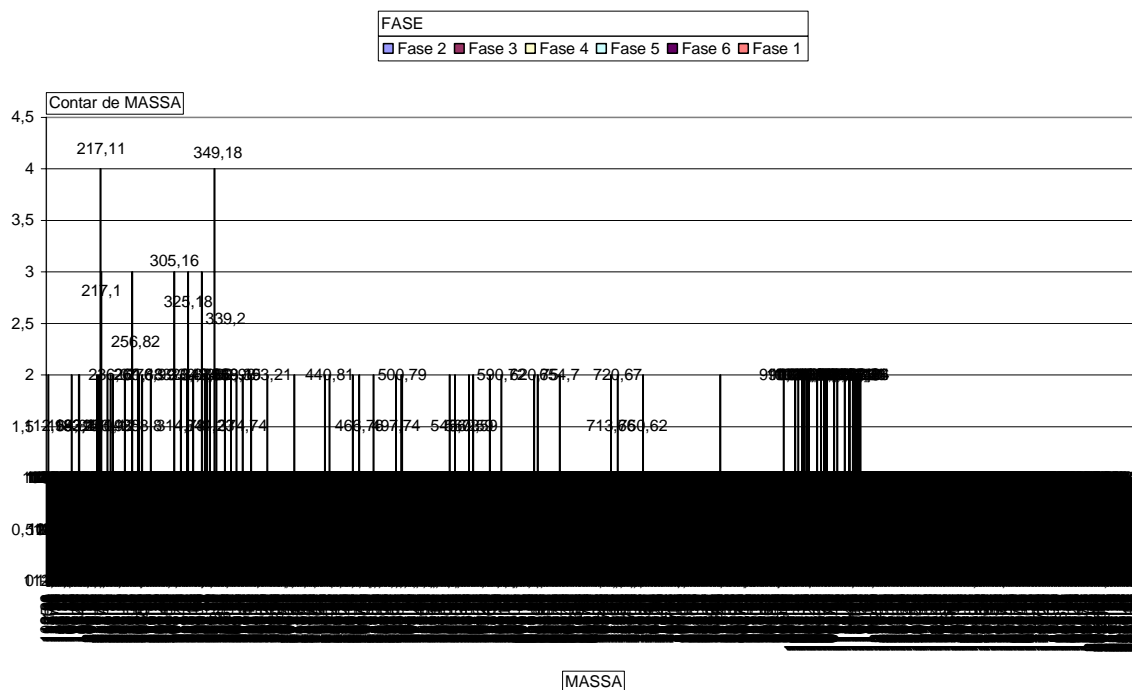


Figura 5.35 – Gráfico dinâmico para a contagem das relações m/z presentes nos efluentes e ausentes nos afluentes

Pôde-se constatar que, houve, de fato, a predominância de baixas massas molares, conforme esperado diante dos resultados de MALDI-TOF. De fato, a ocorrência predominante de compostos de baixas massas molares nos SMPs não é surpresa. Aquino *et al.* (2009), estudando a produção de SMPs em reatores UASB, verificaram que, apesar da distribuição de massas molares dos efluentes dependerem das condições operacionais, a maior parte é constituída de compostos de massa molar inferior a 1.000 Da. Segundo Jarusutthirak e Amy (2007), produtos associados à utilização do substrato (UAPs) são esperados em condições abundantes de substrato, enquanto aqueles associados ao decaimento da biomassa (BAPs) prevalecem em ambientes em que haja sua escassez. Ora, a alimentação de substrato empregada neste trabalho foi contínua e as cargas orgânicas aplicadas (1,25; 0,5 e 0,32kgDQO/m³.d) devidamente abundantes para se justificar a prevalência de SMPs-UAP. Shin e Kang (2003) sugeriram ainda a decomposição de SMPs de alta massa molar a compostos de massas molares inferiores a 10.000Da por microrganismos aclimatados (longo TDC) em bioreatores de membrana cerâmica. Nesta pesquisa, todas as amostras foram coletadas após o tempo de aclimação da biomassa. Portanto, a predominância de compostos de baixa massa molar também poderia ser explicada pela degradação e/ou hidrólise de SMPs de alta massa molar (SMPs-BAP).

Diante dos inúmeros dados de m/z detectados pelo equipamento, com base na Figura 5.35, foi possível selecionar algumas relações m/z para reavaliação dos espectros de massas obtidos. Esta etapa foi particularmente importante, uma vez que a alta resolução do equipamento, que permite a obtenção de m/z com 4 casas decimais, havia sido “mascarada” pelo arredondamento em 2 casas decimais para a planilha de dados do PCA. Além disto, como o equipamento é capaz de detectar m/z em níveis-traço, foi fundamental verificar se as relações m/z realmente eram picos ou apenas ruídos, uma vez que a avaliação matemática também não havia considerado intensidades.

Portanto, com os espectros em mãos e avaliação individual de cada m/z da Tabela 5.3 verificou-se que (i) m/z de 217,10 era a mesma descrita como 217, 11, que estava presente nos afluentes e que, portanto, foi desconsiderada da análise; (ii) as relações m/z 256,82; 349,18; 349,19 e 305,16 tinham intensidades similares ao ruído da análise sendo, portanto, desconsideradas da análise. A Tabela 5.3 apresenta, então, o resultado desta análise com as relações m/z escolhidas e as amostras em que apareceram.

Diante do exposto, as amostras que obtiveram maior intensidade de picos para m/z em questão foram reinjetadas no equipamento, nas mesmas condições anteriores (descritas no Capítulo 4) para reavaliação do espectro e obtenção também da massa segunda (modo MS2). Os espectros de massas obtidos são apresentados nas Figuras 5.36, 5.37 e 5.38.

Tabela 5.3 – Amostras mais frequentemente consideradas para investigação, presentes nos efluentes e ausentes nos afluentes das fases operacionais.

RELAÇÃO MASSA/CARGA (M/Z)	AMOSTRAS EM QUE APARECEM
325,18	EFAN F2, F3, F6
	EPSAN F4
	UASB
339,20	EFAN F2, F3, F6
	EPSAE F4 / EPSAN F4, F6
	LISEAN F4, F6
	UASB

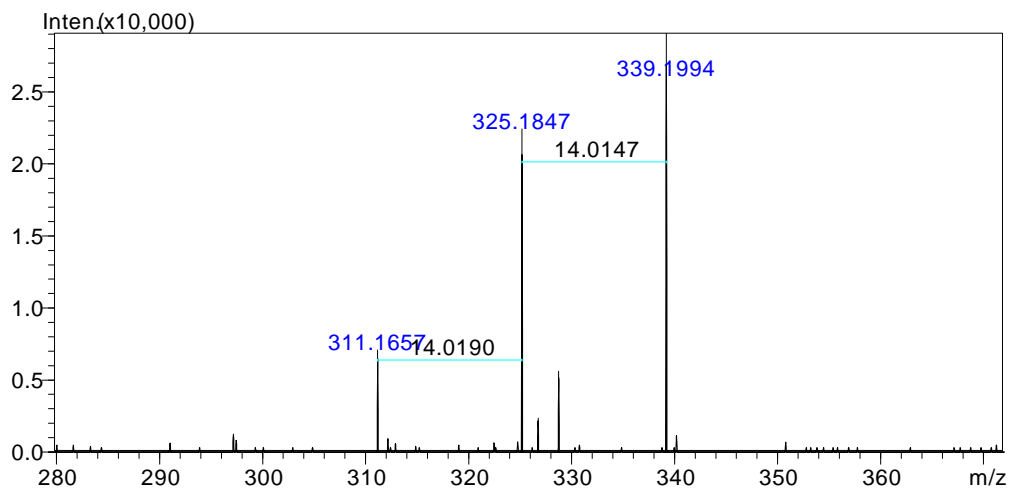


Figura 5.36 – Espectro de massas para o efluente anaeróbio da fase VI, para as relações massa/carga $m/z=339,20$ e $m/z=325,18$

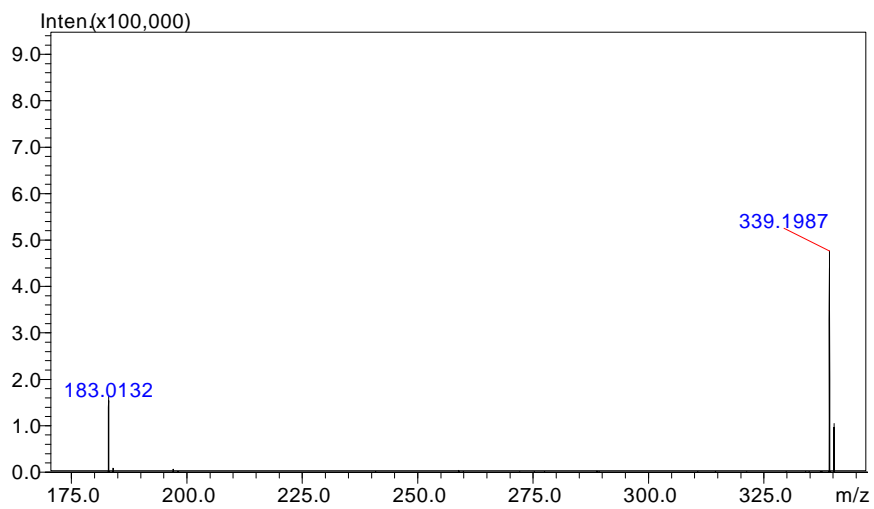


Figura 5.37 – Espectro de massas obtido para análise de massa segunda da relação massa/carga $m/z=339,1987$. Amostra do efluente anaeróbio da fase VI

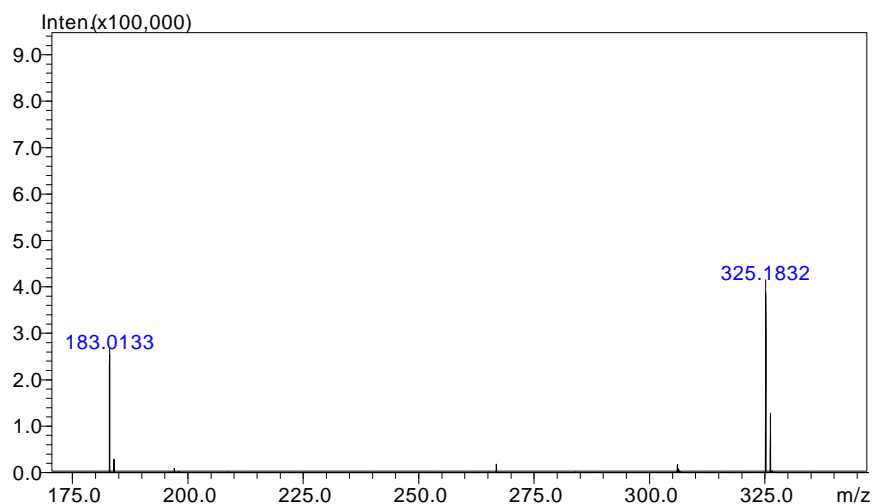


Figura 5.38 – Espectro de massas obtido para análise de massa segunda da relação massa/carga $m/z=325,1832$. Amostra do efluente anaeróbio da fase VI

A Figura 5.36 mostra que a diferença entre as relações m/z 325,1832 e 339,1987 corresponde à $m/z= 14,0147$, atribuída a um CH_2 . Isto sugere que as relações m/z são referentes ao mesmo composto, diferindo apenas pelo número de carbonos da cadeia. As análises de MS2 para ambas as relações m/z confirmaram a hipótese de se tratarem de mesmos compostos, uma vez que m/z da massa segunda obtida a partir da colisão para as duas m/z foi a mesma (183,0133). A seqüência de m/z obtida (339/325/311) diferindo apenas por um CH_2 e a massa segunda de relação m/z 183,0133 confirmaram a caracterização química de LAS (Alquilbenzenos de cadeia linear), que são agentes surfactantes muito utilizados na fabricação de detergentes comerciais, conforme detectado por Leite (2008) analisando esgoto sanitário por espectrometria de massas. A Figura 5.39 mostra a estrutura química típica do surfactante aniônico LAS.

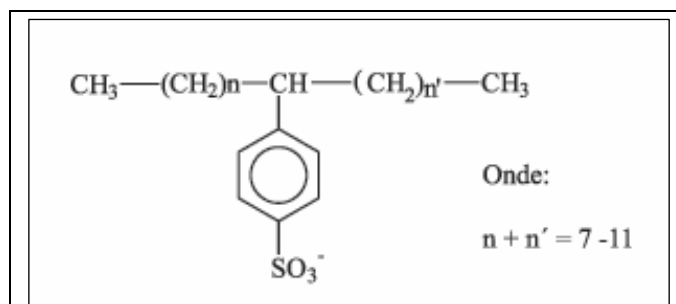


Figura 5.39 – Estrutura química típica do alquilbenzeno sulfonado de cadeia linear (LAS)

Entretanto, como LAS são compostos indicadores de contaminação por detergentes, levantou-se a hipótese de que estes compostos poderiam ser provenientes do processo de obtenção das amostras para identificação ou que poderiam estar adsorvidos no lodo usado no tratamento anaeróbio. Contudo, algumas observações são relevantes para consideração:

- (i) a hipótese de contaminação a partir do afluente e ao longo de toda a linha até a chegada da alimentação ao reator está descartada pelo fato de esta relação m/z não aparecer nos afluentes;
- (ii) a hipótese de contaminação por lavagem de vidraria, obtenção e concentração das amostras e preparo para injeção no LC-MS é praticamente nula, uma vez que, se fosse este o caso, as demais amostras apresentariam a mesma relação m/z, por terem todas seguido os mesmos procedimentos anteriores à análise de espectrometria;
- (iii) a hipótese restante de adsorção destes compostos LAS nos lodos provenientes da estação de tratamento de esgoto de Belo Horizonte quando de sua inoculação é remota. Apenas duas inoculações de lodo anaeróbio foram realizadas: a primeira, em 25/10/07, um mês e meio antes do início da coleta de amostras para resultados de caracterização da fase I (17/12/07). A segunda reinoculação ocorreu no início da fase VI, por necessidade de reposição da população anaeróbia, conforme descrito anteriormente. A data de inoculação foi 01/10/08, 27 dias antes do primeiro resultado obtido para a caracterização dos SMPs desta fase. Estes tempos provavelmente seriam suficientes para que a biomassa tivesse degradado estes contaminantes. Além disto, nas fases II e III, não houve qualquer inoculação de novo lodo; contudo, nestas fases estes compostos também foram observados. Ressalta-se ainda, como citado no Capítulo 4, que o reator foi operado por, no mínimo, 3 vezes o TDH para a coleta de amostras para as análises de espectrometria de massas (30 e 48 dias para as fases II e III, respectivamente).

Desta forma, os resultados abrem a possibilidade de produção de LAS por microrganismos anaeróbios. Sabe-se que alguns microrganismos produzem agentes surfactantes e isso é coerente com as observações de que tais compostos são de difícil degradação anaeróbia, havendo indícios até de ligeiro aumento da concentração de surfactantes nos reatores anaeróbios (Leite, 2008). Contudo, isto deve ser avaliado com cautela, uma vez que os biosurfactantes reportados pela literatura não são LAS.

A formação de complexos com metais seria uma hipótese forte e promissora diante das relações m/z obtidas, considerando a produção de metalóforos (SMPs deliberadamente excretados para complexar metais nutrientes e transportá-los para dentro das células ou para mitigar toxicidade de metais).

Os metalóforos são constituídos de pequenas sequências de peptídeos (portanto dão positivo no teste de proteínas – o que é coerente com os resultados obtidos) e possuem baixa massa molar (por isso não seriam identificados nas análises de MALDI-TOF aqui realizadas). De fato, os surfactantes microbianos incluem lipopeptídeos e glicopeptídeos e estão tendo aplicação cada vez maior na produção de cosméticos, detergentes e agentes anti-microbianos e também na recuperação mineral e de óleo (Price *et al.*, 2009; Nayak *et al.*, 2009). Portanto, os surfactantes microbianos não são sulfonados como o LAS (Price *et al.*, 2009; Nayak *et al.*, 2009; Patel *et al.*, 2009), mas sim constituídos de uma parte lipídica apolar e uma parte glucosídica polar. Como exemplo, os ramnolipídeos são uma classe de biosurfactantes constituída de moléculas de açúcar ramnose e de ácidos β -hidroxilalcanóicos. Nayak *et al.* (2009) indentificaram, também por meio de espectrometria de massas, a produção deste biosurfactante, verificando a predominância de unidade mono e di-ramnose ligadas a duas unidades de ácidos β -hidroxilalcanóicos com cadeia carbônica variando de C₅ a C₁₂ e relação m/z baixa (entre 284 e 689).

Na tentativa de se avançar mais na caracterização dos SMPs, novas relações m/z foram levantadas para análise de MS2, agora com base nos critérios de intensidade e frequência de duas aparições nos efluentes. Eliminando-se ruídos e aquelas m/z presentes nos afluentes, selecionaram-se algumas relações m/z, conforme Tabela 5.4.

Apesar da reinjeção destas amostras para obtenção de massas segunda, pouco foi possível avançar na identificação de sua fórmula química. O *software* do equipamento LC-MS utilizado não possui biblioteca, o que dificulta sobremaneira este trabalho. Além disto, os espectros obtidos não foram conclusivos, o que leva à necessidade de adoção de outras técnicas de identificação para auxiliarem na identificação química precisa, o que demandaria um tempo ainda longo de pesquisa.

Outro dificultador desta avaliação foi o fato de, exceto para as relações m/z já analisadas e identificadas, não haver um perfil de relações m/z típico nas amostras das diversas fases operacionais. Em outras palavras, a maioria das relações m/z detectadas apareceu pontualmente, em uma ou duas fases, o que pode sugerir que, talvez, muitos compostos diferentes em baixas concentrações compõem a parcela de SMPs da DQO residual, ao invés de alguns poucos compostos típicos em alta concentração. Desta forma, cada condição operacional parece interferir intensamente e ser determinante para a característica química dos SMPs produzidos, o que leva a uma necessidade ainda maior de esforços no avanço de sua identificação.

Tabela 5.4 – Novas relações m/z para investigação, presentes nos efluentes e ausentes nos afluentes das fases operacionais estudadas.

RELAÇÃO MASSA/CARGA (M/Z)
173,0794
236,0714
248,9597
320,8690
342,1338
351,0022
362,9802
368,1489
434,8060
560,5892

Outra hipótese a ser considerada ainda diante das relações m/z obtidas seria a formação de complexos com metais. Os compostos orgânicos complexados com metais do meio formaria ‘*adducts*’, dificultando a sua identificação química no espectrômetro de massas. Se tal fato aconteceu com as amostras analisadas, abre-se a perspectiva de os SMPs serem agentes complexantes produzidos por microrganismos para seqüestrar metais nutrientes em condições de escassez nutricional.

Segundo Aquino (2004), os SMPs possuiriam grupos funcionais quelantes típicos (carboxilatos, hidroxilas, sulfidrilas, fenóis, aminas) que agiriam como ligantes e

complexariam metais normalmente encontrados na água. Kuo e Parkin (1996) verificaram a produção de SMPs níquel-quelantes, e mostraram que o aumento no TDC (tempo de detecção celular) implicou no maior acúmulo de SMPs quelantes. Para os autores, os microrganismos excretariam tais substâncias para reposição nutricional em altos TDCs.

Estudos recentes têm sido realizados na avaliação da produção de sideróforos por microrganismos (Patel *et al.*, 2009; Nayak *et al.*, 2009). Sideróforos são ligantes ferro-quelantes de massa molar relativamente baixa (550 a 1.000 Da) sintetizados pela maioria dos microrganismos em condições ferro-limitantes (Hider, 1984; Neilands, 1981, Neilands, 1995 *apud* Patel, 2009). Os microrganismos transportam ferro para dentro da célula por meio da formação de complexos sideróforos-ferro. Os sideróforos solubilizam o ferro circundante não solúvel para torná-lo biologicamente disponível (Neilands, 1995; Winkelmann, 1991 *apud* Patel *et al.*, 2009).

Portanto, uma avaliação de espécies microbianas presentes nos reatores por meio da tentativa de identificação de espécies com capacidade de produção de sideróforos e a procura dos metalóforos e seus complexos seria uma abordagem atrativa para a continuação dessa pesquisa de elucidação acerca da natureza química dos SMPs.

6. Conclusões e sugestões para trabalhos futuros

- No reator aeróbio, na grande maioria dos casos, praticamente toda a DQO residual é advinda da produção de SMPs, conforme previsto em literatura. Alguns atípicos resultados de AGVs obtidos e confirmados para este reator sugerem possíveis condições de microaerofilia, em que há mudança de metabolismo e os microrganismos aeróbios facultativos passam a fermentar e a produzir AGVs.
- No reator anaeróbio, grande parte da DQO residual é constituída por AGVs, principalmente nas condições de estresse. Observou-se que as situações de estresse das fases I, IV e V (baixo TDH e/ou baixa temperatura) contribuíram substancialmente para que a maior parte da DQO residual se devesse aos AGVs, conforme previsto na literatura, como resultado do não atendimento às condições cinéticas e termodinâmicas ótimas.
- A produção relativa de SMPs, considerando a DQO residual, no reator aeróbio foi superior à do anaeróbio, uma vez que no reator anaeróbio, os elétrons do doador (substrato) são canalizados tanto para a produção de SMPs quanto para a de AGVs que se acumulam no meio e a elevada produção de AGVs foi o principal indicador de situações de estresse (baixo TDH e baixa temperatura). Além disto, como os microrganismos aeróbios crescem mais rápido e degradam substrato em velocidade maior, pode haver mais SMP-BAPs e SMP-UAPs.
- As fases I e V foram aquelas que apresentaram maior discrepância entre as taxas de conversão da DQO afluyente em SMPs entre os reatores aeróbio e anaeróbio (na fase I, 35% do aeróbio contra 9% do anaeróbio; na fase V, 68% do aeróbio contra 13% do anaeróbio). Considerando as condições operacionais adversas de baixo TDH e baixa temperatura, para o reator anaeróbio, há um comprometimento dos microrganismos metanogênicos e acetogênicos no meio, levando a um acúmulo de AGVs e para o reator aeróbio, condições adversas podem colaborar para o acúmulo de SMPs no meio, uma vez que não é prevista a produção de intermediários.
- O aumento do TDH em condições não estressantes propiciou uma situação mais favorável à degradação dos AGVs no reator anaeróbio. Nas fases II e III, operadas com glicose na ausência de estresse, a quantidade de SMPs normalizada em função da DQO afluyente no reator aeróbio foi menor que no anaeróbio (11 e 2% contra 27 e 17%, respectivamente). Portanto, sem acúmulo de AGVs, parte significativa dos

elétrons disponíveis na matéria orgânica afluyente foi destinada à produção dos produtos microbianos.

- No reator anaeróbio, a carga orgânica aplicada não apresentou interferência significativa na conversão da DQO afluyente a SMPs sugerindo que, provavelmente, os SMPs acumulados são principalmente advindos da biomassa (SMPs-BAP), ao invés da utilização do substrato (SMPs-UAP). Já no reator aeróbio, os SMPs acumulados parecem principalmente advindos da utilização do substrato (SMPs-UAP), uma vez que a carga orgânica interferiu proporcionalmente na conversão da matéria orgânica afluyente em SMPs.
- A temperaturas mais baixas, a produção de SMPs parece ser maior, especialmente para o reator aeróbio, uma vez que condições adversas de baixa temperatura contribuiriam para a elevação da produção/acúmulo de SMPs no meio. A 15°C, cerca de 33,8% da DQO afluyente foi convertida a SMPs, enquanto que 18,7% foi a proporção obtida a 25°C neste reator, sugerindo que a DQO residual de efluentes de reatores aeróbios operados em climas mais frios seja devida a substrato não degradado por causa do baixo metabolismo, bem como ao maior acúmulo de SMPs (maior produção e menor degradação). Para o reator anaeróbio, uma tendência praticamente constante de conversão da DQO afluyente a SMPs (18,1% para temperatura de 15°C e 18,3% a 25°C) foi observada, uma vez que, mediante condições adversas, a rota metabólica caminha preferencialmente no sentido de acúmulo de AGVs.
- No tratamento aeróbio, a elevação da temperatura aumenta a porcentagem de conversão da biomassa a SMPs, o que pode ser um indício do aumento da proporção de SMPs-BAP (decaimento endógeno). Já no tratamento anaeróbio, o inverso é observado, podendo indicar que são as baixas temperaturas que favorecem a produção de SMPs-BAP.
- A utilização do acetato como substrato, por ser uma molécula mais simples e por prover menos energia que a molécula de glicose para a população microbiana, pode ocasionar uma maior produção de SMPs (por exemplo, excretados para desempenhar alguma função microbiana ou provenientes de lise celular).
- O conteúdo protéico e de carboidratos nas amostras de efluentes são baixos e a maior parte da DQO residual em todas as fases não podem ser atribuídas a estes compostos. No reator aeróbio, a DQO relacionada ao teor de proteínas representou

de 5 a 34% da DQO residual e o teor de carboidratos (também em termos de DQO) não ultrapassou 16%. Já para o reator anaeróbio, o teor de proteínas em termos de DQO atingiu seu máximo na fase I, de TDH igual a 4 dias, representando 17% da DQO residual. Já para avaliação do teor de carboidratos, nenhuma amostra analisada advinda deste reator apresentou contribuição de carboidratos para a DQO residual.

- O baixo conteúdo de proteínas e carboidratos nas amostras foi confirmado pelos ensaios feitos por MALDI-ToF-MS, cujos resultados não indicaram presença de macromoléculas compreendidas na faixa de massa molecular de 20.000 a 80.000Da.
- Nas amostras de lise e EPS, praticamente todo o seu conteúdo pode ser caracterizado como protéico e a concentração de carboidratos foi nula em praticamente todas as amostras, aparecendo apenas nas amostras de EPS provenientes do lodo aeróbio na fase IV e do lodo anaeróbio na fase VI, nas baixas concentrações de 18 e 29 mgDQO/L, respectivamente.
- De modo geral, o conteúdo de carboidratos nas amostras de efluentes foi maior que em amostras de EPS sugerindo que, nas amostras de efluentes em que apareceram carboidratos, estes não eram exclusivamente advindos de polímeros extracelulares e que, como em amostras de lise verificou-se teor de carboidratos nulo, parte destes carboidratos presentes no efluente poderiam ser talvez advindos de SMPs-UAP.
- De modo geral, as amostras provenientes do reator anaeróbio apresentaram maior concentração de proteínas e o maior conteúdo protéico é observado nas amostras de EPS. Contudo, a concentração de proteínas aumentou consideravelmente na fase VI, empregando-se acetato como substrato a 25°C, especialmente no reator aeróbio, sugerindo que parte do conteúdo de SMPs na fase VI para o reator aeróbio seria constituída de proteínas provenientes de polímeros extracelulares.
- Os resultados da espectrometria de massas indicaram que os SMPs produzidos em cada fase operacional não parecem provenientes de lise celular. Portanto, nos casos em que SMPs-BAP fossem produzidos, estes produtos teriam sido degradados/hidrolisados em compostos de menores massas molares.
- Os polímeros extracelulares diferem dos efluentes dos reatores nas fases operacionais estudadas, sugerindo também que os SMPs produzidos não seriam provenientes de substâncias poliméricas extracelulares. Em termos químicos, a

produção de SMPs advindos de EPS em reatores aeróbios de mistura completa parecem acontecer mediante condições ambientais/operacionais adversas e, na medida em que a biomassa vai se adequando a esta nova condição, estes SMPs são degradados e os SMPs produzidos voltam a ser produtos de natureza química diferente de polímeros extracelulares.

- Para os efluentes do reator anaeróbio, pela complexidade da bioquímica do consórcio microbiano presente neste reator, cada condição operacional impõe características químicas distintas para os produtos microbianos produzidos e estes não são provenientes de lise celular e nem da extração de polímeros extracelulares.
- A ocorrência predominante de SMPs de baixas massas molares foi verificada na análise de espectrometria de massas, indicando produtos associados à utilização do substrato (SMPs-UAP) ou provenientes da degradação e/ou hidrólise de SMPs de alta massa molar (SMPs-BAP).
- Na tentativa de identificação por espectrometria de massas, a seqüência de relações m/z obtidas (339/325/311) diferindo apenas por um CH_2 e a massa segunda de 183,0133 confirmaram a caracterização química de LAS (alquilbenzeno sulfonados de cadeia linear). Portanto, os resultados abrem a possibilidade de produção de LAS por microrganismos anaeróbios. Contudo, isto deve ser avaliado com cautela, uma vez que LAS são possíveis indicadores de contaminação por detergentes (que poderiam estar adsorvidos no lodo quando de sua inoculação e que se apresentaram refratários ao tratamento por serem de difícil degradação anaeróbia) e os biosurfactantes microbianos relatados na literatura não serem reportados como LAS.
- A formação de complexos com metais seria uma hipótese forte e promissora diante das relações m/z obtidas, considerando a produção de metalóforos.
- Como sugestão para trabalhos futuros, uma avaliação de espécies microbianas presentes nos reatores e a procura dos metalóforos e seus complexos seria uma abordagem atrativa para a continuação da elucidação acerca da natureza química dos SMPs.
- Uma vez que os espectros obtidos não foram conclusivos, outra sugestão para trabalhos futuros é a adoção de outras técnicas de identificação, complementares à espectrometria de massas, para auxiliarem na identificação química precisa dos SMPs.

7. Referências Bibliográficas

- APHA (1998). *Standard Methods for Examination of Water and Wastewater*. Washington DC. American Public Health Association.
- AQUINO, S.F., GLORIA, R.M., SILVA, S.Q., CHERNICHARO, C.A.L (2009). Quantification of the inert COD of raw sewage and evaluation of SMP production in demo scale UASB reactors under different operational conditions. *Water Environmental Research* (submetido e aceito).
- AQUINO, S.F. E STUCKEY, D.C. (2008). Integrated model of the production of soluble microbial products (SMP) and extracellular polymeric substances (EPS) in anaerobic chemostats during transient conditions. *Biochemical Engineering Journal* **38**: 138-146.
- AQUINO S.F., HU A.Y., AKRAM A., STUCKEY, D.C. (2006). Characterization of dissolved compounds in submerged anaerobic membrane bioreactors (SAMBRs). *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* **81**:1894-1904
- AQUINO S.F., CHERNICHARO, C.A., FORESTI, E., FLORENCIO L., MONTEGGIA L.O. (2007) Metodologias para determinação da atividade metanogênica específica (AME) em lodos ativados. *Eng. Sanit. Ambient.* **12**(2): 380-389.
- AQUINO, S.F. E CHERNICHARO, C.A. (2005). Acúmulo de ácidos graxos voláteis (AGVs) em reatores anaeróbios sob estresse: causas e estratégias de controle. *Eng. San. Ambient.* **10**(2):152-161
- AQUINO, S. F. (2004). Formation of soluble microbial products (SMP) in anaerobic reactors during stress conditions. Doctor of Philosophy Thesis. Imperial College. London.
- AQUINO, S. F. E D. C. STUCKEY (2004). The effect of organic and hydraulic shock loads on the production of soluble microbial products (SMP) in anaerobic digesters. *Water Environment Research.* **38**: 255-266.
- AQUINO, S. F. E D. C. STUCKEY (2004). *Modelling of soluble microbial products accumulation in anaerobic chemostats during stress conditions*. Anaerobic Digestion Congress, Montreal, Canada.
- AQUINO, S. F. E D. C. STUCKEY (2004). Soluble Microbial Product formation in anaerobic chemostats in the presence of toxic compounds. *Water Research* **38**(2): 255-266.

- AQUINO, S. F. E D. C. STUCKEY (2002). Characterization of soluble microbial products (SMP) in effluents from anaerobic reactors. *Water Science and Technology* **45**(10): 127-132.
- AQUINO, S. F.(2003). Caracterização da DQO efluente de sistemas de tratamento biológico. *Engenharia Sanitaria e Ambiental* **8**(3): 135-144.
- BARKER, D. J. E D. C. STUCKEY (2001). Modelling of soluble microbial products in anaerobic digestion: the effect of feed strength and composition. *Water Environmental Research* **73**(2): 173-184.
- BARKER, D. J. E D. C. STUCKEY (1999). A review of soluble microbial products (SMP) in wastewater treatment systems. *Water Research* **33**(14): 3063-3082.
- BARKER, D. J., S. M. L. SALVI, A. A. M. LANGENHOFF E D. C. STUCKEY (2000). Soluble microbial products in an ABR treating low-strength wastewater. *Journal of Environmental Engineering* **126**(3): 239.
- BARKER, D. J., G. A. MANNUCCI, S. M. L. SALVI E D. C. STUCKEY (1999). Characterisation of soluble residual chemical oxygen demand (COD) in anaerobic wastewater treatment effluents. *Water Research* **33**(11): 2499-2510.
- BILGILI, M.S., DEMIR, A., AKKAYA, E., OZKAYA, B.(2008). COD fractions of leachate from aerobic and anaerobic pilot scale landfill reactors. *Journal of Hazardous Materials*. doi:10.1016/j.jhazmat.2008.01.055.
- BLUNDI, C. E., GADELHA, R. F. (2001). *Metodologia para determinação de matéria orgânica específica em águas residuárias. Pós-tratamento de efluentes de reatores anaeróbios: aspectos metodológicos*. C. A. L. Chernicharo. Belo Horizonte, PROSAB: 9-18 (2001).
- BOERO, V.J., ECKENFELDER, W.W., BOWERS, A.R. (1991). Soluble microbial product formation in biological systems. *Water Science Technology*. **23**: 1067-1076.
- CHERNICHARO, C.A (2007). *Reatores anaeróbios*. Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental – UFMG. 2ed. Belo Horizonte.
- CHIPASA, K.B., MEDRZYCKA, K., 2008. The influence of soluble microbial products on microbial community succession. *Polish Journal of Microbiology*. **57**: 59-70.
- CHIPASA, K.B., MEDRZYCKA, K., 2004. Adaptive response of microbial communities to soluble microbial products. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **31**, 384-390.

- CHIPASA, K.B., MEDRZYCKA, K., 2004. Behavior of microbial communities developed in the presence/reduced level of soluble microbial products. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **31**, 457-461.
- DIGNAC, M. F., P. GINESTET, D. RYBACKI, A. BRUCHET, V. URBAIN E P. SCRIBE (2000). Fate of wastewater organic pollution during activated sludge treatment: nature of residual organic matter. *Water Research* **34**(17): 4185-4194.
- DREWS, A., MANTE, J., IVERSEN, V., VOCKS, M., LESJEAN, B., KRAUME, M. (2007). Impact of ambient conditions on SMP elimination and rejection in MBRs. *Water Research* **41**: 3850 – 3858
- EKULUND, F., FREDERIKSON, H.B., ROENN, R. (2002). Population dynamics of active and total ciliate populations in arable soil amended with wheat. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**, 1096-1101.
- ELISIÁRIO, M., R. M. GLÓRIA, S. F. AQUINO E C. A. L. CHERNICHARO (2006). *Fracionamento e caracterização de efluentes de reatores UASB utilizados no tratamento de esgoto sanitário*. III Encontro Nacional de Química Ambiental, Cabo Frio, RJ.
- EMERY, T. (1982). Iron metabolism in human and plants. *American Scientist* **70**: 626-632.
- FONSECA, A.C., SUMMERS, R.S., GREENBERG, A.R., HERNANDEZ, M.T. (2007). Extra-Cellular polysaccharides, soluble microbial products, and natural organic matter impact on nanofiltration membranes flux decline. *Environ.Sci.Technol.* **41**: 2491-2497 .
- FROLUND, B, PALMGREN, R., KEIDING, K., NIELSEN, P.H. (1996). Extraction of extracellular polymers from activated sludge using a cation exchange resin. *Wat. Res.* **30**(8): 1749-1758.
- FUQUA, C. E E. P. GREENBERG (1998). Cell-to-cell communication in Escherichia coli and Salmonella typhimurium: they may be talking, but who's listening? *Proc. Natl. Acad. Sci.* **95**: 6571-6572.
- GRELIER, P., ROSENBERGER, S., TAZI-PAIN, A. (2006). Influence of sludge retention time on membrane bioreactor hydraulic performance. *Desalination* **192**: 10-17.
- GUERLAVA P., IZAC, V., THOLOZAN, J. (1998). Comparison of different methods of cell lysis and protein measurements in *Clostridium perfringens*: application to the cell volume determination. *Current Microbiology* **36**: 131-135.
- GUJER, W. AND ZEHNDER, A. J. B. (1983). Conversion processes in anaerobic

- digestion. *Wat. Sci. Tech.* **15**: 127-167.
- HASTINGS, J. W. E E. P. GREENBERG (1999). Quorum Sensing: the explanation of a curious phenomenon reveals a common characteristic of bacteria. *Journal of Bacteriology* **181**(9): 2667-2668.
- HEJZLAR, J. E J. CHUDOBA (1986). Microbial polymers in the aquatic environment - I. Production by activated sludge microorganisms under different conditions. *Water Research* **20**(10): 1209-1216.
- HER, N., AMY, G., MCKNIGHT, D., SOHN, J., YOON, Y. (2003). Characterization of DOM as a function of MW by fluorescence EEM and HPLC-SEC using UVA, DOC and fluorescence detection. *Water Res.* **37**: 4295-4303.
- HOLAKOO, L., NAKHLA, G., YANFUL, E.K., BASSI, A.S. (2006). Chelating properties and molecular weight distribution of soluble microbial products from an aerobic membrane bioreactor. *Water Research* **40**: 1531-1538.
- HUAJUN, F., LIFANG, H., DAN S., CHENGRAN, F., YONGHUA, H., DONGSHENG, S. (2008). Effects of operational factors on soluble microbial products in a carrier anaerobic baffled reactor treating dilute wastewater. *Journal of Environmental Sciences* **20**:690-695.
- ICHIHASHI, O., SATOH, H., MINO T., 2006. Effect of soluble microbial products on microbial metabolisms related to nutrient removal. *Water Research* **40**, 1627-1633.
- JANG, N., REN, X., KIM, G., AHN, C., CHO, J., KIM, I.S. (2007). Characteristics of soluble microbial products and extracellular polymeric substances in the membrane bioreactor for water reuse. *Desalination* **202**: 90-98.
- JARUSUTTHIRAK, C. E AMY, G. (2007). Understanding soluble microbial products (SMP) as a component of effluent organic matter (EfOM). *Water Research* **41**: 2787 – 2793.
- JARUSUTTHIRAK, C. E AMY, G. (2006). Role of soluble microbial products (SMP) in membrane fouling and flux decline. *Environ. Sci. Technol.* **40**: 969-974.
- KUO, W. C. E G. P. PARKIN (1996). Characterization of soluble microbial products from anaerobic treatment by molecular weight distributions and nickel-chelating properties. *Water Research* **30**(4): 915-922.
- KUO, W. C., M. A. SNEVE e G. P. PARKIN (1996). Formation of soluble microbial products during anaerobic treatment. *Water Environmental Research* **68**: 279-285.
- LANÇAS, F.M.(2004). *Validação de métodos cromatográficos de análise*. São Carlos: RiMa. 62p.

- LASPIDOU, C. S. E B. E. RITTMANN (2002). A unified theory for extracellular polymeric substances, soluble microbial products, and active and inert biomass. *Water Research* **36**: 2711-2720.
- LE-CLECH P., MARSELINA, Y., STUETZ, R., CHEN, V. (2006). Fouling visualization of soluble microbial product models in MBRs. *Desalination* **199**: 477-479.
- LEITE, G.S. (2008). Caracterização cromatográfica de efluentes de um sistema combinado UASB-Filtro Biológico Percolador utilizado no tratamento de esgoto sanitário. Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental) - Universidade Federal de Ouro Preto
- LI , H. JIKU, F., SCHRODER H.F (2000). Assessment of the pollutant elimination efficiency by gas chromatography/mass spectrometry, liquid chromatography-mass spectrometry and –tandem mass spectrometry Comparison of conventional and membrane-assisted biological wastewater treatment processes. *Journal of Chromatography A*, **889**: 155-176.
- LIANG, S., LIU, C., SONG, L. (2007). Soluble microbial products in membrane bioreactor operation: behaviors, characteristics and fouling potential. *Water Research* **41**: 95-101.
- NAMKUNG, E. E B. E. RITTMANN (1986). Soluble microbial products (SMP) formation kinetics by biofilms. *Water Research* **20**(6): 795-806.
- NIES, D. H. (2003). Efflux-mediated heavy metal resistance in prokaryotes. *FEMS Microbiology Reviews* **27**: 313-339.
- NOGUERA, D. R., N. ARAKI E B. E. RITTMANN (1994). Soluble Microbial Products (SMP) in anaerobic chemostats. *Biotechnology and Bioengineering* **44**: 1040-1047.
- OLIVEIRA-ESQUERRE, K.P., NARITA, N., YAMATO, N., FUNAMIZU, N., WATANABE, Y. (2006). Incorporation of the concept of microbial product formation into ASM3 and the modeling of a membrane bioreactor for wastewater treatment. *Brazilian Journal of Chemical Engineering* **23**(4): 461-471.
- PARKIN, G. P. E P. L. MCCARTY (1981). A comparison of the characteristics of soluble organic nitrogen in untreated and activated sludge treated wastewaters. *Water Research* **15**: 139-149.
- PARKIN, G. P. E P. L. MCCARTY (1981). Production of soluble organic nitrogen during activated sludge treatment. *Journal WPCF* **53**(1): 99-112.

- PARKIN, G. P. E P. L. MCCARTY (1981). Sources of soluble organic nitrogen in activated sludge effluents. *Journal WPCF* **53**(1): 89-98.
- PONTES, P.P. (2003). Reatores UASB aplicados ao tratamento combinado de esgotos sanitários e de lodo excedente de filtro biológico percolador. Tese (Doutorado em Saneamento Meio Ambiente e Recursos Hídricos) - Universidade Federal de Minas Gerais.
- RAMESH, A., LEE, D., HONG, S. (2006). Soluble microbial products (SMP) and soluble extracellular polymeric substances (EPS) from wastewater sludge. *Applied Microbiology and Biotechnology* **73**(1):219-225.
- RAPPAPORT, S.M., RICHARD, M.G., HOLLSTEIN, M.C., TALCOTT, R.E., 1979. Mutagenic activity in organic wastewater concentrates. *Environ. Sci. Technol.* **13** (8), 957-961.
- REID, E., LIU, X., JUDD, S.J.(2008). Sludge characteristics and membrane fouling in full-scale submerged membrane bioreactors. *Desalination* **219**: 240-249.
- REEMTSMA, T. E M. JEKEL (1997). Dissolved organics in tannery wastewaters and their alteration by a combined anaerobic and aerobic treatment. *Water Research* **31**(5): 1035-1046.
- RIBANI, M., BOTOLLI, C.B, COLLINS, C.H., JARDIM, I.C., MELO, L.F. (2004). Validação de métodos cromatográficos e eletroforéticos. *Quim. Nova* **27**(5): 771-780.
- RITTMANN, B. E. E P. L. MCCARTY (2001). *Environmental Biotechnology: principles and applications*, McGraw Hill.
- ROSENBERGER, S., LAABS, C., LESJEAN, B., GNIRSS, R., AMY, G., JEKEL, M., SCHROTTER, J.C. (2006). Impact of colloidal and soluble organic material on membrane performance in membrane bioreactors for municipal wastewater treatment. *Water Research* **40**(4): 710-720.
- ROSS, N., DESCHENES, L. , BUREAU, J., CLEMENT, B., COMEAU, Y., SAMSON, R., 1998. Ecotoxicological assessment and effects of physicochemical factors on biofilm development in groundwater conditions. *Environ.Sci. Technol.* **32** (8), 1105-1111.
- SHENG G. E YU, H. (2006). Characterization of extracellular polymeric substances of aerobic and anaerobic sludge using three dimensional excitation and emission matrix fluorescence spectroscopy. *Water Research* **40**: 1233-1239.
- SHIN, H., E KANG, S. (2003). Characteristics and fates of soluble microbial products

- in ceramic membrane bioreactor at various sludge retention times. *Water Research* **37**:121-127.
- TIEHM, A., NICKEL, K., ZELLHORN, M., NEIS, U. (2001). Ultrasonic waste activated sludge disintegration for improving anaerobic stabilization. 1: *Water Research* **35**(8):2003-9.
- TOPALOVA, Y., KOZUHAROV, D., DIMKOV, R. (1999). Adaptive response of trivial activated sludge towards toxic effect of oNP, PCP and combination of oNP/PCP. *Waste Manage* **19**, 247-254.
- TRUSSELL, R.S., MERLO, R.P., HERMANOWICZ, S.W., JENKINS, D. (2006). The effect of organic loading on process performance and membrane fouling in a submerged membrane bioreactor treating municipal wastewater. *Water Research* **40**(14):2675-2683.
- WANG, F., LU, S., JI, M. (2006). Components of released liquid from ultrasonic waste activated sludge disintegration. *Ultrasonics Sonochemistry* **13**(4): 334-338.
- WANG, X.M. ET AL. (2007). Membrane fouling in a submerged membrane bioreactor (SMBR): Characterisation of the sludge cake and its high filtration resistance. *Separation and Purification Technology* **52**: 439–445.
- ZHANG, P., ZHANG, G. e WANGC, W. (2007). Ultrasonic treatment of biological sludge: Floc disintegration, cell lysis and inactivation. *Bioresource Technology* **98**(1): 207-210.

Anexo

Relatório Shimadzu – MALDI-ToF-MS

Apêndice

Validação do Método para Análise e Quantificação de AGVs

- **Validação do método de quantificação de AGVs**

Limite de Detecção e de Quantificação

“O limite de detecção (LD) corresponde à menor quantidade de um analito que pode ser detectada, porém não necessariamente quantificada como um valor exato. Na prática, o LD é determinado como a menor concentração do analito que pode ser diferenciada do ruído do sistema com segurança. Um procedimento comum é aceitar como LD a concentração do analito que produz um sinal três vezes maior que o ruído do sistema” (Lanças, 2004). Para determinação do LD da mistura de AGVs, foram injetadas amostras-padrão preparadas em diferentes concentrações. Os relatórios gerados foram programados para especificarem a relação sinal/ruído da análise. Com base nestes resultados, padrões de concentrações mais diluídas foram sendo preparados até ser atingido o valor sinal/ruído aproximado de 3.

“O limite de quantificação (LQ) corresponde à menor quantidade de um analito que pode ser quantificada com exatidão e com uma fidelidade determinada. Na prática, pode também ser definida em relação ao ruído empregando-se o branco como referência; valores ao redor de 10s (sendo s o desvio-padrão do sinal gerado empregando-se um branco) são comumente aceitos” (Lanças, 2004). Portanto, a escolha do LQ pode ser feita como 10 vezes o ruído ou aproximadamente 3 vezes o LD. Para a determinação do LQ da mistura de AGVs, foram injetadas amostras-padrão preparadas em diferentes concentrações. Os relatórios gerados foram programados para especificarem a relação sinal/ruído da análise. Com base nestes resultados, padrões de concentrações mais diluídas foram sendo preparados até ser atingido o valor sinal/ruído aproximado de 10.

Soluções-padrão da mistura dos principais ácidos orgânicos (fórmico, acético, propiônico, butírico, isobutírico, valérico e isovalérico) foram preparadas de acordo com as concentrações de interesse para cada parâmetro a ser validado. Para a determinação dos Limites de Detecção e de Quantificação, uma solução-padrão estoque de 400mg/L foi preparada a partir dos ácidos puros e as demais concentrações foram obtidas por diluição. Para este caso, em especial, foram avaliadas as concentrações de 25, 12,5 e 6,25mg/L.

Vale ressaltar que a avaliação de LD e LQ foi feita para a mistura de ácidos, uma vez que as calibrações das amostras reais seriam feitas sempre com os padrões de mistura. Como o pico do ácido valérico era sempre o menos intenso, ele foi usado como parâmetro para a escolha destes limites (por apresentar a pior condição). Portanto, o estabelecimento destes limites para este ácido garante a detecção e quantificação de todos os demais. Como este ácido nem apareceu para a concentração de 6,25mg/L e a relação sinal/ruído para o ácido isovalérico nesta concentração ainda foi inferior a 3 (signal/noise=2,9), o LD foi definido como 12,5mg/L para a mistura de ácidos. Utilizando-se o critério da relação sinal/ruído=10 para o limite de quantificação, 12,5mg/L seria o LQ para todos os ácidos, exceto para o ácido valérico, para o qual se adotou LQ=25,0mg/L. A Tabela A.1 mostra os resultados obtidos para a relação sinal/ruído, de onde se extraíram os LD e LQ.

Tabela A.1 – Resultados da relação sinal/ruído (*signal/noise*) para a determinação dos limites de detecção e quantificação da metodologia de análise de AGVs.

Sample Name : **PADRAO 6.25mg/L** Vial : 1

Acq. Operator : Patricia Inj : 1 Inj Volume : 40 µl

Acq. Method : C:\HPCHEM\CORE\PATRICIA.M

Analysis Method : C:\HPCHEM\CORE\PATRICIA.M

Analise de Acidos Organicos Volateis

RetTime [min]	k'	Area [mAU*s]	Height [mAU]	SymmWidth [min]	Plates	Resolution	Signal/Noise	
14.366	-	18.36525	7.18612e-1	0.67	0.3833	7781	10.71	10.0
15.593	-	12.32450	3.96348e-1	0.76	0.4400	6958	1.75	5.5 ←
18.395	-	12.42247	3.32585e-1	0.63	0.5167	7023	3.44	4.6 ←
20.726	-	25.59664	4.36817e-1	1.49	1.0400	2200	1.76	6.1 ←
22.586	-	7.49855	2.28080e-1	0.89	0.5700	8698	1.36	3.2 ←
26.021	-	9.03175	2.06074e-1	0.70	1.4850	1701	1.96	2.9 ←

Sample Name : **PADRAO 12,5mg/L** Vial : 21

Acq. Operator : Patricia Inj : 1 Inj Volume : 40 µl

Acq. Method : C:\HPCHEM\CORE\PATRICIA.M

Analysis Method : C:\HPCHEM\CORE\PATRICIA.M

Analise de Acidos Organicos Volateis

RetTime [min]	k'	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Symm. [min]	Width	Plates	Resolution	Signal/Noise
14.336	-	38.62683	1.56103	0.68	0.3733	8169	20.12	37.1
15.560	-	22.20067	8.45468e-1	0.68	0.3967	8525	1.87	20.1
18.358	-	24.39956	7.05665e-1	0.66	0.5067	7273	3.64	16.8
20.721	-	49.46189	9.16192e-1	1.02	0.6967	4901	2.31	21.8
22.555	-	33.66142	6.48969e-1	0.73	0.7133	5539	1.53	15.4
25.970	-	20.29851	4.47284e-1	0.78	0.7133	7343	2.81	10.6
31.643	-	22.39542	3.54140e-1	0.72	0.9867	5698	3.92	8.4 ←

Sample Name : **PADRAO 25,0mg/L**

Vial : 14

Acq. Operator : Patricia

Inj : 1

Inj Volume : 40 µl

Acq. Method : C:\HPCHEM\CORE\PATRICIA.M

Analysis Method : C:\HPCHEM\CORE\PATRICIA.M

Analise de Acidos Organicos Voláteis

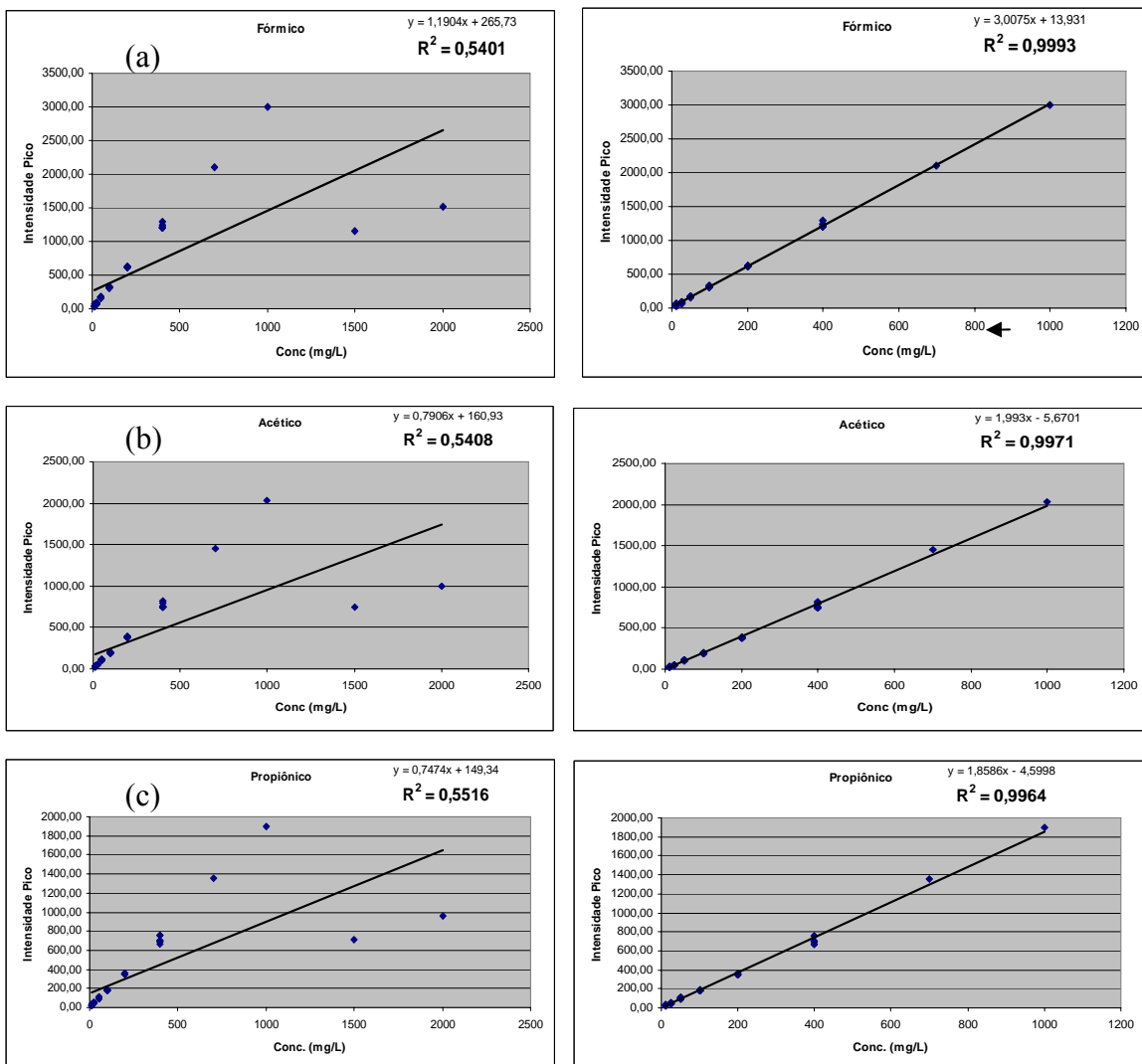
RetTime [min]	k'	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Symm. [min]	Width	Plates	Resolution	Signal/Noise
14.352	-	77.49631	3.09350	0.67	0.3733	8188	4.23	75.5
15.575	-	47.07532	1.71485	0.69	0.4133	7866	1.83	41.9
18.364	-	51.31936	1.42887	0.63	0.5167	6999	3.52	34.9
20.733	-	79.34251	1.68639	0.88	0.6233	6129	2.44	41.2
22.569	-	51.17665	1.13819	0.69	0.6500	6679	1.69	27.8
26.023	-	40.88130	9.12786e-1	0.81	0.7133	7373	2.98	22.3
31.589	-	42.03296	6.99631e-1	0.72	0.9233	6484	4.00	17.1

Faixa dinâmica (Intervalo dinâmico)

“Segundo a IUPAC, a faixa dinâmica tem como limite inferior o limite de quantificação (LQ)”. O limite superior pode ser obtido removendo-se os pontos superiores até que o coeficiente de determinação (r^2) apresente um valor satisfatório (0,98, por exemplo) (Lanças, 2004).

Para a determinação do intervalo de aplicação, soluções-padrão da mistura de ácidos foram preparadas em diferentes concentrações, partindo do limite de quantificação. As concentrações foram 12,5; 25; 50; 100; 200; 400; 700; 1000; 1500 e 2000mg/L.

A Figura A.1 revela que a partir de 1000mg/L, os coeficientes de determinação apresentam valores muito ruins (em torno de 0,5) e que perde-se completamente a linearidade. A primeira coluna da Figura A.1 contém os gráficos incluindo os resultados para as concentrações de 1500 e 2000mg/L. A segunda coluna apresenta os gráficos dos mesmos compostos, considerando a faixa dinâmica de 25 a 1000mg/L, que foi adotada como válida.



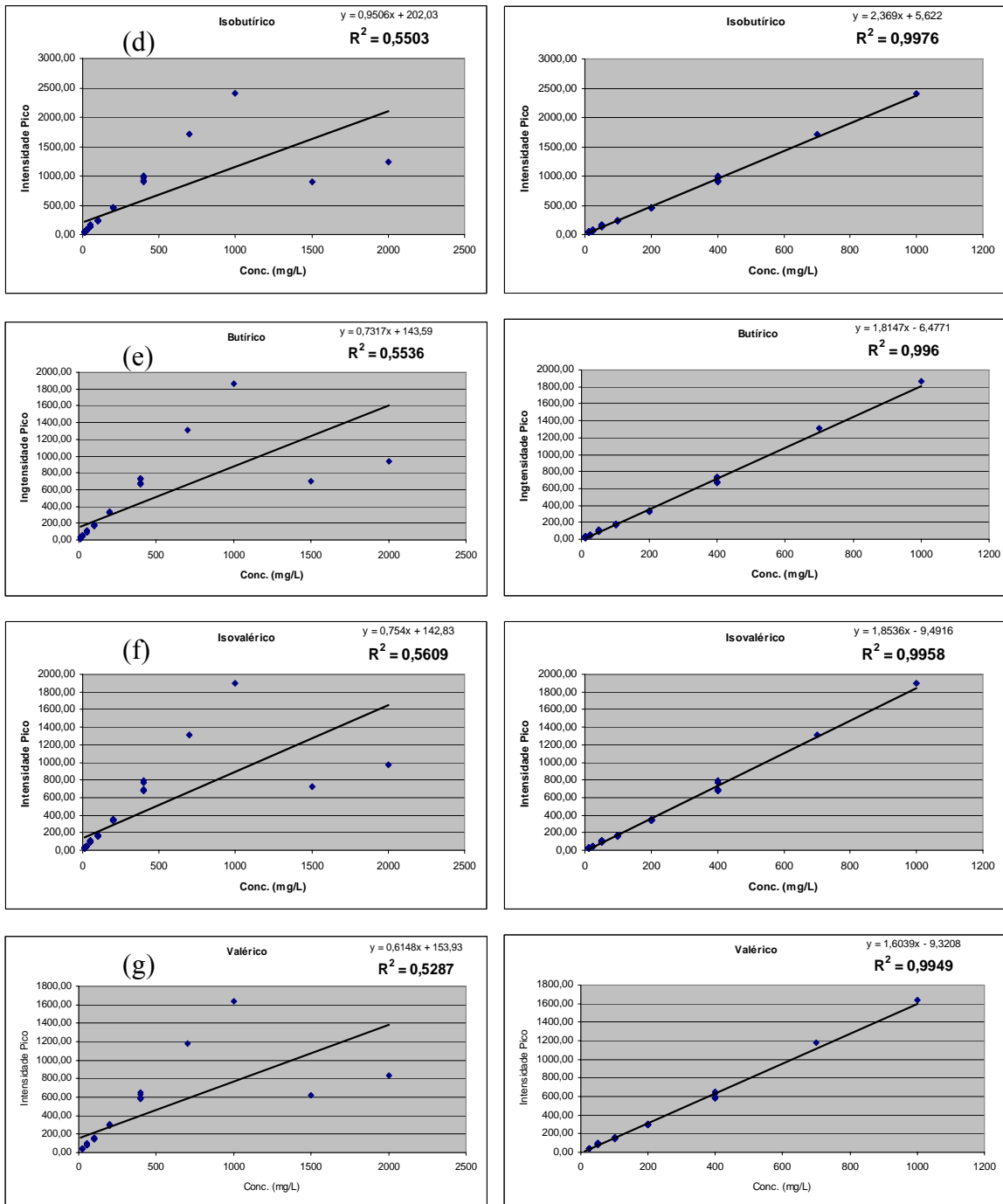


Figura A.1 – Ajustes para a determinação da faixa de aplicação para os AGVs (a) fórmico; (b) acético; (c) propiônico; (d) isobutírico; (e) butírico; (f) isovalérico; (g) valérico.

Linearidade

“A linearidade é a resposta obtida em função da concentração do analito, a qual deve ser estudada em um intervalo de concentração apropriado. Na prática, a linearidade é determinada por intermédio de gráficos de calibração, seguidos de um tratamento

estatístico, o qual deve envolver, no mínimo, a equação da função, a análise da regressão e os dados de correlação” (Lanças, 2004).

Os dados para a determinação da linearidade foram obtidos a partir das mesmas amostras injetadas para determinar a precisão, em sete replicatas por concentração. As concentrações foram de 12,5; 25; 50; 100; 200 e 400mg/L da mistura de ácidos, atendendo à demanda mínima recomendada de 5 pontos para a curva analítica. As respostas obtidas foram plotadas em função da concentração dos padrões, conforme mostram as Figuras A.2, A.3, A.4, A.5, A.6, A.7 e A.8. Em seguida, foi feita análise de regressão por mínimos quadrados e as equações das retas foram registradas em cada gráfico. A correlação foi obtida por meio do coeficiente de determinação r^2 . Registrou-se, pois, a linearidade do método para a faixa de concentração comumente usada (de 12,5 a 400mg/L).

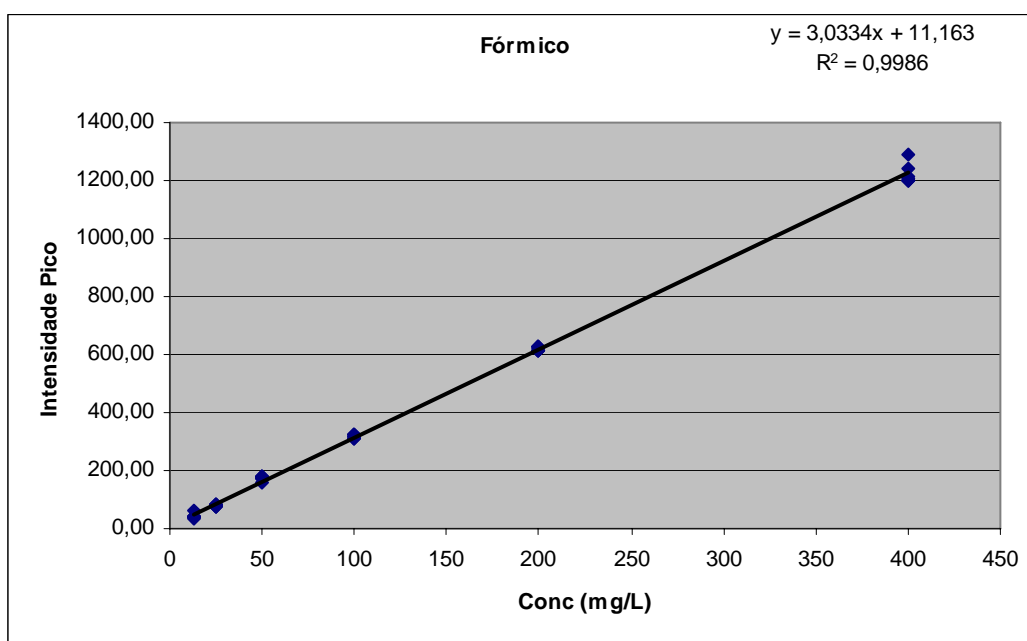


Figura A.2 – Linearidade e análise de regressão para o ácido fórmico.

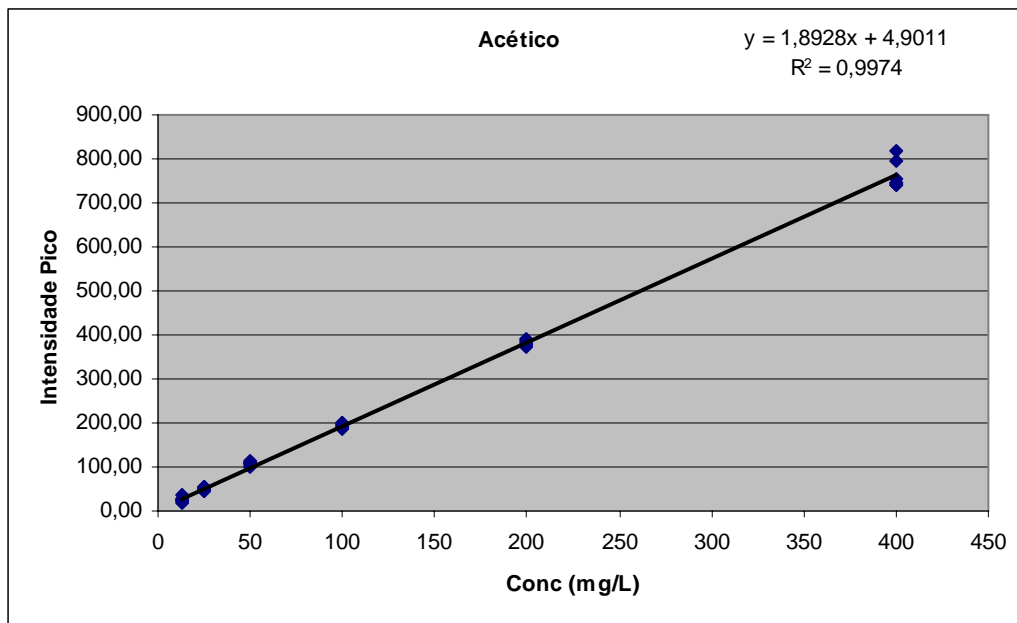


Figura A.3 – Linearidade e análise de regressão para o ácido acético.

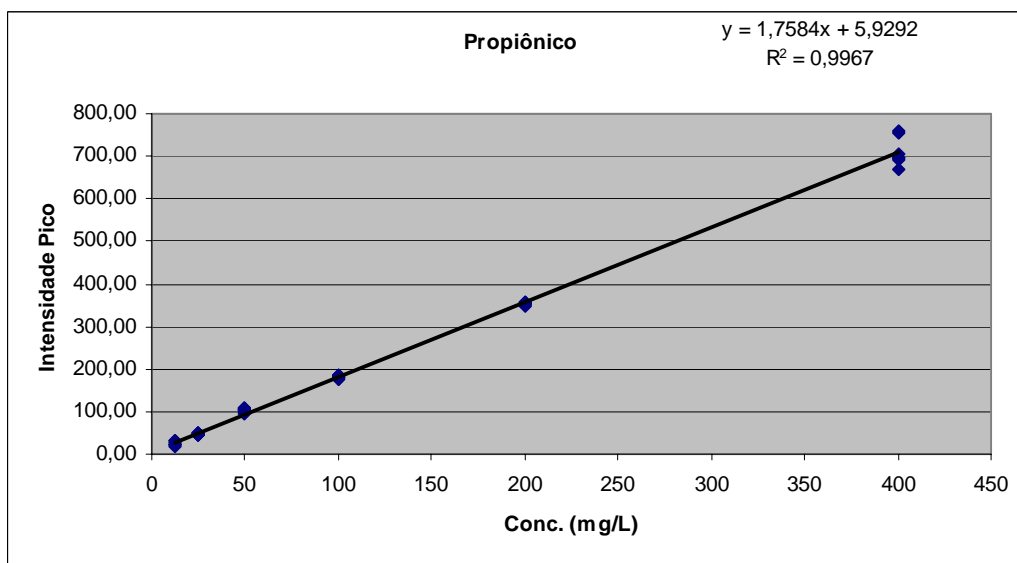


Figura A.4 – Linearidade e análise de regressão para o ácido propiônico.

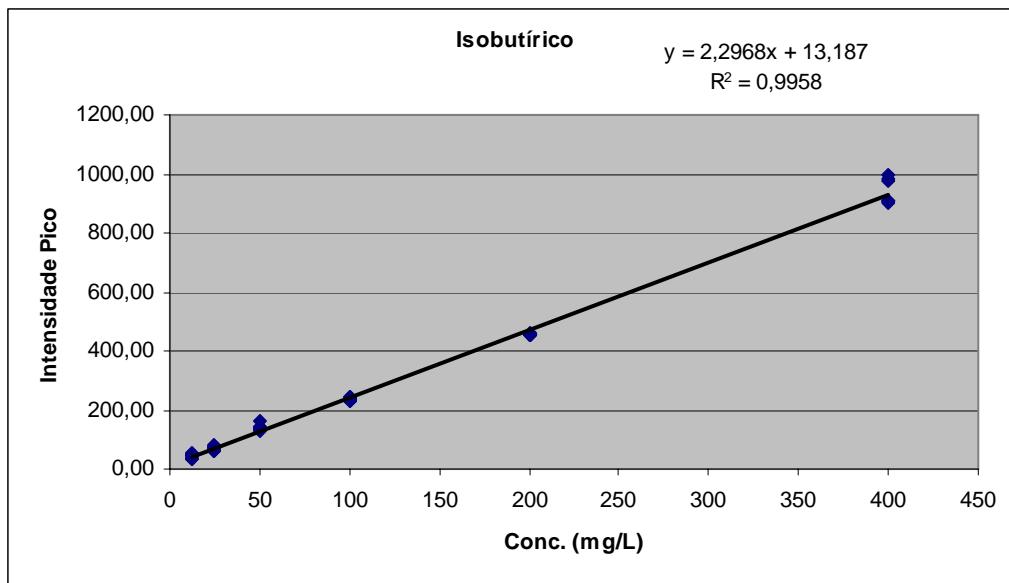


Figura A.5 – Linearidade e análise de regressão para o ácido isobutírico.

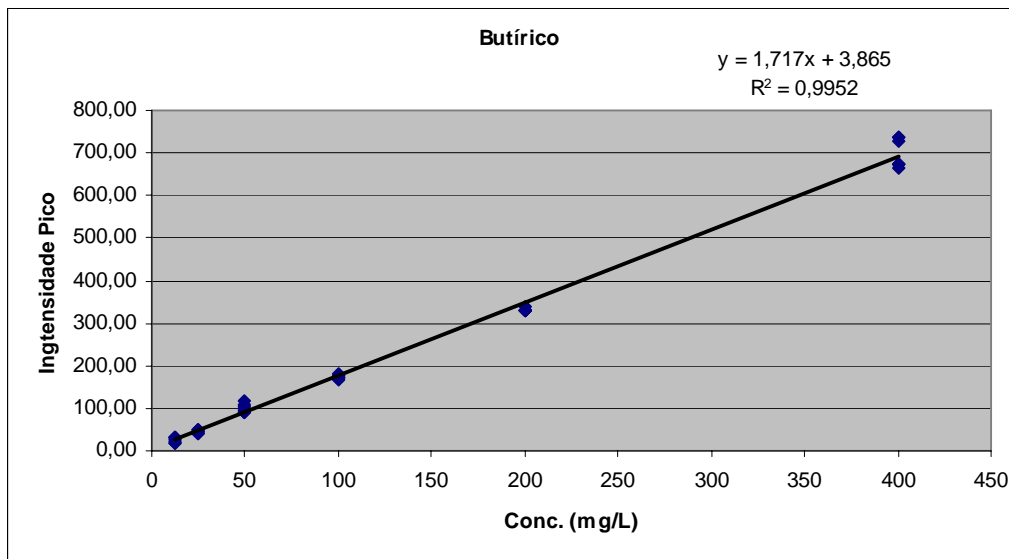


Figura A.6 – Linearidade e análise de regressão para o ácido butírico.

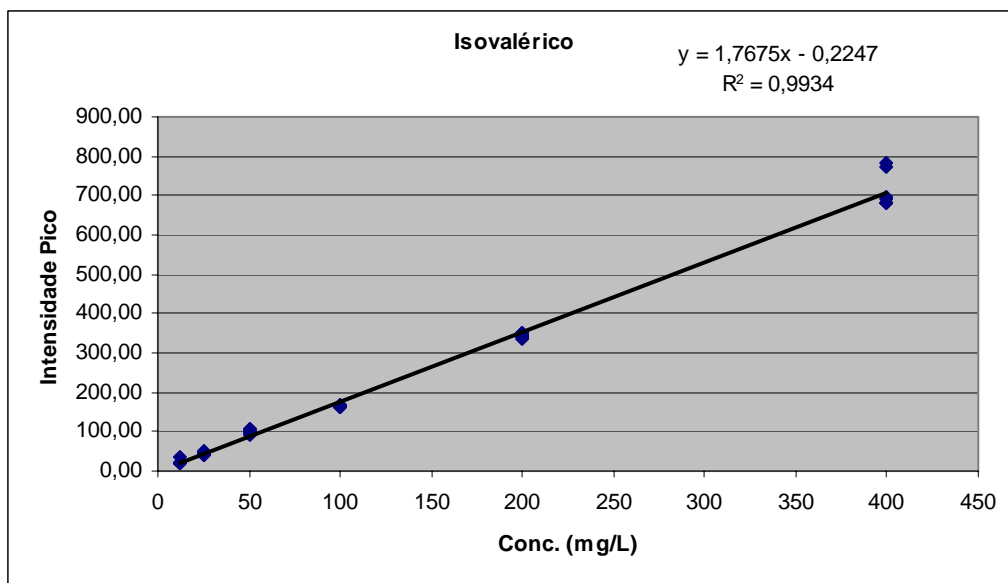


Figura A.7 – Linearidade e análise de regressão para o ácido isovalérico.

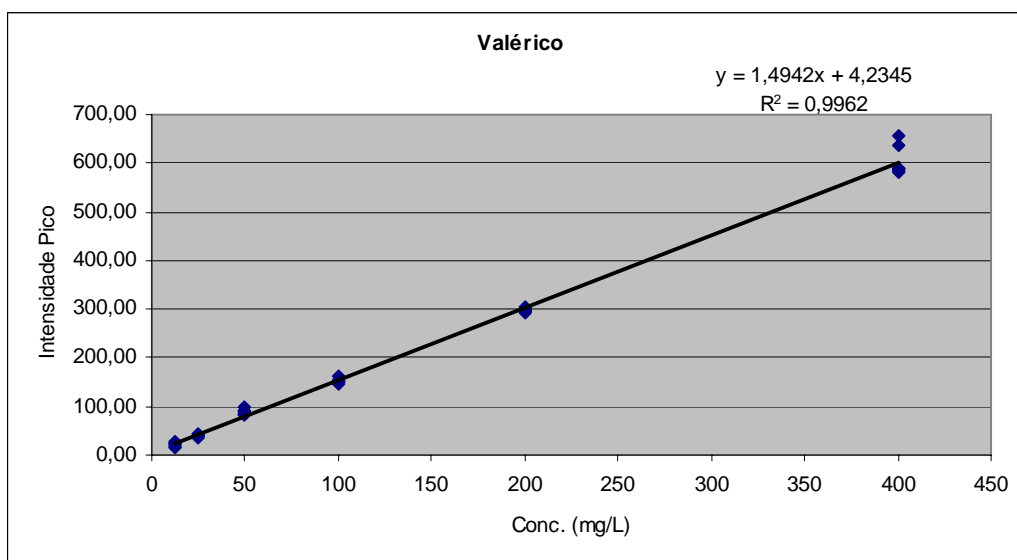


Figura A.8 – Linearidade e análise de regressão para o ácido valérico.

Precisão (Repetibilidade)

A avaliação da precisão do método foi obtida com base na repetibilidade. “A repetibilidade expressa a fidelidade obtida nas mesmas condições operacionais (mesmo analista, mesmo equipamento, etc) aplicadas em um curto intervalo de tempo. A repetibilidade da área de um pico cromatográfico é importante por ser o parâmetro utilizado na quantificação do composto de interesse” (Lanças, 2004).

Soluções-padrão foram preparadas pelo mesmo analista para a concentração de 200mg/L (concentração intermediária da curva analítica), em sete replicatas e foram analisadas cromatograficamente, em seqüência, no mesmo equipamento, com o mesmo eluente e usando as mesmas condições operacionais. As médias e os desvios-padrão foram obtidos com vistas a se determinar a precisão a partir do coeficiente de variação (CV), conforme a Equação A.1:

$$CV = DP/CMP \times 100 \quad (\text{Eq. A.1})$$

onde:

DP = desvio padrão;

CMD = concentração média determinada

Os valores de precisão obtidos com o cálculo de CV estão expressos na Tabela A.2 e foram confirmados pelo software *Validate*[®], da *Croma*. Valores de CV de até 20% são aceitos pelo INMETRO (2003); portanto, pode-se afirmar que o método é preciso.

Tabela A.2 – Dados de áreas de picos para a concentração de 200mg/L da mistura de AGVs para a avaliação da precisão do método.

Concentração (mg/L)	Fórmico	Acético	Propiônico	Isobutírico	Butírico	Isovalérico	Valérico
200	617,16	378,12	354,19	452,32	329,18	341,08	302,07
200	618,82	378,76	351,56	451,13	329,56	343,06	295,57
200	613,37	375,59	350,74	452,72	329,27	337,11	298,21
200	625,80	385,51	355,81	456,45	331,33	352,65	299,77
200	616,94	374,00	349,25	453,76	331,00	343,26	297,11
200	627,55	389,95	358,84	461,63	339,23	351,47	305,69
200	626,00	379,56	354,52	455,96	331,36	347,98	294,32
DP	5,55	5,62	3,29	3,55	3,51	5,68	3,93
MEDIA	620,81	380,21	353,56	454,85	331,56	345,23	298,96
CV	0,89%	1,48%	0,93%	0,78%	1,06%	1,64%	1,31%

Sensibilidade

“A sensibilidade de um método indica sua capacidade de discriminar, com uma fidelidade estabelecida, concentrações próximas de um analito. A sensibilidade pode ser determinada

por intermédio da inclinação do gráfico de calibração.” Quanto maior o coeficiente angular, mais sensível é o método (Lanças, 2004).

Para cada curva analítica construída (Figuras A.2 a A.8) foi avaliado o coeficiente angular obtido a partir da análise regressão. Desta forma, foi possível comparar a sensibilidade do método para cada ácido orgânico. A Tabela A.3 sistematiza a informação dos coeficientes angulares, em ordem crescente. Portanto, o método empregado é mais sensível para o ácido fórmico e bem menos sensível para o ácido valérico.

Tabela A.3 – Valores dos coeficientes angulares, em ordem crescente, para os AGVs, revelando a sensibilidade de cada ácido.

Ácido	Coefficiente angular
Valérico	1,49
Butírico	1,72
Propiônico	1,76
Isovalérico	1,77
Acético	1,89
Isobutírico	2,30
Fórmico	3,03

Seletividade

“A seletividade de um método instrumental de separação é a capacidade de avaliar, de forma inequívoca, as substâncias em exame na presença de componentes que podem interferir com a sua determinação em uma amostra complexa. O método de adição padrão também pode ser aplicado para os estudos de seletividade, porém este método é utilizado quando não é possível obter a matriz isenta da substância de interesse.” (Ribani *et al.*, 2004).

Este método foi o escolhido para avaliação da seletividade, uma vez que é praticamente impossível obter a matriz dos efluentes anaeróbios isenta dos ácidos orgânicos. Foi feita uma curva analítica com a adição dos padrões da mistura de ácidos em diferentes

concentrações em amostras reais de efluente anaeróbio. Esta curva foi comparada à curva analítica obtida para os padrões isentos da matriz. Comparam-se, pois, as duas curvas e, caso elas sejam paralelas, pode-se dizer que o método é seletivo (não há interferência da matriz na determinação da substância de interesse). Portanto, avaliando-se as Figuras A.9 a A.15, o método parece satisfatoriamente seletivo para todos os ácidos, à exceção do ácido isobutírico, em que o efeito da matriz parece mais pronunciado (ajustes não paralelos, coeficientes angulares distintos na presença e na ausência da matriz – 0,6849 *versus* 0,7934, respectivamente).

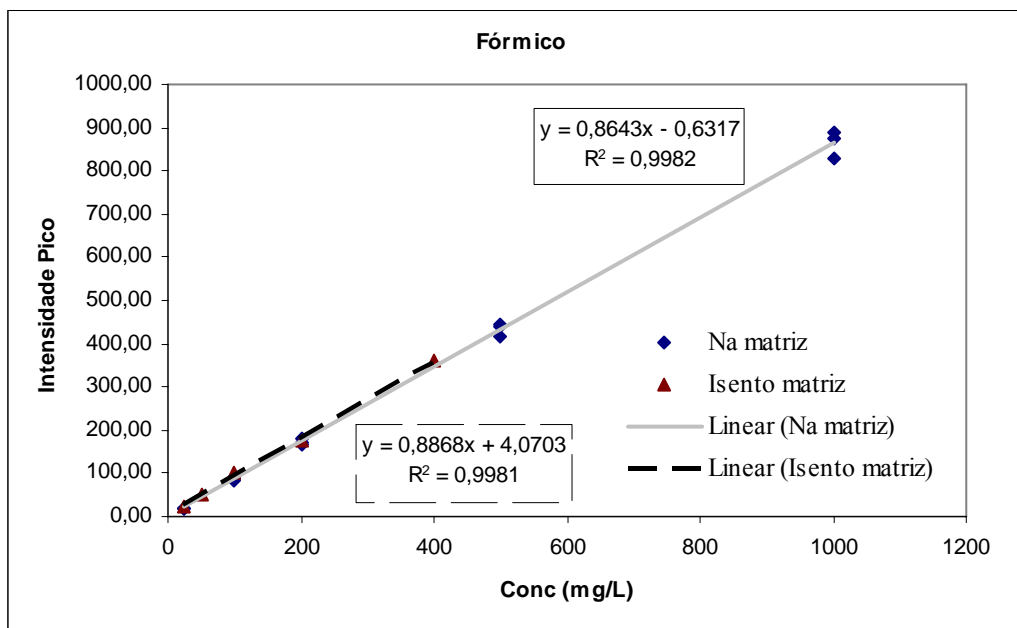


Figura A.9 – Seletividade e análise de regressão para o ácido fórmico.

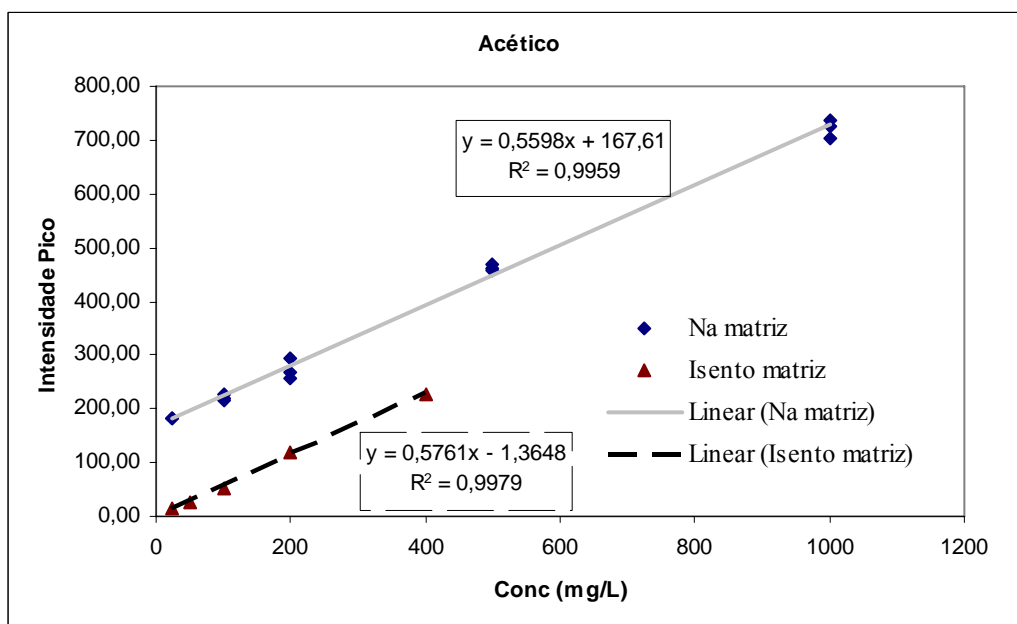


Figura A.10 – Seletividade e análise de regressão para o ácido acético.

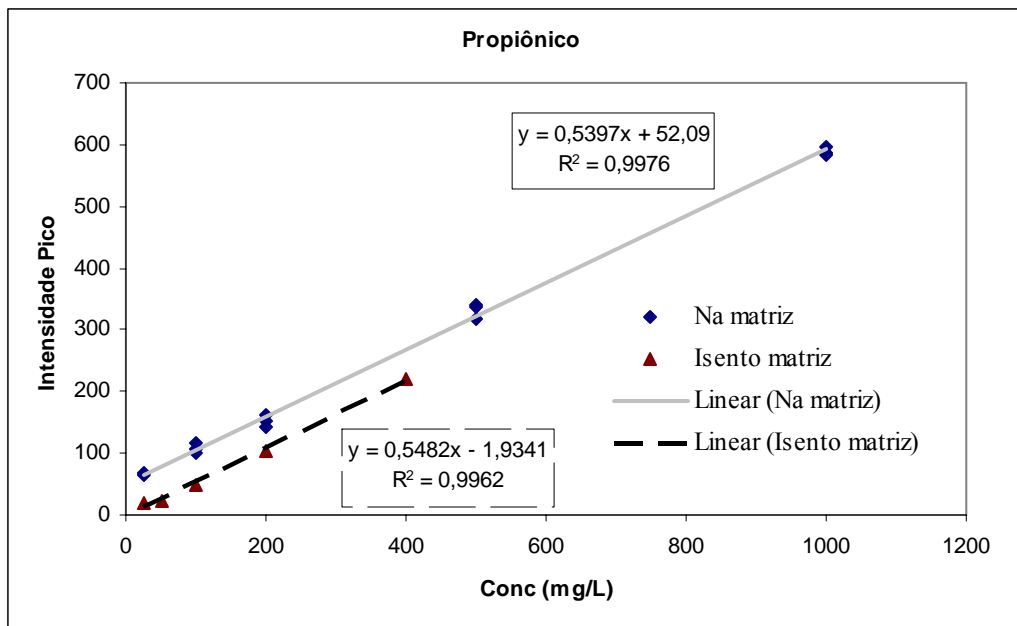


Figura A.11 – Seletividade e análise de regressão para o ácido propiônico.

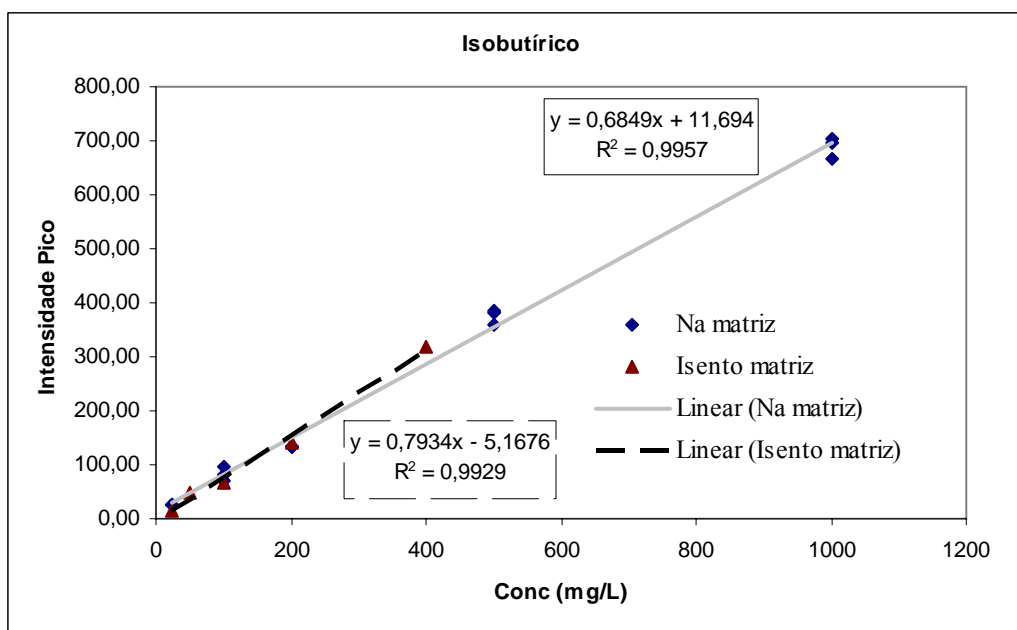


Figura A.12 – Seletividade e análise de regressão para o ácido isobutírico.

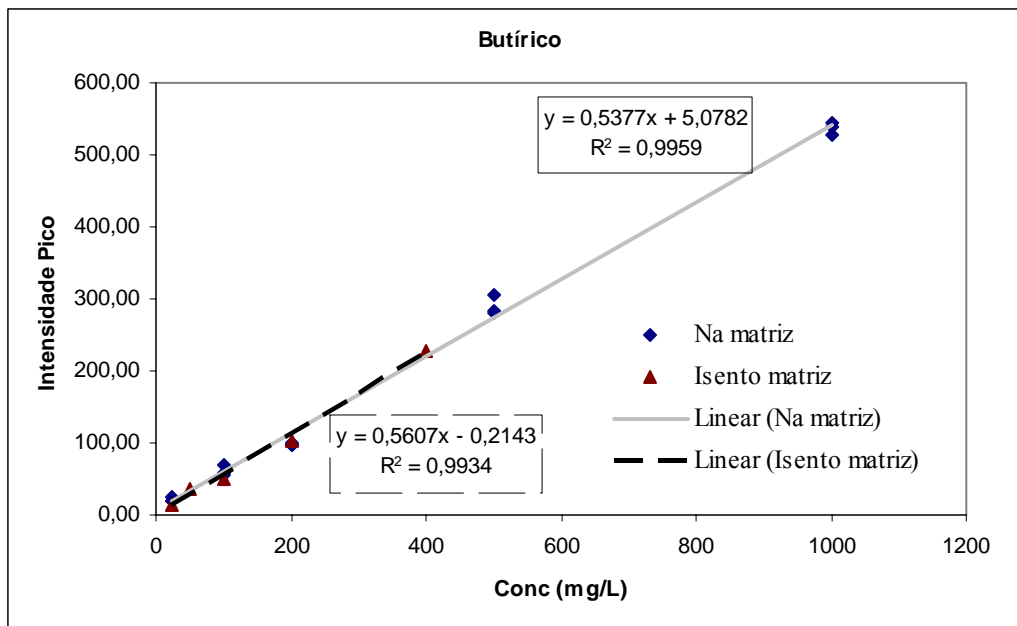


Figura A.13 – Seletividade e análise de regressão para o ácido butírico.

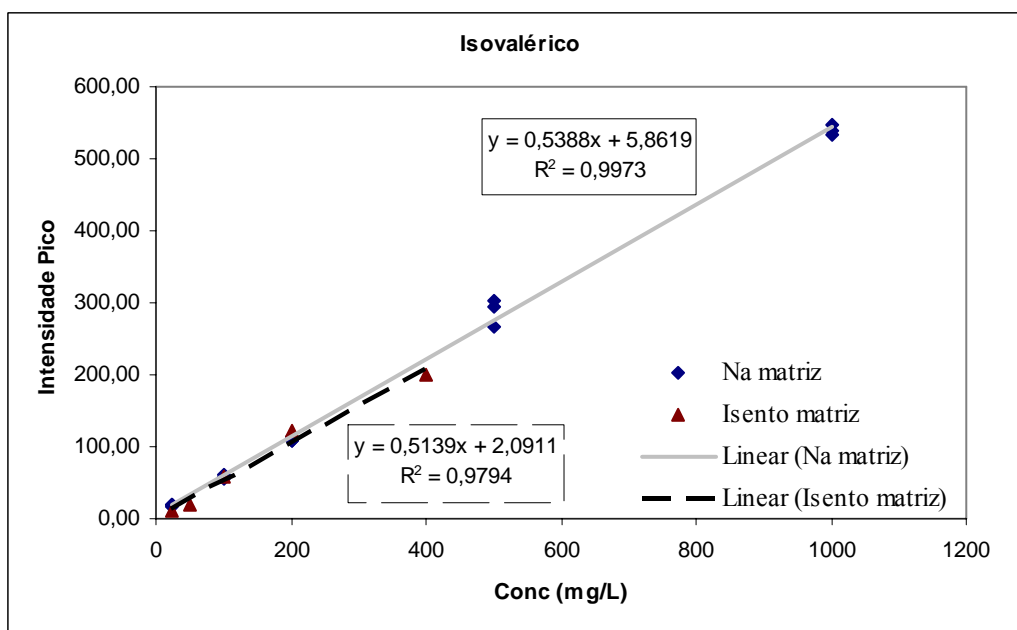


Figura A.14 – Seletividade e análise de regressão para o ácido isovalérico.

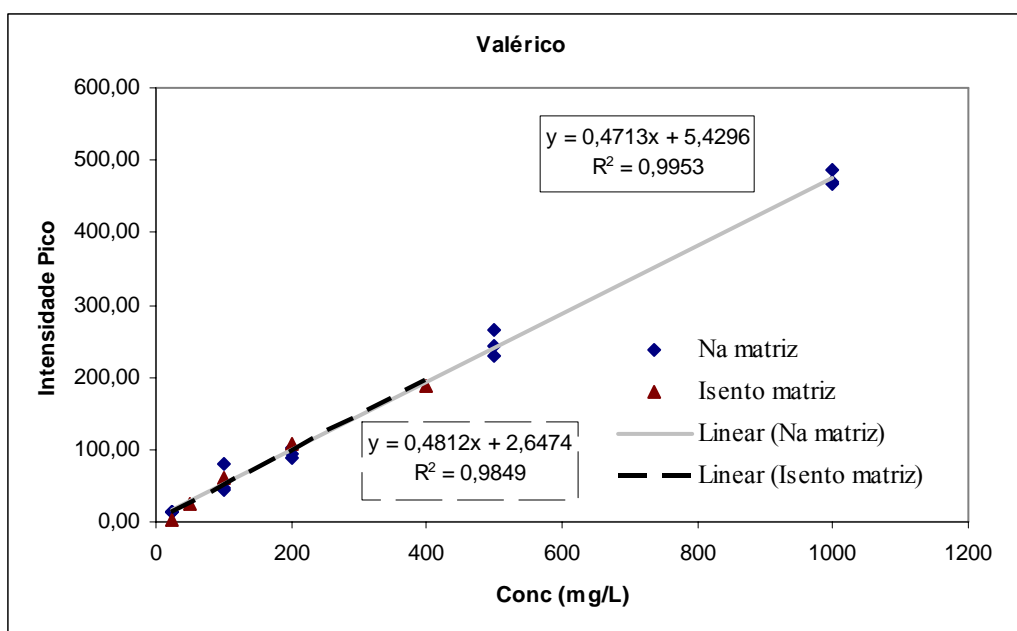


Figura A.15 – Seletividade e análise de regressão para o ácido valérico.

Exatidão (Fortificação)

A exatidão “representa o grau de concordância entre os resultados individuais encontrados em um determinado ensaio e um valor de referência aceito como verdadeiro. Os processos mais utilizados para avaliar a exatidão de um método são: materiais de referência, comparação de métodos, ensaios de recuperação, adição padrão. Este último método é usado quando for difícil ou impossível preparar um branco da matriz sem a substância de interesse” (Ribani *et al.*, 2004). Este foi o caso adotado para avaliação da exatidão neste estudo, uma vez que é praticamente impossível obter a matriz dos efluentes anaeróbios isenta dos ácidos orgânicos.

Foram preparadas soluções-padrão de 100, 200, 500 e 1000mg/L da mistura de ácidos (fórmico, acético, propiônico, butírico, isobutírico, valérico e isovalérico). Amostras de efluentes anaeróbios foram coletadas e fortificadas em 50% com adição dos padrões. Para cada concentração adotada, três ensaios foram conduzidos (ensaios em triplicata), de modo que, ao final, 12 amostras foram obtidas. Em seguida, todos os procedimentos adotados para a preparação da amostra anteriores ao encaminhamento à análise cromatográfica

foram seguidos: centrifugação, filtração do sobrenadante através de membranas de 0,45µm e alocação em *vials*. As amostras foram injetadas para análise cromatográfica.

Para o cálculo da exatidão, duas informações são necessárias: o valor real (aquele tido como verdadeiro; neste caso, corresponde à concentração do padrão preparado para a fortificação da matriz) e o valor obtido (que é aquela concentração obtida pela curva analítica a partir da resposta intensidade do pico). Contudo, após a obtenção das respostas, foi necessário determinar a concentração de cada ácido na matriz original, uma vez que esta não era isenta dos analitos. Para tal, foi feita uma curva analítica com adição de padrão nas concentrações de 25, 50, 100, 200, 500 e 1000mg/L, ensaios em triplicata. Por meio da extrapolação da curva, a intercessão com o eixo *x* proveu a informação, anteriormente desconhecida, quanto à concentração de cada ácido presente na matriz original (Ribani *et al.*, 2004). Este valor foi deduzido da concentração total, proveniente de uma curva analítica dos padrões isentos da matriz (calibração externa) usando as respostas da matriz fortificada e a diferença foi utilizada como valor obtido. Segundo Lanças (2004), a exatidão pode ser determinada pela expressão dada na Equação A.2:

$$\text{Exatidão} = [1-(V_r-V_d)/V_r] \times 100$$

(Eq. A.2)

Onde:

V_r = valor real, aquele tido como verdadeiro

V_d = valor desejado, ou obtido pela curva analítica

A média da triplicata dos valores obtidos e dos verdadeiros foram inseridos no software *Validate*[®], da *Croma*, para o cálculo da exatidão do método. As Figuras A.16 a A.22 mostram os relatórios gerados pelo *software*, com os resultados de exatidão. O método se mostra exato para todos os ácidos, uma vez que a percentagem média de exatidão obtida ficou compreendida entre 85 e 104% (segundo Lanças (2004), a faixa média aceitável para avaliação de exatidão por ensaios de recuperação, por exemplo, fica entre 70 e 120%).

Relatório de Validação
Validação da Metodologia para Análise de Ácidos Graxos Voláteis
 Patrícia da Luz Mesquita
 UFOP

Analitos de Interesse: Ácido Fórmico

2. Exatidão

Valores para o Cálculo da Exatidão (mg/L)				
	Primeiro Valor	Segundo Valor	Terceiro Valor	Quarto Valor
Concentração Verdadeira	100	200	500	1000
Concentração Obtida	87,9	185,22	476,72	963,54

Resultado da Exatidão	95,18777 %
------------------------------	-------------------

Figura A.16 – Resultado da exatidão do método de análise de AGVs para o ácido fórmico.

Relatório de Validação
Validação da Metodologia de Análise de Ácidos Graxos Voláteis
 Patrícia da Luz Mesquita
 UFOP

Analitos de Interesse: Ácido Acético

2. Exatidão

Valores para o Cálculo da Exatidão (mg/L)				
	Primeiro Valor	Segundo Valor	Terceiro Valor	Quarto Valor
Concentração Verdadeira	100	200	500	1000
Concentração Obtida	75,19	162,69	494,04	942,79

Resultado da Exatidão	93,03944 %
------------------------------	-------------------

Figura A.17 – Resultado da exatidão do método de análise de AGVs para o ácido acético.

Relatório de Validação
Validação da Metodologia de Análise de Ácidos Graxos Voltáteis
 Patrícia da Luz Mesquita
 UFOP

Analitos de Interesse: Ácido Propiônico

2. Exatidão

Valores para o Cálculo da Exatidão (mg/L)				
	Primeiro Valor	Segundo Valor	Terceiro Valor	Quarto Valor
Concentração Verdadeira	100	200	500	1000
Concentração Obtida	87,18	167,17	495,88	963,52

Resultado da Exatidão	95,20834 %
------------------------------	-------------------

Figura A.18 – Resultado da exatidão do método de análise de AGVs para o ácido propiônico.

Relatório de Validação
Validação da Metodologia de Análise de Ácidos Graxos Voláteis
 Patrícia da Luz Mesquita
 UFOP

Analitos de Interesse: Ácido Isobutírico

2. Exatidão

Valores para o Cálculo da Exatidão (mg/L)				
	Primeiro Valor	Segundo Valor	Terceiro Valor	Quarto Valor
Concentração Verdadeira	100	200	500	1000
Concentração Obtida	86,16	149,2	453,12	848,51

Resultado da Exatidão	85,38834 %
------------------------------	-------------------

Figura A.19 – Resultado da exatidão do método de análise de AGVs para o ácido isobutírico.

Relatório de Validação
Validação da Metodologia de Análise de Ácidos Graxos Voláteis
 Patrícia da Luz Mesquita
 UFOP

Analitos de Interesse: Ácido Butírico

2. Exatidão

Valores para o Cálculo da Exatidão (mg/L)				
	Primeiro Valor	Segundo Valor	Terceiro Valor	Quarto Valor
Concentração Verdadeira	100	200	500	1000
Concentração Obtida	92,61	159,14	501,55	943,53

Resultado da Exatidão	94,26834 %
------------------------------	-------------------

Figura A.20 – Resultado da exatidão do método de análise de AGVs para o ácido butírico.

Relatório de Validação
Validação da Metodologia de Análise de Ácidos Graxos Voláteis
 Patrícia da Luz Mesquita
 UFOP

Analitos de Interesse: Ácido Isovalérico

2. Exatidão

Valores para o Cálculo da Exatidão (mg/L)				
	Primeiro Valor	Segundo Valor	Terceiro Valor	Quarto Valor
Concentração Verdadeira	100	200	500	1000
Concentração Obtida	98,22	198,23	544,97	1034,82

Resultado da Exatidão	104,2355 %
------------------------------	-------------------

Figura A.21– Resultado da exatidão do método de análise de AGVs para o ácido isovalérico.

Relatório de Validação
Validação da Metodologia de Análise de Ácidos Graxos Voláteis
Patrícia da Luz Mesquita
UFOP

Analitos de Interesse: Ácido Valérico

2. Exatidão

Valores para o Cálculo da Exatidão (mg/L)				
	Primeiro Valor	Segundo Valor	Terceiro Valor	Quarto Valor
Concentração Verdadeira	100	200	500	1000
Concentração Obtida	101,82	181,79	495,25	968,93

Resultado da Exatidão	97,09945 %
------------------------------	-------------------

Figura A.22 – Resultado da exatidão do método de análise de AGVs para o ácido valérico.