

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DE TECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

**“ANÁLISES DE COMPOSTOS ORGÂNICOS NÃO
ESPECÍFICOS NO ESGOTO SANITÁRIO DOMÉSTICO
ATRAVÉS DAS TÉCNICAS RMNq E HPLC-(UV/MS)-SPE-
ASS-NMR”**

Elenilson de Godoy Alves Filho*

Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de DOUTOR EM CIÊNCIAS, área de concentração: QUÍMICA ORGÂNICA.

Orientador: Antonio Gilberto Ferreira

*** bolsista CNPq**

**São Carlos - SP
2014**

**Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da
Biblioteca Comunitária/UFSCar**

A474ac Alves Filho, Elenilson de Godoy.
Análises de compostos orgânicos não específicos no
esgoto sanitário doméstico através das técnicas RMNq e
HPLC-(UV/MS)-SPE-ASS-NMR / Elenilson de Godoy Alves
Filho. -- São Carlos : UFSCar, 2015.
150 f.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal de São Carlos,
2014.

1. Ressonância magnética nuclear. 2. Quimiometria. 3.
Quantificação. 4. Química orgânica. I. Título.

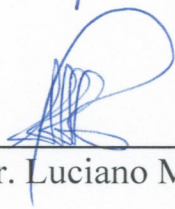
CDD: 547 (20^a)

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia
Departamento de Química
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA
Curso de Doutorado

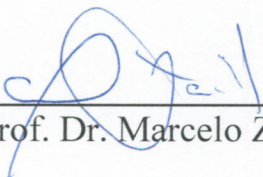
*Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a defesa de tese de doutorado do candidato **Elenilson de Godoy Alves Filho**, realizada em 10 de outubro de 2014:*



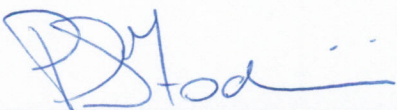
Prof. Dr. Antonio Gilberto Ferreira



Prof. Dr. Luciano Morais Lião



Prof. Dr. Marcelo Zaiat



Prof. Dr. Pedro Sergio Fadini



Prof. Dr. Edson Rodrigues Filho

DEDICATÓRIA

*Dedico este trabalho aos meus pais,
Elenilson e Rosângela,
Aos meus irmãos Danuza e Pedro,
Ao meu afilhado Luiz Henrique,
a minha avó Elvira
e ao meu amor Lorena.*

EPÍGRAFE

*Others inspire us, information feeds us,
practice improves our performance, but we
need quiet time to figure things out, to
emerge with new discoveries, to unearth
original answers.*

*Dr. Ester Buchholz, Professora de Psicologia
da Universidade de Nova Iorque e autora do
livro “The Call of Solitude”.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço,

Primeiramente a Deus pelo propósito de vida proporcionado,

Aos meus pais Elenilson e Rosângela, irmãos Danuza e Pedro, com meus respectivos cunhados Rodrigo e Suellen, afilhado Luiz Henrique, avó Elvira e demais familiares por me darem amor, carinho, suporte e terem me proporcionado momentos de felicidade e descontração nesta longa jornada.

A minha esposa Lorena pelo amor, carinho, compreensão, incentivo, dedicação e pelas conquistas, com sucessos e felicidades em todas as etapas de meu doutorado no Brasil e no Canadá.

A família de minha esposa, Maristela, Zeca, Diogo, Thiago, Fernanda, avó Luzia e demais familiares pelo incentivo, suporte e momentos de alegria e descontração.

Ao meu orientador Prof. Antonio Gilberto Ferreira, pela amizade, apoio, ensinamentos e confiança, além dos inesquecíveis momentos de dedicação e trabalho.

Ao Prof. Tiago Venâncio, pela amizade, apoio e ensinamentos transmitidos.

Aos meus amigos do laboratório de RMN da UFSCar, pela contribuição, ajuda e ótimos momentos de distração: técnicos Luciana e Paulo, Clayton, Lyege, Sérgio, Luiz e Darlene Keng, Tatielih, Chicão, Sheraz, Nazish, Eduardo, Thayana, Valéria e Tatiana.

AGRADECIMENTOS

Aos meus colegas e colaboradores do Laboratório de LbGqA da UFSCar, Prof. Pedro Fadini, Bianca e Mariele pelo apoio, espaço e materiais cedidos.

Ao Prof. Dr. Andre Simpson e ao técnico Dr. Ronald Soong do Environmental NMR Center da Universidade de Toronto, por terem me aceitado com muita dedicação e apoio no meu projeto.

Aos meus colegas do laboratório de RMN da Universidade de Toronto, pelo auxílio nesta etapa de meu doutorado.

Aos professores e funcionários do DQ-UFSCar pelos ensinamentos transmitidos e que, de alguma forma, colaboraram para o desenvolvimento deste trabalho.

Aos meus colegas e colaboradores da Estação de Tratamento de Esgoto de São Carlos, Luci, Rafael e Samara pela coleta das amostras e conhecimentos transmitidos.

As funcionárias da secretaria de pós-graduação Ariane, Cristina e Luciani pelo atendimento atencioso.

As agências CNPq e CAPES pelas respectivas bolsas doutorado e doutorado Sandwich concedidas.

A todos o meu sincero agradecimento!

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

Δ	Média
^1H	Isótopo do átomo de hidrogênio 1
^{13}C	Isótopo do átomo de carbono 13
1D	Unidimensional
2D	Bidimensional
AQ	<i>Acquisition Time</i> – Tempo de aquisição
ASCII	<i>American Standard Code for Information Interchange</i>
ASS	<i>Automatic Sampling Storage</i> – Amostrador automático
B_0	Campo magnético estático de um espectrômetro
<i>Bucket Table</i>	Arquivo gerado a partir de um espectro para análise quimiométrica
CG	Cromatografia Gasosa
CID	<i>Collision-induced Dissociation</i> – Dissociação induzida por colisão
d	Dupleto
D_2O	Água deuterada
d1	Tempo de espera entre cada aquisição
DBO	Demanda Bioquímica de Oxigênio
dd	Duplo dupleto
DEQ	Diagrama de Extremos e Quartis
DP	Desvio Padrão
DQO	Demanda Química de Oxigênio
ETEs	Estações de Tratamento de Esgoto
ESI	<i>Electrospray ionization</i> – ionização por fluxo de elétrons
F1	Eixo vertical no espectro bidimensional
F2	Eixo horizontal no espectro bidimensional
FID	Decaimento livre de indução
G	Gramatura – g/m^2

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

COSY	<i>CO</i> rrelation <i>Spectroscop</i> <i>Y</i>
HSQC	<i>Heteronuclear Single Quantum Coherence</i>
HMBC	<i>Heteronuclear Multiple Bond Correlation</i>
HCA	<i>Hierarchical Clusters Analysis</i> – Análise por Agrupamento Hierárquico
HPAs	Hidrocarbonetos Aromáticos Policíclicos
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i> – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
Hz	Hertz
IV	Infravermelho
<i>J</i>	Constante de acoplamento
LAS	<i>Linear Alkylbenzene Sulfonates surfactants</i> – Surfactantes alquilbenzeno sulfonados de cadeia linear
Lb	<i>Line broadening</i> - Fator utilizado na multiplicação exponencial
m	Multiplete
MRC	Material de Referência Certificado
MS	<i>Mass Spectroscopy</i> – Espectrometria de Massas
m/z	Relação massa/carga
NS	<i>Number of scans</i> – número de varreduras
OCPs	Poluentes Orgânicos Persistentes
p1	Tempo do pulso de 90° de radiofrequência, com alta potência, aplicado no canal F1
PAHs	Hidrocarbonetos Aromáticos Policíclicos
PC	Componentes Principais
PCA	Análise dos Componentes Principais
PCBs	Bifenilas Policloradas
POPs	Pesticidas Clorados
ppm	Parte por milhão
q	Quadruplete
R	Coefficiente de correlação linear
rf	Radiofrequência

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

RMN ou NMR (em inglês)	Ressonância Magnética Nuclear
RMNq	Ressonância Magnética Nuclear Quantitativa
s	Simpleto
SPE	<i>Solid Phase Extraction</i> – Extração em fase sólida
SAS	Alcanosulfonados
SI	data Size – Número de pontos no processamento
SW	<i>Spectral Window</i> – Janela espectral, em ppm
T	Tesla
t	Tripleto
T ₁	Tempo de relaxação longitudinal ou <i>spin</i> -rede
T ₂	Tempo de relaxação transversal ou <i>spin-spin</i>
TCI	<i>Triple Coil Inverse probe</i>
TD	<i>Time Domain</i> – Número de pontos na aquisição
TMSP-d ₄	Trimetilsililpropionato de sódio tetradeuterado
UASB	<i>Upflow Anaerobic Sludge Blanket</i> - Reator anaeróbio de fluxo ascendente
UV	Ultravioleta

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Compostos caracterizados nas amostras de esgoto não tratado e após tratamento ocorrido na ETE de São Carlos-SP.....	40-48
Tabela 2 – Estimativa das concentrações dos compostos orgânicos presentes nas amostras de esgoto não tratado, em mg.L⁻¹ ou ppm....	125-127
Tabela 3 – Incertezas das concentrações dos compostos orgânicos presentes nas amostras de esgoto não tratado, em mg.L⁻¹ ou ppm....	128-130
Tabela 4 – Estimativa das concentrações dos compostos orgânicos presentes nas amostras de esgoto tratado, em mg.L⁻¹ ou ppm.....	130-132
Tabela 5 – Incertezas das concentrações dos compostos orgânicos presentes nas amostras de esgoto tratado, em mg.L⁻¹ ou ppm.....	132-134

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Ciclo do esgoto sanitário doméstico.....	2
Figura 2 – Esquema tradicional de tratamento do esgoto sanitário doméstico.....	4
Figura 3 – Representação do reator anaeróbio de fluxo ascendente utilizado pela ETE de São Carlos-SP.....	6
Figura 4 – Esquema representativo da digestão anaeróbia decorrente do tratamento biológico do esgoto.....	7
Figura 5 – Representação da distribuição energética do fenômeno de RMN.....	11
Figura 6 – Sistema hifenado completo de HPLC-(UV/MS)-SPE-ASS-NMR, no modo <i>off-line</i>	16
Figura 7 – Proporção dos hidrogênios aromático (H Ar), alifático (H Ali) e do grupo funcional (H R-O); carbonos aromático (C Ar), alifático (C Ali) e carboxílico (C C = O); aromaticidade dos ácidos húmicos extraídos do lodo de esgoto; TDP: tanque de decantação primária; CN: câmara de nitrificação; CD: câmara de digestão; LS: leitos de secagem.....	20
Figura 8 – Esquema ilustrativo de alguns métodos quimiométricos aplicados aos dados de RMN.....	22
Figura 9 – Ilustração dos dados: (A) sem tratamento; (B) após a centralização em torno da média; (C) após escalonamento.....	24

LISTA DE FIGURAS

Figura 10 – ETE de São Carlos-SP e os locais onde foram feitas as coletas das amostras de esgoto não tratado (lado esquerdo) e após o tratamento (lado direito).....	30
Figura 11 – Diagrama de blocos das etapas do tratamento do esgoto pela ETE de São Carlos-SP.....	37
Figura 12 – Comparação, por espectros de RMN de ^1H , da composição orgânica das amostras em cada etapa do tratamento ocorrido na ETE de São Carlos-SP.....	38
Figura 13 – Ampliações de um espectro de RMN de COSY de uma amostra de esgoto não tratado.....	50
Figura 14 – Ampliações de um espectro de RMN de HSQC de uma amostra de esgoto não tratado.....	52
Figura 15 – Gráficos de dispersão para os núcleos de ^1H e ^{13}C , com os deslocamentos químicos (δ) experimentais <i>versus</i> padrão.....	53
Figura 16 – Comparação entre os espectros de RMN de ^1H das amostras de esgoto não tratado e tratado.....	54
Figura 17 – a) Representações das <i>bucket tables</i> geradas pelo programa Amix [®] ; b) Espectros de RMN de ^1H empregados nas análises quimiométricas, com exceção do sinal da HOD (faixa na cor preta).....	58
Figura 18 – a) <i>Bucket tables</i> geradas pelo programa Amix [®] ; b) Espectros de RMN de ^1H ilustrando as regiões aromáticas empregadas nas análises quimiométricas.....	60
Figura 19 – Gráfico de agrupamentos naturais (HCA) das amostras de esgoto não tratado (■) e tratado (□).....	62

LISTA DE FIGURAS

Figura 20 - Gráfico da variância explicada versus o número de PCs para as amostras de esgoto não tratado e tratado.....	63
Figura 21 – Escores e pesos da PCA das 49 amostras de esgoto não tratado (“E” e cor preta) e 48 amostras de esgoto tratado (“S” e cor azul).....	64
Figura 22 – Gráfico de pesos projetado em linhas e o espectro de RMN de ¹ H para ilustrar suas regiões.....	65
Figura 23 – Esquema reacional de produção de ácido lático a partir da fermentação glicosídica.....	66
Figura 24 – Proposta reacional de formação e degradação da dimetilamina sob condições anaeróbias.....	67
Figura 25 – Gráfico de agrupamentos naturais (HCA) das regiões de hidrogênios aromáticos das amostras de esgoto não tratado (■) e tratado (□).....	69
Figura 26 – Escores e pesos do sistema de coordenadas PC1 e PC2 para as regiões de hidrogênios aromáticos das amostras de esgoto não tratado e tratado.....	70
Figura 27 – Gráfico de pesos projetado em linhas e o espectro de RMN de ¹ H para ilustrar suas regiões.....	71
Figura 28 – Gráfico de agrupamentos naturais (HCA) das amostras de esgoto não tratado coletadas: junho, julho e agosto de 2011 (□); setembro de 2011 a Abril de 2012 (■).....	73
Figura 29 – Escores e pesos do sistema de coordenadas PC1 e PC2 para amostras de esgoto não tratado.....	74

LISTA DE FIGURAS

Figura 30 – Gráfico de pesos projetado em linhas e o espectro de RMN de ^1H para ilustrar suas regiões.....	75
Figura 31 – Escores e pesos do sistema de coordenadas PC3 e PC4 para amostras de esgoto não tratado.....	77
Figure 32 – Gráfico de HCA das regiões aromáticas das amostras de esgoto não tratado coletadas: maio, junho, julho e agosto de 2011 em □; entre setembro de 2011 e abril de 2012 em ■.....	79
Figura 33 – Gráficos de escores e pesos do sistema de coordenadas PC1 e PC2 relativos a região de hidrogênios aromáticos das amostras de esgoto não tratado.....	80
Figura 34 – Gráfico de pesos projetado em linhas e o espectro de RMN de ^1H para ilustrar suas regiões.....	81
Figura 35 – Gráfico de HCA das amostras de esgoto tratado coletadas: maio, junho, julho e agosto de 2011 em □; entre setembro de 2011 e abril de 2012 em ■.....	83
Figura 36 – Escores e pesos do sistema de coordenadas PC1 e PC2 para amostras de esgoto tratado.....	84
Figura 37 – Gráfico de pesos projetado em linhas e o espectro de RMN de ^1H para ilustrar suas regiões.....	85
Figura 38 – Gráfico de HCA das regiões dos hidrogênios aromáticos para amostras de esgoto tratado coletadas em: maio, junho, julho e agosto de 2011 em □; entre setembro de 2011 e abril de 2012 em ■.....	87
Figura 39 – Gráficos de escores e pesos do sistema de coordenadas PC1 e PC2 (a) para as amostras de esgoto tratado e os respectivos gráficos de peso projetados em linhas com espectros de RMN de ^1H..	88

LISTA DE FIGURAS

Figura 40 – Gráficos de escores e pesos do sistema de coordenadas PC5 e PC6 (b) para as amostras de esgoto tratado e os respectivos gráficos de peso projetados em linhas com espectros de RMN de ^1H ..	89
Figura 41 – a) Gráfico de precipitação pluviométrica na cidade de São Carlos-SP* no período da amostragem; b,c,d) Concentrações no esgoto não tratado, em ppm; e,f,g) Concentrações no esgoto tratado, em ppm.....	94
Figura 42 – Diagramas de extremos e quartis das concentrações dos ácidos: acético, propiônico, láctico, fórmico e fenilacético; dimetilamina e surfactantes LAS, nas amostras de esgoto não tratado (E) e tratado (S).....	98
Figura 43 – Comparação entre os métodos de DBO (vermelho) e RMN de ^1H (azul) para estimar o percentual da matéria orgânica total removida no tratamento da ETE.....	101
Figura 44 – Ilustração do método de SPE para <i>clean up</i> das amostras de efluente.....	106
Figura 45 – Sistema hifenado HPLC-(UV/MS)-SPE-ASS-NMR no modo <i>off-line</i>	107
Figura 46 – Espectros de RMN de ^1H das amostras de efluente do Capítulo I (após filtração) e do Capítulo II (após SPE).....	111
Figura 47 – Cromatogramas 1D (a), 2D (b) e espectros de massas no modo negativo de ionização adquirido a partir do extrato do efluente.....	113
Figura 48 – Espectros de massas $[\text{M-H}]^-$ com as respectivas propostas de fragmentação para os surfactantes LAS: a) C_{10} ; b) C_{11} ; c) C_{12} ; d) C_{13}	116

LISTA DE FIGURAS

Figura 49 – Experimentos de RMN heteronucleares bidimensionais para o homólogo C ₁₀ dos surfactantes detectados no efluente: a) HSQC; b) HMBC.....	117
Figura 50 – Comparação entre os espectros de RMN de ¹ H dos surfactantes isolados.....	118
Figura 51 – Experimento de RMN bidimensional de COSY com as correlações para o homólogo C ₁₀ dos surfactantes LAS detectados no efluente.....	120

ANÁLISES DE COMPOSTOS ORGÂNICOS NÃO ESPECÍFICOS NO ESGOTO SANITÁRIO DOMÉSTICO ATRAVÉS DAS TÉCNICAS RMNq E HPLC-(UV/MS)-SPE-ASS-NMR. Atualmente, o crescimento industrial, a urbanização e as atividades rurais, como a agricultura, são um dos responsáveis pela deterioração do meio ambiente, principalmente nos países em desenvolvimento, como o Brasil. Problemas relacionados com a poluição das águas fluviais na América Latina têm sido bem documentados, porém não há evidências de esforços substanciais para alterar essa situação. Existem vários poluentes orgânicos presentes no esgoto tratado pelas Estações de Tratamento de Esgoto (ETEs) que podem causar danos aos ecossistemas e, com isso, ameaçar a saúde humana. As ETEs são responsáveis pela remoção da maioria dos poluentes antropogênicos ou naturais presentes no esgoto sanitário doméstico, e por isso, desempenham um papel fundamental na preservação do meio ambiente e conseqüentemente da saúde pública. Devido às variações das condições operacionais, processos e qualidade dos descartes, o tratamento do esgoto sanitário doméstico precisa ser monitorado continuamente para assegurar eficiência operacional. Para o estudo de contaminações ambientais, a RMN tem-se configurado como uma valiosa ferramenta, uma vez que ela tem contribuído significativamente no estudo de componentes químicos presentes nas águas e no lodo de esgoto; nas análises de interações com as substâncias húmicas e fúlvicas, além de contaminações ambientais por fármacos, pesticidas, surfactantes e seus produtos de degradação, dentre outros. No presente trabalho, foram propostos dois métodos para estudar as águas oriundas do esgoto anterior e posterior ao tratamento ocorrido na ETE do município de São Carlos-SP: análises de compostos orgânicos não específicos por meio da espectroscopia de RMN 1D (^1H e ^{13}C) e 2D (COSY, HSQC e HMBC), com o intuito de caracterizar o maior número de substâncias dissolvidas nas matrizes; análises desenvolvidas através do sistema hifenado HPLC-(UV/MS)-SPE-ASS-NMR, para detectar e elucidar os compostos não específicos recalcitrantes, em baixas concentrações e sem o uso de padrões. Ademais, foram empregadas análises quimiométricas e quantitativas (RMNq) no primeiro método (compostos orgânicos não específicos) para, desta forma, monitorar variações sazonais e identificar descargas anômalas no sistema comum de escoamento do esgoto sanitário doméstico. Portanto, em ambas as matrizes de esgoto (não tratado e tratado pela ETE) foram caracterizados 50 compostos orgânicos, em que as concentrações variaram consideravelmente com o tratamento

RESUMO

da ETE e de acordo com a sazonalidade da coleta. Também foram verificados uma descarga anormal no sistema comum de esgoto e influências das águas fluviais sobre a composição das águas de esgoto, além de serem completamente elucidados compostos homólogos recalcitrantes pertencentes a classe dos surfactantes LAS (alquilbenzeno sulfonados de cadeia linear) no efluente. As variações sazonais e anormalidade na composição química no esgoto indicaram que o procedimento empregado pode ser especialmente útil para identificar fontes poluidoras e acompanhar a eficiência do tratamento das ETEs para que, desta forma, sejam tomadas ações preventivas a fim de proteger todo sistema de tratamento e equipamentos e, com isso, minimizar os danos causados ao meio ambiente.

ABSTRACT

NON-TARGETED ANALYSES OF ORGANIC COMPOUNDS IN DOMESTIC SEWAGE BY qNMR AND HPLC-(UV/MS)-SPE-ASS-NMR. The growth of industrial deployment and urbanization play a major role in the degradation of global environmental and resource depletion mainly in countries in development such as Brazil. The problems regarding water pollution in Latin America have been well-documented, and there is no evidence of substantive effort to change the situation. There are a large number of organic pollutants that leads several damages to the ecosystem, threatening human health and are flushed to wastewater treatment plants (WWTPs). The WWTPs are responsible for the removal of natural and anthropogenic pollutants from the sewage and, for this, play an important role in protection of human health and the environment. Due to the varying operational conditions, process and quality, the wastewater treatments need to be monitored continuously to ensure a reliable and efficient operation. Therefore, the NMR analyses are widely used in the study of different components of wastewater such as complex organic matter (fulvic and humic acids), sludge and organic contaminants. In the present work, we employed two methods to study wastewater samples: non-targeted 1D (^{13}C and ^1H) and 2D NMR spectroscopy analyses to characterize the largest possible number of compounds in urban wastewater; and analysis by HPLC-(UV/MS)-SPE-ASS-NMR to detect and elucidate the non-specific recalcitrant in treated wastewater, sparing the common use of standards. In the non-targeted 1D NMR analysis, we employed also a method to study wastewater samples by chemometric and quantitative analyses to monitor the seasonal variations and identify anomalous discharges in urban wastewater system. The set of data were constituted of several compounds on which the concentration ranges considerably with treatment and seasonality. An anomalous discharge, the influence of storm water on the wastewater composition and recalcitrant compounds (LAS surfactant homologues) in the effluent were further identified. The seasonal variations and abnormality in the composition of organic compounds in sewage indicated that the employed procedure can be useful to identify the pollution source, to follow up the efficiency of WWTPs plants to design preventive actions in order to protect equipment and preserve the environment.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS.....	viii
LISTA DE TABELAS.....	xi
LISTA DE FIGURAS.....	xii
RESUMO.....	xviii
ABSTRACT.....	xx
1 INTRODUÇÃO.....	1
1.1 – O Esgoto Sanitário Doméstico.....	3
1.1.1 – A Estação de Tratamento de Esgoto Sanitário Doméstico (ETE).....	4
1.1.2 – Degradação de matéria orgânica nos digestores anaeróbios.....	5
1.2 – A Ressonância Magnética Nuclear (RMN) e suas aplicações nas análises ambientais.....	10
1.2.1 – Histórico e princípios das técnicas de RMN.....	10
1.2.2 – RMN aplicada às análises ambientais. A coleta, preparo e conservação amostral.....	12
1.2.2.1 – A hifenação.....	15
1.2.2.2 – RMNq.....	18
1.3 – Análises estatísticas multivariadas e suas aplicações nas análises ambientais.....	22
1.3.1 – Histórico e princípios das técnicas quimiométricas..	22
1.3.2 – Análise por Componentes Principais (PCA).....	23
1.3.3 – Análise por Agrupamentos Hierárquicos (HCA).....	24
1.3.4 – Pré-processamentos quimiométricos.....	24

SUMÁRIO

1.3.5 – Quimiometria aplicada às análises ambientais.....	25
2 OBJETIVOS.....	27
CAPÍTULO I – ANÁLISES DOS COMPOSTOS NÃO ESPECÍFICOS	29
3 PARTE EXPERIMENTAL.....	30
3.1 – Origem e preparo das amostras.....	30
3.2 – Espectros de RMN de ¹ H.....	32
3.3 – Análises Quimiométricas.....	34
3.4 – Análises Quantitativas.....	34
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	36
4.1 – Investigação e caracterização de compostos orgânicos não específicos presentes nas amostras de esgoto sanitário doméstico.....	36
4.2 – Análises quimiométricas dos dados de RMN de ¹ H para estudo do esgoto sanitário doméstico.....	57
4.2.1 – Matrizes das amostras de esgoto não tratado e tratado.....	61
4.2.1.1 – Região relativa a compostos aromáticos.....	68
4.2.2 – Matriz das amostras de esgoto não tratado.....	72
4.2.2.1 – Região relativa a compostos aromáticos.....	78
4.2.3 – Matriz das amostras de esgoto tratado.....	82
4.2.3.1 – Região relativa a compostos aromáticos.....	86
4.3 – Estimativa das concentrações dos compostos que se destacaram nas análises do esgoto (RMNq).....	91

SUMÁRIO

4.4 – Análise quantitativa por Diagrama de Extremos e Quartis (box-and-whiskers).....	96
4.5 – Estimativa do total de matéria orgânica removida com o tratamento da ETE.....	100
CAPÍTULO II – ANÁLISES DOS COMPOSTOS RECALCITRANTES	103
5 PARTE EXPERIMENTAL.....	105
5.1 – Origem e preparo das amostras.....	105
5.2 – Medidas via HPLC-(UV/MS)-SPE-ASS-NMR.....	107
5.2.1 – Procedimentos da etapa HPLC-(UV/MS)-SPE-ASS-NMR.....	107
5.2.2 – Procedimentos da etapa HPLC-(UV/MS)-SPE-ASS-NMR.....	108
5.2.3 – Procedimentos da etapa HPLC-(UV/MS)-SPE-ASS-NMR.....	109
5.2.4 – Procedimentos da etapa HPLC-(UV/MS)-SPE-ASS-NMR.....	109
6 RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	111
7 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	122
8 APÊNDICE.....	124
9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	135

1 INTRODUÇÃO

O crescimento populacional combinado com restrições ambientais tem induzido o aumento da demanda por recursos naturais. Com isso, avanços de atividades que permitam o ajuste do desenvolvimento econômico com os princípios da sustentabilidade são essenciais. Assim, os recursos hídricos que são altamente afetados por atividades antropogênicas estão em declínio significativo, exigindo uma rápida recuperação para posterior reutilização.

Os esgotos, doméstico e industrial, devem ser tratados para prevenir doenças, evitar contaminações das águas subterrâneas, manter a vida aquática e conservar os recursos aquáticos para uso futuro.¹ Entre 1930 e 1940, foi descoberta uma civilização no Paquistão, datada de 1500, em que nas casas haviam banheiros ligados a canais que fluíam para o rio Indus, mostrando uma das primeiras redes de esgoto e, possivelmente, de tratamento.² Como apresentado na Figura 1, o ciclo das águas em um sistema urbano é uma complexa cadeia de geração e destinação de esgoto. No entanto, o destino final dos efluentes é um problema em vários países onde a legislação não é respeitada, causando efeitos deletérios para o meio ambiente.

INTRODUÇÃO

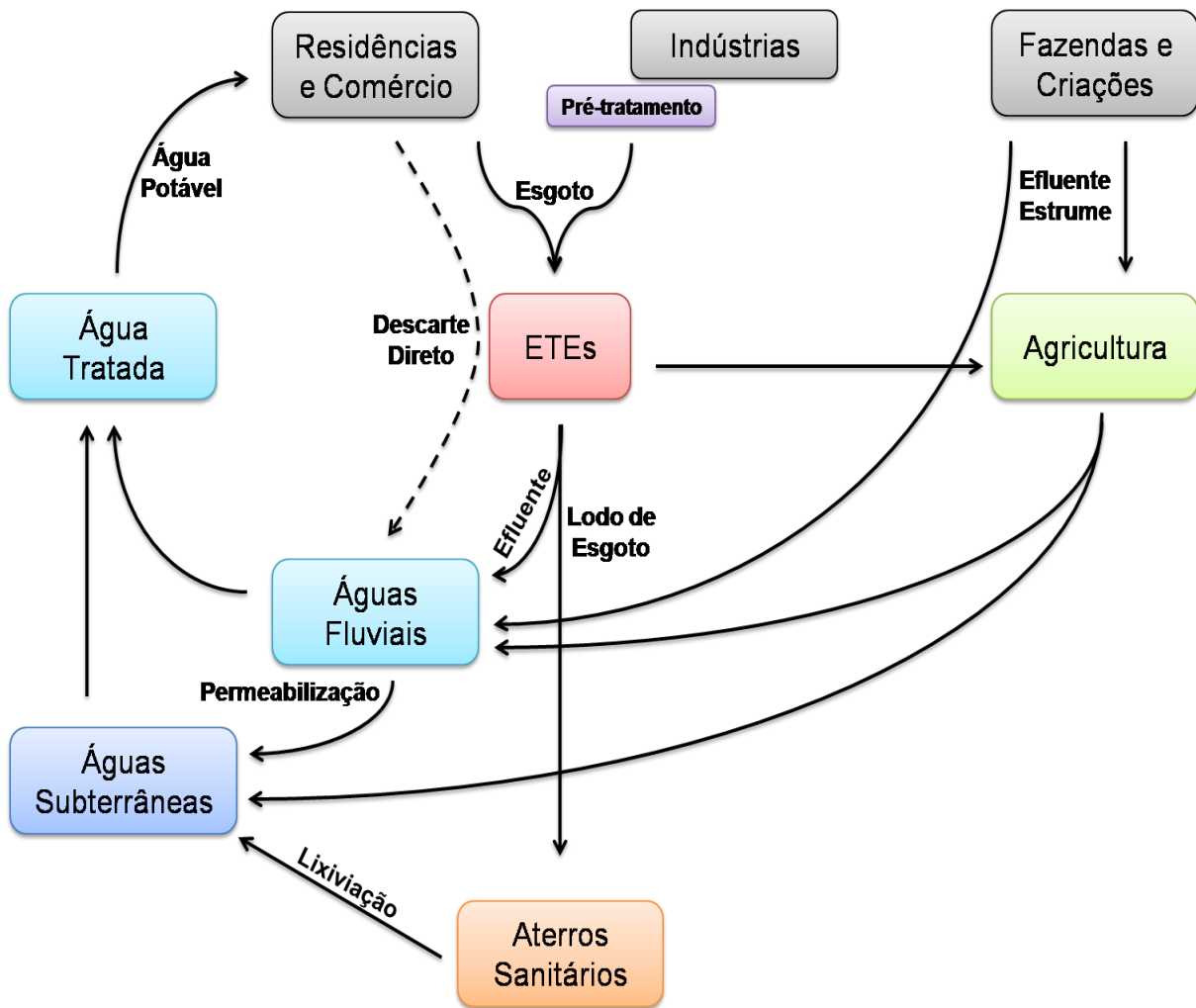


FIGURA 1 – Ciclo do esgoto sanitário doméstico.

Nas cidades, as residências, indústrias e comércios em geral são os maiores poluidores de águas fluviais, já que, além do descarte do efluente tratado nos rios, também pode ser realizado o lançamento de esgoto diretamente (irregulares e ilegais) nos rios, sem o devido tratamento (Fig. 1). Além disto, a maioria das cidades brasileiras não possui sistema para saneamento e tratamento de esgoto e, assim, seus efluentes não tratados são lançados nas águas fluviais que abastecem os centros urbanos.³ Neste sentido, em 2010, o IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística) realizou uma pesquisa mostrando que, no Brasil 82% dos efluentes são descartados nos rios que são utilizados para abastecimento da população.⁴

Deste modo, o solo, as águas superficiais e os mananciais são alvos de contaminações, principalmente, em locais com baixa cobertura de tratamento de

INTRODUÇÃO

esgoto ou locais onde podem ocorrer descartes industriais irregulares. Com a destinação irregular e inadequada dos efluentes e do lodo gerado, os locais atingidos passam a ser perigosos focos de disseminação de doenças. Portanto, o interesse na preservação ambiental vem ganhando forças, pois o meio ambiente já não está atendendo a demanda do sistema econômico, se mostrando incapaz, a cada dia, de processar e absorver contaminantes e resíduos.⁵

1.1 – O Esgoto Sanitário Doméstico

Todos os anos, diversos produtos químicos orgânicos e inorgânicos são utilizados nas indústrias, residências e agricultura. A presença destas substâncias no meio ambiente pode ter um efeito deletério aos ecossistemas, mesmo quando em baixas concentrações. Assim, para entender o impacto destes contaminantes no meio ambiente e na população, é necessário determinar suas concentrações, bem como estabelecer o “tempo de vida médio” de cada um.^{6,1}

Grande parte das águas depois de utilizadas nos processos produtivos e no abastecimento da população, mesmo após a aplicação dos tratamentos convencionais, podem retornar de forma imprópria para os cursos d’água, contendo substâncias nocivas ao meio ambiente e a vida dos seres oriundos daquele meio.⁷ Portanto, dependendo do grau de poluição, as águas residuais podem prejudicar o desenvolvimento do ecossistema de diversas formas, como: liberar compostos voláteis que causam mau cheiro no entorno; prejudicar as operações para uma nova purificação e tratamento dessa água e, até mesmo, causar mudanças no material genético de microrganismos presentes nos cursos d’água, podendo fazer com que estes adquiram resistência a diversos princípios ativos de fármacos que são utilizados pela população em geral.^{8,9}

O esgoto doméstico ou sanitário é originário, predominantemente, das habitações e instalações sanitárias, lavagem de utensílios domésticos, pias, banheiros, lavagem de roupas, dentre outros. Desta forma, o esgoto é uma combinação de várias fontes de dejetos, tais como excrementos humanos e animais (fezes e urina), águas resultantes de lavagem doméstica e/ou industriais e, às vezes, águas pluviais que acabam trazendo toda sorte de contaminantes.^{10,11,12,13} De uma maneira geral, o esgoto coletado nas estações de tratamento é composto por 40-

INTRODUÇÃO

60% de proteínas, 25-50% carboidratos, 10% de óleos e gorduras, além de aminoácidos, peptídeos, ácidos voláteis, ácidos graxos, ésteres, uréia e um grande número de traços de compostos orgânicos, incluindo os pesticidas, surfactantes, compostos fenólicos, dentre outros.^{14,15,16,17,18,19,20,21}

1.1.1 – A Estação de Tratamento do Esgoto Sanitário Doméstico (ETE)

Devido a heterogeneidade e complexidade do esgoto sanitário, diversas etapas são utilizadas para seu tratamento. O processo tradicional para o tratamento de esgoto envolve três etapas consecutivas, que estão divididas em primária, secundária e terciária.²² A organização esquemática de uma ETE depende das fontes poluentes. Na Figura 2 está apresentado um esquema tradicional, utilizado pela maioria das ETEs para o tratamento do esgoto sanitário doméstico.

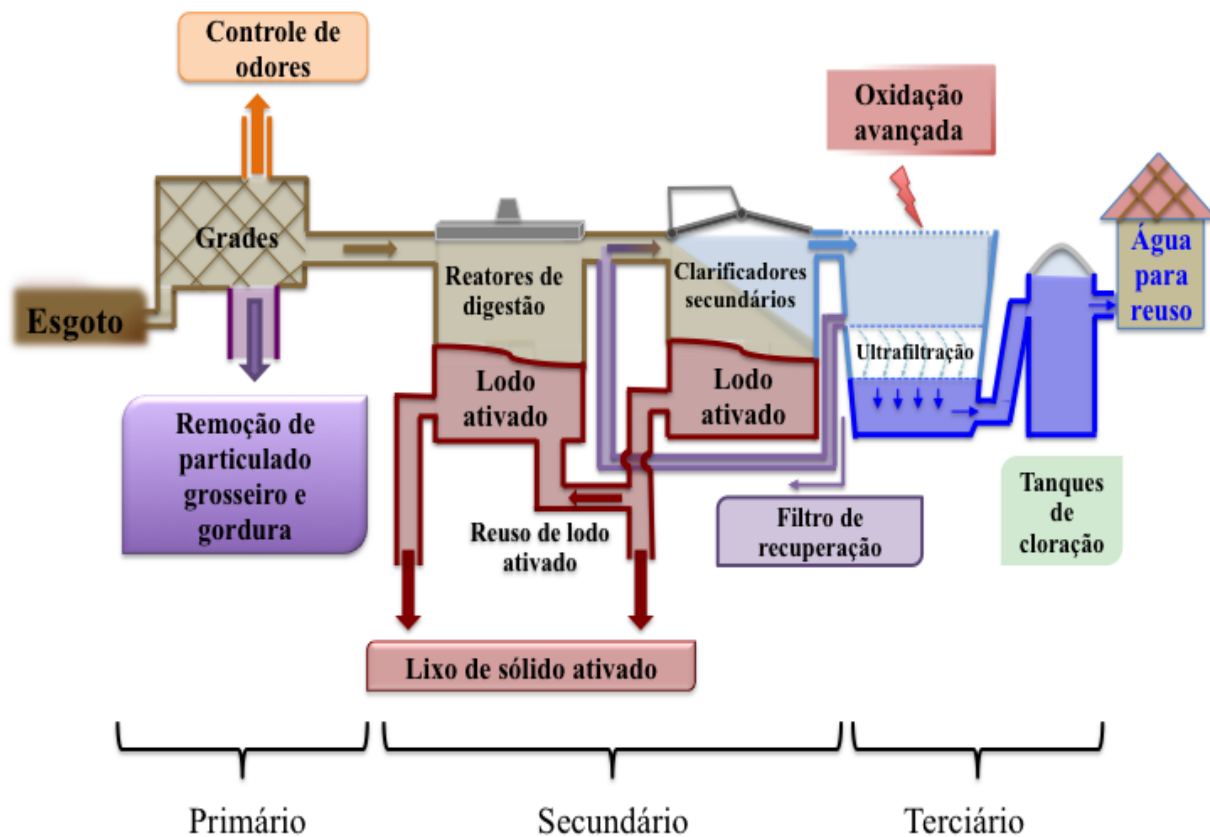


FIGURA 2 – Esquema tradicional de tratamento do esgoto sanitário doméstico.^{23,24}

INTRODUÇÃO

O tratamento primário consiste de uma separação mecânica dos particulados grosseiros como plásticos, areia, galhos, pedras, etc, para prevenir danos às bombas ou entupimento de tubulações. Esta etapa pode remover até 60% de materiais sólidos no esgoto.²⁵ Ademais, nesta etapa é, frequentemente, pulverizada uma solução de água que contém sais de ferro para se realizar o controle de maus odores.

O tratamento secundário envolve a degradação biológica do material orgânico biodegradável. Para tanto, ocorre a mistura da matéria orgânica com uma população controlada de microrganismos (lodo) em tanques ou reatores (um ou mais reatores podem ser utilizados). Nesta etapa pode-se utilizar uma degradação bacteriana aeróbia ou anaeróbia e, até mesmo, a combinação de ambas. Na cidade de São Carlos-SP, por exemplo, é utilizado apenas o tratamento anaeróbico, que ocorre através dos reatores anaeróbios de fluxo ascendente, conhecidos como UASB (*Upflow Anaerobic Sludge Blanket*). Os processos que ocorrem neste reator estão explicitados mais detalhadamente adiante.

Em seguida, para o tratamento terciário, o esgoto é transferido para tanques clarificadores secundários, onde os sólidos biológicos ou lodo são decantados por gravidade. Nesta etapa também são utilizados agentes floculantes que promovem a floculação da matéria orgânica em suspensão, para, posterior, precipitação.²⁶ Portanto, o tratamento terciário inclui o uso de filtração e procedimentos de oxidações avançadas, como a aplicação de luz UV ou ozônio, por exemplo.²⁷ Após estas etapas, a água recuperada pode ser descartada no meio ambiente ou reutilizada.^{28,29}

1.1.2 – Degradação de matéria orgânica nos digestores anaeróbios

A maior parte da matéria orgânica presente nas águas de esgoto é facilmente biodegradável nos reatores anaeróbios. Os mecanismos metabólicos bacterianos e, conseqüentemente, seus produtos formados dependem da atividade dos microrganismos diferenciados. Assim, no lodo podem ser encontradas as bactérias fermentativas ou acidogênicas, sintróficas ou acetogênicas e os microrganismos metanogênicos.^{30,31,32,33} Na Figura 3 está apresentado um esquema de um reator com fluxo ascendente utilizado para a degradação anaeróbia. No UASB, a

INTRODUÇÃO

entrada do esgoto ocorre pela parte inferior e é misturado com o lodo para que ocorra a degradação anaeróbia, o qual origina uma mistura de gases, como metano e dióxido de carbono, e demais produtos da degradação.

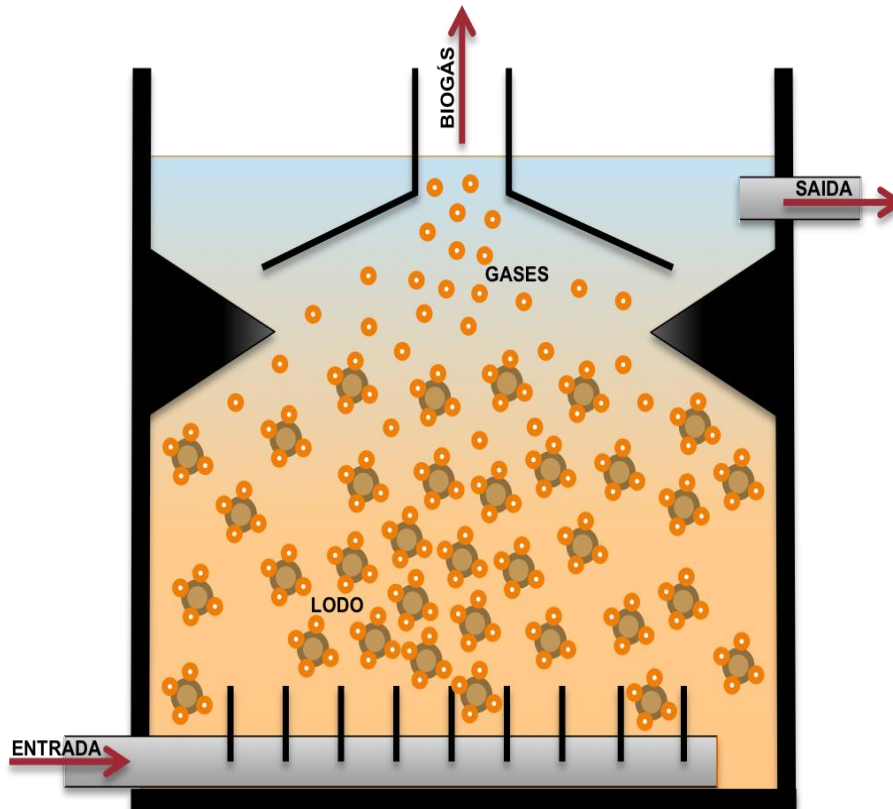


FIGURA 3 – Representação do reator anaeróbio de fluxo ascendente utilizado pela ETE de São Carlos-SP.

A degradação anaeróbia deve ocorrer com a oxidação do material orgânico na ausência de oxigênio.³⁴ Deste modo, as reações ocorrem com a remoção de 65 a 80% da matéria orgânica total, pois os mecanismos citados não acontecem completamente. Na Figura 4, está apresentado um esquema da decomposição anaeróbia, com as bactérias envolvidas e os diversos compostos resultantes. O acúmulo de compostos derivados das reações incompletas nos reatores anaeróbios UASB, como os ácidos fórmico, acético, propiônico e butírico, pode ocorrer pelo resultado da não observância de condições ideais para o desenvolvimento dos microrganismos e/ou por limitações da capacidade e desempenho dos próprios reatores. É importante salientar que a presença destes compostos no efluente reflete instabilidade (que não deve ser oriunda de deficiência

INTRODUÇÃO

tecnológica utilizada), mostrando que uma das etapas do consórcio anaeróbio está sendo prejudicada.³⁵ Assim sendo, esses compostos podem ser utilizados como marcadores para caracterizar a eficiência do processo de tratamento, cujas concentrações podem variar de acordo com a origem, a sazonalidade e descartes indevidos ou anômalos.^{36,37}

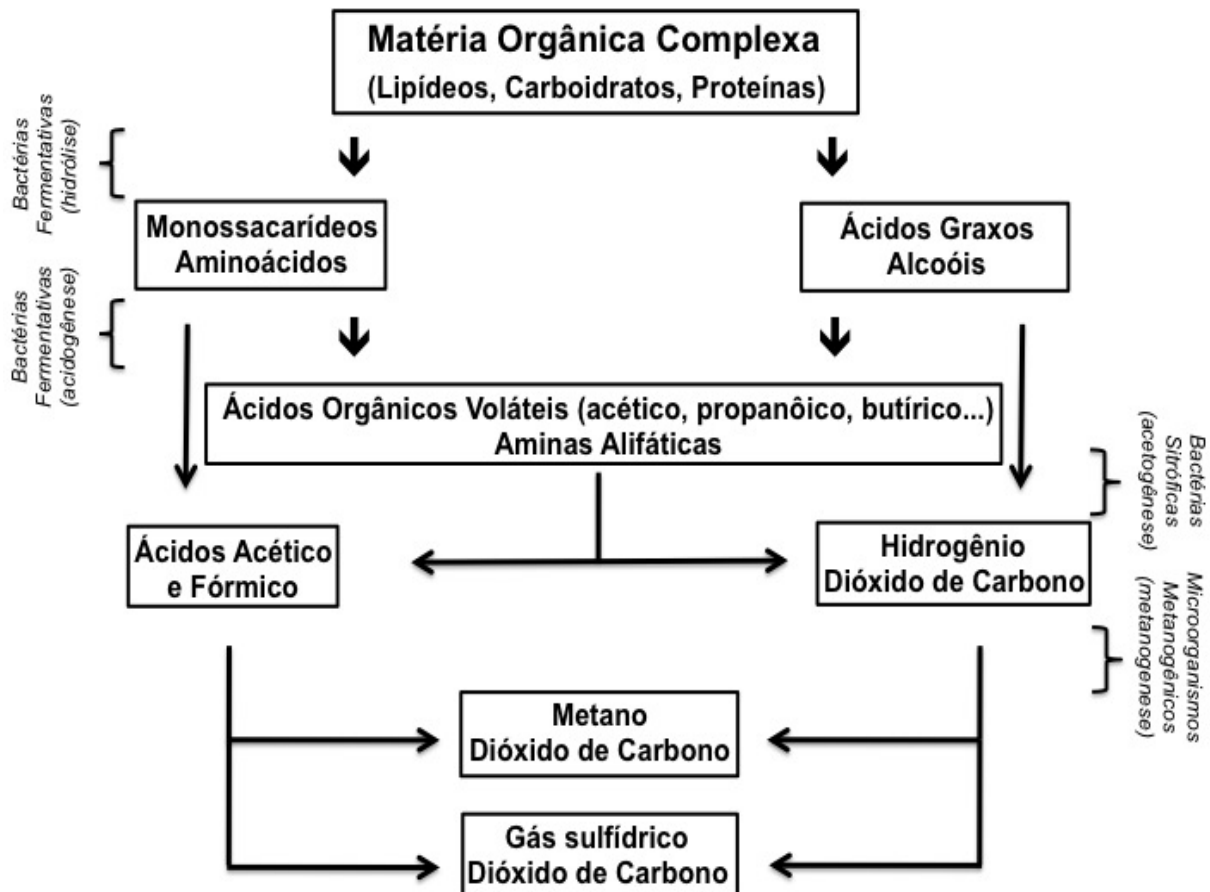


FIGURA 4 – Esquema representativo da digestão anaeróbia decorrente do tratamento biológico do esgoto. (Fonte: Adaptada de Chernicharo, 1997)³⁸

Portanto, é essencial monitorar os níveis de compostos e poluentes orgânicos no meio ambiente, além dos fármacos e seus produtos de degradação.^{39,40} Esse monitoramento vem ganhando grande atenção, já que muitas dessas substâncias são comumente encontradas em efluentes lançados pelas ETEs e nos cursos d'água, em concentrações que variam na faixa de $\mu\text{g.L}^{-1}$ e ng.L^{-1} . Compostos orgânicos que apresentam uma estrutura química relativamente simples (aminoácidos, ácidos de cadeia pequena, dentre outros) são propícios à fácil

INTRODUÇÃO

degradação em um sistema de tratamento biológico. Porém, estruturas mais complexas, como alguns fármacos, surfactantes e compostos estrogênicos, apresentam baixa remoção, pois a presença de anéis aromáticos em suas estruturas os tornam recalcitrantes, principalmente, em tratamentos que empregam apenas o sistema anaeróbio.⁴¹ A presença de fármacos e surfactantes, bem como seus produtos de degradação, em águas superficiais é um indicativo da contaminação por efluentes oriundos das ETEs não tratados e devidamente monitorados.^{42,43} A presença destes compostos no meio ambiente pode significar um grande problema, pois pouco se sabe sobre os possíveis efeitos destes quando entram em contato com organismos aquáticos e/ou terrestres.^{44,45}

Portanto, métodos analíticos que mantêm a integridade amostral são importantes, além de minimizar perturbações que influenciem na composição química. Ainda assim, diversos fatores devem ser levados em consideração, tais como: pré-tratamento para eliminar interferentes; o aumento da concentração dos analitos de interesse; trabalhar com o máximo de segurança, uma vez que o material oriundo do esgoto é patogênico; evitar a degradação ou perda dos constituintes presentes nas matrizes.⁴⁶ Deste modo, métodos que não exigem etapas complexas de pré-tratamentos são os mais indicados⁴⁷ como, por exemplo, a extração dos constituintes químicos da amostra por fluídos supercríticos,^{48,49} a ultra-filtração por membranas especiais,^{50,51} dentre outros.

Em 2010, Leite *et al.* realizaram a caracterização de contaminantes em sistemas de tratamento de esgoto utilizando cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas, mostrando a influência do tratamento anaeróbio na remoção de surfactantes aniônicos lineares (LAS), ácidos graxos e outros contaminantes, como o bisfenol A e o bezafibrato.⁵² Ternes e Hirsch (2000) detectaram poluentes, como os antibióticos, hormônios, anestésicos, antilipêmicos, substâncias utilizadas em contraste de raios-X e anti-inflamatórios utilizando a HPLC-UV. Ademais, esses compostos foram detectados não apenas no esgoto sanitário, mas também em águas superficiais e do subsolo, demonstrando que estes contaminantes podem ser monitorados, uma vez que persistiram no meio ambiente durante um longo período.⁵³ Ternes e Hirsch (1998) fizeram a detecção e a quantificação de 18 antibióticos das classes sulfonamida, penicilina, tetraciclina e

estrogênios. Esses compostos também foram encontrados em efluentes de ETEs e águas superficiais de rios em estudo realizado na Alemanha.⁵⁴

Os compostos da classe dos surfactantes merecem uma atenção especial, já que o seu descarte é elevado e, dentre os efeitos adversos no ambiente, tem-se a redução da concentração de elementos essenciais à vida aquática, como oxigênio dissolvido e da permeação da luz solar, além de contribuir para o aumento da concentração de compostos como PCB's e PAH's pela solubilização micelar, o que acarreta na inibição da sua degradação.^{55,56} Os surfactantes pertencentes a classe dos LAS (alquilbenzeno sulfonados de cadeia linear) podem ser utilizados como tensoativos em produtos comerciais, os quais são constituídos por uma mistura de homólogos e isômeros de posição inerente a cadeia alquílica, podendo variar de C₁₀ a C₁₆. Estudos destes compostos no ambiente têm mostrado que o grau de toxicidade é dependente do tamanho da cadeia alquílica.⁵⁷

1.2 – A Ressonância Magnética Nuclear (RMN) e suas aplicações nas análises ambientais

1.2.1 – Histórico e princípios da RMN

Ressonância Magnética Nuclear (RMN) é uma técnica espectroscópica bem estabelecida para a caracterização de estruturas químicas e no estudo da dinâmica em diversos tipos de sistemas. Além disto, a RMN é amplamente utilizada para medições quantitativas, especialmente em amostras no estado líquido.

A primeira observação da influência do campo magnético em estruturas químicas ocorreu em 1922, quando Gerlach e Stern constataram que um feixe de átomos neutros de prata sofria um desvio se transmitido através de uma região influenciada por um campo magnético não-homogêneo.⁵⁸ Com isso, Pauli sugeriu a existência de núcleos magnéticos, os quais se comportam como ímãs. Já nos anos 30, os aperfeiçoamentos da técnica de Stern e Gerlach permitiu a determinação de momentos magnéticos nucleares. Rabi e colaboradores submeteram um feixe de hidrogênio, primeiro, a um campo magnético não homogêneo e, em seguida, a um homogêneo, concomitante a aplicação de radiação na radiofrequência (ν), observando que, para um determinado valor de frequência, o feixe molecular

INTRODUÇÃO

absorvia energia e sofria um pequeno desvio. Assim, foi constatado que, sob condições apropriadas e em um campo magnético, uma amostra podia absorver radiação eletromagnética em uma frequência regida pelas características estruturais.^{59,60,61}

Assim, o fenômeno da RMN se baseia em medidas de absorção seletiva de *rf* ou ondas de rádio por núcleos amostrais imersos em um campo magnético. Com a regressão do núcleo excitado ao estado inicial, há a emissão de energia no domínio da *rf* que fornece, com a aplicação da Transformada de Fourier, os espectros de RMN.^{62,63} Deste modo, os experimentos de RMN podem ser apresentados em termos de sequências de pulsos, que descrevem as séries de pulsos ou gradientes de pulsos que são utilizados para manipular os *spins* do núcleo atômico. As sequências de pulsos são fundamentais para a obtenção dos espectros de RMN, pois somente com aplicação de sequências adequadas é que pode ser possível a obtenção das informações desejadas.⁶⁴

Os núcleos amostrais, quando submetidos a um campo magnético externo (B_0), para núcleos com *spin* $1/2$, apresentam um momento de *spin* e se orientam contra ou a favor das linhas do campo de B_0 . O torque exercido por um campo magnético B_1 , quando da aplicação de um pulso de radiofrequência, resulta em um movimento precessional desses núcleos em torno de um eixo. A velocidade da precessão é proporcional ao B_0 , de acordo com a Equação 1:⁶⁵

$$\nu_0 = (\gamma \cdot B_0) / (2 \cdot \pi) \quad \text{Equação 1}$$

onde ν_0 : velocidade de precessão (também conhecida como frequência de Larmor), em hertz; γ : constante magnetogírica; B_0 : campo magnético externo.

A diferença de energia entre os dois estados de energia de um *spin* ($-1/2$ e $+1/2$) é dada pela Equação 2:

$$\Delta E = h \cdot \nu_0 \quad \text{Equação 2}$$

A partir das Equações 1 e 2, resulta a Equação 3, logo abaixo:

INTRODUÇÃO

$$\Delta E = (h \cdot \gamma \cdot B_0) / 2\pi$$

Equação 3

onde h : constante de Plank.

Na Figura 5 estão representados os dois estados de energia assumidos pelos *spins* nucleares, bem como a diferença de energia entre eles.⁶⁶

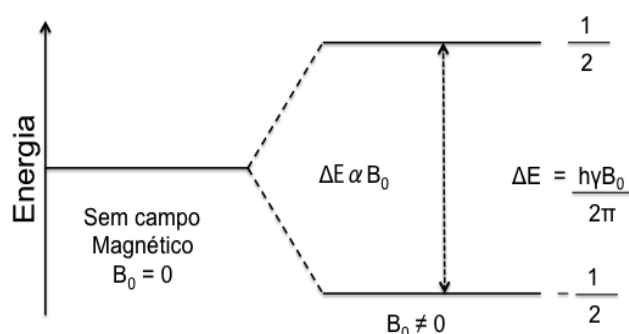


FIGURA 5 – Representação da distribuição energética do fenômeno de RMN.

Deste modo, um sinal de RMN depende da constante magnetogírica e do campo magnético externo. Os núcleos de hidrogênio (^1H) têm alta sensibilidade, já que tem uma grande constante magnetogírica (42.58 MHz/T) e abundância natural de, no máximo, 99.99%. No caso dos núcleos de carbono 13 (^{13}C), esta alta sensibilidade não é verificada. Contudo, a RMN conta com avanços tecnológicos que possibilitam o uso de fluídos criogênicos para resfriar circuitos eletrônicos de uma sonda, possibilitando a redução de ruído eletrônico, aumentando o ganho da razão sinal/ruído no sinal recebido.⁶⁷

Atualmente, a RMN é aplicada em diversas áreas tais como: estudo de dinâmica molecular (mobilidade e flexibilidade de moléculas);⁶⁸ cinética de reações químicas;⁶⁹ caracterização de superfície de sólidos, especialmente catalisadores;⁷⁰ determinação da composição e distribuição isotópica de núcleos em relação à origem; adulteração de amostras de origem alimentar; identificação de compostos orgânicos e organometálicos, entre outras.⁷¹

1.2.2 – RMN aplicada às análises ambientais. A coleta, preparo e preservação amostral

INTRODUÇÃO

Em vários aspectos, as águas e lodos de esgoto podem afetar o corpo receptor após o descarte e, para isso, informações mais detalhadas em relação à composição química são extremamente importantes para avaliar os impactos e, até mesmo, ações para proteção ambiental. Portanto, no progresso das pesquisas de contaminações ambientais, a RMN tem-se apresentado como uma valiosa ferramenta analítica, uma vez que tem um histórico de contribuições significativas nas análises de misturas complexas, podendo ser aplicada a várias matrizes, tais como alimentos,⁷² produtos industriais, biocombustíveis^{73,74} e contaminantes orgânicos, além de ser utilizada para a determinação de propriedades estruturais, quantificação e caracterizações.⁷⁵ Embora existam outras técnicas mais sensíveis, como ultravioleta (UV), infravermelho (IV) e espectrometria de massas (EM), a amplitude de informações estruturais que podem ser obtidas por RMN torna-a uma técnica cada vez mais importante e utilizada no estudo de contaminantes ambientais e seus produtos de degradação.^{76,77,78,79,80,81,82} Além disso, a capacidade da RMN em fornecer informações moleculares sobre as amostras em fases distintas (sólida, líquida e gel ou semi-sólidos), o fato de ser uma técnica não-destrutiva, assim como a necessidade de pouco ou nenhum pré-tratamento prévio da amostra, ao contrário das outras técnicas analíticas, a faz bastante apropriada para a análise ambiental.

Estabelecer protocolos de amostragem, preservação e preparação da amostra são passos de extrema importância para um estudo adequado de qualquer matriz, seja ela sólida ou líquida. Essas etapas demandam tempo e requerem conhecimentos específicos e um cuidadoso planejamento anterior às análises, uma vez que qualquer problema nos estágios mencionados pode inviabilizar o uso dos dados coletados e fornecer informações não confiáveis.

Na etapa de amostragem, é importante levar em consideração as variações na área de coleta amostral, como em bacias hidrográficas, canais, rios, lagos, reservatórios, estações de tratamento e distribuição de sistemas, para que a amostragem seja representativa do meio. Em geral, não é aconselhável retirar amostras perto das margens, canais e em pontos próximos do lançamento de despejos, exceto quando estas regiões são de interesse específico.^{83,84}

Como a RMN apresenta baixa sensibilidade, a intensidade do campo e o uso de sondas específicas devem ser tomados em consideração para uma

INTRODUÇÃO

preparação amostral apropriada quanto a sua concentração. Assim, um fator de sensibilidade (M_s) do equipamento pode ser obtido pela medida da relação sinal-ruído de uma solução de 0,1% de etilbenzeno em clorofórmio dividido pelo número de moles do material, como mostrado na Equação 4:⁸⁵

$$M_s = (\text{Sinal} / \text{Ruído}) / \text{Mols de material} \quad \text{Equação 4}$$

O fator M_s dá uma idéia geral sobre o desempenho de uma sonda qualquer. Por exemplo, uma sonda de 5 mm que possui um fator de 1, para obtenção de um espectro de RMN de ^1H satisfatório em um equipamento de 500 MHz (para a frequência do ^1H), é necessário uma concentração amostral de pelo menos $0,15 \text{ mg.mL}^{-1}$, enquanto que para uma sonda de detecção direta para o ^{13}C , a exigência é de $3,85 \text{ mg.mL}^{-1}$.⁸⁶

A detecção de substâncias em amostras de grande complexidade, como de esgoto sanitário, exige etapas preliminares de limpeza (*cleanup*) e armazenamento do material pós-análise.⁸⁷ Além disso, devido às limitações associadas à sensibilidade de detecção da RMN e a baixa concentração de poluentes orgânicos presentes nas amostras ambientais, há uma série de desafios analíticos para o estudo destes contaminantes e seus subprodutos encontrados no esgoto. Portanto, a utilização de campos magnéticos maiores, bem como o emprego de sondas criogênicas e o uso de etapas de concentração e separação podem ser necessárias para se conseguir quantidade suficiente de material para a sua caracterização.^{88,89,90} Entretanto, Simpson e seus colaboradores, em 2011, estudaram matrizes orgânicas naturais oriundas do gelo glacial coletado na *Victoria Upper Glacier, McMurdo Dry Valleys*, Antártica ($77^\circ 16'S$, $161^\circ 29'E$), onde foram caracterizados e quantificados alguns constituintes químicos sem etapas de separação ou pré-concentração (média de 8 mg.L^{-1}), ou seja, em suas abundâncias naturais.⁹¹ Este trabalho exemplificou com sucesso a potencialidade da RMN e sua diversidade de aplicação.

Altas concentrações do analito na solução culminam em curto tempo para aquisição dos espectros de RMN. No entanto, concentrações elevadas podem resultar em soluções com alta viscosidade, o que induz perda na resolução dos sinais nos espectros de RMN de ^1H .⁹² Portanto, a procura de uma concentração

ótima é de primordial importância para as análises, bem como o uso de sondas apropriadas para detecção. Sondas criogênicas reduzem o ruído eletrônico pelo resfriamento das bobinas e do pré-amplificador, proporcionando ganhos de sensibilidade de pelo menos 4 vezes.⁸⁵ Ademais, as amostras devem ser suficientemente solúveis no solvente deuterado e livres de partículas, uma vez que a presença de sólidos pode deformar a homogeneidade do campo magnético local e provocar o alargamento dos sinais. Assim, as amostras devem ser filtradas cuidadosamente para remover quaisquer partículas sólidas para que melhores resultados experimentais sejam alcançadas.

Como foi mencionado anteriormente, matrizes ambientais, como as águas residuais, representam uma complexa mistura de compostos. Deste modo, a identificação e quantificação dos componentes orgânicos podem requerer métodos analíticos que combinem a facilidade e rapidez no preparo amostral, com a separação de seus constituintes e a possibilidade de interpretação das diversas informações inerentes a cada composto. Uma opção que reúne todos esses requisitos é a utilização de técnicas acopladas (do inglês *hyphenation*), como a HPLC-NMR, que vem sendo cada vez mais utilizada.^{93,94} Recentemente, foi demonstrado que esse tipo de acoplamento pode ser suficientemente sensível e capaz de analisar diversas amostras ambientais, fornecendo informações detalhadas dos constituintes presentes na matriz.^{95,96,97,98} Existem vários estudos do uso da HPLC-UV-NMR na detecção de compostos de baixas concentrações em amostras com alto nível de complexidade e, na seção seguinte, esse acoplamento será mais detalhado.

1.2.2.1 – A hifenação

O acoplamento da cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) com a RMN não é recente, sendo o início da sua aplicação no final da década de 1970.^{99,100} Em 1997 ocorreu a primeira aplicação da técnica hifenada HPLC-NMR no estudo de amostras ambientais, com as detecções do composto nitrobenzeno e seus produtos de transformação em depósitos de munições após a II Guerra Mundial.^{101,102} Hoje em dia, o acoplamento HPLC-NMR já é bem conhecido e muito empregado em estudos ambientais.¹⁰³

INTRODUÇÃO

Com o avanço tecnológico, diversas adequações e melhorias foram desenvolvidas para aprimorar a obtenção dos dados, como o acoplamento de uma unidade com cartuchos de extração em fase sólida (SPE) ao equipamento de HPLC, com o intuito de concentrar os analitos após a separação cromatográfica,¹⁰⁴ além de melhorias nas sequências de pulsos para suprimir os sinais dos solventes e o uso de sondas criogênicas, aumentando o limite de detecção dos equipamentos.¹⁰⁵ Além disto, a utilização de extensas bases de dados aliadas a programas computacionais que sugerem estruturas químicas permitem a caracterização rápida e inequívoca de muitos analitos. Em 2004, Simpson e colaboradores demonstraram a utilização do HPLC-NMR e HPLC-SPE-NMR aliados a interface BPSU (amostrador automático) no estudo da composição de matéria orgânica natural isolada de águas naturais e solo.¹⁰⁶ Mais recentemente, Reineke *et al.* investigaram os produtos de transformação da metilquinolina em águas subterrâneas utilizando a técnica de HPLC-NMR, possibilitando a identificação e distinção de isômeros sem o uso de compostos de referência (padrões).¹⁰³

Com o intuito de se obter uma correlação exata entre os compostos inerentes a fração obtida por HPLC e o espectro de RMN correspondente, especialmente para compostos em baixíssimas concentrações, um acoplamento direto com um espectrômetro de massa (MS) é indicado, uma vez que a RMN tem menor sensibilidade. A Figura 6 ilustra as diversas possibilidades de hifenação em um sistema completo HPLC-(UV/MS)-SPE-ASS-NMR operando em modo desacoplado (do inglês *off-line*), onde a unidade ASS é um amostrador automático (*Automatic Sampling Storage*), além do uso de uma sonda criogênica.¹⁰⁷

INTRODUÇÃO

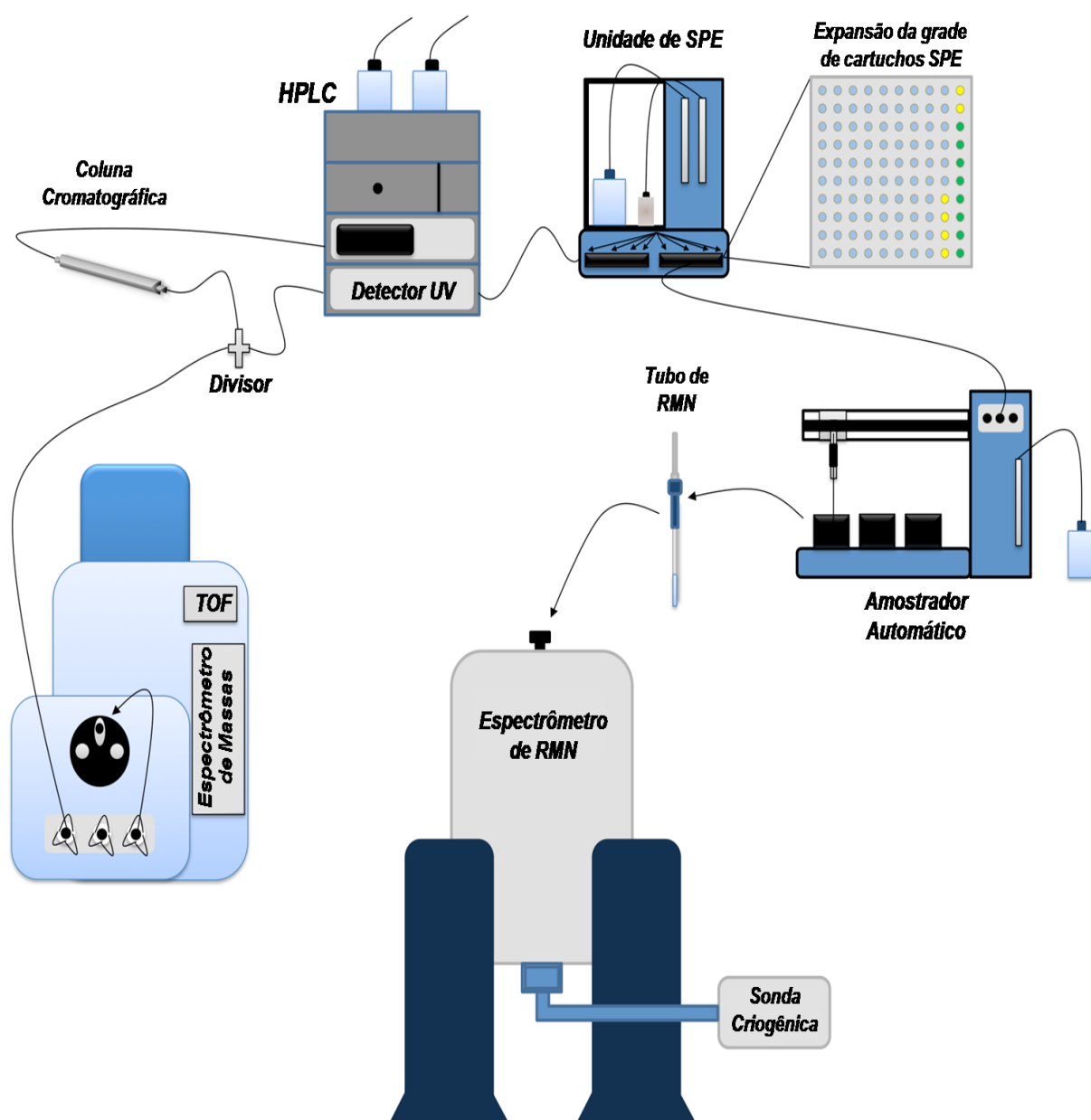


FIGURA 6 – Um sistema hifenado completo de HPLC-(UV/MS)-SPE-ASS-NMR, no modo off-line.

Nesse sistema, a amostra é submetida a uma separação cromatográfica no equipamento de HPLC, que é seguido de uma válvula de divisão, onde alíquotas da amostra injetada são enviadas, concomitantemente, para o detector de UV e MS. Desse modo, os picos de interesse são selecionados e enviados aos cartuchos de SPE quantas vezes forem necessárias, a fim de aumentar a concentração para a realização dos experimentos de RMN uni e bidimensionais. Assim, os picos são automaticamente eluídos dos cartuchos com

INTRODUÇÃO

solvente deuterado e enviados ao amostrador automático, onde são armazenados até se iniciarem as análises por RMN.

Recentemente, Godejohann e colaboradores publicaram um estudo em que extratos de dois efluentes de diferentes ETEs, situadas na Suíça, foram analisados durante o período de aplicação de pesticidas.⁹⁵ Para isso, foi utilizado o sistema HPLC-SPE-NMR/MS, aliado ao “*time slice*”, método baseado na seleção por espaços de tempo no cromatograma que, automaticamente, são enviadas para retenção nos cartuchos de SPE. Com isso, foram identificados os pesticidas linurão, metazacloro, etofumesato, isoproturão, metamitrão, propazina, cloridazão e metamitron-desamino, um produto de transformação do metamitron. Ademais, foram identificados mono e di-ésteres de ácidos graxos, glicerol, ácido 3-carboximefenâmico (metabólitos de drogas), ensulizole (agente utilizado em protetores solares), benzotriazol e N-benzil-indol (produtos químicos industriais).

Schmidt *et al.* em 2010 investigaram os surfactantes LAS por HPLC-SPE-NMR/MS.¹⁰⁸ Esses compostos são vastamente utilizados como tensoativos aniônicos e as ETEs, em condições anaeróbicas, não os degradam.¹⁰⁹ Desse modo, pela primeira vez, experimentos de RMN 1D (¹H) e 2D (COSY) foram obtidos de 14 LAS isolados e outros 6 foram obtidos de amostras por meio da técnica hifenada supramencionada. Em 2011, Scheurer e colaboradores relataram a presença de seis compostos (acessulfame, sucralose, carbamazepina, ácido diatrizóico, ¹H-benzotriazol e seu análogo 4-metil) em águas residuais, águas superficiais e em lençóis freáticos, avaliando o poder de predição como marcadores de poluição em águas residuais.¹¹⁰

Assim, a possibilidade de hifenação de técnicas já consolidadas representa um grande avanço para estudos de matrizes complexas, pois permite a detecção e elucidação de compostos não-específicos em misturas, sem a utilização de padrões e em baixas concentrações. Essa característica é extremamente importante, já que os produtos de degradação em águas residuais não são sempre conhecidos e, ocasionalmente, é difícil de encontrar padrões de referência certificados.

1.2.2.2 – RMNq

INTRODUÇÃO

Existem diversas vantagens da RMN para as análises ambientais, pois a técnica requer um tempo relativamente curto de aquisição de resultados; possibilita a validação de metodologias; não se faz necessário a separação ou particionamento (pré-tratamento amostral complexo) das amostras, além de dispensar o uso de padrões de referência. Assim, a RMN possibilita a obtenção de uma visão global de todos os tipos de compostos orgânicos passíveis de serem detectados pela técnica e presentes nas amostras.¹¹¹

Uma das características importantes da RMN é que a integração sobre a frequência dos núcleos, especialmente o de hidrogênio, é proporcional ao número de núcleos que deram origem ao sinal e, esse fato possibilitou o desenvolvimento da RMN quantitativa ou também conhecida como RMNq.¹¹² Desse modo, após a relaxação dos núcleos previamente excitados por um ou mais pulsos de *rf*, a área integrada (*I_x*) do sinal resultante do sistema de *spins* é diretamente proporcional ao número de *spins* inerentes ao sinal em questão (*N_x*), e pode ser expresso como se segue:^{113,114,115}

$$I_x = K_s \cdot N_x \quad \text{Equação 5}$$

onde: *K_s* é uma constante do espectrômetro que considera a constante magnetogírica, o tempo de relaxação transversal, temperatura, relação da indutância total e fator de qualidade da sonda, entre outros.

Em um experimento de RMN, todos os núcleos que estão na faixa de observação da sonda, estão sujeitos as mesmas condições experimentais.¹¹⁶ Assim, se for realizada a integração de sinais com diferentes deslocamentos químicos, por exemplo *I_x* e *I_y*, e for considerado a proporção de ambos, a constante *K_s* será cancelada:

$$(I_x / I_y) = (N_1 / N_2) \quad \text{Equação 6}$$

Essa simples equação dá origem a Equação 7 que pode ser utilizada para normalização dos dados:

INTRODUÇÃO

$$P_x = (I_x / I_{std}) \cdot (N_{std} / N_x) \cdot (M_x / M_{std}) \cdot (M_{std} / m) \cdot P_{std} \quad \text{Equação 7}$$

onde: a pureza do analito (P_x) pode ser calculada usando um padrão – não necessitando ser a mesma molécula que está sendo quantificada, mas deve ser um padrão primário; M_x e M_{std} são a massa molar do analito e do padrão, respectivamente; m é a massa da amostra estudada; M_{std} correspondem a massa pesada do padrão; P_{std} é a pureza do padrão; N_{std} corresponde ao número de spins presentes no padrão; I_{std} é a área do sinal integrado do padrão.¹¹⁷

Além disso, vários parâmetros de aquisição na obtenção dos espectros de RMNq devem ser otimizados para, desta forma, alcançar a condição de quantificação. Inicialmente, o pulso de excitação deve ser calibrado para 90° para garantir uma perturbação homogênea e completa dos núcleos.¹¹⁸ Depois disto, o tempo de relaxação deve ser estimado, de modo que ele seja de 5 a 7 vezes o valor do tempo de relaxação longitudinal, T_1 (distribuído entre o tempo de aquisição (AQ) e o tempo de espera entre cada aquisição (d_1)) para garantir a relaxação de 99% dos núcleos ativos da amostra antes da aplicação do pulso subsequente.¹¹⁹ Além disso, a sonda de RMN tem de ser precisamente sintonizada na frequência do núcleo a ser quantificado, além da temperatura ser controlada.¹¹⁸ Seguindo as orientações descritas acima, pode-se alcançar uma acurácia superior a 98% na quantificação por RMN.¹¹⁴

A quantificação em águas residuais é utilizada, principalmente, para estimar a degradação da matéria orgânica.^{120,121,122,123,124} Para isso, Lewis e colaboradores (2011) investigaram a degradação de matéria orgânica do lodo de uma fábrica que utilizava celulose e papel através de cromatografia de exclusão por tamanho e RMN de ^{13}C .¹²⁵ Foram demonstradas a remoção de grupos aromáticos e alquílicos durante o processo de coagulação e a remoção adicional de carbonos aromáticos durante o tratamento por tanques de estabilização aeradas.

Em 2008, Jouraiphy *et al.* estudaram a fração fúlvica extraída de lodo ativado através da intensidade dos sinais nas diferentes regiões do espectro de RMN de ^{13}C .¹²⁶ Assim, foi observada a diminuição do conteúdo de polissacarídeos e a produção de estruturas com mais resíduos aromáticos, poliésteres alifáticos e éteres durante o processo de humificação. Em 2008, Bartoszek e colaboradores estudaram os ácidos húmicos em várias etapas do tratamento do esgoto em uma

INTRODUÇÃO

ETE e a Figura 7 resume a intensidade relativa das diferentes regiões dos espectros de ressonância, para os núcleos de ^1H e ^{13}C , nos diferentes pontos de amostragem durante o tratamento do esgoto.¹²⁷

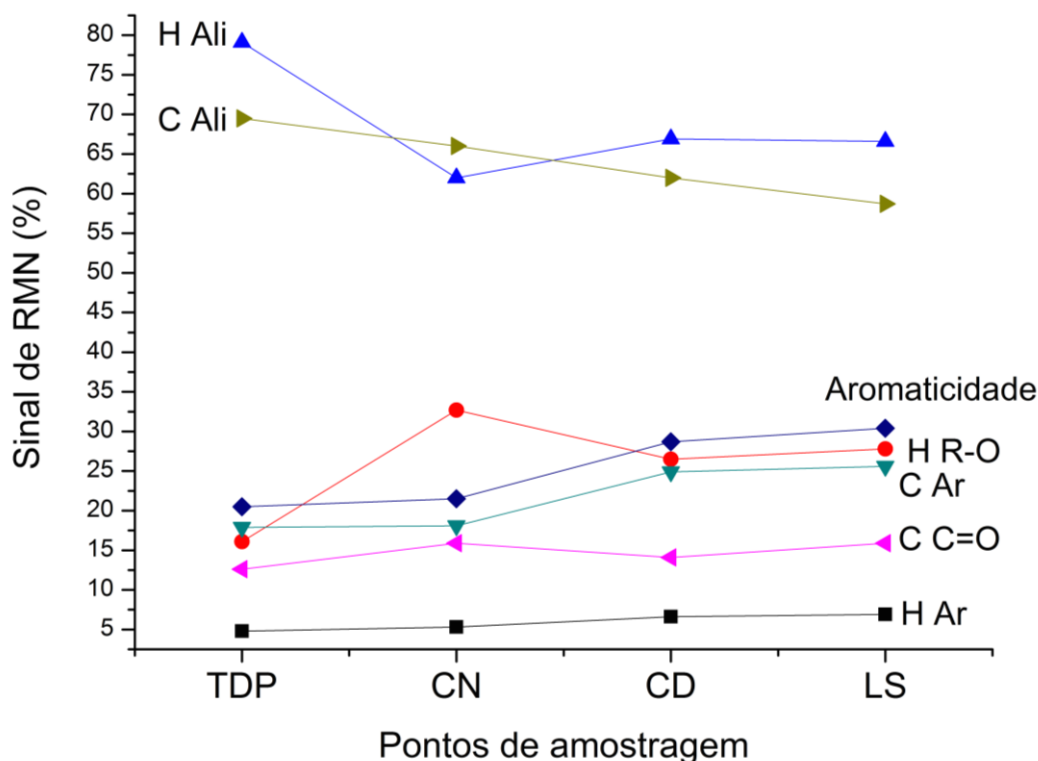


FIGURA 7 – Proporção dos hidrogênios aromáticos (H Ar), alifático (H Ali) e do grupo funcional (H R-O); carbonos aromático (C Ar), alifático (C Ali) e carboxílico (C C = O); aromaticidade dos ácidos húmicos extraídos do lodo de esgoto; TDP: tanque de decantação primária; CN: câmara de nitrificação; CD: câmara de digestão; LS: leitos de secagem.

Deste modo, verificou-se que a quantidade de grupos funcionais oxigenados e anéis aromáticos de ácidos húmicos aumentaram, e os sinais ligados a grupos alifáticos diminuíram no decurso do tratamento, demonstrando que o processo de humificação está em curso. Ainda pode ser notado que o grau de ^1H aromáticos foi menor do que o grau de ^{13}C aromáticos, indicando a formação de anéis aromáticos condensados. O aumento da aromaticidade também representou o processo de humificação. Assim, a maioria dos trabalhos estuda e quantifica grupos funcionais em lodos de esgoto, havendo, portanto, uma deficiência de trabalhos que

usam a RMN para análises de amostras ambientais no estado líquido, com um estudo mais detalhado e da quantificação de compostos em águas residuárias.

1.3 – Análises estatísticas multivariadas e suas aplicações nas análises ambientais

1.3.1 – Histórico e princípios das técnicas quimiométricas

A quimiometria utiliza ferramentas estatísticas e matemáticas para extração de informações químicas relevantes de um conjunto de dados multivariados. Aliadas a RMN, estas análises são utilizadas como uma ferramenta adicional para exploração dos dados, o que permite a verificação das informações originais com o reconhecimento de amostras que não seguem certos padrões, agrupamento de amostras com características semelhantes, além de buscar as variáveis que definem os agrupamentos.¹²⁸ Os primeiros espectros de RMN foram avaliados em conjunto com a quimiometria em 1983, por Johnels e, no início dos anos noventa, Gartland *et al.* introduziram a análise por componentes principais para classificação de urina via RMN.

A análise multivariada é, a rigor, qualquer abordagem analítica que considere o comportamento de duas ou mais variáveis, concomitantemente, independente da área de interesse, envolvendo uma ampla variedade de conceitos estatísticos e matemáticos.¹²⁹ Nas análises exploratórias, conjuntos complexos de dados são reduzidos, por algoritmos matemáticos, a conjuntos mais simples. Com isso, as correlações existentes entre as amostras são fornecidas e, geralmente, baseadas em poucas variáveis derivadas dos conjuntos originais de dados.

Deste modo, os dados experimentais gerados são organizados em matrizes, com os valores inerentes às amostras dispostos em linhas e as variáveis dispostas em colunas. No caso de um conjunto de dados de RMN, as amostras são os espectros e as variáveis são os pontos em que o conjunto espectral foi processado (SI). A Figura 8 ilustra a aplicação dos métodos quimiométricos aos dados de RMN.^{130,131}

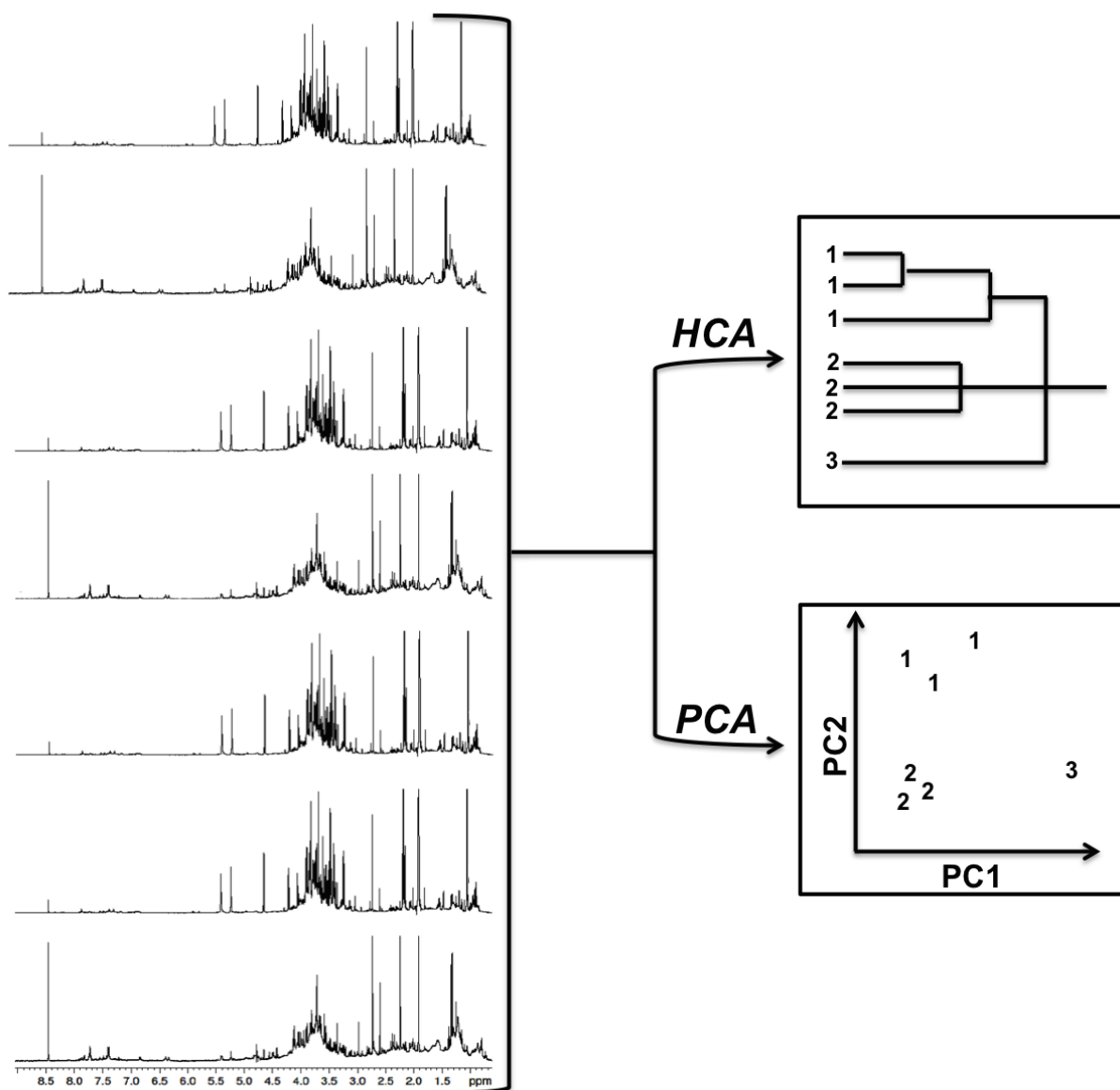


FIGURA 8 – Esquema ilustrativo de métodos quimiométricos aplicados aos dados de RMN.

1.3.2 Análise por Componentes Principais (PCA)

A análise quimiométrica por PCA permite inferir sobre as propriedades da população a partir de variáveis medidas nas amostras estudadas, além de auxiliar na identificação de amostras que fogem do padrão de distribuição normal dos dados (*outliers*). Para a formação das componentes principais (PC), uma decomposição da matriz original é realizada em que três matrizes menores são

obtidas: escores; pesos (*loadings*); erros. Sendo assim, cada vetor é expresso em função de combinações lineares das variáveis originais de tal modo que a mesma variabilidade total existente é obtida e com o mesmo número de eixos originais. A matriz de escores representa a disposição das amostras no novo espaço vetorial, revelando correlações entre as variáveis e a informação do quanto determinada variável contribui para os novos eixos, bem como as relações entre as variáveis originais na matriz de pesos.^{132,133}

1.3.3 Análise por Agrupamentos Hierárquicos (HCA)

As análises por HCA, também conhecidas como análises de conglomerados, classificação ou de Cluster, consistem em agrupar dados em conjuntos que têm atributos similares, apresentando-os de uma maneira que os agrupamentos naturais são enfatizados. Para efetuar estes agrupamentos, é necessário definir matematicamente o conceito de similaridade, ou seja, a distância entre dois objetos (amostras). Entre as medidas mais usuais para estabelecer o conceito de distância, destacam-se o coeficiente de correlação de Pearson, a distância Euclidiana e a distância de Manhattan.

A apresentação dos resultados dessa classificação hierárquica se dá na forma de um gráfico denominado dendrograma, o qual possibilita o reconhecimento visual das categorias formadas. Assim, as distâncias entre as amostras são calculadas, comparadas e, desta forma, as amostras serão similares quando essas distâncias forem pequenas.¹³⁴

1.3.4 Pré-processamentos quimiométricos

Além da transformação dos dados espectrais em matrizes, faz-se necessário a aplicação de certas manipulações matemáticas denominadas de pré-processamentos, que têm como objetivo, a redução ou até mesmo a remoção de informações irrelevantes (randômicas ou sistemáticas) do conjunto de dados. Existem diversas maneiras de pré-processar os dados antes de realizar a PCA e, dentre elas, as mais utilizadas são a centralização dos dados em torno da média e o escalonamento (Fig. 9). A centralização dos dados consiste em subtrair cada

variável pelo vetor média, resultando na soma de seus valores igual a zero. Assim, a centróide do grupo se encontrará na origem do sistema. Este tratamento diminui a influência de ruídos espectrais nas análises quimiométricas e evita a influência de variáveis de baixas concentrações. Por outro lado, o escalonamento ajusta o conjunto de dados de modo a igualar a variância de cada variável, ou seja, igualar a influência de cada variável sobre o conjunto de dados pela divisão de cada elemento da coluna (vetor variável) pelo desvio padrão da mesma.^{135,136,137} Dentre as manipulações descritas, a centralização dos dados em torno da média é a mais apropriada para a RMN.¹³⁸

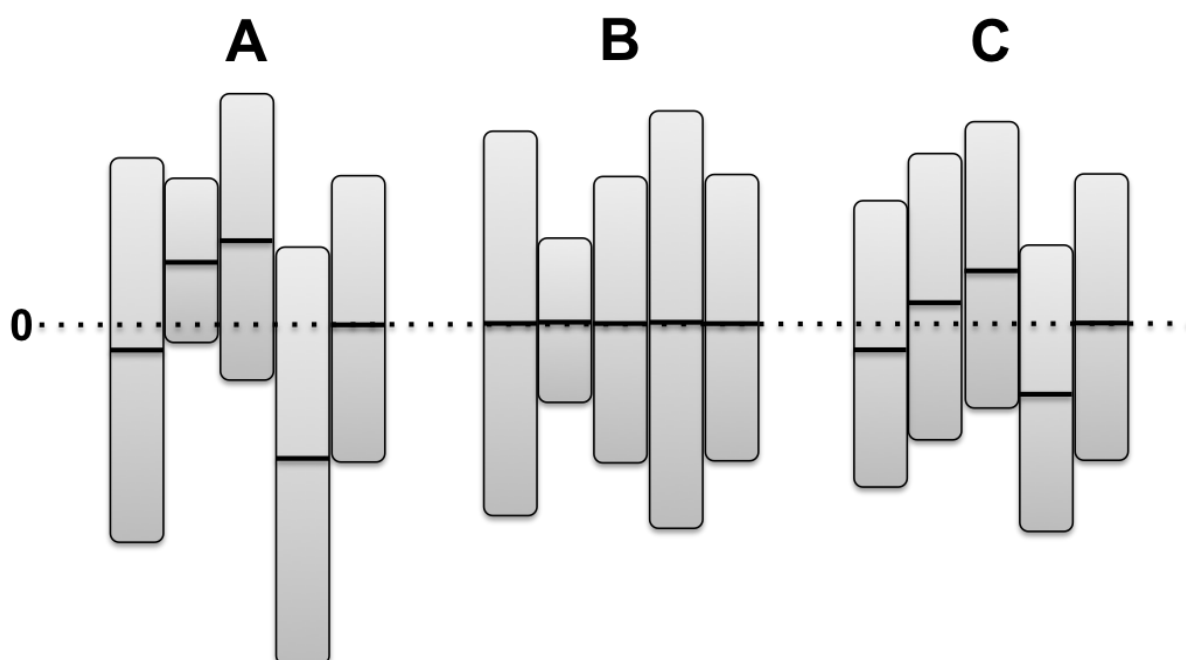


FIGURA 9 – Ilustração dos dados: (A) sem tratamento; (B) após a centralização em torno da média; (C) após escalonamento.

1.3.5 – Quimiometria aplicada às análises ambientais

A análise por RMN de matrizes complexas representa um sério desafio devido a grande quantidade de dados gerados, tanto nos espectros 1D como nos 2D, originando elevada dimensionalidade e não permitindo a sua avaliação através da simples inspeção visual.^{139,140} Assim, a quimiometria é uma importante ferramenta

INTRODUÇÃO

para estudo de matrizes complexas oriundas de RMN, pois as correlações existentes entre as amostras com as variáveis dependentes são fornecidas em termos de poucas variáveis.¹⁴¹

Em 2010, Mas e colaboradores publicaram uma revisão bibliográfica com os recentes progressos na aplicação da quimiometria em análises de contaminantes orgânicos em amostras ambientais, avaliando a sua composição, padrões de distribuição geográfica e temporal e a predição de atividades tóxicas feitas a partir de modelos baseados no uso da descrição física, química e estrutural dos compostos.¹⁴²

Singh e colaboradores em 2005 aplicaram técnicas quimiométricas na análise de águas residuárias para identificar fatores que podem afetar a composição do esgoto sanitário, o qual foi coletado por um período de cinco anos.¹⁴³ As técnicas multivariadas aplicadas descreveram com sucesso a similaridade ou dissimilaridade das amostras com base em atividades de rotinas domésticas e/ou comerciais e variações sazonais.¹⁴⁴

Kowalkowski e colaboradores em 2006 fizeram uma análise quimiométrica da qualidade das águas de um rio na Polônia, monitorando seu nível de poluição no período entre 1994 e 2002, e apontando as variáveis que mais contribuíram para a discriminação das amostras. Os resultados mostraram que os agrupamentos ocorreram em função das diferentes regiões onde foram feitas as coletas, em que algumas localidades possuíam altas contaminações oriundas de esgoto sanitário doméstico, enquanto que em outras, tiveram altas contaminações devido a atividades relacionadas à agricultura.¹⁴⁵

2 OBJETIVOS

De forma a contribuir para a difusão do uso da RMN no estudo de amostras ambientais e, em particular, do esgoto sanitário doméstico, os principais objetivos deste trabalho foram:

2.1 – Traçar um perfil dos constituintes químicos orgânicos existentes no esgoto coletado antes e após o tratamento ocorrido na Estação de Tratamento de Esgoto (ETE) do município de São Carlos-SP, utilizando a RMN 1D, 2D, dados já publicados e com o banco de dados do programa Amix[®] 3.9.14.

2.2 – Utilizar a quimiometria (HCA e PCA) como ferramenta matemática para avaliar possíveis tendências em função da sazonalidade da coleta e possíveis descartes anômalos.

2.3 – Estimar a massa do maior número dos constituintes químicos orgânicos presentes nas amostras do esgoto sanitário doméstico.

2.4 – Identificar os constituintes químicos recalcitrantes presentes nas amostras de efluente por meio do uso de técnicas de pré-purificação e concentração, utilizando colunas cromatográficas específicas para limpeza (*cleanup*) das amostras, bem como colunas cromatográficas para a separação e elucidação dos analitos de interesse, utilizando o sistema hifenado HPLC-(UV/MS)-SPE-ASS-NMR no modo *off-line*, ou seja, sem o uso do *cryo-fit*.

2.5 – Avaliar a qualidade da água descartada no leito do rio Monjolinho e dar subsídios para orientar ações preventivas e/ou corretivas que devam ser tomadas pela ETE.

OBJETIVOS

De forma a tornar mais clara a apresentação dos resultados, o trabalho foi dividido em dois capítulos: Capítulo I, que se refere aos compostos “não específicos”, ou seja, as análises foram desenvolvidas de forma não direcionada para, desta forma, se observar a composição geral das amostras; Capítulo II, referente aos compostos “não específicos recalcitrantes”, os quais foram analisados no laboratório *Environmental NMR Center* da Universidade de Toronto (*UofT*), Toronto-ON, Canadá.

Capítulo I

Compostos Não Específicos

3 PARTE EXPERIMENTAL

3.1 – Origem e preparo das amostras

As amostras anterior e posterior o tratamento ocorrido na ETE de São Carlos-SP foram coletadas com um mesmo volume (500 mL), semanalmente durante o período de 1 ano (entre 08/06/2011 e 13/06/2012), com os locais da coleta ilustrados na Figura 10, totalizando em 97 amostras. As coletas foram realizadas por um funcionário da empresa, em um dia específico da semana (estabelecido pela ETE), de hora em hora e por um período de 24 horas, sendo estas amostras misturadas, gerando uma amostra composta para garantir uma maior representatividade estatística.

A Figura 10 também ilustra o rio Monjolinho, onde é feito o descarte do efluente da ETE de São Carlos-SP.



ANTES DO TRATAMENTO



DEPOIS DO TRATAMENTO

FIGURA 10 – ETE de São Carlos-SP e os locais onde foram feitas as coletas das amostras de esgoto não tratado (lado esquerdo) e após o tratamento (lado direito).

Inicialmente, os espectros de RMN de ^1H adquiridos preliminarmente às análises mostraram que o tempo de relaxação dos núcleos presentes nas amostras de esgoto e a consequente resolução espectral, possuem uma forte dependência com a porcentagem de sólidos dissolvidos. Desta forma, com o intuito de encontrar a maior quantidade de material orgânico que poderia estar dissolvido na matriz sem que afetasse negativamente a resolução espectral e, com isso, fornecesse incorretas informações para quimiometria e quantificação, diferentes volumes de águas de esgoto foram testados. Os resultados mostraram que a quantidade ideal para o preparo amostral foi de 20 mL coletados após a filtração através de filtros de papel.

Assim sendo, imediatamente após a coleta, as amostras foram filtradas com filtros de papel (80G) e, em seguida, foi coletada uma alíquota de 20 mL do filtrado, a qual foi filtrada novamente com filtros de 0,45 μm . O filtrado final foi colocado em uma centrífuga a vácuo (SpeedVac[®]) que operou à 10.000 rpm para secagem rápida do material, depois foi transferido para um frasco próprio (Eppendorf) e armazenado em um dessecador a 24°C (temperatura do laboratório), sendo mantido nessas condições até se iniciarem as análises por RMN. Como foi notado, para efeito de comparação, as análises foram realizadas com um mínimo de pré-tratamento das amostras.

Para as análises de RMN, foi preparada uma solução estoque de $\text{D}_2\text{O}/\text{TMS}\text{-d}_4$ (padrão interno) na concentração de 0,16 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$. As amostras foram solubilizadas em 600,0 μL desta solução com posterior homogeneização, a qual foi realizada por um “misturador” da marca GoMixer MX-S.

O pH das amostras de esgoto tratado pela ETE, após a secagem e ressuspensão em D_2O , foi neutro ou ligeiramente básico (pH 7 – 7,5) e, para as amostras de esgoto não tratado, esteve entre pH 8 - 8,5. Deste modo, para se realizar uma caracterização e quantificação mais adequada e homogênea, os compostos foram considerados na sua forma neutra.

3.2 – Espectros de RMN de ^1H

Os espectros de RMN foram adquiridos em um espectrômetro Bruker Avance[®] III 600 MHz (14,1 T), equipado com uma sonda criogênica TCI ($^1\text{H}/^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$)

com detecção inversa e gradiente de campo, localizado no Laboratório de RMN, do Departamento de Química da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), São Carlos-SP, Brasil.

As análises de RMN foram adquiridas sob temperatura controlada (297K), sendo acumulados 128 espectros (NS) com pulso ($p1$) de 9,75 μ s (calibrado para 90°), 15,0 s de tempo de espera entre cada aquisição ($d1$), 7,0 s de tempo de aquisição (AQ) e 246k de números de pontos na aquisição (TD) para uma largura espectral de 30 ppm. Os espectros foram adquiridos utilizando-se a sequência de pulsos compostos ZGCPPr (denominação Bruker) com pré-saturação do sinal do solvente (HOD). As análises foram feitas em quintuplicatas e processadas com um fator de multiplicação exponencial (lb) igual a 0,3 Hz para as posteriores análises quimiométricas e quantitativas. Utilizou-se o programa Bruker TopSpin® (versão 3.1) para aquisição e processamento dos dados, onde os espectros com distorções de fases e linhas de base foram corrigidos e calibrados através do sinal relativo aos ^1H do TMSP-d4 (trimetilsililpropionato de sódio tetradeuterado utilizado como referência interna) em δ 0,0.

Para assegurar que os sinais nos espectros de RMN de ^1H representassem a completa relaxação dos núcleos presentes nas amostras, os valores de AQ e $d1$ foram estimados através da sequência de pulsos de inversão e recuperação, utilizada após calibração dos pulsos. Esta sequência consiste em um pulso de 180°, o qual inverte o vetor resultante da magnetização longitudinal (T_1) do eixo “z” para “-z”, seguido de um intervalo de tempo (τ) onde a magnetização evolui segundo o processo de relaxação longitudinal, com um subsequente pulso de 90° para leitura dos sinais presentes no FID (do inglês *Free Induction Decay*). A amplitude dos sinais avaliados é diretamente proporcional a resultante da magnetização no eixo “z” no intervalo τ . Assim, pode ser realizada uma sequência de aquisições, com variação do tempo entre o pulso de 180° e 90°, para se conhecer a evolução temporal de T_1 no eixo “z”. Com isso, o valor do tempo de relaxação longitudinal dos núcleos foi determinado através da Equação 8, onde o valor $5T_1$ foi distribuído entre os tempos de AQ e $d1$.

$$\tau_{\text{nulo}} = 5 \cdot T_1 \cdot \ln 2$$

Equação 8

Os experimentos de RMN bidimensionais (2D) COSY, HSQC e HMBC foram adquiridos com gradiente de campo e empregando as sequências de pulsos COSYGPPRQF, HSQCETGP e HMBCGPLNDQF (denominações Bruker), respectivamente, com NS variando de acordo com a concentração das matrizes de esgoto e d1 de 1 s para todas as aquisições. A largura espectral (SW), em F2 e F1, para os experimentos de COSY foi de 30 ppm, e para os experimentos de HSQC e HMBC foram de 30 ppm em F2 e 239 ppm em F1. O número de pontos na aquisição (TD) para todos os experimentos foram de 4 Kb em F2 e 256 em F1. No processamento, o número de pontos (SI) dos experimentos HSQC e HMBC foram utilizados 4 Kb em F2 e 1 Kb em F1. Foram utilizados 1Kb de pontos nas duas dimensões (F2 e F1) para os experimentos de COSY.

3.3 – Análises Quimiométricas

Os espectros de RMN de ^1H foram utilizados como variáveis de entrada no programa Amix[®] versão 3.9.11 para geração de arquivos conhecidos como *bucket table*. Para formação das *bucket tables*, os espectros foram divididos em intervalos com 0,04 ppm de largura onde, dentro de cada um, ocorreu o processamento de dimensionamento a partir do sinal de maior intensidade, o que resultou em uma única variável dentro de cada faixa no espectro. Para análise integral dos constituintes, foram selecionadas as regiões entre δ 0,70 e 8,50, excluindo-se a região entre δ 4,65 e 5,00 referente ao sinal do solvente – HOD, e entre δ 6,50 e 8,40 para a análise dos compostos com hidrogênios aromáticos.

Os espectros foram avaliados por meio da Análise por Agrupamentos Hierárquicos (HCA) e Análise de Componentes Principais (PCA). Por sua vez, para a verificação da similaridade natural entre os indivíduos e auxiliar na compreensão das análises por PCA, as análises por HCA foram aplicadas nas *bucket tables* geradas a partir do programa Amix[®]. Para isso, todas as *bucket tables* foram convertidas para o *American Standard Code for Information Interchange* (ASCII) e exportadas para o programa de quimiometria Pirouette[®] 4.0 (Infometrix, Inc., Seattle, WA).

3.4 – Análises Quantitativas

Um método de quantificação conhecido por Eretic2[®], presente no programa TopSpin[®] versão 3.1, foi utilizado para estimar as massas dos constituintes que mais se destacaram nas amostras de esgoto. Este método é baseado no princípio da proporcionalidade entre as massas, intensidade absoluta e no número de hidrogênios referentes a cada sinal. Desta forma, foi feita a correlação entre o valor da integral e o número de hidrogênios referentes ao sinal do TMSP-d4 (padrão interno) com concentração conhecida em um espectro de RMN de ¹H, que foi adquirido sob condições quantitativas, e os valores das integrais e o número de hidrogênios dos analitos alvo que se desejavam quantificar, também adquiridos sob as mesmas condições quantitativas.¹⁴⁶

As análises quantitativas por diagrama de extremos e quartis (DEQ) foram desenvolvidas pela versão designada por *box-and-whiskers*, a qual permite visualizar os valores que são considerados como anômalos ou *outliers*.

Os valores das médias, os desvios padrões e as incertezas combinadas foram calculados através do programa *Excel Microsoft*. Já os DEQ (primeiro e terceiro quartis e mediana), foram obtidos pelo programa *Origin 8.0*, onde foi estabelecido um intervalo de confiança de 95% para variação das concentrações.

Todos os resultados das quantificações foram divididos por um fator de correção de 20, que se referente aos 20 mL utilizados no preparo amostral (seção 3.1) para que, desta forma, as concentrações fossem apresentadas na unidade mg.L⁻¹ ou partes por milhão (ppm). O cálculo está explicado detalhadamente no Apêndice do trabalho (pag. 125).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 – Investigação e caracterização de compostos orgânicos não específicos presentes nas amostras de esgoto sanitário doméstico

A análise de amostras sem pré-tratamentos complexos é uma das razões pelas quais a RMN tem sido cada vez mais utilizada nos estudos das mais variadas matrizes, pois minimiza o tempo de análise e reduz a possibilidade de provocar alterações na composição química das amostras, o que pode acontecer em técnicas que necessitem de extenuantes etapas de pré-tratamento amostral. Desta maneira, uma sensibilidade e resolução satisfatórias foram alcançadas empregando uma pequena quantidade de material por análise (20 mL), com um tempo total de 47 minutos por aquisição dos espectros RMN de ^1H , além do tempo para filtração e secagem que foi gasto no pré-tratamento. No entanto, para efeito de diferenciação das amostras de esgoto através dos espectros de RMN de ^1H , exigiram-se análises quimiométricas dos dados espectrais, que facilitaram o trabalho com a grande quantidade de informações.

Inicialmente, buscou-se investigar o comportamento da composição orgânica nas amostras de esgoto em cada etapa do tratamento ocorrido na ETE, que tem por objetivo a remoção da maior quantidade possível de contaminantes. De um modo geral, as ETEs apresentam particularidades inerentes ao processo de tratamento do esgoto e, para auxiliar na compreensão da composição química presente, as etapas específicas da ETE em questão serão descritas sucintamente a seguir. O esgoto ao adentrar na ETE de São Carlos, passa por uma etapa de tratamento físico para retirada dos sólidos grosseiros através de peneiras. Nesta etapa também ocorreu a desarenação, ou seja, a areia foi raspada no fundo do tanque e enviada a um reservatório, além da remoção das gorduras que, através de um sistema de flotação, foram suspensas e retiradas por uma pá superficial e armazenadas em local apropriado. Ainda nesta etapa, é adicionado um sal que contém ferro para mitigar o mal cheiro formado pelos gases, como o H_2S . Após o tratamento físico, as águas de esgoto foram encaminhadas à um sistema de tratamento biológico, o qual ocorre através de dois reatores anaeróbios de fluxo

ascendente, conhecidos como UASB, que funcionaram em paralelo. Nesta etapa foram feitos descartes periódicos de lodo de esgoto que foram encaminhados à unidades de fase sólida e enviados a aterros sanitários ou doadas para confecção de adubo. Posteriormente, o esgoto foi enviado para o tratamento químico, o qual ocorreu no “tanque de mistura rápida” e em dois tanques flutuantes que também funcionaram em paralelo. Nesta etapa foi feita a mistura das águas de esgoto com agentes coaguladores, como o PAC (policloreto de alumínio) ou cloreto férrico e, em seguida, foi adicionado um polímero co-coagulante para aumentar o tamanho dos flocos e facilitar a remoção através de um sistema de aeração, raspagem superficial e extração por uma centrífuga. Os lodos excedentes foram encaminhados para desidratação mecânica e enviados às unidades de fase sólida. Após esta etapa, as águas de esgoto passaram por um sistema de desinfecção e remoção de coliformes fecais através de luz UV e, finalmente, passaram por uma escada hidráulica para aumento da oxigenação, e foram descartadas no rio Monjolinho. Todas as etapas no tratamento do esgoto pela ETE de São Carlos-SP estão ilustradas na Figura 11.

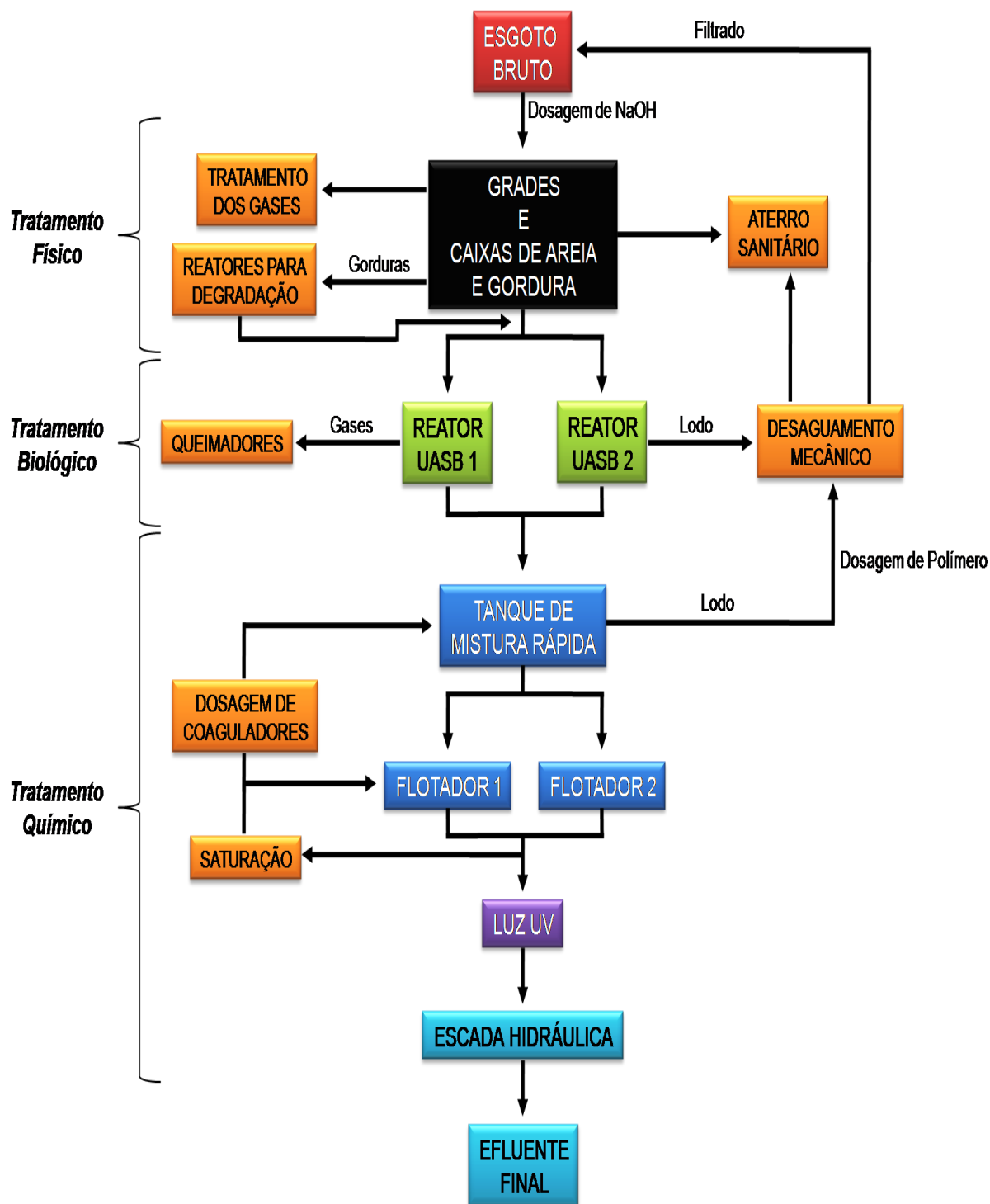


FIGURA 11 – Diagrama de blocos das etapas do tratamento do esgoto pela ETE de São Carlos-SP.

Portanto, após o entendimento do sistema completo de tratamento da ETE, foram adquiridos espectros de RMN de ^1H das amostras de esgoto referentes as seguintes etapas apresentadas na Figura 11: anterior não tratado (esgoto bruto

em vermelho); durante o tratamento biológico nos dois reatores anaeróbios (UASB 1 e 2 em verde); durante o tratamento químico no tanque de mistura rápida (em azul) e nos dois flotadores (1 e 2 em azul); e após todo tratamento (efluente final em azul claro). A Figura 12 apresenta uma comparação espectral de cada uma das amostras citadas acima (espectros na mesma escala), as quais foram coletadas no mesmo dia. Esta análise foi realizada em triplicata para diferentes dias do mês de Junho de 2011.

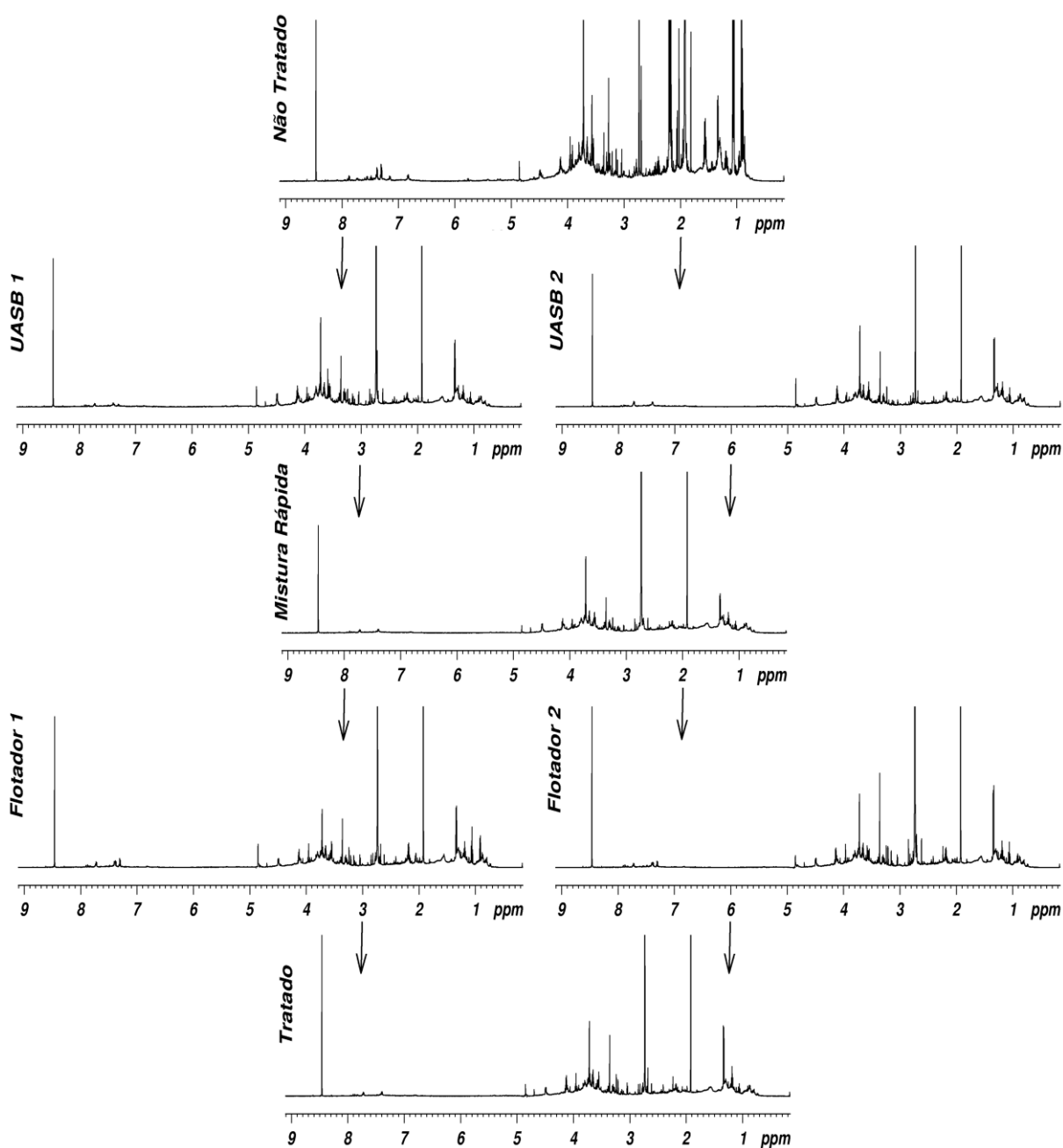


FIGURA 12 – Comparação, por espectros de RMN de ^1H , da composição orgânica das amostras em cada etapa do tratamento ocorrido na ETE de São Carlos-SP.

Desta forma, através desta primeira avaliação geral da composição da amostra e, para os estudos quimiométricos e quantitativos, foram escolhidas as amostras de esgoto não tratado e após o tratamento realizado pela ETE, já que essas apresentaram maiores variações na composição orgânica.

Para a caracterização dos compostos orgânicos foram realizados experimentos unidimensionais de RMN de ^1H (Fig. 16), bidimensionais de correlação homonucleares COSY (Fig. 13) e bidimensionais de correlações heteronucleares HSQC (Fig. 14) e HMBC; análise de “sugestões” feitas por um programa de reconhecimento de padrões espectrais inseridos em um banco de dados, chamado Amix[®] 3.9.14, disponibilizado pelo laboratório *Environmental NMR Center* da Universidade de Toronto. Além disso, para a caracterização inequívoca, dados encontrados em publicações recentes também foram avaliados.^{147,148,149,150,151,152} Com isso, foi revelado um grande número de substâncias químicas que comprovaram a complexidade da matriz, além de permitir a caracterização de 50 constituintes presentes nas amostras do esgoto sanitário doméstico, os quais estão ilustrados e detalhados na Tabela 1.

TABELA 1 – Compostos caracterizados nas amostras de esgoto não tratado e após tratamento ocorrido na ETE de São Carlos-SP.

n°	Compostos e Estruturas	δ ^1H (multiplicidade* J em Hz)	gHSQC (δ ^{13}C)
----	------------------------	-------------------------------------------------------	---------------------------------------

AMINOÁCIDOS

1	<p style="text-align: center;">Ornitina</p>	2 - 3,77 (m) 3 - 1,90 (m) *** 3 - 1,91 (m) *** 4 - 1,77 (m) 5 - 3,01 (m)	59,2 25,9 28,9 25,9 41,7
---	----------------------------------------------------	--------------------------------------------------------------------------------------	--------------------------------------

Tabela 1

continuação

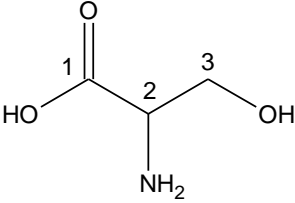
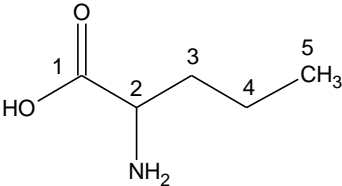
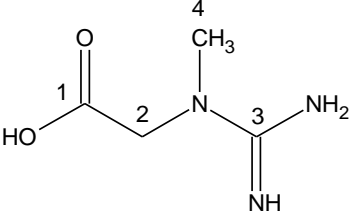
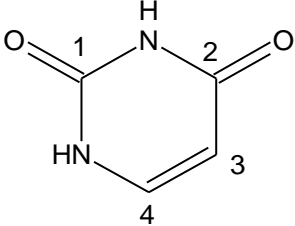
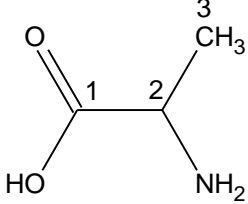
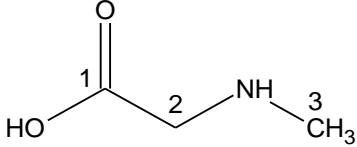
2	<p style="text-align: center;">Serina</p> 	<p style="text-align: center;">2 - 3,66 (m) 3 - 3,97 (m)</p>	<p style="text-align: center;">58,5 63,8</p>
3	<p style="text-align: center;">Leucina</p> 	<p style="text-align: center;">2 - 3,61 (m) 3 - 1,90 (m) *** 4 - 1,59 (m) *** 5 - 0,96 (d 7,04)</p>	<p style="text-align: center;">57,4 43,1 27,0 24,5</p>
4	<p style="text-align: center;">Creatina</p> 	<p style="text-align: center;">2 - 3,93 (m) *** 4 - 3,05 (s)</p>	<p style="text-align: center;">56,6 39,8</p>
5	<p style="text-align: center;">Uracila</p> 	<p style="text-align: center;">3 - 5,76 (d 7,40) 4 - 7,55 (m)</p>	<p style="text-align: center;">103, 4 148,8</p>
6	<p style="text-align: center;">Alanina</p> 	<p style="text-align: center;">2 - 4,12 (q 6,90) 3 - 1,20 (d 6,90)</p>	<p style="text-align: center;">57,5 21,1</p>

Tabela 1

continuação

7	<p style="text-align: center;">Sarcosina</p> 	<p>2 - 3,66 (m) *** 3 - 2,74 (s)</p>	<p>53,8 32,5</p>
---	---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	------------------------------------------	----------------------

ÁCIDOS ORGÂNICOS

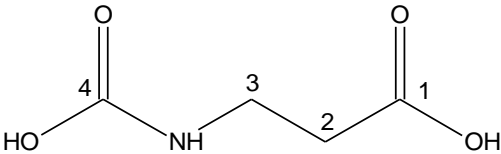
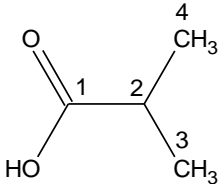
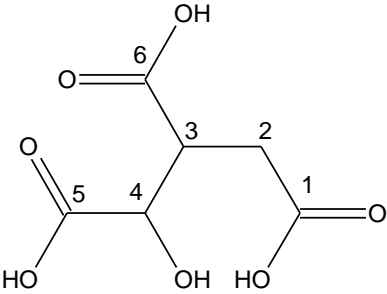
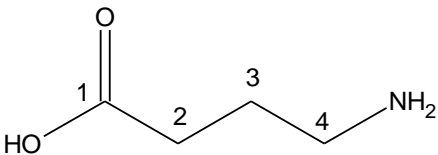
8	<p style="text-align: center;">3-ureidopropanoico</p> 	<p>2 - 2,42 (m) 3 - 3,31 (m)</p>	<p>39,6 39,5</p>
9	<p style="text-align: center;">Isobutírico</p> 	<p>2 - 2,38 (m) 3;4 - 1,02 (d 7,18)</p>	<p>39,5 22,0</p>
10	<p style="text-align: center;">Isocítrico</p> 	<p>2 - 2,40 (m) 3 - 3,15 (m) 4 - 3,96 (d 2,01)</p>	<p>39,5 51,7 76,4</p>
11	<p style="text-align: center;">GABA (γ-aminobutírico ou 4-aminobutírico)</p> 	<p>2 - 2,27 (m) *** 3 - 1,91 (m) *** 4 - 2,98 (t 7,44)</p>	<p>38,0 25,9 41,7</p>

Tabela 1

continuação

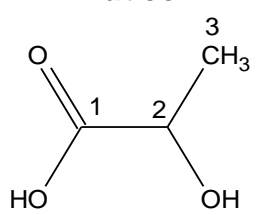
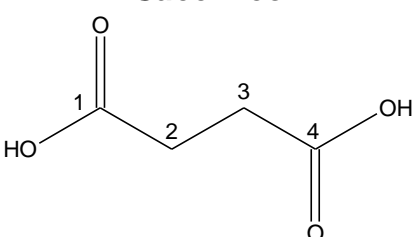
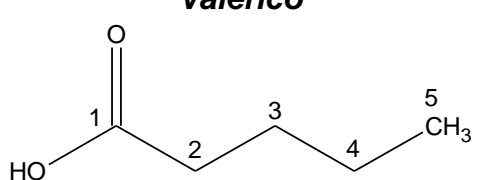
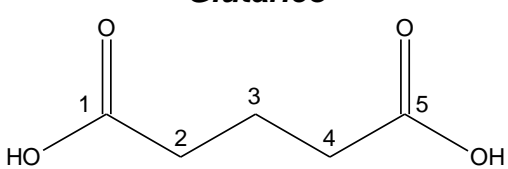
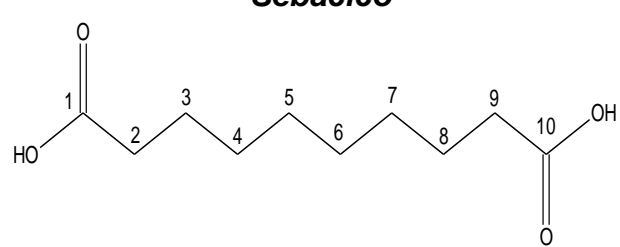
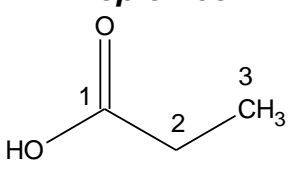
12	<p style="text-align: center;">Lático</p> 	<p>2 - 4,06 (q 7,30) 3 - 1,33 (d 7,30)</p>	<p>71,1 21,1</p>
13	<p style="text-align: center;">Succínico</p> 	<p>2;3 - 2,41 (s)</p>	<p>37,5</p>
14	<p style="text-align: center;">Valérico</p> 	<p>2 - 2,22 (m) *** 3 - 1,57 (m) *** 4 - 1,29 (m) *** 5 - 0,90 (t 7,46)</p>	<p>40,3 28,4 24,7 16,0</p>
15	<p style="text-align: center;">Glutárico</p> 	<p>2;4 - 2,27 (m) *** 3 - 1,86 (m)</p>	<p>38,0 24,5</p>
16	<p style="text-align: center;">Sebáccico</p> 	<p>2;9 - 2,18 (m) *** 3;8 - 1,58 (m) *** 4;5;6;7 - 1,30 (m) ***</p>	<p>40,0 28,0 31,2</p>
17	<p style="text-align: center;">Propiônico</p> 	<p>2 - 2,17 (q 7,41) 3 - 1,06 (t 7,41)</p>	<p>33,4 13,0</p>

Tabela 1

continuação

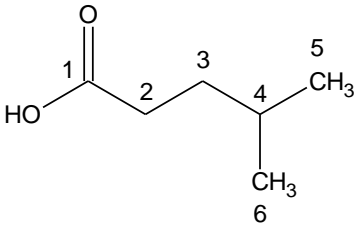
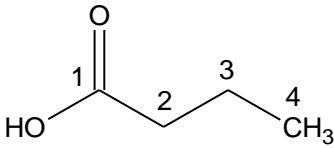
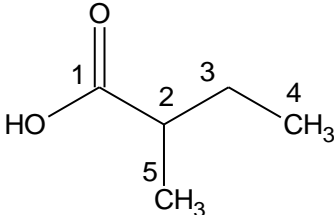
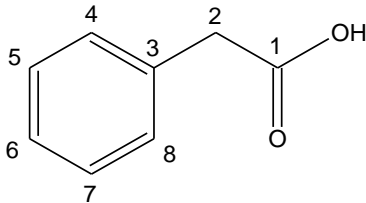
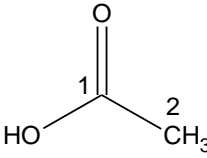
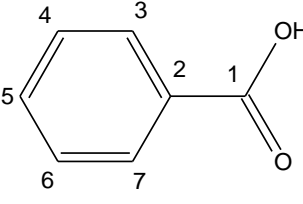
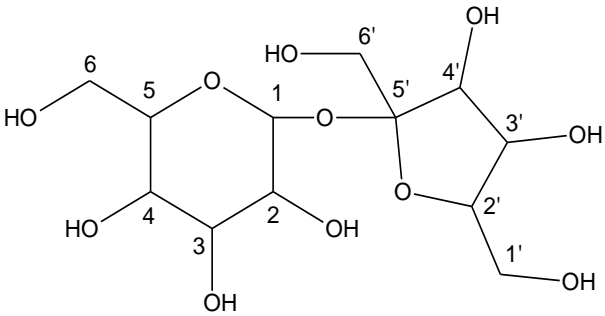
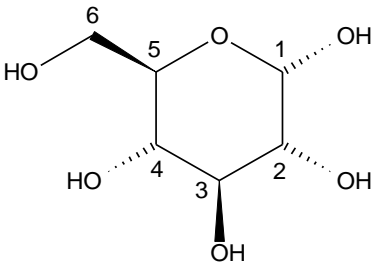
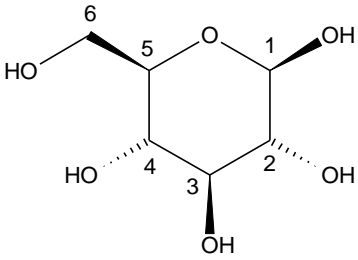
18	<p style="text-align: center;">Isocapróico</p> 	<p>2 - 2,26 (m) *** 3 - 1,55 (m) *** 4 - 1,48 (m) *** 5;6 - 0,92 (d 6,64)</p>	<p>38,2 38,2 30,4 24,6</p>
19	<p style="text-align: center;">Butírico</p> 	<p>2 - 2,16 (t 7,41) 3 - 1,56 (sex) 4 - 0,90 (t 7,41)</p>	<p>42,1 21,9 16,1</p>
20	<p style="text-align: center;">2-metilbutírico</p> 	<p>2 - 2,19 (m) *** 3 - 1,53 (m) *** 3 - 1,47 (m) *** 4 - 0,91 (m) 5 - 1,04 (m)</p>	<p>47,5 30,2 30,0 14,2 20,1</p>
21	<p style="text-align: center;">Fenilacético</p> 	<p>2 - 3,53 (s) 4;6;8 - 7,31 (m) 5;7 - 7,38 (m)</p>	<p>47,2 129,1; 131,5 131,4</p>
22	<p style="text-align: center;">Acético</p> 	<p>2 - 1,92 (s)</p>	<p>26,0</p>
23	<p style="text-align: center;">Benzoico</p> 	<p>3;7 - 7,87 (d 7,43) 4;6 - 7,49 (dd 7,43; 7,60) 5 - 7,56 (d 7,60)</p>	<p>131,2 130,7 133,6</p>

Tabela 1

continuação

24	<p>3-metilglutárico</p>	<p>2;4 - 2,20 (m) *** 3 - 2,13 (m) *** 6 - 0,91 (d 6,61)</p>	<p>47,3 33,5 17,8</p>
25	<p>3-hidroxibutárico (β-hidroxibutárico)</p>	<p>2 - 2,31 (m) 3 - 4,14 (m) 4 - 1,20 (d 6,40)</p>	<p>49,0 68,4 24,7</p>
26	<p>Isovalérico</p>	<p>2 - 2,05 (m) *** 3 - 1,93 (m) *** 4;5 - 0,92 (d 6,65)</p>	<p>50,0 29,1 24,7</p>
27	<p>Fórmico</p>	<p>1 - 8,46 (s)</p>	<p>173,5</p>
28	<p>Ftálico</p>	<p>3;6 - 7,48 (m) 4;5 - 7,41 (m)</p>	<p>130,0 131,0</p>
29	<p>4-hidroxifenilacético</p>	<p>4;8 - 7,15 (d 8,53) 5;7 - 6,83 (d 8,53)</p>	<p>133,4 119,0</p>

CARBOIDRATOS

30	<p style="text-align: center;">Sacarose</p> 	<p>1 - 5,41 (d 3,89) 2 - 3,56 (m) 3 - 3,76 (m) 4 - 3,47 (m) 5 - 3,84 (m) 6 - 3,81 (m) 1' - 3,82 (m) 2' - 3,89 (m) 3' - 4,05 (m) 4' - 4,22 (m) 6' - 3,67 (m)</p>	<p>94,9 73,9 75,2 71,9 75,1 62,9 65,1 84,0 76,5 79,1 64,1</p>
31	<p style="text-align: center;">α-glicose</p> 	<p>1 - 5,24 (d 3,70) 2 - 3,47 (m) 3 - 3,77 (m) 4 - 3,56 (m) 5 - 3,74 (m) 6 - 3,85 (m)</p>	<p>94,7 71,8 75,0 73,8 63,1 74,9</p>
32	<p style="text-align: center;">β-glicose</p> 	<p>1 - 4,60 (d 7,90) 2 - 3,30 (m) 3 - 3,74 (m) 4 - 3,44 (m) 5 - 3,47 (m) 6 - 3,92 (m)</p>	<p>99,0 75,2 63,1 78,3 71,8 63,1</p>

OUTROS COMPOSTOS ORGÂNICOS

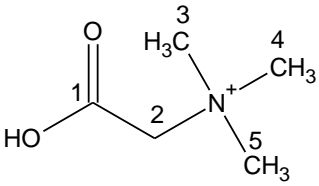
33	<p style="text-align: center;">Betaína</p> 	<p>2 - 3,99 (s) 3;4;5 - 3,26 (s)</p>	<p>68,0 54,6</p>
----	---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	-------------------------------------------	-----------------------

Tabela 1

continuação

34	<p style="text-align: center;">Dietanolamina</p>	<p>2;2' - 3,3 (m) *** 1;1' - 3,81 (m)</p>	<p>55,0 58,6</p>
35	<p style="text-align: center;">2-aminopropanol</p>	<p>1 - 3,75 (m) 1 - 3,57 (m) 2 - 3,36 (m) 3 - 1,25 (m) ***</p>	<p>65,2 65,2 51,4 18,4</p>
36	<p style="text-align: center;">Glicerol</p>	<p>1 - 3,52 (m) 2 - 3,80 (m) 3 - 3,62 (m)</p>	<p>66,8 71,9 66,7</p>
37	<p style="text-align: center;">Glicina</p>	<p>2 - 3,54 (s)</p>	<p>47,1</p>
38	<p style="text-align: center;">Colina</p>	<p>1 - 3,48 (m) 2 - 4,06 (m) 3;4;5 - 3,13 (s)</p>	<p>71,9 58,3 55,6</p>
39	<p style="text-align: center;">Taurina</p>	<p>1 - 3,03 (t 7,90) 2 - 3,38 (t 7,90)</p>	<p>39,5 51,5</p>
40	<p style="text-align: center;">Trimetilamina</p>	<p>1;2;3 - 2,88 (s)</p>	<p>46,3</p>

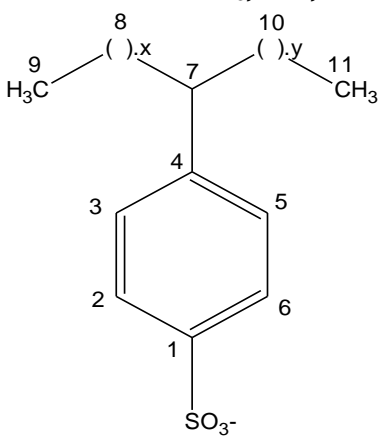
Tabela 1

continuação

41	<p>Metilamina</p> $\begin{array}{c} 1 \\ \text{H}_2\text{N}-\text{CH}_3 \end{array}$	1 - 2,69 (s)	35,6
42	<p>Xilitol</p>	1 - 3,76 (m) 2;4 - 3,88 (m) 3 - 3,58 (m) 5 - 3,67 (m)	65,7 75,0 65,1 74,2
43	<p>Propano-1,3-diol</p>	1;3 - 3,62 (m) 2 - 1,92 (m) ***	61,2 37,1
44	<p>Cadaverina</p>	1;5 - 3,00 (t 7,65) 2;4 - 1,70 (m) 3 - 1,32 (m)	41,7 29,1 26,1
45	<p>Dimetilamina</p>	1;2 - 2,73 (s)	41,1
46	<p>Ureia</p>	1;2 - 5,08 (sl)	165,2

Tabela 1

continuação

	<p>Surfactantes 4-LAS C₁₀, C₁₁, C₁₂ e C₁₃ **</p> 		
47		2;6 - 7,73 (m) 3;5 - 7,40 (m)	128,0 131,3

* s: simpleto; sl: simpleto largo; d: duplete; t: tripleto; q: quadruplete; dd: duplo duplete; sex: sexteto; m: multiplete;

** compostos confirmados nas análises do Capítulo II.

*** picos sobrepostos

Uma vez que a identificação de todos os poluentes presentes é demasiadamente complexa, este trabalho se limitou ao estudo dos compostos com maiores concentrações ou compostos cujos sinais se destacaram nos espectros de RMN de ¹H.

Na Figura 13, para efeito de melhor visualização das correlações dos compostos, estão apresentadas três ampliações de um espectro de RMN de COSY de uma amostra de esgoto não tratado, onde se podem observar as correlações encontradas para 35 dos 50 constituintes que foram caracterizados: a) região de δ 0,70 a 4,65; b) região de δ 0,70 a 4,65; c) região de δ 5,65 a 8,40.

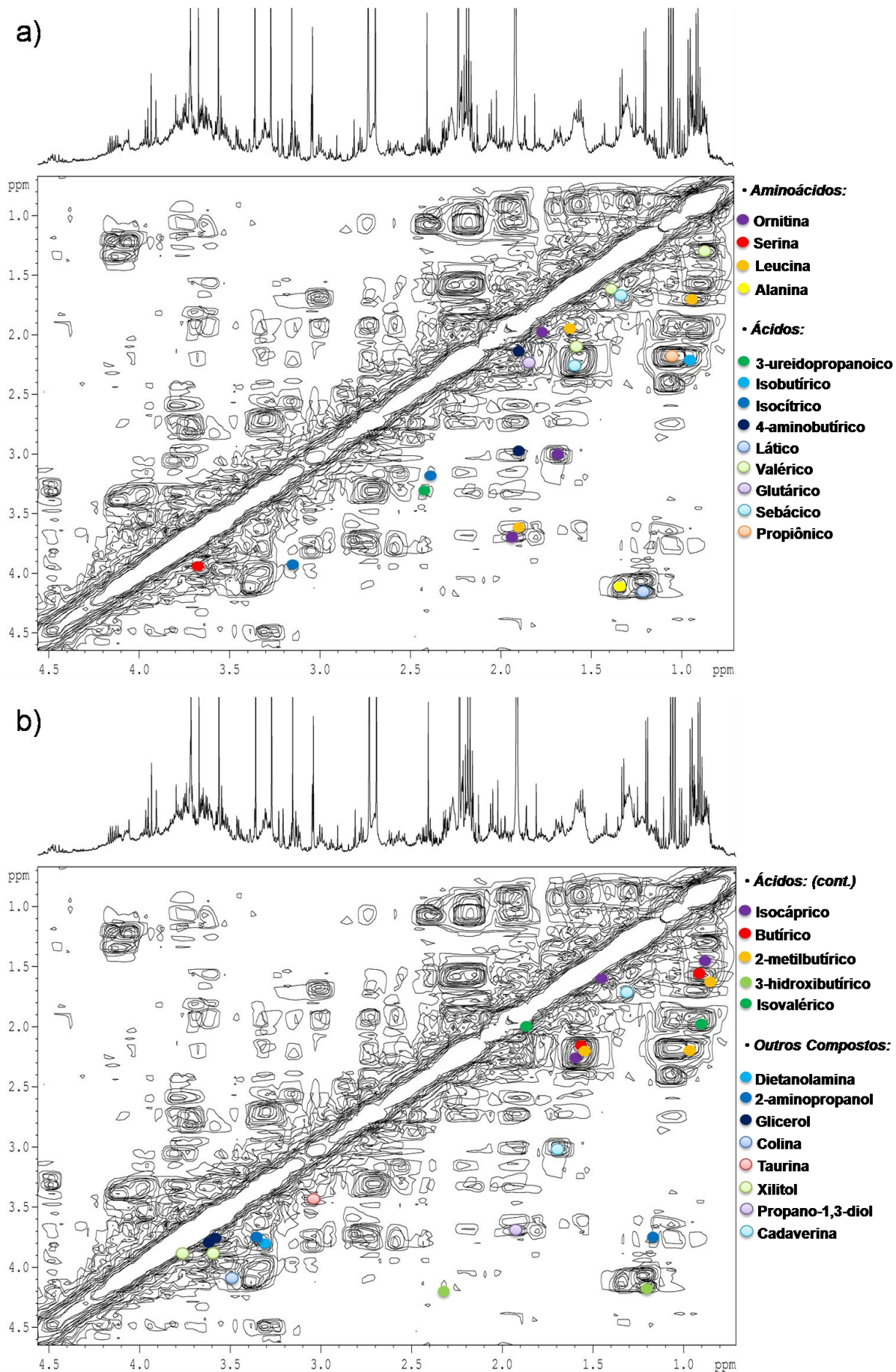


Figura 13

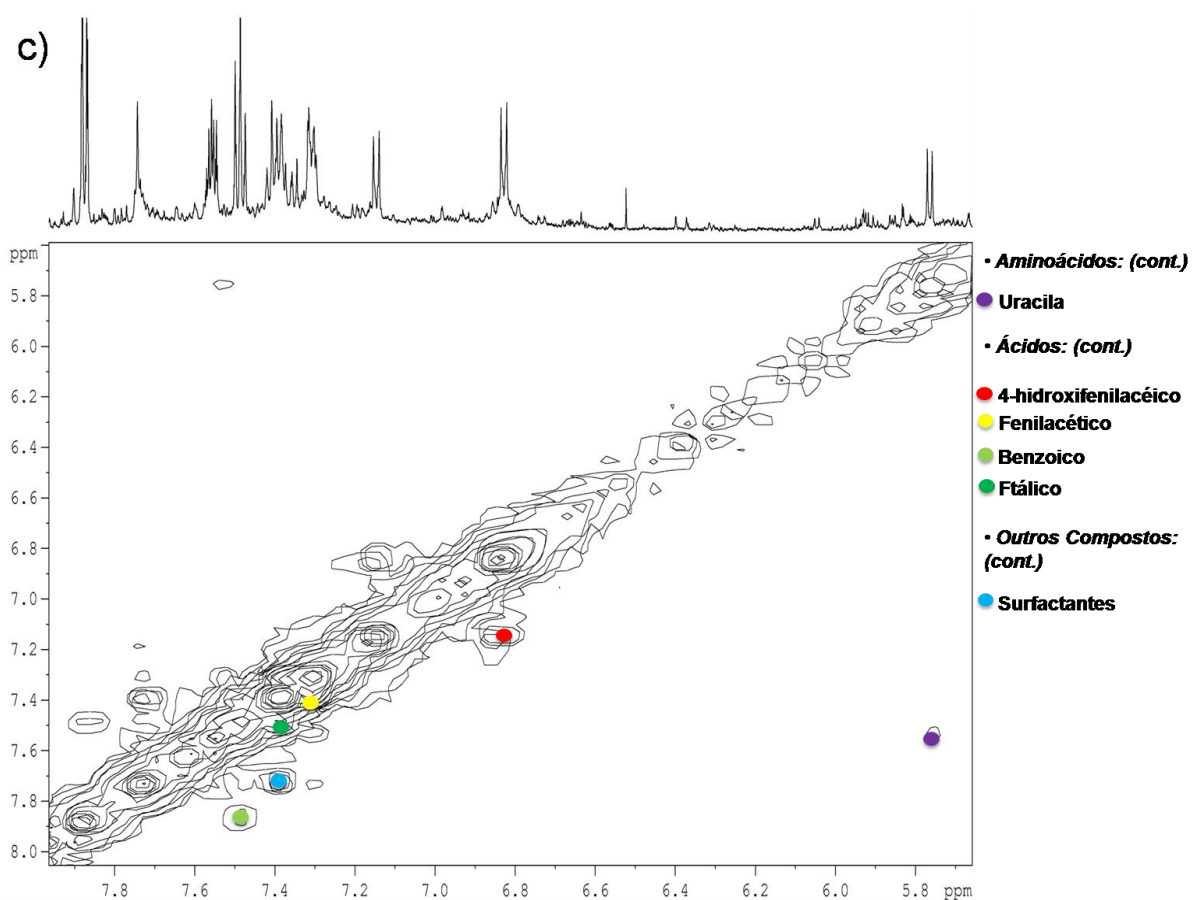


FIGURA 13 – Ampliações de um espectro de RMN de COSY de uma amostra de esgoto não tratado.

Na Figura 14, para efeito de melhor visualização das correlações dos compostos, estão apresentadas três ampliações de um espectro de RMN de HSQC que foi adquirido de uma amostra de esgoto não tratado, onde se apresentam as correlações encontradas para 49 dos 50 compostos caracterizados: a) região de δ 0,70 a 5,85; b) região de δ 0,70 a 5,85; c) região de δ 6,40 a 8,90.

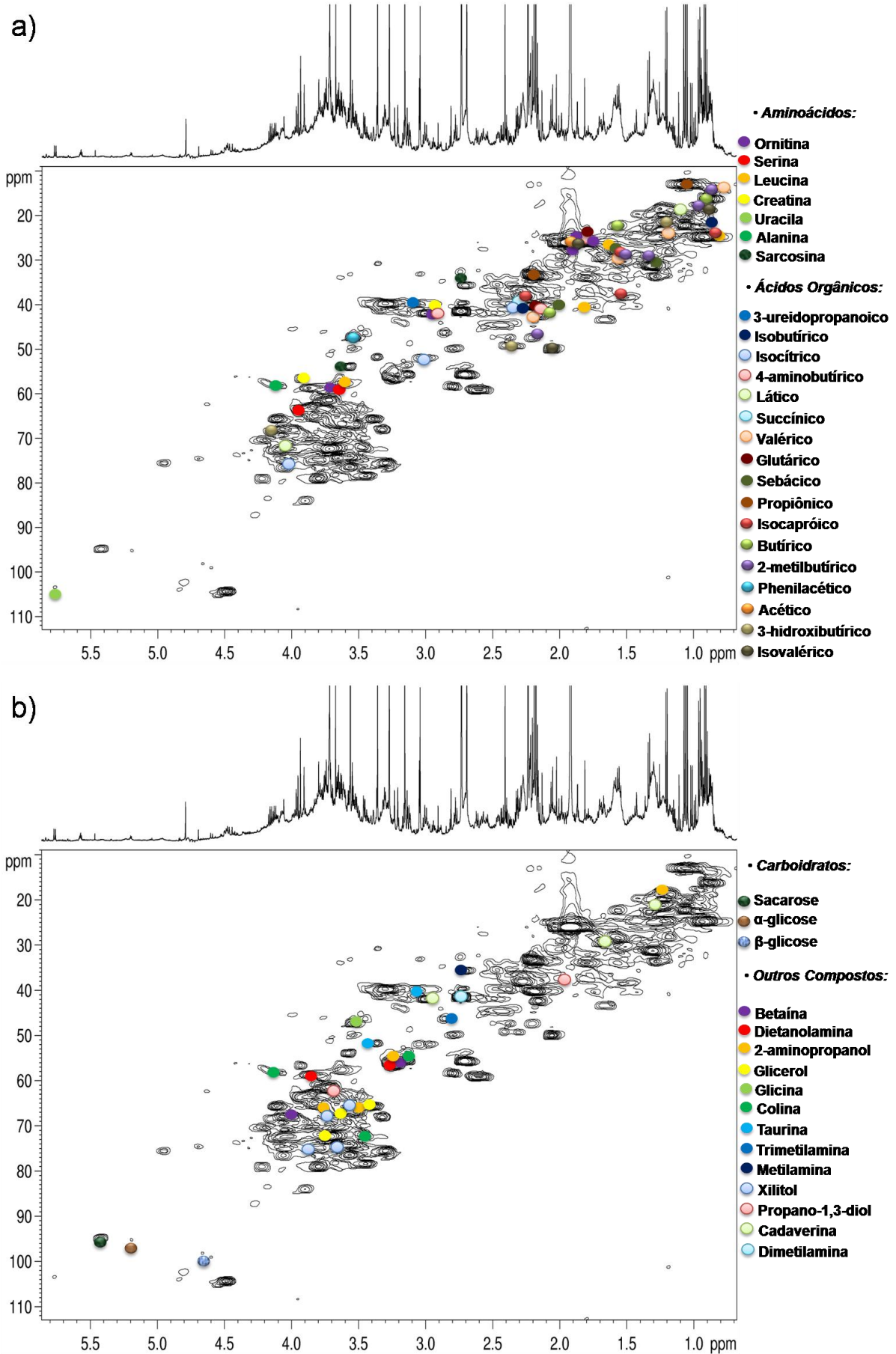


Figura 14

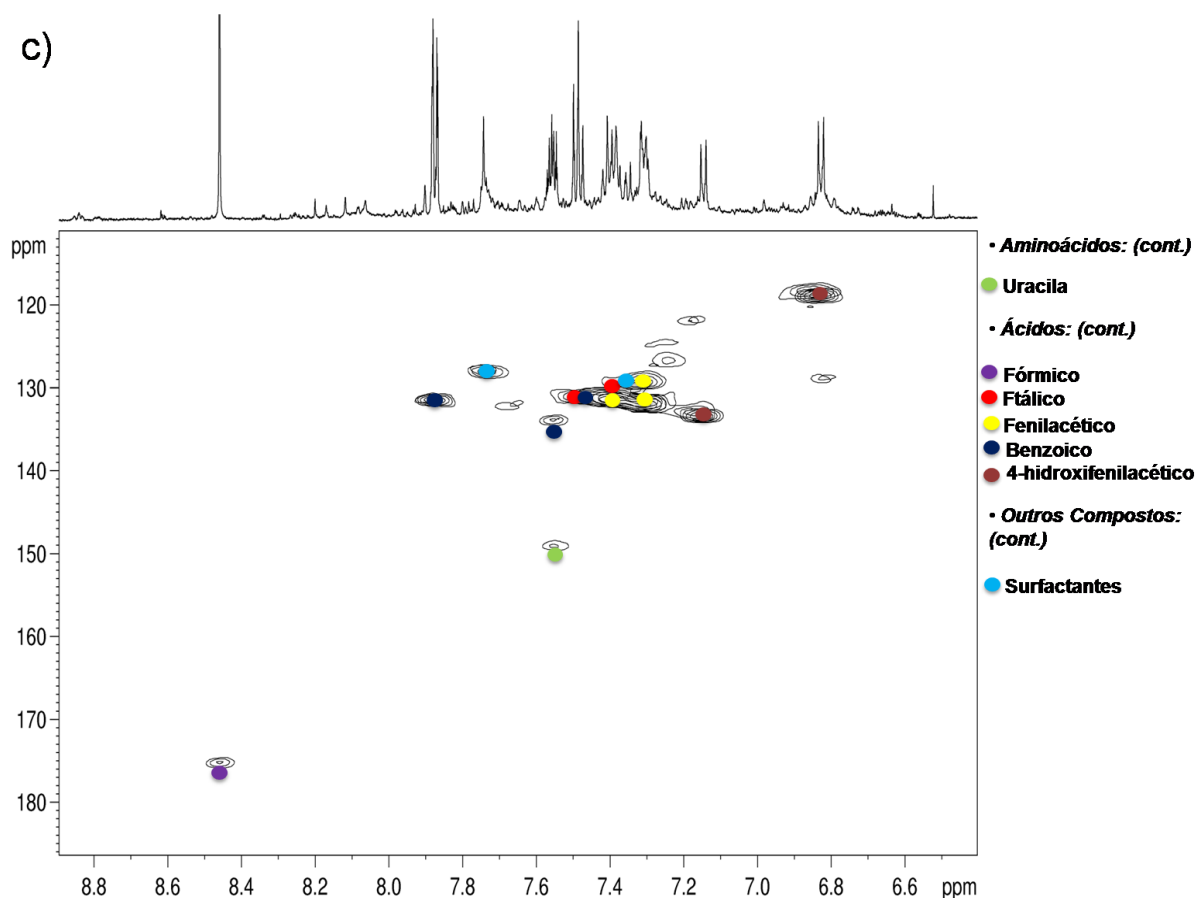


FIGURA 14 – Ampliações de um espectro de RMN de HSQC de uma amostra de esgoto não tratado.

Essas análises resultaram em um amplo perfil espectral, característico das misturas complexas, com sinais entre δ 0,84 e 8,46, revelando que o esgoto sanitário doméstico é composto, predominantemente, de aminoácidos e ácidos orgânicos.

Para se obter maior confiabilidade nos resultados da caracterização dos constituintes químicos, foram traçados dois gráficos de dispersão, em que um é referente aos deslocamentos químicos dos núcleos de ^1H e outro para os núcleos de ^{13}C (Figura 15). Os valores em ambos os gráficos (^1H e ^{13}C) se referem aos deslocamentos químicos encontrados experimentalmente (eixo y) *versus* aqueles referentes a cada composto padrão existentes em um banco de dados do programa Amix[®] ou em publicações recentes (eixo x), com os coeficientes de correlação apresentando credibilidade. Na coleta dos valores dos deslocamentos químicos dos compostos padrão, foram considerados aceitáveis os valores dentro de uma faixa de incerteza de 0,1 ppm para os núcleos de ^1H e 1,0 ppm para os núcleos de ^{13}C .

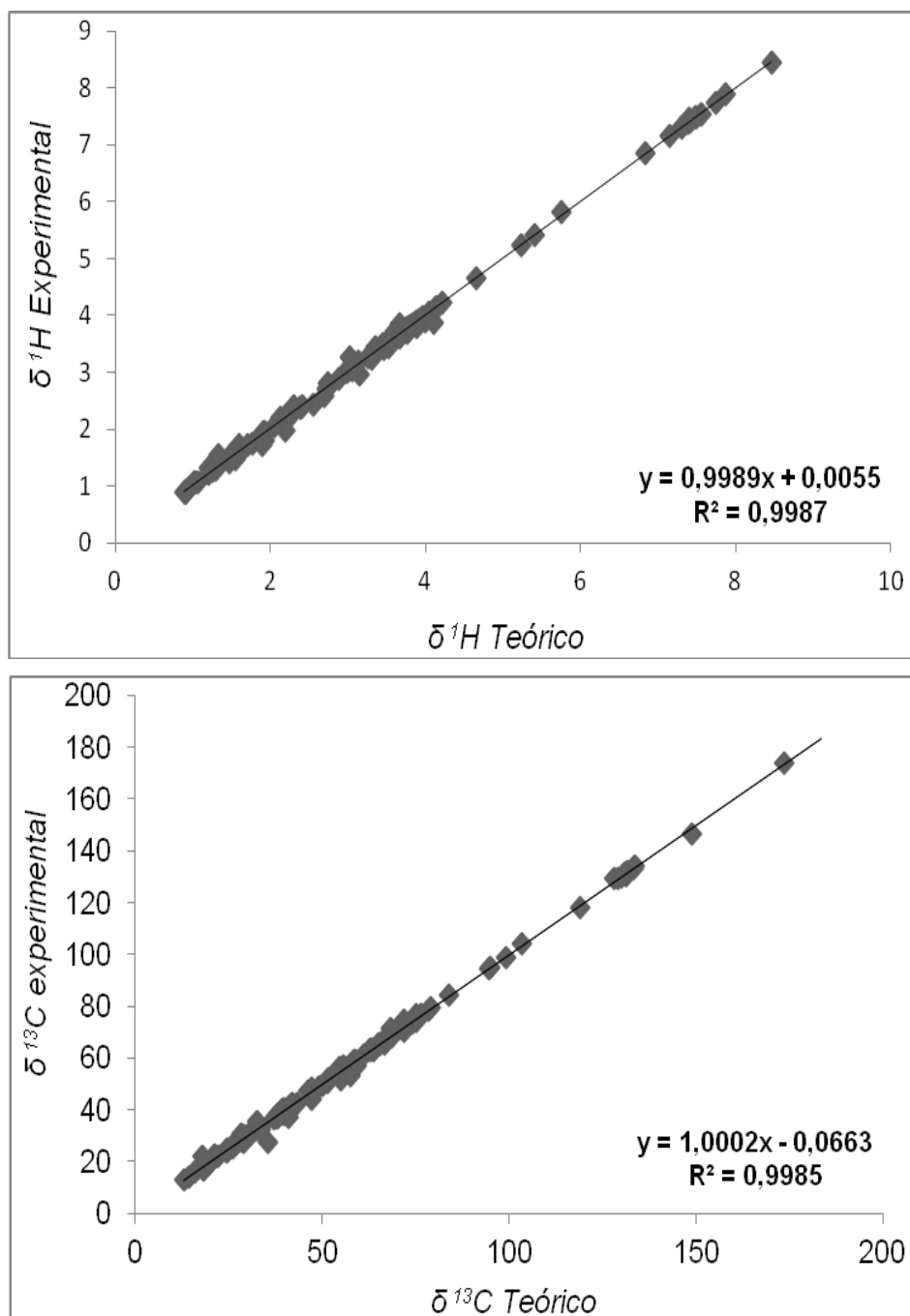


FIGURA 15 – Gráficos de dispersão para os núcleos de ^1H e ^{13}C , com os deslocamentos químicos (δ) experimentais *versus* padrão.

A Figura 16 apresenta com maior clareza, alguns compostos caracterizados nas amostras de esgoto não tratado e tratado, bem como diferenças relacionadas a concentração e composição, onde foram destacadas três regiões distintas referentes a: hidrogênios aromáticos (δ 6,0 a 9,0) na coloração

avermelhada; hidrogênios carbinólicos (δ 3,0 a 6,0) na cor azul; hidrogênios carbinólicos, alílicos, de resíduos alquílicos, dentre outros (δ 1,0 a 3,0) na cor verde.¹⁵³

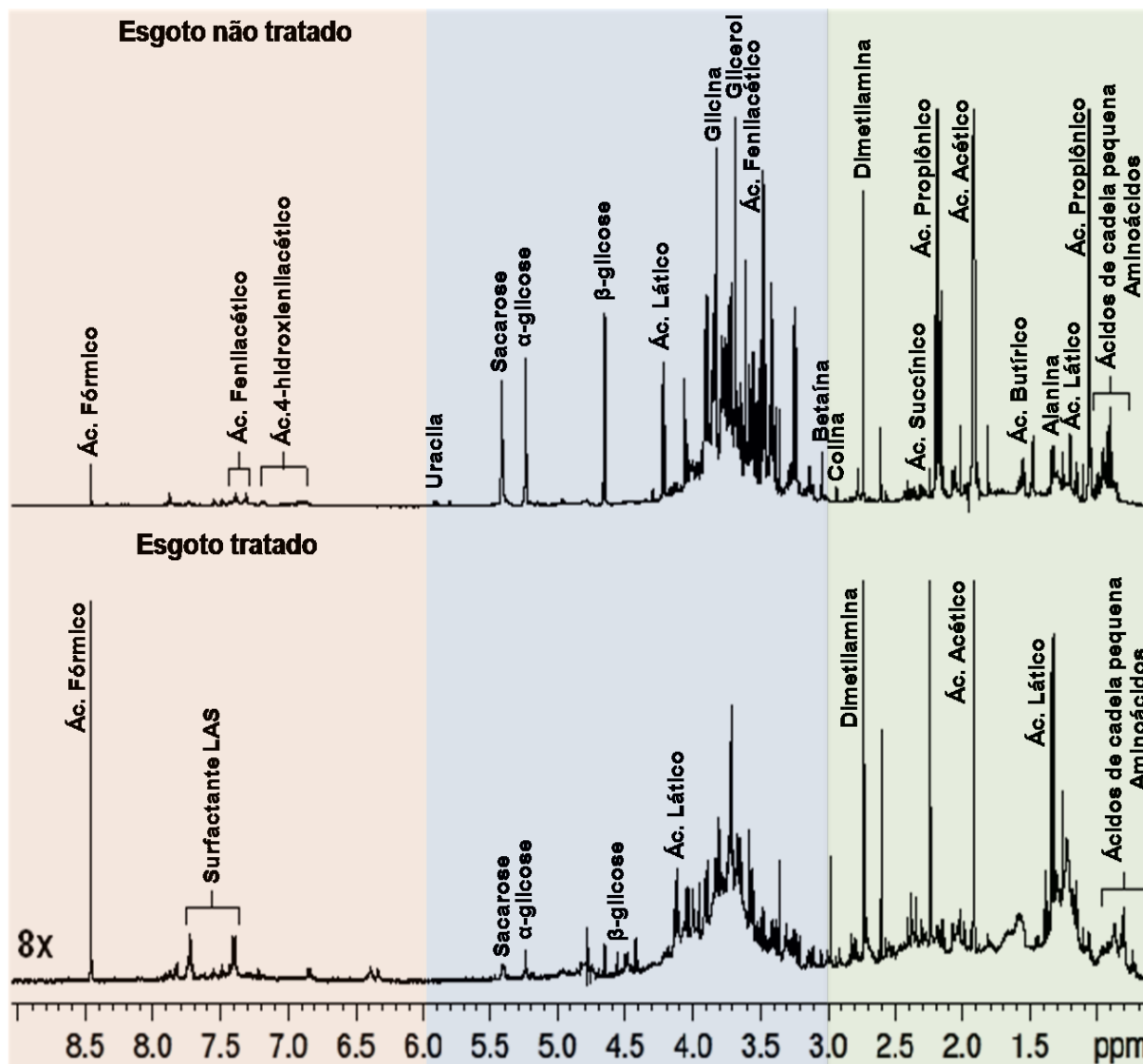


FIGURA 16 – Comparação entre os espectros de RMN de ^1H das amostras de esgoto não tratado e tratado.

Esta comparação espectral revelou um perfil químico semelhante entre as amostras de esgoto não tratado e tratado pela ETE, com variações sutis em determinados deslocamentos químicos, porém com grandes diferenças em termos de concentrações. Essas semelhanças foram verificadas porque as análises foram realizadas em amostras sem pré-tratamentos de extração ou separação, com

apenas filtração e secagem. Desta forma, foram detectados, sobretudo, os metabólitos primários. Através destes espectros, foi possível perceber a redução do número de substâncias químicas com o tratamento da ETE, bem como a degradação de poluentes e, conseqüentemente, o aparecimento de sinais que correspondem a subprodutos de degradação. Ainda neste sentido, em todas as amostras de esgoto tratado (efluente), foram detectados sinais inerentes a região espectral de hidrogênios aromáticos nos deslocamentos químicos em δ 7,40 e 7,73 que, apesar de estarem indicados na Figura 16, só foram caracterizados como os surfactantes aniônicos da classe LAS (*Linear Alkylbenzene Sulfonate*) após as análises descritas no Capítulo II deste trabalho.

Após uma avaliação preliminar dos espectros obtidos, pode-se observar que em determinadas amostras (em alguns dias), a degradação de alguns compostos (que ocorreu nos reatores anaeróbios UASB) como os carboidratos, foram bem menores quando comparadas aos compostos que apresentaram sinais na região alifática. Este fato pode ser explicado pelas interações que essas moléculas podem ter com compostos com estrutura mais complexa (macromoléculas) que, por efeito estérico, dificultaram a biodegradação.¹⁵⁴ Isso é um grande problema para o meio ambiente, pois o aumento excessivo de nutrientes pode aumentar o crescimento de micro-organismos e fitoplâncton no rio receptor do efluente e, assim, podendo levar até a sua eutrofização.¹⁵⁵

A Figura 16 também mostrou que as amostras de esgoto não tratado possuem altos níveis de estruturas alifáticas, com uma significativa redução em suas concentrações após o tratamento da ETE. Compostos com estruturas insaturadas também tiveram suas concentrações drasticamente reduzidas, porém, vários outros compostos, como aminoácidos e ácidos orgânicos de cadeia pequena, persistiram nas águas do esgoto tratado. Apesar da diminuição na concentração destes constituintes, eles ainda podem ter um efeito significativo nos ecossistemas devido à vazão de descarte do efluente no rio Monjolinho, que varia entre 636 e 1.050 L.s⁻¹. Estas substâncias podem exercer ação deletéria nos corpos d'água, como o consumo de oxigênio dissolvido nas águas, causando a morte de peixes e outros organismos aquáticos, liberação de maus odores, acarretar o escurecimento das águas e, com isso, dificultar a entrada de luz, dentre outros.¹⁵⁶ Além disso, o

descarte de compostos biologicamente instáveis no meio ambiente pode estimular a atividade microbiana, como relatado recentemente por Simpson *et al.* 2011.¹⁵⁷

Após a aquisição dos espectros de RMN de ^1H em quintuplicata para cada amostra de esgoto, estes foram utilizados como variáveis de entrada para o tratamento quimiométrico dos dados, que foi uma ferramenta fundamental para a seleção dos compostos considerados mais importantes nas amostras, sejam pela frequência de detecção e/ou intensidade dos sinais.

4.2 Análises quimiométricas dos dados de RMN de ^1H para estudo do esgoto sanitário doméstico

Nesta seção, modelos matemáticos multivariados foram desenvolvidos para correlacionarem a concentração dos analitos presentes nas amostras de esgoto com a correspondente faixa espectral para, assim, possibilitar predições estatisticamente confiáveis, mesmo que na presença de interferentes.

Nas análises quimiométricas desenvolvidas para avaliação integral dos constituintes químicos, cujas regiões espectrais selecionadas estão entre δ 0,70 e 8,50 (Figura 17b), as *bucket tables* resultaram em 195 variáveis (Figura 17a) para ambas as matrizes de esgoto não tratado e tratado, com exclusão da região de supressão dos hidrogênios relativos ao HOD, que está representada pela faixa preta.

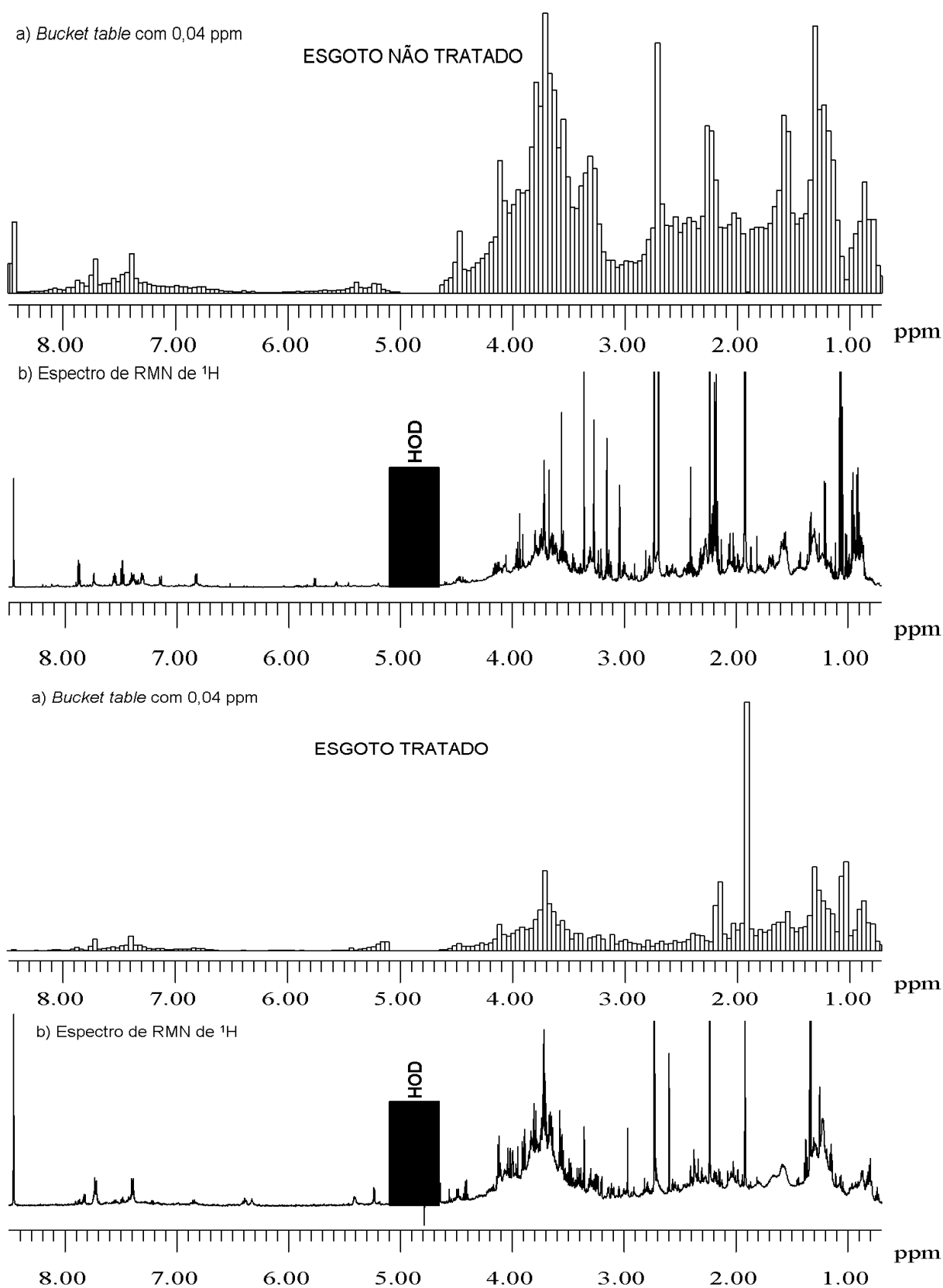
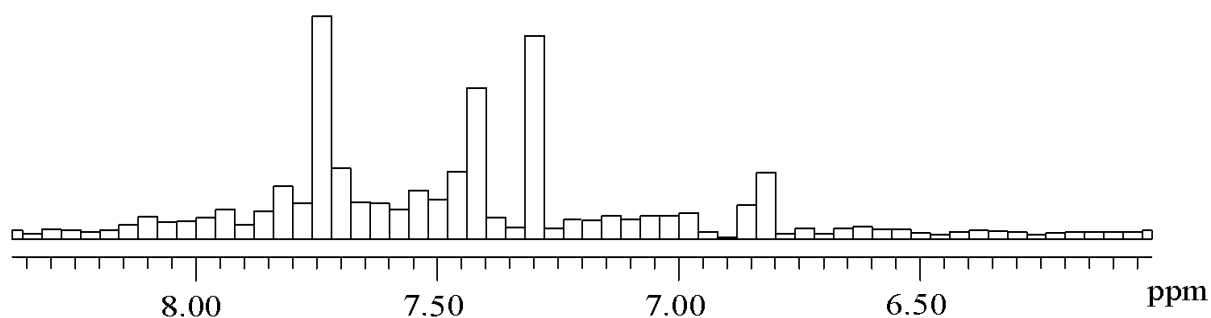
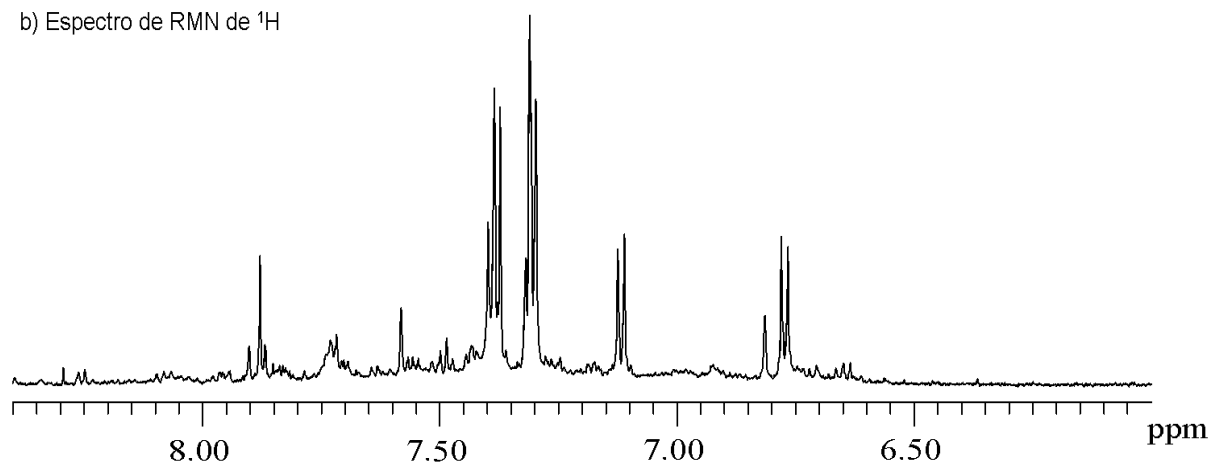


FIGURA 17 – a) Representações das *bucket tables* geradas pelo programa Amix[®]; b) Espectros de RMN de ^1H empregados nas análises quimiométricas, com exceção do sinal da HOD (faixa na cor preta).

Além disso, modelos foram criados para avaliar apenas os constituintes químicos possuidores de hidrogênios aromáticos, cuja região espectral selecionada foi de δ 6,50 a 8,40 (Figura 18b) e resultou na *bucket table* composta por 48 variáveis (Figura 18a).

a) *Bucket table* com 0,04 ppm

ESGOTO NÃO TRATADO

b) Espectro de RMN de ^1H a) *Bucket table* com 0,04 ppm

ESGOTO TRATADO

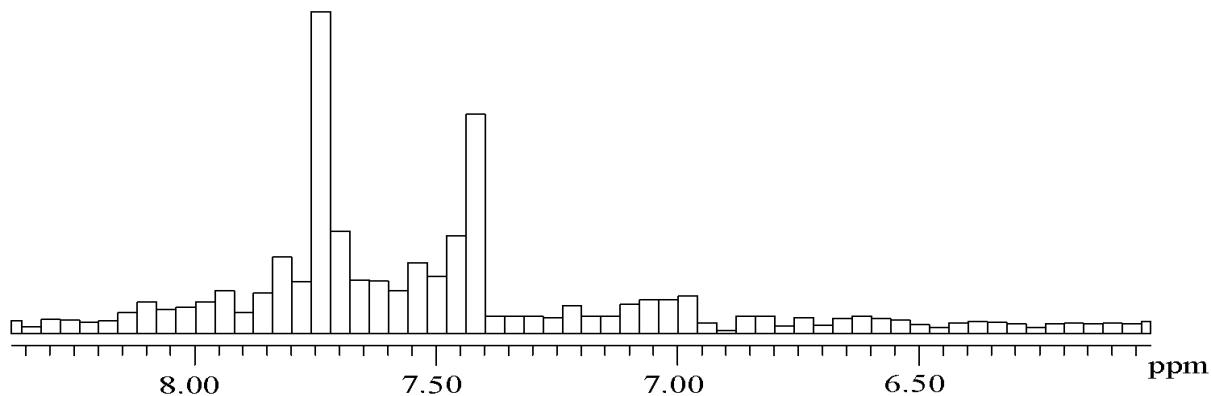
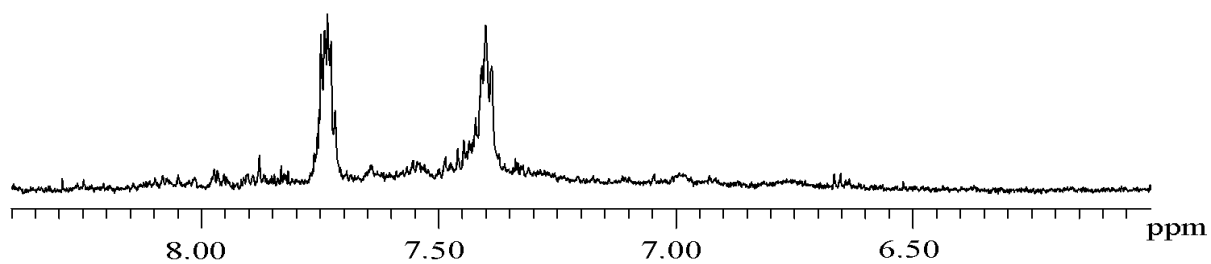
b) Espectro de RMN de ^1H 

FIGURA 18 – a) *Bucket tables* geradas pelo programa Amix[®]; b) Espectros de RMN de ^1H ilustrando as regiões aromáticas empregadas nas análises quimiométricas.

Depois de geradas as *bucket tables*, diversos processamentos foram testados para se iniciarem as análises quimiométricas, sendo que os melhores resultados obtidos foram com a centralização dos dados em torno da média, já que as correlações entre as amostras foram mais facilmente visualizadas. Esse processamento colocou a origem do grupo no centro do conjunto de dados, o que garantiu que todas as variáveis fossem medidas na mesma magnitude e não permitiu que ruídos afetassem negativamente as análises, e que pode ocorrer nas medidas espectroscópicas.¹³¹ Para todas as análises quimiométricas, foi utilizado um intervalo de confiança de 95%.

4.2.1 Matrizes das amostras de esgotos não tratado e tratado

Primeiramente, buscou-se fazer uma análise quimiométrica das matrizes de esgoto não tratado e tratado unidas, para se ter uma compreensão geral de como essas matrizes se comportam, além de identificar quais variáveis (compostos) seriam responsáveis pelas distinções das amostras. As análises a seguir foram realizadas a partir de 485 espectros de RMN de ¹H referentes a 1 ano de coleta (08/06/2011 – 13/06/2012), resultantes das quintuplicatas de 49 amostras de esgoto não tratado e 48 das amostras de esgoto tratado.

Visando fazer uma análise preliminar da estrutura dos dados, foi aplicado o método aglomerativo não-supervisionado (HCA) que, representado em um espaço bidimensional na forma de dendrograma, enfatiza os agrupamentos e seus padrões naturais.¹⁵⁸ Essa discriminação foi realizada com base na similaridade entre os espectros estimada a partir da distância euclidiana multidimensional entre as amostras. Na Figura 19, observa-se o dendrograma gerado através do programa quimiométrico Pirouette[®] 4.0 a partir das *bucket tables* produzidas pelo programa Amix[®]. Este dendrograma foi organizado com os dados no eixo “y” e o índice de similaridade no eixo “x”, de modo que as amostras ficassem dispostas em função da sua proximidade. Não obstante, podem ser observadas duas principais tendências de aglomerações: uma contendo as amostras oriundas do esgoto não tratado pela ETE (■) e outra contendo as amostras de esgoto tratado pela ETE (□).

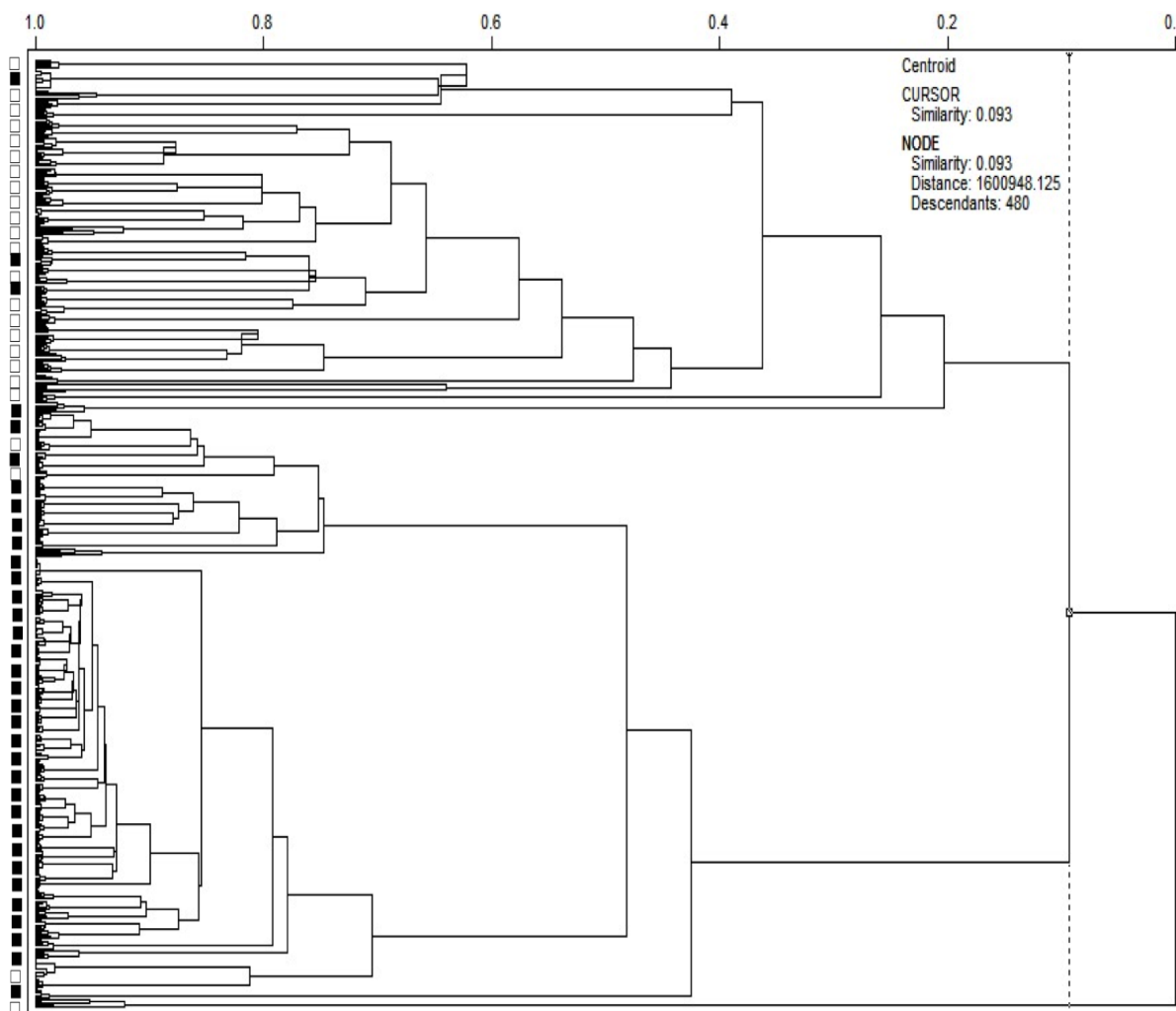


FIGURA 19 – Gráfico de agrupamentos naturais (HCA) das amostras de esgoto não tratado (■) e tratado (□).

O índice de similaridade de 0,093 entre os dois principais agrupamentos refletiu grandes diferenças naturais entre os grupos amostrais, já que valores próximos a zero representam tal situação.¹⁵⁹ Ainda neste sentido, com um índice de similaridade de zero, ou seja, nenhuma similaridade, pode ser observada uma amostra de esgoto não tratado com um comportamento anômalo quando comparada às outras amostras e, portanto, foi considerada como *outlier* neste modelo.

Para aperfeiçoar os padrões de discriminação dos constituintes químicos presentes nas amostras, algoritmos para Análises dos Componentes Principais (PCA) foram empregados. Na Figura 20 verifica-se a porcentagem da variância total explicada para as componentes principais (PCs), apresentadas na

forma de pontos. Neste gráfico pode-se perceber um nítido decréscimo da variância com o aumento do número de PCs e, com isso, contendo cada vez menos informação a respeito dos dados. Esta análise ajudou a compreender como e até quais PCs os dados podem ser explicados.

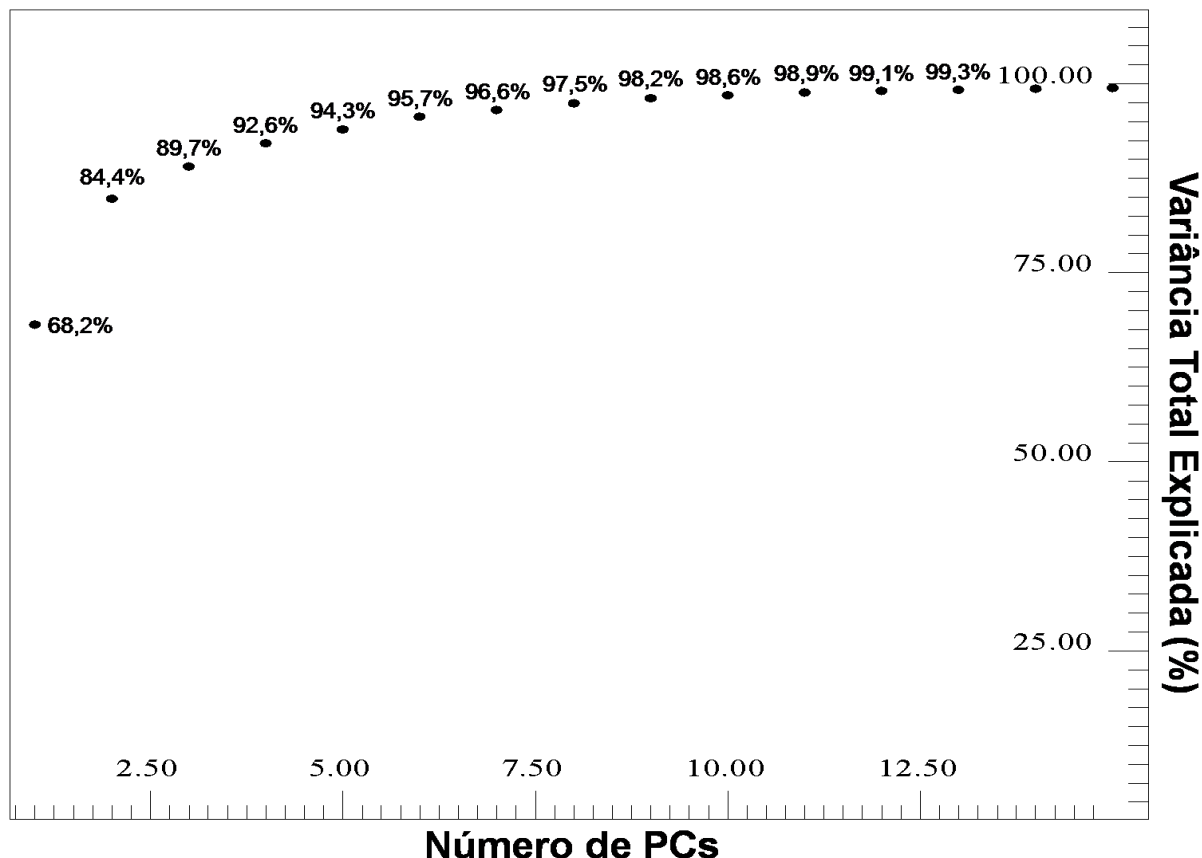


FIGURA 20 – Gráfico da variância explicada versus o número de PCs para as amostras de esgoto não tratado e tratado.

A Figura 21 apresenta a análise de PCA, com o gráfico de escores do lado esquerdo e o gráfico de pesos (*loadings*) do lado direito, onde as amostras de esgoto não tratado estão apresentadas na cor preta (●) e as amostras de esgoto tratado na cor azul (●), o que forneceu informações bastante relevantes quanto ao entendimento da variabilidade amostral.

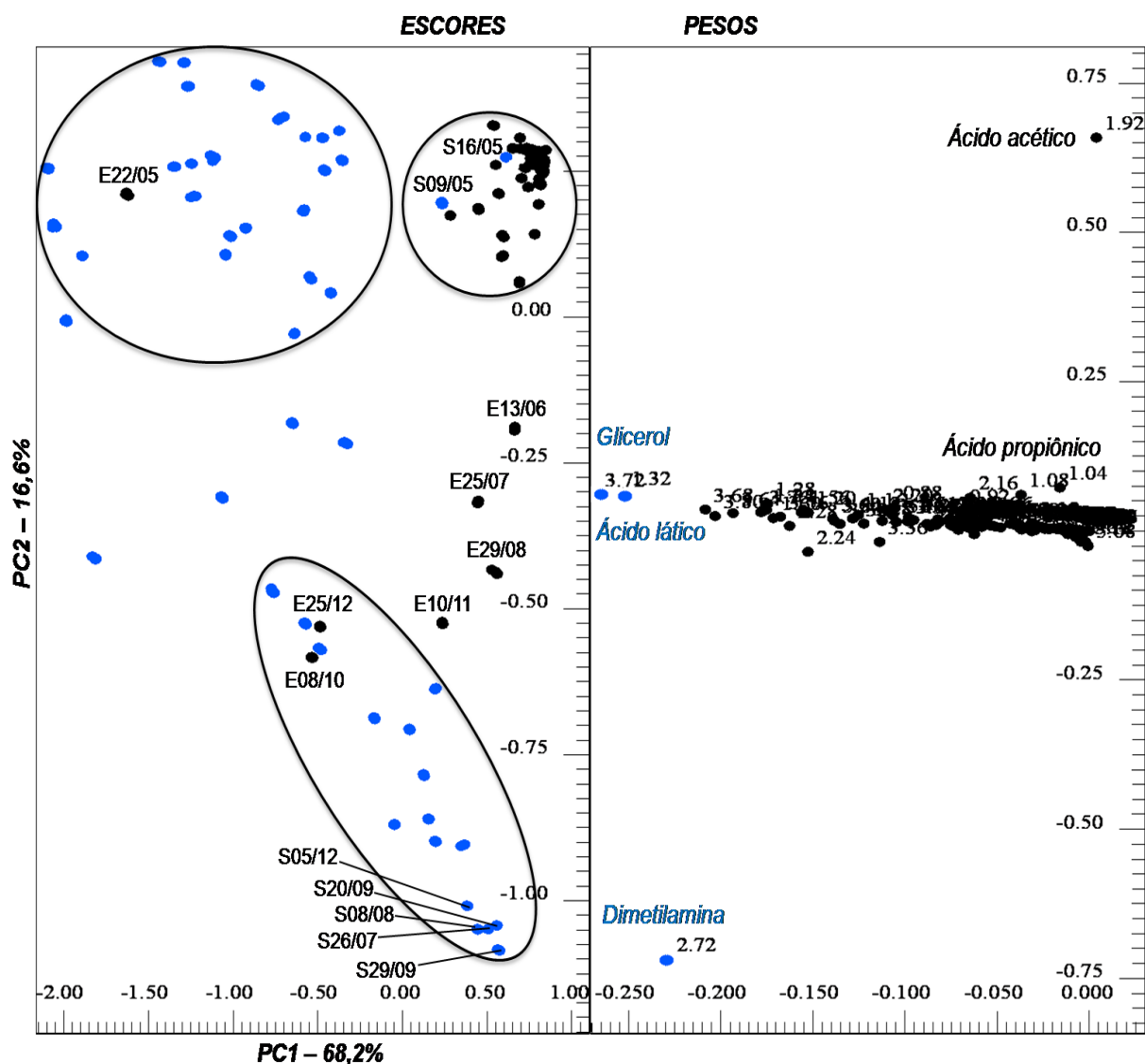


FIGURA 21 – Escores e pesos da PCA das 49 amostras de esgoto não tratado (“E” e cor preta) e 48 amostras de esgoto tratado (“S” e cor azul).

Para auxiliar nas interpretações dos dados na análise de PCA, o gráfico de pesos foi projetado em linhas e um espectro de RMN de ^1H também foi esboçado para ilustrar as regiões afetadas, para se conhecer quais e em qual extensão as variáveis contribuíram para os eixos de PC1 (azul) e PC2 (vermelho) (Figura 22).

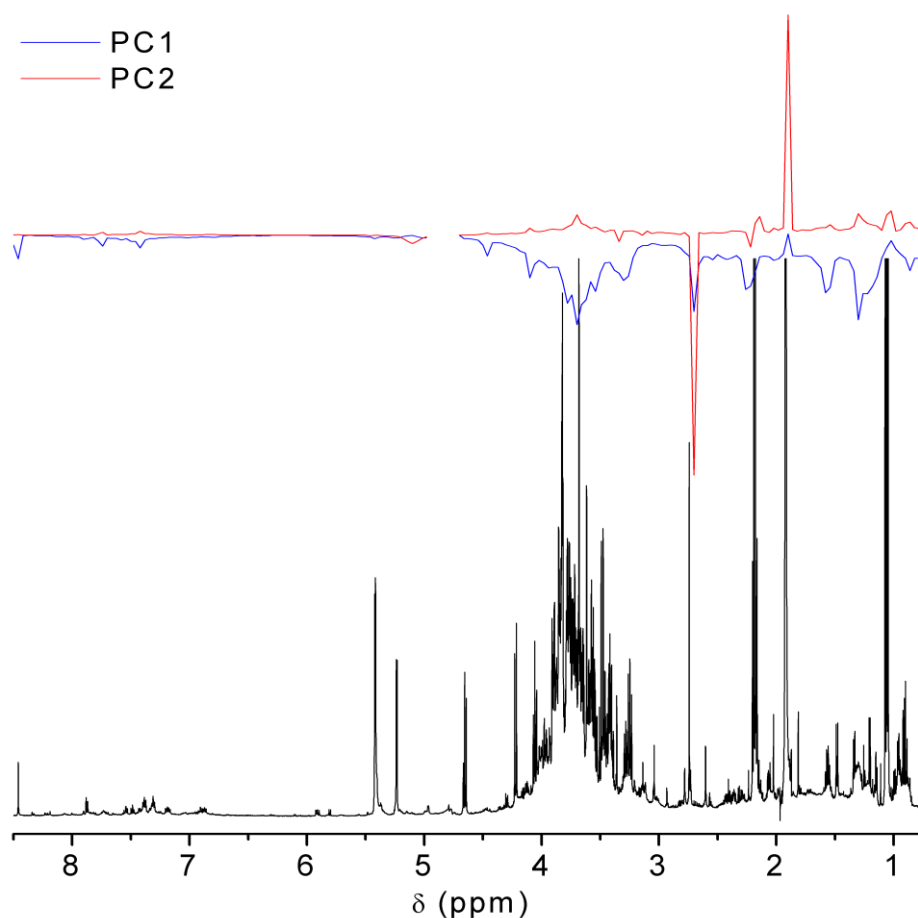


FIGURA 22 – Gráfico de pesos projetado em linhas e o espectro de RMN de ^1H para ilustrar suas regiões.

Os escores das informações adquiridas pela PCA, com 84,8% do total variância acumulada nos eixos diaxiais PC1 e PC2 (Figura 21), apresentaram uma tendência na separação das amostras corroborada pela análise de HCA. Basicamente, três principais agrupamentos se formaram neste espaço bidimensional, os quais estão destacados por elipses e círculos: um com as amostras de esgoto não tratado no lado positivo do eixo PC1 e PC2; outros dois com as amostras de esgoto tratado, sendo que um grupo está no lado negativo de PC1 e positivo de PC2 e outro agrupamento no lado positivo de PC1 e negativo de PC2. Por meio dos dois gráficos de pesos (coordenadas e em linhas) pode-se perceber que muitas variáveis apresentaram relevância no posicionamento das amostras no gráfico de escores. Isso era uma situação esperada, já que o tratamento do esgoto na ETE removeu grande parte dos componentes orgânicos. Também foi observado um comportamento antagônico das variáveis referentes ao composto dimetilamina e

aos compostos oriundos da degradação da matéria orgânica, os ácidos acético e propiônico.

A avaliação dos pesos a partir dos dados de RMN de ^1H na primeira PC, que representou 68,2% do total de variância, revelou associações, principalmente, com as concentrações de glicerol (δ 3,72) e ácido láctico (δ 1,32), este podendo ser oriundo do processo de fermentação dos carboidratos pela ação das bactérias ácido-lácticas (Figura 23).¹⁶⁰ O glicerol presente nas amostras de esgoto tratado também indicou que a degradação do material orgânico ocorrido nos reatores anaeróbios não foi finalizada.¹⁶¹

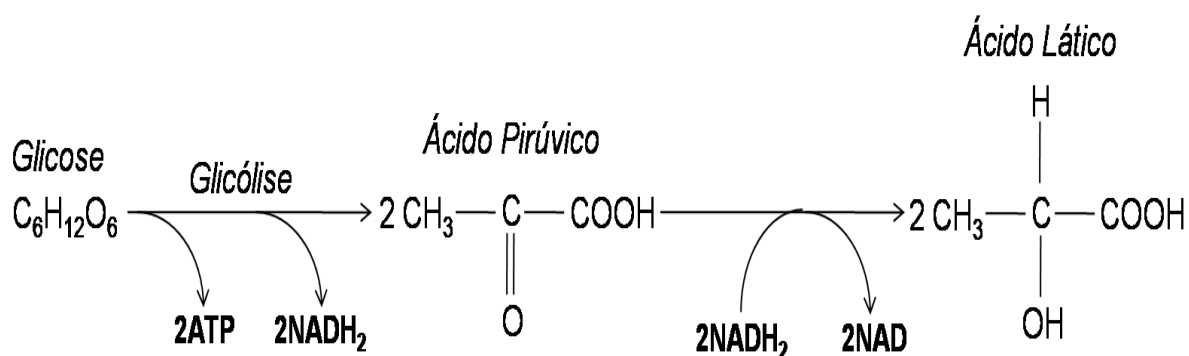


FIGURA 23 – Esquema reacional de produção de ácido láctico a partir da fermentação glicolítica.

As amostras de esgoto tratado (na cor azul) que se localizaram nos valores mais negativos da PC1, apresentaram as maiores concentrações dos compostos glicerol e ácido láctico. Também o posicionamento da variável que representa a dimetilamina (δ 2,72) nos valores negativos de PC1 e PC2 mostrou que as amostras de esgoto tratado apresentaram concentrações mais altas quando comparadas com as amostras de esgoto não tratado. Pode ser destacado que a dimetilamina é a amina alifática mais abundante na urina humana e animal, além de ser muito utilizada como catalisador no processo de vulcanização da borracha e na produção de pesticidas ou detergentes, o que pode refletir suas altas concentrações nas amostras de esgoto ao entrar na ETE em alguns dias.^{162,163}

A segunda PC, que acumulou 16,6% do total de variância, apresentou sua dependência em relação a compostos que representaram a degradação da matéria orgânica, como os ácidos acético (δ 1,92) e propiônico (δ 1,04-1,08 e 2,16)

nos valores mais positivos dessa PC. Com isso, as amostras de esgoto não tratado apresentaram altas concentrações de ambos os compostos, os quais decresceram com o tratamento da ETE. Esses resultados também indicaram a não remoção dos ácidos acético e propiônico nas amostras de esgoto tratado coletadas nos dias 09/05/2012 e 16/05/2012, pois estas se agruparam com as amostras de esgoto não tratado e, com isso, apresentaram composições similares. As amostras de esgoto tratado que foram coletadas nos dias 25/07/2011, 08/08/2011, 20/09/2011, 29/09/2011 e 05/12/2011 apresentaram as maiores concentrações de dimetilamina, que podem estar relacionadas a sua não decomposição e/ou a sua produção natural através da decomposição anaeróbica incompleta de proteínas e aminoácidos, como demonstrado na proposta reacional apresentada na Figura 24.^{164,165}

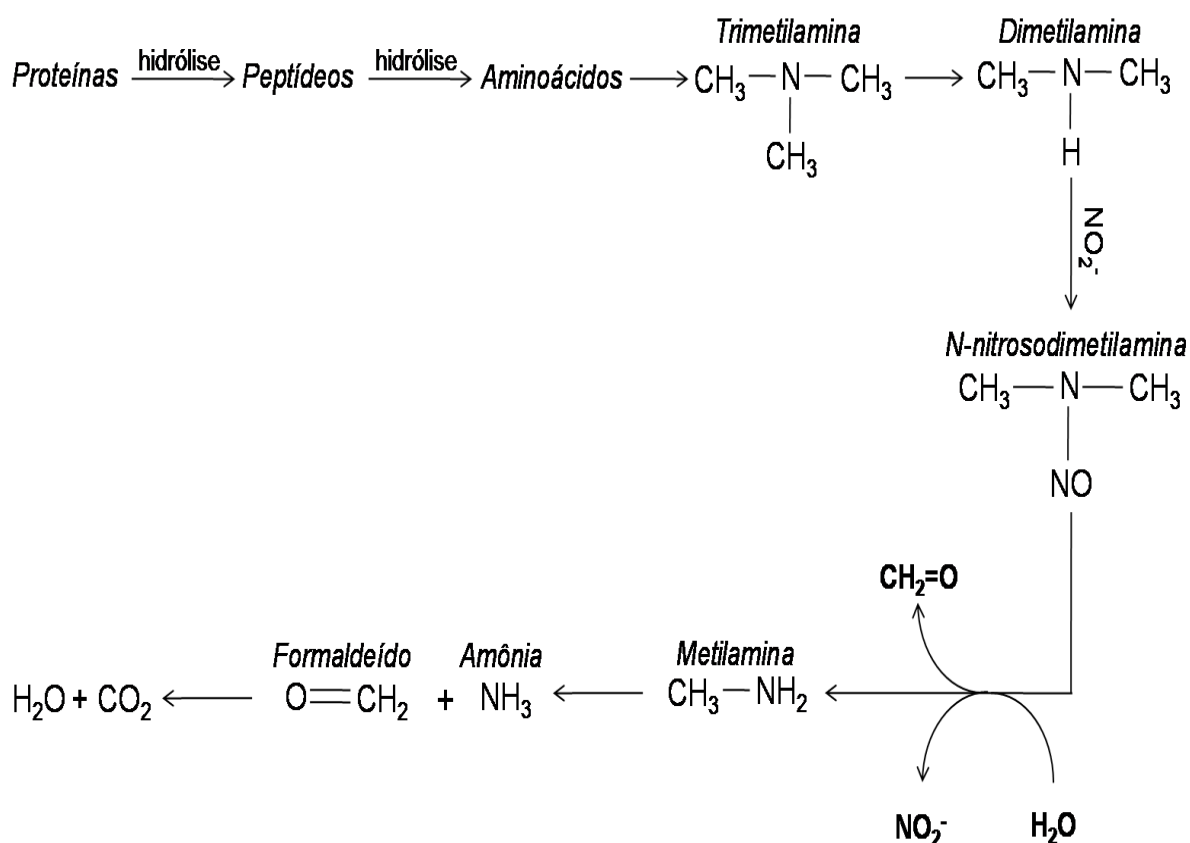


FIGURA 24 – Proposta reacional de formação e degradação da dimetilamina sob condições anaeróbicas.

Ainda foi observado que as amostras de esgoto não tratado que foram coletadas nos dias 29/08/2011, 08/10/2011, 10/11/2011, 25/12/2011, 22/05/2012 e

13/06/2012, apresentaram um decréscimo nas concentrações dos ácidos acético e propiônico e, conseqüentemente, grande quantidade de dimetilamina. Esse decréscimo foi decorrente da mistura que ocorreu entre as águas de esgoto com as águas pluviais, que está claramente ilustrado na seção 4.3 do Capítulo I. Esta mistura pode ser oriunda de conexões entre os sistemas de escoamento das águas de esgoto e pluviais que deveriam ser distintos, o que pode provocar grandes problemas decorrentes do aumento rápido e excessivo no volume de águas de esgoto e, com isso, causar avarias em todo o sistema de escoamento e tratamento. Portanto, a forma ideal para um sistema de tratamento de esgoto de uma cidade é existir redes distintas para escoamento das águas pluviais.

Portanto, todas as variações na composição orgânica das amostras de esgoto tratado podem ocorrer devido a ausência de condições favoráveis para o desenvolvimento dos micro-organismos nos reatores anaeróbios, como: falta de nutrientes; presença de substâncias tóxicas; pH inapropriado; problemas nos sistemas de armazenamento e tratamento de esgoto.^{166,167} Desta forma, a presença e variabilidade de compostos nas amostras de esgoto tratado evidenciaram uma ação incompleta dos microorganismos com características diferenciadas (ilustrado na Figura 4 da seção 1.1 da Introdução) na biodigestão do material orgânico complexo do esgoto. Esta etapa está melhor detalhada na seção 4.2.3, onde se avaliou apenas a matriz formada pelas amostras de esgoto tratado.

4.2.1.1 Região relativa a compostos aromáticos

Para acrescentar na interpretação dos dados multivariados, visando uma avaliação a contribuição dos hidrogênios aromáticos referentes aos deslocamentos químicos entre δ 6,50 e 8,40, uma análise quimiométrica foi aplicada exclusivamente com esse propósito.

A Figura 25 apresenta o dendrograma resultante da análise por HCA aplicada a partir das mesmas amostras de esgoto não tratado e tratado analisadas anteriormente, porém, avaliando apenas a região dos hidrogênios aromáticos. Nesse dendrograma percebeu-se que, com índice de similaridade de 0,223, há um forte agrupamento entre as amostras de esgoto não tratado (■) e sua clara segregação

das amostras de esgoto tratado (□), mostrando que existem diferenças pertinentes entre estes dois grupos.

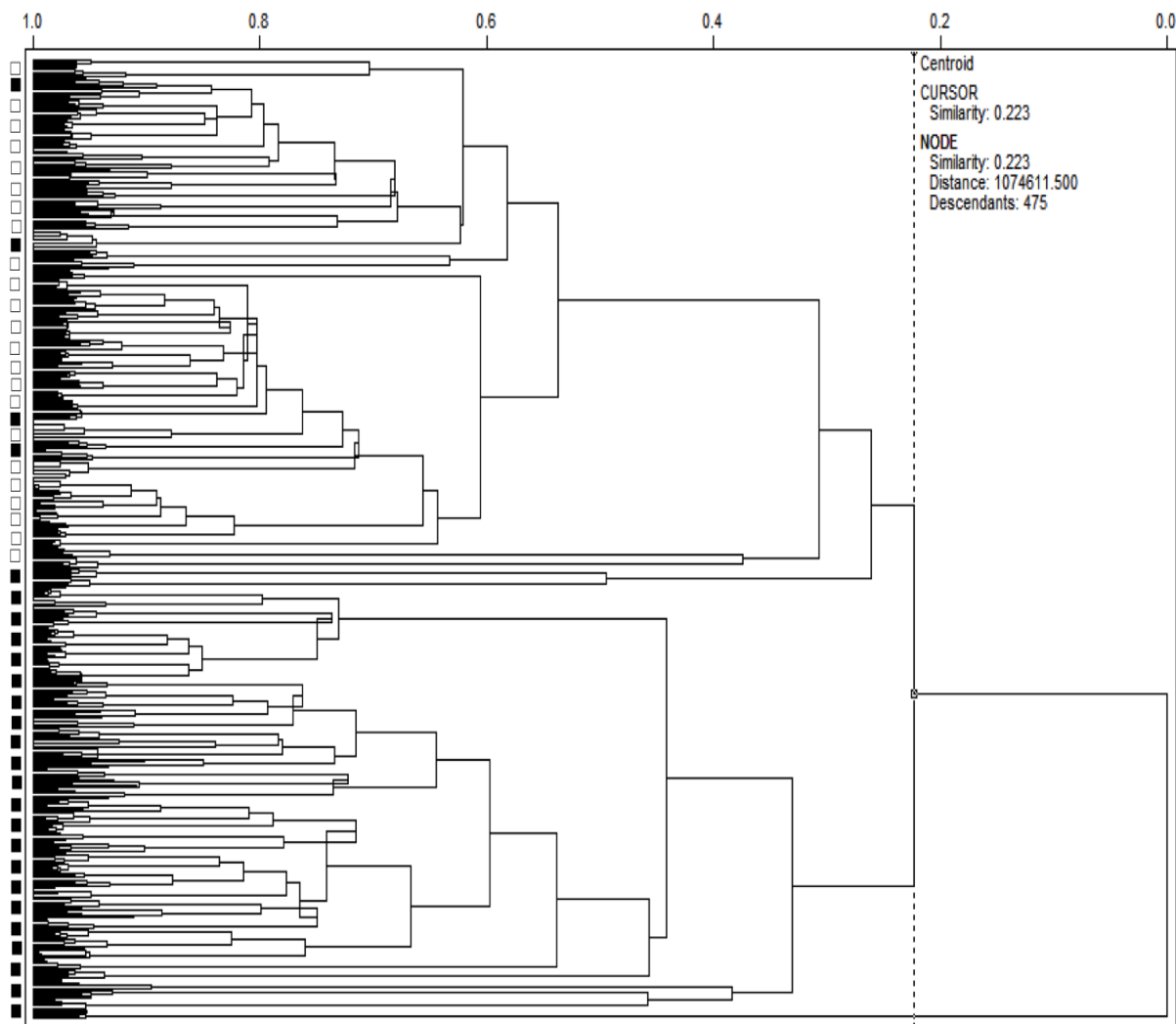


FIGURA 25 – Gráfico de agrupamentos naturais (HCA) das regiões de hidrogênios aromáticos das amostras de esgoto não tratado (■) e tratado (□).

No gráfico de escores do lado esquerdo na Figura 26, com 77,5% da variância total acumulada, pode-se visualizar a separação das amostras de esgoto não tratado, apresentadas pela cor preta (●), das amostras de esgoto tratado na cor azul (●), confirmado pela análise de HCA.

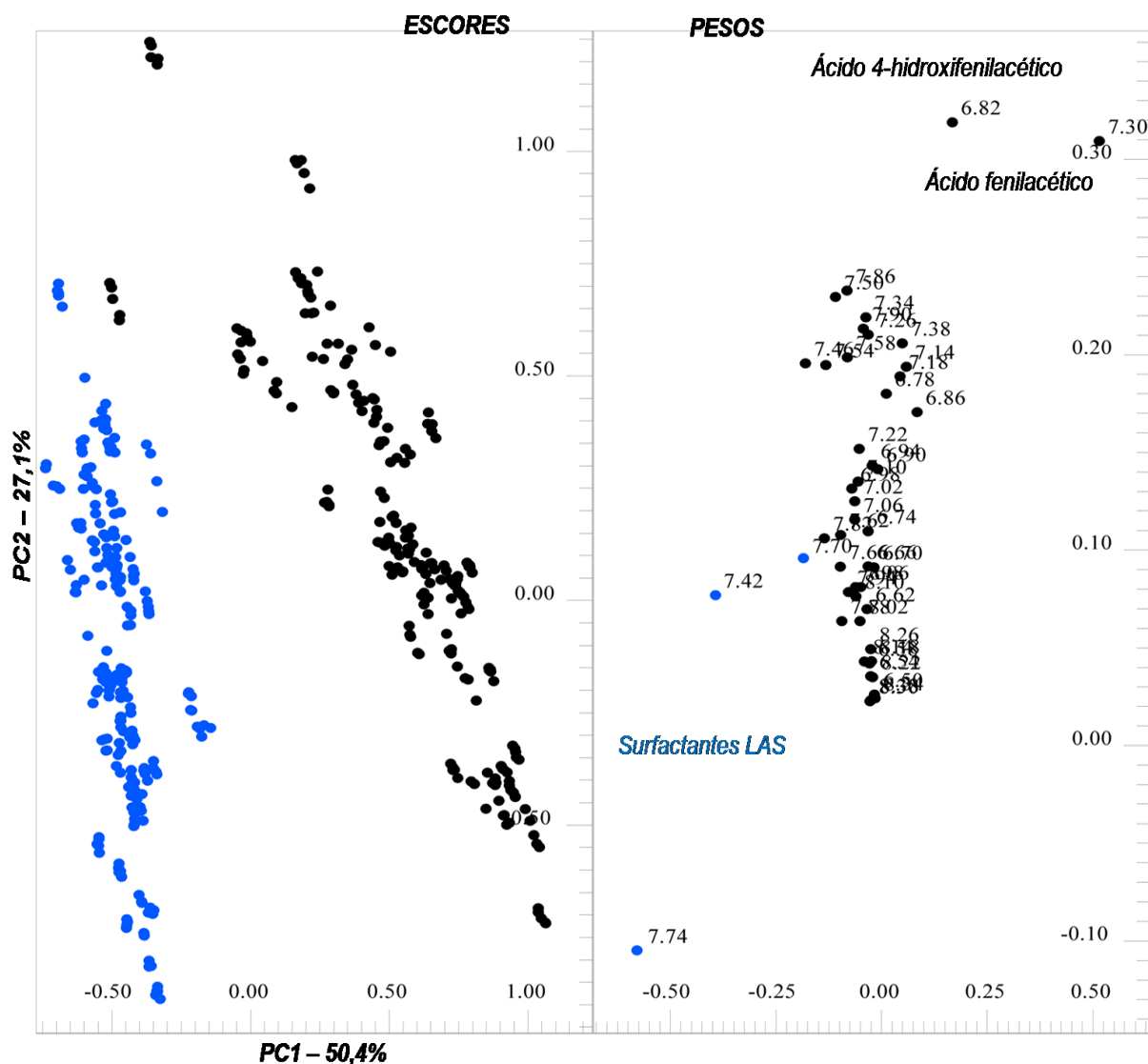


FIGURA 26 – Escores e pesos do sistema de coordenadas PC1 e PC2 para as regiões de hidrogênios aromáticos das amostras de esgoto não tratado e tratado.

O gráfico de pesos projetado em linhas com o espectro de RMN de ^1H para ilustrar as regiões, também auxiliaram na interpretação de quais e quanto cada variável contribuiu para cada PC (Figura 27).

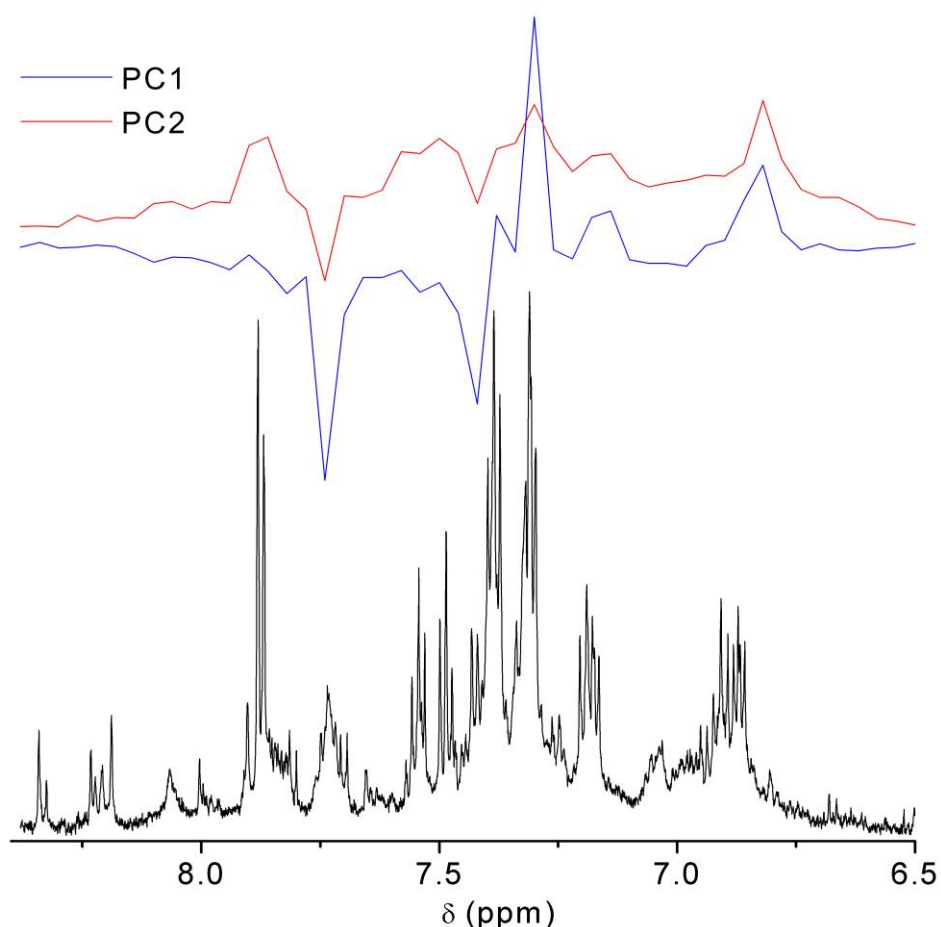


FIGURA 27 – Gráfico de pesos projetado em linhas e o espectro de RMN de ^1H para ilustrar suas regiões.

Desse modo, os gráficos de pesos, tanto em coordenadas como em linhas, sugeriram as altas concentrações dos ácidos fenilacético (δ 7,30) e hidroxifenilacético (δ 6,82) nas amostras de esgoto não tratado que estão alocadas em valores mais positivos de PC1, com a completa degradação destes compostos quando observado o posicionamento das amostras de esgoto tratado nos valores negativos de PC1. Além disto, os resultados também mostraram que os surfactantes LAS, com seus deslocamentos químicos em δ 7,42 e 7,74, não foram completamente removidos com o tratamento do esgoto na ETE. Essa recalcitrância dos LAS ocorreu devido ao tipo de degradação utilizada no tratamento biológico, unicamente anaeróbico (via UASB), o qual não possui grande efetividade na remoção dos surfactantes aniônicos, muito utilizados nos produtos para limpeza.

4.2.2 Matriz das amostras de esgoto não tratado

Após a compreensão geral de ambas as matrizes de esgoto não tratado e tratado, foram desenvolvidas análises quimiométricas para um entendimento mais detalhado das variações dentro de cada matriz de esgoto separadamente, visando estabelecer padrões de comportamento dos constituintes químicos orgânicos e os efeitos que os influenciaram. Desta maneira, foram avaliadas as amostras de esgoto anterior ao tratamento da ETE para estabelecer modelos relacionados a sazonalidade da coleta e, tentar identificar prováveis descartes anômalos no sistema comum de esgoto da cidade, como de indústrias, já que estas necessitam pré-tratar seus efluentes adequadamente anterior ao seu descarte.¹⁶⁸ Para isso, as seguintes análises foram desenvolvidas a partir de 245 *bucket tables* resultantes de 49 amostras analisadas em quintuplicata.

Como feito anteriormente, visando examinar a estrutura geral dos dados presentes na matriz de esgoto não tratado foi aplicado o método HCA para enfatizar os agrupamentos naturais, que está representado na Figura 28 na forma de dendrograma. Portanto, para se conhecer padrões aglomerativos de acordo com a sazonalidade da coleta, fez-se as seguintes considerações: as amostras que foram coletadas nas estações do ano com temperaturas relativas menores, nos meses de junho, julho e agosto de 2011, maio e junho de 2012, estão representadas por □; amostras coletadas nas estações com temperaturas maiores, entre setembro de 2011 e abril de 2012, estão representadas por ■.

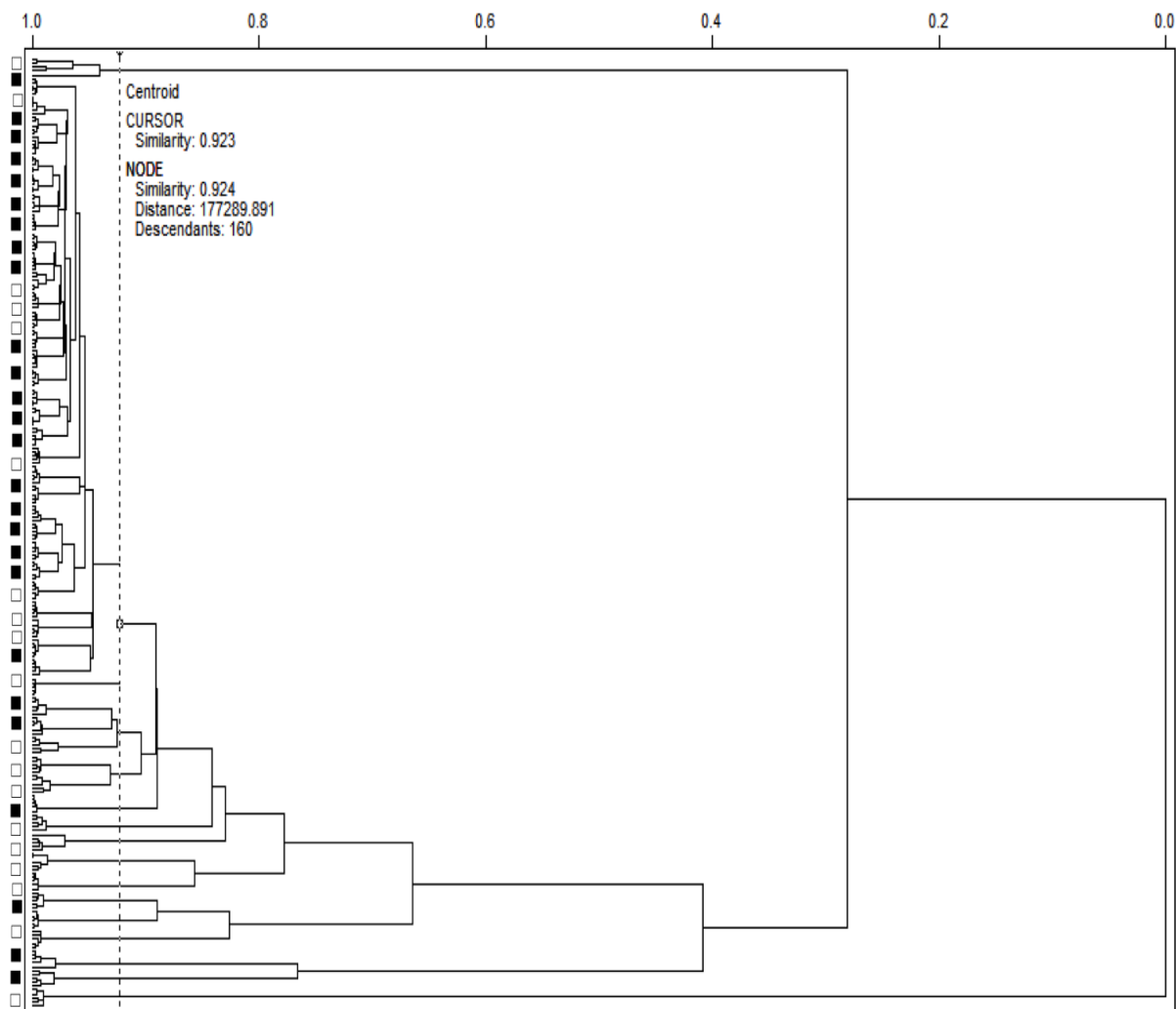


FIGURA 28 – Gráfico de agrupamentos naturais (HCA) das amostras de esgoto não tratado coletadas: junho, julho e agosto de 2011 (□); setembro de 2011 a abril de 2012 (■).

Assim sendo, pode ser observada uma tendência de duas aglomerações amostrais, porém com um alto índice de similaridade de 0,924. Além disso, com um índice de similaridade zero, ou seja, nenhuma similaridade, pode ser confirmado o comportamento anômalo daquela mesma amostra detectada anteriormente nas análises da seção 4.2.1.

A Figura 29 apresenta as relações bidimensionais entre as primeiras e segundas PCs adquiridas apenas para as amostras de esgoto não tratado, as quais acumularam 66,6% do total da variância. Nesse resultado podem ser notados densos agrupamentos amostrais que representaram relações semelhantes entre a maioria das amostras, corroborado pela análise de HCA. O gráfico de escores

apresentou uma tendência de agrupamentos relacionados às coletas nos meses: setembro de 2011 a abril de 2012 na cor em preta (●), que estão associadas a estações do ano com temperaturas relativas altas; junho, julho e agosto de 2011 e maio e junho de 2012 na cor verde (●), que estão associadas a estações do ano com menores temperaturas; 08/10/2011, 10/11/2011, 16/11/2011, 18/12/2011 e 25/12/2011, em azul (●), que estão associadas a mistura das águas de esgoto e águas pluviais.

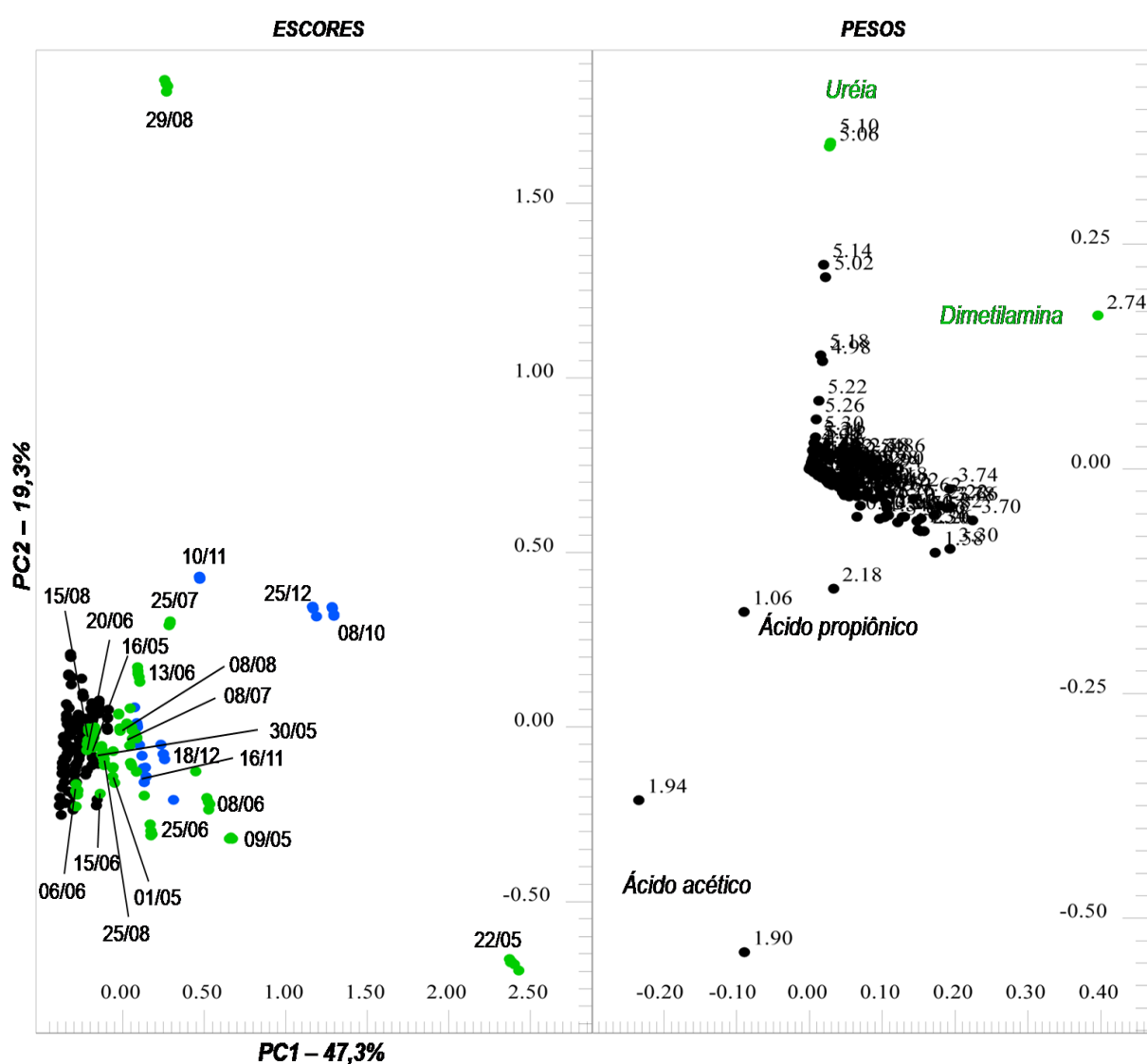


FIGURA 29 – Escores e pesos do sistema de coordenadas PC1 e PC2 para amostras de esgoto não tratado.

O gráfico de pesos projetado em linhas a seguir com seu respectivo espectro de RMN de ^1H que ilustra suas regiões (Figura 30), contribuíram para a interpretação das variáveis que mais afetaram cada PC da Figura 29.

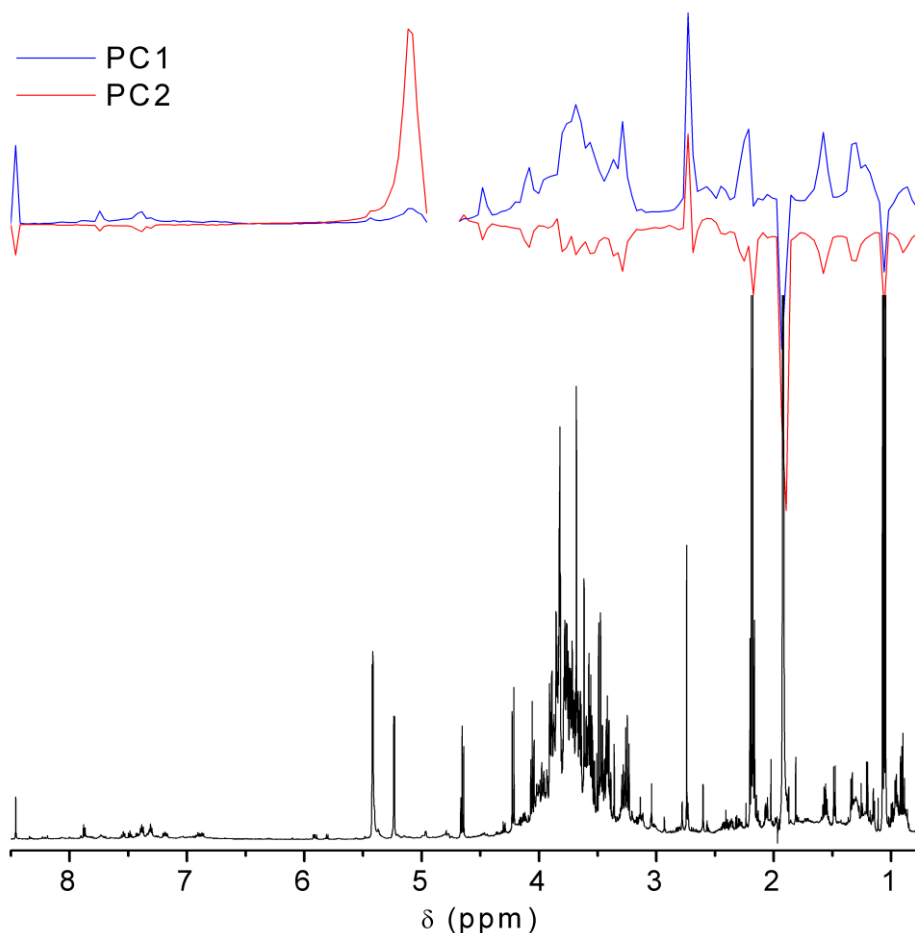


FIGURA 30 – Gráfico de pesos projetado em linhas e o espectro de RMN de ^1H para ilustrar suas regiões.

As análises dos gráficos de pesos sugerem que a tendência da separação das amostras em PC1 ocorreu devido aos domínios espectrais situados em δ 1,90-1,94 (ácido acético), δ 1,06 e 2,18 (ácido propiônico), que estão relacionadas às variações sazonais durante o ano de coleta. Neste sentido, os valores mais negativos de PC1 estão associados a altas concentrações destes compostos, que podem ser relacionadas a estações do ano com temperaturas relativas maiores, porque nesse período tem-se maior atividade bacteriana e, com isso, maior degradação da matéria orgânica presente no esgoto anterior a sua entrada na ETE. O inverso aconteceu para as amostras na cor verde que foram

coletadas em estações do ano com temperaturas relativas menores, pois apresentam menores concentrações destes mesmos compostos devido a menores atividades bacterianas e, portanto, menor degradação da matéria orgânica.

Pode ser observado também que as águas da chuva tiveram grande influência nas concentrações dos ácidos acético e propiônico nas amostras apresentadas na cor azul. Confirmando a irregularidade da mistura das águas da chuva com as águas de esgoto, sendo melhor ilustrado nas análises quantitativas da seção 4.3. Este fato não deveria ocorrer, porque a ETE possui sua vazão de água para tratamento limitada entre 636-1050 L.s⁻¹, e um aumento imprevisto do fluxo pode comprometer equipamentos, instalações e o próprio tratamento.

Outros compostos como o glicerol (δ 3,72), dimetilamina (δ 2,74) e trimetilamina (δ 3,30) estão associados a valores positivos do eixo PC1, os quais se destacaram quando as concentrações dos compostos relacionados a degradação da matéria orgânica diminuíram. Valores positivos do eixo PC2, que acumulou 19,3% do total de variância, estão relacionados a altas concentrações de uréia (δ 4,98-5,26), que foi bastante elevada na amostra coletada no dia 29/08/2011. A alta concentração deste composto pode estar relacionada a descartes de efluentes não pré-tratados oriundos de processos industriais ou produtivos, como granjas de frango no entorno de São Carlos-SP, já que havia muitas penas de aves misturadas às águas de esgoto no dia da coleta. Isso mostra a possibilidade da utilização dessa metodologia para rastrear compostos que foram descartados anomalmente.

Ainda na análise da matriz das amostras de esgoto não tratado, a Figura 31 apresenta os resultados quimiométricos obtidos para os eixos PC3 e PC4 que, apesar de possuírem uma baixa variância total acumulada (4,2%), apresentaram informações relevantes quanto a compreensão da variabilidade amostral. Os eixos PC3 e PC4 foram relacionados a variações na concentração de dimetilamina (δ 2,72), além do eixo PC4 também estar relacionado com as variações das concentrações de glicerol (δ 3,72) e uréia (δ 5,04-5,12) durante o ano da coleta.

urina também se relacionaram com a alta concentração de uréia nas amostras posicionadas em valores negativos de PC4.

Já nos valores positivos de PC4, observa-se que as amostras que foram coletadas nos dias 25/12/2011 e 08/10/2011, na cor vermelha (●) apresentaram altos teores de glicerol, provavelmente devido a descartes comerciais ou industriais não pré-tratados. Vale destacar que o glicerol é bastante utilizado em produções alimentícias e de medicamentos.^{169,170}

4.2.2.1 Região relativa a compostos aromáticos

Como feito na seção anterior, uma análise quimiométrica foi realizada utilizando apenas os deslocamentos químicos presentes na região entre δ 6,50 e 8,40, para avaliar as contribuições de hidrogênios aromáticos e acrescentar na interpretação dos dados multivariados.

A Figura 32 apresenta um dendrograma resultante da análise por HCA desenvolvida a partir das mesmas amostras de esgoto não tratado avaliadas anteriormente nesta seção. Da mesma forma, para se conhecer padrões aglomerativos de acordo com a sazonalidade da coleta, fez-se as mesmas considerações: coletas feitas durante as estações com temperaturas relativas menores do ano, junho, julho e agosto de 2011, maio e junho de 2012, estão representadas por □; coletas durante as estações com temperaturas relativas maiores no ano, entre setembro de 2011 e abril de 2012, estão representadas por ■.

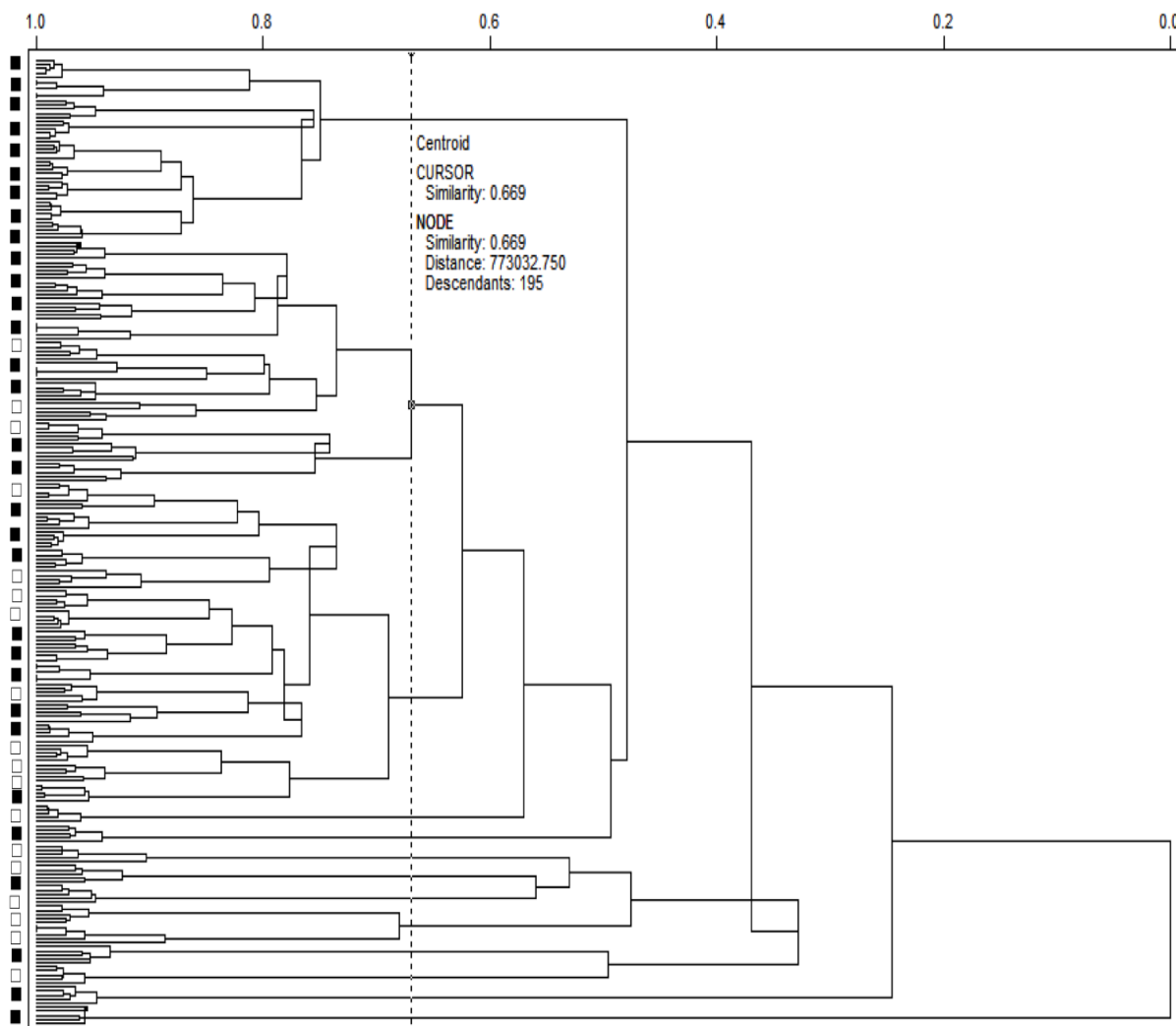


FIGURA 32 – Gráfico de HCA das regiões aromáticas das amostras de esgoto não tratado coletadas: maio, junho, julho e agosto de 2011 em □; entre setembro de 2011 e abril de 2012 em ■.

Com um alto índice de similaridade (0,669), a matriz apresentou uma pequena aglomeração entre as amostras coletadas nas estações do ano com temperaturas maiores, além de apresentar duas amostras com um comportamento completamente distinto das outras, com um índice de similaridade zero.

Buscando uma análise mais aprofundada da variabilidade dentro da matriz, foi aplicada análise de PCA que resultou em 72,7% da variância total acumulada nos eixos PC1 e PC2 (Figura 33), com o gráfico de pesos projetado em linhas apresentado na Figura 34 para auxiliar na interpretação dos dados.

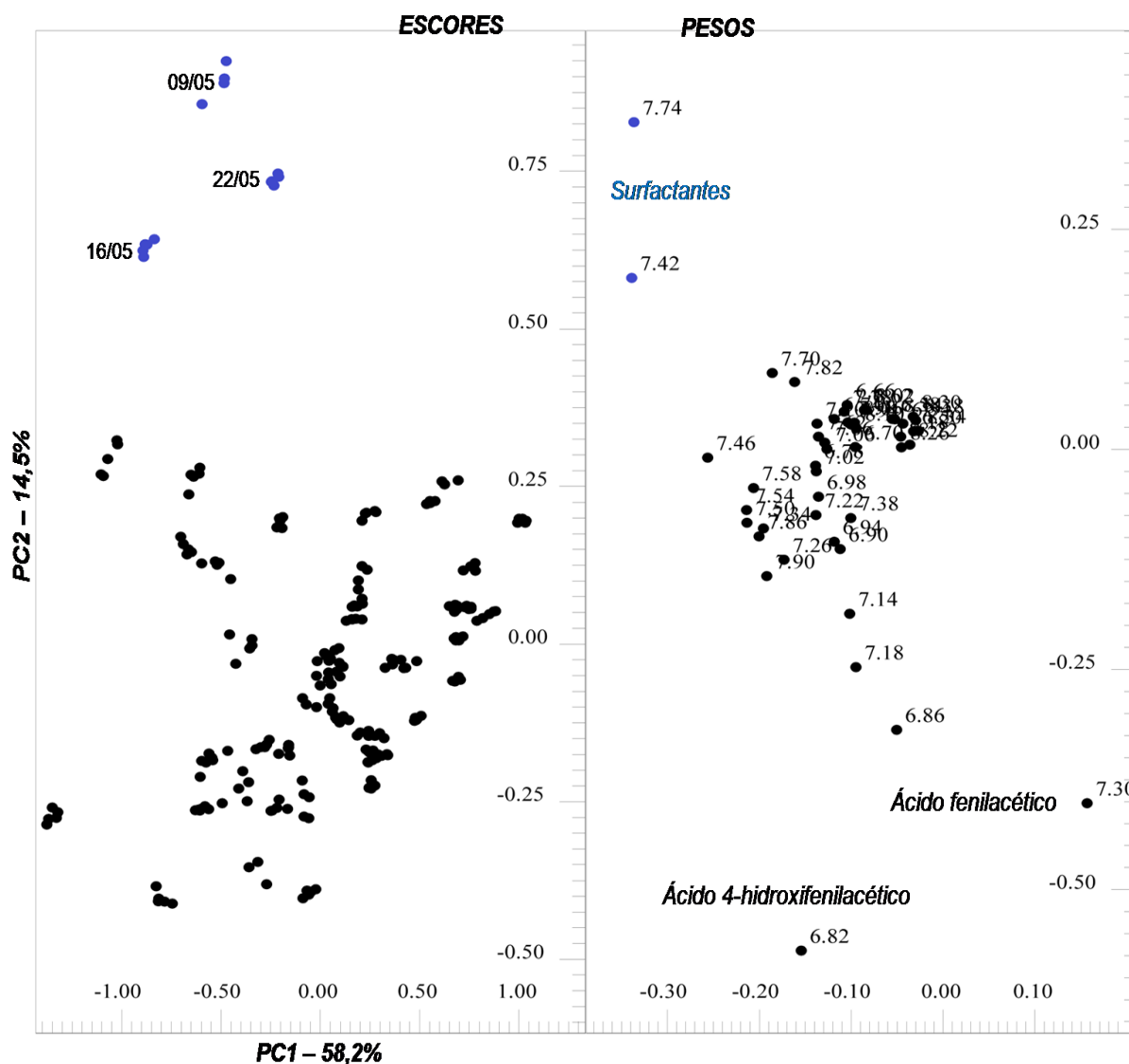


FIGURA 33 – Gráficos de escores e pesos do sistema de coordenadas PC1 e PC2 relativos a região de hidrogênios aromáticos das amostras de esgoto não tratado.

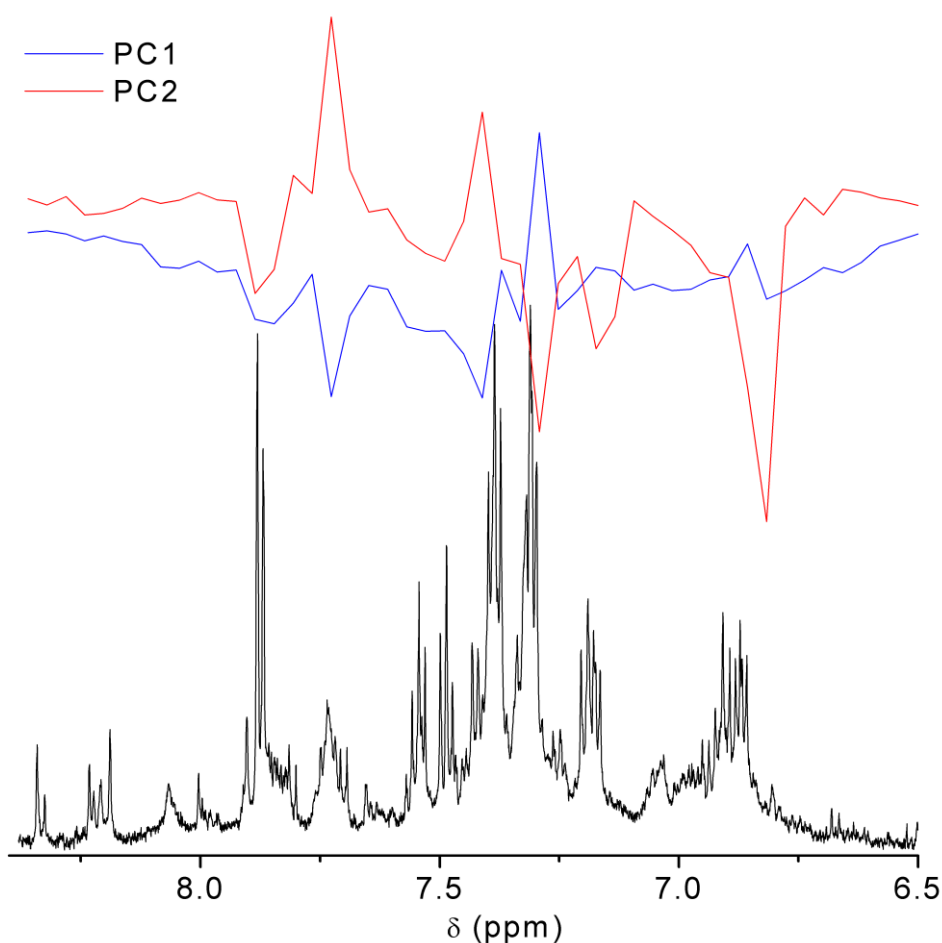


FIGURA 34 – Gráfico de pesos projetado em linhas e o espectro de RMN de ^1H para ilustrar suas regiões.

Analisando as Figuras 33 e 34, basicamente, percebeu-se que as amostras que foram coletadas no mês de maio de 2012 e estão alocadas nos valores positivos de PC2, na cor azul (●), apresentaram as maiores concentrações dos surfactantes LAS (δ 7,74 e 7,42). Estas maiores concentrações podem ser atribuídas a descartes anômalos no sistema comum de esgoto da cidade, como águas de lavagem com alto teor de produtos de limpeza, como os detergentes. Ainda nesta análise foi notado que as amostras posicionadas em valores mais negativos de PC2, na cor preta (●), apresentavam altas concentrações relativas dos ácidos 4-hidroxifenilacético (δ 6,82-6,86 e 7,14-7,18) e fenilacético (δ 7,30), que poder-se-ia relacionar a descartes anômalos, já que é o composto precursor dos fármacos não esteroidais.¹⁷¹

4.2.3 Matriz das amostras de esgoto tratado

Para a compreensão mais detalhada da variação dos constituintes químicos orgânicos na matriz de esgoto tratado, foram feitas análises quimiométricas construídas a partir de 240 *bucket tables* (quintuplicada de 48 amostras). Com isso, pode-se estabelecer padrões relativos às variações decorrentes do tratamento e/ou identificar prováveis produtos relacionados a degradações ou biotransformações de compostos orgânicos.

A Figura 35 apresenta o dendrograma resultante da análise por HCA que foi desenvolvido para buscar agrupamentos ou separações que evidencie variações nas concentrações dos constituintes e, assim, auxiliar na compreensão das análises de PCA. Nele, percebeu-se uma clara agregação de algumas amostras que foram coletadas no período entre 09/09/2011 e 24/04/2012 (■), com um índice de similaridade de zero, além de tendências de agrupamentos entre as amostras que foram coletadas nos meses de maio, junho, julho e agosto de 2011, maio e junho de 2012 (□), que apresentaram um índice de similaridade de 0,200 em relação às outras amostras.

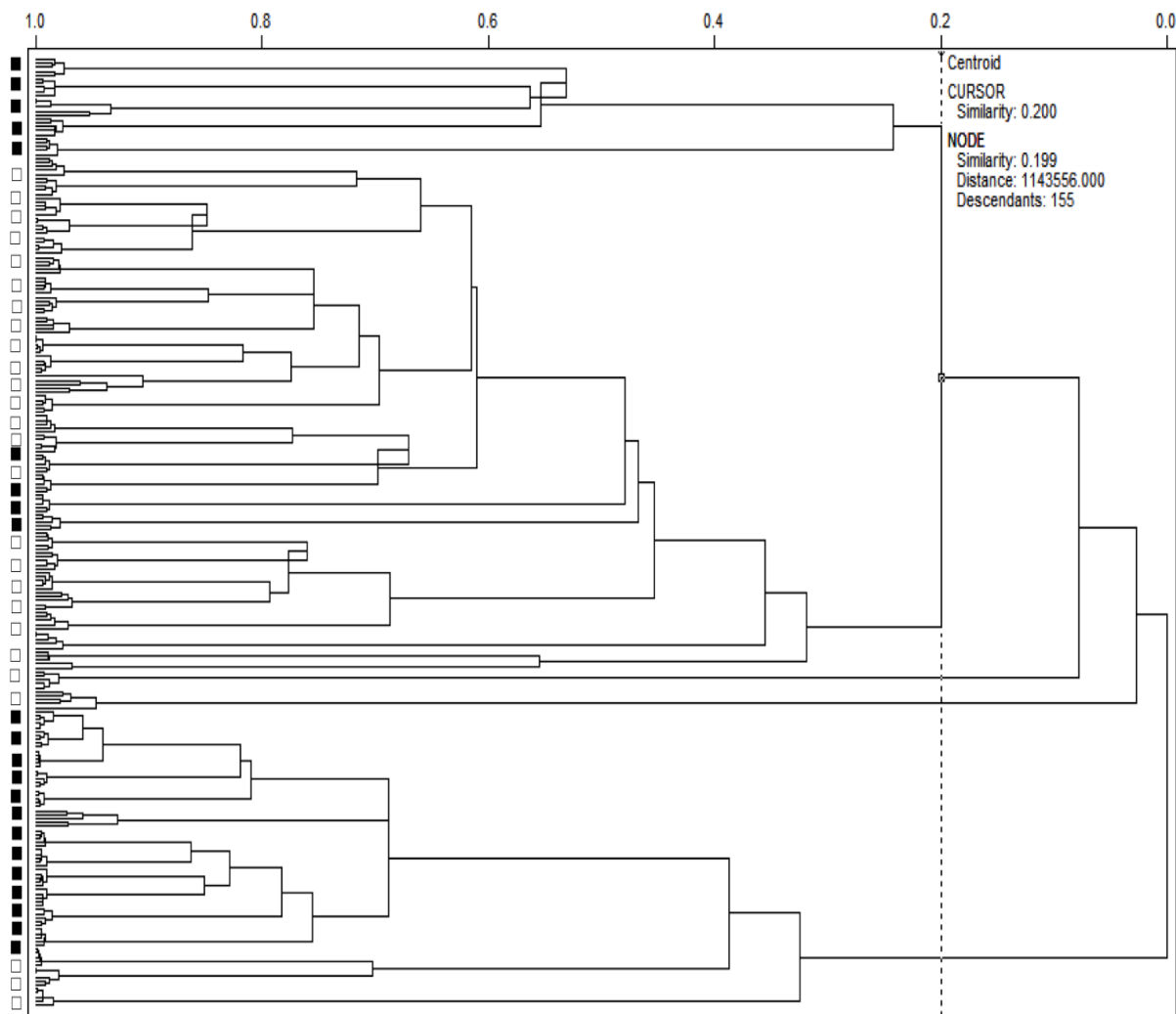


FIGURA 35 – Gráfico de HCA das amostras de esgoto tratado coletadas: maio, junho, julho e agosto de 2011 em □; entre setembro de 2011 e abril de 2012 em ■.

Portanto, na continuidade das análises quimiométricas e para melhor compreensão da variabilidade dos dados, foram aplicados algoritmos de PCA que resultaram em um novo perfil de posicionamento das amostras, com 79,4% da variância total dos dados acumulados na primeira e segunda PCs (Figura 36).

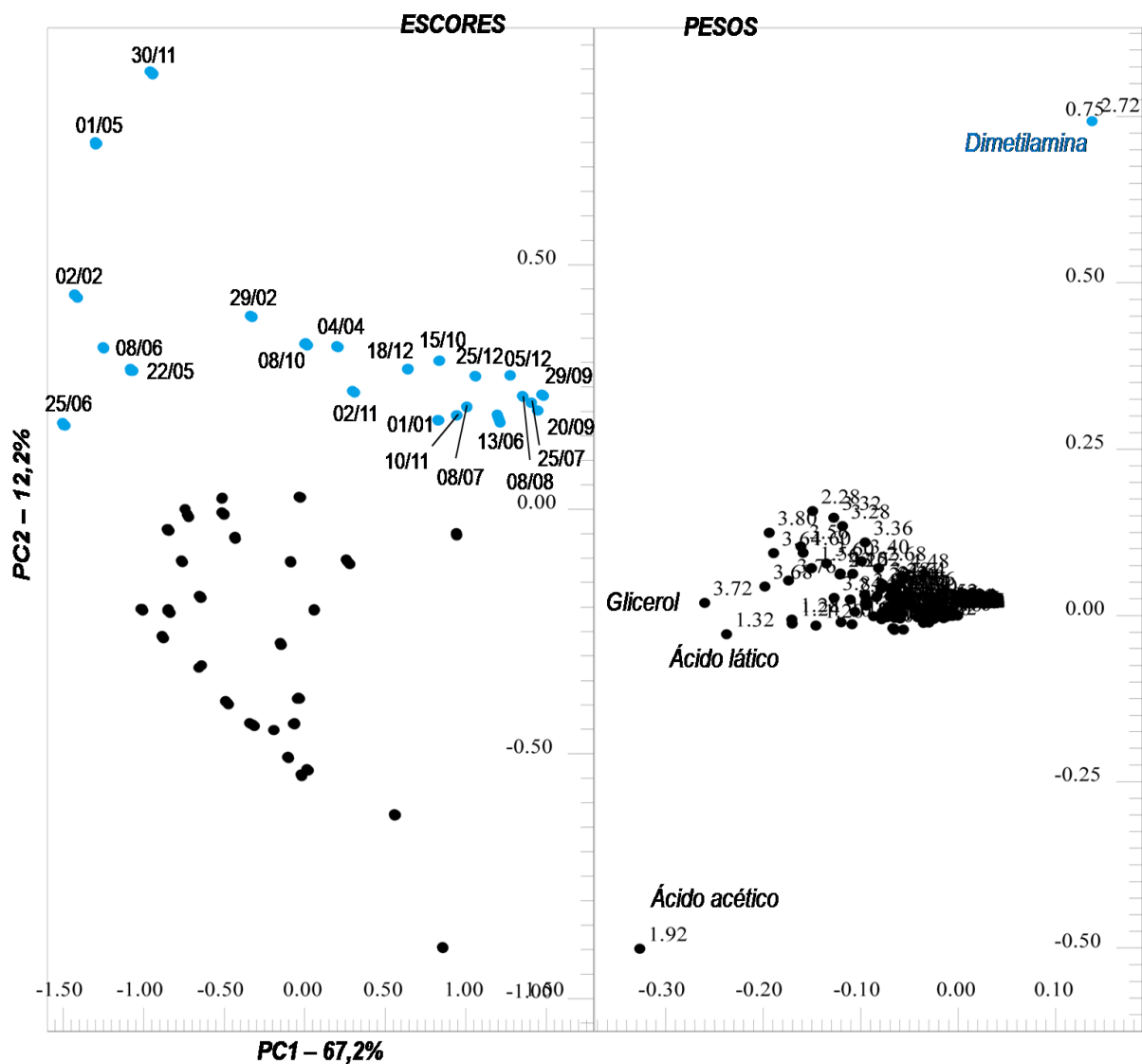


FIGURA 36 – Escores e pesos do sistema de coordenadas PC1 e PC2 para amostras de esgoto tratado.

O gráfico de pesos projetado em linhas representado pela Figura 37, com seu respectivo espectro de RMN de ^1H para ilustrar suas regiões, auxiliou e corroborou nas interpretações de quais variáveis e quanto de cada uma contribuiu para a PC1 e PC2.

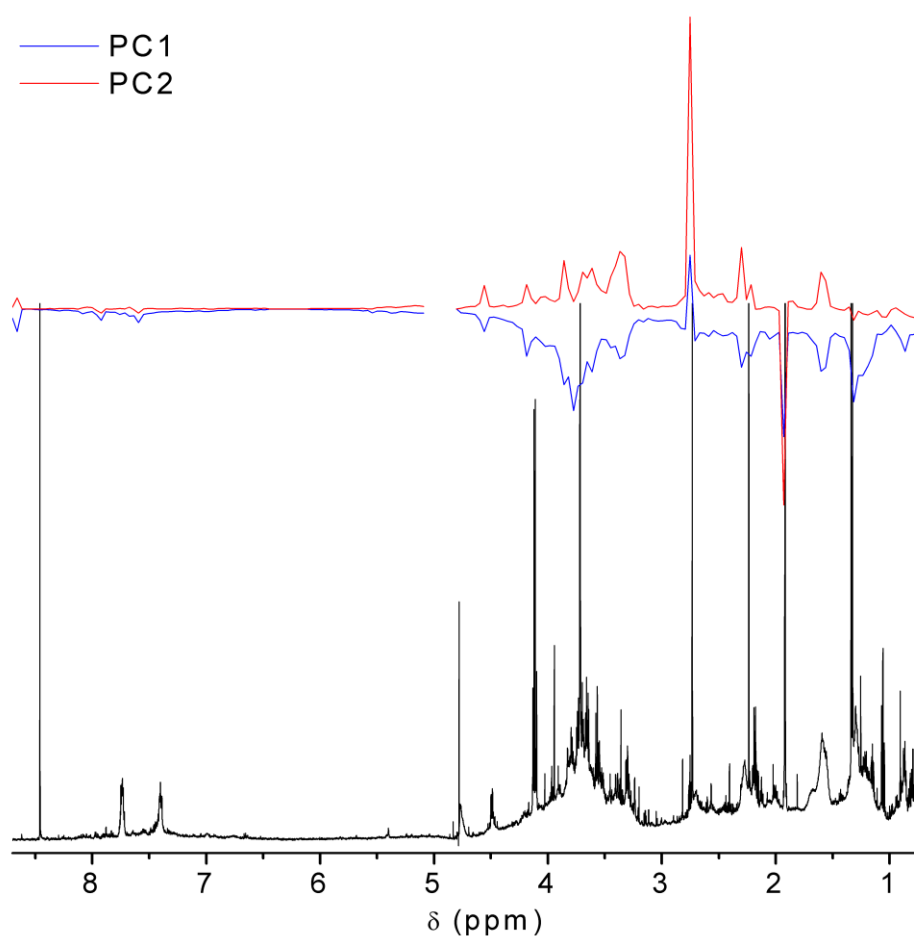


FIGURA 37 – Gráfico de pesos projetado em linhas e o espectro de RMN de ^1H para ilustrar suas regiões.

Nessa análise mais detalhada da variabilidade amostral dentro da matriz de esgoto tratado, pode ser evidenciada a ação incompleta dos micro-organismos nos reatores anaeróbios UASB, responsáveis pela degradação do material orgânico presente nas águas de esgoto. Portanto, o ácido láctico (δ 1,32) e o glicerol (δ 3,72) foram os compostos que mais se destacaram na composição das amostras nos valores mais negativos da PC1 (esgoto tratado), onde suas presenças podem evidenciar a incompleta degradação da matéria orgânica no produto final, o metano, por meio da ação das bactérias acetogênicas e acidogênicas, respectivamente.

As concentrações relativas altas de dimetilamina nas amostras destacadas pela cor azul (●) mostraram a sua provável produção pela degradação de aminoácidos e proteínas e/ou a sua não degradação, já que é a amina alifática de maior concentração na urina.¹⁶³

4.2.3.1 Região relativa a compostos aromáticos

Como feito anteriormente, para averiguação da variabilidade amostral dentro da matriz de esgoto tratado construída a partir da região referente aos compostos aromáticos (δ 6,50-8,40), foram desenvolvidas as análises quimiométricas por HCA e PCA a seguir.

A Figura 38 apresenta o dendrograma resultante da análise de HCA desenvolvida a partir das mesmas amostras de esgoto tratado utilizadas na seção 4.2.3. Da mesma forma, para se conhecer padrões aglomerativos de acordo com a sazonalidade da coleta, fez-se as mesmas considerações: coletas durante as estações de temperaturas relativas menores no ano, maio, junho, julho e agosto de 2011, maio e junho de 2012, estão simbolizadas por □; coletadas durante as estações com temperaturas relativas maiores no ano, entre setembro de 2011 e abril de 2012, estão representadas por ■. No dendrograma observa-se duas aglomerações intensas entre as amostras, com um baixo índice de similaridade de 0,418 entre os agrupamentos. O motivo deste agrupamento apenas foi entendido após as análises por PCA. Ainda, com um índice de similaridade zero (nenhuma similaridade), a matriz apresentou duas amostras com um comportamento completamente distinto quando comparadas às outras.

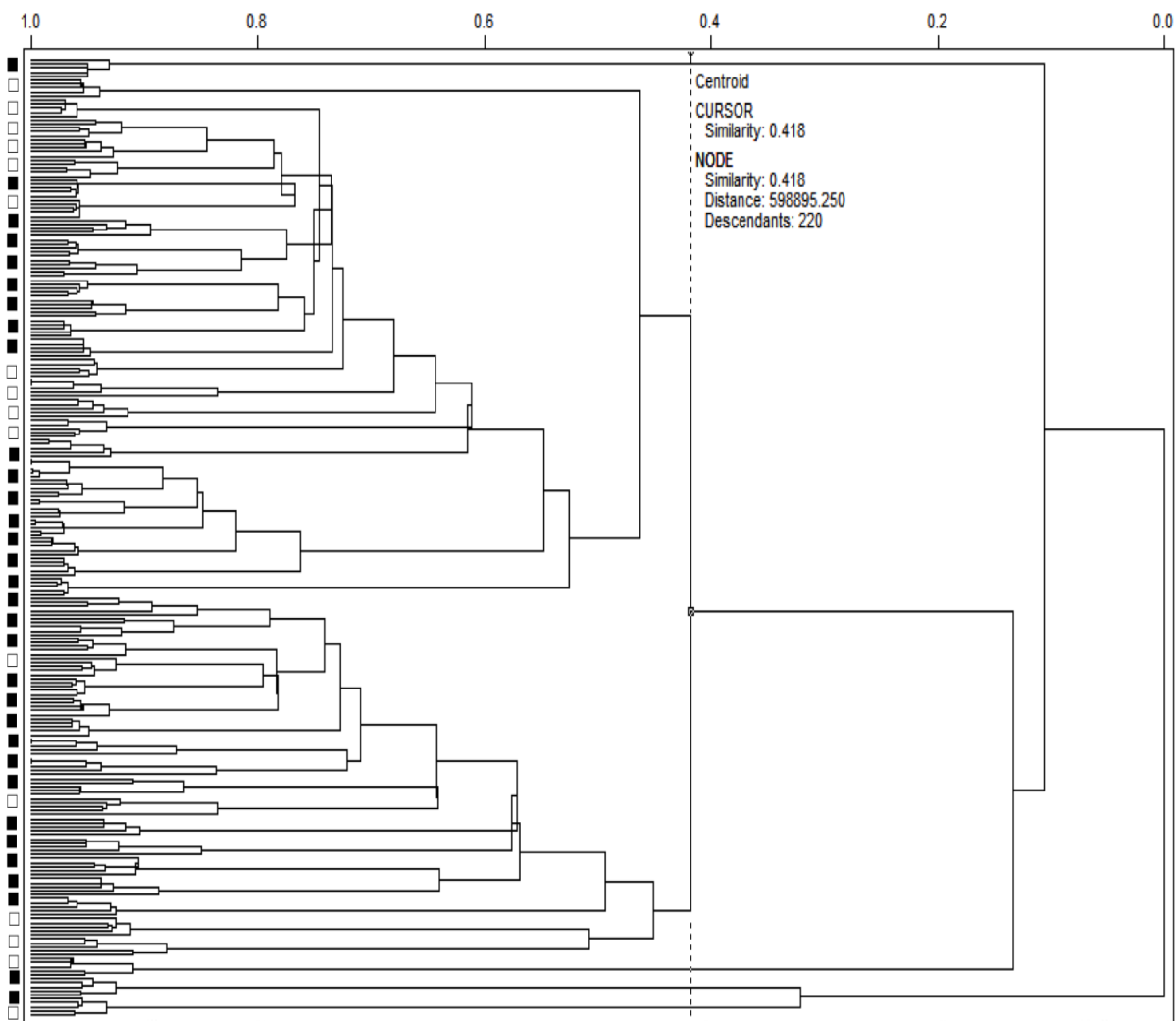


FIGURA 38 – Gráfico de HCA das regiões dos hidrogênios aromáticos para amostras de esgoto tratado coletadas em: maio, junho, julho e agosto de 2011 em □; entre setembro de 2011 e abril de 2012 em ■.

Para uma análise mais detalhada das variações dentro da matriz, foi aplicada a análise de PCA, a qual apresentou 68,9% da variância total acumulada nos eixos PC1 e PC2 (Figura 39 - a), e 7,1% da variância total acumulada nos eixos PC5 e PC6 (Figura 40 - b), com seus respectivos gráficos de peso projetados em linhas e espectros de RMN de ^1H para auxiliar na compreensão dos resultados.

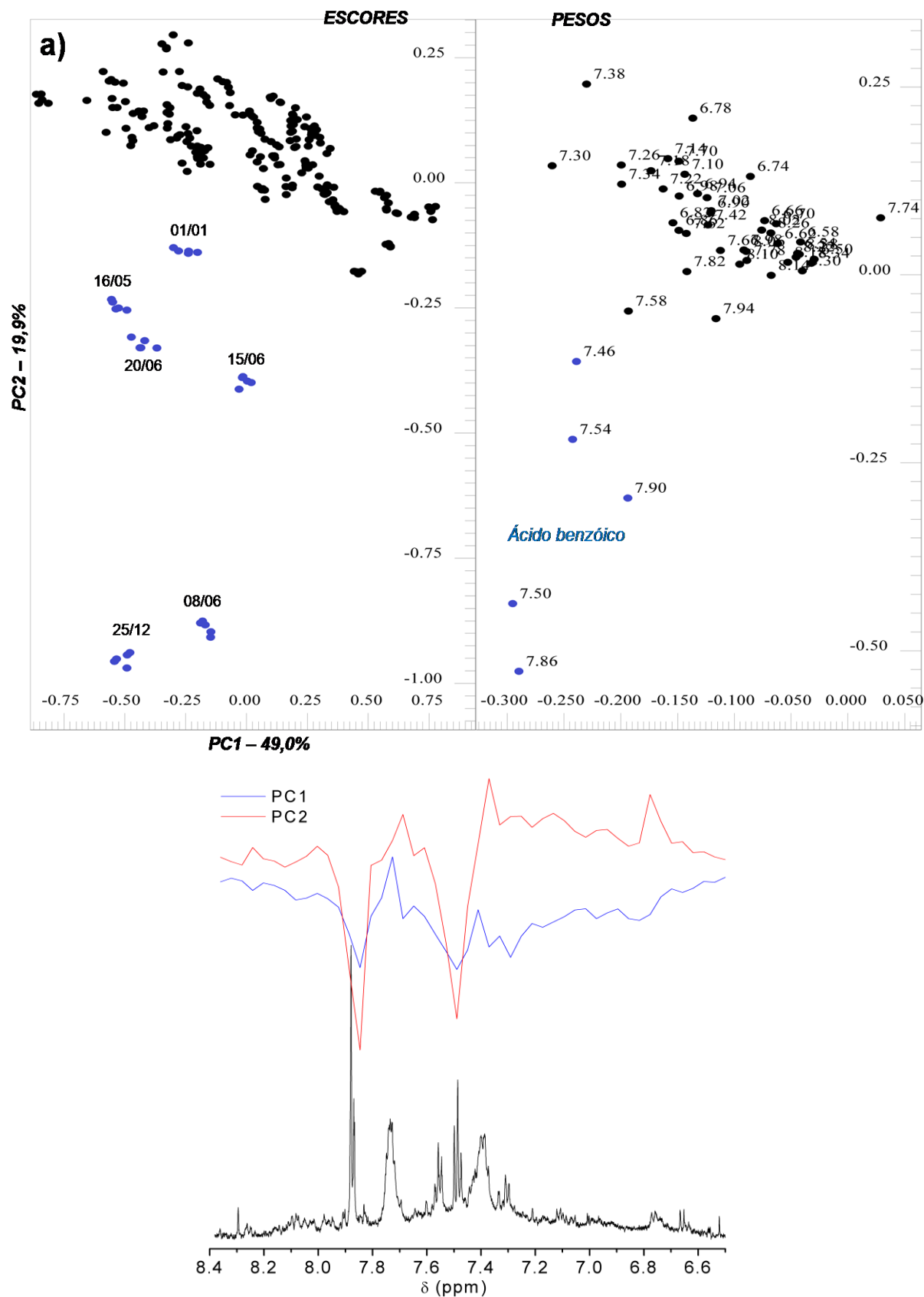


FIGURA 39 – Gráficos de escores e pesos do sistema de coordenadas PC1 e PC2 (a) para as amostras de esgoto tratado e os respectivos gráficos de peso projetados em linhas com espectros de RMN de ^1H .

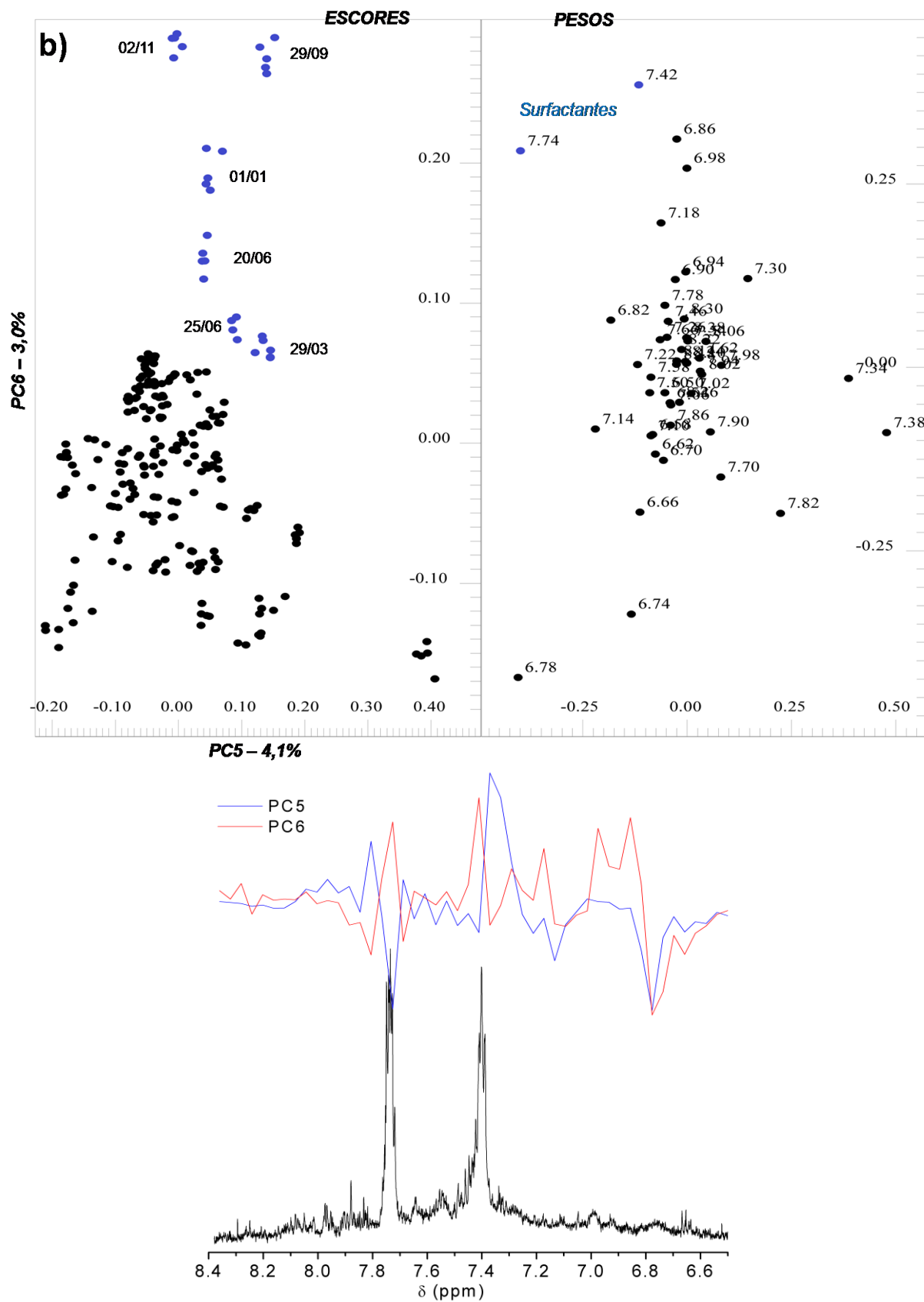


FIGURA 40 – Gráficos de escores e pesos do sistema de coordenadas PC5 e PC6 (b) para as amostras de esgoto tratado e os respectivos gráficos de peso projetados em linhas com espectros de RMN de ^1H .

No gráfico de escores da Figura 39a, os valores negativos de PC1 e PC2 indicaram que as amostras que foram coletadas no mês de junho, no dia 25 de dezembro de 2011 e no dia 1 de janeiro de 2012 (na cor azul ●), apresentaram as maiores concentrações do composto correspondente aos deslocamentos químicos δ δ 7,46-7,54 e δ 7,86-7,94, que foi caracterizado como o ácido benzóico. Esses dados mostram que não houve a completa remoção do ácido benzóico com o tratamento do esgoto praticado pela ETE naqueles dias. É necessário salientar que este composto é muito utilizado como conservante alimentar e talvez tenha alguma relação com o consumo de produtos enlatados naquelas datas.¹⁷²

Os escores e os pesos referentes aos eixos PC5 e PC6 (Figura 39b) mostraram os dias em que a concentração dos surfactantes LAS (δ 7,42 e 7,74) foi mais alta no efluente despejado no rio Monjolinho, também representados pela cor azul (●). Portanto, as análises quimiométricas evidenciaram a recalcitrância e os dias em que as degradações dos surfactantes e do ácido benzóico foram menores.

Em geral, os resultados estatísticos mostraram que a RMN de ^1H aliada a quimiometria pode ser uma poderosa ferramenta para o monitoramento dos constituintes químicos orgânicos presentes no esgoto de um município.

4.3 Estimativa das concentrações por RMN de ^1H dos compostos que se destacaram nas análises do esgoto (RMNq)

Como visto anteriormente, o estudo quimiométrico indicou que a discriminação do esgoto sanitário doméstico utilizando a espectroscopia de RMN de ^1H foi bastante viável. Contudo, para se realizar uma comparação mais efetiva das amostras de esgoto, foram feitas estimativas das concentrações dos compostos que mais contribuíram para as análises quimiométricas e/ou se destacaram nessas amostras.

Sabe-se que dificuldades inerentes a análises quantitativas por RMN (RMNq) de poluentes orgânicos estão ligadas a complexidade da matriz e a baixa quantidade presente dos analitos alvo. Porém, compostos ou produtos de degradação podem ser quantificados mesmo quando não existem padrões comerciais para calibração.¹⁷³ Assim, o desenvolvimento das análises de RMNq de ^1H foi feito a partir de sinais não sobrepostos, portanto com uma boa resolução e, considerando os respectivos tempos de relaxação. Também foram escolhidos sinais que apresentavam intensidades favoráveis para se obter uma boa relação sinal/ruído.¹⁷⁴

Portanto, os sinais selecionados para quantificação foram: os simpletos da dimetilamina (δ 2,73), do ácido acético (δ 1,92) e do ácido fórmico (δ 8,43); os dupletos do ácido láctico (δ 1,32) e do ácido fenilacético (δ 7,31) e o tripleto do ácido propiônico (δ 1,06). As suas concentrações estão apresentadas em ppm (parte por milhão - mg.L^{-1}). Os surfactantes LAS que apresentaram um multipletos no deslocamento químico entre δ 7,68 e 7,76 tiveram suas concentrações estimadas em mmol.L^{-1} (unidade fornecida pelo método Eretic2[®]), porém, foram também apresentadas em ppm. Esta diferença na unidade de concentração se deve ao fato de não se conhecer o número exato de surfactantes que contribuíram para o sinal e, com isso, não se pode saber o valor da massa molar para transformação da unidade mmol.L^{-1} para mg.L^{-1} – Isso está melhor detalhado no Apêndice do trabalho (pag. 125).

No cálculo das concentrações, foram levadas em consideração as incertezas individuais que estão associadas a todo sistema analítico como: erros relacionados a micropipeta e balança; a pureza do TMS- d_4 (padrão interno) e os desvios padrão das quintuplicatas das concentrações calculadas. Com esses

valores, foram calculadas as incertezas combinadas, as quais estão expressas na forma de barras de erros localizadas no topo das barras de concentrações nos gráficos “b, c, d, e” da Figura 41. As equações usadas para os cálculos, os valores exatos das concentrações e as respectivas incertezas combinadas também estão apresentados no Apêndice.

A Figura 41a apresenta o gráfico de precipitação pluviométrica (em mm) referente ao período que foi feito as amostragens para o estudo, já que se percebeu a influência das águas pluviais nas concentrações dos compostos oriundos da degradação da matéria orgânica (ácidos acético e propiônico) nas amostras de esgoto anterior ao tratamento feito pela ETE.

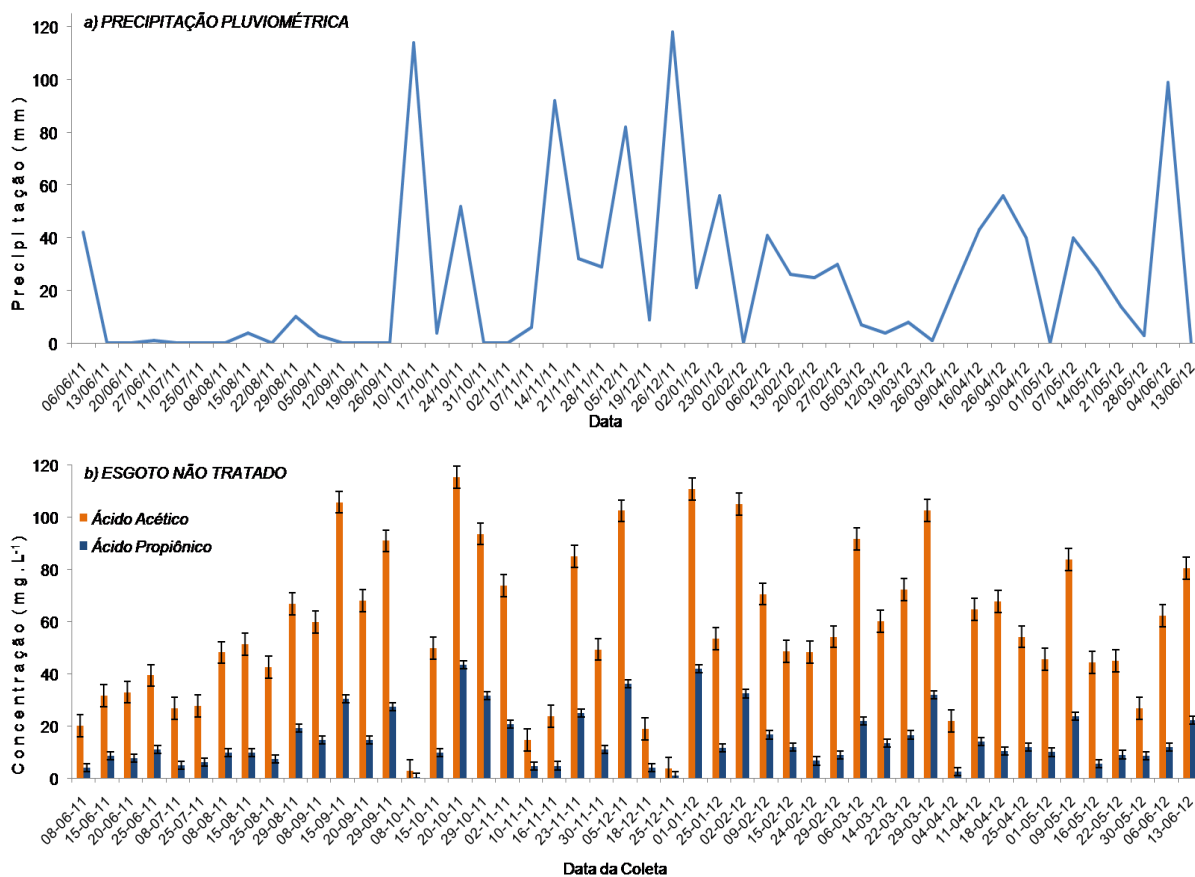


Figura 41

Extensão

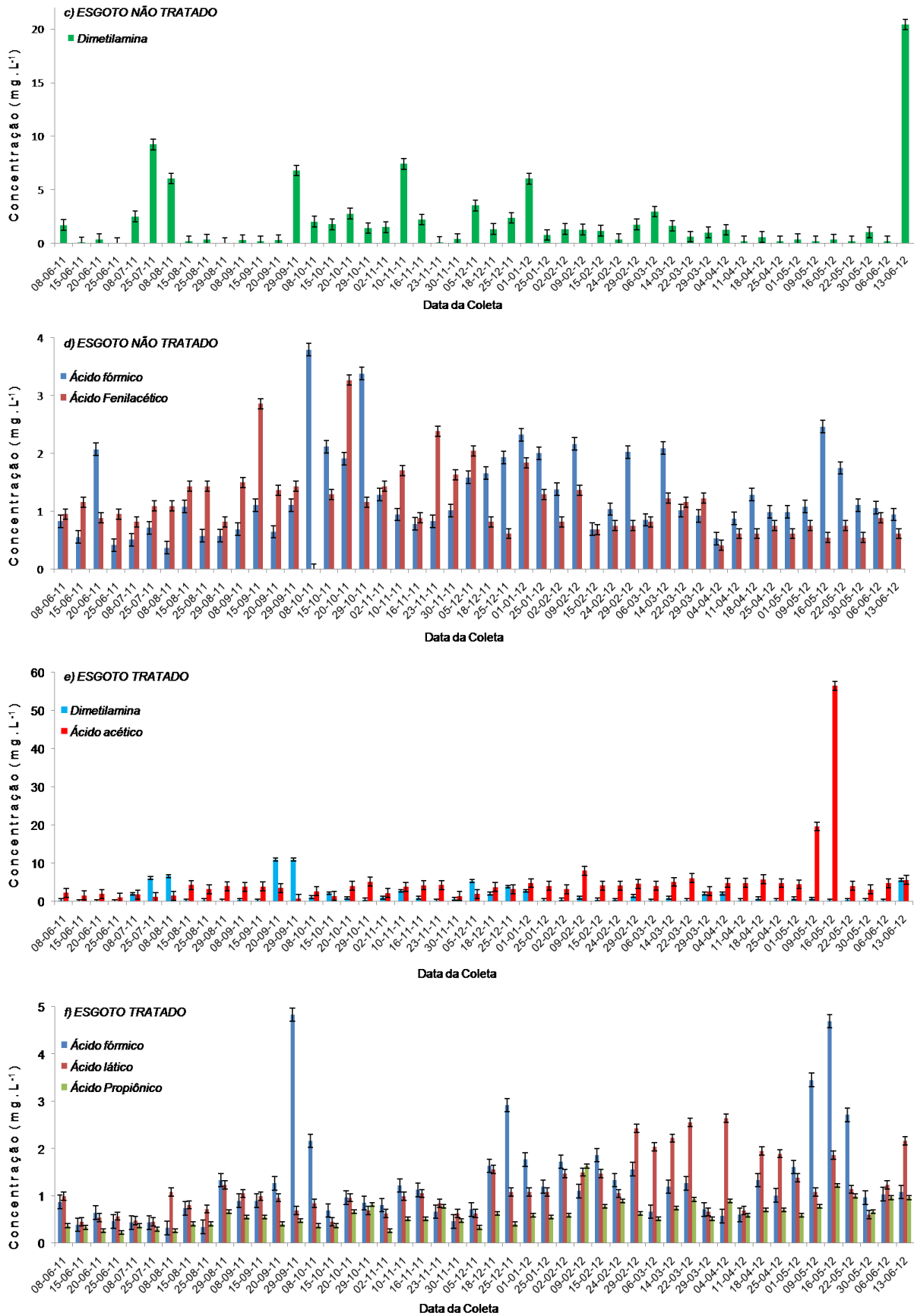


Figura 41

Extensão

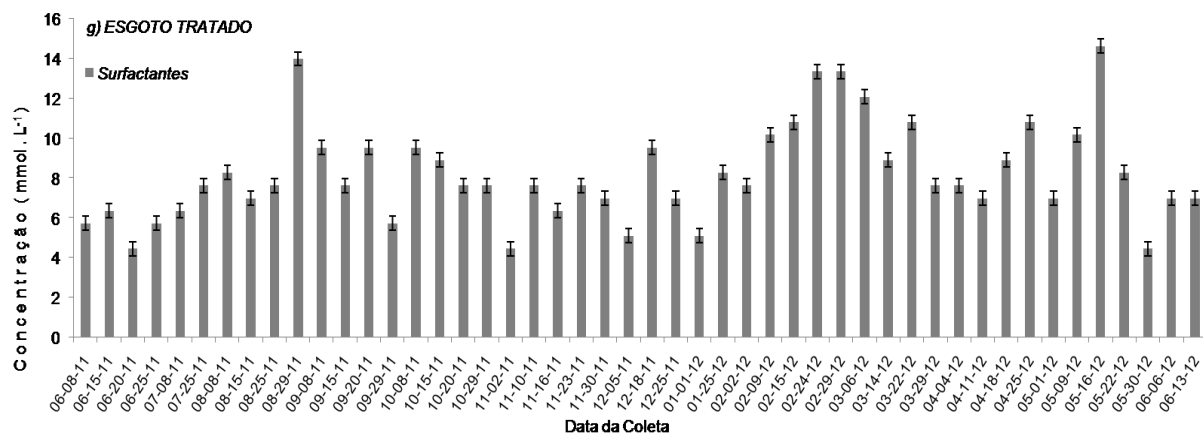


FIGURA 41 – a) Gráfico de precipitação pluviométrica na cidade de São Carlos-SP* no período da amostragem; b,c,d) Concentrações no esgoto não tratado, em ppm; e,f,g) Concentrações no esgoto tratado, em ppm.

*Dados obtidos em 29/09/2012 - <http://www.inmet.gov.br>.

Corroborado pelos resultados quimiométricos, observa-se a influência das mudanças sazonais na composição química das amostras de esgoto não tratado quanto as concentrações dos ácidos acético e propiônico, as quais foram maiores durante as estações do ano de temperaturas relativas maiores, com suas máximas concentrações chegando a 115,4 e 43,4 mg.mL⁻¹, respectivamente. Também foi comprovado o fato de que no período de temperaturas relativas menores foram menos eficazes as degradações microbianas ocorridas na matéria orgânica do esgoto anterior a sua entrada na ETE.

Em relação ao esgoto tratado, as concentrações dos ácidos acético e propiônico foram bem menores, exceto nas amostras que foram coletadas nos dias 09/05/2012 e 16/05/2012, apontando suas não remoções pelo tratamento do esgoto na ETE nesses dias e, também, corroborando com as análises quimiométricas. A dimetilamina apresentou maiores concentrações nas amostras de esgoto tratado coletadas nos dias 25/07/11, 08/08/11, 20/09/11, 29/09/11, 05/12/11 e 13/06/12, com a concentração máxima de 11,0 mg.mL⁻¹.

De maneira geral, o ácido acético foi o composto dominante nas amostras de esgoto não tratado e o composto dimetilamina teve suas maiores concentrações nas amostras de esgoto tratado.

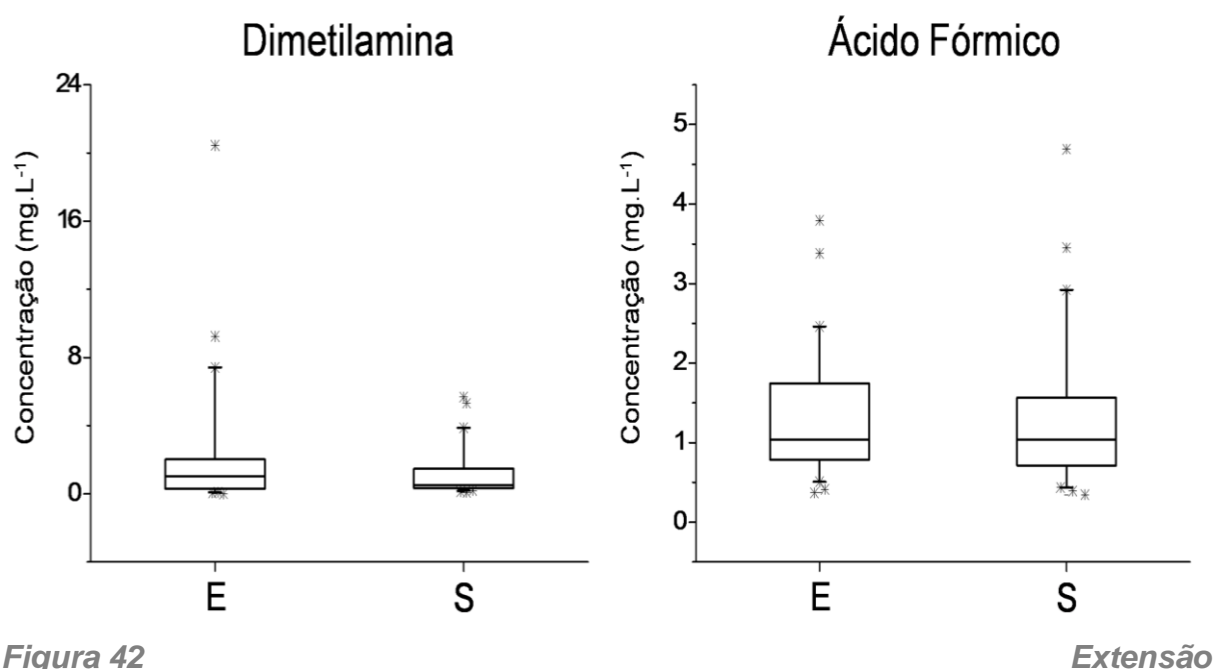
Fazendo uma comparação entre as Figuras 41a e 41b, pode-se observar a influência das águas pluviais (devido a ligações clandestinas residenciais e/ou comerciais) nas concentrações do ácido acético e propiônico nas amostras de esgoto ao entrar na ETE, com um acentuado decréscimo nas suas concentrações

em amostras coletadas nos dias 08/10/2011, 10/11/2011, 16/11/2011, 25/12/2011 e 04/04/2012. Ainda em relação a esses dias, as porcentagens de remoção dos compostos foram de 4,2, 73,9, 82,1, 14,0 e 77,9% para o ácido acético e 15,9, 88,9, 89,0, 49,3 e 56,6% para o ácido propiônico. Essa diminuição nas porcentagens de remoção da matéria orgânica decorrente das águas da chuva não assegura ineficiência do tratamento da ETE, pois o esgoto já possuía pequena quantidade de material orgânico ao entrar na ETE com, conseqüentemente, alta vazão, o que pode comprometer toda eficiência do sistema de tratamento, equipamentos e instalações. Deste modo, e por motivos de segurança, quando o fluxo de esgoto aumenta repentinamente em dias chuvosos, as comportas da ETE são abertas para que as águas de esgoto sejam despejadas diretamente no rio Monjolinho sem qualquer tipo de tratamento causando prejuízos ao meio ambiente.

4.4 Análise quantitativa por Diagrama de Extremos e Quartis (box-and-whiskers)

As representações gráficas por Diagrama de Extremos e Quartis (DEQ) foram utilizadas para se obter, de modo mais claro, a forma com que os valores das concentrações para cada composto se distribuem quanto a simetria ou dispersão dos dados. Esta análise por DEQ incluiu: o valor da concentração mínima; o 1° quartil, que acumulou 25% das menores concentrações; a mediana ou 2° quartil, que dividiu as concentrações em dois grupos, maiores e menores concentrações; o 3° quartil, que acumulou 25% das maiores concentrações; o valor da concentração máxima e, valores anômalos ou *outliers*, ou seja, que estão fora dos 95% do intervalo de confiança e estão representados por asteriscos.

Para esta análise, foram utilizadas as mesmas concentrações dos compostos que foram quantificados previamente na seção 4.3. Os DEQ para as amostras de esgoto não tratado (E) e tratado (S) estão apresentados na Figura 42.



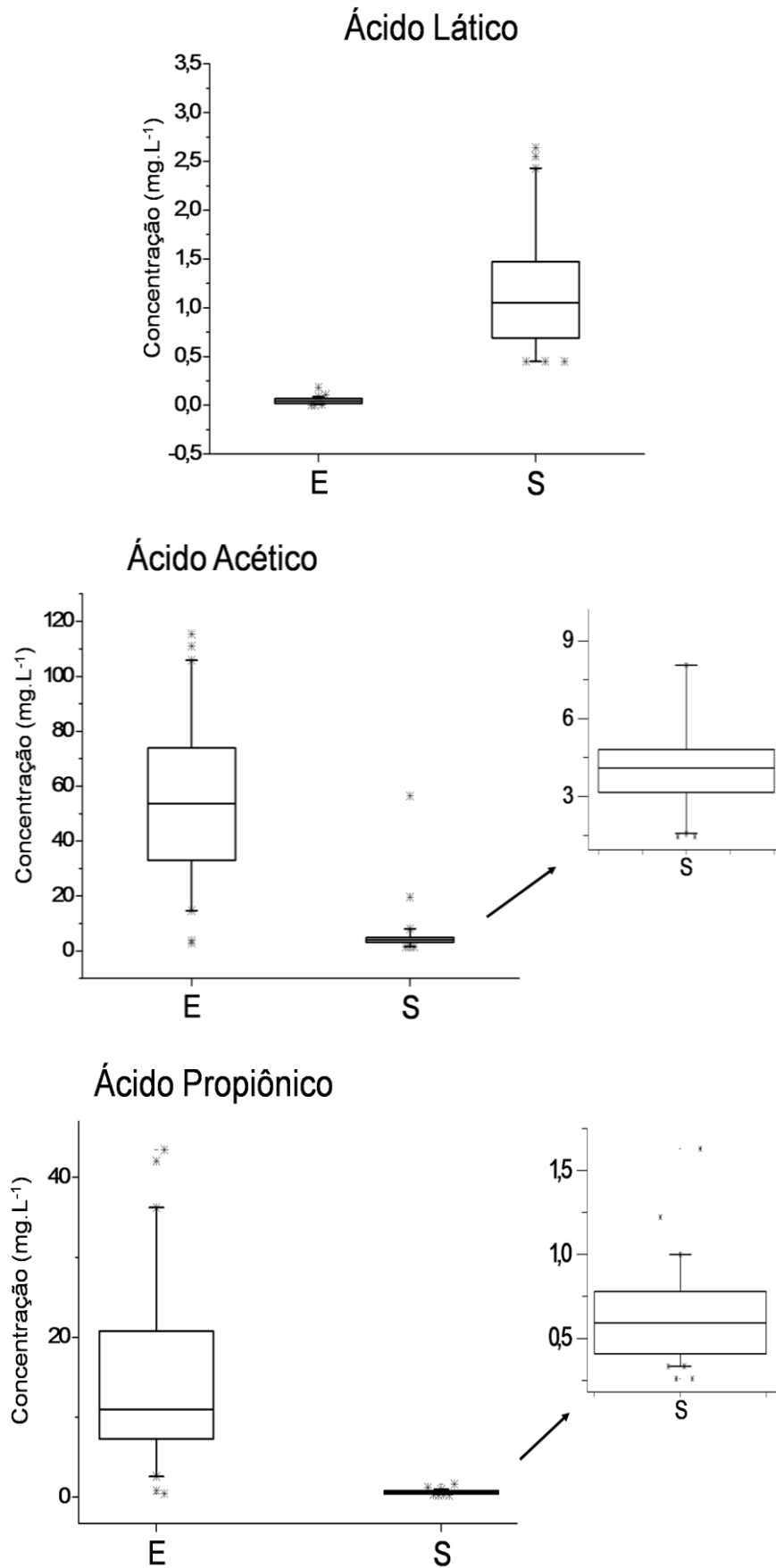


Figura 42

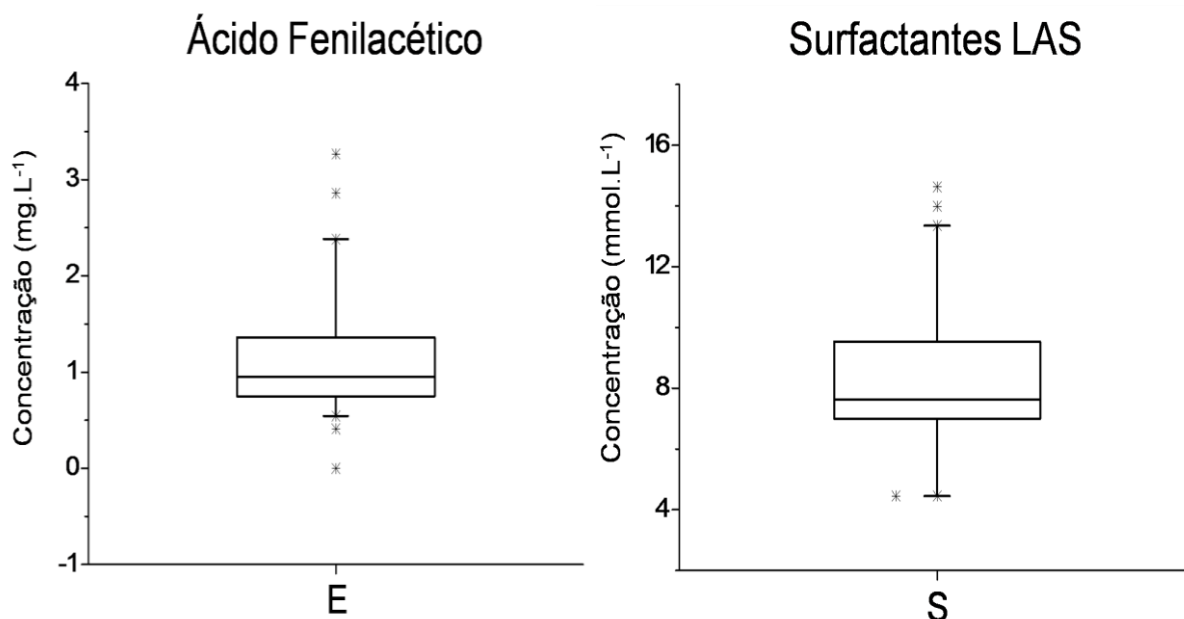


FIGURA 42 – Diagramas de extremos e quartis das concentrações dos ácidos: acético, propiônico, láctico, fórmico e fenilacético; dimetilamina e surfactantes LAS, nas amostras de esgoto não tratado (E) e tratado (S).

No DEQ desenvolvido para a dimetilamina observa-se uma pequena eliminação com o tratamento da ETE, além de uma grande variação das altas concentrações nas amostras de esgoto tratado (S) quando comparadas ao quartil das baixas concentrações, que se apresentaram mais homogêneas ou controladas. Já no DEQ desenvolvido para o ácido fórmico, tanto nas amostras de esgoto não tratado (E) como tratado (S) e apesar da heterogeneidade em suas concentrações, entre os 1° e 3° quartis, percebe-se certa simetria em sua concentração de entrada e saída da ETE. Portanto, reafirmando as análises desenvolvidas na etapa quimiométrica, onde as variações nas concentrações do ácido fórmico e da dimetilamina mostraram a existência de fatores inerentes a não decomposição de dimetilamina com o tratamento praticado pela ETE, pois o ácido fórmico pode ser um dos produtos finais na atuação dos microorganismos metanogênicos (Figura 4).

A análise desenvolvida para o ácido láctico revelou um aumento acentuado na sua concentração com o tratamento praticado pela ETE, além de uma grande heterogeneidade nas concentrações das amostras de esgoto tratado. Esse fato mostra a incompleta degradação do material orgânico para produção de metano através dos reatores anaeróbios (bactérias acetogênicas e metanogênicas).

As concentrações dos ácidos acético e propiônico foram muito afetadas após o tratamento na ETE, observando-se grandes reduções. Nas análises por DEQ desenvolvidas para ambos os compostos, as amostras de esgoto não tratado apresentaram uma grande dispersão entre os valores nos quartis de mínima e máxima concentrações, com quartis largos que refletem grandes variações do descarte de matéria orgânica no sistema comum de esgoto da cidade. Porém, observa-se uma baixa e contínua variação das concentrações nas amostras de esgoto tratado, além de duas amostras coletadas nos dias 09/05/2012 e 16/05/2012 que foram consideradas *outliers*, no quartil superior, corroborando com os resultados apresentados nas seções de quimiometria e quantificação. Como visto na Figura 4, as bactérias acidogênicas são responsáveis pela degradação de aminoácidos e açúcares e, assim, geram produtos intermediários como os ácidos propiônico e butírico, seguidos da produção dos ácidos acético e fórmico pela ação das bactérias acetogênicas. É importante salientar que o acúmulo de ácido propiônico nos reatores UASB reflete que uma ou mais etapas do consórcio anaeróbio estão sendo prejudicadas. Portanto, de forma geral, estes dados indicaram que o caminho de degradação foi relativamente adequado, pois as concentrações do ácido propiônico foram inferiores às dos ácidos acético e fórmico nas amostras de esgoto tratado.

No DEQ construído para o ácido fenilacético, que foi quantificado apenas nas amostras de esgoto não tratado devido a sua grande remoção pelo tratamento da ETE, observa-se uma grande variação ou dispersão das concentrações. Esse fato reflete uma heterogeneidade do seu descarte no sistema comum de esgoto da cidade durante o ano da coleta, com as maiores variações presentes no quartil referente as altas concentrações, ou seja, no 3º quartil.

Finalmente, o diagrama construído para os surfactantes LAS e que foram quantificados apenas nas amostras de esgoto tratado devido a sobreposição dos sinais nos espectros do esgoto não tratado, também apresentou grandes variações nas concentrações com o decorrer do ano de coleta, com maior variação quando suas concentrações são mais altas, ou seja, no 3º quartil. Isso mostrou também que, na maioria das amostras coletadas, existiram fatores que estavam associados a não degradação desta classe de compostos, principalmente, quando suas concentrações foram altas, merecendo maior atenção no que diz respeito a implementação de melhorias no tratamento.

4.5 Estimativa do total de matéria orgânica removida com o tratamento da ETE

Um novo método foi proposto para estimar a quantidade da matéria orgânica total removida com o tratamento da ETE de São Carlos-SP. Para isso, todos os sinais presentes nos espectros de RMN de ^1H entre os deslocamentos químicos δ 0,50 e 9,60 foram integrados, exceto a região de supressão do sinal dos hidrogênios do HOD. Por proporcionalidade entre os valores das integrais encontrados no esgoto não tratado e no esgoto tratado, conseguiu-se obter a porcentagem da quantidade de matéria orgânica (contendo hidrogênios) total removida. Os valores médios propostos neste novo método foram consistentes com os valores reportados em publicações, onde se observa que a quantidade de matéria orgânica total removida pelo tratamento de esgoto através do uso de reatores anaeróbios situa-se entre 65 e 80%.¹⁷⁵ Em alguns dias, a remoção encontrada pelo método de RMN de ^1H (linha azul) exibiu a mesma tendência quando comparada aos valores fornecidos pela ETE (linha vermelha), como mostrado na Figura 43. Os intervalos encontrados nos resultados fornecidos pela ETE mostraram quando não foram feitos os experimentos para se determinar a porcentagem de remoção de matéria orgânica e, com isso, não puderam ser comparados nestes dias.

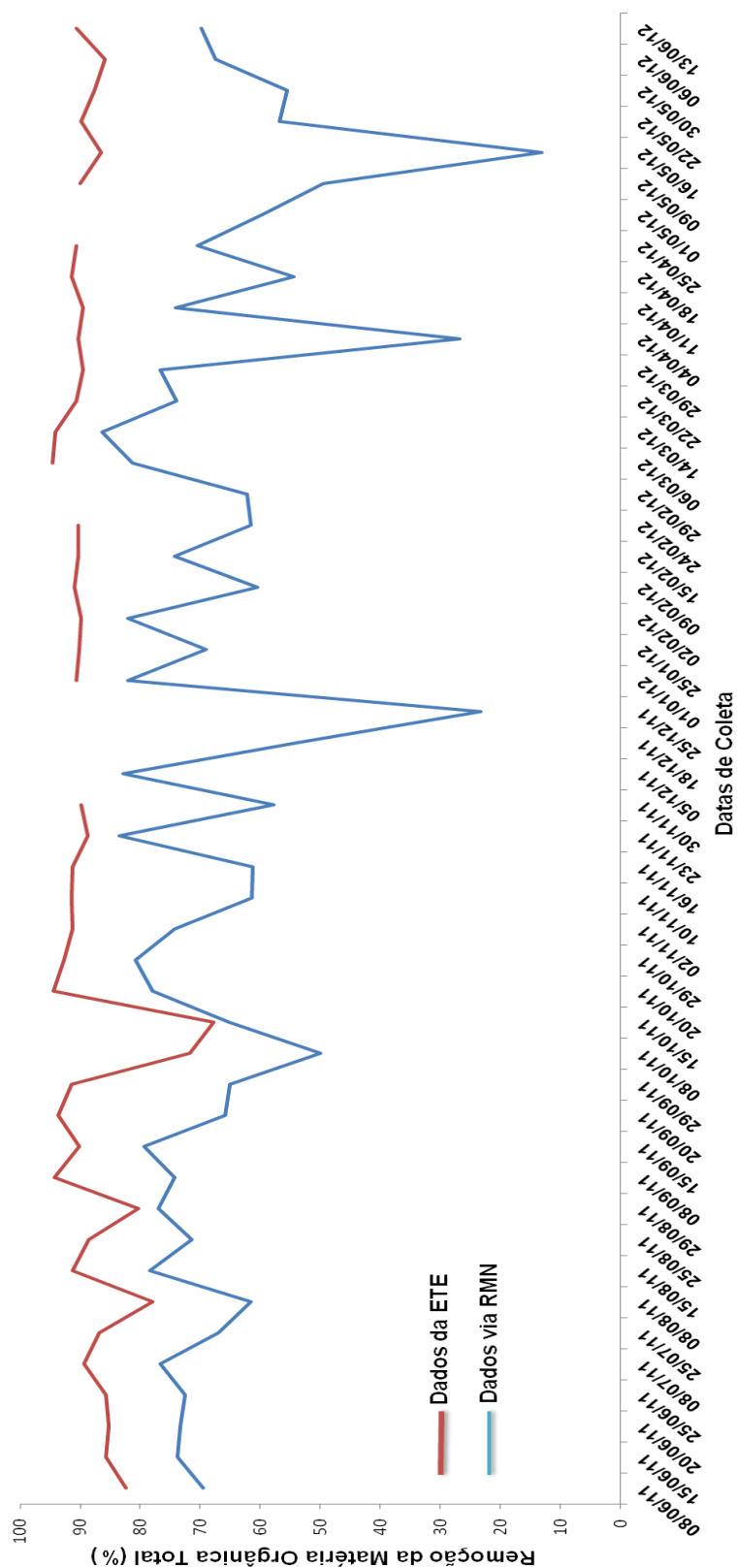


FIGURA 43 – Comparação entre os métodos de DBO (vermelho) e RMN de ¹H (azul) para estimar o percentual da matéria orgânica total removida no tratamento da ETE.

A diferença dos valores encontrados entre os dois métodos pode ser explicada pelos diferentes tipos de compostos detectados. O método utilizado pela ETE é feito através da DBO (demanda bioquímica de oxigênio), que corresponde somente a matéria orgânica que foi degradada pela ação de microorganismos. Já o método por RMN de ^1H detectou apenas a matéria orgânica removida que continha hidrogênio. Porém, o solvente D_2O (água deuterada) utilizado nas análises não possibilitou a detecção total dos compostos orgânicos contendo hidrogênio, como a amônia e a uréia, pois esses como possuem hidrogênios labels, são trocados pelo deutério da água deuterada.

Enfim, todas as análises apresentadas no Capítulo I se mostraram viáveis, com resultados satisfatórios na avaliação da composição da matéria orgânica presente nas águas de esgoto. Contudo, para uma análise mais detalhada sobre a recalcitrância de uma classe de compostos que estava presente em todas as amostras do efluente da ETE, foi proposto o estudo desenvolvido no Capítulo II.

Capítulo II

Compostos Não Específicos Recalcitrantes

Como foi mencionado anteriormente, nas análises dos *Compostos Não Específicos* desenvolvidas no Capítulo I, todas as amostras de efluente apresentaram sinais de compostos remanescentes nos espectros de RMN de ^1H nos deslocamentos químicos em δ 7,40 e 7,73 (dois multipletos), com os respectivos sinais de ^{13}C em δ 128,0 e 131,3. Portanto, no decorrer da pesquisa percebeu-se a necessidade de identificar o maior número de constituintes químicos recalcitrantes presentes no efluente da ETE de São Carlos-SP. Acreditou-se que um estudo mais detalhado destes compostos, utilizando uma técnica completamente hifenada (HPLC-MS-NMR) possibilitaria uma análise automatizada e reproduzível. Para investigar tal recalcitrância, essa parte do trabalho foi desenvolvida no laboratório *Environmental NMR Center* da Universidade de Toronto (*UofT*), Toronto-ON, Canadá, entre 01/04/2013 e 29/01/2014 (10 meses), com bolsa uma de estudos CAPES, sob a orientação do Professor Dr. Andre Simpson.

Além dos avanços referentes ao estudo em questão, o envio do doutorando a um laboratório de referência no desenvolvimento de novas tecnologias de RMN aplicadas à análises de constituintes químicos ambientais, é uma grande oportunidade para aperfeiçoar sua qualificação pessoal e trazer conhecimentos novos que ainda não estão disponíveis na América do Sul.

Também existe a demonstração de interesse do Prof. Dr. Andre J. Simpson em passar seu sabático aqui no Brasil e o nosso laboratório poderá ser uma opção interessante para as instituições e estabelecer uma colaboração mais efetiva entre ambas.

5 PARTE EXPERIMENTAL

5.1 – Origem e preparo das amostras

As amostras de efluente foram coletadas semanalmente na ETE do município de São Carlos-SP, durante o mês de outubro de 2012, no mesmo local onde foram feitas as coletas das amostras de esgoto tratado ilustrado na seção 3.1 do Capítulo I.

Para concentração dos analitos de interesse e limpeza das amostras, ou seja, retirada de aminoácidos e ácidos orgânicos que podem comprometer a etapa de elucidação estrutural, 500 mL foram retirados do conjunto amostral e filtrados em membranas de fibra de vidro de 0,60 μm e 0,40 μm (Macherey-nagel). Em seguida, foi feita uma extração em fase sólida (SPE) através de cartuchos com resinas poliméricas (Oasis HLB[®] 200 mg, 6 mL de volume, Waters), onde foi utilizado metanol grau HPLC para ativação e H₂O Milli-Q para condicionamento da resina anterior as análises – duas vezes de 5 mL para cada etapa. A passagem do filtrado pelos cartuchos de SPE foi realizada sob vácuo, com auxílio do equipamento Manifold, como ilustrado na Figura 44.



FIGURA 44 – Ilustração do método de SPE para limpeza (*cleanup*) das amostras de efluente.

Após a extração, passou-se água grau Milli-Q pelos cartuchos de SPE para retirada dos compostos de menor importância e, então, os cartuchos foram secos por 40 minutos. Os analitos remanescentes nos cartuchos foram, por fim, extraídos com acetonitrila e metanol (duas vezes de 5 mL para cada solvente), transferidos para recipientes apropriados (*vials*) e secos com um fluxo contínuo de N₂ gasoso.

Os extratos resultantes das análises de SPE foram solubilizados em 500 µL de metanol deuterado apenas para serem feitas análises exploratórias por RMN de ¹H, com o intuito de verificar os compostos que permaneceram nas matrizes do efluente, como apresentado na Figura 46. Após estas análises, os extratos foram, novamente, secos com um fluxo de N₂ gasoso e acondicionados a temperatura de 10°C negativos até se iniciarem as análises no sistema hifenado.

Para as análises via HPLC-(UV/MS)-SPE-ASS-NMR, o extrato foi solubilizado em 2 mL de água/metanol (1:1) e a mistura homogeneizada com o auxílio de um “misturador automático”.

5.2 – Medidas por HPLC-(UV/MS)-SPE-ASS-NMR

Na Figura 45 tem-se o sistema hifenado HPLC-(UV/MS)-SPE-ASS-NMR no modo *off-line*, o qual foi utilizado nas análises dos compostos considerados recalcitrantes, situado no laboratório *Environmental NMR Center* da Universidade de Toronto (*UofT*), Toronto-ON, Canadá.



FIGURA 45 – Sistema hifenado HPLC-(UV/MS)-SPE-ASS-NMR no modo *off-line*.

5.2.1 – Procedimentos da etapa **HPLC-(UV/MS)**-SPE-ASS-NMR

Primeiramente, as amostras foram submetidas à separação cromatográfica, empregando um equipamento de HPLC marca Agilent, modelo 1200 series, equipado com um detector de arranjo de díodo (DAD) que esteve paralelamente acoplado a outro detector por espectrometria de massas (MS) de alta resolução MicroTOF-QII[®] Bruker Daltonic, equipado com interface de ionização

por *electrospray* (ESI). Deste modo, foi empregado um volume de 20 μL por injeção com uma taxa de fluxo de $0,7 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$, onde 98% das amostras injetadas no sistema cromatográfico foram enviadas ao detector por UV, para monitoramento do comprimento de onda em 210 nm, e apenas 2% foram enviadas ao detector por MS.

A separação cromatográfica foi realizada empregando-se uma coluna Phenomenex Hypersil[®] C₁₈ (150 x 4,6 mm de diâmetro interno, 5,0 μm de tamanho de partícula). No programa de eluição, foram utilizados os solventes A (água Milli-Q com 0,05% de acetato de amônio) e C (metanol grau HPLC com 0,05% de acetato de amônio), em pH 3, com o modo de eluição por gradiente e variando na seguinte forma: 27% A e 73% C (8 min), 100% C (27 min), 100% C (30 min), 27% A e 73% C (33 min), 27% A e 73% C (40 min).

O processamento dos espectros de MS foi realizado através do programa micrOTOFcontrol versão 2.3, com as análises adquiridas sob a temperatura do gás de secagem a 200 °C, fluxo de $9,0 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$, nitrogênio como gás nebulizador à pressão de 0,4 Bar e voltagem do capilar de 4.500 V. As análises foram realizadas no modo negativo de ionização $[\text{M}-\text{H}]^-$, com a aquisição dos espectros feita no modo *full scan* de 50 a 450 m/z (massa/carga). Os experimentos de monitoramento e fragmentação do íon selecionado ocorreram com uma variação da energia de colisão de zero até 25 eV.

5.2.2 – Procedimentos da etapa HPLC-(UV/MS)-SPE-ASS-NMR

Todo o sistema citado no item 5.2.1 esteve acoplado a um módulo de extração por fase sólida (SPE) com troca de cartuchos automatizada e distribuidor de solvente de alta pressão. A unidade de SPE Bruker/Spark Prospekt 2 (Bruker BioSpin, Rheinstetten, Alemanha & Spark, Emmen, Holanda) foi empregada para reter, automaticamente, os picos cromatográficos selecionados em cartuchos de 2 mm de diâmetro interno e partículas de 10 μm , a base de sílica modificada com octadecil (C₁₈) (HySphere[®]). Água Milli-Q foi adicionada continuamente às frações em um fluxo de $3 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$, através de uma bomba Knauer K100 (Berlim, Alemanha), com o intuito de aumentar a constante dielétrica do solvente e, com isso, proporcionar uma retenção adequada dos picos de interesse. Os picos cromatográficos provindos do detector de UV foram selecionados a partir de suas

intensidades e em intervalos de tempo específicos. Separadamente, cada analito foi retido nos cartuchos de SPE, os quais foram secos por 30 minutos com um fluxo de N₂ gasoso. O programa HyStar[®] versão 3.2 (Bruker BioSpin GmbH, Alemanha) foi empregado para aquisição e processamento dos dados cromatográficos.

5.2.3 – Procedimentos da etapa HPLC-(UV/MS)-SPE-ASS-NMR

De maneira automatizada, os analitos foram eluídos, individualmente, com 30 µL de metanol deuterado (CD₃OD) e enviados a tubos de RMN de 1,7 mm de diâmetro, os quais estavam alocados no amostrador automático (*Automatic Sampling Storage – ASS*) Gilson[®] SPE-TT *Liquid Handler 215 System* (Gilson, Inc., Middleton, WI). O programa PrepGilsonST versão 1.3 foi utilizado para o desenvolvimento dos procedimentos acima.

5.2.4 – Procedimentos da etapa HPLC-(UV/MS)-SPE-ASS-NMR

Após as coletas feitas pelo amostrador automático, experimentos de RMN foram realizados em um espectrômetro Bruker Avance[®] III 500 MHz (11,7 T), equipado com uma sonda TXI (¹H/¹³C/¹⁵N) de 1.7 mm, com detecção inversa e gradiente de campo no eixo z.

As análises de RMN de ¹H foram adquiridas sob temperatura controlada de 297K, com o acúmulo de 8 espectros (NS), com pulsos (p1) de 4,3 µs, 2,0 s de tempo de espera entre cada aquisição (d1), 1,4 s de tempo de aquisição (AQ) e 32k de números de pontos na aquisição (TD) para uma largura espectral de 12 ppm. Os espectros foram adquiridos utilizando-se a sequência de pulsos LC1PNF2 (denominação Bruker) com dupla saturação dos sinais referentes aos hidrogênios da água não deuterada e do metanol deuterado. As análises foram processadas com um fator de multiplicação exponencial (lb) igual a 0,3 Hz. Utilizou-se o programa Bruker TopSpin (versão 3.1) para aquisição e processamento dos dados, onde os espectros de RMN de ¹H com distorções de fases e linhas de base foram corrigidos e calibrados manualmente.

Os experimentos de RMN bidimensionais (2D) COSY, HSQC e HMBC foram realizados com gradiente de campo e empregando as respectivas sequências

de pulso COSYGPPRQF, HSQCETGPST.2 e HMBCETGPND (denominação Bruker), com NS de 24, 200 e 400, respectivamente, além de um d1 de 0.5 s para todas estas análises. Ainda nos experimentos de COSY, HSQC e HMBC, os números de pontos na aquisição (TD) foram, respectivamente, de: em F1, 256, 196 e 128; em F2, 4 Kb, 4 Kb e 2 Kb. O processamento dos espectros foi efetuado com 4 Kb de pontos em F2 e 1 Kb de pontos em F1 (SI).

6 RESULTADOS E DISCUSSÕES

A Figura 46 apresenta uma comparação entre os espectros de RMN de ^1H adquiridos de uma amostra do efluente estudado no Capítulo I, onde o pré-tratamento foi apenas a filtração, com uma amostra de efluente analisada no Capítulo II, onde ocorreu um pré-tratamento de extração por SPE. Em ambos os espectros foi evidenciada a presença dos sinais nos deslocamentos químicos referentes aos hidrogênios aromáticos dos compostos alvos, mostrando que estes foram eficientemente isolados e concentrados.

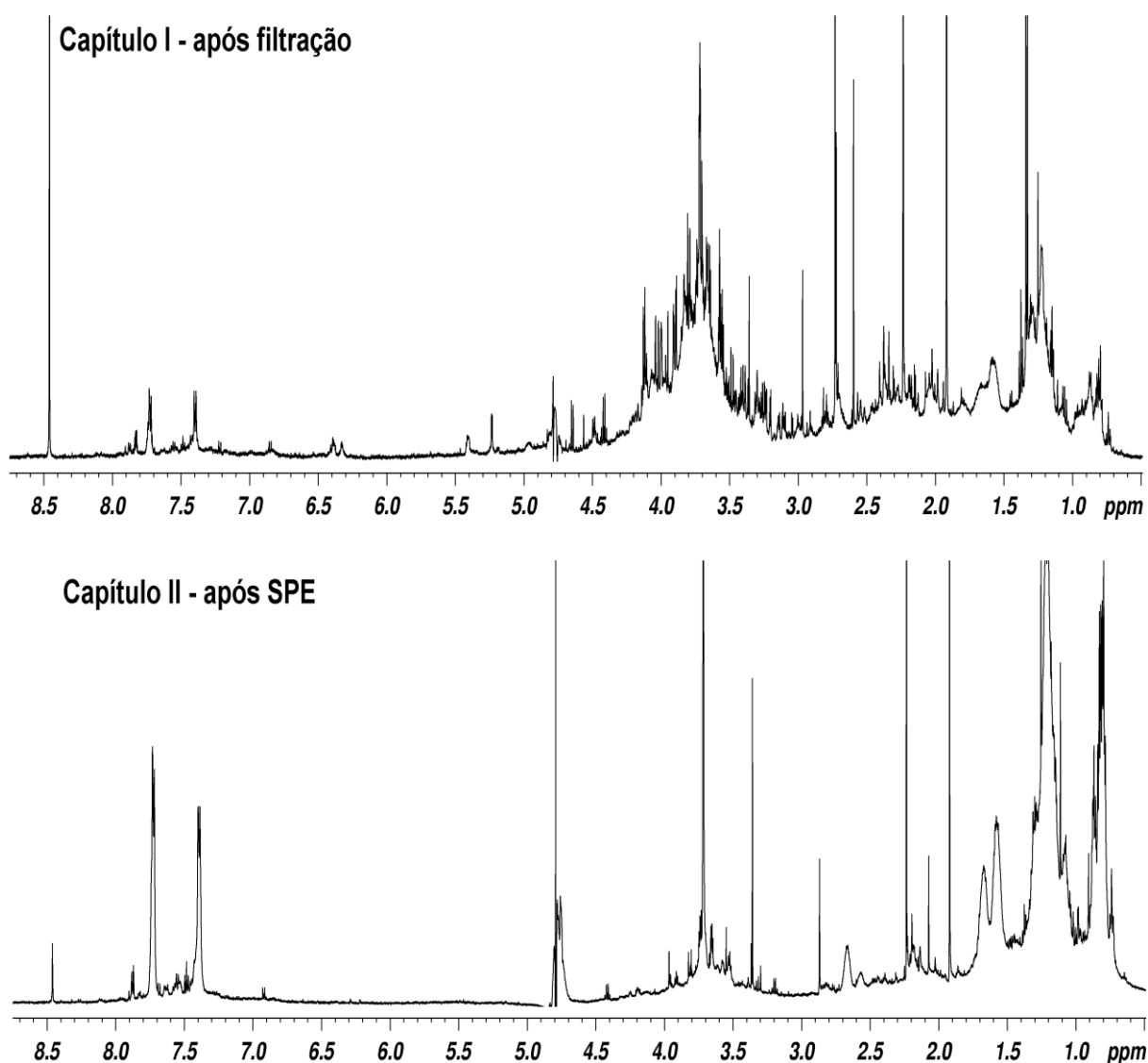


FIGURA 46 – Espectros de RMN de ^1H das amostras de efluente do Capítulo I (após filtração) e do Capítulo II (após SPE).

Após essa averiguação, foram desenvolvidas análises no sistema HPLC hifenado, para separação e elucidação completa dos compostos que persistiram na composição química do efluente da cidade de São Carlos-SP. As análises por HPLC-(UV/MS)-SPE-ASS-NMR forneceram informações complementares e relevantes sobre a constituição e biotransformações da matéria orgânica presente no efluente da ETE.

As resoluções dos picos cromatográficos não foram suficientes para uma completa separação, porém, a mesma separação foi claramente observada pelo detector de MS, já que estes dois detectores (UV e MS) trabalharam em paralelo no sistema. A adição do modificador acetato de amônio aos solventes utilizados na separação cromatográfica, com o ajuste do pH em torno de 3, melhorou a interação dos analitos com a fase estacionária da coluna, além de favorecer o processo de ionização dos analitos no detector por ESI-MS.

Como já afirmado por Albert em 2002, devido a complexidade da matriz, não é requerida uma completa separação cromatográfica para elucidação.¹⁷⁶ Portanto, apesar de o espectro de RMN de ^1H (Figura 46) ter apresentado apenas um composto majoritário nos deslocamentos químicos de hidrogênios aromáticos, as análises da etapa HPLC-(UV/MS) resultaram na detecção de quatro compostos dominantes no efluente, os quais tiveram os tempos de retenção em 12,8, 17,6, 22,5 e 24,9 min, como apresentados nos cromatogramas 1D (Figura 47a) e 2D (Figura 47b). As análises por MS foram adquiridas no modo negativo de ionização $[\text{M-H}]^-$, já que os adutos dos analitos apresentaram melhor desprotonação (Figura 47c) quando comparada a protonação (modo positivo de ionização). Na Figura 47, as cores relacionam cada pico cromatográfico ao seu respectivo sinal (m/z) no espectro de massas.

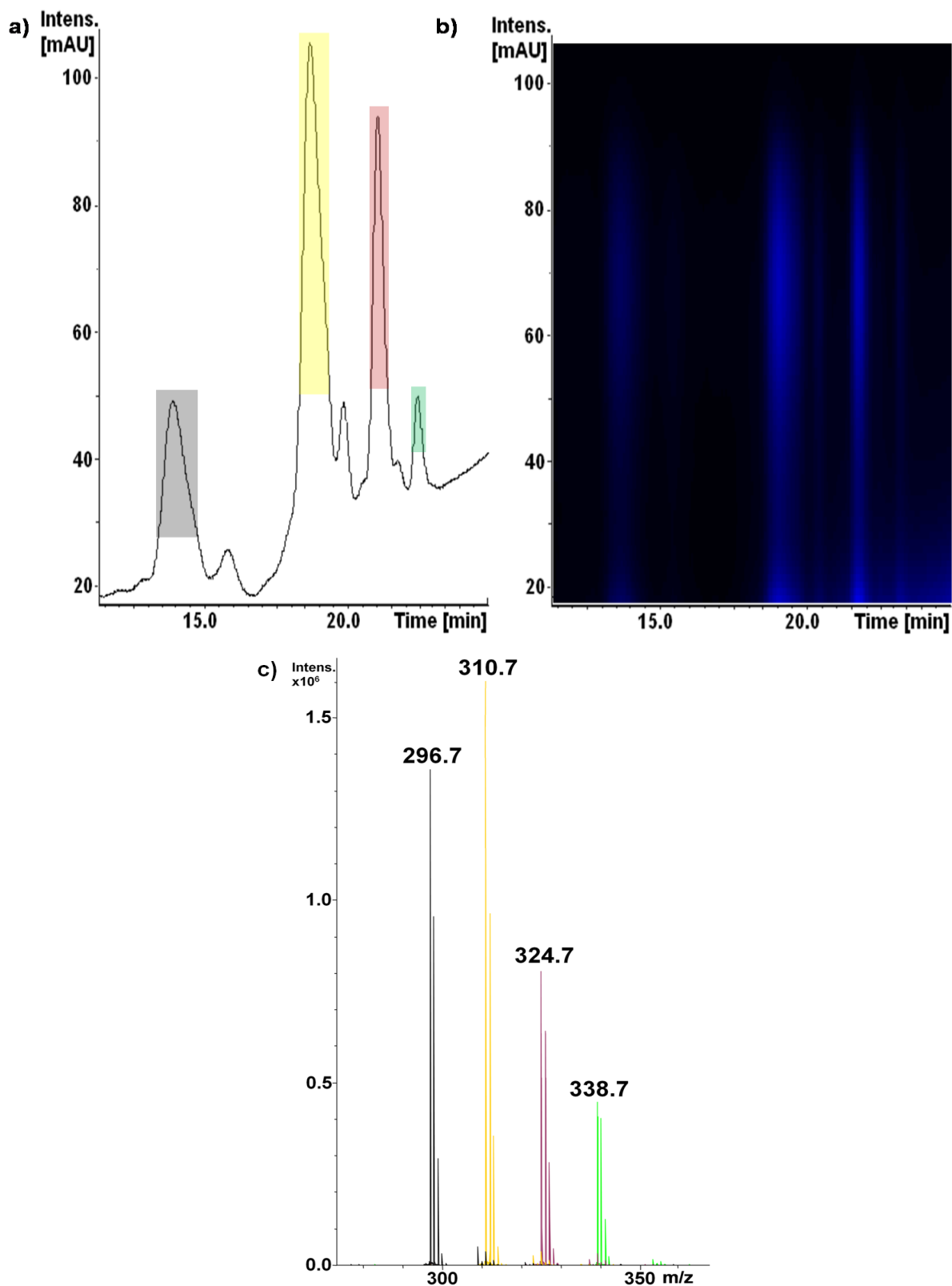


FIGURA 47 – Cromatogramas 1D (a), 2D (b) e espectros de massas no modo negativo de ionização adquirido a partir do extrato do efluente (c). As cores relacionam cada pico cromatográfico ao seu respectivo sinal (m/z) no espectro de massas.

Os resultados da etapa HPLC-(UV/MS) revelaram espécies $[M-H]^-$ com m/z de 296,7, 310,7, 324,7 e 338,7. Com isso, a distinção entre os compostos foi facilmente atingida, já que a diferença entre as relações m/z foi de 14. Portanto, a eluição destes compostos ocorreu de acordo com o comprimento da cadeia alquílica pelos diferentes números de grupos metileno ($-CH_2-$).

Após essa constatação, iniciaram-se as análises da etapa para retenção ou “trapeamento” dos compostos alvos. Para tanto, os quatro picos majoritários foram selecionados e enviados, quinze vezes, aos cartuchos de C_{18} , separadamente, que estavam alocados na unidade SPE. Este procedimento foi feito no sentido de concentrar os analitos de interesse para as posteriores aquisições por RMN. Ainda nesta etapa, foram adquiridos os espectros de fragmentação (MS/MS) através dos experimentos de monitoramento de íon selecionado, com o objetivo de auxiliar na elucidação e diferenciação estrutural dos analitos, os quais estão apresentados na Figura 48. Estes íons, quando submetidos à dissociação induzida por colisão (CID), produziram um fragmento comum com m/z de 182,7, confirmando que são estruturas homólogas e fazem parte da classe dos principais surfactantes aniônicos utilizados nos produtos de limpeza, os LAS. A Figura 48 também apresenta propostas estruturais dos LAS relativos a cada pico, assim como seus respectivos fragmentos. Os padrões de fragmentação obtidos foram os mesmos encontrados por Schmidt *et al.* em 2010.¹⁰⁸ No entanto, as estruturas finais apresentadas na Figura 48 apenas foram alcançadas após as análises dos espectros de RMN bidimensionais de COSY (Figura 51).

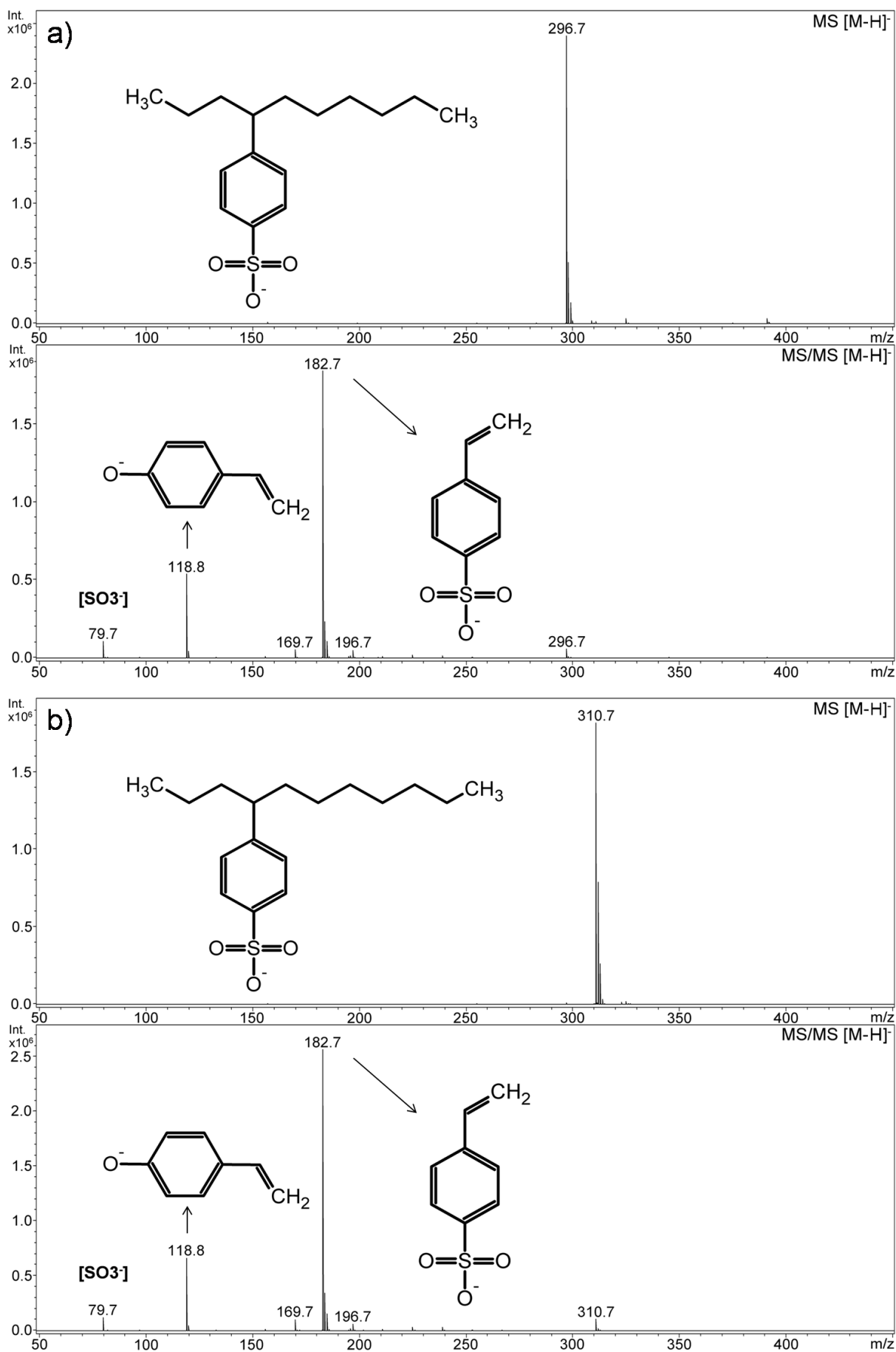


Figura 48

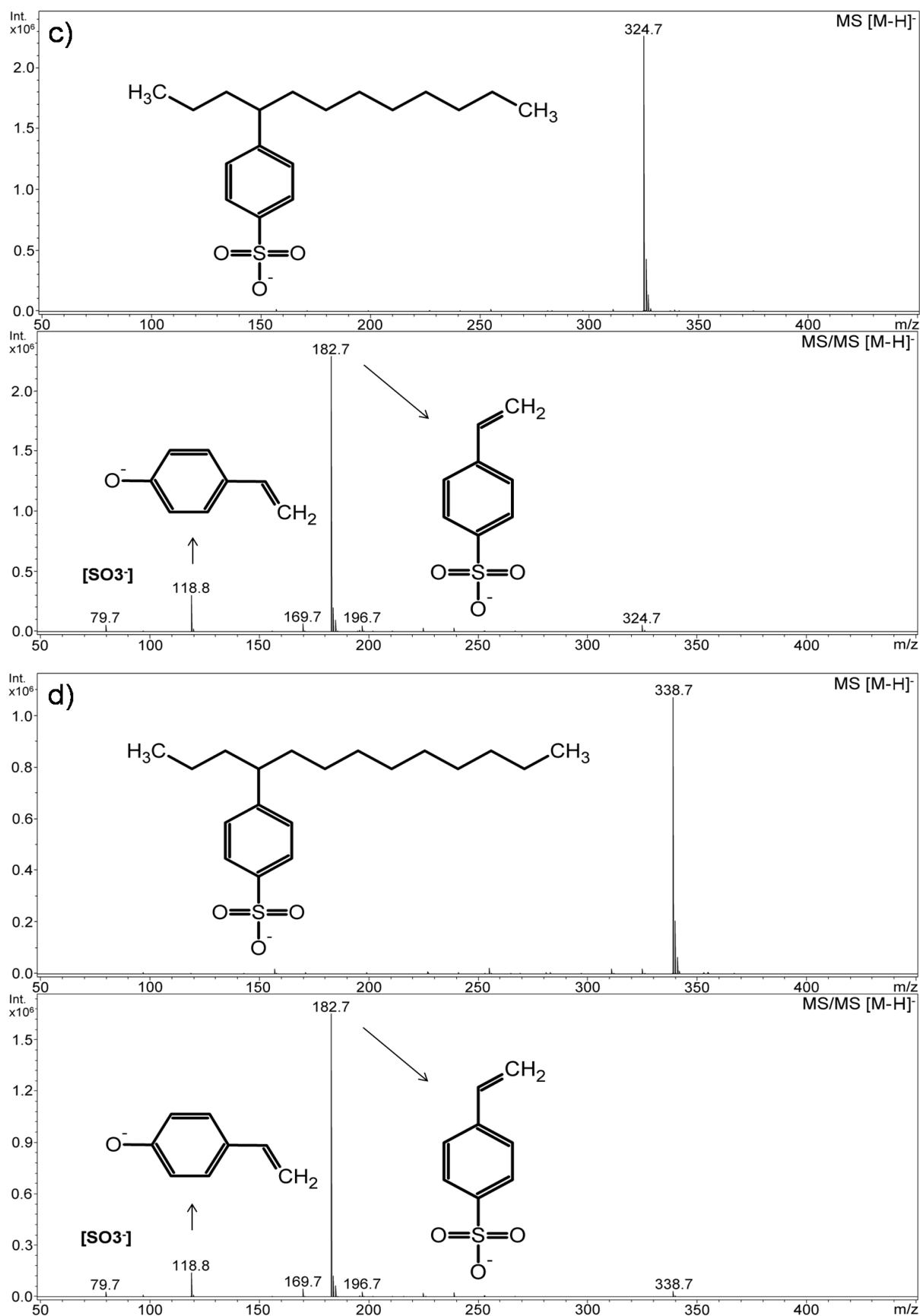


FIGURA 48 – Espectros de massas [M-H]⁻ com as respectivas propostas de fragmentação para os surfactantes LAS: a) C₁₀; b) C₁₁; c) C₁₂; d) C₁₃.

Após o envio de cada analito aos cartuchos de C_{18} na unidade de SPE, o seu conteúdo foi extraído com metanol deuterado e enviado automaticamente para tubos de RMN de 1,7 mm de diâmetro que estavam alocados no amostrador automático (ASS) para, em seguida, serem feitas as análises de RMN necessárias para completa elucidação estrutural.

As Figuras 49a e 49b apresentam os experimentos bidimensionais de correlações heteronucleares a uma ligação (HSQC) e a longa distância (HMBC) para o homólogo C_{10} que foi detectado nas amostras de efluente, onde as atribuições dos deslocamentos químicos e interações entre os núcleos de hidrogênio e carbono confirmaram a presença dos LAS.

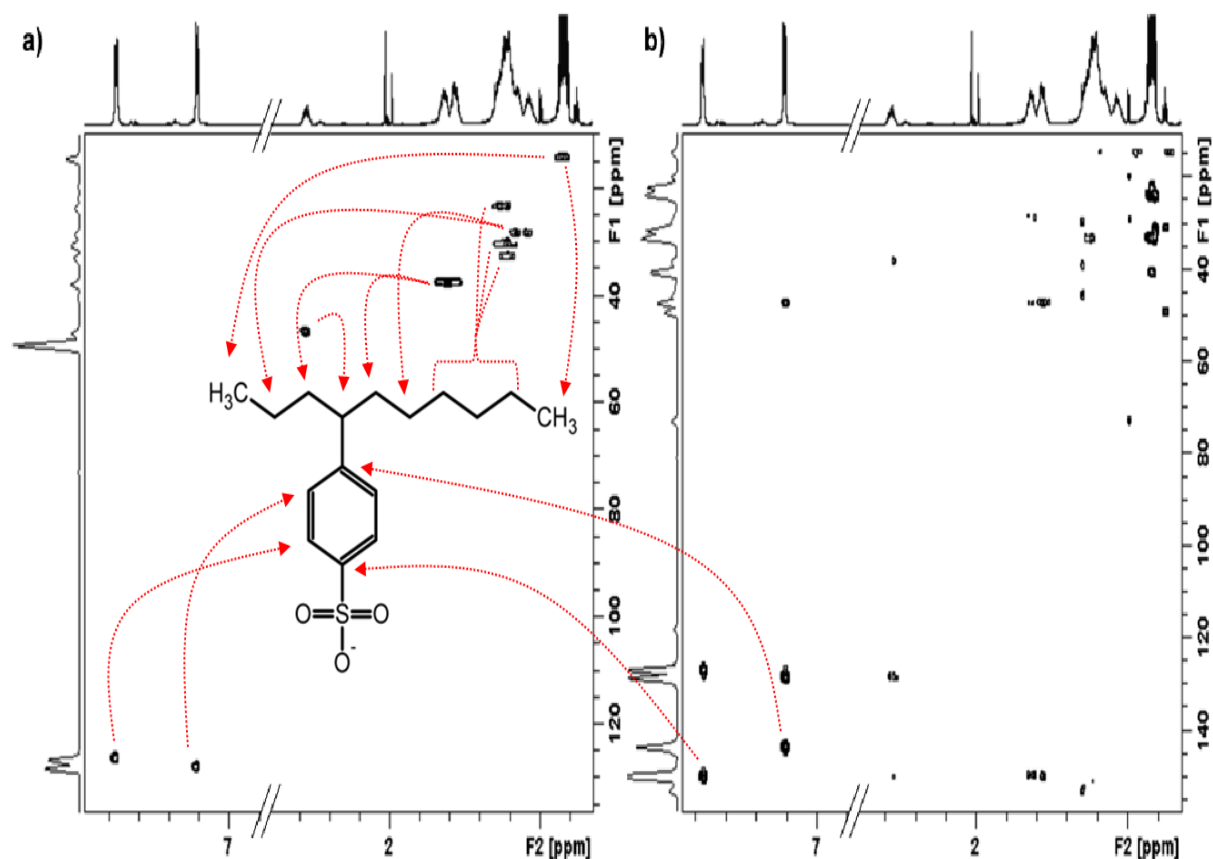


FIGURA 49 – Experimentos heteronucleares bidimensionais para o homólogo C_{10} dos surfactantes detectados no efluente: a) HSQC; b) HMBC.

Uma comparação feita entre os espectros de RMN de 1H dos surfactantes isolados previamente (Figura 50) também revelou o aumento no número de grupos metileno alquílicos nos deslocamentos químicos entre δ 1,00 e

1,45, de acordo com o aumento no valor da relação m/z e, desta forma, corroborando os resultados adquiridos por MS.

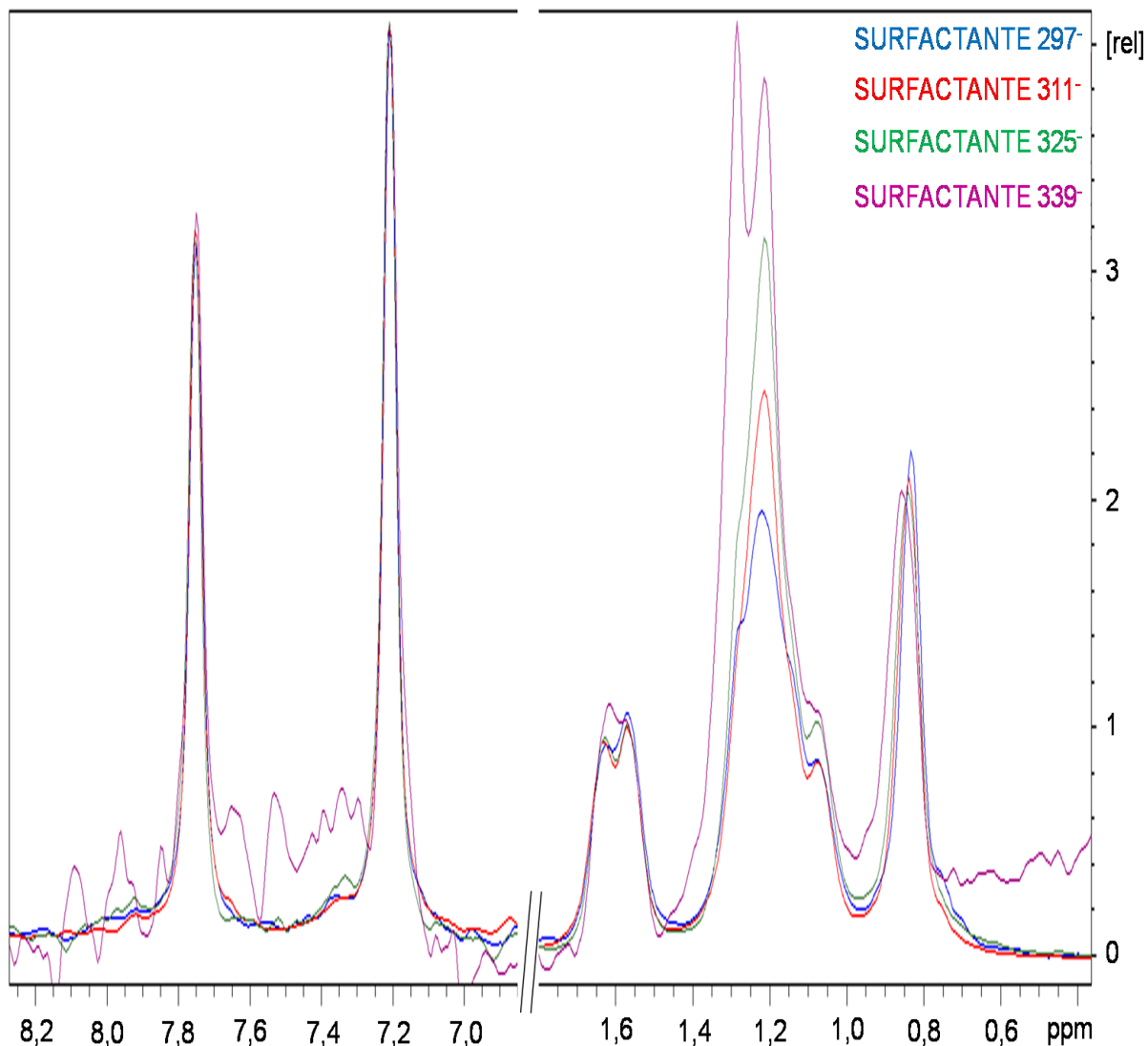


FIGURA 50 – Comparação entre os espectros de RMN de ^1H dos surfactantes isolados.

Todas as análises realizadas até o momento confirmaram a presença de quatro contaminantes homólogos (C_{10} , C_{11} , C_{12} e C_{13}) nas amostras de efluente. Este estudo demonstrou a baixa remoção dos LAS com tratamento do esgoto praticado pela ETE de São Carlos-SP, que foi causada pelo processo biológico para degradação da matéria orgânica, unicamente anaeróbico.^{177,178,179} Desta forma, estes surfactantes foram largamente despejados no rio Monjolinho quando comparados a outros contaminantes emergentes.

Por conseguinte, ainda falta finalizar a elucidação estrutural dos LAS, ou seja, encontrar o carbono “ α ” da cadeia alquílica que interage com o anel aromático. Este resultado apenas foi alcançado através das análises de RMN bidimensionais de correlações homonucleares a uma ligação (COSY). A Figura 51 apresenta um espectro de COSY para o homólogo C₁₀ dos surfactantes LAS.

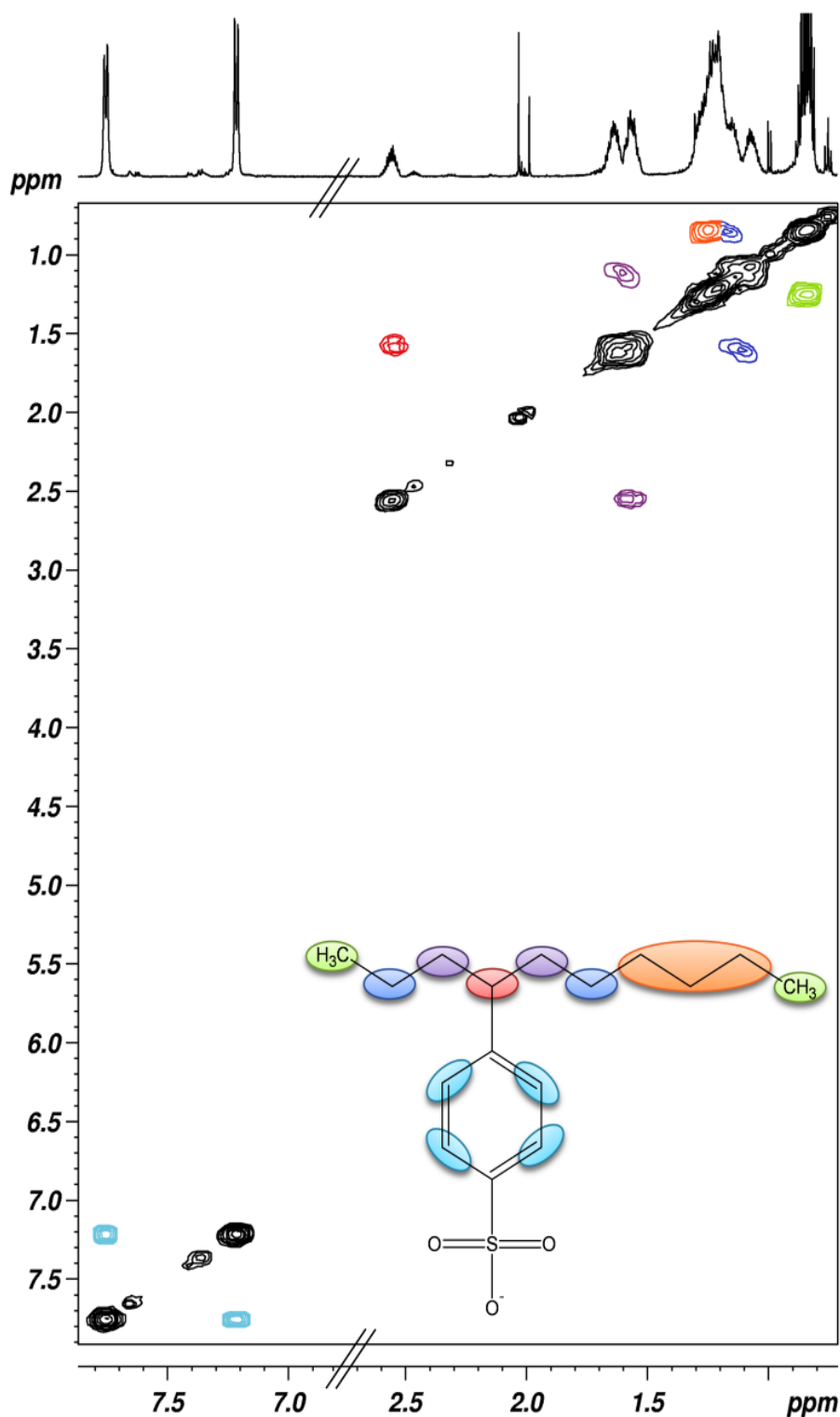


FIGURA 51 – Experimento de RMN bidimensional de COSY com as correlações para o homólogo C₁₀ dos surfactantes LAS detectados no efluente.

Devido a complexidade dos acoplamentos escalares dos hidrogênios alifáticos, seus sinais se apresentam como multipletos. A estratégia para completar a

elucidação foi definir um ponto de partida para se iniciar as correlações, o qual foi o atribuído ao hidrogênio alifático mais desblindado que estava ligado ao carbono “ α ”, ou seja, no deslocamento químico em δ 2,55, apresentado na cor vermelha da Figura 51. A partir deste sinal, todas as outras correlações foram identificadas. Assim, o hidrogênio “ α ” em relação à junção com o anel aromático apresentou correlações para os dois lados da ramificação da cadeia alquílica, ou seja, com os hidrogênios vicinais ligados ao carbono “ β ”, os quais apresentaram dois multipletos nos deslocamentos químicos entre δ 1,52 e 1,69, ilustrados na cor roxa. Estes hidrogênios se correlacionaram também com os dois lados da ramificação da cadeia, onde seus hidrogênios vicinais que estavam acoplados ao carbono “ γ ” apresentaram dois multipletos nos deslocamentos químicos entre δ 1,01 e 1,18, ilustrados na cor azul escura, parcialmente sobreposto pelo multipletto no deslocamento químico entre δ 1,18 e 1,33, que se refere a outros grupos metilenas. Os hidrogênios destes grupos metilenas nos deslocamentos químicos entre δ 1,18-1,33, na cor alaranjada, apresentaram correlações com os hidrogênios terminais de um grupo metílico, em verde, no deslocamento químico entre δ 0,80 e 0,90 e, desta forma, apresentando o lado maior da ramificação da cadeia alquílica. Os hidrogênios ligados ao carbono “ γ ” relativos ao outro lado da ramificação da cadeia alquílica, em azul-escuro, também se correlacionaram com os hidrogênios de outro grupo metila que apresentaram seu sinal no deslocamento químico entre δ 0,80 e 0,90. Assim sendo, os grupos metila mostraram que não existem outros grupos interagindo com os grupos metilenas, finalizando a cadeia alquílica sem ramificações. Os sinais referentes aos hidrogênios aromáticos de todos os homólogos apresentaram dois dupletos ($J = 8,70$ Hz) nos mesmos deslocamentos químicos em δ 7,21 e 7,75, na cor azul claro, os quais foram relacionados a quatro hidrogênios: dois para os carbonos 3/5; dois para os carbonos 2/4.

Portanto, nas amostras do efluente da ETE de São Carlos-SP foi evidenciada a presença predominante de quatro homólogos dos surfactantes LAS (C_{10} , C_{11} , C_{12} e C_{13}) com o mesmo padrão de substituição no carbono 4 da cadeia alquílica, os quais foram quantificados na seção 4.3 do Capítulo I deste trabalho.

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Através das análises quimiométrica (HCA e PCA) e quantitativa desenvolvidas no primeiro capítulo, foi possível detectar tendências nas concentrações dos ácidos acético e propiônico (que representam a degradação do material orgânico) das amostras de esgoto em função da sazonalidade da coleta; apontar possíveis descartes anômalos, como de uréia, dimetilamina e glicerol; além de comprovar a existência de ligações clandestinas, como as residências e/ou comércios fazendo seus descartes de águas pluviais no sistema comum de esgoto da cidade de São Carlos-SP. Desta forma, a discriminação das amostras de esgoto pela RMNq e quimiometria foi importante e inédita, pois as análises foram feitas com uma pequena quantidade do material (20 mL) e sem um pré-tratamento complexo (apenas filtração), o que tornou a composição das amostras muito próxima e representativa da composição real. Estas vantagens podem ser um amplo atrativo para as ETEs, já que para suas análises de monitoramento e controle, é utilizada uma grande quantidade de material, além de um controle feito apenas através da DBO, DQO e pH, por exemplo.

No segundo capítulo, os resultados demonstraram que a combinação HPLC-(UV/MS)-SPE-ASS-NMR permitiu a detecção e a completa elucidação de contaminantes não específicos em misturas complexas, em baixas concentrações e sem o uso de padrões, que é uma prática comum em análises amplamente difundidas como HPLC-MS ou GC-MS. Esse dado é muito importante, pois nem sempre se conhece os produtos de degradação contidos em uma matriz e, em algumas vezes, é difícil se encontrar os padrões certificados.

Portanto, as informações sobre o conteúdo de componentes orgânicos do esgoto – tanto no primeiro como no segundo capítulo deste estudo – foram especialmente úteis para avaliação do tratamento de esgoto da ETE de São Carlos-SP. Deste modo, a RMNq aliada à quimiometria se mostrou uma ferramenta de grande valia, já que os dados foram obtidos de forma rápida, não destrutiva, além de fornecerem informações abrangentes sobre a composição orgânica da amostra. Com isso, as variações sazonais e anomalias na composição química das amostras

CONSIDERAÇÕES FINAIS

do esgoto sanitário doméstico mostraram que os resultados podem servir como orientação para aumentar a eficácia do tratamento, além de identificar descargas anômalas, irregulares ou ilegais.

O controle da presença de certos compostos químicos no esgoto sanitário doméstico deveria ser mais uma variável a ser explorada durante o processo de gestão de uma ETE. Através dos resultados alcançados nos estudos dos Capítulos I e II, foi demonstrado que o monitoramento da carga orgânica presente no esgoto ao entrar e sair da ETE é de grande importância para se estimar os impactos nos corpos hídricos receptores do despejo, neste caso, o rio Monjolinho. Embora seja demasiadamente complicada a implementação de uma rotina para análises como as desenvolvidas neste trabalho, esforços devem ser efetivados para o estudo, no mínimo, das classes de compostos comprovadamente tóxicas e prejudiciais ao meio ambiente e a população.

Por fim, o trabalho mostrou sua viabilidade da aplicação da RMN no estudo dos compostos intermediários na degradação da matéria orgânica pela ação das bactérias nos reatores UASB, como ácidos acético, propiônico, butírico, láctico e dimetilamina, por exemplo. Esta é uma linha de pesquisa promissora, já que pouco se sabe sobre a degradação do material orgânico nos reatores anaeróbio, apesar de alguns estudos terem apresentado resultados sobre o tratamento anaeróbio na decomposição de carboidratos, proteínas e lipídeos.

8. APÊNDICE

As Tabelas 2 e 4 apresentam os valores das massas que foram calculadas, em mg.L^{-1} (ppm – partes por milhão), para os compostos quantificados nas amostras de esgoto não tratado e tratado, respectivamente, com exceção dos surfactantes que tiveram suas concentrações estimadas na unidade mmol.L^{-1} (ppm), como mostrado na seção 4.3. As Tabelas 3 e 5 apresentam as respectivas incertezas combinadas calculadas para cada concentração citada nas Tabelas 2 e 4, as quais foram relacionadas aos erros da micropipeta, da balança, da pureza do TMSD-d₄ (padrão interno) e do desvio padrão relativo a quintuplicata das análises de RMN de ¹H.

Como o método de quantificação por RMN Eretic2[®] (Bruker) fornece as concentrações na unidade mmol.L^{-1} , foi utilizado o procedimento a seguir para converter as concentrações para a unidade mg.L^{-1} . Primeiro, as concentrações foram divididas por 1000 para que a unidade seja modificada para mmol.mL^{-1} e, em seguida, multiplicadas por 0,001 para serem alteradas para mol.mL^{-1} . Agora, para que esta unidade seja transferida para mg.mL^{-1} , as concentrações foram multiplicadas pelas respectivas massas molares (MM em mg.mol^{-1}) dos compostos selecionados para quantificação. Ainda, como todas as concentrações se referem a 20 mL de águas de esgoto que foram utilizados no preparo amostral (apresentado na seção 3.1), estas foram divididas por 20 para se ter uma estimativa por mL. Por fim, as concentrações foram multiplicadas por 1000 para que, assim, as unidades sejam apresentadas na forma final desejada, mg.L^{-1} ou ppm. A Equação 9 apresenta a fórmula que foi utilizada no procedimento de conversão da unidade mmol.L^{-1} para mg.L^{-1} , descrito acima, onde “x” representa a concentração final.

$$\{ [(x / 10^6) \cdot \text{MM}] / 20 \} \cdot 10^3 \quad \text{Equação 9}$$

Previamente ao cálculo das incertezas combinadas, foi estimado o valor das incertezas (“y”) relativas a balança, micropipeta e a pureza de 98% do TMSD-d₄, como mostrado na Equação 10.¹⁸⁰ Desta forma, o valor encontrado foi de 0,00042.

APÊNDICE

$$y = (1,795 / 983,475)^2 + (0,11 / 499,82)^2 + (0,02 / 0,98)^2 \quad \text{Equação 10}$$

Os valores 983,475 e 1,795 apresentados na equação acima foram obtidos a partir da média das massas e desvio padrão, respectivamente, de uma triplicata de 10 medidas de 1,0 mL de água feitas em dias distintos e horários que variaram entre as 8 e 19h para, com isso, se avaliar os erros relacionados a balança e micropipeta que foram utilizados nas medidas. Ainda, um erro relativo apenas a balança foi estimado, com a média das massas (499,82) e o respectivo desvio padrão (0,11) adquiridos a partir de uma massa de referência (500 mg) aferida durante três dias, 10 vezes em cada dia e em horários que variaram entre as 8 e 19h.

O valor resultante da Equação 10 (0,00042) foi utilizado para o cálculo das incertezas combinadas, tanto para as mostras de esgoto não tratado (Tabela 3), como para as amostras de esgoto tratado (Tabela 5). Para o cálculo das incertezas combinadas (“z”), utilizou-se a Equação 11, onde:¹⁸⁰ “Δ” simboliza a média das quintuplicadas das massas fornecidas pelo método Eretic2; “DP” os desvios padrão das respectivas quintuplicatas; 0,00042 representa o erro relacionado a balança, pipeta e a pureza do TMSP-d₄.

$$z = \sqrt{[0,00042 + (DP / \Delta)^2]} \quad \text{Equação 11}$$

TABELA 2 – Estimativa das concentrações dos compostos orgânicos presentes nas amostras de esgoto não tratado, em mg.L⁻¹ ou ppm.

Compostos	<i>Ácido Fórmico</i>	<i>Ácido Fenilacético</i>	<i>Dimetilamina</i>	<i>Ácido Acético</i>	<i>Ácido Propiônico</i>
Coleta					
8-jun-11	0,8282	0,9531	1,7130	20,0267	4,0743
15-jun-11	0,5521	1,1573	0,0902	31,7364	8,5191
20-jun-11	2,0705	0,8850	0,3832	32,9975	7,5931
25-jun-11	0,4141	0,9531	0,0451	39,3928	10,9267
8-jul-11	0,5061	0,8169	2,5019	26,8424	5,0003

APÊNDICE

<i>Tabela 2</i>	<i>continuação</i>				
25-jul-11	0,7132	1,0892	9,2414	27,7431	6,1115
8-ago-11	0,3681	1,0892	6,0633	48,1901	9,7414
15-ago-11	1,0812	1,4296	0,2029	51,3127	9,8155
25-ago-11	0,5751	1,4296	0,3381	42,6355	7,2968
29-ago-11	0,5751	0,8169	-	66,9257	19,0753
8-set-11	0,6902	1,4977	0,3156	59,8398	14,7047
15-set-11	1,1042	2,8592	0,1803	105,8682	30,4835
20-set-11	0,6441	1,3615	0,2930	68,1568	14,5936
29-set-11	1,1042	1,4296	6,8071	91,0058	27,3352
8-out-11	3,7958	-	2,0286	2,8224	0,4445
15-out-11	2,1165	1,2934	1,7807	49,8715	9,8895
20-out-11	1,9094	3,2676	2,7724	115,3861	43,4473
29-out-11	3,3817	1,1573	1,4200	93,7080	31,5577
2-nov-11	1,2883	1,4296	1,5102	73,8915	20,7421
10-nov-11	0,9432	1,7019	7,4157	14,6522	4,7040
16-nov-11	0,7822	0,8850	2,2315	23,6597	4,7411
23-nov-11	0,8282	2,3826	0,1127	85,1809	25,0017
30-nov-11	1,0122	1,6338	0,4057	49,3911	10,9637
5-dez-11	1,5873	2,0423	3,5388	102,5654	36,2246
18-dez-11	1,6564	0,8169	1,3299	18,7957	4,1114
25-dez-11	1,9324	0,6127	2,3892	3,7231	0,8149
1-jan-12	2,3235	1,8380	6,0407	110,9424	42,0398
25-jan-12	2,0014	1,2934	0,7889	53,5646	11,6304
2-fev-12	1,3803	0,8169	1,3299	105,0275	32,4096

APÊNDICE

<i>Tabela 2</i>	<i>continuação</i>				
9-fev-12	2,1625	1,3615	1,2848	70,6188	16,6307
15-fev-12	0,6902	0,6808	1,1721	48,5805	11,8526
24-fev-12	1,0352	0,7488	0,3832	48,3403	6,5930
29-fev-12	2,0244	0,7488	1,7581	54,2552	8,9636
6-mar-12	0,8512	0,8169	2,9753	91,8165	21,8533
14-mar-12	2,0935	1,2254	1,6454	60,1101	13,4083
22-mar-12	1,0122	1,1573	0,6311	72,2101	16,5937
29-mar-12	0,9202	1,2254	1,0143	102,6555	31,9651
4-abr-12	0,5291	0,4085	1,2622	21,8582	2,5928
11-abr-12	0,8742	0,6127	0,2029	64,7339	13,9639
18-abr-12	1,2883	0,6127	0,5860	67,6764	10,4081
25-abr-12	0,9892	0,7488	0,1803	54,2252	11,9267
1-mai-12	0,9892	0,6127	0,3832	45,5479	9,9266
9-mai-12	1,0812	0,7488	0,2029	83,7698	23,7053
16-mai-12	2,4615	0,5446	0,3606	44,3770	5,4448
22-mai-12	1,7484	0,7488	0,1803	44,8874	9,0006
30-mai-12	1,1042	0,5446	1,0368	26,7523	8,6302
6-jun-12	1,0582	0,8850	0,1803	62,3920	11,8526
13-jun-12	0,9432	0,6127	20,4438	80,5271	22,2237

APÊNDICE

TABELA 3 – Incertezas das concentrações dos compostos orgânicos presentes nas amostras de esgoto não tratado, em mg.L⁻¹ ou ppm.

Compostos	<i>Ácido Fórmico</i>	<i>Ácido Fenilacético</i>	<i>Dimetilamina</i>	<i>Ácido Acético</i>	<i>Ácido Propiônico</i>
Coluna					
8-jun-11	0,0087	0,0102	0,0155	0,0395	0,0086
15-jun-11	0,0104	0,0094	0,0032	0,1799	0,0863
20-jun-11	0,0857	0,0144	0,0157	0,8506	0,1816
25-jun-11	0,0015	0,0353	0,0030	0,5743	0,2171
8-jul-11	0,0191	0,0095	0,0691	0,5555	0,0844
25-jul-11	0,0130	0,0417	0,1848	0,5888	0,1302
8-ago-11	0,0073	0,0297	0,1099	0,7419	0,1560
15-ago-11	0,0308	0,0363	0,0078	1,1113	0,2237
25-ago-11	0,0130	0,0352	0,0119	0,6504	0,1507
29-ago-11	0,0093	0,0014	-	0,8603	0,6427
8-set-11	0,0261	0,0147	0,0258	1,0416	0,2458
15-set-11	0,0357	0,0323	0,0019	1,1384	0,2911
20-set-11	0,0972	0,0383	0,0163	2,1931	0,4034
29-set-11	0,0125	0,0135	0,0245	0,2305	0,1096
8-out-11	0,0681	-	0,0127	0,0745	0,0153
15-out-11	0,0835	0,0232	0,0245	1,0757	0,2217
20-out-11	0,0469	0,0569	0,0410	2,3531	0,7613
29-out-11	0,0880	0,0218	0,0178	0,9819	0,3182
2-nov-11	0,0337	0,0132	0,0228	1,1701	0,3140
10-nov-11	0,0093	0,0111	0,1012	0,0587	0,0178
16-nov-11	0,0115	0,0247	0,0387	0,3358	0,1334

APÊNDICE

<i>Tabela 3</i>	<i>continuação</i>				
23-nov-11	0,0363	0,0799	0,0045	3,3800	0,9196
30-nov-11	0,0033	0,0212	0,0053	0,2310	0,0165
5-dez-11	0,0389	0,0164	0,0795	2,1428	0,9499
18-dez-11	0,0344	0,0191	0,0205	0,1743	0,0675
25-dez-11	0,0254	0,0254	0,0567	0,0900	0,0262
1-jan-12	0,0213	0,0345	0,0535	0,7044	0,3308
25-jan-12	0,0347	0,0221	0,0161	0,3581	0,1053
2-fev-12	0,0250	0,0106	0,0320	1,9393	0,5704
9-fev-12	0,0157	0,0047	0,0244	0,4299	0,1503
15-fev-12	0,0188	0,0203	0,0843	1,0912	0,2847
24-fev-12	0,0234	0,0116	0,0301	0,5894	0,0914
29-fev-12	0,0502	0,0166	0,0586	0,7769	0,1474
6-mar-12	0,0190	0,0200	0,0567	1,5282	0,3675
14-mar-12	0,0402	0,0110	0,0185	0,6263	0,1625
22-mar-12	0,0325	0,0248	0,0201	1,6028	0,3933
29-mar-12	0,0081	0,0180	0,0122	0,8259	0,2038
4-abr-12	0,0285	0,0148	0,0974	1,0410	0,0634
11-abr-12	0,0198	0,0349	0,0220	1,4120	0,3701
18-abr-12	0,0516	0,0071	0,0229	1,7338	0,2168
25-abr-12	0,0192	0,0263	0,0037	1,0271	0,2121
1-mai-12	0,0311	0,0149	0,0134	1,1755	0,2615
9-mai-12	0,0254	0,0266	0,0047	1,8147	0,5114
16-mai-12	0,1041	0,0358	0,0418	2,2674	0,2571
22-mai-12	0,0137	0,0091	0,0100	0,4693	0,0935

APÊNDICE

<i>Tabela 3</i>	<i>continuação</i>				
30-mai-12	0,0233	0,0094	0,0281	0,4663	0,1517
6-jun-12	0,0275	0,0105	0,0039	1,4138	0,1771
13-jun-12	0,0168	0,0126	0,2126	0,9237	0,2650

TABELA 4 – Estimativa das concentrações dos compostos orgânicos presentes nas amostras de esgoto tratado, em mg.L⁻¹ ou ppm.

<i>Compostos</i>	<i>Ácido Fórmico</i>	<i>Surfactantes*</i>	<i>Dimetilamina</i>	<i>Ácido Lático</i>	<i>Ácido Acético</i>	<i>Ácido Propiônico</i>
<i>Coleta</i>						
8-jun-11	0,8742	0,0900	0,3381	0,9908	2,2520	0,3704
15-jun-11	0,3911	0,1000	0,0676	0,4504	1,5764	0,3334
20-jun-11	0,6441	0,0700	0,1127	0,5405	1,9367	0,2593
25-jun-11	0,4601	0,0900	0,0902	0,5705	1,0359	0,2222
8-jul-11	0,4371	0,1000	2,0286	0,4804	1,8016	0,3704
25-jul-11	0,4371	0,1200	6,1309	0,4504	1,2161	0,2963
8-ago-11	0,3221	0,1300	6,6493	1,0809	1,4863	0,2593
15-ago-11	0,7362	0,1100	0,2930	0,8107	4,3238	0,4074
25-ago-11	0,3451	0,1200	0,3381	0,7206	3,1978	0,4074
29-ago-11	1,3343	0,2200	0,1803	1,2310	4,0086	0,6667
8-set-11	0,8972	0,1500	0,4057	1,0509	3,8734	0,5556
15-set-11	0,8972	0,1200	0,2254	0,9908	3,9635	0,5556
20-set-11	1,2653	0,1500	10,9544	0,9608	3,5131	0,4074
29-set-11	4,8311	0,0900	10,9770	0,6906	0,7657	0,4815
8-out-11	2,1625	0,1500	1,1045	0,8407	2,7024	0,3704

APÊNDICE

<i>Tabela 4</i>		<i>continuação</i>				
15-out-11	0,6902	0,1400	2,1638	0,4504	1,4413	0,3704
20-out-11	0,9662	0,1200	0,9016	0,9608	4,0986	0,6667
29-out-11	0,8512	0,1200	0,4959	0,6906	5,1796	0,8149
2-nov-11	0,8052	0,0700	1,0143	0,6305	2,2070	0,2593
10-nov-11	1,2193	0,1200	2,7724	0,9908	3,8284	0,5186
16-nov-11	1,1272	0,1000	0,9918	1,0509	4,2338	0,5186
23-nov-11	0,6671	0,1200	0,2479	0,8407	4,2788	0,7778
30-nov-11	0,4601	0,1100	0,6537	0,6305	1,4413	0,4815
5-dez-11	0,7132	0,0800	5,3194	0,6305	1,9367	0,3334
18-dez-11	1,6334	0,1500	2,0737	1,5613	3,7834	0,6297
25-dez-11	2,9216	0,1100	3,8769	1,0809	3,1978	0,4074
1-jan-12	1,7714	0,0800	2,7724	1,0809	4,8193	0,5926
25-jan-12	1,1963	0,1300	0,3606	1,0809	4,0536	0,5556
2-fev-12	1,7254	0,1200	0,5184	1,4712	3,1978	0,5926
9-fev-12	1,1042	0,1600	1,0368	1,5013	8,0622	1,6297
15-fev-12	1,8634	0,1700	0,5184	1,4712	4,1887	0,7778
24-fev-12	1,3343	0,2100	0,4733	1,0509	4,1887	0,8889
29-fev-12	1,5643	0,2100	1,4651	2,4320	4,5941	0,6297
6-mar-12	0,6671	0,1900	0,2254	2,0417	4,0986	0,5186
14-mar-12	1,1963	0,1400	0,9692	2,2219	5,1346	0,7408
22-mar-12	1,2653	0,1700	0,3381	2,5521	6,1254	0,9260
29-mar-12	0,7132	0,1200	2,0737	0,6606	2,7024	0,5186
4-abr-12	0,5751	0,1200	2,1413	2,6422	4,8643	0,8889
11-abr-12	0,5981	0,1100	0,3606	0,6906	4,8643	0,5926

APÊNDICE

<i>Tabela 4</i>				<i>continuação</i>		
18-abr-12	1,3343	0,1400	0,8114	1,9516	5,8102	0,7038
25-abr-12	1,0122	0,1700	0,3381	1,8916	4,8193	0,7038
1-mai-12	1,6104	0,1100	0,8114	1,3812	4,5040	0,5926
9-mai-12	3,4508	0,1600	0,7889	1,0809	19,6374	0,7778
16-mai-12	4,6930	0,2300	0,2705	1,8616	56,3901	1,2223
22-mai-12	2,7146	0,1300	0,4283	1,1410	4,0536	1,0001
30-mai-12	0,9662	0,0700	0,3606	0,6005	3,1528	0,6667
6-jun-12	1,0352	0,1100	0,2254	1,2310	4,7742	0,9630
13-jun-12	1,0812	0,1100	5,6801	2,1618	5,6300	0,9630

*As massas dos surfactantes estão apresentadas em mmol.L⁻¹.

TABELA 5 – Incertezas das concentrações dos compostos orgânicos presentes nas amostras de esgoto tratado, em mg.L⁻¹ ou ppm.

Compostos	<i>Ácido Fórmico</i>	<i>Surfactantes*</i>	<i>Dimetilamina</i>	<i>Ácido Acético</i>	<i>Ácido Láctico</i>	<i>Ácido Propiônico</i>
Coleta						
8-jun-11	0,0054	0,0009	0,0086	0,0061	0,0200	0,0098
15-jun-11	0,0052	0,0012	0,0024	0,0272	0,0240	0,0101
20-jun-11	0,0066	0,0009	0,0027	0,0214	0,0301	0,0044
25-jun-11	0,0071	0,0016	0,0020	0,0209	0,0254	0,0081
8-jul-11	0,0043	0,0011	0,0040	0,0161	0,0094	0,0128
25-jul-11	0,0042	0,0013	0,0247	0,0224	0,0348	0,0049
8-ago-11	0,0057	0,0034	0,0220	0,0452	0,0234	0,0069
15-ago-11	0,0047	0,0013	0,0009	0,0591	0,0295	0,0080
25-ago-11	0,0021	0,0010	0,0079	0,0054	0,0228	0,0055
29-ago-11	0,0303	0,0021	0,0046	0,0292	0,0401	0,0229

APÊNDICE

<i>Tabela 5</i>	<i>continuação</i>					
8-set-11	0,0081	0,0011	0,0102	0,0468	0,0443	0,0156
15-set-11	0,0326	0,0025	0,0060	0,0511	0,0232	0,0155
20-set-11	0,0227	0,0025	0,0511	0,0468	0,0275	0,0130
29-set-11	0,0641	0,0013	0,0718	0,0168	0,0270	0,0052
8-out-11	0,0400	0,0018	0,0065	0,0273	0,0078	0,0069
15-out-11	0,0114	0,0024	0,0148	0,0310	0,0303	0,0068
20-out-11	0,0170	0,0031	0,0103	0,0357	0,0363	0,0207
29-out-11	0,0125	0,0012	0,0143	0,0471	0,0286	0,0171
2-nov-11	0,0082	0,0028	0,0107	0,0079	0,0665	0,0058
10-nov-11	0,0083	0,0019	0,0168	0,0147	0,0328	0,0025
16-nov-11	0,0362	0,0025	0,0140	0,0416	0,0609	0,0160
23-nov-11	0,0068	0,0026	0,0028	0,0407	0,0389	0,0323
30-nov-11	0,0038	0,0086	0,0241	0,0340	0,0171	0,0273
5-dez-11	0,0040	0,0016	0,0273	0,0161	0,0341	0,0019
18-dez-11	0,0113	0,0011	0,0110	0,0245	0,0931	0,0105
25-dez-11	0,0396	0,0014	0,0403	0,0191	0,1281	0,0137
1-jan-12	0,6615	0,0017	0,0287	0,0421	0,1071	0,0131
25-jan-12	0,0099	0,0021	0,0121	0,0176	0,0438	0,0169
2-fev-12	0,0361	0,0027	0,0162	0,0383	0,0252	0,0238
9-fev-12	0,0175	0,0013	0,0181	0,0478	0,0952	0,0338
15-fev-12	0,0378	0,0010	0,0046	0,0405	0,0863	0,0116
24-fev-12	0,0254	0,0028	0,0140	0,0168	0,0231	0,0410
29-fev-12	0,0144	0,0010	0,0088	0,0307	0,0315	0,0257
6-mar-12	0,0067	0,0025	0,0093	0,0389	0,0359	0,0307

APÊNDICE

<i>Tabela 5</i>		<i>continuação</i>				
14-mar-12	0,0186	0,0012	0,0168	0,0372	0,0551	0,0138
22-mar-12	0,0151	0,0017	0,0122	0,0133	0,0548	0,0188
29-mar-12	0,0070	0,0014	0,0141	0,0156	0,1003	0,0269
4-abr-12	0,0123	0,0014	0,0320	0,0551	0,0500	0,0265
11-abr-12	0,0178	0,0030	0,0059	0,0534	0,0733	0,0255
18-abr-12	0,0319	0,0025	0,0233	0,0502	0,1665	0,0182
25-abr-12	0,0092	0,0006	0,0075	0,0132	0,1017	0,0118
1-mai-12	0,0296	0,0017	0,0348	0,0624	0,0792	0,0419
9-mai-12	0,1340	0,0126	0,0176	0,5315	0,0401	0,0647
16-mai-12	0,0571	0,0097	0,0159	0,5599	0,1018	0,0062
22-mai-12	0,0414	0,0010	0,0122	0,0646	0,0873	0,0218
30-mai-12	0,0097	0,0012	0,0049	0,0130	0,0565	0,0086
6-jun-12	0,0374	0,0036	0,0076	0,0913	0,0552	0,0273
13-jun-12	0,0122	0,0014	0,0340	0,0267	0,0322	0,0265

*As medidas das incertezas dos surfactantes estão apresentadas em mmol.L⁻¹.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- (1) SPELLMAN, F. R., Handbook of water and wastewater treatment plant operations. 2ª edição, Taylor & Francis, 44 (2): 205-217, 2009.
- (2) WIESMANN, U.; CHOI, I. S.; DOMBROWSKI, E.M., Fundamentals of biological wastewater treatment, Wiley-VCH, Weinheim, Hoboken, N.J., 362 p., 2007.
- (3) BARCELLOS, C. M.; ROCHA, M.; RODRIGUES, L. S.; COSTA, C. C.; OLIVEIRA, P. R.; SILVA, I. J.; JESUS, E. F. M.; ROLIM, R. G. Avaliação da qualidade da água e percepção higiênico-sanitária na área rural de Lavras MG, Brasil, *Cad. Saúde Pública*, RJ, 22 (9): 1967-1978, 2006.
- (4) SODRÉ, F. F.; LOCATELLI, M. A. F.; JARDIM, W. F. Occurrence of emerging contaminants in Brazilian drinking waters: a sewage-to-tap issue. *Water, Air and Soil Pollution*, 206: 57, 2010.
- (5) KOLPIN, D. W.; FURLONG, E. T.; MEYER, M. T.; THURMAN, E. M.; ZAUGG, S. D.; BARBER, L. B.; BUXTON, H. T. Pharmaceuticals, Hormones, and Other Organic Wastewater Contaminants in U.S. Streams, *Environmental and Science Technology*, 36: 1202-1211, 2002.
- (6) CARDOZA, L. A.; KORIR, A. K.; OTTO, W. H.; WURREY, C. J.; LARIVE, C. K., Applications of NMR spectroscopy in environmental science; *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy*, 45: 209-238, 2004.
- (7) LEE, H.; PEART, T. E.; SVOBODA, M. L. Determination of endocrine-disrupting phenols, acidic pharmaceuticals, and personal-care products in sewage by solid-phase extraction and gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1094: 122-129, 2005.
- (8) BOWER, C. K.; DAESCHEL, M. A., Resistance responses of microorganisms in food environments, *International Journal of Food Microbiology*, 50: 33-44, 1999.
- (9) GALAL-GORCHEV, Desinfección del agua potable y subproductos de inter's para la salud. In: La calidad del agua potable en America Latina: Ponderación de los riesgos microbiológicos contra los riegos de los subproductos de la desinfección química, ILSI Press: Washigton, EUA, p. 89-100, 1996.
- (10) FEACHEM, R. G.; CRADLEY, D. J.; GARELICK, H.; MARA, D. D., Sanitation and Disease: Health Aspect of Excreta and Wastewater Management, John Wiley e Sons, Chichester, p. 65-112, 1983.
- (11) STERRIT, R. M.; LESTER, J. N., Microbiology for Environmental and Public Health Engineers, E. & F.N. Spon, London, p. 32-39, 1988.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- (12) HUTZINGER, O. The Handbook of Environmental Chemistry, Barceló, ed. Springer-Verlag, Berlin, p.13, 2006.
- (13) TCHOBANOGLIOUS, G.; BURTON, F., Wastewater Engineering: Treatment, Disposal and Reuse, Metcalf & Eddy Inc., 3^a ed., McGraw-Hill, NY, p.1-23, 1991.
- (14) AGUILAR, C.; FERRER, I.; BORRUL, F.; MARCÉ, R. M.; BARCELÓ, D., Monitoring of pesticides in river water based on samples previously stored in polymeric cartridges followed by on-line solid-phase extraction liquid chromatography diode array detection and confirmation by atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, 386 (3): 237-248, 1999.
- (15) RADJENOVIC, J.; PETROVIC, M.; BARCELÓ, D. Analysis of pharmaceuticals in wastewater and removal using a membrane bioreactor, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 387 (4): 1365-1377, 2007.
- (16) VASSKOG, T.; BERGER, U.; SAMUELSEN, P.; KALLENBORN, R.; JENSEN, E., Selective serotonin reuptake inhibitors in sewage influents and effluents from Tromsø, Norway, *Journal of Chromatography A*, 187: 1115, 2006.
- (17) CARBALLA, M.; OMIL, F.; LEMA, J. M.; LIOMPART, A.; GARCIA-JARES, C.; RODRIGUES, I.; GOMEZ, M.; TERNES, T., Behavior of pharmaceuticals, cosmetics and hormones in a sewage treatment plant. *Water Research*, 38 (12): 2918-2926, 2004.
- (18) CARBALLA, M.; OMIL, F.; LEMA, J. M., Removal of cosmetic ingredients and pharmaceuticals in sewage primary treatment. *Water Research*, 39 (19): 4790-4796, 2005.
- (19) AGUERA, A.; FERNANDEZ-ALBA, A. R.; PIEDRA, L.; MEZCUA, M.; GOMEZ, M., Evaluation of triclosan and biphenylol in marine sediments and urban wastewaters by pressurized liquid extraction and solid phase extraction followed by gas chromatography mass spectrometry and liquid chromatography mass spectrometry, *Analytica Chimica Acta*, 480: 193-205, 2003.
- (20) DAUGHTON, C. G. e TERNES, T. A., Pharmaceuticals and personal care products in the environment: agents of subtle change? Environ Health Perspect. *Environmental Health Perspectives*, 107: 907-938, 1999.
- (21) BARCELÓ, D.; HENNION, M. C., Trace determination of pesticides and their degradation products in water, Amsterdam, Elsevier, 542 p., 1997.
- (22) TCHOBANOGLIOUS, G.; BURTON, F. L.; STENSEL, H. D.; METCALF; EDDY, Wastewater Engineering. Treatment and Reuse, McGraw-Hill Education, 1081 p., 2003.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- (23) CAREY, R. O.; MIGLIACCIO, K. W. Contribution of wastewater treatment effluents to nutrient dynamics in aquatic systems: a review, *Environmental Management*, 44, (2): 205-217, 2009.
- (24) KRENKEL, P., *Water Quality Management*, Elsevier Science, p.146-165, 2012.
- (25) FORSTER, C. F.; FOUNDATION, W. E. R., *Wastewater Treatment and Technology*, Thomas Telford, p. 67-203, 2003.
- (26) DRINAN, J. E., *Water and Wastewater Treatment. A Guide for the Nonengineering Professional*, CRC Press, p. 71-77, 2001.
- (27) DAVIS, M. L., *Water and Wastewater Engineering. Design Principles and Practice*, McGraw-Hill Education, p. 1-23, 2010.
- (28) EPA, U. S., *Primer for Municipal Wastewater Treatment Systems*. In *EPA 832-R-04-001*, United States Environmental Protection Agency, Washington DC, p. 16, 2004.
- (29) NAIDOO, S.; OLANIRAN, A. O. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 11 (1): 249-70, 2014.
- (30) GIGER, W.; ROBERT, P. V., *Characterization of persistent organic carbon*, *Water Pollution Microbiology*, John Wiley & Sons, NY, p.135-175, 1978.
- (31) PAINTER, H. A.; VINEY, M., *Composition of domestic sewage*, *The Journal of Microbial and Biochemical Technology*, 1: 143-162, 1959.
- (32) GUJER, W. e ZEHNDER, A. J. B. *Conversion processes in anaerobic digestion*, *Water Science and Technology*, 15: 127-167, 1983.
- (33) FADINI, P. S. e FADINI, A. A. B., *Cadernos Temáticos de Química Nova na Escola*, Edição especial – Maio, p. 9-18, 2001.
- (34) CHEREMISINOFF, N. P., *Handbook of water and wastewater treatment technologies*, p.1-42, 2002.
- (35) TAMBONE, F.; GENEVINI, P.; D'IMPORZANO, G.; ADANI, F., *Assessing amendment properties of digestate by studying the organic matter composition and the degree of biological stability during the anaerobic digestion of the organic fraction of MSW*, *Bioresource Technology*, 100: 3140-3142, 2009.
- (36) MONTGOMERY, J. M., *Water Treatment Principles and Design*, John Wiley & Sons, NY, chapter 2, 1985.
- (37) SCHNEIDER, P., *Clear Progress, 25 Years of the Clean Water Act*, p. 36-47 e 106-107, 1997.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- (38) CHERNICHARO, C. A. L., Princípios do tratamento biológico de águas residuais, vol. 5, 2ª edição, Belo Horizonte, UFMG, 20-63 p., 1997.
- (39) CASTIGLIONI, S.; ZUCCATO, E.; CRISCI, E.; CHIABRANDO, C.; FANELLI, R.; BAGNATI, R., Identification and measurement of illicit drugs and their metabolites in urban wastewater by liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *Analytical Chemistry*, 78 (24): 8421-8429, 2006.
- (40) RENNER, T.; BAUMGARTEN, D.; UNGER, K. K., Analysis of organic pollutants in water at trace levels using fully automated solid-phase extraction coupled to high-performance liquid chromatography, *Chromatographia*, 45: 199-205, 1997.
- (41) KIMURA, K.; HARA, H.; WATANABE, Y.; Removal of pharmaceutical compounds by submerged membrane bioreactor (MBRs), *Desalination*, 178 (1-3): 135-140, 2005.
- (42) TERNES, T.A. Occurrence of drugs in German sewage treatment plants and rivers, *Water Research*, 32 (11): 3245-3260, 1998.
- (43) TERNES, T.A.; STUMPF, M.; J. MUELLER, J.; HABERER, K.; WILKEN, R.D.; SERVOS, M., Behavior and occurrence of estrogens in municipal sewage treatment plants: I. Investigations in Germany, Canada and Brazil, *The Science of the Total Environment*, 225: 81-80, 1999.
- (44) STUMPF, M.; TERNES, T. A.; WILKEN, R.; RODRIGUES, S. V.; BAUMANN, W.; Polar drug residues in sewage and natural waters in the state of Rio de Janeiro, Brazil, *Science of the Total Environment*, 225: 135-141, 1999.
- (45) ALVES, M. I. R. e ANTONIOSI-FILHO, N. R., Development and validation of method for the determination of organochlorine pesticides and trihalomethanes in the water by HRGC-ECD, *Acta Scientiarum. Technology*, 32 (4): 391-397, 2010.
- (46) GERARDI, M. H.; ZIMMERMAN, M. C., Wastewater Pathogens, Wastewater Microbiology Series, John Wiley & Sons Inc, p.137-144, 2005.
- (47) MIDDELBERG, A. P. J., Process-scale disruption of microorganisms, *Biotechnology Advances*, 13 (3): 491-551, 1995.
- (48) GECIOVA, J.; BURY, D.; JELEN, P., Methods for disruption of microbial cells for potential use in the dairy industry – A review, *International Dairy Journal*, 12: 541-553, 2002.
- (49) LANÇAS, F. M., Extração com Fluido Supercrítico: Quo Vadis?, *Analytica* 20: 30-37, 2002.
- (50) MADAENI, S. S.; FANE, A. G.; GROHMANN, G. S., Virus removal from water and wastewater using membranes, *Journal of Membrane Science*, 102: 65-75, 1995.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- (51) MAJORS, R. E., Sample preparation in Analytical Chemistry: handbook of instrumental techniques for Analytical Chemistry, NJ, Prentice Hal, 995 p., 1997.
- (52) LEITE, G. S.; AFONSO, R. J. C. F.; AQUILLO, S. F., Caracterização de contaminantes presentes em sistemas de tratamento de esgotos, por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas *tandem* em alta resolução, *Química Nova*, 33 (3): 734-738, 2010.
- (53) TERNES, T. A.; HIRSCH, R., Occurrence and behavior of X-ray contrast media in sewage facilities and aquatic environmental, *Environmental Science and Technology*, 34: 2741-2748, 2000.
- (54) HIRSCH, R.; TERNES, T. A.; HABERER, K.; MEHLICH, A.; BALLWANZ, F.; KRATZ, K. L., Determination of antibiotics in different water compartments via liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry, *Journal of Chromatography*, 518 (2): 213-223, 1998.
- (55) SAOUTER, E.; PITTINGER, C.; FEIJTEL, T., Aquatic environmental impact of detergents: from simple to more sophisticated models, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 50: 153-159, 2001.
- (56) GAVALA, H. N.; AHRING, B. K., Inhibition of the anaerobic digestion process by linear alkylbenzene sulfonates, *Biodegradation*, 13: 201-209, 2002.
- (57) GONSIOR, M.; ZWARTJES, M.; COOPER, W. J.; SONG, W.; ISHIDA, K. P.; TSENG, L. Y.; JEUNG, M. K.; ROSSO, D.; HERTKORN, N.; SCHMITT-KOPPLIN, P., Molecular characterization of effluent organic matter identified by ultrahigh resolution mass spectrometry, *Water Research*, 45: 2943-2953, 2011.
- (58) GERLACH W., S. O. The magnetic moment of silver atoms. *Zeitschrift Fur Physik*, 9: p. 353-355, 1922.
- (59) GIL, V. M. S.; GERALDES, C. F. G. C. Ressonância Magnética Nuclear, Fundamentos, métodos e aplicações, Fundação Calouste Gulbekian, 2ª edição, p. 22-60, 2002.
- (60) SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X.; KIEMLE, D. J., Identificação espectrométrica de compostos orgânicos, LCT – Livros técnicos e científicos, editora S.A., 7ª edição, p. 460-484, 2006.
- (61) PAVIA, D. L., LAMPMAN, G. M., KRIZ, G. S., Introduction to spectroscopy: a guide for students of organic chemistry, 2ª edição, NY, Harcourt Brace College Publishers, 511 p., 1996.
- (62) MACOMBER, R. S., A complete Introduction to Modern NMR Spectroscopy, John Wiley and Sons, 1ª edição, p.16-38, 1998.
- (63) BALCI, M., Basic ¹H and ¹³C-NMR Spectroscopy, Elsevier, p. 3-24, 2005.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- (64) MITCHELL, T. N. e COSTISELLA, B., NMR – From spectra to structure. An experimental approach, Springer Berlin Heidelberg, NY, 2^a edição, p. 17-18, 2007.
- (65) BREITMAIER, E. e VOELTER, W., Carbon-13 NMR Spectroscopy, High resolution methods and applications in organic chemistry and biochemistry, 3^a edição, NY, p. 1-5, 1990.
- (66) LAMBERT, J. B.; MAZZOLA, E. P., Nuclear magnetic resonance spectroscopy: an introduction to principles, applications, and experimental methods, Pearson College Division, p. 1-13, 2004.
- (67) COATES, G.R, XIAO, L AND PRAMMER, M.G. NMR logging principles and applications, Haliburton Energy Services, Houston, p. 33-42, 1999.
- (68) MURIAS, D. C.; FAROOQ, H.; MASOOM, H.; BOTANA, A.; SOONG, R.; LONGSTAFFE, J. G.; SIMPSON, M. J.; MAAS, W. E.; FEY, M.; ANDREW, B.; STRUPPE, J.; HUTCHINS, H.; KRISHNAMURTHY, S.; KUMAR, R.; MONETTE, M.; STRONKS, H. J.; HUME, A.; SIMPSON, A. J., Comprehensive multiphase NMR spectroscopy: Basic experimental approaches to differentiate phases in heterogeneous samples, *Journal of Magnetic Resonance*, 217: 61-76, 2012.
- (69) SUSANNE, F.; SMITH, D. S.; CODINA, A., Kinetic Understanding Using NMR Reaction Profiling, *Organic Process Research Development*, 16 (1): 61-64 p., 2012.
- (70) DENG, F.; YANG, J.; YE, C., Modern Magnetic Resonance, p. 205-211, 2006.
- (71) BOFFO, E. F.; TAVARES, L. A.; TOBIAS, A. C. T.; FERREIRA, M. M. C.; FERREIRA, A. G., Identification of components of Brazilian honey by ¹H NMR and classification of its botanical origin by chemometric methods, *Food Science and Technology*, 49 (1): 55-63, 2012.
- (72) LIÃO, L. M.; ALVES FILHO, E. G.; SILVA, L. M. A.; ALCANTARA, G. B.; BASSINELO, P. Z., Royal Society of Chemistry. Magnetic Resonance in Food Science: An Exciting Future, n° 332, p. 47-53, 2011.
- (73) MONTEIRO, M.R.; AMBROZIN, A.R.P.; LIÃO, L.M.; BOFFO, E.F.; TAVARES, L.A.; FERREIRA, M.M.C.; FERREIRA, A.G., Study of Brazilian Gasoline Quality Using Hydrogen Nuclear Magnetic Resonance (¹H NMR) Spectroscopy and Chemometrics, *Energy & Fuels*, 23: 272-279, 2009.
- (74) MONTEIRO, M.R.; AMBROZIN, A.R.P.; LIÃO, L.M.; FERREIRA, A.G., Determination of biodiesel blend levels in different diesel samples by ¹H NMR, *Fuel*, Guildford, 88: 691-696, 2009.
- (75) WELJIE, A. M.; NEWTON, J.; JIRIK, F. R.; VOGEL, H. J., Evaluating low-intensity unknown signals in quantitative proton NMR mixture analysis, *Analytical Chemistry*, 80: 8956-8965, 2008.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- (76) BROUWER, H.; KLAPWIJK, A.; KEESMAN, K. J., Identification of activated sludge and wastewater characteristics using respirometric batch-experiments, *Water Research*, 32 (4): 1240-1254, 1998.
- (77) GRASSI, M.; GATTI, G.; Nuclear magnetic resonance methods in environmental chemistry, *Annali di Chimica*, 85: 487-502, 1995.
- (78) LENS, P. N. L.; HEMMINGA, M. A., Nuclear magnetic resonance in environmental engineering: principles and applications, *Biodegradation*, 9: 393-409, 1998.
- (79) RIETJENS, I. M. C. M.; CNUBBEN, N. H. P.; JAGER, P. A.; BOEESMA, M. G.; VERVOORT, J., Developments and Ethical Considerations in Toxicology, Springer, NY, p. 94, 1993.
- (80) SCHOCKEN, M. J., HALL, J. C.; HOAGLAND, R. E.; ZABLOTOWICZ, R. M., Pesticide Biotransformation in Plants and Microorganisms, Oxford University Press, NY, p. 30, 2001.
- (81) FEDOROV, L. A.; DONSTOVALOVA, V. I., NMR approach to structure analysis of aromatic toxicants in environment, *Chemosphere*, 30 (7): 1311-1329, 1995.
- (82) CARDOZA, L. A.; ALMEIDA, V. K.; CARR, A.; LARIVE, C. K., Separations Coupled with NMR Detection, *Trends in Analytical Chemistry*, 22: 766-775, 2003.
- (83) RAINWATER, F. H.; THATCHER, L. L., Methods for Collection and Analysis of Water Samples. U.S. Government Printing Office, p. 3-7, 1960.
- (84) OLSEN, R. L.; CHAPPELL, R. W.; LOFTIS, J. C., Water quality sample collection, data treatment and results presentation for principal components analysis - literature review and Illinois River watershed case study, *Water Research*, 46 (9): 3110-3122, 2012.
- (85) CLARIDGE, T. D. W. High-Resolution NMR Techniques in Organic Chemistry, Oxford, Tetrahedron Organic Chemistry Series, 382 p., 1999.
- (86) JACOBSEN, N. E., NMR Spectroscopy Explained. Simplified Theory, Applications and Examples for Organic Chemistry and Structural Biology, Wiley, p. 75-126, 2007.
- (87) WOLFENDER, J. L.; RODRIGUEZ, S.; HOSTETTMANN, K. J., Liquid chromatography coupled to mass spectrometry and nuclear magnetic resonance spectroscopy for the screening of plant constituents, *Journal Chromatography A*, 794: 299-316, 1998.
- (88) EXARCHOU, V.; NENADIS, N.; TSIMIDOU, M.; GEROTHANASSIS, I. P.; TROGANIS, A.; BOSKOU, D., Antioxidant activities and phenolic composition of

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

extracts from Greek oregano, Greek sage, and summer savory, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50: 5294-5299, 2002.

(89) FLYNN, P. F.; MATTIELLO, D. L.; HILL, H. D. W.; WAND, A. J., Optical use of cryogenic probe technology in NMR studies of proteins, *Journal of the American Chemical Society*, 122: 4823-4824, 2000.

(90) KEUN, H. C.; BECKONERT, O.; GRIFFIN, J. L.; RICHTER, C.; MOSKAU, D.; LINDON, J. C.; NICHOLSON, J. K., Cryogenic probe C-13 NMR spectroscopy of urine for metabonomic studies, *Analytical Chemistry*, 74: 4588-4593, 2002.

(91) PAUTLER, B. G.; SIMPSON, A. J.; SIMPSON, M. J.; TSENG, L. H.; SPRAUL, M.; DUBNICK, A.; SHARP, M. J.; FITZSIMONS, S. J., Detection and Structural Identification of Dissolved Organic Matter in Antarctic Glacial Ice at Natural Abundance by SPR-W5-WATERGATE ¹H NMR Spectroscopy, *Environmental Science & Technology*, 45 (11): 4710-4717, 2011.

(92) BALAYSSAC, S.; BERNSTEIN M.; BEYER, T.; CHEUNG, J.; DELSUC, M.-A.; DIEHL, B.; FABER, C.; FANG, F.; GILARD, V.; GOSTAN, T.; GUERRINI, M.; HASSE, H.; HAMERSKY, K. A.; HOLZGRABE, U.; HOOK, J. M.; HUMPFER, E.; JONES, C.; KELLENBACH, E.; LARIVE, C. K.; MAIWALD, M.; MALET-MARTINO, M.; MALZ, F.; MARTINO, R.; MERRYWELL, C.E.; MORTTER, M.; PRIGENT, Y.; RAVENSCROFT, N.; RINKE, P.; SANDERS, K.; SCHAFER, H.; SCHUTZ, B.; SLEIGH, C.; SPRAUL, M.; STEINHOF, O.; TAULELLE, F.; TORRI, G.; TREFI, S.; WAWER, I.; WEBB, A. G.; WELLS, R. J.; WILSON, I. D.; ZOMER, G., NMR Spectroscopy in pharmaceutical analysis, Elsevier, chapter 4, p. 108-107, 2008.

(93) WILSON, I. D.; GRIFFITHS, L.; LINDON, J. C.; NICHOLSON, J. K., HPLC/NMR and related hyphenated NMR methods, *Progress in Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 4: 299-322, 2000.

(94) WILSON, I. D., Multiple hyphenation of liquid chromatography with nuclear magnetic resonance spectroscopy, mass spectrometry and beyond, *Journal Chromatography A*, 892: 315-327, 2000.

(95) GODEJOHANN, M.; BERSET, J. D.; MUFF, D. Non-targeted analysis of wastewater treatment plant effluents by high performance liquid chromatography - time slice - solid phase extraction-nuclear magnetic resonance/time-of-flight-mass spectrometry, *Journal of Chromatography A*, 1218: 9202-9209, 2011.

(96) LAM, B.; SIMPSON, A. J., Direct ¹H NMR spectroscopy of Dissolved Organic Matter in Natural Waters, *Analyst*, 133: 263-269, 2008.

(97) SIMPSON, A. J.; TSENG, L. H.; SIMPSON, M. J.; SPRAUL, M.; BRAUMANN, U.; KINGERY, W. L.; KELLEHER, B. P.; HAYES, M. H. B., The application of LC-NMR and LC-SPE-NMR to compositional studies of natural organic matter, *Analyst*, 129: 1216-1222, 2004.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- (98) SPRAUL, M.; FREUND, A. S.; NAST, R. E.; WITHERS, R. S.; MAAS, W. E.; CORCORAN, O., Advancing NMR sensitivity for LC-NMR-MS using a cryoflow probe: application to the analysis of acetaminophen metabolites in urine, *Analytical Chemistry*, 75: 1536-1541, 2003.
- (99) ELIPE, M. V. S., LC-NMR and Other Hyphenated NMR Techniques. Overview and Applications, Wiley, NY, p. 1-23, 2011.
- (100) GONNELLA, N. C., LC-NMR: Expanding the Limits of Structure Elucidation, Taylor & Francis, p. 78, 2013.
- (101) GODEJOHANN, M.; PREISS, A.; MÜGGE, C.; WÜNSCH, G., Application of online HPLC-H-1 NMR to environmental samples analysis of groundwater near former ammunition plants, *Analytical Chemistry*, 69 (18): 3832-3837, 1997.
- (102) PREISS, A.; LEWIN, U.; WENNRICH, L.; FINDEISEN, M.; EFER, J., Analysis of nitrophenols and other polar nitroaromatic compounds in ammunition waste-water by high-field proton nuclear-magnetic-resonance (H-1-NMR) spectroscopy and chromatographic methods, *Fresenius Journal of Analytical Chemistry*, 357 (6): 676-683, 1997.
- (103) REINEKE, A. K.; PREISS, A.; ELEND, M.; HOLLENDER, J., Detection of methylquinoline transformation products in microcosm experiments and in tar oil contaminated groundwater using LC-NMR, *Chemosphere*, 70 (11): 2118-2126, 2008.
- (104) GODEJOHANN, M.; HEINTZ, L.; DAOLIO, C.; BERSSET, J. D.; MUFF, D., Comprehensive non-targeted analysis of contaminated groundwater of a former ammunition destruction site using 1H-NMR and HPLC-SPE-NMR/TOF-MS, *Environmental and Science Technology*, 43 (18): 7055-7061, 2009.
- (105) GODEJOHANN, M.; TSENG, L.-H.; BRAUMANN, U.; FUCHSER, J.; SPRAUL, M., Characterization of paracetamol metabolite using on-line LC-SPE-NMR-MS and cryogenic NMR probe, *Journal of Chromatography A*, 1058 (1-2): 191-196, 2004.
- (106) SIMPSON, A. J.; TSENG, L.-H.; SIMPSON, M. J.; SPRAUL, M.; BRAUMANN, U.; KINGERY, W. L.; KELLEHER, B. P.; HAYES, M. H. B., The application of LC-NMR and LC-SPE-NMR to compositional studies of natural organic matter, *Analyst*, 129 (12): 1216-1222, 2004.
- (107) ALBERT, K., Liquid chromatography – nuclear magnetic resonance spectroscopy, *Journal Chromatography A*, 856: 199-211, 1999.
- (108) SCHMIDT, S.; PIECHOTTA, C.; GODEJOHANN, M.; WIN, T.; NEHLS, I.; MUGGE, C., Characterisation of commercially available linear alkylbenzenesulfonates by LC-SPE-NMR/MS, *Talanta*, 82 (1): 143-150, 2010.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- (109) GARCÍA, M. T.; CAMPOS, E.; RIBOSA, I.; LATORRE, A.; SÁNCHEZ-LEAL, J., Anaerobic digestion of linear alkyl benzene sulfonates: Biodegradation kinetics and metabolite analysis, *Chemosphere*, 60 (11): 1636-1643, 2005.
- (110) SCHEURER, M.; STORCK, F. R.; GRAF, C.; BRAUCH, H. J.; RUCK, W.; LEV, O.; LANGE, F. T. Correlation of six anthropogenic markers in wastewater, surface water, bank filtrate, and soil aquifer treatment, *Journal of environmental monitoring*, 13 (4): 966-973, 2011.
- (111) PAULI, G. F.; JAKI, B.U., LANKIN, D.C., Quantitative ^1H NMR: development and potential of a method for natural products analysis, *Journal Natural Products*, 68: 133-149, 2005.
- (112) VALVERDE, J.; THIS, H., ^1H NMR Quantitative Determination of Photosynthetic Pigments from Green Beans (*Phaseolus vulgaris* L.), *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56: 314-320, 2008.
- (113) SZŃTAY J, C. High-field NMR spectroscopy as an analytical tool for quantitative determinations: pitfalls, limitations and possible solutions, *Trends in Analytical Chemistry*, 11 (9): 332-344, 1992.
- (114) MALZ, F.; JANCKE, H. Validation of quantitative NMR, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 38 (5): 813-823, 2005.
- (115) COLEGATE, S. M.; MOLYNEUX, R. J., Bioactive Natural Products: Detection, Isolation, and Structural Determination, Taylor & Francis, p. 71-80, 2007.
- (116) JANCKE, H.; MALZ, F.; HAESSELBARTH, W. Structure analytical methods for quantitative reference applications, *Accreditation and Quality Assurance*, 10 (8): 421-429, 2005.
- (117) HOLZGRABE, U.; MALET-MARTINO, M. Analytical challenges in drug counterfeiting and falsification-The NMR approach, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 55 (4): 679-687, 2011.
- (118) HUANG, Y.; SU, B.-N.; YE, Q.; PALANISWAMY, V. A.; BOLGAR, M. S.; RAGLIONE, T. V. Improving the efficiency of quantitative (^1H) NMR: An innovative external standard-internal reference approach, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 88 (0): 1-6, 2014.
- (119) BHARTI, S.; SINHA, N.; JOSHI, B.; MANDAL, S.; ROY, R.; KHETRAPAL, C. Improved quantification from ^1H -NMR spectra using reduced repetition times, *Metabolomics*, 4 (4): 367-376, 2008.
- (120) POLAK, J.; SUŁKOWSKI, W. W.; BARTOSZEK, M.; LUTY, A.; PENTAK, D.; SUŁKOWSKA, A. Spectroscopic study of the effect of biological treatment on the humification process of sewage sludge, *Journal of Molecular Structure*, 834-836 (0): 229-235, 2007.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- (121) PITERINA, A. V.; BARLETT, J.; PEMBROKE, J. T., ^{13}C -NMR assessment of the pattern of organic matter transformation during domestic wastewater treatment by autothermal aerobic digestion (ATAD), *International Journal of Environmental Research Public Health*, 6 (8): 2288-2306, 2009.
- (122) POLAK, J.; SUŁKOWSKI, W. W.; BARTOSZEK, M.; PAPIEŻ, W., Spectroscopy studies of the progress of humification processes in humic acid extracted from sewage sludge, *Journal of Molecular Structure*, 744-747 (0): 983-989, 2005.
- (123) EL HAJJOUJI, H.; MERLINA, G.; PINELLI, E.; WINTERTON, P.; REVEL, J. C.; HAFIDI, M., ^{13}C NMR study of the effect of aerobic treatment of olive mill wastewater (OMW) on its lipid-free content, *Journal of hazardous materials*, 154 (1-3): 927-932, 2008.
- (124) HAJJOUJI, H. E.; BAILLY, J. R.; WINTERTON, P.; MERLINA, G.; REVEL, J. C.; HAFIDI, M., Chemical and spectroscopic analysis of olive mill waste water during a biological treatment, *Bioresource technology*, 99 (11): 4958-4965, 2008.
- (125) DEWIS, R.; VAN LEEUWEN, J. A.; SMERNIK, R. J.; CHOW, C. W. K.; EVERSON, A.; NOTHROP, S. C.; BEECHAM, S., Changes in the organic character of post-coagulated *Pinus radiata* sulfite pulp mill wastewater under aerated stabilization basin treatment - a laboratory scale study, *Chemical Engineering Journal*, 175 (0): 160-168, 2011.
- (126) JOURAIPHY, A.; AMIR, S.; WINTERTON, P.; EL GHAROUS, M.; REVEL, J. C.; HAFIDI, M., Structural study of the fulvic fraction during composting of activated sludge-plant matter: Elemental analysis, FTIR and ^{13}C NMR, *Bioresource technology*, 99 (5): 1066-1072, 2008.
- (127) BARTOSZEK, M.; POLAK, J.; SUŁKOWSKI, W. W., NMR study of the humification process during sewage sludge treatment, *Chemosphere*, 73 (9): 1465-1470, 2008.
- (128) MANLY, B. J. F., Métodos Estatísticos Multivariados: uma introdução, 3ª ed. Bookman, Porto Alegre, p. 80-82, 2005.
- (129) BEEBE, K. R.; PELL, R. J.; SEASHOLTZ, M. B., Chemometrics: A practical guide, NY, John Wiley & Sons, p. 33-37, 1998.
- (130) ALVES FILHO, E. G.; SILVA, L. M. A.; MARTINS, A. O.; SOUZA, P. S.; Variabilidade de cachaças do Estado de Goiás frente à composição de sais minerais, *Analytica* (46): 88-96, 2010.
- (131) ALVES FILHO, E. G.; SILVA, L. M. A.; CHOZE, R.; LIÃO, L. M.; HONDA, N. K.; ALCANTARA, G. B., Discrimination of Sugarcane according to Cultivar by ^1H NMR

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

and Chemometric Analyses, *Journal of Brazilian Chemistry Society*, 23 (2): 273-279, 2010.

(132) MARTENS, H; NAES, T., *Multivariate Calibration*, John Wiley & Sons, NY, p. 28-42, 1989.

(133) OTTO, M., *Chemometrics – Statistics and computer application in Analytical chemistry*, Willey-VCH, p. 58, 1999.

(134) MANLY, B. J. F. *Métodos Estatísticos Multivariados: uma introdução*, 3° ed. Bookman, Porto Alegre, 215 p., 2005.

(135) BEEBE, K. R.; PELL, R. J.; SEASHOLTZ, M. B., *Chemometrics: A practical guide*, NY, John Wiley & Sons, 89 p., 1998.

(136) ALCANTARA, G. B.; BARISON, A.; FERREIRA, A. G., Chemotaxonomic Discrimination of Lichens by ^1H NMR, solution and HR-MAS, and Chemometric Analysis, *Annals of Magnetic Resonance*, 5: 1-4, 2006.

(137) ALCANTARA, G. B.; HONDA, N. K.; FERREIRA, M. M. C.; FERREIRA, A. G., Chemometric analysis applied in ^1H HR-MAS NMR and FT-IR data for chemotaxonomic distinction of intact lichen samples, *Analytica Chimica Acta*, 595: 3-8, 2007.

(138) BEEBE, K. R.; PELL, R. J.; SEASHOLTZ, M. B., *Chemometrics: A practical guide*, NY, John Wiley & Sons, p.102-134, 1998.

(139) DEFERNEZ, M.; COLQUHOUN, I. J., Factors affecting the robustness of metabolite fingerprinting using ^1H NMR spectra, *Phytochemistry*, 62: 1009-1017, 2002.

(140) WARD, J. L.; HARRIS, C.; LEWIS, J.; BEALE, M. H., Assessment of ^1H -NMR spectroscopy and multivariate analysis as a technique for metabolite fingerprinting of *Arabidopsis thaliana*, *Phytochemistry*, 62: 949-957, 2003.

(141) COSTA, D. P.; ALVES FILHO, E. G.; SILVA, L. M. A.; SANTOS, S. C.; PASSOS, X. S.; SILVA, M. R. R.; SERAPHIN, J. C.; FERRI, P. H., Influence of Fruit Biotypes on the Chemical Composition and Antifungal Activity of the Essential Oils of *Eugenia uniflora* Leaves, *Journal of Brazilian Chemistry Society*, 21 (5): 851-858, 2010.

(142) MAS, S.; JUAN, A.; TAULER, R.; OLIVIERI, A. C.; ESCANDAR, G. M., Application of chemometric methods to environmental analysis of organic pollutants: a review, *Talanta* 80: 1052-1067, 2010.

(143) SINGH, K. P.; MALIK, A.; MOHAN, D.; SINHA, S.; SINGH, V. K., Chemometric data analysis of pollutants in wastewater-a case study, *Analytica Chimica Acta*, 532: 15-25, 2005.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- (144) KUNWAR P. SINGH; AMRITA MALIK; DINESH MOHAN; SARITA SINHA; VINOD K. SINGH, Chemometric data analysis of pollutants in wastewater – a case study, *Analytica Chimica Acta*, 532: 15-25, 2005.
- (145) KOWALKOWSKI, T.; ZBYTNIIEWSKI, R.; SZPEJNA, J.; BUSZEWSKI, B., *Water Research*, 40: 744-752, 2006.
- (146) WIDER, G.; DREIER, L., Measuring Protein Concentrations by NMR Spectroscopy, *Journal of the American Chemical Society*, 128: 2571-2576, 2006.
- (147) FULMER, G. R.; MILLER, A. J. M.; SHERDEN, N. H.; GOTTLIEB, H. E.; NUDELMAN, A.; STOLTZ, B. M.; BERCAW, J. E.; GOLDBERG, K. I., NMR Chemical Shifts of Trace Impurities: Common Laboratory Solvents, Organics, and Gases in Deuterated Solvents Relevant to the Organometallic Chemist, *Organometallics*, 29: 2176-2179, 2010.
- (148) MANNINA, I.; SOBOLEV, A. P.; CAPITANI, D.; IAFFALDANO, N.; ROSATO, M. P.; RAGNI, P.; REALE, A.; SORRENTINO, E.; D'AMICO, I.; COPPOLA, R., NMR metabolic profiling of organic and aqueous sea bass extracts: Implications in the discrimination of wild and cultured sea bass, *Talanta*, 77: 433-444, 2008.
- (149) BOFFO, E. F.; TAVARES, L. A.; FERREIRA, M. M. C.; FERREIRA, A. G., Classification of Brazilian vinegars according to their ^1H NMR spectra by pattern recognition analysis, *LWT - Food Science and Technology*, 42: 1455-1460, 2009.
- (150) LEE, M. B.; STORER, M. K.; BLUNT, J. W.; LEVER, M., Validation of ^1H NMR spectroscopy as an analytical tool for methylamine metabolites in urine, *Clinica Chimica Acta*, 365: 264-269, 2006.
- (151) CALIGIANI, A.; ACQUOTTI, D.; PALLA, G.; BOCCHI, V., Identification and quantification of the main organic components of vinegars by high resolution ^1H NMR spectroscopy, *Analytica Chimica Acta*, 585: 110-119, 2007.
- (152) LIU, N. Q.; CAO, M.; FRÉDÉRICH, M.; CHOI, Y. H.; VERPOORTE, R.; VAN, DER KOOY, F., Metabolomic investigation of the ethnopharmacological use of *Artemisia afra* with NMR spectroscopy and multivariate data analysis, *Journal of Ethnopharmacology*, 128 (1): 230-235, 2010.
- (153) Le GALL, G.; PUAUD, M.; COLQUHOUN, I. J. Discrimination between Orange Juice and Pulp Wash by ^1H Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy: Identification of Marker Compounds, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49: 580-588, 2001.
- (154) TAMBONE, F.; GENEVINI, P.; D'IMPORZANO, G.; ADANI, F., Assessing amendment properties of digestate by studying the organic matter composition and the degree of biological stability during the anaerobic digestion of the organic fraction of MSW, *Bioresource Technology*, 100: 3140-3142, 2009.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- (155) PORRELLO, S.; LENZI, M.; PERSIA, E.; TOMASSETTI, P.; FINOIA, M. G., Reduction of aquaculture wastewater eutrophication by phytotreatment ponds system: I. Dissolved and particulate nitrogen and phosphorus, *Aquaculture*, 219: 515-529, 2003.
- (156) KÄRRMAN E., JÖNSSON H., Normalising impacts in an environmental systems analysis of wastewater systems, *Water Science and Technology, Journal of the International Association on Water Pollution Research*, 43 (5): 293-300, 2001.
- (157) SIMPSON, A. J.; MCNALLY, D. J.; SIMPSON, M. J., NMR spectroscopy in environmental research: From molecular interactions to global processes, *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy*, 58 (3-4): 97-175, 2011.
- (158) FERREIRA, E. C.; RODRIGUES, S. H. B. G.; FERREIRA, M. M. C.; NÓBREGA, J. A.; NOGUEIRA, A. R. A., Análise exploratória dos teores de constituintes inorgânicos em sucos e refrigerantes de uva, *Eclética Química*, 27: 77-90, 2002.
- (159) CORREIA, P. R. M.; FERREIRA, M. M. C., Reconhecimento de padrões por métodos não supervisionados: explorando procedimentos quimiométricos para tratamento de dados analíticos, *Química Nova*, 30 (2): 481-487, 2007.
- (160) REDDY, G.; ALTAF, M.; NAVEENA, B. J.; VENKATESHWAR, M.; KUMAR, E. V. Amyolytic bacterial lactic acid fermentation – A review, *Biotechnology Advances*, 26: 22-34, 2008.
- (161) BITTON, G. *Wastewater Microbiology*, University of Florida, Gainesville, Florida, 345 p., 2005.
- (162) MARTIN H. V. A.; KEUNING, S.; JANSSEN, D. B., Handbook of biodegradation and biological of treatment of hazardous organic compounds, Holanda, Kluwer Academic Publishers, p. 29-32, 1998.
- (163) ZHANG, A. Q.; MITCHELL, S. C.; SMITH, R. L. Dimethylamine in human urine, *Clinica Chimica Acta*, 233: 81-88, 1995.
- (164) HUGHES, R.; MAGEE, E. A. m.; BINGHAM, S., Protein Degradation in the Large Intestine: Relevance to Colorectal Cancer, *Current Issues in Intestinal Microbiology*, 1 (2): 51-58, 2000.
- (165) MITCH, W. A.; SHARP, J. O.; TRUSSELL, R. R.; VALENTINE, R. L.; COHEN, L. A.; SEDLAK, D. L., *N*-Nitrosodimethylamine (NDMA) as a Drinking Water Contaminant: A Review, *Environmental Engineering Science*, 20 (5): 389-404, 2003.
- (166) SIEDLECKA, E. M.; KUMIRSKA, J.; OSSOWSKI, T.; GLAMOWSKI, P.; GOŁĘBIEWSKI, M.; GAJDUS, J.; KACZYŃSKI, Z.; STEPNOWSKI, P., Determination of Volatile Fatty Acids in Environmental Aqueous Samples, *Polish Journal of Environmental Studies*, 17 (3): 351-356, 2008.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- (167) CHENG, W. H.; HSU, S. K.; CHOU, M. S., Volatile organic compound emissions from wastewater treatment plants in Taiwan: Legal regulations and costs of control, *Journal of Environmental Management*, 88: 1485-1494, 2008.
- (168) BRITTO, J. M.; RANGEL, M. C., Processos avançados de oxidação de compostos fenólicos em efluentes industriais, *Química Nova*, 31 (1): 114-122, 2008.
- (169) BRISSON, D; VOHL, MC; ST-PIERRE, J; HUDSON, TJ; GAUDET, D. Glycerol: a neglected variable in metabolic process ?, *BioEssays*, 23: 534-542, 2001.
- (170) MORRISON, L. R, Encyclopedia of Chemical Technology, NY, Wiley, p. 921-932, 1994.
- (171) SILVA, C. G. A.; COLLINS, C. H. Aplicações de cromatografia líquida de alta eficiência para o estudo de poluentes orgânicos emergentes, *Química Nova*, 34 (4): 665-676, 2011.
- (172) TFOUNI, S. V. A.; TOLEDO, M. C. F. Determination of benzoic and sorbic acids in Brazilian food, *Food Control*, 13: 117-123, 2002 .
- (173) PREISS, A.; LEVSEN, K.; HUMPFER, E.; SPRAUL, M.; FRESENIUS, Application of high-field proton nuclear magnetic resonance (¹H-NMR) spectroscopy for the analysis of explosives and related compounds in groundwater samples – a comparison with the high-performance liquid chromatography (HPLC) method, *Journal of Analytical Chemistry*, 356: 445-451, 1996.
- (174) SHAMSIPUR, M.; TALEBPOUR, Z.; BIJANZADEH, H.R.; TABATBAEI, S., Monitoring of ampicillin and its related substances by NMR, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 30: 1075-1085, 2002.
- (175) VAN HAANDEL, A. C.; LETTINGA, G. Anaerobic sewage treatment: a practical guide for regions with a hot climate. John Wiley and Sons, p. 102, 1994.
- (176) ALBERT K., On-line HPLC-NMR and Related Techniques. Wiley, Chichester, p. 141-177, 2002.
- (177) DUARTE, I. C. S; OLIVEIRA, L. L.; SAAVEDRA, N. K. D.; FANTINATTI-GARBOGGINI, F.; OLIVEIRA, V. M.; VARESCHE, M. B. A., Evaluation of the microbial diversity in a horizontal-flow anaerobic immobilized biomass reactor treating linear alkylbenzene sulfonate, *Biodegradation*, 19 (3): 375-385, 2008.
- (178) SANZ, J. L.; CULUBRET, E.; DE FERRER, J.; MORENO, A; BERNA, J. L., Anaerobic biodegradation of linear alkylbenzene sulfonate (LAS) in upflow anaerobic sludge blanket (UASB) reactors. *Biodegradation*, 14 (1): 57-64, 2003.
- (179) OLIVEIRA, L. L.; DUARTE, I. C. S.; SAKAMOTO, I. K.; VARESCHE, M. B., Influence of support material on the immobilization of biomass for the degradation of

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

linear alkylbenzenesulfonate in anaerobic reactors *Journal of Environment Management*, 90 (2): 1261-1268, 2009.

(180) GUIA EURACHEM/CIATC; Determinando a incerteza na medição analítica, *Sociedade Brasileira de Metrologia*, Primeira edição brasileira, 2003.