

UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA
Faculdade de Ciências e Tecnologia
Departamento de Ciências e Engenharia do Ambiente

**CONTRIBUIÇÃO PARA O ESTUDO DA INFLUÊNCIA
DO DIÓXIDO DE CARBONO NO PROCESSO DE BIODEGRADAÇÃO
(REACTOR FED-BATCH PROPORCIONAL)**

Por
LISETE CALADO EPIFÂNIO

Dissertação apresentada na Faculdade de Ciências e
Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa para obtenção
do grau de Mestre em Engenharia Sanitária

Orientador: Prof. Doutor Fernando José Pires Santana

Lisboa
2003

À memória do meu avô

À minha avó

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Fernando Santana, pela direcção da dissertação, pela competência, pelo incentivo e pelas discussões que contribuíram para ultrapassar obstáculos que foram surgindo durante a realização dos trabalhos.

À Eng^a Silvia Sequeira, pela sua disponibilidade, pelas sugestões e discussões pelo apoio e incentivo à realização deste estudo.

Ao Prof. António Pedro Mano, pelo apoio, incentivos e compreensão durante o decorrer dos trabalhos.

À Sandra, à Margarida e à Leonor, pela ajuda na realização dos trabalhos de laboratório.

À Ana Gabriela, à Lena, à Idalina e aos restantes colegas do Laboratório de Investigação de Sistemas de Tratamento, pelo apoio laboratorial, pela cooperação, pela boa disposição que contribuía para um bom ambiente de trabalho e acima de tudo pelo incentivo e pela amizade.

Aos técnicos do Laboratório de Análises, pelo apoio e disponibilidade que sempre demonstraram.

Aos SMAS da Câmara Municipal de Sintra, no nome da Eng^a Ana Alegria e dos operadores da Estação de Tratamento de Águas Residuais de Montelavar.

Ao Eng^o Luís Oliveira, pelas facilidades concedidas e pela compreensão que demonstrou.

Ao Rui Cardoso, pela ajuda e disponibilidade em especial no que respeita a questões técnicas na área da matemática.

Aos meus amigos, à Ema, pela ajuda, pelo apoio e incentivo, e pela amizade que fizeram sempre questão de demonstrar durante a realização dos estudos.

Aos meus pais, à minha avó e à minha tia, pelo incentivo, pelo apoio e pela compreensão, constantes durante a realização deste trabalho.

À JNICT, que concedeu o apoio financeiro que tornou possível a realização deste trabalho no âmbito do Projecto PEAM/C/SEL/495/95 e de uma Bolsa de Investigação Científica.

SUMÁRIO

O reactor “Fed-batch” Proporcional utiliza o aumento de pressão que se verifica no interior do reactor, provocado pela acumulação do dióxido de carbono produzido no decurso da degradação aeróbia de um composto orgânico, para adicionar substrato ao reactor, sendo a alimentação proporcional à velocidade ou taxa de degradação de substrato. Nestas circunstâncias, e pretendendo-se avaliar da fiabilidade daquele tipo de reactor, era necessário verificar se a reacção biológica era perturbada pela acumulação de dióxido de carbono.

Assim, o presente trabalho teve por objectivo estudar a influência do dióxido de carbono, dissolvido na solução de fermentação, no crescimento microbiano e no consumo de substrato, através da comparação do funcionamento, em paralelo, de dois reactores “fed-batch”, sendo um proporcional e outro aberto.

Constatou-se que os valores das constantes cinéticas, taxa específica de consumo de substrato (q_{obs}) e coeficiente de rendimento celular ($Y_{(X/S)}$), determinados no reactor “Fed-batch” Proporcional e num reactor “Fed-batch” Aberto, operados em condições equivalentes, eram semelhantes. Os valores da taxa de crescimento específica (μ_{obs}) apresentam diferenças mais significativas, no entanto a maioria dos testes estatísticos não-paramétricos aplicados demonstraram que o conjunto de valores de cada reactor pertencem à mesma distribuição.

A taxa de consumo de oxigénio (OUR), que reflecte a viabilidade da biomassa, é normalmente superior no reactor “Fed-batch” Aberto.

Os resultados obtidos no presente estudo não evidenciaram efeitos inibidores, para a reacção biológica, provocados pelo dióxido de carbono dissolvido, ou pelos iões bicarbonato que se acumulam no reactor “Fed-batch” Proporcional.

SUMMARY

The proportional fed-batch reactor uses the increase in the internal pressure observed, cause by accumulation of carbon dioxide produced during aerobic degradation of an organic substrate, to add substrate to the reactor, being the feeding proportional to the rate of substrate degradation. To want to evaluate this reactor, it was need check if biological reaction is disturbance by accumulation carbon dioxide.

The aim of this work was study the influence of dissolved carbon dioxide in fermentation broths, in the microbial growth and substrate consumption, to confront the work of two reactor - proportional fed-batch reactor and open fed-batch reactor.

The kinetics constants values, substrate consumption specific rate (q_{obs}) and yield substrate ($Y_{(X/S)}$), determine in the proportional fed-batch reactor and in open fed-batch reactor, in same operation conditions, are similar. The values of biomass specific growth rate (μ_{obs}) exhibit more significant differences, however the non-parametric statistic test showed that values belong the same distribution.

The oxygen uptake rate (OUR), that reflect biomass viability, is usually higher in the open fed-batch reactor.

The results get in this study did not show inhibit effect caused by dissolved carbon dioxide or bicarbonate ions, that is accumulate in closed proportional fed-batch reactor.

LISTA DE SIMBOLOS E NOTAÇÕES

C/N - Razão entre a concentração de carbono e a concentração de azoto	-
CBO - Carência Bioquímica de Oxigénio	ML^{-3}
CEA – Consumo específico de substrato (acetato)	MT^{-1}
CEAm – Consumo específico de substrato (acetato) médio	MT^{-1}
CER - Taxa de evolução do dióxido de carbono	MT^{-1}
CQO - Carência Química de Oxigénio	ML^{-3}
CTR - Taxa de evolução do dióxido de carbono transferido	MT^{-1}
D_{CO_2} - Coeficiente de difusão do dióxido de carbono	L^2T^{-1}
D_{O_2} - Coeficiente de difusão do dióxido de carbono	L^2T^{-1}
F – Caudal de alimentação	LT^{-1}
F(t) - Taxa de alimentação	MT^{-1}
K1 - Constante de inibição	ML^{-3}
K_H - Constante de Henry	
Ks - Constante de saturação	ML^{-3}
$(k_La)_{CO_2}$ - Coeficiente de transferência de massa volumétrica do dióxido carbono	T^{-1}
$(k_La)_{O_2}$ - Coeficiente de transferência de massa volumétrica do oxigénio	T^{-1}
MBRT – tempo de retenção médio da biomassa	T
OD - Concentração de Oxigénio Dissolvido	ML^{-3}
OUR - Taxa de consumo de oxigénio	MT^{-1}
OURE - Taxa específica de consumo de oxigénio	$MM^{-1}T^{-1}$
OURend - Taxa de consumo de oxigénio na fase endógena	MT^{-1}
$PpCO_2$ - Pressão parcial de dióxido de carbono	ML^{-2}
PpH_2O - Pressão parcial da água	ML^{-2}

q - Taxa específica de consumo de substrato	T^{-1}
QCO ₂ (G)– Quantidade de dióxido de carbono produzido fase gasosa	MT^{-1}
QCO ₂ (L)– Quantidade de dióxido de carbono produzido na fase líquida	MT^{-1}
QCO ₂ (T)– Quantidade de dióxido de carbono produzido total	MT^{-1}
QECO ₂ (G) – Quantidade específica de dióxido de carbono produzido na fase gasosa	$MM^{-1}T^{-1}$
QECO ₂ (T) – Quantidade específica de dióxido de carbono produzido total	$MM^{-1}T^{-1}$
q _{max} - Taxa específica máxima de consumo de substrato	T^{-1}
q _{obs} - Taxa específica de consumo de substrato observada	T^{-1}
R - Constante dos gases perfeitos	
RQ - Coeficiente Respirométrico	
R _X - Taxa de produção de biomassa	MT^{-1}
S – quantidade de substrato limitante	M
[S] - Concentração de substrato limitante	ML^{-3}
[SAL] - Concentração da solução de alimentação	ML^{-3}
So/Xo - Razão entre a concentração inicial do substrato limitante e a concentração inicial de biomassa	ML^{-3}
T - Temperatura	T_{temp}
ta - Tempo de arejamento	T
TAS - Taxa média de alimentação de substrato durante os ensaios	MT^{-1} ou LT^{-1}
TCA - Taxa de consumo de acetato	MT^{-1}
TCEA - Taxa de consumo específico de acetato	$MM^{-1}T^{-1}$
TPCO ₂ (G) - Taxa de produção de dióxido de carbono na fase gasosa	MT^{-1}
TPCO ₂ (T) - Taxa de produção total de dióxido de carbono	MT^{-1}

TPECO ₂ (T) - Taxa de produção específica total de dióxido de carbono	MM ⁻¹ T ⁻¹
ts - tempo de decantação	T
V - Volume útil	L ³
V _G - Volume da fase gasosa	L
V _L - Volume da fase líquida	L
X - massa de microrganismos	M
[X] - Concentração de biomassa	ML ⁻³
Y _{X/S} - Coeficiente do rendimento celular	MM ⁻¹
Y _{X/S obs} - Coeficiente do rendimento celular observado	MM ⁻¹
μ - Taxa de crescimento específica	T ⁻¹
μ _{max} - Taxa máxima de crescimento específica	T ⁻¹
μ _{obs} - Taxa de crescimento específica observada	T ⁻¹
θ - tempo de retenção hidráulico	T
θ _x - tempo de retenção de lamas/ idade de lamas	T

ÍNDICE DE MATÉRIAS

1. INTRODUÇÃO.....	21
1.1 ASPECTOS GERAIS SOBRE POLUIÇÃO DA ÁGUA	21
1.2 DISPOSITIVOS DE AVALIAÇÃO DE CINÉTICAS DE BIODEGRADAÇÃO	22
1.2.1 AVALIAÇÃO DA BIODEGRADABILIDADE	31
1.2.1.1 Teste Standard do CBO (Carência Bioquímica de Oxigênio)	32
1.2.1.2 Teste modificado OCDE 209	34
1.2.1.3 Teste ANFOR modificado.....	35
1.2.1.4 Teste ISO	35
1.2.1.5 Teste MITI modificado.....	36
1.2.1.6 Teste Sturm modificado	36
1.2.1.7 Testes Químicos	36
1.2.2 RESPIRÓMETROS.....	38
1.2.2.1 Método de Winkler.....	39
1.2.2.2 Warburg.....	39
1.2.2.3 Sierp	39
1.2.2.4 Barcroft.....	39
1.2.2.5 Outros Respirómetros.....	40
1.2.2.6 Respirómetros Abertos	40
1.2.3 TESTES DE INIBIÇÃO	41
1.2.3.1 Testes de toxicidade para a taxa de respiração lamas.....	44
1.2.3.2 Testes de Toxicidade para a Taxa de Respiração Exógena	45
1.2.4 REACTOR “FED-BATCH” PROPORCIONAL	48
1.3 INIBIÇÃO.....	49
1.3.1 XENOBIÓTICOS	50
1.3.2 METAIS.....	51
1.3.3 DIÓXIDO DE CARBONO	52
1.3.3.1 Produção pelas Células.....	54
1.3.3.2 Concentração de Dióxido de Carbono na Fermentação aeróbia.....	55
1.3.3.3 Determinação do Dióxido de Carbono para Avaliação da Actividade Metabólica dos Microrganismos.....	56
1.3.3.4 Quociente de Respiração	57
2. OBJECTIVO	59
3. PLANO EXPERIMENTAL	61
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	65
4.1 PRODUÇÃO DE INÓCULOS	65
4.2 MEIO DE CULTURA	66
4.3 REACTOR “FED-BATCH” PROPORCIONAL.....	68
4.3.1 DESCRIÇÃO.....	68
4.3.2 ENSAIOS DE TRAÇAGEM.....	70

4.4. MODO OPERATÓRIO	71
4.5 MÉTODOS DE ANÁLISE	73
4.5.1 FASE LÍQUIDA	73
4.5.2 FASE GASOSA	75
4.5 MÉTODOS DE CÁLCULO	75
4.5.1 CÁLCULO DOS COEFICIENTES CINÉTICOS μ , q , E Y	75
4.5.2 DETERMINAÇÃO DE μ_{obs} , $Y_{X/S}$ obs , $q_{obs}/TCEA$	77
4.5.3 CÁLCULO DA PRODUÇÃO TOTAL DE DIÓXIDO DE CARBONO	78
4.5.3.1 Equilíbrio Químico do Dióxido de Carbono - Descrição do Sistema	78
4.5.3.2 Estimativa da Quantidade Total do Dióxido de Carbono Produzido	80
4.5.3.3 Coeficiente Respirométrico	82
4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA	82
4.6.1 CORRELAÇÃO DE SPEARMAN	82
4.6.2 TESTE DE U MANN-WHINTNEY	83
4.6.3 TESTE H DE KRUSKAL-WALLIS	85
4.6.3.1 Teste H corrigido para Empates	87
4.6.4 TESTE DE WILCOXON	87
4.6.5 TESTE KOLMOGOROV-SMIRNOV PARA DUAS AMOSTRAS	88
4.6.6 TESTE DE HOMOGENEIDADE	89
5 RESULTADOS	93
5.1 APRESENTAÇÃO E EXPLORAÇÃO	93
5.1.1 AVALIAÇÃO DE INIBIÇÃO	93
5.1.1.1 Avaliação de Inibição em Reactor “Fed-batch” Proporcional (fechado)	94
5.1.1.2 Avaliação de Inibição em Reactor “Fed-batch” Aberto	100
5.1.1.3 Avaliação do Efeito da Concentração do Ião Bicarbonato	104
5.1.2 PARÂMETROS CINÉTICOS	107
5.1.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA	111
5.1.3.1 Correlação de Spearman	113
5.1.3.2 Teste U de Mann-Whintney	113
5.1.3.3 Teste H de Kruskal-Wallis	114
5.1.3.4 Teste de Wilcoxon	115
5.1.3.5 Teste de Homogeneidade	117
5.1.3.6 Teste de Kolmogorov-Smirnov para duas amostras	118
5.1.4 ESTUDO DE INTERDEPENDÊNCIAS ENTRE PARÂMETROS CINÉTICOS	119
5.1.4.1 Quantidade de Biomassa <i>versus</i> Viabilidade da Biomassa	120
5.1.4.2 Taxa de Alimentação <i>versus</i> Taxa de Consumo de Oxigénio	121
5.1.4.3 Taxa de Crescimento Específica	124
5.1.4.4 Taxa Específica de Consumo de Substrato	127
5.1.4.5 Interdependência com a Taxa de Consumo de Substrato (Acetato)	131
5.1.4.6 Taxa de Produção de Dióxido de Carbono	135
5.2 DISCUSSÃO	141
6. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS DE TRABALHO FUTURO	147
7. BIBLIOGRAFIA	149

ANEXOS.....	155
ANEXO I - Ensaio de Traçagem.....	157
ANEXO II - Distribuições Estatísticas.....	161
ANEXO III - Resultados dos ensaios.....	169
ANEXO IV - Parâmetros de Análise.....	201
ANEXO V - Análise Estatística.....	211

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1- Respostas do substrato acumulado num reactor “fed-batch” (Philbrook e Grady, 1985; Eckenfelder e Grau, 1992).....	26
Figura 1.2- Resposta do substrato acumulado e do OURE a um substrato inibidor (Eckenfelder e Grau, 1992).....	27
Figura 1.3 – Determinação da toxicidade (Roš, 1993)	45
Figura 1.4 – Diagrama de distribuição das concentrações para o ácido carbónico (AWWA, 1990).....	53
Figura 1.5 - Processo de produção de dióxido de carbono pelos microrganismos, a pH inferior a 9. (Adaptado de Noorman et al., 1992; Royce, 1992, Spérandio e Paul,1996).....	54
Figura 3.1 - Condições Iniciais dos ensaios “Fed-batch” realizados no estudo	63
Figura 4.1 - Esquema do Reactor “Fed-batch” Proporcional (Reactor Fechado).....	69
Figura 5.1- Evolução comparativa da quantidade de substrato acumulado (acetato) no reactor e da quantidade de substrato total adicionado para os ensaios “Fed-batch” Proporcional com biomassa do inóculo A	94
Figura 5.2 - Evolução comparativa da quantidade de substrato acumulado (acetato) no reactor e da quantidade de substrato total adicionado para os ensaios “Fed-batch” Proporcional com biomassa do inóculo B	95
Figura 5.3 - Evolução comparativa da quantidade de substrato acumulado (acetato) no reactor e da taxa específica de consumo de oxigénio para os ensaios “Fed-batch” Proporcional com biomassa do inóculo A	96
Figura 5.4 - Evolução comparativa da quantidade de substrato acumulado (acetato) no reactor e da taxa específica de consumo de oxigénio para os ensaios “Fed-batch” Proporcional com biomassa do inóculo B	97
Figura 5.5 - Evolução comparativa da quantidade de substrato acumulado (acetato) no reactor e da quantidade total específica de dióxido de carbono para os ensaios “Fed-batch” Proporcional com biomassa do inóculo A.....	98
Figura 5.6 - Evolução comparativa da quantidade de substrato acumulado (acetato) no reactor e da quantidade total específica de dióxido de carbono para os ensaios “Fed-batch” Proporcional com biomassa do inóculo B.....	99
Figura 5.7 - Evolução comparativa da quantidade de substrato acumulado (acetato) no reactor e da quantidade de substrato total adicionado para os ensaios “Fed-batch” Aberto com biomassa do inóculo A.....	100
Figura 5.8 - Evolução comparativa da quantidade de substrato acumulado (acetato) no reactor e da quantidade de substrato total adicionado para os ensaios “Fed-batch” Aberto com biomassa do inóculo B.....	101

Figura 5.9 - Evolução comparativa da quantidade de substrato acumulado (acetato) no reactor e a taxa de consumo específica de oxigénio para os ensaios “Fed-batch” Aberto com biomassa do inóculo A.....	102
Figura 5.10 - Evolução comparativa da quantidade de substrato acumulado (acetato) no reactor e a taxa de consumo específica de oxigénio para ensaios “Fed-batch” Aberto com biomassa do inóculo B.....	103
Figura 5.11 - Alcalinidade inicial e final e Variação da alcalinidade em cada ensaio	104
Figura 5.12 - Comparação dos valores de pH inicial e final entre o reactor “Fed-batch” Proporcional e o reactor “Fed-batch” Aberto	106
Figura 5.13 - Influência dos iões bicarbonatos num ensaio “batch”	106
Figura 5.14 - Comparação entre o reactor “Fed-batch” Proporcional e o reactor “Fed-batch” Aberto através dos valores observados dos parâmetros μ_{obs} , $Y_{(X/S)}$, e q_{obs}	109
Figura 5.15 - Comparação entre o reactor “Fed-batch” Proporcional e o reactor “Fed-batch” Aberto através dos valores observados dos parâmetros OURmed, OUREmed, TCA, e TCEA	110
Figura 5.16 - Comparação dos valores de OURmed e o OUREmed em reactor Aberto e em reactor Fechado	116
Figura 5.17 - Taxa média de consumo de oxigénio em função da biomassa inicial	121
Figura 5.18 - Taxa de adição de substrato em função da Taxa média de consumo de oxigénio.....	122
Figura 5.19 - Taxa mássica de adição de substrato em função da taxa de consumo de oxigénio.....	123
Figura 5.20 - Taxa de adição de substrato em função da Taxa média de consumo de oxigénio da fase endógena.....	124
Figura 5.21 - Relação entre a taxa de crescimento específica observada e a taxa específica de consumo de oxigénio média.....	125
Figura 5.22 - Relação entre taxa de crescimento específica e a razão inicial S_0/X_0	126
Figura 5.23 - Comparação dos valores obtidos por dois métodos de cálculo diferentes para a taxa específica de consumo de acetato.....	127
Figura 5.24 – Taxa específica de crescimento observada em função do rendimento celular.....	129
Figura 5.25 - Taxa específica de crescimento observada em função do rendimento celular.....	130
Figura 5.26 - Taxa de consumo de substrato (acetato) em função da Taxa média de consumo de oxigénio durante o ensaio	132
Figura 5.27 - Taxa de consumo específico de substrato (acetato) em função da Taxa média específica de consumo de oxigénio.....	133

Figura 5.28 - Relação entre a adição de substrato e as taxa de consumo de acetato	134
Figura 5.29 - Relação entre a TCA e a TAS (mg/h) em função da concentração de substrato (acetato) na Solução de alimentação	135
Figura 5.30 - Taxa de Produção de dióxido de Carbono (na fase gasosa e total) em função da taxa de consumo de oxigénio	136
Figura 5.31 - Taxa de Produção de Dióxido de Carbono (na fase gasosa e total) em função da taxa de consumo de oxigénio para diferentes inóculos.....	136
Figura 5.32 - Taxa de Produção de dióxido de Carbono (na fase gasosa e total) em função da taxa de consumo de acetato	137
Figura 5.33 - Taxa de Produção de Dióxido de Carbono (na fase gasosa e total) em função da taxa de consumo de acetato para diferentes inóculos.....	138
Figura 5.34 - $TPCO_2(G)$ $TPCO_2total$ em função da TAS(cm/h)	138
Figura 5.35 - Taxa de Produção de Dióxido de Carbono (fase gasosa) e a Taxa de Produção Específica de Dióxido de Carbono total em função os parâmetros μ_{obs} , $Y_{(X/S)}$, e q_{obs}	139
Figura 5.36 - Coeficiente respirométrico em função da Taxa de adição de substrato	140

ÍNDICE DE QUADROS

Quadro 1.1- Vantagens e desvantagens dos sistemas de mistura completa (adaptado de Nielsen e Villadsen, 1994).....	25
Quadro 1.2 - Efeitos dos diferentes tipos de inibidores nos parâmetros cinéticos, relativamente à biodegradação de compostos não inibidores.....	43
Quadro 3.1 - Resumo dos Ensaios “Fed-batch”	62
Quadro 3.2 - Condições Iniciais dos ensaios “Fed-batch”	62
Quadro 3.3 - Estudo da influência dos bicarbonatos - condições iniciais dos ensaios.....	64
Quadro 4.1 - Composição do meio de mineral e das fontes de carbono e azoto (Sequeira e Santana, 2002).....	67
Quadro 5.1- Parâmetros Cinéticos dos ensaios “Fed-batch”	112
Quadro 5.2 – Resumo do teste da Correlação de Spearman.....	113
Quadro 5.3 – Resumo do teste U de Mann-Whintney.....	114
Quadro 5.4 – Resumo do teste H de Kruskal-Wallis.....	115
Quadro 5.5 – Resumo do teste de Wilcoxon	116
Quadro 5.6 – Resumo do teste de Homogeneidade.....	118
Quadro 5.7 – Resumo do teste de Kolmogorov-Smirnov	119
Quadro 5.8 - Valores comparativos de q_{obs} média entre o Reactor “Fed-batch” Proporcional e o reactor “Fed-batch” Aberto	131
Quadro 5.9 - Valores comparativos de q_{obs} média entre os ensaios com SAL 6 e SAL 12	131
Quadro 5.10 - Valores de μ_{max} , Y, e K_s , referentes a ensaios utilizando acetato como substrato	143
Quadro 5.11 - Valores de q_{max} , Y e K_s utilizando o acetato como substrato para diferentes idades de lamas (adaptado de Pitter e Chudoba, 1990, Sequeira e Santana, 2002)	144

1.INTRODUÇÃO

1.1 ASPECTOS GERAIS SOBRE POLUIÇÃO DA ÁGUA

A preservação do Ambiente, o combate à poluição, ou as preocupações ecológicas em geral, não são incompatíveis com o desenvolvimento, entendido em sentido lato, de progresso ou de crescimento. Antes pelo contrário, devem constituir não apenas novos desafios, mas também novos incentivos para esse desenvolvimento.

À poluição associam-se custos, os quais podem, no essencial, ser avaliados de três modos distintos: pela perda de recursos, resultante de uma exploração desnecessariamente esbanjadora, pelos custos de redução e de controlo da poluição e pelos custos decorrentes dos impactes na saúde humana (Odum, 1971).

Relativamente à poluição da água, as estações de tratamento de águas residuais (ETAR) constituem dispositivos muito importantes para a redução e controlo da poluição. A remoção dos vários contaminantes existentes nas águas residuais depende da sua natureza e respectivas concentrações, sendo materializada por uma série de etapas (operações e processos unitários) ordenadas de modo a estabelecer sequências lógicas, adaptadas ao objectivo pretendido. Nesta perspectiva, e para as águas residuais domésticas, a sequência de operações de tratamento consiste na remoção de sólidos grosseiros e em suspensão (tratamento preliminar e tratamento primário, respectivamente), a que se segue a remoção de compostos orgânicos solúveis, os quais são removidos por meio de processos biológicos, onde populações de microrganismos decompõem a matéria orgânica transformando-a, essencialmente, em dióxido de carbono e novas células (tratamento secundário).

Os sistemas convencionais de tratamento secundário são as lamas activadas, as lagoas, os leitos percoladores e os discos biológicos. Com o aparecimento de novos compostos químicos, normalmente de biodegradabilidade mais difícil do que as substâncias naturais, é importante conhecer as condições de resposta dos actuais sistemas de tratamento, por forma a ser possível estimar residuais daqueles compostos nos efluentes tratados e consequentes impactes ambientais.

Assim, é necessário dispor de informação sobre a respectiva cinética de biodegradação, imprescindível à utilização de modelos racionais que deverão possibilitar um dimensionamento e operação adequados dos mencionados sistemas de tratamento.

1.2 DISPOSITIVOS DE AVALIAÇÃO DE CINÉTICAS DE BIODEGRADAÇÃO

Seguidamente, resumem-se algumas características essenciais dos principais tipos de reactores que constituem o suporte dos dispositivos de avaliação de cinéticas de biodegradação.

Reactor Fechado (“batch”)

Neste tipo de reactor, uma solução de substrato (ou de água residual) é misturada com uma cultura de microrganismos, através de agitação do meio, a qual proporciona a oxigenação necessária ao desenvolvimento da reacção biológica. Com o decorrer do tempo, a concentração de substrato diminui e a concentração de biomassa aumenta, dependendo (Pitter e Chudoba, 1990; Chudoba *et al.*, 1992; Grady *et al.*, 1996, Ellis *et al.*, 1996 (a)) dos seguintes factores:

- razão inicial S_0/X_0 ;
- actividade dos microrganismos;
- características dos compostos que constituem o substrato.

Normalmente são utilizadas culturas mistas, cuja actividade depende da sua história, ou seja, das características do substrato usado durante a cultura anterior, do método de cultura e do tempo de retenção médio da biomassa (Pitter e Chudoba, 1990).

Os reactores “batch” são provavelmente os mais utilizados para a determinação de cinéticas do tipo Monod, dada a simplicidade dos respectivos formalismos. Pollard e colaboradores (1998) utilizaram um reactor “batch” aeróbio para estudarem as cinéticas de biodegradação e as características fisiológicas microbianas para razões S_0/X_0 reduzidas. Os seus resultados confirmaram que os ambientes obtidos em reactores “batch” induzem mudanças

no estado fisiológico e/ou na estrutura da comunidade, quando comparados com o ambiente de tratamento original.

Reactor Semi-Contínuo (“Semi-Batch”)

Culturas semi-contínuas podem ser imaginadas como um processo “batch” repetido no tempo. Após um determinado tempo de arejamento, parte da biomassa e do meio de cultura são substituídos por uma solução de substrato fresco. Quando este processo é repetido com um período de arejamento constante e uma quantidade constante de biomassa, o resultado é designado por cultura semi-contínua ou sistema semi-contínuo (Pitter e Chudoba, 1990).

Neste tipo de reactor, os microrganismos, à semelhança do reactor “batch”, também se encontram num meio com uma concentração de substrato variável. A actividade e estado fisiológico da cultura, nos sistemas semi-contínuo, resultam da composição do substrato e dos parâmetros sob os quais o sistema é operado (período de arejamento (t_a), tempo de decantação (t_s), tempo de retenção médio da biomassa (MBRT – *mean biomass retention time*) (Pitter, Chudoba, 1990):

$$MBRT = \frac{V \cdot X_{av}}{(V/w \cdot t_c) X_{ta}} = \frac{X_{av} w \cdot t_c}{X_{ta}} \quad (1.1)$$

onde: V - Volume de cultura (L^3), $t_c = t_a + t_s$ – tempo total de cada ciclo incluindo o tempo de arejamento e o tempo de sedimentação (T), X_{av} – concentração média da biomassa em cada ciclo (ML^{-3}), X_{ta} – concentração de biomassa no final do ciclo (ML^{-3}), $V/w \cdot t_c$ – Volume de lamas em excesso, em que $1/w$ determina a parte do volume de cultura (em mistura) que é removido como biomassa em excesso.

Durante um ciclo, a concentração de biomassa varia desde a concentração inicial (X_0) até à concentração no final do ciclo (X_{ta}). A concentração média de cada ciclo pode ser calculada pela seguinte expressão:

$$X_{av} = X_{ta} \left(1 - \frac{1}{2w} \right) \quad (1.2)$$

Substituindo a concentração média de biomassa na expressão 1.1 temos:

$$MBRT = \frac{X_{ta}(1-1/2w)wt_c}{X_{ta}} = t_c(w-0,5) \quad (1.3)$$

Reactor Contínuo

O reactor contínuo (“CSTR- *continuous stirred tank reactor*”) é um sistema aberto, no qual se pode atingir um estado de equilíbrio. (Fogler, 1986) Este sistema é também conhecido por quimiostato, o que significa “a química deverá ser constante ou estacionária” (Nielsen e Villadsen, 1994).

Nas ETAR, o sistema de mistura completa em contínuo é normalmente operado com recirculação de biomassa, quase sempre após ser concentrada num separador de fases sólido-líquido (Pitter e Chudoba, 1990).

Nestes sistemas, o contacto entre substrato e biomassa dá-se no reactor, fortemente agitado, promovendo não apenas a mistura, mas garantindo também a mesma quantidade de substrato em qualquer ponto do reactor (Pitter e Chudoba, 1990). Neste sistema os microrganismos encontram-se num meio com uma concentração de substrato baixa, e aproximadamente constante, a qual é praticamente igual à concentração efluente do sistema, o que constitui uma diferença substancial relativamente aos sistemas “batch”, semi-contínuo e até de fluxo pistão, a qual é importante na avaliação da degradação de substâncias tóxicas (Pitter e Chudoba, 1990).

As vantagens e desvantagens dos três modos operatórios anteriormente descritos encontram-se resumidas na Quadro 1.1 (Nielsen e Villadsen, 1994):

Quadro 1.1- Vantagens e desvantagens dos sistemas de mistura completa (adaptado de Nielsen e Villadsen, 1994)

Tipo de reactor	Vantagens	Desvantagens
“Batch”	Versatilidade: pode ser usado para diferentes reacções todos os dias. É possível uma conversão completa do substrato. Segurança: pode ser devidamente esterilizado. Limita os riscos de infecção ou mutação de estripes.	Elevados custos de mão de obra: é necessário mão de obra especializada ou com alguma habilidade. Tempo de preparação do reactor: esterilização, crescimento do inóculo, limpeza após fermentação. Problemas de Segurança: enchimento, esvaziamento, limpeza.
Contínuo em estado de equilíbrio (quimiostato)	Operação intensiva e prolongada. Mão de obra pouco especializada, boa utilização do reactor. Eficiência: devido à natureza autocatalítica das reacções microbianas, a produtividade pode ser elevada. A automação pode ser muito atraente. Qualidade do produto constante.	Todo o equipamento de processamento do caudal tem de ser projectado para taxas volumétricas muito baixas e operação contínua. Após vários meses de produção, o conteúdo pode ser destruído devido a contaminação, por exemplo, causada por uma curta interrupção na esterilização da alimentação, ou por mutação espontânea dos microrganismos. Pouco flexível: raramente pode ser usada para outras produções.
Semi-contínuo/“Semi-batch”	Combina as vantagens da operação em “batch” e em contínuo. Excelente controlo e optimização para um dado critério de produção.	Algumas das desvantagens da operação em “batch” e em contínuo - mas as vantagens são mais que as desvantagens.

Reactor “Fed-Batch”

O termo cultura “Fed-Batch” foi introduzido por Yoshida e colaboradores (1973), para referir uma cultura “batch” alimentada continuamente (Pirt, 1985).

As características essenciais de um reactor “fed-batch” são as seguintes (Eckenfelder and Grau, 1992):

- (1) o substrato é continuamente introduzido a uma concentração suficientemente elevada e através de um fluxo reduzido, para que o volume do reactor não sofra variações significativas;
- (2) a taxa de alimentação excede a taxa máxima de utilização de substrato; e
- (3) a duração dos ensaios é curta e, portanto, permite uma modelação simples do crescimento dos sólidos biológicos.

Na Figura 1.1 mostra-se a resposta teórica do reactor “fed-batch”, para ambos os casos, inibição e não inibição pelo substrato (Eckenfelder e Grau, 1992).

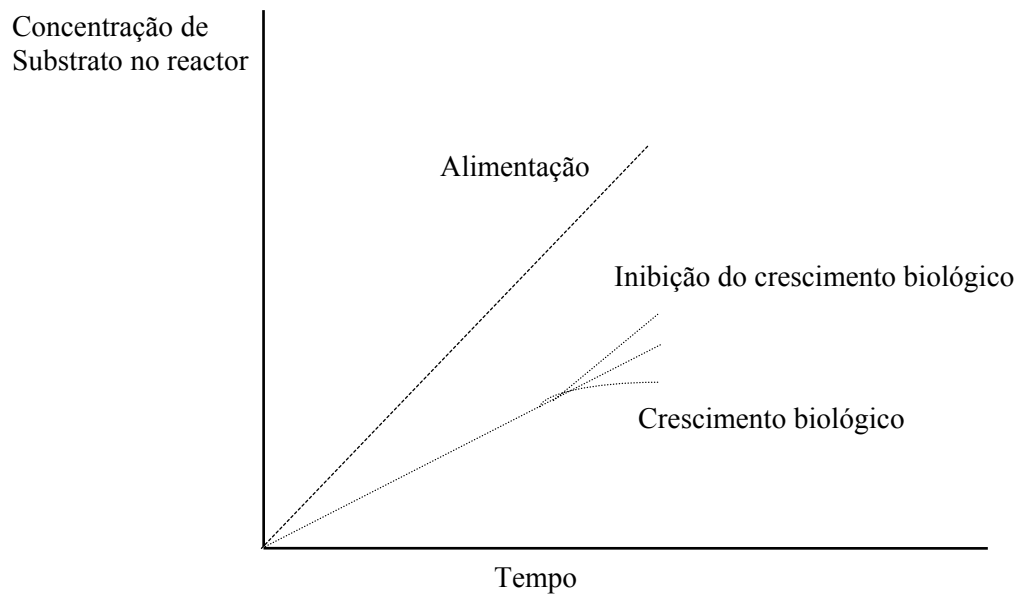


Figura 1.1- Tipos de resposta do substrato acumulado num reactor “fed-batch” (Philbrook e Grady, 1985; Eckenfelder e Grau, 1992)

A resposta a um substrato não inibidor resulta numa acumulação linear de substrato ao longo do tempo. Em caso de inibição, a utilização do substrato decai, resultando numa ascendente deflexão da curva de concentração do substrato acumulado, correspondendo a uma inibição progressiva até se atingir a toxicidade aguda podendo a curva da concentração do substrato acumulado tornar-se paralela à taxa de alimentação do substrato, ou seja, o seu declive ser igual à taxa de alimentação (Philbrook e Grady, 1985; Eckenfelder e Grau, 1992).

A Figura 1.2 mostra o efeito da inibição pelo substrato na taxa específica de consumo de oxigénio (OURE), visível através do seu declínio.

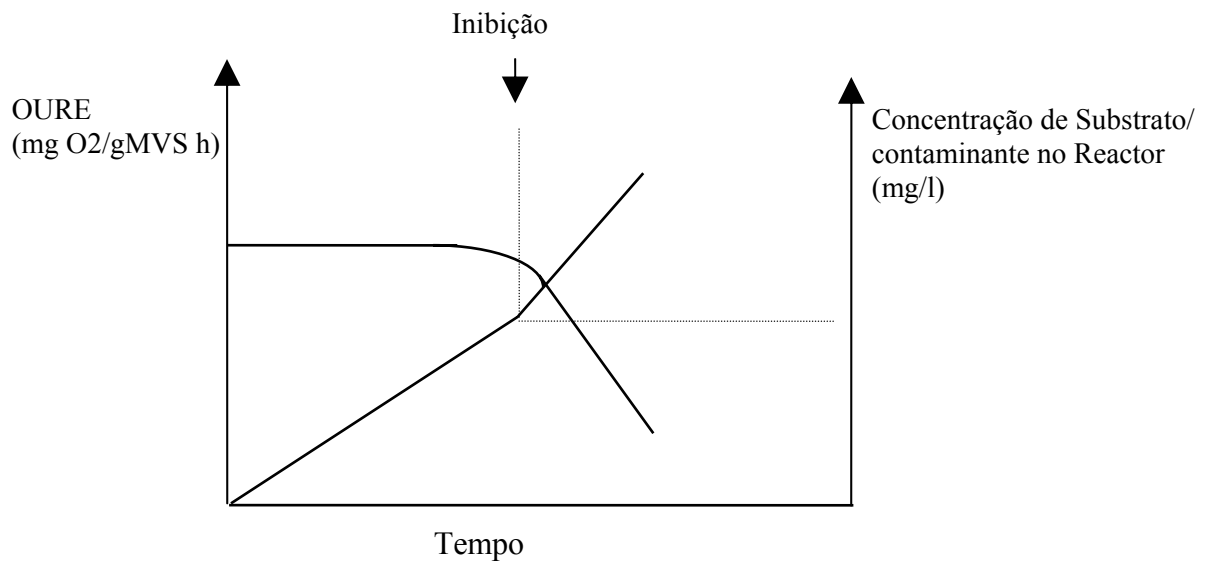


Figura 1.2- Resposta do substrato acumulado e do OURE a um inibidor (Eckenfelder e Grau, 1992)

Williamson e McCarty (1975) utilizaram reactores “fed-batch” para estudar cinéticas de nitrificação e Philbrook e Grady (1985) na remoção de poluentes específicos em lamas activadas, desenvolvendo esta técnica, baseada no teste da diluição infinita, designando-a técnica das diluições infinitas modificada (“*MIDT – modified infinite dilution test*”).

Templeton e Grady (1988) utilizaram a mesma técnica na determinação do efeito da história da cultura na cinética de degradação do 2-clorofenol. Outros autores (Patoczka *et al.*, 1988; Eckenfelder e Grau, 1992) utilizaram reactores “fed-batch” para determinar a toxicidade de efluentes industriais e substâncias químicas individuais em sistemas de tratamento por lamas activadas. Também Ellis e colaboradores (1998) utilizaram esta técnica para estudar o efeito da biodegradação de substratos compostos nas cinéticas de biodegradação de substratos simples.

A cultura “fed-batch” é tecnicamente mais simples do que cultura em quimiostato porque elimina a necessidade de manter volume constante (Pirt, 1975/85), além de que a operação em contínuo é extremamente intensiva e prolongada (Templeton e Grady, 1988). O factor tempo, para além de contribuir para um encarecimento da técnica, pode permitir modificações nas características da comunidade microbiana e, portanto, implicar variação das cinéticas observadas. (Templeton e Grady, 1988).

Constata-se assim que há grande interesse em técnicas rápidas de determinação de cinéticas de biodegradação, como as que usam reactores “batch” e “fed-batch”. Os reactores “batch” são de fácil operação (Templeton e Grady, 1988).

A técnica “fed-batch” é também preferida pelo facto de otimizar a produção de biomassa, ou de produtos formados (San e Stephanopoulos, 1984; Cazzador, 1988; Shukla e Pushpavanam, 1998) e, principalmente, pelo aumento das possibilidades de controlo que este sistema oferece (San e Stephanopoulos, 1984), nomeadamente o volume do líquido no reactor (Hong, 1986), o qual não necessita de ser constante. As vantagens enunciadas fazem com que no final da década de 70 e na década de 80 tenham surgido bastantes estudos utilizando reactores “fed-batch”. Os reactores “fed-batch” são utilizados em muitos processos de fermentação industrial para produção de antibióticos, enzimas ou ácidos orgânicos, sendo também particularmente utilizado quando o crescimento e, ou a produção de metabolitos pelos microrganismos é inibida por elevadas concentrações de substrato, ou pelos produtos finais da reacção (Sengupta e Modak, 2001).

No âmbito do tratamento de águas residuais, Patoczka *et al.* (1989) e Eckenfelder e Grau. (1992), concluíram que os reactores “fed-batch” possibilitavam um método simples e pouco dispendioso para fazer uma avaliação rápida do potencial de inibição/toxicidade de vários efluentes.

Esener e colaboradores (1981) e Templeton e Grady (1988) consideram os reactores “fed-batch” como uma ferramenta valiosa para determinação de cinéticas de biodegradação, o que é reforçado por permitirem realizar procedimentos “fed-batch” modificados (Templeton e Grady, 1988).

Esener e colaboradores (1981), que utilizaram reactores “fed-batch” num estudo sobre as necessidades energéticas dos microrganismos, sugeriram que há uma diminuição nas exigências de manutenção a taxas de crescimento específicas baixas quando se utiliza esta técnica. Os coeficientes de manutenção determinados, no referido estudo, mostraram-se sistematicamente menores do que os determinados em sistema de cultura contínua.

Ellis e colaboradores (1998), no estudo sobre o efeito da biodegradação de substratos compostos nas cinéticas de biodegradação de substratos simples, utilizaram reactores “batch” e “fed-batch”, tendo concluído que com a aplicação da técnica “fed-batch” a taxa

de crescimento específico apresenta um valor ligeiramente superior, tendo também verificado um efeito semelhante no valor de K_s , embora menor. Os resultados relativos à técnica “fed-batch” também mostraram, na biodegradação simultânea de substratos compostos um ligeiro aumento na remoção do composto em estudo, fenol.

As técnicas, “batch” e “fed-batch”, necessitam de uma fonte de biomassa aclimatada, para a realização de ensaios de biodegradabilidade. Normalmente, recorre-se a sistemas de cultura contínua ou semi-contínua, que poderão funcionar à escala laboratorial, ou a uma estação de tratamento à escala real. Contudo, no crescimento de células bacterianas em cultura contínua, a uma taxa específica de crescimento constante, ocorre não apenas a sua adaptação fisiológica, (Daigger e Grady, 1982 citando Powell, 1967), como também mudanças fundamentais nas suas estruturas básicas, por adaptação (Daigger e Grady, 1982), de forma a optimizarem o respectivo crescimento (Grady *et al.*, 1996). Como resultado, as células bacterianas atingem determinados níveis de ácido ribonucleico (RNA), proteínas e outras macromoléculas únicas para as condições de crescimento anteriores (Templeton and Grady, 1988 citando Tempest e Herbert, 1965 e Tempest *et al.*, 1967). Consequentemente, quando são transferidas para um reactor “batch” ou “fed-batch”, nos quais todas as restrições ao crescimento são removidos, ficam inicialmente limitados para um crescimento rápido (Daigger e Grady, 1982). Por outras palavras, as células não conseguem, instantaneamente, alterar a sua taxa de crescimento para o máximo, necessitando de tempo para que a transição ocorra (Daigger e Grady, 1982; Templeton and Grady, 1988). Çeçen e Ipek (1998) referem, como uma vantagem da técnica “fed-batch”, o facto das avaliações de biodegradabilidade em sistemas a funcionar em modo “fed-batch” serem mais rápidas do que em sistemas contínuos, evitando a adaptação dos microrganismos.

A mudança na composição molecular é conhecida como adaptação fisiológica, e a composição molecular num determinado momento é referente a um estado fisiológico dos organismos (Daigger e Grady, 1982). A análise da adaptação fisiológica dos microrganismos, pode ser observada através do sistema de síntese de proteínas (“PSS – *protein synthesizing system*”), que é uma sub-unidade funcional dentro das células (Grady *et al.*, 1996).

Em determinações realizadas em reactores “fed-batch”, as alterações do PSS dependem da taxa específica à qual o substrato é adicionado, relativamente à taxa específica de consumo

que a cultura apresentava no reactor em contínuo, previamente a ter sido retirada para inóculo no reactor “fed-batch”. Se as duas taxas específicas forem iguais, não haverá variações no PSS e na actividade dos organismos. Se a taxa específica no ensaio for mais elevada, haverá variações no PSS e na actividade dos organismos, fomentando o uso mais eficiente da fonte de substrato (Grady *et al.*, 1996).

A história da cultura é um factor que explica a variabilidade dos valores de parâmetros cinéticos publicados na literatura da especialidade (Grady *et al.*, 1996), representando o tipo de condições ambientais impostas e a duração dessas imposições. Há uma variedade de razões que justificam a importância deste factor. Primeiro, pode determinar, para uma cultura mista, as espécies que estão presentes, em resposta às condições de desenvolvimento da cultura. Em segundo lugar, e mesmo para culturas puras, determina a natureza do sistema enzimático dos organismos. A história da cultura determina também o estado fisiológico, como somatório da composição macromolecular das células, determinando a rapidez com que as enzimas reagem (Grady *et al.*, 1996, Konopka *et al.*, 1998, Ellis *et al.*, 1998).

Por outro lado, influencia a determinação de parâmetros cinéticos, independentemente da técnica utilizada para a respectiva medição, podendo no entanto ter uma importância diferente de acordo com essas técnicas. Templeton e Grady (1988), concluíram que os parâmetros medidos em técnicas “fed-batch” sofrem menor influência da história da cultura, relativamente aos que são determinados por técnicas “batch”.

Determinação de Coeficientes Cinéticos em Procedimentos “Fed-Batch”

Os parâmetros cinéticos da equação de Monod, μ , q e K_s , podem ser determinados num reactor “fed-batch”, num único ensaio, se este abranger a fase de crescimento exponencial (determinação de μ_{max} ou q_{max}) e a fase de crescimento linear (determinação de μ ou q e K_s) (Esener *et al.*, 1981), ou em dois ensaios.

Quando a determinação se realiza em dois ensaios, no primeiro deverá ser adicionado substrato a uma taxa que exceda ligeiramente a taxa máxima de consumo específico, permitindo um aumento linear da concentração de substrato com o tempo. Uma avaliação mais precisa da taxa máxima específica de consumo de substrato será obtida quando a taxa

de alimentação exceder apenas em pequena quantidade o valor de q_{max} , o qual poderá ser obtido a partir da diferença entre a taxa mássica de alimentação e o aumento de substrato no reactor (Philbrook e Grady, 1985).

Após ter sido determinado q_{max} , pode iniciar-se o segundo ensaio, de modo a determinar o valor de K_s . Esta determinação resulta da adição de substrato a réplicas dos reactores “fed-batch” a uma taxa de aproximadamente $q_{max}/2$. É assim determinado o período correspondente ao regime pseudo-estacionário. O valor médio da concentração de substrato durante aquele período é utilizado para calcular K_s a partir do valor conhecido de q , (Philbrook e Grady, 1985):

$$K_s = S[(q_{max}/q) - 1] \quad (1.4)$$

O valor do coeficiente μ_{max} , de acordo com a equação de Monod, quando $S \gg K_s$, pode ser obtido através do gráfico do logaritmo de SSV em função do tempo (Esener *et al.*, 1981).

1.2.1 AVALIAÇÃO DA BIODEGRADABILIDADE

Do ponto de vista ecológico, a avaliação da biodegradabilidade de novos compostos químicos é essencial, por forma a habilitar a precisão dos seus potenciais impactes ambientais.

A biodegradabilidade de substâncias orgânicas é, alternativamente, expressa como a seguir se indica (Pitter e Chudoba, 1990):

- (1) necessidade específica de consumo de oxigénio para oxidação de uma dada substância;
- (2) taxa de remoção específica de uma dada substância a partir de um meio de cultura conhecido;
- (3) quantidade de substância removida do meio de cultura.

Alguns compostos orgânicos presentes nas águas residuais, nomeadamente industriais, podem ser completamente degradados nas estações de tratamento quando os processos biológicos contêm microrganismos adaptados a esses compostos. Portanto, para águas

residuais desta natureza, importa conhecer as cinéticas de biodegradação e os possíveis efeitos nos processos de tratamento.

Entretanto, foi desenvolvido um conjunto de testes de biodegradabilidade, para satisfazer aquele objectivo, procurando-se dispor de métodos que optimizem custos e tempo de realização.

O objectivo dos testes de avaliação/controlo (*Screening test*) é avaliar os compostos por forma a verificar a possibilidade de causarem problemas no ambiente, distinguindo-se duas categorias: os que avaliam a facilidade com que os compostos se mineralizam e os que investigam quaisquer efeitos tóxicos e inibidores (Grady, 1985).

No âmbito da legislação nacional, a Portaria n.º 732-A/96, de 11 de Dezembro descreve seis métodos que permitem o despiste da biodegradabilidade de substâncias químicas: (a) Redução gradual do Carbono Orgânico Dissolvido (COD); (b) Método de despiste da OCDE modificado – redução gradual do COD; (c) Libertação de dióxido de carbono (CO₂) (teste de Sturm modificado); (d) Respirometria manométrica; (e) Frasco fechado; (f) MITI (Ministério do Comércio Internacional e da Indústria – Japão).

De seguida, apresenta-se uma síntese de alguns métodos de avaliação de biodegradabilidade.

1.2.1.1 Teste Standard do CBO (Carência Bioquímica de Oxigénio)

Neste teste o composto é dissolvido numa solução mineral de nutrientes (água de diluição para determinação da CBO) e a solução é inoculada com um pequeno número de microrganismos de uma população mista e mantida em frascos fechados a 20°C, na ausência de luz. A degradação é seguida através da variação do teor de oxigénio num período de 28 dias. Os compostos a que corresponde um valor da CBO superior a 60% da carência teórica de oxigénio são classificados como facilmente biodegradáveis (Pitter e Chudoba, 1990).

Os processos que ocorrem nos recipientes em que se efectua a determinação da CBO são, em geral, idênticos aos que ocorrem durante o tratamento aeróbio das águas residuais. Os organismos aeróbios utilizam compostos orgânicos como energia e fonte de carbono para a síntese de substâncias de reserva e novas células. Um substrato facilmente biodegradável é removido de uma solução durante as primeiras 48 horas, sendo uma porção oxidada e outra

transformada em substâncias de reserva (polissacrídeos, lípidos). Quando o substrato exógeno é removido, a concentração de bactérias atinge o seu valor máximo. Posteriormente, o oxigénio é consumido para oxidação das substâncias de reserva (respiração exógena) cujo conteúdo nas células decresce gradualmente.

No teste normalizado de CBO, a oxidação das substâncias de reserva e proteínas produzidas nas células continua por 10 a 20 dias. Contudo, este período de tempo é muito longo para ser aplicado na prática. Por isso, é usado período mais curto, normalmente 5 dias, a que corresponde cerca de 60 a 70 % da oxidação dos compostos presentes (Metcalf e Eddy, 1991).

A evolução da CBO de uma cultura mista adaptada é normalmente descrita por uma cinética de primeira ordem:

$$\frac{dy}{dt} = K(L - y) \quad (1.5)$$

onde:

y - CBO no tempo t (mg/L O₂)

L - CBO último (mg/L O₂)

K - Taxa constante (d⁻¹)

Integrando a equação tem-se:

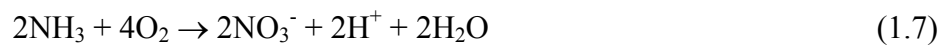
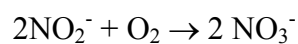
$$y = L(1 - e^{-Kt}) \quad (1.6)$$

A taxa K é um parâmetro muito importante desta equação, determinando a evolução da CBO e deste modo também o valor de CBO₅. Na literatura, é normalmente estabelecido que o valor da constante K depende, principalmente, da taxa à qual as substâncias orgânicas podem ser biologicamente oxidadas (Pitter e Chudoba, 1990). Por exemplo, nas águas residuais domésticas não tratadas, os valores de K são geralmente compreendidos entre 0.12 e 0,46 d⁻¹, com um valor típico de 0,2 d⁻¹ (Metcalf e Eddy, 1991).

Outra razão para a grande variação da constante K , é o facto de depender do número inicial de bactérias, isto é, da quantidade de microrganismos que constitui o inóculo. A aclimação do inóculo para uma dada substância orgânica constitui factor adicional para a

avaliação de K (Pitter, Chudoba, 1990). A significativa variação desta taxa indica que nem a CBO_5 nem a CBO_u (CBO última) constituem uma medida exacta da biodegradabilidade de uma substância orgânica (Pitter, Chudoba, 1990).

A evolução dos valores da CBO , e portanto da CBO_5 , podem ser afectados pela nitrificação. As bactérias autotróficas nitrificantes obtêm energia a partir da oxidação do azoto amoniacal e nitritos de acordo com as equações:



Para oxidação de 1 mg de azoto amoniacal a nitritos são consumidos 3,43 mg de oxigénio. Para oxidar 1 mg de nitrito a nitrato, aquele valor é de 1,14 mg de oxigénio. São então necessárias

4,57 mg de oxigénio para a oxidação completa de 1 mg de azoto amoniacal, pelo que quando a nitrificação não é reprimida, aumenta o valor da CBO (Pitter e Chudoba, 1990).

1.2.1.2 Teste modificado OCDE 209

Na metodologia da OCDE, um composto é caracterizado como sendo biodegradável quando é completamente mineralizado em 28 dias, por uma pequena quantidade de inóculo, constituído por microrganismos provenientes de águas residuais domésticas que nunca tenham sido expostas a esse composto a testar. O teste realiza-se com baixas concentrações de substrato, sendo o composto a testar a única fonte de carbono e energia (Grady, 1985).

O composto é dissolvido numa solução mineral de nutrientes (vitaminas e elementos essenciais) e mantido no escuro, com agitação entre 20 a 25°C (Pitter e Chudoba, 1990), não sendo esta técnica aconselhada para testar compostos orgânicos altamente voláteis (Volskay e Grady, 1988).

O teste pode ser modificado pela utilização de maiores diluições da concentração de células e substrato, realizando o teste em recipientes selados, que permitem minimizar a perda de compostos voláteis (Volskay e Grady, 1988).

A degradação pode ser seguida através da análise do carbono orgânico dissolvido, devendo ser garantida uma concentração de oxigénio acima de 40% da concentração de saturação (Volskay e Grady, 1988). A verificação da mineralização pode também ser obtida pelo consumo de oxigénio e evolução do dióxido de carbono, que devem ser consistentes com a completa remoção do composto para síntese de células, com um valor conservativo do rendimento (Grady, 1985).

Compostos que neste teste sofram uma redução superior a 70% do carbono orgânico dissolvido inicial, durante 28 dias, podem ser considerados como facilmente biodegradáveis (Pitter e Chudoba, 1990).

1.2.1.3 Teste ANFOR modificado

Este teste é semelhante ao teste modificado OCDE. As diferenças consistem na solução mineral de nutrientes, no inóculo (mistura de 3 amostras de água superficial poluída ou de efluente secundário) e na concentração inicial do composto a testar que é elevada (Pitter e Chudoba, 1990). Neste teste a glucose é usada para controlo da acção inibidora.

1.2.1.4 Teste ISO

O método da “International Organization for Standardization” possibilita verificar se o composto está ou não a sofrer um processo de degradação causado por mecanismos de degradação abióticos (mecanismos físico-químicos, químicos, foto-oxidação). A degradação é seguida por análises ao carbono orgânico dissolvido durante um período de 28 dias (Pitter e Chudoba, 1990).

1.2.1.5 Teste MITI modificado

O teste MITI (“Ministry of Internatinal Trade and Industry”, Japão) é baseado na medição da CBO e analisa os compostos químicos residuais, como carbono orgânico dissolvido durante a biodegradação. É utilizado um aparelho de medição do consumo de oxigênio de sistema fechado, automático (respirómetro manométrico). O composto a testar é colocado numa solução mineral e inoculado com lamas activadas, crescendo num meio de glucose-peptona. Valores da CBO superiores a 60% do carbono orgânico teórico (em 28 dias) correspondem a substâncias facilmente biodegradáveis (Pitter e Chudoba, 1990).

1.2.1.6 Teste Sturm modificado

A solução do composto a testar num meio inorgânico é inoculada com o sobrenadante de lamas activadas, homogeneizado. A quantidade de dióxido de carbono produzido a partir do composto a testar é medida durante 28 dias, através da precipitação de BaCO₃ e calculada a percentagem da produção de dióxido de carbono (PCO₂). Compostos que revelem um rendimento superior a 60% PCO₂, no período de 28 dias, podem ser classificados como facilmente biodegradáveis (Pitter e Chudoba,1990).

1.2.1.7 Testes Químicos

Os testes químicos têm limitações, pois são incapazes de diferenciar entre a matéria orgânica biologicamente oxidável e a matéria orgânica biologicamente inerte. Por outro lado, também não fornecem qualquer evidência acerca da velocidade à qual a matéria biologicamente oxidável poder ser estabilizada nas condições prevalecentes na natureza.

Carência Química de Oxigênio

A determinação da Carência Química de Oxigênio (CQO) permite medir a quantidade de oxigênio necessária para oxidar, por via química, a matéria orgânica presente numa amostra, com formação de dióxido de carbono e água:



Este método baseia-se na circunstância de quase todos os compostos orgânicos poderem ser oxidados por agentes químicos oxidantes fortes, em condições ácidas. Existem algumas exceções, como as pirinas e compostos afins, que são resistentes à oxidação, e os compostos orgânicos voláteis que, devido à sua natureza, só são oxidados enquanto permanecem em contacto com o agente oxidante. Também o azoto amoniacal, presente na amostra, ou libertado em resultado da degradação dos compostos orgânicos azotados, não é oxidado se a concentração de cloretos no meio não for significativa.

A CQO é um teste utilizado para avaliar a carga poluente de águas, sobretudo de águas residuais domésticas e industriais.

A grande vantagem do teste da CQO reside no tempo de realização (cerca de 3 horas) comparativamente com o teste da CBO (≥ 5 dias).

A razão entre o valor de CBO₅ e o valor de CQO é normalmente utilizada para avaliar o grau de biodegradabilidade das águas residuais. Uma água residual muito biodegradável apresenta um valor daquela razão próximo de 1.

Método do Carbono Orgânico Total (TOC)

O facto de todos os compostos orgânicos serem compostos de carbono permite prever que exista uma relação quantitativa entre a quantidade de material biodegradável e a quantidade de carbono orgânico desaparecido. A sua determinação exige contudo aparelhos complexos e dispendiosos.

1.2.2 RESPIRÓMETROS

Para medir o oxigénio dissolvido que é consumido, durante o tratamento de águas residuais por lamas activadas, pela respiração dos microrganismos presentes na suspensão e pela biodegradação da água residual, existem vários respirómetros disponíveis (Roš, 1993). Entre as técnicas de medição respirométrica de lamas activadas, as mais utilizadas são as

manométricas e as de medição directa de oxigénio, através de uma sonda com célula galvânica, ou um eléctrodo polarográfico (Suschka e Ferreira, 1986).

Os respirómetros têm sido uma ferramenta útil para trabalhos de investigação sobre poluição de águas, tendo sido produzidos muitos aparelhos respirométricos ao longo dos anos (Roš, 1993).

Do ponto de vista bioquímico, para avaliação da biodegradabilidade de uma dada substância não é suficiente utilizar os dados relativos ao seu grau de degradação (Sequeira e Santana, 1996), exigindo também a determinação das constantes cinética, das quais a taxa de remoção específica máxima de substrato, q_{max} , a constante de saturação, K_s , e o coeficiente de rendimento celular, Y_{XS} , são os mais importantes (Pitter e Chudoba, 1990). Outra constante importante é a taxa máxima de crescimento específico, μ_{max} .

As medições respirométricas podem ser realizadas em sistemas fechados (como as garrafas de Winkler), com uma variedade de instrumentos respirométricos, ou em respirómetros abertos (Roš, 1993). Quanto aos respirómetros fechados, podem ser manométricos (medem a diferença de pressão num sistema de volume constante, enquanto o oxigénio é consumido no sistema), volumétricos (funcionando num sistema de pressão constante medindo o oxigénio consumido através de uma célula electrolítica) (Pitter e Chudoba, 1990, Roš, 1993), ou combinados. Os respirómetros abertos podem ser descontínuos ou contínuos.

De seguida, apresenta-se uma síntese sobre alguns respirómetros que são frequentemente utilizados para testar a biodegradabilidade, embora haja muitos outros aparelhos que foram desenvolvidos ao longo do tempo.

1.2.2.1 Método de Winkler

A taxa de consumo de oxigénio pode ser determinada através de garrafas de Winkler (Roš, 1993). A concentração de oxigénio dissolvido num volume conhecido é medida com um eléctrodo polarográfico, ou com um eléctrodo galvânico selectivo de oxigénio, sendo medida a concentração do oxigénio em função do tempo (Roš, 1993).

1.2.2.2 Warburg

O respirómetro de Warburg é manométrico (Roš, 1993), sendo medida a variação de oxigénio utilizado, através da diminuição de pressão no sistema, a volume constante. O dióxido de carbono produzido é absorvido por uma solução de hidróxido de potássio, pelo que a diminuição de pressão corresponde unicamente à medida do consumo de oxigénio (Roš, 1993).

A absorção de dióxido de carbono pode constituir uma fonte de erro neste método (Montgomery, 1967 citando Wilson, 1967), pois a verificação do consumo de oxigénio resulta aparente se uma concentração significativa de dióxido de carbono se mantiver presente (Montgomery, 1967 citando Myers e Matsen, 1955).

1.2.2.3 Sierp

O aparelho de pressão constante de Sierp, de 1928 (Montgomery, 1967), revelou não possuir os meios adequados para a remoção do dióxido de carbono produzido durante a respiração, o que levou Gellman e Heukelekian, em 1951, a introduzir um recipiente com um conteúdo alcalino no recipiente de reacção. É fornecido oxigénio ao sistema, sendo a respectiva taxa de consumo medida por variação de pressão (Montgomery, 1967).

1.2.2.4 Barcroft

O manómetro diferencial de Barcroft (Montgomery, 1967), consiste em dois recipientes de reacção idênticos ligados entre si por um manómetro capilar. No recipiente de compensação é normalmente colocada água e, no outro, a mistura de reacção. O conteúdo de cada recipiente é ajustado com uma base conveniente para a absorção do dióxido de carbono e a variação manométrica está relacionada com o consumo de oxigénio. Este aparelho tem duas vantagens: não é afectado por variações de pressão atmosférica e a diferença entre a taxa de consumo de oxigénio de duas substâncias pode ser determinada directamente (Montgomery, 1967).

Wooldrigge e Standfast, em 1936, utilizaram o aparelho de Barcroft na primeira aplicação à medição da CBO das águas residuais (Montgomery, 1967).

1.2.2.5 Outros Respirómetros

Outros respirómetros utilizados em vários trabalhos de investigação são, entre muitos outros, o respirómetro de Sapromat e respirómetro HACH (Roš, 1993).

O respirómetro de Sapromat é um respirómetro volumétrico aperfeiçoado (Roš, 1993) e foi utilizado por Brown e colaboradores (1990) e por Naziruddin e colaboradores (1995) para avaliar as cinéticas de biodegradação de vários compostos.

O respirómetro HACH é um respirómetro manométrico (Roš, 1993). O ar existente sobre a amostra, fechada na garrafa, reabastece o oxigénio usado, resultando assim numa quebra da pressão do ar na garrafa da amostra. A baixa de pressão é registada no manómetro de mercúrio sendo directa a leitura em mg/L O₂ (Roš, 1993).

1.2.2.6 Respirómetros Abertos

Um respirómetro aberto deve ser um recipiente térmico (o qual permite manter uma temperatura constante), no qual se coloca uma suspensão de lamas activadas. O reactor pode ser mais ou menos equipado, sendo necessário garantir o fornecimento de oxigénio, uma sonda de oxigénio que permita obter dados em tempo real da concentração de oxigénio dissolvido e um sistema de agitação que garanta que a suspensão de lamas está em contacto com o substrato e o oxigénio de forma homogénea (Roš, 1993).

1.2.3 TESTES DE INIBIÇÃO

Muitos compostos orgânicos apresentam um valor de concentração a partir do qual inibem os organismos heterotróficos nos processos biológicos de tratamento de águas residuais, nomeadamente de lamas activadas.

Aos compostos não inibidores aplica-se normalmente a equação de Monod (1.9), enquanto que para compostos inibidores é, normalmente utilizada a cinética de Haldane-Andrews (1.10) para descrever a respectiva biodegradação (Rozich e Gaudy, 1985; Philbrook e Grady, 1985; Brown *et al.*, 1990; Ellis *et al.*, 1996 (a)):

$$\mu = \frac{\mu_{max} [S]}{K_s + [S]} \quad (1.9)$$

$$\mu = \frac{\mu_{max} [S]}{K_s + [S] + [S]^2 / K_i} \quad (1.10)$$

onde: μ é a taxa de crescimento específico (h^{-1}), μ_{max} a taxa máxima de crescimento específico (h^{-1}), $[S]$ a concentração de substrato (mg/L), K_s a constante de meia velocidade (mg/L) e K_i a constante de inibição (mg/L). As mesmas expressões podem ser utilizadas para a taxa específica de consumo de substrato, q , utilizando o valor da taxa máxima específica de consumo de substrato, q_{max} . Em ambas as expressões a taxa de crescimento específica é uma resposta dos microrganismos a determinadas condições ambientais, nomeadamente a concentração de substrato exógeno (Magbanua *et al.*, 1998). Isto enquadra-se na perspectiva da história da cultura, particularmente a concentração e a quantidade de substrato relativamente à biomassa, impactes na fisiologia microbiana e nas cinéticas de crescimento (Grady *et al.*, 1996).

A constante de inibição K_i é provavelmente muito dependente do sistema enzimático específico envolvido, o qual por seu turno depende da história e da dinâmica da população. Em alguns casos, a constante de inibição pode ser dependente dos caminhos metabólicos particulares que estão presentes em qualquer população microbiana (Eckenfelder e Grau, 1992). Portanto, torna-se óbvio que cada água residual exige um estudo específico.

A equação de Haldane-Andrews baseia-se no pressuposto de que uma enzima forma um complexo enzima - substrato inactivo, envolvendo duas moléculas de substrato por enzima (Tan *et al.*, 1996, citando Bailey e Ollis, 1986).

Outras equações tem sido propostas para o estudo de compostos inibidores. Tan e colaboradores (1996) referem que Eduards, em 1970, demonstrou que a equação de Aiba-Eduards se adaptava melhor a determinados dados que a equação Haldane-Andrews, e

Luong, em 1987, argumentou que a equação Levenspiel-Luong explicava melhor os dados experimentais do que as duas equações citadas. Tan e colaboradores, em 1994, derivaram uma aproximação, da equação de Haldane-Andrews, utilizando um método estatístico, para descrever cinéticas de crescimento em condições de substrato limitante, sendo possível estender a sua aplicação a substratos inibidores (Tan *et al.*, 1996).

Uma simples teoria da resposta microbiana a inibidores de crescimento pode ser baseada nas cinéticas de inibição de enzimas (Pirt, 1985). A inibição pode ser competitiva, quando o inibidor compete com o substrato para ser consumido pela biomassa, e não competitiva se o inibidor reage com a biomassa sem afectar a afinidade para o substrato (Pirt, 1985). A inibição pode ainda ser uma conjugação dos processos anteriores designando-se por mista.

Volskay e Grady (1988) classificaram os compostos inibidores em competitivos, não competitivos (“noncompetitive”), “incompetitivos” (“uncompetitive”) e mistos, dependendo do modo como influenciam a taxa de remoção de substrato específica máxima (q_{max}) e a constante de meia velocidade (K_s) da equação de Monod, representando o efeito da concentração de substrato na taxa de remoção de substrato específica (q) (Quadro 1.2). Esses efeitos foram quantificados através da utilização de modelos de inibição lineares reversíveis simples.

Quadro 1.2 - Efeitos dos diferentes tipos de inibidores nos parâmetros cinéticos, relativamente à biodegradação de compostos não inibidores

Tipo de Inibidor	Efeito em q_{max}	Efeito em K_s
Competitivo	não afecta	Aumenta
Não competitivo	Diminui	Não afecta
“Incompetitivo”	Diminui	Diminui
Misto	Diminui	Aumenta

Fonte: Volskay e Grady (1988)

Muitas vezes o próprio inibidor não está definido, a variabilidade da composição da lama e do substrato influenciam a inibição e existem interacções frequentes entre os inibidores (Eckenfelder e Grau, 1992).

Os testes de toxicidade são necessários para avaliação da poluição da água, dado que os testes químicos e físicos não são suficientes para verificar os seus potenciais efeitos no biota aquático.

A interacção de factores químicos e efeitos tóxicos é uma matriz complexa. Diferentes tipos de organismos aquáticos não são igualmente susceptíveis à mesma substância tóxica. Alguns organismos são afectados de diferentes formas, dependendo da fase do ciclo de vida em que se encontram. A exposição prévia a uma substância tóxica é outro factor que pode alterar a susceptibilidade a essa substância (Roš, 1993).

Os testes de toxicidade são úteis para uma variedade de propósitos, incluindo a determinação de (Roš, 1993):

- condições ambientais aceitáveis da vida aquática,
- toxicidade de resíduos em espécies específicas a testar,
- sensibilidade relativa de organismos aquáticos para um efluente ou um tóxico,
- nível de tratamento necessário para as necessidades de controlo da poluição da água,
- eficácia de métodos de tratamento,
- taxas de descarga de efluentes,
- conformidade com padrões de qualidade da água e requisitos de efluentes.

Para uma estação de tratamento de águas residuais, por um processo biológico, é muito importante que o afluente seja adequado para a degradação microbiana. A água residual não deve conter matérias que impeçam ou prejudiquem a biodegradação de substâncias orgânicas.

As estações de tratamento de águas residuais podem ser sujeitas a variações instantâneas de produtos tóxicos, “choques de carga”, pelo que os testes respirométricos podem ser úteis para estimar os respectivos efeitos e adoptar medidas de operação susceptíveis de corrigir as anomalias.

A toxicologia respirométrica visa determinar o efeito tóxico ou efeito inibidor numa suspensão de lamas activadas. As determinações respirométricas dividem-se em duas partes: testes de toxicidade para a taxa de respiração de lamas (taxa de consumo de oxigénio

endógeno), e teste de toxicidade para a taxa de respiração exógena (taxa de consumo de oxigénio exógeno) (Roš, 1993).

1.2.3.1 Testes de toxicidade para a taxa de respiração lamas

Quando a actividade dos sólidos em suspensão no reactor respirométrico está na fase endógena (nenhuma fonte de energia é adicionada ao sistema), pode ser determinada a respectiva taxa de respiração, r_s (Roš, 1993), designada no âmbito deste trabalho, por taxa de consumo de oxigénio na fase endógena (*OUR_{end}*). Depois de se suspender o fornecimento de ar, a taxa de respiração de lamas é medida através da variação de oxigénio dissolvido num determinado período.

Após saturação da ressuspensão de lamas com oxigénio e adição do tóxico, determina-se, aproximadamente 1 hora depois, o segundo valor da taxa de respiração de lamas, a qual é normalmente inferior à taxa de respiração original (Roš, 1993).

A toxicidade avaliada pela taxa de respiração de lamas respirométrica representa a inibição dos microrganismos na suspensão de lamas activadas. Isto significa que todos os organismos são afectados, incluindo os microrganismos activos que não são envolvidos na degradação (Roš, 1993).

1.2.3.2 Testes de Toxicidade para a Taxa de Respiração Exógena

Quando um novo substrato é adicionado a uma suspensão de lamas activadas na fase endógena, a concentração de oxigénio dissolvido varia até que todo o substrato tenha sido consumido, obtendo-se um respirograma (Roš, 1993).

Para determinar a toxicidade de um substrato coloca-se uma suspensão de lamas activadas no reactor respirométrico. Adiciona-se um determinado substrato conhecido (normalmente água residual ou substrato biodegradável) e regista-se a evolução da concentração de oxigénio dissolvido (respirograma). Quando se atinge a fase endógena é adicionada uma quantidade conhecida de tóxico. Depois de um tempo apropriado (normalmente após 1 hora) a mesma quantidade de substrato é adicionado novamente. A actividade bioquímica das lamas activadas (biocenosis) cria um segundo respirograma de forma diferente do primeiro (Figura 1.3).

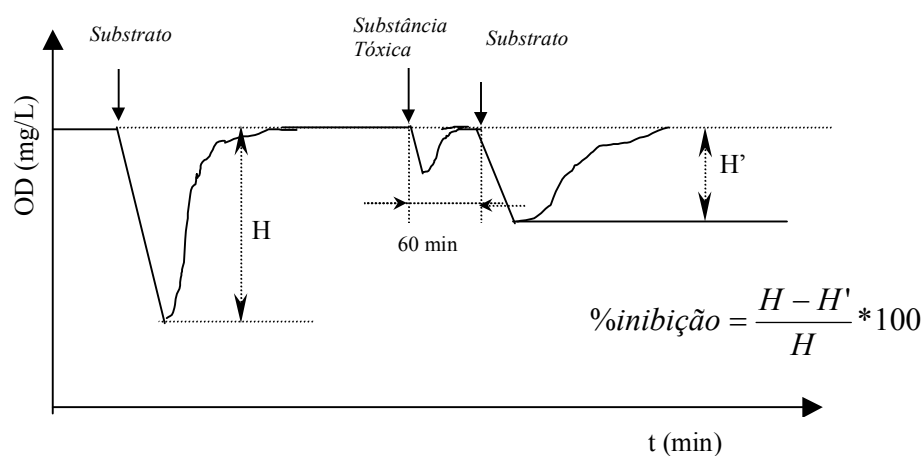


Figura 1.3 – Determinação da toxicidade (Roš, 1993)

Muitos protocolos têm sido desenvolvidos com o objectivo de determinar a toxicidade de um determinado composto, nomeadamente o reactor “fed-batch” de Philbrook e Grady (1985) e Watkin e Eckenfelder (1988), o método OCDE 209 modificado e aplicado por Volkay e Grady (1988) e o teste de inibição da Glucose de Larson e Schaeffer (1982) (Eckenfelder e Grau, 1992).

Método OCDE 209 - Lamas Activadas, Teste de Inibição da Respiração

O método OCDE envolve a medição da taxa de consumo de oxigénio de lamas activadas a partir de um substrato sintético no qual o composto a testar é adicionado a várias concentrações. A taxa de consumo é medida imediatamente após a adição do composto a testar e após 30 minutos de arejamento. O valor de EC₅₀ é determinado como a

concentração do composto a testar à qual o consumo de oxigénio, aos 30 minutos, é 50% da taxa de consumo de oxigénio sem inibição.

Volkay e Grady (1988) utilizaram este teste com algumas modificações para determinar a toxicidade de compostos orgânicos. Pelo facto de muitos compostos serem voláteis, o teste foi modificado utilizando concentrações mais diluídas da biomassa e de substrato, e o ensaio foi realizado em frascos selados. Este estudo incluiu 33 compostos RCRA (*Resource Conservation and Recovery Act*), que tinham sido detectados em estações de tratamento de águas residuais domésticas. Quinze desses compostos apresentaram valores de EC_{50} inferiores a 1000 mg/L, sete valores de EC_{50} superiores e 11 deles possuem um valor de EC_{50} para concentrações superiores ao seu limite de solubilidade.

Reactor “Fed-Batch”

O reactor “fed-batch” pode ser utilizado em testes de inibição, como anteriormente referido. A inibição torna-se visível pela alteração no declive da curva de acumulação do substrato no reactor, atingindo, no caso de inibição máxima, o mesmo declive que a taxa de adição. A evolução da taxa específica de consumo de oxigénio (*OURE*) poderá ser outro parâmetro indicador da inibição. Um aumento do declive da curva de acumulação de substrato é acompanhado de uma diminuição do *OURE*.

A constante de inibição, K_I , pode ser determinada pela identificação da concentração inibidora no ponto médio da fracção da curva linear de resposta do substrato (Eckenfelder e Grau, 1992).

Patoczka e colaboradores (1989) estudaram o efeito de inibidores pela adição de cloreto de mercúrio, na degradação de diclorofenol e de águas residuais industriais.

Teste de Inibição da Glucose

Larson e Schaeffer (1982) desenvolveram um teste de toxicidade rápida baseado na inibição do consumo da glucose por lamas activadas na presença de tóxicos. O teste foi subsequentemente modificado para aplicação a vários tipos de águas residuais.

As etapas deste teste passam pela medição, após 60 minutos de arejamento, da concentração final de glucose. As amostras a analisar são a amostra de controlo das lamas (C_B), constituída por 10 mL de água desionizada, 10 mL de lamas activadas e 1 mL de glucose; a amostra do resíduo/composto a testar (C) onde os 10 mL de água desionizada são substituídas por 10 mL do composto. É ainda necessário determinar a concentração inicial de glucose (C_0) numa toma constituída por 30 mL de água desionizada com 1 mL de glucose, à qual não são adicionadas lamas nem é utilizado arejamento. Esta última amostra utiliza-se para controlo da glucose (Eckenfelder e Grau, 1992).

A percentagem de inibição é a razão da diferença entre a concentração final em solução na amostra e a concentração final de glucose na amostra de lamas de controlo, pela diferença entre a concentração inicial de glucose (controlo de glucose) e a concentração final de glucose na amostra de lamas de controlo (Eckenfelder e Grau, 1992).

$$\text{Inibição (\%)} = (C - C_B) / (C_0 - C_B) \quad (1.11)$$

Inibição da Nitrificação

Muitos efluentes industriais não inibem os organismos que realizam a oxidação de matéria carbonácea, mas inibem organismos mais sensíveis como os nitrificantes. O teste pode basear-se na adição de pequenas doses de carvão activado em pó (“PAC - *powdered activated carbon*”) que adsorvem compostos orgânicos inibidores, permitindo o processo de nitrificação. As cinéticas de inibição da nitrificação podem ser estudadas utilizando procedimentos “fed-batch” e/ou seguindo o protocolo para avaliar o efeito da adição de carvão activado (Eckenfelder e Grau, 1992).

1.2.4 REACTOR “FED-BATCH” PROPORCIONAL

O reactor “Fed-batch” Proporcional foi desenvolvido de modo a avaliar a biodegradabilidade através da produção de dióxido de carbono, dado que dispõe de um sistema proporcional de alimentação de substrato (Sequeira e Santana, 1996). A originalidade do reactor “fed-batch” Proporcional reside no facto de se alimentar no decurso do avanço da reacção de degradação. Trata-se de um reactor fechado, no qual a alimentação

em substrato é induzida pela produção de gás (CO₂) resultante do processo de degradação. O oxigénio necessário é adicionado ao meio de cultura pela decomposição do peróxido de hidrogénio (H₂O₂), por acção da catalase (ou hidroperoxidase) presente na maioria dos microrganismos aeróbios (Rezette *et al.*, 1996, Tusseau-Vuillemin *et al.*, 2002). Esta técnica de oxigenação é possível dado que o peróxido de hidrogénio dissocia-se em poucos minutos em oxigénio e água (Rezette *et al.*, 1996) e por não alterar a taxa de consumo de oxigénio pelos microrganismos, quer em fase endógena quer na presença de substrato (Tusseau-Vuillemin *et al.*, 2002).

O reactor “Fed-batch” Proporcional é um sistema inovador, de simples execução, que poderá permitir obter resultados mais representativos do que os testes clássicos usuais, na medida em que ao longo do período de realização do teste é menos significativa a variação da cultura microbiana responsável pela biodegradação e também porque minimiza eventuais fenómenos de inibição (Sequeira e Santana, 1996), visto que se utiliza um sistema de alimentação de substrato proporcional.

O reactor “Fed-batch” Proporcional introduz portanto, uma inovação muito importante no domínio dos testes de biodegradação, pois incorpora o princípio da respirometria para conseguir uma operação em modo “fed-batch”. Neste reactor, o dióxido de carbono produzido no decurso da degradação aeróbia de um composto orgânico não é capturado por meio de uma solução alcalina (Santana e Sequeira, 2002), como sucede noutros respirómetros clássicos. O aumento de pressão que se verifica no interior do reactor é utilizado para adicionar substrato sendo pois a alimentação proporcional à velocidade, ou taxa de degradação verificada (Sequeira e Santana, 1996).

1.3 INIBIÇÃO

O rápido avanço das tecnologias industriais, tem proporcionado um aumento constante de novos compostos químicos orgânicos no ambiente que provêm da indústria farmacêutica, petroquímica, de solventes, do papel, entre outras. O destino deste compostos orgânicos no ambiente depende da sua bio-oxidação, rápida ou lenta, ou se são biologicamente recalcitrantes, persistindo na água, sendo absorvidos pelos sedimentos e/ou bioacumulados na cadeia alimentar (Tabak *et al.*, 1981).

Muitas substâncias como metais pesados, compostos orgânicos não biodegradáveis, sais, etc., podem por si próprios, ou em conjugação com outros compostos, produzir um efeito tóxico na capacidade de uma dada cultura degradar um determinado resíduo (Rozich e Gaudy, 1992).

A biodegradabilidade e a toxicidade de substâncias orgânicas são dois critérios básicos, determinando o seu comportamento no meio ambiente natural e durante o tratamento biológico de águas residuais. Assim, as substâncias orgânicas podem ser divididas em quatro grupos (Pitter, 1976):

- (1) substâncias biologicamente degradáveis e não tóxicas,
- (2) substâncias biologicamente degradáveis e tóxicas,
- (3) substâncias não degradáveis biologicamente e não tóxicas,
- (4) substâncias não degradáveis biologicamente e tóxicas.

Para os compostos do primeiro grupo não há qualquer objecção ao seu tratamento biológico. Quanto às substâncias que pertencem ao segundo grupo, são tratadas por processos biológicos natural/artificial, após uma diluição adequada. O tratamento de compostos do terceiro, e em especial do quarto grupo, poderá ser limitado, ou tornar-se praticamente impossível (Pitter, 1976; Pitter e Chudoba, 1990).

A biodegradação pode, contudo, não ter um resultado benigno, uma vez que pode converter compostos inócuos em compostos tóxicos, mudar um composto rapidamente metabolizado para um difícil de destruir, ou alterar a toxicidade de um composto que actua contra outro organismo (Grady, 1985). No caso da biodegradação do 1,2-diclorobenzeno, Naziruddin e colaboradores (1995), observaram a inibição dos produtos intermédio da degradação.

Os factores que afectam a biodegradação podem incluir (Pitter, 1976):

- factores físico-químicos (temperatura, solubilidade, grau de dispersão do composto no meio, pH, oxigénio dissolvido),
- factores biológicos (história da cultura, idade de lamas, modo e tempo da sua adaptação, toxicidade ao composto, efeitos de outras substâncias),
- factores químicos (tamanho das moléculas, comprimento da cadeia molecular, número e posição dos substitutos na molécula, estequiometria).

1.3.1 XENOBIÓTICOS

Os compostos químicos orgânicos que entram no ambiente pela acção do homem e que aparecem em concentrações superiores aos níveis naturais (xenobióticos) (Grady, 1985; Richards e Shieh, 1986; Volskay e Grady, 1990, Pitter e Chudoba, 1990), exercem três efeitos principais, que devem ser quantificados (Volskay e Grady., 1990):

- (1) inibem a sua própria biodegradação, através da inibição pelo substrato,
- (2) influenciam a taxa à qual a matéria orgânica biogénica é utilizada pelos microrganismos capazes de degradar ambos os substratos (biogénicos e xenobióticos),
- (3) inibem a biodegradação da matéria orgânica biogénica pelos microrganismos que são incapazes de degradar os compostos xenobióticos.

Alguns compostos aromáticos devem a sua resistência à degradação microbiana aos seus substitutos. O grau de substituição, a posição dos substitutos e a natureza dos grupos de substituição contribuem para as propriedades globais do composto (Dosanjh e Wase, 1987). A posição dos substitutos que confere maior resistência á biodegradação é a posição *orto*, seguida da *para* e por fim a *meta*, e a dificuldade de fissão aumenta do grupo $-NH_2$, para o grupo $-Cl$, para o grupo $-NO_2$, que é o substituto mais resistente (Pitter, 1976, Dosanjh e Wase, 1987 citando Saeger e Thompson, 1980).

Para que ocorra a degradação de um determinado compostos químico orgânico é necessário que estejam presentes organismos com capacidade genética para o degradar (Grady, 1985), para além da síntese de enzimas, e também de condições ambientais adequadas às reacções catalisadas enzimaticamente se processarem a uma taxa significativa (Grady, 1985).

Ellis e colaboradores (1996 (b)) demonstraram a importância do controlo da variabilidade da população da lamas activadas ao realizarem um estudo comparativo de parâmetros cinéticos intrínsecos em dois sistemas de lamas activadas que unicamente diferiam na existência de um selector num dos sistemas. O fenol e o 4-clorofenol foram biodegradados de acordo com a cinética de Monod no sistema com selector e no sistema sem selector, seguiram a cinética de Haldane-Andrews, relativa a compostos inibidores. Além deste facto

verificaram ainda que os valores da taxa máxima de crescimento específico (μ_{max}) e da constante de saturação (K_s) são significativamente superiores no sistema com selector.

1.3.2 METAIS

Os metais pesados estão entre os compostos mais tóxicos no ambiente (Liehr *et al.*, 1994), sendo tóxicos para as lamas biológicas mesmo em baixas concentrações (Eckenfelder, 2000). As principais fontes de metais tóxicos são as águas residuais industriais (Zarnovsky *et al.*, 1994), particularmente as de galvanoplastia, electrónica e tratamentos de superfície (Liehr *et al.*, 1994).

A utilização de material biológico para remover ou recuperar os metais da água tem sido estudada ao longo de muitos anos e por diversas áreas de investigação, tendo sido observada a remoção de metais por microrganismos, apesar dos mecanismos envolvidos serem muitas vezes difíceis de distinguir. Os mecanismos de remoção têm sido organizados em três categorias: precipitação e captura pelos flocos de biomassa, adsorção pela superfície da célula e acumulação intracelular (Liehr *et al.*, 1994, citando Shumate e Strandberg, 1985, e Muraleedharan *et al.*, 1991). A primeira categoria refere-se à incorporação dentro de polímeros extracelulares excretados pelos microrganismos, ou apanhados pela matriz do floco. A remoção de metais por este efeito é afectada pelos parâmetros que determinam as características e tamanho do floco (Eckenfelder e Grau, 1992). A adsorção à superfície das células inclui adsorção, troca de iões, ou complexação à superfície da célula. A idade de lamas e a carga orgânica são dois parâmetros que afectam este tipo de remoção (Eckenfelder e Grau, 1992). A terceira categoria implica um processo de actividade de consumo pelo qual o organismo “consome” o metal e acumula-o dentro da célula.

O método de avaliação aplicado, o tempo de contacto biomassa - metal, são variáveis que influenciam os resultados de toxicidade. Além disso a toxicidade dos metais depende do tipo, concentração e forma do metal em solução (catião ou em forma de complexo), da história da cultura, do pH e da presença de outros compostos na água residual (Zarnovsky *et al.*, 1994).

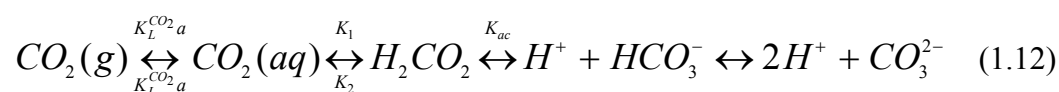
Lewandowski (1987) estudou o efeito da presença do ião crómio hexavalente, inibidor não competitivo, calculando o coeficiente de inibição e o valor de reactor resistente à inibição (RRI). O valor de RRI, a concentração mais elevada do composto inibidor à qual a taxa de conversão do substrato é completa, está possivelmente dependente da concentração de biomassa no reactor, da idade de lamas, do dador de electrões utilizado e da temperatura (Lewandowski, 1987).

O efeito da concentração na biomassa (bioconcentração) pode resultar em níveis elevados de metais nas lamas estabilizadas, limitando as opções de deposição (destino final) das lamas.

1.3.3 DIÓXIDO DE CARBONO

Num sistema biológico o dióxido de carbono tem um papel importante, tomando parte das transformações metabólicas como substrato e como produto e está activo em muitas reacções químicas diferentes e processos de transferência (Noorman *et al.*, 1992).

Como as membranas celulares são relativamente permeáveis (Royce e Thornhill, 1991 citando Jones e Greenfield, 1982), o dióxido de carbono produzido pelo metabolismo dos microrganismos entra na fase líquida como dióxido de carbono dissolvido, podendo então ser envolvido em qualquer dos processos reversíveis (Royce e Thornhill, 1991) apresentados na seguinte expressão:



onde: $K_1, K_2 =$ taxas constantes das respectivas reacções, s^{-1}

$K_{ac} =$ constante de dissociação do ácido carbónico, $mol.m^{-3}$

Como os processos de fermentação são operados em intervalos de pH entre 4 e 8, a concentração de carbonato (CO_3^{2-}) é desprezável, bem como a de complexos de dióxido de carbono com grupos amina ou moléculas de proteína, sendo ainda negligenciável a reacção do dióxido de carbono com os iões hidróxilos (Royce e Thornhill, 1991 citando Sherwood *et al.*, 1976). Das espécies químicas na fase líquida, apenas o dióxido de carbono

dissolvido, $\text{CO}_2(\text{aq})$, contribui para a transferência do CO_2 através da interface gás-líquido. A concentração do ácido carbônico tem uma magnitude de três ordens de grandeza inferiores ao dióxido de carbono (Royce e Thornhill, 1991). A concentração dos íons bicarbonato aumenta com o aumento do pH, sendo igual ao dióxido de carbono dissolvido a pH cerca de 6,3. Contudo, esta concentração de bicarbonato não tem impacto na transferência de massa do dióxido de carbono para as condições do estado pseudo-estacionário (isto é, estático ou variando lentamente o pH e a taxa de evolução do dióxido de carbono), as quais são aplicáveis durante a maioria das fermentações (Figura 1.4). A concentração de dióxido de carbono dissolvido, $[\text{CO}_2]$, poderá ajustar-se a um valor que proporcione um gradiente de concentração tal que a taxa de transferência de dióxido de carbono, CTR, será igual à taxa de produção de dióxido de carbono, CER, pelos microrganismos (Royce e Thornhill, 1991). A concentração de dióxido de carbono dissolvido dependerá do balanço da produção de dióxido de carbono e a sua remoção por transferência gasosa da fase líquida para a fase gasosa (Pirt, 1985).

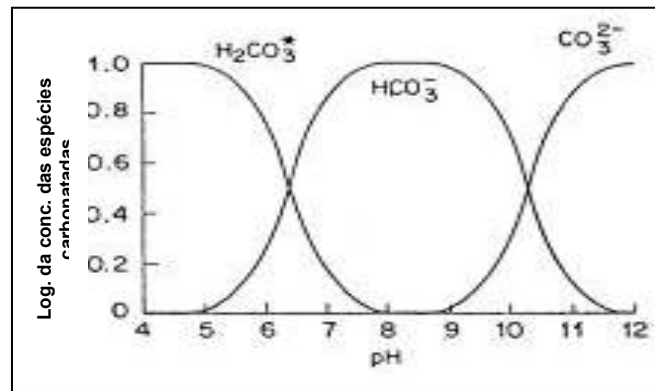


Figura 1.4 – Diagrama de distribuição das concentrações para o ácido carbônico (AWWA, 1990)

A principal resistência à transferência do dióxido de carbono através da interface gás-líquido encontra-se no filme líquido, dado que a resistência da película de gás é negligenciável (Royce e Thornhill, 1991).

1.3.3.1 Produção pelas Células

Nos processos biológicos aeróbios, verifica-se geralmente uma determinada produção de dióxido de carbono. Teoricamente, as células podem excretar dióxido de carbono e bicarbonato. Devido ao pH intracelular ser geralmente inferior a 7 e como a molécula é apolar, então pode ser transferido através da membrana celular (Noorman *et al.*, 1992; Kimura e Miller, 1996). Por sua vez a molécula de bicarbonato (HCO_3^-) tem de ser transportada activamente ou em simultâneo com outro ião que seja energeticamente menos favorável. Por isso, a excreção do dióxido de carbono é um processo mais rápido. Além do mais, é comum assumir-se que o dióxido de carbono não afecta as suas próprias excreções (Noorman *et al.*, 1992). A conversão, transferência e processo de transporte envolvendo a produção de CO_2 pelas células está esquematicamente representado na Figura 1.5.

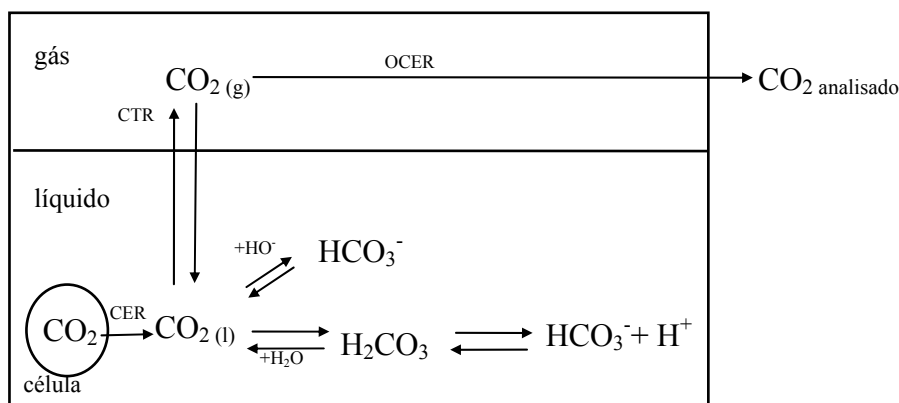


Figura 1.5 - Processo de produção de dióxido de carbono pelos microrganismos, a pH inferior a 9. (Adaptado de Noorman *et al.*, 1992; Royce, 1992, Spérandio e Paul, 1997)

1.3.3.2 Concentração de Dióxido de Carbono na Fermentação aeróbia

Para fermentações aeróbias, a transferência de massa do dióxido de carbono pode ser descrita de um modo análogo ao do oxigênio. O coeficiente de transferência de massa para o dióxido de carbono é 0,89 vezes o do oxigênio. A concentração máxima de dióxido de carbono dissolvido, como uma função da composição do gás de saída, é comparada com a concentração obtida, por se assumir o equilíbrio entre o líquido e o gás de saída. A diferença entre estas duas concentrações é tipicamente 20 a 40% da concentração de equilíbrio (Royce e Thornhill, 1991).

O dióxido de carbono dissolvido existente na solução de fermentação pode, independentemente, inibir ou promover o crescimento microbiano e a produtividade. (Royce e Thornhill, 1991) . Repaske e colaboradores, em 1974, Zadrazil, em 1975, e Gandhi e Kjaergaard, em 1975 observaram o efeito positivo no aumento da concentração do dióxido de carbono, pelo contrário Gill e Tan, em 1979 e Chen e Gutmans, em 1976 observaram um efeito inibidor na produção de biomassa devido à presença de dióxido de carbono (Comunicação para o editor, 1980, B & B vol. XXII).

Os iões bicarbonatos, cuja concentração durante a fermentação depende (no estado de equilíbrio) da concentração do dióxido de carbono dissolvido e do valor de pH, podem inibir ou promover o crescimento microbiano e a (re)produção independente do dióxido de carbono dissolvido (Royce e Thornhill, 1991 citando Repaske *et al*, 1974).

Os resultados de Dagley e Hinshelwood, em 1938, mostraram que a relação entre a taxa de crescimento bacteriano e a pressão parcial de dióxido de carbono ($PpCO_2$) é hiperbólica. Para a espécie *Klebsiella aerogenes* a $\mu_{max}/2$ verifica-se à $PpCO_2$ de 3×10^{-4} atm, ou seja à pressão parcial do dióxido de carbono no ar a 1 atm, e a respectiva taxa máxima de crescimento ocorre a uma $PpCO_2$ de 10^{-3} atm (Pirt, 1985).

Pirt (1985), relata também as experiências de Lwoff e Monod (1947) que mostraram que a taxa de crescimento da *Escherichia coli* num meio mineral de glucose é substancialmente diminuída para $PpCO_2 = 3 \times 10^{-5}$ atm, podendo este efeito ser contrariado pela adição, a 10^{-4} M, de glutamato, succinato, asparagina ou glutamato, sendo este último, o mais eficiente.

Wimpenny, em 1969, sugeriu que a $PpCO_2$ pode ser crítica para outras funções microbianas além do crescimento mas, em geral, as evidências desses efeitos não se mostraram convincentes (Pirt, 1985).

Rozich e Gaudy (1992) apresentaram um caso de inibição por dióxido de carbono cujo efeito tóxico inibiu a capacidade da biomassa para degradar as águas residuais. A estação de tratamento em causa, por razões económicas do processo, dado que a geração de oxigénio puro é dispendiosa, mantém o reactor de lamas activadas coberto por forma a manter uma concentração de oxigénio relativamente alta. Cobrindo os reactores significa também que o dióxido de carbono pode acumular-se no espaço superior do reactor, acima do nível do líquido, contribuindo igualmente para um aumento da sua concentração no líquido. Um estudo realizado na ETAR de Patapsco, em Baltimore, Maryland, por Martin, em 1988, demonstrou efeitos adversos de inibição pelo dióxido de carbono, nas cinéticas que avaliam a capacidade da biomassa em remover CQO. Outros testes auxiliares foram realizados para validar aquela observação, em grande parte devida aos níveis de dióxido de carbono nas lamas activadas e não atribuído à diminuição do pH, a qual resultou também da acumulação do dióxido de carbono (Rozich e Gaudy, 1992).

1.3.3.3 Determinação do Dióxido de Carbono para Avaliação da Actividade Metabólica dos Microrganismos

A concentração de dióxido de carbono dissolvido é importante na determinação da produtividade de uma fermentação, sendo em alguns casos tão importante como a concentração de oxigénio dissolvido (Royce e Thornhill, 1991 citando Nyiri e Lengyel, 1968). Uma vez que há uma ligação directa entre o consumo de oxigénio e a produção de dióxido de carbono, a medição da taxa de produção de dióxido de carbono (CER) pode ser também um bom indicador da actividade metabólica e uma forma para o cálculo de parâmetros cinéticos em várias condições (Spérandior e Paul, 1997).

A taxa de produção de dióxido de carbono pelas bactérias reflecte uma série completa de reacções bioquímicas, as quais constituem o processo de respiração dos organismos. A inibição deste processo altera a quantidade de dióxido de carbono produzido que se encontra no meio de cultura aquoso. (Jardim, 1990)

Alguns autores seguem a evolução da actividade microbiana através da taxa de produção do dióxido de carbono, seja analisando a fase líquida (Jardim, 1990), ou a fase gasosa (Buitrón, 1992). Existem, contudo, alguns factores que afectam a evolução da quantidade de dióxido de carbono, podendo conduzir a interpretações incorrectas. Estas perturbações não reflectem variações reais na taxa de evolução do dióxido de carbono microbiano, mas apenas efeitos físicos (Royce, 1992).

O equilíbrio dinâmico do dióxido de carbono num sistema de fermentação aquosa é afectado pelo pH e pela pressão. Um aumento de pH, ou de pressão, resulta numa descida repentina e momentânea da concentração de dióxido de carbono e vice versa (Yegneswaran *et al.*, 1990).

1.3.3.4 Quociente de Respiração

A taxa volumétrica de produção de dióxido de carbono (CER) quando combinada com a taxa de consumo de oxigénio (OUR) permite a determinação do quociente de respiração (QR). Este parâmetro, definido como a razão entre o CER e o OUR, pode fornecer informação importante ao nível do metabolismo da cultura (Yegneswaran *et al.*, 1990). Quando acompanhado em tempo real, uma alteração no seu valor durante uma fermentação, indica uma provável alteração ao nível das vias metabólicas (Ferreira *et al.*, 1998).

Govind e colaboradores (1997) mediram, durante a biodegradação de fenol os parâmetros OUR e CER. Inicialmente o OUR é devido à biodegradação aeróbia do fenol, resultando na formação de dióxido de carbono e crescimento de biomassa, e o valor de QR é praticamente 1 (Govind *et al.*, 1997, Ferreira *et al.*, 1998). Neste caso, a degradação primária e a mineralização (degradação última) são iguais (Govind *et al.*, 1997). A partir do valor máximo do OUR, verifica-se um consumo de oxigénio mais lento, principalmente devido à degradação da biomassa e dos produtos metabólicos, ocorrendo o aumento de QR ($QR > 1$) (Govind *et al.*, 1997).

Em geral, se o produto formado é bastante mais reduzido do que o substrato, o valor de QR com formação de produto, será superior ao seu valor na ausência de formação de produto. Por outro lado, se o produto fôr mais oxidado do que o substrato, o valor de QR será mais baixo (Ferreira *et al.*, 1998).

2. OBJECTIVO

O presente trabalho teve por objectivo verificar a influência do dióxido de carbono nos processos de biodegradação, em particular nas condições em que funciona o reactor “Fed-Batch” Proporcional. Ou seja, num tipo de reactor em que a taxa de alimentação é função da pressão provocada pela acumulação dióxido de carbono produzido no decurso da degradação aeróbia de um composto orgânico, no presente caso, acetato de sódio.

3. PLANO EXPERIMENTAL

Para determinar a possível influência do dióxido de carbono que se acumula no reactor “Fed-batch” Proporcional (reactor fechado), devido ao aumento da respectiva pressão durante os testes de biodegradabilidade, realizaram-se ensaios com dois tipos de reactores: reactor “Fed-batch” Proporcional (fechado), designado por “F”, e reactor “Fed-batch” Aberto, “R”. O reactor **F** foi o primeiro a ser inicializado. Este reactor permite a adição de substrato através da acumulação dos produtos gasosos libertados no decurso da actividade dos microrganismos - CO₂. Em paralelo, desfasado no tempo em cerca de uma hora e meia, reproduz-se o mesmo ensaio, ou seja, nas mesmas condições iniciais, num reactor geometricamente semelhante, mas aberto (à pressão atmosférica), designado por **R**. Neste reactor a alimentação é realizada por meio de uma bomba peristáltica à mesma taxa de alimentação ocorrida no reactor **F**. Esta taxa de alimentação é reajustada ao longo do ensaio com a informação recolhida no reactor **F**, razão pela qual o reactor aberto é desfasado no tempo.

Os ensaios realizados pretenderam estudar diferentes condições iniciais, isto é, diferentes gamas de concentração de biomassa e diferentes concentrações do substrato a biodegradar.

Nos Quadros 3.1 e 3.2 e na Figura 3.1 mostram-se as condições iniciais dos ensaios realizados.

Numa segunda fase, pretendeu-se despistar a hipótese de uma possível influência provocada pelo aumento dos iões bicarbonato, através de um ensaio “batch”.

O dióxido de carbono produzido pelos microrganismos acumula-se na fase gasosa na forma de CO₂ e na fase líquida na forma de CO₂ livre e HCO₃⁻. Para determinar a influência dos bicarbonatos realizou-se um ensaio com dois reactores “batch” paralelos abertos, com as mesmas condições iniciais, à excepção de um incremento de 500 mg/L de alcalinidade (expressa em CaCO₃) em iões bicarbonato, no reactor designado por **β**, em oposição ao reactor **α**, onde não foi adicionada qualquer outra substância. A solução alcalina utilizada era constituída por bicarbonato de sódio. O Quadro 3.3 resume as condições iniciais destes ensaios.

A biomassa utilizada nestes ensaios proveio de dois inóculos: A e B.

Quadro 3.1 - Resumo dos Ensaios “Fed-batch”

Quantidade inicial de biomassa (X_o)	Concentração da solução de alimentação ([SAL])		
	6g ac. acético/L	8g ac. acético /L	12g ac. acético /L
$X_o < 1000\text{mg}$	7, 10		8, 9, 11
$1000 < X_o < 2000\text{mg}$	2, 6		1, 3, 5
$X_o > 2000\text{mg}$		4	

Quadro 3.2 - Condições Iniciais dos ensaios “Fed-batch”

Ensaio	[SAL]	[So]	[Xo]	So/Xo	Inóculo
	g ac. acético /L	mg ac. acético /L	mg SSV/L	mg ac. acético/mg SSV	
F1	12,113	810	1843	0,44	A _c
R1	12,302	248	1719	0,14	A _c
F2	5,535	367	1433	0,26	A _c
R2	5,535	318	1407	0,23	A _c
F3	12,859	315	1033	0,30	A _l
R3	12,859	270	989	0,27	A _l
F4	8,086	313	2254	0,14	B
R4	8,086	297	2098	0,14	B
F5	12,703	314	1208	0,26	B
R5	12,703	411	1253	0,33	B
F6	6,053	304	1161	0,26	B
R6	6,053	315	1281	0,25	B
F7	5,752	327	641	0,51	B
R7	5,752	320	604	0,53	B
F8	12,148	310	676	0,46	B
R8	12,148	312	667	0,47	B
F9	11,769	302	617	0,49	B
R9	11,769	307	595	0,52	B
F10	5,898	296	589	0,50	B
R10	5,898	314	585	0,54	B
F11	11,404	297	583	0,51	B
R11	11,404	293	609	0,48	B

A_c inóculo com aproximadamente 21 dias de aclimação e congelado

A_l inóculo nas mesmas condições de aclimação que A_c, embora tendo sido liofilizado

B biomassa cuja aclimação durou 15 dias, sendo conservada por congelamento

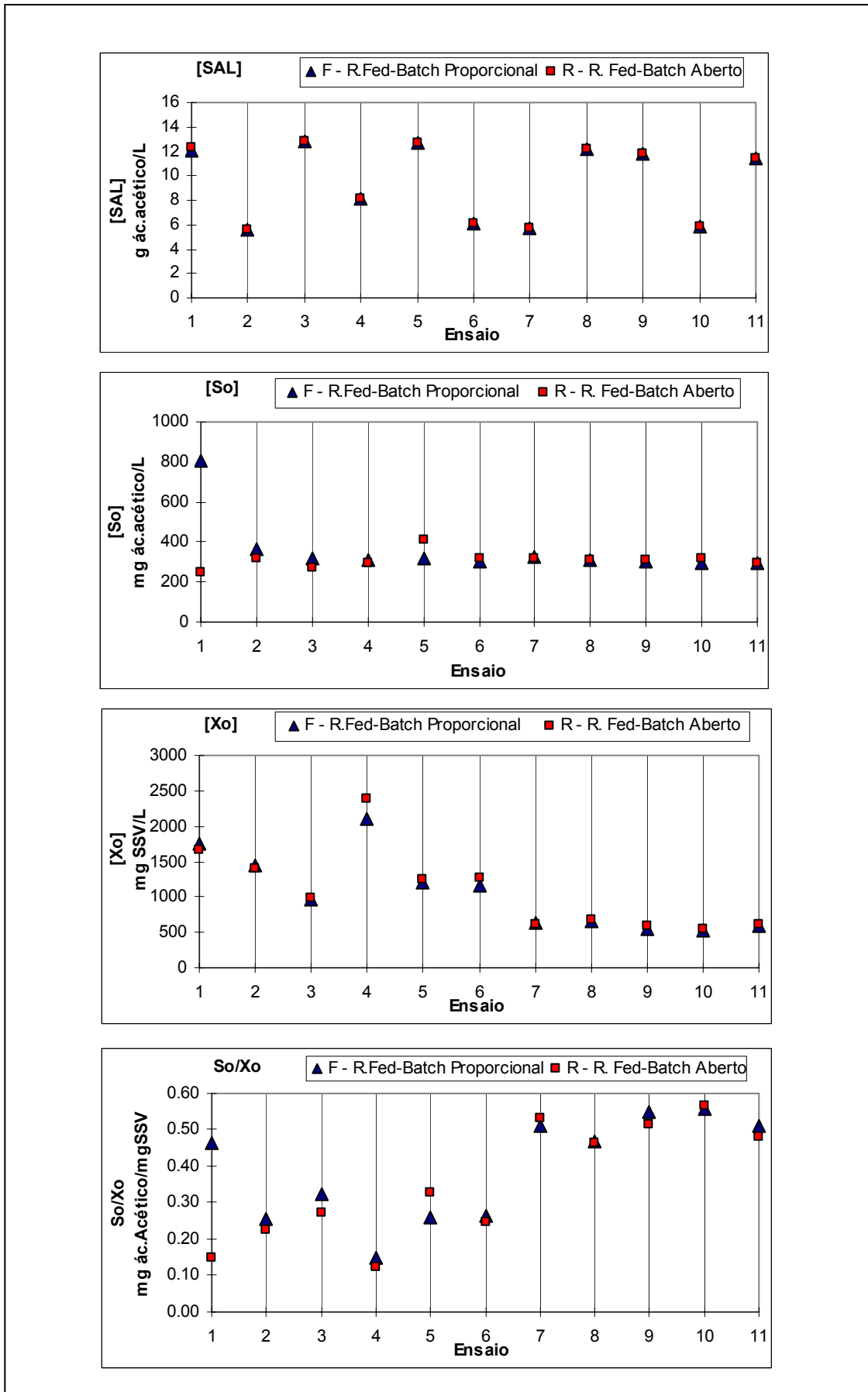


Figura 3. 1 - Condições Iniciais dos ensaios “Fed-batch” realizados no estudo

Quadro 3.3 - Estudo da influência dos bicarbonatos - condições iniciais dos ensaios

Ensaio	[So]	[Xo]	So/Xo	Alcalinidade adicionada	Inoculo
	mg ac. acético/L	mg SSV/L	mg ac. acético/mg SSV	mg CaCO ₃ /L	
α	2317	1445	1,60	0	B
β	2470	1569	1,57	500	B

B biomassa cuja a aclimação durou 15 dias sendo conservada por congelação

Optou-se por não realizar ensaios com gamas de biomassa mais elevadas, uma vez que seria expectável uma maior produção de dióxido de carbono, o que levaria a que os ensaios decorressem num tempo muito curto, pois rapidamente se atingiria o limite de funcionamento do ensaio “Fed-batch” Proporcional, isto é, os 22 centímetros de coluna de líquido, o que não permitiria a obtenção de dados suficientes.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 PRODUÇÃO DE INÓCULOS

Com base na experiência já existente no Laboratório de Sistemas de Tratamento da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa (FCT/UNL) relativamente à produção e manutenção de inóculos para posterior utilização em ensaios de biodegradabilidade, procedeu-se à aclimação e produção de novos inóculos a partir de lamas biológicas de uma Estação de Tratamento de Águas Residuais Domésticas pelo sistema de lamas activadas. Com efeito, era necessário garantir, nesta fase de desenvolvimento dos trabalhos, uma quantidade suficiente de biomassa para realização dos ensaios deste estudo.

O processo de aclimação consistiu basicamente nas seguintes etapas: as lamas provenientes da recirculação de lamas da ETAR de Montelavar, foram arejadas e seguidamente crivadas por uma malha de 75 μm . Após a decantação do crivado, uma parte das lamas resultantes foram aclimatadas com acetato de sódio em sistema semi-contínuo.

A produção de inóculos caracterizou-se por um período de arejamento (t_a) de 22 horas, seguido de um período de decantação (t_s) de 2 horas após o qual se retirava o sobrenadante e se adicionava nova solução de alimentação, perfazendo o volume. A população mista adaptada cresceu a uma concentração de carbono de 1000 mg/L.

Este procedimento foi realizado por duas vezes. Para um primeiro inóculo, a biomassa esteve durante 21 dias no sistema semi-contínuo, ao fim dos quais uma parte da biomassa foi congelada e a restante foi liofilizada. Estes inóculos foram designados de A_c (congelado) e A_l (liofilizado). Uma segunda aclimação, que durou 15 dias em sistema semi-contínuo com características semelhantes às anteriormente apresentadas, foi designada por B.

Durante a aclimação e produção de inóculos analisou-se a concentração de substrato (acetato de sódio) por Cromatografia Líquida de Alta Pressão (HPLC - *High Pressure Liquid Chromatography*) determinando o ácido acético em solução e a concentração de Sólidos Suspensos Totais (SST) e de Sólidos Suspensos Voláteis (SSV), através do método

gravimétrico e por leitura da densidade óptica. Os SSV correspondem a uma medida directa da biomassa.

4.2 MEIO DE CULTURA

A composição do meio de cultura foi semelhante em todas as fases deste estudo (produção de inóculos, ensaios de biodegradabilidade), variando unicamente a concentração em que os seus constituintes se encontravam.

O meio mineral utilizado resultou de ensaios anteriormente realizados no laboratório (Sequeira e Santana, 2002) sendo adaptado a partir da composição do meio mineral segundo Dang e colaboradores (1989). De modo a garantir que a única fonte de carbono disponível era o acetato de sódio, retirou-se da composição do referido meio o extracto de levedura. Enriqueceu-se este meio base com uma solução de oligoelementos de composição semelhante à do meio mineral descrito na Norma AFNOR T 90-306 (Ensaio de biodegradabilidade “última” - Método por análise do CO₂ libertado). Este é um meio normalmente usado em testes de degradação, composto por tampões de fosfato, azoto, e fósforo e outros compostos minerais, que consta igualmente da Portaria n.º 732-A/96 de 11 de Dezembro, que aprova o Regulamento para a Notificação de Substâncias Químicas e para Classificação, Embalagem e Rotulagem de Substâncias Perigosas.

Assim, a fonte de carbono e energia era fornecida através da solução de acetato de sódio. Com o objectivo de garantir que não havia limitações de nutrientes, adicionava-se ao meio de cultura uma solução de cloreto de amónia, para fornecer azoto. Na solução de alimentação garantia-se uma razão C/N de 20 recomendada, para processos aeróbios (Casey, 1997 citando Pipes, 1979).

O Quadro 4.1 apresenta a composição do meio mineral e das fontes de carbono e azoto.

Quadro 4.1 - Composição do meio de mineral e das fontes de carbono e azoto (Sequeira e Santana, 2002)

Composição	Concentração da solução mãe (g/L)	Volume de preparação da solução de alimentação base (5gC/L) (mL)
MEIO MINERAL		
Sol. Tampão		50
KH_2PO_4	8,500	
K_2HPO_2	21,750	
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	33,400	
NH_4Cl	1,700	
Sol. Sulfato de Magnésio heptahidratado		5
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	22,500	
Sol. Cloreto de Cálcio anidro		5
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	36,430	
Sol. Cloreto Férrico hexahidratado		5
$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,250	
Sol. Oligoelementos		5
$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0,040	
H_3BO_3	0,060	
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,040	
$\text{C}_{10}\text{H}_{12}\text{FeN}_2\text{NaO}_8 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$	0,032	
(quelato de ferro) ^a	0,100	
FONTE DE AZOTO		
Sol. Cloreto de amónia (20g N/l)		12,5
NH_4Cl	76,410	
FONTE DE CARBONO		
Sol. Acetato de sódio (20g C/l)		250
$\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2\text{Na} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$	113,400	

^a Esta solução é obtida por mistura de 0,0555g de EDTA sal dissódico ($\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{Na}_2\text{O}_8 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$) e 0,0445g de Cloreto Férrico ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)

O meio de cultura utilizado tinha uma composição correspondente à solução de alimentação base, cuja concentração em carbono era de 5 g/L (teoricamente 12,5 g/L, expresso em ácido acético). Outras concentrações utilizadas resultaram de diluições da solução de alimentação base.

4.3 REACTOR “FED-BATCH” PROPORCIONAL

4.3.1 DESCRIÇÃO

O reactor “Fed-batch” com alimentação proporcional é constituído essencialmente por duas partes. Uma parte cilíndrica inferior com um volume de aproximadamente 1,8 L (12 cm de diâmetro por 16 cm de altura) correspondente ao corpo do reactor, onde decorrem as reacções de biodegradação. A outra parte é constituída por um par de colunas que formam o sistema de alimentação, estando ligadas ao corpo do reactor pelo topo deste.

No corpo do reactor, além da ligação com o sistema de alimentação dispunha-se de três aberturas para sensores (de temperatura, de pH, e de oxigénio dissolvido), um septo para recolha de amostras na fase líquida, outro para recolha de amostras na fase gasosa e a ligação com a linha de gás. O reactor era totalmente em vidro, sendo a ligação das duas partes efectuada por uma rosca dupla com vedante em PTFE no seu interior. A agitação do meio líquido era conseguida e controlada através de uma placa de agitação magnética colocada sob o corpo do reactor.

O fornecimento de oxigénio, pela adição de peróxido de hidrogénio, foi realizado umas vezes por meio de bomba peristáltica e outras por meio de um sistema semelhante ao que é utilizado para controlo de adição de soro, funcionando por gravidade.

O sistema de alimentação constituído por duas colunas cilíndricas ligadas entre si por um braço nas suas extremidades inferiores tinha uma capacidade de 200 mL. As duas colunas funcionam entre si por um sistema de vasos comunicantes.

A Figura 4.1 representa o Reactor “Fed-batch” Proporcional (Fechado) utilizado nos ensaios de biodegradabilidade.

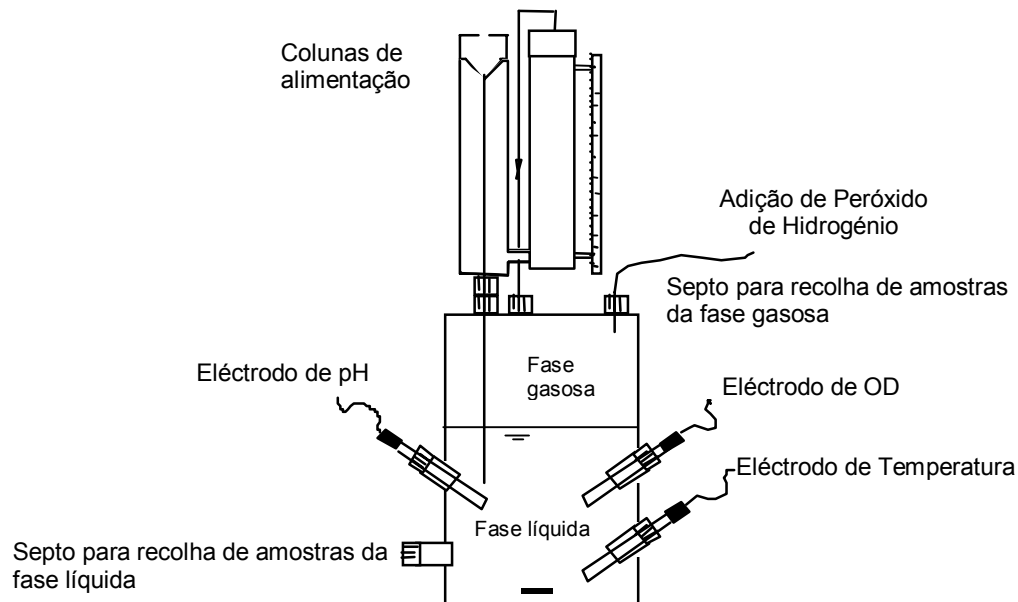


Figura 4.1 - Esquema do Reactor “Fed-batch” Proporcional (Reactor Fechado)

A coluna que liga directamente ao corpo do reactor é aberta em ambas as extremidades, sendo de vidro roscado na extremidade inferior, permitindo a ligação através de uma rosca dupla (“Schott” 18 mm de diâmetro interno). A passagem da solução de alimentação das colunas para o corpo do reactor era conseguida através de um tubo de descarga de 7 mm de diâmetro, com rasgos laterais na parte superior, para facilitar a entrada da solução de alimentação.

O equilíbrio do interior do reactor com a pressão atmosférica era obtido através desta coluna, aberta no topo e ligando ao interior do reactor pelo tubo de descarga.

A segunda coluna do sistema de alimentação era fechada e possui uma escala lateral graduada em centímetros, permitindo fazer a leitura do nível de líquido (solução de alimentação) deslocado no seu interior. Na extremidade superior desta coluna era efectuada a ligação à fase gasosa do corpo do reactor.

O volume descarregado por cada centímetro de solução nas colunas era de 8 mL. Funcionando com um volume da fase líquida de 1000 mL, a fase gasosa ocupava 850 mL.

Dadas as variações que podiam ocorrer no volume da fase gasosa, os ensaios foram efectuados a temperatura constante. Para garantir a temperatura no interior do reactor, as colunas do sistema de alimentação e o corpo do reactor possuíam dupla camisa para circulação de água. O controlo da temperatura era obtido por meio de um banho termostaticado (Frigitem-6000382 Selecta). Adicionalmente, de modo a minimizar os efeitos da variação da temperatura os ensaios de biodegradabilidade foram realizados numa sala climatizada.

4.3.2 ENSAIOS DE TRAÇAGEM

Com o objectivo de verificar se o reactor “Fed-batch” Proporcional garantia mistura completa e instantânea do substrato, realizaram-se ensaios de traçagem com acetato de sódio, de modo a verificar se a quantidade de traçador no reactor (teórica) correspondia à quantidade de traçador medido (experimental).

Este ensaio consistiu em introduzir no reactor um litro de água destilada, sem inóculo, e encher as colunas com solução de alimentação de concentração conhecida. O reactor era fechado e simulava-se a produção de CO₂ através da injeção de ar na fase líquida por meio de uma agulha com ajuda de uma bomba peristáltica. Colhiam-se amostras da fase líquida para determinar a concentração de acetato e lia-se o nível de líquido deslocado na escala graduada.

Dado que já se conhecia o comportamento de mistura deste reactor, resultantes de trabalhos anteriores, realizou-se apenas um ensaio de traçagem. Os resultados do ensaio de traçagem encontram-se na Quadro I.1 no Anexo I, assim como os gráficos que melhor ilustram as características de mistura do reactor “Fed-batch” Proporcional utilizado no desenvolvimento deste trabalho. Através da observação destes gráficos (Figura I.1, no Anexo I) é possível verificar que a mistura da solução de alimentação na solução no reactor é completa e praticamente instantânea até aos 18 cm na coluna de medição do nível, apresentando um ligeiro desvio, insignificante, até se atingir o valor máximo de 22 cm.

4.4. MODO OPERATÓRIO

Para a realização de cada ensaio era efectuada a ressuspensão prévia da biomassa (três dias antes), que se encontrava conservada a -18°C , ou liofilizada. Este procedimento era realizado num sistema semi-contínuo operado nas seguintes condições: $V=1400\text{ mL}$, $t_a=22\text{ h}$, $t_s=2\text{ h}$ e com uma concentração de carbono de 1 g/L .

No dia do ensaio, após 1 h de decantação, ressuspendia-se a biomassa concentrada em 1800 mL de água destilada que era repartida por dois copos e colocada a arejar durante 30 minutos, após o que se media a taxa de respiração endógena. A biomassa colocada em cada copo correspondia à biomassa utilizada no Reactor “Fed-batch” Proporcional (Reactor Fechado) e no Reactor “Fed-batch” Aberto. A quantidade de biomassa era ajustada por determinação de SSV, por leitura da densidade óptica.

Em cada reactor, aos 900 mL de biomassa ressuspendida adicionavam-se 40 mL de Solução Tampão e 25 mL de Solução de Alimentação, perfazendo com água destilada até 1 L, correspondendo às condições iniciais de ensaio no que diz respeito à biomassa e substrato (S_0/X_0).

Nas colunas de alimentação era previamente colocada a Solução de Alimentação, para permitir ajustar-se à temperatura de realização do ensaio ($\pm 20^{\circ}\text{C}$).

Antes de se proceder ao fecho do reactor retirava-se uma amostra de 45 mL da fase líquida para determinação de SSV, por gravimetria e densidade óptica, da concentração de substrato por HPLC e da Alcalinidade por colorimetria. Retirava-se ainda uma amostra de gás para análise da sua composição por GC (Cromatografia Gasosa). Inseridos no reactor estavam os eléctrodos específicos de Temperatura, Oxigénio Dissolvido e pH. Ao longo do ensaio foram recolhidas amostras da fase líquida ($v = 4$ mL) para determinação de SSV e concentração de substrato em ácido acético, por HPLC, e uma amostra da fase gasosa ($v = 0,5$ mL), apenas no reactor “Fed-batch” Proporcional, para determinar a composição do gás, por GC. Após retirar cada amostra da fase líquida repunha-se o mesmo volume com água destilada. Regularmente, e sempre que se retiravam amostras, era medida a Taxa de Consumo de Oxigénio (OUR-“Oxygen Consumption Rate”).

O funcionamento do reactor “Fed-batch” Proporcional decorria da acumulação de gás resultante da respiração dos microrganismos, que provocava um aumento de pressão no reactor, fazendo deslocar o líquido na primeira coluna e implicando na segunda um deslocamento de substrato para a zona de reacção.

Para fornecer oxigénio aos microrganismos era adicionado peróxido de hidrogénio (H_2O_2), sendo contabilizado o volume adicionado.

O Reactor Aberto funcionava com um desfasamento no tempo, relativamente ao reactor Fechado de 1 h e 30 minutos, de modo a simular-se a taxa de adição de substrato que se havia verificado no Reactor “Fed-batch” Proporcional imposta pela actividade dos microrganismos. A alimentação era realizada por meio de bomba peristáltica, com ajustamento de caudal horário para simular o mais próximo possível o Reactor “Fed-batch” Proporcional. O peróxido de hidrogénio adicionado ao Reactor “Fed-batch” Aberto era efectuado de acordo com as necessidades de oxigénio deste reactor.

Estes ensaios (Reactor “Fed-batch” Proporcional e Reactor Aberto “Fed-batch”) foram realizados nas mesmas condições de biomassa (concentração inicial e fase de crescimento), solução de alimentação e de taxa de adição de substrato.

4.5 MÉTODOS DE ANÁLISE

Durante os ensaios de biodegradabilidade analisavam-se as fases líquida e gasosa. Na fase líquida eram analisados os SST, SSV (por gravimetria e densidade óptica) e a concentração de substrato em ácido acético (por HPLC) ao longo do ensaio, para além da Alcalinidade (método colorimétrico) no início e no fim do ensaio.

4.5.1 FASE LÍQUIDA

Para análise da fase líquida era retirada uma amostra de 45 ml no início e no fim do ensaio e 4 mL de hora a hora. Às amostras eram adicionadas gotas de formaldeído, para bloquear o crescimento celular.

Para determinar a concentração de ácido acético, a amostra era filtrada por uma membrana com uma porosidade de 0,2µm, sendo depois analisada em cromatografia líquida de alta pressão (HPLC) “Merck-Hitachi L4250” equipado com detector UV-VIS e uma coluna “Polyspher OA HY”, nas seguintes condições:

Eluente:	H ₂ SO ₄ a 0,01 N
Caudal	0,800 mL/min
Comprimento de onda	210 nm
Temperatura do forno	40 °C
Pressão	2 bar

A concentração de biomassa era avaliada através da análise dos Sólidos Suspensos Voláteis. Os Sólidos Suspensos Totais (SST) e os Sólidos Suspensos Voláteis (SSV), no início e no fim do ensaio eram analisados usando o procedimento descrito em “Standard Methods” (APHA, 1998), utilizando um volume de amostra de 10 mL.

A determinação dos SST era obtida por filtração da amostra em filtros GF/C da “Whatman”, previamente tarados, seguida de secagem a 105 °C.

A quantificação de SSV era efectuada por perda de massa, obtida através da calcinação a 550 °C da matéria seca.

Em alternativa, e de modo a determinar a biomassa através dos SSV durante o ensaio era usado outro método, para o qual o volume de amostra necessário era menor. Este método consistia na leitura da densidade óptica das amostras a um comprimento de onda de 540 nm (Grady Jr., 1985). Os valores obtidos eram traduzidos em SSV através de curva de calibração previamente calculada.

Realizava-se o registo em contínuo de oxigénio dissolvido (OD) na fase líquida, por meio de uma sonda de oxigénio ligada a um aparelho que permitia determinar a Taxa de Consumo de Oxigénio (OUR- “Oxygen Consumption Rate”) ao longo do ensaio (“Viltadini OUR test”). O OUR era determinado durante 5 minutos, sendo interrompida a adição de peróxido de hidrogénio.

Antes de adicionar a solução de alimentação (*So*) e a solução tampão era determinada a Taxa de Consumo de Oxigénio, designando-se este valor pelo *OUR_{end}* (Taxa de Consumo de Oxigénio da fase endógena).

A Taxa de Consumo de Oxigénio Específica (*OUR_E*) corresponde à Taxa de Consumo de Oxigénio medida por unidade massa de microrganismos (ou seja, SSV) presentes aquando da medição do *OUR*.

Através de eléctrodos específicos efectuava-se o registo contínuo do valor de pH e da Temperatura utilizando o método potenciométrico (ORION 720 SA).

A determinação da Alcalinidade era efectuada pelo método colorimétrico, como descrito no “Standard Methods” (APHA, 1998), utilizando 20 mL de amostra da fracção dissolvida, após separação por filtração em GF/C. O titulante utilizado era o ácido sulfúrico com uma concentração de 0,02 N e o indicador é o alaranjado metilo.

A determinação de peróxido de hidrogénio residual não foi realizada, uma vez que no âmbito de outros trabalhos de investigação se verificou que este oxidante se dissociava completamente, segundo a equação estequiométrica:



4.5.2 FASE GASOSA

A composição da fase gasosa era avaliada hora a hora em percentagem de N_2 , O_2 e CO_2 . Recolhia-se uma amostra de 0,5 mL que era analisado por Cromatografia Gasosa (GC) (“Shimadzu Gas Chromatograph GC-14A”). Era utilizado um programa de temperatura que mantinha durante os primeiros 6 minutos a temperatura a 35 °C, aumentando depois até aos 90 °C a uma taxa de 15 °C/min. O tempo total de análise era de 20 minutos.

Através da medição do nível do líquido no tubo de descarga obtinha-se o valor da pressão parcial do dióxido de carbono (PpCO_2).

4.5 MÉTODOS DE CÁLCULO

4.5.1 CÁLCULO DOS COEFICIENTES CINÉTICOS μ , q , E Y

O formalismo cinético de Monod é o mais frequentemente usado, o qual relaciona o crescimento de biomassa com a remoção e concentração de substrato removido (Pitter e Chudoba, 1990), ou seja,

$$\mu = \mu_{max} \frac{[S]}{K_S + [S]} \quad \text{e} \quad q = q_{max} \frac{[S]}{K_S + [S]} \quad (4.2)$$

onde μ_{max} é a taxa específica máxima de crescimento, q_{max} a taxa específica máxima de consumo de substrato, $[S]$ a concentração de substrato, K_S a constante de saturação numericamente igual à concentração correspondente a $\mu = \mu_{max}/2$.

As constantes cinéticas envolvidos na equação de Monod podem ser determinadas por avaliações de biodegradabilidade em reactores “Fed-batch”. Para descrever o processo deste reactor são necessárias três relações - equações de balanço para a biomassa, para o substrato limitante e uma para o volume da cultura (Esener *et al.*, 1981).

Muitas vezes, não são significativas as variações de volume (Philbrook e Grady Jr., 1985; Templeton e Grady Jr., 1988), permitindo um rearranjo das equações de balanço, ignorando a variação de volume. É também possível evitar a equação de volume se se considerar a quantidade total de substrato e biomassa em vez da utilização das suas concentrações. Neste caso, duas equações de estado são suficientes para descrever o sistema:

$$X = V[X] \quad (4.3)$$

$$S = V[S] \quad (4.4)$$

onde V é o volume de cultura, $[X]$ a concentração de biomassa, e $[S]$ a concentração do substrato limitante. X e S são a quantidade de biomassa e de substrato, respectivamente.

A equação de balanço para a biomassa é dada pela seguinte equação:

$$\frac{dX}{dt} = R_X = \mu V[X] \quad (4.5)$$

onde R_X é a taxa de produção de biomassa, assumindo-se que é função da concentração do substrato limitante e μ é a taxa de crescimento específica, que conseqüentemente é uma função da concentração do substrato limitante (Esener *et al.*, 1981).

O balanço para o substrato limitante pode ser expresso pela expressão 4.6:

$$\frac{dS}{dt} = F(t) - R_S = F[SAL] - qV[X] \quad (4.6)$$

onde $F(t)$ é a taxa de alimentação do ensaio, R_S a taxa de consumo de substrato, F o caudal de alimentação do reactor durante o ensaio, $[SAL]$ concentração do substrato na solução de alimentação, e q a taxa específica de remoção/consumo de substrato.

A taxa específica de consumo de substrato (q) está relacionada com a taxa específica de crescimento (μ) através da expressão (Pitter e Chudoba, 1990):

$$q = \frac{\mu}{Y_{X/S}} \quad (4.7)$$

onde $Y_{X/S}$ é o coeficiente do rendimento celular do substrato.

4.5.2 DETERMINAÇÃO DE μ_{obs} , $Y_{X/S obs}$, $q_{obs}/TCEA$

O valor da taxa específica de crescimento observada (μ_{obs}), de acordo com a equação 4.5, corresponde ao declive da recta obtida entre o logaritmo dos SSV (X) em função do tempo. Se as determinações da quantidade de biomassa forem efectuadas durante a fase exponencial, o mesmo procedimento permite obter o coeficiente μ_{max} de acordo com a equação de Monod (equação 4.1), desde que $S \gg K_s$.

Os valores da taxa de consumo específico observado foram determinadas por dois caminhos distintos: o primeiro pela razão entre os coeficientes cinético μ_{obs} e $Y_{X/S obs}$ de acordo com a equação 4.7 (q_{obs}) e, o segundo com base na diferença entre a taxa mássica de substrato que alimenta o reactor e o aumento linear da quantidade de substrato no meio de cultura no reactor (4.8). Neste último caso, designou-se o parâmetro por TCEA – taxa de consumo específico de acetato, sendo TCA a taxa de consumo de substrato (acetato).

$$CA_i = A_{i-1} + Aad_i - A_i \quad (4.8)$$

onde: CA_i - Consumo de substrato (acetato) durante o intervalo de tempo $t_i - t_{i-1}$; A_i - Substrato medido no reactor no tempo i ; Aad_i - Substrato (acetato) adicionado durante o intervalo de tempo $t_i - t_{i-1}$.

O consumo específico de substrato (acetato) (CEA) durante o tempo $t_i - t_{i-1}$, corresponde ao consumo de substrato (acetato) ocorrido nesse período de tempo por unidade de massa de SSV, considerando o valor médio deste parâmetro durante o período de tempo em causa.

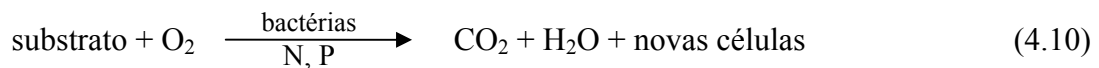
O consumo de substrato (acetato) foi também calculado em função do tempo inicial t_0 , ou seja $t_{i-1} = t_0$, sendo designados por CAM e CEAm.

Para o cálculo do rendimento celular utilizou-se o método descrito por Patkar e Seo (1992), que consiste na determinação da derivada de primeira ordem da equação 4.9, que resulta no declive da regressão linear do gráfico da massa celular em função da quantidade de substrato consumido.

$$Y_{X/S} = -\frac{(d/dt).([X]V)}{F[SAL] - (d/dt).([S]V)} = -\frac{F[X] + V(d[X]/dt)}{F([SAL] - [S]) - V(d[S]/dt)} \quad (4.9)$$

4.5.3 CÁLCULO DA PRODUÇÃO TOTAL DE DIÓXIDO DE CARBONO

A biodegradabilidade pode ser quantificada de acordo com a diminuição dos compostos de reacção, na equação estequiométrica - substrato, oxigénio, ou através da formação de produtos, na equação estequiométrica - dióxido de carbono, biomassa (Pitter e Chudoba, 1990).



4.5.3.1 Equilíbrio Químico do Dióxido de Carbono - Descrição do Sistema

O dióxido de carbono pode envolver-se em inúmeras transformações químicas. Estas transformações, que foram sintetizadas por Kern, em 1960, podem ser representadas pelas reacções reversíveis que a seguir se apresentam, assim como a respectiva constante de equilíbrio (definida em água pura com uma diluição infinita, com coeficiente de actividade igual a 1) (Noorman *et al.*, 1992):



O equilíbrio de hidratação (1a) estabiliza muito lentamente, contudo o equilíbrio de formação do bicarbonato (1b) é quase instantâneo. Portanto, a combinação dos dois é permitida, resultando:

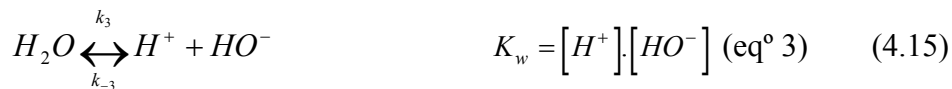


em que $K_1(20^\circ C) = 4,26 \times 10^{-7} \text{ mol/L} \Rightarrow pK_1 = 6,37$.

Em simultâneo, tem lugar a reacção directa do dióxido de carbono com o ião hidróxilo:



O equilíbrio de dissociação da água deve também ser considerado:



A desprotonação do bicarbonato, produzindo carbonato, a reacção do dióxido de carbono com a amónia para formar carbonato são outras possibilidades de reacções que devem ser consideradas, mas estas consomem uma quantidade de carbono reduzida a pH inferior a 9 (Noorman et al, 1992; Spérandio e Paul, 1997). Dado que os valores de pH durante as condições de operação do reactor “Fed-batch” foram sempre inferiores a 9, não foram considerados estes processos nos balanços do dióxido de carbono e do bicarbonato.

4.5.3.2 Estimativa da Quantidade Total do Dióxido de Carbono Produzido

A quantidade total instantânea de carbono inorgânico, expresso em CO_2 , foi estimada com base nas determinações de pressão parcial, através da leitura em centímetros da subida do nível de líquido no tubo interno de descarga da solução de alimentação, da percentagem de dióxido de carbono na fase gasosa do reactor e do valor de pH do meio de cultura.

Teoricamente, a lei de Henry e o equilíbrio químico 1 (equação 4.13) são suficientes para calcular as quantidades de dióxido de carbono e bicarbonato na fase líquida, assim como a quantidade de dióxido de carbono de um sistema em equilíbrio, através da expressão:

$$[CO_{2aq}] = PpCO_2 \cdot K_H \quad (4.16)$$

onde $[CO_{2aq}]$ é a concentração do dióxido de carbono na fase líquida (mol/L), $PpCO_2$ a pressão parcial do dióxido de carbono na fase gasosa (atm) ($PpCO_2 = \%CO_{2G} \cdot Ptotal$) e K_H a constante da lei de Henry para o dióxido de carbono, que a 20°C é 0,0372 mol/atm.L.

Para calcular a concentração em ião bicarbonato $[HCO_3^-]$ utilizaram-se as expressões 4.17 e 4.18, com base no equilíbrio químico 1 (equação 4.13).

$$\log[HCO_3^-] = pH - pK_1 + \log[CO_{2aq}] \quad (4.17)$$

$$[HCO_3^-] = [CO_{2aq}] \cdot 10^{pH - pK_1} \quad (4.18)$$

A quantidade total de dióxido de carbono produzida no sistema é dado pela equação:

$$QCO_2(T) = QCO_2(G) + QCO_2(L) \quad (4.19)$$

onde $QCO_2(T)$, $QCO_2(G)$, e $QCO_2(L)$ são respectivamente, a quantidade instantânea de dióxido de carbono total, na fase gasosa, e na fase líquida do reactor. $QCO_2(L)$ é a soma da quantidade de dióxido de carbono dissolvido e a de dióxido de carbono combinado.

A quantidade de dióxido de carbono na fase gasosa é determinada através da equação dos gases perfeitos, $PV=nRT$, ou seja de acordo com a equação 4.20.

$$QCO_2(G) = PpCO_2 \cdot V_G \frac{1000}{R.T} \quad (4.20)$$

onde $PpCO_2$ é a pressão parcial instantânea do dióxido de carbono na fase gasosa do reactor, V_G o volume da fase gasosa, R a constante universal dos gases perfeitos e T a temperatura absoluta. O valor de R é de $8,206 \times 10^{-5} \text{ m}^3 \cdot \text{atm.}/\text{K} \cdot \text{mol}$. $QECO_2$ designa a quantidade de dióxido de carbono específica, ou seja, por unidade massa de SSV.

Na fase líquida, a quantidade de dióxido de carbono é dada pela expressão :

$$QCO_2(L) = ([CO_2] + [HCO_3^-])V_L \quad (4.21)$$

onde V_L é o volume da fase líquida (L), e $[CO_2]$ e $[HCO_3^-]$ são as concentrações instantânea (mmol/L) na fase líquida do dióxido de carbono dissolvido e do ião bicarbonato, respectivamente, calculados através das equações 4.17 e 4.18.

Combinando e rearrajando as equações referidas, a expressão que se obtém (4.22) permite determinar a quantidade total de dióxido de carbono na fase líquida.

$$QCO_2(L) = V_L \cdot PpCO_2 \cdot K_H \cdot (1 + 10^{pH-pK_1}) \quad (4.22)$$

A equação que representa o balanço total da quantidade instantânea de dióxido de carbono no sistema é dada pela soma das equações 4.19 e 4.21.

$$QCO_2(T) = V_L \cdot PpCO_2 \cdot K_H \cdot (1 + 10^{pH-pK_1}) + PpCO_2 \cdot V_G \frac{1000}{R.T} \quad (4.23)$$

A partir da quantidade de CO_2 total produzida ao longo do ensaio (QCO_2) foi calculada a taxa de produção de dióxido de carbono ($TPCO_2 = CER - \text{“Carbon Evolution Rate”}$), e a taxa de produção específica de dióxido de carbono ($TPECO_2$).

4.5.3.3 Coeficiente Respirométrico

O coeficiente respirométrico (QR), sendo a razão entre a taxa de produção de dióxido de carbono ($TPCO_2$) e a taxa de consumo de oxigénio (OUR) (4.24), pode fornecer informação sobre o metabolismo da cultura, sendo obtido pela equação:

$$QR = TPCO_2/OUR \quad (4.24)$$

4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

De modo a comparar amostras, de constantes cinéticas e outros parâmetros característicos dos ensaios, resultantes das experiências em reactor “Fed-batch” Proporcional (Fechado) e em reactor “Fed-batch” Aberto, realizou-se uma análise estatística para averiguar a existência ou não de diferenças entre as duas populações, de modo a inferir se o factor dióxido de carbono acumulado podia de alguma forma ter influenciado o comportamento dos microrganismos, reflectindo-se nas constantes determinadas.

As técnicas estatísticas aplicadas foram as técnicas não-paramétricas de testes de hipóteses que são particularmente adaptáveis aos dados de comportamento.

4.6.1 CORRELAÇÃO DE SPEARMAN

Os métodos não-paramétricos podem também ser usados para medir a correlação entre duas variáveis X e Y . Ao invés de usar os valores precisos das variáveis pode-se ordená-los de 1 a N , de acordo com a sua grandeza, importância etc.. Se X e Y forem ordenados deste modo, o coeficiente de correlação de posto, ou fórmula de Spearman para a correlação de posto, como é muitas vezes denominado, é dado pela expressão (Siegel, 1975, McBean e Rovers, 1998):

$$r_s = 1 - \frac{6 \cdot \sum D^2}{N \cdot (N^2 - 1)} \quad (4.25)$$

onde D representa as diferenças entre os postos dos valores correspondentes a X e Y, e N o número de pares de valores (X,Y) dos dados.

No caso de se estudar a independência contra a dependência, num teste bilateral, usando r_s , a independência é aceite se $|\sqrt{N-1} \cdot r_s| < z_{(0,1);\alpha}$ ¹ (Oliveira, 1990), sendo $z = 1,96$ para o nível de significância de 5% e 2,58 para o nível de significância de 1%. (Quadro II.1 - Distribuição normal reduzida – Anexo II)

4.6.2 TESTE DE U MANN-WHITNEY

O teste de U Mann-Whitney aplica-se para comprovar se dois grupos independentes foram ou não extraídos da mesma população, desde que exista um grau de mensuração, pelo menos ordinal nos dados desses grupos. Trata-se de um dos mais poderosos testes não-paramétricos (Siegel, 1975).

Foi realizado o teste U de Mann-Whitney bilateral, embora, não se possa garantir a independência das amostras, dado que a taxa de alimentação do reactor aberto é a mesma que ocorre no reactor “Fed-batch” Proporcional (Fechado) e era definida pela actividade dos microrganismos deste reactor.

As hipóteses a testar foram:

H₀: As duas amostras são provenientes de populações com a mesma distribuição.

H₁: As duas amostras são provenientes de populações com duas distribuições distintas.

A estatística do teste baseia-se nos postos das observações. O teste consiste nas seguintes etapas (Siegel, 1975, Murteira, 1990, Spiegel, 1994):

(1) Procede-se à ordenação dos valores por ordem crescente, considerando as duas amostras como uma amostra única. Se dois ou mais valores da amostra forem idênticos, isto é,

¹ $z_{(0,1);\alpha}$ Distribuição Normal Reduzida

existirem valores empatados, ou empates, são atribuídos a cada valor amostral um posto igual à média dos postos.

(2) Determina-se a soma dos postos para cada amostra. Representa-se estas somas por R_1 e R_2 . N_1 e N_2 são respectivamente os tamanhos amostrais.

(3) Para testar a diferença entre as somas dos postos usa-se a estatística, dada pela expressão (Siegel, 1975, Spiegel, 1994, McBean e Rovers, 1998):

$$U_1 = N_1N_2 + \frac{N_1(N_1 + 1)}{2} - R_1 \quad (4.26)$$

correspondente à amostra 1. A distribuição da amostragem de U é assimétrica e possui média e variância dadas, respectivamente, pelas seguintes expressões:

$$\mu_U = \frac{N_1N_2}{2} \quad (4.27)$$

$$\sigma_U^2 = \frac{N_1N_2(N_1 + N_2 + 1)}{12} \quad (4.28)$$

Se N_1 e N_2 forem pelo menos iguais a 8, verifica-se que a distribuição de U é aproximadamente normal (Spiegel, 1994, McBean e Rovers, 1998), de modo que:

$$z = \frac{U - \mu_U}{\sigma_U} \quad (4.29)$$

é normalmente distribuída com média zero e variância 1.

(4) O valor estatístico correspondente à amostra 2 é dado pela estatística:

$$U_2 = N_1N_2 + \frac{N_2(N_2 + 1)}{2} - R_2 \quad (4.30)$$

com média e variância iguais à da amostra 1, dado que são igualmente dadas pelas expressões 4.27 e 4.28.

A estatística dada pela expressão 4.29 está relacionada à estatística da expressão 4.26, tendo-se:

$$U1 + U2 = N1.N2 \quad (4.31)$$

e

$$R1 + R2 = \frac{N(N + 1)}{2} \quad (4.32)$$

onde $N = N1+N2$. A expressão 4.32 pode fornecer um controlo dos cálculos.

NOTA: A estatística $U1$ corresponde ao número total de vezes em que os valores da amostra 1 antecedem os valores da amostra 2 quando todos os valores amostrais são ordenados crescentemente.

(5) Segundo Siegel (1975) a distribuição amostral apresentada no Anexo II (Quadro II.2) é a base de comparação para o menor valor da estatística U . No entender de Spiegel (1994) e McBean e Rovers (1998), tal como já foi referido, para $N1$ e $N2$ maiores que 8, a estatística U tende rapidamente para a distribuição normal (Quadro II.1 - Anexo II). Utilizou-se a Quadro da distribuição da normal reduzida, de acordo com a sugestão de Spiegel, dado que apresenta uma zona de não rejeição mais pequena.

Aceita-se a hipótese H_0 , as duas amostras são provenientes de populações com a mesma distribuição, se $|z| < z_{(0,1);\alpha}$.

4.6.3 TESTE H DE KRUSKAL-WALLIS

O teste H de Kruskal-Wallis é normalmente aceite como uma alternativa não-paramétrica à análise de variância simples (Spiegel, 1994).

Este teste é normalmente utilizado para verificar se k , para ($k > 2$), amostras aleatórias independentes podem ou não ser consideradas como provenientes de populações com a mesma distribuição. Este teste é uma generalização do teste anterior para k amostras, tendo

vido utilizado com a pretensão de confirmar os resultados do teste de U Mann-Whitney (Spiegel, 1994).

Assim as hipóteses podem ser postuladas como:

H₀: As k populações partilham a mesma distribuição

H₁: Pelo menos uma das populações tem distribuição diferente das restantes, dando origem a valores tendencialmente superiores.

O modo como o teste é construído torna-o especialmente sensível às diferenças de medidas de localização, em especial às diferenças entre as medianas das k populações.

Este teste pode ser descrito do seguinte modo: supondo que se possui k amostras de tamanhos N₁, N₂, ..., N_k, com o tamanho referente ao conjunto de todas as amostras dado por N = N₁+N₂+...+N_k. Suponha-se, além disso, que os dados do conjunto de todas as amostras são contados (são atribuídos postos) e que a soma dos postos para as k amostras são R₁, R₂,..., R_k, respectivamente. A estatística do teste é dada pela expressão (Spiegel, 1994, McBean e Rovers, 1998):

$$H = \frac{12}{N(N+1)} \sum_{j=1}^k \frac{R_j^2}{N_j} - 3(N+1) \quad (4.33)$$

A distribuição amostral H é muito próxima de uma distribuição qui-quadrado com k-1 graus de liberdade (Quadro II.3 – Anexo II), desde que N₁, N₂, ..., N_k sejam todos pelo menos igual a 5.

Aceita-se a hipótese H₀, as k populações partilham a mesma distribuição, se $H < \chi^2_{(1-\alpha),v}$ para v graus de liberdade, com v = número de amostra-1. Neste caso, $\chi^2_{(1-0,05),v} = 3.84$.

4.6.3.1 Teste H corrigido para Empates

No caso de existirem muitos empates entre as observações dos dados amostrais, o valor de H dado pela estatística (4.33) é menor do que deveria ser. O valor corrigido de H,

representado por H_c é obtido dividindo o valor da estatística H pelo factor de correcção dado pela expressão (Spiegel, 1994):

$$1 - \frac{\sum (T^3 - T)}{N^3} - N \quad (4.34)$$

onde T é o número de empates correspondentes a cada valor observado. Na prática, a correcção é usualmente desprezável (Spiegel, 1994), isto é, não é suficiente para garantir a mudança na decisão.

4.6.4 TESTE DE WILCOXON

O teste de Wilcoxon, baseado na noção de posto, permite incorporar a amplitude das diferenças existentes entre as duas variáveis, X e Y , em estudo e é aplicado a amostras relacionadas (Sigel, 1975).

As hipóteses subjacentes ao teste de Wilcoxon podem ser postuladas da seguinte forma, para o teste bilateral:

$$H_0: E[X] = E[Y] \quad H_1: E[X] \neq E[Y], \quad (4.35)$$

(as distribuições são desconhecidas).

Caso os respectivos valores esperados existam, e admitindo-se uma amostra aleatória bivariada, este teste pode assim ser encarado como uma alternativa não-paramétrica ao teste t para a diferença de médias em amostras emparelhadas.

O teste consiste nas seguintes etapas:

- (1) Determinar a diferença relativa entre os valores observados de cada par (X, Y)

$$D_i = Y_i - X_i \quad i = 1, \dots, n \quad (4.36)$$

- (2) Atribuição de postos às diferenças determinadas na etapa anterior, independentemente do sinal que possuam - atribuir postos a $|D_i| = R'_i$

(3) Atribuição a cada posto o sinal da diferença

$$R_i = (D_i / |D_i|) \cdot R'_i \quad (4.37)$$

(4) Cálculo da estatística T

$$T = \frac{\sum R_i}{\sqrt{R_i^2}} \cap N(0,1) \quad (4.38)$$

A estatística utilizada neste caso, é sempre válida caso haja empates ou o número de pares em análise seja grande. Siegel (1975) mostrou que mesmo para amostras pequenas, é boa a aproximação da estatística T à normal reduzida, (Quadro II.1 – Anexo II). Este teste é apresentado com algumas diferenças por outros autores.

4.6.5 TESTE KOLMOGOROV-SMIRNOV PARA DUAS AMOSTRAS

Tal como no teste U de Mann-Whitney, o objectivo do teste de Kolmogorov-Smirnov consiste em tentar descobrir se duas amostras podem ou não ser consideradas como provenientes de populações com a mesma distribuição. Este teste baseia-se na noção de função de distribuição empírica, sendo o objecto de análise constituído pela diferença entre as funções de distribuição empírica das duas amostras.

Intuitivamente, caso as duas amostras sejam provenientes de populações com a mesma distribuição, espera-se que os valores de uma e de outra apareçam indiferentemente, fazendo com que, em cada ponto, a diferença entre as funções seja relativamente pequena.

O teste bilateral é sensível a qualquer diferença nas distribuições das quais se extraíram as amostras.

As hipóteses a testar são:

H₀: As duas amostras são provenientes de populações com a mesma distribuição.

H₁: As duas amostras são provenientes de populações com distribuições diferentes.

Seja $S_{n1}(X)$ a função acumulada observada para a mostra 1, isto é, $S_{n1}(X) = k/n_1$, onde k é o número de valores não superiores a X , e $S_{n2}(X)$ a função cumulativa observada da amostra 2. A estatística do teste é dada por D :

$$D = \max | S_{n1}(X) - S_{n2}(X) | \quad (4.39)$$

Para pequenas amostras, quando $n_1 = n_2$, pode-se usar o Quadro II.4 do Anexo II para comprovar a hipótese de nulidade. O referido Quadro dá vários valores da quantidade k_D , que é definida como o numerador da maior diferença entre as duas distribuições cumulativas, isto é, o numerador de D (Siegel, 1975). Para $n_1 = n_2 = 11$ e para um nível de significância de 5%, k_D é igual a 7.

O ponto crítico pode também ser calculado pela expressão seguinte, embora Siegel (1975) defenda este cálculo apenas para amostras superiores a 40 observações:

$$r \sqrt{\frac{n_1 + n_2}{n_1 \cdot n_2}} \quad (4.40)$$

onde r depende do nível de significância assumido. Para o teste bilateral r toma o valor de 1,36 para $\alpha = 0,05$.

4.6.6 TESTE DE HOMOGENEIDADE

O teste de homogeneidade permite inferir sobre a homogeneidade de duas sub-populações.

Em cada uma de s populações (sub-populações ou estratos) designados por B_j , $j=1,2,\dots, s$, observam-se amostras de dimensão N_j e arrumam-se os elementos observados em r classes, em função da modalidade - A_i , $i=1,2, \dots, r$ - que apresentam; obtém-se um quadro do tipo:

	B1	B2	...	Bs	Totais
A1	N11	N12	...	N1s	N1.
A2	N21	N22	...	N2s	N2.
...
Ar	Nr1	Nr2	...	Nrs	Nr.
Totais	N.1	N.2	...	N.s	N

Como cada B_j , $j=1,2,\dots,s$ designa uma sub-população ou estrato cujos elementos se distribuem pelas r modalidades do atributo A , a homogeneidade verifica-se quando de sub-população para sub-população são idênticas as proporções de elementos em cada uma das modalidades do atributo A (Murteira, 1990).

Mais concretamente seja,

$$P_{i|j} = P\{A_i|B_j\}, \quad \sum_{i=1}^r P_{i|j} = 1 \quad \forall j; \quad (4.41)$$

a probabilidade condicionada da modalidade A_i no estrato B_j .

A hipótese da homogeneidade representa-se por,

$$H_0: P_{i|j} = \pi(i) \quad \forall i, j \quad \text{ou} \quad H_0: P_{i|1} = P_{i|2} = \dots = P_{i|s} \quad \forall i \quad (4.42)$$

Se a hipótese é verdadeira, o estimador da máxima verosimilhança do valor comum das probabilidades condicionadas,

$$\bar{P}_{i|1} = \bar{P}_{i|2} = \dots = \bar{P}_{i|s} = N_{i.}/N \quad (4.43)$$

obtém-se combinando as sub-populações, isto é, entrando com a frequência relativa da modalidade A_i , no conjunto das N observações.

Consequentemente, as frequências esperadas em cada célula $\{A_i B_j\}$ são obtidas multiplicando a dimensão de cada $(N_{.j})$ pelo estimador da probabilidade da modalidade A_i comum a todas as sub-populações,

$$N\bar{P}_{ij} = N \cdot j\bar{P}_{i|j} = N_{i.} N_{.j} / N \quad (4.44)$$

Para ensaiar a homogeneidade é se reconduzido à estatística teste:

$$\chi^2 = \sum_{i=1}^r \sum_{j=1}^s \frac{(N_{ij} - N\bar{P}_{i.}\bar{P}_{.j})^2}{N\bar{P}_{i.}\bar{P}_{.j}} \quad (4.45)$$

A estatística tem no limite distribuição qui-quadrado com $(r-1).(s-1)$ graus de liberdade (Quadro II.3 - Anexo II) quando a hipótese é verdadeira.

5. RESULTADOS

5.1 APRESENTAÇÃO E EXPLORAÇÃO

No Anexo III apresentam-se os valores dos parâmetros controlados em cada um dos ensaios, para o reactor “Fed-batch” Proporcional (Fechado - F) e para o Reactor “Fed-batch” Aberto (R). Para cada ensaio, é ainda apresentada, a evolução comparativa de alguns parâmetros sob a forma gráfica.

5.1.1 AVALIAÇÃO DE INIBIÇÃO

Numa primeira análise dos resultados pode-se avaliar a evolução comparativa dos parâmetros quantidade de acetato, quantidade de SSV, relação S/X, CEAm, OURE, e $Q_{\text{ECO}_2(\text{G})}$, entre os ensaios “Fed-batch” realizados em reactor fechado (F) e aberto (R) para condições iniciais e de operação semelhantes, através da análise gráfica referente a cada ensaio, que constam no Anexo III, nas Figuras III.1 a III.11.

Pela observação dos gráficos não se detectam diferenças significativas entre os reactores “Fed-batch” Proporcional (Fechado) e “Fed-batch” Aberto. As curvas são quase sempre paralelas e os pequenos desvios podem ser justificados pela diferença entre a quantidade de biomassa, embora reduzida, ou por eventuais pequenas diferenças de operação.

Uma análise mais consistente relativamente à existência de inibição nos ensaios “Fed-batch”, é sugerida por Philbrook e Grady (1985) e Eckenfelder e Grau (1992), segundo os quais a resposta de um ensaio de um reactor “Fed-batch” sem inibição resulta numa acumulação linear de substrato ao longo do tempo. No caso dos ensaios realizados neste estudo, a resposta poderá não ser completamente linear, uma vez que esta surge em função da alimentação, a qual não é constante nestes ensaios.

5.1.1.1 Avaliação de Inibição em Reactor “Fed-batch” Proporcional (fechado)

Analisando os gráficos das Figuras 5.1 e 5.2, acetato acumulado e substrato adicionado em função do tempo de ensaio, das experiências realizadas em reactor “Fed-batch” Proporcional (Fechado) pode observar-se que em nenhum ensaio parece existir inibição, quanto muito poderá suspeitar-se de crescimento de biomassa no ensaio F5, de acordo com o referido no ponto 1.2.1.4).

As formas das curvas correspondentes aos ensaios como F3, F7 e F8, apresentam uma ligeira convexão, a qual não parece corresponder a uma situação de inibição, dado que praticamente acompanha a curva de adição de substrato.

No ensaio F10, verificou-se uma fuga no reactor e embora a atmosfera gasosa fosse sendo enriquecido em dióxido de carbono (Figura III.10 – Anexo III), não existiu acumulação de todo o gás libertado, não provocando portanto a adição de substrato. Desta forma, não existe também acumulação de substrato (acetato).

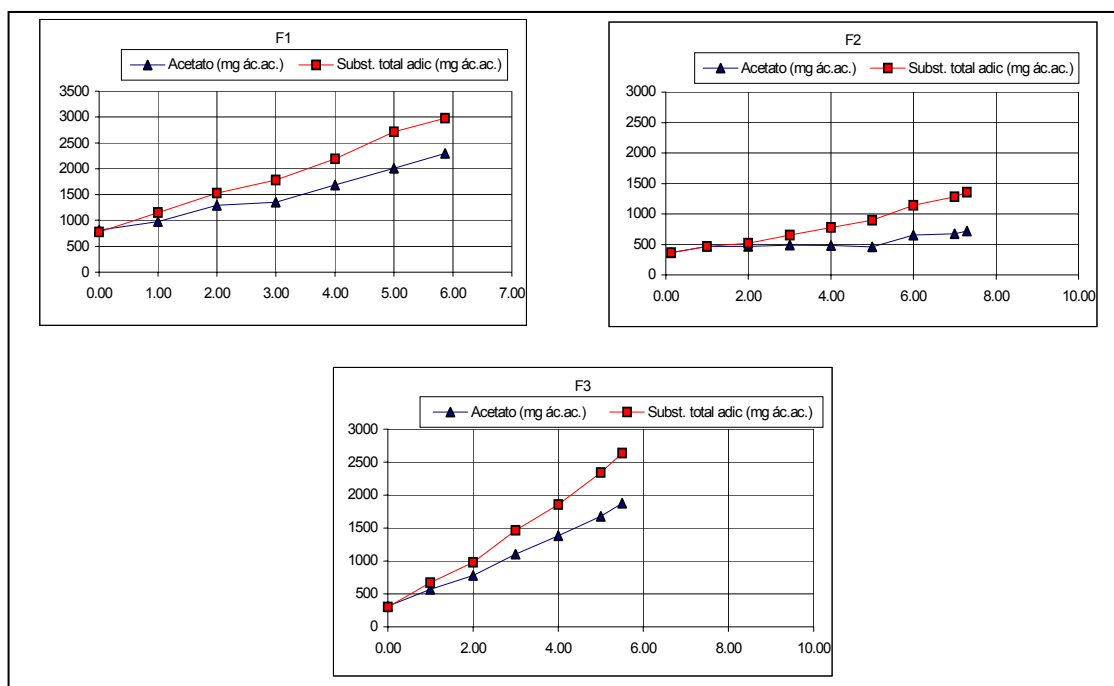


Figura 5.1- Evolução comparativa da quantidade de substrato acumulado (acetato) no reactor e da quantidade de substrato total adicionado para os ensaios “Fed-batch” Proporcional com biomassa do inóculo A

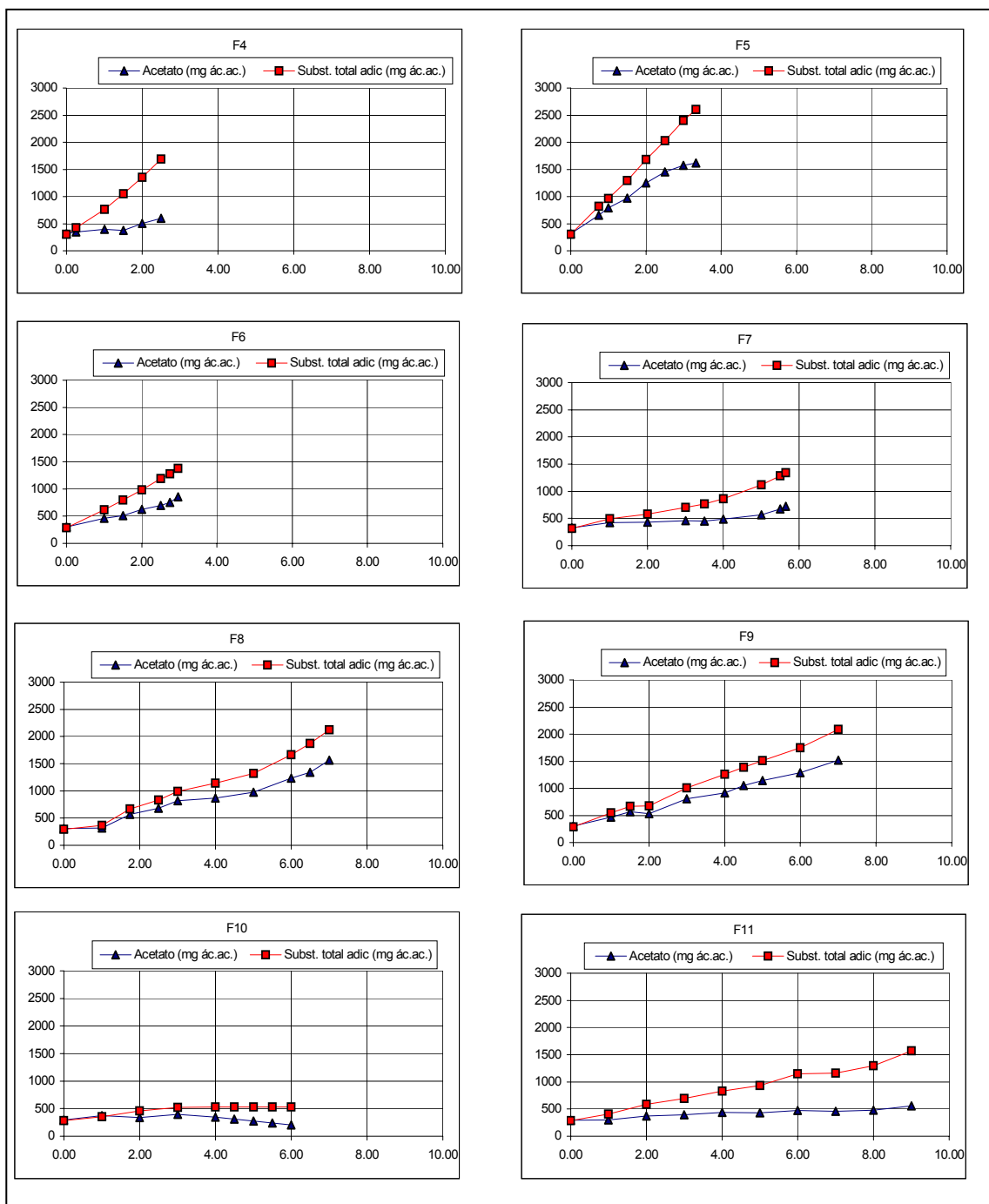


Figura 5.2 - Evolução comparativa da quantidade de substrato acumulado (acetato) no reactor e da quantidade de substrato total adicionado para os ensaios “Fed-batch” Proporcional com biomassa do inóculo B

A não inibição poderá ser confirmada pela análise dos gráficos “substrato acumulado (acetato) e OURE *versus* tempo” dos ensaios das Figuras 5.3 e 5.4, análise igualmente

sugerida por Eckenfelder e Grau (1992). Um aumento da inclinação da curva de substrato acumulado (acetato) (indicador de inibição), deverá ser acompanhada por um decréscimo do OURE (diminuição da viabilidade dos microrganismos). Esta análise não é muito clara, relativamente à evolução do OURE nos ensaios F1, F2, F3, e F8, embora não seja visível nenhuma alteração na curva de substrato acumulado (acetato).

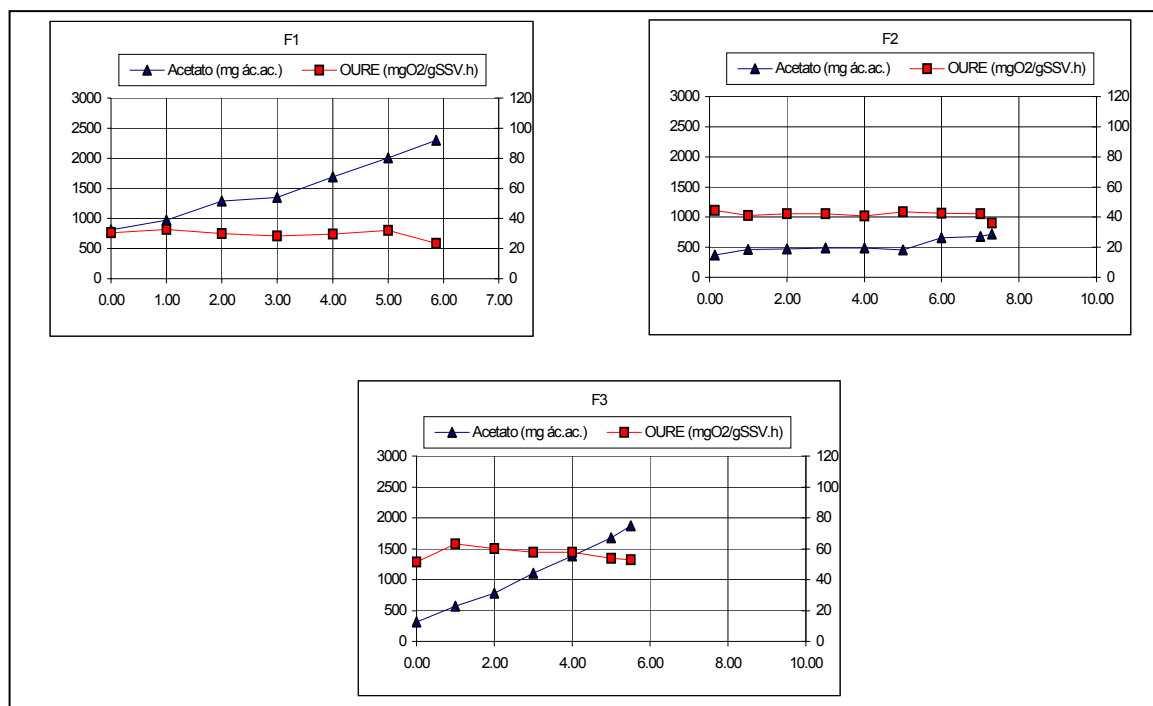


Figura 5.3 - Evolução comparativa da quantidade de substrato acumulado (acetato) no reactor e da taxa específica de consumo de oxigénio para os ensaios “Fed-batch” Proporcional com biomassa do inóculo A

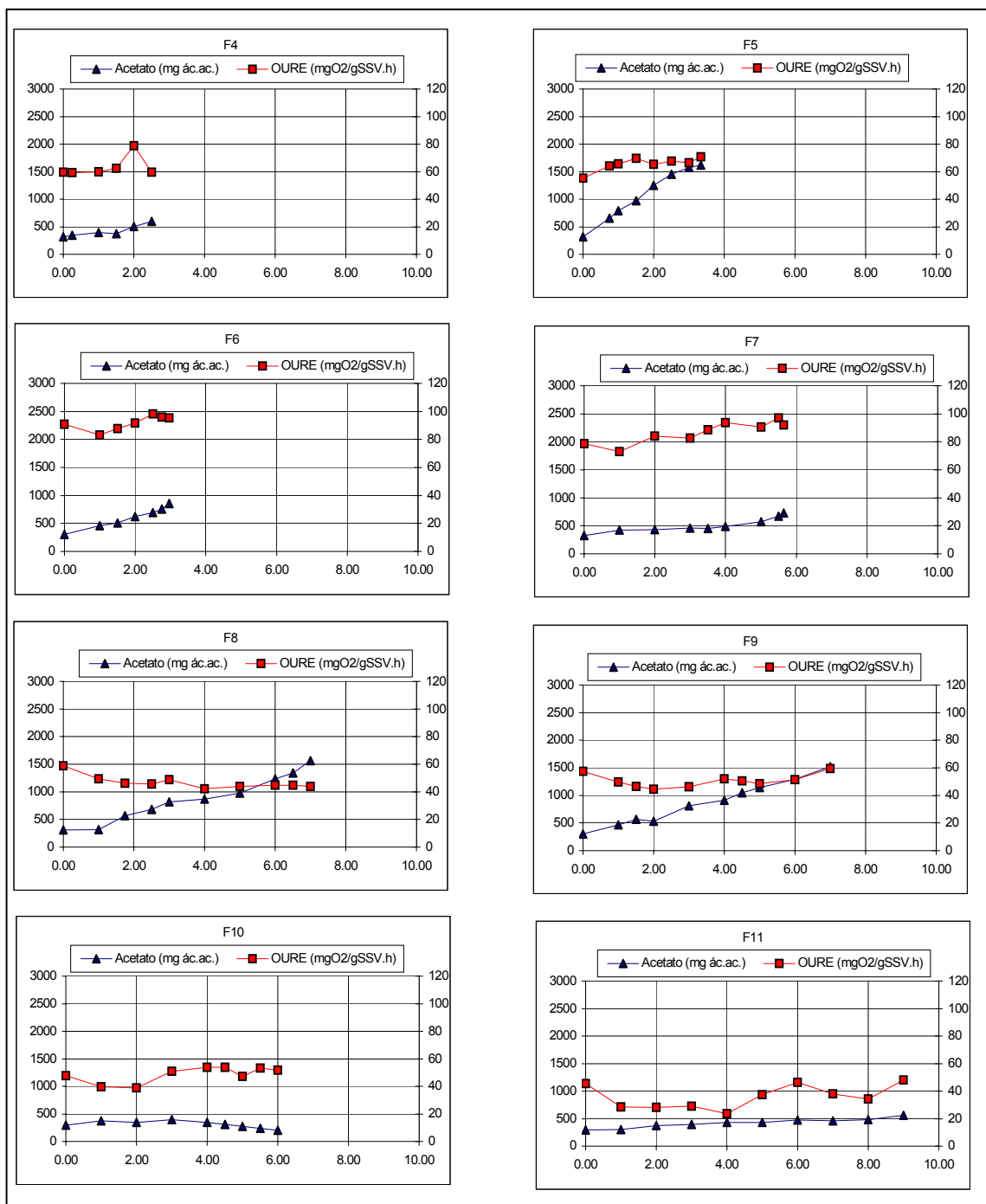


Figura 5.4 - Evolução comparativa da quantidade de substrato acumulado (acetato) no reactor e da taxa específica de consumo de oxigénio para os ensaios “Fed-batch” Proporcional com biomassa do inóculo B

Além dos indicadores de inibição já analisados, alteração do declive das curvas de acumulação de substrato e OURE, optou-se por mais uma análise gráfica, com outro

parâmetro que, tal como o OURE, pode ser indicativo da viabilidade dos microrganismos, o $Q_{ECO_2}(T)$.

Através dos gráficos das Figuras 5.5 e 5.6 verifica-se que existem alterações do declive das curvas de $Q_{ECO_2}(T)$ em vários ensaios. Estas alterações são essencialmente uma redução do declive, ou seja, uma diminuição da taxa de produção de dióxido de carbono, que poderá ser uma indicação da diminuição da viabilidade dos microrganismos. Uma vez que os valores do parâmetro $Q_{ECO_2}(T)$ são calculados a partir de outras medições ($\%CO_2(G)$ e pH) e os parâmetro acetato, substrato adicionado e OUR são medidos directamente, prevalecem dúvidas relativamente à evolução das curvas de $Q_{ECO_2}(T)$.

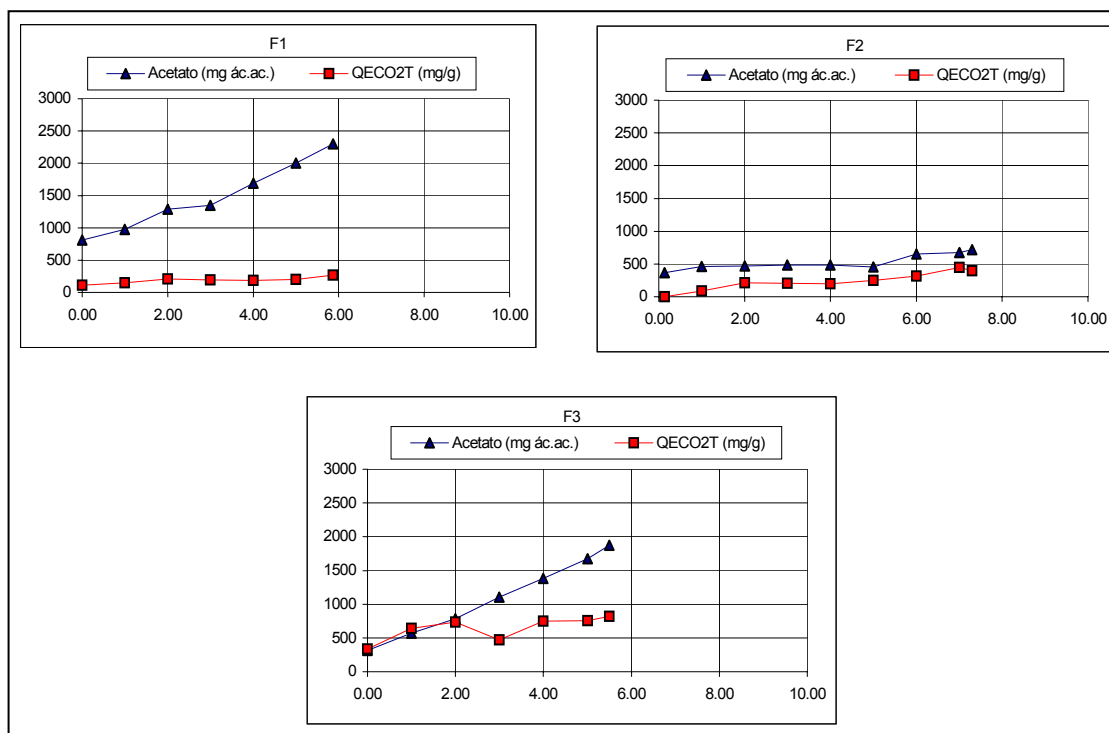


Figura 5.5 - Evolução comparativa da quantidade de substrato acumulado (acetato) no reactor e da quantidade total específica de dióxido de carbono para os ensaios “Fed-batch” Proporcional com biomassa do inóculo A

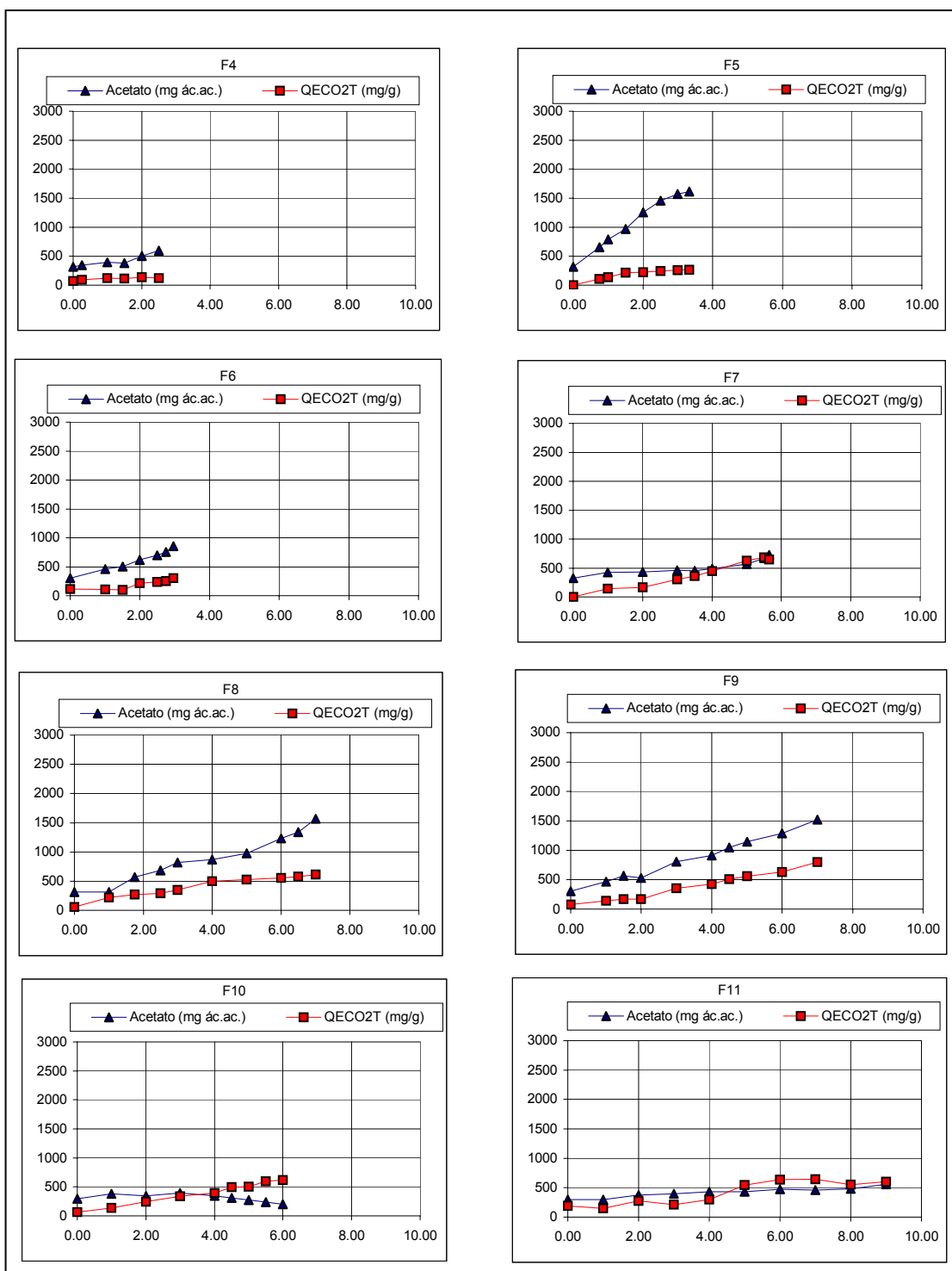


Figura 5.6 - Evolução comparativa da quantidade de substrato acumulado (acetato) no reactor e da quantidade total específica de dióxido de carbono para os ensaios “Fed-batch” Proporcional com biomassa do inóculo B

5.1.1.2 Avaliação de Inibição em Reactor “Fed-batch” Aberto

Uma análise semelhante à anteriormente realizada para o reactor “Fed-batch” Proporcional foi realizada para os resultados obtidos no reactor Aberto. Esta análise pretendia verificar se o CO_2 livre e os iões bicarbonatos (HCO_3^-) ou a acumulação de substrato poderiam inibir a actividade dos microrganismos. A análise dos gráficos das Figuras 5.7 e 5.8, “substrato acumulado (acetato) e substrato adicionado em função do tempo” permitem inferir que não há evidências de inibição, à excepção do ensaio R3.

O ensaio R3 não apresenta concentrações extremas de alcalinidade, nem de aumento da quantidade de alcalinidade durante o ensaio. No entanto, do total dos ensaios em reactor Aberto, este é o que apresenta o maior valor de concentração de acetato durante o ensaio (S_{max}).

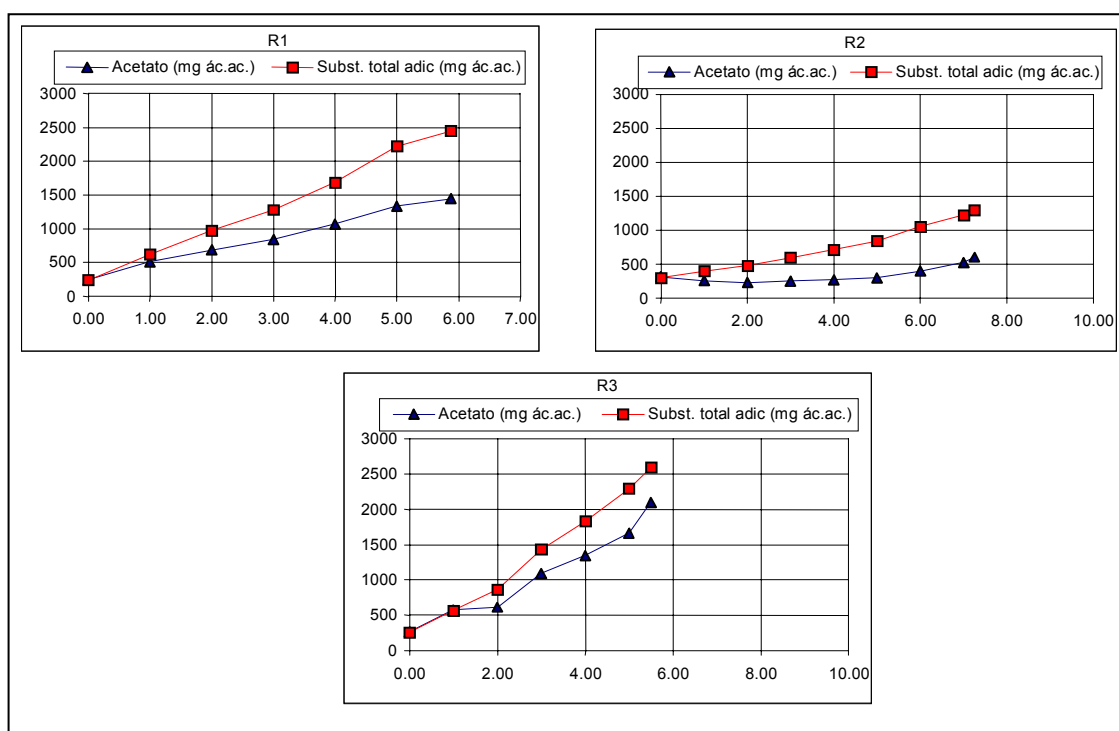


Figura 5.7 - Evolução comparativa da quantidade de substrato acumulado (acetato) no reactor e da quantidade de substrato total adicionado para os ensaios “Fed-batch” Aberto com biomassa do inóculo A

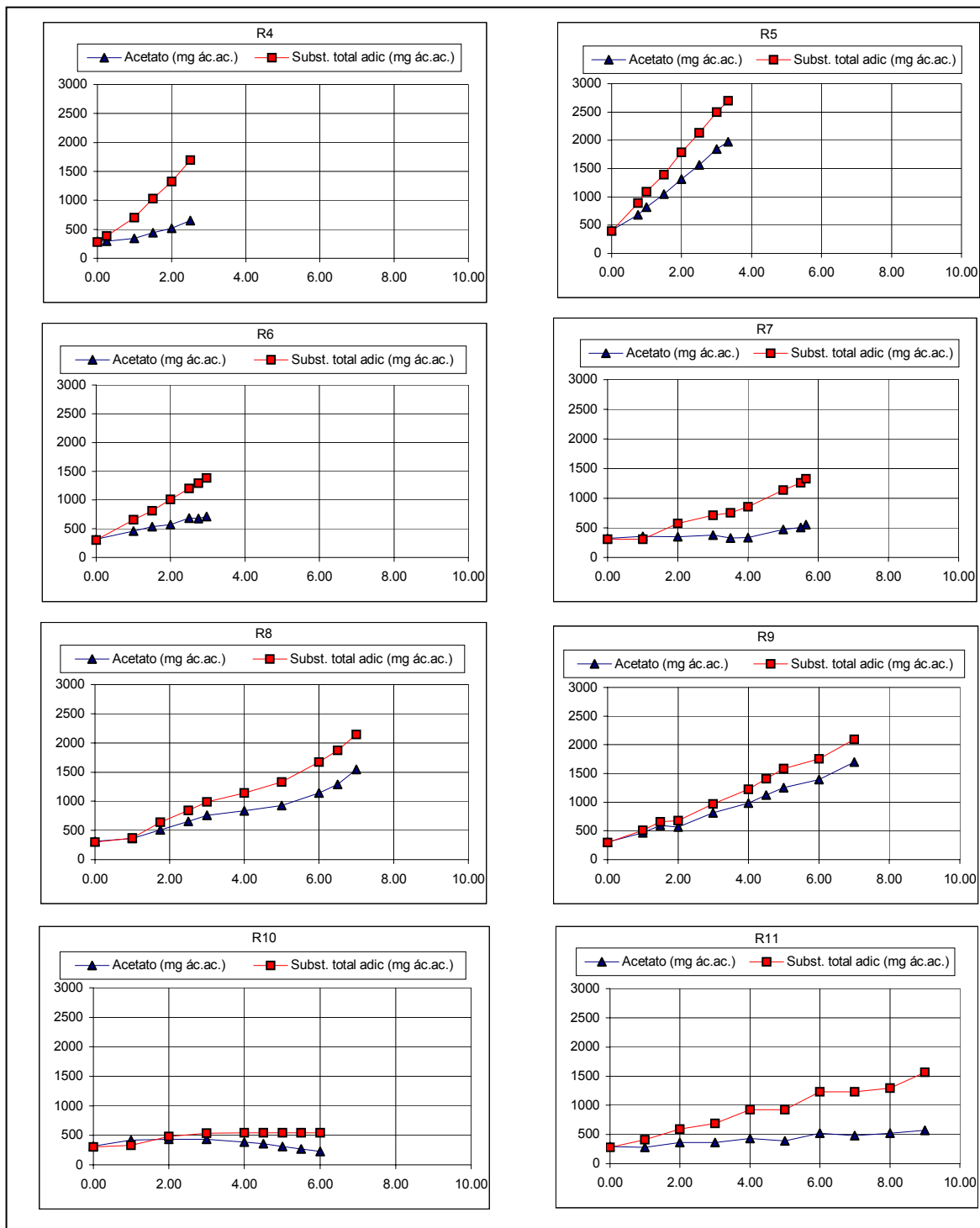


Figura 5.8 - Evolução comparativa da quantidade de substrato acumulado (acetato) no reactor e da quantidade de substrato total adicionado para os ensaios “Fed-batch” Aberto com biomassa do inóculo B

As Figuras 5.9 e 5.10 mostram a evolução do substrato acumulado (acetato) e do OURE em função do tempo de ensaio.

A análise do gráfico referente ao ensaio R3, parece apoiar a hipótese de inibição, embora não seja completamente conclusiva, dado que noutros ensaios, o decréscimo de valores do parâmetro OURE não parece ter uma implicado efeito semelhante na curva de acumulação de substrato.

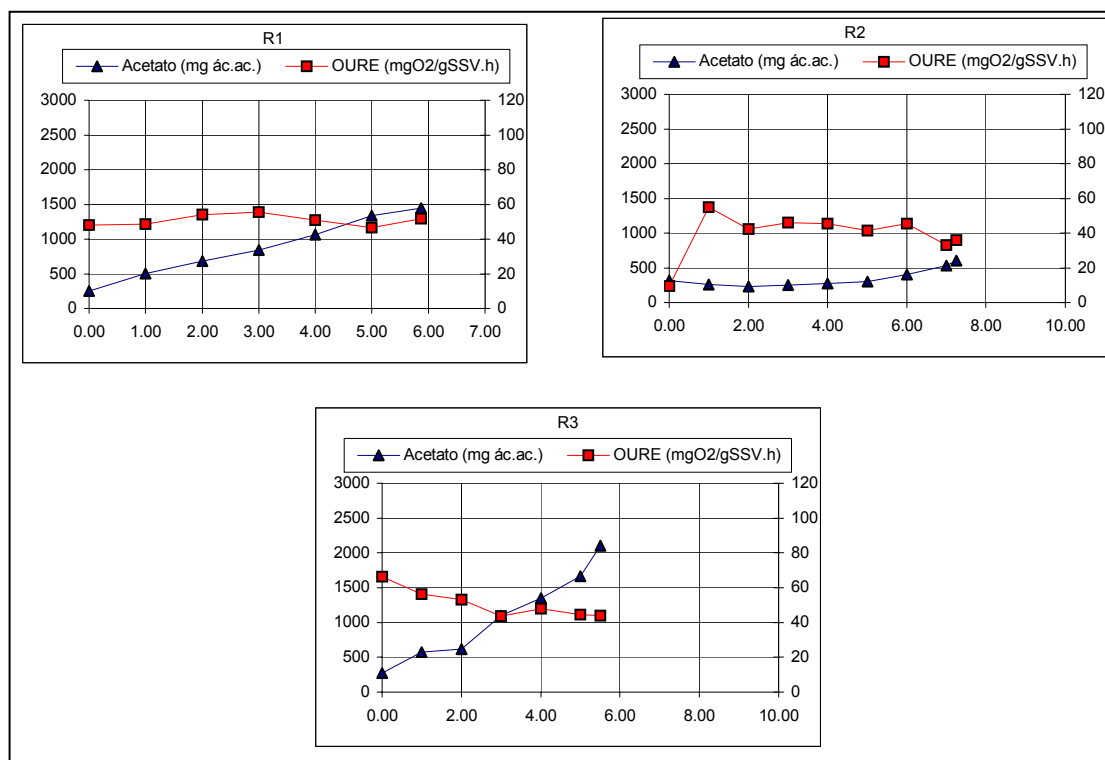


Figura 5.9 - Evolução comparativa da quantidade de substrato acumulado (acetato) no reactor e a taxa de consumo específica de oxigénio para os ensaios “Fed-batch” Aberto com biomassa do inóculo A

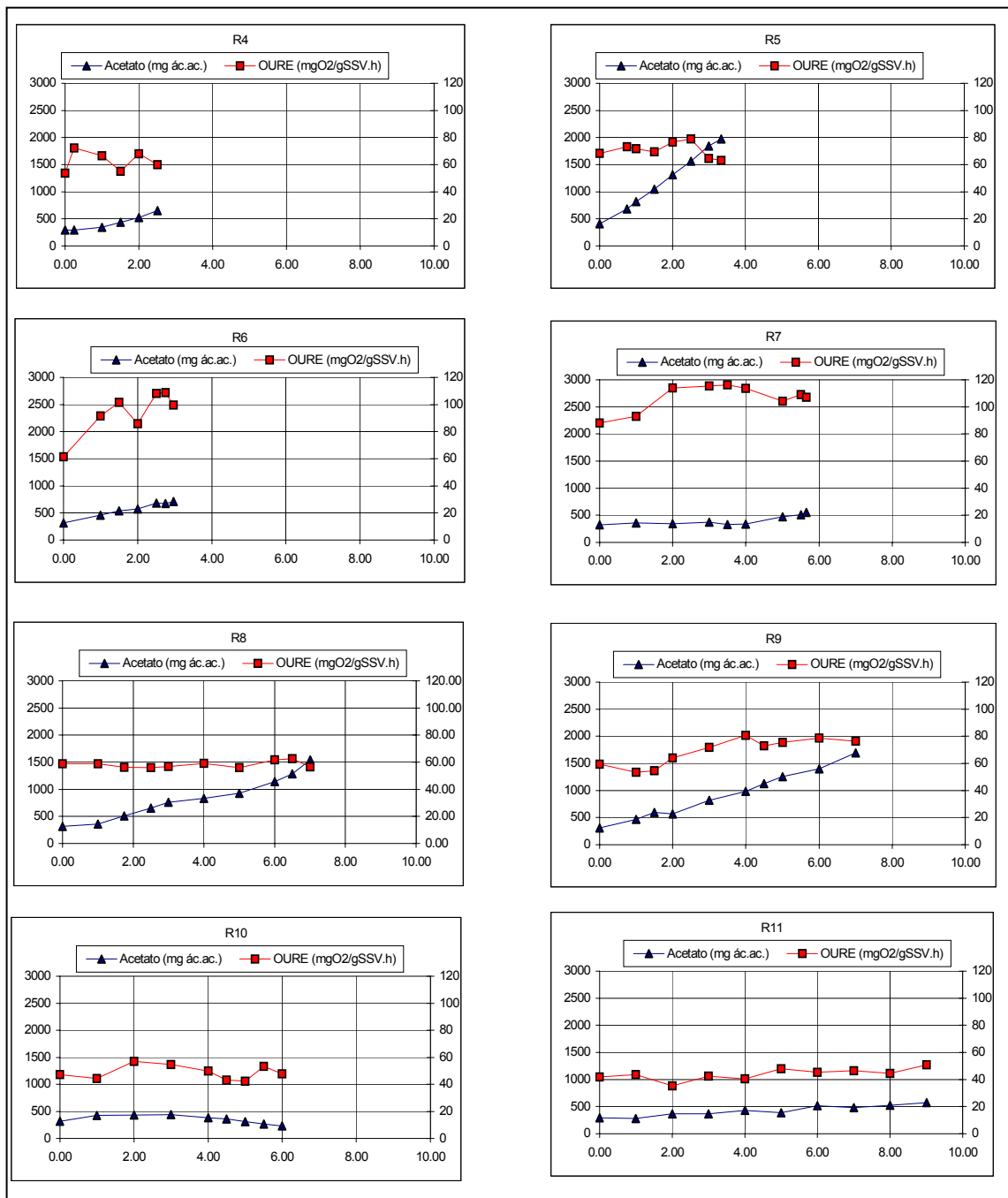


Figura 5. 10 - Evolução comparativa da quantidade de substrato acumulado (acetato) no reactor e a taxa de consumo específica de oxigénio para ensaios “Fed-batch” Aberto com biomassa do inóculo B

5.1.1.3 Avaliação do Efeito da Concentração do Ião Bicarbonato

Nos ensaios efectuados com o reactor “Fed-batch” Aberto não foi analisada a evolução da quantidade de dióxido de carbono. Para avaliar o aumento da concentração do ião bicarbonato, resultantes da actividade biológica, analisou-se a alcalinidade inicial e final em cada ensaio. A variação da alcalinidade, expressa em mg CaCO₃/L pode ser observada no Figura 5.11.

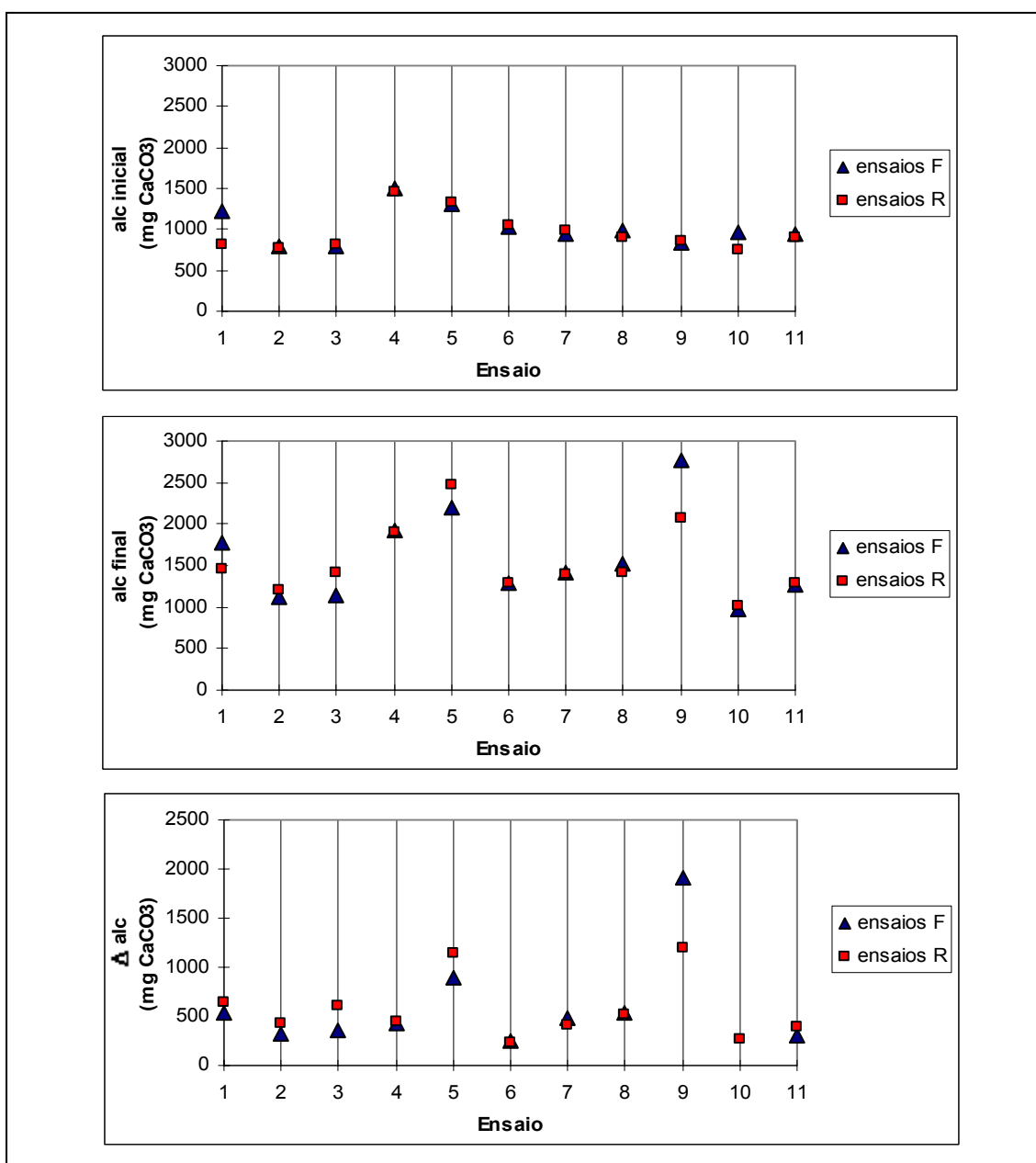


Figura 5. 11 - Alcalinidade inicial e final e Variação da alcalinidade em cada ensaio

A Figura 5.11 mostra que a variação da alcalinidade, que para os valores de pH em causa corresponde ao incremento da concentração do ião bicarbonato, é quase sempre, ligeiramente superior nos ensaios Abertos. Exceptuam-se os ensaios 7 e 9, onde a variação da alcalinidade apresenta valor superior no ensaio Fechado.

A alcalinidade não varia linearmente com o substrato consumido. No entanto, é de referir que a medição da alcalinidade é uma medição que pode depender da sensibilidade de cada operador e da luminosidade existente no local onde se realiza a análise.

A análise da variação do pH também pode fornecer informações a respeito do ião bicarbonato, uma vez que a sua origem e a do ião H^+ é a mesma, ou seja, a dissociação do ácido carbónico, que tem origem na dissolução do dióxido de carbono libertado. Pela Figura 5.12, é possível comparar a diferença entre os ensaios em reactor “Fed-batch” Proporcional e em reactor “Fed-Batch” Aberto, para o pH inicial e final.

A Figura 5.12 permite observar que os ensaios “Fed-batch” Proporcional e Aberto se iniciaram praticamente com o mesmo valor de pH, à excepção do ensaio 2 que apresentava uma diferença superior. Permite igualmente observar que, relativamente ao pH final, as diferenças são mais notórias, reflectindo-se num valor de pH final mais baixo no reactor “Fed-batch” Proporcional.

Embora não se tenha verificado indício de inibição resultante da alcalinidade acumulada nos ensaios em causa, realizou-se um ensaio com dois reactores “batch” paralelos Abertos, com as mesmas condições iniciais, à excepção de um incremento de 500 mg/L de alcalinidade (expressas em $CaCO_3$), no reactor designado por β , em oposição ao reactor α , onde a alcalinidade existente era proveniente das condições iniciais à semelhança dos ensaios “Fed-batch” realizados. Este ensaio foi realizado com o objectivo de confirmar a avaliação anterior do efeito dos bicarbonatos no comportamento da biomassa. A solução alcalina utilizada foi de bicarbonato de sódio.

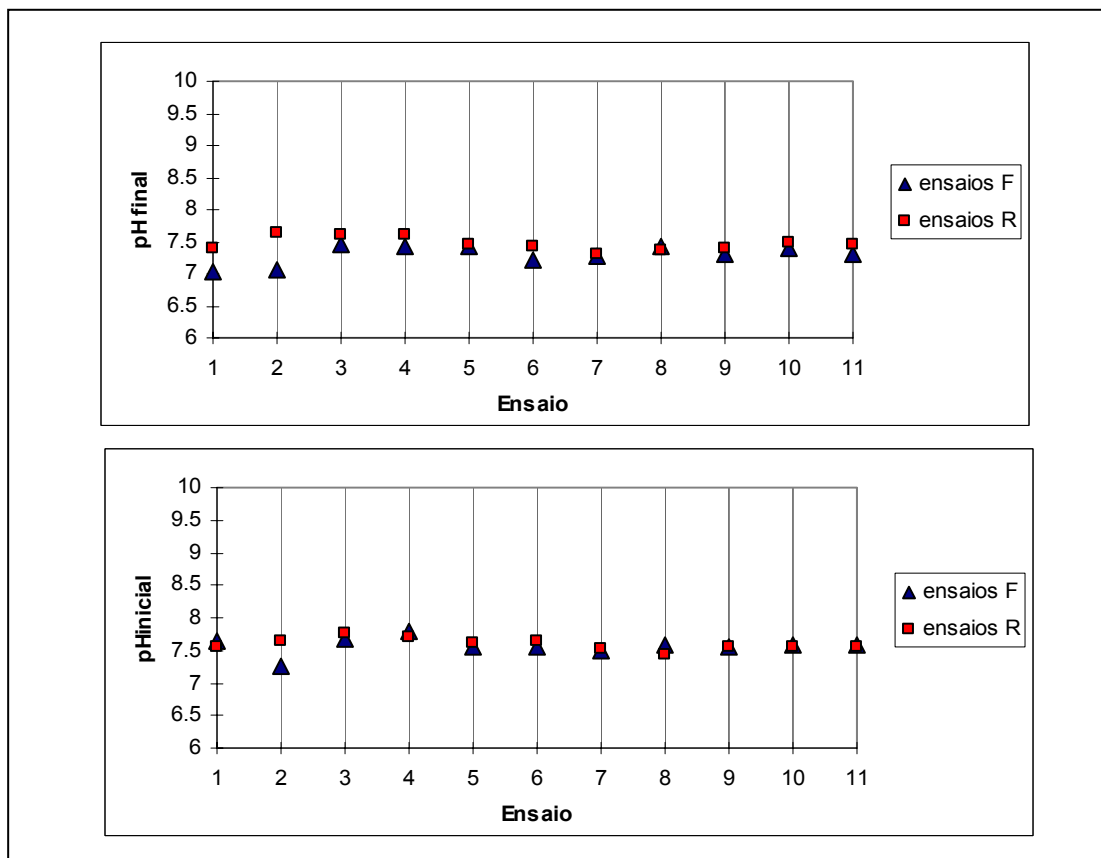


Figura 5.12 - Comparação dos valores de pH inicial e final entre o reactor “Fed-batch” Proporcional e o reactor “Fed-batch” Aberto

Na Figura 5.13 pode-se observar que a evolução do consumo de substrato (acetato) é semelhante em ambos os ensaios, com e sem quantidade adicional de bicarbonato.

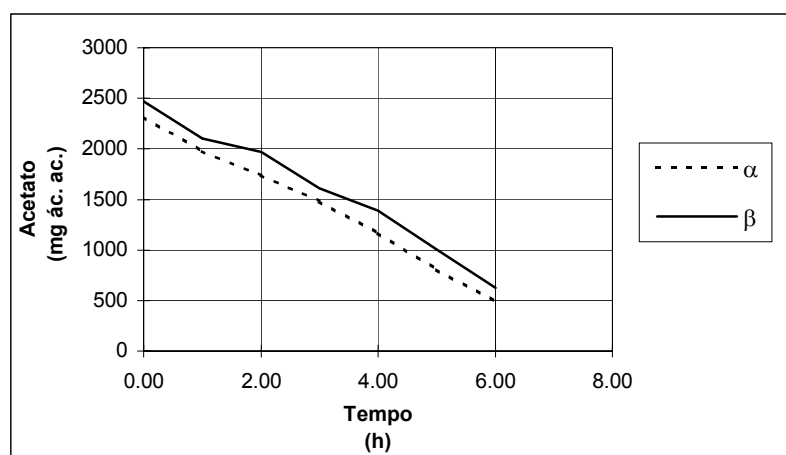


Figura 5.13 - Influência dos iões bicarbonatos num ensaio “batch”

Da análise anterior, verificou-se que à excepção do ensaio R3, o qual também não é conclusivo, não existe indicação da existência de inibição pelo aumento do dióxido de carbono proveniente da actividade microbiana.

5.1.2 PARÂMETROS CINÉTICOS

De modo a resumir os ensaios, considerando as variáveis que directamente os caracterizam, procedeu-se ao cálculo de alguns parâmetros cinéticos: rendimento celular, crescimento de biomassa, taxas de consumo, taxas de produção de dióxido de carbono, taxa de alimentação e outros parâmetros, que se apresentam no Quadro IV.1 no Anexo IV.

No Anexo IV encontram-se as Figuras IV.1 a IV.4 onde se comparam os valores obtidos para vários parâmetros nos ensaios em reactor “Fed-batch” Proporcional com condições iniciais semelhantes de SAL e X_0 , de acordo com o Quadro 3.1.

O primeiro grupo é referente aos ensaios em que se utilizou solução de alimentação (acetato) com uma concentração de aproximadamente 12 g/L, expressa em ácido acético, e uma quantidade inicial de biomassa inferior ou igual a 1000 mg SSV/L, sendo este grupo constituído pelos ensaios F3, F8, F9 e F11. Neste grupo o OUREmed é semelhante em todos os ensaios, decrescendo ligeiramente do ensaio com maior quantidade de biomassa para o que foi realizado com menor quantidade. A taxa de crescimento observada é semelhante nos ensaios F3, F9 e F11, sendo F3 o que apresenta um menor valor destes três ensaios. O ensaio F8 apresenta um valor para a taxa de crescimento observado superior aos restantes, sendo praticamente o dobro dos valores obtidos nos outros ensaios deste grupo. O coeficiente de rendimento celular apresenta um comportamento semelhante à taxa de crescimento observada. A $TPCO_2(G)$ é superior nos ensaios F8 e F9, sendo F11 o ensaio que apresenta menor valor deste parâmetro. Quanto à $TPCO_2(T)$, estes quatro ensaios parecem subdividirem-se em dois grupos: F3 e F8 com valores superiores relativamente a F9 e F11. A taxa de adição de substrato é superior em F3, sendo praticamente a mesma em F8 e F9, e menor em F11, seguindo o mesmo comportamento do parâmetro OURmed, embora as diferenças

possam não ser tão visíveis. Os valores de TCA e de TCEA são muito semelhantes entre estes quatro ensaios. É curioso salientar que, embora tenha sido no ensaio F3 que foi consumido mais substrato por unidade de tempo, a taxa específica de consumo de acetato é superior no ensaio F11, sendo o ensaio com menor quantidade de biomassa inicial, menor OUR_{med} e menor coeficiente de rendimento celular.

Os ensaios F1, F5 e F3 fazem parte do grupo de ensaios onde se utilizou solução de alimentação (acetato) com uma concentração de 12 g/L, expressa em ácido acético, e quantidade inicial de biomassa entre 1000 e 2000 mg em SSV. O ensaio F3, embora tenha sido analisado no grupo anterior é igualmente inserido neste grupo, pelo facto do seu valor de X_0 ser aproximadamente 1000 mg. Neste grupo de ensaios, do reator “Fed-batch” Proporcional, a taxa de crescimento observada é superior no ensaio realizado com a maior quantidade de biomassa, embora o menor valor da taxa não corresponda ao ensaio com menor quantidade de biomassa. A sequência observada para o parâmetro μ_{obs} : F1>F3>F5, verifica-se igualmente para o coeficiente de rendimento celular e varia inversamente para o parâmetro OURE_{med}. A ordem: F1<F3<F5, é observada na TPCO₂(T) e na TCEA. Quanto à taxa de consumo de oxigénio média (OUR_{med}), o seu valor é praticamente o mesmo nos ensaios F1 e F3, sendo superior em F5, comportamento também verificado para a TAS. A TPCO₂(G) é superior em F5 e o menor valor verifica-se no ensaio F3.

Os ensaios F7 e F10 diferem em aproximadamente 100 mg na quantidade inicial de biomassa expressa em SSV, verificando-se a maior quantidade no ensaio F7. À excepção dos parâmetros μ_{obs} e $Y_{(X/S)}$ verifica-se que os valores superiores ocorrem em F7. Nestes ensaios foi utilizado solução de alimentação com 6 g/L, expressa em ácido acético.

No grupo de ensaios com solução de alimentação (acetato) com uma concentração de aproximadamente 6 g/L, expressa em ácido acético, e uma quantidade de biomassa inicial entre 1000 e 2000 mg, em SSV encontram-se os ensaios F2 e F6, tendo F6 menor quantidade inicial de biomassa do que F2. No entanto, quando se avaliam os parâmetros referentes ao consumo de oxigénio, os valores são superiores em F6. Embora a viabilidade da biomassa possa ser avaliada pela taxa de consumo de oxigénio, ou pela

evolução da produção de dióxido de carbono, as $TPCO_2(G)$ e $TPCO_2(T)$ apresentam uma sequência contrária, verificando-se que em F2 os valores são superiores aos que ocorreram no ensaio F6. A ordem anteriormente referida é também verificada no coeficiente de rendimento celular e na taxa de crescimento celular. Para os restantes parâmetros, F6 apresenta valores superiores a F2.

Para uma primeira análise comparativa entre os valores obtidos nos ensaios em reactor “Fed-batch” Proporcional e reactor “Fed-batch” Aberto, apresenta-se uma análise gráfica nas Figuras 5.14. e 5.15, que inclui os parâmetros μ_{obs} , $Y(X/S)$, q_{obs} , OUR_{med} , $OURE_{med}$, TCA e TCEA.

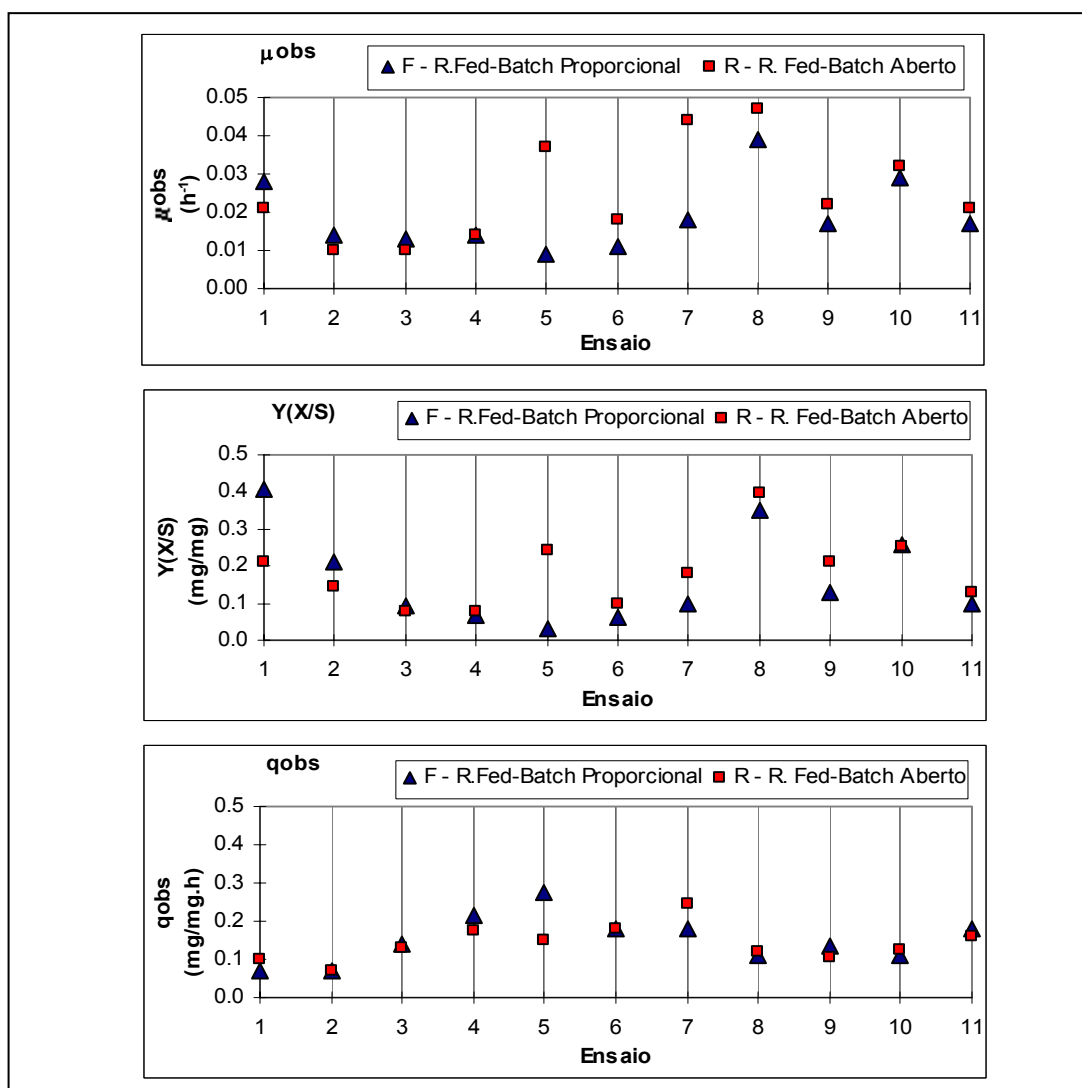


Figura 5. 14 - Comparação entre o reactor “Fed-batch” Proporcional e o reactor “Fed-batch” Aberto através dos valores observados dos parâmetros μ_{obs} , $Y(X/S)$, e q_{obs}

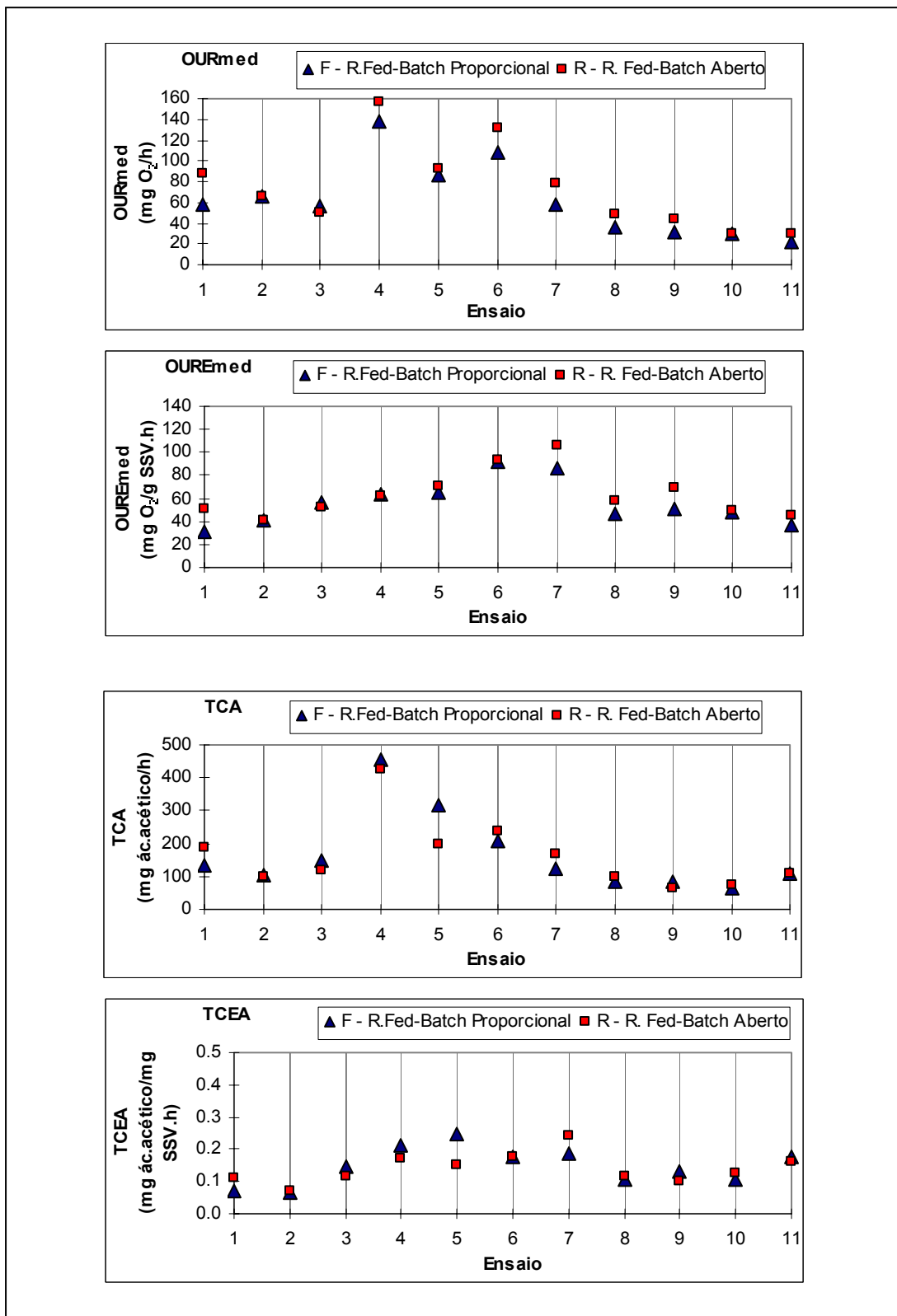


Figura 5.15 - Comparação entre o reactor “Fed-batch” Proporcional e o reactor “Fed-batch” Aberto através dos valores observados dos parâmetros OURmed, OUREmed, TCA, e TCEA

A análise dos gráficos da Figura 5.14 permite observar diferenças entre os valores obtidos nos dois reactores. Numa primeira análise, a taxa específica de crescimento observada (μ_{obs}) parece apresentar maiores diferenças, apesar das escalas utilizadas na figura serem distintas. Parece portanto, necessário averiguar se estas diferenças são significativas. Para esse efeito apresenta-se no ponto seguinte, uma análise estatística.

Na Figura 5.15 faz-se o mesmo tipo de análise comparativa, através dos parâmetros que representam a viabilidade e a actividade dos microrganismos (consumo de oxigénio e consumo de substrato). Também para estes parâmetros os valores obtidos nos dois reactores não são exactamente iguais, parecendo, como era esperado, que as diferenças são inferiores quando a avaliação é realizada por unidade de massa de microrganismos.

5.1.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os testes de biodegradabilidade têm como objectivo último a determinação de parâmetros cinéticos. Nesta óptica, será necessário garantir que potenciais efeitos de inibição não interferem na determinação destes parâmetros no reactor “Fed-batch” Proporcional, de forma a validar qualquer conclusão que se pretenda retirar deste estudo. Para o efeito realizou-se uma análise estatística e comparativa entre os ensaios realizados em reactor “Fed-batch” Proporcional (Fechado) e o reactor “Fed-batch” Aberto, com os resultados que se indicam no Quadro 5.1.

Apresenta-se assim os resultados da análise estatística não paramétrica realizada, utilizando os dados provenientes dos ensaios “Fed-batch” Proporcional (Fechado) e dos ensaios “Fed-batch” Abertos, designando por F e por R respectivamente, as amostras provenientes daqueles reactores.

Os testes estatísticos realizados foram os seguintes:

- Correlação de Spearman
- Teste de U de Mann-Whintney

- Teste H de Kruskal-Wallis
- Teste de Wilcoxon
- Teste de Homogeneidade
- Teste de Kolmogorov-Smirnov para duas amostras

Quadro 5.1- Parâmetros Cinéticos dos ensaios “Fed-batch”

Ensaio	μ_{obs} h ⁻¹	q_{obs} g ác.ac./gSSV.h	TCEA mg ác.ac./gSSV.h	$Y_{(X/S)}$ mg/mg	OURmed mg O ₂ /h	OURMed mg O ₂ /gSSV.h	OURend mg O ₂ /h
F1	0.028	0.069	69.14	0.407	57.88	30.49	58.8
R1	0.021	0.100	110.53	0.213	87.16	50.65	12.0
F2	0.014	0.068	66.09	0.212	65.64	41.66	6.1
R2	0.010	0.070	69.89	0.146	66.43	40.75	7.3
F3	0.013	0.140	148.06	0.095	57.25	56.70	19.4
R3	0.010	0.128	115.59	0.076	50.16	52.75	10.5
F4	0.014	0.213	211.95	0.067	138.06	63.32	25.9
R4	0.014	0.175	173.63	0.078	157.34	62.66	15.1
F5	0.009	0.275	246.60	0.031	86.00	65.60	14.7
R5	0.037	0.152	152.26	0.241	92.94	70.76	15.0
F6	0.011	0.179	176.98	0.061	107.64	91.24	29.5
R6	0.018	0.181	178.75	0.100	131.70	92.88	18.7
F7	0.018	0.182	186.02	0.097	58.46	86.05	6.2
R7	0.044	0.243	241.05	0.180	77.74	106.74	8.8
F8	0.039	0.111	108.41	0.351	35.58	46.79	7.0
R8	0.047	0.119	118.50	0.397	48.40	58.28	5.2
F9	0.017	0.134	130.57	0.129	31.31	50.53	6.4
R9	0.022	0.104	101.93	0.209	44.03	69.19	4.1
F10	0.029	0.111	107.41	0.258	29.16	48.54	4.3
R10	0.032	0.127	126.56	0.254	29.93	48.79	8.2
F11	0.017	0.178	175.26	0.097	22.44	36.34	8.2
R11	0.021	0.161	162.56	0.131	29.94	44.67	9.4

Os quadros com os respectivos testes aos parâmetros q_{obs} , μ_{obs} , TCEA, OURmed, OURMed, $Y_{(X/S)}$, e OURend, encontram-se no Anexo V - Análise Estatística.

5.1.3.1 Correlação de Spearman

O teste da Correlação de Spearman serve para mostrar se existe ou não dependência entre as amostras. Para o caso das variáveis testadas, verifica-se que não se aceita a hipótese H_0 de independência entre as amostras para um nível de significância de 0,05, ou seja as amostras são dependentes (Quadro V.1 ao Quadro V.7 – Anexo V).

O quadro seguinte resume o resultado do teste da correlação de Spearman.

Quadro 5.2 – Resumo do teste da Correlação de Spearman

H_0: F e R são amostras independentes		
H_1: F e R são amostras dependentes		
Região de aceitação ($N_{(0,1)}$ para $\alpha = 0,05$): $-1.96 < z < 1.96$		
Parâmetro	z	Conclusão
OURend (mg O ₂ /h)	3.91	Não se aceita H_0
Y(X/S) (mg SSV/mg ác.ac.)	2.78	Não se aceita H_0
μ_{obs} (h ⁻¹)	2.66	Não se aceita H_0
TCEA (mg ác.ac./g SSV.h)	3.86	Não se aceita H_0
q_{obs} (mg ác.ac./mg SSV.h)	4.27	Não se aceita H_0
OURMed (mg O ₂ /g SSV.h)	3.16	Não se aceita H_0
OURmed (mg O ₂ /h)	4.77	Não se aceita H_0

5.1.3.2 Teste U de Mann-Whintney

O teste U de Mann-Whintney permite decidir quanto à existência ou não de diferença entre as amostras, ou equivalentemente, se têm origem ou não na mesma população (Spiegel, 1994).

Para as variáveis em causa, resulta que não se pode rejeitar a não existência de diferença entre os dois reactores (“Fed-batch” Proporcional Aberto e “Fed-batch” fechado) para um nível de significância de 0,05 (Quadros V.8 a V.14 – Quadro V).

O quadro seguinte resume o resultado do teste U de Mann-Whintney.

Quadro 5.3 – Resumo do teste U de Mann-Whitney

Ho: F e R são provenientes de populações com a mesma distribuição		
H1: F e R são provenientes de populações com a mesma distribuição distintas		
Região de aceitação ($N_{(0,1)}$ para $\alpha = 0,05$): $-1.96 < z < 1.96$		
Parâmetro	 z 	Conclusão
OURend (mg O ₂ /h)	0.034	Aceita-se Ho
Y(X/S) (mg SSV/mg ác.ac.)	0.116	Aceita-se Ho
μ_{obs} (h ⁻¹)	0.134	Aceita-se Ho
TCEA (mg ác.ac./g SSV.h)	0.039	Aceita-se Ho
q_{obs} (mg ác.ac./mg SSV.h)	0.056	Aceita-se Ho
OURMed (mg O ₂ /g SSV.h)	0.134	Aceita-se Ho
OURmed (mg O ₂ /h)	0.091	Aceita-se Ho

5.1.3.3 Teste H de Kruskal-Wallis

O teste H de Kruskal-Wallis permite o mesmo tipo de conclusão que o teste anterior, relativa à existência ou não de diferença entre as amostras, até porque como já foi referido no Capítulo 4 - Materiais e Métodos, este teste é uma generalização do teste anterior, para k amostras. Embora alguns autores defendam que o teste se aplica apenas para $k > 2$ (Siegel, 1975), outros nada referem a esse respeito (McBean e Rovers, 1998), pelo que se optou pela realização deste teste para confirmação do resultados do teste anterior.

Os resultados da aplicação do presente teste permitem concluir de modo semelhante ao anterior para todas as amostras das variáveis testadas, ou seja, não se pode rejeitar a não existência de diferença entre os dois reactores (“Fed-batch” Aberto e “Fed-batch” Proporcional Fechado) para um nível de significância de 0,05 (Quadro V.15 a V.21 – Quadro V). Por outras palavras, podemos aceitar a hipótese Ho.

O quadro seguinte resume o resultado do teste H de Kruskal-Wallis.

Quadro 5.4 – Resumo do teste H de Kruskal-Wallis

Ho: F e R partilham a mesma distribuição		
H1: F e R tem distribuições diferentes, dando origem a valores tendencialmente superiores		
Região de aceitação ($\alpha = 0.05$, n.º de graus de liberdade = 1): $H < \chi^2_{(0.95)} = 3.84$		
Parâmetro	H	Conclusão
OURend (mg O ₂ /h)	0.07	Aceita-se Ho
Y(X/S) (mg SSV/mg ác.ac.)	1.39	Aceita-se Ho
μ_{obs} (h ⁻¹)	0.56	Aceita-se Ho
TCEA (mg ác.ac./g SSV.h)	0.09	Aceita-se Ho
q_{obs} (mg ác.ac./mg SSV.h)	0.18	Aceita-se Ho
OUREmed (mg O ₂ /g SSV.h)	1.04	Aceita-se Ho
OURmed (mg O ₂ /h)	0.05	Aceita-se Ho

5.1.3.4 Teste de Wilcoxon

O teste de Wilcoxon utiliza-se em situações em que se pretende testar se uma das variáveis de um par (X,Y) tende ou não a ser superior à outra, para o teste unilateral, e se são idênticas par o teste bilateral.

A aplicação deste teste bilateral revelou que para os parâmetros q_{obs} , $Y_{(X/S)}$, TCEA, μ_{obs} e OURend não se rejeita a hipótese Ho, ou seja não se rejeita a hipótese das amostras (F e R) serem idênticas para um nível de significância de 0,05 (Quadros V.22 a V.28 – Anexo V). No entanto, para os parâmetros OURmed e OUREmed, uma amostra é superior à outra, ou seja, rejeita-se Ho.

O Quadro 5.5 resume o resultado do teste de Wilcoxon.

O facto do OURmed e OUREmed tenderem a ser superiores numa das amostras pode-se igualmente verificar na Figura 5.16.

Quadro 5. 5 – Resumo do teste de Wilcoxon

Ho: $E(X) = E(Y)$ H1: $E(X) \neq E(Y)$ Região de aceitação ($N_{(0,1)}$ para $\alpha = 0,05$): $-1.96 < T < 1.96$		
Parâmetro	T	Conclusão
OUR _{end} (mg O ₂ /h)	-1.25	Aceita-se Ho
Y(X/S) (mg SSV/mg ác.ac.)	1.07	Aceita-se Ho
μ_{obs} (h ⁻¹)	1.60	Aceita-se Ho
TCEA (mg ác.ac./g SSV.h)	-0.27	Aceita-se Ho
q _{obs} (mg ác.ac./mg SSV.h)	-0.36	Aceita-se Ho
OUR _{Emed} (mg O ₂ /g SSV.h)	2.04	Não se aceita Ho
OUR _{med} (mg O ₂ /h)	2.58	Não se aceita Ho

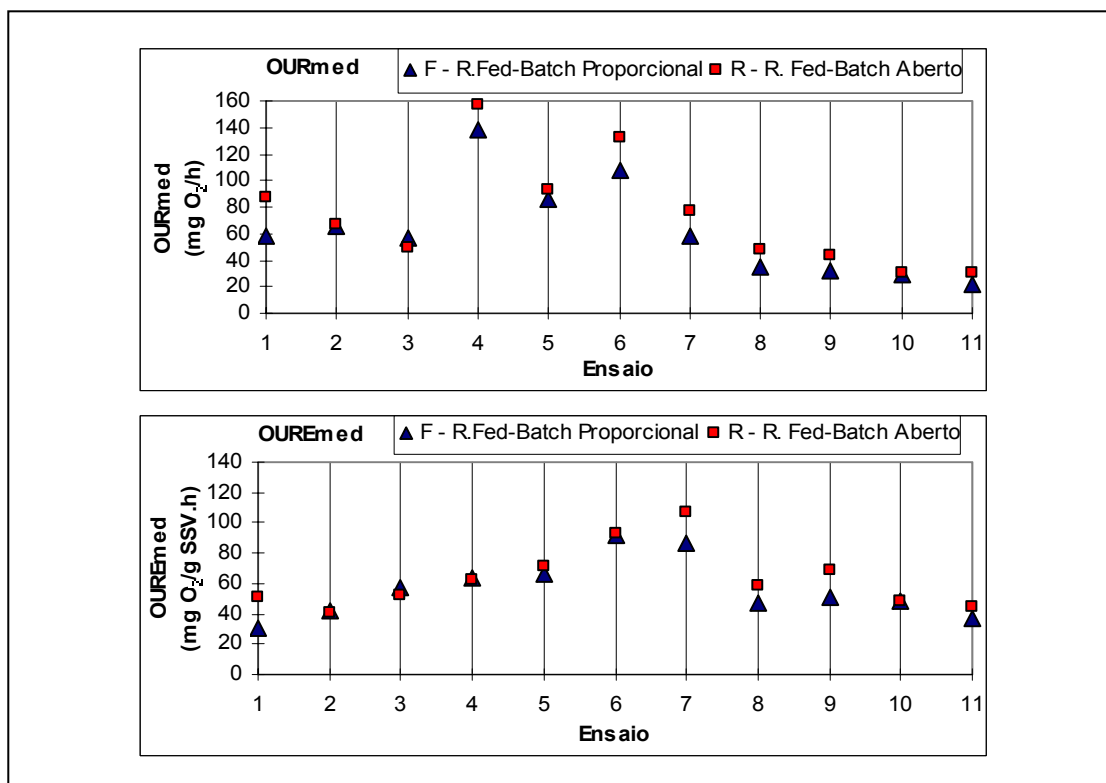


Figura 5. 16 - Comparação dos valores de OUR_{med} e o OURE_{med} em reactor Aberto e em reactor Fechado

Como se pode verificar pela observação de ambos os gráficos, embora os valores sejam muito próximos, em quase todos os ensaios o valor deste parâmetro é superior no reactor aberto. A única excepção é o ensaio 3. As diferenças entre os ensaios abertos e fechados são mais evidente no parâmetro OURmed, o que poderá significar que a diferença entre a viabilidade dos microrganismos que constituem a população em cada reactor é muito diminuta.

5.1.3.5 Teste de Homogeneidade

A aplicação do teste de homogeneidade permite inferir sobre a homogeneidade de duas sub-populações, ou seja, saber se as amostras em causa têm origem na mesma população. Para este ensaio foi considerado que as várias modalidades do atributo A são as diversas condições iniciais de biomassa, o que na prática corresponde a uma modalidade por cada ensaio. As classes da segunda característica - B, designam as sub-populações a estudar, ensaios em reactor “Fed-batch” Proporcional (Fechado) e ensaios em reactor “Fed-batch” Aberto (Quadros V.29 a V.38 - Anexo V).

Embora seja possível concluir que não se pode rejeitar a hipótese H_0 , referente à igualdade entre amostras, os resultados do teste tornam-se um pouco dúbios, dado que permitem conclusões diferentes face à dimensão da grandeza da unidade utilizada. Quer isto dizer que, por exemplo para a variável TCEA, se esta for expressa em mg/gh, rejeita-se H_0 , mas se for expressa em mg/mgh já não se rejeita H_0 . Num teste onde a grandeza da unidade utilizada parece interferir na aplicação do teste, considera-se que será aconselhável expressar estas variáveis em unidades adimensionais, caso seja possível, o que corresponde a aceitar que para a variável TCEA aceita-se H_0 , ou seja tem origem na mesma população. No entanto optou-se por não considerar este teste numa avaliação final.

O Quadro 5.6 resume o resultado do teste de Homogeneidade.

Quadro 5. 6 – Resumo do teste de Homogeneidade

Ho: F e R tem origem na mesma população (homogeneidade)		
H1: F e R não tem origem na mesma população		
Região de aceitação ($\alpha = 0.05$, n.º de graus de liberdade = 10): $\hat{\theta} < \chi^2_{(0.95)} = 18.3$		
Parâmetro	$\hat{\theta}$	Conclusão
OURend (mg O ₂ /h)	25.63	Não se aceita Ho
Y(X/S) (mg SSV/mg ác.ac.)	0.29	Aceita-se Ho
μ_{obs} (h ⁻¹)	0.03	Aceita-se Ho
TCEA (mg ác.ac./g SSV.h)	51.13	Não se aceita Ho
TCEA (mg ác.ac./mg SSV.h)	0.05	Aceita Ho
q_{obs} (mg ác.ac./mg SSV.h)	0.06	Aceita-se Ho
OURemed (mg O ₂ /g SSV.h)	7.68	Aceita-se Ho
OURmed (mg O ₂ /h)	7.70	Aceita-se Ho

5.1.3.6 Teste de Kolmogorov-Smirnov para duas amostras

O teste de Kolmogorov-Smirnov para duas amostras, tem como objectivo tentar descobrir se as amostras podem ou não ser consideradas como provenientes de populações com a mesma distribuição. O teste de Kolmogorov-Smirnov para duas amostras é aplicável desde que a escala de medida seja pelo menos ordinal, embora o teste só seja exacto no caso das variáveis terem natureza contínua.

Para as variáveis estudadas, resulta deste teste que não se rejeita Ho, com um nível de significância de 0,05, ou seja não se pode rejeitar que ambas as amostras pertençam à mesma população (Quadros V.37 a V.43, do Anexo V). O valor crítico é 7 para $n_1 = n_2 = 11$ em teste bilateral (pequenas amostras), ou 0,58 se se considerar que o valor crítico é dado pela expressão $1,36 * \sqrt{\frac{n_1 + n_2}{n_1 * n_2}}$, como é considerado de forma geral por alguns autores (Spielgel, 1994), ou só para grandes amostras como considerou (Siegel, 1975)

O Quadro 5.7 resume o resultado do teste de Kolmogorov-Smirnov.

Quadro 5. 7 – Resumo do teste de Kolmogorov-Smirnov

Ho: F e R são provenientes de populações com a mesma distribuição		
H1: F e R são provenientes de populações com distribuições diferentes		
Região de aceitação ($\alpha = 0.05, N = 11$): $K_D < 6.38^2$		
Parâmetro	D.N	Conclusão
OURend (mg O ₂ /h)	4	Aceita-se Ho
Y(X/S) (mg SSV/mg ác.ac.)	4	Aceita-se Ho
μ_{obs} (h ⁻¹)	4	Aceita-se Ho
TCEA (mg ác.ac./g SSV.h)	3	Aceita-se Ho
q_{obs} (mg ác.ac./mg SSV.h)	3	Aceita-se Ho
OURemed (mg O ₂ /g SSV.h)	3	Aceita-se Ho
OURmed (mg O ₂ /h)	3	Aceita-se Ho

5.1.4 ESTUDO DE INTERDEPENDÊNCIAS ENTRE PARÂMETROS CINÉTICOS

Quando se pretende avaliar parâmetros cinéticos é conveniente garantir o conhecimento uniforme de um conjunto de condições frequentemente conhecidas por “história da cultura”.

Este factor não foi tido em conta, pois para além de não constar das preocupações iniciais que originaram este estudo, também tinha associada a necessidade de grandes quantidades de biomassa necessárias para cada ensaio. Este factor, tornava técnica e, de alguma forma, economicamente pouco viável a existência de um reactor contínuo ou semi-contínuo com biomassa em estado de equilíbrio. Caso se tivesse optado por uma solução deste tipo também se corria o risco da biomassa a utilizar nos últimos ensaios não apresentar as mesmas características que a biomassa dos primeiros, dado que neste caso o factor tempo iria ser determinante, face à necessidade de esperar que a cultura,

após a realização de cada ensaio, atingisse novamente o estado de equilíbrio, uma vez que o facto de se retirar biomassa, mesmo que voltasse a ser novamente introduzida após o ensaio, alteraria a estabilidade da cultura. Atingir o estado de equilíbrio de uma população, num sistema semi-contínuo, pode demorar três a seis vezes a idade de retenção de sólidos (Pitter e Chudoba, 1990).

5.1.4.1 Quantidade de Biomassa *versus* Viabilidade da Biomassa

A quantidade de biomassa existente num determinado ensaio seria, em princípio, um factor determinante na taxa de consumo de cada ensaio. No entanto, a quantidade de biomassa mensurável na determinação dos SSV dificilmente corresponde exclusivamente a biomassa activa e a razão entre a biomassa activa e a quantidade de sólidos biológicos totais pode não ter sido igual em todos os ensaios. Além disso, há ainda que considerar que a viabilidade da biomassa poderá não ser semelhante de ensaio para ensaio.

Esta análise resulta da observação da Figura 5.17, que relaciona a taxa média de consumo de oxigénio, representativo da viabilidade da cultura, em função da quantidade de biomassa inicial (mg).

Na figura é visível uma correlação não muito elevada entre as variáveis, o que justifica que a viabilidade da cultura não era semelhante em todos os ensaios. Na referida figura pode observar-se que em universos menores, ensaios F, ensaios R, ensaios com SAL 6 e ensaios com SAL 12, a correlação não aumenta significativamente, decrescendo mesmo nalguns casos. Quando se agrupam os ensaios em termos do inóculo utilizado, verifica-se que a correlação entre estes dois parâmetros (OURmed e X_o) é maior nos ensaios com inóculo B. No entanto, recorde-se que os ensaios que utilizaram inóculo A, para além de ser em menor número, incluem biomassa que foi congelada e biomassa que foi liofilizada, no seu processo de conservação.

² $K_D = 0.58 \times N$

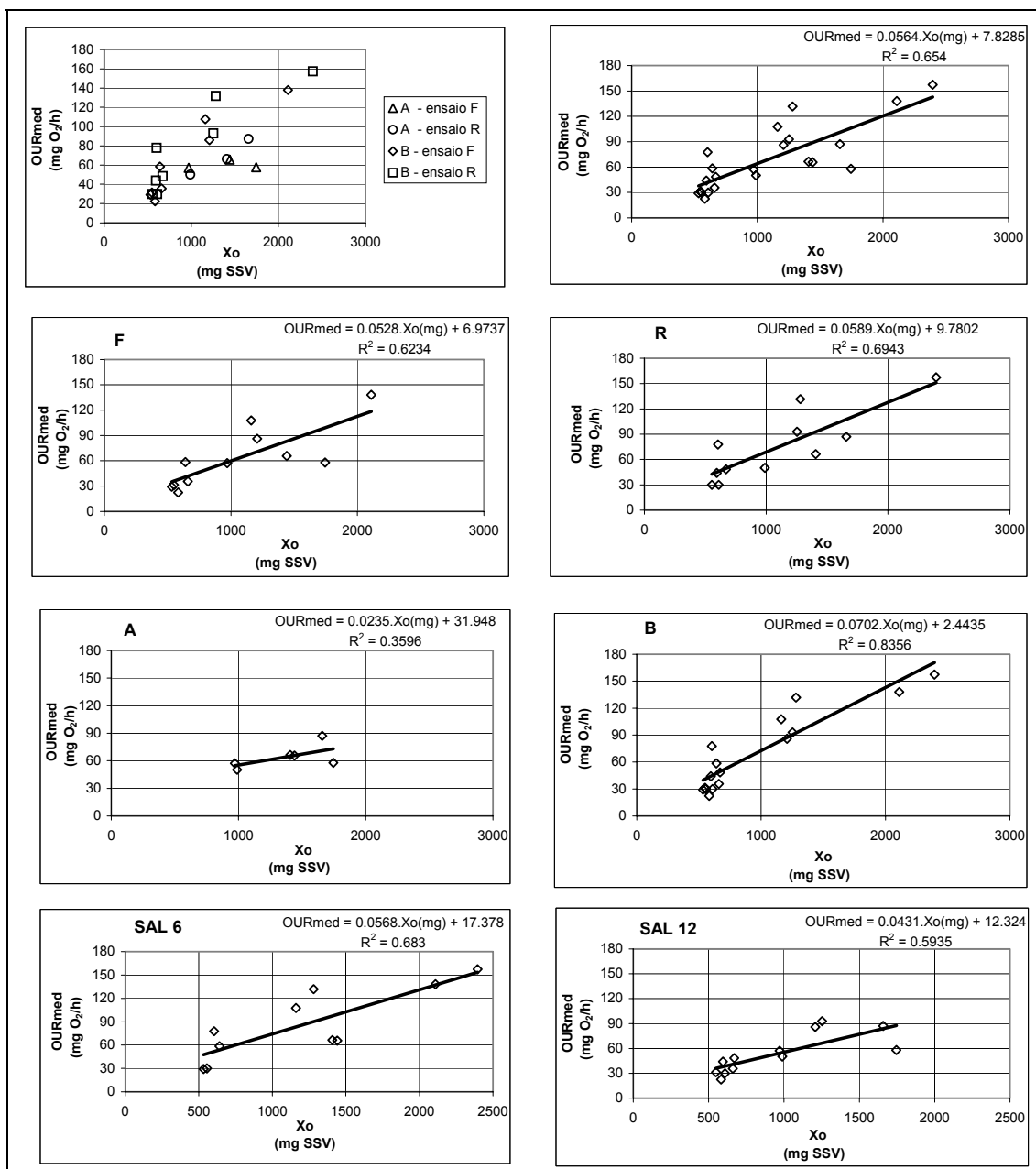


Figura 5.17 - Taxa média de consumo de oxigénio em função da biomassa inicial

5.1.4.2 Taxa de Alimentação versus Taxa de Consumo de Oxigénio

O princípio que originou o desenvolvimento do reactor “Fed-batch” Proporcional, terá sido a utilização da actividade metabólica dos microrganismos como mecanismo que impulsiona a adição de substrato. A conjugação das variáveis implícitas neste princípio pode observar-se na Figura 5.18, ou seja, a relação entre a TAS expressa em

deslocamento de substrato por unidade de tempo e o OURmed. Esta Figura mostra a existência de uma forte correlação, no gráfico referente aos ensaios em reactor “Fed-batch” Proporcional (Fechado - F). Crê-se que a circunstancia da correlação nos ensaios Abertos (R) ser ligeiramente inferior se deve ao facto da adição de substrato ter sido provocada, não correspondendo ao consumo de oxigénio da biomassa destes ensaios, mas dos respectivos ensaios fechados. Com o declive da regressão linear entre o OURmed e a TAS (expressa em cm/h) calcula-se um coeficiente que permite relacionar a Taxa de adição de substrato em função da taxa de consumo de oxigénio da cultura. Este coeficiente apresenta valores semelhantes, quer quando se calcula com base em todos os ensaios em Reactor Fed-batch Proporcional (F), quer nos que resultaram apenas da utilização do inóculo B. Não se apresentam dados relativos ao inóculo A porque se dispunha apenas de três resultados.

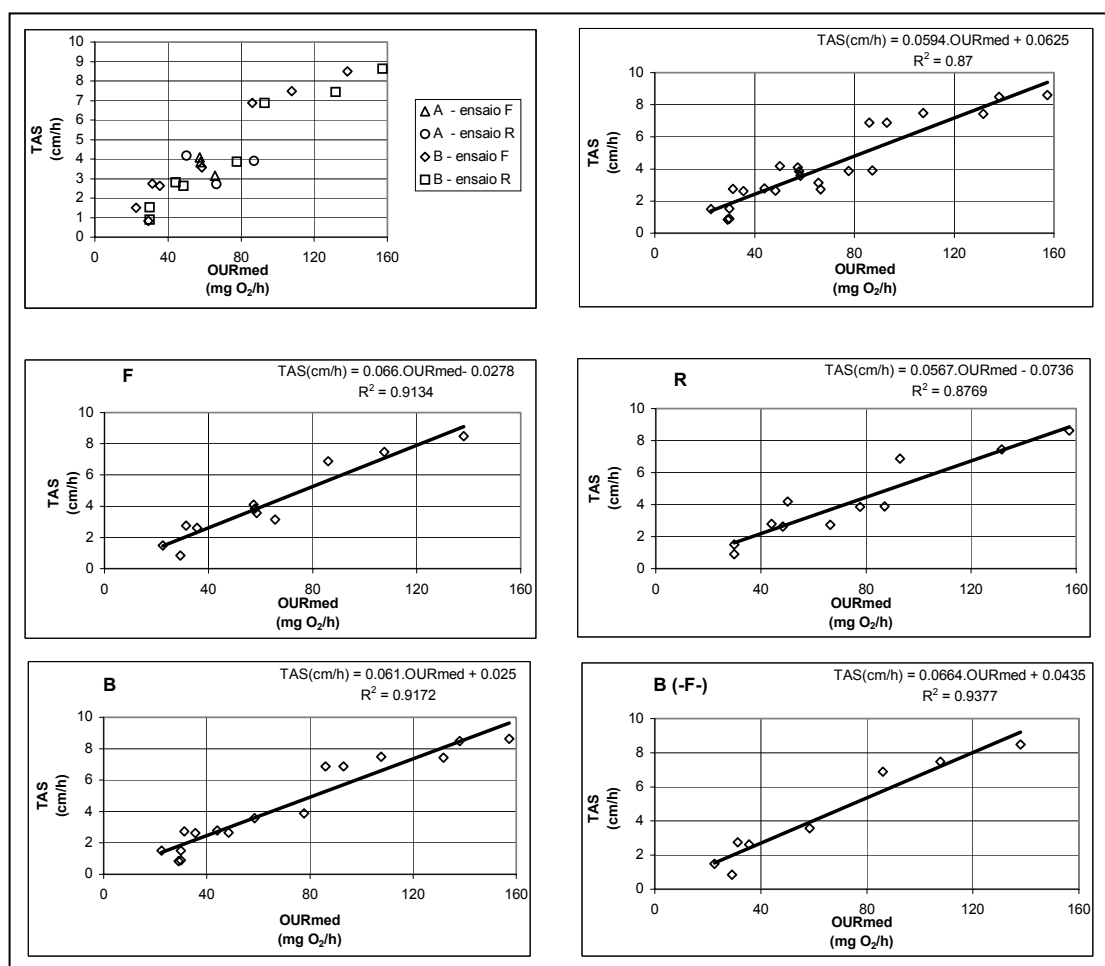


Figura 5.18 - Taxa de adição de substrato em função da Taxa média de consumo de oxigénio

Relativamente à taxa de alimentação, expressa em caudal mássico horário, a correlação com o OURmed só é significativa se a análise for realizada nos sub-grupos SAL 6 e SAL 12, como se pode observar pela Figura 5.19.

Tal como esperado, o declive das rectas com SAL 6 é aproximadamente metade do declive das rectas relativas à SAL 12, ou seja, para adicionar a mesma quantidade de alimento por unidade de tempo, quando se utiliza SAL 6, é necessário que a OURmed seja o dobro de quando se utiliza SAL 12.

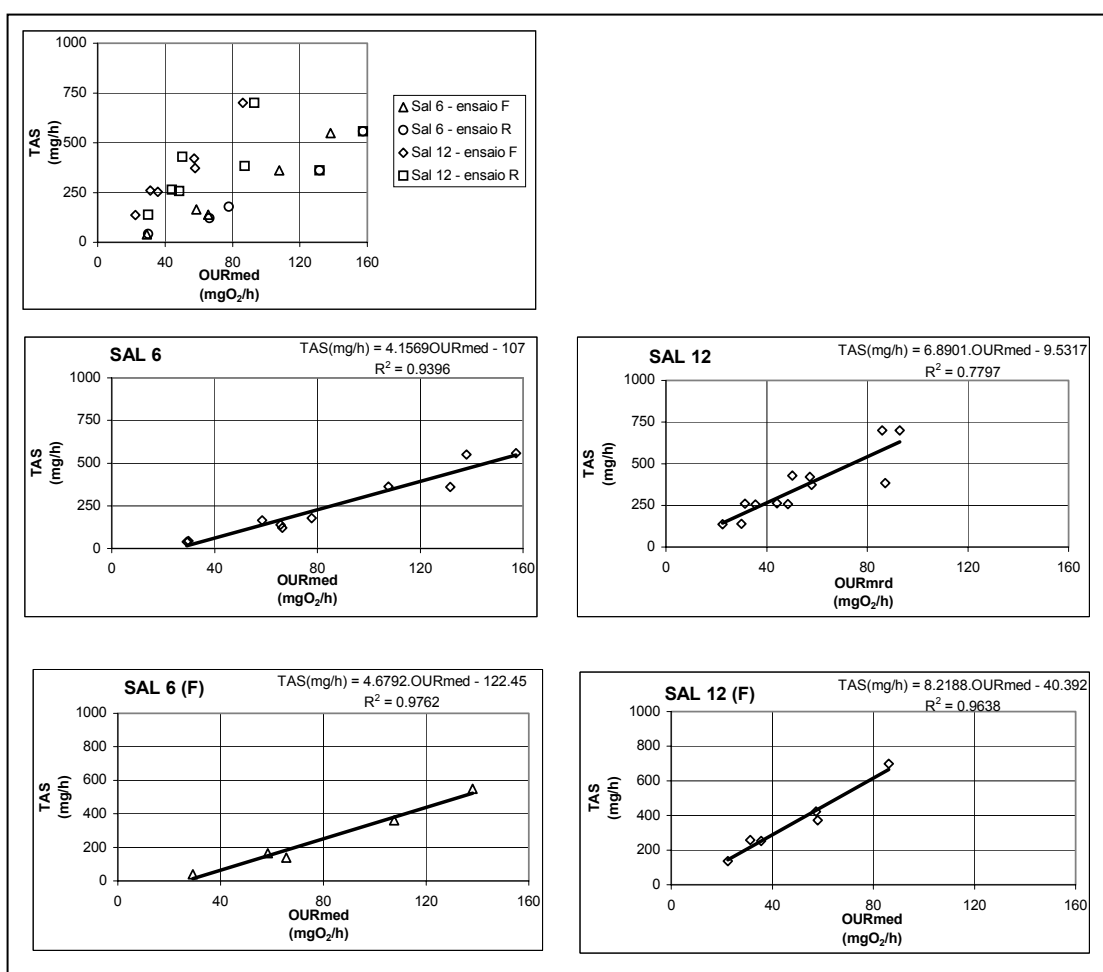


Figura 5.19 - Taxa mássica de adição de substrato em função da taxa de consumo de oxigénio

A Figura 5.20 mostra que o deslocamento do substrato ao longo do ensaio também se relaciona com a taxa de respiração endógena da cultura. A correlação é ligeiramente inferior, uma vez que a actividade da biomassa durante o ensaio é influenciada por outros factores, nomeadamente a quantidade de substrato e de biomassa. Deste gráfico foi retirado o ensaio F1, uma vez que apresentava um valor de OUR_{end} muito elevado. Este valor terá resultado, provavelmente, de erros de medição. Os ensaios com inóculo A não foram analisados separadamente pelos motivos já referidos.

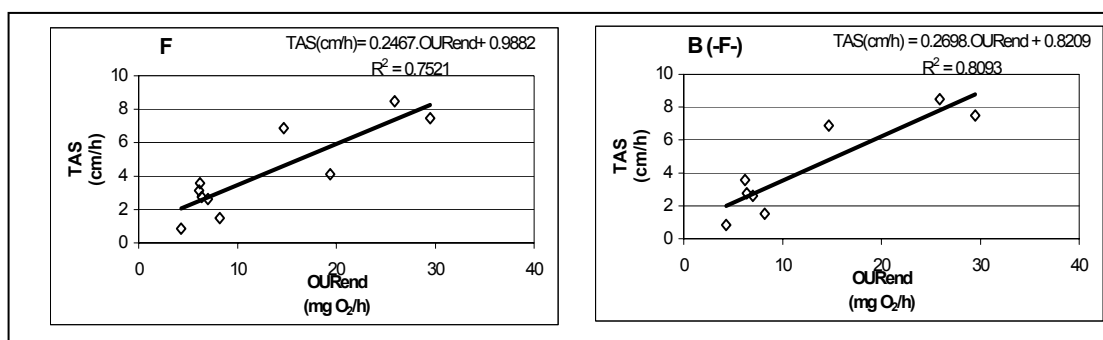


Figura 5. 20 - Taxa de adição de substrato em função da Taxa média de consumo de oxigénio da fase endógena

5.1.4.3 Taxa de Crescimento Específica

Na remoção de substâncias orgânicas realizada por culturas de microrganismos, uma parte dos compostos é oxidada a CO₂ e H₂O (processo catabólico) e outra parte é utilizada para síntese de material de reserva ou novas células (processo anabólico) (Pitter, Chudoba, 1990). O método escolhido para determinação de SSV, através do peso dos sólidos orgânicos, não permite distinguir se as variações detectadas reflectem um aumento do número de indivíduos da população (divisão celular), ou simplesmente um crescimento (“engorda”) das células existentes por incorporação de material de reserva nas células.

A Figura 5.21 relaciona a taxa de crescimento específica com o a taxa específica de consumo de oxigénio.

Quando se compara a taxa de crescimento específica observada com a taxa específica de consumo de oxigênio média, que representa a viabilidade dos microrganismos (Figura 5.21), não se observa nenhuma relação entre estes parâmetros. Esta independência entre estas duas variáveis (taxa de consumo específica de oxigênio e taxa de crescimento) foi também referida por Weddle e Jenkins (1971).

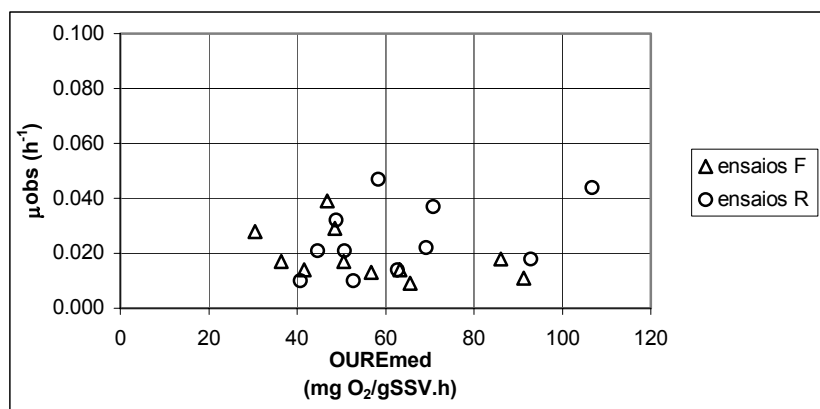


Figura 5.21 - Relação entre a taxa de crescimento específica observada e a taxa específica de consumo de oxigênio média

Nos ensaios em “batch” a relação inicial S_0/X_0 é determinante para a taxa de crescimento dos microrganismos, uma vez que está em causa a existência de substrato para satisfazer as necessidades de manutenção e de crescimento. Quando a razão S_0/X_0 é reduzida, ou seja, o substrato é insuficiente para todas as necessidades dos microrganismos, em princípio, satisfazem-se apenas as necessidades de manutenção.

No caso dos ensaios realizados no âmbito deste estudo, ensaio “Fed-batch”, uma vez que se verificava em todos eles uma acumulação de substrato, considera-se que não terão existido limitações de substrato para satisfazer ambas as necessidades. Analisando a relação entre a taxa de crescimento e a razão S_0/X_0 para os ensaios deste estudo, parece existir uma tendência de linearidade entre estas duas variáveis, embora com uma correlação muito fraca. Esta relação mostra que quanto maior é a razão S_0/X_0 , ou seja quanto maior for a quantidade de substrato inicialmente disponível, maior a taxa de

crescimento específico de microrganismos observada, como se pode observar na Figura 5.22.

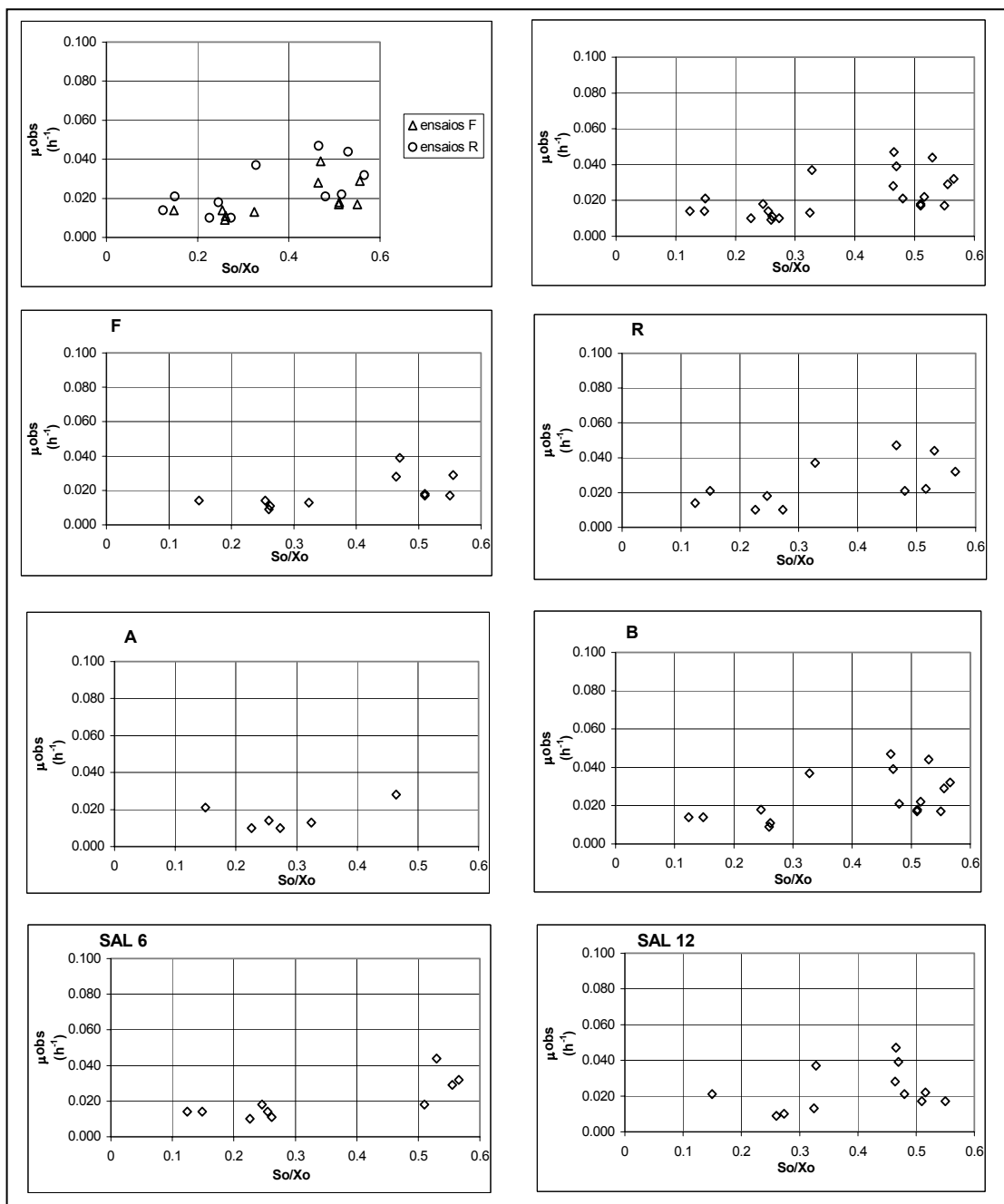


Figura 5.22 - Relação entre taxa de crescimento específica e a razão inicial So/Xo

5.1.4.4 Taxa Específica de Consumo de Substrato

A taxa específica de consumo de um determinado substrato é um dos parâmetros que traduzem a actividade dos microrganismos.

A razão entre a taxa de crescimento e o rendimento celular corresponde à taxa de consumo específico observado ($q_{obs} = \mu_{obs}/Y_{(X/S)}$). O valor desta constante cinética foi igualmente calculado com base no consumo de substrato (acetato) verificado ao longo dos ensaios (TCEA), pela diferença entre a taxa de alimentação e a acumulação de substrato (acetato) no reactor. Se se compararem os gráficos da Figura 5.23, que apresenta o consumo específico calculados por estes dois métodos, verifica-se que os valores obtidos são praticamente iguais. No primeiro gráfico verifica-se que na maioria dos casos os valores quase se sobrepõem e o declive da curva do segundo gráfico é aproximadamente 1. Considera-se que esta análise permite validar os cálculos efectuados.

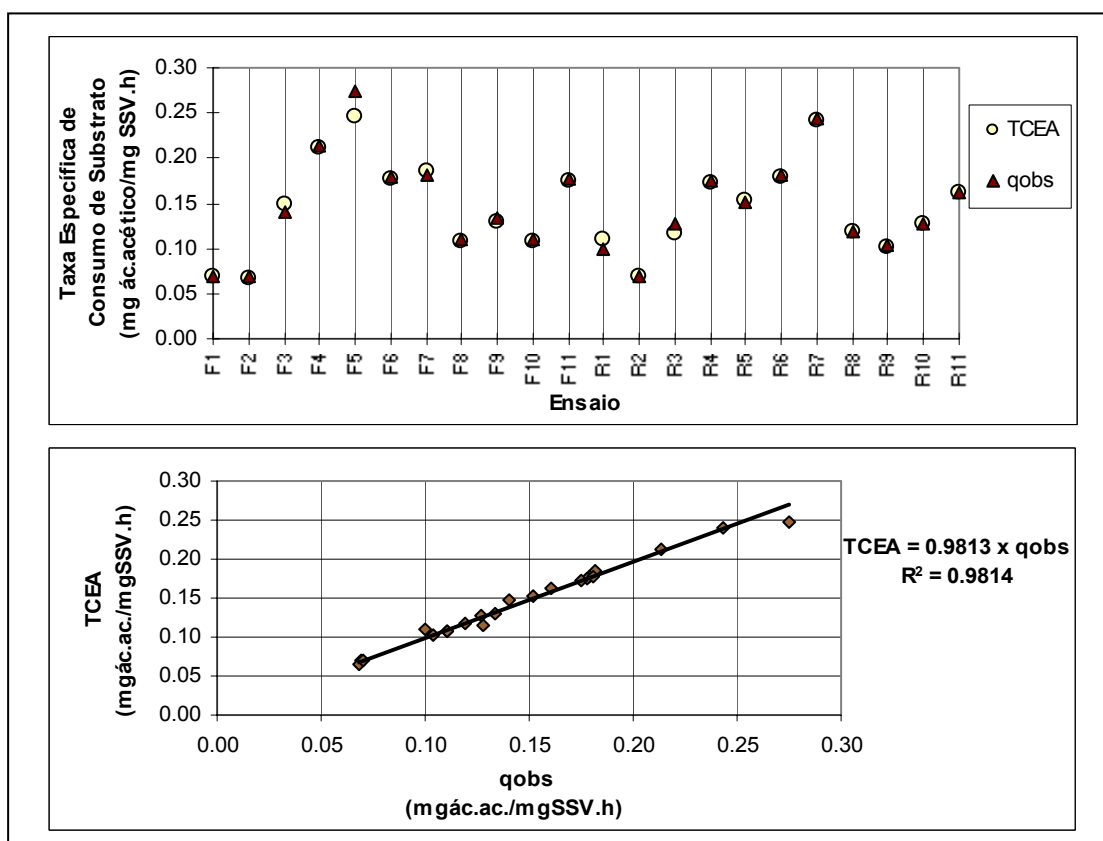


Figura 5. 23 - Comparação dos valores obtidos por dois métodos de cálculo diferentes para a taxa específica de consumo de acetato

Com os gráficos das Figuras 5.24 e 5.25 pretende efectuar-se a análise comparativa da taxa específica de consumo de substrato, correspondendo ao declive da linearização dos valores da variável μ_{obs} em função de $Y_{(X/S)}$ ($y=mx$) (Pitter e Chudoba, 1990).

$$\mu_{\text{obs}} = qY_{(X/S)} \Leftrightarrow q = \mu_{\text{obs}}/Y_{(X/S)} \quad (5.1)$$

Nelson e Lawrence (1980) aplicam igualmente o método da linearização, não considerando a obrigatoriedade de a recta passar na origem, ou seja calculando a taxa do coeficiente endógeno. As conclusões que se apresentam a seguir, no que respeita à comparação das taxas de consumo específico, são semelhantes para qualquer dos métodos utilizados.

Na Figura 5.24 mostra-se a análise dos valores da taxa de consumo de substrato, tendo em conta as várias situações iniciais consideradas neste estudo. Pela análise da figura referida pode-se observar que a taxa específica média de consumo de substrato é:

- superior nos ensaios abertos relativamente aos ensaios fechados;
- superior para o inóculo B relativamente ao A;
- praticamente igual, quer se utilize SAL 6 ou SAL 12.

Embora segundo os testes estatísticos se tenha demonstrado que não existia diferença na taxa específica de consumo de substrato entre os ensaios F e R, segundo a análise dos gráficos parece verificar-se que os valores da taxa específica média de consumo de substrato relativa aos ensaios em reactor “Fed-batch” Aberto são ligeiramente superiores como se mostra nas Figuras 5.24 e 5.25. Deste modo, optou-se por calcular a taxa de consumo específico também pela média das taxas de consumo específicas de cada ensaio. Deste cálculo resultou que não há alterações significativas entre os ensaios em Fed-batch proporcional e ensaios em reactor aberto, comprovando o resultado dos ensaios estatísticos. A comparação entre os valores da taxa específica média de consumo de substrato observados encontra-se resumida no Quadro 5.8. É no entanto de referir que as correlações, do método de linearização, são baixa, principalmente no que respeita aos ensaios com SAL 6.

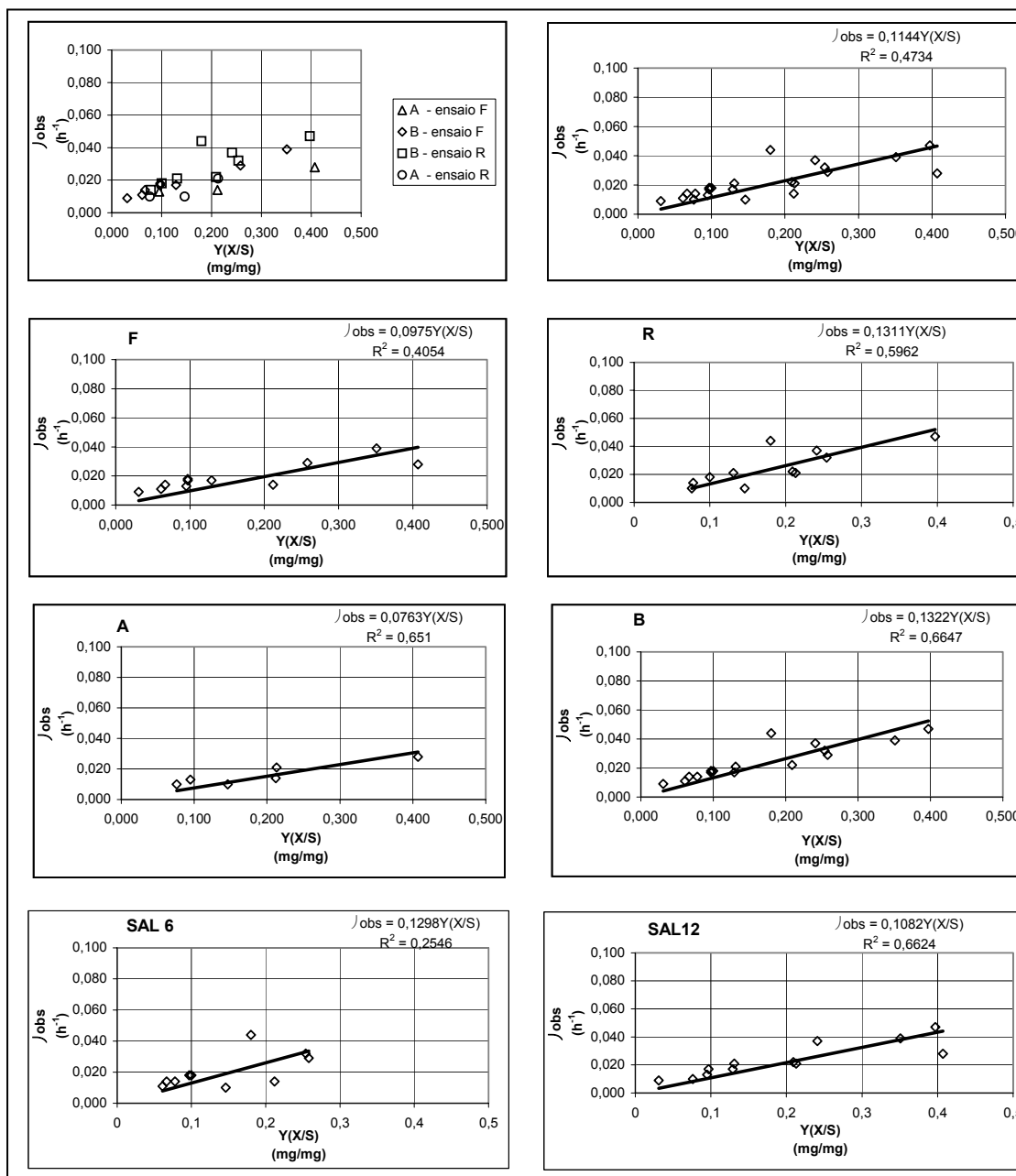


Figura 5.24 – Taxa específica de crescimento observada em função do rendimento celular

Quanto à comparação dos valores da taxa específica média de consumo de substrato em função da concentração da solução de alimentação utilizada – método da linearização, verifica-se que os valores da taxa específica de consumo são praticamente iguais, embora sejam ligeiramente superiores quando se utiliza SAL com 6 g/L, expressa em ácido acético. Os valores da taxa específica de consumo observados são igualmente resumidos no Quadro 5.9. No entanto, as correlações relativamente aos ensaios com

SAL 6 são reduzidas. A análise relativa à concentração da solução de alimentação não foi realizada para os ensaios com inóculo A devido ao seu reduzido número.

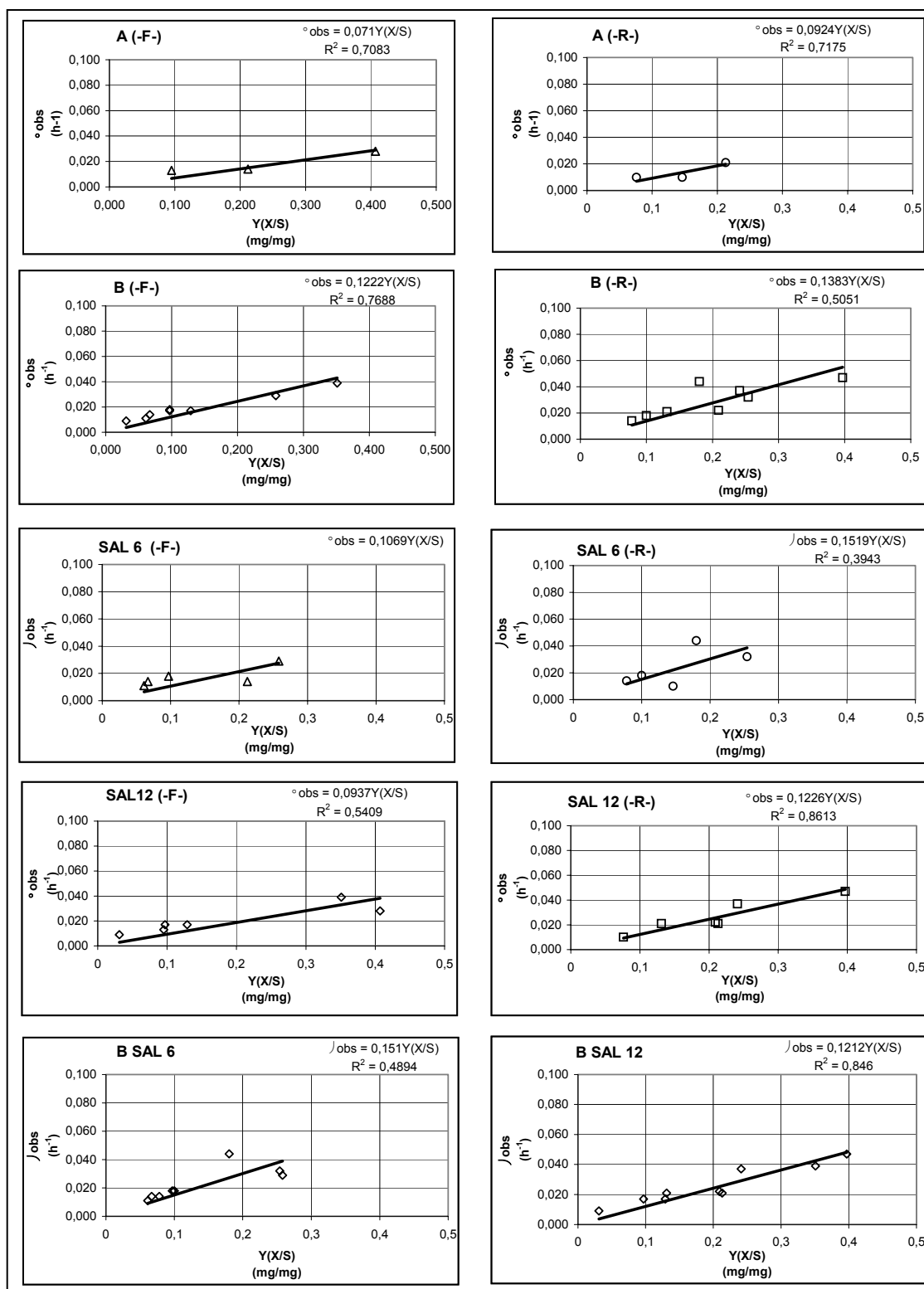


Figura 5.25-Taxa específica de crescimento observada em função do rendimento celular

Quadro 5.8 - Valores comparativos de q_{obs} média entre o Reactor “Fed-batch” Proporcional e o reactor “Fed-batch” Aberto

Grupos de ensaios	Taxa específica média de consumo de substrato			
	Método linearização (Pitter e Chudoba, 1990)		Média aritmética das taxas de consumo de cada ensaio	
	“Fed-batch” Proporcional	“Fed-batch” Aberto	“Fed-batch” Proporcional	“Fed-batch” Aberto
	0,0975	0,1311	0,1509	0,1418
A _c e A _l	0,0710	0,0924	0,0923	0,0993
B	0,1222	0,1383	0,1729	0,1578
SAL 6	0,1069	0,1519	0,1350	0,1553
SAL 12	0,0973	0,1226	0,1512	0,1273

Quadro 5.9 - Valores comparativos de q_{obs} média entre os ensaios com SAL 6 e SAL 12

Grupos de ensaios	Taxa específica média de consumo de substrato			
	Método linearização (Pitter e Chudoba, 1990)		Média aritmética das taxas de consumo de cada ensaio	
	SAL 6g ác.ac./L	SAL 12g ác. ac./L	SAL 6g ác.ac./L	SAL 12g ác. ac./L
	0,1298	0,1082	0,1451	0,1393
Ensaio F	0,1069	0,0973	0,1350	0,1512
Ensaio R	0,1519	0,1226	0,1553	0,1273
A _c e A _l	-	-	-	-
B	0,1510	0,1212	0,1705	0,1543

5.1.4.5 Interdependência com a Taxa de Consumo de Substrato (Acetato)

O consumo de substrato (acetato), única fonte de carbono fornecida aos microrganismos, reflecte a actividade da cultura de microrganismos, podendo ser também interpretada como uma resposta da viabilidade da biomassa, como tal esperando-se que se relacione com a taxa de consumo de oxigénio. Esta relação pode ser observada na Figura 5.26, ou seja, quanto maior o OURmed maior o consumo de substrato (acetato) durante o ensaio (TCA). A correlação reduzida entre os valores

resultantes dos ensaios com inóculo A, resultar do reduzido número de ensaios pertencentes a este sub-grupo.

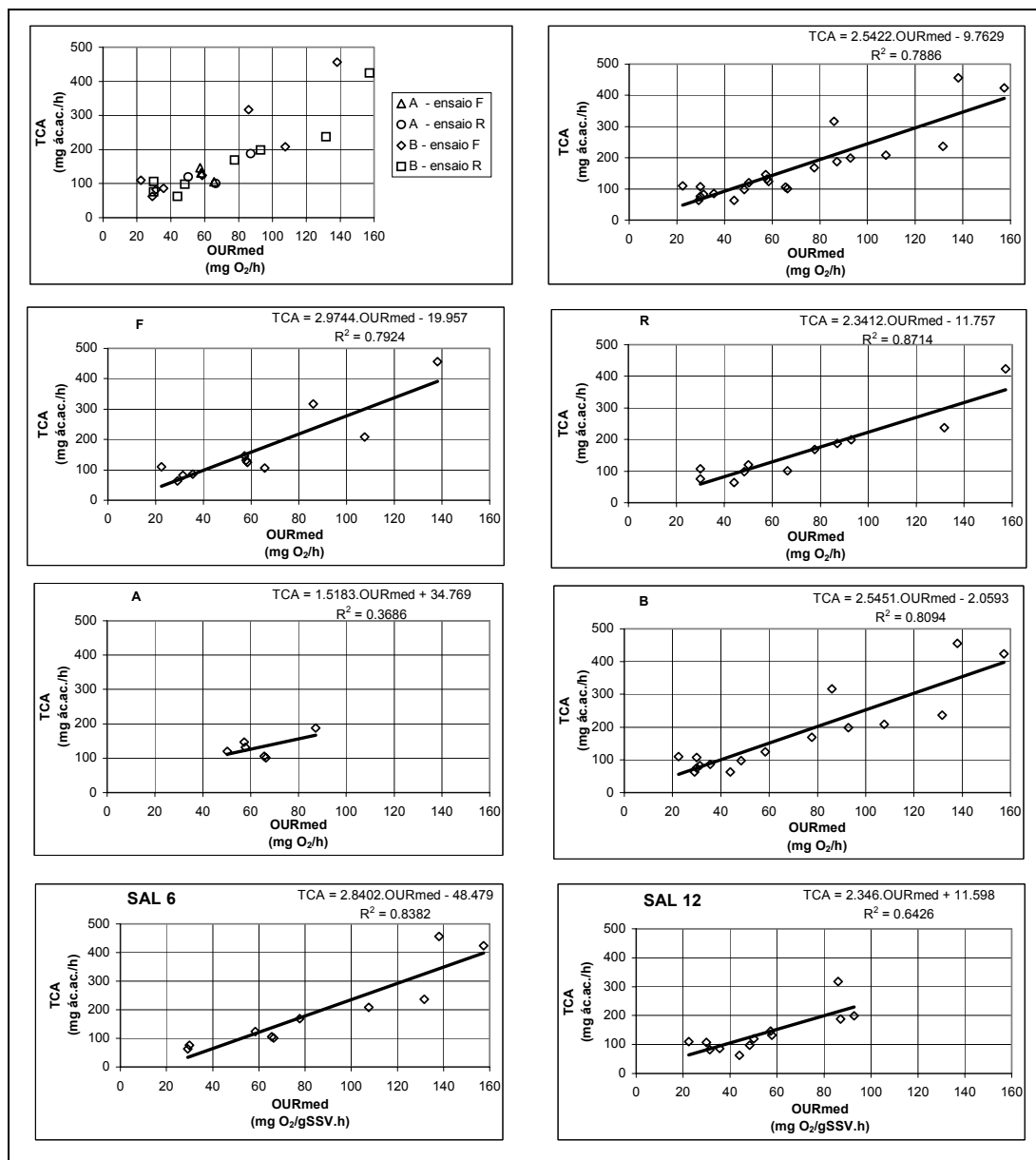


Figura 5.26 - Taxa de consumo de substrato (acetato) em função da Taxa média de consumo de oxigénio durante o ensaio

Para avaliar em termos da taxa de consumo específica de substrato (acetato), calculada com base na diferença entre a taxa de alimentação e o substrato (acetato) acumulado no reactor, que corresponde ao consumo por unidade de massa de microrganismos, terá de se ter em conta a taxa específica de consumo de oxigénio. Como se pode observar pela

Figura 5.27, parece existir uma tendência de correlação entre estas duas variáveis, embora não muito elevada

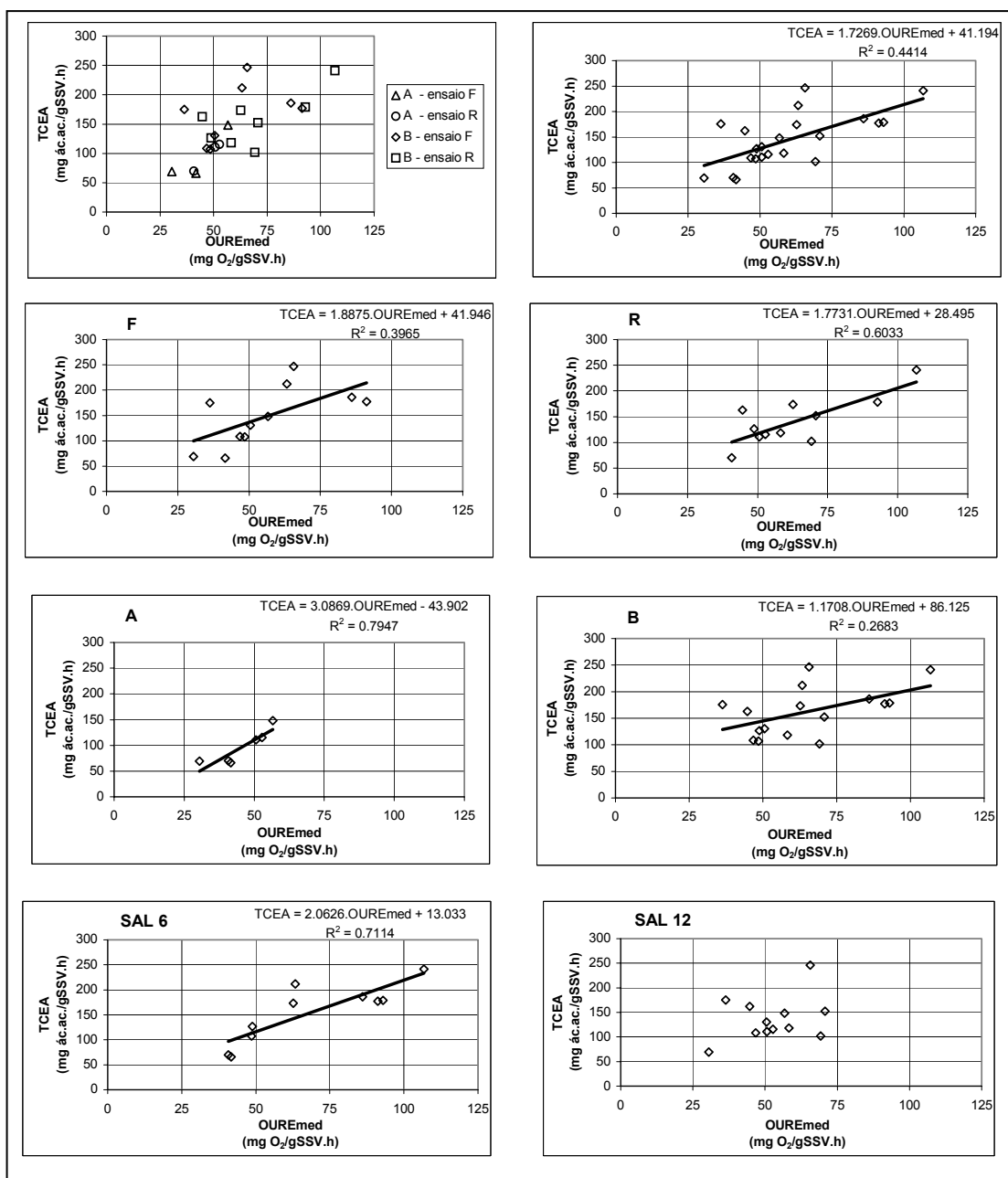


Figura 5.27 - Taxa de consumo específico de substrato (acetato) em função da Taxa média específica de consumo de oxigénio

Na Figura 5.18 observa-se uma correlação elevada entre a taxa de adição de substrato (TAS cm/h) e a taxa de consumo de oxigénio média da cultura, parâmetro que traduz a

viabilidade da cultura. O parâmetro OURmed apresenta também uma correlação elevada com a Taxa de consumo de substrato (acetato) (TCA), como se observou na Figura 5.26. Portanto, será de esperar que os parâmetros TCA e TAS (cm/h) também se correlacionem, circunstancia que pode ser confirmada pela análise do primeiro gráfico da Figura 5.28. Esta figura permite ainda observar que quando a TAS é expressa por caudal mássico parece existir uma divisão entre os resultados. Essa relação representa a sub-divisão em ensaios com solução de alimentação com uma concentração de 6 g/L e com 12g /L, expressa em ácido acético, como pode ser observado mais facilmente na Figura 5.29.

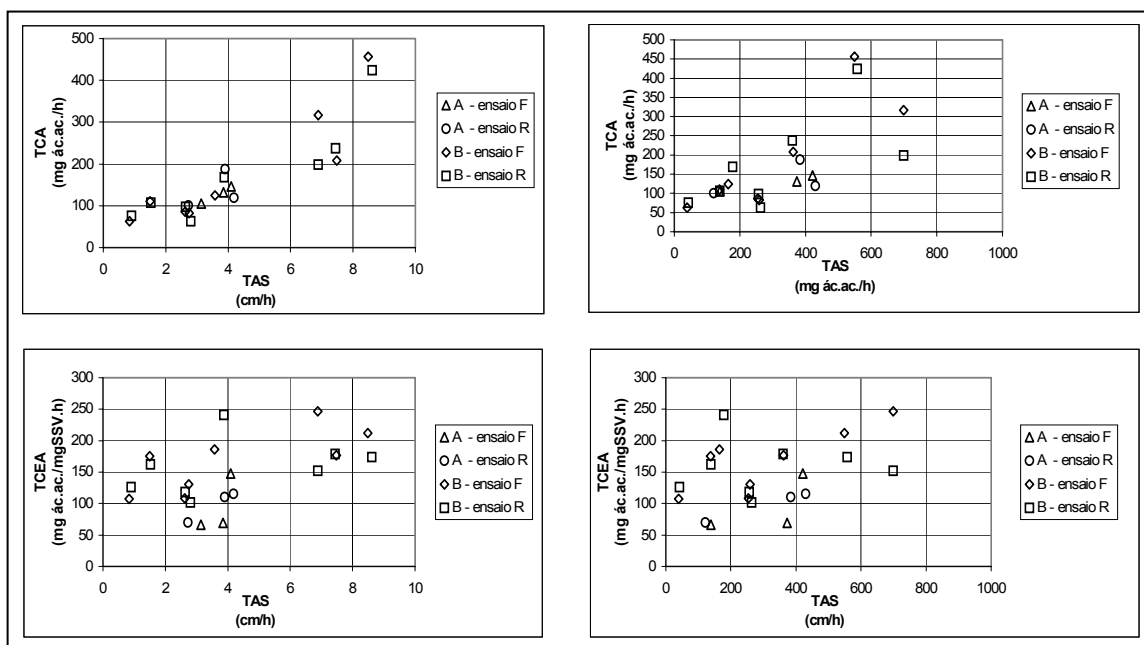


Figura 5.28 - Relação entre a adição de substrato e as taxas de consumo de acetato

Ressalta ainda da Figura 5.28, que a taxa específica de consumo de acetato não se relaciona com a taxa de adição de substrato.

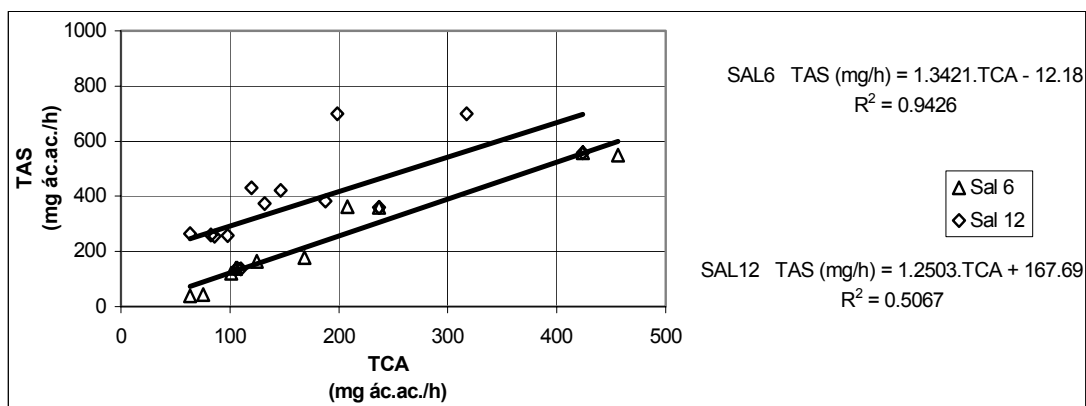


Figura 5.29 - Relação entre a TCA e a TAS (mg/h) em função da concentração de substrato (acetato) na Solução de alimentação

5.1.4.6 Taxa de Produção de Dióxido de Carbono

A análise do efeito do dióxido de carbono só é realizada para os ensaios fechados, uma vez que este parâmetro não foi medido nos ensaios abertos.

A viabilidade da biomassa pode ser expressa em função da taxa de consumo de oxigénio, assim como da taxa de produção de CO₂. Na primeira análise realizada neste estudo utilizou-se a produção de dióxido de carbono para identificar possíveis efeitos de inibição. Nesta fase relaciona-se a taxa de produção de CO₂, na fase gasosa e total, com o valor médio da taxa de consumo de oxigénio, permitindo verificar se a viabilidade da biomassa pode ser representada por qualquer um destes parâmetros. A Figura 5.30 não revela uma correlação muito acentuada entre estes parâmetros. O ensaio que apresenta uma taxa de produção de CO₂ menor para valores de OURmed superiores a 120mg/L, é o ensaio F4.

A Figura 5.31 apresenta a relação entre a taxa de produção de CO₂ (na fase gasosa e total) e a taxa de consumo de oxigénio média, para cada inóculo utilizado.

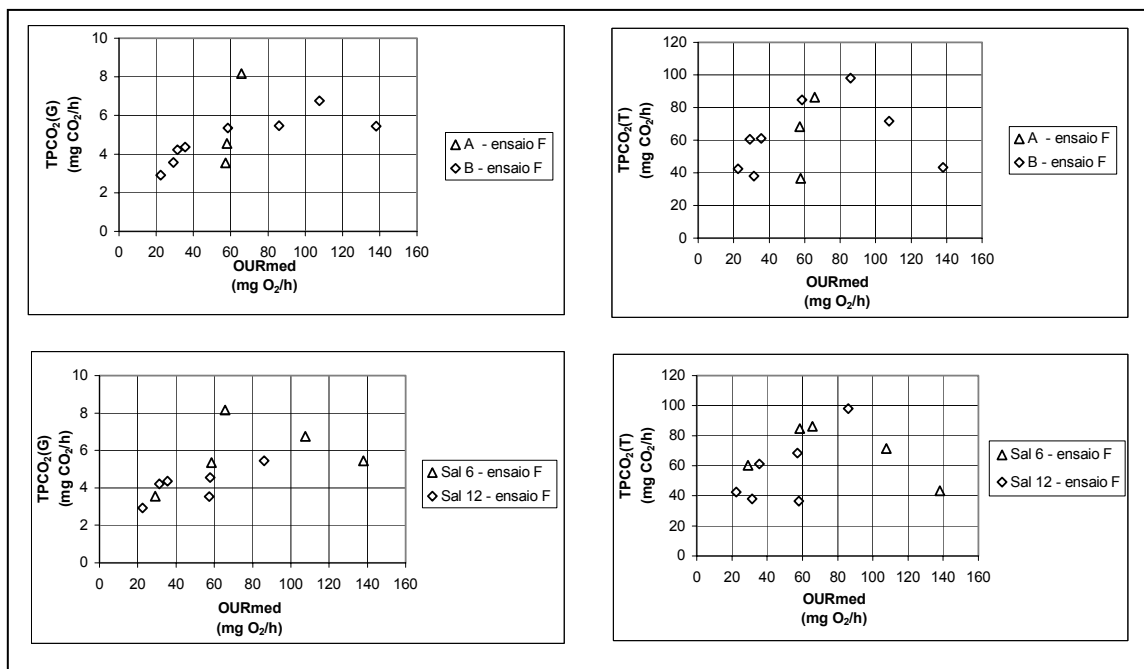


Figura 5.30 - Taxa de Produção de dióxido de Carbono (na fase gasosa e total) em função da taxa de consumo de oxigênio

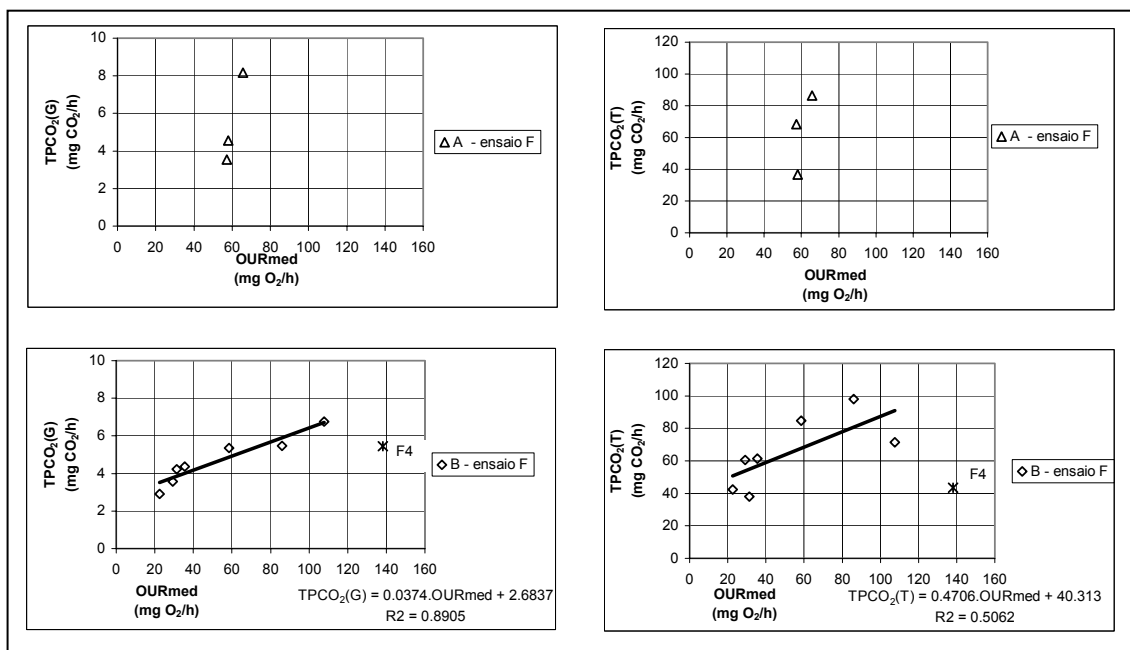


Figura 5.31- Taxa de Produção de Dióxido de Carbono (na fase gasosa e total) em função da taxa de consumo de oxigênio para diferentes inóculos

Por outro lado, a Figura 5.31 mostra que quando a análise é realizada por sub-grupos, correspondentes ao diferentes inóculos, pelo menos relativamente à Taxa de Produção de Dióxido de Carbono na fase gasosa se verificam correlações significativas entre esta variável e a taxa média de consumo de oxigénio.

Dado que o coeficiente de respiração QR é o quociente entre o $TPCO_2(T)$ e o OUR, e este fornece informação relativa ao metabolismo da cultura (Ferreira *et al.*, 1998), as figuras anteriores mostram que nos vários ensaios, as culturas apresentavam diferenças ao nível das suas vias metabólicas.

As Figura 5.32 e 5.33 apresentam a relação entre a taxa de produção de dióxido carbono, na fase gasosa e total, e a taxa de consumo de acetato.

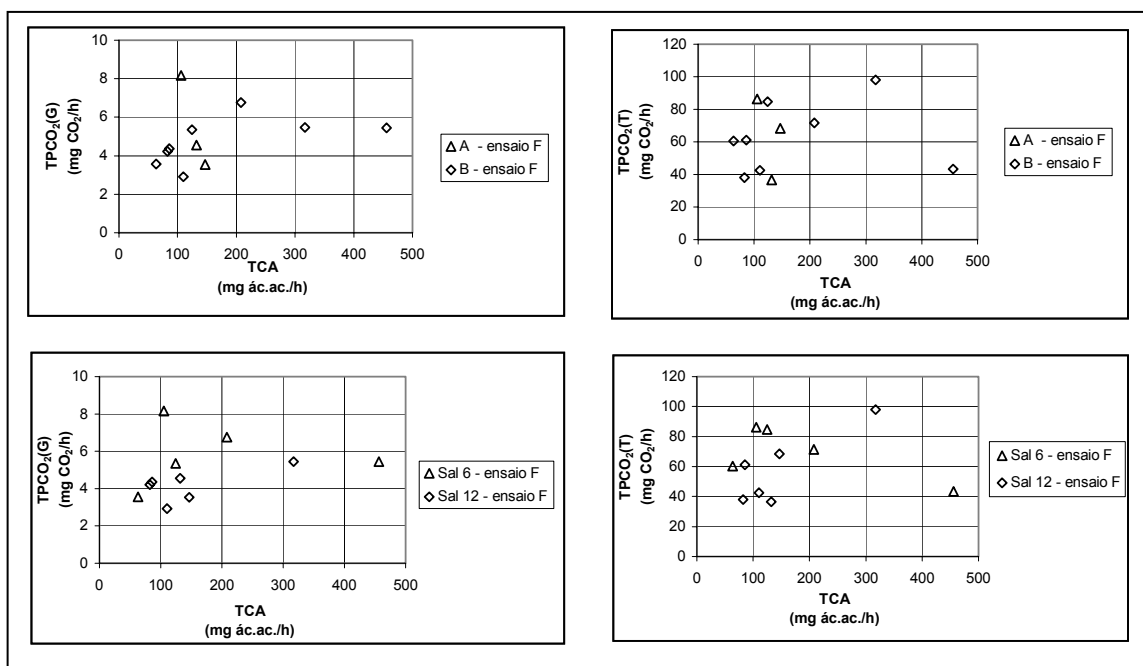


Figura 5.32 - Taxa de Produção de dióxido de Carbono (na fase gasosa e total) em função da taxa de consumo de acetato

Mais uma vez as melhores correlações verificam-se quando a análise se realiza considerando as diferentes fontes de inóculos.

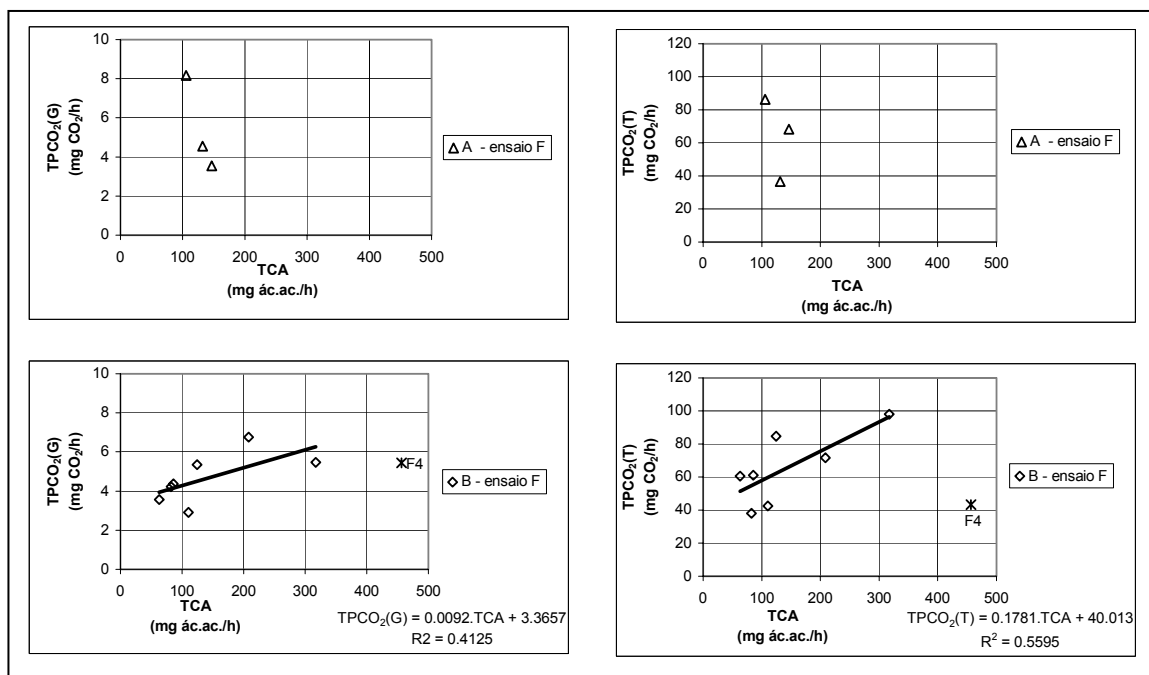


Figura 5.33 - Taxa de Produção de Dióxido de Carbono (na fase gasosa e total) em função da taxa de consumo de acetato para diferentes inóculos

A Figura 5.34 mostra a relação entre a taxa de produção de CO₂ (na fase gasosa e total) e a taxa de alimentação ou adição de substrato expressa em termos de deslocação na coluna por hora (cm/h).

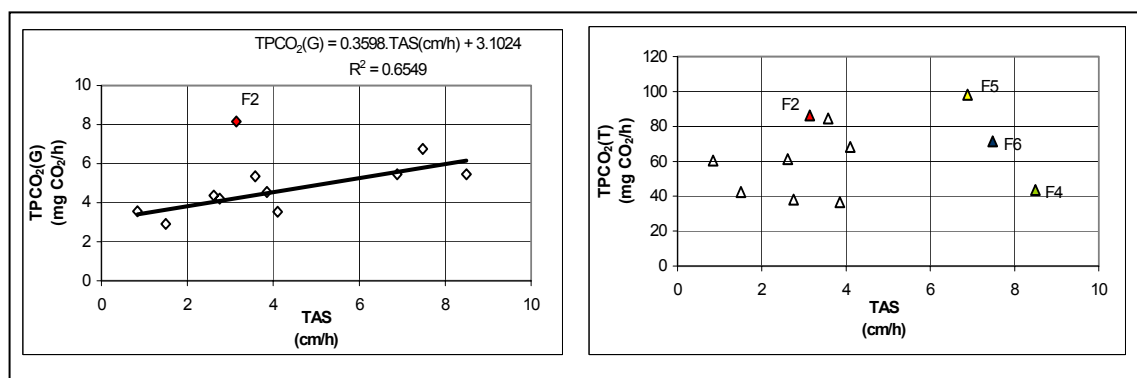


Figura 5.34 - TPCO₂(G) TPCO₂total em função da TAS(cm/h)

Esta figura permite ainda observar que o deslocamento correspondente à adição da solução de alimentação está correlacionado com o dióxido de carbono que passa para a fase gasosa.

A Figura 5.35 apresenta a relação entre a taxa de produção de CO₂ (na fase gasosa e total) e os parâmetros taxa específica de crescimento observada, rendimento celular e taxa de consumo de acetato. Os valores do parâmetro rendimento celular utilizados nesta comparação foram expressos em termos de carbono.

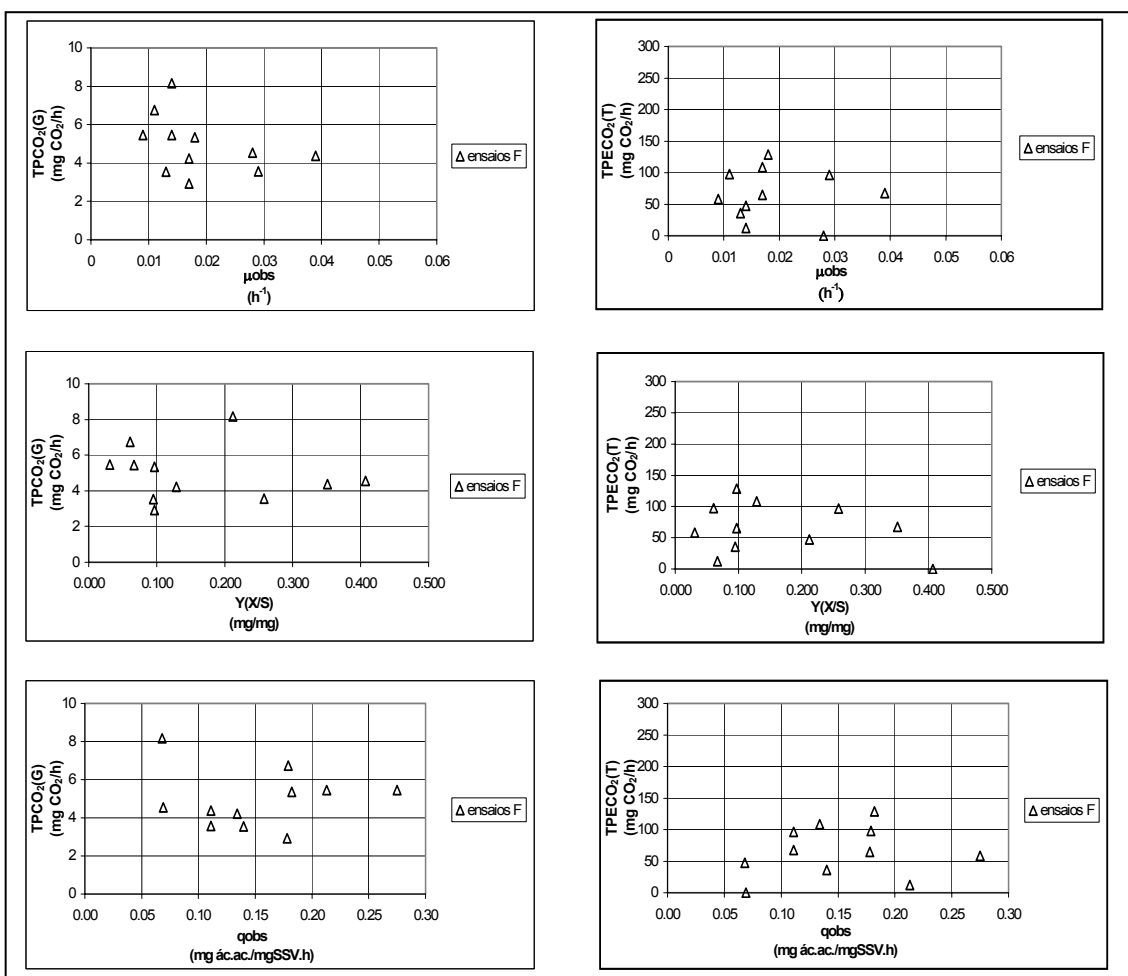


Figura 5. 35 - Taxa de Produção de Dióxido de Carbono (fase gasosa) e a Taxa de Produção Específica de Dióxido de Carbono total em função os parâmetros μ_{obs} , Y(x/s), e q_{obs}

Como se pode observar, não parece haver qualquer relação entre as variáveis presentes nesta análise gráfica.

A relação entre o quociente respirométrico e a taxa de alimentação, expressa em cm/h, é apresentada na Figura 5.36.

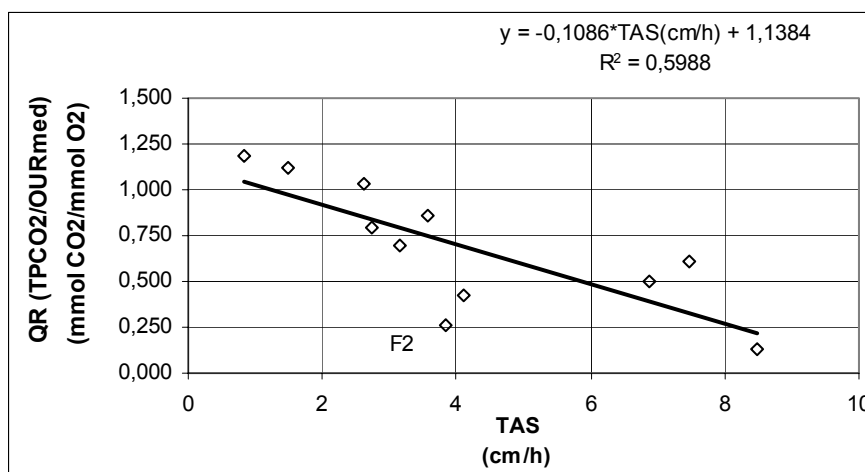


Figura 5. 36 - Coeficiente respirométrico em função da Taxa de adição de substrato

Observa-se que quanto maior é o coeficiente respirométrico menor é a taxa de adição de substrato, ou seja, quanto maior a quantidade de CO₂ produzido por oxigénio consumido, menor é a adição de substrato.

5.2 DISCUSSÃO

Da análise de resultados apresentada, constata-se que os ensaios realizados em reactor “Fed-batch” Proporcional não apresentam características que permitam concluir quanto à existência de inibição, como decorre da análise da evolução das curvas de “substrato adicionado e substrato acumulado”, e “substrato acumulado e OURE”.

Quanto às constantes cinéticas obtidas a partir destes ensaios, e quando comparadas com as que provêm do reactor “Fed-batch” Aberto, os testes estatísticos revelaram que os valores das amostras para os parâmetros taxa de consumo específica (q_{obs} e TCEA), coeficiente de rendimento celular ($Y_{(X/S)}$), taxa de crescimento específica (μ_{obs}) pertencem a populações que tem a mesma distribuição. A aplicação dos testes estatísticos não paramétricos aos valores de OUR_{end} da biomassa utilizada nos dois reactores revelou que as duas amostras pertencem à mesma população, ou que as populações tem a mesma distribuição. Esta circunstancia indica, de algum modo, que as características da biomassa no início de cada par de ensaios eram idênticas. Contudo, o teste de Wilcoxon, para a taxa de consumo de oxigénio média (da cultura ou específica), não permite aceitar a hipótese das amostras pertencerem à mesma população, o que é também observado na análise gráfica produzida, permitindo verificar que, embora os valores sejam semelhantes, os valores obtidos no reactor aberto são, de um modo geral, ligeiramente superiores aos obtidos no reactor “Fed-batch” Proporcional (reactor fechado).

Por outro lado, embora os testes estatísticos tenham mostrado que o conjunto de valores de taxa específica de consumo obtido no reactor “Fed-batch” Proporcional e no reactor “Fed-batch” Aberto são semelhantes, a determinação dos valores da taxa específica média de consumo de substrato, através do declive da recta obtida com os valores da taxa de crescimento específico e do rendimento celular, mostraram pequenas diferenças. Saliente-se que, por este método, o valor de taxa específica de consumo observada média no reactor “Fed-batch” Proporcional é ligeiramente inferior à do reactor “Fed-batch” Aberto, mesmo quando analisado por vários sub-grupos como ensaios utilizando soluções de alimentação de 12 g/L ou 6 g/L, expressa em ácido acético, ensaios com inóculo A, ou com B.

Embora os ensaios se tenham realizado a uma taxa de alimentação superior à taxa de consumo, e se possa considerar que os microrganismos provavelmente iniciaram uma fase de crescimento exponencial durante os ensaios, face à sua adaptabilidade ao substrato e por se encontrarem em fase endógena, não se pode afirmar que os valores da taxa de crescimento específica observados (μ_{obs}) correspondam à taxa máxima. Peil e Gaudy (1971) e Chudoba (1985) realizaram ensaios “batch” com o objectivo de determinar a taxa máxima de crescimento específico, com biomassa com idades de lamas de 1,1d e 4,3d, respectivamente (Chudoba, 1985). Os valores que encontraram para uma razão elevada de S_0/X_0 foram de 0,36 e 0,29 h^{-1} e, para razões S_0/X_0 baixas foram de 0,032 e 0,017 h^{-1} (Grady e Lim, 1992, Chudoba et al, 1992) (ver Quadro 5.10).

No referido quadro apresentam-se também os dados obtidos no mesmo reactor Fed-batch Proporcional, em trabalhos anteriores, tendo-se registado um valor de μ_{max} de 0,047 h^{-1} (Sequeira e Santana, 2002).

Os valores alcançados de μ_{obs} no presente trabalho, variaram entre 0,009 e 0,047 h^{-1} , sendo o valor máximo de taxa de crescimento específica observada no reactor “Fed-batch” Proporcional de 0,039 h^{-1} e 0,047 h^{-1} no reactor “Fed-batch” Aberto. Embora não tenha ficado provada a influência da razão S_0/X_0 nos valores de μ_{obs} para estes ensaios e a bibliografia disponível também nada refira sobre este aspecto no que respeita a ensaios “Fed-batch”, constata-se que os valores de μ_{obs} são próximos dos valores referidos na literatura para razões de S_0/X_0 baixas, característica comum dos ensaios realizados no presente trabalho.

Quadro 5.10 - Valores de μ_{\max} , Y, e Ks, referentes a ensaios utilizando acetato como substrato

Autor (ano)		μ_{\max} (h ⁻¹)	Y (mg CQO/mg CQO)	Ks (mg/L)
Peil e Gaudy (1971) e Chudoba <i>et al.</i> (1985)	(1)	0,36 ^(a)		41 ^(a)
		0,032 ^(b)		2,2 ^(b)
	(2)	0,29 ^(a)		47 ^(a)
		0,017 ^(b)		0,7 ^(b)
Smets <i>et al.</i> (1994)		0,014 ^(c)	0,79 ^(c)	0,08 ^(c)
		0,029 ^(d)	0,74 ^(d)	0,3 ^(d)
Sequeira e Santana. (2002)		0,047 ^(e)		

- (1) Peil e Gaudy (1971): crescimento disperso de microrganismos de águas residuais domésticas cultivadas em semicontínuo (técnica enriquecida) a $\theta_x = 1,1d$. Chudoba *et al.* (1985): cultura mista floculada cultivada em contínuo num sistema com selector a $\theta_x = 4,3d$.
- (2) Peil e Gaudy (1971): crescimento disperso de microrganismos de águas residuais domésticas cultivadas em semicontínuo (técnica enriquecida) a $\theta_x = 1,1d$ (dados de um período posterior). Chudoba *et al.* (1985): cultura mista filamentosa cultivada em contínuo num reactor completamente agitado a $\theta_x = 4,3d$.
- (a) So/Xo elevado
- (b) So/Xo baixo
- (c) biomassa proveniente de um sistema de Lamas activadas completamente agitado (CMAS)
- (d) biomassa proveniente de um sistema de Lamas activadas completamente agitado com um selector à cabeça (S/CMAS)
- (e) em reactor Fed-batch

Quanto à taxa de consumo específico de substrato, os valores observados (q_{obs}) neste estudo variaram entre 0,068 e 0,275 mg/mg.h, sendo os valores extremos determinados no reactor “Fed-batch” Proporcional.

Na literatura encontram-se valores para a taxa de consumo específica máxima que englobam os valores encontrados. As culturas utilizadas nos estudos realizados com acetato e cujos valores se apresentam no Quadro 5.11, apresentam idades de lamas compreendidas entre 3,5 e 9,5 dias. No referido quadro apresentam-se também os dados obtidos no mesmo reactor Fed-batch Proporcional, em trabalhos anteriores, tendo-se registado um valor de q_{\max} de 0,235 h⁻¹ (Sequeira e Santana, 2002).

Quadro 5.11 - Valores de q_{\max} , Y e K_s utilizando o acetato como substrato para diferentes idades de lamas (adaptado de Pitter e Chudoba, 1990, Sequeira e Santana, 2002)

Autores (ano)	θ_x (d)	q_{\max} (mg/g.h ⁻¹)	Y_{CQO}	K_s mg CQO/L
Chudoba <i>et al.</i> (1985)	4,3 ^(a)	46 - 110	0,44 - 0,49	0,8 - 3,8
	4,3 ^(b)	21 - 77	0,35 - 0,49	0,4 - 1,1
Chudoba <i>et al.</i> (1986) ^(f)	4,5 ^(c)	120 - 186		1,8 - 4,4
	3,5 ^(d)	227 - 266		1,4 - 2,9
Pitter e Chudoba (1988) ^(f)	9,5	173 - 193		
Sequeira e Santana (2002) ^(e)		235		

(a) Sistema com modelo Plug Flow; (b) Sistema de Lamas activadas completamente agitado

(b) A biomassa destes sistemas era alimentada com ácido cítrico, ácido glutâmico, ácido valérico, tirosina, e metanol.

(c) Valores encontrados durante a fase endógena com culturas mistas a crescer em sistema semi-contínuo com $t_a=22$ h, $t_s=2$ h, $R=1$.

(d) Valores encontrados durante a fase endógena com uma cultura mista a crescer num sistema completamente agitado com $\theta=48$ h.

(e) em reactor Fed-batch

(f) adaptado de Pitter e Chudoba, 1990

Segundo Philbrook e Grady (1985) a taxa de consumo específica máxima de substrato, em reactores “fed-batch” deve ser determinada utilizando taxas de alimentação ligeiramente superiores ao seu valor. No reactor “Fed-batch” Proporcional este procedimento pode ser conseguido através da adequação da concentração do substrato na solução de alimentação.

Dos ensaios realizados, os mais próximos desta situação foram os ensaios F2 e R2, F6 e R6, F7e R7 e F11 e R11. Os ensaios 6 e 11 (F e R) apresentam valores muito semelhantes da taxa de consumo específica de substrato (acetato) (q_{obs}) (0,161 a 0,181 mg/mg.h). Valores desta ordem de grandeza são encontrados igualmente nos ensaios F7 e R4. O ensaio 2 apresenta valores de 0,068 mg/mg.h para F2, e 0,070 mg/mg.h em R2. Este ensaio foi realizado com biomassa proveniente de um

inóculo diferente daquele que foi utilizada nos ensaios 6 e 11. Analisando os valores de q_{obs} dos dois inóculos é perfeitamente observável que os valores resultantes da utilização do inóculo A são inferiores aos obtidos com biomassa proveniente do inóculo B.

Relativamente à alcalinidade, embora seja um parâmetro em que os erros associados ao operador e a condições de luminosidade possam ser relevantes, verifica-se que, de uma forma global, os ensaios em “Fed-batch” Abertos apresentam um maior incremento de iões bicarbonato durante o ensaio, apesar de não se detectarem diferenças significativas. Esta circunstancia contradiz as expectativas iniciais, uma vez que se esperaria que no ensaio em reactor fechado, devido ao aumento da pressão, o dióxido de carbono dissolvido fosse superior e, conseqüentemente, houvesse maior quantidade de iões bicarbonato. Com estes resultados poder-se-ia admitir que a pressão que é atingida no reactor “Fed-batch” Proporcional não fosse suficiente para contribuir para um aumento significativo da solubilidade do dióxido de carbono, ou seja, o deslocamento do equilíbrio químico, no sentido da formação de maior quantidade de ácido carbónico, relativamente ao equilíbrio que se atinge à pressão atmosférica. No entanto, as variações observadas nos valores de pH mostram uma maior quantidade de iões H^+ nos ensaios F, provavelmente provenientes da maior solubilidade do dióxido de carbono, que se traduz na dissociação do ácido carbónico, formando iões H_3O^+ e HCO_3^- .

A elevada correlação entre a taxa de consumo de acetato e a taxa de consumo de oxigénio comprova a relação entre a actividade dos microrganismos e a respectiva viabilidade, provando também que o OUR reflecte estes aspectos, à semelhança do que referiram Huang e seus colaboradores (1985).

De uma maneira geral, a comparação de parâmetros referentes à cultura tem melhores correlações do que quando se utilizam parâmetros referentes à unidade de massa de microrganismos, como se observa quando se compara a taxa de consumo de acetato com a taxa de consumo de oxigénio, que apresentam uma boa correlação entre si. Contudo, quando a comparação se efectua em termos da taxa de consumo específico de substrato (acetato) e de oxigénio a correlação não é tão elevada.

Por outro lado, quando se compara a produção de dióxido de carbono com a adição de substrato, parece natural que a correlação exista com o dióxido de carbono que se liberta para a fase gasosa. Quando se pretende avaliar a viabilidade da biomassa, a correlação esperada é entre a produção de dióxido de carbono total $TPCO_2(T)$ e a taxa de consumo de oxigénio. A circunstância da $TPCO_2(G)$ apresentar maior correlação com as variáveis, TAS e OURmed, poderá ser devida a terem-se realizado as medições na fase gasosa, assumindo-se os valores das constantes de equilíbrio para calcular a $TPCO_2(T)$.

A avaliação da biodegradabilidade de compostos orgânicos no reactor “Fed-batch” Proporcional tem como medida alternativa da viabilidade da biomassa o parâmetro referente ao deslocamento da solução de alimentação nas colunas - Taxa de adição de Substrato - dada a sua estreita relação com a taxa de consumo de oxigénio pela cultura.

6. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS DE TRABALHO FUTURO

Da análise dos resultados obtidos com os ensaios realizados em reactor “Fed-batch” Proporcional e em reactor “Fed-batch” Aberto verificou-se não haver evidências claras de ocorrência de inibição. Estas observações permitiram concluir que para o substrato utilizado, acetato de sódio, para as concentrações máximas acumuladas no reactor e para populações microbianas semelhantes, que o aumento da concentração do dióxido de carbono e, ou do ião bicarbonato, não inibiram a actividade microbiana.

A comparação de parâmetros cinéticos obtidos no reactor “Fed-batch” Proporcional e no reactor “Fed-batch” Aberto revelou que a taxa de consumo específica (q_{obs} ou TCEA), o coeficiente de rendimento ($Y_{(X/S)}$) e a taxa de crescimento específico (μ_{obs}) têm valores semelhantes, e os testes não paramétricos concluíram que as amostras de valores dos ensaios F e dos ensaios R pertencem a populações com a mesma distribuição. As taxas médias de consumo de oxigénio da cultura e específica, por massa de SSV, apresentam valores tendencialmente superiores no reactor “Fed-batch” Aberto.

O reactor “Fed-batch” Proporcional parece constituir um instrumento útil para a medição de cinéticas de biodegradação e de inibição, embora as determinações exijam um tempo considerável, o que poderá ser muito minimizado se se proceder à sua automatização e controlo, tornando-o um reactor suficientemente simples e rápido de operar, permitindo, com um mínimo de trabalho experimental, obter dados indispensáveis para projecto e operação de instalações de tratamento.

Como trabalho futuro, considera-se que a realização de experiências com compostos inibidores utilizando o reactor “Fed-batch” Proporcional poderia permitir aumentar a quantidade de dados disponíveis sobre o funcionamento do reactor com vários substratos, por forma a viabilizar o desenvolvimento de um modelo para determinação de constantes cinéticas directamente a partir do deslocamento de substrato observado.

7. BIBLIOGRAFIA

AWWA, Water Quality and Treatment, 4th edition, McGraw-Hill, 1990.

APHA, AWWA, WEF, Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 20th edition, United Book Press, Inc., 1998

BROWN, SUSAN COOPER; GRADY Jr., C. P. LESLIE, TABAK, HENRY H. (1990), Biodegradation Kinetics of Substituted Phenolics: Demonstration of a Protocol Based on Electrolytic Respirometry, *Water Research*, vol.24, n°7, pp.853-861.

BUITRÓN, G.; KOEFOED, A; CAPDEVILLE, B. (1992), Microbial Activity Evolution during the Acclimation of a Mixed Culture to Phenol: Use of CO₂ Evolution Rate as Indicator, *Water Science Technology*, vol. 26, n° 9-11.

CASEY, T. J., Unit Treatment Processes in Water and Wastewater Engineering, John Wiley & Sons, Ltd, 1997.

CAZZADOR, L. (1988), On the Optimal Control of Fed-Batch Reactors with Substrate-Inhibited Kinetics, *Biotechnology and Bioengineering*, vol. 31, pp. 670 – 674.

ÇEÇEN, F., IPEK, S. (1998), Determination of the Inhibition of Ammonia-N and Urea-N Oxidation by the Fed-batch Reactor (FBR) Technique, *Water Science Technology*, vol. 38, n.° 1, pp. 141 – 148.

CHUDOBA, JAN (1985), Quantitative Estimation in COD Units of Refractory Organic Compounds Produced by Activated Sludge Microorganisms, *Water Research*, vol.19, n°1, pp. 37-43.

CHUDOBA, JAN; CECH, J. S.; FARAC, J.; GRAU, P. (1985), Control of Activated Sludge Filamentous Bulking - Experimental Verification of a Kinetic Selection Theory, *Water Research*, vol. 19, n° 2.

CHUDOBA, P.; CAPDEVILLE, B.; CHUDOBA, J. (1992), Explanation of Biological Meaning of the So/Xo Ratio in Batch Cultivation, *Water Science Technology*, vol.26, n°3-4, pp.743-751.

Communication to the Editor (1980), Steam-Sterilizable pCO₂, *Biotechnology and Bioengineering*, vol.XXII, pp. 2411-2416.

DAIGGER, GLEN T., GRADY, C. P. LESLIE Jr. (1982); The Dynamics of Microbial Growth on Soluble Substrates - A Unifying Theory; *Water Research*; vol 16.

DANG, J. S.; HARVEY, D. M.; JOBBAGY, A.; GRADY Jr. (1989), Evolution of Biodegradation Kinetics with Respirometric Data, *Res. J. Water Pollut. Control Fed.*, vol. 61, n°11-12,.

DOSANJH, MANJIT; WASE, D. A. JOHN (1987), Oxygen Uptake Studies on Various Sludges Adapted to a Waste Containing Chloro- Nitro- and Amino-Substituted Xenobiotics, *Water Research*, vol.21, n°2, pp. 205-209.

- ECKENFELDER Jr., W.WESLEY, Industrial Water Pollution Control, 3rd edition, McGraw Hill, 2000.
- ECKENFELDER, W.WESLEY, GRAU, PETR, Activated Sludge Process Design and Control, (Water quality Management Library - Volume 1), Technomic Publishing Company, Inc, USA, 1992
- ELLIS, TIMOTHY G.; BARBEAU, DANIEL S.; SMETS, BARTH F.M.; GRADY Jr., C. P. LESLIE (1996(a)), Respirometric technique for Determination of Extant Kinetics Parameters Describing Biodegradation, *Water Environment Research*, vol68, n°5, pp.917-926.
- ELLIS, TIMOTHY G.; SMETS, BARTH F.; MAGBANUA Jr., BEJAMIN S.; GRADY Jr., C. P. LESLIE (1996(b)), Changes in Measured Biodegradation Kinetics during the Long-term Operation of Completely Mixed Activated Sludge (CMAS) Bioreactors, *Water Science Technology*, vol. 34, n° 5-6.
- ELLIS, TIMOTHY G., SMETS, , BARTH F.; GRADY Jr., C. P. LESLIE (1998), Effect of simultaneous biodegradation of multiple substrates on the extant biodegradation kinetics of individual substrates, *Water Environment Research*, vol. 70, n.º1, Jan/Fev
- ESENER, A. A., ROELS, J. A., KOSSEN, N. W. F (1981), Fed-Batch Culture: Modeling and Applications in the Study of Microbial Energetics, *Biotechnology and Bioengineering*, vol XXIII, pp. 1851-1871.
- FERREIRA, B. S., van KEULEN, F., FONSECA, M. M. R. (1998), Caracterização, monitorização e controlo de fermentações através da análise de correntes gasosas, *Boletim de Biotecnologia*, n.º 61, Dezembro, pp. 6-11.
- FOGLER, SCOTT H., Elements of Chemical Reaction Engineering, Prentice-Hall, Inc., 1986.
- GAUDY Jr., ANTHONY F.; EKAMBARAM, ANAND; ROZICH, ALAN F. (1988), A Respirometric for Biokinetic Characterization of Toxic Waste, Proceedings of the 43rd Industrial Waste Conference, Maio, Purdue University, Lewis Publishers, pp. 35-44.
- GOVIND, RAKESH, GAO, CHAO, LAI, LIE, TABAK, HENRY H., (1997) Continuous, automated and simultaneous measurement of oxygen uptake and carbon dioxide evolution in biological systems, *Water Environment Research*, vol. 69, n.º1, Jan/Fev
- GRADY JR., C. P. LESLIE (1985), Biodegradation: Its Measurement and Microbiological Basis, *Biotechnology and Bioengineering*, vol XXVII, pp. 660 – 674.
- GRADY, C. P. LESLIE JR.; SMETS, BARTH F.; BARBEAU, DANIELS (1996); Variability in Kinetic Parameter Estimates: A Review of Possible Causes and a Proposed Terminology; *Water Research*, vol 30, n°3.
- HONG, J. (1986), Optimal Substrate Feeding Policy for a Fed Batch Fermentation with Substrate and Product Inhibition Kinetics, *Biotechnology and Bioengineering*, vol.XXVIII, pp. 1421-1431.

- HUANG, JERRY Y. C.; CHENG, MENG-DAWN; MULLER, JAMES T. (1985), Oxygen Uptake Rates for Determining Microbial Activity and Application, *Water Research*, vol.19, nº3, pp. 373-381.
- JARDIM, W. F.; PASQUINI, C.; GUIMARÃES, J. R.; FARIA, L. C. (1990), Short-Term Toxicity Test Using *Escherichia coli*: Monitoring CO₂ Production by Flow Injection Analysis, *Water Research*, vol.24, nº3, pp.351-354.
- KIMURA, ROY; MILLER, WILLIAM M. (1996), Effects of Elevated pCO₂ and/or Osmolality on the Growth and Recombinant tPA Production of CHO Cells, *Biotechnology and Bioengineering*, vol.52, nº1, pp.152-160.
- KONOPKA, A., ZAKHAROVA, T., OLIVER, L., PASEUTH, E., TURCO, R. F. (1998), Physiological state of a microbial community in a biomass recycle reactor, *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 20, pp. 232 – 237.
- LARSON, R. J., SCHAEFFER, S. L. (1982), A rapid method for Determining the Toxicity of Chemicals to Activated Sludge, *Water Research*, vol. 16, pp 675 – 680.
- LEWANDOWSKI, ZBIGNIEW (1987), Behaviour of Biological Reactors in the Presence of Toxic Compounds, *Water Research*, vol. 21, nº 2.
- LIEHR, S. K.; CHEN, HUI-JUNG; LIN, SHUN-HUNG (1994), Metals Removal by Algal Biofilms, *Water Science Technology*, vol. 30, nº11.
- MAGBANUA Jr., BENJAMIN S.; LU, YUNN-TZER; GRADY Jr., C. P. LESLIE (1998), A Technique for Obtaining Representative Biokinetic Parameter Values from Replicate Sets of Parameter Estimates, *Water Research*, vol.32, nº3, pp. 849-855.
- McBEAN, E. A., ROVERS, F. A., Statistical Procedures for Analysis of Environmental Monitoring Data and Risk Assessment, Prentice Hall PTR, USA, 1998
- METCALF & EDDY, Wastewater Engineering; Treatment Disposal Reuse, McGraw-Hill, USA, 1991.
- Ministérios da Economia, da Saúde e do Ambiente, Portaria n.º 732-A/96, de 11 de Dezembro, Diário da República n.º 286/96 Suplemento Série I-B, 11 de Dezembro de 1996.
- MONTGOMERY, H. A. (1967) The Determination of Biochemical Oxygen Demand by Respirometric Methods, *Water Research*, vol.1, pp. 631 - 662.
- MURTEIRA, B. J. F., Probabilidades e Estatística, Volume II, Editora McGraw-Hill de Portugal, Lda., 1990 (2ª edição)
- NAZIRUDDIN, MOHAMMAD, GRADY Jr., C. P. LESLIE, TABAK, HENRY H. (1995), *Water Environment Research*, vol.67, nº2, pp.151-158.
- NELSON, PETER O.; LAWRENCE, ALONZO W_M (1980), Microbial Viability Measurements and Activated Sludge Kinetics, *Water Research*, vol. 14, pp. 217-225.
- NIELSEN, JENS, VILLADSEN, John, Bioreaction Engineering Principles, Plenum Press, New York, 1994

- NOORMAN, H. J., LUIJKX, G. C. A., LUYBEN, K. CH. A. M., HEIJNEM, J. J. (1992) Modeling and Experimental Validation of Carbon Dioxide Evolution in Alkalophilic Cultures, *Biotechnology and Bioengineering*, vol. 39, n.º 11, Maio.
- ODUM, EUGENE P., Fundamentos de Ecologia, Fundação Calouste Gulbenkian, 4ª Edição, 1988
- OLIVEIRA, J. TIAGO, Probabilidades e Estatística - Conceitos, Métodos e Aplicações, Volume II, Editora McGraw-Hill de Portugal, Lda., 1990
- PATKAR, A. E SEO, J. H. (1992), Fermentation Kinetics of Recombinant Yeast in Batch and Fed-batch Cultures, *Biotechnology and Bioengineering*, vol. 40, n.º1.
- PATOCZKA, JERZY; PULLIAM, GREGORY W.; CHOWNING, GARY L. (1989), Determination of Toxicity Thresholds of Industrial Wastestream Sludge Process Using Fed Batch Reactor, Proceedings of the 43rd Industrial Waste Conference, Maio, Purdue University, Lewis Publishers, pp. 51-59.
- PHILBROOK, DAVID M., GRADY, C. P. LESLIE JR. (1985); Evaluation of Biodegradation Kinetics for Priority Pollutants, Proceedings of the 40th Industrial Waste Conference, Maio 1985, Purdue University, J. M. Bell, Ed. (Publicado em 1986)
- PIRT, S. JOHN, Principles of Microbe and Cell Cultivation, , Blackwell Scientific Publication, Great Britain, 1975, Reprinted 1985.
- PITTER, P. (1976), Determination of Biological Degradability of Organic Substances, *Water Research*, vol. 10.
- PITTER, P, CHUDOBA, J., Biodegradability of Organic substances in the Aquatic Environment, CRC Press, United States, 1990.
- POLLARD, PETER C.; STEFFENS, MARC A.; BIGGS, CATHERINE A.; LANT, PAUL A. (1998), Bacterial Growth Dynamics in Activated Sludge Batch Assays, *Water Research*, vol.32, n.º3, pp.587-596.
- REZETTE, F., VASEL, J. L., HEDUIT, A. (1996), Détermination du coefficient de transfert d'oxygène en boues selon la méthode au peroxyde d'hydrogène, *Tribune de L'eau*, n.os 5-6, pp. 35 – 41.
- RICHARDS, DEANNA J.; SHIEH, WEN K., (1986) Biological Fate of Organic Priority Pollutants in the Aquatic Environment, *Water Research*, vol.20, n.º9, pp. 1077-1090.
- ROS MILÉNIO, *Respirometry of Activated Sludge*, Technomic Publishing Company, Inc, USA, 1993.
- ROYCE, PATRICK N. (1992), Effect of Changes in the pH and Carbon Dioxide Evolution Rate on the measured Respiratory Quotient of Fermentations, *Biotechnology and Bioengineering*, vol.40, n.º10, pp. 1129-1138.
- ROYCE, PATRICK N. C., THORNHILL, N. F. (1991), Estimation of Dissolved Carbon Dioxide Concentration in Aerobic Fermentation, *AIChE Journal*, vol.37, n.º.11, Novembro.

- ROZICH, A. F., GAUDY Jr., A. F. (1985), Response of Phenol-Acclimated activated Sludge Process to quantitative Shock Loading, *Journal WPCF*, vol.57, n°7, pp. 795-804.
- ROZICH, ALAN F., GAUDY Jr., ANTHONY F., Design and Operation of Activated Sludge Processes Using Respirometry, Lewis Publishers, INC., USA, 1992.
- SAN, K. Y., STEPHANOPOULOS, G. (1984), A Note on the Optimality for Maximum Biomass Production in a Fed-Batch Fermentor, *Biotechnology and Bioengineering*, vol.XXVI, pp. 1261 – 1264.
- SANTANA, F. J. P., SEQUEIRA, A. S. P.; (2002), A Self-regulated Fed-batch Reactor. Parte I – The Principle, *Environmental Technology*, vol. 23, pp. 1075 – 1079.
- SENGUPTA, S., MODAK, J. M. (2001), Optimization of fed-batch bioreactor for immobilized enzyme process, *Chemical Engineering Science*, 56, pp. 3315 – 3325.
- SEQUEIRA, A. S. P., SANTANA, F. (1996), Desenvolvimento de um Reactor “Fed-batch” para Estudos Cinéticos de Biodegradação. Condições de Arranque e Funcionamento.
- SEQUEIRA, A. S. P., SANTANA, F. (2002), A Self-regulated Fed-batch Reactor. Parte II – Results Obtained with a Ready Biodegradable Substrate and an Acclimatized Mixed Culture, *Environmental Technology*, vol. 23, pp. 1197 – 1201.
- SHUKLA, P. K., PUSHPAVANAM, S. (1998), Optimisation of biochemical reactors – an analysis of different approximation of fed-batch operation, *Chemical Engineering Science*, vol. 53, n.º 2, pp. 341 – 352.
- SIEGEL, SIDNEY, Estatística não-paramétrica, Makron Books do Brasil Editora Ltda., Editora McGraw-Hill, Ltda, São Paulo, 1975
- SMETS, BARTH F.; ELLIS, TIMOTHY G.; BRAU, STEPHANIE; SANDERS, RICHARD W.; GRADY Jr., C. P. LESLIE (1994), Quantification of the kinetic differences between communities isolated from completely mixed activated sludge systems operated with or without a selector using a novel respirometric method, *Water Science Technology*, vol30, n°11, pp.255-261.
- SPÉRANDIO, MATHIEU; PAUL, ETIENNE (1997); Determination of Carbon Dioxide Evolution Rate Using On-Line Gas Analysis During Dynamic Biodegradation Experiments, *Biotechnology and Bioengineering*, vol 53, pp. 243 - 252.
- SPIEGEL, MURRAY R., Estatística, Makron Books do Brasil Editora Ltda., Editora McGraw-Hill, Ltda, São Paulo, (3ª edição), 1994
- SUSCHKA, JAN; FERREIRA, EDSON (1986); Activated Sludge Respirometric Measurements, *Water Research*, vol 20, n°2, pp. 137 - 144.
- TABAK, HENRY H.; QUAVE, STEPHEN A.; MASHNI, CHARLES I.; MARTH, EDWIN F. (1981), Biodegradability Studies with Organic Priority Pollutant Compounds, *Journal WPCF*, vol.53, n°10, pp. 1503- 1518.
- TAN, YUNHU; WANG, ZHI-XIN; MARSHALL, KEVIN C. (1996), Modeling Substrate Inhibition of Microbial Growth, *Biotechnology and Bioengineering*, vol.52, n°5, pp.602-608.

- TEMPLETOM, LAURA L., GRADY JR., C. P. LESLIE (1988), Effect of culture history on the determination of biodegradation kinetics by batch and fed-batch techniques, *Journal Water Pollution Control Federation*, número 60, Maio.
- TUSSEAU-VUILLEMIN, M., -H., LAGARDE, F., CHAUVIÈRE, C., HÉDUIT, A (2002), Hydrogen peroxide (H₂O₂) as a source of dissolved oxygen in a COD-degradation respirometric experiments, *Water Research*, 36, pp. 793 – 798.
- VOLSKAY JR., V. T.; GRADY JR., C. P. LESLIE (1988), Toxicity of Selected RCRA compounds to Activated Sludge Microorganisms, *Journal Water Pollution Control Federation*, vol 60, n° 10, pp. 1850 - 1856.
- VOLSKAY JR., V. T.; GRADY JR., C. P. LESLIE (1990); Respiration Inhibition Kinetic Analysis, *Water Research*, vol 24, n° 7, pp. 863 – 874.
- WEDDLE, C. L., JENKINS, D., (1971) The Viability and Activity of Activated Sludge, *Water Research*, vol. 5. Pp 621-640.
- WILLIAMSON, K. J., McCARTY, P. L. (1975), “Rapid Measurement of Monod Half-Velocity Coefficients for Bacterial Kinetics, *Biotechnology and Bioengineering*, vol.17, pp. 915-924.
- YEGNESWARAN, P. K.; GRAY, M. R.; THOMPSON, B. G. (1990), Kinetics of CO₂ hydration in fermentors: pH and pressure effects, *Biotechnology and Bioengineering*, vol.36, Junho, pp. 92-96.
- ZARNOVSKY, L.; DERCO, J; KUFFA, R., DRTIL, M. (1994), The Influence of Cadmium on Activated Sludge Activity, *Water Science Technology*, vol.30, n°11.

ANEXOS

ANEXO I

Ensaio de Traçagem

Quadro I.1 - Ensaio de Traçagem com Acetato de Sódio

tempo (h)	Nível 1 (cm)	Pressão (cm)	Acetato medido (mg)	Acetato teórico (mg)
0.00	-0.2	0.20	302.5	302.5
0.25	2.4	2.80		553.1
0.50	3.3	3.30		639.6
0.75	3.3	3.30		639.6
1.00	4.1	4.70	716.1	716.5
1.25	4.2	4.70		726.1
1.50	5.7	7.20		870.3
1.75	6.7	7.60		966.4
1.92	8.6	9.40		1149.1
2.00	9.0	10.00	1155.8	1187.5
2.25	11.0	12.20		1379.8
2.50	12.6	14.07		1533.6
2.75	14.2	16.01		1687.3
3.00	15.3	16.6	1770.0	1793.1
3.25	17.1	17.8		1966.1
3.50	18.0	19.9		2052.6
3.75	19.5	21.5		2196.8
4.00	21.4	23.2	2311.0	2379.4
4.17	22.0	24.4	2408.9	2437.1

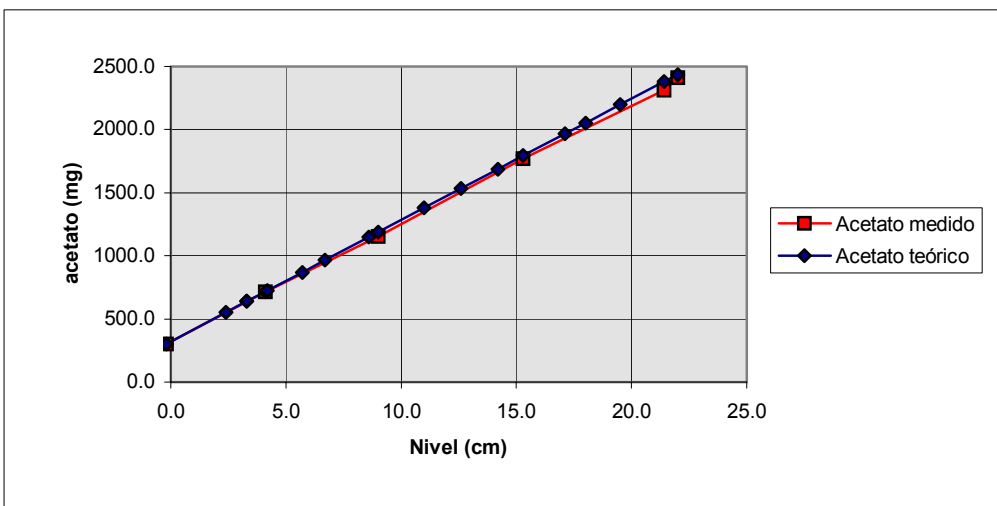
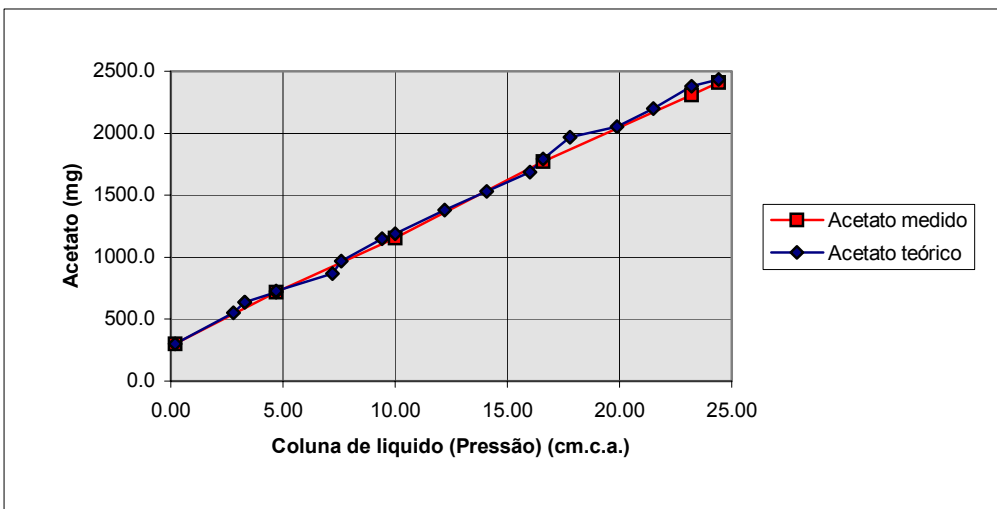
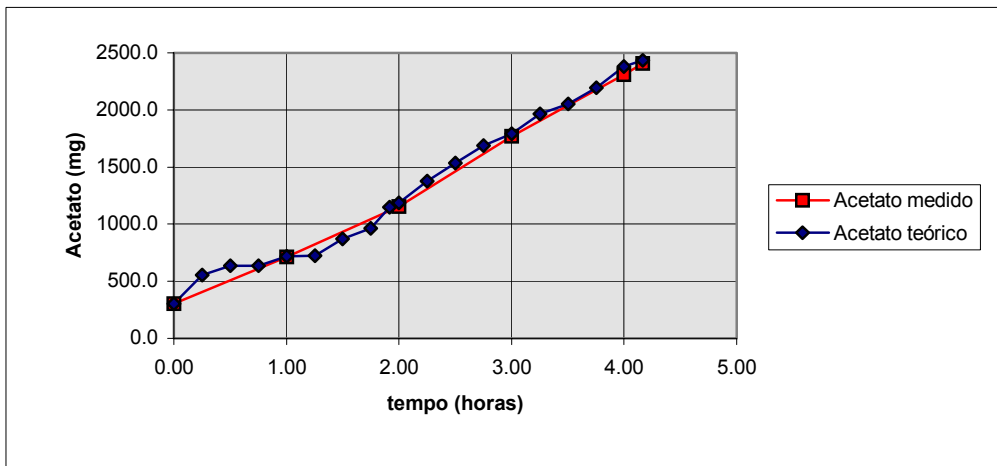
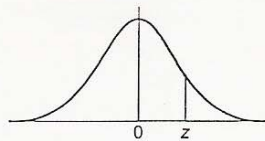


Figura I.1 - Ensaio de Traçagem no Reactor “Fed-batch”

ANEXO II

Distribuições Estatísticas

Quadro II.1 - Área subentendida pela curva normal reduzida de 0 a z



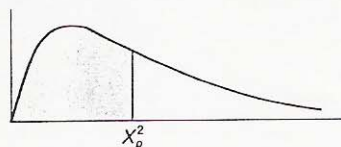
z	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
0,0	0,000	0,0040	0,0080	0,0120	0,0160	0,0199	0,0239	0,0279	0,0319	0,0359
0,1	0398	0438	0478	0517	0557	0596	0636	0675	0714	0754
0,2	0793	0832	0871	0910	0948	0987	1026	1064	1103	1141
0,3	1179	1217	1255	1293	1331	1368	1406	1443	1480	1517
0,4	1554	1591	1628	1664	1700	1736	1772	1808	1844	1879
0,5	1915	1950	1985	2019	2054	2088	2123	2157	2190	2224
0,6	2258	2291	2324	2357	2389	2422	2454	2486	2518	2549
0,7	2580	2612	2642	2673	2704	2734	2764	2794	2823	2852
0,8	2881	2910	2939	2967	2996	3023	3051	3078	3106	3133
0,9	3159	3186	3212	3238	3264	3289	3315	3340	3365	3389
1,0	3413	3438	3461	3485	3508	3531	3554	3577	3599	3621
1,1	3643	3665	3686	3708	3729	3749	3770	3790	3810	3830
1,2	3849	3869	3888	3907	3925	3944	3962	3980	3997	4015
1,3	4032	4049	4066	4082	4099	4115	4131	4147	4162	4177
1,4	4192	4207	4222	4236	4251	4265	4279	4292	4306	4319
1,5	4332	4345	4357	4370	4382	4394	4406	4418	4429	4441
1,6	4452	4463	4474	4484	4495	4505	4515	4525	4535	4545
1,7	4554	4564	4573	4582	4591	4599	4608	4616	4625	4633
1,8	4641	4649	4656	4664	4671	4678	4686	4693	4699	4706
1,9	4713	4719	4726	4732	4738	4744	4750	4756	4761	4767
2,0	4772	4778	4783	4788	4793	4798	4803	4808	4812	4817
2,1	4821	4826	4830	4834	4838	4842	4846	4850	4854	4857
2,2	4861	4864	4868	4871	4875	4878	4881	4884	4887	4890
2,3	4893	4896	4898	4901	4904	4906	4909	4911	4913	4916
2,4	4918	4920	4922	4925	4927	4929	4931	4932	4934	4936
2,5	4938	4940	4941	4943	4945	4946	4948	4949	4951	4952
2,6	4953	4955	4956	4957	4959	4960	4961	4962	4963	4964
2,7	4965	4966	4967	4968	4969	4970	4971	4972	4973	4974
2,8	4974	4975	4976	4977	4977	4978	4979	4979	4980	4981
2,9	4981	4982	4982	4983	4984	4984	4985	4985	4986	4986
3,0	4987	4987	4987	4988	4988	4989	4989	4989	4990	4990
3,1	4990	4991	4991	4991	4992	4992	4992	4992	4993	4993
3,2	4993	4993	4994	4994	4994	4994	4994	4995	4995	4995
3,3	4995	4995	4995	4996	4996	4996	4996	4996	4996	4997
3,4	4997	4997	4997	4997	4997	4997	4997	4997	4997	4998
3,5	4998	4998	4998	4998	4998	4998	4998	4998	4998	4998
3,6	4998	4998	4999	4999	4999	4999	4999	4999	4999	4999
3,7	4999	4999	4999	4999	4999	4999	4999	4999	4999	4999
3,8	4999	4999	4999	4999	4999	4999	4999	4999	4999	4999
3,9	0,5000	0,5000	0,5000	0,5000	0,5000	0,5000	0,5000	0,5000	0,5000	0,5000

Quadro II.2 - Valores críticos para a prova bilateral com $\alpha=0,05$

$n_1 \backslash n_2$	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
1												
2	0	0	0	1	1	1	1	1	2	2	2	2
3	2	3	3	4	4	5	5	6	6	7	7	8
4	4	5	6	7	8	9	10	11	11	12	13	13
5	7	8	9	11	12	13	14	15	17	18	19	20
6	10	11	13	14	16	17	19	21	22	24	25	27
7	12	14	16	18	20	22	24	26	28	30	32	34
8	15	17	19	22	24	26	29	31	34	36	38	41
9	17	20	23	26	28	31	34	37	39	42	45	48
10	20	23	26	29	33	36	39	42	45	48	52	55
11	23	26	30	33	37	40	44	47	51	55	58	62
12	26	29	33	37	41	45	49	53	57	61	65	69
13	28	33	37	41	45	50	54	59	63	67	72	76
14	31	36	40	45	50	55	59	64	67	74	78	83
15	34	39	44	49	54	59	64	70	75	80	85	90
16	37	42	47	53	59	64	70	75	81	86	92	98
17	39	45	51	57	63	67	75	81	87	93	99	105
18	42	48	55	61	67	74	80	86	93	99	106	112
19	45	52	58	65	72	78	85	92	99	106	113	119
20	48	55	62	69	76	83	90	98	105	112	119	127

* Adaptado e resumido das Tábuas 1, 3, 5 e 7 de Auble, D. 1953. Extended tables for the Mann-Whitney statistic. *Bulletin of the Institute of Educational Research at Indiana University*, 1, No. 2, com permissão do autor e do editore.

Quadro II.3 - Valores dos Percentis (χ^2_p) da Distribuição de Qui-Quadrado com v graus de liberdade (área sombreada =p)



n	$\chi^2_{0,995}$	$\chi^2_{0,99}$	$\chi^2_{0,975}$	$\chi^2_{0,95}$	$\chi^2_{0,90}$	$\chi^2_{0,75}$	$\chi^2_{0,50}$	$\chi^2_{0,25}$	$\chi^2_{0,10}$	$\chi^2_{0,05}$	$\chi^2_{0,025}$	$\chi^2_{0,01}$	$\chi^2_{0,005}$
1	7,88	6,63	5,02	3,84	2,71	1,32	0,455	0,102	0,0158	0,0039	0,0010	0,0002	0,0000
2	10,6	9,21	7,38	5,99	4,61	2,77	1,39	0,575	0,211	0,103	0,0506	0,0201	0,0100
3	12,8	11,3	9,35	7,81	6,25	4,11	2,37	1,21	0,584	0,352	0,216	0,115	0,072
4	14,9	13,3	11,1	9,49	7,78	5,39	3,36	1,92	1,06	0,711	0,484	0,297	0,207
5	16,7	15,1	12,8	11,1	9,24	6,63	4,35	2,67	1,61	1,15	0,831	0,554	0,412
6	18,5	16,8	14,4	12,6	10,6	7,84	5,35	3,45	2,20	1,64	1,24	0,872	0,676
7	20,3	18,5	16,0	14,1	12,0	9,04	6,35	4,25	2,83	2,17	1,69	1,24	0,989
8	22,0	20,1	17,5	15,5	13,4	10,2	7,34	5,07	3,49	2,73	2,18	1,65	1,34
9	23,6	21,7	19,0	16,9	14,7	11,4	8,34	5,90	4,17	3,33	2,70	2,09	1,73
10	25,2	23,2	20,5	18,3	16,0	12,5	9,34	6,74	4,87	3,94	3,25	2,56	2,16
11	26,8	24,7	21,9	19,7	17,3	13,7	10,3	7,58	5,58	4,57	3,82	3,05	2,60
12	28,3	26,2	23,3	21,0	18,5	14,8	11,3	8,44	6,30	5,23	4,40	3,57	3,07
13	29,8	27,7	24,7	22,4	19,8	16,0	12,3	9,30	7,04	5,89	5,01	4,11	3,57
14	31,3	29,1	26,1	23,7	21,1	17,1	13,3	10,2	7,79	6,57	5,63	4,66	4,07
15	32,8	30,6	27,5	25,0	22,3	18,2	14,3	11,0	8,55	7,26	6,26	5,23	4,60
16	34,3	32,0	28,8	26,3	23,5	19,4	15,3	11,9	9,31	7,96	6,91	5,81	5,14
17	35,7	33,4	30,2	27,6	24,8	20,5	16,3	12,8	10,1	8,67	7,56	6,41	5,70
18	37,2	34,8	31,5	28,9	26,0	21,6	17,3	13,7	10,9	9,39	8,23	7,01	6,26
19	38,6	36,2	32,9	30,1	27,2	22,7	18,3	14,6	11,7	10,1	8,91	7,63	6,84
20	40,0	37,6	34,2	31,4	28,4	23,8	19,3	15,5	12,4	10,9	9,59	8,26	7,43
21	41,4	38,9	35,5	32,7	29,6	24,9	20,3	16,3	13,2	11,6	10,3	8,90	8,03
22	42,8	40,3	36,8	33,9	30,8	26,0	21,3	17,2	14,0	12,3	11,0	9,54	8,64
23	44,2	41,6	38,1	35,2	32,0	27,1	22,3	18,1	14,8	13,1	11,7	10,2	9,26
24	45,6	43,0	39,4	36,4	33,2	28,2	23,3	19,0	15,7	13,8	12,4	10,9	9,89
25	46,9	44,3	40,6	37,7	34,4	29,3	24,3	19,9	16,5	14,6	13,1	11,5	10,5
26	48,3	45,6	41,9	38,9	35,6	30,4	25,3	20,8	17,3	15,4	13,8	12,2	11,2
27	49,6	47,0	43,2	40,1	36,7	31,5	26,3	21,7	18,1	16,2	14,6	12,9	11,8
28	51,0	48,3	44,5	41,3	37,9	32,6	27,3	22,7	18,9	16,9	15,3	13,6	12,5
29	52,3	49,6	45,7	42,6	39,1	33,7	28,3	23,6	19,8	17,7	16,0	14,3	13,1
30	53,7	50,9	47,0	43,8	40,3	34,8	29,3	24,5	20,6	18,5	16,8	15,0	13,8
40	66,8	63,7	59,3	55,8	51,8	45,6	39,3	33,7	29,1	26,5	24,4	22,2	20,7
50	79,5	76,2	71,4	67,5	63,2	56,3	49,3	42,9	37,7	34,8	32,4	29,7	28,0
60	92,0	88,4	83,3	79,1	74,4	67,0	59,3	52,3	46,5	43,2	40,5	37,5	35,5
70	104,2	100,4	95,0	90,5	85,5	77,6	69,3	61,7	55,3	51,7	48,8	45,4	43,3
80	116,3	112,3	106,6	101,9	96,6	88,1	79,3	71,1	64,3	60,4	57,2	53,5	51,2
90	128,3	124,1	118,1	113,1	107,6	98,6	89,3	80,6	73,3	69,1	65,6	61,8	59,2
100	140,2	135,8	129,6	124,3	118,5	109,1	99,3	90,1	82,4	77,9	74,2	70,1	67,3

Fonte: Catherine M. Thompson, *Table of percentage points of the χ^2 distribution*. Biometrika, Vol. 32 (1941) com permissão dos autores e editores.

Quadro II.4 - Valores críticos de KD no Teste Kolmogorov-Smirnov para duas amostras (amostras pequenas)

N	Unilateral*		Bilateral †	
	$\alpha = 0,05$	$\alpha = 0,01$	$\alpha = 0,05$	$\alpha = 0,01$
3	3	—	—	—
4	4	—	4	—
5	4	5	5	5
6	5	6	5	6
7	5	6	6	6
8	5	6	6	7
9	6	7	6	7
10	6	7	7	8
11	6	8	7	8
12	6	8	7	8
13	7	8	7	9
14	7	8	8	9
15	7	9	8	9
16	7	9	8	10
17	8	9	8	10
18	8	10	9	10
19	8	10	9	10
20	8	10	9	11
21	8	10	9	11
22	9	11	9	11
23	9	11	10	11
24	9	11	10	12
25	9	11	10	12
26	9	11	10	12
27	9	12	10	12
28	10	12	11	13
29	10	12	11	13
30	10	12	11	13
35	11	13	12	
40	11	14	13	

* Resumido de Goodman, L. A. 1954. Kolmogorov-Smirnov tests for psychological research. *Psychol. Bull.*, 51, 167, com permissão do autor e da the American Psychological Association.

† Deduzida da Tábua 1 de Massey, F. J., Jr. 1951. The distribution of the maximum deviation between two sample cumulative step functions. *Ann. Math. Statist.*, 22, 126-127, com permissão do autor e do editor.

Quadro II.5 - Valores críticos de D no teste de Kolmogorov-Smirnov para duas amostras (grandes amostras - teste bilateral)

Nível de significância	Valor de D que conduz à rejeição de H_0 ao nível indicado, $D = \text{máximo } S_{n_1}(X) - S_{n_2}(X) $ onde
0,10	$1,22 \sqrt{\frac{n_1 + n_2}{n_1 n_2}}$
0,05	$1,36 \sqrt{\frac{n_1 + n_2}{n_1 n_2}}$
0,025	$1,48 \sqrt{\frac{n_1 + n_2}{n_1 n_2}}$
0,01	$1,63 \sqrt{\frac{n_1 + n_2}{n_1 n_2}}$
0,005	$1,73 \sqrt{\frac{n_1 + n_2}{n_1 n_2}}$
0,001	$1,95 \sqrt{\frac{n_1 + n_2}{n_1 n_2}}$

* Adaptado de Smirnov, N. 1948. Tables for estimating the goodness of fit of empirical distributions. *Ann. Math. Statist.*, 19, 280-281, com permissão do editor.

ANEXO III

Resultados dos Ensaio

Quadro III.1 - Resultados do ensaio 1

Ensaio F1														
T	P	%O2	%N2	%CO2	T. Int	V. Gás	Pp O₂	O₂	Pp N₂	N₂	Pp CO₂	CO₂	CO₂	QECO₂(G)
(h)	(mb)				(°C)	(mL)	(mb)	(mg)	(mb)	(mg)	(mb)	(mg)	(mmol)	(mg/g.h)
0.00	1013.2	20.68	76.27	0.914	21.5	848.9	209.48	319.40	772.72	1178.19	9.26	14.12	0.32	8.09
1.00	1017.0	20.10	78.57	1.336	21.6	848.1	204.40	311.25	799.01	1216.72	13.59	20.69	0.47	11.55
2.00	1021.7	20.03	77.93	2.039	21.9	846.5	204.67	310.76	796.20	1208.92	20.83	31.63	0.72	17.20
3.00	1024.2	20.57	77.86	2.076	22.2	844.8	210.72	318.99	797.44	1207.14	21.27	32.19	0.73	16.79
4.00	1028.6	20.35	76.40	2.114	22.3	842.9	209.30	316.02	785.81	1186.46	21.74	32.83	0.75	17.07
5.00	1034.4	20.26	77.26	2.479	22.5	841.3	209.54	315.56	799.22	1203.60	25.64	38.61	0.88	19.13
5.87	1037.0	20.33	76.20	3.472	22.5	839.3	210.85	316.78	790.15	1187.11	36.00	54.09	1.23	27.00

Ensaio F1														
T	OD	pH	Acetato	VR	Subst.	OUR	SSV	S/X	Acetato	SSV	Ac Ad	CA	CEA	OURE
(h)	mg/L		(mg/l)	(ml)	(mg)	(mg/h)	(mg/l)	(mg/mg)	(mg)	(mg)	(mg)	(mg/h)	(mg/g.h)	(mg/g.h)
0.00	0.000	7.28	809.40	1001.10	0.00	53.1	1745	0.46	810.29	1745				30.43
1.00	8.300	7.23	986.02	988.16	378.65	58.4	1814	0.54	974.35	1792	378.65	214.59	121.33	32.58
2.00	9.000	7.19	1261.75	1020.96	756.58	55.2	1801	0.70	1288.19	1839	377.93	64.08	35.30	30.02
3.00	8.200	7.15	1292.48	1043.46	1008.53	54.4	1837	0.70	1348.65	1917	251.95	191.49	101.98	28.38
4.00	6.200	7.10	1564.15	1078.96	1415.53	56.9	1783	0.88	1687.66	1924	407.00	67.99	35.41	29.58
5.00	9.600	7.06	1784.48	1123.76	1938.81	64.5	1796	0.99	2005.33	2018	523.28	205.61	104.32	31.96
5.87	7.300	7.02	2003.81	1147.36	2200.45	46.9	1746	1.15	2299.09	2003	261.64	-36.92	-18.36	23.41

Ensaio R1															
T	OD	pH	T. Int	Acetato	VR	Subst.	OUR	SSV	S/X	Acetato	SSV	Ac Ad	CA	CEA	OURE
(h)	mg/L		(°C)	(mg/L)	(mL)	(mg)	(mg/h)	(mg/L)	(mg/mg)	(mg)	(mg)	(mg)	(mg/h)	(mg/g.h)	(mg/g.h)
0.00	5.600	7.54	21.3	248.41	1000.00	0.00	79.6	1658	0.15	248.41	1658				48.01
1.00	6.500	7.54	21.4	512.82	988.70	383.82	80.7	1713	0.30	507.03	1663	383.82	125.20	75.40	48.53
2.00	10.000	7.31	22.0	671.15	1020.10	738.11	90.5	1636	0.41	684.64	1668	354.29	176.68	106.07	54.24
3.00	7.900	7.38	22.3	802.62	1047.60	1043.20	93.1	1597	0.50	840.82	1673	305.09	148.90	89.13	55.66
4.00	7.300	7.43	22.5	984.53	1083.50	1446.70	86.0	1558	0.63	1066.74	1688	403.50	177.59	105.68	50.95
5.00	6.800	7.32	22.6	1181.38	1130.70	1987.98	85.5	1627	0.73	1335.79	1839	541.28	272.23	154.36	46.49
5.87	9.800	7.4	22.5	1254.93	1151.90	2214.33	95.2	1594	0.79	1445.55	1836	226.35	134.01	72.92	51.85

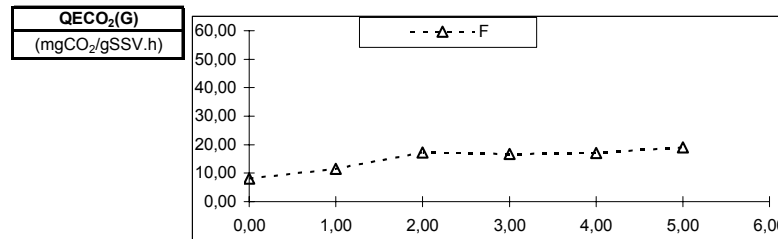
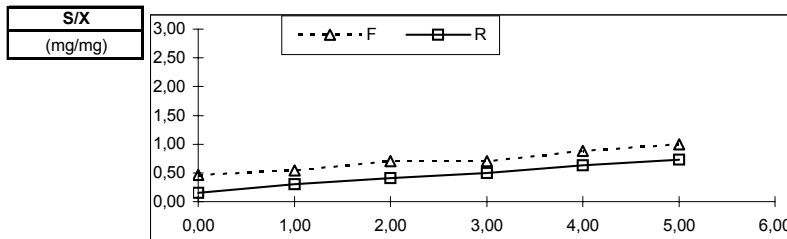
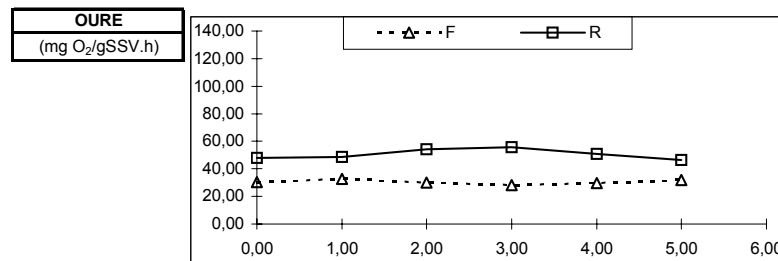
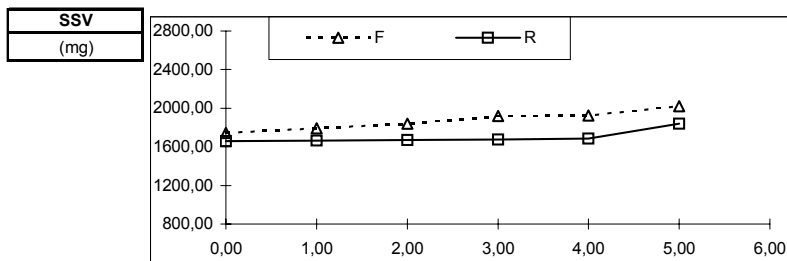
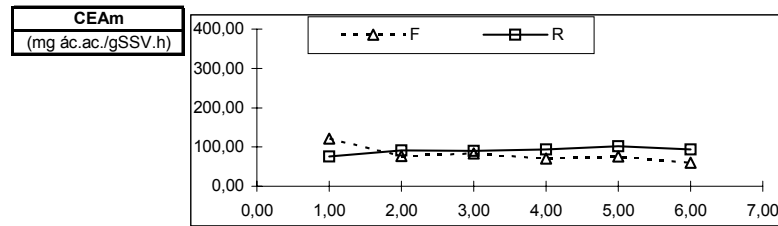
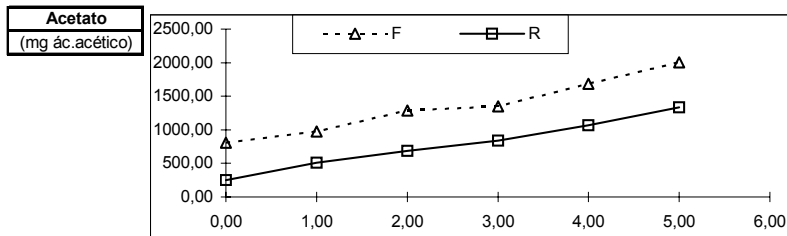


Figura III.1 - Gráficos comparativos entre o reactor Fed-batch Proporcional e o reactor Fed-batch Aberto do ensaio 1
Evolução dos parâmetros acetato, SSV, S/X, CEAm, OURE e QECO₂(G)

Quadro III.2 - Resultados do ensaio 2

Ensaio F2														
T	P	%O2	%N2	%CO2	T. Int	V. Gás	Pp O₂	O₂	Pp N₂	N₂	Pp CO₂	CO₂	CO₂	PECO₂(G)
(h)	(mb)				(°C)	(mL)	(mb)	(mg)	(mb)	(mg)	(mb)	(mg)	(mmol)	(mg/g.h)
0.13	1014.20	20.62	78.95	0.00	21.3	849.40	209.16	319.31	800.69	1222.39	0.00	0.00	0.00	0.00
1	1016.20	19.82	78.75	0.57	21.3	848.00	201.45	307.03	800.25	1219.70	5.74	8.75	0.20	5.89
2	1017.90	19.65	78.78	1.56	21.4	846.40	200.07	304.25	801.94	1219.55	15.90	24.17	0.55	15.77
3	1021.58	19.60	79.20	1.62	21.3	844.50	200.19	305.63	809.13	1228.14	16.55	25.12	0.57	16.12
4	1024.42	19.92	78.40	1.68	21.4	842.90	204.02	311.29	803.19	1216.41	17.20	26.05	0.59	16.10
5	1029.00	19.58	78.22	2.20	21.4	840.90	201.51	307.35	804.86	1216.05	22.62	34.18	0.78	21.06
6	1033.00	18.43	77.67	2.90	21.5	838.90	190.39	290.18	802.37	1208.98	29.99	45.19	1.03	27.76
7	1036.60	19.17	76.52	4.30	21.5	836.80	198.73	302.79	793.25	1192.25	44.62	67.06	1.52	41.07
7.3	1038.80	19.57	76.21	3.79	21.5	834.90	203.33	309.54	791.65	1187.14	39.38	59.05	1.34	36.11

Ensaio F2														
T	OD	pH	Acetato	VR	Subst.	OUR	SSV	S/X	Acetato	SSV	Ac Ad	CA	CEA	OURE
(h)	mg/L		(mg/L)	(mL)	(mg)	(mg/h)	(mg/L)	(mg/mg)	(mg)	(mg)	(mg)	(mg/h)	(mg/g.h)	(mg/g.h)
0.13	11.7	7.26	364.59	1005.60	0.00	64.1	1433.29	0.25	366.63	1441.32				44.47
1	6.6	7.28	451.89	1024.66	97.76	60.9	1326.92	0.34	463.04	1487.00	97.76	1.56	1.07	40.95
2	8.4	7.24	450.46	1036.66	155.32	64.6	1478.44	0.30	466.97	1532.64	57.57	53.63	35.52	42.15
3	6.2	7.2	457.15	1062.56	288.17	65.7	1466.63	0.31	485.75	1558.38	132.85	114.07	73.81	42.16
4	4.4	7.17	446.48	1085.76	407.74	66.1	1489.91	0.30	484.77	1617.69	119.56	120.54	75.90	40.86
5	7.8	7.14	410.36	1110.16	531.73	70.4	1311.34	0.31	455.56	1623.00	123.99	153.21	94.55	43.38
6	9	7.09	565.06	1156.16	775.29	69.1	1300.38	0.43	653.30	1628.00	243.56	45.82	28.19	42.44
7	6.1	7.06	572.00	1183.86	916.99	69.1	1269.24	0.45	677.17	1633.00	141.71	117.84	72.27	42.31
7.3	8.2	7.06	598.31	1199.36	992.28	59.2	1363.56	0.44	717.59	1635.40	75.28	116.22	71.12	36.20

Quadro III.2 (cont.) - Resultados do ensaio 2

Ensaio R2

T (h)	OD (mg/L)	pH	T. Int (°C)	Acetato (mg/L)	VR (mL)	Subst. (mg)	OUR (mg/h)	SSV (mg/L)	S/X (mg/mg)	Acetato (mg)	SSV (mg)	Ac Ad (mg)	CA (mg/h)	CEA (mg/g.h)	OURE (mg/g.h)
0	4.4	7.65	20.2	318.16	1000.00	0.00	13.3	1407.05	0.23	318.16	1407.05				9.47
1	2.46	7.65	21.5	264.28	974.66	97.75	78.1	1421.77	0.19	257.58	1418.00	97.75	158.33	112.09	55.06
2	16.84	7.62	21.9	231.81	991.86	177.45	59.9	1512.86	0.15	229.92	1420.00	79.70	107.36	75.66	42.20
3	10.22	7.59	22	247.97	1014.96	297.01	65.3	1400.37	0.18	251.68	1421.32	119.56	97.80	68.84	45.94
4	7.1	7.56	22.1	265.38	1038.46	416.56	66.7	1421.09	0.19	275.58	1464.00	119.56	95.65	66.30	45.57
5	7.76	7.66	22.15	281.85	1062.86	540.55	61.3	1377.77	0.20	299.57	1476.00	123.98	100.00	68.02	41.55
6	3.86	7.66	22.15	363.30	1103.46	753.09	67.2	1341.02	0.27	400.88	1479.76	212.54	111.23	75.27	45.42
7	10.12	7.66	22.2	466.40	1136.06	921.36	65.3	1740.74	0.27	529.85	1977.58	168.26	39.29	22.73	33.03
7.25	12.19	7.66	22.2	524.62	1149.46	992.20	74.4	1798.43	0.29	603.03	2067.23	70.85	-9.30	-4.60	35.97

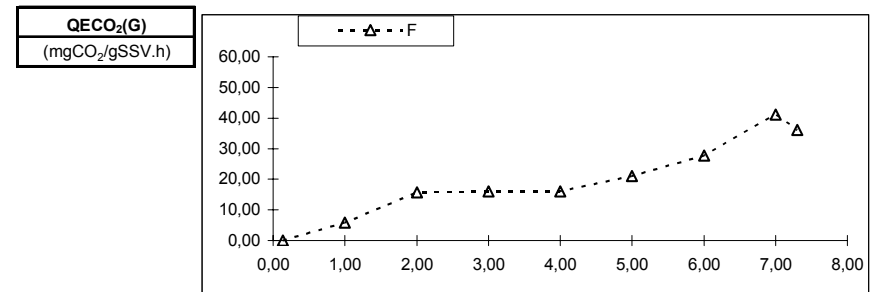
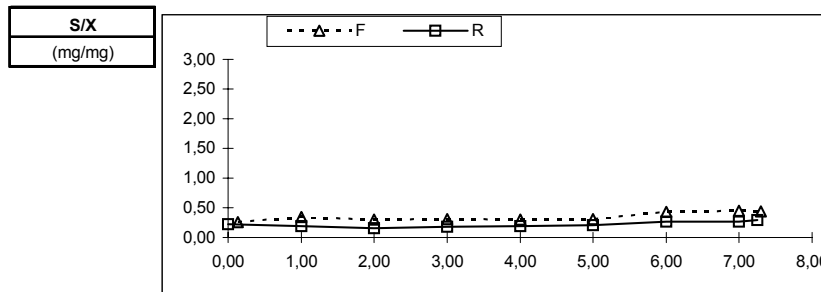
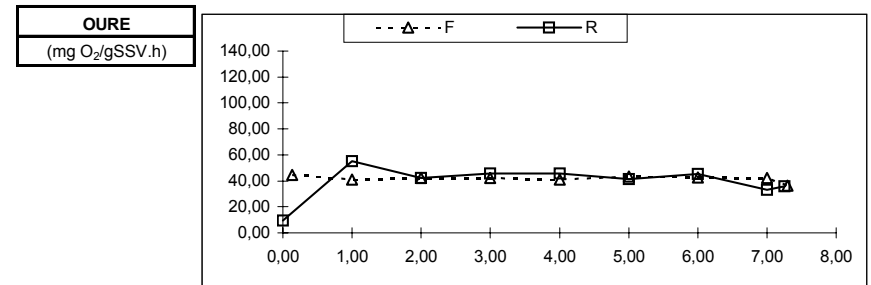
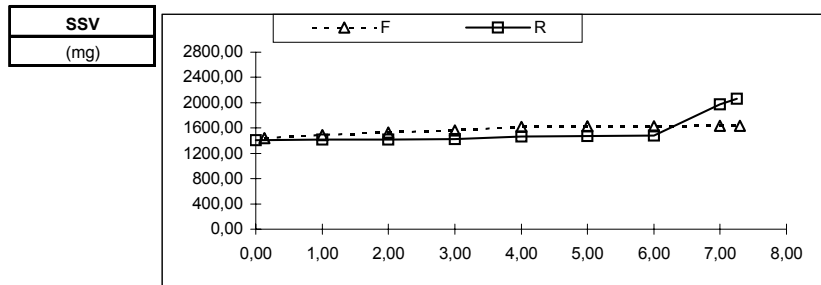
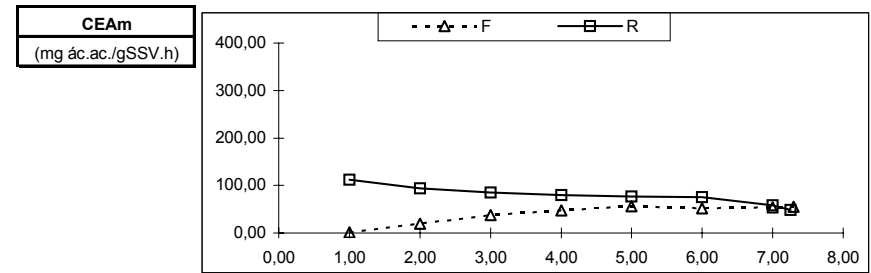
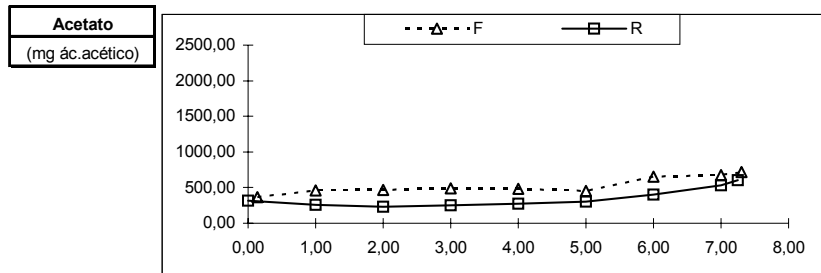


Figura III.2 - Gráficos comparativos entre o reactor Fed-batch Proporcional e o reactor Fed-batch Aberto do ensaio 2
Evolução dos parâmetros acetato, SSV, S/X, CEA_m, OURE e QECO₂(G)

Quadro III.3 - Resultados do ensaio 3

Ensaio F3														
T (h)	P (mb)	%O2	%N2	%CO2	T. Int (°C)	V. Gás (mL)	Pp O ₂ (mb)	O ₂ (mg)	Pp N ₂ (mb)	N ₂ (mg)	Pp CO ₂ (mb)	CO ₂ (mg)	CO ₂ (mmol)	QECO ₂ (G) (mg/g.h)
0.00	1018.0	21.13	76.55	0.666	20.7	850.0	215.10	329.29	779.25	1192.93	6.78	10.38	0.24	10.69
1.00	1021.1	19.90	77.71	1.387	21.2	847.2	203.20	309.52	793.49	1208.66	14.16	21.57	0.49	22.15
2.00	1025.6	20.05	73.61	1.826	21.3	846.0	205.66	312.72	754.94	1147.93	18.73	28.48	0.65	29.15
3.00	1030.4	20.58	77.60	1.021	21.3	844.2	212.09	323.21	799.59	1213.23	10.52	15.96	0.36	16.27
4.00	1034	21.19	76.06	1.696	21.3	842.2	219.19	333.87	786.64	1190.76	17.54	26.55	0.60	26.98
5.00	1039.0	20.93	76.08	2.000	21.3	840.6	217.41	331.09	790.50	1194.32	20.78	31.40	0.71	30.99
5.50	1042.6	20.66	76.11	2.304	21.3	839.4	215.38	327.96	793.52	1197.18	24.03	36.25	0.82	34.79

Ensaio F3														
T (h)	OD (mg/L)	pH	Acetato (mg/L)	VR (mL)	Subst. (mg)	OUR (mg/h)	SSV (mg/L)	S/X (mg/mg)	Acetato (mg)	SSV (mg)	Ac Ad (mg)	CA (mg/h)	CEA (mg/g.h)	OURE (mg/g.h)
0.00	2.5	7.67	314.80	1000.00	0.00	49.8	971	0.32	314.80	971				51.29
1.00	9.1	7.64	576.02	986.75	372.26	61.6	988	0.58	568.38	974	372.26	118.68	122.04	63.24
2.00	5	7.56	772.58	1011.95	680.88	58.8	999	0.77	781.81	977	308.61	95.18	97.58	60.18
3.00	10.5	7.61	1049.61	1051.35	1164.37	56.5	924	1.14	1103.51	981	483.49	161.79	165.26	57.59
4.00	8.9	7.57	1277.53	1083.75	1555.28	56.8	908	1.41	1384.52	984	390.91	109.90	111.86	57.72
5.00	9.9	7.49	1491.64	1122.95	2038.77	54.5	902	1.65	1675.04	1013	483.49	192.97	193.26	53.80
5.50	9.8	7.46	1634.67	1147.35	2337.10	55.3	861	1.90	1875.54	1042	298.33	195.65	190.41	53.07

Ensaio R3															
T (h)	OD (mg/L)	pH	T. Int (°C)	Acetato (mg/L)	VR (mL)	Subst. (mg)	OUR (mg/h)	SSV (mg/L)	S/X (mg/mg)	Acetato (mg)	SSV (mg)	Ac Ad (mg)	CA (mg/h)	CEA (mg/g.h)	OURE (mg/g.h)
0	4.09	7.76	20.1	269.92	1000.00	0.00	65.5	988.78	0.27	269.92	988.78				66.29
1	16.91	7.76	20.5	583.44	981.55	310.54	57.1	1035.72	0.56	572.67	1016.61	310.54	7.79	7.77	56.14
2	19.95	7.76	21.1	609.30	1008.35	608.87	54.5	949.14	0.64	614.39	1029.00	298.33	256.61	250.89	52.98
3	4.86	7.74	21.2	1039.96	1052.75	1174.66	45.3	907.83	1.15	1094.82	1040.00	565.79	85.36	82.51	43.53
4	16.8	7.44	21.4	1243.44	1085.85	1575.85	50.5	968.42	1.28	1350.19	1051.56	401.20	145.82	139.44	48.02
5	4.4	7.62	21.9	1482.90	1123.55	2038.77	47.1	942.56	1.57	1666.11	1059.01	462.92	147.00	139.30	44.48
5.5	6.8	7.6	21.9	1831.56	1147.05	2337.10	46.5	898.61	2.04	2100.89	1062.00	298.33	-272.91	-257.34	43.79

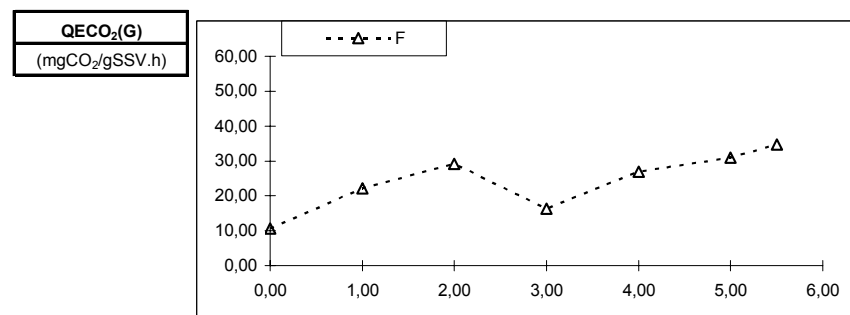
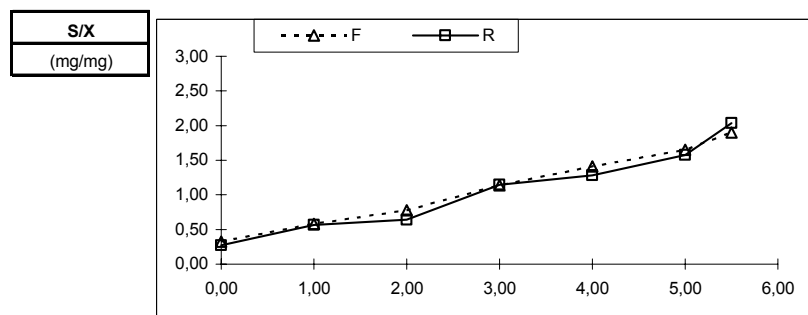
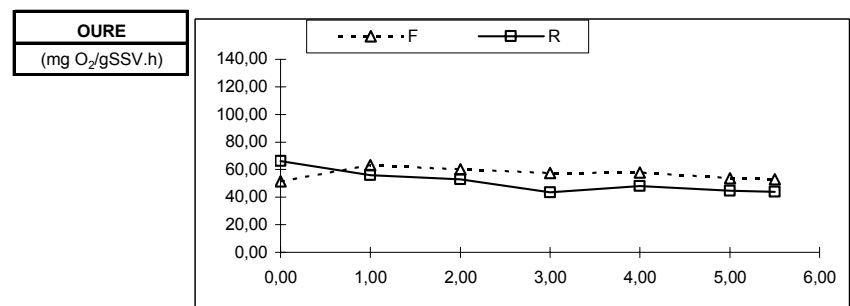
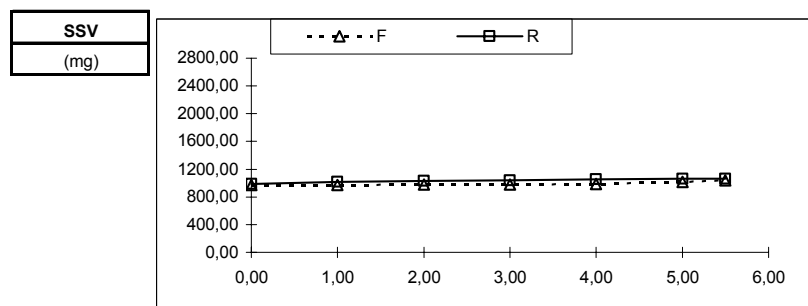
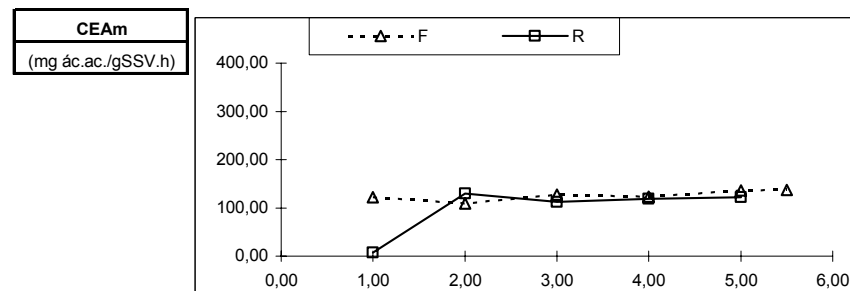
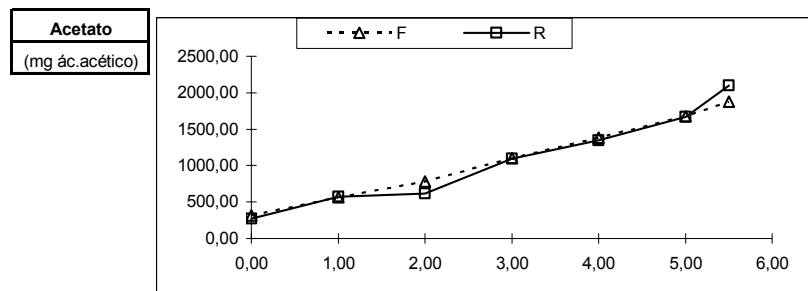


Figura III.3 - Gráficos comparativos entre o reactor Fed-batch Proporcional e o reactor Fed-batch Aberto do ensaio 3
Evolução dos parâmetros acetato, SSV, S/X, CEA_m, OURE e QECO₂(G)

Quadro III.4 - Resultados do ensaio 4

Ensaio F4														
T (h)	P (mb)	%O ₂	%N ₂	%CO ₂	T. Int (°C)	V. Gás (mL)	Pp O ₂ (mb)	O ₂ (mg)	Pp N ₂ (mb)	N ₂ (mg)	Pp CO ₂ (mb)	CO ₂ (mg)	CO ₂ (mmol)	PECO ₂ (G) (mg/g.h)
0.00	1045.5	21.48	78.29	0.233	21.5	850.0	224.58	342.87	818.49	1249.59	2.43	3.71	0.08	1.76
0.25	1046.6	21.37	78.32	0.315	21.4	849.5	223.62	341.32	819.68	1251.10	3.30	5.03	0.11	2.38
1.00	1053.0	21.02	78.42	0.562	21.2	846.0	221.37	336.73	825.71	1255.96	5.92	9.00	0.20	4.20
1.50	1057.2	20.79	78.48	0.726	21.3	843.7	219.84	333.37	829.70	1258.17	7.68	11.64	0.26	5.40
2.00	1062.4	20.45	77.53	0.903	21.3	841.5	217.29	328.64	823.63	1245.71	9.59	14.51	0.33	6.68
2.50	1067.9	21.05	77.88	1.080	21.3	839.0	224.83	339.03	831.63	1254.08	11.53	17.39	0.40	7.96

Ensaio F4														
T (h)	OD mg/L	pH	Acetato (mg/L)	VR (mL)	Subst. (mg)	OUR (mg/h)	SSV (mg/L)	S/X (mg/mg)	Acetato (mg)	SSV (mg)	Ac Ad (mg)	CA (mg/h)	CEA (mg/g.h)	OURE (mg/g.h)
0.00	0.2	7.8	313.49	1000.00	0.00	125.8	2110	0.15	313.49	2110				59.62
0.25	9.7	7.79	352.45	970.79	123.63	125.8	2274	0.16	342.16	2118	123.63	379.87	179.71	59.41
1.00	10.6	7.63	391.31	1016.69	466.47	128.4	2226	0.18	397.84	2140	342.84	382.88	179.86	60.00
1.50	8.2	7.47	358.12	1054.19	751.09	134.7	2229	0.16	377.52	2156	284.62	609.87	283.92	62.48
2.00	10	7.41	457.76	1093.99	1055.12	171.0	2153	0.21	500.79	2171	304.03	361.53	167.11	78.77
2.50	8.9	7.25	522.95	1138.09	1391.49	130.4	1980	0.26	595.16	2186	336.37	483.99	222.17	59.65

Ensaio R4															
T (h)	OD mg/L	pH	T. Int (°C)	Acetato (mg/L)	VR (mL)	Subst. (mg)	OUR (mg/h)	SSV (mg/L)	S/X (mg/mg)	Acetato (mg)	SSV (mg)	Ac Ad (mg)	CA (mg/h)	CEA (mg/g.h)	OURE (mg/g.h)
0.00	0	7.71	22.0	297.18	1000.00	0.00	128.8	2395	0.12	297.18	2395				53.78
0.25	20	7.7	22.0	300.97	970.89	104.23	173.8	2108	0.14	292.21	2403	104.23	436.78	182.06	72.32
1.00	7.1	7.78	22.2	340.88	1010.99	414.72	161.9	2146	0.16	344.63	2428	310.50	344.10	142.45	66.68
1.50	9.1	7.67	22.5	416.95	1054.09	744.62	134.5	2152	0.19	439.50	2445	329.90	470.06	192.93	55.01
2.00	16.4	7.6	23.0	476.57	1093.69	1042.18	167.6	2055	0.23	521.22	2461	297.56	431.68	175.98	68.10
2.50	4.3	7.55	23.0	570.58	1141.59	1410.90	148.9	1981	0.29	651.37	2478	368.71	477.13	193.21	60.09

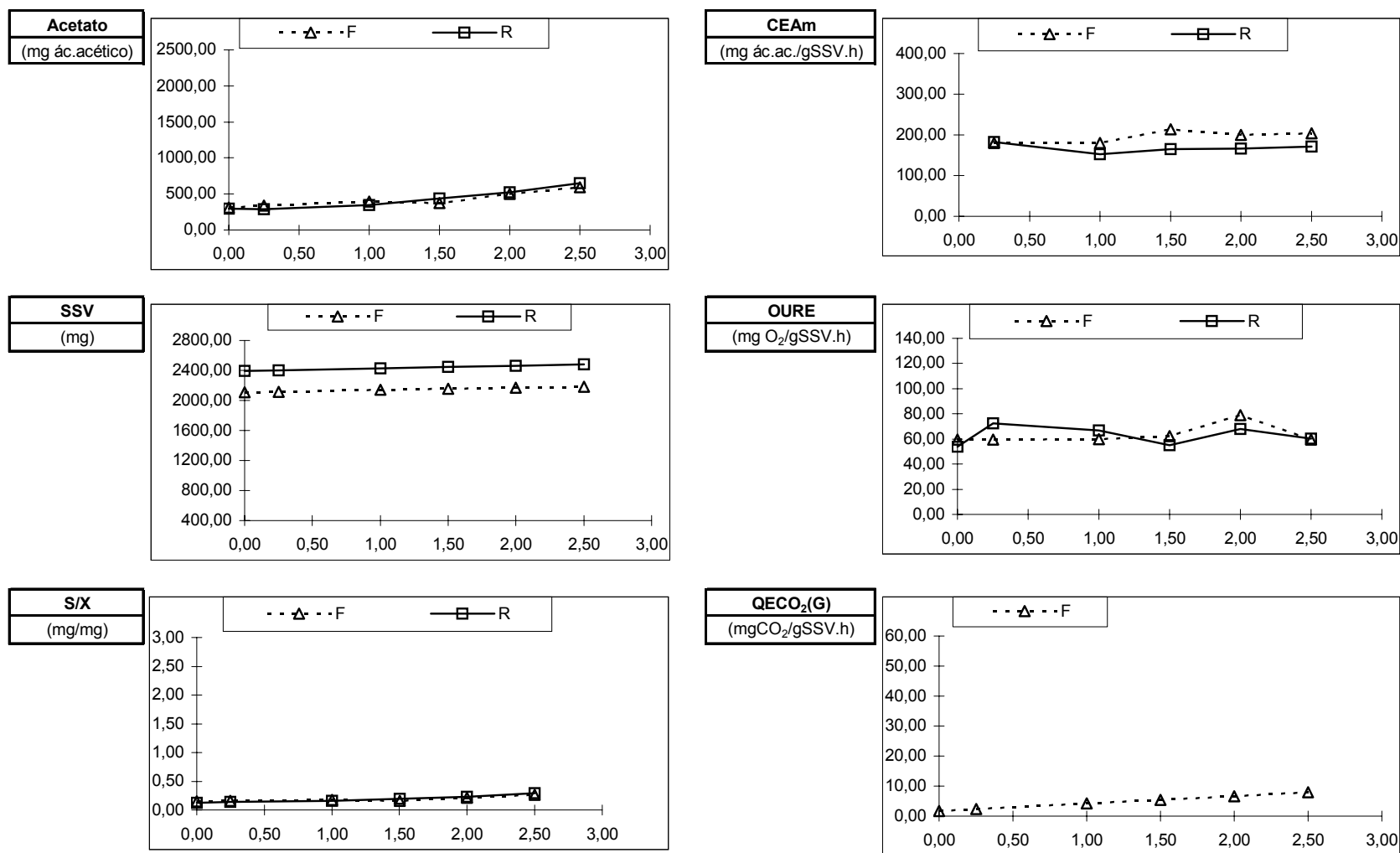


Figura III.4 - Graficos comparativos entre o reactor Fed-batch proporcional e o reactor Fed-batch Aberto do ensaio 4
Evolução dos parâmetros acetato, SSV, S/X, CEA_m, OURE, e QECO₂(G)

Quadro III.5 - Resultados do ensaio 5

Ensaio F5														
T (h)	P (mb)	%O ₂	%N ₂	%CO ₂	T. Int (°C)	V. Gás (mL)	Pp O ₂ (mb)	O ₂ (mg)	Pp N ₂ (mb)	N ₂ (mg)	Pp CO ₂ (mb)	CO ₂ (mg)	CO ₂ (mmol)	PECO ₂ (G) (mg/g.h)
0.00	990.0	21.29	78.71	0.001	20.8	850.0	210.81	322.61	779.19	1192.43	0.01	0.02	0.00	0.01
0.75	995.1	21.11	78.51	0.386	21.1	847.9	210.04	320.31	781.23	1191.37	3.84	5.85	0.13	4.65
1.00	997.5	20.74	78.79	0.495	21.2	847.5	206.85	315.19	785.91	1197.54	4.94	7.52	0.17	5.90
1.50	1000.2	20.54	78.56	0.898	21.2	846.1	205.45	312.53	785.79	1195.38	8.98	13.66	0.31	10.67
2.00	1004.3	20.60	78.51	0.932	21.2	844.7	206.88	314.20	788.51	1197.53	9.36	14.21	0.32	11.06
2.50	1007.9	20.65	78.34	1.041	21.2	843.0	208.10	315.41	789.57	1196.73	10.49	15.90	0.36	12.35
3.00	1012.0	20.69	78.17	1.150	21.2	841.2	209.43	316.74	791.04	1196.40	11.64	17.60	0.40	13.63
3.33	1014.0	20.73	78.05	1.223	21.2	840.0	210.16	317.41	791.44	1195.29	12.40	18.73	0.43	14.48

Ensaio F5														
T (h)	OD mg/L	pH	Acetato (mg/L)	VR (ml)	Subst. (mg)	OUR (mg/h)	SSV (mg/L)	S/X (mg/mg)	Acetato (mg)	SSV (mg)	Ac Ad (mg)	CA (mg/h)	CEA (mg/g.h)	OURE (mg/g.h)
0.00	0.6	7.54	313.81	1000.00	0.00	66.6	1208	0.26	313.81	1208				55.12
0.75	12.4	7.53	655.61	997.96	519.06	80.6	1155	0.57	654.27	1258	519.06	238.13	193.11	64.07
1.00	7.4	7.51	780.75	1009.56	661.34	83.7	1263	0.62	788.21	1275	142.28	33.37	26.34	65.62
1.50	10.1	7.45	934.44	1037.36	996.71	89.0	1163	0.80	969.35	1280	335.37	308.47	241.42	69.53
2.00	8.5	7.43	1173.28	1069.16	1382.89	84.1	1202	0.98	1254.42	1285	386.18	202.22	157.65	65.42
2.50	7.8	7.41	1326.54	1098.06	1728.42	87.1	1230	1.08	1456.62	1288	345.53	286.68	222.80	67.62
3.00	7.8	7.37	1394.36	1129.46	2104.44	86.0	1121	1.24	1574.87	1291	376.02	515.53	399.79	66.62
3.33	7	7.35	1410.62	1146.66	2307.70	91.5	1127	1.25	1617.51	1293	203.25	481.86	372.98	70.77

Quadro III.5 (cont.)- Resultados do ensaio 5

Ensaio R5

T (h)	OD mg/L	pH	T. Int (°C)	Acetato (mg/L)	VR (mL)	Subst. (mg)	OUR (mg/h)	SSV (mg/L)	S/X (mg/mg)	Acetato (mg)	SSV (mg)	Ac Ad (mg)	CA (mg/h)	CEA (mg/g.h)	OURE (mg/g.h)
0.00	3.7	7.61	20.0	410.70	1000.00	0.00	85.6	1253	0.33	410.70	1253				68.30
0.75	10.5	7.59	20.5	685.86	996.26	498.74	92.1	1253	0.55	683.30	1258	498.74	301.51	240.13	73.21
1.00	9	7.57	21.0	808.94	1012.96	701.99	90.4	1244	0.65	819.42	1260	203.25	268.52	213.27	71.74
1.50	8.3	7.52	21.2	1010.25	1037.26	996.71	89.2	1236	0.82	1047.89	1282	294.72	132.50	104.26	69.60
2.00	10.5	7.48	21.9	1227.53	1069.96	1393.05	99.8	1219	1.01	1313.41	1304	396.35	261.66	202.37	76.52
2.50	8.1	7.46	22.0	1426.03	1098.56	1738.59	103.9	1197	1.19	1566.58	1315	345.53	184.73	141.08	79.04
3.00	9.4	7.44	22.1	1633.04	1129.66	2104.44	87.6	1203	1.36	1844.78	1359	365.86	175.32	131.16	64.47
3.33	3.3	7.42	22.3	1721.22	1146.06	2307.70	87.6	1209	1.42	1972.62	1386	203.25	226.23	164.85	63.21

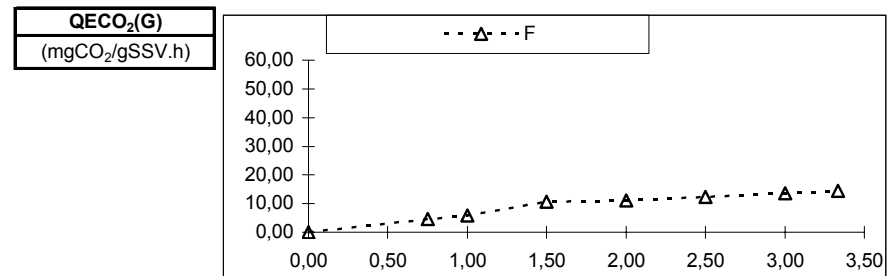
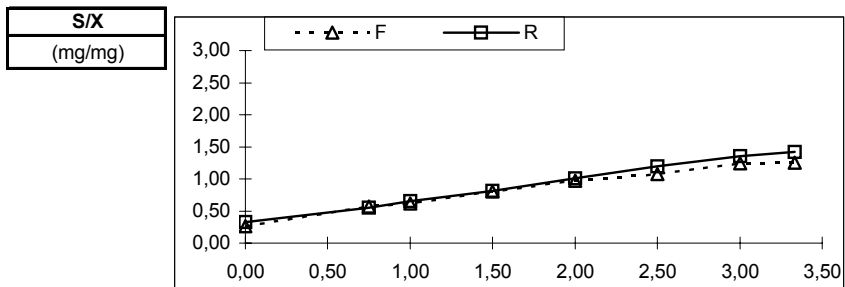
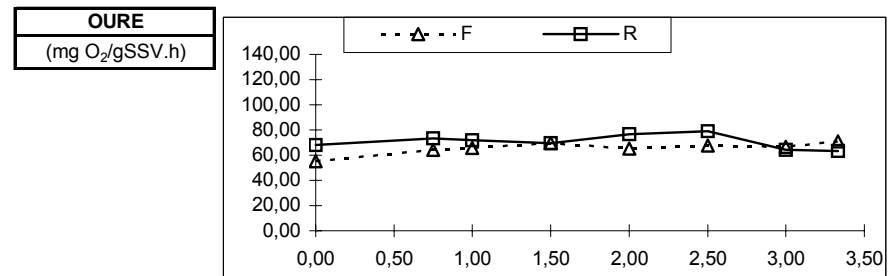
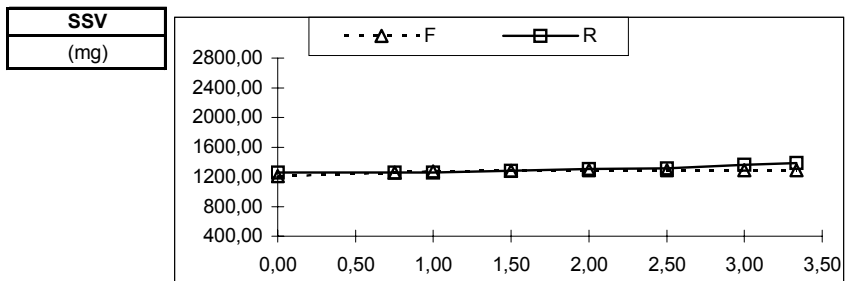
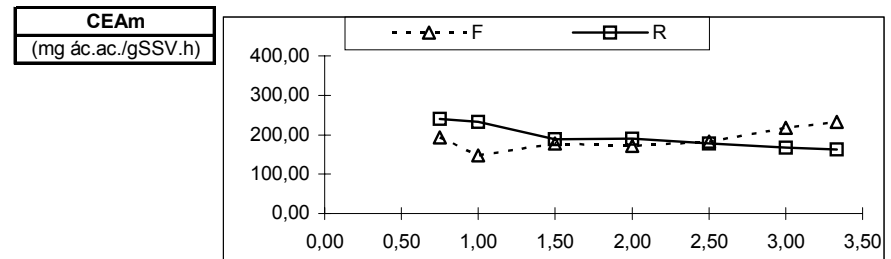
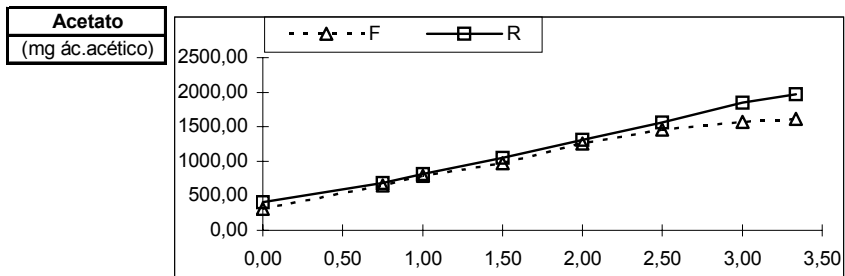


Figura III.5 - Graficos comparativos entre o reactor Fed-batch proporcional e o reactor Fed-batch Aberto do ensaio 5
Evolução dos parâmetros acetato, SSV, S/X, CEA_m, OURE, e QECO₂(G)

Quadro III.6 - Resultados do ensaio 6

EnsaioF6															
T	P	%O₂	%N₂	%CO₂	T. Int	V. Gás	Pp O₂	O₂	Pp N₂	N₂	Pp CO₂	CO₂	CO₂	PECO₂(G)	
(h)	(mb)				(°C)	(mL)	(mb)	(mg)	(mb)	(mg)	(mb)	(mg)	(mmol)	(mg/g.h)	
0.00	1011.0	20.77	78.86	0.366	21.2	850	209.98	320.90	797.32	1218.52	3.70	5.66	0.13	4.88	
1.00	1018.6	21.01	78.55	0.439	21.2	844.7	213.99	325.00	800.14	1215.20	4.47	6.79	0.15	5.81	
1.50	1021.9	20.58	78.94	0.478	21.2	841.7	210.35	318.33	806.68	1220.78	4.89	7.40	0.17	6.31	
2.00	1026.0	20.75	78.13	1.117	21.2	838.6	212.90	321.00	801.68	1208.74	11.46	17.27	0.39	14.70	
2.50	1031.1	20.44	78.20	1.360	21.3	834.8	210.76	316.23	806.27	1209.75	14.02	21.03	0.48	17.77	
2.75	1033.3	20.53	78.05	1.419	21.2	833.6	212.10	317.89	806.54	1208.82	14.66	21.97	0.50	18.43	
2.97	1035.3	20.52	77.78	1.696	21.2	832.2	212.41	317.82	805.28	1204.91	17.56	26.27	0.60	21.91	
EnsaioF6															
T	OD	pH	Acetato	VR	Subst.	OUR	SSV	S/X	Acetato	SSV	Ac Ad	CA	CEA	OURE	
(h)	mg/L		(mg/L)	(mL)	(mg)	(mg/h)	(mg/L)	(mg/mg)	(mg)	(mg)	(mg)	(mg/h)	(mg/g.h)	(mg/g.h)	
0.00	1.4	7.54	303.97	1000.00	0.00	105.4	1161	0.26	303.97	1161				90.81	
1.00	9.5	7.4	454.11	1014.76	329.63	97.3	1097	0.41	460.81	1168	329.63	172.80	148.41	83.30	
1.50	10.1	7.32	484.03	1047.36	508.80	102.7	1135	0.43	506.95	1172	179.16	266.04	227.39	87.63	
2.00	9.6	7.27	574.67	1080.86	692.80	107.7	1087	0.53	621.14	1175	184.00	139.63	118.99	91.66	
2.50	8.2	7.2	621.85	1119.06	901.02	116.1	1058	0.59	695.88	1184	208.22	266.94	226.35	98.09	
2.75	7.2	7.2	665.62	1134.66	988.18	114.4	1010	0.66	755.25	1192	87.16	111.16	93.59	95.97	
2.97	12.9	7.19	742.41	1152.06	1085.02	114.4	1041	0.71	855.30	1199	96.84	-14.77	-12.35	95.42	
Ensaio R6															
T	OD	pH	T. Int	Acetato	VR	Subst.	OUR	SSV	S/X	Acetato	SSV	Ac Ad	CA	CEA	OURE
(h)	mg/L		(°C)	(mg/L)	(mL)	(mg)	(mg/h)	(mg/L)	(mg/mg)	(mg)	(mg)	(mg)	(mg/h)	(mg/g.h)	(mg/g.h)
0.00	3.4	7.63	21.0	314.83	1000.00	0.00	78.7	1281	0.25	314.83	1281				61.42
1.00	10.2	7.52	21.7	448.96	1019.76	353.85	119.5	1238	0.36	457.84	1305	353.85	210.84	163.04	91.57
1.50	13	7.4975	22.0	513.91	1049.86	513.64	133.7	1161	0.44	539.54	1316	159.79	156.19	119.18	101.60
2.00	7.7	7.49	22.2	527.32	1085.06	707.33	113.8	1224	0.43	572.17	1328	193.69	322.10	243.68	85.72
2.50	8.7	7.46	22.5	607.88	1121.36	901.02	145.0	1223	0.50	681.66	1340	193.69	168.41	126.27	108.21
2.75	12	7.44	22.9	595.74	1138.26	988.18	146.5	1195	0.50	678.11	1347	87.16	362.83	270.07	108.76
2.97	5.5	7.43	22.8	614.81	1156.26	1085.02	134.5	1169	0.53	710.88	1352	96.84	295.72	219.14	99.49

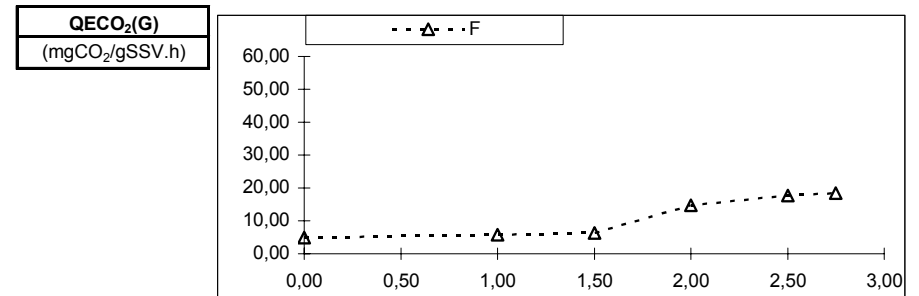
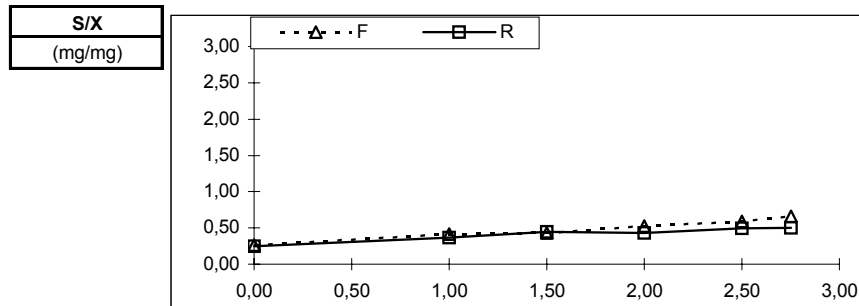
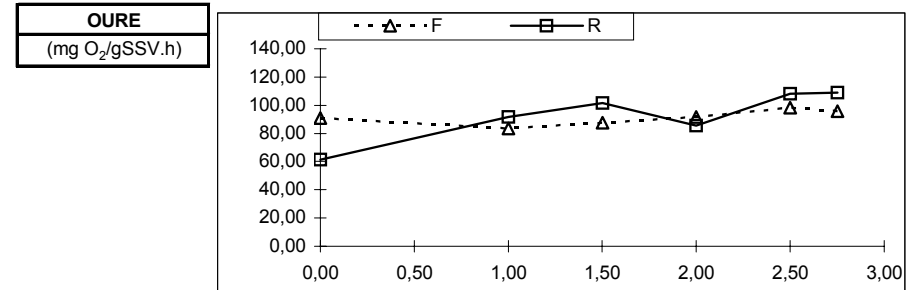
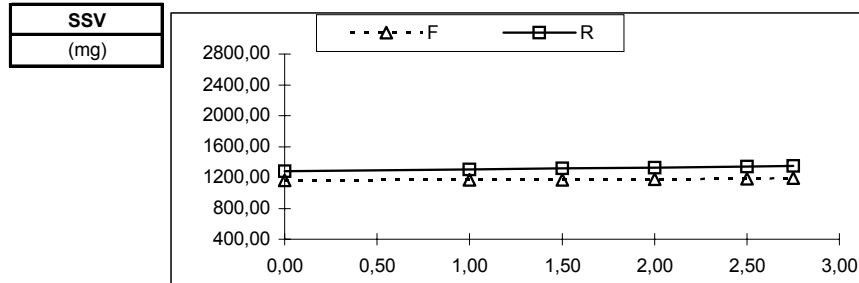
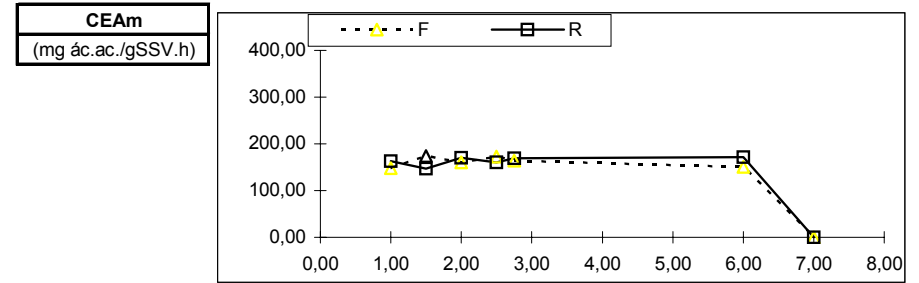
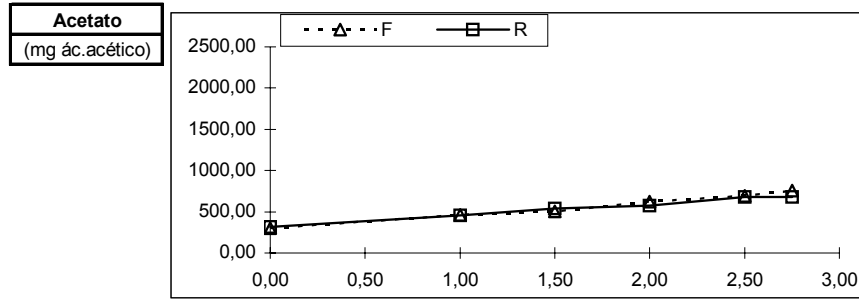


Figura III.6 - Graficos comparativos entre o reactor Fed-batch proporcional e o reactor Fed-batch Aberto do ensaio 6
Evolução dos parâmetros acetato, SSV, S/X, CEA_m, OURE, e QECO₂(G)

Quadro III.7 - Resultados do ensaio 7

Ensaio F7														
T	P	%O₂	%N₂	%CO₂	T. Int	V. Gás	Pp O₂	O₂	Pp N₂	N₂	Pp CO₂	CO₂	CO₂	PECO₂(G)
(h)	(mb)				(°C)	(mL)	(mb)	(mg)	(mb)	(mg)	(mb)	(mg)	(mmol)	(mg/g.h)
0.00	1011.0	20.94	79.07	0.000	20.4	850.0	211.68	324.38	799.35	1224.95	0.00	0.00	0.00	0.00
1.00	1014.7	20.83	78.84	0.321	20.2	847.3	211.41	323.15	800.03	1222.93	3.26	4.98	0.11	7.70
2.00	1017.7	21.06	78.53	0.407	20.2	843.6	214.35	326.22	799.21	1216.34	4.14	6.31	0.14	9.64
3.00	1020.1	20.41	78.80	0.787	20.2	839.4	208.22	315.31	803.86	1217.32	8.03	12.16	0.28	18.42
3.50	1021.8	20.28	78.78	0.945	20.2	837.6	207.21	313.11	804.97	1216.39	9.66	14.60	0.33	22.01
4.00	1023.9	20.79	78.08	1.193	20.2	835.2	212.83	320.68	799.46	1204.61	12.21	18.40	0.42	27.38
5.00	1030.0	20.22	78.06	1.723	20.2	831.3	208.26	312.34	803.99	1205.77	17.75	26.62	0.60	38.52
5.50	1033.2	20.05	78.03	1.913	20.2	828.6	207.20	309.73	806.23	1205.21	19.77	29.55	0.67	42.16
5.65	1035.2	20.50	77.65	1.844	20.2	827.6	212.25	316.90	803.87	1200.22	19.09	28.50	0.65	39.94

Ensaio F7														
T	OD	pH	Acetato	VR	Subst.	OUR	SSV	S/X	Acetato	SSV	Ac Ad	CA	CEA	OURE
(h)	mg/L		(mg/L)	(mL)	(mg)	(mg/h)	(mg/L)	(mg/mg)	(mg)	(mg)	(mg)	(mg/h)	(mg/g.h)	(mg/g.h)
0.00	12.2	7.48	327.31	1000.00	0.00	50.4	641	0.51	327.31	641				78.62
1.00	5.6	7.42	428.78	988.93	179.63	47.3	617	0.69	424.04	647	179.63	82.90	128.73	73.11
2.00	5.4	7.38	430.36	1007.83	267.06	54.9	554	0.78	433.73	654	87.43	77.74	119.51	83.94
3.00	7.9	7.34	447.22	1033.63	391.31	54.6	590	0.76	462.26	660	124.24	95.71	145.67	82.73
3.50	9.6	7.33	430.57	1046.63	455.73	58.8	634	0.68	450.64	663	64.42	152.08	229.89	88.68
4.00	6.2	7.32	456.26	1065.03	547.76	63.0	549	0.83	485.93	672	92.03	113.49	170.00	93.75
5.00	12.2	7.288	511.16	1114.53	810.05	62.6	560	0.91	569.71	691	262.29	178.51	261.94	90.59
5.50	8.3	7.275	587.34	1145.23	971.10	68.0	529	1.11	672.64	701	161.05	116.24	167.01	97.00
5.65	6.1	7.27	629.08	1155.83	1026.32	65.7	617	1.02	727.11	713	55.22	5.00	7.07	92.08

Quadro III.7 (cont.) - Resultados do ensaio 7

Ensaio R7

T (h)	OD mg/L	pH	T. Int (°C)	Acetato (mg/L)	VR (mL)	Subst. (mg)	OUR (mg/h)	SSV (mg/L)	S/X (mg/mg)	Acetato (mg)	SSV (mg)	Ac Ad (mg)	CA (mg/h)	CEA (mg/g.h)	OURE (mg/g.h)
0.00	5.9	7.53	21.0	319.59	1000.00	0.00	53.3	604	0.53	319.59	604				88.23
1.00	8.4	7.46	21.0	359.73	989.13	4.77	59.2	643	0.56	355.82	636	4.77	-31.45	-50.73	93.09
2.00	11.4	7.41	21.7	344.03	1007.93	267.06	75.6	613	0.56	346.76	664	262.29	271.35	417.48	113.86
3.00	3.6	7.36	22.1	361.31	1035.53	405.11	79.9	669	0.54	374.15	692	138.05	110.65	163.14	115.38
3.50	5.7	7.35	22.1	313.78	1046.13	451.13	83.0	633	0.50	328.26	713	46.02	183.82	261.57	116.41
4.00	6	7.32	22.1	313.17	1065.93	547.76	83.4	688	0.46	333.82	734	96.63	182.15	251.84	113.69
5.00	5.7	7.31	22.2	421.22	1120.33	828.45	79.3	679	0.62	471.90	761	280.70	142.61	190.88	104.25
5.50	8.6	7.31	22.5	444.12	1144.63	952.70	83.8	655	0.68	508.35	769	124.24	175.58	229.57	108.97
5.65	6.9	7.3	22.5	479.96	1157.93	1021.72	83.1	671	0.72	555.76	777	69.02	144.11	186.49	107.01

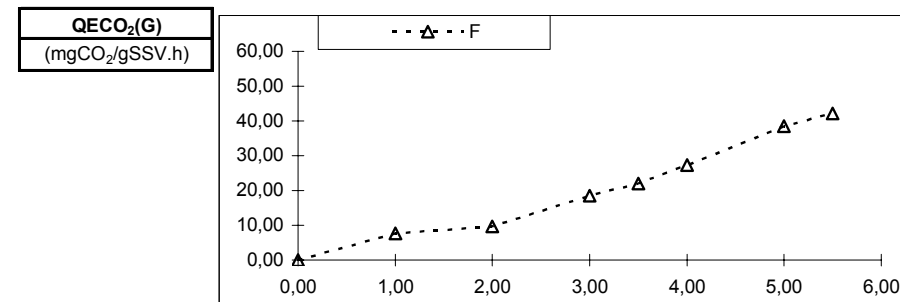
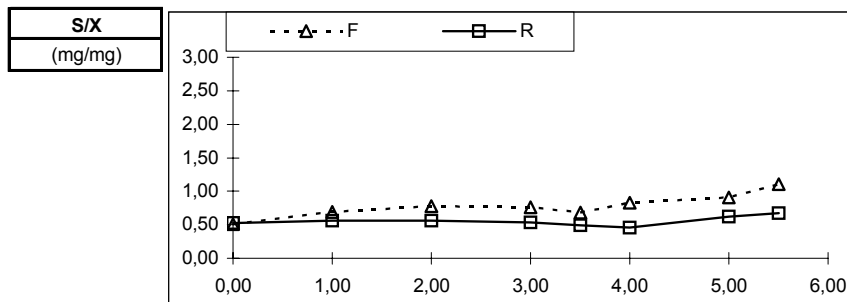
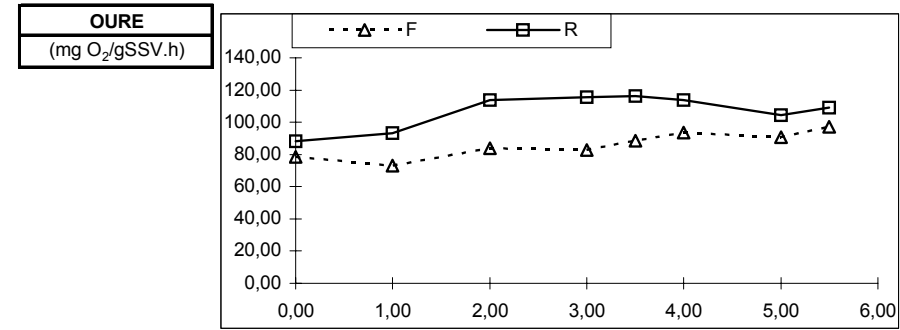
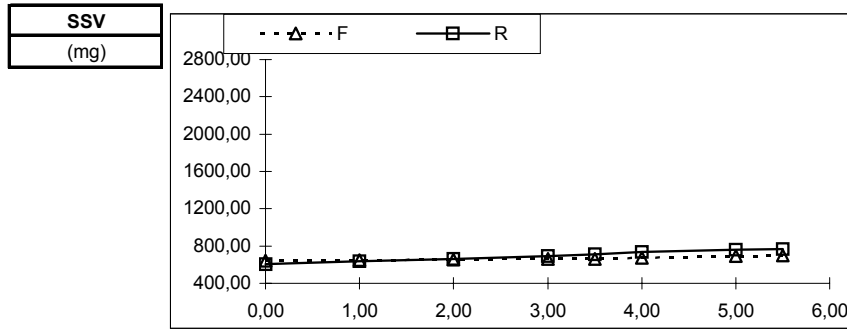
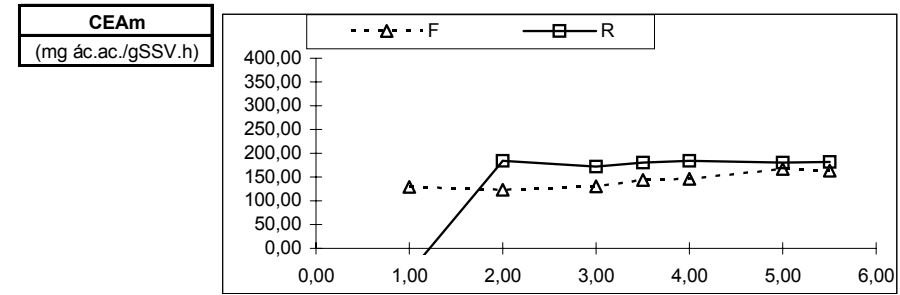
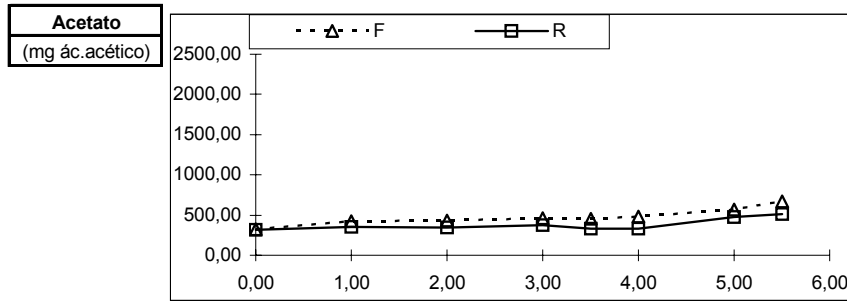


Figura III.7 - Graficos comparativos entre o reactor Fed-batch proporcional e o reactor Fed-batch Aberto do ensaio 7
Evolução dos parâmetros acetato, SSV, S/X, CEA_m, OURE, e QECO₂(G)

Quadro III.8 - Resultados do ensaio 8

Ensaio F8														
T	P	%O₂	%N₂	%CO₂	T. Int	V. Gás	Pp O₂	O₂	Pp N₂	N₂	Pp CO₂	CO₂	CO₂	PECO₂(G)
(h)	(mb)				(°C)	(mL)	(mb)	(mg)	(mb)	(mg)	(mb)	(mg)	(mmol)	(mg/g.h)
0.00	1012.5	21.58	78.31	0.102	20.9	850.0	218.53	334.31	792.94	1213.05	1.04	1.58	0.04	2.40
1.00	1013.6	22.36	79.37	0.439	20.2	848.2	226.69	346.89	804.54	1231.12	4.45	6.81	0.15	9.86
1.75	1016.6	20.21	79.21	0.574	20.2	846.8	205.50	313.94	805.26	1230.20	5.84	8.92	0.20	12.49
2.50	1019.1	20.05	79.31	0.647	20.2	845.0	204.31	311.46	808.20	1232.06	6.59	10.05	0.23	13.66
3.00	1020.8	20.29	78.91	0.800	20.2	843.7	207.11	315.24	805.53	1226.10	8.16	12.42	0.28	16.52
4.00	1022.5	19.72	79.10	1.188	20.2	842.0	201.59	306.23	808.76	1228.53	12.15	18.45	0.42	23.60
5.00	1024.3	20.00	78.62	1.384	20.2	839.4	204.85	310.21	805.30	1219.51	14.18	21.47	0.49	26.40
6.00	1028.0	20.73	77.63	1.635	20.2	836.9	213.14	321.80	798.03	1204.89	16.81	25.38	0.58	30.11
6.50	1030.5	19.59	78.58	1.828	20.2	836.0	201.89	304.50	809.77	1221.31	18.83	28.41	0.65	33.07
7.00	1033.1	19.72	78.28	2.002	20.2	834.7	203.73	306.79	808.69	1217.78	20.68	31.15	0.71	35.64

Ensaio F8														
T	OD	pH	Acetato	VR	Subst.	OUR	SSV	S/X	Acetato	SSV	Ac Ad	CA	CEA	OURE
(h)	mg/L		(mg/L)	(mL)	(mg)	(mg/h)	(mg/L)	(mg/mg)	(mg)	(mg)	(mg)	(mg/h)	(mg/g.h)	(mg/g.h)
0.00	4.3	7.57	310.33	1000.00	0.00	38.9	660	0.47	310.33	660				58.94
1.00	3	7.52	325.31	963.26	68.76	34.1	690	0.47	313.36	691	68.76	65.73	97.31	49.35
1.75	5.4	7.5	573.57	988.66	370.04	32.9	610	0.94	567.06	714	301.28	63.43	90.29	46.08
2.50	7	7.48	680.89	1004.06	535.26	33.5	562	1.21	683.66	736	165.22	64.84	89.43	45.52
3.00	8.6	7.47	803.71	1018.16	690.76	36.7	666	1.21	818.30	752	155.50	41.71	56.06	48.80
4.00	3.5	7.46	838.60	1032.66	846.26	32.9	601	1.40	865.99	782	155.50	107.81	140.57	42.07
5.00	6.9	7.42	930.98	1049.66	1021.20	35.6	588	1.58	977.22	813	174.94	63.71	79.88	43.79
6.00	6.7	7.37	1142.27	1080.96	1371.07	37.7	587	1.95	1234.74	843	349.88	92.35	111.53	44.72
6.50	8.1	7.34	1221.49	1098.66	1575.17	38.4	622	1.96	1342.01	859	204.09	193.66	227.57	44.70
7.00	7.7	7.32	1398.25	1120.76	1827.86	38.4	603	2.32	1567.11	874	252.69	55.17	63.68	43.94

Quadro III.8 (cont.) - Resultados do ensaio 8

Ensaio R8

T	OD	pH	T. Int	Acetato	VR	Subst.	OUR	SSV	S/X	Acetato	SSV	Ac Ad	CA	CEA	OURE
(h)	mg/L		(°C)	(mg/L)	(mL)	(mg)	(mg/h)	(mg/L)	(mg/mg)	(mg)	(mg)	(mg)	(mg/h)	(mg/g.h)	(mg/g.h)
0.00	6.1	7.4	20.8	312.21	1000.00	0.00	39.4	670	0.47	312.21	670				58.81
1.00	5.2		21.0	371.39	967.56	68.76	41.8	696	0.53	359.34	709	68.76	21.63	31.37	58.96
1.75	4.2		21.1	517.58	987.36	340.89	41.6	706	0.73	511.04	739	272.13	160.57	221.78	56.29
2.50	3.3	7.3	21.5	651.98	1005.86	544.98	43.0	698	0.93	655.80	768	204.09	79.11	104.98	55.99
3.00	6.0		21.8	747.67	1019.06	690.76	44.7	702	1.06	761.92	787	145.78	79.34	102.04	56.80
4.00	6.1	7.4	22.0	806.74	1034.76	846.26	48.8	731	1.10	834.78	827	155.50	82.64	102.40	59.01
5.00	6.6	7.4	22.0	878.13	1052.96	1030.92	48.4	767	1.15	924.63	866	184.66	94.80	111.99	55.89
6.00	6.6	7.4	22.0	1052.12	1084.06	1371.07	55.9	748	1.41	1140.56	905	340.16	124.23	140.29	61.77
6.50	7.6	7.4	22.1	1120.82	1147.96	1575.17	57.9	709	1.58	1286.65	924	204.09	116.01	126.86	62.66
7.00	7.7	7.4	22.1	1316.47	1172.06	1847.29	53.5	734	1.79	1542.98	944	272.13	31.58	33.82	56.67

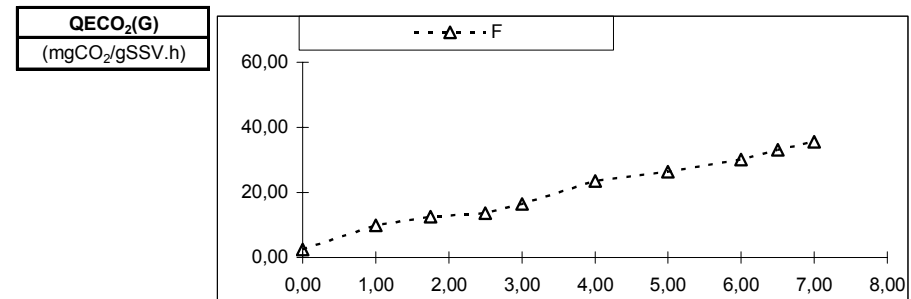
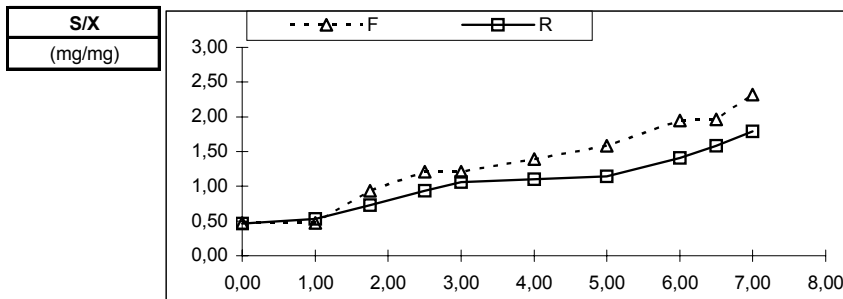
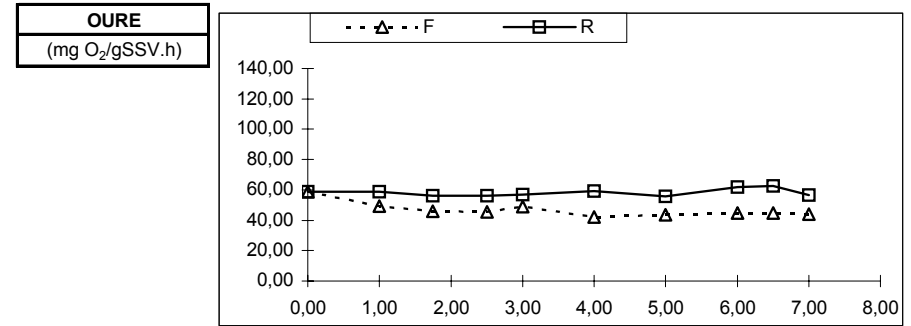
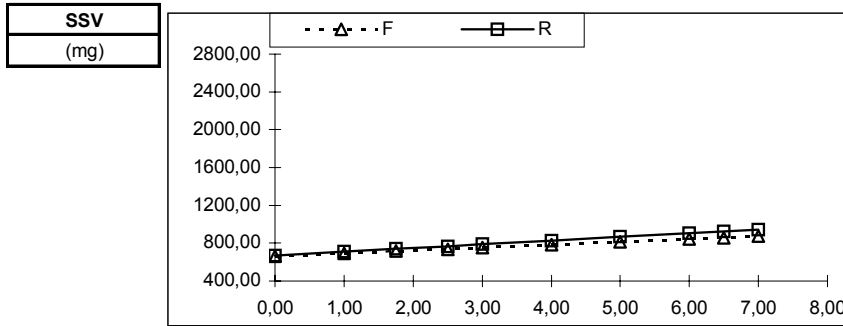
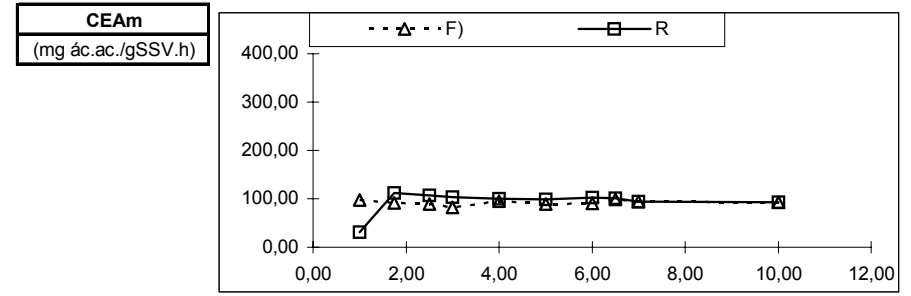
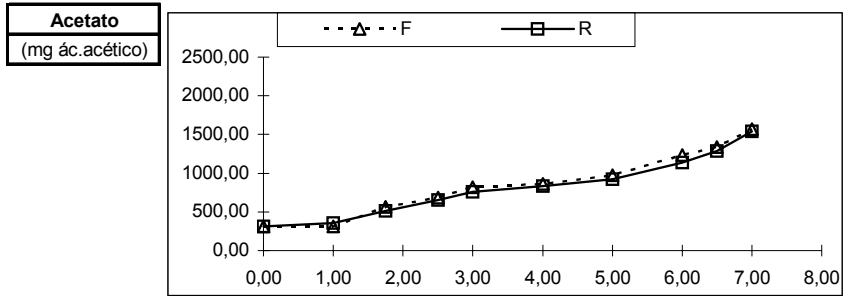


Figura III.8 - Graficos comparativos entre o reactor Fed-batch proporcional e o reactor Fed-batch Aberto do ensaio 8
Evolução dos parâmetros acetato, SSV, S/X, CEA_m, OURE, e QECO₂(G)

Quadro III.9 - Resultados do ensaio 9

Ensaio F9														
T	P	%O₂	%N₂	%CO₂	T. Int	V. Gás	Pp O₂	O₂	Pp N₂	N₂	Pp CO₂	CO₂	CO₂	PECO₂(G)
(h)	(mb)				(°C)	(mL)	(mb)	(mg)	(mb)	(mg)	(mb)	(mg)	(mmol)	(mg/g.h)
0.00	1013.5	20.08	79.81	0.111	20.1	850.0	203.50	312.17	808.87	1240.81	1.13	1.73	0.04	3.15
1.00	1016.8	20.81	78.94	0.247	20.2	848.3	211.60	323.84	802.68	1228.43	2.52	3.85	0.09	6.68
1.50	1018.0	20.86	78.83	0.313	20.2	847.6	212.32	324.67	802.49	1227.13	3.19	4.87	0.11	8.05
2.00	1018.3	20.32	79.33	0.347	20.2	846.7	206.92	316.07	807.84	1234.00	3.54	5.40	0.12	8.87
3.00	1021.9	20.78	78.50	0.721	20.2	844.5	212.31	323.46	802.22	1222.22	7.37	11.23	0.26	18.18
4.00	1024.8	19.65	79.44	0.915	20.2	842.1	201.36	305.90	814.05	1236.72	9.38	14.25	0.32	22.72
4.50	1026.4	19.57	79.29	1.137	20.2	841.0	200.90	304.81	813.84	1234.79	11.67	17.71	0.40	28.02
5.00	1027.9	19.55	79.19	1.265	20.2	840.1	200.92	304.51	814.01	1233.73	13.00	19.71	0.45	30.99
6.00	1030.8	19.94	78.56	1.497	20.2	837.6	205.54	310.59	809.83	1223.74	15.43	23.32	0.53	36.15
7.00	1034.5	19.75	78.34	1.913	20.2	834.8	204.28	307.66	810.44	1220.55	19.79	29.81	0.68	45.57
8.00	1038.2	19.81	78.00	2.194	20.2	832.2	205.65	308.75	809.77	1215.76	22.78	34.20	0.78	51.20

Ensaio F9														
T	OD	pH	Acetato	VR	Subst.	OUR	SSV	S/X	Acetato	SSV	Ac Ad	CA	CEA	OURE
(h)	(mg/L)		(mg/L)	(mL)	(mg)	(mg/h)	(mg/L)	(mg/mg)	(mg)	(mg)	(mg)	(mg/h)	(mg/g.h)	(mg/g.h)
0.00	6.6	7.54	302.47	1000.00	0.00	31.5	549	0.55	302.47	549				57.38
1.00	6.5	7.48	476.71	978.36	254.91	28.7	589	0.81	466.40	577	254.91	90.98	161.64	49.77
1.50	3.2	7.47	574.31	989.46	377.30	28.1	611	0.94	568.26	605	122.39	41.07	69.51	46.45
2.00	5.4	7.44	538.60	991.16	386.72	27.1	792	0.68	533.84	609	9.41	87.66	144.42	44.50
3.00	5.7	7.43	791.94	1021.36	716.24	28.5	674	1.17	808.86	618	329.52	54.50	88.84	46.12
4.00	6.9	7.4	872.45	1045.36	970.44	32.5	486	1.79	912.02	627	254.20	151.04	242.63	51.83
4.50	8.8	7.38	993.42	1057.66	1102.25	31.9	523	1.90	1050.70	632	131.81	-13.74	-21.83	50.47
5.00	5.5	7.37	1070.85	1068.96	1224.65	30.8	565	1.90	1144.70	636	122.39	56.80	89.58	48.43
6.00	6	7.34	1180.63	1091.46	1460.02	33.1	533	2.21	1288.61	645	235.37	91.46	142.80	51.32
7.00	7.6	7.33	1352.27	1123.06	1798.96	38.9	582	2.32	1518.68	654	338.94	108.87	167.61	59.47
8.00	5.8	7.29	1511.11	1150.46	2090.82	33.5	571	2.64	1738.47	668	291.86	72.07	109.02	50.07

Quadro III.9 (cont.) - Resultados do ensaio 9

EnsaioR9

T (h)	OD mg/L	pH	T. Int (°C)	Acetato (mg/L)	VR (mL)	Subst. (mg)	OUR (mg/h)	SSV (mg/L)	S/X (mg/mg)	Acetato (mg)	SSV (mg)	Ac Ad (mg)	CA (mg/h)	CEA (mg/g.h)	OURE (mg/g.h)
0.00	7.2	7.56	20.1	307.50	1000.00	0.00	35.4	595	0.52	307.50	595				59.52
1.00	7.2		20.1	479.23	975.06	217.25	31.9	676	0.71	467.28	597	217.25	57.47	96.45	53.43
1.50	8.7		20.5	603.69	989.06	367.89	32.7	543	1.11	597.09	599	150.64	41.66	69.66	54.59
2.00	7.7	7.45	20.9	571.98	991.56	386.72	38.4	606	0.94	567.16	601	18.83	97.52	162.57	63.92
3.00	5.8	7.42	21.2	800.55	1018.46	678.58	43.3	622	1.29	815.33	604	291.86	43.69	72.53	71.69
4.00	6.4		21.8	945.52	1042.46	932.78	48.9	582	1.62	985.67	607	254.20	83.86	138.54	80.60
4.50	6.6	7.4	22.0	1064.58	1059.16	1111.67	44.4	510	2.09	1127.56	610	178.88	73.99	121.63	72.79
5.00	8.3		22.0	1164.43	1075.76	1290.55	46.2	569	2.05	1252.65	612	178.88	107.58	176.04	75.47
6.00	9.7	7.38	22.1	1276.95	1093.36	1460.02	50.9	533	2.39	1396.17	647	169.47	25.95	41.21	78.67
7.00	5.8	7.37	22.1	1449.57	1170.16	1798.96	52.0	582	2.49	1696.23	682	338.94	38.88	58.52	76.30
8.00	10.1	7.37	22.1	1585.86	1200.16	2100.23	51.6	571	2.78	1903.29	696	301.28	94.22	136.80	74.14

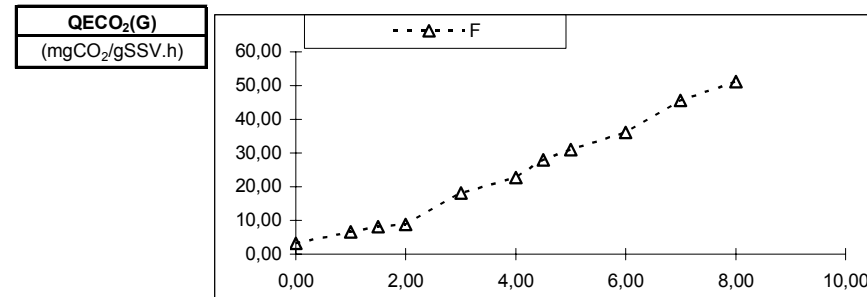
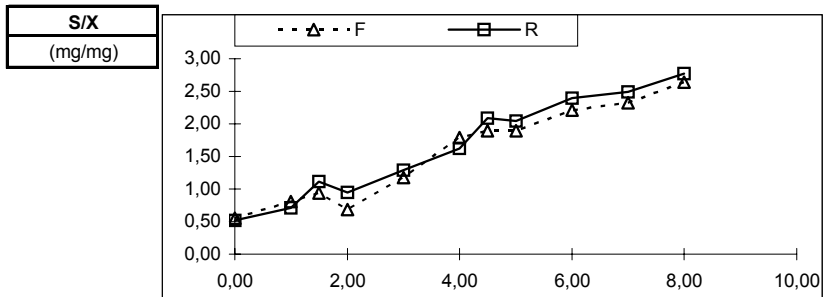
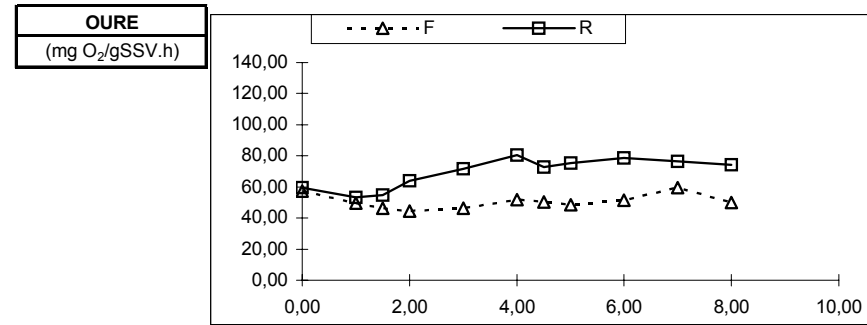
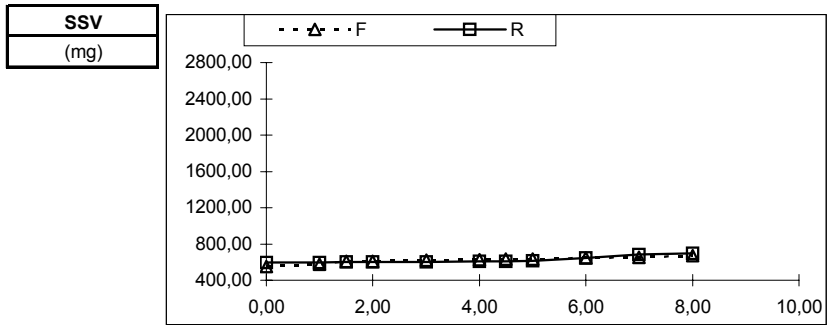
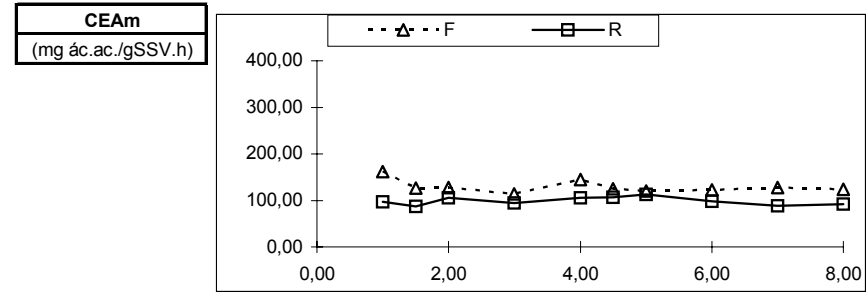
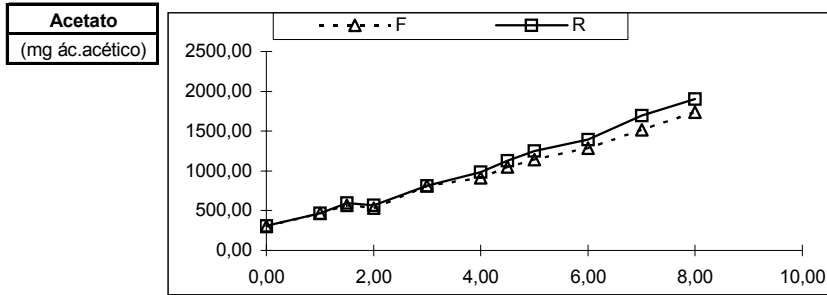


Figura III.9 - Gráficos comparativos entre o reactor Fed-batch proporcional e o reactor Fed-batch Aberto do ensaio 9
Evolução dos parâmetros acetato, SSV, S/X, CEA_m, OURE, e QECO₂(G)

Quadro III.10 - Resultados do ensaio 10

Ensaio F10														
T (h)	P (mb)	%O₂	%N₂	%CO₂	T. Int (°C)	V. Gás (mL)	Pp O₂ (mb)	O₂ (mg)	Pp N₂ (mb)	N₂ (mg)	Pp CO₂ (mb)	CO₂ (mg)	CO₂ (mmol)	PECO₂(G) (mg/g.h)
0.00	1013.5	20.79	79.13	0.084	19.9	850.0	210.68	323.40	801.97	1231.05	0.85	1.31	0.03	2.46
1.00	1016.8	20.28	79.52	0.205	20.4	848.7	206.20	315.50	808.52	1237.10	2.08	3.19	0.07	5.81
2.00	1017.6	20.11	79.49	0.393	20.5	847.1	204.69	312.49	808.91	1234.95	4.00	6.11	0.14	10.81
3.00	1018.9	19.84	79.57	0.588	20.5	845.1	202.17	307.93	810.73	1234.80	5.99	9.13	0.21	15.73
4.00	1019.6	20.19	79.02	0.795	20.5	843.5	205.81	312.87	805.68	1224.79	8.11	12.32	0.28	20.64
4.50	1020.1	20.03	78.94	1.036	20.5	842.2	204.29	310.08	805.24	1222.23	10.57	16.04	0.36	26.15
5.00	1020.2	19.37	79.56	1.067	20.5	841.2	197.65	299.64	811.67	1230.53	10.88	16.50	0.37	26.78
5.50	1020.3	19.65	79.03	1.328	20.5	840.3	200.44	303.55	806.31	1221.10	13.55	20.52	0.47	33.21
6.00	1020.5	19.61	78.93	1.454	20.5	839.3	200.15	302.75	805.52	1218.45	14.83	22.44	0.51	35.25

Ensaio F10														
T (h)	OD (mg/L)	pH	Acetato (mg/L)	VR (mL)	Subst. (mg)	OUR (mg/h)	SSV (mg/L)	S/X (mg/mg)	Acetato (mg)	SSV (mg)	Ac Ad (mg)	CA (mg/h)	CEA (mg/g.h)	OURE (mg/g.h)
0.00	7.8	7.57	295.52	1000.00	0.00	25.4	533	0.55	295.52	533				47.65
1.00	4.3	7.55	385.65	977.56	71.13	21.8	561	0.69	377.00	549	71.13	-10.35	-19.14	39.72
2.00	3.3	7.52	346.74	987.56	174.92	22.0	550	0.63	342.42	565	103.80	138.37	248.45	38.94
3.00	6.3	7.48	396.70	1000.76	240.98	29.5	580	0.68	397.00	581	66.05	11.48	20.04	50.82
4.00	4.4	7.43	345.75	1003.16	245.70	32.2	679	0.51	346.84	597	4.72	54.88	93.21	53.94
4.50	7.6	7.42	307.25	1004.46	245.70	33.0	611	0.50	308.62	613	0.00	76.44	126.30	53.80
5.00	5	7.42	274.40	1005.46	245.70	29.0	526	0.52	275.90	616	0.00	65.44	106.46	47.08
5.50	5.2	7.4	237.39	1006.36	245.70	32.9	614	0.39	238.90	618	0.00	74.00	119.95	53.25
6.00	4.4	7.38	201.20	1007.36	245.70	32.9	632	0.32	202.68	636	0.00	72.44	115.51	51.69

Quadro III.10 (cont.) - Resultados do ensaio 10

Ensaio R10

T (h)	OD mg/L	pH	Tint (°C)	Acetato (mg/L)	VR (mL)	Subst. (mg)	OUR (mg/h)	SSV (mg/L)	S/X (mg/mg)	Acetato (mg)	SSV (mg)	Ac Ad (mg)	CA (mg/h)	CEA (mg/g.h)	OURE (mg/g.h)
0.00	7.1	7.6	19.1	314.29	1000.00	0.00	26.2	555	0.57	314.29	555				47.21
1.00	12.0	7.5	19.2	430.54	978.06	28.66	25.0	577	0.75	421.10	565	28.66	-78.15	-139.58	44.27
2.00	6.1	7.5	19.5	437.58	989.36	179.64	32.7	581	0.75	432.93	575	150.98	139.15	244.22	56.89
3.00	6.2	7.5	20	435.24	1000.06	236.26	32.1	588	0.74	435.26	588	56.62	54.28	93.33	54.55
4.00	5.9	7.5	20.1	382.62	1002.86	240.98	30.5	610	0.63	383.71	612	4.72	56.27	93.74	49.82
4.50	6.4	7.5	20.5	355.61	1004.86	245.70	26.5	610	0.58	357.33	613	4.72	62.19	101.53	43.24
5.00	4.6	7.5	20.7	304.82	1005.76	245.70	26.1	613	0.50	306.58	617	0.00	101.51	165.08	42.31
5.50	2.9	7.5	20.8	267.60	1006.86	245.70	34.3	598	0.45	269.44	646	0.00	74.29	117.65	53.10
6.00	6.0	7.5	20.8	227.02	1008.26	245.70	32.2	669	0.34	228.90	675	0.00	81.08	122.76	47.71

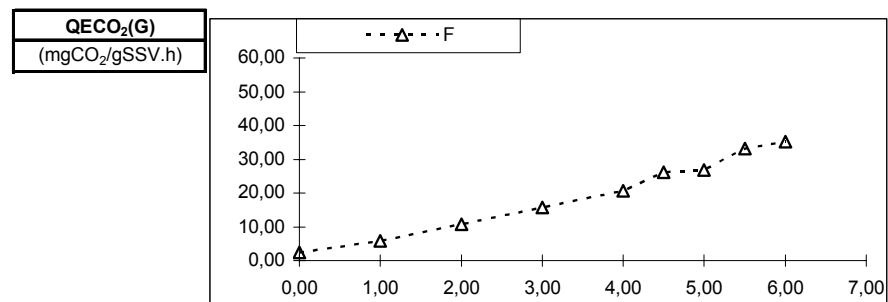
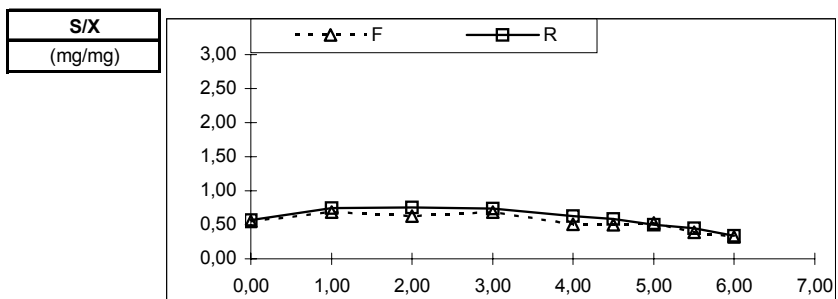
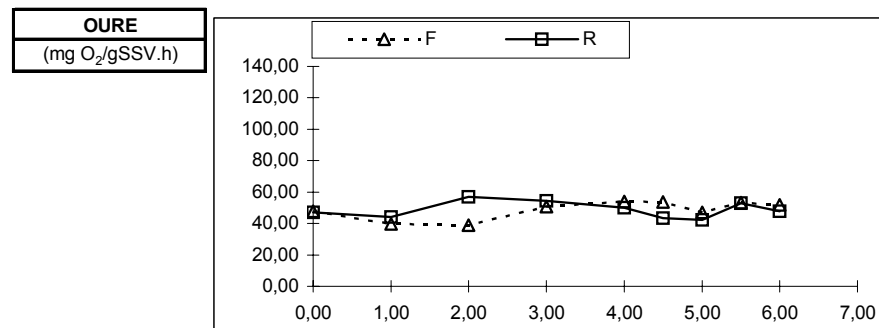
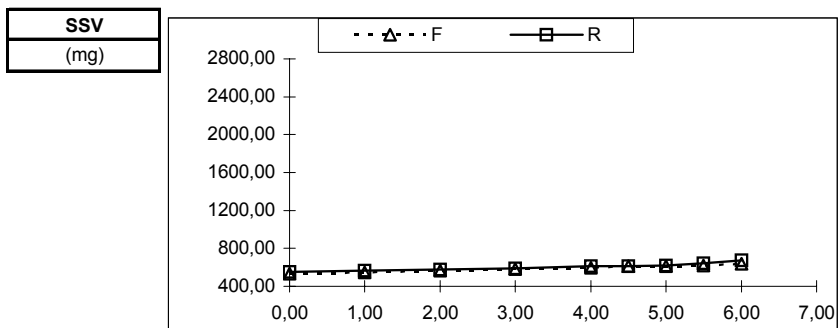
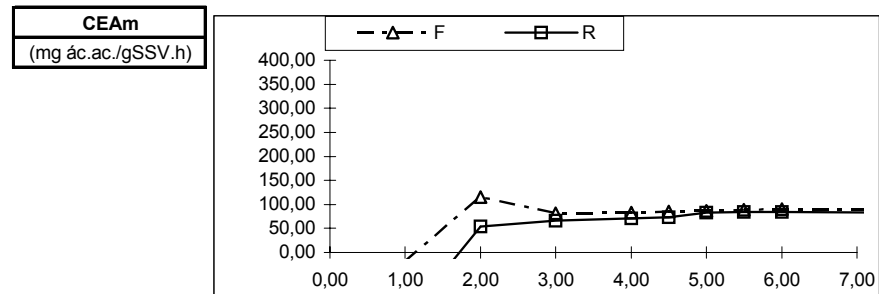
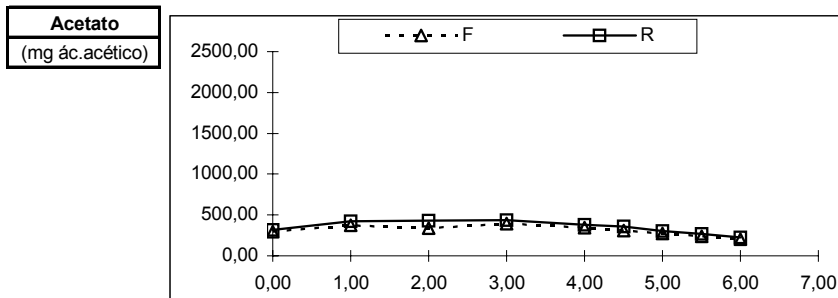


Figura III.10 - Gráficos comparativos entre o reactor Fed-batch proporcional e o reactor Fed-batch Aberto do ensaio 10
Evolução dos parâmetros acetato, SSV, S/X, CEA_m, OURE, e QECO₂(G)

Quadro III.11 - Resultados do ensaio 11

Ensaio F11														
T (h)	P (mb)	%O₂	%N₂	%CO₂	T. Int (°C)	V. Gás (mL)	Pp O₂ (mb)	O₂ (mg)	Pp N₂ (mb)	N₂ (mg)	Pp CO₂ (mb)	CO₂ (mg)	CO₂ (mmol)	PECO₂(G) (mg/g.h)
0.00	1005.5	20.83	78.88	0.292	19.2	850.0	209.44	322.28	793.12	1220.39	2.93	4.51	0.10	7.74
1.00	1007.3	20.85	78.89	0.254	20.6	849.0	210.05	321.29	794.69	1215.54	2.56	3.91	0.09	6.67
2.00	1009.3	19.65	79.86	0.486	20.6	847.9	198.33	302.97	806.06	1231.34	4.91	7.49	0.17	12.68
3.00	1010.7	20.26	79.34	0.404	20.7	847.3	204.75	312.46	801.86	1223.64	4.08	6.23	0.14	10.46
4.00	1013.0	19.89	79.51	0.593	20.7	846.1	201.51	307.07	805.49	1227.43	6.00	9.15	0.21	15.15
5.00	1013.8	19.68	79.08	1.241	20.7	844.6	199.48	303.44	801.74	1219.55	12.58	19.14	0.43	31.27
6.00	1015.8	19.74	78.82	1.446	20.7	843.0	200.50	304.41	800.61	1215.53	14.69	22.31	0.51	35.07
7.00	1016.2	19.80	78.55	1.652	20.7	841.7	201.20	305.00	798.21	1210.02	16.79	25.45	0.58	38.62
8.00	1017.8	19.74	78.82	1.445	20.7	840.0	200.88	303.90	802.21	1213.63	14.71	22.25	0.51	33.61
9.00	1019.7	19.70	78.65	1.645	20.7	839.3	200.92	303.71	802.03	1212.34	16.77	25.35	0.58	38.07
10.00	1019.7	19.07	78.83	2.097	20.7	839.3	194.51	294.02	803.83	1215.06	21.38	32.33	0.73	48.32

Ensaio F11														
T (h)	OD (mg/L)	pH	Acetato (mg/L)	VR (mL)	Subst. (mg)	OUR (mg/h)	SSV (mg/L)	S/X (mg/mg)	Acetato (mg)	SSV (mg)	Ac Ad (mg)	CA (mg/h)	CEA (mg/g.h)	OURE (mg/g.h)
0.00	7.1	7.57	297.12	1000.00	0.00	26.5	583	0.51	297.12	583				45.47
1.00	3.5	7.53	310.76	967.26	128.41	16.7	606	0.51	300.59	586	128.41	124.94	213.80	28.50
2.00	8.8	7.5	381.73	983.56	301.74	16.6	702	0.54	375.46	591	173.34	98.47	167.34	28.09
3.00	4.9	7.46	397.16	993.76	411.22	17.3	599	0.66	394.68	596	109.48	90.25	152.07	29.03
4.00	4	7.44	431.27	1006.96	548.07	14.3	559	0.77	434.27	604	136.85	97.25	162.08	23.68
5.00	5.1	7.38	421.40	1017.26	648.42	22.9	602	0.70	428.68	612	100.35	105.95	174.26	37.42
6.00	8.8	7.38	458.76	1038.06	867.37	29.4	572	0.80	476.22	636	218.95	171.41	274.69	46.23
7.00	5.9	7.34	441.32	1040.16	876.49	25.1	633	0.70	459.04	659	9.12	26.30	40.62	38.09
8.00	3.2	7.33	456.13	1053.86	1013.34	22.7	621	0.73	480.69	662	136.85	115.19	174.41	34.29
9.00	7.1	7.3	517.74	1079.66	1287.03	32.0	764	0.68	558.98	666	273.69	195.40	294.28	48.05
10.00	7.1	7.3	548.46	1092.56	1414.75	27.4	576	0.95	599.23	669	127.72	87.47	131.05	40.96

Quadro III.11 (cont.) - Resultados do ensaio 11

Ensaio R11

T (h)	OD mg/L	pH	T. Int (°C)	Acetato (mg/L)	VR (mL)	Subst. (mg)	OUR (mg/h)	SSV (mg/L)	S/X (mg/mg)	Acetato (mg)	SSV (mg)	Ac Ad (mg)	CA (mg/h)	CEA (mg/g.h)	OURE (mg/g.h)	
0.00	7.0	7.6	18.1	293.26	1000.00	0.00	25.6	609	0.48	293.26	609					42.04
1.00	4.8	7.5	18.7	291.22	967.46	128.41	26.6	630	0.46	281.74	610	128.41	139.93	229.62		43.62
2.00	11.1	7.5	19.1	369.32	984.96	310.87	21.8	602	0.61	363.76	618	182.46	100.44	163.60		35.28
3.00	6.9	7.5	20.0	366.56	994.96	411.22	26.6	608	0.60	364.71	627	100.35	99.40	159.69		42.42
4.00	5.8	7.5	20.5	425.32	1017.06	648.42	25.7	624	0.68	432.58	635	237.20	169.33	268.33		40.46
5.00	5.1	7.5	21.0	382.05	1018.36	648.43	30.8	631	0.61	389.06	643	0.01	43.52	68.12		47.93
6.00	11.8	7.5	21.0	496.23	1046.66	949.48	30.3	604	0.82	519.38	666	301.05	170.73	260.93		45.50
7.00	6.5	7.5	21.0	438.23	1093.46	949.49	32.0	630	0.70	479.18	689	0.01	40.21	59.36		46.47
8.00	4.9	7.4	21.1	473.56	1100.66	1013.34	30.8	624	0.76	521.23	693	63.85	21.80	31.56		44.44
9.00	3.9	7.5	21.1	508.90	1127.06	1287.03	35.3	617	0.82	573.56	696	273.69	221.36	318.76		50.73
10.00	3.9	7.5	21.1	494.74	1140.96	1423.88	39.5	659	0.75	564.48	752	136.85	145.94	201.58		52.52

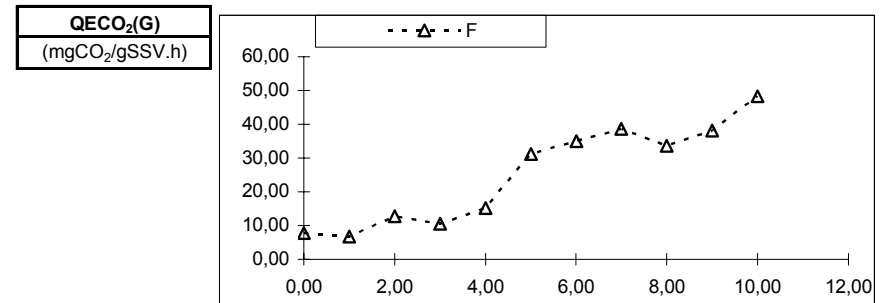
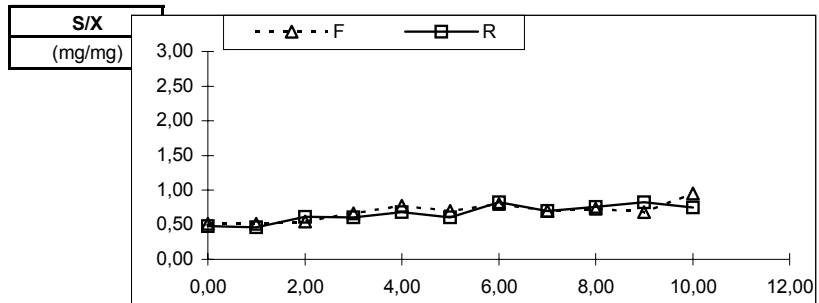
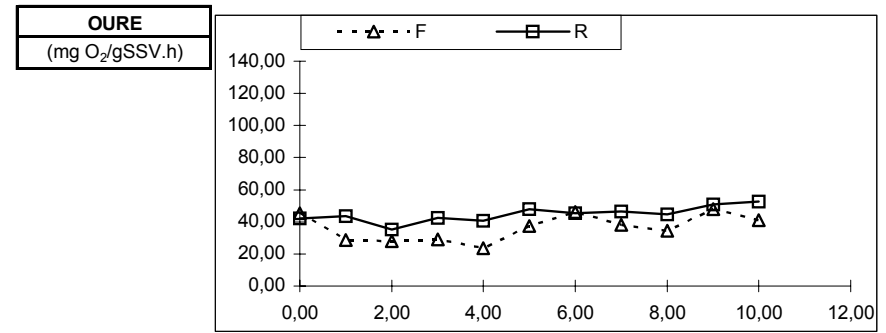
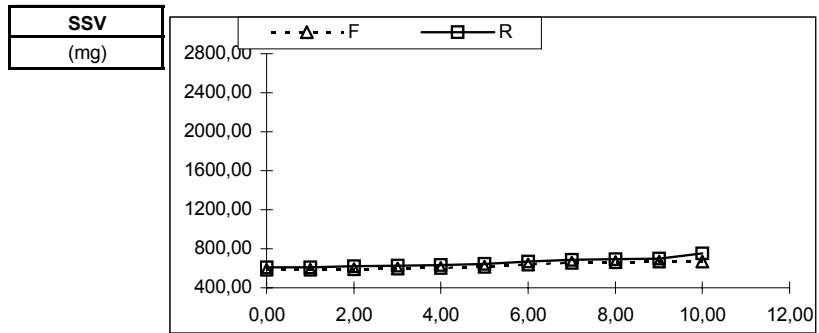
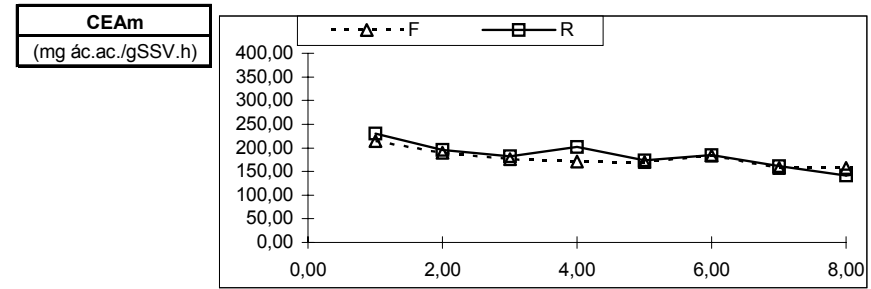
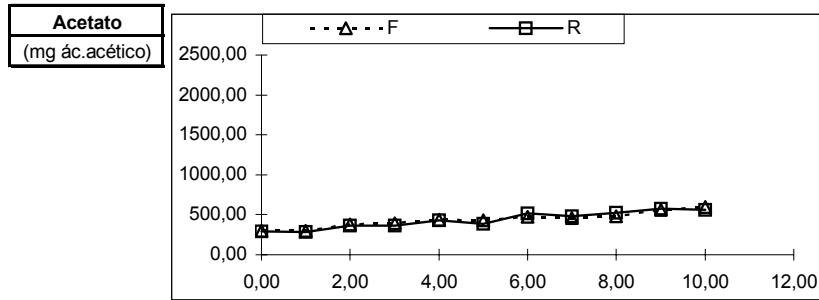


Figura III.11 - Gráficos comparativos entre o reactor Fed-batch proporcional e o reactor Fed-batch Aberto do ensaio 11
Evolução dos parâmetros acetato, SSV, S/X, CEA_m, OURE, e QE_{CO₂}(G)

ANEXO IV
Parâmetros de Análise

Quadro IV.1 - Parâmetros característicos de cada ensaio

Ensaio	TAS cm/h	TAS mg/h	TCA mg/h	TPCO₂ (G) mg/h	TPCO₂ (T) mg/h	OURmed mg/h	QR	OUREmed mg/gh	QR
F1	3.85	373.05	131.78	4.55	36.58	57.88	0.26	30.49	0.23
R1	3.9	383.82	187.73			87.16		50.65	
F2	3.14	138.98	105.55	8.16	86.26	65.64	0.70	41.66	0.70
R2	2.73	120.86	101.03			66.43		40.75	
F3	4.1	421.67	146.54	3.54	68.34	57.25	0.42	56.70	0.43
R3	4.18	429.95	119.79			50.16		52.75	
F4	8.49	548.94	456.08	5.45	43.45	138.06	0.13	63.32	0.13
R4	8.62	557.75	424.04			157.34		62.66	
F5	6.88	699.4	317.07	5.46	98.1	86.00	0.5	65.6	0.51
R5	6.88	699.36	198.71			92.94		70.76	
F6	7.48	362.21	208.06	6.75	71.53	107.64	0.61	91.24	0.61
R6	7.44	360.24	237.03			131.7		92.88	
F7	3.58	164.59	124.47	5.35	84.68	58.46	0.86	86.05	0.87
R7	3.87	177.86	168.58			77.74		106.74	
F8	2.62	254.29	85.71	4.37	61.25	35.58	1.03	46.79	0.99
R8	2.64	256.62	97.83			48.4		58.28	
F9	2.75	259.25	82.52	4.22	38.11	31.31	0.79	50.53	0.78
R9	2.8	263.42	63.21			44.03		69.19	
F10	0.84	39.84	63.22	3.56	60.45	29.16	1.19	48.54	1.2
R10	0.9	42.45	75.71			29.93		48.79	
F11	1.5	137.21	110.09	2.92	42.46	22.44	1.12	36.34	1.1
R11	1.52	138.54	106.92			29.94		44.67	

Quadro IV.1 (cont.) - Parâmetros característicos de cada ensaio

Ensaio	t ensaio h	Alcin mg CaCO ₃	Alcf mg CaCO ₃	Dif Alc mg CaCO ₃	pHi	pHf	OURend mgO ₂ /l	Xmax Fed mg/l	Smax mg/l
F1	5.00	1225	1768	543	7.64	7.02	58.8	2018	2299
R1	5.00	813	1460	648	7.54	7.40	12.0	1839	1446
F2	7.30	795	1125	330	7.26	7.06	6.1	1635	718
R2	6.00	775	1210	435	7.65	7.65	7.3	1480	603
F3	5.50	790	1140	350	7.67	7.46	19.4	1042	1876
R3	5.50	805	1405	600	7.76	7.60	10.5	1062	2101
F4	2.50	1500	1925	425	7.80	7.41	25.9	2254	595
R4	2.50	1450	1900	450	7.71	7.60	15.1	2478	651
F5	3.33	1310	2200	890	7.54	7.41	14.7	1293	1618
R5	3.33	1320	2470	1150	7.61	7.44	15.0	1386	1973
F6	2.75	1025	1280	255	7.54	7.20	29.5	1192	855
R6	2.75	1040	1280	240	7.63	7.43	18.7	1347	711
F7	5.50	940	1415	475	7.48	7.28	6.2	701	727
R7	5.50	985	1400	415	7.53	7.31	8.8	769	556
F8	7.00	980	1524	544			7.0	874	1567
R8	7.00	895	1415	520			5.2	944	1543
F9	8.00	845	2759	1914	7.54	7.29	6.4	668	1738
R9	8.00	860	2065	1205	7.56	7.40	4.1	696	1903
F10	6.00	970	970	0	7.57	7.38	4.3	637	397
R10	6.00	750	1020	270	7.55	7.49	8.2	675	435
F11	10.00	950	1260	310	7.57	7.30	8.2	669	637
R11	10.00	890	1290	400	7.56	7.45	9.4	752	607

Quadro IV.2 - Constantes Cinéticas

Ensaio	μ_{obs} h⁻¹	q_{obs} h⁻¹	Y(X/S) mg/mg	Y(X/S) (C) mg/mg C	TCEA mg/gh
F1	0.028	0.07	0.41	1.001	69.14
R1	0.021	0.100	0.213	0.524	110.53
F2	0.014	0.068	0.212	0.521	66.09
R2	0.010	0.070	0.146	0.359	69.89
F3	0.013	0.140	0.095	0.233	148.06
R3	0.010	0.128	0.076	0.187	115.59
F4	0.014	0.213	0.067	0.164	211.95
R4	0.014	0.175	0.078	0.192	173.63
F5	0.009	0.275	0.031	0.077	246.60
R5	0.037	0.152	0.241	0.593	152.26
F6	0.011	0.179	0.061	0.149	176.98
R6	0.018	0.181	0.100	0.245	178.75
F7	0.018	0.182	0.097	0.239	186.02
R7	0.044	0.243	0.18	0.443	241.05
F8	0.039	0.111	0.351	0.862	108.41
R8	0.047	0.119	0.397	0.977	118.5
F9	0.017	0.134	0.129	0.318	130.57
R9	0.022	0.104	0.209	0.513	101.93
F10	0.029	0.111	0.258	0.635	107.41
R10	0.032	0.127	0.254	0.624	126.56
F11	0.017	0.178	0.097	0.239	175.26
R11	0.021	0.161	0.131	0.323	162.56

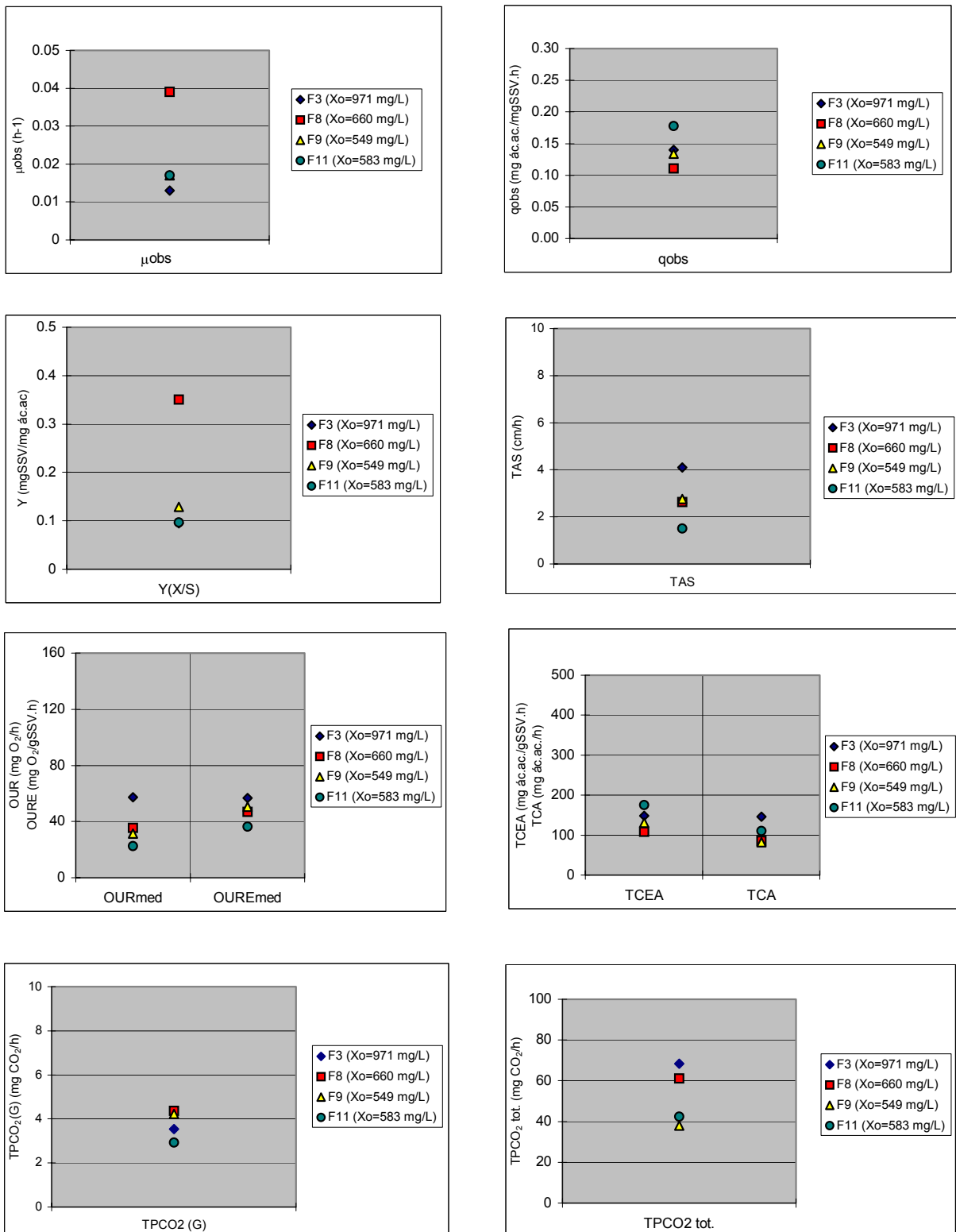


Figura IV.1 - Comparação dos valores de μ_{obs} , q_{obs} , $Y(X/S)$, OUR_{med} , $OURE_{med}$, TAS , $TPCO_2(G)$, $TPCO_2$ total, $TCEA$, e TCA - SAL 12 $X_o < 1000$ mg, no Reactor "Fed-batch" Proporcional

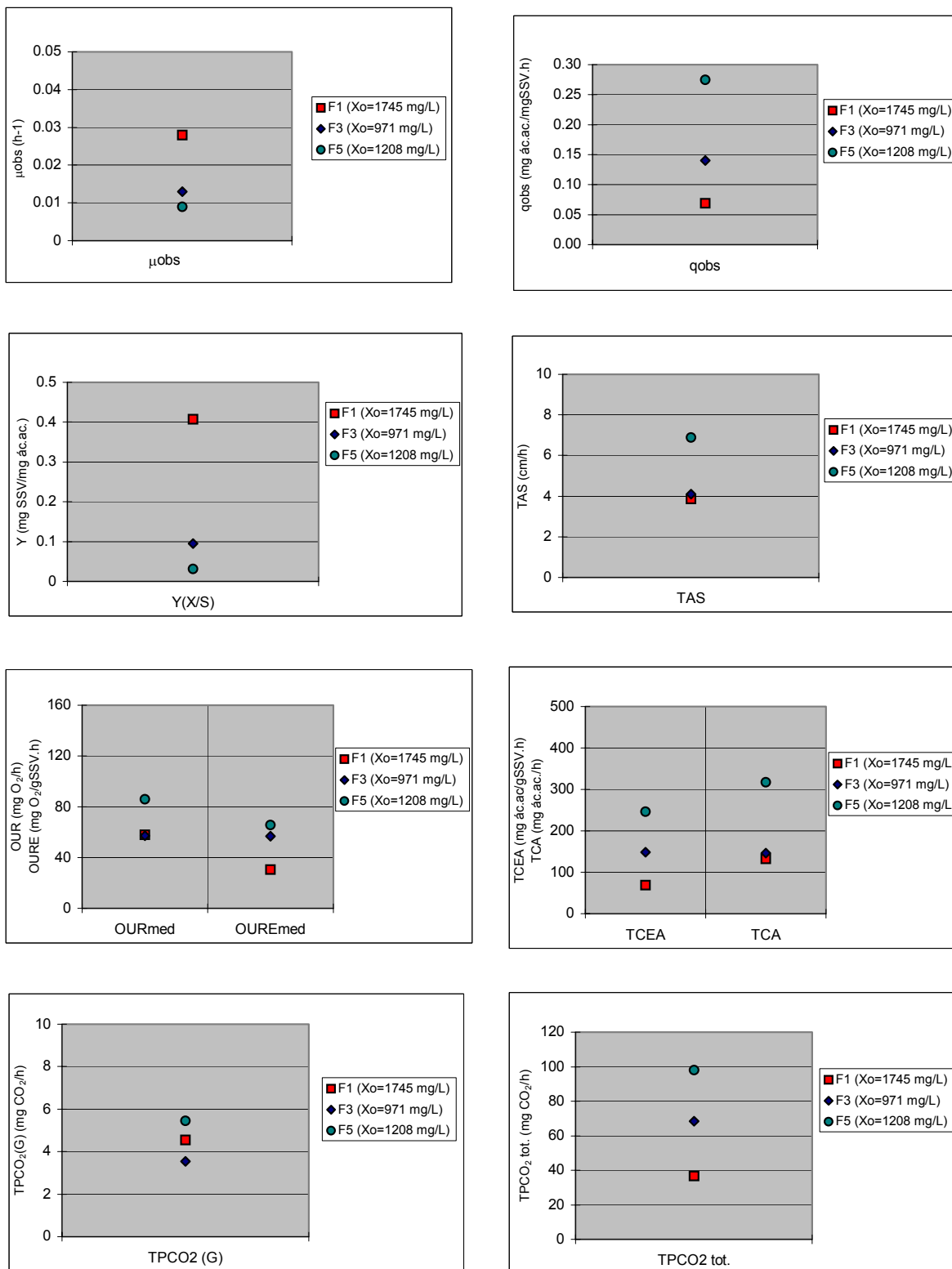


Figura IV.2 - Comparação dos valores de μ_{obs} , q_{obs} , $Y(X/S)$, OUR_{med} , $OURE_{med}$, TAS , $TPCO_2(G)$, $TPCO_2$ total, $TCEA$, e TCA - SAL 12 $1000 < X_o < 2000$ mg

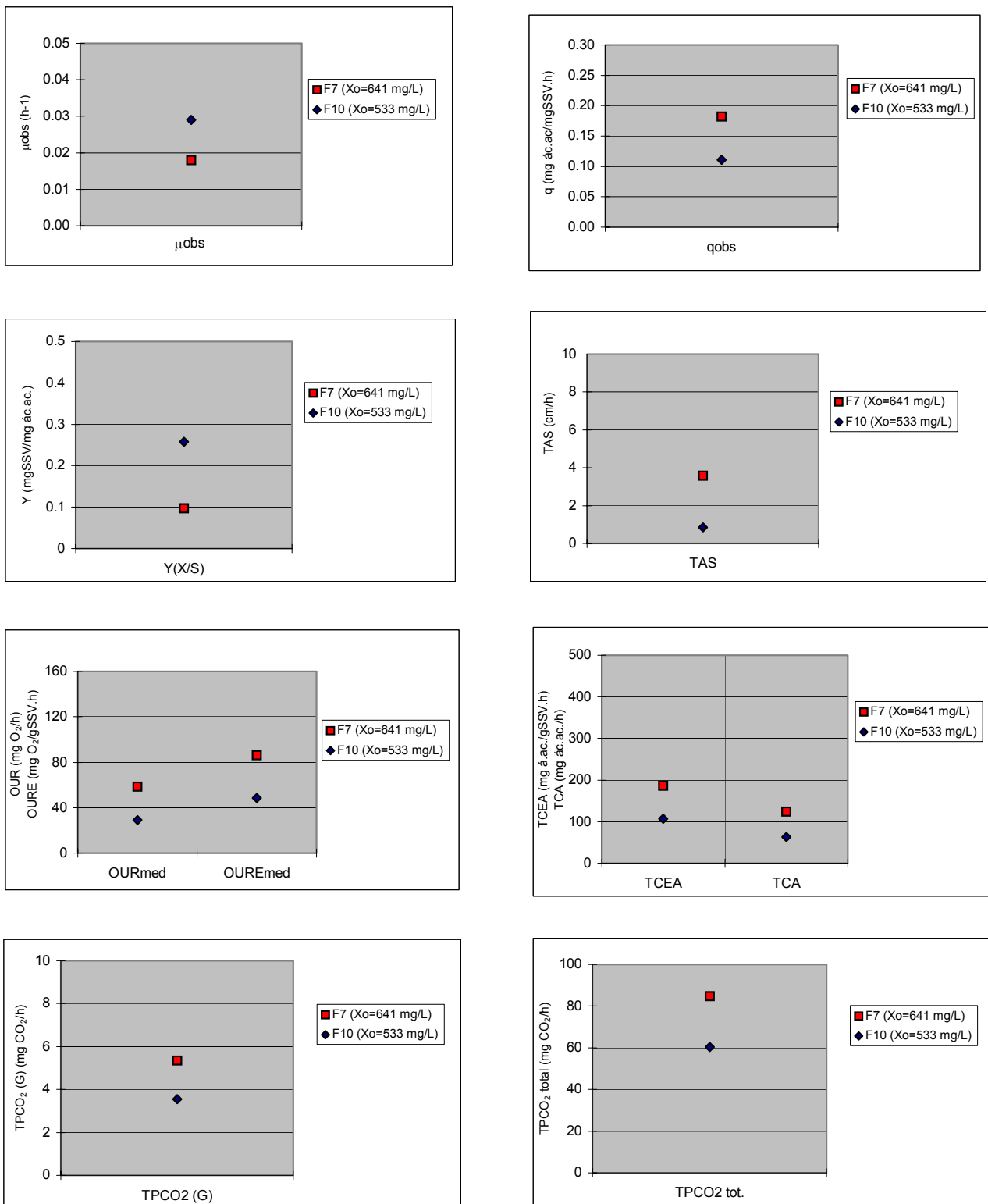


Figura IV.3 - Comparação dos valores de μ_{obs} , q_{obs} , $Y(X/S)$, OUR_{med} , $OURE_{med}$, TAS , $TPCO_2(G)$, $TPCO_2$ total, $TCEA$, e TCA - SAL 6 $X_o < 1000$ mg, no Reactor "Fed-batch" Proporcional

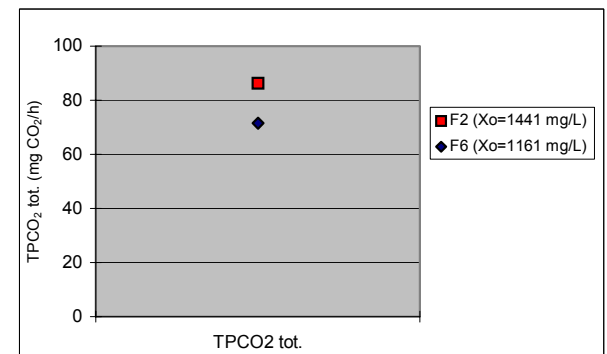
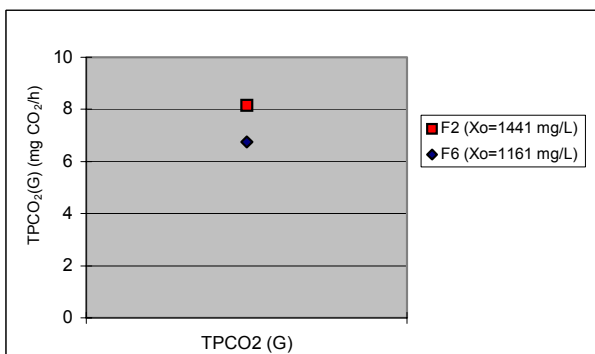
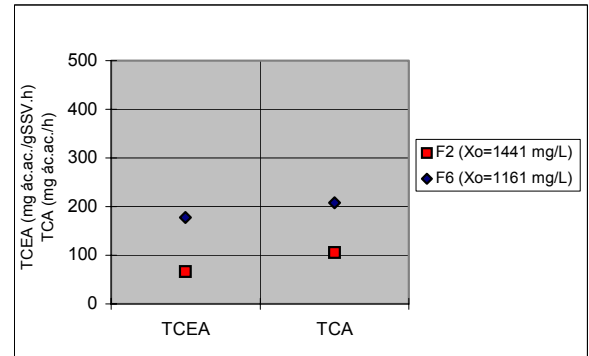
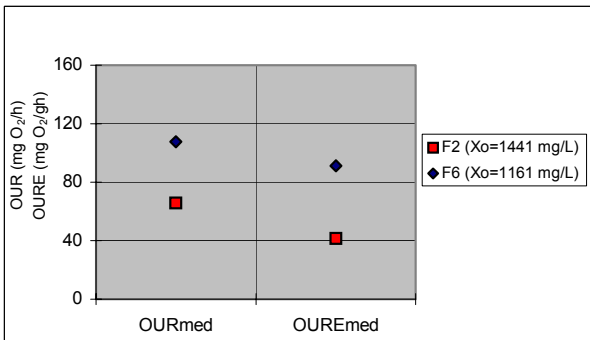
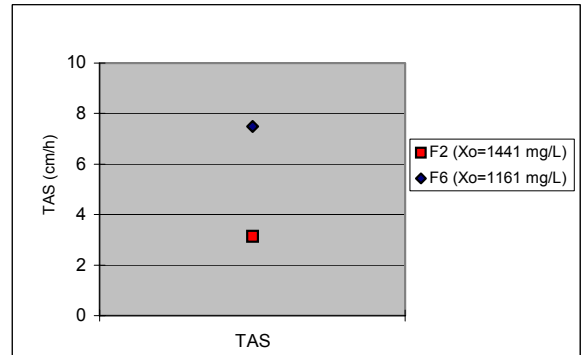
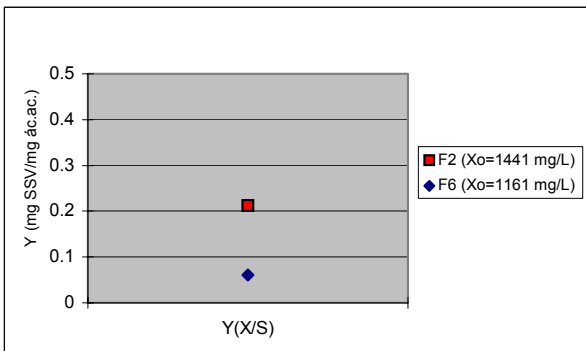
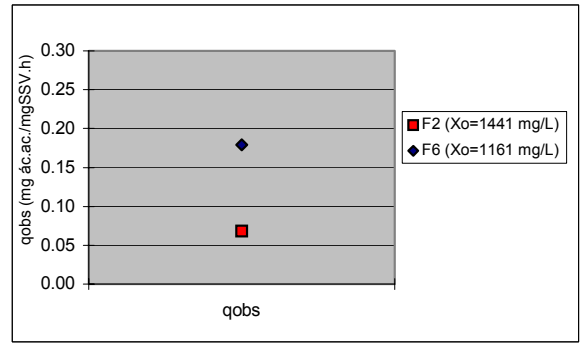
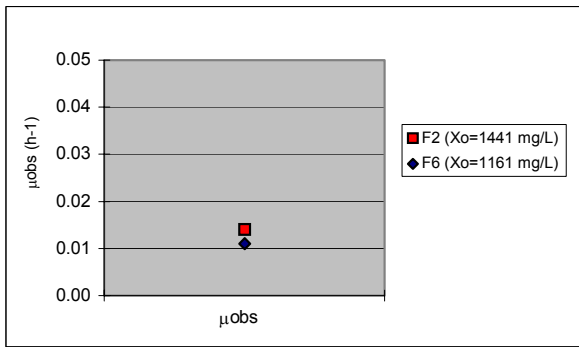


Figura IV.4 - Comparação dos valores de μ_{obs} , q_{obs} , $Y(X/S)$, OUR_{med} , $OURE_{med}$, TAS , $TPCO_2(G)$, $TPCO_2$ total, $TCEA$, e TCA - SAL 6 1000 $X_o < 2000$ mg, no Reactor "Fed-batch" Proporcional

ANEXO V
Análise Estatísticas

QuadroV.1 - Aplicação do teste de Correlação de Spearman para o parâmetros OUREnd

F			R			D ²
Ensaio	OUREnd	Posição	Ensaio	OUREnd	Posição	
F1	58.8	11	R1	12	8	9.0
F2	6.1	2	R2	7.3	3	1.0
F3	19.4	8	R3	10.5	7	1.0
F4	25.9	9	R4	15.1	10	1.0
F5	14.7	7	R5	15.0	9	4.0
F6	29.5	10	R6	18.7	11	1.0
F7	6.2	3	R7	8.8	5	4.0
F8	7	5	R8	5.2	2	9.0
F9	6.4	4	R9	4.1	1	9.0
F10	4.3	1	R10	8.2	4	9.0
F11	8.2	6	R11	9.4	6	0.0
<i>Sum</i>						48

N (nº de pares) 11
rs 0.782
Abs((N-1)^{1/2}*rs) 3.909 =Abs(z) **Não se aceita => Amostras dependentes**

Aceitar Ho se $-1.96 < z < 1.96$ com um nível de significância de 0,05

Aceitar significa que as amostras são independentes

Rejeitar significa que são dependentes

QuadroV.2 - Aplicação do teste de Correlação de Spearman para o parâmetros Y_(X/S)

F			R			D ²
Ensaio	Y(X/S)	Posição	Ensaio	Y(X/S)	Posição	
F1	0.407	11	R1	0.213	8	9
F2	0.212	8	R2	0.146	5	9
F3	0.095	4	R3	0.076	1	9
F4	0.067	3	R4	0.078	2	1
F5	0.031	1	R5	0.241	9	64
F6	0.061	2	R6	0.100	3	1
F7	0.097	5.5	R7	0.180	6	0.25
F8	0.351	10	R8	0.397	11	1
F9	0.129	7	R9	0.209	7	0
F10	0.258	9	R10	0.254	10	1
F11	0.097	5.5	R11	0.131	4	2.25
<i>Sum</i>						97.5

N (nº de pares) 11
rs 0.557
Abs((N-1)^{1/2}*rs) 2.784 =Abs(z) **Não se aceita => Amostras dependentes**

Aceitar Ho se $-1.96 < z < 1.96$ com um nível de significância de 0,05

Aceitar significa que as amostras são independentes

Rejeitar significa que são dependentes

QuadroV.3 - Aplicação do teste de Correlação de Spearman para o parâmetros μ_{obs}

Ensaio	F		Ensaio	R		D ²
	μ_{obs}	Posição		μ_{obs}	Posição	
F1	0.028	9.0	R1	0.021	5.5	12.25
F2	0.014	4.5	R2	0.010	1.5	9
F3	0.013	3.0	R3	0.010	1.5	2.25
F4	0.014	4.5	R4	0.014	3	2.25
F5	0.009	1.0	R5	0.037	9	64
F6	0.011	2.0	R6	0.018	4	4
F7	0.018	8.0	R7	0.044	10	4
F8	0.039	11.0	R8	0.047	11	0
F9	0.017	6.5	R9	0.022	7	0.25
F10	0.029	10.0	R10	0.032	8	4
F11	0.017	6.5	R11	0.021	5.5	1
<i>Sum</i>						103

N (nº de pares) 11
rs 0.532
Abs((N-1)^{1/2}*rs) 2.659 =Abs(z) **Não se aceita => Amostras dependentes**

Aceitar Ho se $-1.96 < z < 1.96$ com um nível de significância de 0,05
Aceitar significa que as amostras são independentes
Rejeitar significa que são dependentes

QuadroV.4 - Aplicação do teste de Correlação de Spearman para o parâmetros TCEA

Ensaio	F		Ensaio	R		D ²
	TCEA	Posição		TCEA	Posição	
F1	69.14	2	R1	110.53	3	1
F2	66.09	1	R2	69.89	1	0
F3	148.06	6	R3	115.59	4	4
F4	211.95	10	R4	173.63	9	1
F5	246.60	11	R5	152.26	7	16
F6	176.98	8	R6	178.75	10	4
F7	186.02	9	R7	241.05	11	4
F8	108.41	4	R8	118.50	5	1
F9	130.57	5	R9	101.93	2	9
F10	107.41	3	R10	126.56	6	9
F11	175.26	7	R11	162.56	8	1
<i>Sum</i>						50

N (nº de pares) 11
rs 0.773
Abs((N-1)^{1/2}*rs) 3.864 =Abs(z) **Não se aceita => Amostras dependentes**

Aceitar Ho se $-1.96 < z < 1.96$ com um nível de significância de 0,05
Aceitar significa que as amostras são independentes
Rejeitar significa que são dependentes

QuadroV.5 - Aplicação do teste de Correlação de Spearman para o parâmetros q_{obs}

F			R			D ²
Ensaio	q	Posição	Ensaio	q	Posição	
F1	0.069	2	R1	0.100	2	0
F2	0.068	1	R2	0.070	1	0
F3	0.140	6	R3	0.128	6	0
F4	0.213	10.0	R4	0.175	9	1
F5	0.275	11	R5	0.152	7	16
F6	0.179	8.0	R6	0.181	10	4
F7	0.182	9	R7	0.243	11	4
F8	0.111	3	R8	0.119	4	1
F9	0.134	5	R9	0.104	3	4
F10	0.111	4	R10	0.127	5	1
F11	0.178	7	R11	0.161	8	1
<i>Sum</i>						32

N (nº de pares) 11
rs 0.855
Abs((N-1)^{1/2}*rs) 4.273 =Abs(z) **Não se aceita => Amostras dependentes**

Aceitar Ho se $-1.96 < z < 1.96$ com um nível de significância de 0,05

Aceitar significa que as amostras são independentes

Rejeitar significa que são dependentes

QuadroV.6 - Aplicação do teste de Correlação de Spearman para o parâmetros OUREmed

F			R			D ²
Ensaio	OUREmed	Posição	Ensaio	OUREmed	Posição	
F1	30.49	1	R1	50.65	4	9.0
F2	41.66	3	R2	40.75	1	4.0
F3	56.70	7	R3	52.75	5	4.0
F4	63.32	8	R4	62.66	7	1.0
F5	65.60	9	R5	70.76	9	0.0
F6	91.24	11	R6	92.88	10	1.0
F7	86.05	10	R7	106.74	11	1.0
F8	46.79	4	R8	58.28	6	4.0
F9	50.53	6	R9	69.19	8	4.0
F10	48.54	5	R10	48.79	3	4.0
F11	36.34	2	R11	44.67	9	49.0
<i>Sum</i>						81

N (nº de pares) 11
rs 0.632
Abs((N-1)^{1/2}*rs) 3.159 =Abs(z) **Não se aceita => Amostras dependentes**

Aceitar Ho se $-1.96 < z < 1.96$ com um nível de significância de 0,05

Aceitar significa que as amostras são independentes

Rejeitar significa que são dependentes

QuadroV.7 - Aplicação do teste de Correlação de Spearman para o parâmetros OURmed

Ensaio	F		Ensaio	R		D ²
	OURmed	Posição		OURmed	Posição	
F1	57.88	6	R1	87.16	8	4.0
F2	65.64	8	R2	66.43	6	4.0
F3	57.25	5	R3	50.16	5	0.0
F4	138.06	11	R4	157.34	11	0.0
F5	86.00	9	R5	92.94	9	0.0
F6	107.64	10	R6	131.70	10	0.0
F7	58.46	7	R7	77.74	7	0.0
F8	35.58	4	R8	48.40	4	0.0
F9	31.31	3	R9	44.03	3	0.0
F10	29.16	2	R10	29.93	1	1.0
F11	22.44	1	R11	29.94	2	1.0
<i>Sun</i>						10

N (nº de pares) 11
rs 0.955
Abs((N-1)^{1/2}*rs) 4.773 =Abs(z) **Não se aceita => Amostras dependentes**

Aceitar Ho se $-1.96 < z < 1.96$ com um nível de significância de 0,05
Aceitar significa que as amostras são independentes
Rejeitar significa que são dependentes

QuadroV.8 - Aplicação do teste de U Mann-Whintney para o parâmetros OUREnd

F			R		
Ensaio	OUREnd	Posição	Ensaio	OUREnd	Posição
F1	58.8	22	R1	12	14
F2	6.1	4	R2	7.3	8
F3	19.4	19	R3	10.5	13
F4	25.9	20	R4	15.1	17
F5	14.7	15	R5	15	16
F6	29.5	21	R6	18.7	18
F7	6.2	5	R7	8.8	11
F8	7	7	R8	5.2	3
F9	6.4	6	R9	4.1	1
F10	4.3	2	R10	8.2	9.5
F11	8.2	9.5	R11	9.4	12
<i>Sun</i>	R1	130.5	R2	122.5	

n1	11			
n2	11			
U1	64.5		U2	56.5
μ U1	60.5		μ U2	60.5
σ^2 U1	115.958		σ^2 U2	115.958
z1	0.034		z	-0.034

Ho: F e R são provenientes de populações com a mesma distribuição

H1: F e R são provenientes de populações com duas distribuições distintas

Dado que $N1$ e $N2 > 8$

Aceita-se Ho porque $-1.96 < z < 1.96$ para um nível de significância de 0,05

Verificação

U1+U2	121.0
$N1 \cdot N2$	121.0
R1+R2	253.0
$N(N+1)/2$	253.0

QuadroV.9 - Aplicação do teste de U Mann-Whintney para o parâmetros $Y_{(X/S)}$

F			R		
Ensaio	Y(X/S)	Posição	Ensaio	Y(X/S)	Posição
F1	0.407	22	R1	0.213	16
F2	0.212	15	R2	0.146	12
F3	0.095	6	R3	0.076	4
F4	0.067	3	R4	0.078	5
F5	0.031	1	R5	0.241	17
F6	0.061	2	R6	0.100	9
F7	0.097	7.5	R7	0.180	13
F8	0.351	20	R8	0.397	21
F9	0.129	10	R9	0.209	14
F10	0.258	19	R10	0.254	18
F11	0.097	7.5	R11	0.131	11
<i>Sun</i>	R1	113.0	R2		140

n1	11			
n2	11			
U1	47.0		U2	74.0
$\mu U1$	60.5		$\mu U2$	60.5
$\sigma^2 U1$	115.958		$\sigma^2 U2$	115.958
z1	-0.116		z	0.116

H0: F e R são provenientes de populações com a mesma distribuição

H1: F e R são provenientes de populações com duas distribuições distintas

Dado que $N1$ e $N2 > 8$

Aceita-se H0 porque $-1.96 < z < 1.96$ para um nível de significância de 0,05

Verificação

U1+U2	121.0
$N1 \cdot N2$	121.0
R1+R2	253.0
$N(N+1)/2$	253.0

Quadro V.10 - Aplicação do teste de U Mann-Whintney para o parâmetros μ_{obs}

F			R		
Ensaio	μ_{obs}	Posição	Ensaio	μ_{obs}	Posição
F1	0.028	16.0	R1	0.021	13.5
F2	0.014	7.0	R2	0.010	2.5
F3	0.013	5.0	R3	0.010	2.5
F4	0.014	7.0	R4	0.014	7
F5	0.009	1.0	R5	0.037	19
F6	0.011	4.0	R6	0.018	11.5
F7	0.018	11.5	R7	0.044	21
F8	0.039	20.0	R8	0.047	22
F9	0.017	9.5	R9	0.022	15
F10	0.029	17.0	R10	0.032	18
F11	0.017	9.5	R11	0.021	13.5
<i>Sun</i>	R1	107.5		R2	145.5

n1	11				
n2	11				
U1	41.50		U2	79.5	
$\mu U1$	60.50		$\mu U2$	60.5	
$\sigma^2 U1$	115.958		$\sigma^2 U2$	115.958	
z1	-0.164		z	0.164	

Ho: F e R são provenientes de populações com a mesma distribuição

H1: F e R são provenientes de populações com duas distribuições distintas

Dado que $N1$ e $N2 > 8$

Aceita-se Ho porque $-1.96 < z < 1.96$ para um nível de significância de 0,05

Verificação

U1+U2	121.0
$N1 \cdot N2$	121.0
R1+R2	253.0
$N(N+1)/2$	253.0

QuadroV.11 - Aplicação do teste de U Mann-Whintney para o parâmetros TCEA

F			R		
Ensaio	TCEA	Posição	Ensaio	TCEA	Posição
F1	69.14	2	R1	110.53	7
F2	66.09	1	R2	69.89	3
F3	148.06	12	R3	115.59	8
F4	211.95	20	R4	173.63	15
F5	246.60	22	R5	152.26	13
F6	176.98	17	R6	178.75	18
F7	186.02	19	R7	241.05	21
F8	108.41	6	R8	118.50	9
F9	130.57	11	R9	101.93	4
F10	107.41	5	R10	126.56	10
F11	175.26	16	R11	162.56	14
<i>Sun</i>	R1	131.0	R2	122.0	

n1	11			
n2	11			
U1	65.0		U2	56.0
$\mu U1$	60.5		$\mu U2$	60.5
$\sigma^2 U1$	115.958		$\sigma^2 U2$	115.958
z1	0.039		z	-0.039

Ho: F e R são provenientes de populações com a mesma distribuição

H1: F e R são provenientes de populações com duas distribuições distintas

Dado que $N1$ e $N2 > 8$

Aceita-se Ho porque $-1.96 < z < 1.96$ para um nível de significância de 0,05

Verificação

U1+U2	121.0
$N1 \cdot N2$	121.0
R1+R2	253.0
$N(N+1)/2$	253.0

Quadro V.12- Aplicação do teste de U Mann-Whitney para o parâmetros q_{obs}

F			R		
Ensaio	q_{obs}	Posição	Ensaio	q_{obs}	Posição
F1	0.069	2	R1	0.100	4
F2	0.068	1	R2	0.070	3
F3	0.140	12	R3	0.128	10
F4	0.213	20	R4	0.175	15
F5	0.275	22	R5	0.152	13
F6	0.179	17	R6	0.181	18
F7	0.182	19	R7	0.243	21
F8	0.111	6.5	R8	0.119	8
F9	0.134	11	R9	0.104	5
F10	0.111	6.5	R10	0.127	9
F11	0.178	16	R11	0.161	14
<i>Sun</i>	R1	133.0	R2	120.0	

n1	11			
n2	11			
U1	67.0		U2	54.0
$\mu U1$	60.5		$\mu U2$	60.5
$\sigma^2 U1$	115.958		$\sigma^2 U2$	115.958
z1	0.056		z	-0.056

Ho: F e R são provenientes de populações com a mesma distribuição

H1: F e R são provenientes de populações com duas distribuições distintas

Dado que $N1$ e $N2 > 8$

Aceita-se Ho porque $-1.96 < z < 1.96$ para um nível de significância de 0,05

Verificação

U1+U2	121.0
$N1 \cdot N2$	121.0
R1+R2	253.0
$N(N+1)/2$	253.0

QuadroV.13 - Aplicação do teste de U Mann-Whintney para o parâmetros OUREmed

F			R		
Ensaio	OUREmed	Posição	Ensaio	OUREmed	Posição
F1	30.49	1	R1	50.65	10
F2	41.66	4	R2	40.75	3
F3	56.70	12	R3	52.75	11
F4	63.32	15	R4	62.66	14
F5	65.60	16	R5	70.76	18
F6	91.24	20	R6	92.88	21
F7	86.05	19	R7	106.74	22
F8	46.79	6	R8	58.28	13
F9	50.53	9	R9	69.19	17
F10	48.54	7	R10	48.79	8
F11	36.34	2	R11	44.67	5
<i>Sun</i>	R1	111.0	R2	142.0	

n1	11			
n2	11			
U1	45.0		U2	76.0
$\mu U1$	60.5		$\mu U2$	60.5
$\sigma^2 U1$	115.958		$\sigma^2 U2$	115.958
z1	-0.134		z	0.134

Ho: F e R são provenientes de populações com a mesma distribuição

H1: F e R são provenientes de populações com duas distribuições distintas

Dado que $N1$ e $N2 > 8$

Aceita-se Ho porque $-1.96 < z < 1.96$ para um nível de significância de 0,05

Verificação

U1+U2	121.0
$N1 \cdot N2$	121.0
R1+R2	253.0
$N(N+1)/2$	253.0

QuadroV.14 - Aplicação do teste de U Mann-Whintney para o parâmetros OURmed

F			R		
Ensaio	OURmed	Posição	Ensaio	OURmed	Posição
F1	57.88	11	R1	87.16	17
F2	65.64	13	R2	66.43	14
F3	57.25	10	R3	50.16	9
F4	138.06	21	R4	157.34	22
F5	86.00	16	R5	92.94	18
F6	107.64	19	R6	131.70	20
F7	58.46	12	R7	77.74	15
F8	35.58	6	R8	48.40	8
F9	31.31	5	R9	44.03	7
F10	29.16	2	R10	29.93	3
F11	22.44	1	R11	29.94	4
<i>Sun</i>	R1	116.0	R2	137.0	

n1	11			
n2	11			
U1	50.0		U2	71.0
$\mu U1$	60.5		$\mu U2$	60.5
$\sigma^2 U1$	115.958		$\sigma^2 U2$	115.958
z1	-0.091		z	0.091

Ho: F e R são provenientes de populações com a mesma distribuição

H1: F e R são provenientes de populações com duas distribuições distintas

Dado que $N1$ e $N2 > 8$

Aceita-se Ho porque $-1.96 < z < 1.96$ para um nível de significância de 0,05

Verificação

U1+U2	121.0
$N1 \cdot N2$	121.0
R1+R2	253.0
$N(N+1)/2$	253.0

QuadroV.15 - Aplicação do teste de H de Kruskal-Wallis para o parâmetros OUREnd

F			R		
Ensaio	OUREnd	Posição	Ensaio	OUREnd	Posição
F1	58.8	22	R1	12	14
F2	6.1	4	R2	7.3	8
F3	19.4	19	R3	10.5	13
F4	25.9	20	R4	15.1	17
F5	14.7	15	R5	15	16
F6	29.5	21	R6	18.7	18
F7	6.2	5	R7	8.8	11
F8	7	7	R8	5.2	3
F9	6.4	6	R9	4.1	1
F10	4.3	2	R10	8.2	9.5
F11	8.2	9.5	R11	9.4	12
<i>Sun</i>	<i>R1</i>	130.5	<i>R2</i>	122.5	

H₀: Fe R partilham a mesma distribuição

H₁: as populações tem distribuição diferente, dando origem a valores tendencialmente superiores

H 0.069

n° de graus de liberdade 1 (n° de amostras-1)

$H < \chi^2_{(1-\alpha)}$ não se rejeita a hipótese da não existência de diferença entre amostra

α 0.05

$\chi^2_{(0.95)}$ **3.84**

$(H=0.069) < (\chi^2_{(0.95)}=3.84)$ **não se rejeita a hipótese da não existência de diferença entre amostra**

Quadro V.16 - Aplicação do teste de H de Kruskal-Wallis para o parâmetros $Y_{(X/S)}$

F			R		
Ensaio	Y(X/S)	Posição	Ensaio	Y(X/S)	Posição
F1	0.407	22	R1	0.213	16
F2	0.212	15	R2	0.146	13
F3	0.095	6	R3	0.076	4
F4	0.067	3	R4	0.078	5
F5	0.031	1	R5	0.241	17
F6	0.061	2	R6	0.100	9
F7	0.097	7.5	R7	0.180	13
F8	0.351	20	R8	0.397	21
F9	0.129	10	R9	0.209	14
F10	0.258	19	R10	0.254	18
F11	0.097	7.5	R11	0.131	11
<i>Sun</i>	<i>R1</i>	113.0	<i>R2</i>	141.0	

H₀: Fe R partilham a mesma distribuição

H₁: as populações tem distribuição diferente, dando origem a valores tendencialmente superiores

H 1.392

n° de graus de liberdade 1 (n° de amostras-1)

$H < \chi^2_{(1-\alpha)}$ não se rejeita a hipótese da não existência de diferença entre amostra

α 0.05

$\chi^2_{(0.95)}$ **3.84**

$(H=1.392) < (\chi^2_{(0.95)}=3.84)$ **não se rejeita a hipótese da não existência de diferença entre amostra**

QuadroV.17- Aplicação do teste de H de Kruskal-Wallis para o parâmetros μ_{obs}

Ensaio	F		Ensaio	R	
	μ_{obs}	Posição		μ_{obs}	Posição
F1	0.028	16.0	R1	0.021	13.5
F2	0.014	7.0	R2	0.010	2.5
F3	0.013	5.0	R3	0.010	2.5
F4	0.014	7.0	R4	0.014	7
F5	0.009	1.0	R5	0.037	19
F6	0.011	4.0	R6	0.018	11.5
F7	0.018	11.5	R7	0.044	21
F8	0.039	20.0	R8	0.047	22
F9	0.017	9.5	R9	0.022	15
F10	0.029	17.0	R10	0.032	18
F11	0.017	9.5	R11	0.021	13.5
<i>Sun</i>	<i>R1</i>	107.5	<i>R2</i>	145.5	

H₀: Fe R partilham a mesma distribuição

H₁: as populações tem distribuição diferente, dando origem a valores tendencialmente superiores

H 1.557

n° de graus de liberdade 1 (n° de amostras-1)

$H < \chi^2_{(1-\alpha)}$ não se rejeita a hipótese da não existência de diferença entre amostra

α 0.05

$\chi^2_{(0.95)}$ **3.84**

$(H=1.557) < (\chi^2_{(0.95)}=3.84)$ **não se rejeita a hipótese da não existência de diferença entre amostra**

QuadroV.18 - Aplicação do teste de H de Kruskal-Wallis para o parâmetros TCEA

F			R		
Ensaio	TCEA	Posição	Ensaio	TCEA	Posição
F1	69.14	2	R1	110.53	7
F2	66.09	1	R2	69.89	3
F3	148.06	12	R3	115.59	8
F4	211.95	20	R4	173.63	15
F5	246.60	22	R5	152.26	13
F6	176.98	17	R6	178.75	18
F7	186.02	19	R7	241.05	21
F8	108.41	6	R8	118.50	9
F9	130.57	11	R9	101.93	4
F10	107.41	5	R10	126.56	10
F11	175.26	16	R11	162.56	14
<i>Sun</i>	<i>R1</i>	131.0	<i>R2</i>	122.0	

H₀: Fe R partilham a mesma distribuição

H₁: as populações tem distribuição diferente, dando origem a valores tendencialmente superiores

H 0.087

n° de graus de liberdade 1 (n° de amostras-1)

$H < \chi^2_{(1-\alpha)}$ não se rejeita a hipótese da não existência de diferença entre amostra

α 0.05

$\chi^2_{(0.95)}$ **3.84**

$(H=0.087) < (\chi^2_{(0.95)}=3.84)$ **não se rejeita a hipótese da não existência de diferença entre amostra**

QuadroV.19 - Aplicação do teste de H de Kruskal-Wallis para o parâmetros q_{obs}

F			R		
Ensaio	q_{obs}	Posição	Ensaio	q_{obs}	Posição
F1	0.069	2	R1	0.100	4
F2	0.068	1	R2	0.070	3
F3	0.140	12	R3	0.128	10.0
F4	0.213	20	R4	0.175	15
F5	0.275	22	R5	0.152	13
F6	0.179	17	R6	0.181	18
F7	0.182	19	R7	0.243	21
F8	0.111	6.5	R8	0.119	8
F9	0.134	11	R9	0.104	5
F10	0.111	6.5	R10	0.127	9
F11	0.178	16	R11	0.161	14
<i>Sun</i>	<i>R1</i>	133.0		<i>R2</i>	120.0

H₀: Fe R partilham a mesma distribuição

H₁: as populações tem distribuição diferente, dando origem a valores tendencialmente superiores

H 0.182

n° de graus de liberdade 1 (n° de amostras-1)

$H < \chi^2_{(1-\alpha)}$ não se rejeita a hipótese da não existência de diferença entre amostra

α 0.05

$\chi^2_{(0.95)}$ **3.84**

$(H=0.182) < (\chi^2_{(0.95)}=3.84)$ **não se rejeita a hipótese da não existência de diferença entre amostra**

QuadroV.20 - Aplicação do teste de H de Kruskal-Wallis para o parâmetros OUREmed

F			R		
Ensaio	OUREmed	Posição	Ensaio	OUREmed	Posição
F1	30.49	1	R1	50.65	10
F2	41.66	4	R2	40.75	3
F3	56.70	12	R3	52.75	11
F4	63.32	15	R4	62.66	14
F5	65.60	16	R5	70.76	18
F6	91.24	20	R6	92.88	21
F7	86.05	19	R7	106.74	22
F8	46.79	6	R8	58.28	13
F9	50.53	9	R9	69.19	17
F10	48.54	7	R10	48.79	8
F11	36.34	2	R11	44.67	5
<i>Sun</i>	<i>R1</i>	111.0		<i>R2</i>	142.0

H₀: Fe R partilham a mesma distribuição

H₁: as populações tem distribuição diferente, dando origem a valores tendencialmente superiores

H = 1.036

nº de graus de liberdade = 1 (nº de amostras-1)

$H < \chi^2_{(1-\alpha)}$ não se rejeita a hipótese da não existência de diferença entre amostra

$\alpha = 0.05$

$\chi^2_{(0.95)} = 3.84$

$(H=1.036) < (\chi^2_{(0.95)}=3.84)$ não se rejeita a hipótese da não existência de diferença entre amostra

QuadroV.21 - Aplicação do teste de H de Kruskal-Wallis para o parâmetros OURmed

F			R		
Ensaio	OURmed	Posição	Ensaio	OURmed	Posição
F1	57.88	11	R1	87.16	17
F2	65.64	13	R2	66.43	14
F3	57.25	10	R3	50.16	9
F4	138.06	21	R4	157.34	22
F5	86.00	16	R5	92.94	18
F6	107.64	19	R6	131.70	20
F7	58.46	12	R7	77.74	15
F8	35.58	6	R8	48.40	8
F9	31.31	5	R9	44.03	7
F10	29.16	2	R10	29.93	3
F11	22.44	1	R11	29.94	4
<i>Sun</i>	<i>R1</i>	116.0	<i>R2</i>	137.0	

H₀: Fe R partilham a mesma distribuição

H₁: as populações tem distribuição diferente, dando origem a valores tendencialmente superiores

H = 0.475

nº de graus de liberdade = 1 (nº de amostras-1)

$H < \chi^2_{(1-\alpha)}$ não se rejeita a hipótese da não existência de diferença entre amostra

$\alpha = 0.05$

$\chi^2_{(0.95)} = 3.84$

$(H=0.475) < (\chi^2_{(0.95)}=3.84)$ não se rejeita a hipótese da não existência de diferença entre amostra

QuadroV.22 - Aplicação do teste de Wilcoxon para o parâmetros OUREnd

Ensaio	F R		diferença	Abs(dif)	I	ordem	Ri	(Ri)^2
	OUREnd	OUREnd						
5	14.7	15	0.300	0.300	1	1	1	1
2	6.1	7.3	1.200	1.200	1	2.5	2.5	6.25
11	8.2	9.4	1.200	1.200	1	2.5	2.5	6.25
8	7	5.2	-1.800	1.800	-1	4	-4	16
9	6.4	4.1	-2.300	2.300	-1	5	-5	25
7	6.2	8.8	2.600	2.600	1	6	6	36
10	4.3	8.2	3.900	3.900	1	7	7	49
3	19.4	10.5	-8.900	8.900	-1	8	-8	64
4	25.9	15.1	-10.800	10.800	-1	9.5	-9.5	90.25
6	29.5	18.7	-10.800	10.800	-1	9.5	-9.5	90.25
1	58.8	12	-46.800	46.800	-1	11	-11	121

Aproximou-se à N (0,1)		S	-28
Teste bilateral		W	505.0
Ho : E(X)=E(Y)		T	-1.25
H1: E(X) E(Y)			

$z_{0,95}$ 1.96

$-z_{0,95} < T < z_{0,95}$ então aceita-se Ho

QuadroV.23 - Aplicação do teste de Wilcoxon para o parâmetros Y(X/S)

Ensaio	F R		diferença	Abs(dif)	I	ordem	Ri	(Ri)^2
	Y(X/S)	Y(X/S)						
10	0.258	0.254	-0.004	0.004	-1	1	-1	1
4	0.067	0.078	0.011	0.011	1	2	2	4
3	0.095	0.076	-0.019	0.019	-1	3	-3	9
11	0.097	0.131	0.034	0.034	1	4	4	16
6	0.061	0.100	0.039	0.039	1	5	5	25
8	0.351	0.397	0.046	0.046	1	6	6	36
2	0.212	0.146	-0.066	0.066	-1	7	-7	49
9	0.129	0.209	0.080	0.080	1	8	8	64
7	0.097	0.180	0.083	0.083	1	9	9	81
1	0.407	0.213	-0.194	0.194	-1	10	-10	100
5	0.031	0.241	0.210	0.210	1	11	11	121

Aproximou-se à N (0,1)		S	24
Teste bilateral		W	506
Ho : E(X)=E(Y)		T	1.067
H1: E(X) E(Y)			

$z_{0,95}$ 1.96

$-z_{0,95} < T < z_{0,95}$ então aceita-se Ho

QuadroV.24 - Aplicação do teste de Wilcoxon para o parâmetros μ obs

	F		R					
Ensaio	μ obs	μ obs	diferença	Abs(dif)	I	ordem	Ri	(Ri)^2
4	0.014	0.014	0.000	0	1	1		
3	0.013	0.010	-0.003	0.003	-1	2.5	-2.5	6.25
10	0.029	0.032	0.003	0.003	1	2.5	2.5	6.25
2	0.014	0.010	-0.004	0.004	-1	4.5	-4.5	20.25
11	0.017	0.021	0.004	0.004	1	4.5	4.5	20.25
9	0.017	0.022	0.005	0.005	1	6	6	36
1	0.028	0.021	-0.007	0.007	-1	7.5	-7.5	56.25
6	0.011	0.018	0.007	0.007	1	7.5	7.5	56.25
8	0.039	0.047	0.008	0.008	1	9	9	81
7	0.018	0.044	0.026	0.026	1	10	10	100
5	0.009	0.037	0.028	0.028	1	11	11	121
							S	36
Aproximou-se à N (0,1)							W	503.5
Teste bilateral							T	1.60
Ho : E(X)=E(Y)								
H1: E(X) E(Y)								
$z_{0,95}$	1.96							
$-z_{0,95} < T < z_{0,95}$ então aceita-se Ho								

QuadroV.25 - Aplicação do teste de Wilcoxon para o parâmetros TCEA

	F		R					
Ensaio	TCEA	TCEA	diferença	Abs(dif)	I	ordem	Ri	(Ri)^2
6	176.98	178.75	1.770	1.770	1	1	1	1
2	66.09	69.89	3.800	3.800	1	2	2	4
8	108.41	118.50	10.090	10.090	1	3	3	9
11	175.26	162.56	-12.700	12.700	-1	4	-4	16
10	107.41	126.56	19.150	19.150	1	5	5	25
9	130.57	101.93	-28.640	28.640	-1	6	-6	36
3	148.06	115.59	-32.470	32.470	-1	7	-7	49
4	211.95	173.63	-38.320	38.320	-1	8	-8	64
1	69.14	110.53	41.390	41.390	1	9	9	81
7	186.02	241.05	55.030	55.030	1	10	10	100
5	246.60	152.26	-94.340	94.340	-1	11	-11	121
							S	-6
Aproximou-se à N (0,1)							W	506.0
Teste bilateral							T	-0.27
Ho : E(X)=E(Y)								
H1: E(X) E(Y)								
$z_{0,95}$	1.96							
$-z_{0,95} < T < z_{0,95}$ então aceita-se Ho								

QuadroV.26 - Aplicação do teste de Wilcoxon para o parâmetros q_{obs}

	F		R					
Ensaio	qobs	q obs	diferença	Abs(dif)	I	ordem	Ri	(Ri)^2
2	0.068	0.070	0.002	0.002	1	1.5	1.5	2.25
6	0.179	0.181	0.002	0.002	1	1.5	1.5	2.25
8	0.111	0.119	0.008	0.008	1	3	3	9
3	0.140	0.128	-0.012	0.012	-1	4	-4	16
10	0.111	0.127	0.016	0.016	1	5	5	25
11	0.178	0.161	-0.017	0.017	-1	6	-6	36
9	0.134	0.104	-0.030	0.030	-1	7	-7	49
1	0.069	0.100	0.031	0.031	1	8	8	64
4	0.213	0.175	-0.038	0.038	-1	9	-9	81
7	0.182	0.243	0.061	0.061	1	10	10	100
5	0.275	0.152	-0.123	0.123	-1	11	-11	121
							S	-8
Aproximou-se à N (0,1)							W	505.5
Teste bilateral							T	-0.36
Ho : E(X)=E(Y)								
H1: E(X) E(Y)								
$z_{0,95}$	1.96							
$-z_{0,95} < T < z_{0,95}$ então aceita-se Ho								

QuadroV.27 - Aplicação do teste de Wilcoxon para o parâmetros OUREmed

	F		R					
Ensaio	OUREmed	OUREmed	diferença	Abs(dif)	I	ordem	Ri	(Ri)^2
10	48.54	48.79	0.250	0.250	1	1	1	1
4	63.32	62.66	-0.660	0.660	-1	2	-2	4
2	41.66	40.75	-0.910	0.910	-1	3	-3	9
6	91.24	92.88	1.640	1.640	1	4	4	16
3	56.70	52.75	-3.950	3.950	-1	5	-5	25
5	65.60	70.76	5.160	5.160	1	6	6	36
11	36.34	44.67	8.330	8.330	1	7	7	49
8	46.79	58.28	11.490	11.490	1	8	8	64
9	50.53	69.19	18.660	18.660	1	9	9	81
1	30.49	50.65	20.160	20.160	1	10	10	100
7	86.05	106.74	20.690	20.690	1	11	11	121
							S	46
Aproximou-se à N (0,1)							W	506.0
Teste bilateral							T	2.04
Ho : E(X)=E(Y)								
H1: E(X) E(Y)								
$z_{0,95}$	1.96							
$T > z_{0,95}$ então não se aceita Ho								

QuadroV.28 - Aplicação do teste de Wilcoxon para o parâmetros OURmed

Ensaio	F		R		I	ordem	Ri	(Ri)^2
	OURmed	OURmed	diferença	Abs(dif)				
10	29.16	29.93	0.770	0.770	1	1	1	1
2	65.64	66.43	0.790	0.790	1	2	2	4
5	86.00	92.94	6.940	6.940	1	3	3	9
3	57.25	50.16	-7.090	7.090	-1	4	-4	16
11	22.44	29.94	7.500	7.500	1	5	5	25
9	31.31	44.03	12.720	12.720	1	6	6	36
8	35.58	48.40	12.820	12.820	1	7	7	49
7	58.46	77.74	19.280	19.280	1	8.5	8.5	72.25
4	138.06	157.34	19.280	19.280	1	8.5	8.5	72.25
6	107.64	131.70	24.060	24.060	1	10	10	100
1	57.88	87.16	29.280	29.280	1	11	11	121
							S	58
Aproximou-se à N (0,1)							W	505.5
Teste bilateral							T	2.58
Ho : E(X)=E(Y)								
H1: E(X) E(Y)								
z _{0,95}								
1.96								
T > z _{0,95} então não se aceita Ho								

QuadroV.29 - Aplicação do teste de Homogeneidade para o parâmetros OURend

Ensaio	F	R	total	F	R	total estimado	F	R	
	OURend	OURend		F	R				
2	58.800	12.000	70.800	43.897	26.903	70.800	5.060	8.256	
3	6.100	7.300	13.400	8.308	5.092	13.400	0.587	0.958	
5	19.400	10.500	29.900	18.538	11.362	29.900	0.040	0.065	
12	25.900	15.100	41.000	25.421	15.579	41.000	0.009	0.015	
13	14.700	15.000	29.700	18.414	11.286	29.700	0.749	1.223	
15	29.500	18.700	48.200	29.885	18.315	48.200	0.005	0.008	
16	6.200	8.800	15.000	9.300	5.700	15.000	1.033	1.686	
17	7.000	5.200	12.200	7.564	4.636	12.200	0.042	0.069	
18	6.400	4.100	10.500	6.510	3.990	10.500	0.002	0.003	
19	4.300	8.200	12.500	7.750	4.750	12.500	1.536	2.506	
20	8.200	9.400	17.600	10.912	6.688	17.600	0.674	1.100	
total	186.500	114.300	300.800				9.737	15.888	25.625
Estimador	0.620	0.380	1.000						
nº de graus de liberdade		10							$\chi^2_{(\alpha=0.05,10)}=18.3$

QuadroV.30 - Aplicação do teste de Homogeneidade para o parâmetros $Y_{(X/S)}$

Ensaio	F	R	total	F	R	total estimado	F	R	
	$Y_{(X/S)}$	$Y_{(X/S)}$		F	R				
1	0.407	0.213	0.620	0.292	0.328	0.620	0.045	0.040	
2	0.212	0.146	0.358	0.169	0.189	0.358	0.011	0.010	
3	0.095	0.076	0.171	0.081	0.090	0.171	0.003	0.002	
4	0.067	0.078	0.145	0.068	0.077	0.145	0.000	0.000	
5	0.031	0.241	0.272	0.128	0.144	0.272	0.074	0.066	
6	0.061	0.100	0.161	0.076	0.085	0.161	0.003	0.003	
7	0.097	0.180	0.277	0.131	0.146	0.277	0.009	0.008	
8	0.351	0.397	0.748	0.352	0.396	0.748	0.000	0.000	
9	0.129	0.209	0.338	0.159	0.179	0.338	0.006	0.005	
10	0.258	0.254	0.512	0.241	0.271	0.512	0.001	0.001	
11	0.097	0.131	0.228	0.107	0.121	0.228	0.001	0.001	
total	1.805	2.025	3.830				0.152	0.135	0.287
Estimador	0.471	0.529	1.000						
nº de graus de liberdade		10							$\chi^2_{(\alpha=0.05,10)}=18.3$

QuadroV.31 - Aplicação do teste de Homogeneidade para o parâmetros μ_{obs}

Ensaio	F	R	total	F	R	total estimado	F	R	
	μ_{obs}	μ_{obs}		F	R				
1	0.028	0.021	0.049	0.021	0.028	0.049	0.002	0.002	
2	0.014	0.010	0.024	0.010	0.014	0.024	0.001	0.001	
3	0.013	0.010	0.023	0.010	0.013	0.023	0.001	0.001	
4	0.014	0.014	0.028	0.012	0.016	0.028	0.000	0.000	
5	0.009	0.037	0.046	0.020	0.026	0.046	0.006	0.004	
6	0.011	0.018	0.029	0.012	0.017	0.029	0.000	0.000	
7	0.018	0.044	0.062	0.027	0.035	0.062	0.003	0.002	
8	0.039	0.047	0.086	0.037	0.049	0.086	0.000	0.000	
9	0.017	0.022	0.039	0.017	0.022	0.039	0.000	0.000	
10	0.029	0.032	0.061	0.026	0.035	0.061	0.000	0.000	
11	0.017	0.021	0.038	0.016	0.022	0.038	0.000	0.000	
total	0.209	0.276	0.485				0.014	0.011	0.025
Estimador	0.431	0.569	1.000	estimador da máxima verosimilhança					
nº de graus de liberdade		10							$\chi^2_{(\alpha=0.05,10)}=18.3$

QuadroV.32 - Aplicação do teste de Homogeneidade para o parâmetros TCEA (mg/g.h)

	F	R		F	R		F	R
Ensaio	TCEA (mg/gh)	TCEA (mg/gh)	total			total estimado		
1	69.140	110.530	179.670	91.962	87.708	179.670	5.664	5.938
2	66.090	69.890	135.980	69.600	66.380	135.980	0.177	0.186
3	148.060	115.590	263.650	134.946	128.704	263.650	1.274	1.336
4	211.950	173.630	385.580	197.355	188.225	385.580	1.079	1.132
5	246.600	152.260	398.860	204.152	194.708	398.860	8.826	9.254
6	176.980	178.750	355.730	182.076	173.654	355.730	0.143	0.150
7	186.020	241.050	427.070	218.591	208.479	427.070	4.853	5.089
8	108.410	118.500	226.910	116.141	110.769	226.910	0.515	0.540
9	130.570	101.930	232.500	119.002	113.498	232.500	1.124	1.179
10	107.410	126.560	233.970	119.755	114.215	233.970	1.273	1.334
11	175.260	162.560	337.820	172.909	164.911	337.820	0.032	0.034
total	1626.490	1551.250	3177.740				24.960	26.170
Estimador	0.512	0.488	1.000					
nº de graus de liberdade		10						

$\chi^2_{(\alpha=0.05,10)}=18.3$

QuadroV.33 - Aplicação do teste de Homogeneidade para o parâmetros TCEA (mg/mg.h)

	F	R		F	R		F	R
Ensaio	TCEA (mg/mgh)	TCEA (mg/mgh)	total	estimado	estimado	total estimado		
1	0.069	0.111	0.180	0.092	0.088	0.180	0.006	0.006
2	0.066	0.070	0.136	0.070	0.066	0.136	0.000	0.000
3	0.148	0.116	0.264	0.135	0.129	0.264	0.001	0.001
4	0.212	0.174	0.386	0.197	0.188	0.386	0.001	0.001
5	0.247	0.152	0.399	0.204	0.195	0.399	0.009	0.009
6	0.177	0.179	0.356	0.182	0.174	0.356	0.000	0.000
7	0.186	0.241	0.427	0.219	0.208	0.427	0.005	0.005
8	0.108	0.119	0.227	0.116	0.111	0.227	0.001	0.001
9	0.131	0.102	0.233	0.119	0.113	0.233	0.001	0.001
10	0.107	0.127	0.234	0.120	0.114	0.234	0.001	0.001
11	0.175	0.163	0.338	0.173	0.165	0.338	0.000	0.000
total	1.626	1.551	3.178				0.025	0.026
Estimador	0.512	0.488	1.000					
nº de graus de liberdade		10						

$\chi^2_{(\alpha=0.05,10)}=18.3$

QuadroV.34 - Aplicação do teste de Homogeneidade para o parâmetros q_{obs}

	F	R		F	R		F	R
Ensaio	qobs	qobs	total			total estimado		
1	0.069	0.100	0.169	0.087	0.082	0.169	0.004	0.004
2	0.068	0.070	0.138	0.071	0.067	0.138	0.000	0.000
3	0.140	0.128	0.268	0.138	0.130	0.268	0.000	0.000
4	0.213	0.175	0.388	0.200	0.188	0.388	0.001	0.001
5	0.275	0.152	0.427	0.220	0.207	0.427	0.014	0.015
6	0.179	0.181	0.360	0.186	0.174	0.360	0.000	0.000
7	0.182	0.243	0.425	0.219	0.206	0.425	0.006	0.007
8	0.111	0.119	0.230	0.119	0.111	0.230	0.000	0.001
9	0.134	0.104	0.238	0.123	0.115	0.238	0.001	0.001
10	0.111	0.127	0.238	0.123	0.115	0.238	0.001	0.001
11	0.178	0.161	0.339	0.175	0.164	0.339	0.000	0.000
total	1.660	1.560	3.220				0.028	0.029
Estimador	0.516	0.484	1.000					
nº de graus de liberdade		10.000						

$\chi^2_{(\alpha=0.05,10)}=18.3$

QuadroV.35 - Aplicação do teste de Homogeneidade para o parâmetros OUREmed

	F	R		F	R		F	R
Ensaio	OUREmed	OUREmed	total			total estimado		
1	30.490	50.650	81.140	38.076	43.064	81.140	1.511	1.336
2	41.660	40.750	82.410	38.672	43.738	82.410	0.231	0.204
3	56.700	52.750	109.450	51.361	58.089	109.450	0.555	0.491
4	63.320	62.660	125.980	59.118	66.862	125.980	0.299	0.264
5	65.600	70.760	136.360	63.989	72.371	136.360	0.041	0.036
6	91.240	92.880	184.120	86.401	97.719	184.120	0.271	0.240
7	86.050	106.740	192.790	90.469	102.321	192.790	0.216	0.191
8	46.790	58.280	105.070	49.306	55.764	105.070	0.128	0.113
9	50.530	69.190	119.720	56.180	63.540	119.720	0.568	0.502
10	48.540	48.790	97.330	45.673	51.657	97.330	0.180	0.159
11	36.340	44.670	81.010	38.015	42.995	81.010	0.074	0.065
total	617.260	698.120	1315.380				4.074	3.602
Estimador	0.469	0.531	1.000					
nº de graus de liberdade		10						$\chi^2_{(\alpha=0.05,10)}=18.3$

QuadroV.36 - Aplicação do teste de Homogeneidade para o parâmetros OURmed

	F	R		F	R		F	R
Ensaio	OURmed	OURmed	total			total estimado		
1	57.880	87.160	145.040	66.432	78.608	145.040	1.101	0.931
2	65.640	66.430	132.070	60.492	71.578	132.070	0.438	0.370
3	57.250	50.160	107.410	49.197	58.213	107.410	1.318	1.114
4	138.060	157.340	295.400	135.302	160.098	295.400	0.056	0.048
5	86.000	92.940	178.940	81.960	96.980	178.940	0.199	0.168
6	107.640	131.700	239.340	109.625	129.715	239.340	0.036	0.030
7	58.460	77.740	136.200	62.383	73.817	136.200	0.247	0.209
8	35.580	48.400	83.980	38.465	45.515	83.980	0.216	0.183
9	31.310	44.030	75.340	34.508	40.832	75.340	0.296	0.250
10	29.160	29.930	59.090	27.065	32.025	59.090	0.162	0.137
11	22.440	29.940	52.380	23.992	28.388	52.380	0.100	0.085
total	689.420	815.770	1505.190				4.171	3.525
Estimador	0.458	0.542	1.000					
nº de graus de liberdade		10						$\chi^2_{(\alpha=0.05,10)}=18.3$

QuadroV.37- Aplicação do teste Kolmogorov Smirnov para o parâmetros OUREnd

OUREnd	F	R	F	R	diferenças
4.1	0	1	0	1/11	1/11
4.3	1	1	1/11	1/11	0
5.2	1	2	1/11	2/11	1/11
6.1	2	2	2/11	2/11	0
6.2	3	2	3/11	2/11	1/11
6.4	4	2	4/11	2/11	2/11
7.0	5	2	5/11	2/11	3/11
7.3	5	3	5/11	3/11	2/11
8.2	6	4	6/11	4/11	2/11
8.8	6	5	6/11	5/11	1/11
9.4	6	6	6/11	6/11	0
10.5	6	7	6/11	7/11	1/11
12.0	6	8	6/11	8/11	2/11
14.7	7	8	7/11	8/11	1/11
15.0	7	9	7/11	9/11	2/11
15.1	7	10	7/11	10/11	3/11
18.7	7	11	7/11	1	4/11
19.4	8	11	8/11	1	3/11
25.9	9	11	9/11	1	2/11
29.5	10	11	10/11	1	1/11
58.8	11	11	1	1	0
D=					4/11

Ho: F e R são provenientes de populações com a mesma distribuição

H1: F e R são provenientes de populações com distribuições diferentes

$K_D (N=11; \alpha=0,05) = 7$

$1.36 + ((n1+n2)/n1.n2)^{(1/2)} = 0.58 \Rightarrow K_D = 6.38$

D.N < K_D então aceita-se Ho -aceita-se que F e R são provenientes de populações com a mesma distribuição

Quadro V.38 - Aplicação do teste Kolmogorov Smirnov para o parâmetros $Y_{(X/S)}$

Y(X/S)	F	R	F	R	diferença
0.031	1	0	1/11	0	1/11
0.061	2	0	2/11	0	2/11
0.067	3	0	3/11	0	3/11
0.076	3	1	3/11	1/11	2/11
0.078	3	2	3/11	2/11	1/11
0.095	4	2	4/11	2/11	2/11
0.097	6	2	6/11	2/11	4/11
0.100	6	3	6/11	3/11	3/11
0.129	7	3	7/11	3/11	4/11
0.131	7	4	7/11	4/11	3/11
0.146	7	5	7/11	5/11	2/11
0.180	7	6	7/11	6/11	1/11
0.209	7	7	7/11	7/11	0
0.212	8	7	8/11	7/11	1/11
0.213	8	8	8/11	8/11	0
0.241	8	9	8/11	9/11	1/11
0.254	8	10	8/11	10/11	2/11
0.258	9	10	9/11	10/11	1/11
0.351	10	10	10/11	10/11	0
0.397	10	11	10/11	1	1/11
0.407	11	11	1	1	0
D=					4/11

H₀: F e R são provenientes de populações com a mesma distribuição

H₁: F e R são provenientes de populações com distribuições diferentes

K_D (N=11; α=0,05) = 7

$1.36 + ((n_1 + n_2) / n_1 \cdot n_2)^{1/2} = 0.58 \Rightarrow K_D = 6.38$

D.N < K_D então aceita-se H₀ - aceita-se que F e R são provenientes de populações com a mesma distribuição

QuadroV.39 - Aplicação do teste Kolmogorov Smirnov para o parâmetros μ_{obs}

μ_{obs}	F	R	F	R	diferença
0.009	1	0	1/11	0	1/11
0.010	1	2	1/11	2/11	1/11
0.011	2	2	2/11	2/11	0
0.013	3	2	3/11	2/11	1/11
0.014	5	3	5/11	3/11	2/11
0.017	7	3	7/11	3/11	4/11
0.018	8	4	8/11	4/11	4/11
0.021	8	6	8/11	6/11	2/11
0.022	8	7	8/11	7/11	1/11
0.028	9	7	9/11	7/11	2/11
0.029	10	7	10/11	7/11	3/11
0.032	10	8	10/11	8/11	2/11
0.037	10	9	10/11	9/11	1/11
0.039	11	9	1	9/11	2/11
0.044	11	10	1	10/11	1/11
0.047	11	11	1	1	0
D=					4/11

H₀: F e R são provenientes de populações com a mesma distribuição

H₁: F e R são provenientes de populações com distribuições diferentes

K_D (N=11; $\alpha=0,05$) = 7

$1.36 + ((n1+n2)/n1.n2)^{(1/2)} = 0.58 \Rightarrow K_D = 6.38$

D.N < K_D então aceita-se H₀ -aceita-se que F e R são provenientes de populações com a mesma distribuição

QuadroV.40 - Aplicação do teste Kolmogorov Smirnov para o parâmetros TCEA

TCEA	F	R	F	R	diferenças
66.09	1	0	1/11	0	1/11
69.14	2	0	2/11	0	2/11
69.89	2	1	2/11	1/11	1/11
101.93	2	2	2/11	2/11	0
107.41	3	2	3/11	2/11	1/11
108.41	4	2	4/11	2/11	2/11
110.53	4	3	4/11	3/11	1/11
115.59	4	4	4/11	4/11	0
118.50	4	5	4/11	5/11	1/11
126.56	4	6	4/11	6/11	2/11
130.57	5	6	5/11	6/11	1/11
148.06	6	6	6/11	6/11	0
152.26	6	7	6/11	7/11	1/11
162.56	6	8	6/11	8/11	2/11
173.63	6	9	6/11	9/11	3/11
175.26	7	9	7/11	9/11	2/11
176.98	8	9	8/11	9/11	1/11
178.75	8	10	8/11	10/11	2/11
186.02	9	10	9/11	10/11	1/11
211.95	10	10	10/11	10/11	0
241.05	10	11	10/11	1	1/11
246.60	11	11	1	1	0
D=					3/11

Ho: F e R são provenientes de populações com a mesma distribuição

H1: F e R são provenientes de populações com distribuições diferentes

$$K_D (N=11; \alpha=0,05) = 7$$

$$1.36 + ((n1+n2)/n1.n2)^{(1/2)} = 0.58 \Rightarrow K_D = 6.38$$

D.N < K_D então aceita-se Ho -aceita-se que F e R são provenientes de populações com a mesma distribuição

Quadro V.41 - Aplicação do teste Kolmogorov Smirnov para o parâmetros q_{obs}

q	F	R	F	R	diferença
0.068	1	0	1/11	0	1/11
0.069	2	0	2/11	0	2/11
0.070	2	1	2/11	1/11	1/11
0.100	2	2	2/11	2/11	0
0.104	2	3	2/11	3/11	1/11
0.111	4	3	4/11	3/11	1/11
0.119	4	4	4/11	4/11	0
0.127	4.0	5	4/11	5/11	1/11
0.128	4.0	6	4/11	6/11	2/11
0.134	5	6	5/11	6/11	1/11
0.140	6	6	6/11	6/11	0
0.152	6	7	6/11	7/11	1/11
0.161	6	8	6/11	8/11	2/11
0.175	6	9	6/11	9/11	3/11
0.178	7	9	7/11	9/11	2/11
0.179	8	9	8/11	9/11	1/11
0.181	8	10	8/11	10/11	2/11
0.182	9	10	9/11	10/11	1/11
0.213	10	10	10/11	10/11	0
0.243	10	11	10/11	1	1/11
0.275	11	11	1	1	0
D=					3/11

H₀: F e R são provenientes de populações com a mesma distribuição

H₁: F e R são provenientes de populações com distribuições diferentes

K_D (N=11;α=0,05) = 7

1.36+((n1+n2)/n1.n2)^(1/2)=0.58 => K_D =6.38

D.N < K_D então aceita-se H₀ -aceita-se que F e R são provenientes de populações com a mesma distribuição

Quadro V.42 - Aplicação do teste Kolmogorov Smirnov para o parâmetros OUREmed

OUREmed	F	R	F	R	diferenças
30.49	1	0	1/11	0	1/11
36.34	2	0	2/11	0	2/11
40.75	2	1	2/11	1/11	1/11
41.66	3	1	3/11	1/11	2/11
44.67	3	2	3/11	2/11	1/11
46.79	4	2	4/11	2/11	2/11
48.54	5	2	5/11	2/11	3/11
48.79	5	3	5/11	3/11	2/11
50.53	6	3	6/11	3/11	3/11
50.65	6	4	6/11	4/11	2/11
52.75	6	5	6/11	5/11	1/11
56.70	7	5	7/11	5/11	2/11
58.28	7	6	7/11	6/11	1/11
62.66	7	7	7/11	7/11	0
63.32	8	7	8/11	7/11	1/11
65.60	9	7	9/11	7/11	2/11
69.19	9	8	9/11	8/11	1/11
70.76	9	9	9/11	9/11	0
86.05	10	9	10/11	9/11	1/11
91.24	11	9	1	9/11	2/11
92.88	11	10	1	10/11	1/11
106.74	11	11	1	1	0
D=					3/11

H₀: F e R são provenientes de populações com a mesma distribuição

H₁: F e R são provenientes de populações com distribuições diferentes

K_D (N=11; α=0,05) = 7

1.36+((n1+n2)/n1.n2)^(1/2)=0.58 => K_D =6.38

D.N < K_D então aceita-se H₀ -aceita-se que F e R são provenientes de populações com a mesma distribuição

Quadro V.43 - Aplicação do teste Kolmogorov Smirnov para o parâmetros OURmed

OURmed	F	R	F	R	diferença
22.44	1	0	1/11	0	1/11
29.16	2	0	2/11	0	2/11
29.93	2	1	2/11	1/11	1/11
29.94	2	2	2/11	2/11	0
31.31	3	2	3/11	2/11	1/11
35.58	4	2	4/11	2/11	2/11
44.03	4	3	4/11	3/11	1/11
48.40	4	4	4/11	4/11	0
50.16	4	5	4/11	5/11	1/11
57.25	5	5	5/11	5/11	0
57.88	6	5	6/11	5/11	1/11
58.46	7	5	7/11	5/11	2/11
65.64	8	5	8/11	5/11	3/11
66.43	8	6	8/11	6/11	2/11
77.74	8	7	8/11	7/11	1/11
86.00	9	7	9/11	7/11	2/11
87.16	9	8	9/11	8/11	1/11
92.94	9	9	9/11	9/11	0
107.64	10	9	10/11	9/11	1/11
131.70	10	10	10/11	10/11	0
138.06	11	10	1	10/11	1/11
157.34	11	11	1	1	0
D=					3/11

H₀: F e R são provenientes de populações com a mesma distribuição

H₁: F e R são provenientes de populações com distribuições diferentes

K_D (N=11; α=0,05) = 7

$1.36 + ((n1+n2)/n1.n2)^{(1/2)} = 0.58 \Rightarrow K_D = 6.38$

D.N < K_D então aceita-se H₀ -aceita-se que F e R são provenientes de populações com a mesma distribuição